

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET EN BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
MYLÈNE CLAUDE GAGNON

PRODUCTION ET OPTIMISATION D'UNE PECTINASE
EN VUE DE SON UTILISATION DANS LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER

MARS 2009

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

AVANT-PROPOS

Le travail de recherche qui fait l'objet de cette thèse a été effectué dans un contexte bien particulier et je profite de cette page pour en discuter.

En janvier 2003, AgroTerra Biotech, une entreprise de biotechnologies en démarrage fondée par les Drs Marc Beauregard et Marc Sirois tous deux professeurs au département de Chimie-Biologie à l'Université du Québec à Trois-Rivières, cherchait à élargir ses champs d'activité. En effet, l'entreprise souhaitait débiter des travaux de recherche afin de se positionner sur le marché des enzymes fonctionnelles pour l'industrie des pâtes et papiers. Les deux instigateurs de la compagnie, sachant que je souhaitais poursuivre des études doctorales m'ont alors demandé si un tel projet m'intéressait. Après avoir analysé les différentes possibilités concernant les enzymes qui pourraient être utiles au secteur papetier, j'ai choisi de travailler sur la polygalacturonase, une enzyme pouvant être utilisée dans l'étape de rétention des fibres lors de la fabrication du papier.

Je savais, en décidant de m'impliquer dans ce projet, que mon doctorat ne serait pas du tout conventionnel. En effet, la recherche effectuée dans un contexte industriel, contrairement à la recherche effectuée en milieu académique, est soumise à des exigences capitalistes. Le déroulement des travaux de recherche est ainsi dirigé par des facteurs tels que la rentabilité et les échéances pour fins de financement (« milestones ») plutôt que par la quête ultime du savoir. Dans ces circonstances, il est souvent difficile, d'un point de vue purement scientifique, de peaufiner une découverte dans le but d'en publier les résultats. En effet, dans un contexte de développement commercial; le temps, c'est de l'argent. C'est pourquoi le chercheur en milieu industriel n'a pas toujours le loisir de s'attarder sur les détails fondamentaux qui lui vaudraient des publications scientifiques. De plus, pour que les découvertes ou les produits obtenus aient une valeur commerciale, les avancées scientifiques doivent rester secrètes. Éventuellement, par contre, ces dernières peuvent faire l'objet d'un brevet, mais la plupart du temps elles font parties de ce qu'on appelle le secret industriel.

La recherche en milieu industriel, n'a pas que des contraintes; elle offre aussi plusieurs avantages dont le fait de pouvoir évoluer dans un environnement dynamique. Par exemple, lorsque nécessaire, tous les moyens possibles sont pris afin d'accélérer les étapes d'un projet. Ainsi, au cours de mes études doctorales j'ai eu à plusieurs reprises l'aide momentanée de techniciens et de stagiaires. De plus, j'ai eu l'opportunité, lorsque je le jugeais bon, d'avoir recours à certains produits technologiques qui malgré leur coût rendaient mon travail plus efficace. Ainsi, en choisissant de faire mon doctorat dans ce contexte industriel, j'ai pu renforcer mes compétences en management et en gestion de projets.

Mon projet étant complexe, il pouvait être subdivisé en d'autres projets de différents niveaux. C'est ainsi que j'ai eu l'occasion d'élaborer, entre autres, le plan de recherche de Vicky Houle, une étudiante à la maîtrise, et de guider ses travaux qui consistaient à « détermin[er] l'impact de la glycosylation sur l'activité et la stabilité de l'endopolygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* par mutagenèse dirigée ».¹ Les résultats de ses travaux ont mené à la rédaction d'un article qui a récemment été publiés dans « The Open Biotechnology Journal » (2008) et dont je suis co-auteure.²

Pour tout ce qu'ils m'ont permis d'apprendre, je désire remercier chaleureusement la Compagnie AgroTerra Biotech et ses deux fondateurs. Un merci spécial au professeur Marc Sirois, Ph.D. qui a si gentiment accepté la direction de ma thèse et à Monsieur Maurice Boissinot, Ph.D. qui en a accepté la co-direction. Je ne serai jamais assez reconnaissante pour vous exprimer la gratitude que je vous porte pour le temps que vous m'avez consacré.

Puisque j'en suis rendue aux remerciements, je tiens à remercier mon conjoint sans qui ce projet n'aurait jamais eu lieu, ma famille et mes amies Caroline J., Judith C. et Vicky B. pour le soutien qu'ils m'ont apporté à travers cette aventure. Je tiens aussi à remercier mes collègues de travail Étienne Dubé, Vicky Houle, Fatma Meddeb, Ph.D. et

¹ Titre du mémoire de Vichy Houle, 2007

² Houle, V., Gagnon, M.C., Dubé, E., Hurtubise, Y. et Beauregard, M. (2008) "Impact of glycosylation on *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase PGU1 activity and stability." Open J. Biotech. 2 (1) : 36-42.

Yves Hurtubise, Ph.D. pour leur camaraderie. Un gros merci, aussi, à tous les stagiaires et techniciens qui m'ont aidé à mener à bien ce projet : Philippe Champagne, Amélie Dotta, Maxime Bergeron, Dominique Bastien, Judith Cossette, David Charbonneau, Ognjen Sekulovic, Valérie Ouellet et Cindy Lavallée.

Enfin, je remercie la Kruger Inc. qui m'a généreusement fourni la pâte sur laquelle j'ai pu effectuer mes traitements enzymatiques et son directeur R&D, Daniel Montplaisir Ph.D., pour le partage de son expérience. Je remercie aussi le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada pour son soutien financier sous forme de bourse d'études supérieures à incidence industrielle. Je remercie encore une fois la compagnie AgroTerra Biotech et son président Marc Beauregard, Ph.D. qui a pu m'assurer un salaire quand j'en avais besoin et ce malgré la conjoncture économique négative qui frappe depuis quelques années déjà l'industrie des biotechnologies.

RÉSUMÉ

L'utilisation des enzymes dans les procédés industriels est très avantageuse, et ce, tant sur le plan économique par la réduction des coûts d'énergie et des matières premières, que sur le plan environnemental par la diminution des déchets toxiques. Dans le domaine des pâtes et papiers, des enzymes telles les xylanases, les ligninases et les laccases ont déjà prouvé leur utilité pour le blanchiment et le traitement de la pâte kraft ainsi que pour le contrôle de la poix et pour le traitement des effluents. La polygalacturonase pourrait elle aussi conférer des avantages économiques et environnementaux considérables aux papetières pour la fabrication du papier à partir de pâte thermomécanique blanchie au peroxyde. Cependant, les polygalacturonases actuellement retrouvées sur le marché ne sont pas efficaces dans les conditions extrêmes du procédé de fabrication du papier. La production d'une polygalacturonase ayant la capacité de fonctionner dans ces conditions particulières était donc d'un grand intérêt pour cette industrie.

Au cours de ce projet de doctorat, des polygalacturonases fonctionnelles dans les conditions retrouvées dans le procédé de fabrication du papier ont été produites. En effet, les polygalacturonases de *Kluyveromyces marxianus* et de *Saccharomyces cerevisiae*, exprimées de façon hétérologue dans *Saccharomyces cerevisiae*, ont démontré une activité à des pH allant de 4,5 à 6,0 et des température allant de 47°C à 60°C, soit les conditions propres au procédé papetier. Pour mesurer l'activité et la stabilité de ces polygalacturonases, le test de quantification des sucres réducteurs au PAHBAH a été utilisé. C'est la première fois que ce test est employé pour caractériser l'activité d'une polygalacturonase. Afin d'accélérer la caractérisation des polygalacturonases, ce test a aussi été automatisé sur un robot Biomek 2000 de Beckman-Coulter. Même si les deux enzymes ont des propriétés similaires, la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* s'est avérée la plus efficace lorsque l'activité, la durée de vie dans les conditions étudiées ainsi que le rendement de production de ces deux polygalacturonases étaient considérés.

Pour ce qui est de leur effet sur la pâte, les deux polygalacturonases ont démontré une spécificité d'action sur la pâte thermomécanique blanchie au peroxyde, tel qu'attendu. En effet, jusqu'à 35% de diminution de demande cationique de la pâte a été observé. La polygalacturonase a aussi démontré un impact considérable sur l'eau blanche des machines où cette même pâte était employée ce qui confère une utilisation additionnelle de cette enzyme dans le traitement des eaux blanches. Pour accélérer et faciliter les essais sur la pâte ainsi que pour s'assurer de leur reproductibilité, le traitement de la pâte a été automatisé. Tout comme l'utilisation du test de quantification des sucres réducteurs au PAHBAH pour la caractérisation de la polygalacturonase, l'automatisation du traitement de la pâte est une nouveauté dans le domaine. La mise au point du traitement automatisé a entre autres permis la caractérisation de l'activité de la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* dans la pâte. C'est ainsi qu'il a été observé que la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* se comporte dans la pâte de la même manière que dans le tampon pour ce qui est de sa préférence pour les pHs acides, mais qu'elle est plus sensible à la chaleur dans la pâte, l'activité chutant de 60% après 54°C, ce qui n'est pas le cas dans le tampon. De plus, la caractérisation de l'activité de la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* dans la pâte a permis de constater que la composition complexe de cette dernière a un effet important sur la stabilité de la polygalacturonase. En effet, la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* a une durée de vie de moins de 2½ minutes dans la pâte ce qui est 5 fois moins que dans le tampon.

Dans le but de rechercher la construction génétique donnant le meilleur rendement et la meilleure activité de polygalacturonase, 24 constructions génétiques et 45 mutants ont été préparés. Les constructions génétiques ont été obtenues à partir de combinaisons d'un des trois gènes des polygalacturonases de *Kluyveromyces marxianus*, de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Stereum purpureum* avec un vecteur parmi pBAD pour l'expression dans *Escherichia coli*, pYES-2ct pour l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae* et pGAP pour l'expression dans *Pichia pastoris* et une séquence signal parmi celle de la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae*, celle de la polygalacturonase de *Kluyveromyces marxianus*, le facteur Z α et le signal gIII de la protéine PIII dans le cas du vecteur pBAD. Pour ce qui est des mutants, ils ont été

obtenus à partir des mutations Q150M, K282D, K326T, K326Y, V329C / A334C et C353K / C362YL (numérotation basée sur la PG II d'*Aspergillus niger*), des mutations annulant les sites putatifs de glycosylation ainsi que des combinaisons de ces mutations sur les gènes des polygalacturonases de *Kluyveromyces marxianus* et de *Saccharomyces cerevisiae* lesquelles ont été exprimées dans *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide du vecteur pYES-2ct et de leur propre séquence signal. Pour la majorité de ces constructions, la présence des enzymes recombinantes dans le surnageant et leur activité a été vérifiée. Dans tous les cas, à l'exception des clones comportant les constructions dans le vecteur pBAD, des polygalacturonases actives ont été détectées. Bien que les différentes priorités imposées par la compagnie AgroTerra Biotech (notre partenaire industriel) n'ont pas permis de caractériser tous les mutants en profondeur, l'activité dans la pâte de sept des mutants de la polygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae*, soit les mutants Sc Q149M, Sc S282D, Sc K325T, Sc N318D, Sc N318Q, Sc N330D et Sc N330Q, ont pu être comparés à la polygalacturonase sauvage. Les mutants Sc S282D et Sc N318D sont ressortis de cette étude comme étant les plus performants dans la pâte. En effet, leurs plages d'activité sont plus étendues que la PG sauvage de *Sc* allant jusqu'à 4°C et 0,2 unité de pH de plus. Aussi, dans certaines conditions leur activité est plus importante. La mutation K325T est quant à elle celle qui s'est avérée la plus néfaste sur l'activité de la PG de *Sc* dans la pâte. Les raisons probables expliquant l'impact de ces mutations seront présentées à la fin du présent travail.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
RÉSUMÉ	v
LISTE DES TABLEAUX	xvi
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xx
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 L'INDUSTRIE DES PÂTES ET PAPIERS ET L'UTILISATION DES ENZYMES	2
1.2 LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER	4
1.2.1 La mise en pâte	4
1.2.2 Le blanchiment	4
1.2.3 Le mélange et la préparation des pâtes	6
1.2.4 La mise en feuille	6
1.2.5 La recirculation et le traitement des eaux blanches (usées)	6
1.3 FACTEURS LIMITATIFS DE L'UTILISATION DES ENZYMES DANS L'INDUSTRIE PAPETIÈRE	7
1.4 LA RÉTENTION DES CHARGES	7
1.5 L'UTILISATION DE LA PECTINASE DANS LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER	13
1.6 LA POLYGALACTURONASE	13
1.7 LES RELATIONS STRUCTURE FONCTION CONNUES DES PGs	18
1.7.1 Les PGs d' <i>Aspergillus niger</i>	18
1.7.2 Les résidus impliqués dans la catalyse	19
1.7.3 Les résidus impliqués dans la liaison du substrat	22

1.8	PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	29
1.9	OBJECTIFS INITIAUX	30
CHAPITRE II : STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE		31
2.1	CHOIX DE L'ENZYME	31
2.2	OBTENTION DU GÈNE DE L'ENZYME	32
2.3	CONCEPTION D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION	32
2.4	EXPRESSION ET PURIFICATION	33
2.5	MISE AU POINT DE TESTS DE DÉTECTION ET DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	34
2.5.1	Le test de détection sur gélose	34
2.5.2	Le zymogramme	35
2.5.3	La turbidimétrie	35
2.5.4	Le test de digestion du concombre	35
2.5.5	Les tests colorimétriques	36
2.6	CARACTÉRISATION INITIALE DE L'ENZYME	36
2.6.1	Mesure de l'activité enzymatique	37
2.6.1.1	Le dosage initial de l'activité	37
2.6.1.2	Les tests d'activité	38
2.6.1.3	Les tests de stabilité	38
2.6.2	Mesure de l'action de l'enzyme sur la pâte	38
2.6.2.1	Le test de demande cationique	38
2.7	OPTIMISATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME PAR LA CRÉATION D'UNE BANQUE DE MUTANTS	41
2.7.1	L'évolution dirigée	42
2.7.2	Le design rationnel	42
2.8	IDENTIFICATION DES MUTANTS ACTIFS ET VÉRIFICATION DE LEUR EXPRESSION	43
2.9	COMPARAISON DES MUTANTS AVEC LA PG SAUVAGE VIA DES ESSAIS PILOTES	43

CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES	44
3.1 CHOIX DES PGs	44
3.2 OBTENTION DES GÈNES DE L'ENZYME	44
3.2.1 Isolation des gènes des PGs de <i>Sc</i> et de <i>Km</i> par PCR	44
3.2.2 Synthèse du gène de la PG de <i>Sp</i> par PCR récursif	45
3.3 CONCEPTION DES SYSTÈMES D'EXPRESSION	46
3.3.1 Préparation des gènes en vue des clonages	46
3.3.2 Système procaryote pBAD pour expression dans <i>Escherichia coli</i>	47
3.3.3 Système eucaryote pYES pour expression dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.3.4 Système eucaryote pGAP pour expression dans <i>Pichia pastoris</i>	48
3.4 EXPRESSION ET PURIFICATION	49
3.4.1 Expression pilote dans <i>Escherichia coli</i>	49
3.4.2 Expression dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.4.2.1 Optimisation de l'expression	50
3.4.2.2 Conditions d'expression retenues	51
3.4.3 Expression dans <i>Pichia pastoris</i>	52
3.4.4 Purification, quantification et déglycosylation des PGs	52
3.5 MISE AU POINT DE TESTS DE DÉTECTION ET DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	53
3.5.1 Le test de détection sur gélose PGA	53
3.5.2 Le zymogramme	54
3.5.3 Le test de turbidimétrie	55
3.5.4 Le test de digestion du concombre	55
3.5.5 Les tests colorimétriques	56
3.5.5.1 Test Nelson-Somogyi	57
3.5.5.2 Test à la néocuproïne	57
3.5.5.3 Test au PAHBAH	58
3.6 CARACTÉRISATION INITIALE DES PGs	59
3.6.1 Mesure de l'activité enzymatique	59
3.6.1.1 Dosage initial de l'activité spécifique	60
3.6.1.2 Automatisation du dosage initial	60
3.6.1.3 Tests d'activité enzymatique	60
3.6.1.4 Automatisation des tests d'activité enzymatique	61
3.6.1.5 Tests de stabilité enzymatique	61
3.6.1.6 Automatisation des tests de stabilité enzymatique	62

3.6.2	Mesure de l'activité sur la pâte (essais pilotes)	62
3.6.2.1	Traitement enzymatique de la pâte	62
3.6.2.2	Traitement enzymatique de la pâte avec ajout de coagulant	63
3.6.2.3	Test de demande cationique	64
3.6.2.4	Automatisation du traitement de la pâte	64
3.6.2.5	Dosage préliminaire automatisé du PGA dans la pâte	64
3.7	CRÉATION D'UNE BANQUE DE MUTANTS PAR MUTAGENÈSES DIRIGÉES	65
3.7.1	Mutagenèses sur le gène de la PG de <i>Km</i>	65
3.7.2	Mutagenèses sur le gène de la PG de <i>Sc</i>	66
3.8	IDENTIFICATION DES MUTANTS ACTIFS ET CARACTÉRISATION	66
3.8.1	Détection des mutants actifs	66
3.8.2	Expression des mutants	66
3.8.3	Vérification de l'induction par SDS-PAGE	67
3.8.4	Purification et quantification des protéines	67
3.8.5	Dosage initial de l'activité spécifique des mutants	67
3.8.6	Criblage des mutants par la mesure de leur activité enzymatique	67
3.8.7	Criblage des mutants par la mesure de leur activité sur la pâte	68
3.8.7.1	Criblage de 4 ou 40 mutants	68
3.8.7.2	Test de stabilité dans la pâte	69
CHAPITRE IV	: RÉSULTATS ET DISCUSSION - PARTIE 1	70
4.1	CHOIX DES PGs	70
4.1.1	PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i>	70
4.1.2	PGs de <i>Sp</i>	70
4.1.3	Autres PGs intéressantes	71
4.2	GÈNES DE PG OBTENUS	72
4.2.1	Gène, séquence primaire et homologie des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i>	72
4.2.2	Gène, séquence primaire et homologie de la PG de <i>Sp</i>	73
4.3	SYSTÈMES D'EXPRESSION	74

4.4 EXPRESSION ET PURIFICATION	78
4.4.1 Expression pilote dans <i>Escherichia coli</i>	78
4.4.2 Expression dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
4.4.2.1 Optimisation de l'expression	78
4.4.2.2 Conditions d'expression retenues	83
4.4.2.3 Patrons et taux d'expression des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> produites dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
4.4.2.4 Note sur l'expression des PGs de <i>Sp</i> dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
4.4.3 Expression dans <i>Pichia pastoris</i>	85
4.4.3.1 Patron d'expression des PGs de <i>Sc</i> produites dans <i>Pichia pastoris</i> ..	87
4.4.4 Purification des PGs	89
4.5 DÉTECTION ET MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	90
4.5.1 Le test de détection sur gélose	90
4.5.2 Le zymogramme	93
4.5.3 Le test de turbidimétrie	97
4.5.4 Le test de digestion du concombre	99
4.5.5 Les tests colorimétriques	100
4.5.5.1 Test Nelson-Somogyi	100
4.5.5.2 Test à la Néocuproïne	100
4.5.5.3 Test au PAHBAH	105
4.5.6 Synthèse des méthodes retenues et non retenues	106
4.6 CARACTÉRISATION INITIALE DE L'ACTIVITÉ DES PGs DANS LE TAMPON	107
4.6.1 Propriétés de la PG de <i>Km</i> produite dans la souche INVSc de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
4.6.1.1 Activité de la PG de <i>Km</i> à 50°C et pH 5,0	107
4.6.1.2 Activité de la PG de <i>Km</i> en fonction du pH	108
4.6.1.3 Activité de la PG de <i>Km</i> en fonction de la température	109
4.6.1.4 Stabilité thermique de la PG de <i>Km</i>	111
4.6.1.5 Longévité de la PG de <i>Km</i>	111
4.6.2 Propriétés de la PG de <i>Sc</i> produite dans la souche INVSc de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
4.6.2.1 Activité de la PG de <i>Sc</i> à 50°C et pH 5,0	116
4.6.2.2 Activité de la PG de <i>Sc</i> en fonction du pH	116
4.6.2.3 Activité de la PG de <i>Sc</i> en fonction de la température	117
4.6.2.4 Stabilité thermique de la PG de <i>Sc</i>	118
4.6.2.5 Longévité de la PG de <i>Sc</i>	119
4.6.3 PG de <i>Km</i> vs PG de <i>Sc</i>	120
4.6.3.1 Courbes d'activité des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i>	120
4.6.3.2 Pouvoir enzymatique relatif des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i>	120
4.6.3.3 Pouvoir enzymatique des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> sur la base de leurs rendements	123

4.6.4	Propriétés de la PG de <i>Sp</i> produite dans la souche INVSc de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	127
4.6.4.1	Activité de la PG de <i>Sp</i> à 50°C et pH 5,0	127
4.6.5	Propriétés de la PG de <i>Sc</i> produite dans la souche GS-115 de <i>Pichia pastoris</i>	127
4.6.5.1	Activité de la PG de <i>Sc</i> à 50°C et pH 5,0	127
4.7	ÉTUDES DE FAISABILITÉ DU TRAITEMENT DE LA PÂTE AVEC LES PGs	128
4.7.1	Action des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> sur la pâte TMP blanchie au peroxyde ..	128
4.7.2	Spécificité d'action de la pectinase sur la pâte TMP blanchie au peroxyde	130
4.7.3	Action de la pectinase sur l'eau blanche	131
4.8	MISE AU POINT DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE DE LA PÂTE ET DE LA MESURE DE LA DEMANDE CATIONIQUE	132
4.8.1	Considérations particulières concernant la reproductibilité des essais ...	132
4.8.1.1	Variabilité due à la méthode de traitement enzymatique de la pâte	133
4.8.1.2	Variabilité due à la méthode de mesure de la demande cationique	133
4.8.1.3	Variabilité dans la composition de la pâte	134
4.8.2	Améliorations apportées à la méthode de traitement enzymatique et à la méthode de mesure de la demande cationique	135
4.8.3	Dosage du PGA dans la pâte TMP blanchie au peroxyde	136
4.8.4	Notes sur les conditions du procédé de fabrication du papier	137
4.9	CARACTÉRISATION DE LA PG DE <i>Sc</i> DANS LA PÂTE TMP BLANCHIE AU PEROXYDE	139
4.9.1	Plage d'activité de la PG de <i>Sc</i> dans la pâte	141
4.9.2	Stabilité de la PG de <i>Sc</i> dans la pâte	141
4.10	CONCLUSIONS CONCERNANT L'UTILISATION DE LA PG DANS LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER	141
CHAPITRE V	STRATÉGIES D'OPTIMISATION DES PGs	143
5.1	STRATÉGIES POUR AUGMENTER L'ACTIVITÉ DES PGs	143
5.2	STRATÉGIES POUR AUGMENTER LA STABILITÉ DES PGs	146
5.2.1	Stratégies impliquant les ponts disulfures	146
5.2.2	Stratégie impliquant la position 326 (sur la PG II d' <i>Aspergillus niger</i>) ..	146

5.3 STRATÉGIES SPÉCIFIQUES À LA PG DE <i>SP</i>	147
5.4 STRATÉGIES RELIÉES À LA GLYCOSYLATION	148
5.5 RÉSUMÉ DES STRATÉGIES D'OPTIMISATION DES PGS	150
CHAPITRE VI : RÉSULTATS ET DISCUSSION - PARTIE 2	151
6.1 CONSTRUCTIONS GÉNÉTIQUES ET MUTANTS DE PGS OBTENUES	151
6.1.1 Constructions génétiques obtenues	151
6.1.2 Mutants obtenus	154
6.2 IDENTIFICATION ET EXPRESSION DES CLONES ACTIFS	157
6.2.1 Détection des clones actifs sur gélose	157
6.2.2 Vérification et étude de l'expression des clones par SDS-PAGE	160
6.2.3 Glycosylation de la PG de <i>Km</i> produite dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160
6.2.4 Glycosylation de la PG de <i>Sc</i> produite dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	163
6.3 CRIBLAGE DES CLONES	165
6.3.1 Criblage de l'activité des clones dans le tampon et dans la pâte	165
6.3.2 Méthode automatisée pour le traitement enzymatique de la pâte en vue du criblage de 4 ou 40 clones	166
6.3.3 Méthode automatisée pour le traitement enzymatique de la pâte en vue de tester la stabilité des mutants sur la pâte	166
6.3.4 Comparaison de l'activité des mutants sur la pâte	167
6.3.4.1 Comparaison des mutants la base uniformisée de la quantité de protéines totales	167
6.3.4.2 Comparaison des mutants sur la base uniformisée de la quantité de PG dosée sur SDS-PAGE	168
6.3.4.3 Comparaison des mutants sur la base uniformisée de l'activité à 50°C, pH 5,0	169
6.3.4.4 Comparaison des mutants sur la base uniformisée du volume de surnageant	169
6.3.5 Caractérisation de quelques mutants de <i>Sc</i> produits dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (sur la base uniformisée de la quantité de PG dosée sur SDS-PAGE)	170
6.3.5.1 Mutants Q149M, S282D et K325T	173
6.3.5.2 Mutants N318D/Q, N330D/Q	174

CHAPITRE VII : CONCLUSION	177
7.1 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS ET RETOUR SUR LE CONTEXTE DE TRAVAIL	177
7.2 SUITE DES TRAVAUX ET AVENUES DE RECHERCHE	185
RÉFÉRENCES	188
ANNEXES	201
ANNEXE I : Automatisation des tests enzymatiques, du traitement de la pâte et du criblage des mutants de PGs : protocoles de préparation, programmes et exemples de données obtenues	202
a) Dosage initial de l'activité de la PG	203
b) Test d'activité de la PG dans une solution tampon	213
c) Test de stabilité de la PG dans une solution tampon	225
d) Dosage préliminaire du PGA dans la pâte	246
e) Criblage de mutants de la PG dans une solution tampon	251
f) Criblage de 4 ou 40 mutants de la PG dans la pâte	259
g) Test de stabilité de la PG dans la pâte	263
ANNEXE II : Séquences de la PG isolée de <i>Sc</i>	266
ANNEXE III : Séquences de la PG isolée de <i>Km</i>	267
ANNEXE IV : Séquences de la PG de <i>Sp</i>	268
ANNEXE V : Vecteurs d'expression commerciaux	269
a) pBADgIII B Carte et site de clonage multiple	270
b) pYES2/CT Carte et site de clonage multiple	272
c) pGAPZ α A Carte et site de clonage multiple	274
ANNEXE VI : Article publié	276
Houle, V., Gagnon, M.C., Dubé, E., Hurtubise, Y. et Beauregard, M. (2008) "Impact of glycosylation on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> endopolygalacturonase PGU1 activity and stability." Open Biotech. J. 2 (1) : 36-42.	

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	Coûts annuels approximatifs d'agents de rétention pour une usine produisant 4000 tonnes de papier par semaine	10
TABLEAU 1.2	Activités spécifiques et paramètres cinétiques des formes sauvages et mutées de la PG II	26
TABLEAU 4.1	Les 21 constructions préparées pour les différents systèmes d'expression	77
TABLEAU 4.2	Comparaison des trois tests colorimétriques de mesure de l'activité enzymatique	107
TABLEAU 5.1	Activité de la PG II d' <i>Aspergillus niger</i> et de certains de ses mutants	145
TABLEAU 5.2	Stratégies retenues (mutations) pour optimiser les PGs de <i>Km</i> de <i>Sc</i> et de <i>Sp</i>	150
TABLEAU 6.1	Construction de PGs obtenues	152
TABLEAU 6.2	Mutants de la PG de <i>Km</i> produits dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	155
TABLEAU 6.3	Mutants de la PG de <i>Sc</i> dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	156

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	Procédé de fabrication des pâtes et du papier	5
FIGURE 1.2	Mécanisme de coagulation	9
FIGURE 1.3	Mécanisme de floculation	9
FIGURE 1.4	Compétition entre les substances indésirables et les fibres et fines de bois envers le coagulant	10
FIGURE 1.5	L'acide galacturonique (a) et l'acide polygalacturonique (b)	11
FIGURE 1.6	Réaction d'hydrolyse de la liaison $\alpha(1-4)$ du PGA par la polygalacturonase	12
FIGURE 1.7	Modèle à ruban de la structure de la polygalacturonase : Endo-Polygalacturonase II d' <i>Aspergillus niger</i>	15
FIGURE 1.8	Séquence consensus du site actif de la polygalacturonase	16
FIGURE 1.9	Séquence protéique de la PGII d' <i>Aspergillus niger</i>	16
FIGURE 1.10	PG II d' <i>Aspergillus niger</i>	20
FIGURE 1.11	Localisation des résidus mutés dans le site actif de la PG II	21
FIGURE 1.12	Alignement des PGs d' <i>Aspergillus niger</i>	23
FIGURE 1.13	Localisation des résidus mutés au site de liaison avec le substrat	24
FIGURE 1.14	Site de liaison au substrat de la PG II	27
FIGURE 1.15	Stabilité thermique de la PGII et du mutant Y326L	28
FIGURE 2.1	Schéma d'un détecteur de charges particulières	39
FIGURE 2.2	Le détecteur de charges particulières Mütek	40
FIGURE 4.1	Schéma d'une construction type d'un gène et de sa séquence signal dans les systèmes d'expression	76
FIGURE 4.2	Inductions dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79

FIGURE 4.3	Induction de la PG de <i>Sc</i> dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> après une préculture dans du YP raffinose	81
FIGURE 4.4	Induction de 31 heures de la PG de <i>Km</i> dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> après une préculture dans du YP glucose ou dans du YP galactose	82
FIGURE 4.5	PGs de <i>Sc</i> produites dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
FIGURE 4.6	Patron d'expression des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> produites dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
FIGURE 4.7	PGs de <i>Sc</i> produites dans <i>Pichia pastoris</i>	86
FIGURE 4.8	Patrons d'expression des PGs de <i>Sc</i> produites dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Pichia pastoris</i>	88
FIGURE 4.9	Test de détection de l'activité de la PG produite par différentes levures sur gélose PGA à différentes températures et différents pH	91
FIGURE 4.10	Détection de l'activité de la PG à 25°C et différents pH sur des zymogrammes	94
FIGURE 4.11	Détection de l'activité de la PG à pH 4,5 à 37°C et 50°C sur des zymogrammes	96
FIGURE 4.12	Détermination de l'activité de la PG de <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-49 par turbidimétrie	98
FIGURE 4.13	Évaluation du test à la néocuproïne à l'aide de la PG II commerciale d' <i>Aspergillus niger</i>	102
FIGURE 4.14	Comparaison des courbes étalons du test à la néocuproïne et du test au PAHBAH	104
FIGURE 4.15	Courbes d'activité de la PG de <i>Km</i> en fonction du pH	109
FIGURE 4.16	Courbes d'activité de la PG de <i>Km</i> en fonction de la température	110
FIGURE 4.17	Courbes de stabilité de la PG de <i>Km</i>	112
FIGURE 4.18	Vitesses initiales de la PG de <i>Km</i> à pH 5,0	114
FIGURE 4.19	Courbes d'activité de la PG de <i>Sc</i> en fonction du pH	117
FIGURE 4.20	Courbes d'activité de la PG de <i>Sc</i> en fonction de la température	118

FIGURE 4.21	Courbes de stabilité de la PG de <i>Sc</i> à 50°C	119
FIGURE 4.22	Vitesses initiales de la PG de <i>Sc</i> à pH 5,0	121
FIGURE 4.23	Comparaison de l'activité des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i>	122
FIGURE 4.24	Comparaison du pouvoir enzymatique relatif des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> en fonction de la température et du pH	124
FIGURE 4.25	Comparaison du pouvoir enzymatique des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> en fonction de la température et du pH sur la base de leurs rendements	126
FIGURE 4.26	Action des PGs de <i>Km</i> et de <i>Sc</i> sur la pâte TMP blanchie au peroxyde en fonction de la quantité de coagulant ajouté	129
FIGURE 4.27	Dosage du PGA dans la pâte TMP blanchie au peroxyde	138
FIGURE 4.28	Plage d'activité de la PG de <i>Sc</i> sur la pâte TMP blanchie au peroxyde	140
FIGURE 5.1	Alignement des séquences primaires de la PG II d' <i>Aspergillus niger</i> et des PGs de <i>Km</i> , de <i>Sc</i> et de <i>Sp</i>	144
FIGURE 5.2	L'aspartate (D), l'asparagine (N) et la glutamine (Q)	148
FIGURE 5.3	Séquence consensus d'un site de glycosylation lié à l'Asparagine	149
FIGURE 6.1a	Détection, sur géloses PGA, de l'activité des PGs produites par certains clones	158
FIGURE 6.1b	Détection, sur géloses PGA, de l'activité des PGs produites par certains clones (suite)	159
FIGURE 6.2	Vérification, sur SDS-PAGE, de l'expression des PGs produites par certains clones	161
FIGURE 6.3	Analyse SDS-PAGE de la glycosylation de la PG de <i>Km</i> produite dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et de ses mutants N189D/Q et N293D/Q	162
FIGURE 6.4	Analyse SDS-PAGE de la glycosylation de la PG de <i>Sc</i> produite dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et de ses mutants N318D/Q et N330D/Q	164
FIGURE 6.5a	Plage d'activité de mutants de la PG de <i>Sc</i> sur la pâte TMP blanchie	171
FIGURE 6.5b	(Suite)	172

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCA	acide bicinchoninique
BcPG	polygalacturonase de <i>Botrytis cinerea</i>
Da	Daltons (grammes/moles)
DG	degré de polymérisation
DO ₆₀₀	densité optique à 600nm
DSC	matières organiques colloïdales dissoutes et en suspension
EC	numéro de classification des enzymes
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
GA	acide galacturonique
kDa	kiloDaltons (kilogrammes/mole)
nKat	nanokatal $\text{nmoles mg}^{-1} \text{s}^{-1}$
PAHBAH	acide para-hydroxybenzoïque hydrazide
PAGE	gel de polyacrylamide pour électrophorèse
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PG	polygalacturonase
PGA	acide polygalacturonique
Poly-DADMAC	poly-diallyldiméthyl-ammonium chloride
SDS	laurylsulfate de sodium
TMP	pâte thermomécanique
U	$\mu\text{moles/min}$
YNB	yeast nitrogen base
YP	yeast extract 1%, peptone 2%, sucre spécifié 2%
YPD	yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%

Micro-organismes (Levures)

<i>Km</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ³
<i>Sp</i>	<i>Stereum purpureum</i>

³ *Saccharomyces cerevisiae* est abrégé seulement lorsqu'il est question de l'organisme d'où le gène de la PG est isolée.

Acides aminés

A	alanine	I	isoleucine	R	arginine
C	cystéine	K	lysine	S	serine
D	aspartate	L	leucine	T	thréonine
E	glutamate	M	méthionine	V	valine
F	phénylalanine	N	asparagine	W	tryptophane
G	glycine	P	proline	Y	tyrosine
H	histidine	Q	glutamine		

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'utilisation des enzymes dans les procédés industriels est très avantageuse. Le nombre d'enzymes utilisées pour des fins industrielles a plus que doublé entre 1990 et 2002 passant de 62 à 134 (Seoane 2003). Les avantages de l'utilisation des enzymes industrielles se retrouvent tant sur le plan économique par la réduction des coûts d'énergie et des matières premières, que sur le plan environnemental par la diminution des déchets toxiques. Ainsi, leur utilisation dans les procédés industriels s'inscrit dans la lignée des solutions alternatives qui s'accordent avec les principes de la chimie verte (*Green Chemistry*) (Anastas et Warner 1998). Cependant, malgré leur potentiel catalytique, certaines enzymes ne peuvent pas être utilisées efficacement dans les procédés industriels parce que leur stabilité et donc leur activité sont altérées par les conditions extrêmes retrouvées dans ces procédés. L'identification d'enzymes pouvant fonctionner dans des conditions se rapprochant des conditions désirées et leur optimisation peut donc jouer un rôle primordial dans leur application.

Mon projet de doctorat s'est inscrit dans cette voie. L'industrie ciblée par mes travaux est celle des pâtes et papiers, et l'enzyme d'intérêt est la polygalacturonase (PG), communément appelée la pectinase. Cette enzyme a le potentiel de jouer un rôle dans la rétention des fines de papier pour améliorer la mise en feuille de la pâte traitée.

Le présent travail vise à exposer la méthodologie que j'ai utilisée pour obtenir une PG présentant des propriétés compatibles avec son utilisation dans le procédé de fabrication du papier ainsi que les résultats de mes travaux. Avant d'entrer dans les détails du projet, je souhaite présenter de façon brève l'industrie des pâtes et papiers et ses contraintes afin d'illustrer les impacts économiques et environnementaux que peut apporter l'utilisation d'enzymes adaptées. J'introduirai aussi les notions théoriques relatives à ce projet soit le procédé de fabrication du papier et plus particulièrement la rétention des charges et ses défis. La réaction catalysée par la PG, son origine, ses caractéristiques globales ainsi que les relations connues entre sa structure et sa

fonction seront également décrites. Cette introduction me mènera ensuite à présenter les hypothèses de recherche et les objectifs du projet. Ces derniers seront expliqués en détails au chapitre deux dans l'approche expérimentale. Le matériel et les méthodes seront décrits au chapitre trois. Les résultats concernant le choix des gènes et leur obtention ainsi que ceux obtenus par la mise au point des méthodes et la caractérisation initiale des enzymes seront discutés au chapitre quatre. Les stratégies d'optimisation des PGs, lesquelles étaient dépendantes des résultats de la première partie, seront expliquées au chapitre cinq. Les résultats obtenus suite à l'application de ces stratégies seront quant à eux discutés au chapitre six. Je conclurai en dévoilant l'orientation des travaux qui découlent de mon projet et en élaborant sur les avenues de recherche.

1.1 L'INDUSTRIE DES PÂTES ET PAPIERS ET L'UTILISATION DES ENZYMES

En 2004, la production mondiale de pâtes et papiers s'élevait à 337 millions de tonnes. Cette production inclut la production de carton, de papier à journaux ainsi que celle du papier d'impression. En plus d'être une des plus importantes industries dans le monde, les pâtes et papiers constituent une industrie pilier dans l'économie de la région Mauricienne, du Québec et plus globalement du Canada. Ces régions produisent respectivement 0,6%, 3% et 9% de la production mondiale en produits papetiers dont 3,7%⁴, 9% et 22% de la production mondiale de papier journal ce qui les positionne au 4^{ième} rang des producteurs pour les pâtes et papier et au 1^{er} rang pour le papier journal.^{5,6} Avec la globalisation des marchés où la compétition pour le meilleur rapport qualité-prix est féroce, il va de soi que le producteur de papier qui pourra réduire ses coûts de production (et de traitement des effluents) aura une longueur d'avance sur ses rivaux. Au besoin d'efficience des producteurs de pâtes et papiers s'ajoute aussi la considération environnementale liée à leurs activités. En effet, par son utilisation massive d'agents de blanchiment tels les peroxydes et les sels chlorés, par son

⁴ Pourcentage pour 2001. Données pour 2004 non connues. Cependant les pourcentages de production pour le Québec et le Canada sont restés les mêmes de 2001 à 2004.

⁵ Données tirées du Site Web du Conseil de l'Industrie Forestière du Québec.

⁶ Les États-Unis (25%), la Chine (11%) et le Japon (9%) étaient les trois plus importants producteurs de pâtes et papiers au monde en 2004.

utilisation d'agents de rétention tels les polyacrylamides, les polyéthylénimines et les chlorures d'ammonium ainsi que par les résidus des composantes de bois qui n'ont pas adhéré à la feuille de papier et qui se retrouvent en suspension (puis en sédiment) dans l'eau, cette industrie génère des quantités importantes d'agents polluants. Avec le Traité de Kyoto sur la réduction des effets nocifs pour l'environnement, l'augmentation des préoccupations environnementales des consommateurs, et les coûts liés à la gestion des déchets, cette industrie, au même titre que toutes les autres, se doit de rester à l'affût des nouvelles technologies qui peuvent améliorer ses procédés de fabrication.

Considérant le besoin constant de réduire les coûts de production et considérant les pressions mondiales pour augmenter les efforts de protection de la nature, l'industrie des pâtes et papiers pourrait grandement bénéficier de l'utilisation d'enzymes dans ses procédés (Ahuja *et al.* 2004). En effet, certaines enzymes telles les xylanases, les lipases et les cellulases ont déjà fait leurs preuves pour faciliter le travail des agents de blanchiment, pour prévenir les problèmes dus à la déposition des triglycérides sur les machines lors du processus de fabrication du papier, et pour faciliter le drainage des fibres recyclées en lissant⁷ leur surface (Jaeger et Reetz 1998; Subramaniyan et Prema 2002; Suurnakki *et al.* 1997; Bajpai 1999; Bajpai 2004). Les ligninases, les laccases et la pectinase sont d'autres enzymes qui méritent qu'on s'y intéresse. Ces dernières peuvent être utilisées dans les procédés de fabrication du papier pour faciliter le travail des agents de blanchiment et de rétention (Bajpai 1999; Reid et Ricard 2000; Ricard et Reid 2004; Rodriguez Couto et Toca Herrera 2006). En facilitant le travail de ces agents, une moins grande quantité de produits chimiques sera nécessaire pour produire le papier diminuant ainsi le coût de matières premières ainsi que leurs effets nocifs sur l'environnement. Leur action peut aussi générer une amélioration de la qualité du papier et contribuer à la dépollution des effluents (Murugesan 2003).

⁷ Le lissage se fait par l'hydrolyse des fibrilles qui sont les plus accessibles à la surface des fibres de cellulose.

1.2 LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER⁸

La fabrication du papier est essentiellement un procédé continu de filtration lors duquel une suspension diluée de fibres de bois, de fragments de fibres (les fines) et de particules inorganiques de remplissage comme la glaise ou la chaux est asséchée pour former une feuille. La figure 1.1 présente d'une manière schématisée le procédé de fabrication du papier.

Les étapes principales sont énumérées ci-après de façon simplifiée :

1.2.1 La mise en pâte

Le papier est principalement composé de fibres cellulosiques provenant de copeaux de bois (70%), de billes de bois écorcées et de papier recyclé. Il existe 3 principaux procédés de mise en pâte :

- a) Le procédé mécanique (TMP): le bois est broyé à l'aide de meules (défibreurs).
- b) Le procédé thermomécanique (TMP): les copeaux sont raffinés par des raffineurs.
- c) Le procédé chimique (Kraft) : les copeaux de bois sont cuits dans de grands autoclaves en présence de produits chimiques (lessiveurs).

1.2.2 Le blanchiment

Le blanchiment conventionnel de la pâte de papier se fait à l'aide de sels chlorés. Ces sels ont pour fonction de briser les molécules de lignine et d'hemicellulose du bois afin de les éliminer de la pâte. Ces molécules, qui servent naturellement de colle aux fibres de bois (cellulose), jaunissent avec l'oxydation et le temps. En les éliminant, on permet aux fibres de bois de garder leur blancheur.

⁸ Information tirée du Site Web du Conseil de l'Industrie Forestière du Québec.

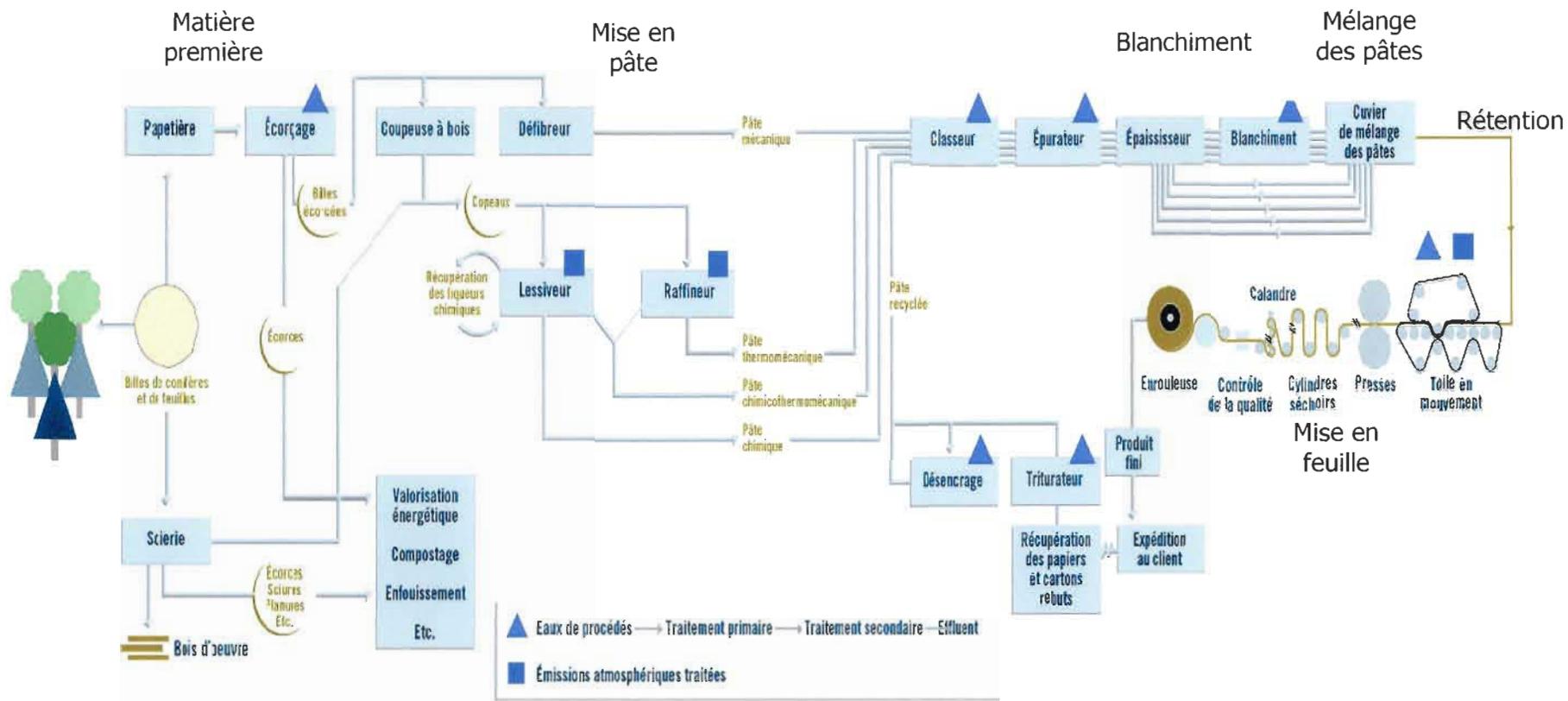


FIGURE 1.1 Procédé de fabrication des pâtes et du papier

(Source : Site Web version 2003 de l'Association des industries forestières du Québec⁹)

⁹ <http://www.aifq.qc.ca/francais/industrie/part2.html>.

1.2.3 Le mélange et la préparation des pâtes

Les différents types de pâtes sont mélangés selon les proportions désirées pour le type de papier souhaité. Plusieurs cycles de dilutions et de lavages de la pâte sont ensuite effectués puis des agents de rétention y sont ajoutés pour faciliter la mise en feuille. La durée de cette étape, du mélange à la mise en feuille est d'environ 15 minutes, son pH moyen est d'environ 5,3 et sa température est d'environ 55°C.¹⁰

1.2.4 La mise en feuille

À cette étape, la teneur en eau de la pâte est d'environ 99%¹¹. Le mélange est envoyé sous pression sur une immense toile en mouvement qui sert de tamis. L'eau est ainsi filtrée et la feuille qui se forme passe au pressage et au séchage dans d'immenses rouleaux d'aciers chauffés.

1.2.5 La recirculation et le traitement des eaux blanches (usées)

Tout au long du procédé de fabrication du papier, l'eau est recirculée. Dans un processus continu, une partie de ces eaux usées (eaux blanches) est traitée dans une unité de traitement des boues usées annexée à l'usine de pâtes et papiers.

Tel que présenté ci-haut, le procédé de fabrication du papier implique plusieurs étapes. Chacune de ces étapes se produit dans des conditions de pH, de température et de composition chimique différentes. Par exemple, à travers les différentes étapes du procédé, le pH peut varier de 4 à 8 et la température de 45°C à 75°C.¹² De plus, il arrive que les conditions retrouvées dans une étape varient quelque peu d'un lot de production à un autre selon le mélange de pâtes utilisé. Par exemple le pH de l'étape

¹⁰ Daniel Montplaisir, Ph.D. Directeur R&D à l'usine Kruger Trois-Rivières, Bruno Chabot, Ph.D. et Claude Daneault, Ph.D. professeurs en pâtes et papiers à l'UQTR. Communications personnelles.

¹¹ La consistance peut varier selon le grade de papier produit et les caractéristiques de la machine à papier.

¹² Information fournie par Daniel Montplaisir, Ph.D. Directeur R&D à l'usine Kruger Trois-Rivières.

de rétention est généralement de 5,3, mais peut varier de 4,8 à 6.13 Une enzyme qui peut être active de façon optimale dans l'étape du procédé où elle doit agir (et cela malgré l'inconstance de ses conditions) tout en résistant aux conditions retrouvées ailleurs dans le procédé (sans nécessairement rester active) pourrait fournir un bon avantage aux producteurs de papiers. En effet, à cause de la re-circulation des eaux, une quantité basale d'enzymes pourrait toujours subsister dans le processus. Cela pourrait avoir pour avantage de diminuer la quantité d'enzymes à ajouter lors de l'étape où elles doivent agir, diminuant ainsi les coûts reliés à leur utilisation.

1.3 FACTEURS LIMITATIFS DE L'UTILISATION DES ENZYMES DANS L'INDUSTRIE PAPERIÈRE

Malgré ses avantages, l'utilisation des enzymes dans le domaine des pâtes et papiers reste marginale puisque les conditions de traitement de la pâte aux différentes étapes ne correspondent pas toujours à celles où les enzymes sont les plus performantes. De plus, les micro-organismes qui produisent ces enzymes ne le font pas toujours en quantité suffisante ce qui rend souvent impensable leur utilisation à cause des coûts importants qu'elle implique. À titre d'exemple, une usine moyenne de pâte et papier produit jusqu'à 4000 tonnes métriques de papier par semaine ce qui nécessiterait des quantités considérables d'enzymes. Pour contourner ces contraintes, et tel que déjà mentionné dans le présent chapitre, les techniques de biotechnologie peuvent être utilisées pour modifier ces enzymes de façon à les adapter au milieu réactionnel souhaité et à les produire en grande quantité.

Après considérations des propriétés des différentes enzymes et des besoins actuels de l'industrie papetière, j'ai choisi de consacrer mes recherches de doctorat à la pectinase et à son rôle dans l'étape de rétention.

¹³ Idem

1.4 LA RÉTENTION DES CHARGES ¹⁴

Le papier est un composé complexe fait de matériaux biologiques (fibres, fines et autres composantes du bois), de matériaux organiques (glaise), de matériaux synthétiques (polymères améliorant la rétention et la résistance du papier), de minéraux, ainsi que d'autres additifs. La rétention de ces composantes dans des proportions appropriées est critique à l'obtention d'une feuille aux propriétés souhaitées. De plus, la proportion de matériaux retenus dans la feuille par rapport à la quantité utilisée pour fabriquer la feuille a un impact important sur la pollution générée et le coût de fabrication. Plus les fibres s'associent entre elles lors de la formation des feuilles, plus le rendement de production est élevé (moins il y a de pertes). Afin de garder les fibres, les fines et les autres particules dans la feuille de papier, des agents de rétention sont ajoutés à la pâte. Au niveau moléculaire, ces agents, qui sont généralement des polymères cationiques, agissent en permettant la formation de liens électrostatiques entre les surfaces des composants de la pâte, qui sont généralement chargés négativement.

Les agents de rétention sont ajoutés à la pâte en deux étapes, juste avant la mise en feuille. Le premier ajout d'agents permet la coagulation des particules de la pâte (figure 1.2). Puisque les fibres et les fines de la pâte sont généralement chargées négativement, elles ont tendance à se repousser. Cela a pour effet de diminuer leur rétention lors de la mise en feuille. L'utilisation de coagulants cationiques, comme l'Alum¹⁵, les polyamines, le polyéthylèneimine et les poly-DADMACs ("poly-diallyl-diméthyl-ammonium-chloride") permet la neutralisation des charges négatives des particules colloïdales ce qui permet leur rapprochement (leur agglomération).

Après que la répulsion électrostatique des composantes du milieu ait été contrôlée par l'ajout des agents de rétention coagulants, les flocculants sont ajoutés (figure 1.3). Les flocculants sont des polymères généralement chargés qui possèdent un haut poids moléculaire et qui permettent l'agglomération des particules colloïdales de la pâte en floccules en formant des ponts électrostatiques et chimiques. Des exemples de flocculants sont les poly-acrylamides cationiques et anioniques (PAM) et les "poly-ethyleneoxide" (PEO).

¹⁴ Retention of Fines and Fillers During Papermaking (1998) Atlanta, Georgia, USA, Tappi Press.

¹⁵ Sulfate d'Aluminium hydraté : $Al_2(SO)_4 \times 18H_2O$

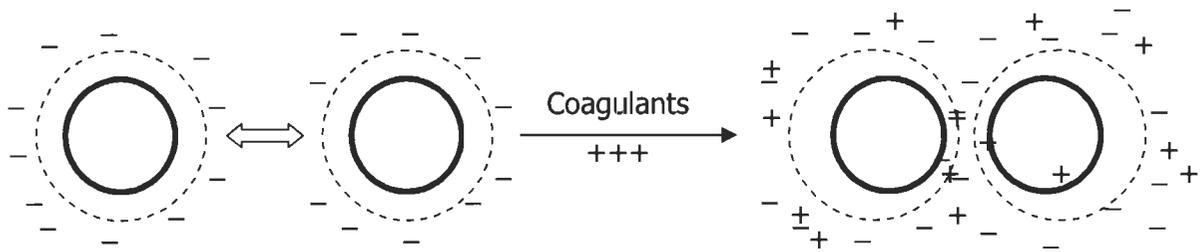


FIGURE 1.2 Mécanisme de coagulation.

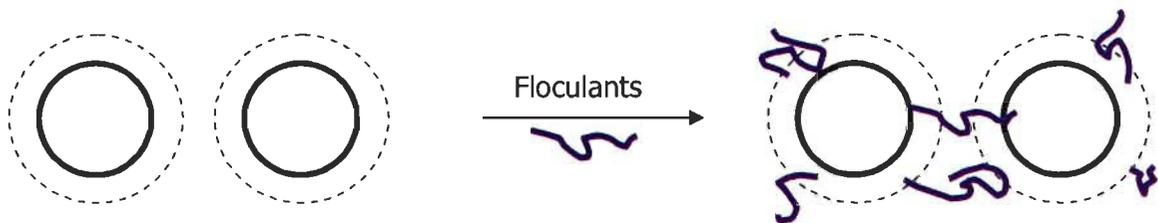


FIGURE 1.3 Mécanisme de floculation.

Puisque les coagulants fonctionnent en générant des attractions électrostatiques dans le milieu réactionnel et d'une manière non-spécifique, leur efficacité peut être affectée par les composantes chargées de la pâte qui ne sont pas nécessairement désirées pour la formation de la feuille. En effet, la pâte, en plus des fibres, des fines et des particules inorganiques, contient d'autres éléments chargés négativement. Ces substances indésirables ("anionic trash") entrent en compétition avec les composants favorables et diminuent ainsi l'efficacité des agents de rétention en diminuant leur disponibilité. Cela a pour conséquence que la quantité d'agents de rétention nécessaire pour effectuer le travail est beaucoup plus grande que la demande réelle des composantes du papier. Le coût des produits de rétention est donc plus important que ce qu'il pourrait être, sans compter qu'une quantité additionnelle inutile de ces produits est rejetée dans l'environnement.

La figure 1.4 présente ce phénomène de compétition entre ces substances indésirables et les fibres et fines de bois. Le tableau 1.1 présente quant à lui une idée des coûts relatifs à l'utilisation de certains agents de rétention s'ils étaient utilisés (individuellement) dans une usine produisant 4000 tonnes métriques de papier par semaine (capacité moyenne).

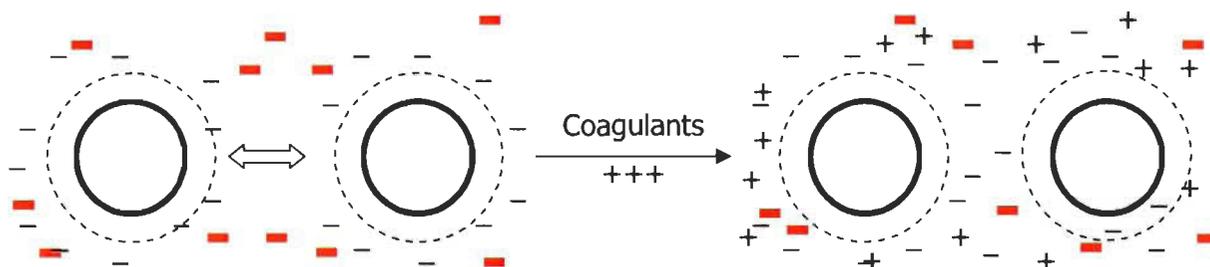


FIGURE 1.4 Compétition entre les substances indésirables et les fibres et fines de bois envers le coagulant.

■ Substances anioniques interférentes

Agents de rétention	Quantité utilisée / tonne produite	Coût / Kg	Coûts annuels approximatifs
Polyacrylamide (PAM) (ex. Percol 182)	300 ou 500g	4,50\$ ou 6\$	270 000\$ à 600 000\$
Polyéthylèneimine (PEI)	2kg	2,75\$	1,1 million \$
Dérivés de PEI (ex. polymin SKA)	Jusqu'à 5kg	2\$	Plus de 2 millions \$
Polyamidoamine (PAA)	2kg	2,50\$	1 million \$
Polyéthylène Oxyde (PEO)	100g	4,19\$	83 800\$

TABLEAU 1.1 Coûts annuels approximatifs d'agents de rétention pour une usine produisant 4 000 tonnes de papier par semaine. Il est à noter que ces coûts ne sont pas cumulables puisqu'ils dépendent de la recette d'agents de rétention utilisés, laquelle varie d'une usine et d'une pâte à une autre. (Source : Claude Daneault Ph.D., Centre Intégré sur les pâtes et papiers de Trois-Rivières)

Les substances indésirables qui entrent en compétition avec les fibres de la pâte sont de différentes natures et varient d'un type de bois à un autre et d'un type de pâte à un autre. Outre l'interférence qu'elles créent avec les agents coagulants, ces substances peuvent aussi causer d'autres problèmes aux producteurs de pâtes et papiers : elles peuvent augmenter le temps de drainage, elles peuvent former des dépôts qui réduisent l'uniformité des feuilles de papier et elles peuvent réduire la brillance et la résistance des feuilles de papier. Parmi ces substances, on retrouve des dérivés de la lignine, des hemicelluloses et des acides gras provenant de la pâte. On retrouve aussi des acides organiques, de l'amidon, des polyphosphates et des polyacrylates (Linhart *et al.* 1987). Dans le cas de la pâte thermomécanique blanchie au peroxyde (TMP blanchie), 5% des matières organiques colloïdales en suspension (DSC)¹⁶ sont des polymères d'acide galacturonique (PGA). À lui seul, ce 5% de PGA contribue à 50% de la charge anionique interférente (Thornton 1994). Le PGA proviendrait de la dissolution de la pectine présente dans la paroi cellulaire du bois lors du blanchiment de la pâte TMP qui se produit dans des conditions alcalines (pH 8) (Sundberg 1998). Le PGA, aussi appelé pectate, est en fait de la pectine déméthylée (Deuel et Stutz 1958). La charge négative du PGA est quant à elle due à l'ionisation du groupement carboxyle de l'acide galacturonique (GA) qui compose le polymère. Cette ionisation est conservée à toutes les étapes du procédé puisque le pH y est toujours autour de 5,0, soit la valeur estimée de pKa du PGA (Ryden *et al.* 2000). L'acide galacturonique et l'acide polygalacturonique sont représentés à la figure 1.5.

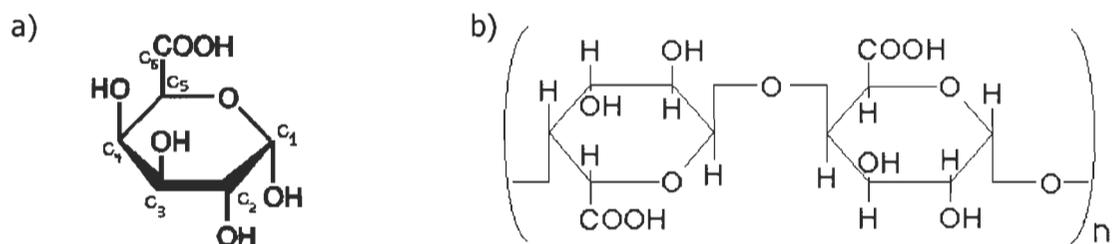


FIGURE 1.5 L'acide galacturonique (a) et l'acide polygalacturonique (b).

¹⁶ Outre le PGA, les DSC sont aussi constituées de substances non chargées et hydrophobes telles les résines du bois et certains acides gras.

Puisque le PGA constitue à lui seul 50% de la charge anionique des substances indésirables, son élimination pourrait être la solution de choix pour résoudre les problèmes liés aux interférences avec les agents de rétention. Selon Thornton (1994), l'habileté du PGA à s'associer avec les coagulants et à se complexer avec les flocculants cationiques (demande cationique) dépend fortement de son degré de polymérisation (DP). Les monomères, les dimères et les trimères d'acides galacturoniques ne créent pas de demande cationique mesurable. Toutefois, les hexamères et les plus grandes chaînes ont une demande cationique importante. Ainsi, la dépolymérisation du PGA pourrait diminuer considérablement la quantité d'agents de rétention nécessaire. Pour dépolymériser le PGA, une pectinase peut être utilisée. Les pectinases catalysent l'hydrolyse de liens glycosidiques à l'intérieur des polymères de pectine. Différentes pectinases ont différentes préférences pour les formes méthylées et non-méthylées de la pectine. L'enzyme la plus intéressante pour la dégradation du PGA dans le cas présent est l'endo-PG, ou simplement la PG. La PG est spécifique au PGA en ce sens qu'elle catalyse l'hydrolyse du lien glycosidique $\alpha(1-4)$ situé entre deux acides galacturoniques qui ne sont pas estérifiés (particularité du PGA). L'ajout de cette pectinase à la pâte après son blanchiment peut ainsi permettre une réduction des coûts de production et de décontamination des effluents puisqu'elle permet de diminuer le besoin en agents de rétention. La réaction d'hydrolyse de la liaison $\alpha(1-4)$ du PGA par la polygalacturonase est représentée à la figure 1.6.

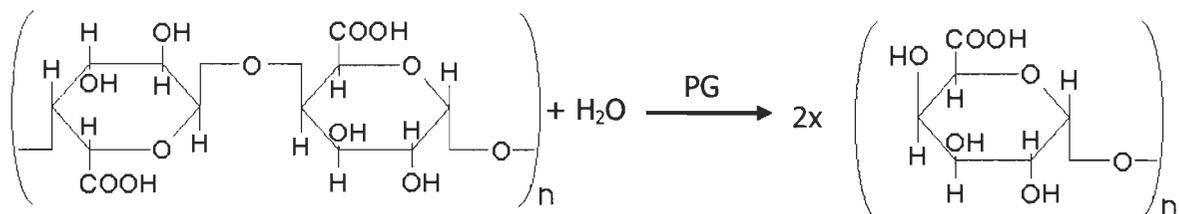


FIGURE 1.6 Réaction d'hydrolyse de la liaison $\alpha(1-4)$ du PGA par la polygalacturonase.

1.5 L'UTILISATION DE LA PECTINASE DANS LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER

Pour être efficace, la pectinase devra être ajoutée après le blanchiment et avant l'ajout des agents de rétention. Plusieurs options d'ajout de la pectinase sont à considérer. La pectinase pourrait par exemple être ajoutée au cuvier de mélange des pâtes. Étant donné que le passage de la pâte (de son mélange à sa mise en feuille) traverse plusieurs étapes de lavage et de dilution, de la pectinase liquide pourrait aussi être ajoutée à l'eau de dilution pour que son mélange à la pâte se fasse d'une manière uniforme. Une autre solution pour intégrer uniformément l'enzyme à la pâte serait d'en vaporiser une solution liquide sur la pâte tout au long de sa préparation avant l'ajout d'agents de rétention. Il est sans contredit que tant les conditions chimiques que physiques du procédé (pH, température, composition chimique de la pâte, consistance de la pâte, parcours de la pâte dans la machinerie, friction des mélangeurs, dilutions et durée de l'étape du procédé) doivent être considérées en vue de l'optimisation et de l'utilisation de l'enzyme.

Selon les connaissances actuelles du procédé de fabrication et la volonté de développer une enzyme qui répond au besoin précis de l'industrie, aucune modification majeure ne semble devoir être effectuée au niveau des installations de l'usine. Naturellement, l'ajout de la pectinase au mélange aura pour effet de réduire le besoin en agents de rétention pour la mise en feuille, obligeant ainsi les producteurs à adapter leurs recettes de produits chimiques. À cette exception près, ces derniers ne devraient pas avoir à investir des fonds dans l'achat de nouveaux équipements et ne devraient pas avoir à payer des frais indirects pour la modification des temps de passage de la pâte de son mélange à sa mise en feuille.

1.6 LA POLYGALACTURONASE

Tel que mentionné précédemment, la PG catalyse l'hydrolyse des liens α 1,4-D-galactosiduroniques du pectate (PGA) et d'autres galacturonans. Pendant l'hydrolyse, la configuration anomérique change de α à β ce qui fait que cette enzyme

fonctionne par inversion (Biely *et al.* 1996). La PG est produite par les fruits, où elle est impliquée dans leur mûrissement, et par certaines bactéries et fungi pathogènes où elle est impliquée dans le ramollissement et la décomposition des tissus des plantes. *Erwinia carotovora* et *Pseudomonas solanacearum* sont les principaux pathogènes bactériens connus produisant la PG. Parmi les autres micro-organismes producteurs de cette enzyme, on retrouve, entre autres, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awaori*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Stereum purpureum*, et certains *Saccharomyces* et *Kluyveromyces*.

L'endo-PG hydrolyse les liens glycosidiques de façon aléatoire à l'intérieur du polymère et l'exo-PG hydrolyse les liens glycosidiques à partir de l'extrémité non-réductrice du polymère pour en relarguer un galacturonate ou un digalacturonate. Le comité de nomenclature des enzymes de la « International Union of Biochemistry and Molecular Biology » (IUBMB, autrefois la « International Union of Biochemistry » dont la « Enzyme Commission » a créé les numéros EC) a attribué le numéro EC 3.2.1.x aux hydrolases attaquant les liaisons O-glycosidiques où x représente la spécificité du substrat (et parfois aussi le mécanisme ou le type de lien brisé). L'endo-PG (aussi nommée PG ou pectinase) porte ainsi le numéro 3.2.1.15. Le premier nombre de la nomenclature EC indique le type de réaction catalysée ; le nombre trois indiquant une réaction d'hydrolyse. Le second nombre indique le substrat général impliqué lors de la réaction ; le nombre deux indiquant que le substrat est un glucide. Le troisième nombre implique le substrat de façon spécifique, le nombre un indiquant que l'hydrolyse est faite sur les glycosides liés à un oxygène ou un soufre. Le quatrième et dernier chiffre est quant à lui le numéro de série de l'enzyme. Pour ce qui est des exo-PGs, ils portent les numéros EC 3.2.1.67 et 3.2.1.82. Il y a plus d'endo-PGs que d'exo-PGs répertoriées jusqu'à présent. Une autre façon de classer les glycosides hydrolases a été développée au début des années 1990 et celle-ci se rapporte plutôt aux similitudes existant entre leurs séquences en acides aminés. Selon cette classification, les pectinases font partie de la famille 28 des glycosides hydrolases (Henrissat 1991; Henrissat et Bairoch 1993; Henrissat et Romeu 1995; Henrissat et Bairoch 1996).

Les PGs sont des protéines sécrétées d'environ 360 acides aminés et contiennent une séquence signal d'environ 20 à 65 acides aminés. Elles sont généralement glycosylées et comportent quelques ponts disulfures stabilisants (Pickersgill *et al.* 1998; Pickersgill *et al.* 1999; Van Santen *et al.* 1999). Plus de 115 séquences ont été trouvées et étudiées jusqu'à maintenant (Markovic et Janecek 2001). Les PGs ont une structure monomérique en forme d'hélice main droite composée de feuillets β parallèles (right-handed parallel β -helix) qui peut contenir de 7 à 12 tours complets formant de 3 à 4 feuillets β (Yoder et Journak 1995; Jenkins *et al.* 1998; Van Santen *et al.* 1999). La structure des PGs est représentée à la figure 1.7.

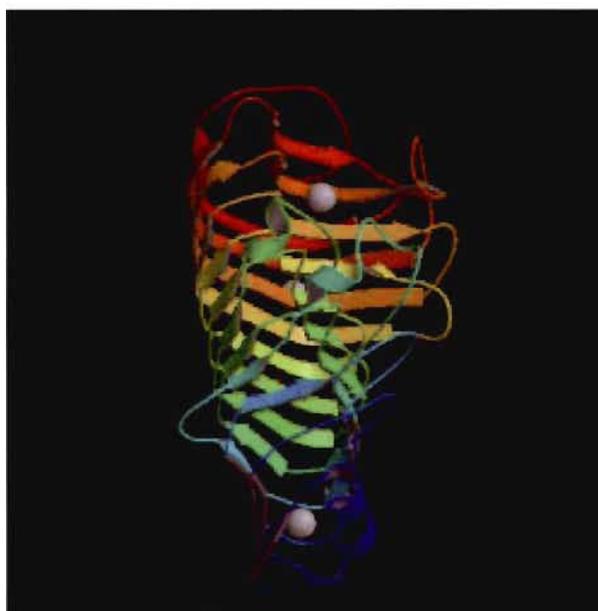


FIGURE 1.7 Modèle à ruban de la structure de la polygalacturonase : **Endo-Polygalacturonase II d'*Aspergillus niger***. Les sphères sont des atomes de Zinc, elles sont au nombre de trois. Ce sont des ligands liés de façon non covalente à la protéine lors de sa cristallisation. (Van Santen *et al.* 1999). (Source : RCSB, Protein Data Bank Structure explorer : 1CZF).

Les PGs et les exo-PGs procaryotes et eucaryotes partagent quelques similitudes dans leurs séquences. Le mécanisme catalytique implique six acides aminés conservés soit Asp-180, Asp-201, Asp-202, His-223, Arg-256 et Lys-258 (numérotation basée sur la

séquence primaire de la PGII d'*Aspergillus niger*). L'aspartate 180 avec l'aide de l'aspartate 202 agirait comme une base pour activer la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse et l'aspartate 201 serait le donneur de proton au substrat. L'histidine 223 aurait pour fonction de maintenir le bon état d'ionisation d'un carboxylate impliqué dans la catalyse (probablement celui de l'aspartate 201) en partageant un proton. L'arginine et la lysine seraient quant à elles impliquées dans la liaison du substrat (Armand *et al.* 2000). La séquence consensus du site actif est montrée à la figure 1.8 (Huang et Schell 1990; Ruttkowski *et al.* 1990; Bussink *et al.* 1991; Henrissat 1991). Parmi les autres acides aminés conservés dans les PGs, on retrouve aussi la tyrosine 291. Elle jouerait elle aussi un rôle dans la catalyse et dans la liaison du substrat (Armand *et al.* 2000; Stratilova *et al.* 1993 et 1996; Rao *et al.* 1996; Pages *et al.* 2000). Une séquence protéique type (celle de la PGII d'*Aspergillus niger*) est présentée à la figure 1.9.

[GSDENKRH]-x(2)-[VMFC]-x(2)-[GS]-**H**-G-[LIVMAG]-x(1,2)- [LIVM]-G-S

FIGURE 1.8 Séquence consensus du site actif de la polygalacturonase.

L'histidine centrale joue un rôle indirect dans la catalyse. Dans les encadrés se trouvent les acides aminés qui peuvent se retrouver à ces positions. Les x représentent n'importe quel acide aminé et les chiffres entre parenthèses leur nombre à cette position. (Source : ExPASy-PROSITE numéro d'accèsion PDOC00415)

```

1 MHSFASLLAY GLVAGATFAS ASPIEARDSC TFTTAAAKA GKAKCSTITL NNIEVPAGTT
61 LDLTGLTSGT KVIFEGTTTF QYEEWAGPLI SMSGEHITVT GASGHLINCD GARWWDGKGT
121 SGKKKPKFFY AHGLDSSSIT GLNIKNTPLM AFSVQANDIT FTDVTINNAD GDTQGGHNTD
181 AFDVGNVSVG NIIKPWVHNQ DDCLAVNSGE NIWFTGGTCI GGHGLSIGSV GDRSNNVVKN
241 VTIEHSTVSN SENAVRITI SGATGSVSEI TYSNIVMSGI SDYGWVIQQD IEDGKPTGKP
301 TNGVTIQDVK LESVTGSVDS GATEIYLLCG SGSCSDWTWD DVKVTGGKKS TACKNFPSVA
361 SC

```

FIGURE 1.9 Séquence primaire de la PGII d'*Aspergillus niger*.

La séquence signal est surlignée en gris. La séquence consensus est surlignée en jaune. Les acides aminés impliqués dans la catalyse sont surlignés en rouge. (Source : NCBI numéro d'accèsion X58893)

En ce qui concerne les propriétés biophysiques et enzymatiques des polygalacturonases, elles varient beaucoup en fonction de l'organisme d'où elles proviennent. La plupart des PGs ont un pH optimal aux environs de 4 et 4,5 à l'exception des PGs des levures *Saccharomyces* et *Kluyveromyces* qui ont un pH optimal autour de 5. La plupart des PGs perdent beaucoup d'activité hors de l'intervalle de pH 3,5 à 5,5. Pour ce qui est de la température optimale de ces enzymes, elle tourne généralement autour de 40°C et 50°C, et à températures plus élevées que 50°C, la plupart des PGs caractérisées perdent de la vigueur (Harman et Corden 1972; Mussell et Strouse 1972; Urbanek et Zalewska-Sobczak 1975; Strand *et al.* 1976; Barnby *et al.* 1990; Kester et Visser 1990; Bussink *et al.* 1991; Ruttkowski *et al.* 1991; Johnston et Williamson 1992; Allen et Lonsdale 1993; Saarilahti 1993; Blanco *et al.* 1994; Hasui *et al.* 1998; Martel *et al.* 1998; Colangelo *et al.* 1999; Hirose *et al.* 1999; Wubben *et al.* 1999; Gainvors *et al.* 2000; Nagai *et al.* 2000; Parenicova *et al.* 2000; Pathak *et al.* 2000; Cabanne et Doneche 2002; Cotton *et al.* 2002; Serrat *et al.* 2002). Toujours en ce qui a trait à la température, un phénomène particulier a été observé pour la PGII d'*Aspergillus niger*.

Le taux et les patrons de glycosylation des PGs ont aussi une importance sur l'activité de l'enzyme. C'est en déglycosylant les PGs de façon enzymatique ou en empêchant la glycosylation de se produire que ces conclusions ont été tirées. En effet, lorsque la PG d'*Aspergillus sp.* est déglycosylée avec la N-glycosidase F, elle perd complètement son activité (Stratilova *et al.* 1998). De plus, lorsque les deux asparagines de la PG de *Saccharomyces cerevisiae* (gène PGU1) exprimée dans *Pichia pastoris* ont été mutées pour des glutamates, l'enzyme a perdu 50% d'activité lorsque produite par la souche X-33 et elle en a perdu plus de 85% lorsque produite dans la souche KM71 (Blanco *et al.* 2002). L'expression hétérologue de la PG dans un organisme lui conférant un patron de glycosylation différent peut donc offrir des avenues de recherche intéressante dans l'optique de conférer à l'enzyme de nouvelles propriétés enzymatiques.

1.7 LES RELATIONS STRUCTURE FONCTION CONNUES DES PGs

La compréhension des relations structure/fonction des PGs a été rendue possible depuis que les structures 3D de la PG de *Erwinia carotovora* (Pickersgill *et al.* 1998) et de la PG II d'*Aspergillus niger* (van Santen *et al.* 1999) ont été élucidées (voir figure 1.7). En fait, ce sont surtout les études de mutagenèses dirigées effectuées sur la PG II d'*Aspergillus niger* qui ont contribué à améliorer les connaissances des chercheurs par rapport aux propriétés catalytiques et par rapport à la spécificité de liaison avec le substrat (Armand *et al.* 2000; Pagès *et al.* 2000, 2001).

1.7.1 Les PGs d'*Aspergillus niger*

La PG II d'*Aspergillus niger* fait partie d'une famille de sept PGs exprimées par ce champignon. Elle a été purifiée pour la première fois en 1999 en même temps que la PG I à partir d'une préparation commerciale de pectinases d'*Aspergillus niger* (Kester et Visser 1990). Les gènes correspondant à ces deux PGs ont ensuite été découverts (Bussink *et al.* 1991a, 1991b) et utilisés pour cribler une banque de fragments du génome d'*Aspergillus* obtenus à l'aide d'enzymes de restriction. Ce criblage a permis de trouver les cinq autres PGs de la famille, nommées PG A à PG E (Parenicova *et al.* 1998, 2000a, 2000b). Cependant, même si elles proviennent du même hôte, la caractérisation de base de ces enzymes démontre qu'elles présentent une grande variabilité dans leur activité d'hydrolyse du PGA. Les PGC, PGD et PGE ont une activité satisfaisante (par rapport à l'activité de l'ensemble des PGs) avec des V_{max} de 25, 96 et 80 U/mg. Les PGI, PGB et PGA démontrent une activité encore meilleure avec des V_{max} de 800, 900 et 1200 U/mg. Toutefois, c'est la PG II qui est en tête avec une activité de 4000 U/mg.^{17,18}

Les études effectuées sur la PG II d'*Aspergillus niger* ayant permis d'approfondir les connaissances sur les relations structure/fonction des PGs ainsi que leurs conclusions seront présentées dans les sections qui suivent. Certains résultats utiles concernant les différentes PGs d'*Aspergillus niger* ou leurs mutants seront aussi exposés.

¹⁷ V_{max} mesurés à 40°C et pH 4.2 dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM.

¹⁸ Résultats compilés à partir des articles mentionnés ci-haut.

1.7.2 Les résidus impliqués dans la catalyse

Les résidus impliqués dans la réaction catalytique de la PG ont été découverts en 2000 lors d'une étude dans laquelle des mutagenèses dirigées ont été effectuées sur la PG II. En effet, l'équipe maintenant réputée de Visser et Benen a orienté ses choix de mutations sur les quelques résidus d'acides aminés hautement conservés des hydrolases de la famille 28 (Armand *et al.* 2000). Parmi les résidus d'acides aminés conservés, les mutagenèses ont été dirigées sur ceux qui étaient chargés, soit les résidus aspartate 180, aspartate 201, aspartate 202, histidine 223, arginine 256, et lysine 258. Deux raisons expliquent ces choix : premièrement, les résidus impliqués dans la catalyse par les glycosides hydrolases sont généralement des aspartates ou des glutamates et deuxièmement, les résidus chargés positivement chez les PGs ont plus de chance de jouer un rôle important dans l'établissement de liaisons avec le substrat qui lui est chargé négativement.

À l'aide de la caractérisation biochimique des mutants de la PG II, il a été démontré que l'aspartate 180 et l'aspartate 201 sont les deux résidus principaux impliqués dans la réaction catalytique. En effet, leur mutation a occasionné les plus gros changements dans la catalyse et de plus, ce sont les seuls résidus strictement conservés. La caractérisation des quatre autres résidus mutés, aidée de l'analyse de la structure 3D de la PG II, a aussi mené les auteurs de l'étude à suggérer des rôles pour ces derniers. Tel que mentionné précédemment à la section 1.6, l'aspartate 202 aiderait l'aspartate 180 à activer la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse. L'histidine 223 aurait pour fonction de maintenir le bon état d'ionisation d'un carboxylate impliqué dans la catalyse (probablement celui de l'aspartate 201 qui donne un proton au substrat) en partageant un proton. L'arginine 256 et la lysine 258 seraient quant à elles impliquées dans la liaison du substrat aux « subsites » -1 et +1.¹⁹ Les figures qui suivent présentent l'emplacement des mutations effectuées par rapport au reste de la PG (figure 1.10) et de façon plus locale, dans le site actif (figure 1.11).

¹⁹ Les « subsites » seront expliqués à la section suivante.

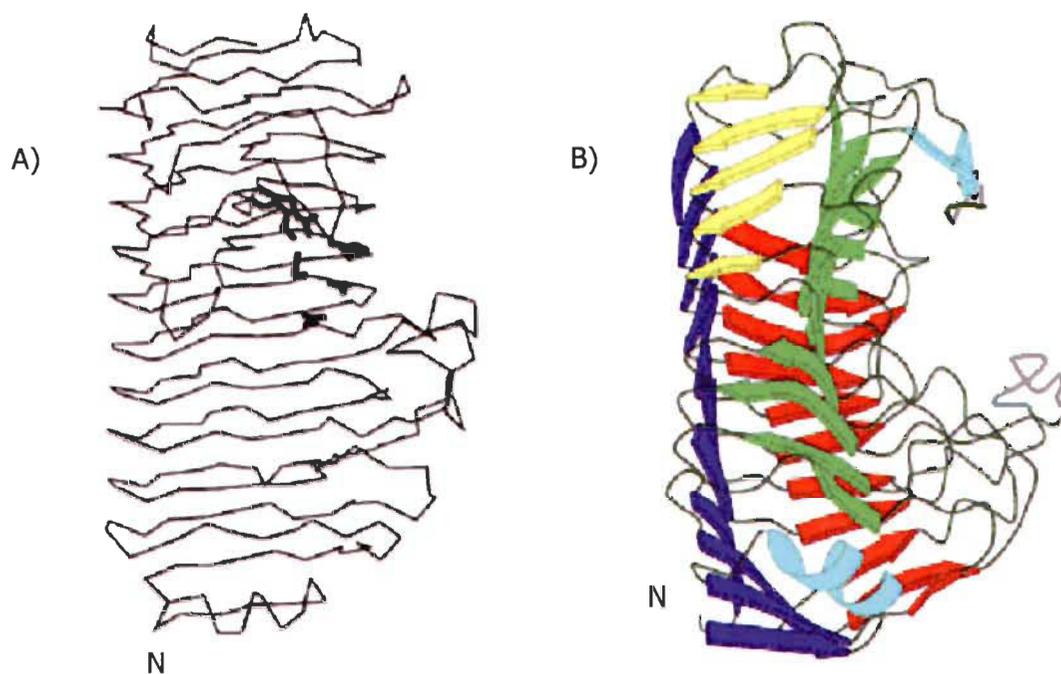


FIGURE 1.10 PG II d'*Aspergillus niger*. A) Chaîne de carbones α de la PG II avec, en gras, les chaînes latérales des résidus mutés (*Figure 1 modifiée de l'article de Armand et al. 2000*). B) Modèle présentant les structures secondaires de la PG II. (*Figure 1 modifiée de l'article de van Pouderooyen et al. 2003*).

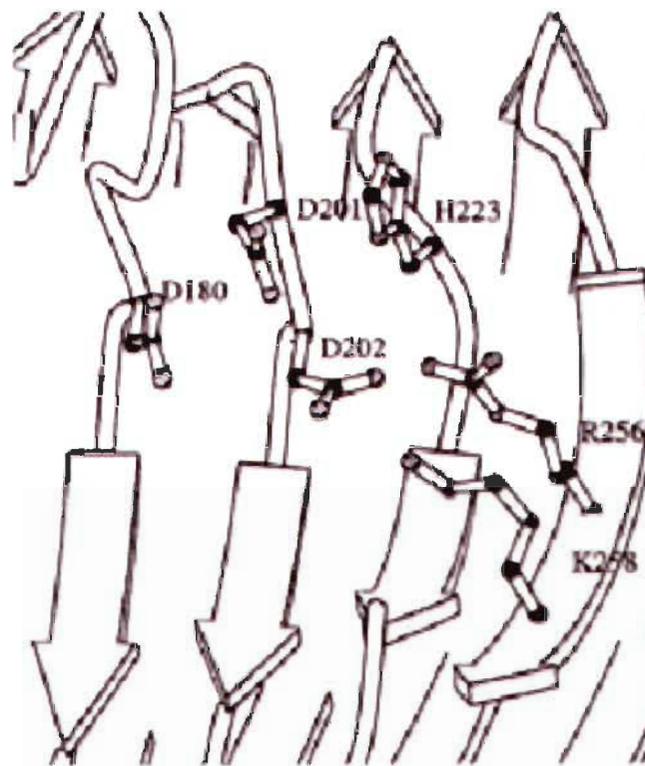


FIGURE 1.11 Localisation des résidus mutés dans le site actif de la PG II. (Figure 2 modifiée de l'article de Armand et al. 2000)

1.7.3 Les résidus impliqués dans la liaison du substrat

Le site de liaison d'un substrat, lorsque celui-ci est un polymère d'hydrates de carbones, est constitué de régions appelées « subsites ». Ces « subsites » sont les endroits où se lient les monomères de la chaîne carbonée. En général, les enzymes dépolymérisantes comme la PG ont plusieurs « subsites » et leur nombre varie de 2 à 14 (Thoma *et al.* 1971). Les « subsites » sont numérotés à partir du site catalytique, lequel est localisé entre les « subsites » -1 et +1.

Dans une étude parallèle à celle portant sur les résidus impliqués dans la catalyse, les membres de l'équipe de Jaap Visser et de Jacques Benen ont aussi découvert, en plus de l'arginine 256 et de la lysine 258, d'autres résidus de la PG II impliqués dans la liaison au substrat. Pour ce faire, ils ont étudié l'activité spécifique et les paramètres cinétiques de mutants de l'enzyme ainsi que leur mode d'action sur des oligomères de galacturonates ayant différents DP (Pagès *et al.* 2000). Le choix des résidus à muter et de leur remplaçant a été basé sur la structure 3D de la PGII avec l'aide de l'alignement des séquences des différentes PGs d'*Aspergillus niger* (voir figure 1.12). L'aspartate 183, et les tyrosines en position 291 et 326 sont conservés dans toutes les PGs d'*Aspergillus niger* (Stratilova *et al.* 1993 et 1996). À l'inverse, la méthionine 150 et la glutamine 288 sont présentes seulement dans la PG II. Dans les autres PGs, ces résidus sont remplacés respectivement par la glutamine et par le glutamate. L'asparagine en position 186 est remplacée par des résidus chargés dans les autres PGs, sauf dans la PG B où c'est une glutamine qui s'y trouve. Le glutamate en position 252, aussi présent dans la PG A, est remplacé par une glutamine ou une alanine dans les autres PGs. L'aspartate en position 282 est quant à lui conservé dans toutes les PGs sauf dans la PG B où c'est un résidu de lysine qui se trouve à cette position. C'est ainsi que les mutants M150Q, D183N, N186E, E252A, D282K, Q288E, Y291F, Y291L et Y326L ont été créés et caractérisés. Les positions des résidus mutés sur le site de liaison du substrat sont présentées par le stéréogramme de la figure 1.13.

```

      30          40          50          60          70
PGII DSC TFT...TAAAKA GKAKCSTITL NNIEVPAGTT LDLTGLTSGT
PGI  ASTC TFT...SASEASE SISSCSDVVL $$IEVPAGET LDLSDAADGS
PGA.  STC TFT...DAATASE SKTSCSDIVL KQITVPAGET LNLKDLNDGT
PGB.  S.C TFT...SASAAKS GKSSCSTITL DNIAVPAGET LDLTGLKKGTT
PGC  ATTC TFSGSEGASKASK SKTSCSTIYL SDVAVPSGTT LDLSDLNDGT
PGE  ATSC TFSGSEGASSASK SKTSCSTIVL SDVAVPSGTT LDLTDLNDGT
CON   C TF-----A--A-- ----CS-I-L --I-VP-G-T L-L-----

      71          80          90          100         110         120
PGII KVIPEGTTTF QYEEWAGPLI SMSGEHITVT GASGHLINCD GARWWDGKGT
PGI  TITPEGTTSF GYKEWKGPLI RFGGKOLTVT MADGAVIDGD GSRWWDGKGT
PGA.  TVTPEGTTTW EYEEWAGPLI RISGKDITVT QSSDAVLNCG GAKWWDGEGT
PGB.  TVIPEGTTTF GYKEWKGPLI SMSGTDITVK QASGAKINCD GARWWDGKGS
PGC  HVIPQGETTF GYEEWAGPLV RVSQTDITVE GESDAVLNCG GSRWWDGEGG
PGE  HVIFEGETHF GYEEWAGPLV SVSQTDTITV GADGAYLNGD GSRWWDGEGS
CON  -V-F-G-T-F -Y-EW-GPL- ---G---TV ----- G--WWD--G-

      121         130         140         150         160         170
PGII .SGKKKFKFFY AHGLCSSSIT GLNIKNTPLM AFSVQ.ANDIT FTQVTTINNAD
PGI  NGGRTKFKFFY IHDVEOSTFK GINIKNTPVQ AISVQ.ATNVH LNDFTIDNSD
PGA.  NGGRTKFKFFY AHDLEDSKIS GLYIKNTPVQ AISVE.SONLV IEDVTIDNSD
PGB.  NGGRTKFKFFY AHKLQSSIT GLKVYNTPVQ GFSIL.ADHLT ITDVTIDNSA
PGC  NGGRTKFKFFY AHDLSSITK SIYIENSPVQ VFSIDGSTDLT MTDITVDNTD
PGE  NGGRTKFKFFY AHDLSSITIS GIYIQNSPVQ VFSIDGSTYLT MEDITIDNTD
CON  --GK-KFKFF- -H---S--- ---I-N-P-- --S--- ---- --D-TI-N--

      171         180         190         200         210         220
PGII GDTQG.GHNTD AFDVGNVSVG NIIPKPVHNQ DDCLAVNSGE NIWFTGGTCI
PGI  GDDNG.GHNTD GFDISESTGV YISGATVKNQ DDCLAVNSGE SISFTGGTCS
PGA.  GDSEG.GHNTD GFDISESTYI TITGATVKNQ DDCLAVNSGE NIYFSGGTCS
PGB.  G.TSK.GHNTD AFDIGQSTYI TIDGATVYNQ DDCLAVNSGE HITFTNGYCD
PGC  GDTDDLAANTD GFDIGESTYI TITGAEIYNQ DDCLAVNSGE NIYFSAVCS
PGE  GD.DGEAANTD GFDIGDSTYI TITGANVYNQ DDCLAVNSGE NIYFSGGVCSS
CON  G-----NTD -FDI--S--I -I----V-NQ DDCLAVNSGE -I-F----C-

      221         230         240         250         260         270
PGII GGHGLSIGSV GDRSDNTVKN VTIEHSTVSN SENAVRIKTI SGATGSVSEI
PGI  GGHGLSIGSV GGRDDNTVKN VTISDSTVSN BANGVRIKTI YKETGQVSEI
PGA.  GGHGLSIGSV GGRDDNTVKN VTFIDSTVSD SENGVRIRKTI YDATGTVEDI
PGB.  GGHGLSIGSV GGRSDNTVND VTISNSKVLN SQNGVRIKTI YKGTGTVENV
PGC  GGHGLSIGSV GGRDDNTVKN VTFYDVNVLK SQQAIRIKTI YGDTGQVSEV
PGE  GGHGLSIGSV GGRSDNTVKN VTFYDSDIKS SQNGVRIKTI YGDTGQVSEV
CON  GGHGLSIGSV G-R--N-V-- VT-----V-- S---VRIKTI ---TG-V--

      271         280         290         300         310         320
PGII TYSNIQVSGI SDYGVVIEQD YEDGKPTGKP TNGVTIQDVK LESVTGQVSDS
PGI  TYSNIQVSGI TDYGVVIEQD YENGSPGTGP STGIPITDVT VDGVTGTLED
PGA.  TYSNIQVSGI SDYGVVIEQD YENGDPGTGP SNGVTISDVT LEDITGQVSDS
PGB.  KFEDITLSDI SKYGVVIEQD YENGSPGTGP TNGKVVEDIT FKKVTGQVSKS
PGC  TYHEIAFSDA TDYGVVIEQN YDDTSK..P TTGVPITDFV LENIVGTCEQ
PGE  TYKEITLSDI TDYGVVIEQN YDDTSES..P TDGITIEDFV LONVQGVSEV
CON  -Y--I-LS-- --YGVVIEQ- YE-----P --GV-I-D-- ---V-G----

      321         330         340         350         360
PGII GA.TEYIYLLCG SGSCSDWTWD DVKVTGGKKS TACKNFPSPA SC6
PGI  DA.TQVYIYLCG DGSCSDWTWS GVDLSGGKKS DKCENVPSCA SC6
PGA.  DA.VEYIYLCG DGSCSDWTWS GIDITGGETS SDCENVPSCA SCDQ.
PGB.  SG.TDIYIYLCG SGSCSNWTWS GVDVTGGKKS SKCKNVPSCA SCSQ.
PGC  DDCTEVYIACG DGSCSDWTWT GVSVTGGSVS DDCLNVPSCI SCDL6
PGE  SG.TNIVYVCG SDSCDWTWT DVDVTGGKKS SDCENVPDII SC
CON  -----IY--CG --SC--WT-- -Y---GG--S ---C-N-P---SC

```

FIGURE 1.12 Alignement des PGs d'*Aspergillus niger*. La numérotation est celle de la PG II. Les flèches bleues indiquent l'emplacement des mutations au site de liaison du substrat et les flèches rouges les résidus impliqués dans la catalyse. (Figure 2 modifiée de l'article de Pagès et al. 2001).

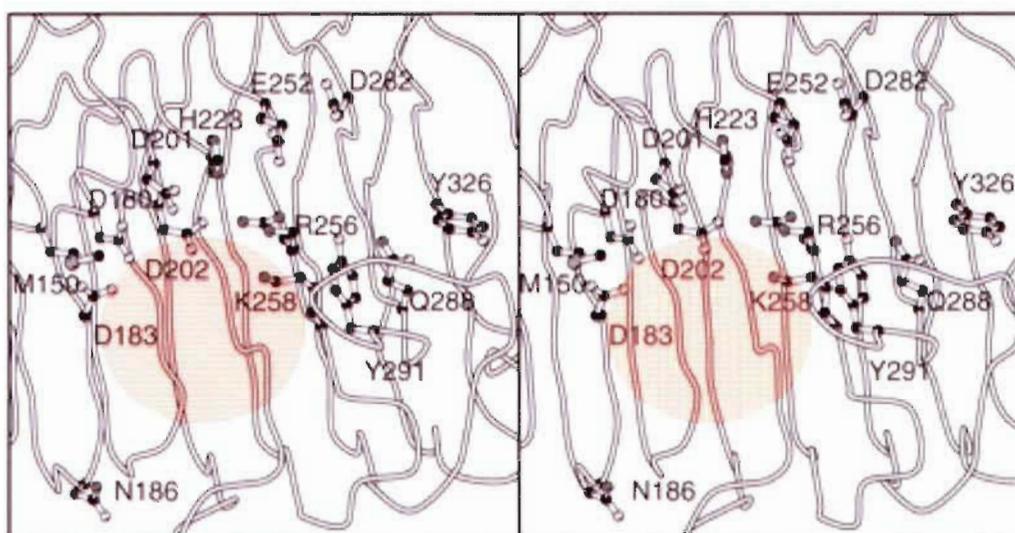


FIGURE 1.13 Localisation des résidus mutés au site de liaison avec le substrat. Les résidus dans le rond rouge sont ceux impliqués dans la catalyse. (*Figure 3 de l'article de Pagès et al. 2000*).

Le tableau 1.2 regroupe les valeurs de l'activité spécifique et celles des paramètres cinétiques obtenues par la caractérisation de la PG II et de ses mutants. Dans ce tableau, on peut entre autres remarquer que l'activité spécifique de la plupart des mutants est plus faible que l'activité de la PG II. Ces valeurs, appuyées des paramètres cinétiques et des résultats relatifs au mode d'action des mutants sur les différents oligomères de galacturonates, ont permis de tirer plusieurs conclusions par rapport aux rôles des résidus étudiés. Premièrement, les auteurs suggèrent un rôle important de la fonction hydroxyle de la tyrosine 291 dans la catalyse puisque la différence de ΔG avec la PG II sauvage est suffisamment importante pour croire en une liaison « ionogénique »²⁰ dans laquelle la tyrosine serait déprotonée. De plus, sa partie aromatique contribuerait à la stabilisation du substrat pendant la catalyse. Les résultats concernant la tyrosine 326, qui est elle aussi conservée dans toutes les PGs d'*Aspergillus niger*, indiqueraient au contraire qu'elle ne serait pas impliquée dans le site de liaison du substrat. Elle ferait plutôt partie du « subsite imaginaire »²¹ +3 dont il est question dans un article publié par la même équipe avant l'étude de Pagès *et al.* (Benen *et al.* 1999). En effet, la mutation n'a eu que très peu d'impact sur les paramètres cinétiques de l'enzyme. Les valeurs d'activité spécifique obtenues dirigent aussi notre attention vers les résidus de méthionine et d'aspartate aux positions 150 et 183. Dans le cas des deux mutations effectuées sur ces positions, l'activité de la PG II diminue considérablement ce qui indique des rôles importants pour ces deux résidus. Pour ce qui est de la méthionine 150, les auteurs suggèrent que le potentiel électrostatique généré par son atome de soufre pourrait être important dans la liaison du substrat. L'aspartate 183 servirait quant à lui au maintien du bon état d'ionisation de l'aspartate 180 impliqué dans l'activation de la molécule d'eau durant la catalyse.

²⁰ Terme employé par les auteurs dans l'article de Pagès *et al.* 2000 qui signifie probablement une liaison qui favorise l'ionisation de la tyrosine.

²¹ Terme employé dans la littérature traitant des « subsites » pour décrire des résidus qui sont positionnés par rapport au substrat de façon à laisser croire en une interaction, mais qui ne présentent pas une affinité suffisante envers ce dernier pour conclure en la possibilité d'une liaison.

	Activité spécifique	$V_{\max}(\text{app})$	$K_m(\text{app})$	K_{cat}/K_m	$\Delta\Delta G$
	<i>U/mg</i>	<i>U/mg</i>	<i>mg/ml</i>	<i>ml/mg·s</i> ($\times 10^3$)	<i>kJ/mol</i>
PG II	3900	4000	0.15	15.51	0
M150Q	1500	1700	0.4	2.47	4.4
D183N	500	500	0.5	0.58	7.9
N186E	3100	3000	0.5	3.49	3.6
E252A	2900	3000	0.6	2.91	4.0
D282K	2400	2500	0.3	4.85	2.8
Q288E	2400	2600	1	1.51	5.6
Y291L	30	35	1.9	0.012	17.5
Y291F	200	250	1.8	0.081	12.6
Y326L	4000	4200	0.2	12.2	0.6

TABLEAU 1.2 Activités spécifiques et paramètres cinétiques des formes sauvage et mutées de la PG II. L'activité spécifique et les constantes d'activité et de cinétique de la PG II et de ses mutants ont été déterminées dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 4.2, à 30 °C. Pour l'activité spécifique du PGA 2.5 mg/ml a été utilisé. Les valeurs de $K_m(\text{app})$ et de $V_{\max}(\text{app})$ ont été obtenues par régression non-linéaire en utilisant le programme Kaleidagraph. Les valeurs de $k_{\text{cat}}/K_m(\text{app})$ ont été calculées selon la constante de Michaelis $K_m(\text{app})$ et l'activité moléculaire $k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$. Les valeurs $\Delta\Delta G$ sont le delta de la différence d'énergie libre de l'état de transition du complexe PG II-PGA et de la différence d'énergie libre de l'état de transition entre le complexe mutant-PGA. (Tiré de l'article de Pagès et al. 2000).

En plus de permettre l'identification des résidus impliqués dans la liaison du substrat et la localisation des « subsites » auxquels ils sont associés, l'étude de Pagès *et al.* (2000) a aussi permis de confirmer l'orientation du PGA par rapport à l'enzyme. En effet, il a été déterminé, par la position des résidus impliqués dans la liaison du substrat et par l'étude du mode d'action des mutants sur les différents oligomères de galacturonates, que le PGA se lie à la PG en dirigeant son bout réducteur vers le C-terminal de l'enzyme. Les conclusions en regard à la localisation des résidus étudiés dans le site de liaison du substrat sont résumées dans le schéma présenté à la figure 1.14.

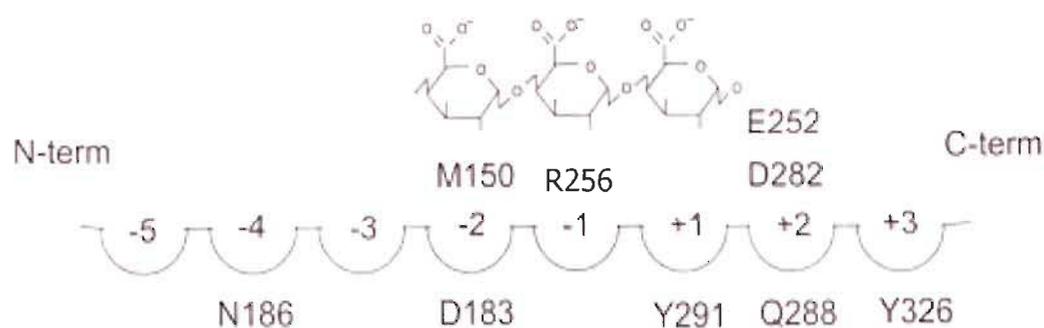


FIGURE 1.14 Site de liaison au substrat de la PG II. Le bout réducteur du substrat se lie vers le C terminal de l'enzyme. Un trimère de substrat est lié aux « subsites » -2, -1 et +1. Le site actif se trouve entre les « subsites » -1 et +1. Les résidus mutés (présentés avec le code d'acides aminés à une lettre) sont indiqués près des « subsites » auxquels ils sont assignés. Le « subsite » +3 est imaginaire. (*Schéma 1 modifié de l'article de Pagès et al. 2000*).

Finalement, les auteurs de l'article ont voulu vérifier si les mutations effectuées avaient un impact sur le profil d'activité de la PG II. Ils ont donc évalué l'activité de chaque mutant en fonction du pH ainsi que leur stabilité à 40°C. Les résultats de ces mesures d'activité ont démontré qu'aucune des mutations étudiées n'affecte la courbe de pH de

l'enzyme. Toutefois, la mutation de la tyrosine 326 contre une leucine a occasionné une perte de stabilité thermique de l'enzyme. Le graphique de l'activité résiduelle de la PG II et du mutant Y326L en fonction du temps d'incubation à 40°C, pH 4,2 est présenté à la figure 1.15.

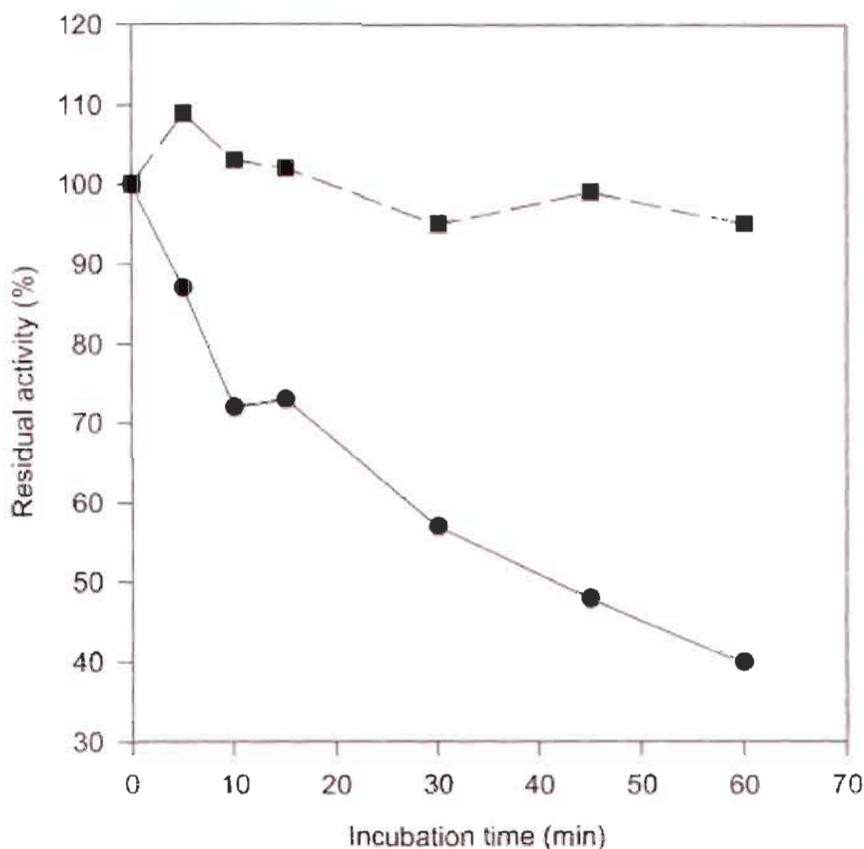


FIGURE 1.15 Stabilité thermique de la PGII et du mutant Y326L.

La PGII et son mutant Y326L ont été incubés à 40°C pendant 5, 10, 15, 30, 45 et 60min. L'activité spécifique résiduelle, exprimée en pourcentage de l'activité spécifique initiale, a été déterminée dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 4,2, contenant 2,5 mg/ml de PGA à 30 °C. Un contrôle a été effectué en déterminant la stabilité thermique d'un autre mutant E252A (résultats non montrés). ■, Activité de la PGII. ●, Activité du mutant Y326L. (Figure 2 tirée de l'article de Pagès et al. 2000).

1.8 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Le PGA est une molécule produite lors du blanchiment au peroxyde de la pâte TMP. C'est une matière organique colloïdale en suspension qui a elle seule peut constituer jusqu'à 50% de la contamination anioniques de la pâte TMP blanchie de cette façon. En effet, ces molécules polymériques chargées négativement entre en compétition avec les fines et les fibres de bois en s'associant et se complexant avec les agents de rétention utilisés lors de l'étape de la formation de la feuille de papier, cela implique donc une augmentation du besoin en agents de rétention afin de permettre la coagulation et la floculation souhaitée des composantes du papier. La PG, pour sa part, a la capacité de catalyser spécifiquement la réaction d'hydrolyse du PGA. La dégradation du PGA en plus petits polymères a pour effet de diminuer sa capacité à se lier aux agents de rétention. La quantité de coagulants et de floculants habituellement utilisée pour neutraliser les contaminants anioniques (charges interférentes) pendant l'étape de rétention du procédé papetier n'est ainsi plus nécessaire, entraînant, se faisant, une diminution des coûts des matières premières et de l'énergie. Malgré le fait que la PG a déjà été étudiée en profondeur sur le plan fondamental et pour certaines applications, notamment dans le domaine de la transformation alimentaire (Gainvors *et al.* 1994; Lang et Dornenburg 2000; Kashyap *et al.* 2001; Evans *et al.* 2002), seulement deux équipes de recherche ont travaillé sur cette enzyme pour son application au niveau des pâtes et papiers (Thornton 1994; Reid et Ricard 2000; Ricard et Reid 2004, 2005). Les travaux effectués prouvent l'utilité de l'enzyme pour favoriser la réaction impliquée et l'idée a même été brevetée en 1996 (Thornton 1994; Thornton *et al.* 1996). Ces travaux ont toutefois été effectués avec une enzyme commerciale impure dont les propriétés biochimiques ne sont pas optimales pour les conditions du procédé. Il est compréhensible, étant donné les coûts de la recherche, que les premiers travaux aient été conduits avec une enzyme accessible commercialement et peu coûteuse. Certaines considérations doivent toutefois être prises en compte dans ce cas. Premièrement, l'enzyme commerciale, telle que vendue dans sa formulation non-purifiée, contient aussi d'autres enzymes telles les cellulases et les hémicellulases qui, selon leur spécificité, peuvent entraver les autres réactions du procédé de fabrication de la pâte ou tout simplement détruire la matière première,

c'est-à-dire les fibres de bois. Deuxièmement, l'utilisation d'une enzyme dont les conditions optimales d'activité ne s'apparient pas avec celles du procédé a pour effet de diminuer l'efficacité de la réaction et d'en augmenter les coûts.

Ces deux considérations offrent de nouvelles avenues de recherches soit 1) de recommencer les essais d'activité avec une formulation d'enzyme ne contenant pas d'autres enzymes potentiellement contaminantes et 2) de trouver ou de développer une version de cette enzyme ayant des propriétés biochimiques lui permettant d'être encore plus efficace dans les conditions du procédé industriel. En utilisant les techniques de la biotechnologie, ces défis peuvent être relevés.

1.9 OBJECTIFS INITIAUX

Les objectifs de mon projet étaient les suivants :

- 1- Choisir une PG ayant une activité mesurable dans les conditions du procédé de fabrication du papier.
- 2- Développer un système d'expression de cette enzyme afin de la produire en quantité et en pureté suffisante pour sa caractérisation et pour des essais sur des échantillons de pâtes et cela en tenant compte des impératifs associés à la production industrielle.
- 3- Mettre au point des tests de détection et de mesure de l'activité enzymatique compatibles avec le besoin d'efficacité du contexte industriel.
- 4- Mettre au point des méthodes pour comparer avec efficacité et rigueur l'activité de différentes PGs (ou des mutants) en considérant les conditions propres à l'étape de rétention.
- 5- Tenter, au moyen de méthodes biotechnologiques, d'optimiser l'efficacité industrielle de la PG choisie.

CHAPITRE II

STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Bien que mes objectifs principaux soient au nombre de cinq, l'approche expérimentale que j'ai utilisée se résume en neuf étapes : 1- le choix de l'enzyme ; 2- l'obtention du gène de l'enzyme; 3- la conception d'un système d'expression; 4- l'expression et la purification; 5- la mise au point de tests de détection et de mesure de l'activité enzymatique; 6- la caractérisation initiale de l'enzyme; 7- l'optimisation de l'activité de l'enzyme par la création d'une banque de mutants; 8- l'identification des mutants actifs et la vérification de leur expression; 9- la comparaison des mutants avec la PG sauvage via des essais pilotes. Voici ces neuf étapes de façon plus détaillée:

2.1 CHOIX DE L'ENZYME

La première étape du projet consistait à choisir, parmi toutes les PGs répertoriées dans la littérature, celle(s) qui possède(nt) les propriétés qui se rapprochent le plus de celles recherchées, i.e. soit les propriétés qui confèrent à l'enzyme la meilleure activité dans les conditions du procédé industriel (plus spécifiquement à 55°C et au pH 5,3). En effet, selon son origine, une enzyme peut avoir une activité différente selon son environnement. Le choix de la PG devait donc être effectué en considérant son activité spécifique ainsi que le pH, la température et les autres conditions dans lesquelles son activité est optimale. Les particularités liées à son clonage et à son expression (usage de codons optimaux, nécessité d'une séquence signal, compatibilité entre le gène et l'hôte); les propriétés post-transcriptionnelles (glycosylations, ponts disulfures, maturation de la protéine) ainsi que la facilité d'obtention du gène de l'enzyme devaient aussi être étudiées afin d'accroître les chances de réussite du projet. Finalement, les autres informations pertinentes comme l'existence de brevets et les recherches déjà publiées devaient être considérées afin de s'assurer de la pertinence du projet. En effet, d'un point de vue industriel, le fait qu'une enzyme soit brevetée pose un problème quant à la liberté d'utilisation de cette enzyme. Le producteur

utilisant une enzyme brevetée, dans le cas présent AgroTerra Biotech, serait ainsi probablement obligé de défrayer le coût d'une licence et devrait se soustraire aux conditions d'exploitation qui y sont reliées, ce qui diminuerait nécessairement sa marge de profit. De leur côté, les efforts de recherche et de développement fournis pour l'amélioration de l'enzyme contribueraient à la valorisation de l'entreprise auprès des investisseurs de capitaux de risque en ce sens qu'elle aurait la pleine possession de la propriété intellectuelle liée à l'enzyme et sa production. D'un point de vue plus académique, il fallait aussi s'assurer que le choix de l'enzyme offre aussi la possibilité de développer des avenues encore inexplorées, c'est-à-dire pas encore publiées, puisque c'est là la première exigence pour l'obtention d'un doctorat.

2.2 OBTENTION DU GÈNE DE L'ENZYME

La seconde étape visait à se procurer le ou les gènes qui permettront l'expression de variants sauvages de la ou des PG(s) qui répondent le mieux aux critères de sélection définis à l'étape précédente du projet. L'obtention des gènes peut se faire de trois différentes manières soit 1) par l'intermédiaire d'un donateur généreux possédant l'ADN complémentaire à l'ARN utilisé pour la traduction de la protéine; 2) par l'isolation du gène directement à partir de l'organisme porteur à l'aide de la technique conventionnelle de PCR avec des oligomères flanquant la séquence codante située sur l'ADN génomique de l'organisme (Sakai *et al.* 1988); ou 3) par la synthèse du gène (ADNc) qui elle peut être effectuée en sous-traitance ou planifiée et effectuée au laboratoire à partir de l'hybridation de plusieurs oligos selon la technique du PCR récursif (Prodromou et Pearl 1992). Puisque nous n'avons obtenu le support d'aucun donateur généreux, les approches 2 et 3 ont été retenues pour obtenir les gènes désirés. Les détails expérimentaux seront donnés au chapitre 3 : Matériel et méthodes.

2.3 CONCEPTION D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION

La troisième étape consistait à choisir et à préparer un ou des nouveau(x) système(s) d'expression de l'enzyme. Le choix du ou des systèmes d'expression dépend du taux

d'expression souhaité (échelle analytique ou grande échelle), du type de purification souhaité et principalement des caractéristiques biophysiques de la protéine choisie telles sa solubilité, la présence de ponts disulfures, de sites de glycosylation ou de toutes autres modifications post-transcriptionnelles nécessaires à son activité ou à sa fonction. Le système d'expression consiste en fait en un plasmide dans lequel le gène codant pour l'enzyme est inséré. Cette insertion se fait par clonage avec l'aide, entre autres, d'enzymes de restriction qui scindent le plasmide et le gène de façon spécifique pour ensuite permettre leur ligation. Des modifications peuvent avoir à être apportées au plasmide et aux extrémités des gènes isolés afin de permettre leur union. Ces modifications impliquent différentes techniques de biologie moléculaire dont la mutagenèse dirigée, le clonage et la transformation cellulaire. Le plasmide est ensuite introduit par transformation dans un organisme hôte possédant le matériel physiologique nécessaire à la production fonctionnelle de la protéine. Le type d'expression souhaité (expression intracellulaire ou sécrétion) ainsi que l'organisme hôte (bactéries, levures, fungi, plantes) servent de base au choix du système.

2.4 EXPRESSION ET PURIFICATION

Cette étape consiste tout d'abord à produire l'enzyme au moyen des systèmes d'expression préparés lors de l'étape précédente. Le taux d'expression de l'enzyme d'intérêt dans le système de production est un facteur considérable dans la rentabilité de son utilisation industrielle, c'est pourquoi l'expression devrait être optimisée de façon à produire le plus de protéines possible par litre de culture et ce dans un minimum de temps afin de réduire les coûts au gramme. Plusieurs facteurs tels que la composition du milieu de culture, son pH, la concentration de l'agent inducteur et le taux d'oxygénation du milieu entrent en jeu dans l'expression des protéines. Cette étape implique donc l'optimisation de l'expression de l'enzyme.

Cette étape implique aussi la mise au point de la purification de l'enzyme par rapport au milieu de croissance cellulaire et par rapport aux autres protéines afin de pouvoir effectuer, avec le meilleur contrôle possible, les tests de caractérisation biophysique de

la molécule. La mise au point de la purification d'une protéine peut être une entreprise très compliquée. Elle peut impliquer plusieurs étapes de chromatographies (exclusion de taille, échange ionique, affinité) qui doivent toutes être maîtrisées dans le processus. Dans le cas du présent projet, l'enzyme d'intérêt n'est pas soumise à des réglementations particulières au niveau de sa pureté puisque son utilisation n'est pas pour des fins médicales ou nutritives. Le degré de pureté de l'enzyme n'aura donc pas à être de 99%. La purification sera donc conduite de manière à réduire au maximum les coûts reliés tout en obtenant un produit de qualité contrôlée. Une série de filtrations membranaires et tangentielles éliminant en première étape les débris cellulaires et en seconde étape les grosses protéines; suivie d'un changement de tampon pour la conservation et de la concentration de la molécule d'intérêt si nécessaire seront probablement suffisantes.

La production de l'enzyme peut être effectuée au laboratoire à des échelles allant de 5 à 15mL ou de 1 à 2 litres de culture cellulaire. Ces échelles sont généralement suffisantes pour la caractérisation initiale des protéines. Dans le cadre de ce projet, il faut aussi tenir compte que l'enzyme devra être produite en assez grande quantité afin de pouvoir effectuer les essais de son activité sur des modèles utilisés en pâtes et papiers et, éventuellement, à l'échelle pilote.

2.5 MISE AU POINT DE TESTS DE DÉTECTION ET DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Parmi les tests de détection utilisés dans la littérature pour la détection et le dosage de l'activité de la PG, on retrouve :

2.5.1 Le test de détection sur gélose

Dans ce test, le substrat de l'enzyme (PGA) est incorporé à la gélose sur laquelle les micro-organismes susceptibles de produire l'enzyme sont inoculés. La dégradation du substrat polymérique par l'enzyme permet la coloration de la région de la gélose par le rouge de ruthénium (McKay 1988). Le principe de la coloration est basé sur la capacité

du rouge de ruthénium à se lier sélectivement entre l'oxygène du groupement carboxyle d'une molécule (dans ce cas-ci, l'acide galacturonique) et l'oxygène du groupement hydroxyle (OH) d'une autre molécule qui se trouve à proximité (dans ce cas-ci, le monomère voisin qui est encore lié (par l'autre extrémité) à la chaîne du PGA (Hou *et al.* 1999).

2.5.2 Le zymogramme

Ce test permet de déterminer les conditions (température, pH, compositions du milieu réactionnel) dans lesquelles une enzyme est active. Il consiste à faire migrer la solution de protéines dans un gel de polyacrylamide non-dénaturant contenant le substrat de l'enzyme, puis à incuber le gel dans une solution représentative du milieu à étudier. La coloration du gel au rouge de ruthénium permet de détecter l'activité et la présence de l'enzyme (Cruickshank et Wade 1980).

2.5.3 Le test de turbidimétrie

Ce test implique la formation de complexes entre le PGA, un polymère anionique, et le Bromure de cétyl-triméthyl-ammonium (CTBA), un sel quaternaire. La dépolymérisation du substrat par l'enzyme diminue la quantité de complexes et diminue ainsi la turbidité de la solution (Avigad et Milner 1967).

2.5.4 Le test de digestion du concombre

Dans ce test le taux de dégradation du concombre qui contient beaucoup de pectine (constituée entre autre d'acide polygalacturonique) permet d'avoir une idée relative de l'activité de l'enzyme (Mussell et Morre 1969).

2.5.5 Les tests colorimétriques

Ces tests impliquent deux réactions : la réaction enzymatique qui peut être conduite dans les conditions désirées; suivie de la réaction colorimétrique où l'acide galacturonique (un sucre réducteur) produit lors de la dégradation du PGA par l'enzyme, est dosé par spectrophotométrie. Les tests colorimétriques utilisés dans la littérature portant sur les PGs sont principalement basés sur la réduction, par le sucre réducteur, du Cu^{2+} qui réagit à son tour avec un agent chromogénique pour former un complexe coloré (Woods et Mellon 1941; Nelson 1944; Somogyi 1952; Nelson 1957; Dygert *et al.* 1965; Milner et Avigad 1967, Stephen *et al.* 1974).

Quoique ces tests aient déjà été conduits par des équipes étudiant les PGs (Barnby *et al.* 1990; Blanco *et al.* 1994; Gainvors *et al.* 1994; Gainvors et Belarbi 1995; Blanco *et al.* 1998, 1999; Siekstele *et al.* 1999; Gainvors *et al.* 2000; Jia et Wheals 2000); cela ne signifie pas qu'ils peuvent être reproduits facilement. Ces tests devaient donc être essayés et adaptés afin qu'ils puissent être utilisés pour sonder l'activité enzymatique dans différentes conditions de pH, de températures et de force ionique, en fait dans les conditions qui correspondent à celles du procédé industriel pour lequel l'enzyme est dédiée. Une étude comparative devait donc être effectuée sur ces différents tests afin de déterminer lesquels sont les plus efficaces en terme de durée, de facilité, de toxicité et de coûts. De plus, la possibilité d'automatiser ces tests en vue d'accélérer la caractérisation ou de faire du criblage à haut débit ("high-throughput screening") devait être considérée.

2.6 CARACTÉRISATION INITIALE DE L'ENZYME

Cette étape implique l'analyse de l'activité spécifique et des conditions optimales de catalyse (pH et température) des enzymes exprimées afin d'étudier les changements apportés par leur optimisation.

2.6.1 Mesure de l'activité enzymatique

Les enzymes sont généralement comparées sur la base de leur activité spécifique. L'activité spécifique est le nombre d'unités²² contenues dans un milligramme d'enzyme. La comparaison des activités spécifiques des PGs sauvages avec leurs mutants, impliquerait donc que chaque PG soit purifiée et quantifiée. Dans un contexte nécessitant la caractérisation de plusieurs mutants, il était impensable de fonctionner de la sorte. Il fallait donc fonder notre comparaison sur une autre base, sans pour autant négliger la précision. La comparaison de l'activité sur la base du volume de surnageant de culture cellulaire était aussi inapproprié, puisque chaque mutant est produit individuellement, et même si les conditions de culture sont identiques, des variations dans le taux d'expression de la PG et des autres protéines du milieu sont possibles. Par exemple, il est impossible de contrôler parfaitement l'inoculation du milieu. De plus, la simple transformation d'un micro-organisme, même avec la même construction génétique peut occasionner des taux d'expression différents. Il faut ajouter que l'utilisation de différents systèmes d'expression implique nécessairement des différences quant aux taux et aux profils d'expression des protéines. L'activité des différents mutants a donc été comparée sur la base d'une dilution effectuée suite à un test de dosage initial.

2.6.1.1 Le dosage initial de l'activité

Le test de dosage initial de l'activité est effectué en mesurant l'activité obtenue pour plusieurs dilutions de chaque mutant dans des conditions identiques. La dilution qui donnait une activité de $0,75 \pm 0,25$ U/mL était conservée pour tous les autres tests de caractérisation. Les conditions utilisées pour le dosage initial ont été choisies de manière à favoriser la détection d'une activité enzymatique, tout en tenant compte des objectifs de l'optimisation. En effet, la plupart des PGs sont actives entre 20°C et 50°C et entre les pH 3,5 et 5,5. Les objectifs d'optimisation vont surtout vers des températures élevées (de 50°C à 70°C) et des pH neutres (pH 5 à 6). Les conditions pour le dosage initial de l'activité ont donc été établies à 50°C, pH 5,0.

²² Une unité étant le nombre de micromoles de produit libéré par minute.

2.6.1.2 Les tests d'activité

Les tests d'activité ont été effectués dans des combinaisons de pH et de température allant de 4,0 à 6,5 et de 35°C à 70°C. Dans certains cas différents tampons et forces ioniques ont aussi été étudiés.

2.6.1.3 Les tests de stabilité

Les tests de stabilité peuvent permettre de déterminer la longévité des enzymes dans certaines conditions. Le plus souvent par contre, ils sont utilisés afin de déterminer dans quelle mesure l'activité d'une enzyme est affectée suite à son exposition à un environnement potentiellement déstabilisant. Les tests de stabilité utilisés pour la caractérisation enzymatique initiale impliquaient donc l'incubation des enzymes dans différentes conditions, suivie de la mesure de leur activité résiduelle dans les mêmes conditions que le dosage initial soit 50°, pH 5,0.

2.6.2 Mesure de l'action de l'enzyme sur la pâte

Des essais enzymatiques ont aussi été effectués directement sur la pâte de papier afin d'étudier l'action de l'enzyme dans le milieu de réaction pour lequel elle a été optimisée. Le test de demande cationique de la pâte a été utilisé pour mesurer cette action.

2.6.2.1 Le test de demande cationique

Le test de demande cationique de la pâte est la mesure de la quantité de matières colloïdales en suspension, chargées négativement, par unités de volume ou de poids. Cette mesure est effectuée par titrage à l'aide d'un détecteur de charges particulières (Streaming current detector) et d'un titreux (Gerdes 1966). La détection des charges particulières est basée sur la différence de potentiel créée entre les deux électrodes du détecteur lorsque les colloïdes chargés sont déplacés mécaniquement dans la cellule de

mesure. Un schéma de l'appareil est présenté à la figure 2.1. Dans une solution aqueuse, les ions tendent à se répartir autour des particules colloïdales chargées de manière à atteindre un équilibre dynamique. Ainsi, il se forme une couche d'ions positifs autour d'un colloïde chargé négativement (et vice versa) c'est la couche de Stern (Stern layer). D'autres ions positifs sont nécessairement attirés vers le colloïde, mais repoussés par la couche de Stern et des ions négatifs sont attirés par les ions positifs de la couche de Stern mais repoussés par le colloïde. Cet équilibre entre les ions positifs et négatifs à l'extérieur de la couche de Stern s'appelle la couche diffuse. Graduellement, la concentration d'ions positifs dans la couche diffuse diminue au fur et à mesure que leur distance avec le colloïde augmente jusqu'à ce que la concentration d'ions soit la même que celle en équilibre dans l'eau. Lorsque le piston de l'appareil est mis en mouvement, il y a destruction de l'équilibre des charges et les colloïdes chargés se dirigent vers l'électrode de charge opposée et y adhèrent momentanément tandis que les ions de charge inverse sont balayés vers la seconde électrode et font de même. Cette séparation momentanée des charges à la surface du mur de la cellule de mesure génère ainsi une différence de potentiel mesurable à l'intérieur du fluide (Elicker *et al.* 1992; Waker *et al.* 1996; Edney 2005 et sans date (post 2005)).

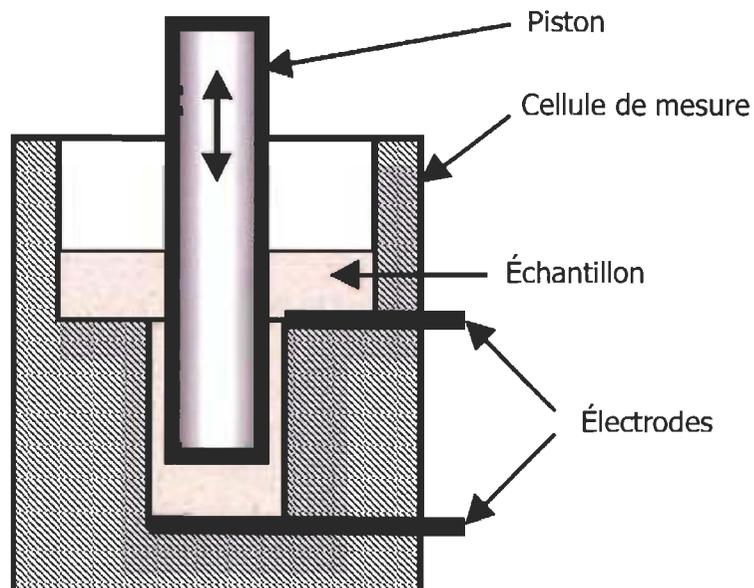


FIGURE 2.1 Schéma d'un détecteur de charges particulaires.

Le détecteur de charges particulaires Mütek présenté à la figure 2.2 est l'appareil standard utilisé à cet effet et il est disponible au Centre Intégré sur les pâtes et papiers et à l'usine de la Kruger à Trois-Rivières. Il est généralement employé en usine pour contrôler le dosage des agents de rétention lors du traitement de la pâte ou du traitement de l'eau potable (Dentel et Kingery 1989). Les titrants utilisés sont le poly-DADMAC (poly-diallyldiméthyl-ammonium chloride), un polymère cationique, ou le PESNa (polyéthylène sulphonate de sodium), un polymère anionique, à une concentration de 1mN. L'ajout de l'enzyme devrait diminuer le besoin en cations (coagulants et floculants cationiques) de la pâte, puisque sa fonction est de dégrader le PGA (qui est colloïdal) en particules plus petites sur lesquelles de plus petites (sinon aucune) couches de Stern se produiront. La différence de potentiel mesurée par l'appareil, donc la demande cationique, sera ainsi moins importante lorsque le PGA sera dégradé par l'enzyme puisque la disposition des ions en solution sera plus uniforme avec moins de colloïdes et les charges seront ainsi moins sujettes à la séparation mécanique.

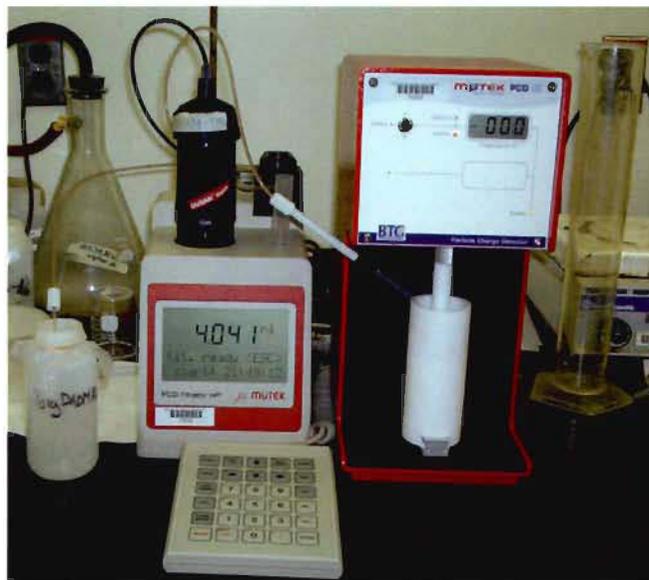


FIGURE 2.2 Le détecteur de charges particulaires Mütek.

2.7 OPTIMISATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME PAR LA CRÉATION D'UNE BANQUE DE MUTANTS

La fonction et la stabilité d'une enzyme sont intimement reliées à sa structure tridimensionnelle. Pour simplifier la chose, c'est l'organisation spatiale des résidus des acides aminés de la protéine qui va lui permettre de se lier à son substrat, de catalyser la réaction et de résister à son environnement. La structure tridimensionnelle de la protéine est quant à elle dépendante de sa structure primaire. En effet, la séquence des acides aminés de la chaîne polypeptidique engendre des interactions moléculaires pour la plupart non-covalentes²³ qui sont intrinsèques à la protéine ou influencées par le solvant. On parle entre autres des forces de Van der Waals, des angles de torsion, de l'encombrement stérique, des longueurs de liaisons, des liaisons hydrogène, des liens électrostatiques et des interactions hydrophobes. Des modifications au niveau de la chaîne polypeptidique ont donc le potentiel de changer les interactions moléculaires de la protéine, qui elles, les plus légères soient-elles, peuvent avoir un grand impact sur son activité et sa stabilité. La littérature scientifique abonde d'exemples à ce sujet. On peut entre autres citer les cas de la 1,3-fucosyltransferase où la mutation d'acides aminés dans son domaine alpha a affecté son activité et ses Km vis-à-vis ses substrats (Jost *et al.* 2005); de la beta-1,4-galactosyltransferase I bovine où la mutation R228K a augmenté son activité glucosyltransferase (Ramakrishnan *et al.* 2005); de la tyrosine hydroxylase de rat où la mutation de sérines pour des glutamates a eu un effet sur son activité et sa stabilité (Royo *et al.* 2005); et finalement, de la protéine MB-1 dont la stabilité a augmenté considérablement par la simple mutation de sa tyrosine 62 par un tryptophane (Gagnon *et al.* 2000).

Considérant que la fonction et la stabilité d'une enzyme reposent sur sa structure tertiaire et donc primaire, son efficacité peut être optimisée en modifiant sa chaîne polypeptidique. Deux stratégies principales peuvent être employées pour effectuer ces modifications, soit : l'évolution dirigée ou le design rationnel. Dans les deux cas, il faut muter la séquence d'acide désoxyribonucléique codant la protéine d'intérêt de manière à induire des modifications au niveau de sa séquence primaire. Les gènes obtenus sont ensuite intégrés à des plasmides, lesquels sont introduits dans des cellules hôtes

²³ Les ponts disulfures sont l'exception.

en vue de l'expression des nouvelles enzymes. Voici une explication simplifiée de ces méthodes et les raisons qui ont menées à mes stratégies pour l'optimisation.

2.7.1 L'évolution dirigée

L'évolution dirigée est un ensemble de méthodes qui imitent et accélèrent le processus d'évolution naturelle d'une protéine afin de trouver des variants avec des propriétés désirées. La PCR à haut taux d'erreurs (error-prone PCR), la PCR sexuelle (DNA shuffling) et le procédé d'extension par appariement partiel (StEP) (Claveau *et al.* 2004; Leung *et al.* 1989; Stemmer 1994; Zhao *et al.* 1998) font partie de ces méthodes et peuvent ainsi être très efficaces pour générer une banque de mutants. Des mutations aléatoires et/ou semi-contrôlées à un taux de (0,4% à 1%) sont généralement générées par ces techniques et une banque contenant des millions de gènes mutés peut être créée. Les micro-organismes hôtes pour l'expression de l'enzyme sont transformés avec cette banque de mutants et leurs produits d'expression sont soumis à une sélection par criblage. Plusieurs équipes de recherche ont réussi à démontrer l'efficacité de ces méthodes pour obtenir des variants plus performants ou stables de leur enzyme d'intérêt; c'est le cas des groupes de Stephens *et al.* (2007), de Minagawa *et al.* (2007) et de Khan *et al.* (2005) pour n'en citer que trois. L'évolution accélérée semblait être la façon plus appropriée pour essayer d'optimiser la PG. Cependant, ces techniques d'évolution, quoique fonctionnelles avec des gènes plus courts que ceux des PGs choisies, n'ont pas pu être maîtrisées à temps dans notre équipe de recherche pour qu'elles puissent être employées pour son optimisation. Encore une fois, le contexte industriel de la présente recherche s'est imposé. Des mutants caractérisables devaient être obtenus sans délai. Une approche rationnelle a donc été utilisée pour générer la banque de mutants à caractériser.

2.7.2 Le design rationnel

Le design rationnel, comme son nom l'indique, implique la prédiction rationnelle des mutations à effectuer sur la molécule d'intérêt de manière à ce qu'elle adopte le comportement désiré. Il se fait généralement avec le soutien de la bioinformatique, de

la géométrie et des probabilités à l'aide de techniques qui permettent de visualiser les molécules en trois dimensions (la modélisation moléculaire) et/ou de les comparer. Dans la méthode de modélisation moléculaire, le modèle tridimensionnel obtenu par la cristallisation de la protéine d'intérêt ou de son complexe avec le substrat sert de base pour étudier le site de liaison de l'enzyme à son substrat ou son site de catalyse. Cependant, cette technique sert surtout à expliquer les impacts fonctionnels occasionnés par les mutations et non à les prédire. Jusqu'à présent, l'usage unique de cette méthode pour optimiser l'activité d'une protéine n'a pas donné de résultats convaincants, du moins il ne semble pas y avoir eu de publication à cet effet. Le choix des mutations à effectuer sur nos PGs a donc été fondé sur les connaissances existantes des relations structure *vs* fonction de l'enzyme avec l'aide de la technique bioinformatique de l'alignement de séquences.

2.8 IDENTIFICATION DES MUTANTS ACTIFS ET VÉRIFICATION DE LEUR EXPRESSION

Avant de produire et de purifier les enzymes provenant de la banque de mutants, les clones actifs ont été identifiés lors d'une pré-sélection effectuée sur le milieu de culture cellulaire. En effet, on peut conclure que l'enzyme mutée est exprimée et active si de l'acide galacturonique (GA) est détecté dans le milieu de culture après que le micro-organisme transformé ait été mis en présence du PGA. L'expression des PGs est ensuite vérifiée sur gel de poly-acrylamide dénaturant.

2.9 COMPARAISON DES MUTANTS AVEC LA PG SAUVAGE VIA DES ESSAIS PILOTES

Après l'identification des clones actifs, l'activité et la stabilité des mutants doivent être comparées avec celles des PGs sauvages dans le but de faire ressortir les mutants plus performants. Pour ce faire, des essais pilotes dans un environnement se rapprochant le plus possible de celui ciblé pour l'utilisation des enzymes, soit la pâte au pH et à la température recherchée, doivent être effectués.

Dans le chapitre qui suit, les méthodes employées pour répondre aux exigences de cette approche expérimentale seront expliquées en détails.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 CHOIX DES PGs

Le choix des PGs a été effectué après une étude exhaustive de la littérature (plus de 100 références consultées) et avec l'aide de la banque de données Internet sur les enzymes « Brenda ». Les enzymes de trois micro-organismes différents ont été retenues, soient celles de deux levures *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) et *Kluyveromyces marxianus* (*Km*) et celle du fungus *Stereum purpureum* (*Sp*). Les raisons de ces choix seront expliquées en détails au chapitre 4 portant sur les résultats et discussion.

3.2 OBTENTION DES GÈNES DE L'ENZYME

3.2.1 Isolation des gènes des PGs de *Sc* et de *Km* par PCR

Les gènes des PGs de *Sc* et de *Km* ainsi que leur séquence signal ont été isolés des souches CECT-1389 de *Saccharomyces cerevisiae* et Y-49 de *Kluyveromyces marxianus* (ATCC) cultivées dans du YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose). Les oligonucléotides (ci-après nommés oligos) suivants ont été utilisés pour la PCR sur l'ADN de *Sc* : 5' GACAAACGCAATGATTTCTG 3' et 5' TCCTGCATCTTTGTTCTGTT 3' et les oligos suivants ont été utilisés pour isoler le gène de *Km* : 5' AAAATGTTATTTCAGCAACACC 3' et 5' AAAAAGAGACGCTTAACAGAA 3'. Le design de ces oligos a été fait à partir des séquences des gènes *PGU1* de *Sc* et *epg1* de *Km* (numéros d'accèsion NC_001142 et AJ000076). L'ADN présent dans le surnageant des levures lysées avec du laurylsulfate de sodium (SDS) 0,25% a été utilisé comme gabarit pour les PCRs. La polymérase Taq de New England Biolabs a été utilisée pour l'amplification. Un premier séquençage a été effectué avec les mêmes oligos. Un deuxième séquençage a été effectué pour confirmer la séquence des extrémités des gènes avec des oligos se situant au centre

des deux gènes : Sckm1 5' TCAACTCTGACAACGG 3' et Sckm2 5' CCGTTGTCAGAGTTG 3'. Les oligos ont été obtenus de chez BioCorp Inc., Montréal et les séquençages effectués au SUCOF de l'Université Laval.

3.2.2 Synthèse du gène de la PG de *Sp* par PCR récursif

Un gène codant pour la PG I mature de *Sp*²⁴, a été synthétisé selon la méthode du PCR récursif mise au point par Prodromou et Pearl (1992). L'ARNm du gène *ccpg1*, correspondant au numéro d'accèsion D45072²⁵, a été utilisé comme gabarit pour la préparation des oligos. Ses codons ont toutefois été optimisés pour tenir compte des préférences des hôtes prévus pour l'expression soit *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli*. Les sites EcoRI et NotI (soulignés) ont été incorporés aux extrémités 5' et 3' respectivement afin de permettre le clonage du gène dans un plasmide. Les oligos suivant ont été utilisés : F₀ - 5' TAACCGGAATTCGCTACTT 3'; F₁ - 5' TAACCGGAATTCGCTACTTGACAGTCAAATCTGTCGATGATGCCAAAGACATTGCAGGCTGCAGTGCAGTTCCTAAACGG 3' ; F₂ - 5' GCTACAGTTACCATGGCTGGCGATATTACATTCGCAAAAACCACATTGGACGGTCCATTGTTTACTATTGACGGGACGGGT 3' ; F₃ - 5' GTATTGGGATGGCAAAGGAACCAACAATGGCACTCACAAGCCTCACCCATTCTTAAAGATTAAGGATCTGGTACCTACAAG 3' ; F₄ - 5' CCGACGCACACTTAACCTTGGATGGGATCACTGTCGATGATTTTGCTGGAGACACCAAAAATTTGGGTCACAACACTGATGGC 3' ; F₅ - 5' CCAAGATGACTGTATCGCAATTAATGATGGAATAACATTAGATTTGAAAATAACCAATGCTCTGGTGGCCATGGAATTTCTAT 3' ; F₆ - 5' GTAACACGGTTACCAATCCATGTACGGTGTGTCAGGATCAAAGCCCAAAGAACTGCTACCTCTGCCTCTGTGTCCGGCGTGA 3' ; F₇ - 5' GTCTTACCCTGACGATGTTGGAAACCCTGGGACTGGTGGCCATTTTCTGATGTCAACTTTACTGGAGGTGCCACTACAATC 3' ; F₈ - 5' CTGCTCTGGAATTTGGAATTTGGTCCCAACTGACTGTCACCGGTGGAAAGGCTGGTACAATTAAGTCTGATAAGGCCAAGATC 3' ; R₈ - 5' GCCATGGTAACTGTAGCGCCCTTGTGCGGATTCACACTAAGGTATTCCAGCAGGTACAGTAAATCCGTTTAGAGTAACCGC 3' ; R₇ - 5' CCTTTGCCATCCCAATACAAAGCGCCGTTTCCATCGAAGATATGATCGGCTCCAACAAAGTTGATACCCGTCCTCAATAG 3' ; R₆ - 5' GGTAAAGTGTGCGTCCGGTGGGCCAACTGAAATTTGCTTGTGTCAGGACTATTCAAAACCTCGAATTTCTTGTAGGTACCAGATCC 3' ; R₅ - 5' GCATAACAGTCACTTGGTTCTTAACAATACAATTTTGAATAGTTACATTGTTGGCAGAGACGTCGAAGCCATCAGTGTGTGAC 3' ; R₄ - 5' GATCTGGTAACCGTGTACCTTTAATGACAACATTAGAAACATGTTTGGCAGTGGCGATTGAACCAATAGAAATTCATGGCCAC 3' ; R₃ - 5' CATCGTCAGGGTAAGACTGTGAAATCAAGACGCCGATTTAGCAA

²⁴ La PG I de *Sp* subit des modifications post-traductionnelles lors desquelles sa séquence signal et 44 acides aminés à son bout bout C-terminal son enlevés (Shimizu *et al.* 2000).

²⁵ Séquence obtenue par Miyari *et al.* 1997

TTCCAGAGATCGTGTGGCGTCATAGGTCACGCCGGACACA 3' ; R₂ - 5' TTCCAATTTCCAGAGCAGTTACCACAT TCAACAGTGACTCTAGTTGCAGCATTATTGACCTTGATTGTAGTGGCACCTC 3' ; R_{1N} - 5' TAACCGGAATTCGCT ACTTGCGGCCGCTCACAAGTACTGGCCACCAGTGATCTTGGCCTTATCAGAC 3'. Les conditions utilisées pour l'amplification sont les suivantes : 5 cycles de 1 min à 92°C, 30 s à 54°C, 30 s à 52°C, 1 min à 50°C et 2 min à 72°C suivis de 25 cycles de 1 min à 94°C, 2 min à 56°C et 2 min à 72° avec une extension finale de 5 min à 72°C. Le produit de la PCR a été cloné dans le vecteur pDrive (Qiagen). Les inserts correspondant à la taille du gène (environ 1kb) ont été séquencés. Le clone produisant le gène dont la séquence présentait la plus grande homologie à celle souhaitée a été sélectionné. Les erreurs de polymérisation (une dizaine constituées surtout de délétions de une à cinq bases) ont été corrigées une à la fois par la technique de mutagenèse dirigée Quickchange de Stratagene (oligos non présentés). Les oligos ont été obtenus de chez BioCorp Inc., Montréal et les séquençages effectués au SUCOF de l'Université Laval.

3.3 CONCEPTION DES SYSTÈMES D'EXPRESSION²⁶

3.3.1 Préparation des gènes en vue des clonages

Les produits PCR contenant les gènes des PGs de *Sc* et de *Km* ont été amplifiés de nouveau et allongés à l'aide d'oligos comportant les sites de restrictions prévus pour leur clonage. Le site de restriction HindIII a été ajouté à l'extrémité 5' des deux gènes. Pour l'extrémité 3', les deux gènes ont été allongés avec soit le site NotI soit le site XbaI selon qu'un codon stop était nécessaire à la fin du gène ou non. Les produits PCR des gènes allongés ont ensuite été clonés dans le vecteur intermédiaire pDrive pour faciliter le clonage dans les systèmes d'expression. Le plasmide recombinant était alors introduit dans des cellules compétentes XL1-blue d'*Escherichia coli* (Stratagene) pour l'amplification. Lorsque nécessaire, une mutagenèse dirigée était effectuée afin d'insérer un site EcoRI entre la séquence codant pour la séquence signal et celle

²⁶ Les plasmides commerciaux proviennent de chez Invitrogen. Les enzymes de restriction proviennent de chez New England Biolabs. Les oligos proviennent de chez Sigma Genosys, sauf ceux identifiés par un astérisque qui proviennent de chez BioCorp. Inc. Les mutagenèses dirigées ont été effectuées selon la méthode Quickchange de Stratagene. Les séquençages ont été faits au SUCOF de l'Université Laval.

codant pour la protéine mature. Dans le cas du gène de la PG de *Sc*, une mutagenèse dirigée a été effectuée afin d'enlever le site de restriction EcoRI qui s'y trouve naturellement. Les oligos utilisés pour allonger les extrémités des gènes des PGs de *Sc* et de *Km* sont les suivants : $Sc_{HindIII}$: 5' ATATTAAGCTTIGATGATTTCTGCTAATTCA 3'; $Km_{HindIII}$: 5' ATATTAAGCTTIGATGTTTTCTGCAACACCT 3'; Sc_{NotI} : 5' CGCGGGCCGCCTTAACAGCTTGACCAGA 3' et Km_{NotI} : 5' CGCGGGCCGCCTTAACAGAAGACTCCGCT 3'. Les oligos utilisés pour insérer le site EcoRI sont les suivants : 5' CGCAACACCTTTGTCAAAAAGAGAATTTCGATTCTGTACCC 3' et 5' GGGTACAGG AATCGAATTCTCTTTTTGACAAAGGTGTTGCG 3' pour le gène de *Sc* ; et 5' GAAAAGAGAGACAGTTGTGAATTCA CCTTGAGTGGGAAG 3' et 5' CTTCCCACTCAAGGTGAATTCACAAGTGTCTCTTTTC 3' pour le gène de *Km*. Les oligos suivants ont été utilisés pour enlever le site de restriction EcoRI du gène de *Sc* : 5' GACTGTATTGCTGTTAATCCGGTTCAAC 3' et 5' GTTGAACCGGAATTAACAGCAATACAGTC 3'. Pour le séquençage des constructions clonées dans pDrive, les oligos SP6 et T7 ont été utilisés.

3.3.2 Système procaryote pBAD pour expression dans *Escherichia coli*

Le site de clonage multiple du plasmide pBAD-gIII B a été modifié de façon à permettre le clonage des gènes dans le bon cadre de lecture avec l'enzyme EcoRI à l'extrémité 5' immédiatement après la séquence signal du gène III et NotI à l'extrémité 3'. Premièrement, un site EcoRI a été inséré à la place du site NcoI par mutagenèse dirigée à l'aide des oligos suivants : 5' GCCGTTCTATAGCCATAGCGAATTCGCTAGCTCGAGATCTGCAGCTGG 3' et 5' CCAGCTGCAGATCTCGAGCTAGCGAATTCGCTATGGCTATAGAACGGC 3'. Ensuite, le site de restriction NotI a été inséré par le clonage du gène de la PG de *Km* retiré du vecteur pYES2/CT (auquel il avait préalablement été cloné²⁷) avec l'aide des enzymes EcoRI et XbaI. Les gènes des PGs matures²⁸ de *Sc* et de *Sp* ont ensuite été clonés avec les enzymes EcoRI et NotI. Les oligos BAD_{forw} : 5' ATGCCATAGCATTTTTATCC 3' et BAD_{rev} : 5' GAAAACAGCCAAGCTGGAG 3' ont été utilisés pour le séquençage. Les plasmides recombinants ont été introduits par électroporation dans la souche Top10 d'*Escherichia coli* (Stratagene) pour l'expression des enzymes. Les cellules transformées ont été sélectionnées sur une gélose LB faible en sel (1% Tryptone, 0,5% yeast extract, 0,5% NaCl et 2% agar) contenant 50µg/mL d'ampicilline.

²⁷ Voir section 4.3.3.

²⁸ C'est-à-dire sans leur séquence signal.

3.3.3 Système eucaryote pYES pour expression dans *Saccharomyces cerevisiae*

Les gènes des PGs de *Sc* et de *Km* ont été clonés dans le bon cadre de lecture avec les enzymes HindIII et NotI. La séquence signal $Z\alpha$ (mating factor) de *Sc* obtenue du vecteur commercial pGAP- $Z\alpha$ a été clonée dans le vecteur pYES2/CT dans le bon cadre de lecture avec les enzymes HindIII et EcoRI.²⁹ Le gène de la protéine mature de *Sp* a été cloné avec les enzymes EcoRI et NotI à la suite des séquences signal de *Sc*, de *Km* et de $Z\alpha$. Les gènes des protéines matures³⁰ de *Sc* et de *Km* ont aussi été clonés avec les enzymes EcoRI et NotI à la suite des séquences signal $Z\alpha$, de *Sc* (dans le cas du gène de la PG de *Km*) et de *Km* (dans le cas du gène de la PG de *Sc*). Les plasmides recombinants ont été introduits par choc thermique dans des cellules compétentes XL1-blue d'*Escherichia coli* (Stratagene) pour l'amplification. Les cellules transformées ont été sélectionnées sur une gélose LB contenant 50µg/mL d'ampicilline. Les oligos YES_{forw} : 5' CCTCTACTTTAACGTC 3' et YES_{rev} : 5' GCGTGAATGTAAGCGTGAC 3' ont été utilisés pour le séquençage. Les plasmides recombinants ont été introduits par électroporation dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* (Stratagene) pour l'expression des enzymes. Les cellules transformées sont sélectionnées sur une gélose SC minimale « Drop-out uracil » (0,67% yeast nitrogen base sans acides aminés, 2% dextrose, 0,01% d'adénine, d'arginine, de cystéine, de leucine, de lysine, de thréonine et de tryptophane, 0,05% d'acide aspartique, d'histidine, d'isoleucine, de méthionine, de phénylalanine, de proline, de sérine, de tyrosine et de valine et 2% agar).

3.3.4 Système eucaryote pGAP pour expression dans *Pichia pastoris*

Les gènes des trois protéines matures (de *Sc*, de *Km* et de *Sp*) ont été clonés à la suite de la séquence signal $Z\alpha$ du vecteur pGAP $Z\alpha$ A avec les enzymes EcoRI et NotI. Les gènes complets³¹ des PGs de *Sc* et de *Km*, ainsi que les autres constructions obtenues avec le vecteur pYES2/CT ont aussi été clonés à l'aide des enzymes HindIII et NotI. Un

²⁹ Le vecteur pGAP $Z\alpha$ A a été préalablement modifié par l'ajout d'un site HindIII au début de la séquence $Z\alpha$ (voir la section 4.3.4).

³⁰ C'est-à-dire sans leur séquence signal.

³¹ Séquence nucléotidique codant pour la séquence signal et la protéine mature.

site HindIII avait préalablement été inséré par mutagenèse dirigée avant la séquence signal $Z\alpha$ présente dans le vecteur. Les oligos suivants ont été utilisés : 5' GAACAAC TATTT CGAAAGCTTGATGAGATTTCTTC 3' et 5' GAAGGAAATCTCATCAAGCTTT CGAAATAG TTGTTTC 3'. Pour optimiser l'expression, une mutagenèse dirigée a été effectuée sur les constructions impliquant les séquences signal de *Sc* et de *Km* afin que le codon d'initiation de la traduction fasse partie d'une séquence consensus Kozak, tel que suggéré par Invitrogen (Kozak, 1987; Kozak, 1990). Trois bases ont donc été éliminées juste avant l'ATG de chaque séquence signal à l'aide des oligos suivants : 5' GAACAAC TATTT CGAAAGGATGATTTCTGCTAACTCC 3' et 5' GGAGTTAGCAGAAATCATCCTTT CGAAA TAGTTGTTTC 3' pour la séquence signal de la PG de *Sc* et 5' CAATTGAACAAC TATTT CGAAAC GATGTTTTTCTGCAACACC 3' et 5' GGTGTTGCAGAAAAACATCGTTTT CGAAATAGTTGTTCAATTG 3' pour la séquence signal de la PG de *Km*. Les plasmides recombinants ont été introduits par choc thermique dans des cellules compétentes XL1-blue d'*Escherichia coli* (Stratagene) pour l'amplification. Les cellules transformées ont été sélectionnées sur une gélose LB faible en sel contenant 50 μ g/mL de zéocine. Les oligos GAP_{forw} 5' GAACACCTTTCCCAATTTTGG 3' et GAP_{rev} 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3' ont été utilisés pour le séquençage. Les plasmides recombinants ont été linéarisés avec l'enzyme *Avr* II et introduits par électroporation dans la souche GS-115 de *Pichia pastoris* (Stratagene) pour l'expression des enzymes. Les cellules transformées ont été sélectionnées sur une gélose YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1M sorbitol et 2% agar) contenant 100 μ g/mL de zéocine.

3.4 EXPRESSION ET PURIFICATION

3.4.1 Expression pilote dans *Escherichia coli*

Plusieurs essais ont été effectués dans le but d'exprimer la PG avec le vecteur pBADgIII. Des cellules Top10 transformées avec le plasmide contenant le gène de la PG de *Km* ou celui de la PG de *Sp* ont été utilisées pour les essais et le protocole suggéré dans le manuel d'utilisation du vecteur a été suivi. Des incubations de 4 à 24 heures ont été faites dans des volumes de 10mL de LB faible en sel contenant

50µg/mL d'ampicilline et des concentrations d'arabinose allant de 0,00002% à 0,2%. Des échantillons de surnageant et le lysat cellulaire de chaque essais ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10% Tricine (Gradipore) après avoir été bouillis 5 minutes dans du « Tricine sample buffer » (Biorad). Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent avec le kit Proteosilver staining de Sigma. Un Western blot anti-His a aussi été effectué sur des échantillons obtenus avec une construction du vecteur pBADgIII avec le gène de la PG de *Km* suivi de la queue histidine incluse dans le vecteur. Cette construction a été obtenue par la délétion du codon stop du gène de la PG de *Km* par mutagenèse dirigée.³²

3.4.2 Expression dans *Saccharomyces cerevisiae*

3.4.2.1 Optimisation de l'expression

Pour l'expression des PGs, les levures ont été cultivées dans le milieu de culture standard YP (yeast extract 1%, peptone 2%) avec une source de carbones (2%). Par contre, différentes sources de carbones et différents temps de culture ont été étudiés afin de déterminer les meilleurs paramètres d'expression dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*.

Deux sucres ont été essayés pour déterminer la source de carbones à utiliser pour la culture soit le glucose et le galactose. Pour commencer, les cellules ont été précultivées dans du YPD puis centrifugées à 2000g avant d'être resuspendues dans un flacon en verre d'au moins trois fois le volume de culture à une DO_{600} de $0,42 \pm 0,02$ dans du YPD ou du YP galactose (yeast extract 1%, peptone 2%, galactose 2%). Les cellules ont été cultivées à 30°C avec une agitation de 300 RPM pour une durée allant de 0 à 48 heures. Les échantillons de surnageant récupérés aux différents temps de culture ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10% Tricine (Gradipore) après avoir été bouillis 5 minutes dans du « Tricine sample buffer » (Biorad). Les protéines ont été détectées au nitrate d'argent avec le kit Proteosilver staining de Sigma.

³² Mutagenèse selon la méthode Quickchange de Stratagene. Puisque les oligos de cette mutagenèse ne sont pas utiles pour la compréhension du présent travail, ils ne sont pas décrits (Sigma).

Deux sources de carbones ont aussi été comparées pour les précultures soit le glucose et le raffinose. Les cellules ont ainsi été précultivées dans du YPD ou du YP raffinose (yeast extract 1%, peptone 2%, raffinose 2%) à 30°C avec une agitation de 300 RPM jusqu'à une DO_{600} de 2. Les levures ont ensuite été centrifugées à 2000g et resuspendues à une DO_{600} de $0,42 \pm 0,02$ dans du YP Galactose pour leur culture à 30°C et 300 RPM. Des échantillons de surnageant ont été récupérés à différents temps d'induction et ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10% Tricine (Gradipore) après avoir été bouillis 5 minutes dans du « Tricine sample buffer » (Biorad). Les protéines ont été détectées au nitrate d'argent avec le kit Proteosilver staining de Sigma.

L'optimisation de l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae* a été effectuée avec les clones contenant les gènes complets des PGs de *Km* et de *Sc*. La souche INVSc non-transformée a servi de contrôle négatif. Les souches CECT 1389 de *Saccharomyces cerevisiae* et Y-49 de *Kluyveromyces marxianus* ont aussi été cultivées afin de comparer les patrons d'expression.

3.4.2.2 Conditions d'expression retenues³³

Pour produire les PGs, les cellules provenant d'une préculture d'un clone de *Saccharomyces cerevisiae* ont été centrifugées à 2000g et resuspendues dans du milieu YP galactose à une DO_{600} de 0,4 à 0,5. L'induction a ensuite été conduite à 30°C avec une agitation de 300 RPM durant 20 à 24 heures. La durée des précultures a été déterminée selon le milieu de fermentation utilisé. Dans du YP glucose la préculture a été conduite de 16 à 24 heures tandis que dans YP raffinose elle a été de 30 à 65 heures. Les cultures ont été faites dans des flacons de 15 mL à 1 Litre, selon le besoin. Le rendement et la pureté de chaque préparation ont été vérifiés sur gel SDS-PAGE 10% Tricine (Gradipore). Pour ce faire, les surnageants ont été bouillis 5 minutes dans du « Tricine sample buffer » (Biorad) et migrés sur gel. Les protéines ont été détectées au nitrate d'argent avec le kit Proteosilver staining de Sigma.

³³ Les PGs qui ont été caractérisées dans le présent projet ont été produites selon les conditions d'expression présentées dans cette section.

3.4.3 Expression dans *Pichia pastoris*

Pour l'expression dans *Pichia pastoris*, les cellules ont été cultivées dans un milieu YPD à 30°C dans un flacon avec une agitation de 300 RPM. Une préculture d'une nuit préparée dans les mêmes conditions a servi d'inoculum dans une dilution 1 dans 500. L'expression a généralement été faite sur une période de 48 heures, mais des tests d'induction ont été effectués sur une période de 4 jours. Les échantillons de surnageant ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10% (ou 16%) Tricine (Gradipore) après avoir été bouillis 5 minutes dans du « Tricine sample buffer » (Biorad). Les protéines ont été détectées au nitrate d'argent avec le kit Proteosilver staining de Sigma.

3.4.4 Purification, quantification et déglycosylation des PGs

Le milieu de culture cellulaire a été centrifugé 10 min à 2000g et le surnageant filtré sur un filtre de 0.45 µm. Les protéines ont ensuite été resuspendues et conservées dans un tampon d'acétate de sodium 50mM pH 5,0 après avoir été concentrées de 1 à 20 fois selon le cas par ultrafiltration sur une membrane Amicon de 30kDa (YM30 de Millipore). La quantification des protéines a été effectuée à l'aide d'un test BCA (acide bicinchoninique) dans une plaque de 96 puits avec comme standard de calibration de l'albumine de sérum bovin (BSA 1mg/mL, Sigma). L'absorbance à 560nm a été mesurée par un lecteur de plaques multipuits (Multiskan Ascent de Thermo Electron Corporation). La pureté des protéines a été confirmée à chaque fois par SDS-PAGE 10% coloré au nitrate d'argent. Lorsque nécessaire, 1,4 mg de protéine a été déglycosylée avec 0,125 U d'endoglycosidase H (Roche) à 37°C pendant 16 heures.

3.5 MISE AU POINT DE TESTS DE DÉTECTION ET DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

3.5.1 Le test de détection sur gélose PGA

Le test employé pour la détection de la PG sur gélose est une adaptation du test de McKay (1988).

Les géloses ont été préparées comme suit : une solution de 2,5g de PGA (Sigma) dans 125mL d'eau nanopure a été autoclavée pendant 5 minutes dans un flacon en verre de 500mL. 25 mL de tampon phosphate 0,5M pH 5,0 (ou autre pH souhaité) ont ensuite été ajoutés et le pH a été réajusté avec du KOH ou du HCl dilué.³⁴ Le volume de la solution a été ajusté avec de l'eau nanopure à 200mL. 1g d'agar et 0,25g d'un mélange d'acides aminés composé de deux parts d'adénine, d'arginine, de cystéine, de leucine, de lysine, de thréonine et de tryptophane, et d'une part d'acide aspartique, d'histidine, d'isoleucine, de méthionine, de phénylalanine, de proline, de sérine, de tyrosine et de valine ont ensuite été ajoutés. Le tout a été autoclavé pendant 20 minutes. Une fois le milieu refroidi à environ 50°C, 25mL d'une solution de galactose 10% filtrée et 25mL d'une solution de YNB sans acides aminés 10X (67g/L) filtrée sont finalement ajoutés. La solution a ensuite été bien mélangée pour uniformiser l'agar et coulée dans environ 15 plats Pétri. Pour la croissance cellulaire, les levures ont été inoculées sur les géloses PGA à l'aide de cure-dents stériles pour un maximum de 8 clones par gélose. Les plats de Pétri ont été incubés à 30°C pendant environ 3 jours. Les souches INVSc ou GS-115 selon le cas ont été utilisées comme contrôles négatifs et la souche de *Kluyveromyces marxianus* Y-49 a été utilisée comme contrôle positif. Afin d'activer les PGs, les géloses ont ensuite été transférées à 50°C (ou à la température souhaitée) pendant 10 minutes, puis elles ont été refroidies à la température de la pièce pendant un minimum de 10 minutes. Pour la détection de l'activité, les géloses ont été colorées pendant 5 minutes avec une solution de rouge de ruthénium 0,0075% à raison de 8mL par plat de Pétri puis, elles ont été décolorées avec de l'eau distillée.

³⁴ Le pH du milieu de culture peut être ajusté de 4,75 à 6,25 au besoin, toujours avec du tampon phosphate, mais le pH de la gélose peut varier lorsque celle est gelifiée.

3.5.2 Le zymogramme

Le test de zymogramme utilisé est une adaptation du test initialement mis au point par Cruickshank et Wade (1980) et modifié par Gainvors *et al.* (1994a).

Pour détecter l'activité de la PG sur gel de polyacrylamide, les surnageants de culture ou les resuspensions de protéines précipitées à l'acétone glaciale ont été migrés pendant 2h30 à 4°C sur des gels non-dénaturants contenant du PGA comme substrat. Les levures ont été cultivées 24 heures à 30°C dans du milieu YP Galactose contenant 0,5% de PGA. Les protéines contenues dans le surnageant ont été précipitées à l'acétone glaciale dans des proportions de 1 volume de surnageant pour 3 volume d'acétone glaciale. Elles ont ensuite été resuspendues dans du tampon acétate 50mM pH 5,0 avant d'être déposées sur gels à la place du surnageant. Le gel de séparation pH 8,7 était composé de 0,5% PGA, de 10% d'acrylamide, de 0,25% de bis-acrylamide, de 38mM Tris et de 25mM d'acide citrique monohydrate et le gel de compression pH 6,7 était composé de 4% d'acrylamide, de 0,25% de bis-acrylamide, de 12,5mM Tris et de 17mM d'acide citrique monohydrate. Pour figer les gels, 10uL de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) et 100uL d'une solution de 4% d'ammonium persulfate ont été ajoutés pour chaque 10mL de gel. Le tampon de migration était composé de 100mM d'acide borique et de 40mM de tetraborate de sodium tétra hydraté pour un pH de 8,7. Pour étudier les conditions d'activité des PGs, les gels ont été coupés dans le sens de la migration en sections qui ont été incubées dans 100mL de tampons phosphate 100mM à des pH allant de 3 à 5,5 pendant 20 heures. Les gels ont ensuite été colorés dans une solution de 0,02% de rouge de ruthénium pendant 5 minutes, puis rincés à l'eau avant d'être incubés dans l'eau jusqu'à l'apparition des zones de dégradation du substrat.

3.5.3 Le test de turbidimétrie

Le test de turbidimétrie qui a été employé est celui mis au point par Avigad et Milner (1967). Du surnageant de culture³⁵ (ou une dilution appropriée) a été ajouté dans un volume équivalent d'une solution incubée à 30°C contenant 1% de PGA³⁶, 100mM de tampon acétate pH 4,5 et 10mM d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique). Des échantillons de 200uL de ce système réactionnel ont été récupérés dans des intervalles de temps et déposés dans des tubes immergés dans de l'eau bouillante. Après 3 minutes d'inactivation, 7,8mL d'eau nanopure ont été ajoutés avec agitation suivis de 2,0mL d'une solution de 5% de CTAB (Hexadécyl-triméthyl-ammonium bromide) dans 0,5M de tampon acétate pH 5,0. Le tout a été mélangé à l'aide d'un appareil de type vortex et l'absorbance a été mesurée à 400nm immédiatement après avec un spectrophotomètre Spectronic-20. Dans ce test, une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour causer la réduction de 0,01 unités de DO à 400nm.

3.5.4 Le test de digestion du concombre

La chair blanche d'un concombre (entre le centre de graines et la pelure) a été coupée en morceaux d'environ 5mm³ pesant entre 500 et 550mg. Les morceaux de concombre ont ensuite été préincubés en groupe de deux dans de l'eau nanopure pendant une heure et repesés. 5mL de surnageant de culture ont été mis dans deux tubes et 5 mL de milieu de culture stérile a été dans un autre tube qui a servi de blanc. Un des deux 5mL de surnageant a été chauffé à 100°C pendant 5 minutes afin d'inactiver les enzymes. Chaque groupe de deux morceaux de concombre ont été déposé dans un tube de surnageant et incubé à la température de la pièce pendant 24 heures sans agitation. Les morceaux de concombre ont ensuite été rincés à l'eau pendant 15 à 20 secondes, remis dans l'eau pour 20 minutes et repesés. La perte de poids des morceaux de concombre incubés dans le surnageant a été corrigée par la perte de poids des morceaux de concombre incubés dans le surnageant inactivé.

³⁵ Les levures ont été cultivées dans du milieu YP Galactose avec 0,5% de PGA.

³⁶ PGA provenant d'une solution stock de 2% préalablement solubilisé à l'autoclave durant 5 min.

3.5.5 Les tests colorimétriques

Dans tous les tests de quantification des sucres réducteurs, on retrouve une réaction enzymatique dont le produit, le GA obtenu par l'hydrolyse du PGA, est dosé en fonction du temps d'incubation par une réaction colorimétrique. Les réactions enzymatiques ont été effectuées à la température souhaitée (généralement à la température de la pièce lors de la mise au point des tests). Le substrat pour les réactions provient d'une solution stock de PGA 2% conservée à 4°C après avoir été solubilisée à l'autoclave pendant 5 minutes. Les courbes étalons ont été effectuées avec des dilutions de GA provenant d'une solution stock de 10mM stérilisée par filtration et conservée à 4°C auxquelles un demi volume de PGA 2% a été ajouté. Lorsque nécessaire, les tests ont été mis au point avec la PG II d'*Aspergillus niger* vendue chez Sigma (dosée par la compagnie à 445U/mL à pH 4,5 et 37°C et conservée dans 10% de glycérol). Les cultures cellulaires ont été effectuées tel que décrit à la section 3.4.2. Les réactions enzymatiques ont été conduites soit avec l'enzyme commerciale diluée dans du tampon acétate 50mM pH 5,0; soit avec des protéines de surnageant précipitées à l'acétone glacial et resuspendues dans le tampon souhaité; soit avec des protéines de surnageant purifiées par ultrafiltration et resuspendues dans du tampon acétate 50mM pH 5,0 tel que décrit à la section 3.4.2. Au temps zéro³⁷, un échantillon contenant les enzymes a été déposé et mélangé dans un tube contenant deux fois ce volume de PGA 2% pré-incubé à la température souhaitée. Aux temps voulus des aliquotes de ce système réactionnel ont été prises et dosées pour les sucres réducteurs au moyen d'une réaction colorimétrique (voir sections suivantes).

Les réactions colorimétriques propres à chaque test sont décrites ci-après :

³⁷ Pour la réaction colorimétrique, le temps zéro est préparé en ajoutant un échantillon d'enzymes qui n'a pas été mis en présence de PGA à la solution du tube. Le PGA 2% y est ensuite ajouté. L'échantillon d'enzymes et le PGA 2% y sont tous deux ajoutés en 1/2 volumes de la quantité nécessaire au test (pour avoir le bon volume final).

3.5.5.1 Test Nelson-Somogyi

Le test Nelson-Somogyi utilisé (Nelson 1944 et 1957, Somogyi 1952, Milner et Avigad 1967) a été adapté par Gainvors en 1994. Deux solutions sont nécessaires pour ce test : la solution de cuivre et la solution d'arsenomolybdate. Pour préparer la solution de cuivre, 140g de sulfate de sodium anhydre et 20g de chlorure de sodium ont été dissous avec agitation et chauffage dans 360mL d'eau nanopure. La solution a été laissée à température ambiante jusqu'à ce qu'elle atteigne une température d'environ 60°C, puis 50 mL de tampon acétate 2M pH 5,1 et 32,5 mL d'une solution de sulfate de cuivre 0,32M ont été ajoutées. Le pH a été ajusté avec du HCl ou du NaOH à 4,8 et le volume ajusté à 500 mL. La solution a été conservée dans une bouteille brune à 37°C pour un maximum de deux mois. Pour préparer la solution d'arsenomolybdate, 3g d'arsenate de sodium ont été préalablement dissous dans 25mL d'eau nanopure. 25g de molybdate d'ammonium tétrahydraté ont été dissous dans 450mL d'eau nanopure et 21 mL d'acide sulfurique ont été ensuite ajoutés lentement en agitation continue. La solution de 25mL d'arsenate de sodium préalablement dissout a finalement été ajoutée. Cette solution a aussi été conservée à 37°C dans une bouteille brune.

Pour la réaction colorimétrique, un volume de 750uL de la solution de cuivre a préalablement été déposé dans des tubes en verre. Les échantillons y ont ensuite été ajoutés en volumes de 250uL. Chaque tube a immédiatement été vortexé et recouvert de parafilm puis chauffé 10 minutes dans un bain d'eau bouillant à gros bouillons. Les tubes ont été refroidis légèrement dans un bain de glace et d'eau froide sans agitation. 500uL de solution d'arsenomolybdate ont été ajoutés dans les tubes suivis de 1mL d'eau nanopure. Lorsque nécessaire, l'échantillon a été dilué 1 dans 2 et la mesure corrigée. L'absorbance a été lue à 600nm sur un Spectronic 20 en dedans de 1 heure.

3.5.5.2 Test à la néocuproïne

Le test de quantification des sucres réducteurs à la néocuproïne est tiré de l'article de Dygert *et al.* (1965). Deux solutions sont nécessaires pour ce test. Pour faire la solution A, 0,450g de sulfate de cuivre pentahydraté et 16g de glycine ont été ajoutés

à une solution de 600mL d'eau nanopure contenant 40g de carbonate de sodium dissout. Le volume de la solution a ensuite été ajusté à 1 litre. La solution B est composée de 5mM de néocuproïne-HCl (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline-hydrochloré). Elle est conservée dans une bouteille en verre brun et est jetée lorsqu'elle vire au jaune.

Pour la réaction colorimétrique, un volume de 1mL de solution A a préalablement été déposé dans des tubes en verre. Les échantillons y ont ensuite été ajoutés en volumes de 50uL suivis de 1mL de solution B. Chaque tube a immédiatement été vortexé et recouvert de parafilm puis chauffé 12 minutes dans un bain d'eau bouillant à gros bouillons. Les tubes ont été refroidis légèrement dans un bain d'eau froide et leur contenu dilué avec de l'eau nanopure jusqu'à un volume final de 10 à 25 mL.³⁸ L'absorbance a été lue à 450nm sur un Spectronic 20 ou sur un lecteur de plaques Multiskan Ascent de Labsystems dans un délai de 1 heure. Il est à noter qu'un précipité formé durant le chauffage indique un manque de réactif et qu'un précipité formé durant le refroidissement indique que la solution a été trop refroidie et qu'il faut la réchauffer avant de la diluer.

3.5.5.3 Test au PAHBAH

Le test de détermination des sucres réducteurs à l'aide du PAHBAH (acide parahydroxybenzoïque hydrazide) mis au point par Lever *et al.* (1984) a été adapté pour la mesure de l'activité enzymatique de la PG. Pour ce test, une seule solution est nécessaire. La solution de PAHBAH est composée de 0,5% de PAHBAH dans 0,5M d'hydroxide de sodium. Le PAHBAH est d'abord dissout dans un demi volume de NaOH 1M et un demi volume d'eau nanopure est ensuite ajouté. Cette solution est préparée fraîche pour chaque utilisation et doit être utilisée en dedans de deux heures.

Pour la réaction colorimétrique, des aliquotes de 1mL de solution de PAHBAH ont préalablement été déposés dans des micro-tubes. Les échantillons y ont été ajoutés en

³⁸ Il ne faut pas ajouter un volume fixe d'eau car cette manière de fonctionner peut augmenter l'erreur due à l'évaporation de l'eau contenue dans les échantillons lors du chauffage : la dilution finale serait erronée.

volumes de 50 uL au moment opportun. Les tubes³⁹ ont ensuite été chauffés à 100°C pendant 5 minutes, agités avec un vortex puis refroidis dans un bain de glace et d'eau pendant un autre 5 minutes et agités de nouveau au vortex. L'absorbance a été lue à 405nm à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan Ascent de Labsystems en dedans de 1 heure.

3.6 CARACTÉRISATION INITIALE DES PGs

3.6.1 Mesure de l'activité enzymatique

Toutes les mesures d'activité enzymatique ont été effectuées en triplicata avec le test de quantification des sucres réducteurs au PAHBAH (voir section 3.5.5.3).⁴⁰ Les PGs utilisées pour les tests sont celles qui ont été purifiées du surnageant de culture et qui ont été resuspendues dans le tampon acétate 50mM pH 5,0. Les courbes étalons ont été effectuée avec des dilutions finales de 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5,0, 6,25, 7,5 et 10mM de GA dans une solution de 1% PGA dans le tampon et la température étudiés. Les tests automatisés ont été conduits sur un appareil Biomek 2000 de Beckman Coulter auquel deux bains à sec numériques à deux places de VWR ont été intégrés. Ces blocs chauffants ont été munis de plaques chauffantes usinées de façon à pouvoir chauffer uniformément des plaques de 96 puits de 1,2mL ou de 2mL lors des réactions enzymatiques.⁴¹ Le chauffage pour la réaction colorimétrique a été fait sur le même type de montage. Cependant, il a été effectué à 110°C pendant 10 minutes au lieu de 5 minutes dans l'eau bouillante à cause de la perte importante de chaleur à cette température.

³⁹ Il n'est pas important de chauffer les échantillons au fur et à la mesure. Les enzymes sont inactivées aussitôt transférées dans la solution de PAHBAH contenant 0,5M de NaOH. Cependant, les tubes ont été chauffés dans un délai de 30 minutes après l'arrêt de la réaction enzymatique.

⁴⁰ L'écart-type des tests en triplicata était toujours inférieur à 15% de la moyenne des trois tests, sinon la valeur problématique était exclue.

⁴¹ À l'atelier de mécanique de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

3.6.1.1 Dosage initial de l'activité⁴²

Pour déterminer l'activité des PGs d'une préparation, plusieurs dilutions ont été effectuées et utilisées dans une réaction enzymatique avec une concentration finale de 0,67% de PGA à 50°C dans du tampon acétate 50mM pH 5,0. À toutes les deux minutes pendant 14 minutes, et ce à partir de la deuxième minute, un échantillon de cette réaction a été dosé pour étudier l'évolution du produit. La dilution donnant la plus belle régression sur la période de 2 à 10 minutes, généralement celle qui donne une activité de $0,75 \pm 0,25$ U/mL, a été testée de nouveau avec deux autres dilutions rapprochées le tout en triplicata. La meilleure de ces dilutions a servi à déterminer l'activité spécifique et a été utilisée pour les autres tests de caractérisation.

3.6.1.2 Automatisation du dosage initial

Le test de dosage de l'activité spécifique d'une préparation de PG a été automatisé afin que 8 réactions (dilutions) enzymatiques puissent être conduites et dosées en l'espace de 1 heure et 16 réactions en l'espace de 1½ heure. Le protocole de préparation du test de dosage enzymatique ainsi que le programme de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe Ia.

3.6.1.3 Tests d'activité enzymatique dans une solution tampon

Les PGs ont été caractérisées dans des combinaisons de températures et de pH allant de 35°C à 70°C et de 4,0 à 6,5. Les réactions enzymatiques ont été effectuées avec la dilution de l'enzyme obtenue à la section 3.6.1.1 dans du tampon acétate/bis-tris à 100mM au pH souhaité.

⁴² L'activité en U/mL est déterminée à pH 5,0 à 50°C. Voir l'explication à la section 2.6.1.

3.6.1.4 Automatisation des tests d'activité enzymatique

Le test de mesure de l'activité enzymatique des PGs a été automatisé afin que 8 réactions (mutants, pH, tampons, forces ioniques) puissent être étudiées en même temps à une température donnée et ce en triplicata, le tout en l'espace de 1½ heure. Si une deuxième série de tests est commencée tout de suite après la première, ces deux tests prennent 2 heures. En une journée, soit 3 fois 2 tests de 2 heures, une enzyme peut être caractérisée dans 8 intervalles de pH donnés (par exemple à 4,0, 4,5, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25) et ce à 6 températures (par exemple à 35°C, 50°C, 55°C, 57,5°C, 60°C, et 65°C); d'autre part, deux enzymes peuvent être caractérisées à 8 pH et 3 températures, ou 48 mutants peuvent être comparés à un pH et une température donnée). Dans ce programme, le robot dilue l'enzyme 20 fois; il faut donc prendre ce facteur en compte lors de la préparation de l'enzyme. La dilution finale doit correspondre à celle obtenue à la section 3.6.1.1. L'échantillonnage se fait aux 3 minutes sur une période de 15 minutes. Le protocole de préparation du test de mesure de l'activité enzymatique des PGs ainsi que le programme de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe Ib.

3.6.1.5 Tests de stabilité enzymatique dans une solution tampon

La stabilité des PGs a été étudiée dans des combinaisons de températures et de pH allant de 50°C à 65°C et de 4,5 à 6,25. Les enzymes ont été incubées dans du tampon acétate/bis-tris à 100mM au pH souhaité à la température souhaitée et pour la durée souhaitée. La concentration de l'enzyme à cette étape correspond à 20 fois la dilution obtenue à la section 3.6.1.1. L'activité résiduelle des enzymes a ensuite été mesurée à 50°C dans le tampon acétate 50Mm pH 5,0, la dilution finale de l'enzyme à cette étape correspond à celle obtenue à la section 3.6.1.1.

3.6.1.6 Automatisation des tests de stabilité enzymatique

Le test de mesure de la stabilité enzymatique des PGs a été automatisé afin que 16 réactions⁴³ puissent être étudiées en même temps à une température donnée et ce en triplicata. Les enzymes sont d'abord incubées dans les conditions souhaitées, puis leur activité résiduelle est dosée sur une période de 15 minutes à 50°C dans le tampon acétate 50mM pH 5,0. La stabilité est mesurée après 0, 30 minutes, 1h 1h30, 2h et 3h d'incubation puis, jusqu'à temps qu'il n'y ait plus d'activité, à 6h, 12h, 24h et aux autres temps souhaités. Le protocole de préparation du test de mesure de la stabilité enzymatique des PGs ainsi que les programmes de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe Ic.

3.6.2 Mesure de l'activité sur la pâte⁴⁴

Des échantillons de pâte thermomécanique (TMP), de pâte TMP blanchie au peroxyde, de pâte TMP blanchie au peroxyde et lavée à la presse, de filtrat de presse et d'eau blanche ont été prélevés à l'usine de la Kruger de Trois-Rivières. La pâte lavée à la presse a été épaissie à la presse et rediluée en usine avec de l'eau claire. L'eau blanche a été échantillonnée à partir du bassin de drainage sous la toile de mise en feuille de la même machine à papier.⁴⁵ Les échantillons ont été conservés pour un maximum de 2 semaines à 4°C jusqu'à leur utilisation. La consistance de la pâte TMP était de 3,5%, celle de la pâte TMP blanchie était de 4,0%, celle de la pâte lavée à la presse était de 3,2%, celle du filtrat de presse était de 0,25% et celle de l'eau blanche de 0,5 %.

3.6.2.1 Traitement enzymatique de la pâte

Deux façons ont été employées pour préparer la pâte au traitement. Certains essais ont été effectués sur de la pâte telle quelle et d'autres essais ont été effectués sur du filtrat

⁴³ 16 réactions avec soit 1 PG et 16 tampons différents ou 8 PGs dans 2 tampons ou une combinaison par exemple 4 PGs et 4 tampons.

⁴⁴ Le terme pâte est employée au sens large pour désigner la pâte et tout produit dérivé en phase liquide obtenu lors de la fabrication du papier (pâte, eau blanche, filtrat de presse, etc.).

⁴⁵ Le choix des pâtes sera expliqué plus loin (sections 4.7.2, 4.7.3 et 4.8.2).

de presse ou de l'eau blanche centrifugés à 2500g pendant 10 minutes et passés sur un filtre Whatman no. 202 puis sur un filtre Whatman no. 42 pour enlever les particules en suspension. Pour le traitement de la pâte et les analyses subséquentes des échantillons de 200mL ont été amenés à la température souhaitée dans un bain thermostaté. Lorsqu'un certain pH était souhaité, le pH de la pâte a été ajusté à 50°C avec de l'acide acétique et du NaOH. Des échantillons contrôles étaient enlevés avant l'ajout de l'enzyme. 1 à 2 mL d'une dilution de surnageant de culture ou de PGs préparée dans du tampon acétate 50mM pH 5,0 et dosée à 50°C ont été ajoutés à une concentration finale allant de 0 à 1 000 unités par Litre à 200mL de pâte pré-incubée. La pâte a été mélangée régulièrement durant le traitement et des échantillons de 1 mL à 10mL ont été enlevés aux temps désirés sur une intervalle de 0 à 1 heure, et testés immédiatement pour la demande cationique. Pour le temps zéro, l'enzyme a été remplacée par du tampon ou de l'enzyme inactivée dans le cas de l'enzyme purifiée ou par du surnageant inactivé 5 minutes à 100°C lorsque du surnageant de culture a été utilisé. Pour enlever les aliquotes dans les échantillons de pâte incubés tels quels, la pâte a préalablement été filtrée au travers un béccher à fond de tamis afin d'éviter que des fibres se retrouvent dans la suspension à analyser. Cette étape n'était pas nécessaire pour les échantillons de pâte ayant été préalablement filtrés.

3.6.2.2 Traitement enzymatique de la pâte avec ajout de coagulant

Le coagulant, un produit composé principalement de polyamine, a été fourni par LPM.⁴⁶ Il a été ajouté en volume de 1mL à raison de 0 à 5 kg/tonne de pâte à des échantillons de 200mL de pâte TMP blanchie au peroxyde qui avaient été traités ou non pendant 15 minutes avec 1000 unités de PGs par Litre de pâte. Les PGs utilisées pour ces traitements étaient celle de *Sc* ou de *Km* préparées dans du tampon acétate 50mM pH 5,0 et dosée à 50°C. La pâte qui était à pH 5,3 a été traitée à 50°C. Après l'ajout de coagulant, les échantillons étaient mélangés avec un bâton agitateur pendant 10 secondes, tamisés et testés immédiatement après pour la demande cationique. La moyenne de deux à trois titrages a été prise pour les données graphiques.

⁴⁶ La composition exacte de ce produit ne peut être divulguée dans cet ouvrage.

3.6.2.3 Test de demande cationique

La demande cationique a été mesurée à l'aide d'un détecteur de charges Mütek (PCD-02) et d'un titreur (PCD-T). Les échantillons ont été dilués de 1 à 10 fois avec de l'eau nanopure lorsque nécessaire pour obtenir un volume de 10mL⁴⁷ et ont été titrés avec une solution de 1mN de poly-DADMAC (poly-diallyldiméthyl-ammonium chloride).

3.6.2.4 Automatisation du traitement enzymatique de la pâte

Le traitement enzymatique de la pâte a été automatisé comme suit : des échantillons de 1,2mL d'eau blanche ou de filtrat de presse, préparés selon la méthode présentée à la section 3.6.2.1, ont été incubés à la température souhaitée dans des plaques de 96 puits de 2mL. Au temps zéro, 12uL d'une dilution souhaitée d'enzyme ont été ajoutés et mélangés à la pâte. Après le temps d'incubation souhaité, la plaque 96 puits a été transférée sur une plaque chauffante à 110°C pendant 2 minutes pour arrêter la réaction enzymatique, puis refroidie sur de la glace pendant 5 minutes. Les échantillons de pâte traités ont été recouverts et conservés à 4°C en attendant d'être dilués à raison de 1 mL dans 10mL et dosés pour la demande cationique selon la méthode présentée à la section 3.6.2.3.

3.6.2.5 Dosage préliminaire automatisé du PGA dans la pâte

La présence de PGA dans la pâte a été confirmée par le test de dosage du PGA. Pour ce faire, les échantillons de pâte sont incubés à 50°C et/ou 55°C pendant 1 minute, 2,5 minutes, 5 minutes et 10 minutes en présence de surnageant de PG de *Sc* non-mutée. Les mesures ont été effectuées en duplicata (sur deux plaques différentes) à des pH allant de 4,6 à 6,0. Le protocole de préparation de ce test ainsi que le programme de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe Id.⁴⁸

⁴⁷ La dilution utilisée est fonction du volume de titrant nécessaire pour neutraliser la charge. Ce volume ne doit pas dépasser 8 mL, car la capacité de la cuvette de titration est de 20mL, soit 10mL d'échantillon et approximativement 8mL de titrant.

⁴⁸ Il est à noter que les dosages ultérieurs de PGA seront fait seulement à 55°C et à pH 4,6 et 5,4 avec le surnageant de la même enzyme à des concentrations de 1X et 5X pendant 4 à 6

3.7 CRÉATION D'UNE BANQUE DE MUTANTS PAR MUTAGENÈSE DIRIGÉE

Pour modifier les gènes des PGs de *Km* et de *Sc*, la méthode de mutagenèse dirigée Quickchange de Stratagene a été employée. Les mutations ont été dirigées sur les gènes de PGs présents dans les constructions plasmidiques pYES2-Ct pour l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae*. Les oligos utilisés pour effectuer ces mutagenèses ont été construits en respectant les règles proposées dans le Guide de l'utilisateur en prenant comme gabarits la séquence des gènes des PGs obtenus. Ils ont été commandés chez Sigma-Genosys. Pour les mutagenèses sur les sites de glycosylation des deux gènes, des oligos dégénératifs pour le codon de l'asparagine ont été utilisés, cela a rendu possible l'obtention d'un aspartate, d'une glutamine, mais aussi d'un glutamate et d'une histidine sans occasionner plus de travail. Toutes les mutagenèses ont été vérifiées par séquençage automatique au SUCOF de l'Université Laval. Les plasmides contenant les gènes mutés ont ensuite été introduits dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* tel que décrit dans la section 3.3.3.

3.7.1 Mutagenèse sur le gène de la PG de *Km*

Les oligos qui ont été utilisés pour effectuer les mutagenèses sur le gène de la PG de *Km* sont les suivants : KmQ148M-a - 5' GGTGCAAATCAAGAATACCCCAATTATGGCTATC TCAGTGAACCTTTG 3' ; KmQ148M-b - 5' CAAGAGTTCACTGAGATAGCCATAATTGGGGTAT TCTTGATTTGCAACC 3' ; KmK282D-a - 5' CCACTATCTCCGGCATCAGAGACTTCGGAATTGTTGTTG 3' ; KmK282D-b - 5' CAACAACAATCCGAAGTCTCTGATGCCGGAGATAGTGG 3' ; KmK326T-a - 5' CCG CTTACAGAGTCACTATCTTGTTGCTGGTGC 3' ; KmK326T-b - 5' GCACCAGCAACCAAGATAGTGA CTCTGTAAGCGG 3' ; KmK326Y-a - 5' CTCCGCTTACAGAGTCTACATCTTGTTGCTGGTGC 3' ; KmK326Y-b - 5' GCACCAGCAACCAAGATGTAGACTCTGTAAGCGGAAG 3' ; KmV329-A332C-a - 5' GCTTA CAGAGTCAAGATCTTGTGTGCTGGTTGTTCTAAGTGGACTTGG 3' ; KmV329-A332C-b - 5' CCAAGTCCAC TTAGAACAACCAGCACACAAGATCTTGACTCTGTAAGC 3' ; KmN189D/Q-a - 5' GATGTTGGTAGCGTTA ACSASGTCACCATTGAGAACTGTC 3' ; KmN189D/Q-b - 5' GACAGTTCTCAATGGTGACSTSGTTAACGCTAC

minutes de façon à réduire le temps requis pour vérifier la présence de PGA (protocole et programme non-présentés).

CAACATC 3' ; KmN293D/Q-a - 5' GAAACTGATTACAGCSAWGGATCCACCACCGGTACC 3' ; KmN293D/Q-b - 5' GGTACCGGTGGTGGATCCWTS GCTGTAATCAGTTTC 3' ; où S = G ou C et W = A ou T.

3.7.2 Mutagenèse sur le gène de la PG de *Sc*

Les oligos utilisés pour effectuer les mutagenèses sur le gène de la PG de *Sc* sont les suivants : ScQ149M-a - 5' CCGGATTGAATATTA AAAATGCTCCACACATGGTCTTCAGCATCAATAAATG 3' ; ScQ149M-b - 5' CATTTATTGATGCTGAAGACCATGTGTGGAGCATTTTTAATATTCAATCCGG 3' ; ScS282D-a - 5' CAGTAATAAAATTAGCGGCATAAAAAGATTATGGTATTGTTATCGAAGGCG 3' ; ScS282D-b - 5' CGCCTT CGATAACAATACCATAATCTTTTATGCCGCTAATTTTATTACTG 3' ; ScK325T-a - 5' CCACAGCGAAGAGGGTT ACAATTTTGGTGAAAAACGC 3' ; ScK325T-b - 5' GCGTTTTTCACCAA ATTGTAACCCTCTTCGCTGTGG 3' ; ScK325Y-a - 5' CTCCACAGCGAAGAGGGTTTACATTTTGGTGAA AAACGCTAC 3' ; ScK325Y-b - 5' GTAGC GTTTTTACCAAATGTAAACCCTCTTCGCTGTGGAG 3' ; ScV328-A331C-a - 5' GCGAAGAGGGTTAAAA TTTTGTGCAAAA ACTGTACTA ACTGGCAATGGTCTGGGGTG 3' ; ScV328-A331C-b - 5' CACCCAGACCATTG CCAGTTAGTACAGTTTTTGCACAAAATTTTAACCCTCTTCGC 3' ; ScN318D/Q-a - 5' CACCGGGAGCGTGSA STCCACAGCGAAGAG 3' ; ScN318D/Q-b - 5' CTCTTCGCTGTGGASTSCACGCTCCCGGTG 3' ; ScN330D/Q-a - 5' GAGGGTTAAAATTTTGGTGAAASAGCTACTA ACTGGCAATGGTC 3' ; ScN330D/Q-b - 5' GACCATTGC CAGTTAGTAGCSTSTTTCACCAAATTTTAACCCTC 3' ; où S = G ou C.

3.8 IDENTIFICATION DES MUTANTS ACTIFS ET CARACTÉRISATION

3.8.1 Détection des mutants actifs

Les clones de levures transformées ont été inoculés sur gélose PGA selon la méthode décrite à la section 3.5.1. La détection de l'activité a été réalisée à 50°C, pH 5,1 ±0,1.

3.8.2 Expression des mutants

Les clones actifs ont ensuite été produits en milieu liquide dans des volumes de 15 mL selon la méthode décrite à la section 3.4.2.2. Les précultures ont été faites dans du milieu YPD durant 16 heures et les cultures durant 20 heures.

3.8.3 Vérification de l'induction par SDS-PAGE

Le niveau d'expression des PGs par rapport aux autres protéines encore présentes dans les préparations purifiées a ensuite été vérifié sur un gel de polyacrylamide 10% coloré au nitrate d'argent.

3.8.4 Purification et quantification des protéines

Les protéines des surnageants cellulaires ont été purifiées et quantifiées selon les méthodes décrites à la section 3.4.4.

3.8.5 Dosage initial de l'activité spécifique des mutants

Les enzymes ont été préparées afin d'obtenir une concentration d'environ 30mg/L pour les PGs de *Sc* et de 200mg/L pour les PGs de *Km*. Un dosage préliminaire de l'activité de ces préparations a été effectué par la méthode automatisée décrite à la section 3.6.1 en utilisant une dilution de 1 dans 5 (dilution finale de 1 dans 20)⁴⁹ à raison de 7 clones par plaque plus un clone contrôle soit celui de la PG non-mutée de *Sc* ou celui de la PG non-mutée de *Km*. Les conditions utilisées pour ce dosage sont les mêmes que celles décrites à la section 3.6.1 soit dans le tampon acétate au pH 5,0 à 50°C. Selon les résultats obtenus, les dilutions ont ensuite été ajustées et vérifiées expérimentalement avec le même protocole afin d'obtenir une activité finale de 0,75 U/mL.

3.8.6 Criblage des mutants par la mesure de leur activité enzymatique dans une solution tampon

Le criblage des mutants par la mesure de leur activité a été fait de manière automatisée par un protocole semblable à celui présenté à la section 3.6.1.4. Dans ce programme, 16 mutants sont étudiés en même temps dans une seule combinaison de conditions (température/tampon) et ce en triplicata, le tout en l'espace de 1 heure. Si

⁴⁹ Le programme automatisé effectue une dilution de 1 dans 4.

une deuxième série de tests est commencée tout de suite après la première, ces deux tests prennent 1h30 heures. En une journée, 4 fois 2 tests de 1h30 heures peuvent être effectués. Ainsi, 128 mutants peuvent être criblés si une seule combinaison de conditions (pH vs T°C) est utilisée ou 16 mutants peuvent être comparés si 8 combinaisons de conditions (pH vs T°C) sont utilisées. Les pHs et températures qui peuvent être étudiés sont les mêmes que pour le test d'activité présenté à la section 3.6.1.3. Dans ce programme le robot dilue l'enzyme 20 fois, il faut donc prendre ce facteur en compte. La dilution finale doit correspondre à celle obtenue à la section 3.8.5. L'échantillonnage se fait aux 3 minutes sur une période de 12 à 15 minutes. Le protocole de préparation du test de mesure de l'activité enzymatique des PGs ainsi que le programme de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe Ie.

3.8.7 Criblage des mutants par la mesure de leur activité sur la pâte

Pour le criblage des mutants, la présence de PGA dans la pâte a préalablement été vérifiée selon la méthode présentée à la section 3.6.2.5. Le traitement de la pâte a ensuite été effectué de façon automatisée selon la méthode de base présentée à la section 3.6.2.4. Les spécifications des différents tests utilisés pour le criblage des mutants sont présentées ci-après.

3.8.7.1 Criblage de 4 ou 40 mutants dans la pâte

Le criblage des mutants a été fait à l'aide de deux tests automatisés. Un des tests permet d'étudier l'activité de 4 clones (incluant le clone contrôle) à des pH allant de 4,6 à 6,0 et à une température donnée. L'autre test permet d'étudier 40 clones (incluant 1 ou 2 clones contrôles) à un seul pH et une température donnée. Dans ces tests, la durée du traitement est de plus de 15 minutes et les traitements sont faits en duplicata. Les tests ont été effectués soit avec le surnageant de culture des mutants, soit avec des dilutions des PGs purifiées qui ont été ajustées selon la méthode présentée à la section 3.8.5. Le protocole de préparation du test de criblage sur pâte ainsi que les programmes de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe If.

3.8.7.2 Test de stabilité dans la pâte

Dans ce test, l'activité d'un maximum de 8 clones (incluant le clone contrôle) est testée dans la pâte au pH souhaité et à une température donnée. L'activité est mesurée après 1 minute, 2,5 minutes et 5 minutes de traitement. L'activité des clones est aussi mesurée après 6 minutes de traitement, avec la différence que 60uL de PG sont mis dans 1,2mL de pâte au lieu de 12uL, ce qui donne une concentration de PG de 5X. Tout comme le criblage des mutants, les tests de stabilité ont été effectués en duplicata avec le surnageant de culture des mutants ou avec des dilutions des PGs purifiées qui ont été ajustées selon la méthode présentée à la section 3.8.5. Le protocole de préparation du test de stabilité dans la pâte ainsi que le programme de commandes du robot s'y rapportant sont présentés à l'annexe Ig.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION - PARTIE 1

4.1 CHOIX DES PGs

4.1.1 PGs de *Km* et de *Sc*

Les PGs des levures *Km* et *Sc* ont été choisis pour deux raisons. Premièrement, leur gènes pouvaient être obtenus relativement facilement puisqu'ils ne contiennent pas d'introns; ainsi, il pouvaient être isolés directement à partir du génome des levures par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Deuxièmement, ces PGs ont un profil d'activité qui se rapproche de celui du procédé industriel. Leur pH optimal se situe entre 4,5 et 5,5 et elles sont actives de 20°C à 55°C dans un intervalle de pH de 3,0 à 5,5 (Sakai *et al.* 1984; Barnby *et al.* 1990; Blanco *et al.* 1994, 1998; Hirose *et al.* 1999; Gainvors *et al.* 2000; Jia et Wheals 2000; Serrat *et al.* 2002). Pour ce qui est de leur activité, elle a été rapportée à environ 25U/mg de protéines totales.^{50,51}

4.1.2 PG de *Sp*

La PG de *Sp* (endoPG I) a quant à elle été retenue pour son activité spécifique (~450U/mg), sa température d'activité optimale (55°C) et sa stabilité relative à différentes températures (de 40°C à 90°C (35% d'activité)) et à différents pH (pH 4 à pH 8). De plus, cette PG est exprimée sous la forme de trois isozymes de glycosylation (endoPG Ia,b,c) ce qui rend son étude encore plus intéressante. Cependant, les pH optimaux connus pour ces isozymes sont de 3,5 à 4,5 ce qui laisse place à l'optimisation (Miyairi *et al.* 1985, 1997; Hasui *et al.* 1998, Shimizu *et al.* 2000, 2005).

⁵⁰ Aucun article ne présente des résultats d'activité spécifique pour les PGs de *Sc*. Pour ce qui est des PGs de *Km*, leur activité spécifique est calculée à ~100U/mg dans l'article de Barnby *et al.* (1990) et à 219U/mg dans l'article de Serrat *et al.* (2002).

⁵¹ Notez que les valeurs d'activités des PGs ne peuvent pas être comparées de façon précise puisque les tests d'activité et les conditions employés divergent d'un groupe de recherche à un autre et d'un article à un autre selon l'orientation favorisée par le groupe de recherche.

Comme pour les PGs des levures, la PG I de *Sp* a déjà été clonée; une raison de plus qui permet de croire à la réussite de l'objectif concernant la production de ces enzymes par des systèmes d'expression (Miyairi *et al.* 1997; Blanco *et al.* 1998; Hirose *et al.* 1998; Gognies *et al.* 1999; Siekstele *et al.* 1999; Gainvors *et al.* 2000; Jia et Wheals 2000; Shimizu *et al.* 2005).

4.1.3 Autres PGs intéressantes

Les PGs de deux autres fungi soient celles d'*Aspergillus niger* et celle de *Botrytis cinerea* ont aussi été identifiées comme très intéressantes. Certaines des PGs d'*Aspergillus niger* ont une très grande activité spécifique allant jusqu'à 4000U/mg. Malgré le fait que le pH optimal de ces enzymes tourne autour de 4,2 (sauf l'enzyme du gène PGB qui se trouve à 5,3) et que ces enzymes sont plutôt fragiles à des pH dépassant 5,5 et à des températures dépassant 50°C, elles sont en fait le choix le plus intéressant (Cooke *et al.* 1976; Kester et Visser 1990; Parenicova *et al.* 1998; Benen *et al.* 1999; Colangelo *et al.* 1999; Parenicova *et al.* 2000; Bonnin *et al.* 2002; Singh et Rao 2002). Cependant ces enzymes ont déjà été étudiées en profondeur et quelques-unes sont même brevetées et déjà utilisées commercialement pour la clarification des jus de fruits. Les enzymes d'*Aspergillus niger* n'ont donc pas été conservées pour le présent projet puisque, tel que mentionné à la section 2.1, les connaissances déjà acquises à leur sujet pourraient nuire au potentiel industriel du présent doctorat. (Cooke *et al.* 1976; Bussink *et al.* 1990; Harmsen *et al.* 1990; Kester et Visser 1990; Ruttkowski *et al.* 1990; Whittington *et al.* 1990; Bussink *et al.* 1991; Bussink *et al.* 1991; Kusters-van Someren *et al.* 1991; Ruttkowski *et al.* 1991; Bussink *et al.* 1992; Schroter *et al.* 1994; Lang et Looman 1995; Visser *et al.* 1995; Parenicova *et al.* 1998; Benen *et al.* 1999; Colangelo *et al.* 1999; van Santen *et al.* 1999; Armand *et al.* 2000; Limberg *et al.* 2000; Pagès *et al.* 2000; Parenicova *et al.* 2000; Parenicova *et al.* 2000; Pagès *et al.* 2001; Maldonado *et al.* 2002; Singh et Rao 2002). Pour ce qui est des PGs de *Botrytis cinerea*, des résultats d'études de caractérisation datant de plusieurs décennies leur conféraient une très grande activité spécifique allant jusqu'à 7092 U/mg et un pH optimal d'environ 4,5 (Urbanek et Zalewska-Sobczak 1975a, 1975b; Schejter 1988). Même si la validité de ces résultats peut aujourd'hui être contestée à cause des

méthodes de purification et des tests de mesure d'activité employés, il n'en reste pas moins que ces PGs démontraient un certain potentiel. Plus récemment, des publications ont exposé la présence d'une famille de 6 gènes de PG chez ce microorganisme, mais il fallait encore trouver lesquels de ces gènes démontrent une activité semblable à celles obtenues dans les études de 1975 (Wubben *et al.* 1999; ten Have *et al.* 2001). En analysant les résultats de l'article de ten Have *et al.* (2001), les variants BcPG2 et BcPG6 des enzymes de cet organisme semblent être les plus intéressants à explorer. En effet, leur ARN est présent en grande quantité par rapport aux autres variants. De plus, selon l'article de Wubben *et al.* (1999) BcPG6 fait partie de la même région (V) de l'arbre de l'évolution des PGs que celles de *Km* et de *Sc*. Au début du présent projet de doctorat (soit en 2003), l'étude des produits de ces gènes avait été proposée comme complément au présent projet de doctorat. Cependant l'équipe de Jacques Benen a été plus rapide que la nôtre et elle a publié, en 2005, les résultats de la caractérisation de cinq des six PGs de *Botrytis cinerea* exprimées dans *Pichia pastoris* (Kars *et al.* 2005). Le pH optimal des cinq enzymes était similaire à ceux obtenus en 1975 soit de 4,5. Le $V_{\max(\text{app})}$ de ces BcPGs, mesuré à 30°C va de 10 à 900U/mg dont 150U/mg pour la BcPG6 et 900U/mg pour la BcPG2. Le profil d'activité en fonction de la température et la stabilité thermique de ces enzymes n'ont toutefois pas été présentés dans cet article, on pourrait néanmoins croire que leur température optimale d'activité se situerait autour de 37°C tel que mesuré pour les deux endo-PGs étudiées dans l'article de Johnston et Williamson datant de 1992.

4.2 GÈNES DE PGS OBTENUS

4.2.1 Gènes, séquences primaires et homologie des PGs de *Sc* et de *Km*.

Les gènes des PGs de *Km* et de *Sc* ont été isolés par la méthode PCR. Leur séquence a été vérifiée par séquençage. Le gène isolé de *Sc* a 99,7% d'homologie avec le gène *PGU1* (numéro d'accèsion NC_001142), soit 6 bases de différentes dont la moitié se trouve dans le signal séquence. Le gène isolé de *Km* a 98.1% d'homologie avec le gène *epg1* (numéro d'accèsion AJ000076), soit 18 bases de différentes et 1 codon de plus.

Pour ce qui est des séquences primaires, la PG de *Sc* a 99,7% d'identité avec la PG encodée par PGU1, soit un seul acide aminé de différent et la PG de *Km* a 95,9% d'identité avec la PG encodée par epg1, soit 14 acides aminés de différents et 1 acide aminé de plus soit une valine à la position 122. Cette valine doit être située dans une boucle puisque l'activité de la PG de *Km* ne semble pas affectée par cette modification, elle n'influence donc pas sa conformation de manière significative. De plus, cette position ne semble pas située dans une zone impliquée dans la liaison au substrat ou dans la catalyse si on se fie uniquement à la séquence primaire des PGs (voir figure 1.12). Cette zone commençant plutôt vers l'acide aminé 150. La séquence du gène de la PG de *Sc* ainsi que sa séquence primaire sont présentées à l'annexe II et la séquence du gène de la PG de *Km* obtenu ainsi que sa séquence primaire sont présentées à l'annexe III.

4.2.2 Gène, séquence primaire et homologie de la PG de *Sp*.

Le gène de *Sp* a été synthétisé par PCR récursif à partir de l'hybridation de plusieurs oligos synthétiques suivie de leur amplification. Cette stratégie a été retenue pour deux raisons soit 1) pour éviter d'avoir à cultiver des fungi au laboratoire, ce qui implique un contrôle microbiologique plus serré et 2) pour permettre le contrôle de la séquence nucléotidique du gène. En effet, la séquence du gène a été conçue afin que son code génétique soit conforme à celui préféré par les hôtes prévus pour la production de la PG. L'optimisation des codons a été effectuée selon un compromis entre les codons préférentiels de *E. coli* et ceux de *Sc*. La protéine codée a la même séquence en acides aminés que la PG mature produite de façon naturelle par le fungus, mais sa séquence nucléotidique est différente à cause de son optimisation pour l'expression dans les hôtes choisis.

Les premiers essais de synthèse ont été infructueux et des améliorations au design initial ont dû être apportées.⁵² Pour faciliter l'amplification, un seul oligo d'extrémité (complémentaire au bout 5' et au bout 3' de la séquence nucléotidique) a été utilisé, soit l'oligo F₀. Cette stratégie a nécessité que le design de l'oligo R_{1x} soit refait.

⁵² Seuls les oligos du design optimal ont été présentés dans la section matériel et méthodes.

Cependant, elle a permis d'éliminer le facteur d'incertitude reliée à l'hybridation des oligos de bout. En effet, les conditions optimales d'hybridation sont différentes d'un oligo à un autre à cause de leur composition. Même si la température d'hybridation calculée est identique pour deux oligos, ça ne signifie pas qu'ils vont nécessairement se comporter de la même manière. En utilisant le même oligo pour l'amplification des deux bouts, il a été plus facile d'optimiser la température d'hybridation et la possibilité que la synthèse ne fonctionnait pas à cause d'un des oligos de bout a été exclue. Malgré les améliorations apportées, le gène de *Sp* obtenu par cette méthode n'était pas parfait. Il avait 96% d'homologie par rapport au design (résultats non présentés). Des mutagenèses dirigées ont dues être effectuées afin de corriger la séquence avant d'effectuer le clonage dans le vecteur d'expression. La séquence du gène optimisé de la PG de *Sp* ainsi que sa séquence primaire sont présentées à l'annexe IV.

4.3 SYSTÈMES D'EXPRESSION

Trois systèmes d'expression potentiels ont été considérés et construits pour le projet soit un système procaryote pour l'expression par *Escherichia coli* et deux systèmes pour l'expression eucaryote soit dans *Saccharomyces cerevisiae* et dans *Pichia pastoris*. La comparaison de ces trois systèmes permettait l'étude de l'effet du système d'expression sur le taux d'expression et sur l'activité de l'enzyme. Puisque le système d'expression bactérien ne peut pas effectuer de glycosylation et que les différents systèmes eucaryotes peuvent quant à eux produire différents patrons de glycosylation (Bretthauer et Castellino 1999, Gemmill et Trimble 1999, Cereghino et Cregg 2000), ces systèmes permettaient aussi l'étude de l'impact de la glycosylation sur l'enzyme. De plus, en étudiant plus d'un système à la fois, il devient plus facile de choisir un système de production de l'enzyme pour l'application souhaitée, la décision allant vers le plus efficace et le moins coûteux.

Les trois systèmes sont vendus chez Invitrogen et impliquent l'expression de la protéine à l'extérieur du cytoplasme cellulaire ce qui en facilite la purification. En effet, la sécrétion de l'enzyme évite une étape de lyse cellulaire lors de la purification, ce qui élimine des coûts pour la formulation du produit et évite aussi une dégradation de

l'enzyme par les protéases intracellulaires. De plus, la PG est généralement sécrétée par les micro-organismes qui la produisent; exprimer la PG dans l'environnement extracellulaire allait donc de soi. Le vecteur pBADgIII d'Invitrogen a été choisi comme plasmide d'expression procaryote puisqu'il possède une séquence signal dirigeant l'expression des protéines dans le périplasme. Le vecteur d'expression pYES2/CT a été choisi pour l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae*. Il ne contient pas de séquence signal dirigeant la sécrétion, la séquence signal propre aux gènes des PGs devait donc être incluse lors du clonage. L'expression de la protéine est constitutive et augmentée avec l'utilisation de galactose. Pour ce qui est de l'expression dans *Pichia pastoris*, le vecteur pGAPZ α a été choisi. Il contient sa propre séquence signal soit celle du facteur de reproduction Z α de *Saccharomyces cerevisiae*. Le vecteur pGAP contient un promoteur constitutif, c'est-à-dire que l'expression des gènes ne nécessite pas d'inducteur spécifique comme c'est le cas pour le vecteur pPIC (actuellement le plus utilisé dans *Pichia pastoris*) dont le promoteur requiert du méthanol pour induire l'expression des gènes. La carte et le site de clonage multiple de ces vecteurs sont présentés à l'annexe V.

Malgré le fait que les systèmes d'expression choisis sont des systèmes commerciaux, ils nécessitaient des modifications pour permettre l'insertion des gènes le plus près possible des promoteurs et dans le bon cadre de lecture pour leur traduction en protéine. Puisque des modifications étaient nécessaires, les sites de clonage multiple des trois vecteurs ont été retouchés afin que le clonage de tous les gènes et séquences signal se fasse avec les mêmes enzymes de restriction. Ce système, et le fait que le vecteur pYES ne possède pas sa propre séquence signal, a permis de préparer plusieurs combinaisons des trois gènes de PGs (*Sc*, *Km* et *Sp*) avec les différentes séquences signal (*Sc*, *Km* et Z α). La comparaison des taux d'expression engendrés par ces différentes séquences signal est ainsi devenue possible.⁵³ La figure 4.1 présente un schéma d'une construction type d'un gène et de sa séquence signal et le tableau 4.1 présente les 21 constructions obtenues par la combinaisons des différentes séquences signal possibles avec les trois gènes et ce pour chaque vecteur. Il est à noter qu'une

⁵³ L'étude de comparaison des taux d'expression engendrés par les différentes séquences signal n'a toutefois pas été poursuivie dans le cadre de ce projet.

nomenculture a été déterminée afin de permettre la distinction entre la séquence signal et le gène de la protéine mature. La séquence signal⁵⁴, si de source différente à celle du gène de la protéine mature, est écrite entre parenthèses, suivie par la source du gène de la PG mature. Cette nomenclature est aussi utilisée pour indiquer la provenance des PG; par exemple la PG de *Sc* est la PG provenant de la construction *Sc*.

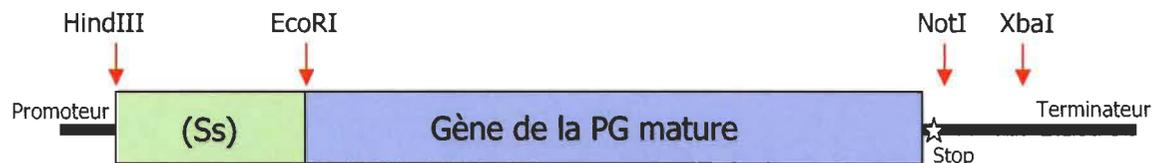


FIGURE 4.1 Schéma d'une construction type d'un gène et de sa séquence signal dans les systèmes d'expression réalisés. La séquence signal est représentée par le sigle (Ss). Les sites de restriction communs à toutes les constructions sont identifiés. Le site de restriction HindIII est absent devant la séquence signal gIII de pBAD et devant la séquence signal Z α de pGAP. De plus, HindIII est enlevé pour faire place à une séquence consensus Kozak devant le codon d'initiation de la traduction dans le vecteur d'expression pGAP. Le site de restriction EcoRI ajoute un glutamate et une phénylalanine au début des PGs matures lorsqu'il est présent. Le codon stop est représenté par une étoile.

⁵⁴(gIII) : séquence signal de la protéine pIII exprimée dans la capsid du phage filamenteux fd; (Km) : séquence signal de la PG de *Km*; (Sc) : séquence signal de la PG de *Sc*; (Z α) : séquence signal du facteur « alpha mating » de *saccharomyces cerevisiae*.

pBAD (<i>Escherichia coli</i>)	pYES (<i>Sacc. cerevisiae</i>)	pGAP (<i>Pichia pastoris</i>)
(gIII)Sc (gIII)Km (gIII)Sp		
	Sc (Sc)Km (Sc)Sp	Sc (Sc)Km (Sc)Sp
	Km (Km)Sc (Km)Sp	Km (Km)Sc (Km)Sp
	(Z α)Sc (Z α)Km (Z α)Sp	(Z α)Sc (Z α)Km (Z α)Sp

TABLEAU 4.1 Les 21 constructions obtenues pour les différents systèmes d'expression. Les séquences signal sont indiquées entre parenthèses. Un site de restriction EcoRI encodant les acides aminés glutamate et phénylalanine est présent entre les séquences signal et les gènes de PG matures. Lorsque aucune séquence signal n'est indiquée, c'est que le gène contient sa propre séquence signal et qu'il n'y a pas de site EcoRI ajouté au début de la protéine mature. Les hôtes transformés par les vecteurs sont entre parenthèses.

4.4 EXPRESSION ET PURIFICATION

4.4.1 Expression pilote dans *Escherichia coli*

Plusieurs tentatives ont été faites pour essayer d'exprimer une PG dans *Escherichia coli*, mais sans succès. Il est certain que d'autres efforts auraient pu être faits pour obtenir une protéine, comme par exemple changer de souche d'expression ou induire dans un plus gros volume, surtout que d'autres équipes de recherche ont réussi cet exploit (Laing et Pretorius 1993; Shimizu *et al.* 2005). Cependant, des raisons importantes ont fait que les recherches concernant l'expression dans cet hôte ont été mises de côté. Premièrement, les niveaux d'expression des PGs obtenues par des systèmes bactériens sont plutôt faibles (et 0,2U/mL⁵⁵ et 3,75U/mL⁵⁶). Deuxièmement, les résultats des recherches effectuées en parallèle avec le système d'expression pYES dans *Saccharomyces cerevisiae* étaient encourageants (voir section suivante). Et finalement, l'aspect industriel du projet ne permettait pas de consacrer plus temps à cette étape, surtout qu'une autre alternative existait et fonctionnait.

4.4.2 Expression dans *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.2.1 Optimisation de l'expression

L'expression dans *Saccharomyces cerevisiae* a été mise au point avec les gènes des PGs provenant de *Sc* et de *Km* avec leur propre séquence signal. Tout d'abord la culture des levures en présence de glucose et de galactose a été menée. Tel que spécifié dans le manuel d'utilisation du vecteur pYES2/Ct (Invitrogen), l'expression avec ce vecteur est constitutive. Cependant, l'utilisation du galactose comme source de carbone est plus efficace que l'utilisation du glucose, car ce dernier réprime le promoteur P_{GAL1} (Giniger *et al.* 1985; West *et al.* 1984). En effet, les protéines sont surexprimées plus tôt lorsqu'elles sont produites dans du YP galactose

⁵⁵ PG d'*Erwinia carotovora* produite dans la souche JM103.

⁵⁶ PG de *Stereum purpureum* produite dans *Escherichia coli*. 442U/mg, donc 8,48 mg/L pour une fermentation de 8L dans la souche Origami (D3).

comparativement à lorsqu'elle sont produites dans du YPD. Un exemple des résultats obtenus avec cette étude est présenté à la figure 4.2. Il est important de noter que l'expression avec du glucose reste possible même si elle est retardée.

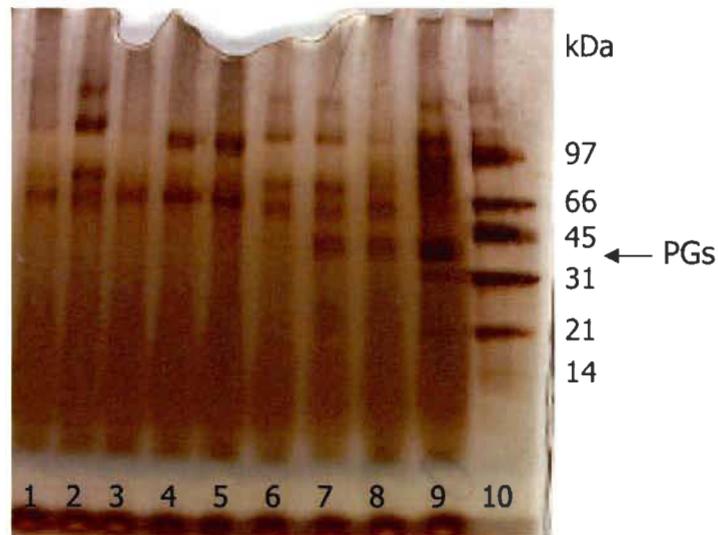


FIGURE 4.2 Inductions dans *Saccharomyces cerevisiae*. 20 μ L de surnageant des cultures ont été déposés dans les puits. La préculture a été faite dans du YPD. Puits 1 et 2 : souche INVSc non transformée cultivée dans du YP galactose 12 heures et 24 heures (contrôles négatifs). Puits 3 : *Saccharomyces cerevisiae* souche CECT 1389 cultivée dans du YP galactose 12 heures. Puits 4 et 5 : *Kluyveromyces marxianus* souche Y-49 cultivée dans du YP galactose 12 heures et 24 heures. Puits 6 et 7 : INVSc transformée avec pYES-*Km* cultivée dans du YP glucose 12 heures et 24 heures. Puits 8 et 9 : INVSc transformée avec pYES-*Km* cultivée dans du YP galactose 12 heures et 24 heures. Le marqueur utilisé est le LMW protein standard de Bio-Rad, puits 10.

Dans le manuel d'utilisation du vecteur pYES2/Ct, il est mentionné que l'induction des protéines peut débuter plus rapidement lorsque les cellules sont maintenues dans le raffinose plutôt que dans le glucose avant l'induction (parce que le glucose est un répresseur). Dans le projet qui nous intéresse, la quantité d'enzymes potentiellement produites après un temps donné est plus importante que le moment où les enzymes commencent à être produites. Néanmoins, il fallait prendre la peine de vérifier l'effet du milieu de préculture des cellules puisqu'un impact sur l'expression était possible. Les cellules ont ainsi été maintenues soit dans du YPD, soit dans du YP raffinose et tel que prévu, une fois l'induction lancée, les protéines étaient induites plus rapidement, peut-être 2 heures plus tôt, dans le raffinose (résultats non montrés). Cependant, lorsqu'on considère le temps nécessaire pour obtenir une préculture maintenue dans du raffinose comparativement à une préculture maintenue dans le glucose, ces 2 heures ne sont plus significatives. En effet, pour qu'une préculture atteigne une DO_{600} de 2 dans du glucose cela nécessite environ 16 heures, tandis que dans du raffinose, nos expériences démontrent que cela peut prendre jusqu'à 3 jours. Si l'on considérait seulement le facteur relié à la rapidité d'expression, il serait inutile d'effectuer des précultures dans le YP raffinose. Cependant, le hasard a fait que d'autres conclusions ont pu être tirées par rapport à l'utilisation du raffinose dans la préculture. Ces conclusions sont liées au taux d'expression des PGs par rapport aux protéines totales produites, en d'autres mots, à la pureté de la PG dans le surnageant. En effet, les résultats des études sur les sources de carbones utilisées pour les précultures ont permis de constater qu'une protéine non-identifiée d'un poids moléculaire d'environ 30 kDa apparaît dans le surnageant à mesure que la durée de l'induction est augmentée. Cette protéine apparaît toutefois plus tard lorsque les cellules sont préalablement cultivées dans le raffinose plutôt que dans le glucose. En observant attentivement le puits 9 de la figure 4.2, on voit l'apparition de cette protéine après 24 heures d'induction lorsque la PG de *Km* est produite après une préculture dans le glucose. La figure 4.3 présente une étude d'induction de cette protéine après une préculture dans le raffinose. On y voit que la protéine de 30 kDa commence à apparaître après 30 heures d'induction et qu'elle est présente après 36 heures. Afin de vérifier ces observations, deux nouvelles préparations de PGs provenant de *Km* ont été faites dans les mêmes conditions, mais à partir de précultures différentes. Des résultats clairs ont

été obtenus (voir figure 4.4). Après 31 heures d'induction (dans le YP galactose), une protéine de 30 kDa apparaît lorsque la préculture est effectuée dans du YP glucose, tandis qu'elle est absente lorsque la préculture est effectuée dans le raffinose. Une préculture dans le YP glucose peut être intéressante dans le cas où l'activité des PGs doit être étudiée sommairement, comme par exemple lors du criblage de clones, car elle permet d'obtenir des enzymes en moins de temps (jusqu'à deux jours plus tôt) tout en économisant sur les coûts de produits (le raffinose est plus cher que le glucose et doit être stérilisé avec un filtre contrairement au glucose qui peut être autoclavé). Toutefois, la préculture dans le raffinose pourra être privilégiée lorsque la préparation de protéines demandera un plus haut niveau de pureté; par exemple, lorsqu'une estimation de la quantité de PGs par rapport aux protéines totales sera nécessaire.

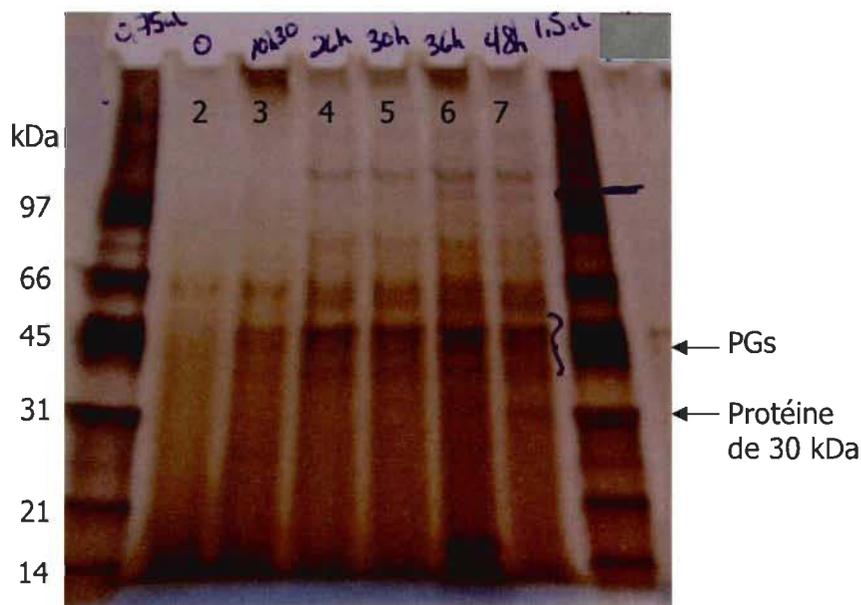


FIGURE 4.3 Induction de la PG de *Sc* dans *Saccharomyces cerevisiae* après une préculture dans du YP raffinose. Puits 1 et 8 : Marqueur de protéines LMW de Bio-Rad. Puits 2 à 7 : 10 μ L de surnageant de culture prélevés à différents temps de culture (de 0 à 48h).⁵⁷

⁵⁷ Note pour le puits 7 : le surnageant de la culture de 48 heures a été dilué par inadvertance. Le volume déposé a été ajusté le mieux possible, mais il ne reflète pas la quantité exacte de protéines dans 10 μ L de surnageant, c'est pourquoi il semble y avoir moins de protéines exprimées après 48 heures qu'après 36 heures.

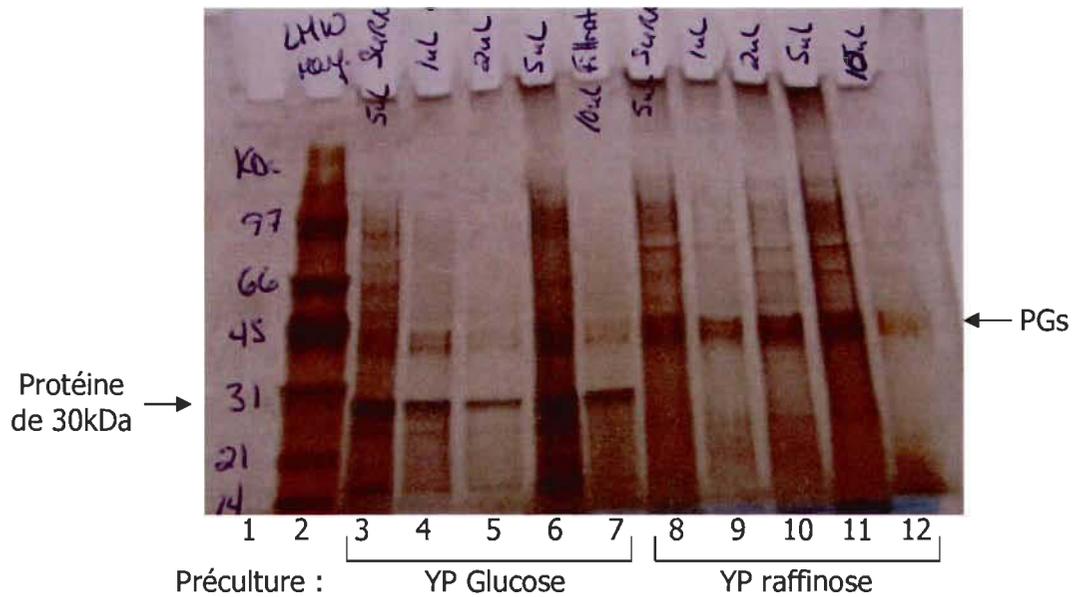


FIGURE 4.4 Induction de 31 heures de la PG de *Km* dans *Saccharomyces cerevisiae* après une préculture dans du YP glucose ou dans du YP raffinose. Puits 1 : Rien. Puits 2 : Marqueur de protéines LMW de Bio-Rad. Puits 3 et 8 : 5 μ L de surnageant de culture. Autres puits : Resuspensions dans de l'acétate de sodium 50mM pH 5,0 des protéines du surnageant concentrées 2,4 fois sur membrane Amicon de 30kDa. Puits 4 et 9 : 1 μ L, puits 5 et 10 : 2 μ L, puits 6 et 11 : 5 μ L. Puits 7 et 12 : 10 μ L du filtrat.

4.4.2.2 Conditions d'expression retenues

Les conditions retenues pour l'expression des PGs dans *Saccharomyces cerevisiae* sont les suivantes: une préculture de 16 à 24 heures dans du YP glucose (ou de 30 à 65 heures dans du YP raffinose), suivie d'une induction de 20 à 24 heures dans du milieu YP galactose. L'induction est initiée par la resuspension à une DO_{600} de 0,4 à 0,5 des cellules de la préculture préalablement centrifugées à 2000g. Les cultures se font à 30°C dans des flacons de 15 mL à 1 Litre, selon le besoin, avec une agitation de 300 RPM. Un exemple de préparation de PGs selon ces conditions est présenté à la figure 4.5. Notez la grande pureté de la préparation. La méthode de purification est celle décrite à la section 4.4.4.

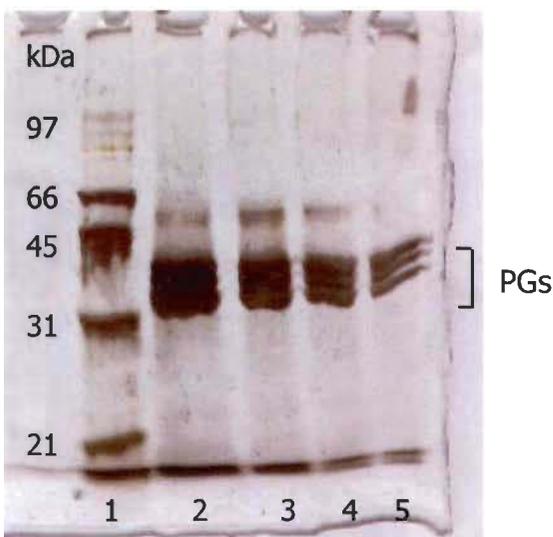


FIGURE 4.5 PGs de *Sc* produites dans *Saccharomyces cerevisiae*.

Puits 1 : Marqueur de protéines LMW de Bio-Rad. Puits 2 à 5 : 10 μ L, 5 μ L, 2 μ L et 1 μ L de surnageant de culture. Induction de 24 heures dans du YP galactose précédée d'une préculture de 16 heures dans du YP glucose.

4.4.2.3 Patrons et taux d'expression des PGs de *Km* et de *Sc* produites dans *Saccharomyces cerevisiae*

Le gène de la PG de *Km* dans *Saccharomyces cerevisiae* est exprimé en deux glycozymes d'environ 38 et 43 kDa. La PG de *Km* possède effectivement 2 sites putatifs de glycosylation qui peuvent être responsables de ses glycoformes, soit aux asparagines des positions 189 et 293.⁵⁸ Le gène de la PG de *Sc* est quant à lui exprimé en trois glycozymes obtenues par des variations dans la glycosylation des asparagines aux positions 318 et 330. Leurs poids moléculaires sont d'environ 37, 41 et 45 kDa, la plus petite PG étant la forme non-glycosylée.⁵⁹ La figure 4.6 démontre ces patrons d'expression.

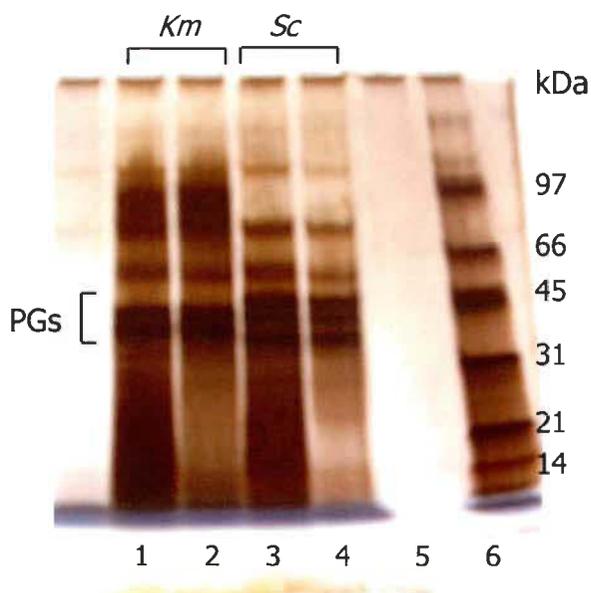


FIGURE 4.6 Patron d'expression des PGs de *Km* et de *Sc* produites dans *Saccharomyces cerevisiae*.⁶⁰ 10 μ L de surnageant d'une culture de 24 heures dans du YP galactose ont été déposés dans les puits. Puits 1 et 3 : précultures de 16 heures dans le YP glucose. Puits 2 et 4 : précultures de 40 heures dans le YP raffinose. Puits 5 : rien. Puits 6 : Marqueur de protéines LMW de Bio-Rad.

⁵⁸ La glycosylation de la PG de *Km* produite dans *Saccharomyces cerevisiae* sera discutée dans la section 6.2 portant sur l'identification et l'expression des clones actifs.

⁵⁹ *Idem* pour la PG de *Sc*.

⁶⁰ Notez que le gel a été trop coloré.

Le taux exact d'expression des PGs ne peut être obtenu qu'après l'isolation complète des PGs du reste des protéines sécrétées, ce qui, dans le cadre d'une utilisation industrielle des enzymes est inutile et trop coûteux. Cependant, un estimé peut être effectué en comparant le niveau d'expression des protéines détectées sur SDS-PAGE avec le dosage des protéines totales. Par exemple, sur le gel de la figure 4.6, on peut estimer à 50% la quantité de PGs de *Km* et à 65% la quantité de PGs de *Sc* par rapport aux protéines totales détectées. En multipliant ces facteurs par les résultats de la quantification des protéines totales par le test BCA, on obtient *grosso modo* la quantité de PGs exprimées. Généralement, de 50 à 450 mg de PGs sont obtenus par Litre de milieu de culture.⁶¹

4.4.2.4 Note sur l'expression des PGs de *Sp* dans *Saccharomyces cerevisiae*

Les PGs de *Sp* n'ont pas été exprimées aussi fortement que les PGs de *Km* et de *Sc* produites dans *Saccharomyces cerevisiae*. Trois bandes de protéines difficilement perceptibles à l'œil sont retrouvées sur SDS-PAGE lorsque la séquence signal $Z\alpha$ est utilisée (résultats non présentés). Ces trois bandes concordent avec ce qui a déjà été publié concernant la PG de *Stereum purpureum* selon quoi cette enzyme serait exprimée en trois isoformes lesquelles seraient glycosylées sur 2, 3 et 4 sites de glycosylation (Shimizu *et al.* 2000).

4.4.3 Expression dans *Pichia pastoris*

L'expression dans *Pichia pastoris* s'est avéré plus simple que celle dans *Saccharomyces cerevisiae*. La préculture et la culture sont toutes deux effectuées dans un milieu YPD et les conditions de culture qui ont été utilisées sont les mêmes que pour *Saccharomyces cerevisiae* soit à une température de 30°C avec une agitation de 300 RPM le tout dans des flacons de 15mL à 1 Litre. De plus, les rendements des PGs par rapport aux protéines totales sont supérieurs à ceux obtenus dans *Saccharomyces* et la pureté de la préparation ne semble pas influencée par la durée de la culture. La figure 4.7 présente une partie des résultats d'une étude d'induction de la PG dans *Pichia*

⁶¹ Ces rendements devraient être plus importants si l'expression était faite en fermenteur.

pastoris en fonction du temps. On remarque que, contrairement à l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae*, aucune protéine additionnelle n'apparaît en fonction du temps ce qui a permis d'augmenter la durée de l'induction et ainsi d'obtenir un meilleur rendement protéique. En effet, 316 mg de PG de *Sc* par Litre de culture ont été obtenus dans *Pichia pastoris* comparativement à un maximum de 225 mg/L dans *Saccharomyces cerevisiae*.⁶² Il est à noter que seule l'expression du gène de la PG de *Sc* a été tenté jusqu'à présent dans *Pichia pastoris*. Il est prévu que les autres constructions seront aussi exprimées, cependant elles ne le seront pas dans le cadre de ce projet de doctorat.

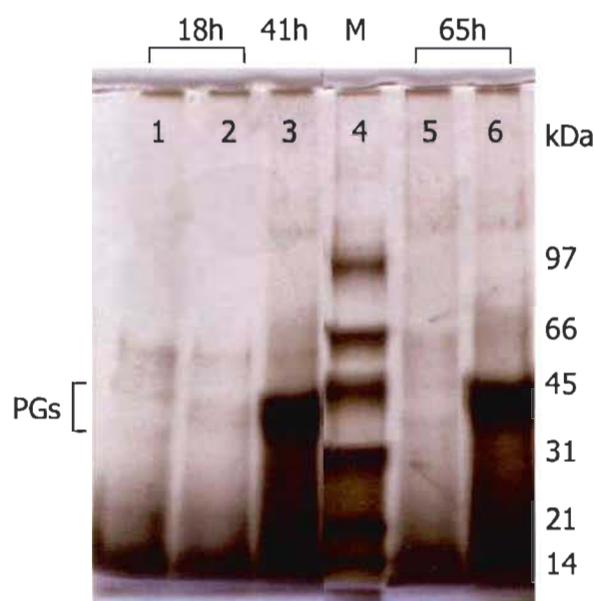


FIGURE 4.7 PGs de *Sc* produites dans *Pichia pastoris*. 10 μ L de surnageant de culture ont été déposés dans les puits. Puits 4 : Marqueur de protéines LMW de Bio-Rad. Puits 1 et 5 : Souche GS115 non transformée cultivée pendant 18 heures et 65 heures (contrôle négatif). Puits 2, 3 et 6 : GS115 transformée avec pGAP-*Sc* cultivée pendant 18 heures, 41 heures et 65 heures.⁶³

⁶² Pour une induction de 90 heures dans *Pichia pastoris* et 24 heures dans *Saccharomyces cerevisiae*.

⁶³ La partie centrale du gel (entre les puits 3 et 4) a été enlevée puisqu'elle n'était pas pertinente à la discussion. La bande de PG du puit 3 est plus basse que celle du puit 5 uniquement à cause d'un problème de migration du gel.

4.4.3.1 Patron d'expression des PGs de *Sc* produites dans *Pichia pastoris*

Dans *Pichia pastoris*, on constate une différence notable dans le patron d'expression de la PG de *Sc* comparativement à son expression dans *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, dans *Pichia* la PG de *Sc* est exprimée en deux glycozymes au lieu d'en trois comme dans *Saccharomyces*. Sur le gel SDS-PAGE présenté à la figure 4.8, du surnageant contenant les PGs de *Sc* produites dans *Saccharomyces cerevisiae* et des dilutions de surnageant contenant les PGs de *Sc* produites dans *Pichia pastoris* ont été mis côte à côte afin de permettre la visualisation de cette différence. On remarque sur cette figure que la plus petite des glycozymes produites par *Pichia pastoris* n'est pas exactement du même poids moléculaire que la plus petite PG produite dans *Saccharomyces cerevisiae*. Elle aurait un poids moléculaire légèrement supérieur se rapprochant plus de 39 kDa que de 37kDa. Quant à l'autre PG elle a sensiblement le même poids que la PG de *Saccharomyces* qui se situe au milieu du patron d'expression, soit à environ 41 kDa. Cette différence s'explique par les variations dans les patrons de glycosylation des protéines produites par ces deux levures. Les glycoprotéines produites dans *Pichia pastoris* contiennent généralement de 8 à 12 unités de mannose. Les oligosaccharides des protéines produites dans *Saccharomyces cerevisiae* sont pour leur part beaucoup plus long et ramifiés, allant jusqu'à 50 unités de mannose (Bretthauer et Castellino 1999). Dans les deux cas, les mannoses sont liés à un oligosaccharide de base composé de deux unités d'acétyl-glucosamine et de huit unités de mannose. Le poids moléculaire du plus petit oligosaccharide produit par *Pichia pastoris* est donc de 1,72 kDa lequel est augmenté de 162 Da pour chaque mannose additionnel. On peut donc supposer que les deux bandes de PGs obtenues par l'expression dans *Pichia pastoris* sont toutes les deux glycosylées puisque leur poids correspond à une PG possédant une glycosylation de 8 à 10 mannoses et à une autre PG possédant 2 glycosylations de 8 à 12 mannoses.

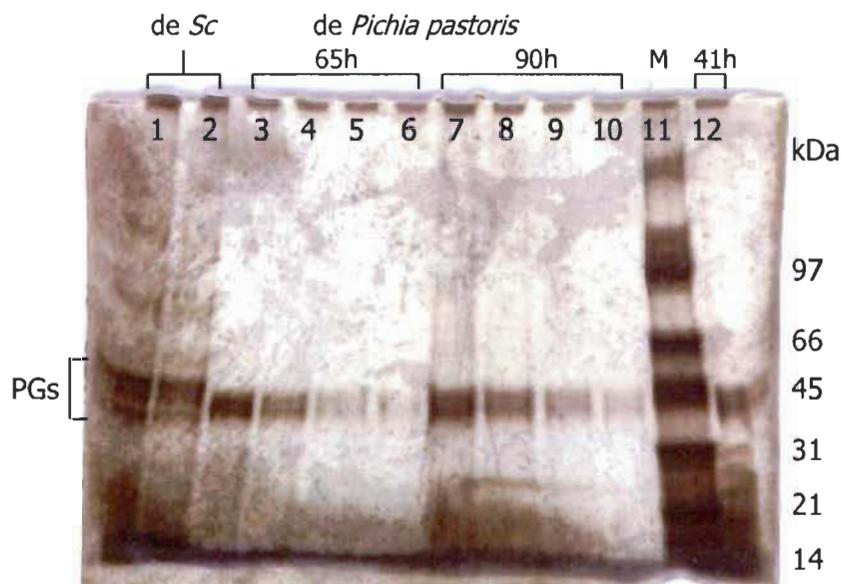


FIGURE 4.8 **Patrons d'expression des PGs de *Sc* produites dans *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*.** 10 μ L de ont été déposés dans les puits. Puits 1 et 2 : Induction de 24 et 48 heures dans *Saccharomyces cerevisiae*. Puits 3 à 6 : Surnageant de l'induction de 65 heures dans *Pichia pastoris* dilué 1/10, 1/20, 1/50 et 1/100. Puits 7 à 10 : Surnageant de l'induction de 90 heures dans *Pichia pastoris* dilué 1/10, 1/20, 1/50 et 1/100. Puits 11 : Marqueur de protéines LMW de Bio-Rad. Puits 12 : Surnageant de l'induction de 41 heures dans *Pichia pastoris* dilué 1/20.

4.4.4 Purification des PGs

L'expression recombinante des PGs dans les systèmes eucaryotes choisis a bien fonctionné. Les PGs sont exprimées en grande quantité dans les surnageants de culture des deux levures étudiées et ce de façon majoritaire. De plus, leurs conditions d'induction ont été optimisées afin que l'apparition d'autres protéines soit limitée. Le niveau d'expression relatif des PGs dans le surnageant ainsi que le faible taux de protéines co-exprimées a permis, tel que souhaité, de limiter les étapes de purification au minimum. Pour l'application industrielle ou les tests sur la pâte, une simple centrifugation suivie d'une filtration⁶⁴ pour enlever les cellules encore vivantes et les débris cellulaires peuvent être effectuées. Par contre, pour le dosage de la quantité de protéines dans le surnageant à l'aide du test BCA ou pour la quantification de l'activité enzymatique par un tests détectant les sucres réducteurs, ces deux étapes devaient être suivies d'une ultrafiltration afin de changer le milieu de culture par du tampon. En effet, les sucres ajoutés au milieu de culture cellulaire encore présent dans le surnageant doivent être enlevés puisqu'ils interfèrent avec les acides aminés dosés dans le test BCA et aussi avec l'acide galacturonique produit par l'action de l'enzyme dans les tests colorimétriques, ce qui fausserait les résultats.

Puisque les étapes de purifications des PGs sont simples, aucune évaluation de la perte de protéines, comme on pourrait l'avoir fait dans le cas d'une purification impliquant une série de chromatographie, n'a été effectuée. En outre, la perte de protéines et d'activité spécifique est un facteur qui n'a pas été jugé pertinent à étudier pour deux autres raisons. Tout d'abord, la production de l'enzyme était axée sur la simplicité des méthodes de production et de purification et non sur le rendement maximal. Ensuite, la perte est probablement négligeable et d'autant plus reproductible d'un lot de protéines à un autre peu importe la PG produite.

⁶⁴ À la place de la filtration, un agent inhibant la croissance cellulaire aurait aussi pu être ajouté.

4.5 DÉTECTION ET MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Plusieurs tests de détection et de mesure de l'activité des PGs ont été essayés et dans certains cas ont dû être mis au point. Seuls certains d'entre eux ont été choisis pour la poursuite du projet. Des résultats types obtenus avec ces tests et les raisons qui ont guidé le choix des tests retenus seront décrits ci-après.

4.5.1 Le test de détection sur gélose

Le test de détection de l'activité sur gélose permet de savoir si un clone de levure produit une PG active et ce sans avoir à faire une culture liquide de ce clone. Il suffit d'isoler les cellules sur géloses PGA et de les repiquer pour en faire une copie sur une gélose ordinaire (YPD) avant de procéder à la coloration. Un autre aspect intéressant de ce test, est qu'il peut aussi servir d'indicateur pour déterminer la plage d'activité d'une enzyme. Pour ce faire, un même clone doit être inoculé sur des géloses PGA de différents pH lesquelles doivent ensuite être exposées à différentes températures d'activation. La figure 4.9 présente les résultats d'une étude effectuée en vue d'évaluer l'activité enzymatique de différentes levures à différents pH et différentes températures. On remarque sur cette figure que la présence et le diamètre des halos pour une même levure varie en fonction des conditions essayées. Pour ne citer que quelques exemples, à toutes les températures étudiées, on voit que les deux souches de *Saccharomyces* sont beaucoup moins actives à pH 6,2 qu'à pH 5,3 et qu'à 50°C, elles ne sont pas actives du tout à pH 6,2. De façon générale, on constate aussi que la PG produite par *Kluyveromyces marxianus* semble beaucoup plus active et/ou plus exprimée que les PGs des autres levures et ce dans toutes les conditions étudiées. Une chose importante à noter pour le présent projet est que la (les) PG(s) de *Kluyveromyces marxianus* sont encore actives à 50°C, pH 6,2 ce qui donne une longueur d'avance aux enzymes provenant de cette source pour leur application dans le procédé de fabrication du papier.

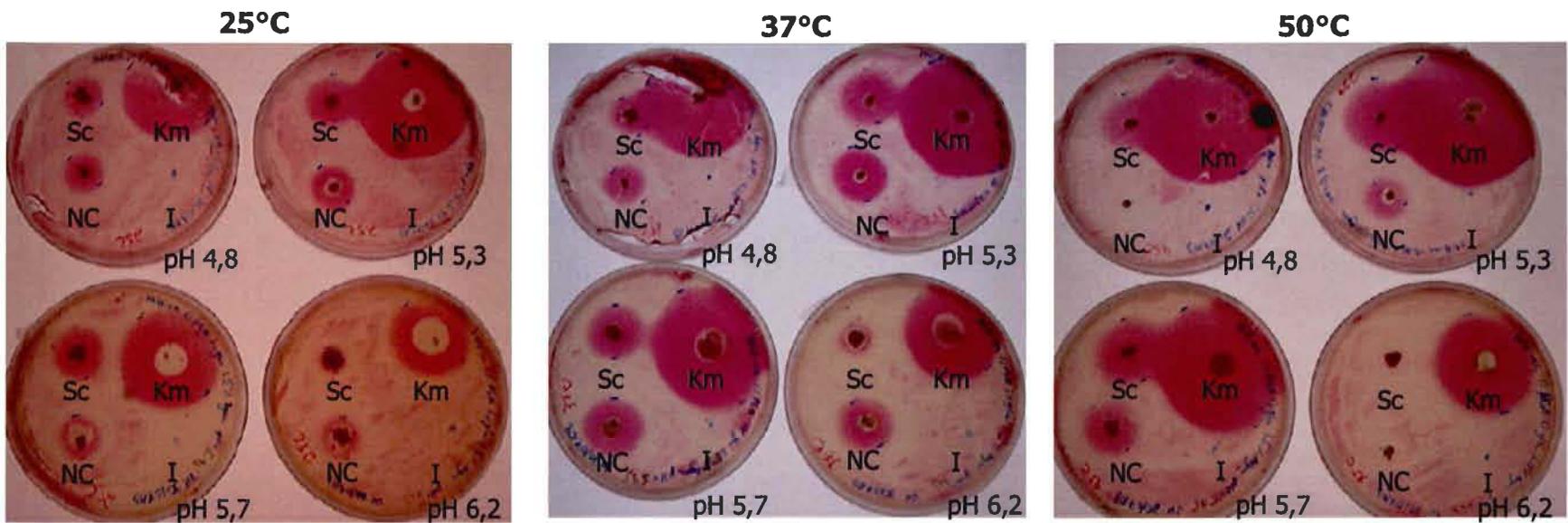


FIGURE 4.9 Test de détection de l'activité de la PG produite par différentes levures sur gélose PGA à différentes températures et différents pH. Sc : *Saccharomyces cerevisiae* souche CECT 1389, Km : *Kluyveromyces marxianus* Y-49, NC : *Saccharomyces cerevisiae* souche NCYC 365 et I : *Saccharomyces cerevisiae* souche INVSc qui ne produit pas de PG.⁶⁵

⁶⁵ Notez que la souche INVSc n'a pas poussé sur ces géloses parce que l'uracile a été omis dans le milieu de culture, toutefois la souche INVSc n'a jamais présenté d'activité de PG dans aucun autre essai.

Malgré le fait que ce test soit simple d'utilisation, il a tout de même fallu mettre au point les étapes de préparation du milieu de culture, sa composition et les conditions d'incubation des géloses afin d'obtenir des résultats de qualité satisfaisante. Lors de la préparation du milieu de culture, deux phénomènes survenaient régulièrement, soit la formation d'un précipité de PGA durant la stérilisation du milieu à l'autoclave et la formation de globules lors de l'ajustement du pH avec l'acide chlorhydrique. Pour éviter la formation de précipités de PGA dans le milieu de culture, ce dernier est maintenant solubilisé à l'autoclave avant l'ajout des autres produits. Pour ce qui est de la formation de globules occasionnés par l'ajout d'acide concentré lors de l'ajustement du pH, elle est maintenant évitée par l'utilisation d'une dilution de l'acide. La composition du milieu de culture a pour sa part dû être adaptée car les géloses contenant du YPD (le milieu général utilisé pour la croissance des levures) ne se décoloraient pas lors du lavage du rouge de ruthénium à l'eau. Une hypothèse probable expliquant ce phénomène est que le peptone contenu dans cette gélose (YPD) et non dans la gélose de YNB maintenant utilisée, a une structure permettant au colorant de s'y lier. Finalement, à force d'essayer différentes conditions pour l'incubation des géloses et pour l'activation des enzymes (pH des géloses, température et temps d'incubation), les limites du test ont été trouvées. Ainsi, les tests ne peuvent pas être effectués à des températures plus élevées que 60°C car la gélose peut se liquéfier. De plus, les tests ne peuvent pas être conduits à des pH plus bas que 4,75 car le milieu de culture ne fige pas. Les tests ne peuvent pas non plus être effectués à des pH en deçà de 6,2 car les levures ne poussent pas. Il a aussi été déterminé que 10 minutes d'incubation pour l'activation des enzymes après la croissance des levures sont suffisantes pour donner de beaux halos rouges lorsqu'il y a de l'activité. Heureusement, même si les zones d'étude de l'activité enzymatique sont limitées, elles ne causent pas de problème majeur pour la réussite du criblage préliminaire de la PG puisque nous cherchons une enzyme active à un pH de 5,0 et plus et à une température de 50°C et plus.

Quoiqu'il ait fallu lui apporter plusieurs ajustements par rapport à ce qui est mentionné dans la littérature, le test de détection de l'activité de la PG sur gélose reste un test idéal. C'est ce test qui a été conservé pour la première étape du criblage des clones produisant la PG. Il est néanmoins important de spécifier que cette façon de procéder

ne doit servir qu'à titre indicatif, car elle n'est pas précise. En effet, lors de la stérilisation à l'autoclave et lors de la solidification du milieu de culture, le pH varie de quelques dixièmes d'unité de pH (par exemple de 5,0 à 5,16). Il est ainsi difficile de s'assurer de l'exactitude du pH d'une gélose. Il est aussi difficile de contrôler la quantité de cellules inoculées sur le plat de Pétri, laquelle a aussi son importance quant à la quantité d'enzyme secrétées sur la gélose. Le test de détection de l'activité, comme son nom l'indique, n'est donc que qualitatif ce qui signifie qu'il ne permet pas de connaître de façon précise la vitesse de l'enzyme ni son niveau d'expression. Ainsi, pour connaître le potentiel réel d'une enzyme et dans le cas du présent projet, des mutants de l'enzyme, ce test doit absolument être combiné à un test de quantification de protéines et à un test de quantification de l'activité enzymatique.

4.5.2 Le zymogramme

Le test de détection de l'activité de la PG sur zymogramme permet de détecter l'activité des PGs contenues dans un milieu liquide et ce à différents pH et différentes températures. Pour ce faire, il faut déposer l'aliquote à étudier dans un puits d'un gel de polyacrylamide non-dénaturant contenant du PGA, le faire migrer, incuber le gel au pH et à la température souhaités et procéder à la détection. Des exemples de zymogrammes servant à détecter l'activité des PGs sont présentés aux figures 4.10 et 4.11. La figure 4.10 présente des essais effectués à 25°C à des pH allant de 3,0 à 5,5. On voit sur cette figure que les surnageants de culture des levures étudiées possèdent des enzymes actives à 25°C à des pH allant de 4,0 à 5,0 et jusqu'à 5,5 dans le cas de la PG de *Kluyveromyces marxianus*. De plus, il est clair que la PG de *Kluyveromyces marxianus* est plus active et/ou en plus grande quantité par rapport aux PGs des deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* étudiées. Ces résultats sont comparables avec les résultats obtenus avec le test de détection sur gélose (figure 4.9). Cependant, à pH 5,5 on aurait dû détecter de l'activité pour les souches de *Saccharomyces*. La quantité de PGs présentes dans le surnageant de culture de ces levures était probablement insuffisante pour que leur activité soit détectée par cette méthode. C'est un point négatif du zymogramme, car on peut passer à côté d'un mutant positif s'il n'est pas

25°C

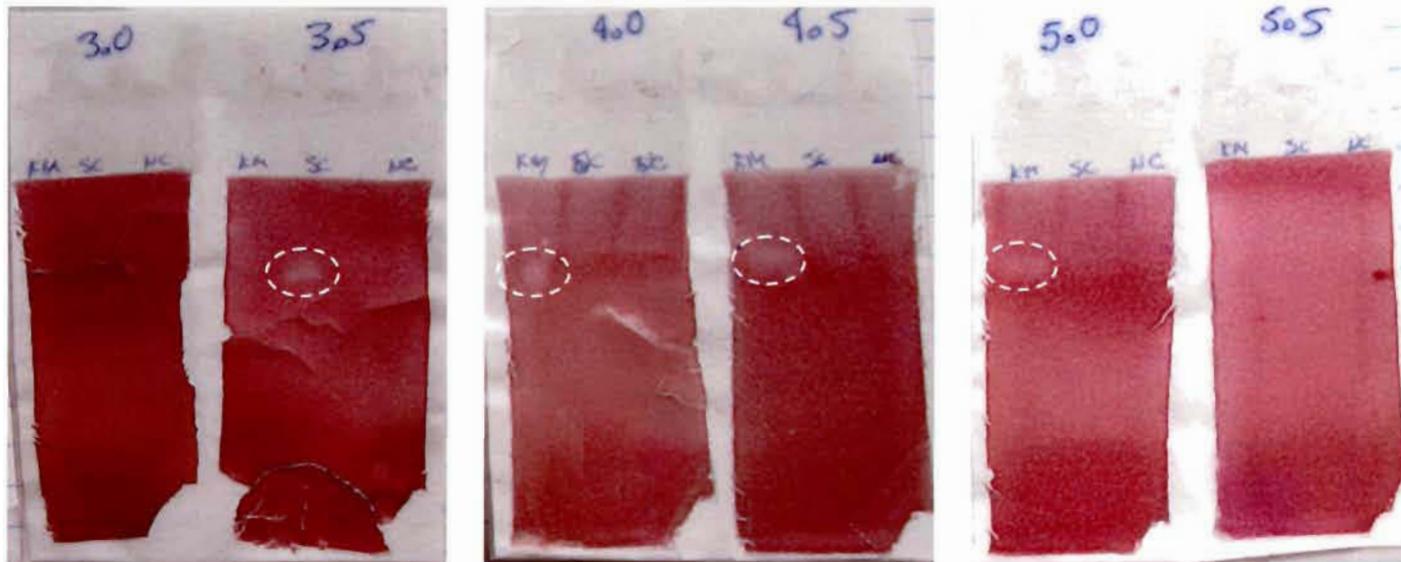


FIGURE 4.10 Détection de l'activité de la PG à 25°C et différents pH sur des zymogrammes. Le pH étudié est indiqué au-dessus de chaque gel. 10uL de surnageant de *Kluyveromyces marxianus* Y-49 (Km), de *Saccharomyces cerevisiae* souche CECT 1389 (Sc) et de *Saccharomyces cerevisiae* souche NCYC 365 (NC) ont été déposés dans les puits.

produit en assez grande quantité, ce qui est moins le cas pour le test de détection sur gélose. À la figure 4.11 des essais effectués à pH 4,5 à 37°C et à 50°C sont présentés. Afin de vérifier s'il était possible de détecter l'activité d'enzymes concentrées par précipitation, des échantillons de protéines précipitées à l'acétone et concentrées 5 fois ont été déposés à côtés des surnageants. Les résultats de ces deux zymogrammes sont plus faciles à constater que les résultats des zymogrammes de la figure 4.10. On remarque encore que la PGs de *Kluyveromyces marxianus* est plus active ou présente que les autres. On remarque aussi que la précipitation à l'acétone a fonctionné puisque les enzymes sont toujours actives. Cependant, il semble y avoir eu beaucoup de perte lors de cette étape (sauf dans le cas des PGs de *Kluyveromyces marxianus* qui étaient sûrement produite en plus grande quantité) ce qui fait qu'elle ne donne pas l'effet escompté et qu'elle est donc inutile. Les résultats présentés aux figures 4.10 et 4.11 sont en fait les plus beaux résultats qui ont été obtenus avec la méthode du zymogramme. Plusieurs gels ont dû être effectués dans les mêmes conditions pour en arriver à ces résultats.

Plusieurs raisons ont fait que le test de détection de l'activité de la PG sur zymogramme n'a pas été retenu pour le criblage des clones. Premièrement, et tel qu'il en a été question dans le paragraphe précédent, les résultats obtenus à l'aide de ce test sont peu concluants. Deuxièmement, la quantité de manipulations et de matériel nécessaire pour procéder à ce test n'est pas compatible avec les objectifs d'un criblage qualitatif qui sont d'évaluer le plus de clones possible, le plus rapidement possible et ce au moindre coût possible. On n'a qu'à penser au temps que l'inoculation des cultures liquides peut prendre et à la place que les cultures liquides occupent dans un incubateur pour comprendre que le criblage des clones peut déjà être limité à cette étape. Le fait d'avoir à effectuer des électrophorèses est aussi un facteur d'improductivité non négligeable pour le criblage. En effet, même si plusieurs électrophorèses peuvent être effectuées en même temps, cette étape demande tout de même un travail de la part du technicien, lequel est nécessairement limité par le fait qu'il ne peut déposer qu'un échantillon à la fois dans les puits. De plus, la quantité d'appareils disponibles et le temps de migration sont aussi importants à considérer

pH 4,5

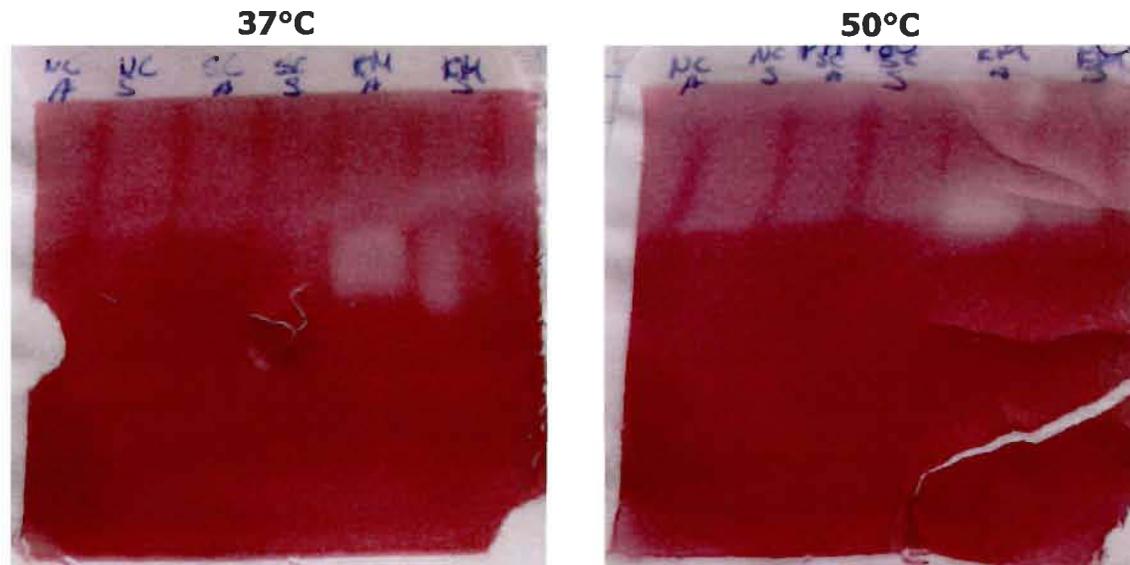


FIGURE 4.11 Détection de l'activité de la PG à pH 4,5 à 37°C et 50°C sur des zymogrammes. 10uL de surnageant de culture (S) ou de protéines précipitées à l'acétone et concentrées 5 fois (A) de *Saccharomyces cerevisiae* souche NCYC 365 (NC), de *Saccharomyces cerevisiae* souche CECT 1389 (Sc) et de *Kluyveromyces marxianus* Y-49 (Km) ont été déposés dans les puits.

dans le calcul, sans compter le temps de préparation des gels de polyacrylamide non-dénaturants qui doivent être faits en petits nombres et qui sont en soi difficiles à réaliser et à réussir. À toutes ces étapes peuvent s'ajouter la préparation des gels en vue de leur incubation pour l'activation des enzymes et la durée de cette dernière qui prend environ 20 heures. À titre indicatif, cette étape prend un maximum de 20 minutes avec le test de détection sur géloses (le transfert des plats de Pétri dans l'incubateur + 10 minutes d'incubation + 5 minutes pour la période de refroidissement avant la coloration). Si on considère le temps de manipulation, les milieux de culture et les solutions pour l'incubation des gels ainsi que l'appareillage et l'électricité, il est sans contredit que les coûts associés au criblage par zymogramme seraient très élevés. Et finalement, malgré toutes les raisons énumérées ci-haut, la meilleure raison qui a fait que le zymogramme n'a pas été retenu pour le criblage qualitatif des clones est bien simple : le test de détection de l'activité sur gélose, après qu'il ait été optimisé selon nos exigences, nous offrait une alternative qui rendait son utilisation inutile.

4.5.3 Le test de turbidimétrie

Le test de turbidimétrie est un test qui permet de quantifier l'activité enzymatique. Il aurait aussi pu être utilisé simplement pour détecter la présence de PG active. La figure 4.12 présente un graphique de la turbidité (mesurée par spectrophotométrie à 400 nm) qui diminue en fonction du temps de réaction des enzymes présentes dans le surnageant de culture de la levure *Kluyveromyces marxianus* Y-49. Selon les chercheurs qui ont développé ce test, une unité enzymatique correspondrait à une diminution de 0,01 unité de densité optique par minute (Avigad et Milner 1967). Dans le graphique de la figure 4.12, il y aurait ~10 unités dans 100uL de surnageant (100 unités par mL de culture).

Quoique le test de turbidimétrie donne des résultats quantitatifs, il a tout de même été exclu des tests de mesure de l'activité employés dans le projet. Il a aussi été exclu des tests de détection. Tout d'abord, l'analyse spectroscopique de ce test se fait dans des cuvettes de 3 mL à l'aide d'un faisceau lumineux horizontal et les échantillons sont traités et lus un à la fois parce qu'après quelques minutes l'effet de turbidité se

transforme en floculation et la lecture est faussée, ce qui demande beaucoup de temps de technicien. Pour la même raison, ce test ne peut pas être robotisé parce que l'utilisation de plaques multipuits nécessite l'usage d'un faisceau lumineux dirigé du bas vers le haut et que la formation de dépôts au fond des puits fausserait les mesures. Finalement, l'unité enzymatique employée dans ce test n'est pas l'unité standard utilisée en enzymologie soit la quantité d'enzymes qui génère 1 μ mole de produit par minute ce qui rend les résultats difficilement comparables aux autres méthodes quantitatives qui elles seront décrites plus loin.

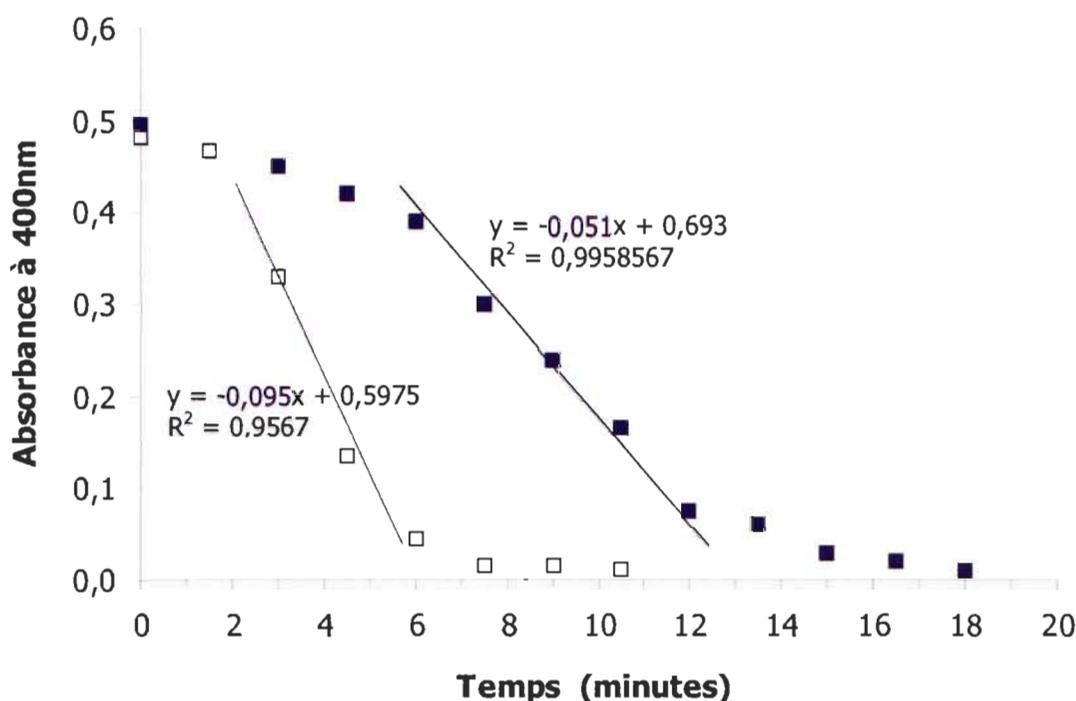


FIGURE 4.12 Détermination de l'activité de la PG de *Kluyveromyces marxianus* Y-49 par turbidimétrie.⁶⁶

■ Surnageant dilué 1 dans 2 , □ Surnageant.

⁶⁶ La quantité de PGA à utiliser dans ce test a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon. La linéarité de la courbe était perdue dépassé les 0,5mg, soit à 0,5 unité de DO à cause de la formation de flocons dans la solution de PGA-CTAB.

4.5.4 Le test de digestion du concombre

Une étude préliminaire lors de laquelle des morceaux de concombre ont été incubés en présence de surnageants de culture de *Kluyveromyces marxianus* Y-49 et de la souche NCYC 365 de *Saccharomyces cerevisiae* a été effectuée. La PGII d'*Aspergillus niger* vendue par Sigma a été utilisée à titre de contrôle positif pour le test. Celle-ci a été ajoutée à raison de 2 ou de 20 unités dans du surnageant stérile contenant des morceaux de concombre. L'activité pectinolytique la plus élevée a été obtenue avec le surnageant de *Kluyveromyces marxianus* dans lequel les morceaux de concombre ont perdu en moyenne 80%⁶⁷ de leur poids après 24 heures d'incubation. Pour ce qui est des morceaux de concombre incubés dans le surnageant de *Saccharomyces cerevisiae*, la perte de poids n'a pas été significative. En effet, le milieu de culture stérile (11%) et le surnageant de *Kluyveromyces* inactivé (13%) ont occasionné une perte de poids plus grande que celle occasionnée par le surnageant de culture de *Saccharomyces* (8%). Le surnageant de *Saccharomyces* inactivé a occasionné quant à lui une perte de 1%, ce qui nous laisse croire que la marge d'erreur de ce test tourne autour de 10% et que l'activité du surnageant, même si elle est probablement réelle, n'est pas significative. La perte de poids des morceaux de concombre occasionnée par la PGII commerciale était assez importante soit de $67\% \pm 0,5\%$ dans les deux cas. On peut en conclure 1) que les morceaux de concombre ne pouvaient pas perdre plus de poids dans ces conditions puisque les deux tests avec la PG II commerciale ont donné le même résultat et 2) que c'était aussi le cas pour les morceaux de concombre incubés avec le surnageant de *Kluyveromyces*, à moins que d'autres enzymes du surnageant de *Kluyveromyces* aient aussi joué un rôle dans la digestion du concombre, ce qui peut expliquer la perte de poids additionnelle de 13%.

Le test de digestion du concombre peut servir à donner une idée grossière de l'activité d'un milieu liquide, ce qui peut être pratique dans certains cas, comme par exemple lorsqu'on veut éviter de purifier les enzymes d'un milieu de culture complexe pour savoir s'ils s'y trouvent des pectinases. Cependant, la préparation des morceaux de concombre, les pesées, l'inactivation des surnageants pour générer des blancs sont

⁶⁷ Valeur non corrigée par le blanc.

beaucoup de manipulations pour le type de résultats qu'il est possible d'obtenir par cette méthode. Il était donc impossible de concevoir le criblage d'une banque de mutants de la PG de cette manière.

4.5.5 Les tests colorimétriques

Dans le but de déterminer le test quantitatif d'activité le plus approprié pour la caractérisation et le criblage des PGs et de leur mutants, trois tests de dosage des sucres réducteurs ont été expérimentés : le test Nelson-Somogyi, le test à la néocuproïne et le test au PAHBAH. Pour essayer et mettre au point ces tests, la PG II d'*Aspergillus niger* vendue chez Sigma a été utilisée. Cette PG est offerte en solution dans du glycérol 10% et son activité par mL est connue puisqu'elle est dosée par le fournisseur. Le fait d'avoir utilisé une PG d'activité connue, nous a permis de vérifier que les tests donnaient les résultats attendus, c'est-à-dire que les quantités de GA mesurées à la suite d'une réaction enzymatique correspondaient à celles qui devaient être obtenues selon la quantité d'enzyme utilisée. Dans la cadre du présent projet, le test le plus approprié devait 1- être automatisable, 2- être le moins coûteux possible, 3- être le moins nocif possible pour l'environnement. Puisque les molécules de GA générées par la PG en présence de PGA ne sont pas des chromogènes, il n'est pas possible de suivre la réaction enzymatique directement. Ainsi, pour mesurer la vitesse initiale de l'enzyme, des aliquotes doivent être prélevées dans le temps et dosées une à la fois pour le produit généré. Cela signifie que pour chaque réaction enzymatique, dans une combinaison de conditions donnée (pH, température, composition du milieu), plusieurs tests doivent être conduits en fonction du temps de la réaction. La caractérisation des PGs et de leurs mutants à différentes températures et différents pH (et ce en triplicata) demande donc de conduire énormément de tests de dosage des sucres.⁶⁸ C'est à cause de cette grande quantité de tests à effectuer que le test d'activité choisi devait répondre aux trois critères énumérés ci-haut. En plus de fournir

⁶⁸ Par exemple, pour une PG, si on veut connaître sa vitesse initiale prise sur 5 temps à 8 pH et 4 températures, en triplicata en considérant une courbe étalon à 5 points par combinaison de conditions on a à faire 640 tests. Pour les tests de stabilité ce nombre est multiplié par les durée d'incubation mesurées (pour étudier la stabilité à 0, 30, 60 et 120 minutes il faut faire 2560 tests).

plus de résultats en moins de temps et de sauver du temps de manipulation, l'automatisation permet de réduire les volumes de réactifs nécessaires. Malgré cela, la grande quantité de tests à effectuer demande tout de même d'utiliser une grande quantité de produit. Il est ainsi financièrement plus avantageux de choisir un test qui demande des produits moins dispendieux. De plus, il est aussi plus responsable d'utiliser le test qui générera le moins de déchets nocifs pour l'environnement d'où le troisième critère pour la sélection du test. Dans les sections qui suivent, les raisons qui ont guidé nos choix concernant chacun des trois tests qui ont été essayés seront discutées.

4.5.5.1 Test Nelson-Somogy

Le test Nelson-Somogy à l'arsenomolybdate (Nelson 1944 et 1957, Somogyi 1952, Milner et Avigad 1967) est le test le plus employé dans la littérature concernant les PGs. Il a entre autre été utilisé par Blanco *et al.* (1994, 1998, 2000), Gainvors *et al.* (1994,2000), Hasui *et al.* (1998), Jia et Wheals (2000), Miyairi *et al.* (1985), Shimizu *et al.* (2000), Singh et Rao (2002) et par Stratilova *et al.* (1998). Les expériences qui ont été menées avec ce test ont donné les résultats escomptés (résultats non présentés). Cependant, les produits qui doivent être utilisés dans ce test sont hautement toxiques et les solutions sont longues et coûteuses à préparer. Pour effectuer 100 réactions avec ce test avec les conditions détaillées à la section 3.5.5.1 du chapitre sur le matériel et les méthodes, il nous en coûtait 7,40\$. Si la réaction avait été adaptée afin que son volume final soit de 1mL pour permettre l'automatisation du test, le coût de 100 réactions aurait été d'environ 3\$. Ces légers détails nous ont poussé à essayer le test de quantification des sucres à la néocuproïne avant d'arrêter notre choix.

4.5.5.2 Test à la néocuproïne

Le test à la néocuproïne (Stephens *et al.* 1974), a été adapté pour la quantification de l'activité de la PG en 1998 par l'équipe de Benen et Visser pour la PG II d'*Aspergillus niger* (Parenicova *et al.* 1998). Il a depuis été adopté par cette équipe et par d'autres chercheurs qui étudient les enzymes de ce fungus et celles de *Botrytis cinerea*

(Armand *et al.* 2000; Benen *et al.* 1999; Kars *et al.* 2005; Pagès *et al.* 2000, 2001; Parenicova *et al.* 2000a,b; Reid *et al.* 2001; van Pouderoyen *et al.* 2003). La figure 4.13 présente un exemple des études qui ont été faites avec la PG II d'*Aspergillus niger* pour vérifier l'exactitude des tests. On peut y voir que la quantité de GA mesurée en fonction du temps est cohérente avec la quantité de PG II d'*Aspergillus niger* utilisée.

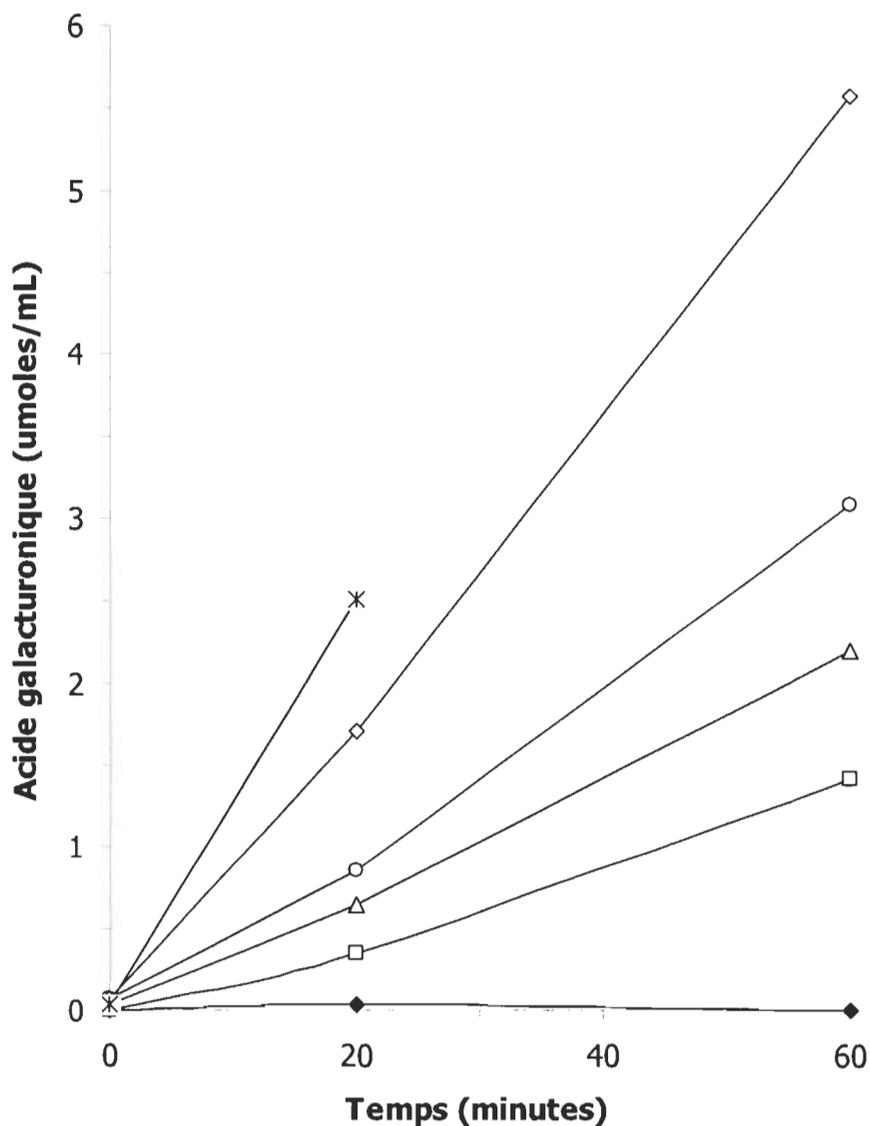


FIGURE 4.13 Évaluation du test à la néocuproïne à l'aide de la PG II commerciale d'*Aspergillus niger*. La réaction enzymatique a été conduite dans le tampon acétate à pH 5,0 et à 50°C. Quantité de PG II d'*Aspergillus niger* en U/mL : —◆— 0 —□— 0,01 —△— 0,02 —○— 0,04 —◇— 0,08 —×— 0,12 .

D'après notre expérience, le coût de l'utilisation de ce test pour 100 réactions est de 1,65\$, soit presque la moitié moins que celui du test de Nelson-Somogyi. De plus, la néocuproïne est un irritant, mais n'est pas hautement toxique comme c'est le cas pour l'arsenate de sodium et le molybdate d'ammonium employés dans le test Nelson-Somogyi. Cependant, nos expérimentations avec le test à la néocuproïne nous ont permis de constater que deux éléments importants nuisent à l'automatisation du test : la formation possible d'un précipité et la sensibilité du test. En effet, il arrive qu'un précipité se forme au cours de la réaction colorimétrique, soit lors du chauffage, soit lors du refroidissement. Le précipité formé par le chauffage, tel que mentionné dans la section 3.5.5.2, est causé par un manque de réactif. Nous avons pu contrôler l'apparition de ce précipité en optimisant les proportions de PGA et de réactifs utilisés. Nous avons aussi réussi à maîtriser la formation de précipité causée par le refroidissement. En effet, au lieu de refroidir dans un bain de glace, un volume fixe d'eau à une température contrôlée peut être ajouté puisque de toute manière, une dilution sera nécessaire avant la lecture de l'absorbance. Néanmoins, advenant la formation d'un précipité (encore possible, mais moins probable), seul l'œil averti d'un technicien peut le remarquer pour exclure la valeur de l'analyse. Pour ce qui est de la sensibilité du test, c'est une autre histoire. La néocuproïne est un agent chromogénique tellement sensible que, malgré l'utilisation de seulement 50uL provenant de la réaction enzymatique dans un volume total de 2mL de réactifs, il faut encore diluer cette solution de 5 à 12 fois après la réaction afin d'obtenir une intensité de couleur mesurable. À la figure 4.14, où l'intensité de la coloration de la néocuproïne est comparée à celle du PAHBAH (test présenté à la section suivante), on constate facilement la sensibilité du test.

La nécessité de diluer la néocuproïne réduite lors du dosage du GA implique deux problèmes quant à l'automatisation. Voici pourquoi : pour mettre à une échelle de 1mL⁶⁹ le volume final de cette réaction, il faudrait que le robot pipette 5uL de la réaction enzymatique pour le transférer dans 100uL de solution A auquel il ajouterait un 100uL de solution B avant que le tout soit chauffé pour ensuite être dilué 5 fois par

⁶⁹ Volume maximal raisonnable pour une plaque multipuits de 1,6mL.

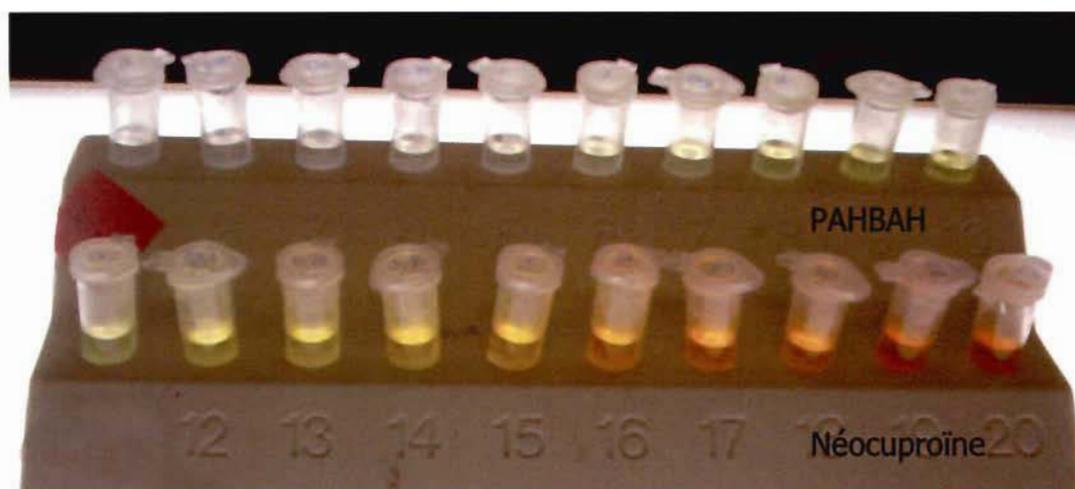
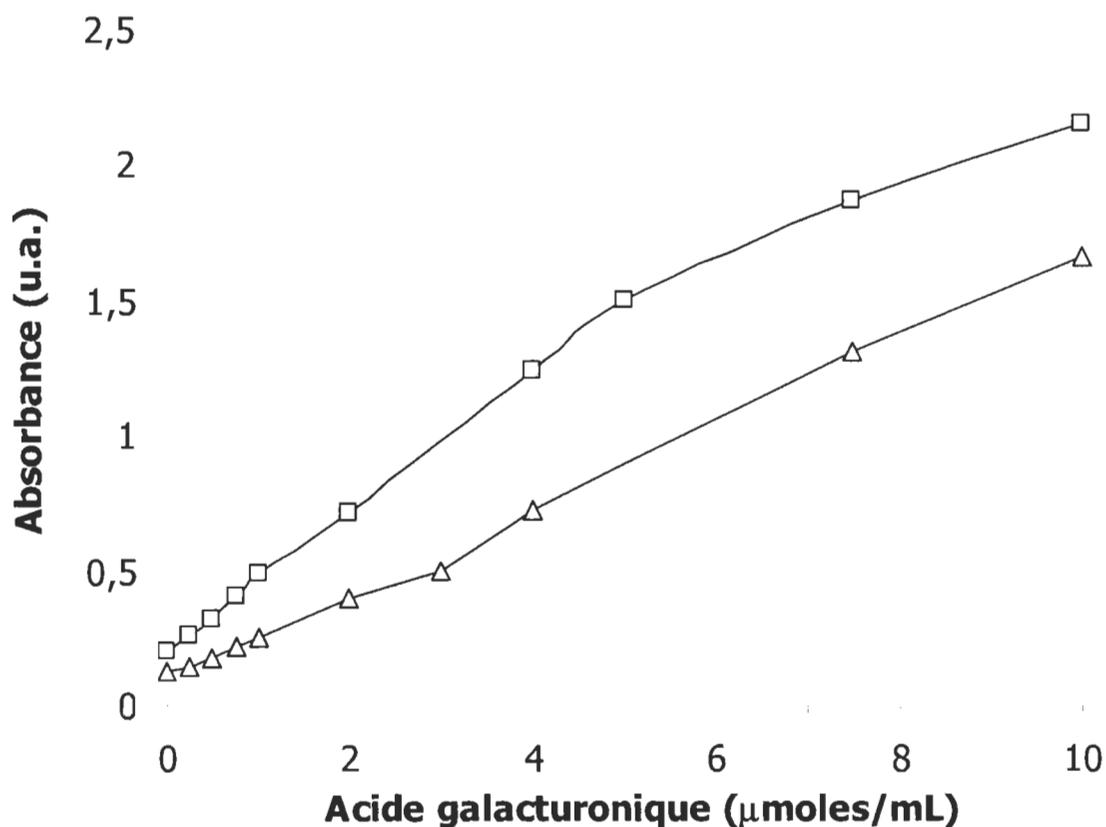


FIGURE 4.14 Comparaison des courbes étalons du test à la néocuproïne et du test au PAHBAH. Les courbes étalons ont été effectuées à partir de solution de GA dans du tampon acétate 50mM à pH 5,0 en présence de 0,67% de PGA. —□— Néocuproïne diluée 5x (absorbance mesurée à 450 nm) —△— PAHBAH (absorbance mesurée à 405 nm).

l'ajout de 800uL. Le premier problème est que le robot ne peut pas pipeter un volume de 5uL. De plus, l'erreur reliée au pipetage d'un tel volume augmentée de l'erreur reliée à la viscosité variable de la solution pipetée⁷⁰ auraient été trop importantes pour que les résultats obtenus aient été valables. Le deuxième problème provient de la dilution en soi. En effet, celle-ci doit être effectuée en ajustant le volume à une mesure prédéterminée et non en ajoutant simplement un volume fixe d'eau. Ce type de dilution est nécessaire parce que les chromogènes ne sont pas évaporés lors du chauffage ce qui fait qu'ils sont concentrés de façon hétérogène dans ce qui reste de liquide dans le tube. Ainsi, la dilution doit obligatoirement être effectuée, une réaction à la fois avec l'œil averti d'un technicien, ce qui fait que le robot n'aurait pas pu simplement ajouter le 800uL tel que proposé ci-haut. Ainsi, malgré le fait qu'il soit simple, non toxique et peu coûteux, le test à la néocuproïne présente le désavantage d'être difficilement automatisable.

4.5.5.3 Test au PAHBAH

Le test au PAHBAH est un autre test utilisé pour quantifier les sucres réducteurs. Il a été développé par Lever *et al.* en 1984. Depuis quelques années il a été utilisé par l'équipe de Dupont, Morosoli et Sharek du Centre de Microbiologie et Biotechnologie de l'Institut Armand-Frappier (Québec, Canada) pour l'étude de l'activité de la xylanase et de la cellulase de *Streptomyces lividans* (Ebanks *et al.* 2000, autres résultats non publiés⁷¹). À notre connaissance, aucune équipe de chercheurs n'a encore utilisé ce test pour quantifier les sucres réducteurs produits par la dégradation du PGA par la PG. C'est la simplicité de ce test qui nous a poussé à l'adapter à l'étude de l'activité de la PG. En effet, le test au PAHBAH est très facile. 50uL de la réaction enzymatique est déposé dans 1mL d'une solution simple de 0,5% de PAHBAH et de NAOH 0,5M puis chauffé et refroidi avant d'être lu pour son absorbance à 405nm. Les résultats du test au PAHBAH, selon la procédure que nous avons mis au point, se sont avérés cohérents avec l'activité de la PG II d'*Aspergillus niger* (résultats non-montrés). De plus, ce test répond à tous les critères de sélection que nous avons établis. En effet, nous avons

⁷⁰ Le PGA rend les solutions visqueuses. La dégradation du PGA par la PG diminue la viscosité de la solution où se produit la réaction enzymatique.

⁷¹ Communication personnelle du Dr Claude Dupont, Ph.D à notre équipe de recherche.

réussi à l'automatiser (voir sections 3.6.1 et 4.6.1) et à obtenir des résultats reproductibles de cette manière. De plus, le coût des produits nécessaires à son utilisation revient à 0,65\$ pour 100 réactions soit à environ un cinquième du coût du test Nelson-Somogyi et deux cinquième de celui du test à la néocuproïne. Et finalement, le PAHBAH est un produit irritant mais non toxique. C'est donc ce test qui a été retenu pour la caractérisation de l'activité enzymatique des PGs. Plusieurs des résultats obtenus à l'aide de ce test seront présentés dans les sections qui suivent, c'est pourquoi nous n'en discuterons pas plus longtemps dans la présente section. Néanmoins, il est important de mentionner que, malgré la facilité du test au PAHBAH, l'automatisation des tests menant à la caractérisation des PGs ne s'est pas faite en criant ciseaux. Plusieurs semaines ont été nécessaires pour mettre au point des programmes qui donnent des résultats reproductibles. L'annexe I regroupe les protocoles, la programmation et des exemples de données brutes obtenues à l'aide des différents tests.

4.5.6 Synthèse des méthodes retenues et non retenues

Parmi tous les tests de détection et de mesure de l'activité essayés, seulement deux ont été conservés pour la suite du projet. Le test de détection sur gélose et le test colorimétrique au PAHBAH. Plusieurs tests de détection de l'activité enzymatique présentés dans la littérature scientifique ont été évalués. Il faut dire que certains d'entre eux étaient dès le départ questionnables, mais le but d'explorer ces tests était d'en trouver un qui permettrait de faire de la détection à grande échelle. Il devait être peu coûteux et facile d'exécution. Ainsi, le test de détection sur gélose, le zymogramme, le test de turbidimétrie et le test de digestion du concombre ont été essayés. Le test de détection sur gélose a été retenu. Malgré le fait qu'il puisse difficilement être fait à grande échelle, il permet de détecter facilement l'activité enzymatique sur plusieurs clones à la fois et ce sur un bon intervalle de température et de pH. Les autres tests de détection donnaient des résultats peu concluants ou bien demandaient trop d'équipement et de temps.

Pour ce qui est de la sélection du test de mesure de l'activité enzymatique qui répondait le mieux aux besoins du présent projet, le tableau 4.2 résume les trois tests colorimétriques considérés et les principaux critères de sélection utilisés. Ainsi, le test au PAHBAH, parce qu'il est simple, non toxique, peu coûteux et surtout parce qu'il a pu être automatisé est celui qui a été retenu.

	Simplicité	Toxicité	Coût / 100 réactions	Automatisation
1. Arseno-molybdate	non	oui	3,00\$	non
2. Néocuproïne	oui	non	1,65\$	difficilement
3. PAHBAH	oui	non	0,65\$	oui

TABLEAU 4.2 Comparaison des trois tests colorimétriques de mesure de l'activité enzymatique.

4.6 CARACTÉRISATION INITIALE DE L'ACTIVITÉ DES PGs DANS LE TAMPON

Les trois PGs exprimées dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*, soit la PG de *Km*, la PG de *Sc* et la PG de *Sp* (avec le signal séquence $Z\alpha$) ont été caractérisées afin de vérifier si elles avaient les propriétés attendues pour fonctionner dans les conditions de pHs et de températures du procédé de fabrication du papier.

4.6.1 Propriétés de la PG de *Km* produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*

4.6.1.1 Activité de la PG de *Km* à 50°C et pH 5,0

Le dosage initial de l'activité de la PG de *Km* effectué à 50°C dans le tampon acétate pH 5,0 à 50mM donne une activité de 100 à 120 U par mg de protéines totales. Les préparations de PG de *Km* avec une préculture dans le glucose (voir section 3.4.2.2) ont donné des rendements allant jusqu'à 450mg/L de protéines totales, ce qui donne une activité par mL de surnageant allant jusqu'à 54U/mL.

4.6.1.2 Activité de la PG de K_m en fonction du pH

La figure 4.15 présente les courbes d'activité de la PG de K_m en fonction du pH à 50°C, 55°C et 60°C. Sur cette figure, on voit que le pH optimal de la PG de K_m est de 4,0 à 4,5 tel que mentionné par Serrat *et al.* (2002). Par contre, la particularité qui présente le plus d'intérêt pour les fins du présent projet est que la PG de K_m démontre encore une activité entre les pH 5,0 et 6,0, soit la zone de pH recherchée pour son utilisation dans le procédé de fabrication du papier. En effet, à pH 5,5, elle présente encore plus de 80% de l'activité à 50°C et c'est encore mieux à 55°C et 60°C où elle présente plus de 100% de son activité mesurée à pH 5,0 50°C. À pH 6,0, même si la PG de K_m est complètement inactive à 60°C, elle présente encore 70% de son activité à 50°C et environ 50% de son activité à 55°C. Ces résultats sont conformes avec celui obtenu avec le test sur gélose (figure 4.9) dans lequel la PG de K_m présentait encore une activité à 50°C, pH 6,2.

Il est intéressant de constater la présence de plusieurs pics d'activité dépassé le pH 5,0. La nature du site de catalyse et des sous-sites de l'enzyme doit être en partie responsable de la perte d'activité, mais il existe aussi une hypothèse qui pourrait expliquer ces fluctuations qui sont inhabituelles sur des courbes de pH. Cette hypothèse implique la nature du substrat. Tel que mentionné dans l'introduction (section 1.4), le PGA possède un pKa d'environ 5 (Ryden *et al.* 2000). En franchissant les environ du pH 5,0 (le pKa varie selon la longueur du polymère), la charge du PGA change pour devenir négative et cela doit avoir un effet sur la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat. Ainsi, l'augmentation d'activité remarquée entre les pH 5 et 6 est peut-être due à une diminution du K_m de la PG : plus il y a de charges négatives en solution, plus l'enzyme se déplace vite d'une molécule de substrat à une autre ce qui se conclut en une augmentation de l'activité au moment de ce changement de charge.

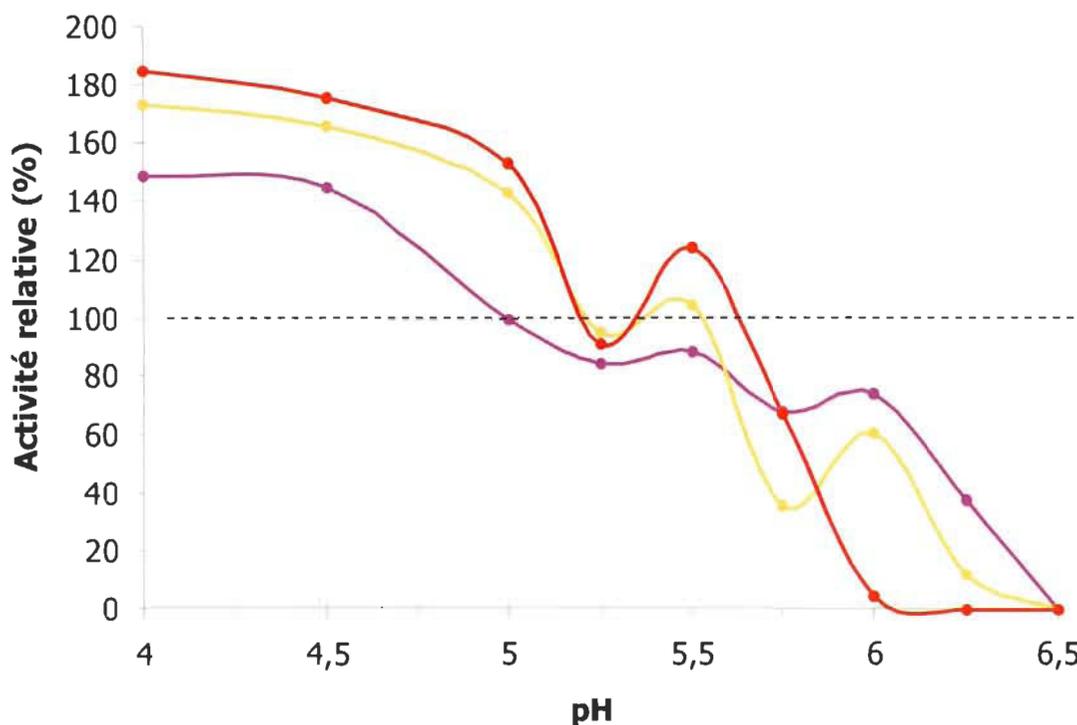


FIGURE 4.15 Courbes d'activité de la PG de *Km* en fonction du pH. Le 100% a été établi avec l'activité de l'enzyme à 50°C au pH 5,0.
 —■— 50°C —■— 55°C —■— 60°C

4.6.1.3 Activité de la PG de *Km* en fonction de la température

La figure 4.16 présente les courbes d'activité de la PG de *Km* en fonction de la température à des pH allant de 4,5 à 6,0. Sur ce graphique, on remarque que l'activité de la PG de *Km* est optimale à des températures élevées. En effet, tel que mentionné dans l'article de Serrat *et al.* (2002), l'activité de la PG étudiée augmente de façon constante en fonction de la température.⁷² Cependant, dans le cas présent, l'activité de la PG de *Km* ne tombe pas en flèche à 55°C tel que stipulé dans ce même article; elle continue plutôt d'augmenter jusqu'à 60°C et même jusqu'à 65°C à pH 4,5.

⁷² La PG étudiée provient de la souche CCEBI 2011 de *Kluyveromyces marxianus* de la collection de culture du Centre d'études de biotechnologie industrielle de l'Université de Oriente de Santiago de Cuba.

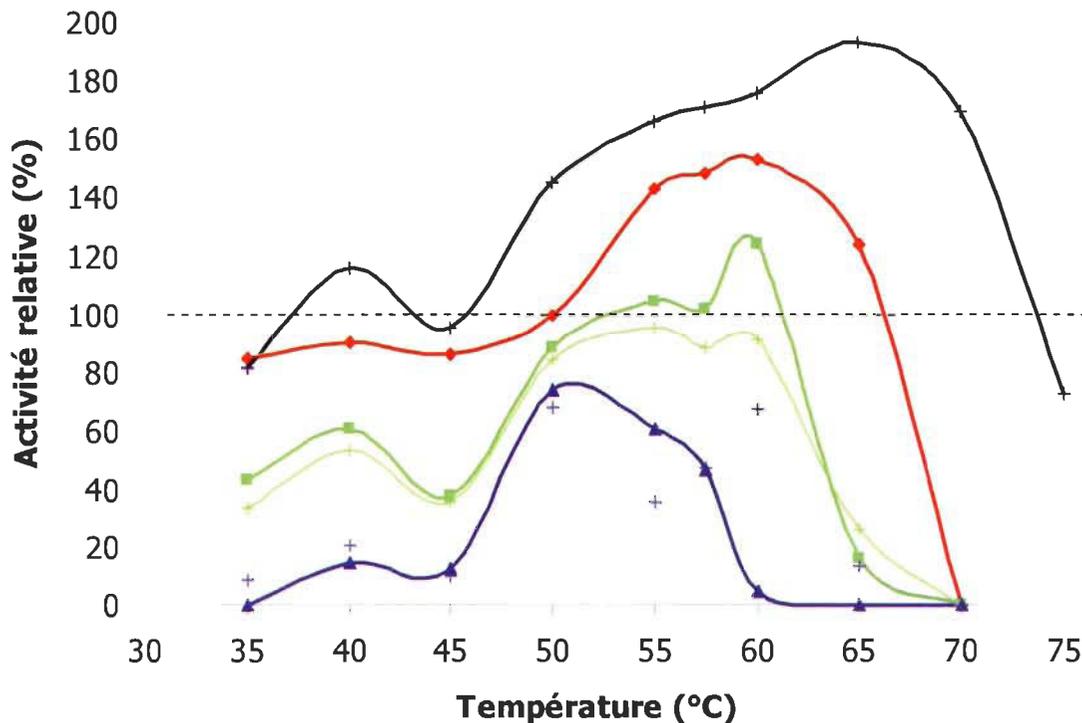


FIGURE 4.16 Courbes d'activité de la PG de *Km* en fonction de la température. Le 100% a été établi avec l'activité de l'enzyme à 50°C au pH 5,0. —+— pH 4,5 —●— pH 5,0 —□— pH 5,25 —■— pH 5,5 —+— pH 5,75 —▲— pH 6,0

Pour ce qui est de l'utilisation de cette PG dans le procédé de fabrication du papier, les résultats décrits ci-haut confirment qu'elle peut être active dans les conditions souhaitées soit autour de 55°C et à des valeurs de pH allant de 4,5 à 6,0⁷³, le tout avec une action favorisée à pH acide et températures élevées. Néanmoins, c'est le fait que l'activité de la PG de *Km* soit de 90% ou plus⁷⁴ aux pHs allant jusqu'à 5,5 et le fait qu'elle présente encore environ 50% d'activité aux pHs 5,75 et 6,0 à des températures entre 50°C et 60°C qui lui confère un caractère très prometteur pour son utilisation dans le procédé de fabrication du papier.

⁷³ Voir sections 1.2.3 et 1.2.5

⁷⁴ À 60°C, l'activité de la PG de *Km* va jusqu'à 170% à pH 4,5, jusqu'à 150% à pH 5,0 et jusqu'à 123% à pH 5,25.

4.6.1.4 Stabilité thermique de la PG de *Km*

La figure 4.17 présente les courbes de stabilité de la PG de *Km*. On remarque que cette enzyme est très stable à 50°C. En effet, elle conserve 50% de son activité après une incubation de presque 3 jours à pH 5,0, de 1 journée et demie à pH 5,5 et d'environ une demie-journée à pH 6,0. À 55°C, par contre, la PG de *Km* est plus fragile : après seulement 30 minutes d'incubation, il ne lui reste que 35% d'activité à pH 5,0, que 20% d'activité à pH 5,5 et moins de 5% d'activité à pH 6,0. Pour ce qui est de sa stabilité à 57,5°C, on peut conclure qu'elle est complètement désactivée en moins de 20 minutes. Ainsi, même si la PG de *Km* est active aux températures et aux pHs retrouvés dans le procédé papetier, elle ne leur résiste pas longtemps. Ces résultats signifient donc que cette PG pourra probablement être utilisée dans le procédé, mais qu'elle devra probablement être ajoutée à plusieurs reprises ou de façon continue au cours de la préparation de la pâte pour donner le résultat escompté.

4.6.1.5 Longévité de la PG de *Km*

Même si la PG de *Km* présente une activité intéressante entre 4,5 et 6,0 de pH et entre 50°C et 60°C et qu'elle conserve une grande partie de son activité après une incubation de plusieurs heures à 50°C, cela ne signifie pas qu'elle peut fonctionner longtemps dans ces conditions. La meilleure façon de vérifier sa longévité était de mesurer son activité sur une période suffisamment longue. C'est pourquoi le dosage initial et les tests d'activité ont été effectués sur 14 minutes.⁷⁵ Cette durée correspond à celle qui a été estimée pour l'étape impliquant le mélange des pâtes, leur préparation et leur mise en feuille. Ainsi, lorsque la vitesse initiale de l'enzyme est déterminée, il est possible de visualiser si l'enzyme perd de la vigueur et à quel moment cette perte d'activité se produit. En effet, lorsque l'activité de l'enzyme commence à diminuer, la pente de la courbe de vitesse initiale se modifie et tend vers zéro. Cependant, cette situation peut aussi survenir lorsque le milieu réactionnel atteint un équilibre entre la concentration de substrat et de produit (insuffisance de substrat). Dans le cas qui nous intéresse, la

⁷⁵ Les tests d'activité effectués à la main ont été effectués sur 14 minutes et ceux automatisés ont été effectués sur 15 minutes.

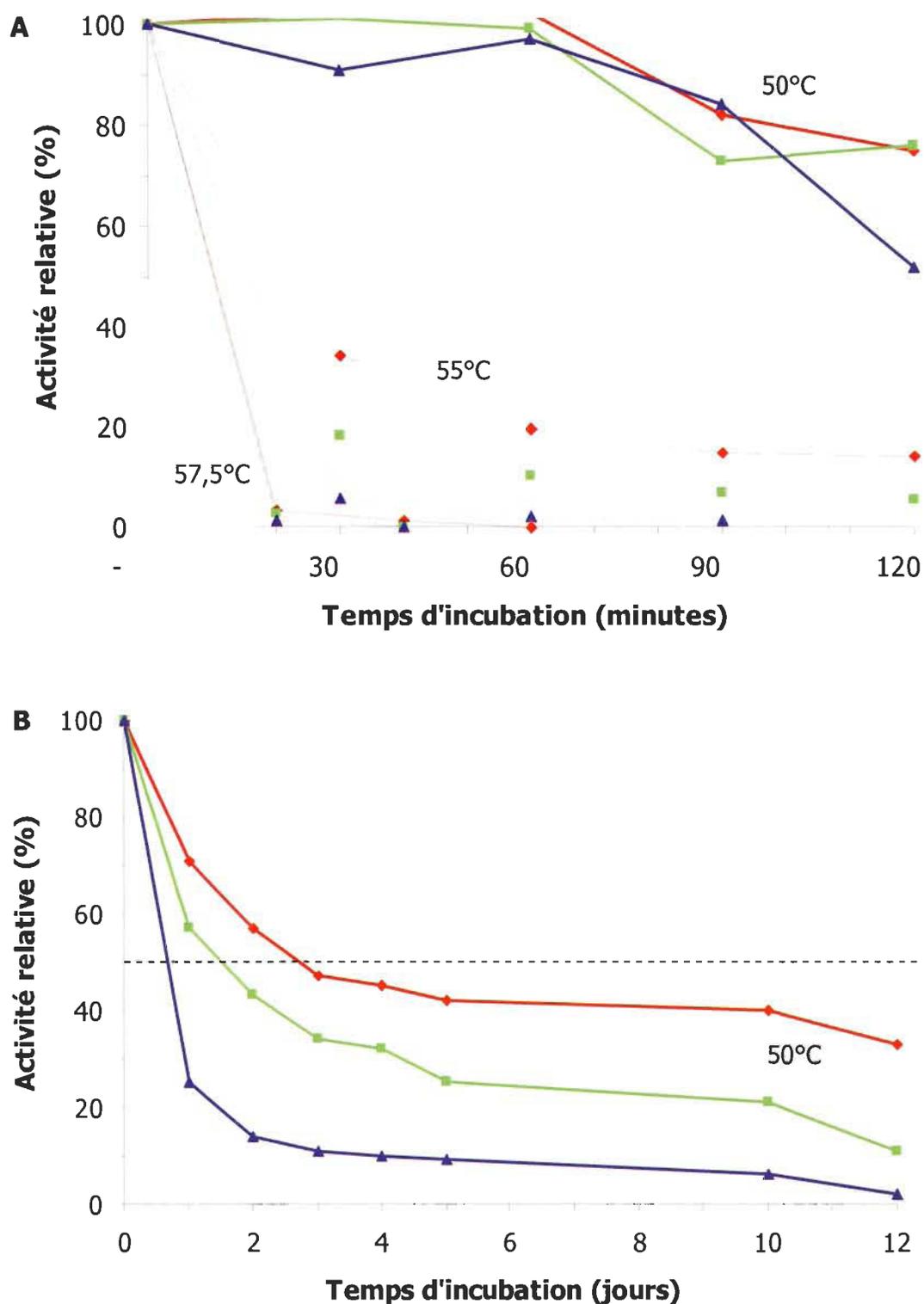


FIGURE 4.17 Courbes de stabilité de la PG de *Km*. Suite à l'incubation, l'activité résiduelle de l'enzyme a été mesurée dans le tampon acétate 50mM à 50°C, pH 5,0. (A) incubation à 50°C, 55°C et 57,5°C sur 120 minutes. (B) à 50°C sur 12 jours. —●— pH 5,0 —■— pH 5,5 —▲— pH 6,0

concentration de substrat utilisée pour la réaction enzymatique a due être limitée à 0,67% parce que le PGA forme un précipité au cours de la réaction colorimétrique qui absorbe une partie de la lumière émise. Il a donc fallu trouver un équilibre entre la ligne de base de la mesure d'absorbance occasionnée par le substrat et la concentration de ce dernier. À 0,67%, le PGA est théoriquement en excès⁷⁶ et absorbe autour de 0,25 unités d'absorbance à 405nm, ce qui était selon nous un bon compromis. L'excès de PGA a été confirmé à plusieurs reprises lors d'essais enzymatiques où la quantité de GA mesurée dépassait 16 umoles par mL sans que la linéarité de la courbe de vitesse initiale en soit affectée (résultats non montrés).

En observant les régression des courbes de vitesse initiale présentées à la figure 4.18A, on remarque que la PG de *Km* reste efficace pendant au moins 14 minutes et ce à 50°C et à 55°C. Cependant, à 60°C, elle semble commencer à perdre de la vigueur après 10 minutes d'action. Comme il l'a été mentionné dans le paragraphe précédent, cette diminution de vitesse enzymatique peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, la température du milieu réactionnel peut soumettre l'enzyme à un stress et ainsi la dénaturer. Dans le cas des PGs, le changement de conformation poussé par l'augmentation de la température finit, comme pour la plupart des enzymes, par les inactiver (voir figure 4.17). La conformation qu'elle prend au fur et à la mesure que la température augmente, quoique moins stable, semble augmenter la vitesse de la catalyse. C'est la raison pour laquelle la vitesse initiale des réactions catalysées par la PG de *Km* augmente ainsi en fonction de la température en attendant que la conformation de l'enzyme atteigne un point où c'est l'inverse qui se produit, c'est-à-dire qu'elle devient moins efficace jusqu'à devenir complètement inactivée. La deuxième manière d'expliquer la diminution de la vitesse enzymatique qui se produit après 10 minutes à 60°C est elle aussi reliée au changement de conformation de l'enzyme et à la vitesse de réaction conséquente, mais elle implique en plus le substrat. En effet, même

⁷⁶ 6,7g/L de PGA divisé par 194g/mol de GA = 34,53umol/mL. La dilution utilisée pour la mesure de la vitesse initiale doit donner une activité à pH 5,0 et 50°C de 0,75 ± 0,25 U/mL ce qui veut dire qu'en 15 minutes environ de 7 à 15 umoles/ml de GA peuvent être générées. En considérant que le DP du PGA utilisé est autour de 70 et en considérant le fait que même si la PG hydrolyse des liens α 1,4-D-galactosiduroniques de façon aléatoire elle génère aussi des monomères et des dimères, il est raisonnable de supposer que la quantité de substrat fourni à l'enzyme, est suffisante.

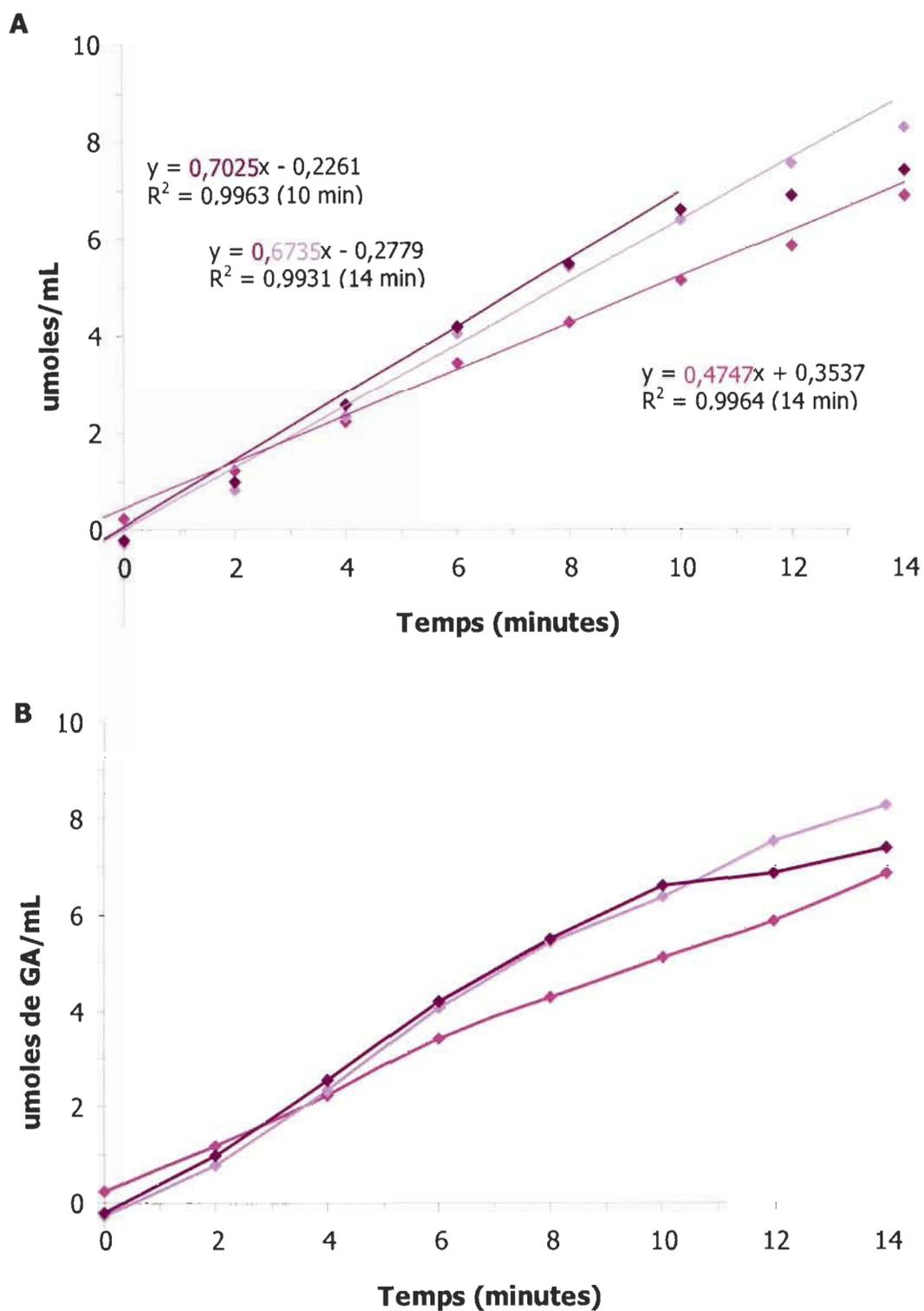


FIGURE 4.18 Vitesses initiales de la PG de *Km* à pH 5,0. Régressions (A) Points reliés (B). Ces tests d'activité ont été effectués à la main à partir d'une dilution de 1 dans 105 de PG de *Km* purifiée. Les courbes étalons ont été effectuées entre 0 et 10 umoles de GA par mL.

—●— 50°C —●— 55°C —●— 60°C

si le PGA a été mis en excès dans le milieu réactionnel, la vitesse de la réaction enzymatique peut être influencée au cours de sa dépolymérisation. En dépolymérisant le PGA de façon aléatoire (endo), la PG génère des oligomères de différentes longueurs. Puisque les PGs possèdent 7 « subsites », lorsque les oligomères sont de 7 GAs ou moins, la vitesse de la catalyse diminue en fonction de la longueur de l'oligo. C'est ce qui a été démontré par l'équipe de Jaap Visser et de Jacques Benen dans une étude portant sur la caractérisation cinétique de trois PGs d'*Aspergillus niger* (Benen *et al.* 1999). Ainsi, un changement dans la distribution des oligomères au cours de la catalyse peut finir par influencer la vitesse de cette dernière. Dans le paragraphe précédent, il a été mentionné que l'excès de PGA a été confirmé à plusieurs reprises et c'est bien le cas. Cependant, cette conclusion ne tenait pas compte du fait qu'un changement dans la conformation de l'enzyme peut non seulement accélérer la vitesse de la catalyse selon le milieu réactionnel, mais qu'elle peut aussi (nécessairement) changer son affinité pour le substrat. Un changement d'affinité pour le substrat peut de ce fait influencer le positionnement de l'enzyme par rapport au bout réducteur du substrat ou bien même augmenter sa processivité⁷⁷ ce qui a pour effet de modifier la distribution des oligomères de GA obtenus comparativement à la distribution pouvant être obtenue dans d'autres conditions. Par exemple, si une PG générerait plus de pentamères à 60°C et plus de trimères et dimères à 50°C, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme commencerait plus vite à diminuer à 60°C parce que la concentration effective de substrat dans le temps serait plus faible et inversement si plus de trimères étaient générés à 60°C qu'à 50°C.

Les deux hypothèses expliquant la perte de vigueur de l'enzyme au bout de 10 minutes à 60°C se valent autant l'une que l'autre. Cependant, la première conclusion, soit celle qui suppose que l'enzyme perd de la vigueur au bout de 10 minutes à 60°C à cause du début de son inactivation reste la plus probable puisque les études de stabilité de l'enzyme démontrent qu'après 20 minutes d'incubation à 57,5°C celle-ci est complètement inactive lorsque mesuré à 50°C (voir figure 4.17A). À la figure 4.18B, les points des courbes de vitesse initiale ont été reliés pour permettre une meilleure visualisation de la longévité de la PG de *Km*.

⁷⁷ Capacité d'une polymérase à effectuer plusieurs hydrolyses de suite sur une même molécule de substrat (voir Pagès *et al.* 2001)

L'analyse des courbes de vitesse initiale de la PG de *Km* sous d'autres conditions a fourni d'autres données par rapport à la longévité de cette enzyme. À pH 5,5 et 50°C cette PG garde la même vitesse pendant 12 minutes, à 50°C. Toujours à pH 5,5, elle perd de la vigueur après 9 minutes à 55°C, à 57,5°C et à 60°C et après 3 minutes à 65°C. À pH 5,75, l'enzyme se comporte de la même manière qu'à pH 5,5 à 50°C et 55°C, mais commence à perdre de la vitesse après 6 minutes à 57,5°C, après 3 minutes à 60°C et elle ne dure qu'une minute à 65°C. À pH 6,0 elle perd de la vigueur après 12 minutes à 50°C, après 9 minutes à 55°C et après 3 minutes à 57,5°C. Évidemment, plus le pH et la température augmentent, moins l'enzyme est active longtemps (résultats non montrés).

4.6.2 Propriétés de la PG de *Sc* produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*

4.6.2.1 Activité de la PG de *Sc* à 50°C et pH 5,0

La PG de *Sc* a été préparée plus de six fois selon la méthode décrite à la section 3.4.2.2 à partir d'une préculture dans le glucose. Son dosage initial donne une activité allant de 420 à 540 U par mg de protéines totales à 50°C, pH 5,0. Des rendements allant de 100 à 225mg/L de protéines totales ont été obtenus, ce qui donne une activité par mL de surnageant allant jusqu'à 120U/mL.

4.6.2.2 Activité de la PG de *Sc* en fonction du pH

La figure 4.19 présente les courbes d'activité de la PG de *Sc* en fonction du pH à 50°C, 55°C et 60°C. Sur cette figure, on voit que le pH optimal de la PG de *Sc* produite dans la souche INVSc est de 4,5; une légère différence avec ce qui avait été mesuré pour l'enzyme produite de façon non-recombinante soit un pH optimal de 5,5 (Blanco *et al.* 1994). À pH 5,5, et ce aux trois températures ciblées, l'enzyme a déjà perdu 45% de sa vitalité. À 50°C et 55°C, on peut dire que l'enzyme est complètement inactivée à pH 6,25 tandis qu'à 60°C elle est inactivée plus tôt soit à pH 5,75.

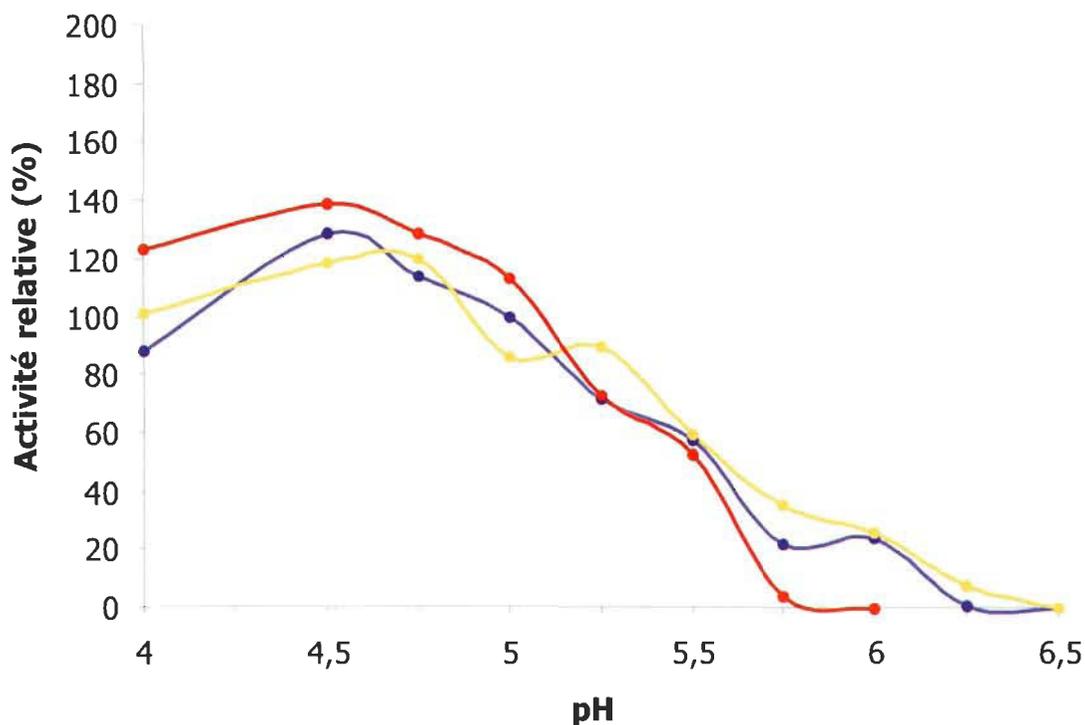


FIGURE 4.19 Courbes d'activité de la PG de *Sc* en fonction du pH. Le 100% a été établi avec l'activité de l'enzyme à 50°C au pH 5,0.
 —●— 50°C —●— 55°C —●— 60°C

4.6.2.3 Activité de la PG de *Sc* en fonction de la température

La figure 4.20 présente les résultats obtenus pour l'activité de la PG de *Sc* en fonction de la température à des pH allant de 4,5 à 6,0. Sur ce graphique, on remarque qu'à pH 5,0 il y a deux pics principaux d'activité soit à un 50°C et un à 60°, la température optimale à ce pH étant de 60°C. On remarque aussi que le pic d'activité de la PG de *Sc* varie en fonction du pH. Ainsi, à pH 5,25, le pic d'activité se situe plutôt à 55°C et à pH 5,5 il se situe à 65°C. En 1994, Blanco *et al.* avaient rapporté pour cette même enzyme une température optimale plus basse que celle trouvée dans nos conditions expérimentales soit de 45°C (souche CECT-1389). Cependant la PG avait été produite dans son hôte naturel et de façon non-recombinante. De leur côté, Fernandez-Gonzalez

et al. ont rapporté une température optimale de 50°C à pH 5,0 pour la PG produite par la souche numéro 39 provenant de la banque de micro-organismes de l'Université de Castilla-La Mancha (2004). Ils ont aussi rapporté que cette enzyme perdait complètement son activité à 60°C tandis que nos conditions expérimentales à pH 5,0 et 70°C nous permettent toujours de détecter une vitesse initiale équivalente à 60% de l'activité à 50°C.

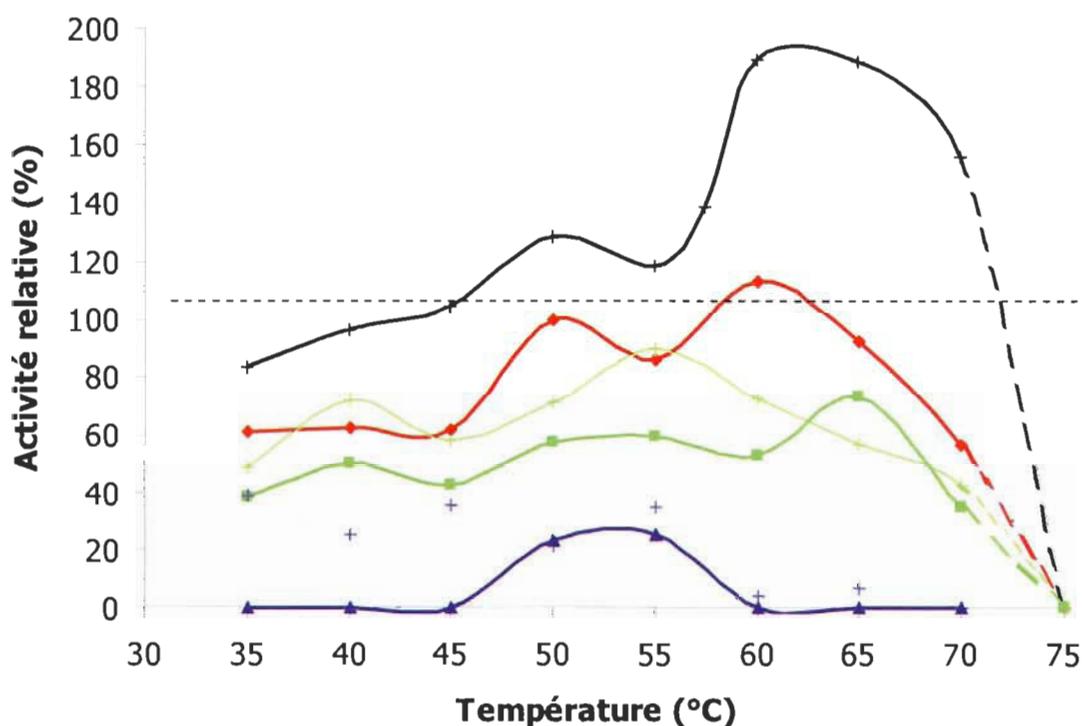


FIGURE 4.20 Courbes d'activité de la PG de *Sc* en fonction de la température. — pH 4,5 — pH 5,0 — pH 5,25 — pH 5,5
— pH 5,75 — pH 6,0

4.6.2.4 Stabilité thermique de la PG de *Sc*

La figure 4.21 présente les résultats de l'étude de stabilité de la PG de *Sc*. À 50°C, la PG de *Sc* perd 50% de son activité en l'espace de 30 minutes à pH 5,0 et le perd en quelques minutes de moins à pH 5,5. À pH 6,0 sa demi-vie est un peu plus longue soit d'environ 50 minutes.

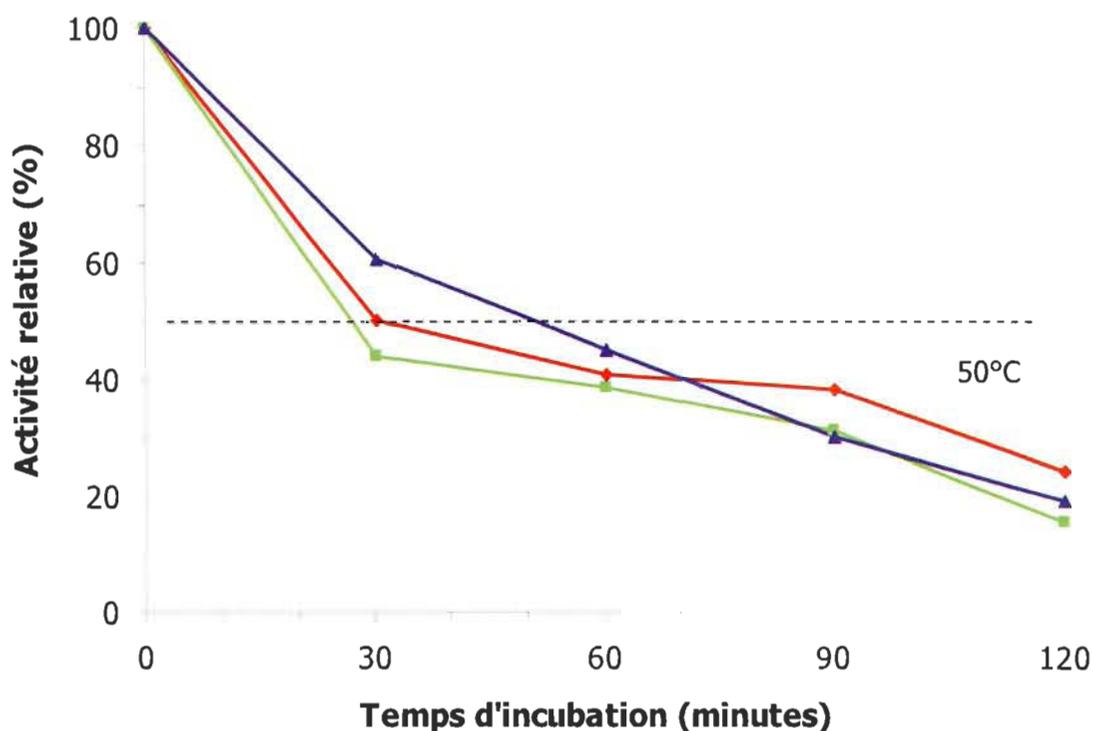


FIGURE 4.21 Courbes de stabilité de la PG de *Sc* à 50°C. Suite à l'incubation, l'activité résiduelle de l'enzyme a été mesurée dans le tampon acétate 50mM à 50°C, pH 5,0. —●— pH 5,0 —■— pH 5,5 —▲— pH 6,0

4.6.2.5 Longévité de la PG de *Sc*

La figure 4.22A présente la régression des vitesses initiales de la PG de *Sc* à pH 5,0. À 50°C et 55°C la PG de *Sc* reste efficace pendant 12 minutes tandis qu'à 60°C, elle est inactivée après 10 minutes, comme c'est le cas pour la PG de *Km*. La figure 4.22B, présente les mêmes courbes de vitesse initiale, mais cette fois-ci avec les points reliés pour permettre une meilleure visualisation de la longévité de la PG de *Sc*.

La longévité de la PG de *Sc* dans le tampon a aussi été analysée sous d'autres conditions. Toujours à pH 5,0, mais à 65°C, l'enzyme fonctionne pendant 6 minutes

avant de s'éteindre complètement. À pH 5,5, elle fonctionne pendant 12 à 14 minutes à 50°C et 55°C, pendant 10 minutes à 60°C et jusqu'à 4 minutes à 65°C. À pH 5,75, l'enzyme travaille 12 minutes à 50°C, 10 minutes à 55°C et 60°C et aussi 4 minutes à 65°C. Finalement, à pH 6,0, elle fonctionne pendant 10 à 12 minutes à 50°C et 55°C (résultats non montrés).

4.6.3 PG de *Km* vs PG de *Sc*

4.6.3.1 Courbes d'activité des PGs de *Km* et de *Sc*

Afin de comparer plus facilement l'activité des PGs de *Km* et de *Sc*, leurs courbes d'activité en fonction du pH à 50°C (figure 4.23A), et en fonction de la température à pH 5,0 (figure 4.23B) ont été regroupées. En regardant la figure 4.23A on constate rapidement que la PG de *Km* est celle qui démontre le meilleur potentiel pour une utilisation dans l'intervalle de pH souhaité pour son utilisation dans le procédé de fabrication du papier. En effet, à pH 5,5 sa vitesse initiale exprime une activité équivalente à 88% de ce qu'elle exprimait à pH 5,0 et 50°C, soit 31% de plus que l'activité exprimée par la PG de *Sc*. La différence est encore plus frappante à pH 6,0 où la PG de *Km*, qui présente encore une activité intéressante de 74%, dépasse de 50% celle de la PG de *Sc*. Pour ce qui de la PG qui possède le meilleur potentiel dans l'intervalle de température souhaité pour l'utilisation en pâte et papier, la PG de *Km* est encore gagnante. Même si l'activité de la PG de *Sc* semble assez égale entre 50°C et 65°C en conservant une activité de 100% ±15% dans cet intervalle, l'activité de la PG de *km* atteint un pic de 153% à 60°C et possède encore 123% de son activité lorsqu'elle soumise à une température de 65°C.

4.6.3.2 Pouvoir enzymatique relatif des PGs de *Km* et de *Sc*

Tel que mentionné précédemment à la section 4.6.1.5, les courbes d'activité des enzymes ne donnent pas d'information sur la capacité de ces dernières à travailler longtemps à la vitesse mesurée (dans ce cas-ci sur une période de 15 minutes). Pour savoir si la PG de *Km* est vraiment celle qui présente le meilleur potentiel pour l'utilisa-

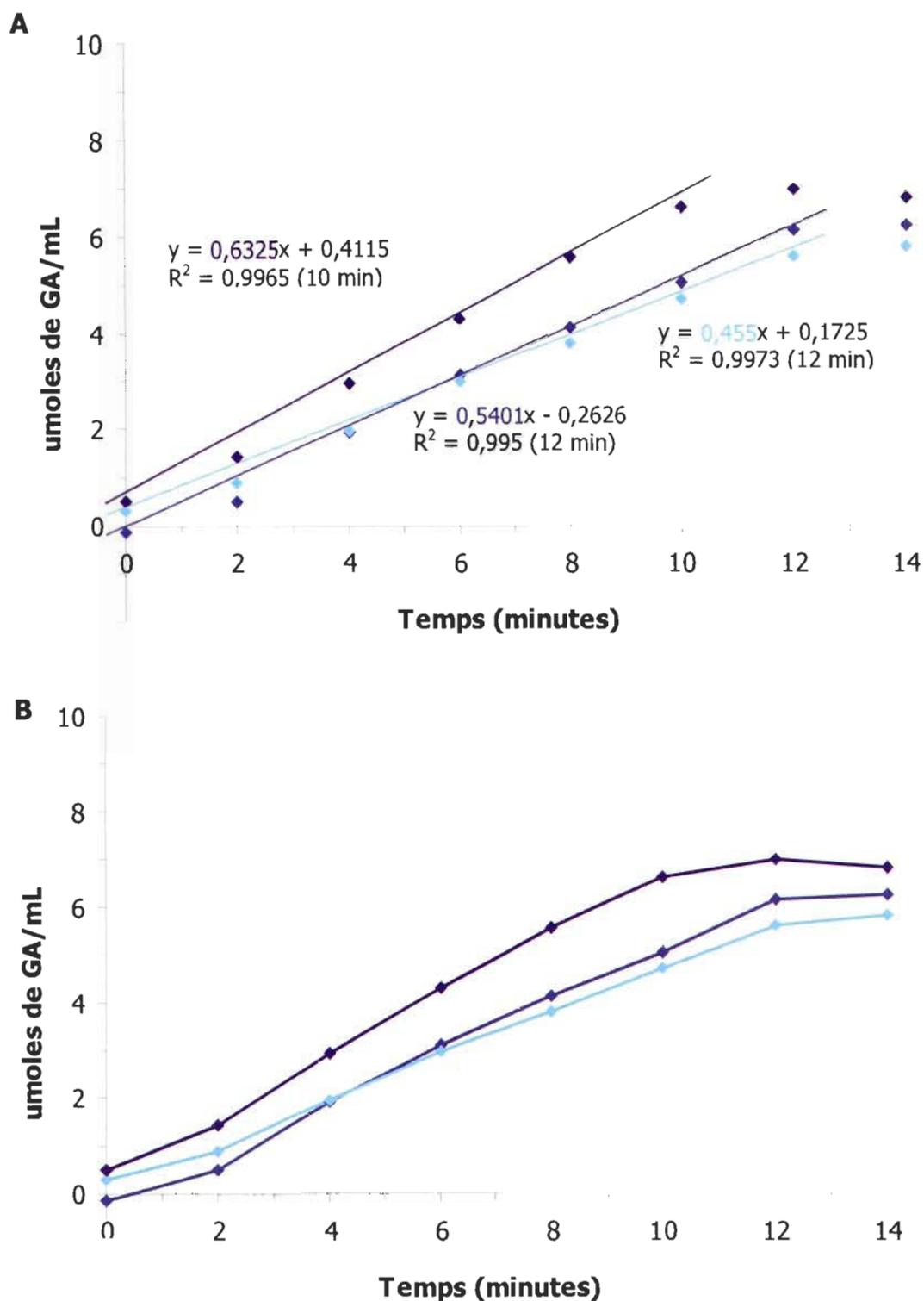


FIGURE 4.22 Vitesses initiales de la PG de *Sc* à pH 5,0. Régressions (A) Points reliés (B). Ces tests d'activité ont été effectués à la main à partir d'une dilution de 1 dans 200 de PG de *Sc* purifiée. Les courbes étalons ont été effectuées entre 0 et 10 umoles de GA par mL.

—◆— 50°C —●— 55°C —■— 60°C

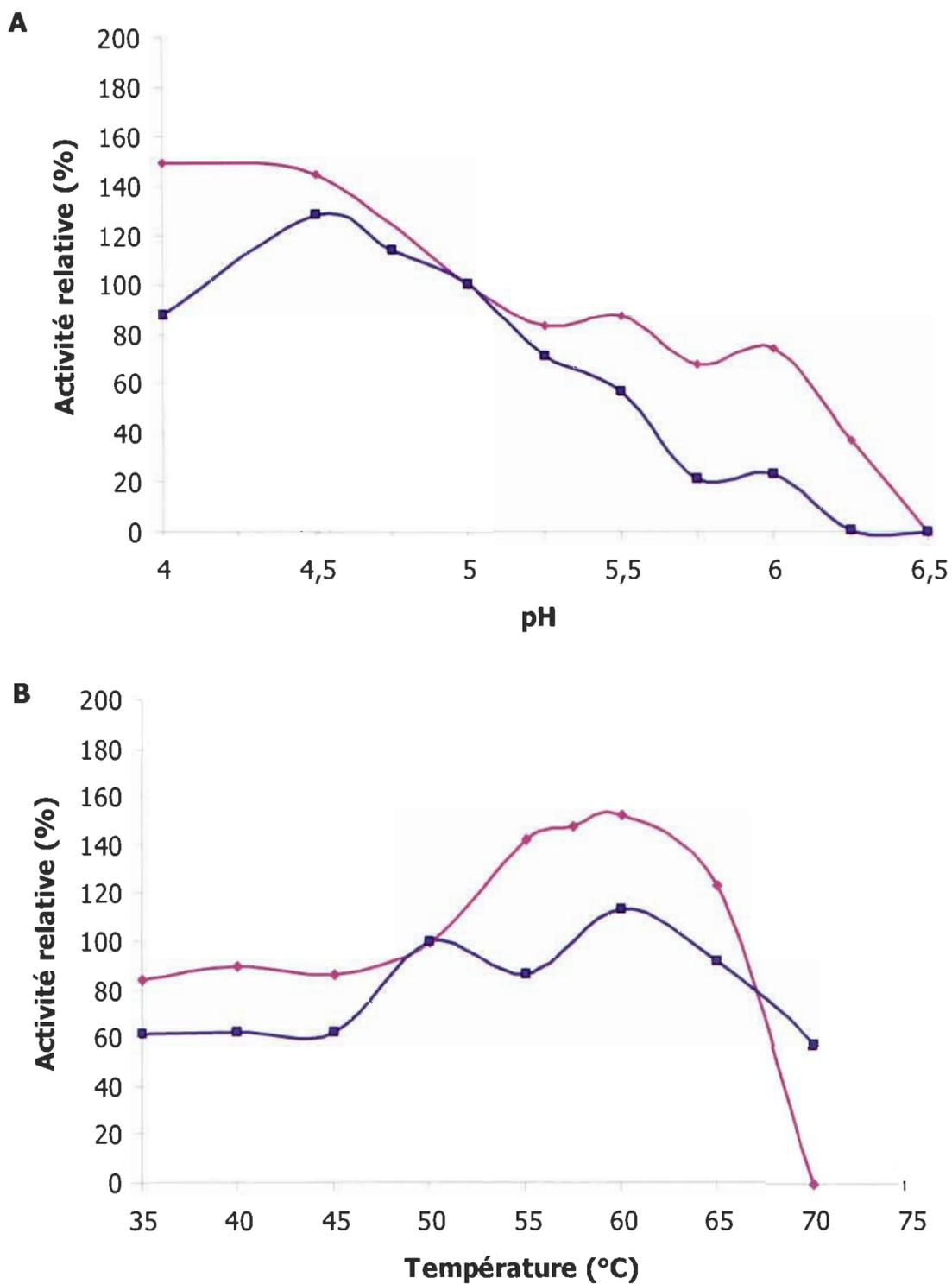


FIGURE 4.23 Comparaison de l'activité des PGs de *Km* et de *Sc*.
 Courbes de pH à 50°C (A) et courbes de températures à pH 5,0 (B).
 Le 100% a été établi avec l'activité de l'enzyme à 50°C au pH 5,0.
 —◆— PG de *Km* —■— PG de *Sc*

tion de la PG dans le procédé de fabrication du papier, son pouvoir enzymatique a été comparé à celui de la PG de *Sc*. Tout d'abord, le pouvoir enzymatique relatif des deux PGs dans les conditions propres au procédé papetier a été calculé. Leur activité à pH 5,0 et 50°C a servi de base pour la comparaison. Le pouvoir enzymatique relatif a donc été calculé en tenant compte de l'activité relative et de la durée de vie des enzymes pour chacune des conditions entre 50°C et 65°C et entre 5,0 et 6,0 unités de pH et ce, pour une période maximale de 14 minutes. Voici la formule :

$$\text{Pouvoir enzymatique relatif} = 100 \% \times \frac{\text{Activité relative} \times \text{Durée de vie de la PG (max. 14 minutes)}}{\text{Activité relative} \times \text{Durée de vie de la PG à pH 5,0 et 50°C}}$$

Les valeurs de pouvoir enzymatique relatif des deux PGs sont présentées sous forme d'histogramme à la figure 4.24. En regardant cet histogramme on constate que même en tenant compte du facteur de longévité de chaque PG, la PG de *Km* démontre encore le meilleur potentiel pour fonctionner dans les conditions du procédé de fabrication du papier. En effet, dans presque toutes les combinaisons de conditions, son pouvoir enzymatique relatif est meilleur que celui de la PG de *Sc*. En clair, ces résultats signifient que dans un contexte d'utilisation où les conditions sont variables et difficilement contrôlable, si une quantité identique d'enzyme est employée (en unités), la PG de *Km* a plus de chance de donner les résultats escomptés que la PG de *Sc*.

4.6.3.3 Pouvoir enzymatique des PGs de *Km* et de *Sc* sur la base de leurs rendements

Dans un contexte industriel, le choix de la mise en marché d'un produit n'est pas seulement lié à son pouvoir enzymatique. En effet, un autre facteur doit nécessairement être pris en considération : le coût de production. Le coût de production d'un produit est important à considérer puisque c'est lui qui déterminera le prix du produit et qui permettra de savoir si son utilisation sera rentable. Naturellement, pour un même système de production (dans ce cas-ci la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* transformée avec le vecteur pYES-2 CT), les coûts de production sont similaires d'un lot à un autre. Cependant, une différence dans le rendement moyen de deux produits préparés de la même façon peut avoir une incidence majeure sur leurs coûts par unité, par mg ou par mL. Sans entrer dans les

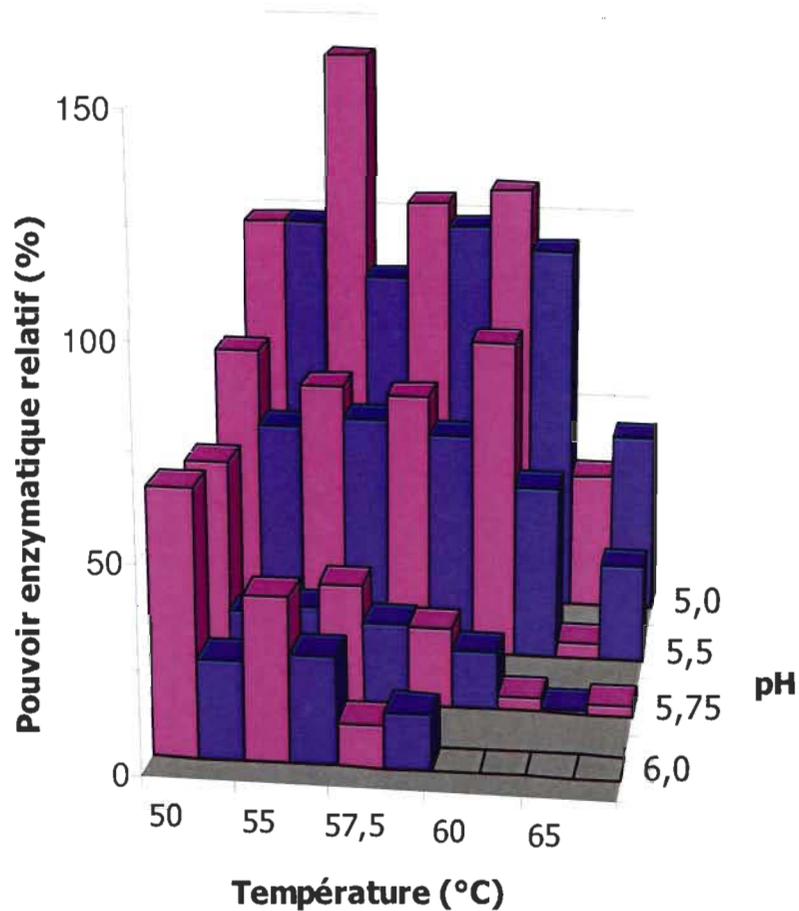


FIGURE 4.24 Comparaison du pouvoir enzymatique relatif des PGs de *Km* et de *Sc* en fonction de la température et du pH. Le pouvoir enzymatique relatif a été calculé en multipliant l'activité de l'enzyme par sa durée de vie sur une période maximale de 14 minutes soit la durée approximative de l'étape lors de laquelle les pâtes sont mélangées, préparées et mises en feuille. Le 100% a été établi avec l'activité de l'enzyme à 50°C au pH 5,0. ■ PG de *Km*
■ PG de *Sc*

détails des coûts de production et des études de rentabilité (puisque là n'est pas le but du présent travail), les PGs de *Km* et de *Sc* ont été comparées sur la base de leur pouvoir enzymatique (sur un maximum de 14 minutes), mais cette fois-ci en tenant compte de leurs rendements respectifs en U/mg et en U/mL (voir sections 4.6.1.1 et 4.6.2.1). Voici la formule⁷⁸ :

$$\begin{aligned} \text{Pouvoir enzymatique sur la base du rendement} &= \frac{\text{Activité}}{\text{mg (ou mL)}} \times \text{Durée de vie de la PG (max. 14 minutes)} \\ &= \frac{\mu\text{moles de GA} / \text{minute}}{\text{mg (ou mL)}} \times \text{max. 14 minutes} \end{aligned}$$

La figure 4.25 présente les histogrammes de pouvoir enzymatique des PGs de *Km* et de *Sc* sur la base de leur activité par mg (figure 4.25A)⁷⁹ et sur la base de leur activité par mL (figure 4.25B)⁸⁰. Sur cette figure on doit se rendre à l'évidence que même si techniquement la PG de *Km* présente un meilleur potentiel pour l'utilisation d'une PG dans le procédé de fabrication du papier (résultats précédents basés sur l'activité uniquement), la PG de *Sc* est de loin supérieure pour ce qui est du rapport pouvoir enzymatique vs coût de production. En effet, à quantités de protéines égales (en mg) la PG de *Sc* est plus efficace que la PG de *Km* et ce dans toutes les combinaisons de conditions testées (figure 4.25A). C'est également le cas pour ce qui est du pouvoir enzymatique des deux PGs à volumes comparables de surnageant (figure 4.25B). En supposant que la production à grande échelle des PGs (et son optimisation) permette d'obtenir des quantités similaires de PGs en grammes par volume, la PG de *Sc* sera encore le meilleur choix à faire. Ainsi, avec le système actuel de production dans *Saccharomyces cerevisiae*, l'utilisation de la PG de *Sc* devrait être (et sera) favorisée dans la suite du projet.

⁷⁸ Le pouvoir enzymatique sur 14 minutes aurait aussi pu être calculé plus simplement, soit en prenant la concentration moyenne de GA obtenu à 14 minutes sans se soucier de la vitesse et de la longévité de l'enzyme.

⁷⁹ Les valeurs de 100U/mg pour la PG de *Km* et de 420U/mg pour la PG de *Sc* ont été utilisées pour les calculs.

⁸⁰ Les valeurs de 54U/mL pour la PG de *Km* et de 120U/mL pour la PG de *Sc* ont été utilisées pour les calculs.

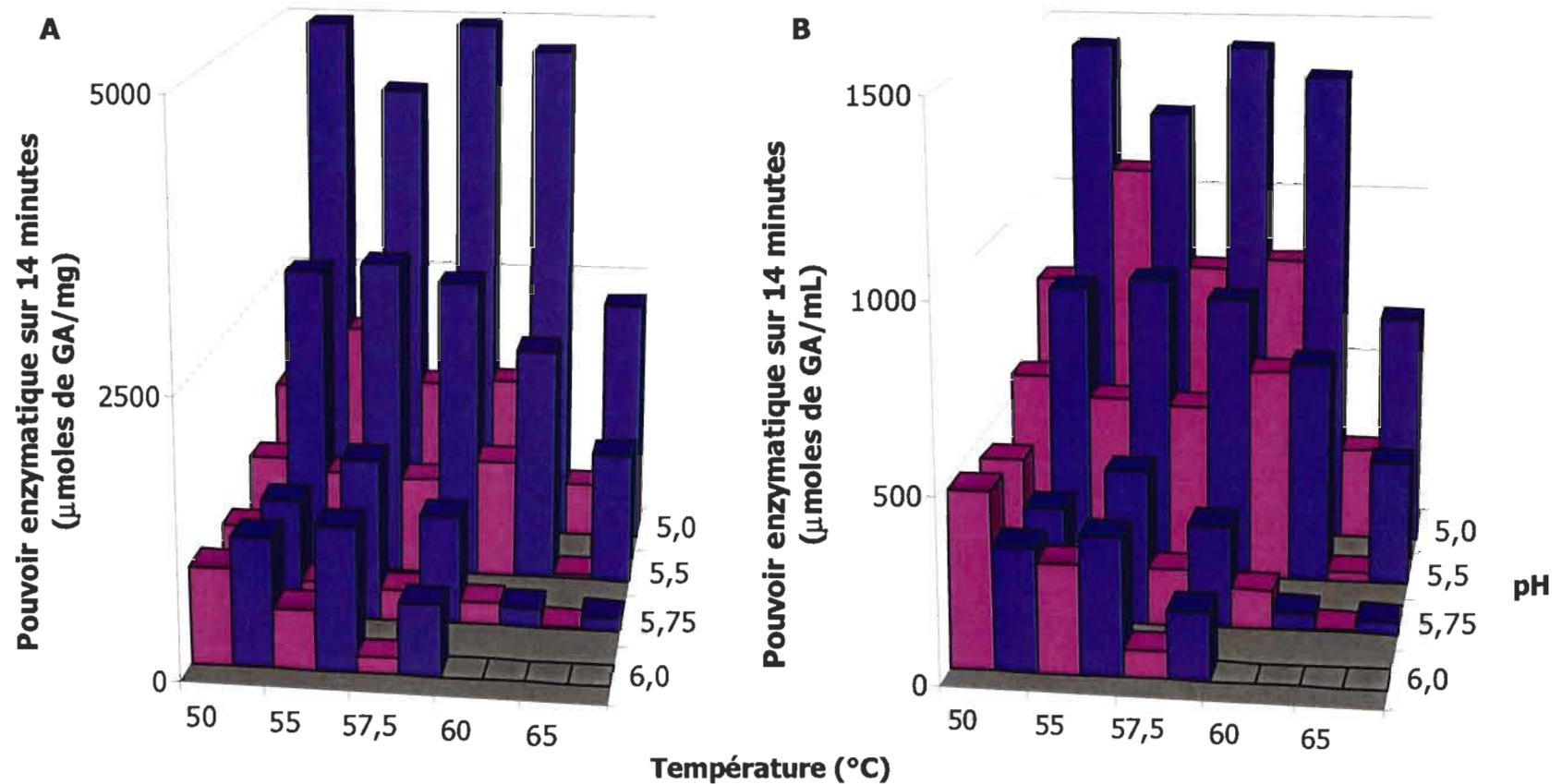


FIGURE 4.25 Comparaison du pouvoir enzymatique des PGs de *Km* et de *Sc* en fonction de la température et du pH sur la base de leurs rendements. Le pouvoir des enzymes a été calculé en multipliant leur activité par mg de protéines totales (A) ou par mL de surnageant (B) par sa durée de vie sur une période maximale de 14 minutes soit la durée approximative de l'étape lors de laquelle les pâtes sont mélangées, préparées et mises en feuille.

■ PG de *Km* ■ PG de *Sc*

4.6.4 Propriétés de la PG de *Sp* produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*

4.6.4.1 Activité de la PG de *Sp* à 50°C et pH 5,0

Six essais de production ont été réalisés pour la PG de *Sp* produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* dont au moins deux essais avec chaque séquence signal (voir tableau 4.1). Malheureusement, l'activité obtenue pour cette PG est très faible soit de l'ordre de 2 à 10 U par mg de protéines totales à 50°C pH 5,0. La quantité de protéines totales obtenue variait de 100 à 200 mg/L de culture et l'activité par mL de surnageant n'a jamais dépassée 1,15 U/mL. En 2005, Shimizu *et al.* ont exprimé le même gène de la PG de *Sp* dans la souche Origami (DE3) de *Escherichia coli* et les rendements obtenus n'étaient pas plus encourageants soit de 12,3 U/mg de protéines totales pour environ 280 mg/L de culture. Les problèmes d'expression dont il a été question à la section 4.4.2.4 sont l'hypothèse la plus probable pour expliquer la faiblesse d'activité de cette PG. Pour des raisons de temps et de priorités industrielles, la résolution du problème d'expression et la caractérisation de la PG de *Sp* a été reportée. Avec les rendements actuels, il aurait fallu cultiver cette PG dans un minimum de 8 litres pour ensuite la concentrer au moins 200 fois afin d'en avoir suffisamment pour tous les tests de caractérisation.

4.6.5 Propriétés de la PG de *Sc* produite dans la souche GS-115 de *Pichia pastoris*

4.6.5.1 Activité de la PG de *Sc* à 50°C et pH 5,0

Malgré le fait que la PG de *Sc* soit produite en plus grande quantité dans *Pichia pastoris* par rapport à dans *Saccharomyces cerevisiae* (316mg/L de culture comparativement à 225 mg/L lorsqu'elle est produite dans *Saccharomyces cerevisiae*) et que son taux d'expression par rapport au protéines totales est de loin plus important, son activité par mL à 50°C et pH 5,0 est plus faible. En effet, son activité dans ces conditions est de 29 U/mL comparativement à 120 U/mL lorsqu'elle est produite dans *Saccharomyces cerevisiae*. Ces résultats confirment donc que l'hôte d'expression joue un grand rôle dans les propriétés d'une enzyme. Dans ce cas-ci, c'est probablement la différence

dans les patrons de glycosylation qui explique la différence dans l'activité de la PG de *Sc* produite dans ces deux sources. Cependant, même si la PG de *Sc* a été produite au moins trois fois dans *Pichia pastoris*, son activité à 50°C et pH 5,0 n'a été mesurée qu'une fois.⁸¹ Ainsi, ces résultats n'ont pas été vérifiés.

4.7 ÉTUDES DE FAISABILITÉ DU TRAITEMENT DE LA PÂTE AVEC LES PGs

Le but premier de l'utilisation de la pectinase dans le procédé de fabrication du papier est de réduire la quantité de charges négatives (« anionic trash ») en suspension dans la pâte TMP blanchie au peroxyde. En effet, la pectinase a le pouvoir de dégrader le PGA qui, à lui seul, peut être responsable de 50% de ces charges négatives. Pour neutraliser ces charges négatives qui réduisent le rendement de la mise en feuille, des tonnes d'agents de rétention cationiques doivent être ajoutées au procédé. Thornton (1994, 1996) et Ricard (Reid et Ricard 2000, Ricard *et al.* 2005) ont déjà prouvé la faisabilité du traitement de la pâte TMP blanchie au peroxyde avec une préparation commerciale de pectinase d'*Aspergillus niger*. Néanmoins, il était essentiel de vérifier le potentiel des PGs de *Km* et de *Sc* sur la pâte TMP blanchie avant d'aller plus loin dans le projet. Les résultats obtenus quant à l'action des PGs de *Km* et de *Sc* ainsi que leur spécificité seront discutés dans les sections qui suivent.

4.7.1 Action des PGs de *Km* et de *Sc* sur la pâte TMP blanchie au peroxyde

La figure 4.26 présente les résultats d'une expérience lors de laquelle l'action des PGs de *Km* et de *Sc* (produites dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*) a été évaluée sur la pâte TMP blanchie au peroxyde à pH 5,3 (pH de la pâte échantillonnée à l'usine) et 50°C. Pour cette étude, les enzymes ont été ajoutées à raison de 1000 U/L de pâte, soit 5 fois plus que nécessaire⁸², afin de s'assurer qu'un effet serait observé.

⁸¹ La première préparation de PG de *Sc* dans *Pichia pastoris* n'a servi qu'à valider leur expression sur gel SDS-PAGE et la troisième préparation n'a pas été étudiée à cause d'un changement de priorité dans les travaux de recherche en cours à ce moment.

⁸² Dans leur article Reid et Ricard (2000) démontrent qu'une concentration de 1000 U de PG par litre de pâte TMP blanchie au peroxyde donne l'effet maximal sur la demande cationique. Ils démontrent aussi qu'avec 200 U/L, plus de 90% de l'effet est atteint et que dépassé cette valeur, aucun gain significatif n'est obtenu au niveau de la rétention.

En effet, le fait que la préparation commerciale de pectinase d'*Aspergillus niger* soit active dans la pâte ne signifie pas nécessairement que les PGs de *Km* et de *Sc* le seront. Différentes concentrations de coagulant (fourni par LPM et composé principalement de polyamine) ont aussi été ajoutés à la pâte traitée avec les PGs pour vérifier que le traitement de la pâte a non seulement un impact sur la demande cationique, mais aussi (par ricochet) sur la quantité d'agent de rétention nécessaire à la neutralisation des charges. En regardant la figure 4.26, on constate que les PGs de *Km*

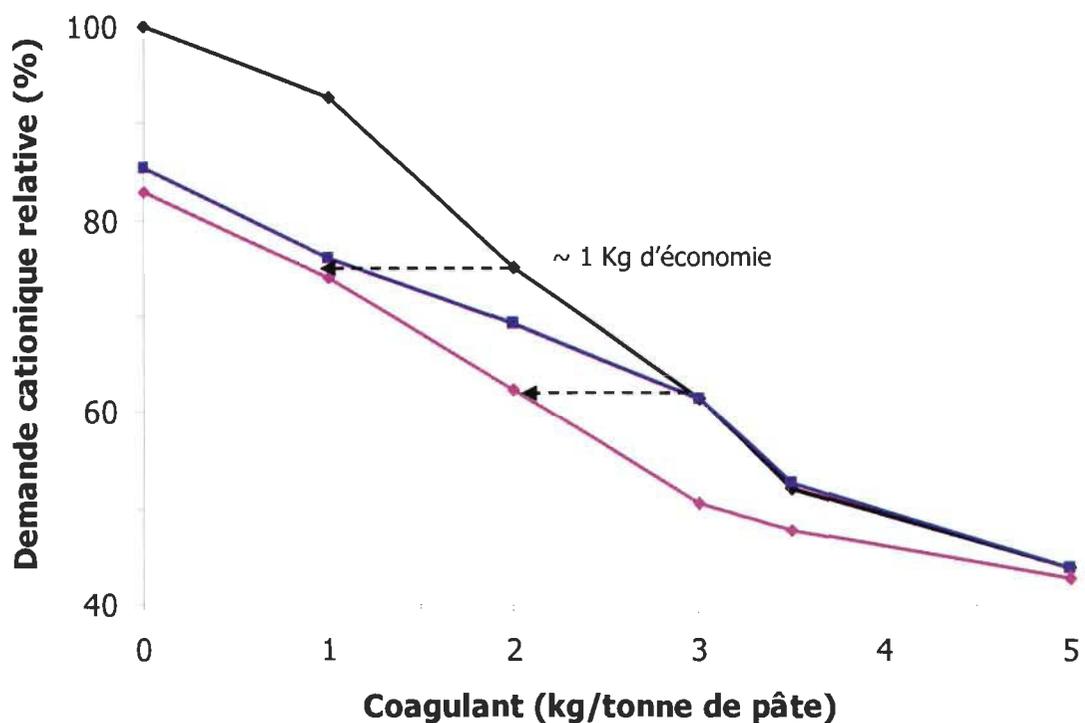


FIGURE 4.26 Action des PGs de *Km* et de *Sc* sur la pâte TMP blanchie au peroxyde en fonction de la quantité de coagulant ajouté. Traitement de 15 minutes à 50°C avec 1000 U/L de pâte à 4%. Le pH de la pâte pour cette expérience était de 5,3.

—◆— Pâte TMP Blanchie non-traitée —■— Pâte traitée avec la PG de *Sc*
 —◆— Pâte traitée avec la PG de *Km*

et de *Sc* ont l'effet attendu, soit de réduire la demande cationique de la pâte. Cependant le pourcentage de diminution de la demande cationique obtenu sans agent de rétention n'est pas aussi important que ce à quoi on pouvait s'attendre selon les

résultats de Reid et Ricard obtenus en 2000. En effet, ces derniers ont obtenu une réduction d'environ 30% avec l'ajout de 1000U/L, tandis qu'à la figure 4.26 on constate une réduction de 17%. Cette différence peut s'expliquer de plusieurs façons et il en sera question à la section 4.8. L'important pour cette étude qui se voulait préliminaire était de valider l'effet de la PG sur la pâte, ce qui a été fait.

Pour ce qui est des résultats obtenus avec l'ajout de coagulant, la figure 4.26 démontre bien l'impact du traitement enzymatique sur les besoins en agent de rétention cationiques de la pâte. On voit que le traitement enzymatique dans ces conditions permet une économie d'environ 1 Kg de ce coagulant par tonne de pâte pour une réduction de demande cationique allant jusqu'à 40% pour le traitement avec la PG de *Km*. À ce sujet, il est important de mentionner que selon Daniel Montplaisir, Ph.D., directeur du laboratoire à l'usine Kruger, une réduction totale de 40% de la demande cationique est un niveau acceptable pour les papetières qui recherchent une amélioration de la rétention sans pour autant négliger les coûts associés pour obtenir ces résultats.⁸³

4.7.2 Spécificité d'action de la pectinase sur la pâte TMP blanchie au peroxyde

Afin de vérifier que la PG possède bel et bien une action spécifique sur la pâte TMP blanchie au peroxyde, des essais sur de la pâte TMP non-blanchie, sur de la pâte TMP blanchie au peroxyde et sur de la pâte TMP blanchie au peroxyde lavée par un passage sur une presse ont été effectués. Les tests ont été conduits sur des échantillons de 200mL en triplicata sur une période de 15 minutes avec une quantité d'enzymes largement en excès, soit plus de 3000U/L à 50°C. C'est la PG de *Sc* qui a été utilisée pour cette étude. La consistance des pâtes variait de 3,28% pour la pâte TMP blanchie pressée à 3,98% pour la pâte TMP blanchie. La pâte non blanchie avait une consistance de 3,52%. Seul le pH de la pâte TMP blanchie a été ajusté de 5,7 à 5,0 avec de l'acide acétique. Le pH de la pâte TMP blanchie pressée était de 5,2, celui de la pâte TMP non-blanchie était de 4,7.

⁸³ Communication personnelle de Daniel Montplaisir, Ph.D., Directeur du laboratoire à l'usine de la Kruger.

Les résultats de cette étude ont confirmé l'action spécifique de la PG. En effet, aucune diminution de demande cationique n'a été observée suite au traitement pour la pâte TMP non-blanchie, ni pour la pâte TMP blanchie lavée à la presse (Δ de 0% \pm 2%) et une diminution de 48% \pm 20% de demande cationique a été observée pour la pâte TMP blanchie au peroxyde. En plus de confirmer l'action spécifique de la PG pour le PGA contenu dans la pâte qui a été blanchie au peroxyde, ils démontrent aussi que le PGA « contaminant » est bel et bien dissout dans l'eau et non lié aux constituants majeurs de la pâte (fibres et fines) par une affinité chimique forte, puisqu'il est totalement éliminé de la pâte lorsque celle-ci est pressée.

4.7.3 Action de la pectinase sur l'eau blanche

L'eau blanche est le terme employé dans l'industrie pour désigner l'eau de drainage de la pâte, c'est-à-dire l'eau dont la pâte a été filtrée. Comme son nom l'indique, cette eau n'est pas transparente, elle reflète le type de traitement que la pâte reçoit lors de son passage aux différentes étapes qui l'amènent à devenir du papier. On y retrouve une multitude de produits chimiques, mais aussi des fines de papier qui n'ont pas été retenues dans la feuille et dans le cas de l'eau blanche de machines utilisant de la pâte TMP blanchie au peroxyde, du PGA. Depuis les années 1980, cette eau, qui se retrouve dans le bassin de drainage des machines à papier, est recirculée en circuit fermé dans la machine et est réutilisée, avec une partie d'eau fraîche, pour diluer la pâte aux différentes étapes. C'est une des solutions écologiques importantes que les papetières ont mises en place et qui leur a permis de diminuer leur consommation en eau de plus 50%.⁸⁴ Cependant, cette recirculation implique que les matières dissoutes dans l'eau et la pâte s'accumulent et compliquent la préparation de la pâte pour la mise en feuille. En considérant que le PGA formé lors du blanchiment alcalin se retrouve inévitablement dans l'eau blanche, le traitement de cette dernière par la PG, parallèlement au traitement de la pâte ou même à sa place, pourrait avoir un effet global non négligeable sur la demande cationique du système. Puisque la composition de l'eau blanche doit être différente de celle de la pâte avant son passage à l'étape de

⁸⁴ Source : Conseil de l'Industrie Forêtère du Québec, données 2001 et 2005. www.cifq.qc.ca

rétenion⁸⁵, la faisabilité du traitement de l'eau blanche devait être évaluée. Pour ce faire, du filtrat de presse de la pâte TMP blanchie et de l'eau blanche provenant de la même machine ont été traités avec la PG de *Sc*. Le traitement a été effectué selon la méthode automatisée (section 3.6.2.5) sur une période de 2 minutes avec 200U/L, 400U/L, 1000U/L et 2000U/L de PG de *Sc* purifiée à 50°C. Le pH du filtrat de presse a été ajusté de 5,72 à 5,0 avec de l'acide acétique et le pH de l'eau blanche a été ajusté de 4,6 à 5,0 avec de l'hydroxyde de sodium. Dans les deux cas, une diminution de la demande cationique a été notée. Pour le filtrat de presse la demande cationique a diminué de 11% à 200U/L et de 25%±3% aux trois autres concentrations d'enzymes utilisées ce qui démontre que cette valeur est probablement la réduction maximale de demande cationique qui aurait pu être obtenue dans ces conditions. Pour ce qui est des résultats obtenus avec l'eau blanche, on constate une diminution de demande cationique de 13%±2% lorsque des concentrations de 200 et 400U/L d'enzymes sont utilisées et on constate une diminution de 28%±6%⁸⁶ lorsque des concentrations de 1000 et 2000U/L d'enzymes sont utilisées. Ces résultats démontrent que la pectinase a la capacité de fonctionner dans l'eau blanche et que la quantité de PGA présente dans cette eau est non négligeable et même semblable à celle de la pâte.

4.8 MISE AU POINT DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE DE LA PÂTE ET DE LA MESURE DE LA DEMANDE CATIONIQUE

4.8.1 Considérations particulières concernant la reproductibilité des essais

Plusieurs expériences impliquant le traitement enzymatique de la pâte ont été effectuées et ce dans différentes conditions et avec différents échantillons de pâte. D'un essai à un autre, les résultats étaient très variables et ce malgré le fait que les mêmes conditions de traitement ont été utilisées. En effet, les premiers résultats de demande cationique obtenus présentaient des déviations standard allant jusqu'à 25%.

⁸⁵ La pâte étant diluée avec une partie d'eau blanche et une partie d'eau fraîche doit être moins chargée en produits chimiques que l'eau blanche.

⁸⁶ Diminution de 28% à 2000U/L et diminution de 34% à 1000U/L. Le résultat de demande cationique à 1000U/L est probablement celle qui est erronée si on considère les résultats pour le filtrat de presse et ceux pour l'eau blanche à 200 et 400U/L.

Puisqu'une diminution de 20% (ou plus)⁸⁷ de la demande cationique était souhaitée par le traitement enzymatique, une déviation de cet ordre était inacceptable pour étudier l'effet de différentes concentrations d'enzymes ou de différents mutants. Les différentes causes de la variabilité dans les résultats de demande cationique sont expliquées ci-après.

4.8.1.1 Variabilité due à la méthode de traitement enzymatique de la pâte

Tel que mentionné dans la section 3.6.2 du chapitre Matériel et les méthodes, le traitement enzymatique se faisait dans un volume de 200mL de pâte pré-incubée dans un bain thermostaté. Malgré le fait que les meilleures précautions aient été prises pour effectuer les tests, trop d'aspects influençaient le traitement. Le facteur problématique le plus important était sans contredit la consistance de la pâte. En effet, celle-ci était généralement autour de 4%. À cette consistance, on retrouve de gros floccules dans l'eau et ces derniers peuvent nécessairement ralentir le déplacement de l'enzyme en solution. Ainsi, même si, lors de son ajout, l'enzyme était bien mélangée à la pâte et que le tout était ensuite mélangé régulièrement au cours du traitement; il n'est pas difficile de croire que d'un traitement à un autre, l'exposition de l'enzyme aux molécules de PGA peut varier. Un autre facteur ayant pu influencer la reproductibilité des traitements est la stabilité de la température du bain thermostaté et de la pâte. En effet, sur la période du traitement qui se faisait alors sur 10 à 60 minutes, une variation de 1 à 2 °C pouvait être notée. Lorsqu'on sait que l'activité d'une enzyme est sensible aux variations de températures, on comprend que d'un essai à un autre le taux de PGA dégradé ne sera pas le même selon que l'essai ait été conduit à 50°C en moyenne ou à 52°C.

4.8.1.2 Variabilité due à la méthode de mesure de la demande cationique

La méthode de mesure de la demande cationique contenait elle aussi un élément pouvant jouer sur la reproductibilité des résultats. Pour mesurer la demande cationique

⁸⁷ Communication personnelle de Daniel Montplaisir, Ph.D., directeur du laboratoire de l'usine de la Kruger.

d'un échantillon, la pâte était préalablement filtrée au travers un béccher à fond de tamis afin d'éviter que des fibres se retrouvent dans la suspension à analyser.⁸⁸ Après avoir effectué de nombreux tests de demande cationique sur le détecteur de charges particulières Mütek et après avoir discuté avec des techniciens du Centre intégré en pâtes et papiers (CIPP) qui étaient familiers avec l'appareil, la sensibilité de l'appareil et sa grande marge d'erreur ont été mis en lumière. En effet, tous les gens qui ont travaillé avec le détecteur de charges particulières Mütek s'entendent pour dire qu'il est très difficile d'obtenir des résultats reproductibles avec cet appareil. Seul un technicien expérimenté peut réussir à le maîtriser. Les tests sont généralement fait en triplicata et la plupart du temps une valeur sur trois est exclue. Pour un même échantillon, il peut y avoir une différence de 10 à 20% sur les résultats obtenus, selon la solution analysée. Ainsi, comme la pâte était filtrée manuellement à l'aide du tamis, la composition en fines du filtrat obtenu pouvait varier d'un tamisage à un autre et influencer sur les résultats de demande cationique obtenus, le détecteur de charge subissant l'interférence des fines.⁸⁹

4.8.1.3 Variabilité dans la composition de la pâte

Naturellement, la composition de la pâte influe aussi sur la reproductibilité des résultats de demande cationique. D'un lot de pâte à un autre, il est irréaliste de s'attendre à ce que la pâte ait la même composition. En effet, selon les saisons et la provenance des arrivages de copeaux de bois, les proportions des essences d'arbres varient. Cela a nécessairement un impact sur la composition de la pâte dont entre autres sur le taux de PGA présent dans cette dernière. C'est ce qui explique la différence des résultats présentés à la section 4.7.1 avec ceux obtenus par Reid et Ricard en 2000 et ce même si la concentration d'enzyme était à quasi saturation dans les deux cas. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences reproduites sur des échantillons de pâte obtenus à différents moments. En traitant différents échantillons de pâte TMP blanchie au peroxyde avec une PG provenant de la même préparation et ce dans les

⁸⁸ Cette méthode est la méthode standard employée par les techniciens du Centre Intégré sur les pâtes et papiers de l'UQTR pour les analyses de demande cationique sur les échantillons de pâte.

⁸⁹ Les fines peuvent interférer sur la mesure des charges parce que 1) elles sont chargées négativement et 2) elle modifient l'homogénéité de la solution à analyser.

mêmes conditions de pH et de température, des résultats allant de 5% à 52% de réduction de demande cationique ont été observés (résultats non montrés). Ces variations dans le taux de PGA de la pâte amènent un point important quant à l'utilisation de la pectinase dans le procédé de fabrication du papier : l'utilisation de la pectinase sur la pâte TMP blanchie au peroxyde ne peut être pertinente que si le PGA est présent en quantité suffisante pour qu'un traitement soit significatif.⁹⁰

4.8.2 Améliorations apportées à la méthode de traitement enzymatique et à la méthode de mesure de la demande cationique

Pour éliminer le plus possible les éléments jouant sur la reproductibilité des résultats, des modifications ont été apportées sur la préparation de la pâte. En effet, puisque les floccules présents dans la pâte peuvent ralentir la dispersion d'une enzyme en solution et ainsi nuire à son action sur le substrat et puisque les fines présentes dans le filtrat de pâte tamisée avant l'analyse par le détecteur de charges particulaires peuvent interférer avec la mesure de la demande cationique, la pâte a été centrifugée et filtrée plusieurs fois afin d'obtenir une eau de pâte limpide. Pour la pâte TMP blanchie, le filtrat de la presse utilisée à la Kruger pour laver la pâte TMP blanchie de ces charges anioniques contaminantes (« anionic trash ») a été utilisé au lieu de la pâte. Au lavage de la pâte, les matières dissoutes en suspension, dont le PGA, se retrouvent dans le filtrat de presse. Ce dernier devient par le fait même le meilleur modèle de la pâte TMP blanchie, les fibres de bois en moins. La consistance du filtrat de presse est d'environ 0,25% soit une valeur se rapprochant de l'eau blanche qui est généralement près de 0,46%. Les échantillons avec ces consistances, étant plus limpides, leur filtration et l'ajustement de leur pH sont de beaucoup facilités. De plus, le fait d'avoir un modèle limpide de la pâte permettait l'automatisation du traitement, ce qui a permis de réduire la marge d'erreur associée au traitement manuel et donc d'augmenter la reproductibilité des essais. En effet, la déviation standard des résultats obtenus est passée de 25% à une moyenne de 5% (avec un maximum de 10%) et beaucoup moins de mesures de demande cationique ont dû être exclues soit environ 2 valeurs sur 30 au lieu de 1 sur 3.

⁹⁰ Il est raisonnable de croire qu'une diminution de plus de 15% de la demande cationique suite au traitement enzymatique serait significative.

En plus d'augmenter la reproductibilité des essais, l'automatisation du traitement a aussi eu pour avantage de diminuer le stress imposé au technicien et de réduire la quantité de pâte nécessaire pour les traitements. En effet, en quinze minutes, un technicien devait vérifier plus d'une fois la température du bain thermostaté et de la pâte, ajouter l'enzyme au temps zéro, mélanger régulièrement la pâte et la tamiser aux moments souhaités, soit au temps zéro et à un ou deux autres temps, afin d'en récupérer un aliquote qu'il devait diluer avant de mesurer sa demande cationique et le tout en étant bien synchronisé. Advenant une erreur de manipulation du technicien ou une mauvaise mesure de l'appareil de détection des charges, cet essai était alors complètement perdu. L'automatisation du traitement, en revanche, permet de générer 48 échantillons prêts à être analysés sur l'appareil de détection des charges, le tout en duplicata. Le traitement enzymatique étant inactivé dans la méthode automatisée, le technicien peut effectuer les analyses de demande cationique à son rythme sans avoir à se soucier d'oublier de mélanger la pâte, de vérifier la température ou de prendre l'échantillon à temps. Pour ce qui est du volume de pâte nécessaire, il est passé de 200 mL par traitement à un maximum de 7,2 mL par traitement ce qui a facilité le transport des échantillons, leur préparation ainsi que leur entreposage.

4.8.3 Dosage du PGA dans la pâte TMP blanchie au peroxyde

Afin de s'assurer que la pâte destinée aux essais enzymatiques contenait suffisamment de PGA pour que les études de traitements à la PG donnent des résultats significatifs et comparables, un test de dosage du PGA dans la pâte a été mis en place. Dans ce test, la différence de la demande cationique entre la pâte non-traitée et la pâte traitée avec le surnageant de culture de la PG de *Sc* produite dans INVSc (soit un minimum de 1000 U/L) était évaluée.⁹¹ Les premiers essais ont été conduits à plusieurs pH et à deux températures cibles soit à 50°C et à 55°C.⁹² En vérifiant ainsi l'activité enzymatique sous différentes conditions au lieu d'une ou deux, les chances de trouver une condition dans laquelle l'enzyme serait active étaient augmentées. Il ne faut pas oublier que les

⁹¹ Lors des premiers essais de dosage du PGA, du surnageant a été utilisé pour le traitement pour simplifier le plus possible les étapes menant au dosage. Le surnageant contenant la PG de *Sc* a été utilisé puisque c'est celui qui contient le plus d'activité par mL.

⁹² Avec la méthode améliorée de traitement et de mesure de la demande cationique.

tests d'activité enzymatique dans le tampon constituaient un environnement idéal pour l'enzyme comparativement à ce à quoi elle est exposée dans la pâte et que l'activité enzymatique d'une enzyme à un pH et une température donnée dans le tampon ne signifie pas qu'elle le sera autant à ce pH et cette température dans la pâte. L'histogramme de la figure 4.27 est un exemple de résultats obtenus avec un test de dosage de PGA. À l'aide de cet histogramme, on remarque qu'une diminution de 28% de demande cationique peut être minimalement obtenue par le traitement de cette pâte. On constate aussi par la même occasion que la quantité d'enzyme utilisée pour le dosage n'est pas en excès puisqu'on n'obtient pas la même diminution de demande cationique à chaque condition. De plus, fait intéressant, la PG de *Sc* dans cette pâte suit une courbe d'activité similaire à celle obtenue dans le tampon (voir figure 4.19). Un pic d'activité est retrouvé à pH 4,6 (4,5) et une légère remontée est notée à pH 5,4 (5,5). Pour ce qui est de l'activité reliée à la température, on voit aussi que l'enzyme est généralement plus active à 55°C qu'à 50°C. Il faut comprendre que même si ce test semble facile d'exécution, il nécessite tout de même plus de 120 tests de demande cationique de 5 minutes chacun (théoriquement 182 tests) soit 2 jours d'analyses sur le détecteur de charges particulières. À l'avenir, pour simplifier le test et sauver du temps d'analyse, ce dernier pourra être fait à seulement 2 valeurs de pH (par exemple 4,8 et 5,4), toujours à 50°C et 55°C et en duplicata. Ces conditions semblent représentatives des conditions dans lesquelles les PGs sont généralement actives (pH 4,8 et 50°C) et en mêmes temps des conditions recherchées (pH 5,4 et 55°C).

4.8.4 Note sur les conditions du procédé de fabrication du papier

Au début du présent projet les conditions ciblées pour l'utilisation de la PG dans le procédé de fabrication du papier à l'étape de rétention avaient été établies à un pH de 5,3 et une température de 55°C avec l'aide de Daniel Montplaisir, de Bruno Chabot et de Claude Daneault (voir section 1.2 de l'introduction). Ces conditions ont servi de point de départ dans la recherche d'une PG pouvant fonctionner dans le procédé de fabrication du papier. Néanmoins, plusieurs facteurs comme les saisons nuisent à l'homogénéité des conditions de fabrication du papier au cours d'une année. Par

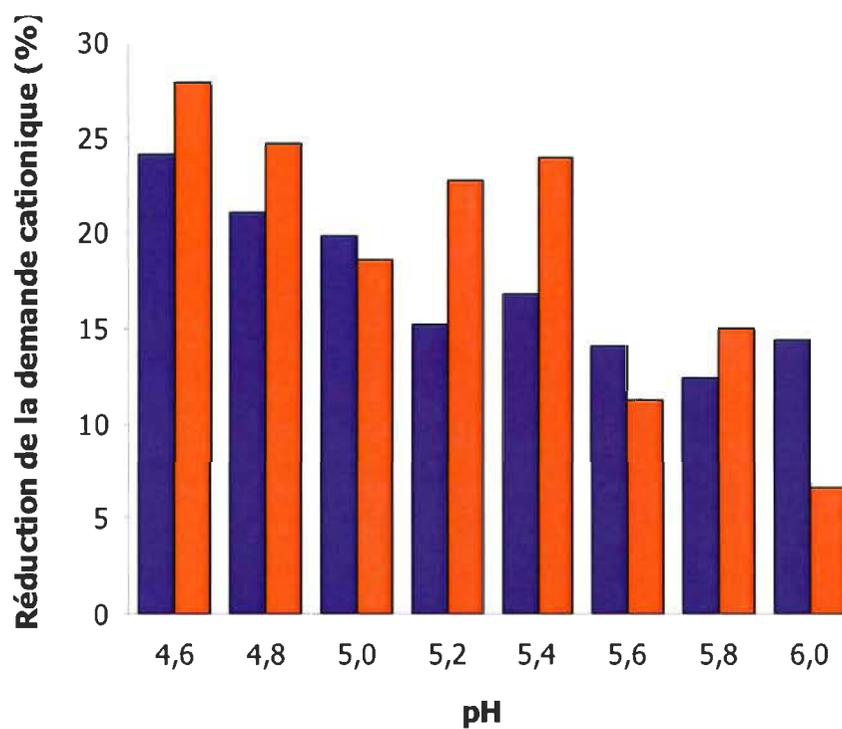


Figure 4.27 **Dosage du PGA dans la pâte TMP blanchie au peroxyde.** Pourcentages de réduction de la demande cationique obtenus après le traitement de la pâte avec du surnageant de PG de *Sc* non dilué (équivalent à environ 1000U/L de pâte). ■ 50°C ■ 55°C

exemple, en été, la machinerie dans l'usine conserve la chaleur générée par l'action des machines ce qui fait que la température de la pâte est plus élevée qu'en hiver. De plus, la composition de la pâte varie au gré des arrivages de copeaux et des conditions de blanchiment. Ainsi, au fil des échantillonnages, le pH de la pâte donnait des valeurs allant de 5,2 à 6 pour la pâte TMP blanchie et le filtrat de presse et de 4,5 à 4,9 pour l'eau blanche. Pour ce qui est des valeurs de température mesurées, elles variaient de 54°C à 60°C pour la pâte TMP blanchie, de 47°C à 56°C pour le filtrat de presse et de 50°C à 59°C pour l'eau blanche. Cela nous amène donc à dire que la plage d'activité de la PG devra de façon optimale s'étendre jusqu'à un pH de 6,0 et une température de 60°C.

4.9 CARACTÉRISATION DE LA PG DE *Sc* DANS LA PÂTE TMP BLANCHIE AU PEROXYDE

La capacité des PGs de *Km* et de *Sc* (produites dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*) à fonctionner à des pH et des températures se rapprochant de celles retrouvées dans le procédé de fabrication du papier a été vérifiée lors de leur caractérisation dans le tampon (section 4.6). Leur capacité à fonctionner dans la pâte a aussi été démontrée à la section 4.7. Cependant, même si les PGs ont démontré une activité dans la pâte à pH 5,3 et 50°C, cela ne signifiait pas que leur plage d'activité dans la pâte allait être identique à leur plage d'activité dans le tampon. Il en est de même pour ce qui est de leur stabilité. En effet, la composition chimique de la pâte, qui est beaucoup plus complexe que celle du tampon, peut affecter son pouvoir enzymatique. Ainsi, afin d'étudier l'effet de la pâte sur l'activité enzymatique des PGs, la caractérisation de l'activité de la PG de *Sc* a été effectuée dans la pâte. Les résultats de demande cationique obtenus sont présentés sous forme de graphiques 3D à la figure 4.28.

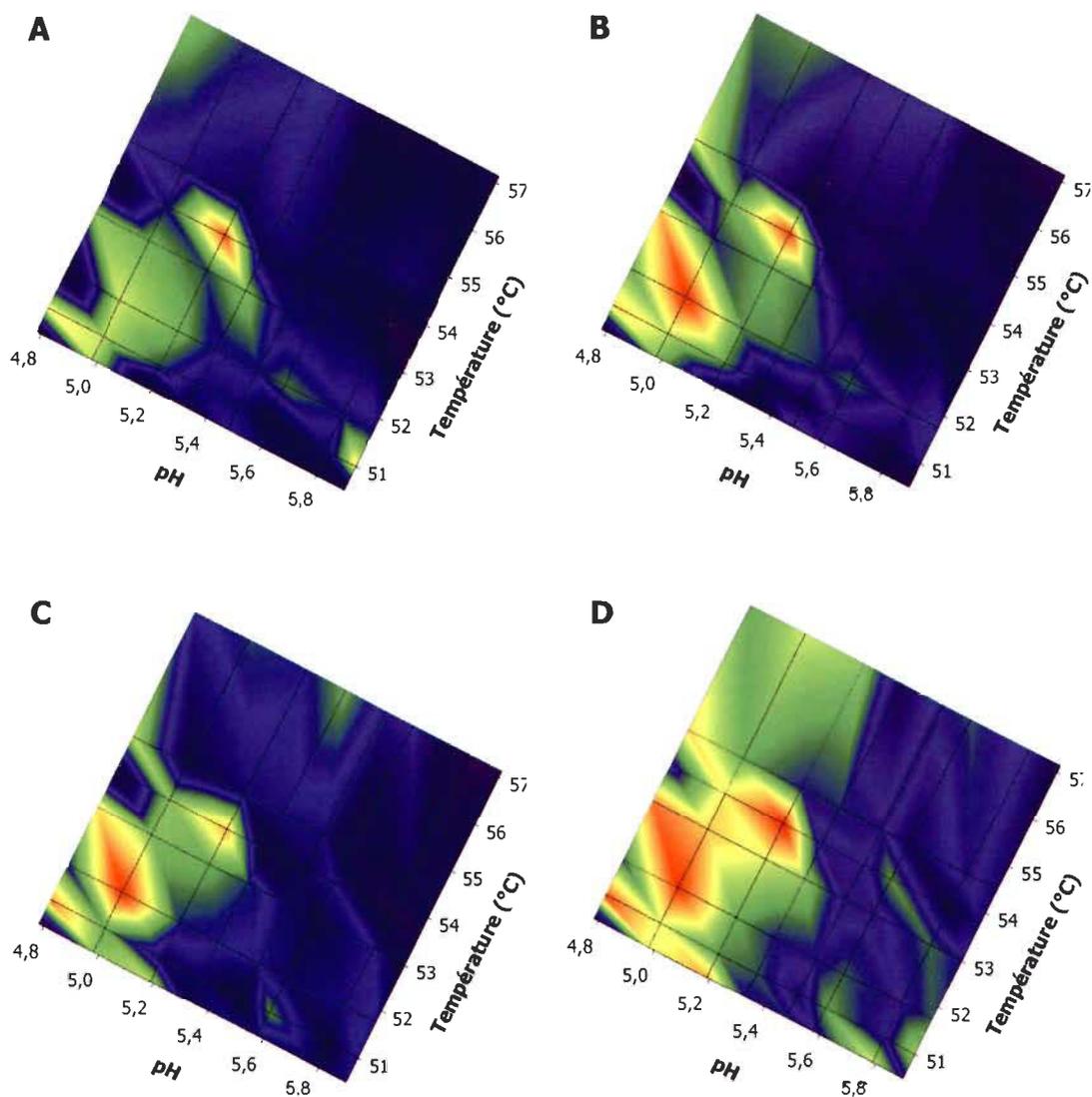
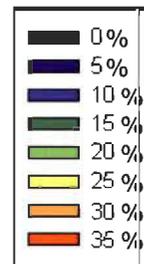


FIGURE 4.28 Plage d'activité et stabilité de la PG de *Sc* sur la pâte TMP blanchie au peroxyde. Le filtrat de presse de la pâte a été traité à des pHs allant de 4,8 à 5,8 et des températures allant de 50°C à 57°C avec 75U/L de PG pendant : 1 minute (A), 2½minutes (B), 5 minutes (C) et avec 375U/L de PG pendant 6 minutes (D). L'activité de la PG est présentée en pourcentage de réduction de la demande cationique de la pâte selon l'échelle de couleurs ci-jointe.



4.9.1 Plage d'activité de la PG de *Sc* dans la pâte

Les graphiques de la figure 4.28 nous informent que l'activité de la PG de *Sc* (produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*) dans la pâte est à son meilleur aux pHs plus acides. Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus dans le tampon (voir figure 4.24). Pour ce qui est de son activité en fonction de la température, on observe aussi les mêmes tendances que dans le tampon. Néanmoins, l'enzyme semble tout de même moins efficace à haute température dans la pâte que dans le tampon. Par exemple, dans le tampon (voir figure 4.20), on retrouve un pic d'activité à 55°C au pH 5,25. Dans la pâte, ce pic d'activité se retrouve plutôt vers 54°C et de 54°C à 55°C la diminution de demande cationique passe de 35% à 10% \pm 5% selon le cas, ce qui équivaut à une diminution d'activité de plus de 60% qui n'est pas retrouvée dans le tampon.

4.9.2 Stabilité de la PG de *Sc* dans la pâte

En regardant les graphiques A, B et C de la figure 4.28 on constate que l'enzyme perd rapidement son activité dans la pâte. En effet, on remarque que la diminution de la demande cationique après 5 minutes (graphique C) est sensiblement la même qu'après 2½ minutes (graphique B); la légère différence s'expliquant par la marge d'erreur. L'enzyme semble perdre son activité moins de 2½ minutes après avoir été exposée à la pâte. C'est aussi ce que tous les autres traitements enzymatiques dont les premières mesures ont été effectuées dans les premières minutes ont démontré (résultats non-montrés).

4.10 CONCLUSIONS CONCERNANT L'UTILISATION DE LA PG DANS LE PROCÉDÉ DE FABRICATION DU PAPIER

Les difficultés survenues dans la méthode de traitement de la pâte et la caractérisation de l'activité de la PG de *Sc* dans la pâte permettent de tirer quelques conclusions générales concernant l'utilisation des PGs dans le procédé de fabrication du papier.

Premièrement, à moins qu'une PG plus résistante soit découverte, la PG devra être ajoutée en continu dans la pâte. En effet, la faible durée de vie de la PG de Sc dans la pâte, advenant qu'elle soit représentative des autres PGs, signifie qu'elle ne pourra pas agir pendant toute la durée du trajet de la pâte de son mélange à l'ajout des agents de rétention, soit pendant la période de 15 minutes estimée au début du projet. De plus, à cause des problèmes putatifs de dispersion de l'enzyme dans la pâte ayant une forte consistance⁹³, l'ajout de la PG devra probablement être fait en plusieurs points dans le circuit et ce lorsque la pâte sera le plus diluée possible. En particulier, l'ajout de l'enzyme dans l'eau blanche présente un double avantage soit 1) que la consistance de l'eau blanche est parfaite pour la dispersion de l'enzyme et 2) que son pH (qui est généralement plus acide) et sa température (qui est généralement plus basse) sont plus appropriés pour l'activité des PGs que le pH et la température de la pâte qui circule dans la machine (voir section 4.8.4). Finalement, même s'il est clair que les PGs sont moins efficaces dans certaines conditions, si elles démontrent une faible activité dans ces conditions cela signifie qu'elles peuvent être employées dans le procédé. En fait, et tel qu'il l'est démontré par les résultats des graphiques C et D de la figure 4.27, la solution repose dans la quantité d'enzyme à ajouter. En effet, en comparant le graphique du traitement de la pâte avec 75U/L d'enzyme (graphique C) avec celui du traitement avec 375U/L (graphique D) et en considérant les résultats de la caractérisation de l'activité enzymatique dans le tampon (figures 4.19 et 4.20), on constate que plus on ajoute d'enzyme plus on a de chance de réduire la demande cationique au niveau souhaité. Par exemple, lorsque le filtrat de presse a été traité avec 75U/L de PG, la réduction de demande cationique tournait autour de 5 à 10% à pH acide et température élevée, tandis qu'en utilisant 5 fois cette concentration, la réduction de demande cationique est passée à 15 à 20%. À cette concentration d'enzyme une réduction allant jusqu'à 20% de demande cationique est même observée à des pH de 5,6 et 5,8 et le maximum de réduction de 35% est atteint sur une plus grande zone. Évidemment, plus on ajoutera d'enzyme plus les coûts d'utilisation de la technologie seront élevés, d'où l'importance de trouver une enzyme plus active et plus stable pouvant être produite à faible coût.

⁹³ À titre indicatif, une consistance de 3% est considérée forte et une consistance de 0,5% ou moins est considérée parfaite.

CHAPITRE V

STRATÉGIES D'OPTIMISATION DES PGs

Tel que discuté à la section 2.7, il n'a pas été possible d'utiliser les techniques d'évolution accélérée pour l'optimisation des PGs. C'est donc à l'aide du design rationnel que la stratégie d'optimisation des PGs a été développée. Pour débiter, les séquences primaires des PGs dont la caractérisation a été rendue publique ont été alignées de façon stratégique pour essayer de faire ressortir des éléments clefs pouvant être responsables, par exemple, de la stabilité thermique ou de l'efficacité à pH élevé (pH 6 et plus). Malheureusement, le nombre de PGs caractérisées présentant les propriétés recherchées étant limité, aucune information significative n'est ressortie de ces alignements (résultats non présentés).

Connaissant plusieurs relations entre la structure et la fonction des PGs grâce aux recherches de l'équipe de Benen et Visser sur la PG II d'*Aspergillus niger* (voir chapitre 1 section 1.7), les séquences primaires des PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp* y ont été alignées afin d'identifier les régions où des modifications rationnelles pouvaient être apportées. L'alignement de ces quatre PGs est présenté à la figure 5.1 et les mutations d'intérêts (avec comme numérotation celle de la PG II d'*Aspergillus niger*) sont présentées dans les sections qui suivent.

5.1 STRATÉGIES POUR AUGMENTER L'ACTIVITÉ DES PGs

En analysant l'alignement de séquences présenté à la figure 5.1 et le tableau 5.1, on remarque que les acides aminés des PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp* situés sur certaines des positions étudiées par l'équipe de Benen et Visser ne sont pas ceux qui sont les plus favorables à l'activité. En effet, dans les trois cas, à la position 150, on retrouve une glutamine au lieu de la méthionine de la PG II d'*Aspergillus niger*. Dans le tableau 5.1, qui résume les résultats des études de Pagès *et al.* (2000), on constate qu'une glutamine à cette position fait perdre plus de 60% de l'activité de la PG II.

À la position 282, on retrouve une situation semblable, où un résidu chargé (une sérine dans le cas de la PG de *Sc* et une lysine dans le cas des PGs de *Km* et de *Sp*) remplace l'aspartate présent sur la PG II d'*Aspergillus niger*. Dans le cas de cette mutation, presque 40% de l'activité de la PG II est perdue. Les mutations Q150M, K282D (avec la numérotation de la PG II d'*Aspergillus niger*) sont donc retenues dans le but d'étudier leur effet sur l'activité des PGs du présent projet.

	Activité spécifique	Perte d'activité
	<i>U/mg</i>	%
PG II	3900	-
M150Q	1500	61,5
D183N	500	87,2
N186E	3100	20,5
E252A	2900	25,6
D282K	2400	38,5
Q288E	2400	38,5
Y291L	30	99,2
Y291F	200	94,9
Y326L	4000	-

TABLEAU 5.1 **Activité de la PG II d'*Aspergillus niger* et de certains de ses mutants.** L'activité spécifique de la PG II et de ses mutants a été déterminée dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM contenant 2,5mg/mL de PGA à pH 4.2 et à 30 °C. La perte d'activité est la différence en pourcent entre l'activité de la PG II d'*Aspergillus niger* et chacun de ses mutants. (Tiré et modifié de l'article de Pagès et al. 2000).

5.2 STRATÉGIES POUR AUGMENTER LA STABILITÉ DES PGs

5.2.1 Stratégies impliquant les ponts disulfures

Pour augmenter la stabilité des protéines, il est connu depuis longtemps que les ponts disulfures jouent un rôle important (Zhou *et al.* 1993; Mansfeld *et al.* 1997; Doucet *et al.* 2002; Jeong *et al.* 2007). En étudiant l'alignement de séquences présenté ci-haut, on remarque que les PGs de *Km* et de *Sc* possèdent trois des quatre ponts disulfures présents sur la PG d'*Aspergillus niger*, le troisième étant manquant (C329 et C334). Il en est de même pour la PG de *Sp*, mais c'est le quatrième pont qui est manquant sur cette dernière. En ajoutant les ponts disulfures manquants sur ces PGs, leur stabilité pourrait être augmentée. Dans le même ordre d'idée, il pourrait être intéressant d'enlever le dernier pont disulfure (C353K et C362) des PGs de *Km* et *Sc* puisque la PG de *Sp* ne le possède pas et cette dernière présente une activité à des températures plus élevées que les autres (Miyari *et al.* 1985). Le troisième pont de la PG de *Sp* pourrait aussi être enlevé, puisque les PGs de *Km* et *Sc* (qui n'ont pas ce troisième pont SS) sont reconnues pour être plus actives à des pH plus élevés que 5,0 (Sakai *et al.* 1984; Barnby *et al.* 1990; Blanco *et al.* 1994; Hirose *et al.* 1999; Jia et Wheals 2000; Serrat *et al.* 2002). En effet, il est probable qu'une structure figée par des ponts disulfures favorise une stabilité conformationnelle sans nécessairement améliorer l'activité enzymatique. Les mutations V329C et A334C, ainsi que C353K et C362YL sont donc retenues dans le but d'étudier leur effet sur l'activité des PGs de *Km* et *Sc* et les mutations C329V et C334A, ainsi que K353C et YL362C sont donc retenues dans le but d'étudier leur effet sur l'activité des PGs de *Sp*.

5.2.2 Stratégie impliquant la position 326 (sur la PG II d'*Aspergillus niger*)

Dans leur article portant sur la cartographie des « subsites » de la PG II d'*Aspergillus niger*, Pagès *et al.* (2000) ont remarqué que la tyrosine à la position 326, quoique non nécessaire à l'activité de l'enzyme (voir tableau 1.2) avait un rôle important dans sa stabilité thermique (voir figure 1.15). Dans cette étude, la stabilité thermique n'a été évaluée qu'à 40°C, une température qui n'est pas aussi élevée que celle souhaitée pour

l'utilisation de la pectinase dans le procédé de fabrication du papier. De plus, les acides aminés présents à cette position dans les PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp* possèdent, tout comme la tyrosine, des chaînes latérales hydrophiles (soit des lysines dans le cas des levures et une thréonine dans le cas de *Sp*) et la mutation étudiée par Pagès *et al.* impliquait le remplacement de cette tyrosine par une leucine, un acide aminé possédant une chaîne latérale hydrophobe. Néanmoins, cette mutation reste intéressante à essayer, seule ou en combinaison avec l'ajout de pont disulfure dans le cas des PGs de *Km* et de *Sc*. En effet, l'alignement des séquences met en évidence la proximité de la position 326 avec le 3^{ième} pont disulfure. Ce pont est présent dans la PG II d'*Aspergillus niger* et dans la PG de *Sp*, lesquelles possèdent des résidus polaires qui ne sont pas chargés et il est absent dans les PGs de *Km* et de *Sc* qui possèdent les résidus de lysine chargés positivement. La mutation K326Y sur les PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp* sont retenues dans le but d'étudier leur impact sur la stabilité thermique des pectinases. À la limite, la lysine est peut-être encore plus stabilisante que la tyrosine, surtout si on considère son emplacement au « subsite » imaginaire +3 (voir figure 1.14). Sa charge positive a peut-être un effet de rétention sur le substrat chargé négativement. La mutation K326T sur les PGs de *Km* et de *Sc* est aussi retenue puisque la PG de *Sp* qui possède une thréonine à cette position est reconnue comme encore active à des températures dépassant 50°C.

5.3 STRATÉGIES SPÉCIFIQUES À LA PG DE *Sp*

Lors de l'étude de cartographie des « subsites » de la PG II d'*Aspergillus niger* effectuée par l'équipe de Jaap Visser et de Jacques Benen (Pagès *et al.* 2000), une perte d'activité de 25% a été remarquée lorsque le glutamate de la position 252 (chargé négativement) a été changé par un résidu non-polaire. L'aspartate situé sur cette position dans les PGs de *Km* et de *Sc* n'attire pas notre attention puisqu'il est aussi chargé négativement. Par contre, la méthionine de la PG de *Sp* diffère beaucoup du glutamate. La mutation M252D/E a donc été retenue pour la PG de *Sp*.

5.4 STRATÉGIES RELIÉES À LA GLYCOSYLATION

La glycosylation des protéines contribue souvent à leur stabilité, leur activité et même leur niveau d'expression (Aikawa *et al.* 1990; Elbein 1991; Kim *et al.* 2004; Yanez *et al.* 1998). Pour étudier l'effet des glycosylations sur les PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp*, les asparagines susceptibles d'être glycosylées seront remplacées par un aspartate ou une glutamine. En effet, ces deux acides aminés ont une chaîne latérale semblable à celle de l'asparagine (voir la figure 5.2). Ils risquent donc moins de troubler la structure conformationnelle des PGs. La séquence consensus rendant possible la glycosylation de l'asparagine est quant à elle présentée à la figure 5.3. Il est important de spécifier que la présence de cette séquence consensus sur une protéine n'indique pas nécessairement qu'il va y avoir glycosylation. Effectivement, la glycosylation dépend aussi d'autres facteurs tels son utilité pour la protéine, l'organisme produisant la protéine et la position de l'asparagine dans la structure 3D. Pour la PG de *Km*, les asparagines susceptibles d'être glycosylées sont N189 et N293. Pour ce qui est de la PG de *Sc*, les asparagines susceptibles d'être glycosylées sont N319 et N331. Pour la PG de *Sp*, ces asparagines sont N122, N189, N310 et N331.

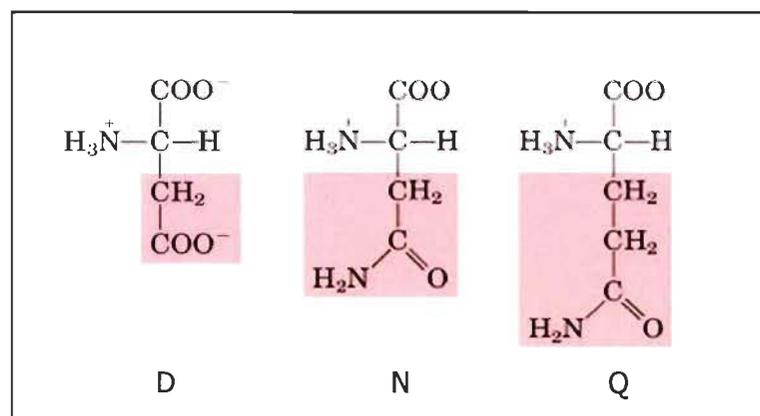


FIGURE 5.2 L'aspartate (D), l'asparagine (N) et la glutamine (Q).

En portant une attention particulière à l'alignement de séquences de la figure 5.1 on remarque qu'à plusieurs endroits, un site de glycosylation sur une des PGs pourrait se retrouver sur une autre PG si ce n'était que d'un seul acide aminé de différent dans la séquence consensus (voir figure 5.3). Ainsi, en mutant un seul acide aminé, des glycosylations pourraient être ajoutées sur les PGs aux endroits où elles se trouvent sur d'autres PGs. Par exemple, à la position 319, la PG de *Sc* a un site de glycosylation, mais la PG de *Km* n'en a pas. Cependant, l'acide aminé de la PG de *Km* qui se trouve à la position 321 est une sérine, ce qui fait que l'aspartate de la position 319 pourrait être muté pour une asparagine afin de créer un site putatif de glycosylation. C'est le même principe pour le site de glycosylation présent à la position 189 sur les PGs de *Km* et de *Sp*, mais absent sur la PG de *Sc*. Quoique la PG de *Sc* possède une asparagine à cette position, elle a une leucine au lieu d'une thréonine à la position 191. En changeant cette leucine pour une thréonine ou une sérine, on vient de créer un nouveau site putatif de glycosylation. Ainsi, les mutations retenues pour l'optimisation des PGs par l'ajout d'un nouveau site (logique) de glycosylation sont D319N pour la PG de *Km*, L191S/T et K295S/T pour la PG de *Sc* et V242S/T et A321S/T pour la PG de *Sp*. Les mutations qui ont été retenues pour l'optimisation des PGs sont donc N189D/Q, N293D/Q, D319N pour la PG de *Km*, L191S/T, K295S/T, N319D/Q et N331D/Q pour la PG de *Sc* et N122D/Q, N189D/Q, V242S/T, N310D/Q, A321S/T et N331D/Q pour la PG de *Sp*.

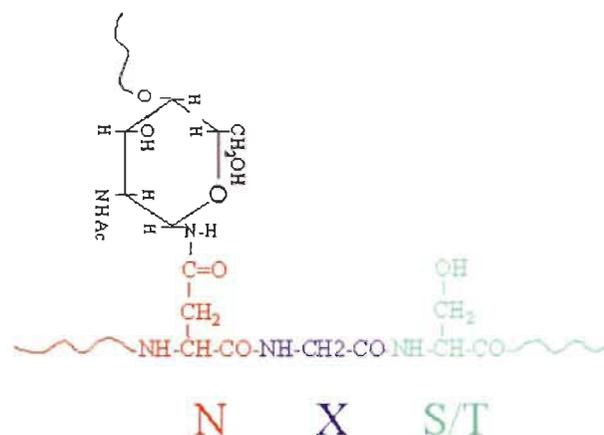


FIGURE 5.3 Séquence consensus d'un site de glycosylation lié à l'asparagine. X représente n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline.

5.5 RÉSUMÉ DES STRATÉGIES D'OPTIMISATION DES PGs

Le tableau 5.2 présente un résumé des stratégies retenues pour optimiser les PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp*. Naturellement, des combinaisons de ces mutations pourront être effectuées pour agrandir la banque de PGs à cribler.

Optimisation de la PG de :	<i>Km</i>	<i>Sc</i>	<i>Sp</i>
reliée à l'activité	Q150M K282D	Q150M K282D	Q150M M252D/E K282D
reliée à la stabilité	K326T/Y V329C et A334C C353K et C362YL	K326T/Y V329C et A334C C353K et C362YL	T326Y C329V et C334A K353C et YL362C
reliée à la glycosylation	N189D/Q N293D/Q D319N	L191S/T K295S/T N319D/Q N331D/Q	N122D/Q N189D/Q V242S/T N310D/Q A321S/T N331D/Q

TABLEAU 5.2 Stratégies retenues (mutations) pour optimiser les PGs de *Km*, de *Sc* et de *Sp*. La numérotation utilisée est celle de la PG II d'*Aspergillus niger*.

CHAPITRE VI

RÉSULTATS ET DISCUSSION - PARTIE 2

Le présent chapitre décrit les résultats qui sont reliés aux stratégies d'optimisation de la pectinase en vue de son utilisation dans le procédé de fabrication du papier. Ces stratégies, qui avaient en fait pour but d'augmenter l'efficacité de la PG, peuvent être divisées en deux catégories. La première catégorie inclut les stratégies en lien avec l'expression. Parmi ces stratégies on retrouve l'essai de différents systèmes pour l'expression dans différents hôtes soit *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* et l'essai de différentes séquences signal. La deuxième catégorie de stratégies reliées à l'optimisation de l'efficacité de la PG en vue de son utilisation dans l'industrie papetière implique quant à elle les mutations rationnelles décrites au chapitre cinq.

6.1 CONSTRUCTIONS ET MUTANTS DE PGs OBTENUES

6.1.1 Constructions génétiques obtenues

Les deux catégories de stratégies engagées sur les différentes PGs choisies, soient celles de *Km*, de *Sc* et de *Sp*, nous ont mené à la préparation de plusieurs constructions génétiques et à la préparation de plusieurs mutants. Les différents organismes ont été transformés avec certaines de ces constructions et certains de leurs mutants.⁹⁵ Comme le tableau 4.1, le tableau 6.1 présente un résumé des constructions génétiques préparées⁹⁶ (pas les mutants qui seront présentés à la section suivante). Le tableau 6.1 indique en plus les clones qui ont été testés pour leur activité et leur patron d'expression (la section 6.2 qui suivra présente une analyse de ces résultats en détails).

⁹⁵ Les autres constructions ou les autres clones possibles, n'ont pas été obtenus fautes de temps et non à cause d'impossibilités expérimentales.

⁹⁶ Quelques constructions sont ajoutées dans le tableau 6.1 comparativement au tableau 4.1. Elles sont discutées un peu plus loin dans le texte.

Vecteur	PG	Construction (Séquençage)	Activité (Gélose PGA)	Expression (SDS-PAGE)
pBAD (<i>E. coli</i>)	(gIII) Km	+	Négatif *	non détectable
	(gIII) Km-His	+	Négatif *	non détectable*
	(gIII) Sc	+	Négatif *	-
	(gIII) Sp	+	Négatif *	non détectable
pYES (<i>S. cerevisiae</i>)	Sc	+	+	+
	(Sc) Sc	+	+	+
	(Km) Sc	+	+	+
	(Za) Sc	+	-	-
	Km	+	+	+
	(Km) Km	+	+	+
	(Sc) Km	+	+	+
	(Za) Km	+	-	-
	(Km) Sp	+	+	+
	(Km) Sp - EF	+	+	+
	(Sc) Sp	+	+	-
	(Za) Sp	+	+	+
	(Za) Sp - EF	+	+	+
pGAP (<i>P.pastoris</i>)	Sc	+	+	+
	(Km) Sc	-	-	-
	(Za) Sc	+	-	-
	Km	+	-	-
	(Sc) Km	+	-	-
	(Za) Km	+	-	-
	(Km) Sp	+	-	-
	(Sc) Sp	-	-	-
	(Za) Sp	+	-	-

TABLEAU 6.1 Construction de PGs obtenues. + : Fait et positif, - : Pas fait. La séquence signal est indiquée entre parenthèse. Celle-ci implique la présence du dipeptide EF causé par l'insertion du site EcoRI pour faciliter les clonages entre la séquence signal et la séquence de la protéine mature. Les tests d'activité et d'expression (pour en connaître le patron et le taux approximatif) ont été fait sur les cellules transformées avec les constructions indiquées. * : Pour le test d'activité, une goutte de surnageant a été déposé sur la gélose PGA et incubé à 37°C et 50°C. * : Vérification de l'expression effectuée sur une Western blot avec des anticorps anti-His. -EF : signifie que le site EcoRI situé entre le signal séquence et la protéine mature a été enlevé. Les hôtes transformées par les vecteurs sont entre parenthèses.

Sur ce tableau on constate que la plupart des clonages qui avaient été prévus (voir tableau 4.1) ont été obtenus sauf deux soit pGAP(Sc)Sp et pGAP(Km)Sc, qui n'ont pas été obtenus à cause d'une question de temps et de priorités et non pas à cause de difficultés particulières. De plus, cinq constructions additionnelles (non prévues) ont été préparées soient pBAD(gIII)Km-His, pYES(Sc)Sc, pYES(Km)Km, pYES(Km)Sp-EF et pYES(Za)Sp-EF.

La construction pBAD(gIII)Km-His a été préparée afin de permettre la vérification de l'expression par Western blot. En effet, aucune activité de PG produite dans *Escherichia coli* n'a été détectée sur gélose ni sur SDS-PAGE. Il était donc important de vérifier l'expression par une méthode plus sensible (le Western blot), puisqu'il était possible que la protéine ait été faiblement exprimée tout en n'étant pas active ou en ayant une activité non détectable dans les conditions testées. Tout comme pour les autres constructions de PG dans le vecteur pBAD, les tests de détection et d'expression effectués sur la construction avec une queue histidine se sont avérés négatifs dans les conditions expérimentales essayées. Ces résultats indiquent que les constructions préparées avec le vecteur pBAD ne permettaient tout simplement pas l'expression de la PG dans *Escherichia coli*.

Pour leur part, les constructions pYES(Sc)Sc et pYES (Km)Km, lesquelles ont un site EcoRI d'inséré entre la séquence signal et la protéine mature, ont été préparées pour permettre le clonage des constructions nécessitant une séquence signal provenant d'un hôte différent que celui de la protéine mature. Les clones de levure comportant ces constructions ont de plus été comparés aux clones comportant les vecteurs pYES Sc et pYES Km afin de vérifier que le dipeptide (EF) composé du glutamate (E) et de la phénylalanine (F) n'empêchait pas la sécrétion des PGs et leur activité. Le faible niveau d'expression de la PG de *Sp* produite par les clones comportant les constructions pYES(Sc)Sp, pYES(Km)Sp et pYES(Za)Sp nous a aussi poussé à préparer ces constructions sans le dipeptide codé par le site EcoRI. C'est ainsi que les constructions pYES(Km)Sp-EF et pYES(Za)Sp-EF ont été préparées.⁹⁷ Dans tous les cas vérifiés, la présence du dipeptide EF imposé par le site EcoRI n'influençait pas (de façon

⁹⁷ La construction pYES(Sc)SP-EF n'a pas été préparée faute de temps.

significative) l'activité ni l'expression des PGs. Tous les clones de levure préparés qui ont été vérifiés pour leur activité et leur expression se sont avérés positifs. Il est à noter que pour ce qui est des constructions génétiques préparées pour l'expression dans *Pichia pastoris* (vecteur pGAP), seule la construction pGAP Sc a été intégrée à la levure pour des raisons de temps et de priorités.

6.1.2 Mutants obtenus

Les tableaux 6.2 et 6.3 présentent un résumé semblable à celui du tableau 6.1, mais pour les mutants obtenus. Le tableau 6.2 présente les résultats relatifs aux mutations sur la PG de *Km* et le tableau 6.3 ceux relatifs aux mutations sur la PG de *Sc*. Les mutations stratégiques sur le gène de la PG de *Sp* ont quant à elles été reportées jusqu'à ce que le problème d'expression de cette PG soit réglé.

Les mutations ont été effectuées sur les gènes des PGs de *Km* et de *Sc* contenant leur propre séquence signal et clonés dans le vecteur pYES pour l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae*. Dans les deux cas, la plupart des mutations simples prévues ont été effectuées. Les exceptions sont 1- la mutation (pour les deux PGs) des deux dernières cystéines (C351K/C362YL sur la PG de *Km* et C350K/C361YL sur la PG de *Sc*), laquelle avait pour but d'enlever le dernier pont disulfure et 2- les mutations devant conduire à l'ajout d'un site de glycosylation (soit D319N pour la PG de *Km* et L190S/T, K294S/T pour la PG de *Sc*). Pour ce qui est des combinaisons de mutations, aucune de celles impliquant la mutation sur la position K326 et les mutations dans le but de créer un nouveau pont disulfure aux positions V329 et A334 (numérotation de la PG II d'*Aspergillus niger*) n'a été effectuée. Pour la PG de *Km*, les mutations impliquant des combinaisons de délétions de sites de glycosylation (N189D/Q et N293D/Q) n'ont pas non plus été faites. Ces mutations n'ont pas été effectuées, dans le cadre du présent projet, uniquement pour des raisons de temps et de priorités.

Tous les clones obtenus qui ont été vérifiés pour leur activité et leur expression se sont avérés positifs. Le contraire était peu probable étant donné que les stratégies d'optimisation ont été fondées sur des alignements de séquence de protéines

Mutants de <i>Km</i> (pYES <i>Km</i>)	Construction (Séquençage)	Activité (Gélose PGA)	Expression (SDS-PAGE)
A = Q150M	+	+	+
B = K282D	+	+	+
C = K326T	+	+	+
D = K326Y	+	+	+
E = V329C / A334C	+	+	+
F = C353K / C362YL	-	-	-
Combinaisons			
A + B	+	+	+
A + C	+	+	+
A + D	+	+	+
A + E	+	-	-
B + C	+	+	+
B + D	+	+	+
B + E	+	+	+
C + E	-	-	-
D + E	-	-	-
A + B + C	+	+	+
A + B + D	+	+	+
A + B + E	+	-	-
A + C/D + E	-	-	-
B + C/D + E	-	-	-
A + B + C + E	-	-	-
A + B + D + E	-	-	-
Glycosylation			
N189D	+	+	+
N189Q	+	+	+
N293D	+	+	+
N293Q	+	+	+
N189D N293D	+	-	-
N189D N293Q	+	-	-
N189Q N293D	+	-	-
N189Q N293Q	+	-	-
D319N	-	-	-

TABLEAU 6.2 Mutants de la PG de *Km* produits dans *Saccharomyces cerevisiae*. La numérotation utilisée dans le tableau est celle de la PG II d'*Aspergillus niger*. La numérotation correspondante sur la PG de *Km* est : Q148, K282, K326, V329/A332, C351/C362, N189, N293, D319. + : Fait, - : Pas fait.

Mutants de <i>Sc</i> (pYES <i>Sc</i>)	Construction (Séquençage)	Activité (Gélose PGA)	Expression (SDS-PAGE)
A = Q150M	+	+	+
B = S282D	+	+	+
C = K326T	+	+	+
D = K326Y	+	+	+
E = V329C / A334C	+	+	+
F = C353K / C362YL	-	-	-
Combinaisons			
A + B	+	+	+
A + C	+	+	+
A + D	+	+	+
A + E	+	+	+
B + C	+	+	+
B + D	+	+	+
B + E	+	-	-
C + E	-	-	-
D + E	-	-	-
A + B + C/D	+	+	+
A + B + E	+	-	-
A + C/D + E	-	-	-
B + C/D + E	-	-	-
A + B + C + E	-	-	-
A + B + D + E	-	-	-
Glycosylation			
N319D	+	+	+
N319Q	+	+	+
N331D	+	+	+
N331Q	+	+	+
N319D N331D	+	+	+
N319D N331Q	+	+	+
N319Q N331D	+	+	+
N319Q N331Q	+	+	+
L191S/T	-	-	-
K295S/T	-	-	-

TABLEAU 6.3 Mutants de la PG de *Sc* produits dans *Saccharomyces cerevisiae*. La numérotation utilisée dans le tableau est celle de la PG II d'*Aspergillus niger*. La numérotation correspondante sur la PG de *Sc* est : Q149, S281, K325, V328/A331, C350/C361, N318, N330, L190, K294. + : Fait, - : Pas fait.

homologues et sur les résultats obtenus sur une autre PG soit la PG II d'*Aspergillus niger*. Parmi les clones vérifiés et actifs, on retrouve aussi les PGs dont un des deux sites putatifs de glycosylation (ou les deux dans le cas de la PG de *Sc*) ont été éliminés. Ces résultats, qui indiquent que la glycosylation n'est pas un élément essentiel à l'activité des PGs de *Km* et de *Sc*, sont ainsi en accord avec ceux que Blanco *et al.* ont obtenus en 2002.

Des résultats relatifs à l'identification des clones actifs et à leur expression seront présentés à la section suivante.

6.2 IDENTIFICATION ET EXPRESSION DES CLONES ACTIFS

6.2.1 Détection des clones actifs sur gélose

Les tests de détection d'activité de certains clones sont présentés à titre d'exemple à la figure 6.1.⁹⁸ Tel que stipulé dans la section précédente, tous les clones obtenus qui ont été vérifiés pour leur activité et leur expression se sont avérés positifs. Il est toutefois déjà arrivé qu'une des colonies obtenues suite à la transformation des levures par une construction donne un résultat négatif. Le clone d1 présenté à la figure 6.1 est un exemple de cette situation. Dans ces rares cas le repiquage d'une autre colonie de la même transformation a toujours permis de détecter une activité positive. L'obtention de ces clones négatifs peut s'expliquer de deux façons : soit que la colonie sélectionnée sur la gélose sélective était en fait un contaminant, soit que le vecteur intégré dans la cellule avait subi une délétion d'une section du gène de la PG tout en conservant le gène codant pour l'uracile ce qui lui permettait de survivre sur la gélose sélective.

⁹⁸ Les résultats ne sont pas tous présentés puisque cela n'apportait aucun élément nouveau à la discussion.

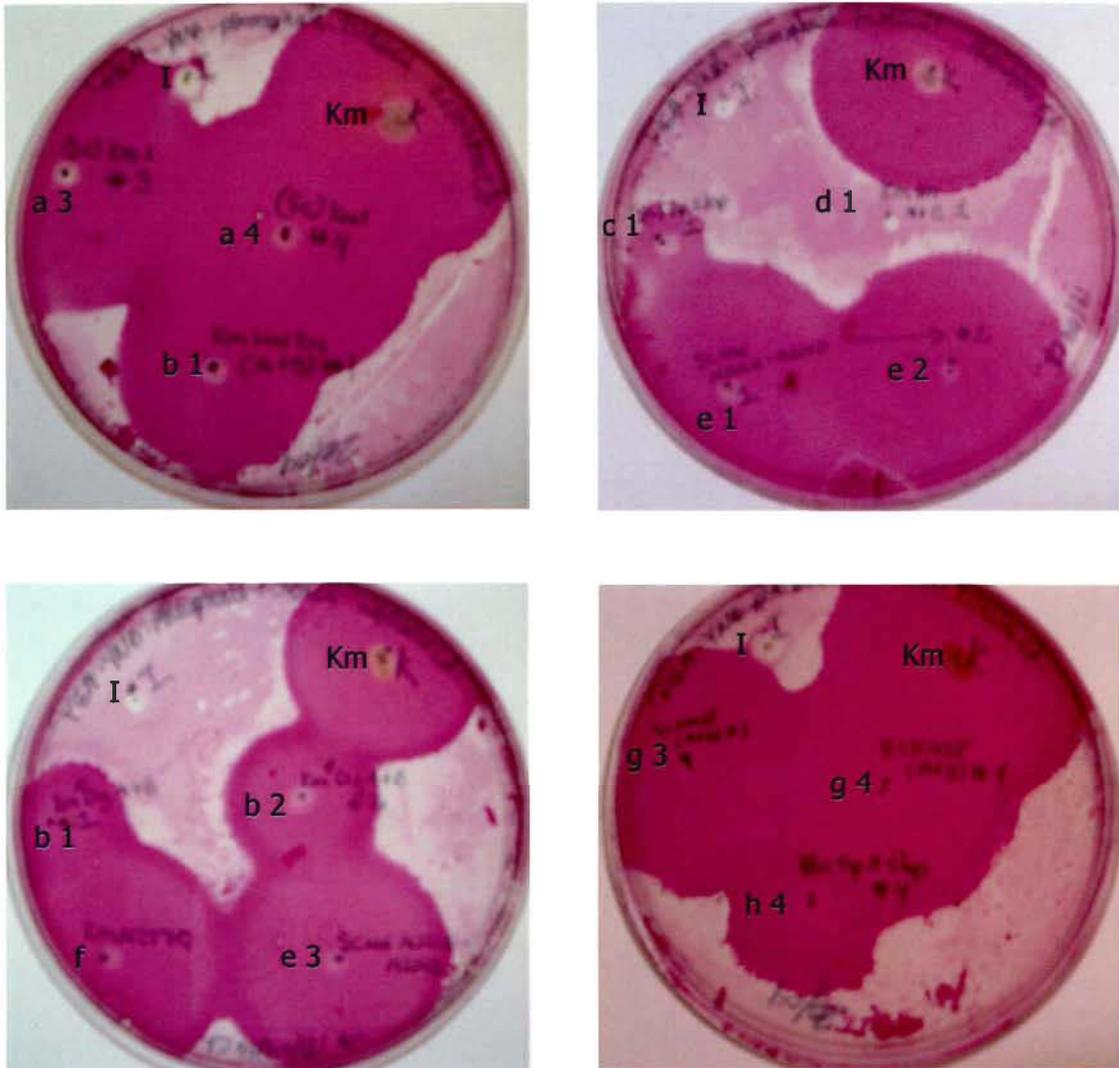


FIGURE 6.1a Détection, sur géloses PGA, de l'activité des PGs produites par certains clones. I : souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* qui ne produit pas de PG (contrôle négatif), Km : *Kluyveromyces marxianus* Y-49 (contrôle positif), a : (Sc)Km, b : Km Q148M+K282D+K326Y⁹⁹, c : (Sc)Sp, d : Km Q148M+V329C/A332C¹⁰⁰, e : Sc N318D+N330D, f : Km N293Q, g : Sc Q149M+S281D+K325T et h : (Z α)Sp. Les chiffres accompagnant les lettres correspondent aux numéros des clones (colonies provenant de la transformation d'une construction).

⁹⁹ Le clone b1 a été inoculé 2 fois.

¹⁰⁰ Le clone numéro 1 du mutant Km Q148M+V329C/A332C (d) est un exemple de clone qui n'a pas montré d'activité lors d'une première vérification sur gélose PGA, mais dont une deuxième colonie s'est avéré positive (résultat non montré).

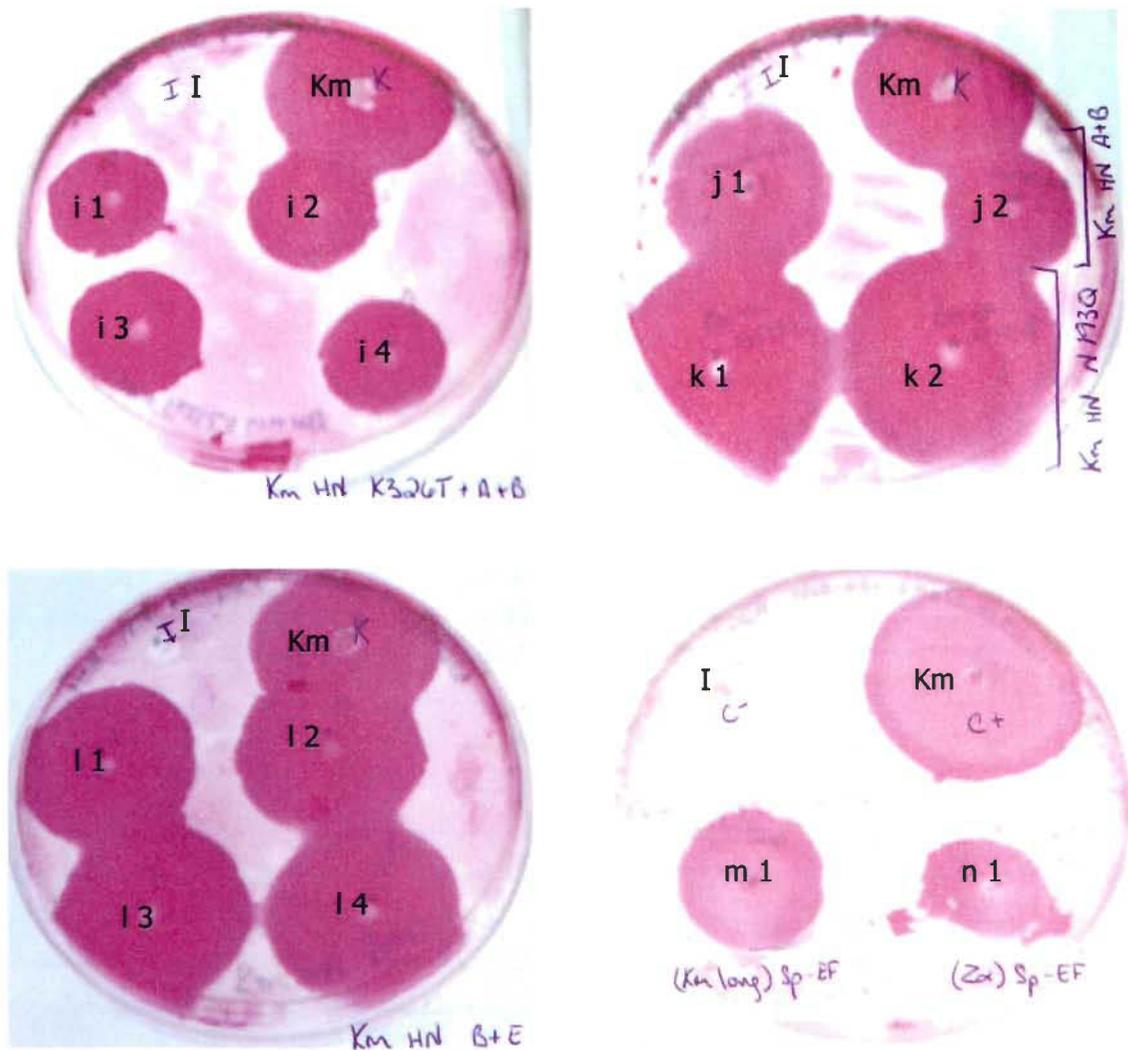


FIGURE 6.1b Détection, sur géloses PGA, de l'activité des PGs produites par certains clones (suite). I : souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* qui ne produit pas de PG (contrôle négatif), Km : *Kluyveromyces marxianus* Y-49 (contrôle positif), i : Km Q148M+K282D+K326T, j : Km Q148M+K282D, k : Km N189Q, l : Km K282D+V329C/A332C, m : (Km)Sp-EF, n : (Zα)Sp-EF. Les chiffres qui accompagnent les lettres correspondent aux numéros des clones (colonies provenant de la transformation d'une construction).

6.2.2 Vérification et étude de l'expression des clones par SDS-PAGE

La figure 6.2 présente des exemples de PGs dont l'expression a été vérifiée sur SDS-PAGE. Sur cette figure, on constate, tel qu'attendu, que les patrons d'expression des mutants des PGs de *Km* et de *Sc* produits dans *Saccharomyces cerevisiae* sont semblables à ceux des PGs sauvages, à l'exception faite des PGs mutées sur un site (ou des sites) putatif(s) de glycosylation. En effet, deux bandes de PGs sont visibles pour les mutants de la PG de *Km* et trois bandes sont visibles pour les mutants de la PG de *Sc*. L'analyse des patrons d'expression des PGs mutées sur un ou des sites de glycosylation est présentée dans les sections suivantes.

6.2.3 Glycosylation de la PG de *Km* produite dans *Saccharomyces cerevisiae*

La figure 6.3 présente les patrons d'expression de la PG de *Km*, de sa forme déglycosylée à l'endo-H et de ses mutants de glycosylation produits dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*. En analysant ces patrons d'expression on constate que la PG de *Km* produite dans *Saccharomyces cerevisiae* n'est glycosylée que sur le site N189. En effet, les puits 6 et 7 correspondants aux mutants N293D et N293Q ont le même patron que le puit 3 correspondant à la PG de *Km* sauvage. Ainsi, malgré le fait qu'elle se trouve à l'intérieur de la séquence consensus d'un site de glycosylation, les patrons d'expression des mutants N293D et N293Q démontrent que l'asparagine située à la position 293 n'est pas glycosylée lorsque la PG de *Km* est produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour ce qui est de la glycosylation à la position 189, les patrons d'expression des puits 4 et 5 correspondants aux mutants N189D et N189Q démontrent bel et bien que l'asparagine à la position 189 est normalement glycosylée lorsque l'enzyme est produite dans *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, une seule bande de PG est visible sur le gel pour ces mutants et cette bande a sensiblement la même hauteur que la bande obtenue pour la PG de *Km* déglycosylée à l'endo-H (puits 2), soit de 38 kDa. Les deux bandes de PGs retrouvées dans le surnageant de culture de la PG de *Km* correspondraient donc à la PG non-glycosylée, soit la bande de 38 kDa, et à la PG glycosylée à la position 189, soit la bande à 43kDa. La glycosylation à la position 189 serait donc composée

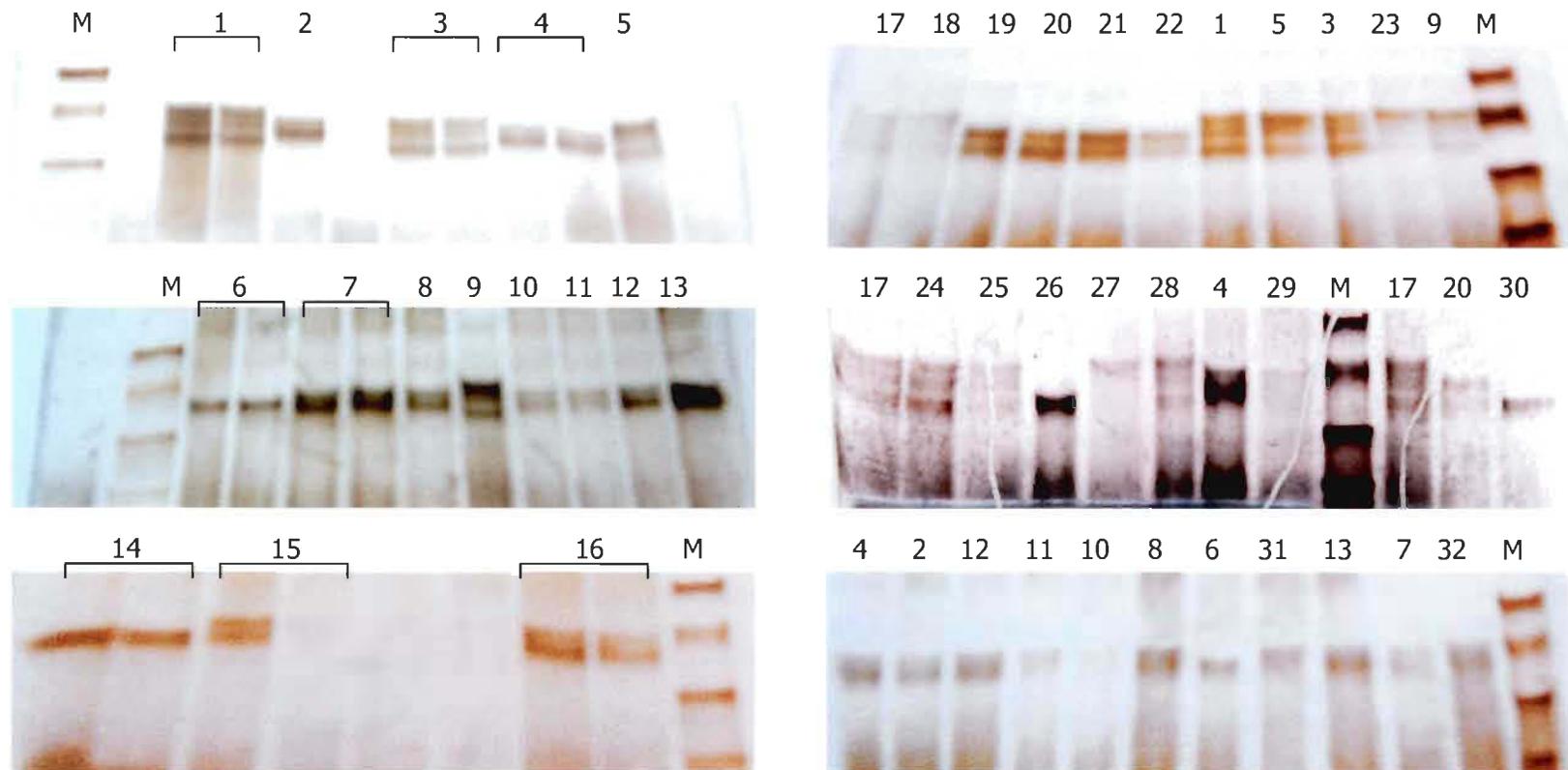


FIGURE 6.2 Vérification, sur SDS-PAGE, de l'expression des PGs produites par certains clones.

1 : Sc S281D, 2 : Km K282D, 3 : Sc K325Y, 4 : Km, 5 : Sc K325T, 6 : Km N189D, 7 : Km K326Y, 8 : Km Q148M, 9 : Sc S281K+K325T, 10 : Km K282D+K326T, 11 : Km Q148M+K326T, 12 : Km K326T, 13 : Km V329C/A332C, 14 : Km N189Q, 15 : Km M148Q+K282D, 16 : Km K282D+V329C/A332C, 17 : Sc, 18 : Sc Q149M, 19 : Sc N318D, 20 : Sc N318Q, 21 : Sc N330D, 22 : Sc N330Q, 23 : Sc Q149M+K325T, 24 : Sc S281K+K325Y, 25 : Sc Q149M+ S281K+K325T, 26 : Sc N318D+N330D, 27 : Sc Q149M+ S281K+K325T, 28 : Sc Q149M+ S281K, 29 : Km M148Q+K282D+K326Y, 30 : Sc N318Q+N330Q, 31 : Km Q148M+K326Y, 32 : Km N293Q. M : Marqueur LMW protein standard de Biorad. Tous les clones présentés sont les clones 1 ou 1 et 2.

d'approximativement 28 mannoses ce qui est probable pour une glycosylation dans *Saccharomyces cerevisiae* (Bretthauer et Castellino 1999).¹⁰¹ Dans la littérature portant sur l'expression des PGs de différentes souches de *Kluyveromyces marxianus*, de 1 à 4 glycozymes de PG ont été rapportées selon la souche. Pour ce qui est des poids moléculaires rapportés, ils varient de 34,7kDa à 49,6kDa (Barnby *et al.* 1990; Sakai *et al.* 1984; Schwan *et al.* 1997; Serrat *et al.* 2002; Siekstele *et al.* 1999). Les patrons d'expression que nous avons obtenus sont donc cohérents avec ceux qui ont déjà été rapportés dans la littérature.

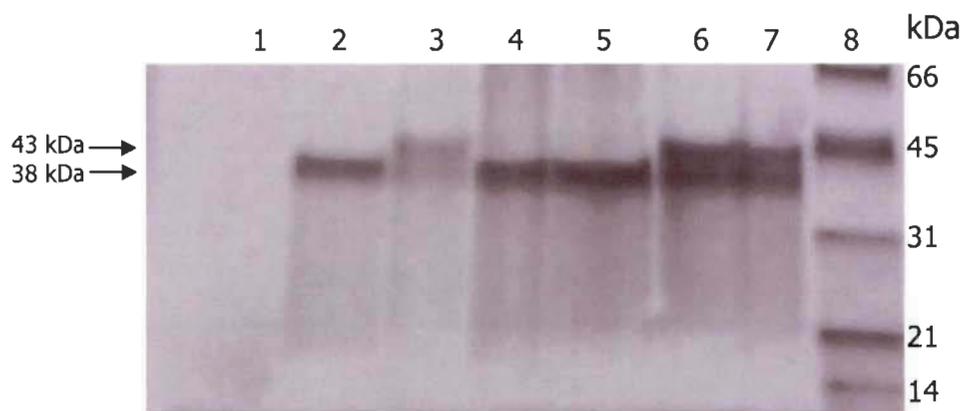


FIGURE 6.3 Analyse SDS-PAGE de la glycosylation de la PG de *Km* produite dans *Saccharomyces cerevisiae* et de ses mutants N189D/Q et N293D/Q.

Puit 1: Surnageant de la souche INVSc non transformée, puits 2 à 7 : Surnageants de la souche INVSc transformée avec la PG de *Km*. Puit 2 : PG de *Km* deglycosylée avec l'endo H, puit 3 : PG de *Km*, puit 4 : mutant N189D, puit 5 : mutant N189Q, puit 6 : mutant N293D et puit 7 : mutant N293Q. Le poids moléculaire approximatif des protéines est indiqué à gauche. Le marqueur utilisé est le LMW protein standard de Bio-Rad, puit 8.

¹⁰¹Une glycosylation de 5kDa pourrait être expliquée comme suit : 1,72 kDa pour les deux molécules de N-acétylglucosamine et les 8 premiers mannoses et 162Da pour chaque mannose additionnel, donc $((5000-1720)/162=20,2\text{mannoses} + \text{les 8 premiers mannoses} = \sim 28 \text{ mannoses}$.

6.2.4 Glycosylation de la PG de *Sc* produite dans *Saccharomyces cerevisiae*

La figure 6.4 présente les patrons d'expression de la PG de *Sc*, de sa forme déglycosylée à l'endo-H et de ses mutants de glycosylation produits dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae*. La comparaison du patron d'expression de la PG de *Sc* (puit 3) et de sa forme déglycosylée à l'endo-H (puit 2) révèle que la plus petite des trois bandes de PG obtenue, soit celle à 37kDa n'est pas glycosylée. En effet, son poids correspond à celui de la PG déglycosylée. Les deux plus hautes bandes de la PG de *Sc*, soit la bande à 41kDa et la bande à 45kDa correspondent quant à elles à des glycozymes de la PG contenant respectivement une ou deux glycosylations. En effet, lorsqu'un ou l'autre des deux sites possibles de glycosylation est enlevé (voir les patrons d'expression des mutants dans les puits 4 à 7), la plus haute bande de PG disparaît, et les deux bandes restantes sont du même poids que les deux plus petites formes de la PG non-mutée. De plus, lorsque les deux sites possibles de glycosylation sont mutés (voir les patrons d'expression des mutants dans les puits 8 à 11), les deux bandes du haut disparaissent laissant derrière elles une seule bande dont la hauteur sur le gel SDS correspond à celle de la forme de PG déglycosylée à l'endo-H. Ces résultats indiquent donc que les deux sites putatifs de glycosylation sont tous deux glycosylés. En outre, les oligosaccharides se trouvant sur ces sites seraient similaires puisque la différence apparente de poids moléculaire entre la PG non-glycosylée et la glycozyme contenant deux mutations, soit 8kDa, est le double de la différence de poids moléculaire entre la PG non-glycosylée et la glycozyme contenant une seule mutation, soit 4kDa. Chaque glycosylation pourrait donc contenir environ 22 mannoses.¹⁰² À notre connaissance, c'est la première fois qu'une PG de *Saccharomyces cerevisiae* est rapportée comme étant exprimée en trois glycoformes. En effet, dans les publications scientifiques où il est question de l'expression de la PG de *Saccharomyces cerevisiae*, une seule forme de PG est retrouvée (1 seule bande de PG est visible sur gel SDS) et ce peu importe la souche (Blanco *et al.* 1994; Gainvors *et al.* 2000; Hirose *et al.* 1999). Pour ce qui est du poids moléculaire de ces PGs exprimées sous une seule forme, il se

¹⁰² 4kDa moins 1,72 kDa pour les deux molécules de N-acétylglucosamine et les 8 premiers mannoses et 162Da pour chaque mannose additionnel, donc $((4000-1720)/162=14$ mannoses + les 8 premiers mannoses = ~22 mannoses.

situe entre 39kDa et 45kDa. Ces poids moléculaires peuvent facilement correspondre à des formes glycosylées de la PG de 37kDa obtenue dans notre étude.

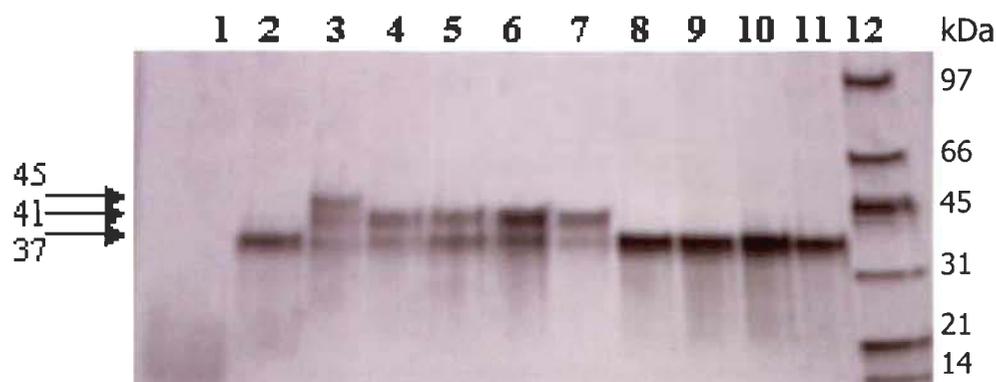


FIGURE 6.4 Analyse SDS-PAGE de la glycosylation de la PG de *Sc* produite dans *Saccharomyces cerevisiae* et de ses mutants N318D/Q et N330D/Q.

Puit 1: Surnageant de la souche INVSc non transformée, puits 2 à 11 : Surnageants de la souche INVSc transformée avec la PG de *Km*. Puit 2 : PG de *Sc* deglycosylée avec l'endo H, puit 3 : PG de *Sc*, puit 4 : mutant N318D, puit 5 : mutant N318Q, puit 6 : mutant N330D et puit 7 : mutant N330Q, puit 8 : mutant N318D-N330D, puit 9 : mutant N318D-N330Q, puit 10 : mutant N318Q-N330D, puit 11 : mutant N318Q-N330Q et puit 12 : marqueur LMW protein standard de Bio-Rad. Le poids moléculaire approximatif des protéines est indiqué à gauche. (Figure aussi retrouvée dans l'article présenté à l'annexe VI).

6.3 CRIBLAGE DES CLONES

6.3.1 Criblage de l'activité des clones dans le tampon et dans la pâte

Deux méthodes de criblage de l'activité des clones de PG ont été développées au cours de ce projet. La première méthode implique le criblage de l'activité des clones dans le tampon et la deuxième méthode implique le criblage de l'activité des clones directement dans la pâte. Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients et le choix de l'une ou de l'autre dépend principalement des critères de sélection souhaités et du nombre de mutants à cribler. Dans le chapitre IV (figures 4.19, 4.20 et 4.28 et section 4.9.1), il a été possible de constater que les conditions de pH et de température dans lesquelles la PG est active sont sensiblement les mêmes dans le tampon et dans la pâte, c'est pourquoi le criblage dans le tampon comme un modèle simplifié de la pâte est possible. Néanmoins, la stabilité de la PG est plus affectée dans la pâte que dans le tampon. La PG de *Sc*, par exemple, est complètement inactivée après 2½ minutes d'action à 50°C et pH 5,0 dans la pâte tandis que son activité dans ces conditions perdure plus de 12 minutes dans le tampon (voir figures 4.28 et 4.22). Ainsi, si on veut s'assurer que le criblage des mutants prenne en considération leur activité sur une période représentative de leur utilisation et dans les conditions du procédé industriel, il doit être fait directement dans la pâte. Pour ce qui est des différences dans la vitesse de criblage, la méthode dans le tampon surpasse la méthode dans la pâte. En effet, pour comparer en triplicata l'activité de 128 clones dans une seule condition, le criblage dans le tampon nécessite 8 heures de travail¹⁰³ qui sont principalement effectuées par le robot, tandis que le criblage du même nombre de mutants dans la pâte nécessite plus de 30 heures de travail¹⁰⁴ dont la plupart sont effectuées par un technicien. Ainsi, si un très grand nombre de mutants doit être analysé, le criblage dans le tampon serait probablement le plus approprié. Au besoin, le criblage dans la pâte pourra être effectué en deuxième tour avec les clones qui semblent les plus intéressants. Ceci étant dit, dans le cadre du présent projet, le criblage des mutants a été effectué directement dans la pâte dès le début puisque leur nombre était limité.

¹⁰³ Incluant l'analyse des données brutes.

¹⁰⁴ *Idem*

6.3.2 Méthode automatisée pour le traitement enzymatique de la pâte en vue du criblage de 4 ou 40 clones

Le criblage des mutants dans la pâte se fait en deux étapes. La première étape est le traitement enzymatique de la pâte et la deuxième étape est le test de demande cationique qui permet d'évaluer le résultat du traitement enzymatique sur la pâte. Le traitement de la pâte a été mis au point de manière à permettre aux PGs testées de montrer leurs capacités sur un minimum de 15 minutes, soit la durée estimée de l'étape où la pâte est préparée avant l'ajout des agents de rétention en vue de sa mise en feuille. Ainsi, le pouvoir enzymatique des mutants dans la pâte, et non seulement leur activité, est mesurée. Cette méthode ne renseigne toutefois pas sur la stabilité des mutants puisqu'elle ne permet pas de vérifier l'évolution de la réaction enzymatique dans le temps.

Tel que spécifié à la section 3.8.7.1 du chapitre III portant sur le matériel et les méthodes, cette méthode permet de cribler 40 clones en duplicata pour 1 combinaison de conditions (pH et température) à la fois ou 4 clones pour 8 conditions à la fois (8 pH et 1 température). Les résultats qui seront présentés un peu plus loin ont été obtenus à l'aide de cette méthode et 4 clones ont été analysés à la fois. Pour étudier l'activité de 4 clones en duplicata sur 8 pH et 4 températures, 4 traitements enzymatiques de la pâte (pour les quatre températures étudiées) et 448 tests de demande cationique (incluant les blancs et les contrôles) doivent être effectués.

6.3.3 Méthode automatisée pour le traitement enzymatique de la pâte en vue de tester la stabilité des mutants dans la pâte

Cette méthode a été développée pour permettre une caractérisation plus poussée des mutants intéressants. En plus de donner les informations fournies par la méthode de criblage de 4 ou 40 clones, elle renseigne sur la stabilité des mutants dans le temps. Cependant, elle prend 5 fois plus de temps que cette dernière. Le dosage préliminaire du PGA dans la pâte (voir section 3.6.2.5) a été basé sur cette méthode. De plus, cette méthode a été utilisée pour caractériser la PG de *Sc* dont les résultats ont déjà été présentés à la section 4.9. Malgré le fait qu'elle puisse être utilisée pour le criblage, cette méthode n'a pas été utilisée à cette fin dans le présent projet.

6.3.4 Comparaison de l'activité des mutants sur la pâte

Une fois la méthode de criblage déterminée, il reste à décider sur quelle base les mutants seront comparés. Cette décision ne va pas de soi, car il existe plusieurs bases sur lesquelles les enzymes peuvent être comparées et chacune d'elle possède ses avantages et ses inconvénients. Nous discuterons ici des quatre manières que nous avons envisagées pour comparer les mutants, soient : 1- sur la base de la quantité de protéines totales, 2- sur la base de la quantité de PG, 3- sur la base de l'activité à une condition donnée et 4- directement à partir du surnageant.

6.3.4.1 Comparaison des mutants sur la base uniformisée de la quantité de protéines totales

La comparaison des mutants sur la base uniformisée de la quantité de protéines totales nécessite un dosage des protéines totales présentes dans le surnageant de culture cellulaire des clones de levures et une dilution pour mettre tous les mutants sur la même base. Préalablement, les protéines du surnageant doivent toutefois être resuspendues dans un tampon puisque les sucres et les acides aminés présents dans le milieu de culture interfèrent avec les protéines dans les tests de quantification (Bradford 1976; Smith *et al.* 1985). Cette manière de comparer les mutants contient toutefois une faille importante. En effet, le taux d'expression de la PG peut varier d'un clone de levure à un autre comparativement aux autres protéines du milieu. En basant la comparaison des mutants sur les protéines totales, on peut passer à côté d'un mutant qui est moins exprimé, mais qui pourrait présenter une plage d'activité ou une stabilité plus intéressante que les autres. La meilleure façon de résoudre ce problème, est de comparer les mutants sur la base uniformisée de la quantité de PGs (en mg). La section suivante présente cette méthode de comparaison.

6.3.4.2 Comparaison des mutants sur la base uniformisée de la quantité de PG dosée sur SDS-PAGE

Pour comparer les clones sur la base uniformisée de la quantité de PG, il faut être en mesure de pouvoir quantifier les PGs dans le surnageant. La meilleure manière serait de purifier les PGs des autres protéines du surnageant en utilisant des méthodes de chromatographie. Cependant, il n'est pas logique de procéder de la sorte dans un contexte de criblage de mutants puisque que la purification d'une protéine de la sorte est coûteuse et demande beaucoup de temps. Il existe deux manières alternatives pour quantifier les PGs : la première manière est d'estimer sa pureté sur gel SDS et de comparer cette dernière à la quantité de protéines totales; la deuxième, est de comparer l'intensité de la bande de PG sur gel (de quantité inconnue) à une autre bande de PG dont le dosage a déjà été fait (quantité connue). Cette méthode de comparaison a été utilisée pour comparer quelques-uns des mutants (les résultats sont présentés à la section 6.3.5). Au cours de nos expérimentations, nous avons noté trois aspects négatifs concernant cette méthode de comparaison. Premièrement, pour que tous les clones soient uniformisés de la même façon, la quantité de PGs doit être estimée toujours par le même technicien. Deuxièmement, la comparaison des mutants sur la base de la quantité de PG dosée par SDS-PAGE nécessite beaucoup de matériel (gels)¹⁰⁵ et de temps (temps de migration et d'estimation). Finalement, cette méthode de comparaison ne tient pas compte de l'activité par mg, ni de la quantité de protéine exprimées dans le surnageant. Ainsi, dans le cas où la quantité de protéines utilisées pour la comparaison des mutants ne serait pas suffisante pour que l'activité d'un des mutants soit détectée (à cause d'une faible activité par mg), ce mutant pourrait être exclu. Dans la plupart des cas, cette exclusion serait probablement correcte. Par contre, dans le cas où ce mutant (de faible activité) présenterait une plage d'activité intéressante tout en étant exprimé en grande quantité dans le surnageant, on viendrait de passer à côté d'une belle opportunité. Pour contrer cet inconvénient de la méthode de comparaison des mutants sur la base de la quantité de PG, la méthode de comparaison sur la base de l'activité à une condition donnée peut être utilisée. Cette méthode est discutée à la section suivante.

¹⁰⁵ Un gel de 10 puits permet d'estimer la quantité de PG pour 7 clones, trois puits étant utilisés pour différentes concentrations de la PG contrôle.

6.3.4.3 Comparaison des mutants sur la base uniformisée de l'activité à 50°C, pH 5,0

L'utilisation de l'activité uniformisée à une combinaison de conditions donnée est probablement la meilleure méthode pour comparer les mutants de la PG. Dans cette méthode, l'activité des mutants (purifiés par ultrafiltration ou dialysés) doit premièrement être dosée (avec, par exemple le programme de dosage initial de l'activité enzymatique), puis les solutions d'enzymes doivent ensuite être diluées de manière à ce que l'activité par mL de tous les mutants soit semblable pour une combinaison de conditions (pH et température) donnée. Dans le cadre de notre projet, la combinaison de conditions la plus appropriée est à 50°C et pH 5,0, soit les mêmes conditions que pour le dosage initial de l'activité. L'activité des mutants est ainsi comparée sur une même base et de plus, il est moins probable qu'un mutant avec une plage d'activité intéressante soit exclu. Pour vérifier le potentiel réel des mutants, soit le nombre d'unités enzymatique par mL de surnageant, il suffit par la suite de multiplier l'activité enzymatique (en U/mL) par le facteur de dilution utilisé. Pour connaître l'activité par mg, il suffit de diviser l'activité par mL de surnageant par la quantité de mg dans ce même volume. Cette méthode sera celle préconisée à l'avenir pour le criblage des clones sur la pâte.

6.3.4.4 Comparaison des mutants sur la base uniformisée du volume de surnageant

La comparaison des mutants sur la base uniformisée du volume de surnageant (ou d'une dilution) est probablement la méthode la plus simple. Elle implique l'utilisation directe du surnageant pour traiter la pâte. Néanmoins, elle présente l'inconvénient majeur que la quantité d'enzyme utilisée pour le traitement n'est pas contrôlée. Ainsi, sur deux mutants qui donnent des résultats similaires dans la pâte, l'un peut être très actif sur une base d'activité en mg mais peu exprimé et l'autre peut à l'inverse être peu actif, mais exprimé en grande quantité. Deux mutants peuvent aussi donner des résultats semblables dans le cas où l'un est plus actif que l'autre, mais moins stable, et inversement pour le second. Finalement, des résultats similaires obtenus avec deux mutants aux activités différentes peuvent aussi s'expliquer dans le cas où le traitement maximal de la pâte est atteint. Cela est possible si, pour les deux mutants, la quantité

de PG présente dans le volume de surnageant utilisé est plus grande que le besoin réel. Il est ainsi impossible de savoir lequel des deux mutants est le plus actif. Dans cette dernière situation, par contre, le traitement peut être refait avec une plus grande dilution de surnageant pour essayer de déterminer le meilleur des mutants. Cette méthode de comparaison serait celle à employer si le but recherché était d'optimiser la production d'une enzyme. Dans ce cas, un seul variant de la PG serait utilisé et produit de différentes manières et le criblage aurait pour but de trouver la méthode de production donnant le meilleur rendement. Étant donné que le but de cette thèse est est d'optimiser l'activité et non d'optimiser la production en tant que tel, cette méthode n'a pas été utilisée.

6.3.5 Caractérisation de quelques mutants de *Sc* produits dans *Saccharomyces cerevisiae* (sur la base uniformisée de la quantité de PG dosée sur SDS-PAGE)

La figure 6.5 présente les plages d'activité de la PG de *Sc* produite dans la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* et de sept de ses mutants. La comparaison des variants de PG pour le criblage a été effectuée sur la base uniformisée de la quantité de PG en mg. Ainsi, tous les mutants ont été préparés de manière à ce que leur quantité de PG par mL (visualisée sur SDS-PAGE) soit semblable à celle de la PG sauvage. Sur cette figure, deux mutants semblent plus performants sur la pâte que la PG de *Sc* (graphique A) soient le mutant S282D et le mutant N318D (graphiques C et E, respectivement). En effet, la réduction de la demande cationique occasionnée par ces mutants est plus importante dans certaines conditions et leurs plages d'activité sont plus étendues que la PG sauvage de *Sc*, allant jusqu'à un pH de 5,6 et une température de 60°C là où la PG de *Sc* va jusqu'à 5,4 et 56°C. Pour ce qui est des mutations ayant eu un impact négatif sur l'activité de la PG de *Sc* dans la pâte, les mutations Q149M, K325T, N330D et N330Q (graphiques B, D, G et H) sont celles qui ont été mises en évidence avec les résultats de cette étude, la mutation K325T étant celle ayant le plus affecté le pouvoir de la PG de *Sc*.

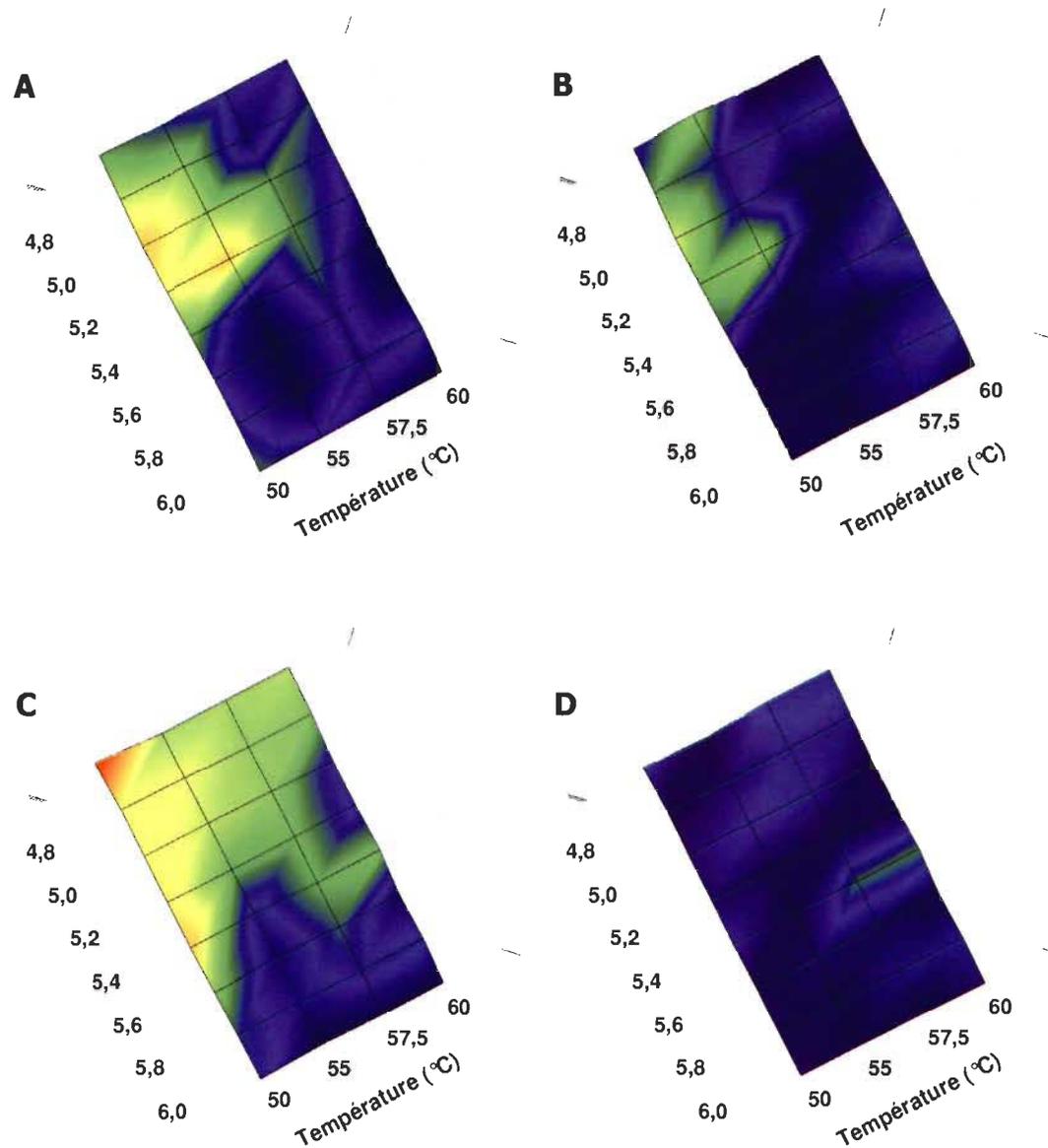


FIGURE 6.5a Plage d'activité de mutants de la PG de *Sc* sur la pâte TMP blanchie. La pâte a été traitée pendant 15 minutes avec du surnageant de culture dilué de manière à ce que la quantité de PGs des mutants visualisée sur SDS-PAGE se rapproche de celle de la PG de *Sc* laquelle donne $\sim 75\text{U/L}$ de pâte. PG de *Sc* (A), de Sc Q149M (B), de Sc S282D (C) et de Sc K325T (D). L'activité de la PG est présentée en pourcentage de réduction de la demande cationique de la pâte selon l'échelle de couleurs ci-jointe.

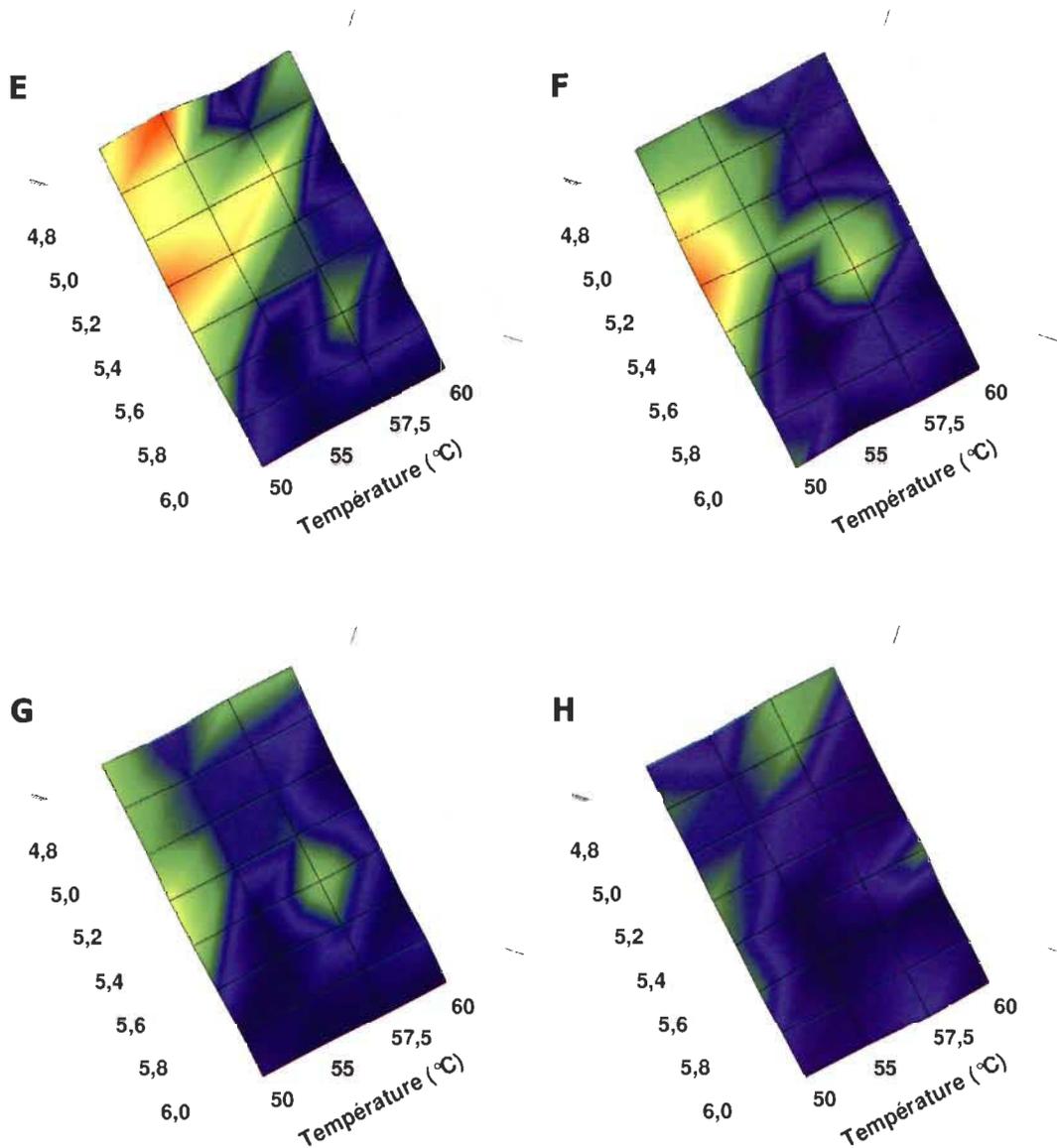
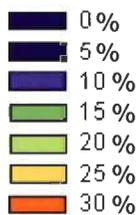


FIGURE 6.5b Plage d'activité de mutants de la PG de *Sc* sur la pâte TMP blanchie (suite). La pâte a été traitée pendant 15 minutes avec du surnageant de culture dilué de manière à ce que la quantité de PGs des mutants visualisée sur SDS-PAGE se rapproche de celle de la PG de *Sc* laquelle donne ~75U/L de pâte. Mutants *Sc* N318D (E), *Sc* N318Q (F), *Sc* N330D (G) et *Sc* N330Q (H). L'activité de la PG est présentée en pourcentage de réduction de la demande cationique de la pâte selon l'échelle de couleurs ci-jointe.



6.3.5.1 Mutants Q149M, S282D et K325T

Même si les mutations Q149M et S282D avaient le même objectif, soit celui d'améliorer l'activité de la PG de *Sc*, seule la mutation S282D a eu l'effet escompté. En effet, le résultat obtenu par cette mutation va dans le même sens que celui prédit par l'hypothèse voulant que l'inverse d'une mutation néfaste pour la PG II d'*Aspergillus niger* (Q149M pour la PG de *Sc* au lieu de M150Q pour la PG II) serait favorable à la PG de *Sc* (voir la figure 5.1 page 139 et le tableau 5.1 page 140). Pour ce qui est de l'impact négatif que la mutation Q149M a eu sur l'activité de la PG de *Sc*, il s'explique peut être par la différence d'environnement dans la PG II d'*Aspergillus niger* et la PG de *Sc*. Par exemple, la PG de *Sc* est la seule des quatre PGs alignées à la figure 5.1 (qui inclut la PG II d'*Aspergillus niger*, et les PGs de *Km* et de *Sp*) qui a un résidu d'histidine (polaire et probablement chargé à pH 5,0) directement à côté de la position Q149 (se référer à la position 150 sur la figure 5.1 de la page 139 du présent travail). La caractérisation d'un clone de la PG de *Km* portant cette même mutation nous permettra de comprendre pourquoi cette mutation a été néfaste dans la PG de *Sc*. En effet, à cette position la PG de *Km* a un voisinage se rapprochant de celui de la PG II d'*Aspergillus niger*.

Pour la mutation K325T, le résidu thréonine a été choisi puisqu'il est présent dans la PG de *Sp* laquelle est plus résistante à la chaleur que les autres (Miyairi *et al.* 1985, 1997). L'effet néfaste de cette mutation pourrait s'expliquer par des différences d'environnements entre la PG de *Sc* et la PG de *Sp*. Par exemple, en position 327, on retrouve une leucine (hydrophobe) dans la PG de *Sc* tandis que dans la PG de *Sp* on y retrouve un glutamate (chargé négativement) à la position équivalente. De plus, dans la PG de *Sp*, le résidu glutamate est suivi d'un résidu cystéine lequel est impliqué dans un pont disulfure. Or, la PG de *Sc* ne possède pas de pont disulfure à cet endroit. Ces différences structurales pourraient donc expliquer le résultat de la mutation en défaveur de la thréonine dans la PG de *Sc*. Pour vérifier ces allégations, la caractérisation d'un clone de la PG de *Sc* portant la mutation K325T ainsi que les mutations permettant l'ajout d'un pont disulfure à cet endroit (V329C et A334C) pourrait être envisagée.

6.3.5.2 Mutants N318D/Q et N330D/Q

La caractérisation des mutants N318D/Q et N330D/Q de la PG de *Sc* dans la pâte (aidée de la caractérisation de leur activité dans le tampon¹⁰⁶) a permis d'émettre des hypothèses intéressantes quant au rôle de ces deux glycosylations sur l'activité et la stabilité de la PG de *Sc*. Ainsi, l'analyse des résultats de caractérisation de ces mutants nous porte à croire que la glycosylation de l'asparagine à la position 318 n'est pas nécessaire à la stabilité de la PG tandis que la glycosylation de l'asparagine à la position 330 pourrait l'être dans certains environnements déstabilisants. La caractérisation de l'activité de ces mutants a aussi permis de conclure, tout comme les travaux de Blanco *et al.* (1994) que les glycosylations ne sont pas essentielles à l'activité de cette PG. L'hypothèse voulant que la glycosylation à la position 318 n'est pas nécessaire à l'activité ni à la stabilité de la PG de *Sc* est fondée sur le fait que ni le mutant N318D, ni le mutant N318Q (graphiques E et F sur la figure 6.5b) ne présente une diminution d'activité significative comparativement à la PG sauvage de *Sc* (graphique A sur la figure 6.5a). Dans le cas du mutant N318D, c'est même le contraire. En plus de prouver que la glycosylation n'est pas nécessaire à l'activité et la stabilité de l'enzyme, la caractérisation de ces mutants démontre que l'asparagine à cette position 318 (même non-glycosylée) n'est pas nécessaire à l'activité de la PG de *Sc*. Parmi les deux remplacements effectués pour cette asparagine, le remplacement par l'aspartate est celui qui a été le plus favorable. Ce résultat n'est pas surprenant puisque c'est ce résidu qui est retrouvé à la place du résidu asparagine dans les autres PGs alignées (voir la figure 5.1 à la page 139). Pour ce qui est de la glycosylation à la position 330, l'hypothèse voulant que cette glycosylation contribue à la stabilité de la PG de *Sc* repose sur la différence de comportement des mutants N330D et N330Q dans le tampon par rapport à dans la pâte. En effet, dans le tampon, ces deux mutants conservent la même activité (voir l'article à l'annexe VI) tandis que dans la pâte, un environnement plus complexe et agressant, ces mutants démontrent en fait très peu d'activité comparativement à la PG sauvage de *Sc* (voir figure 6.5). La faible diminution de demande cationique de la pâte occasionnée par ces mutants peut s'expliquer par le fait que cet environnement affecte rapidement l'enzyme de manière à ce qu'elle n'ait

¹⁰⁶ Ces résultats sont décrits dans l'article présenté à l'annexe VI.

pas le temps d'agir. Ce qui pourrait expliquer pourquoi les mutants N330D et N330Q démontrent une activité dans le tampon, un environnement relativement doux, et qu'ils sont peu actifs dans la pâte, un environnement plus stressant. Ainsi, la glycosylation à la position 330 ne semble pas être essentielle à son activité, mais semble avoir un effet stabilisateur sur le pliage de la PG de *Sc* ce qui la protège contre les environnements nocifs. La présence d'un pont disulfure retrouvé au même endroit (C329 et C334) sur la structure des PGs d'*Aspergillus niger* et de *Sp* (voir les figures 1.12 et 5.1 pages 23 et 139) permet d'appuyer cette hypothèse. En effet, ce pont disulfure sert sûrement à solidifier la structure de ces PGs à cet emplacement, ralentissant ainsi le processus de dénaturation dans les environnements stressants. Dans la PG de *Sc* où ce pont disulfure est absent, son rôle stabilisateur serait comblé par la glycosylation de l'asparagine.

Le cas des mutants de glycosylation N318D, N318Q, N330D et N330Q permet de comprendre que les résultats de caractérisation des PGs obtenus dans le tampon ne sont pas nécessairement représentatifs des résultats de caractérisation qui seront obtenus dans la pâte. Ainsi rien ne dit que les meilleurs mutants dans le tampon seront aussi très actifs dans la pâte. C'est pourquoi la caractérisation des mutants doit être effectuée dans un environnement qui se rapproche le plus possible de celui dans lequel ils seront utilisés, dans le cas actuel, il s'agit de la pâte.

La différence qui est observée entre l'action des mutants par rapport à la PG sauvage dans la pâte et l'action des mutants par rapport à la PG sauvage dans le tampon s'explique par le fait que les deux tests de caractérisation, en plus d'être effectués dans des environnements différents, ne mesurent pas la même chose. En effet, les traitements enzymatiques sur la pâte, lesquels sont effectués sur une période de 15 minutes, prennent en considération la stabilité de l'enzyme, ce qui n'est pas le cas pour les tests d'activité dans le tampon. Ainsi, en plus des hypothèses qui ont été discutées plus haut, les différences entre les résultats de caractérisation obtenus au cours du présent travail et ceux obtenus par l'équipe de Jacques Benen et Jaap Visser (donc ceux attendus) pourraient s'expliquer par le fait que les stratégies d'optimisation de la PG ont été fondées principalement sur l'activité spécifique des mutants de la PG II

d'*Aspergillus niger* dans le tampon (à l'exception des stratégies reliées à la glycosylation et aux ponts disulfures). De plus, les méthodes de caractérisation employées étaient très différentes. C'est pourquoi il sera impossible de savoir si les mutations sur la PG de *Sc* (et de *Km*) ont eu des effets comparables aux mêmes mutations effectuées sur la PG II d'*Aspergillus niger* tant que les mutants ne seront pas caractérisés dans le tampon et dans les conditions utilisées par l'équipe de Benen et Visser.

Note importante : L'étude d'expression en lien avec les différentes constructions génétiques présentées au tableau 6.1 n'a pas été poursuivie au cours de cette thèse pour une raison de priorité chez AgroTerra Biotech, le partenaire de ce projet de type industriel.

CHAPITRE VII

CONCLUSION

7.1 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS ET RETOUR SUR LE CONTEXTE DE TRAVAIL

Les objectifs de mon projet étaient les suivants : d'abord choisir une PG ayant une activité mesurable dans les conditions du procédé de fabrication du papier. Je devais en deuxième lieu développer un système d'expression de la PG choisie afin de la produire en quantité et en pureté suffisante pour sa caractérisation et pour des essais sur des échantillons de pâtes et cela en tenant compte des impératifs associés à la production industrielle. Troisièmement, je devais mettre au point des tests de détection et de mesure de l'activité enzymatique compatibles avec le besoin d'efficacité du contexte industriel. Le quatrième objectif était de mettre au point des méthodes pour comparer avec efficacité et rigueur l'activité de différentes PGs (ou des mutants) en considérant les conditions propres à l'étape de rétention. Le cinquième et dernier objectif était de tenter, au moyen de méthodes biotechnologiques, d'optimiser l'efficacité industrielle de la PG choisie.

À cause du contexte industriel dans lequel j'ai effectué mes recherches, mon parcours doctoral a été quelque peu sinueux. À plusieurs reprises, les priorités de mon travail ont été déplacées ou mises de côté pour plusieurs semaines afin de répondre à d'autres besoins plus urgents de l'entreprise dans laquelle j'évoluais. La plupart du temps, ces changements de cap étaient dus à l'arrivée de dates limites pour l'obtention de résultats reliés au financement de l'entreprise (« milestones »). Avec le recul, je constate que malgré cela, j'ai tout de même réussi à mener à bien les objectifs de mon projet. En effet, deux des trois enzymes que j'ai choisies en fonction de leur capacité à fonctionner dans des conditions se rapprochant de celles du procédé de fabrication du papier ont pu être exprimées en assez grande quantité et se sont avérées utilisables dans les conditions souhaitées soit à des pH allant de 4,5 à 6,0 et des températures allant de 47°C à 60°C.

En plus de la nécessité que les PGs produites fonctionnent dans les conditions du procédé papetier, les autres impératifs principaux associés à la production industrielle étaient 1) que les enzymes soient produites en quantité suffisante et de façon économique, 2) qu'elles soient produites par un système d'expression facilitant leur préparation en vue de leur utilisation dans le procédé et 3) qu'elles soient produites en absence d'autres enzymes pouvant avoir un impact négatif sur le produit fini (comme des cellulases). Pour répondre à ces impératifs, trois systèmes d'expression ont été explorés dont deux qui ont fonctionné et qui ont permis d'obtenir des PGs en quantité suffisante pour qu'elles soient caractérisées et utilisées pour des essais sur des échantillons de pâte. De plus, le fait que ces systèmes d'expression permettaient la production des PGs dans le surnageant et ce, sans la présence d'enzymes contaminantes a simplifié la préparation des enzymes pour leur utilisation dans la pâte au maximum permettant l'utilisation directe du surnageant dans la pâte. Ainsi, les systèmes eucaryotes impliquant les vecteurs pYES-2ct pour l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae* et le vecteur pGAP pour l'expression dans *Pichia pastoris* ont tous deux donné des rendements de PGs satisfaisants. Les PGs de *Km* et de *Sc* exprimées dans *Saccharomyces cerevisiae* ont respectivement donné des activités de 54U/mL et 120U/mL à 50°C et pH 5,0. Pour ce qui est de l'expression dans *Pichia pastoris*, seule la PG de *Sc* a été essayée et, malgré le fait qu'elle ait été exprimée en plus grande quantité que dans *Saccharomyces cerevisiae* (soit 316mg/L comparativement à 225mg/L), son activité était quatre fois moins importante que celle mesurée dans le surnageant de culture de *Saccharomyces cerevisiae* (soit de 29U/mL). La différence dans le patron de glycosylation des PGs exprimées dans ces deux systèmes d'expression est la meilleure explication de cette diminution d'activité par mg de protéines exprimées dans *Pichia pastoris*. Pour ce qui est de la PG de *Sp*, la troisième PG choisie, elle a été exprimée à raison de 1,15U par mL de surnageant, ce qui n'était pas suffisant pour permettre sa caractérisation.

Le pH optimal des PGs de *Km* et de *Sc* se situe entre 4,0 et 4,5 et leur température optimale à pH 5,0 est de 60°C. Dans les deux cas, la vitesse initiale des PGs augmente en fonction de la température. Les études de stabilité effectuées dans le tampon ont par contre démontré que la PG de *Km* est plus stable que la PG de *Sc*. En effet, à

50°C, la demi-vie de la PG de *Km* est de plus de 2 jours et demi et celle de la PG de *Sc* est de 30 minutes. La comparaison des courbes d'activité et de longévité des PGs de *Km* et de *Sc* indique que la PG de *Km* présente le meilleur potentiel pour une utilisation dans la plage de pH et de températures retrouvée dans le procédé de fabrication du papier. Cependant, même si techniquement la PG de *Km* présente un meilleur potentiel pour l'utilisation d'une PG dans le procédé de fabrication du papier, la PG de *Sc* est de loin supérieure pour ce qui est du rapport efficacité vs coût de production. En effet, à quantités de protéines égales (en mg) ou même à volumes égaux de surnageant, la PG de *Sc* a un meilleur pouvoir enzymatique que la PG de *Km* et ce dans toutes les combinaisons de conditions testées.

Pour sélectionner les clones positifs et pour caractériser les PGs, plusieurs tests de détection et de mesure de l'activité enzymatique ont été essayés. En considérant le fait que ces tests allaient aussi servir au criblage des mutants de PGs, les tests les plus efficaces et les moins coûteux ont été sélectionnés et adaptés aux exigences du projet, ce qui correspondait au troisième objectif de la présente thèse. Le test de détection de l'activité de la PG sur gélose PGA est celui qui a été conservé pour identifier les clones produisant des PGs actives. Malgré le fait que ce test soit simple d'utilisation, les étapes de préparation du milieu de culture, sa composition et les conditions d'incubation des géloses ont dûes être optimisées afin d'obtenir des résultats de qualité satisfaisante. Pour ce qui est de la caractérisation des PGs, un test de turbidimétrie, le test de digestion du concombre et trois tests colorimétriques de dosage des sucres réducteurs ont été essayés soit le test Nelson-Somogyi, le test à la néocuproïne et le test au PAHBAH. Le test de turbidimétrie et le test de digestion du concombre ont été exclus parce que les résultats obtenus avec ces tests étaient difficilement comparables avec ceux de la littérature et parce qu'ils demandaient beaucoup de manipulations ce qui allait à l'encontre des besoins d'efficacité. Les tests colorimétriques qui semblaient, tout compte fait, être les plus appropriés pour la caractérisation des PGs ont donc été évalués selon les critères suivants soit 1- la possibilité d'être automatisé, 2- le coût et 3- la nocivité. Tout d'abord, les deux tests colorimétriques les plus utilisés dans la littérature portant sur la caractérisation des PGs, soit le test Nelson-Somogyi et le test à la néocuproïne, ont été évalués. Le test Nelson-Somogyi impliquait l'utilisation de

produits très toxiques pour l'environnement et était plutôt coûteux. Le test à la néocuproïne, quoique 45% moins coûteux que le test Nelson-Somogyi, aurait pour sa part été difficilement automatisable. Par conséquent, un troisième test de quantification des sucres réducteurs, soit le test au PAHBAH, a dû être adapté pour permettre le dosage du produit de la réaction enzymatique de la PG. À notre connaissance, c'est la première fois que ce test a été employé pour quantifier les sucres réducteurs produits par la dégradation du PGA par la PG. L'adaptation de ce test pour l'étude des PGs et son automatisation ont été un succès. De plus, le test au PAHBAH répond aux deux autres critères de sélection qui avaient été établis : il est peu coûteux, soit le cinquième du coût du test Nelson-Somogyi, et il n'est pas nocif pour l'environnement et l'utilisateur.

Le quatrième objectif de la présente thèse, soit de mettre au point des méthodes pour comparer avec efficacité et rigueur l'activité de différentes PGs (ou des mutants) en tenant compte des conditions propres à l'étape de rétention, a aussi été atteint. La capacité d'action des PGs de *Km* et de *Sc* sur la pâte TMP blanchie au peroxyde a premièrement été vérifiée à l'aide d'un traitement de 15 minutes de la pâte à pH 5,3 et 50°C avec 1000U d'enzymes par litre. Dans les deux cas, le traitement s'est avéré positif, car une réduction importante de demande cationique de la pâte, soit de 17%, a été observée suite au traitement. La spécificité d'action des pectinases sur la pâte TMP blanchie au peroxyde a aussi été validée. De plus, le traitement de l'eau blanche générée par les machines à papier utilisant de la pâte TMP blanchie au peroxyde avec la pectinase s'est aussi avéré positif ce qui ouvre une nouvelle avenue pour l'utilisation de la pectinase dans le procédé de fabrication du papier, soit pour le traitement des eaux blanches. En effet, un traitement de 2 minutes à pH 5,0 et 50°C avec 200 à 400U d'enzymes par litre d'eau blanche a permis une diminution de demande cationique de 13% et un traitement avec 1000U d'enzymes par litre d'eau a permis une diminution de demande cationique de 28%¹⁰⁷. Malgré le fait que la méthode de traitement de la pâte

¹⁰⁷ Il est important de rappeler que le pourcentage de réduction de demande cationique obtenu dépend, en plus de la quantité d'enzyme utilisée, des conditions de traitement (pH et température), de la quantité de PGA dans la pâte TMP blanchie et du reste de la composition de la pâte. C'est pourquoi, le pourcentage de réduction obtenu diffère d'un essai à l'autre et qu'il peut être plus important, pour les mêmes conditions de traitement, lorsque moins d'enzymes sont utilisées simplement parce qu'il y a plus de PGA dans la pâte.

employée pour les études préliminaires fonctionnait, elle donnait des résultats peu reproductibles. De plus, la méthode de traitement utilisée initialement suivie de la mesure de la demande cationique demandaient tant de temps qu'il était pratiquement impensable de fonctionner ainsi pour caractériser et comparer l'activité des PGs dans les différentes conditions du procédé. L'analyse des points critiques du traitement de la pâte selon la méthode initiale a toutefois permis de développer une méthode reproductible et plus efficace. C'est ainsi, entre autres, que du filtrat de presse a été utilisé au lieu de la pâte pour contrôler la consistance et l'homogénéité des échantillons et que le traitement de ce filtrat a été automatisé. L'automatisation du traitement a eu plusieurs avantages dont celui de réduire la marge d'erreur associée au traitement manuel (qui spécifions-le était assez complexe) et donc d'augmenter la reproductibilité des essais.

À partir du moment où le traitement automatisé de la pâte a été réussi, des programmes pour la caractérisation et la comparaison des PGs dans les conditions du procédé de fabrication du papier ont été développés. Parmi les programmes développés on retrouve un programme pour le traitement enzymatique de la pâte en vue de tester la stabilité des PGs sur la pâte (1 clone à 8 pH donnés ou 8 clones à 1 pH donné ou 8 réactions au choix). Ce programme a entre autre permis d'étudier l'action de la PG de *Sc* dans la pâte aux conditions propres au procédé de fabrication du papier. Il a ainsi été observé que l'activité de la PG de *Sc* dans la pâte est optimale dans des valeurs de pH plus acides soit de 4,8 à 5,4. De plus, sa température optimale d'activité à des valeurs de pH allant de 5,0 à 5,3 se situe autour de 54°C, ce qui est très près de la température optimale dans le tampon soit de 55°C. Cependant, la PG de *Sc* est tout de même moins active à haute température dans la pâte qu'elle ne l'est dans le tampon. En effet, de 54°C à 55°C, la diminution de demande cationique de la pâte occasionnée par le traitement enzymatique¹⁰⁸ passe de 35% à 10% ±5%, ce qui équivaut à une diminution d'activité de plus de 60%; une perte d'activité qui ne se produit pas de façon aussi marquée dans le tampon. Pour ce qui est de sa stabilité dans la pâte, le programme de traitement enzymatique de la pâte en vue de tester la

¹⁰⁸ Traitement enzymatique effectué avec 75U/L de filtrat de presse de pâte TMP blanchie pendant 2½ minutes.

stabilité des PGs a permis de constater que la PG de *Sc* est complètement inactivée dans la pâte après 2½ minutes d'incubation, soit 5 fois plus vite que dans le tampon, et ce peu importe les conditions de traitement essayées. Le fait que l'enzyme présente des différences d'activité et de stabilité dans le tampon et dans la pâte indique bien l'importance d'effectuer des essais pilotes dans les conditions réelles d'utilisation, soit dans la pâte pour ce qui est de l'application ciblée dans le présent projet.

Le cinquième et dernier objectif de cette thèse était de tenter, au moyen de méthodes biotechnologiques, d'optimiser l'efficacité industrielle de la (ou des) PG(s) choisie(s). Pour répondre à cet objectif, deux stratégies principales ont été utilisées soit 1- l'optimisation de l'efficacité par l'amélioration du rendement d'expression ce qui permet de réduire les coûts d'utilisation des enzymes et 2- l'optimisation de l'efficacité au moyen de mutations rationnelles en vue d'améliorer l'activité spécifique des PGs dans les conditions souhaitées. Pour améliorer le rendement d'expression des PGs obtenus (soit les PGs de *Km* de *Sc* et de *Sp*), 24 constructions génétiques ont été préparées soit à l'aide du vecteur pBAD pour l'expression dans *Escherichia coli* (4 constructions), du vecteur pYES-2ct pour l'expression dans *Saccharomyces cerevisiae* (13 constructions) ou du vecteur pGAP pour l'expression dans *Pichia pastoris* (7 constructions). Ces trois vecteurs ayant été choisi de façon à comparer le rendement des PGs en fonction de l'organisme de production et des patrons de glycosylations propres à chacun de ces organismes. Parmi ces constructions, différentes séquences signal ont aussi été employées dont gIII pour l'expression dans pBAD et les séquences signal de la PG de *Km*, de la PG de *Sc* ou du facteur de reproduction $Z\alpha$ de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'expression dans pYES et pGAP de manière à voir si ces séquences influençaient le niveau de sécrétion des PGs. Dans le vecteur pBAD, aucune activité de PG, ni présence de PG n'ont été détectées. Pour ce qui est des constructions dans le vecteur d'expression eucaryote, toutes les constructions testées pour l'activité se sont avérées positives. Malgré le grand nombre de constructions générées en vue de déterminer la combinaison vecteur et séquence signal la plus avantageuse pour la production des PGs, la comparaison des rendements de ces différentes constructions n'a pas été faite et ce pour la bonne raison que la compagnie AgroTerra Biotech était satisfaite des rendements obtenus avec les premiers systèmes

d'expression étudiés soit le vecteur d'expression pYES-2ct dans lequel le gène complet des PGs (codant pour la séquence signal et la protéine mature) a été cloné et qu'elle a préféré concentrer les efforts de recherche et de développement sur la mise au point de méthodes de caractérisation efficaces et sur l'optimisation des PGs.

Pour améliorer l'activité spécifique des PGs dans les conditions souhaitées, 8 mutations par PG (pour la PG de *Km* ou la PG de *Sc*) ont été effectuées seules ou en combinaison ce qui a donné un total de 45 constructions préparées. Parmi les 8 mutations, on retrouve 2 mutations pour annuler des sites de glycosylation ainsi que les mutations Q150M, K282D, K326T, K326Y, V329C / A334C et C353K / C362YL, dont la numérotation est basée sur la PG II d'*Aspergillus niger*. Des 45 constructions préparées, 37 clones ont été obtenus jusqu'à présent.¹⁰⁹ Pour chacun de ces clones, l'activité a été détectée et l'expression a été confirmée sur SDS-PAGE. L'analyse des patrons d'expression des mutants obtenus sur SDS-PAGE a permis de constater que la PG de *Km* produite dans *Saccharomyces cerevisiae* n'est glycosylée que sur le site N189 contrairement à ce qu'on s'attendait étant donné la présence de deux sites putatifs de glycosylation sur la séquence primaire de la protéine dont celui à la position N293. Deux bandes de PGs sont donc retrouvées dans le surnageant de culture de la PG de *Km* exprimée par la souche INVSc de *Saccharomyces cerevisiae* soit une bande de 38 kDa correspondant à la PG non-glycosylée et une bande à 43kDa correspondent à la PG glycosylée à la position 189 laquelle serait ainsi composée d'approximativement 28 mannoses. Pour ce qui est de la PG de *Sc*, les patrons d'expression des mutants exprimés dans *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que la bande obtenue après la déglycosylation de la PG sauvage de *Sc* avec l'endo H nous révèlent que les sites de glycosylation de cette PG sont ceux attendus. En effet, trois bandes sont retrouvées dans le patron d'expression de la PG de *Sc* sauvage soit une de 37kDa, une à 41kDa et une à 45kDa. Ces bandes correspondent respectivement à la PG de *Sc* non-glycosylée, à la PG de *Sc* dont un ou l'autre des deux sites putatifs de glycosylation (soit N318 et N330) a été glycosylé et à la PG de *Sc* dont les deux sites ont été glycosylés, chacun des deux sites étant glycosylé également soit avec 22 mannoses. Parmi tous les mutants clonés, sept mutants de la PG de *Sc* ont été caractérisés et comparés à la PG

¹⁰⁹ Un clone est une levure dans laquelle une construction a été introduite et exprimée.

sauvage au cours du présent projet soit les mutants *Sc* Q149M, *Sc* S282D, *Sc* K325T, *Sc* N318D, *Sc* N318Q, *Sc* N330D et *Sc* N330Q. Pour caractériser ces mutants, un programme pour le traitement enzymatique automatisé de la pâte a été utilisé soit le programme en vue du criblage de 4 clones (à 8 pH donnés) ou 40 clones (à 1 pH donné). Les mutants *Sc* S282D et *Sc* N318D sont ceux parmi les sept mutants étudiés qui sont ressortis comme étant les plus performants dans la pâte. En effet, après 15 minutes de traitement, la réduction de la demande cationique occasionnée par ces mutants est plus importante dans certaines conditions et leurs plages d'activité sont plus étendues que la PG sauvage de *Sc*, allant jusqu'à un pH de 5,6 et une température de 60°C là où la PG de *Sc* va jusqu'à 5,4 et 56°C. Les mutations Q149M, K325T, N330D et N330Q sont quant à elles celles qui ont été les plus néfastes sur l'activité de la PG de *Sc* dans la pâte, la mutation K325T étant la pire. L'impact négatif des mutations Q149M et K325T pourrait s'expliquer par la différence d'environnement entre la PG de *Sc* et les PGs¹¹⁰ qui ont servi au choix des acides aminés de remplacement tandis que l'impact négatif obtenu suite au remplacement de l'asparagine de la position 330 pourrait quant à lui s'expliquer par le rôle important de la glycosylation dans la stabilisation de la structure de la PG à cet endroit. Étant donné que les quatre premiers objectifs du projet ont été atteints avec succès, que la démonstration d'un effort important pour tenter d'optimiser les PGs obtenues a été effectuée et aussi pour des raisons propres au caractère industriel du présent projet, la présentation de sept mutants a été jugée suffisante par mon directeur de travaux pour compléter mon projet de thèse.

Malgré le fait que le cinquième objectif de mon travail n'ait pas entièrement été complété, je considère l'ensemble du projet comme une réussite. En effet, j'ai pu mener à bien l'implantation d'un tout nouveau champs de recherche au sein du laboratoire où j'ai travaillé. Avant ce projet, aucune protéine n'avait encore été exprimée dans une levure dans ce laboratoire. L'utilisation de ces organismes était donc nouvelle. En outre, aucune protéine produite précédemment dans ce laboratoire n'avait de fonction enzymatique. Toutes les techniques reliées à la détection des

¹¹⁰ La PG II d'*Aspergillus niger* a servi pour le choix de la méthionine à la position 149 et la PG de *Sp* a servi pour le choix de la thréonine à la position 325.

enzymes et à la mesure de leur activité étaient donc, elles aussi nouvelles; sans compter qu'une de ces techniques (le test de dosage des sucres réducteurs au PAHBAH) a même été adaptée et utilisée pour la première fois avec une PG. C'était aussi la première fois, dans le laboratoire, que des essais sur de la pâte et des analyses avec des appareils réservés aux analyses de l'industrie papetière (avec tous les ajustements que cela implique) étaient effectués. Les techniques liées à l'étude des PGs sont maintenant maîtrisées dans le laboratoire. Il ne reste plus qu'à trouver la PG idéale pour l'industrie des pâtes et papiers ou pour toute autre application industrielle.

7.2 SUITE DES TRAVAUX ET AVENUES DE RECHERCHE

Voici quelques avenues de recherche soulevées par la présente thèse :

- 1- La caractérisation de tous les mutants dans le tampon afin de découvrir si les mutations sur la PG de *Sc* (et de *Km*) ont eu des effets comparables aux mêmes mutations effectuées sur la PG II d'*Aspergillus niger*.
- 2- La caractérisation des mutants à l'aide de méthodes biophysiques comme le dichroïsme cellulaire pour appuyer les résultats obtenus par les essais d'activité concernant la stabilité des PGs.
- 3- L'expression des PGs et de leurs mutants dans *Pichia pastoris* et la comparaison de leur activité avec celle des mutants des PGs produites dans *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4- Une étude pour déterminer si la processivité d'une enzyme peut être modifiée simplement par un changement de conformation dû à l'environnement (température et pH). Il suffirait de faire l'étude des longueurs des oligomères obtenus suite au traitement du PGA par une enzyme dans différentes conditions. Cette ressemblerait un peu à celle que l'équipe de Benen a fait (Pagès *et al.* 2001) en prouvant que la processivité pouvait être modifiée par le changement d'un seul acide aminé.

5- La comparaison des taux d'expression des PGs de *Km* et de *Sc* avec leurs différentes séquences signal.

6- La comparaison des taux d'expression des PGs de *Km* et de *Sc* et de leurs mutants dont les sites de glycosylation ont été enlevés afin de savoir si une plus grande quantité de protéines pourraient être exprimée par les levures étant donné le fait que l'énergie globale nécessaire à la sécrétion des protéines est probablement moins importante (par protéine exprimée) que lorsque la protéine doit être glycosylée.

7- L'optimisation de l'expression de la PG de *Sp* dans *Saccharomyces cerevisiae*. Pour ce faire, une stratégie qui pourrait être essayée est le remplacement de l'alanine et de la thréonine situées au début de la protéine mature par un aspartate et une sérine. En effet, l'étude de l'alignement des séquences des PGs présentée à la figure 5.1 de la page 139 nous fait remarquer que les deux premiers acides aminés de la PG de *Sp* sont différents des acides aminés présents au début des deux PGs qui sont sécrétées à l'aide des séquences signal $Z\alpha$ et des séquences signal des PGs de *Km* et de *Sc*. Une deuxième stratégie concernant l'optimisation de l'expression de la PG de *Sp* serait d'essayer de l'exprimer à l'aide de sa propre séquence signal. Troisièmement, le gène non-optimisé de la PG de *Sp* pourrait être essayé pour l'expression (les codons préférentiels de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Escherichia coli* avaient été utilisés lors de la synthèse du gène de la PG de *Sp* afin de maximiser les chances d'expression dans ces organismes). Finalement, la PG de *Sp* pourrait être exprimée avec sa queue C-terminale, laquelle a été omise lors des premiers essais d'expression parce qu'elle n'est pas retrouvée dans la protéine mature.

8- Des études pour mieux connaître les effets du procédé en usine sur l'efficacité de la PG et aussi sur celle (en parallèle) d'autres enzymes, surtout pour des applications continues et à long terme. Les points suivants pourraient entre autres être étudiés :

- a. L'effet des variations du procédé (température, dosage de réactifs, saisons, etc.) sur l'efficacité de l'enzyme.
- b. L'effet des espèces de bois utilisées (lesquelles influencent sûrement la quantité de PGA retrouvée dans la pâte et donc le pouvoir de l'enzyme).

- c. Les effets relatifs à la composition de pâtes provenant d'autres procédés (ex. la pâte désencrée, de papier recyclé) ou relatifs à d'autres constituants contaminants, dans le cas d'un mélange par exemple ou bien dans le cas du traitement de l'eau blanche provenant de plusieurs machines ou procédés.

Malgré le fait que le présent projet de thèse en était un d'envergure, il est loin d'avoir permis d'explorer toutes les polygalacturonases potentielles. Pour des fins de priorités seules les PGs de *Km* et de *Sc* ont été étudiées dans le tampon et seule la PG de *Sc* avec quelques-uns de ses mutants l'ont été dans la pâte. Cependant, cette thèse aura eu le grand avantage de définir des méthodes d'expression fonctionnelles; des méthodes de dosage enzymatique et de traitement de la pâte automatisables et probablement applicables à d'autres enzymes; et des méthodes de criblage de mutants utilisables. Les mises au point effectuées dans cette thèse permettront ainsi aux chercheurs dans les domaines des pectinases, des autres hydrolases et de l'enzymologie industrielle en général, de sauver du temps. La méthode de criblage des mutants dans la pâte permettra aussi de tester toutes les PGs qui ont été exclues du projet pour différentes raisons sans pour autant avoir à les purifier de leur surnageant. Cela ouvre aussi la porte au criblage de la flore microbienne sur les différents sites des papetières (comme les sites de stockage des copeaux, les effluents ou les unités de traitement des eaux) afin, peut-être, d'y dénicher la PGs la mieux adaptée pour le travail souhaité.

RÉFÉRENCES

Articles scientifiques et livres

Ahuja, S.K., Ferreira, G.M., Moreira, A.R. (2004) "Utilization of enzymes for environmental applications." *Crit Rev Biotechnol.* 24(2-3) : 125-154.

Aikawa, J., Yamashita, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S. et Beppu, T. (1990). "Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of *Mucor rennin*, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast." *J Biol Chem.* 265(23) : 13955-13959.

Allen, R.L., Lonsdale, D.M. (1993) "Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development." *Plant J* 3(2) : 261-271.

Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998) "Green Chemistry, Theory and practice" Oxford, UK, Oxford University Press.

Armand, S., Wagemaker, M.J., Sanchez-Torres, P., Kester, H.C.M, van Santen, Y., Dijkstra, B.W., Visser, J., Benen, J.A.E. (2000) "The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 275(1) : 691-696.

Avigad, G., Milner, Y. (1967) "Turbidimetric assay for pectinase activity." *Israel Journal of Chemistry* 5 : 175-180.

Bajpai P. (1999) "Application of enzymes in the pulp and paper industry". *Biotechnol. Prog.* 15 : 147-157.

Bajpai P. (2004) "Biological bleaching of chemical pulps. *Crit Rev Biotechnol.*" 24(1) : 1-58.

Barnby, F.M., Morpeth, F.F., Pyle, D.L. (1990) "Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme." *Enzyme Microb Technol* 12 : 891-897.

Biely, P., Benen, J.A.E., Heinrichova, K, Kester, H.C., Visser, J. (1996) Inversion of configuration during hydrolysis of alpha-1,4-galacturonidic linkage by three *Aspergillus* polygalacturonases. *FEBS Letters* 382 : 249-255.

Benen, J.A.E., Kester, H.C.M, Visser, J. (1999) "Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C." *Eur J Biochem* 259(3) : 577-585.

Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., Villa, T.G. (1994) "Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*." *Can J Microbiol* 40(11) : 974-977.

Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N.M., Villa, T.G. (1998) "Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b." FEMS Microbiol Lett 164(2) : 249-255.

Blanco, P., Sieiro, C., Villa, T.G. (1999) "Production of pectic enzymes in yeasts." FEMS Microbiol Lett 175(1) : 1-9.

Blanco, P., Thow, G., Simpson, C.G., Villa, T.G., Williamson, B. (2002) "Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*." FEMS Microbiol Lett 210(2) : 187-191.

Bonnin, E., Le Goff, A., Korner, R., Vigouroux, J. Roepstorff, P., Thibault, J.-F. (2002) "Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*." Biochim Biophys Acta 1596(1) : 83-94.

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

Bretthauer RK, Castellino FJ. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. Biotechnol Appl Biochem. 30 (Pt 3) : 193-200.

Bussink, H.J., Brouwer, K.B., de Graaff, L.H., Kester, H.C.M., Visser, J. (1991a) "Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*." Curr Genet 20(4) : 301-307.

Bussink, H.J., Buxton, F.P., Fraaye, B.A., de Graaff, L.H., Visser, J. (1992) "The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes." Eur J Biochem 208(1) : 83-90.

Bussink, H.J., Buxton, F.P., Visser, J. (1991b) "Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenensis* genes encoding polygalacturonase II." Curr Genet 19(6) : 467-474.

Bussink, H.J., Kester, H.C.M., Visser, J. (1990) "Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*." FEBS Lett 273(1-2) : 127-130.

Cabanne, C., Doneche B. (2002) "Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity." Microbiol Res 157(3) : 183-189.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. 24(1) : 45-66.

- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D. (2003) "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs." *Nucleic Acids Res* 31(13) : 3497-500.
- Claveau, S., Sasseville, M., Beauregard, M. (2004) "Alcohol-mediated error-prone PCR." *DNA Cell Biol.*23(11) : 789-795.
- Colangelo, J., Licon, V. Benen, J.A.E., Visser, J., Bergmann, C., Orlando, R. (1999) "Characterization of the glycosylation of recombinant endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*." *Rapid Commun Mass Spectrom* 13(14) : 1448-1453.
- Cooke, R.D., Ferber, C.E., Kanagasabapathy, L. (1976) "Purification and characterisation of polygalacturonases from a commercial *Aspergillus niger* preparation." *Biochim Biophys Acta* 452(2) : 440-451.
- Cotton, P., Rasclé, C., Fevre, M. (2002) "Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast." *FEMS Microbiol Lett* 213(2) : 239-244.
- Cruikshank, R.H., Wade, G.C. (1980) "Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels." *Anal Biochem* 107(1) : 177-181.
- Dentel, S. K. et Kingery, K. M. (1989) "Using Streaming Current Detectors in Water Treatment." *Journal American Water Works Association* 81 : 85-94.
- Deuel, H., Stutz, E. (1958) "Pectic substances and pectic enzymes." *Advances in enzymology and related subjects* 20 : 341-382.
- Doucet, A., Williams, M., Gagnon, M.C., Sasseville, M. et Beauregard, M. (2002) "Engineering nutritious proteins: Improvement of stability in the designer protein MB-1 via introduction of disulfide bridges." *J. Agric. Food Chemistry* 50 : 92-98.
- Dygert, S., Li, L.H., Florida, D., Thoma, J.A. (1965) "Determination of reducing sugar with improved precision." *Analytical Biochemistry* 13 : 367-374.
- Ebanks, R., Dupont, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., Dupont, C. (2000) Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 25(6) : 310-314.
- Edney, D.B.L (2005) "Control and Optimisation of Coagulant Dosing in Drinking Water Treatment." PhD Thesis. University of Auckland.
- Edney, D.B.L (post 2005) "Introduction to the Theory of the Streaming Current Meter." <http://www.accufloc.com/downloads/SCMTheory.pdf> (référence incomplète)
- Elbein, A.D. (1991) "The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function." *Trends Biotechnol.* 9(10) : 346-352.

Elicker, M.L., Resta, J.J., Hunt, J.W. et Dentel, S.K. (1992) "A fundamental basis for use of the streaming current detector." Proc. 1992 AWWA Annual Conf., (Vancouver). Jun 22.

Evans, J.D., Akin, D.E., Foulk, J.A. (2002) "Flax-retting by polygalacturonase-containing enzyme mixtures and effects on fiber properties." J Biotechnol 97(3) : 223-231.

Fernandez-Gonzalez, M., Ubeda, J.F., Vasudevan, T.G., Cordero Otero, R.R., Briones, A.I. (2004) "Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains." FEMS Microbiol Lett. 237(2) : 261-266.

Gagnon, M.C., Williams, M., Doucet, A., Beauregard, M. (2000) "Replacement of tyr62 by trp in the designer protein milk bundle-1 results in significant improvement of conformational stability." FEBS Lett. 484(2) : 144-148.

Gainvors, A., Belarbi, A. (1995) "Detection method for polygalacturonase-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast 11(15) : 1493-1499.

Gainvors, A., Frezier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., Belarbi, A. (1994a) "Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain." Yeast 10(10) : 1311-1319.

Gainvors, A., Karam, N., Lequart, C. Belarbi, A. (1994b) "Use of *saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices." Biotechnology letters 16(12) : 1329-1334.

Gainvors, A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nedjma, M., Belarbi, A. (2000) "Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Microbiol Lett 183(1) : 131-135.

Gemmill T.R, Trimble R.B. (1999) "Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species". Biochim Biophys Acta. 1426(2) : 227-237.

Gerdes, F.W. (1966) "A New Instrument – The Streaming Current Detector." Analysis Instrumentation 4 : 181-198.

Giniger, E., Barnum, S.M., Ptashne, M. (1985). "Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. " Cell 40 : 767-774.

Gognies, S., Gainvors, A., Aigle, M., Belarbi, A. (1999) "Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1)." Yeast 15(1) : 11-22.

Harman, G.E., Corden, M.E. (1972) "Purification and partial characterization of the polygalacturonases produced by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*." Biochim Biophys Acta 264(2) : 328-338.

Harmsen, J.A., Kusters-van Someren, M.A., Visser, J. (1990) "Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (pelA): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*." Curr Genet 18(2) : 161-166.

- Hasui, Y., Fukui, Y., Kikuchi, J., Kato, N., Miyairi, K., Okuno, T. (1998) "Isolation, characterization, and sugar chain structure of endoPG Ia, Ib and Ic from *Stereum purpureum*." *Biosci Biotechnol Biochem* 62(5) : 852-857.
- Henrissat, B. (1991) "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* 280 (Pt 2) : 309-316.
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1993) "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* 293 (Pt 3) : 781-788.
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1996) "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases." *Biochem J* 316 (Pt 2): 695-696.
- Henrissat, B., Romeu, A. (1995) "Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases." *Biochem J* 311 (Pt 1) : 350-351.
- Hirose, N., Kishida, M., Kawasaki, H., Sakai, T. (1998) "Molecular cloning and expression of a polygalacturonase gene in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of fermentation and bioengineering* 86(3) : 332-334.
- Hirose, N., Kishida, M., Kawasaki, H., Sakai, T. (1999) "Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biosci Biotechnol Biochem* 63(6) : 1100-1103.
- Hou, W.C, Chang, W.H, Jiang, C.M. (1999) "Qualitative distinction of carboxyl group distributions in pectins with ruthenium red." *Bot Bull Acad Sin* 40 : 115-119.
- Houle, V. (2007) "Détermination de l'impact de la glycosylation sur l'activité et la stabilité de l'endopolygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* par mutagenèse dirigée" Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières.
- Houle, V., Gagnon, M.C., Dubé, E., Hurtubise, Y. et Beaugard, M. (2008) "Impact of glycosylation on *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase PGU1 activity and stability." *Open Biotech J* 2(1) : 36-42.
- Huang, J.H., Schell, M.A. (1990) "DNA sequence analysis of pglA and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas solanacearum*." *J Bacteriol* 172(7) : 3879-3887.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. (1998) "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." *Trends Biotechnol* 16(9) : 396-403.
- Jenkins, J., Mayans, O., Pickersgill, R. (1998) "Structure and evolution of parallel beta-helix proteins." *J Struct Biol* 122(1-2) : 236-246.

- Jeong, M.Y., Kim, S., Yun, C.W., Choi, Y.J., Cho, S.G. (2007) "Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236." *J Biotechnol* 127(2) : 300-309.
- Jia, J., Wheals, A. (2000) "Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*." *Curr Genet* 38(5) : 264-270.
- Johnston, D.J., Williamson, B. (1992) "Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*." *Mycol Res* 96(5) : 343-349.
- Jost, F., de Vries, T., Knegtel, R.M.A., Macher, B.A. (2005) "Mutation of amino acids in the alpha 1,3-fucosyltransferase motif affects enzyme activity and K-m for donor and acceptor substrates." *Glycobiology* 15 (2) : 165-175.
- Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A., van Kan, J.A. (2005) "Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*." *Plant J* 43(2) : 213-225.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) "Applications of pectinases in the commercial sector: a review." *Bioresour Technol* 77(3) : 215-227.
- Kester, H.C.M., Visser, J. (1990) "Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*." *Biotechnol Appl Biochem* 12(2) : 150-160.
- Khan, M.I., Ito, K., Kim, H., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H., Sawa, Y. (2005) "Molecular properties and enhancement of thermostability by random mutagenesis of glutamate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*." *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(10):1861-1870.
- Kim, B.M., Kim, H., Raines, R.T., Lee, Y. (2004) "Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 315(4) : 976-983.
- Kusters-van Someren, M.A., Harmsen, J.A., Kester, H.C., Visser, J. (1991) "Structure of the *Aspergillus niger* pelA gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*." *Curr Genet* 20(4) : 293-299.
- Laing, E., Pretorius, I.S. (1993) "A note on the primary structure and expression of an *Erwinia carotovora* polygalacturonase-encoding gene (peh1) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." *J Appl Bacteriol* 75(2) : 149-158.
- Lang, C., Dornenburg, H. (2000) "Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases." *Appl Microbiol Biotechnol* 53(4) : 366-375.

- Lang, C., Looman, A.C. (1995) "Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*." Appl Microbiol Biotechnol 44(1-2) : 147-156.
- Leung, D.W., Ellson, C. (1989) "A Method Random Mutagenesis of a Defined DNA Segment Using a Modified Polymerase Chain Reaction." Technique 1 : 11-15.
- Limberg, G., Korner, R., Buchholt, H.C., Christensen, T.M.I.E., Roepstorff, P., Mikkelsen, J.D. (2000) "Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*." Carbohydr Res 327(3) : 321-332.
- Linhart, F., Auhorn, W. Degen, H.G., Lorz, R. (1987) "'Anionic trash": controlling detrimental substances." Tappi journal 70(10) : 79-85.
- Maldonado, M.C., Caceres, S., Galli, E., Navarro, A.R. (2002) "Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus niger*." Folia Microbiol (Praha) 47(4) : 409-412.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., Eijsink, V.G. (1997) "Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond." J Biol Chem. 272(17) : 11152-11156.
- Markovic, O., Janecek, S. (2001) "Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution." Protein Eng 14(9) : 615-631.
- Martel, M.B., Letoublon, R., Fevre, M. (1998) "Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*." FEMS Microbiol Lett 158(1) : 133-138.
- McKay, A.M. (1988) "A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion." FEMS Microbiol Lett 56 : 355-358.
- Milner, Y., Avigad, G. (1967) "A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses." Carbohydr Res 4 : 359-361.
- Minagawa, H., Yoshida, Y., Kenmochi, N., Furuichi, M., Shimada, J., Kaneko, H. (2007) "Improving the thermal stability of lactate oxidase by directed evolution." Cell Mol Life Sci. 64(1) : 77-81.
- Miyairi, K., Okuno, T., Sawai, K. (1985) "Purification and properties of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, a factor inducing silver-leaf symptoms on apple trees." Agric. Biol. Chem. 49(4) : 1111-1118.
- Miyairi, K., Senda, M., Watanabe, M., Hasui, Y., Okuno, T. (1997) "Cloning and sequence analysis of cDNA encoding endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*." Biosci Biotechnol Biochem 61(4) : 655-659.

- Murugesan K. (2003) "Bioremediation of paper and pulp mill effluents." *Indian J Exp Biol.* 41(11) : 1239-1248.
- Mussell, H.W., Morre, D.J. (1969) "A quantitative bioassay specific for polygalacturonases." *Anal Biochem* 28(1) : 353-360.
- Mussell, H.W., Strouse, B. (1972) "Characterization of two polygalacturonases produced by *Verticillium albo-atrum*." *Can J Biochem* 50(6) : 625-632.
- Nagai, M., Katsuragi, T., Terashita, T., Yoshikawa, K., Sakai, T. (2000) "Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*." *Biosci Biotechnol Biochem* 64(8) : 1729-1732.
- Nelson, N. (1944) "A photometric adaptation of the Somogyi." *J Biol Chem* 153 : 375-380.
- Nelson, N., Ed. (1957) *Colorimetric analysis of sugars. Methods in enzymology.* New-York, Academic Press.
- Pagès, S., Heijne, W.H.M, Kester, H.C.M, Visser, J., Benen, J.A.E. (2000) "Subsite mapping of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 275(38) : 29348-29353.
- Pagès, S., Kester, H.C.M., Visser, J., Benen, J.A.E. (2001) "Changing a single amino acid residue switches processive and non-processive behavior of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase I and II." *J Biol Chem* 276(36) : 33652-33656.
- Parenicova, L., Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., Visser, J. (1998) "pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*." *Eur J Biochem* 251(1-2) : 72-80.
- Parenicova, L., Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., Visser, J. (2000) "pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*." *Biochem J* 345 : 637-644.
- Parenicova, L., Kester, H.C.M., Benen, J.A.E., Visser, J. (2000) "Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties." *FEBS Lett* 467(2-3) : 333-336.
- Pathak, N., Mishra, S., Sanwal, G.G. (2000) "Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit." *Phytochemistry* 54(2) : 147-152.
- Pickersgill, R., Scott, M., Smith, D., Worboys, K., Jenkins, J. (1999) "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the endo-polygalacturonase from *Erwinia carotovora ssp. carotovora*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 1) : 320-322.

- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K., Jenkins, J. (1998) "Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora ssp. carotovora*." J Biol Chem 273(38) : 24660-24664.
- Prodromou, C., Pearl, L.H. (1992) "Recursive PCR : a Novel Technique for Total Gene Synthesis." Protein Eng 5(8) : 827-829.
- Ramakrishnan, B., Boeggeman, E., Qasba, P.K. (2005) "Mutation of arginine 228 to lysine enhances the glucosyltransferase activity of bovine beta-1,4-galactosyltransferase I." Biochemistry 44 (9) : 3202-3210.
- Rao, M.N., Kembhavi, A.A., Pant, A. (1996) "Implication of tryptophan and histidine in the active site of endo-polygalacturonase from *Aspergillus ustus*: elucidation of the reaction mechanism." Biochim Biophys Acta 1296(2) : 167-173.
- Reid, I., Ricard, M. (2000) "Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide." Enzyme Microb Technol 26(2-4): 115-123.
- Ricard, M., Reid, I., Orccotoma, J.A. (2005a) "Pectinase reduces the cationic demand of peroxide-bleached TMP: A paper machine trial." Pulp and Paper Canada 106 (12) : 78-83.
- Ricard M, Orccotoma, J.A., Ling, J., Watson, R. (2005b) "Pectinase reduces cationic chemical costs in peroxide-bleached mechanical grades." Pulp and Paper Canada 106 (12) : 84-88.
- Ricard, M., Reid, I. (2004) "Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp." Enzyme Microb Technol 34 (5) : 499-504.
- Rodriguez Couto, S., Toca Herrera, J.L. (2006) "Industrial and biotechnological applications of laccases: a review." Biotechnol Adv. 24(5) : 500-513.
- Royo, M., Fitzpatrick, P.F., Daubner, S.C. (2005) "Mutation of regulatory serines of rat tyrosine hydroxylase to glutamate: effects on enzyme stability and activity." Arch. Biochem Biophys. 434 (2) : 266-274.
- Ruttkowski, E., Labitzke, R., Khanh, N.Q., Loffler, F., Gottschalk, M., Jany, K.D. (1990) "Cloning and DNA sequence analysis of a polygalacturonase cDNA from *Aspergillus niger* RH5344." Biochim Biophys Acta 1087(1) : 104-106.
- Ruttkowski, E., Khanh, N.Q., Wientjes, F.J., Gottschalk, M. (1991) "Characterization of a polygalacturonase gene of *Aspergillus niger* RH5344." Mol Microbiol 5(6) : 1353-1361.
- Ryden, P., MacDougall, A. J., Tibbits, C. W., Ring, S. G. (2000) "Hydration of pectic polysaccharides." Biopolymers 54(6) : 398-405.

- Saarilahti, H.T. (1993) "Characterization of polygalacturonases." *Gene* 124(1) : 145-147.
- Sakai, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase." *Science* 239 : 487-491.
- Sakai, T., Okushima, M., Yoshitake, S. (1984) "Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*." *Agric. Biol. Chem.* 48(8) : 1951-1961.
- Schejter, A., Marcus, L. (1988) "Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea Pers.*" *Methods in enzymology* 161 : 366-373.
- Schroter, K.H., Arkema, A., Kester, H.C., Visser, J., Dijkstra, B.W. (1994) "Crystallization and preliminary crystallographic characterization of endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*." *J Mol Biol* 243(2) : 351-352.
- Seoane, G. (2003) "Biocatalysis. Conférence, PASI on Green Chemistry, Montevideo, Uruguay. Juillet 2003"
- Serrat, M., Bermudez, R.C., Villa, T.G. (2002) "Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater." *Appl Biochem Biotechnol* 97(3) 193-208.
- Schwan, R.F., Cooper, R.M., Wheals, A.E. (1997) "Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts." *Enzym Microbiol Technol.* 21 : 234-244.
- Shimizu, T., Miyairi, K., Okuno, T. (2000) "Determination of glycosylation sites, disulfide bridges, and the C-terminus of *Stereum purpureum* mature endopolygalacturonase I by electrospray ionization mass spectrometry." *Eur J Biochem.* 267(8) : 2380-2389.
- Shimizu, T., Shibata, H., Araya, T., Nakatsu, T., Miyairi, K., Okuno, T., Kato, H. (2005) "Expression, purification, and crystallization of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif.* 44(2) : 130-135.
- Siekstele, R., Bartkeviciute, D., Sasnauskas, K. (1999) "Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1)." *Yeast* 15(4) : 311-322.
- Singh, S.A., Rao, A.G.A. (2002) "A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*." *Biotechnol Appl Biochem* 35 : 115-123.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem.* 150(1) : 76-85. Erratum dans : *Anal Biochem* 163(1):279.

Somogyi, M. (1952) "Notes on sugar determination." *J Biol Chem* 159 : 19-23.

Stemmer, W.P.C. (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10747-10751.

Stephens, B.G., Felkel, Jr., Spinelli, W.M. (1974) "Spectrometric determination of Copper and iron Subsequent to the simultaneous extraction of bis(2,9-dimethyl-1,10phenantroline) copper(I) abs bis[2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazne]iron(II) into propylene Carbonate." *Anal. Chem.* 46(6) : 692-696.

Stephens, D.E., Rumbold, K., Permaul, K., Prior, B.A., Singh, S. (2007) "Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*." *J Biotechnol.* 10; 127(3) : 348-354.

Strand, L.L., Corden, M.E., MacDonald, D.L. (1976) "Characterization of two endopolygalacturonase isozymes produced by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*." *Biochim Biophys Acta* 429(3) : 870-883.

Stratilova, E., Dzurova, M., Markovic, O., Jornvall, H. (1996) "An essential tyrosine residue of *Aspergillus* polygalacturonase." *FEBS Lett* 382(1-2) : 164-166.

Stratilova, E., Markovic, O., Skrovinova, D., Rexova-Benkova, L., Jornvall, H. (1993) "Pectinase *Aspergillus sp.* polygalacturonase: multiplicity, divergence, and structural patterns linking fungal, bacterial, and plant polygalacturonases." *J Protein Chem* 12(1) : 15-22.

Stratilova, E., Mislovicova, D., Kacurakova, M., Machova, E., Kolarova, N., Markovic, O., Jornvall, H. (1998) "The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus* polygalacturonase." *J Protein Chem* 17(2) : 173-179.

Subramanian, S., Prema, P. (2002) "Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application." *Crit Rev Biotechnol.* 22(1) : 33-64.

Sundberg, K.E., Sundberg, A.C., Thornton, J.W., Holmbom, B.R. (1998) "Pectic acids in the production of wood-containing paper." *Tappi journal* 81(7) : 131-136.

Suurnakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J., Viikari, L. (1997) "Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps." *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 57 : 261-872.

ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J., van Kan, J.A.L. (2001) "*Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues." *Fungal Genet Biol* 33(2) : 97-105.

Thoma J.A., Rao, G.V.K., Brothers, C., Spradlin, J. (1971) "Subsite mapping of enzymes." J Biol Chem 246 : 5621-5635.

Thornton, J.W. (1994) "Enzymatic degradation of polygalacturonic acids released from mechanical pulp during peroxide bleaching." Tappi journal 77(3) : 161-167.

Thornton, J.W., Eckerman, C.S., Ekman, R.O., Holmbom, B.R. (1996) "Treatment of alkaline bleached mechanical wood pulp with pectinase." US Patent 5,487,812, Mesta-Serla Oy, Mantta, Finland.

Urbanek, H., Zalewska-Sobczak, J. (1975) "Characterization of polygalacturonases of *Botrytis cinerea* E-200." Bull Acad Pol Sci Biol 23(10): 669-674.

Urbanek, H., Zalewska-Sobczak, J. (1975) "Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* E-200 Pers." Biochim Biophys Acta 377(2) : 402-409.

van Pouderooyen, G., Snijder, H.J., Benen, J.A., Dijkstra, B.W. (2003) "Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*." FEBS Lett. 554(3) : 462-466.

van Santen, Y., Benen, J.A.E, Schroter, K.-H., Kalk, K.H., Armand, S., Visser, J., Dijkstra, B.W. (1999) "1.68 Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus Niger* and Identification of Active Site Residues by Site-Directed Mutagenesis." J Biol Chem 274(43) : 30474-30480.

Visser, J., Bussink, H.J., Witteveen, C. (1995) "Gene expression in filamentous fungi. Expression of pectinases and glucose oxidase in *Aspergillus niger*." Bioprocess Technol 22 : 241-308.

West, R.W.J., Yocum, R.R., Ptashne, M. (1984). "Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region: Location and Function of the Upstream Activator Sequence UAS_G." Mol. Cell. Biol. 4 : 2467-2478.

Walker, C.A., Kirby, J.T. et Dentel, S.K. (1996) "The Streaming Current Detector: A Quantitative Model." Journal Of Colloid And Interface Science, 182 : 71-81.
<http://chinacat.coastal.udel.edu/~kirby/papers/walker-kirby-dentel-jcis96.pdf>

Whittington, H., Kerry-Williams, S., Bidgood, K., Dodsworth, N., Peberdy, J., Dobson, M., Hinchliffe, E., Ballance, D.J. (1990) "Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet 18(6): 531-536.

Woods, J.T., Mellon, M.G. (1941) "The Molybdenum Blue Reaction." Industrial and Engineering Chemistry 13(11) : 760-764.

Wubben, J.P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J.A.L., Visser, J. (1999) "Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*." Appl Environ Microbiol 65(4) : 1596-1602.

Yanez, E., Carmona, T.A., Tiemblo, M., Jimenez, A., Fernandez-Lobato, M. (1998) "Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion." *Biochem J.* 329 : 65-71.

Yoder, M.D., Jurnak, F. (1995) "Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds." *Faseb J* 9(5) : 335-342.

Zhao, H., Giver, L., Shao, Z.X., Affholter, J.A., Arnold, F.H. (1998) "Molecular Evolution by Staggered Extension Process (StEP) in vitro recombination." *Nature Biotechnology* 16 : 258-261.

Zhou, N.E., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1993) "Disulfide bond contribution to protein stability: positional effects of substitution in the hydrophobic core of the two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry.*" 32(12) : 3178-3187.

Sites Web

Association des industries forestières du Québec.
<http://www.aifq.qc.ca/francais/stats/pates01.html>

Conseil de l'Industrie Forêtère du Québec, données 2001 et 2005.
<http://www.cifq.qc.ca>

Brenda, banque de données sur les enzymes
http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php3?ecno=3.2.1.15

Institut de recherche Kazusa – listes de codons préférentiels pour *Echerischia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* <http://www.kazusa.or.jp/codon>

National Center for Biotechnology information (NCBI)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

ANNEXES

ANNEXE I

AUTOMATISATION DES TESTS ENZYMATIQUES, DU TRAITEMENT DE LA PÂTE ET DU CRIBLAGE DES MUTANTS DE PGs :

PROTOCOLES DE PRÉPARATION, PROGRAMMES ET EXEMPLES DE DONNÉES OBTENUES

- a) Dosage initial de l'activité de la PG
- b) Test d'activité enzymatique dans une solution tampon
- c) Test de stabilité enzymatique dans une solution tampon
- d) Dosage préliminaire du PGA dans la pâte
- e) Criblage des mutants dans une solution tampon
- f) Criblage de 4 ou 40 mutants dans la pâte
- g) Test de stabilité dans la pâte

ANNEXE Ia
Protocole de préparation

Dosage initial de l'activité de la PG
(avec dilution faite par le technicien)

Dilutions à partir de l'enzyme purifiée et concentrée dans du tampon acétate 50mM pH 5,0

Note: Le robot redilue par 4

Dilutions:	Tampon (µL)	Enzyme (µL)	Volume total	dilution totale
1 ds 25	336	14 [tré]	350	1 ds 100
1 ds 37,5	219	6,0 [tré]	225	1 ds 150
1 ds 50	343	7,0 [tré]	350	1 ds 200
1 ds 75	296	4,0 [tré]	300	1 ds 300
1 ds 100	300	100 [1/25]	400	1 ds 400
1 ds 150	200	100 [1/50]	300	1 ds 600
1 ds 200	100	100 [1/100]	200	1 ds 800
1 ds 250	175	75 [1/75]	250	1 ds 1000

ou

Dilutions:	Tampon (µL)	Enzyme (µL)	Volume total	dilution totale
1 ds 50	540,5	9,5 [tré]	550	1 ds 200
1 ds 75	370	5,0 [tré]	375	1 ds 300
1 ds 100	200	200 [1/50]	400	1 ds 400
1 ds 150	200	100 [1/50]	300	1 ds 600
1 ds 200	100	100 [1/100]	200	1 ds 800
1 ds 250	175	75 [1/75]	250	1 ds 1000
1 ds 300	100	100 [1/150]	200	1 ds 1200
1 ds 375	160	40 [1/75]	200	1 ds 1500

Courbe étalon : 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5,0, 6,25, 7,5 et 10mM (1^{ière} colonne de la plaque)
L'échantillonnage est pris aux temps 0,2,4,6,8,10,12 et 14 minutes. En général seule la pente initiale (0 à 10 minutes) est conservée pour les calculs d'activité.

INCUBATEURS À PARTIR

Celui de droite (position A6) à 50°C (53,7°C) et un autre à 110°C (si bloc double) ou à 115°C (si bloc simple) avec aluminium dessus.

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

- * Il est important que ces volumes minimum soient respectés sinon le robot va pipeter de l'air

A6 (Plaque dans l'incubateur à 50°C)

600µL d'H₂O dans les colonnes 1, 3 et 4, la réaction enzymatique sera faite dans la colonne 2

B5 (Plaque Axygen 1,2 mL)

750uL Acide galacturonique (GA) 40mM (mw=212,16g) colonne 2 rangée 1
* doit être récupéré

200uL Dilutions de l'enzyme dans du tampon acétate qui sera rediluée ¼ par le robot (**colonne 4**)

B4 (Réservoir "Quarter")

10mL Tampon acétate 250mM pH 5,0 (B) * doit être récupéré

10mL Tampon acétate 50mM pH 5,0 (C) * doit être récupéré

10mL PGA 1% dans H₂O autoclavé 5 minutes (D) * doit être récupéré

A5 PAHBAH Frais

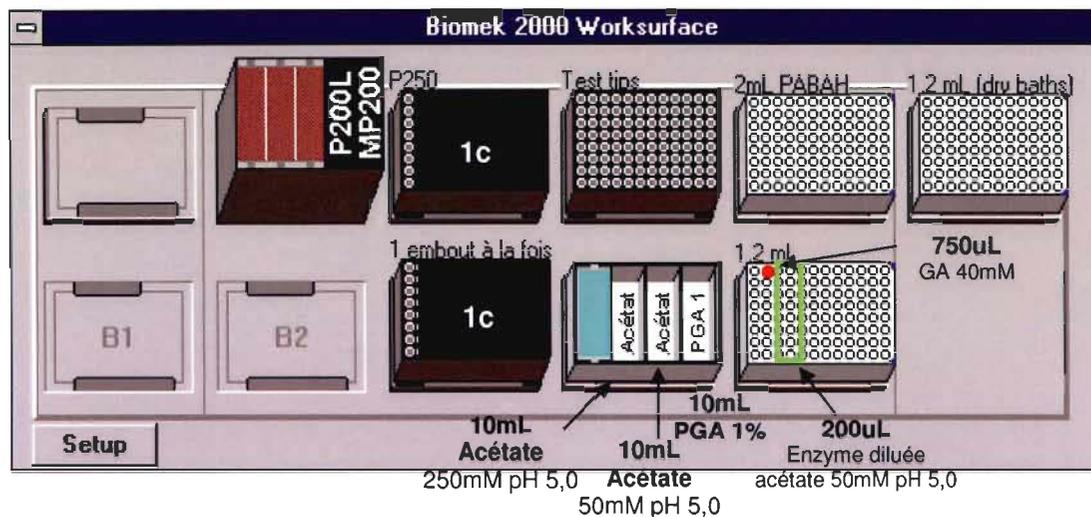
80mL PAHBAH (0,4g para hydrobenzoïque acid + 40mL NaOH 1M + 40mL H₂O)

- peut être fait une fois le programme parti.
- prendre un « aliquoteur » et aliquoter 1mL par puit dans une plaque 96 puits de 2mL (Axygen-polyprop.) (**colonnes 2 à 10**)
Mettre 1 mL d'H₂O dans les **colonnes 1, 11 et 12**
- Le robot prendra une pause et indiquera le moment de mettre la plaque sur la station de travail. Appuyer sur OK pour continuer le test.

UTILISATION DES EMBOUTS

3 boîtes de P250

Position A3	P250	Seulement 1 colonne utilisée
Position A4	Test tips	
Position B3	Tips seuls	1 colonne utilisée



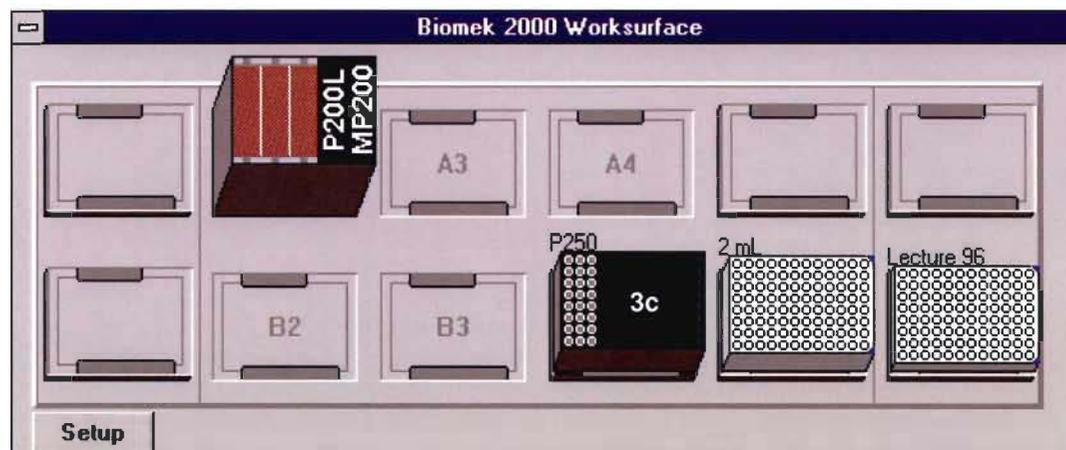
MANIPULATION DE PLAQUE À FAIRE

Avec des gants,

1. Prendre la plaque en A5
2. Mettre la plaque à 110°C pour 10 minutes
3. Vortexer et mettre sur glace + H₂O 10 minutes

TRANSFERT DE PLAQUE

1. Choisir le protocole « Transfert DOSAGE »
2. Mettre 3 colonnes de tips en B4, la plaque en B5 et une plaque de polycarbonate propre en B6



ENREGISTREMENT DES DONNÉES

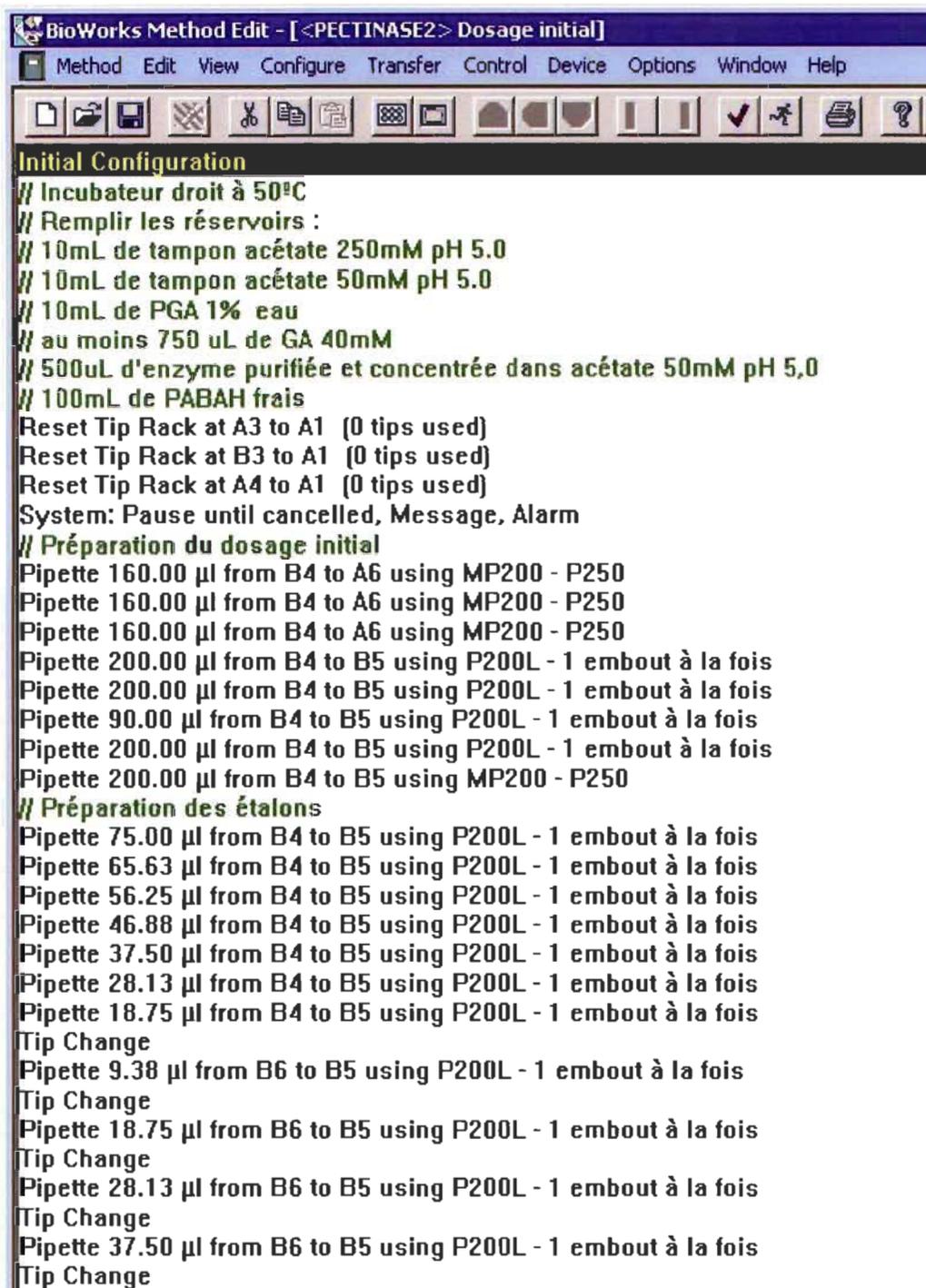
1. Ouvrir le lecteur de plaque et l'ordinateur du lecteur de plaque au moins 15 minutes à l'avance.
2. Ouvrir le logiciel Spectro
3. Choisir le programme PAHBAH (lecture à 405nm – 600nm)
4. Après la lecture des échantillons, transférer les données avec un cut and paste dans le fichier excel dans dossier/ labo beauregard/vicky/template/template Dosage 1ds100 à 1ds1000 ou 1ds200 à 1ds1500.

DURÉE DU PROTOCOLE : 24 min. + 10 min. à 110°C + 10 min. sur glace + H₂O
+ 3 minutes transfert et 3 minutes lecture

Total : 50 minutes

Programme

Dosage initial de l'activité de la PG

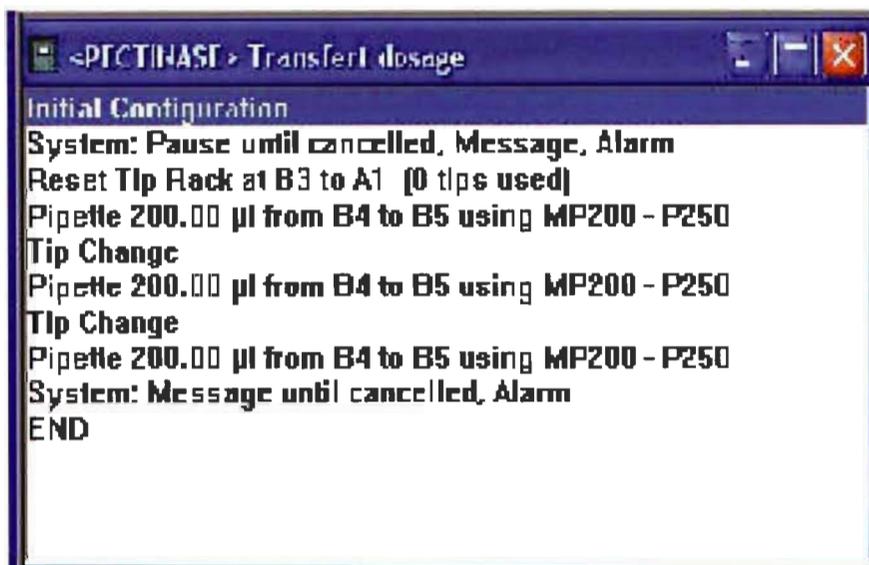


The screenshot shows the BioWorks Method Edit window for a method named '<PECTINASE2> Dosage initial'. The interface includes a menu bar (Method, Edit, View, Configure, Transfer, Control, Device, Options, Window, Help) and a toolbar with various icons for file operations and execution. The main text area contains the following configuration and protocol steps:

```

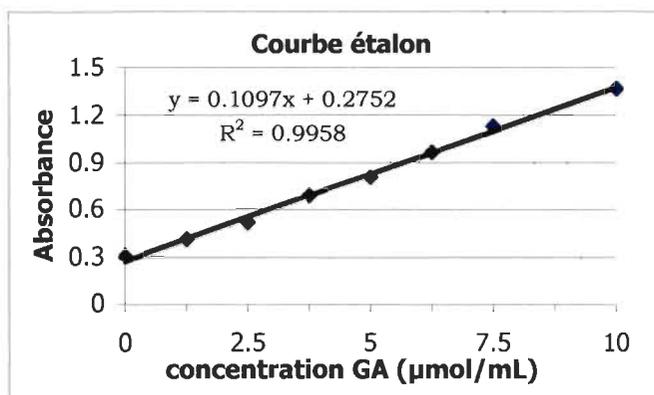
Initial Configuration
// Incubateur droit à 50°C
// Remplir les réservoirs :
// 10mL de tampon acétate 250mM pH 5.0
// 10mL de tampon acétate 50mM pH 5.0
// 10mL de PGA 1% eau
// au moins 750 uL de GA 40mM
// 500uL d'enzyme purifiée et concentrée dans acétate 50mM pH 5,0
// 100mL de PABAH frais
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at B3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
// Préparation du dosage initial
Pipette 160.00 µl from B4 to A6 using MP200 - P250
Pipette 160.00 µl from B4 to A6 using MP200 - P250
Pipette 160.00 µl from B4 to A6 using MP200 - P250
Pipette 200.00 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 90.00 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B4 to B5 using MP200 - P250
// Préparation des étalons
Pipette 75.00 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 65.63 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 56.25 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 46.88 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 37.50 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 28.13 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 18.75 µl from B4 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 9.38 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 18.75 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 28.13 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 37.50 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
  
```

Pipette 46.88 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 56.25 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 75.00 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 75.00 µl from B4 to B5 using MP200 - P250
Tip Change
Pipette 150.00 µl from B4 to B5 using MP200 - P250
Tip Change
Pipette 150.00 µl from B4 to B5 using MP200 - P250
Tip Change
Pipette 120.00 µl from B4 to A6 using MP200 - P250
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
// Test
Pipette 50.00 µl from B5 to A5 using MP200 - Test tips
Pipette 60.00 µl from B6 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Tip Change
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 200.00 µl from B5 to B5 using P200L - 1 embout à la fois
Pipette 120.00 µl from B5 to A6 using MP200 - Test tips
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:37
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:24
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:25
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:25
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:26
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:25
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:26
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:26
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause for = 00:01:25
Pipette 50.00 µl from A6 to A5 using MP200 - Test tips
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
System: Message until cancelled
END



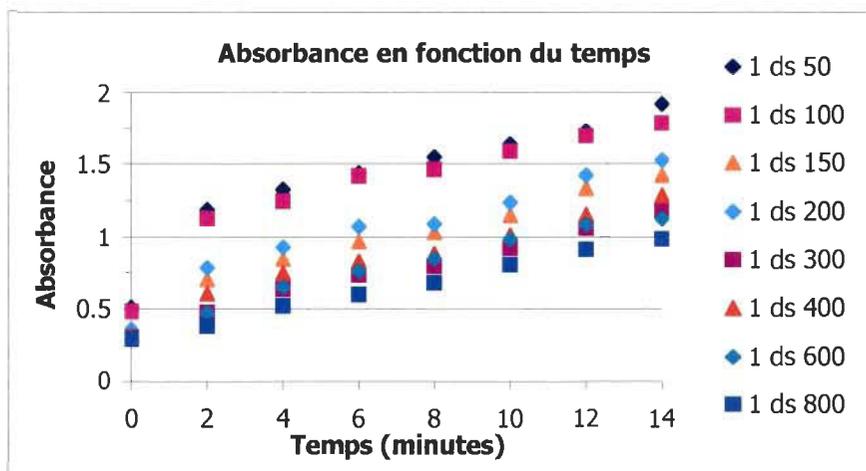
Dosage initial (données)

Date:	14-Nov-05	GA [μmol]	Abs.
protéine:	pSc	Température :	50°C
Produite le :	08-Nov	Induction:	24h
Exprimée dans :	INVSc	Vecteur:	pYes
mL de surnageant :	200	vers:	35
Concentré :	5.7142857 fois		
mg/L de protéines totales :	134.7		
Tampon:	acétate 50mM pH 5,0		
		0	0.306
		1.25	0.408
		2.5	0.513
		3.75	0.688
		5	0.802
		6.25	0.967
		7.5	1.131
		10	1.364



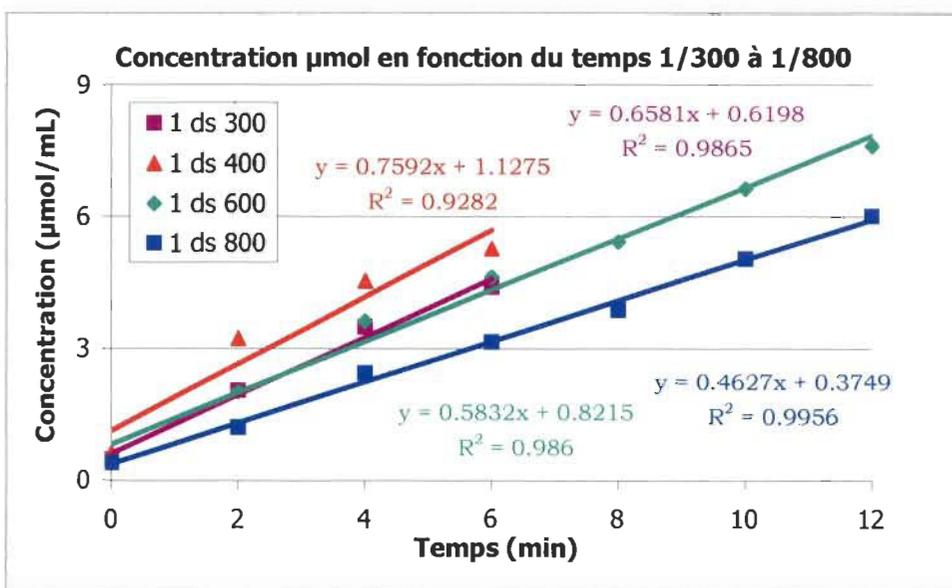
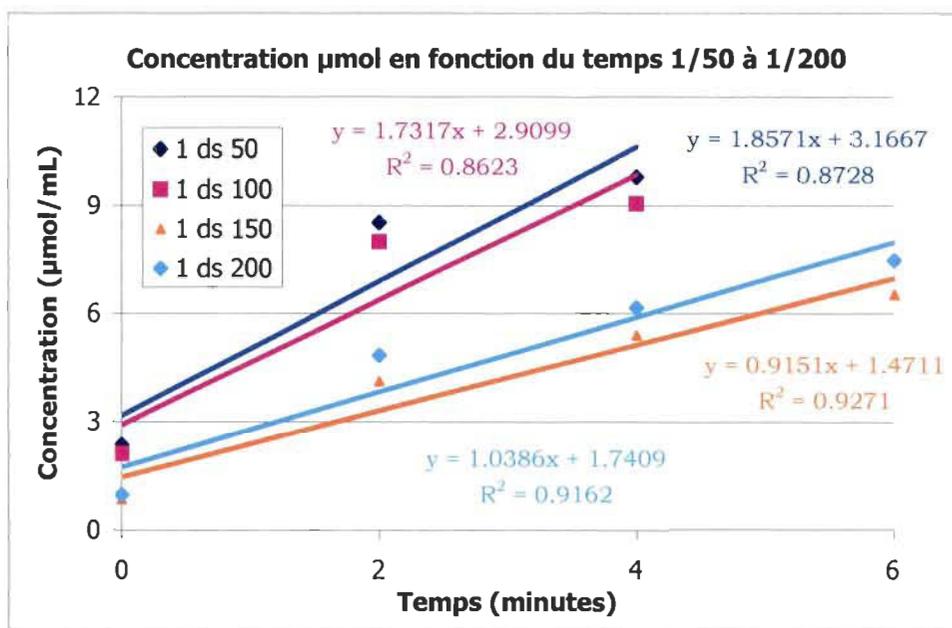
Mesure absorbance 405-600 nm

dilution	0	2	4	6	8	10	12	14
1 ds 50	0.508	1.185	1.323	1.434	1.544	1.635	1.73	1.918
1 ds 100	0.482	1.125	1.242	1.413	1.458	1.585	1.693	1.783
1 ds 150	0.343	0.701	0.843	0.965	1.029	1.148	1.331	1.421
1 ds 200	0.357	0.782	0.925	1.069	1.087	1.234	1.419	1.523
1 ds 300	0.303	0.473	0.633	0.731	0.79	0.917	1.058	1.182
1 ds 400	0.319	0.604	0.746	0.827	0.881	1.01	1.153	1.282
1 ds 600	0.293	0.47	0.647	0.756	0.844	0.978	1.083	1.126
1 ds 800	0.294	0.382	0.517	0.595	0.674	0.801	0.91	0.983



Concentration en μmol

dilution	0	2	4	6	8	10	12	14	
1 ds 50	2.348	8.518	9.776	10.788	11.790	12.620	13.486	15.199	
1 ds 100	2.111	7.971	9.038	10.596	11.007	12.164	13.148	13.969	pente :
1 ds 150	0.844	4.107	5.401	6.513	7.096	8.181	9.849	10.669	0.1097
1 ds 200	0.972	4.845	6.149	7.461	7.625	8.965	10.651	11.599	b:
1 ds 300	0.479	2.029	3.487	4.380	4.918	6.076	7.361	8.491	0.2504
1 ds 400	0.625	3.223	4.517	5.255	5.748	6.923	8.227	9.402	
1 ds 600	0.388	2.002	3.615	4.608	5.410	6.632	7.589	7.981	
1 ds 800	0.397	1.199	2.430	3.141	3.861	5.018	6.012	6.677	



pSc 8 novembre 2005

Dilutions	Inverse	Pente	U/mL	U/mg
1 ds 50	50	1.8571	16.25	120.64
1 ds 100	100	1.7317	30.30	224.98
1 ds 150	150	0.9151	24.02	178.33
1 ds 200	200	1.0386	36.35	269.87
1 ds 300	300	0.6581	34.55	256.50
1 ds 400	400	0.7592	53.14	394.54
1 ds 600	600	0.5832	61.24	454.61
1 ds 800	800	0.4627	64.78	480.91

1 ds 700 serait correcte

ANNEXE Ib

Protocole de préparation

Test d'activité de la PG dans une solution tampon

Le robot effectuera une dilution 1 dans 20 à partir de l'enzyme diluée à 15 ± 5 U/mL selon le dosage dans le tampon acétate 50mM pH 5,0

Le test est effectué en triplicata (3 plaques). Les 5 premières colonnes sont la courbe étalon et les colonnes 6 à 11, l'échantillonnage aux temps 0, 3, 6, 9, 12 et 15 minutes.

Courbe étalon : 0, 2,5; 5,0; 7,5 et 10mM

INCUBATEURS À PARTIR

Celui de droite (position A6) à la température souhaitée et 1 bloc double à 110°C et 1 bloc simple à 115°C les deux avec aluminium dessus.

Températures généralement mesurées

50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C

Tampon utilisé : Acétate/Bis-Tris 100mM (concentration constante)

pH mesurés (exemple)

pH 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25

Enzyme utilisée

Pectinase purifiée et concentrée dans du tampon acétate 50mM pH 5,0, préalablement dosée et diluée dans l'acétate 50mM pH 5,0 pour obtenir une activité de 15 ± 5 U/mL.

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

* Il est important que ces volumes minima soient respectés sinon le robot va pipeter de l'air.

Plaque de préparation de 96 puits de 2mL (B3) (Axygen-polypropylene)

Tampons	1mL de chacun des 8 tampons 5X dans la <u>colonne 4</u>
Tampons	1mL de chacun des 8 tampons 1X dans la <u>colonne 1</u> mis avec le dipenseur eppendorf en position 5

PGA1%	1,6mL de PGA 1% dans les colonnes 2 et 3 , * doit être récupéré mis avec le dipenseur eppendorf en position 8
GA 40mM	600uL d'acide galacturonique (GA) 40mM dans la colonne 5 * à récupérer mis avec le dipenseur eppendorf en position 3
Enzyme	300uL d'enzyme diluée dans l'acétate 50mM pH 5,0 pour une concentration finale de 20U/mL dans la colonne 11 * doit être récupéré

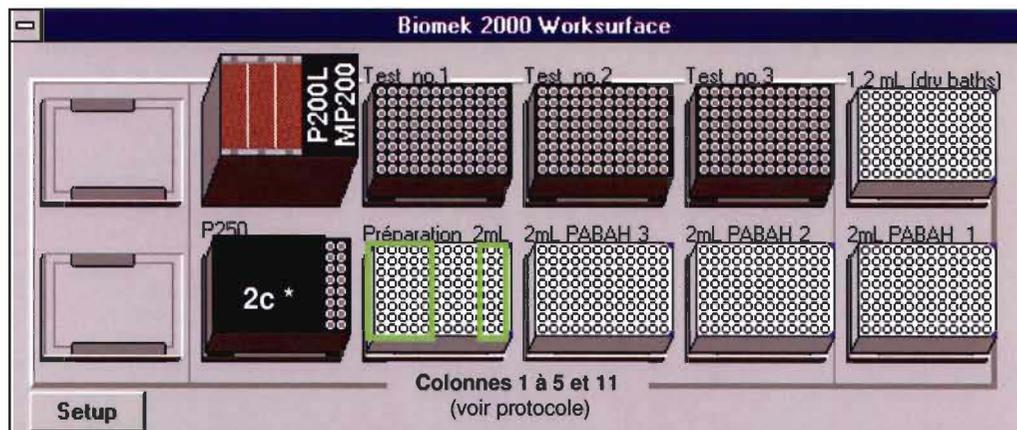
Plaque en A6 (1,2mL Axygen-polypropylene)

Mettre 600µL d'H₂O dans les **colonnes 4 et 5**

PAHBAH Frais (2mL Axygen-polypropylene)

270mL 1,35g para hydrobenzoïque acid + 135mL NaOH 1M + 135mL H₂O

- peut être fait une fois le programme parti.
- prendre un « aliquoteur » et aliquoter 1mL par puit dans 3 plaques 96 puits de 2mL (Axygen-polyprop.) (**colonnes 1 à 11**)
+ mettre 1mL d'H₂O dans **colonne 12**
- prendre Le robot prendra une pause et indiquera le moment de mettre les plaques sur la station de travail. Appuyer sur OK pour continuer le test.



UTILISATION DES EMBOUTS

3 boîtes pleines de P250 Position A3, A4, A5
2 colonnes de tips P250 Position B2*

* Si on fait 1 test 1 dosage :

Mettre un rack en B2 avec les colonnes 1 et 2 ; 5, 6, 7 et 8 pour les 3 premiers tests de la journée, ensuite prendre des racks avec les colonnes 5 à 8 de remplies. Le robot prendra les colonnes 1 et 2 pour le premier test. Ensuite, il prendra toujours les colonnes 7 et 8 aux autres tests puisqu'ils seront faits après des transferts de plaques qui prendront 6 colonnes d'un autre rack. Donc, le même rack servira plusieurs fois, il suffit de le changer de bord lorsque nécessaire.

*Si on fait deux tests deux dosages :

Mettre un rack en B2 avec les colonnes 1 à 4 et 7 à 10 pour les 4 premiers tests de la journée, ensuite prendre des racks avec les colonnes 7 à 10 (tests 5 et 6) et 7 à 10 (si tests 7 et 8, on vire le rack de bord). Le robot prendra les colonnes 1 à 4 pour les deux premiers tests. Ensuite, il prendra toujours les colonnes 7 à 10 pour tous les autres tests, puisqu'ils seront faits après des transferts de plaques qui prendront 6 colonnes d'un autre rack. Donc, le même rack servira plusieurs fois, il suffit de le changer de bord lorsque nécessaire.

MANIPULATION DES PLAQUES À FAIRE (3 fois)

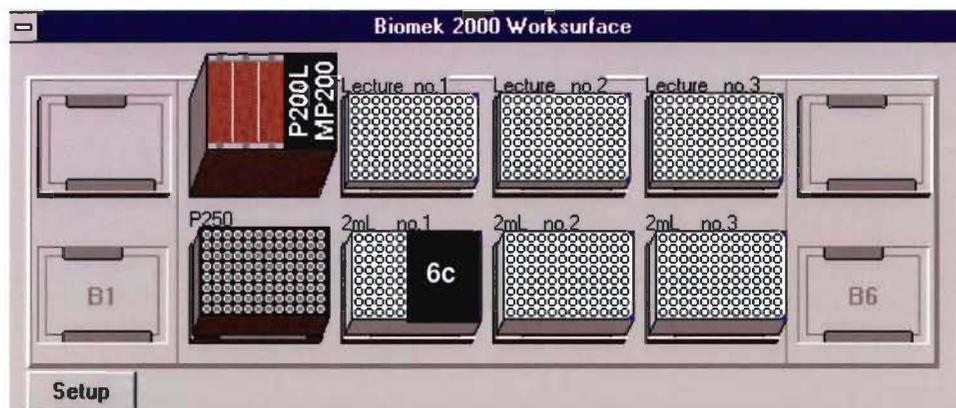
Avec des gants,

1. Prendre la plaque en B5
2. Mettre la plaque à 110°C pour 10 minutes
3. Vortexer et mettre sur glace + H₂O 10 minutes

TRANSFERT DE PLAQUE

Choisir le protocole « Transfert ACTIVITÉ »

Mettre les plaques 1, 2 et 3 en A3, A4 et A5 et des plaques de polycarbonate propres en B3, B4 et B5



ENREGISTREMENT DES DONNÉES (3 fois)

1. Ouvrir le lecteur de plaque et l'ordinateur du lecteur de plaque au moins 15 minutes à l'avance.
2. Ouvrir le logiciel Spectro
3. Choisir le programme PAHBAH (lecture à 405nm – 600nm)
4. Après la lecture des échantillons, transférer les données avec un cut and paste dans le fichier excel dans dossier/labo beauregard/vicky/template/template activité moy abs.

DURÉE DU PROTOCOLE : 40 Minutes

40 minutes + 10 minutes à 110°C + 10 minutes sur glace + H₂O + 10 minutes pour le transfert des plaques suivi de la lecture des plaques (10 minutes)

Total de 1 test = 1h20 ou 1h40

Note : Si un autre test est parti immédiatement à la suite d'un précédent pendant que les plaques chauffent... 2 tests peuvent prendre 2h.

Programme

Test d'activité de la PG dans une solution tampon

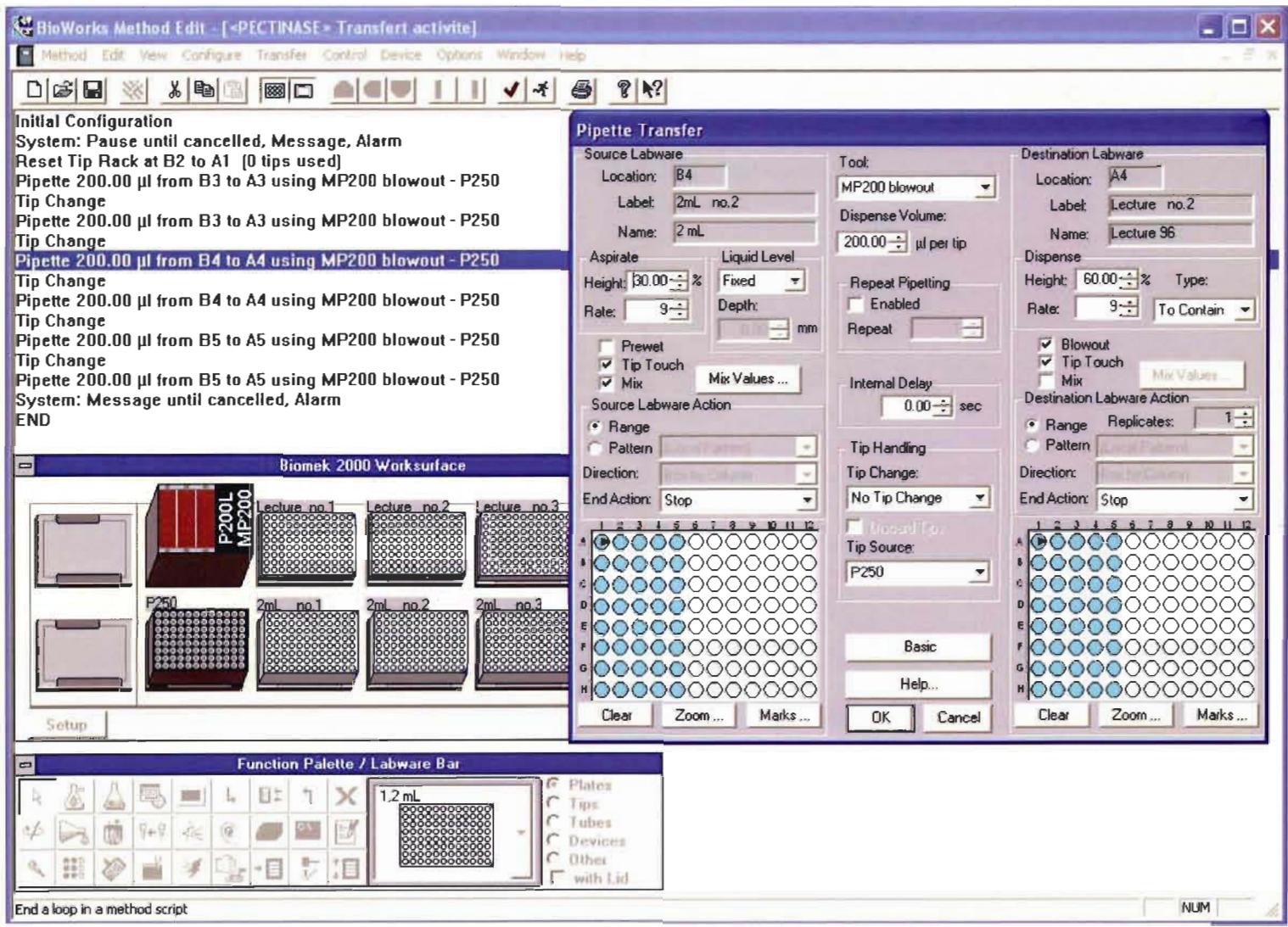
```

BioWorks Method Edit - [<PEC<INASE> Test d'activite]
Method Edit View Configure Transfer Control Device Options Window Help
Initial Configuration
// Incubateur droit à 50°C
// Remplir la plaque de préparation :
// 1 mL/puit des différents tampons 1x dans colonne 1
// 1 mL/puit des différents tampons 5x dans colonne 4
// 1 mL/puit de PGA 1% dans colonnes 2 et 3
// 600µL/puit de GA 40mM dans colonne 5
// 300µL/puit d'enzyme purifiée et diluée dans acétate 50mM pH 5,0 colonne 11
// 270mL de PABAH frais (1,35g)
Reset Tip Rack at A3 to A1 [0 tips used]
Reset Tip Rack at A4 to A1 [0 tips used]
Reset Tip Rack at A5 to A1 [0 tips used]
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
// Préparation du dosage Initial
Pipette 200.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 200.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 200.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 200.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 200.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 200.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Tip Change
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
Pipette 56.25 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
Pipette 37.50 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
Pipette 18.75 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Tip Change
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Tip Change
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Tip Change

```

Tip Change
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Tip Change
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 150.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 150.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 18.75 µl from B3 to B3 using MP200 - P250
Pipette 37.50 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.1
Pipette 56.25 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.2
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using MP200 - Test no.3
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.2
Tip Change
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.2
Tip Change
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.2
Tip Change
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.2
// Test
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Tip Change
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Tip Change
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:52
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1

System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:44
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:16
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:44
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:16
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:44
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:16
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
END



Test d'activité (données)

Date: 20-Nov-05
protéine: pKm dans INVSc
Fait le: 7 et 8 novembre 2005

Température: 50°C
Tampon: acétate bis-tris 100mM
Dilution totale 1 ds 200

Par: Mylène Gagnon

Inverse dilution 200
Concentré: 9.67 fois
mg/L de protéines totales : 133.3
 (BCA)

Données des courbes étalons

	pH 4,0			moyennécarttype	
GA=0	0.317	0.250	0.271	0.279	0.034
GA=2,5	0.589	0.660	0.666	0.638	0.043
GA=5	0.850	1.036	0.976	0.954	0.095
GA=7,5	1.119	1.170	1.179	1.156	0.032
GA=10	1.359	1.489	1.355	1.401	0.076

	pH 4,25			moyennécarttype	
	0.237	0.277	0.257	0.257	0.020
	0.512	0.580	0.613	0.568	0.052
	0.753	0.802	0.875	0.810	0.061
	0.990	1.065	1.085	1.047	0.050
	1.015	1.069	1.114	1.066	0.050

	pH 4,5			moyennécarttype	
GA=0	0.296	0.327	0.291	0.305	0.020
GA=2,5	0.640	0.723	0.645	0.669	0.047
GA=5	0.897	1.010	0.946	0.951	0.057
GA=7,5	1.140	1.265	1.193	1.199	0.063
GA=10	1.183	1.324	1.450	1.319	0.134

	pH 4,75			moyennécarttype	
	0.334	0.320	0.294	0.316	0.020
	0.576	0.584	0.597	0.586	0.011
	0.940	1.002	0.953	0.965	0.033
	1.093	1.373	1.200	1.222	0.141
	1.586	1.586	1.534	1.569	0.030

	pH 5,0			moyennécarttype	
GA=0	0.322	0.330	0.305	0.319	0.013
GA=2,5	0.649	0.689	0.634	0.657	0.028
GA=5	0.898	1.086	0.899	0.961	0.108
GA=7,5	1.106	1.243	1.245	1.198	0.080
GA=10	1.434	1.535	1.507	1.492	0.052

	pH 5,25			moyennécarttype	
	0.369	0.307	0.284	0.320	0.044
	0.617	0.654	0.604	0.625	0.026
	1.027	1.188	1.098	1.104	0.081
	1.284	1.443	1.334	1.354	0.081
	1.566	1.716	1.602	1.628	0.078

	pH 5,5			moyennécarttype	
GA=0	0.328	0.319	0.312	0.320	0.008
GA=2,5	0.710	0.770	0.671	0.717	0.050
GA=5	1.107	1.196	1.171	1.158	0.046
GA=7,5	1.256	1.361	1.380	1.332	0.067
GA=10	1.603	1.703	1.435	1.580	0.135

	pH 5,75			moyennécarttype	
	0.259	0.271	0.257	0.262	0.008
	0.688	0.723	0.665	0.692	0.029
	1.065	1.153	1.018	1.079	0.069
	1.267	1.462	1.278	1.336	0.110
	1.628	1.630	1.433	1.564	0.113

Courbes étalons

[μ mol]	0	2.5	5	7.5	10
pH 4,0	0.279	0.638	0.954	1.156	1.401
pH 4,25	0.257	0.568	0.810	1.047	1.066
pH 4,5	0.305	0.669	0.951	1.199	1.319
pH 4,75	0.316	0.586	0.965	1.222	1.569
pH 5,0	0.319	0.657	0.961	1.198	1.492
pH 5,25	0.320	0.625	1.104	1.354	1.628
pH 5,5	0.320	0.717	1.158	1.332	1.580
pH 5,75	0.262	0.692	1.079	1.336	1.564

Données des absorbances

	Abs. pH 4,0					Abs. pH 4,25				
	moyenne:cart-type					moyenne:cart-type				
t=0	0.247	0.254	0.215	0.239	0.021	0.275	0.261	0.227	0.254	0.025
t=3	0.608	0.523	0.411	0.514	0.099	0.782	0.609	0.366	0.586	0.209
t=6	1.095	0.872	0.745	0.904	0.177	1.323	0.960	0.570	0.951	0.377
t=9	1.487	1.266	1.012	1.255	0.238	1.619	1.243	0.867	1.243	0.376
t=12	1.361	1.560	1.144	1.355	0.208	1.817	1.528	1.021	1.455	0.403
t=15	1.906	1.790	1.313	1.670	0.314	1.937	1.822	1.222	1.660	0.384

	Abs. pH 4,5					Abs. pH 4,75				
	moyenne:cart-type					moyenne:cart-type				
t=0	0.288	0.276	0.236	0.267	0.027	0.297	0.286	0.243	0.275	0.029
t=3	0.811	0.493	0.315	0.404	0.126	0.801	0.526	0.318	0.664	0.242
t=6	1.351	0.820	0.473	0.647	0.245	1.307	0.998	0.510	1.153	0.402
t=9	1.597	1.097	0.672	0.885	0.301	1.518	1.240	0.682	1.379	0.426
t=12	1.731	1.312	0.842	1.077	0.332	1.692	1.353	0.834	1.523	0.432
t=15	1.930	1.615	1.060	1.338	0.392	1.805	1.611	1.025	1.708	0.406

	Abs. pH 5,0					Abs. pH 5,25				
	moyenne:cart-type					moyenne:cart-type				
t=0	0.297	0.278	0.248	0.274	0.025	0.294	0.282	0.264	0.280	0.015
t=3	0.710	0.512	0.328	0.420	0.130	0.668	0.560	0.322	0.441	0.168
t=6	1.173	0.866	0.504	0.685	0.256	1.055	0.916	0.513	0.715	0.285
t=9	1.393	1.173	0.701	0.937	0.334	1.284	1.176	0.679	0.928	0.351
t=12	1.529	1.307	0.796	1.052	0.361	1.444	1.302	0.808	1.055	0.349
t=15	1.718	1.516	0.975	1.246	0.383	1.581	1.528	0.935	1.232	0.419

	Abs. pH 5,5					Abs. pH 5,75				
	moyenne:cart-type					moyenne:cart-type				
t=0	0.294	0.278	0.256	0.276	0.019	0.275	0.274	0.257	0.269	0.010
t=3	0.643	0.485	0.322	0.483	0.161	0.425	0.434	0.279	0.379	0.087
t=6	1.012	0.798	0.432	0.747	0.293	0.697	0.670	0.367	0.578	0.183
t=9	1.224	1.071	0.581	0.959	0.336	0.947	0.851	0.492	0.763	0.240
t=12	1.322	1.226	0.719	1.089	0.324	1.134	1.027	0.590	0.917	0.288
t=15	1.486	1.324	0.820	1.210	0.347	1.294	1.210	0.739	1.081	0.299

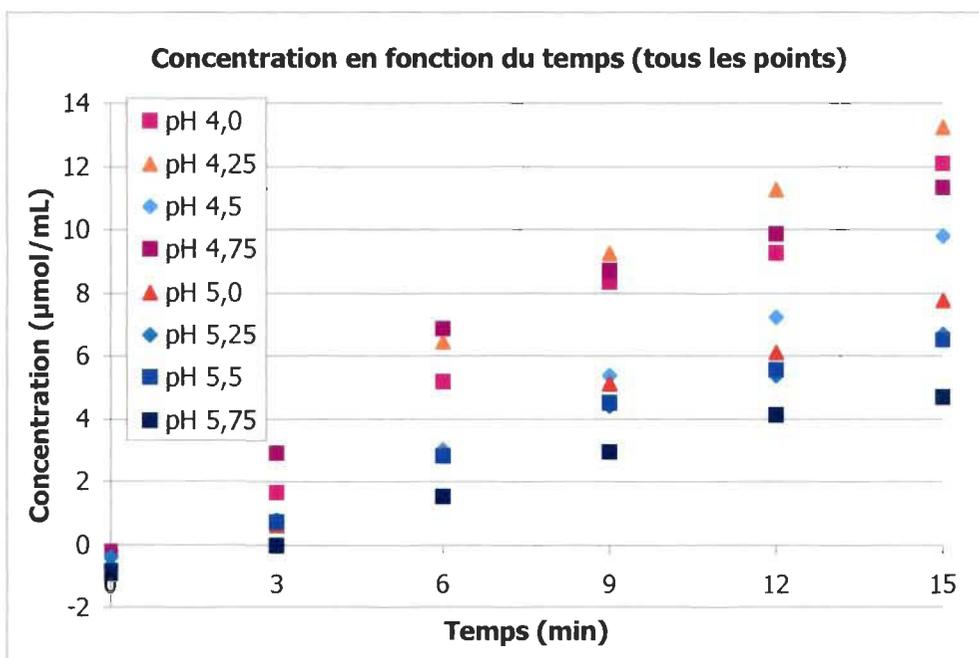
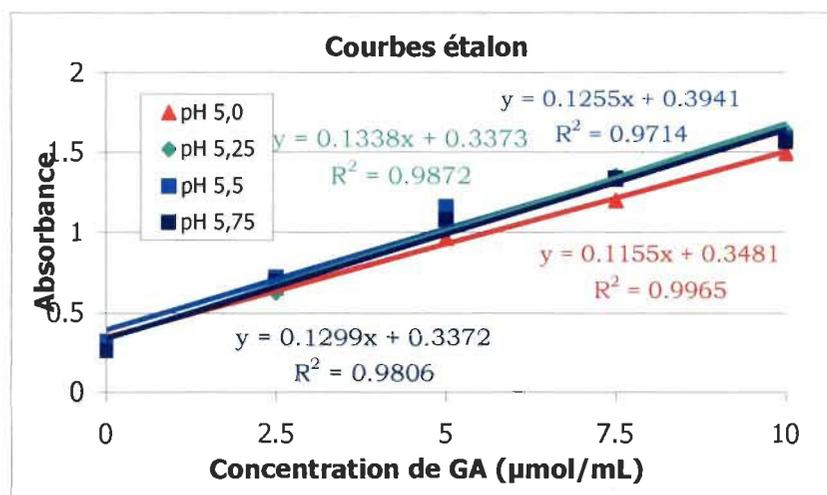
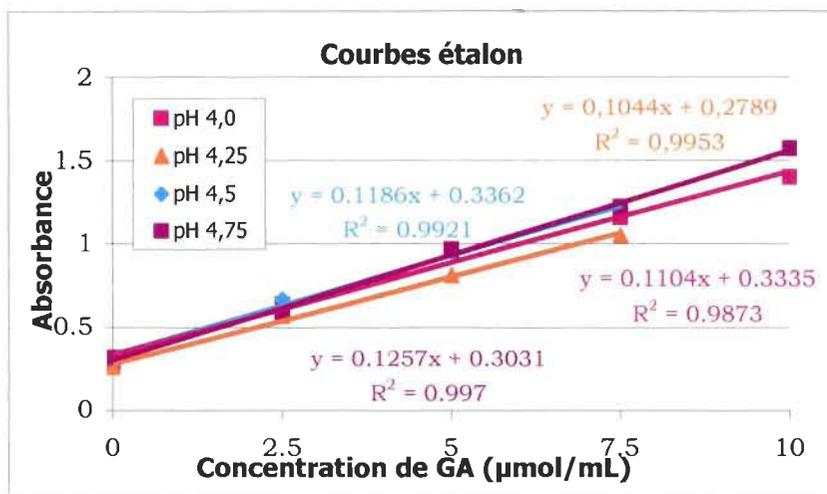
Moyenne des absorbance pour les triplicatas aux différents pH

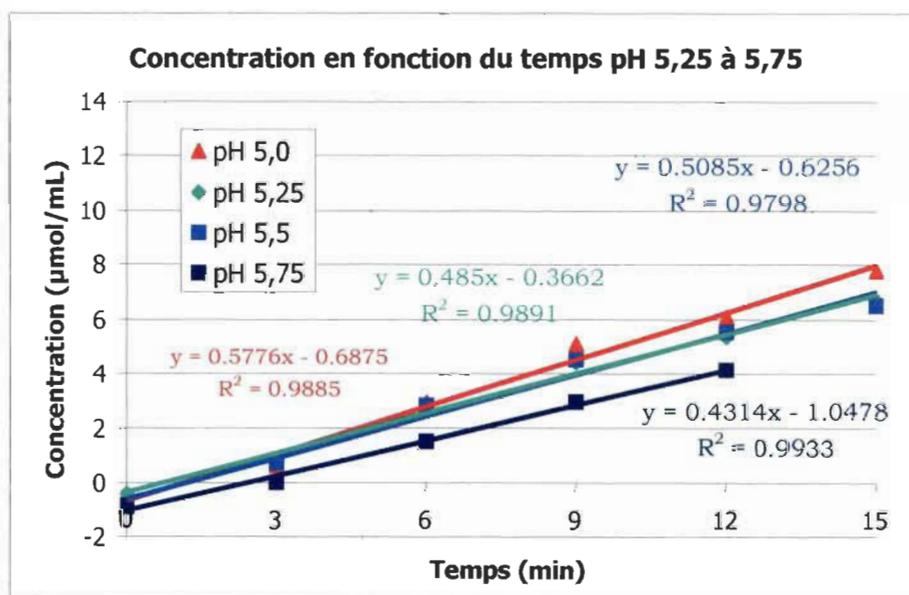
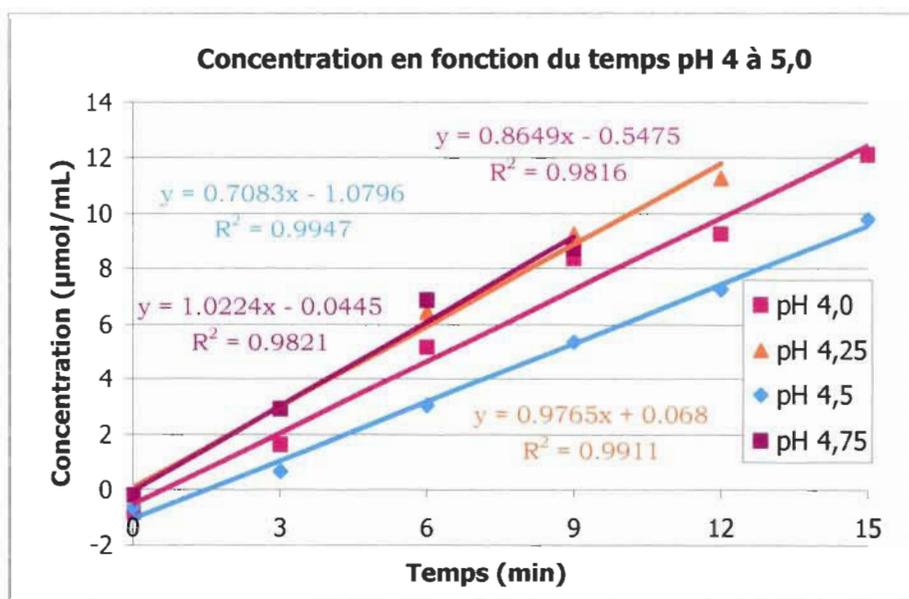
Moyenne	pH 4,0	pH 4,25	pH 4,5	pH 4,75	pH 5,0	pH 5,25	pH 5,5	pH 5,75
0	0.239	0.254	0.267	0.275	0.274	0.280	0.276	0.269
3	0.514	0.586	0.404	0.664	0.420	0.441	0.483	0.379
6	0.904	0.951	0.647	1.153	0.685	0.715	0.747	0.578
9	1.255	1.243	0.885	1.379	0.937	0.928	0.959	0.763
12	1.355	1.455	1.077	1.523	1.052	1.055	1.089	0.917
15	1.670	1.660	1.338	1.708	1.246	1.232	1.210	0.990

[μmol] calculée à partir des équations des courbes étalon

[μmol]	pH 4,0	pH 4,25	pH 4,5	pH 4,75	pH 5,0	pH 5,25	pH 5,5	pH 5,75
0	-0.859	-0.235	-0.679	-0.224	-0.639	-0.428	-0.941	-0.867
3	1.634	2.938	0.662	2.909	0.623	0.775	0.711	-0.014
6	5.166	6.436	3.032	6.856	2.918	2.819	2.815	1.516
9	8.344	9.232	5.357	8.684	5.100	4.412	4.500	2.943
12	9.249	11.266	7.238	9.842	6.092	5.365	5.539	4.126
15	12.099	13.229	9.783	11.340	7.772	6.684	6.503	4.688

Pente:	0.1104	0.1044	0.1023	0.1239	0.1155	0.133786667	0.1255	0.1299
b:	0.3335	0.2789	0.3362	0.3031	0.3481	0.3373	0.3941	0.3812





Dosage à partir des pentes de régression

	pende	U/r	U/mg
pH 4,0	0.8649	18	134.2
pH 4,25	0.9765	20	151.51
pH 4,5	0.7083	15	109.9
pH 4,75	1.0224	21	158.63
pH 5,0	0.5776	12	89.619
pH 5,25	0.485	10	75.251
pH 5,5	0.5085	11	78.898
pH 5,75	0.4314	8.9	66.935

ANNEXE Ic
Protocole de préparation

Test de stabilité de la PG dans une solution tampon

Évaluer la stabilité de l'enzyme pour une température souhaitée et ce à 16 pH différents pour une durée de 0, ½h, 1h 1h30, 2h et 3h; puis à 6h, 12h 24h, 36h, 48h, 3j, 4j, 5j,...

Dilution 1 dans 10; puis 1 dans 20 (total de 1 dans 200) à partir de l'enzyme ajustée à 150 ±50 U/mL selon le dosage dans le tampon acétate 50mM pH 5,0

Courbe étalon : 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5,0, 6,25, 7,5 et 10mM. L'échantillonnage est pris aux temps 0,3,6,9,12,15 (18) minutes. En général seule la pente initiale (0 à 12 minutes) est conservée pour les calculs d'activité.

Températures généralement mesurées :

50 °C, 55 °C, 57,5 °C, 60 °C, 65 °C

Tampon généralement utilisé : Acétate/Bis-Tris 100mM (concentration constante)

pH généralement mesurés :

pH 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25

Enzyme utilisée

Pectinase purifiée et concentrée dans du tampon acétate 50mM pH 5,0, préalablement dosée et diluée (ou concentrée) dans l'acétate 50mM pH 5,0 pour obtenir une activité de 150U/mL.

INCUBATEURS À PARTIR

Celui de droite (position A6) à 50 °C (53,7°C) et celui de gauche (A1) à la température souhaitée + 1 bloc double à 110 °C et 1 bloc simple à 115°C les deux avec de l'aluminium dessus.

Allumer : - A1 à la température souhaitée
 - A6 à 53,7°C (prend ≈ 20 min. à s'équilibrer)
 - Un bloc double à 110°C
 - Un bloc simple à 115°C
 - Un incubateur simple à 53,7 °C pour préincubation du PGA 1%

Allumer le robot, lorsqu'il fait un toc, allumer l'ordinateur

Pendant le 20 minutes de réchauffage des blocs :

Préparer 6 plaques de PGA 1%, mettre une en A6 et une autre en préincubation
 Préparer la plaque avec les tampons pour l'incubation de la PG (la mettre en A1)
 Préparer la plaque de préparation et la mettre en B3
 Mettre les boîtes de tips, mettre les tampons acétate dans les réservoirs

Temps 0

Lorsque les incubateurs en A1 et A6 sont à la bonne température ou presque, partir le test. Le temps zéro commence 14 minutes après que le programme ait été démarré, donc les incubateurs ont encore 14 min. pour s'équilibrer.

Pendant ce 14 min. :

Préparer les plaques de PAHBAH
 Aller chercher de la glace et de l'eau distillée

Après 9 min, une alarme va sonner pour dire d'enlever le tapis hermétique en A6

Après environ 13 min, enlever le tapis hermétique en A1

Une alarme sonne après 14 min. faire OK (enlever le tapis) et partir un timer, le temps 0 commence.

Notez qu'aussitôt qu'un test est terminé, une nouvelle plaque de PGA 1% (préincubée à 50°C) doit être mise en A6. De plus, les plaques de PAHBAH doivent être prêtes avant le début du test suivant.

Autres durées d'incubation à partir de 6h00 d'incubation

Le temps 0 des tests effectués à partir de 6h est exactement 14 minutes après avoir appuyé sur le bouton START (Donc, par exemple, le test de 6h doit être débuté 5h46min après le premier temps zéro. L'incubateur en A6 doit être à 53,7°C et une plaque de PGA 1% doit être incubée, la température doit être équilibrée.

- 30 minutes Allumez le robot et les 3 incubateurs (celui en A1 reste toujours allumé).
 Lorsque le robot fait toc, allumez l'ordinateur
 Mettre les racks de tips en place
 Mettre les tampons acétate dans les réservoirs
 Préparer la plaque de préparation
- 14 minutes Appuyez sur le bouton Start
 Préparer les plaques de PAHBAH
 Aller chercher de la glace et de l'eau distillée

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

- * Il est important que ces volumes minimum soient respectés sinon le robot va pipeter de l'air

Pour tous les temps

(Préparer 6 plaques X 6 colonnes (ou 3 plaques X 12 colonnes) d'avance pour les temps 0 à 3h et 6 colonnes pour les autres tests après 3h)

Plaque de test 1,2mL (mise dans un incubateur à 50°C 30 min. avant le test)

PGA 1% 400uL de PGA 1% dans les **colonnes 1 à 6** avec le dispenser en position 2 + 400µL H₂O dans les **colonnes 7 et 8** ou dans les **colonnes 1 à 12**, mais on garde un tapis hermétique sur les 6 colonnes qui sont non utilisées pour un temps et on tourne la plaque de bord lorsque le test est terminé pour faire le 2^e temps.

PAHBAH Frais (à chaque test = aux 1/2heure au début)

300mL 1,5g para hydrobenzoïque acid + 150mL NaOH 1M + 150mL H₂O

- peut être fait une fois le programme parti.
- prendre un « aliquoteur » et aliquoter 1mL par puit dans 3 plaques 96 puits de 2mL (Axygen-polypropylène)
- Le robot prendra une pause et indiquera le moment de mettre les plaques sur la station de travail. Appuyer sur OK pour continuer le test.

Pour les temps de 0 à 3h

Réservoirs (B1)

Tampons « quarter » (C) et « quarter » (D)
 20 mL de tampon acétate 250mM pH 5,0 * doit être récupéré
 20 mL de tampon acétate 50mM pH 5,0 * doit être récupéré

Plaque de préparation de 96 puits de 1,2mL (B3) (Axygen-polypropylène)

Préparer une seule plaque pour les tests 0 à 3h, et la laisser là jusqu'à la fin.

PGA 1% 800uL de PGA 1% dans chaque puit de la **colonne 1**, mis avec le dipenseur eppendorf en position 4

GA 40mM 1mL GA 40mM dans le 1^{er} puit de la colonne 2 * doit être récupéré

Plaque d'incubation de 96 puits de 1,2mL (A1) (Axygen-polypropylene)

Programme stabilité 0h à 3h (50°C) = longue durée

Colonne 1 à 3 900µL de 8 tampons 1X (position 4½)
 Colonne 4 à 5 900µL de autres 8 tampons 1X
 + 800uL d'enzyme dans la colonne 4 de la colonne de préparation

Programme stabilité 0h à 3h (hautes températures)

Colonne 1 à 3 500µL de 8 tampons 1X (position 2½)
 Colonne 4 à 5 500µL de 8 autres tampons 1X
 + 600uL d'enzyme dans la colonne 4 de la colonne de préparation

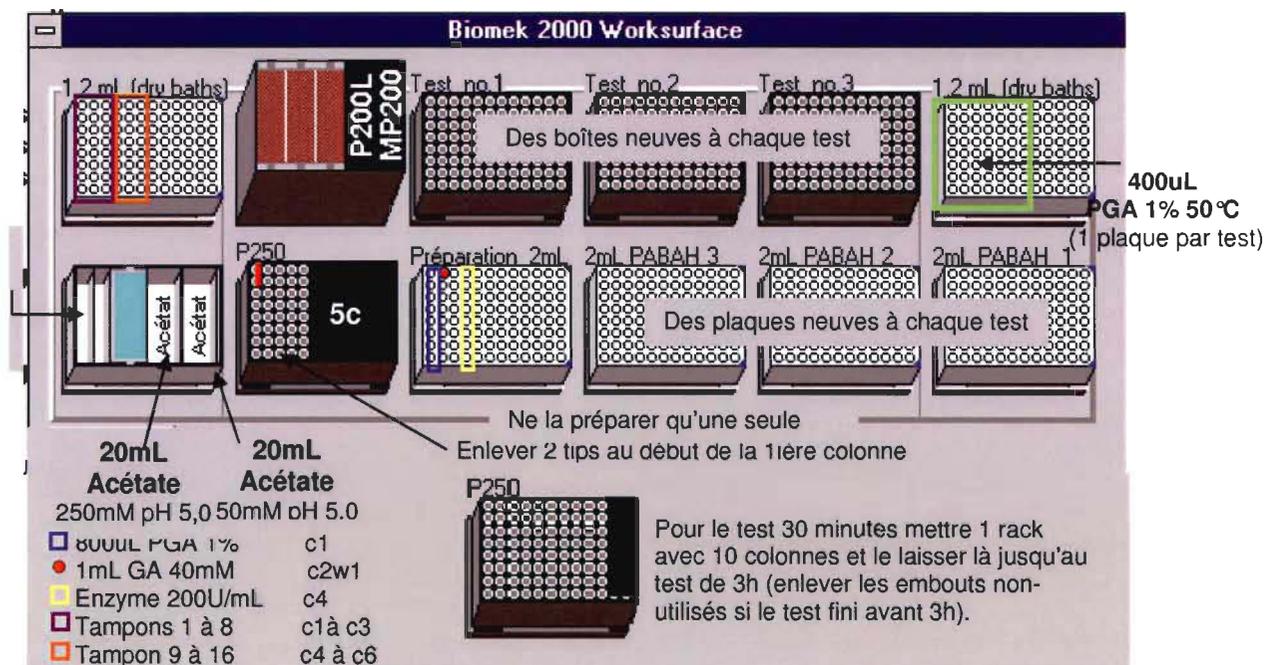
Programme stabilité 0h à 2h = court (57,5°C en montant)

Colonne 1 à 3 300uL de 8 tampons 1x (position 1½)
 Colonne 4 à 5 300uL de 8 autres tampons 1x
 + 400uL d'enzyme dans la colonne 4 de la colonne de préparation

Dans chacun des cas ci-dessus, mettre le même volume d'H₂O dans les **colonnes 7 et 8** en A1

Note : Les transferts de plaque pour les 5 tests entre 0h et 2h se font à la main. La pipette multi-channel est utilisée. Le transfert du test de 3h peut être fait par le robot.

Attention : Étalons test temps 0 : 1 colonne par plaque : p1c7, p2c1 et p3c3.
 Étalons autres temps : 1 colonne par plaque : p1c12, p2c6 et p3c12.
 La même série d'embouts est utilisée pour les étalons. 1 série d'embouts est utilisée pour les temps 0 à 18 min pour les pH 1 à 8 et une autre pour les temps 1 à 15 min pour les pH 9 à 16.



Pour chaque autre test aux temps de 6h à x jours (programme stabilité 30 minutes)

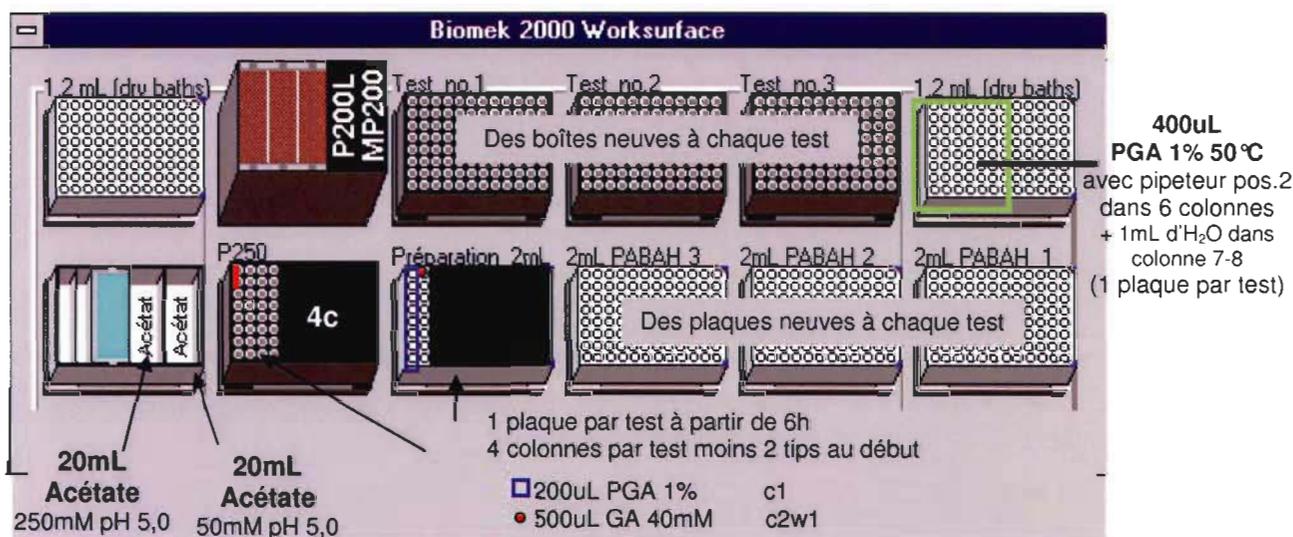
Plaque de préparation de 96 puits de 1,2mL (B3) (Axygen-polypropylene)

PGA1% 200uL de PGA 1% dans chaque puit de la **colonne 1**,
mis avec le dipenseur eppendorf en position 1

GA 40mM 500uL GA 40mM dans le 1^{er} puit de la **colonne 2** * doit être récupéré

Réservoirs Quarter (B1)

Tampon 20 mL de tampon acétate 250mM pH 5,0 (C) * doit être récupéré
20 mL de tampon acétate 50mM pH 5,0 (D) * doit être récupéré



UTILISATION DES EMBOUTS

Des nouveaux pour chaque test : aux 30 minutes au début

3 boîtes pleines de P250 Position A3, A4, A5

Pour le premier test seulement

5 colonnes de P250 Position B2
Enlever 2 tips au début de la 1^{ière} colonne

Pour les autres tests jusqu'à 3h inclus (2 colonnes par tests sont utilisées)

1 x 10 colonnes de tips P250 Position B2

Pour chaque test à partir du test de 6h

4 colonnes de tips P250 Position B2
Enlever 2 tips au début de la 1^{ière} colonne

DURÉE DU PROTOCOLE :

4h00 les premiers (3h30 sans le chauffage des plaques), environ 1h00 les autres (32 minutes sans le chauffage des plaques)

MANIPULATION DES PLAQUES À FAIRE

Avec des gants,

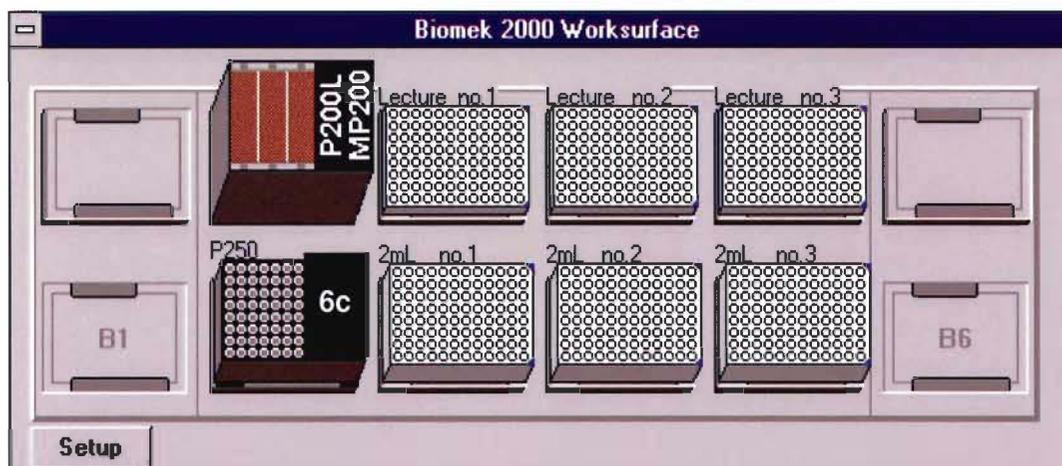
1. Prendre les plaques en B4 (3), B5 (2) et B6 (1)
2. Mettre la plaque à 110°C pour 10 minutes
3. Vortexer et mettre sur glace + H₂O 10 minutes

TRANSFERT DE PLAQUES (pour les tests à partir de 3h)

Choisir le protocole « Transfert Stabilité »

Mettre les plaques 1, 2 et 3 en A3, A4 et A5 et des plaques de polycarbonate propres en B3, B4 et B5

Attention les courbes étalons sont transférées en premier dans les 3 plaques de lecture



ENREGISTREMENT DES DONNÉES (3 fois)

1. Ouvrir le lecteur de plaque et l'ordinateur du lecteur de plaque au moins 15 minutes à l'avance.
2. Ouvrir le logiciel Spectro
3. Choisir le programme PAHBAH (lecture à 405nm – 600nm)
4. Après la lecture des échantillons, transférer les données avec un cut and paste dans le fichier excel dans dossier/lab0 beauregard/vicky/template/
 - Template stabilité-A (pour temps 0 à 1h30)
 - Template stabilité-B (pour temps 2 et 3h)
 - Template stabilité-C (pour temps 6 à 72h)

Programmes

Test de stabilité de 0 à 3h de la PG dans une solution tampon



```

BioWorks Method Edit - [<PECTINASE2> Stabilité 0h à 3h]
Method Edit View Configure Transfer Control Device Options Window Help

Initial Configuration
// Incubateur droit à 50°C
// Incubateur gauche à T°C souhaitée
// 400uL/puit de PGA 1% eau dans les colonnes 1 à 6 de la plaque 1,2mL qui sera en position A6
// Remplir la plaque de préparation :
// 800uL/puit de PGA 1% eau dans la colonne 1 de la plaque en position B3
// 1mL de GA 40mM dans le 1ier puit de la colonne 2
// 1mL/puit des 8 différents tampons 1x dans colonnes 3, 4 et 5
// 1mL/puit des 8 autres tampons 1x dans colonnes 6, 7 et 8
// 20mL de tampon Acétate 250mM dans réservoir C
// 20mL de tampon Acétate 50mM dans réservoir D
// 3mL d'enzyme dans le réservoir A1 (concentrée puis diluée dans du tampon Acétate 50mM pH 5
// 3 x 100mL de PABAH frais                                pour que cette dilution x 1/200 donne la dilution finale
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at B2 to A1 (0 tips used)
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
// Préparation
Begin Loop: Count = 3
Pipette 180.00 µl from B3 to A1 using MP200 - P250
End Loop
Begin Loop: Count = 3
Pipette 180.00 µl from B3 to A1 using MP200 - P250
End Loop
// Préparation des étalons
Reset Tip Rack at B2 to C3 (18 tips used)
Pipette 200.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 175.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 150.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 125.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 100.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 75.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 50.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 25.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 50.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 75.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250

```

Pipette 125.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 150.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 200.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 200.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
System: Message until cancelled
System: Pause for = 00:05:54
// Test 0 minute
System: Message until cancelled, Alarm
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 60.00 µl from B1 to A1 using MP200 - Test no.1
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 60.00 µl from B1 to A1 using MP200 - Test no.1
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
Pipette 60.00 µl from B1 to A1 using MP200 - Test no.1
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:25
Pipette 60.00 µl from B1 to A1 using MP200 - Test no.2
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
Pipette 60.00 µl from B1 to A1 using MP200 - Test no.2
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
Pipette 60.00 µl from B1 to A1 using MP200 - Test no.2
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:26
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3

System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:22
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:05
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:26
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
// Étalons
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause for = 00:01:00
System: Message until cancelled, Alarm
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at B2 to A1 (0 tips used)

```
// Test 30 minutes
System: Pause for = 00:05:26
System: Message until cancelled
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:06
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:38
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:07
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
```

Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:31
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
// Étalons
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause for = 00:01:00
System: Message until cancelled, Alarm
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
// Test 1h
System: Pause for = 00:06:59
System: Message until cancelled
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:06
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:38

Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:07
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:31
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02

Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
// Étalons
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause for = 00:01:00
System: Message until cancelled, Alarm
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
// Test 1h30m
System: Pause for = 00:06:59
System: Message until cancelled
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:06
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:38
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:07
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1

Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:31
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
// Étalons
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause for = 00:01:00
System: Message until cancelled, Alarm
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)

// Test 2h**System: Pause for = 00:06:59****System: Message until cancelled****Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250****Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Tip Change****System: Pause for = 00:00:06****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Tip Change****System: Pause for = 00:00:02****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:38****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Tip Change****System: Pause for = 00:00:02****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Tip Change****System: Pause for = 00:00:04****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****System: Pause for = 00:00:07****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:01****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:02****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:01****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:03**

Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:31
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3

// Étalons

Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause for = 00:01:00
System: Message until cancelled, Alarm
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)

// Test 3h

System: Pause for = 00:36:59
System: Message until cancelled
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:06
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1

Tip Change**System: Pause for = 00:00:02****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:38****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Tip Change****System: Pause for = 00:00:02****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Tip Change****System: Pause for = 00:00:04****Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****System: Pause for = 00:00:07****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:01****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:02****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:01****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****System: Pause for = 00:00:03****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****System: Pause for = 00:00:31****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****System: Pause for = 00:00:01****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****System: Pause for = 00:00:03****Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3****Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2****System: Pause for = 00:00:01**

Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
// Étalons
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause for = 00:01:00
System: Message until cancelled, Alarm
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
System: Message until cancelled, Alarm
END

Test de stabilité (tous les autres temps) de la PG dans une solution tampon

```

BioWorks Method Edit - [<PECTINASE2> Stabilité 1 temps]
Method Edit View Configure Transfer Control Device Options Window Help

Initial Configuration
// Incubateur droit à 50°C
// Incubateur gauche à T°C souhaitée
// 400uL/puit de PGA 1% eau dans les colonnes 1 à 6 de la plaque 1,2mL (
// Remplir la plaque de préparation : qui sera en position A6
// 200uL/puit de PGA 1% eau dans la colonne 1 de la plaque en position B3
// 500uL de GA 40mM dans le 1ier puit de la colonne 2
// 1mL/puit des 8 différents tampons 1x dans colonnes 3, 4 et 5
// 1mL/puit des 8 autres tampons 1x dans colonnes 6, 7 et 8
// 20mL de tampon Acétate 250mM dans réservoir C
// 20mL de tampon Acétate 50mM dans réservoir D
// 3 x 100mL de PABAH frais
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at B2 to A1 (0 tips used)
Pipette 50.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 43.75 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 37.50 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 31.25 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 25.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 18.75 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 12.50 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 6.25 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 12.50 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 18.75 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 25.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 31.25 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 37.50 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 50.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Reset Tip Rack at B2 to A3 (16 tips used)
Pipette 50.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
System: Pause for = 00:01:45
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 80.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change

```

System: Pause for = 00:00:06
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:38
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 20.00 µl from A1 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:07
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:31
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:03
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2

System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:02
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:01
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
// Étalons
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled, Alarm
END

ANNEXE Id
Protocole de préparation

Dosage préliminaire du PGA dans la pâte

INCUBATEURS À PARTIR

Les deux incubateurs du robot doivent être équilibrés à la température souhaitée (indépendamment l'un de l'autre si nécessaire) avec les blocs chauffants noirs pour les plaques de 2mL, et l'incubateur 2 places doit être mis à 110°C avec du papier d'aluminium sur les blocs chauffants noirs pour les plaques de 1,2mL.

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

A2 (Réservoir "Quarter")

- 4mL d'enzyme conc. ou de surnageant (A1)...12uL sera ajouté à 1,2mL de filtrat
- 4mL de tampon acétate 50mM pH 5,0 ou de surnageant inactivé 5minutes dans l'eau bouillante si l'enzyme utilisée n'a pas été purifiée (= blanc) (A2)

A1 et A6 (plaques axygen 2mL 96 puits en polypropylène)

- 1,2mL de filtrat mis avec le dispenser Eppendorf (position 6) colonnes 1 à 6
1 filtrat par ligne jusqu'à concurrence de 8pH (pour une T°C)
- 1,2mL d'eau dans les colonnes 7 et 8

pH\temps	0'	0'	1'	2'30s	5'	10'	H ₂ O	H ₂ O				
4,6	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
4,8	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
5,0	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
5,2	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
5,4	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
5,6	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
5,8	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						
6,0	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL						

MANIPULATION DE PLAQUE À FAIRE

Pour chacune des plaque de 2mL... celle de gauche (A1), puis celle de droite (A6)

Lorsque l'alarme sonne (après presque 6 minutes du début du pipetage)

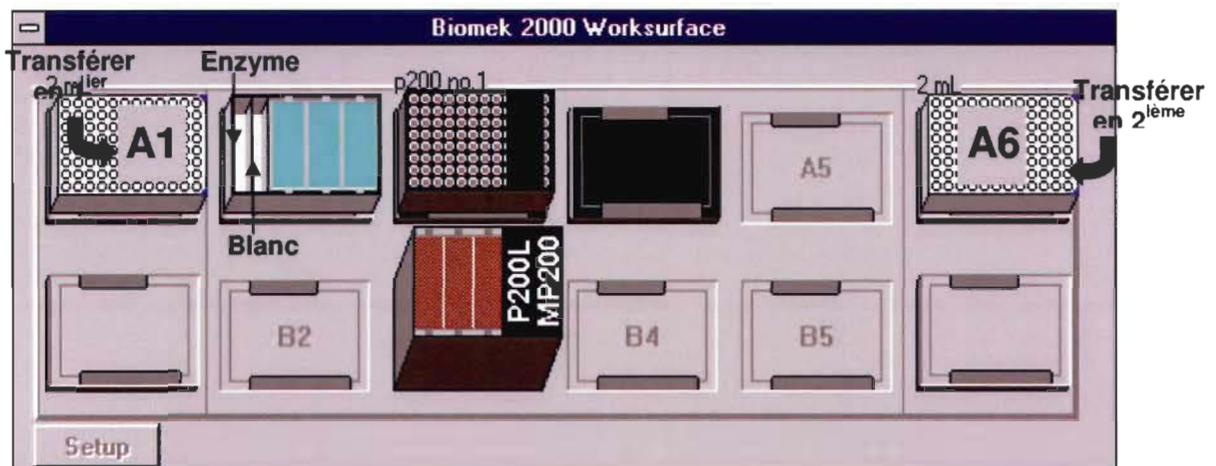
1. Mettre le tapis hermétique dessus la plaque
2. Mettre à 110°C pour exactement 2 minutes (inactivation de l'enzyme)
3. Mettre sur glace 2 minutes

UTILISATION DES EMBOUTS

1 boîte de P250

Position A3

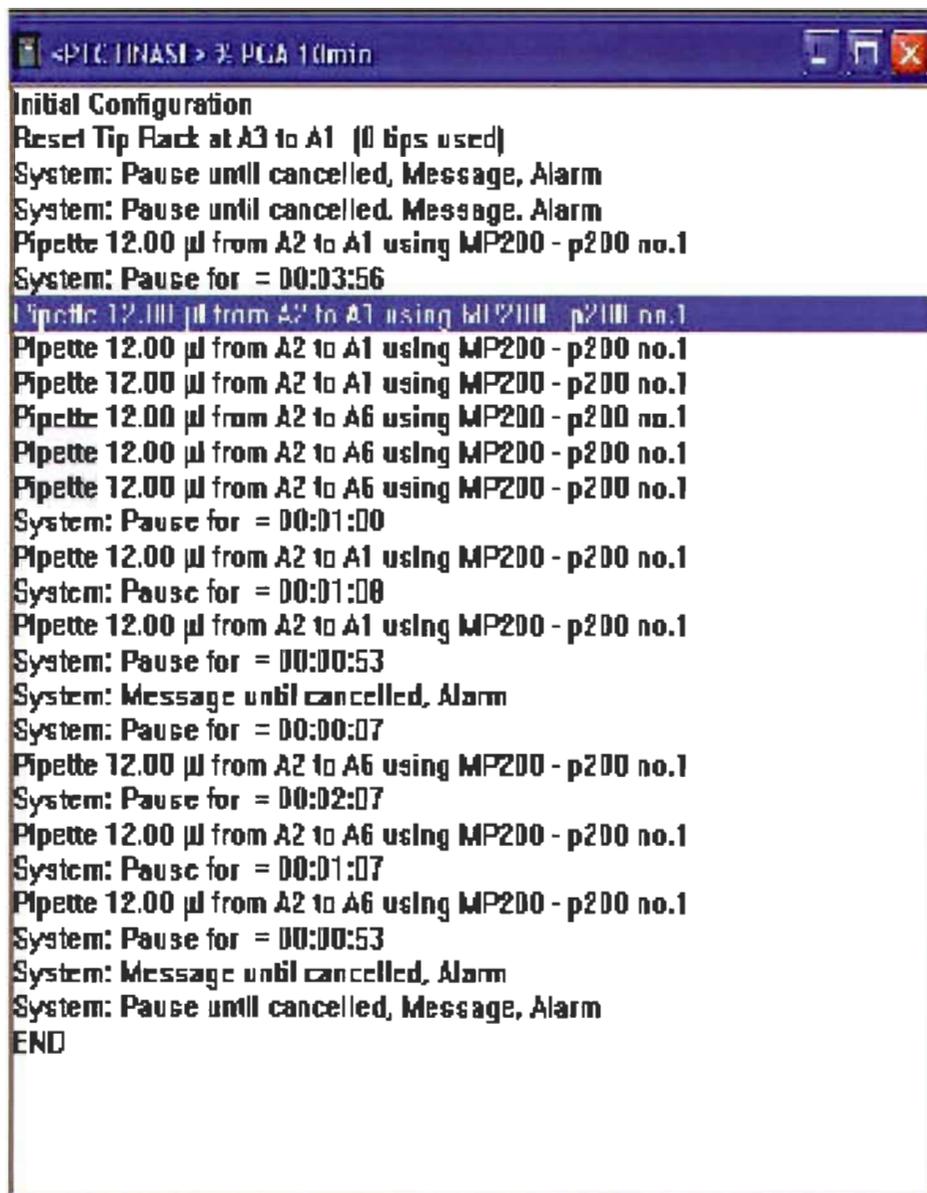
9 colonnes utilisées



DURÉE DU PROTOCOLE : 7m30s minutes + 5 min à 110°C + 5 min. sur glace

ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Procéder à l'analyse de la demande cationique sur le détecteur de charge Mutek. Diluer exactement 1 mL provenant d'un puit dans 9mL d'eau dd, puis titrer avec du poly-DADMAC 0,001N. Noter les volumes de titrant obtenus dans le document Excel approprié (gabarit existant).

Programme**Dosage préliminaire du PGA dans la pâte**

```
<PIC: INASI > ? PGA 10min  
Initial Configuration  
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)  
System: Pause until cancelled, Message, Alarm  
System: Pause until cancelled, Message, Alarm  
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:03:56  
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1  
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1  
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1  
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1  
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:01:00  
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:01:08  
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:00:53  
System: Message until cancelled, Alarm  
System: Pause for = 00:00:07  
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:02:07  
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:01:07  
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1  
System: Pause for = 00:00:53  
System: Message until cancelled, Alarm  
System: Pause until cancelled, Message, Alarm  
END
```

Dosage du PGA dans la pâte (données)

Demande cationique

Date : 25-26 mai 2006
Techniciens : Ogyy et David

Enzyme : Sc HN

Préparée le / par : 24 mai par Mylène et Yves

Activité à 50°C : U/ml

Dosée BCA à : mg/L

Pâte

Filtrat de presse machine 5

Date : 23 mai 2006

Échantillonnée par Daniel Laliberté

T°C à l'usine 47°C

pH à l'usine 0

Filtrée sur 2,5um le 23 mai 2006

pH ajusté par / le Cindy le 24 mai 2006

pH à 50°C au labo pH 5,65

Traitement le / par 25 mai par Mylène avec surnageant d'enzyme non-dilué : 12ul de surnageant dans 1,2mL de filtrat (inactivation à 110°C pendant 5 minutes)

Filtrat de presse traité avec le surnageant (temps 0 = avec surnageant inactivé 5min à 100°C)

Plaque A 55°C

Demande cationique

pH\temps	0'	1'	2'30	5'	10'	0'	0'	1'	2'30	5'	10'	0'
4.6	127.2	101.9		63.1	71.0	100.0	283.4	227.1		140.7	158.2	222.9
4.8	98.7	86.0	83.3	87.3	79.7	101.3	185.5	161.7	156.5	164.0	149.8	190.3
5.0	104.7	78.9	82.6	90.0	83.4	95.3	185.4	139.8	146.3	159.5	147.7	168.9
5.2	107.0	83.2	77.2	65.6	74.1	93.0	226.8	176.4	163.6	139.1	157.1	197.0
5.4	104.3	93.7	85.3	79.7	78.6	95.7	223.8	201.0	183.0	171.0	168.7	205.4
5.6	98.2	85.5	99.5	99.0		101.8	201.9	175.8	204.5	203.5		209.2
5.8	106.7	89.5	99.3	83.3	82.0	93.3	226.3	189.9	210.6	176.8	174.0	197.9
6.0	96.6	97.8	90.7		88.7	103.4	200.2	202.7	187.9		183.9	214.4

Le volume de filtrat n'était pas correct (moins que normal)

Plaque B 55°C

Demande cationique

pH\temps	0'	1'	2'30	5'	10'	0'	0'	1'	2'30	5'	10'	0'
4.6	89.5	58.4	71.1	72.6	73.2	100.0	158.06	103.13	125.53	128.22	129.19	176.55
4.8	98.1	67.4	67.4	60.2	71.0	101.9	183.95	126.35	126.40	112.91	133.09	191.20
5.0	102.2	82.0	81.2		79.4	97.8	176.16	141.47	140.06		136.98	168.72
5.2	97.5	87.3	79.5		80.4	102.5	176.70	158.13	143.94		145.55	185.58
5.4	100.3	84.5	84.5	76.5	73.5	99.7	192.72	162.34	162.36	147.04	141.27	191.70
5.6	97.0	95.6	88.1		88.8	103.0	181.89	179.43	165.21		166.62	193.30
5.8	100.6	85.2	85.5		88.0	99.4	194.81	164.99	165.45		170.42	192.37
6.0	97.9	95.8	97.5		98.1	102.1	183.58	179.54	182.70		183.95	191.34

Titrant : poly-Dadmac

Lot : 04722MC

Acheté chez : Sigma

Cat # : 409022-1L

Préparé par C.L. le : 20 février 2006

Dosé à : 0,997meq

avec du PVSK 0,001N (lot # 605A) acheté chez BDG

Volume (mL) nécessaire pour titrer 1mL de filtrat traité (= dilution 1 ds 10 dans la cuvette Mutek)

Moyenne des duplicatas

En rouge = valeurs exclues

% maximum de diminution de demande cationique

pH\temps	0'	1'	2'30	5'	10'	0'	0'	1'	2'30	5'	10'	0'
4.6			71.1	67.9	72.1	100.0			28.9	32.1	27.9	
4.8	98.4	76.7	75.3	73.7	75.3	101.6		23.3	24.7	26.3	24.7	
5.0	103.4	80.5	81.9	90.0	81.4	96.6		19.5	18.1	10.0	18.6	
5.2	102.3	85.3	78.3	65.6	77.2	97.7		14.7	21.7	34.4	22.8	
5.4	102.3	89.1	84.9	78.1	76.1	97.7		10.9	15.1	21.9	23.9	
5.6	97.6	90.6	93.8	99.0	88.8	102.4		9.4	6.2		11.2	
5.8	103.7	87.4	85.5	83.3	85.0	96.3		12.6	14.5	16.7	15.0	
6.0	97.2	96.8	94.1		93.4	102.8		3.2	5.9		6.6	

Dosage du PGA dans la pâte

Demande cationique

Date : 25-26 mai 2006
Techniciens : Oggy et David

Pâte

Filtrat de presse machine 5

Date : 23-May-06
Échantillonnée par Daniel Laliberté
T°C à l'usine 47°C

Enzyme : Sc HN
Préparée le / par : 24 mai par Mylène et Yves

pH à l'usine nd
Filtrée sur 2,5um le 23 mai 2006

Activité à 50°C : U/ml

pH ajusté par / le Cindy le 24 mai 2006

Dosée BCA à : mg/L

pH à 50°C au labo pH 5,65

Traitement le / par 25 mai par mylène avec surnageant d'enzyme non-dilué : 12ul de surnageant dans 1,2mL de filtrat
(inactivation à 110°C pendant 5 minutes)

Filtrat de presse traité avec le surnageant (temps 0 = avec surnageant inactivé 5min à 100°C)

Plaque A 50°C						Demande cationique						
pH\temps	0'	1'	2'30	5'	10'	0'	0'	1'	2'30	5'	10'	0'
4.6	99.3	70.6	72.0		69.6	100.7	171.45	121.92	124.26		120.24	173.83
4.8	106.5	86.5	76.7		74.5	93.5	197.66	160.54	142.45		138.35	173.70
5.0	100.8	78.9	81.6		79.1	99.2	183.84	143.81	148.72		144.22	180.76
5.2	97.5	92.7	88.4	81.1	89.6	102.5	169.19	160.74	153.41	140.64	155.44	177.78
5.4	105.2	80.6	82.1		76.2	94.8	211.10	161.82	164.74		152.95	190.34
5.6	102.1	91.7	88.3		84.4	97.9	197.69	177.54	170.92		163.25	189.38
5.8	102.0	93.1	95.8	88.8	87.6	98.0	193.74	176.81	181.90	168.67	166.40	186.13
6.0	103.5	90.1	82.1		96.3	96.5	196.31	170.96	155.78		182.69	183.09

Plaque B 50°C						Demande cationique						
pH\temps	0'	1'	2'30	5'	10'	0'	0'	1'	2'30	5'	10'	0'
4.6	99.8	90.2	88.6		82.1	100.2	184.11	166.36	163.32		151.41	184.71
4.8	104.3	82.7	82.7		83.4	95.7	187.70	148.85	148.88		150.04	172.23
5.0	102.8	80.9	82.6		81.3	97.2	195.05	153.42	156.72		154.31	184.43
5.2	100.6	88.5	80.9		80.0	99.4	198.42	174.51	159.53		157.83	196.12
5.4	92.0	85.7	84.9		90.1	108.0	176.58	164.56	162.92		173.05	207.42
5.6	99.2	88.1	91.3		87.6	100.8	183.70	163.27	169.06		162.27	186.79
5.8	101.3	92.0	88.9		95.4	98.7	197.89	179.82	173.69		186.52	192.99
6.0	103.2	85.9	89.1		95.0	96.8	200.50	166.97	173.15		184.70	188.24

Le 12 uL de surnageant inactivé a été ajouté à la main après le traitement et non avec le robot

Titrant : poly-Dadmac Lot : 04722MC Acheté chez : Sigma Cat # : 409022-1L
Préparé par C.L. le : 20 février 2006 Dosé à : 0,997meq avec du PVSK 0,001N (lot # 605A) acheté chez BDG
Volume (mL) nécessaire pour titrer 1mL de filtrat traité (= dilution 1 ds 10 dans la cuvette Mutek)

Moyenne des duplicatas						% maximum de diminution de demande cationique						
pH\temps	0'	1'	2'30	5'	10'	0'	0'	1'	2'30	5'	10'	0'
4.6	99.6	80.4	80.3		75.9	100.4		19.6	19.7		24.1	
4.8	105.4	84.6	79.7		78.9	94.6		15.4	20.3		21.1	
5.0	101.8	79.9	82.1		80.2	98.2		20.1	17.9		19.8	
5.2	99.1	90.6	84.6	81.1	84.8	100.9		9.4	15.4	18.9	15.2	
5.4	98.6	83.2	83.5		83.2	101.4		16.8	16.5		16.8	
5.6	100.7	89.9	89.8		86.0	99.3		10.1	10.2		14.0	
5.8	101.6	92.5	92.3	88.8	87.6	98.4		7.5	7.7	11.2	12.4	
6.0	103.3	88.0	85.6		95.7	96.7		12.0	14.4		14.4	

ANNEXE Ie
Protocole de préparation

Criblage de mutants de la PG dans une solution tampon

Le robot effectuera une dilution 1 dans 20 à partir de l'enzyme diluée à 15 ± 5 U/mL selon le dosage dans le tampon acétate 50mM pH 5,0

Le test est effectué en triplicata (3 plaques). L'échantillonnage est effectué aux temps 0, 3, 6, 9, 12 et 15 minutes. Les 8 premières réactions se retrouvent dans les 5 premières colonnes et les 8 autres dans les colonnes 7 à 12. La courbe étalon se trouve à la colonne 6.

Courbe étalon : 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5,0, 6,25, 7,5 et 10mM. L'échantillonnage est pris aux temps 0,3,6,9,12,15 minutes. En général seule la pente initiale (0 à 12 minutes) est conservée pour les calculs d'activité.

INCUBATEURS À PARTIR

Celui de droite (position A6) à la température souhaitée et 1 bloc double à 110°C et 1 bloc simple à 115°C les deux avec aluminium dessus.

Températures généralement mesurées : 50°C, 55°C, 57,5°C, 60°C

Tampon utilisé : Acétate/Bis-Tris 100mM (concentration constante)

pH généralement mesurés : pH 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25

Enzyme utilisée :

Pectinase purifiée et concentrée dans du tampon acétate 50mM pH 5,0, préalablement dosée et diluée dans l'acétate 50mM pH 5,0 pour obtenir une activité de 15 ± 5 U/mL.

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

* Il est important que ces volumes minimum soient respectés sinon le robot va pipeter de l'air.

Réservoirs (B1) « quarter » (C) et « quarter » (D)

Tampons 20 mL de tampon 5X (500mM) * doit être récupéré
20 mL de tampon 1X (100mM) * doit être récupéré

Plaque de préparation de 96 puits de 2mL (B3) (Axygen-polypropylene)

Enzymes 300uL de 16 mutants dilués dans l'acétate 50mM pH 5,0 pour une concentration finale de 15 ± 5 U/mL dans les **colonnes 1 et 2**
* doivent être récupérées

GA 40mM 600uL d'acide galacturonique (GA) 40mM dans la **colonne 3** * à récupérer mis avec le dipenseur eppendorf en position 3

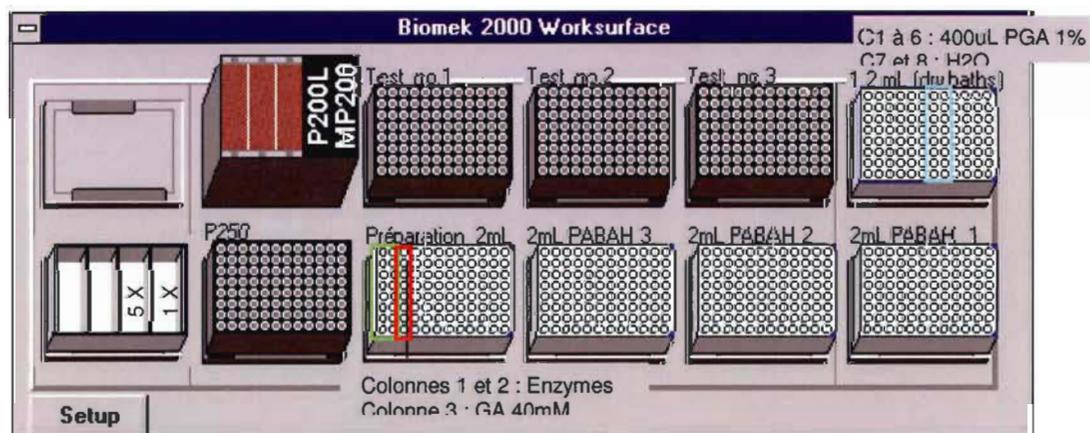
Plaque en A6 (1,2mL Axygen-polypropylene)

PGA 1% 400uL de PGA 1% dans les **colonnes 1 à 6** avec le dispenser en position 2 + 400uL H₂O dans les **colonnes 7 et 8**.

PAHBAH Frais (2mL Axygen-polypropylene)

300mL 1,5g para hydrobenzoïque acid + 150mL NaOH 1M + 150mL H₂O

- peut être fait une fois le programme parti.
- prendre un « aliquoteur » et aliquoter 1mL par puit dans 3 plaques 96 puits de 2mL (Axygen-polypropylene)
- Le robot prendra une pause et indiquera le moment de mettre les plaques sur la station de travail. Appuyer sur OK pour continuer le test.



UTILISATION DES EMOBOUTS

3 boîtes pleines de P250

Position A3, A4, A5, B2

MANIPULATION DES PLAQUES À FAIRE (3 fois)

Avec des gants,

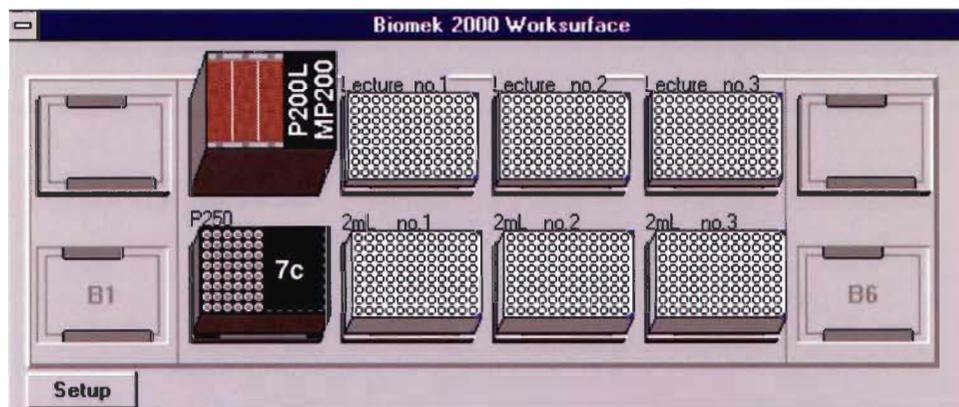
1. Prendre la plaque en B5
2. Mettre la plaque à 110°C pour 10 minutes
3. Vortexer et mettre sur glace + H₂O 10 minutes

TRANSFERT DE PLAQUE

Choisir le protocole « Transfert CRIBLAGE »

Mettre les plaques 1, 2 et 3 en A3, A4 et A5 et des plaques de polycarbonate propres en B3, B4 et B5

Attention les courbes étalons sont transférées en premier dans les 3 plaques de lecture.



ENREGISTREMENT DES DONNÉES (3 fois)

1. Ouvrir le lecteur de plaque et l'ordinateur du lecteur de plaque au moins 15 minutes à l'avance.
2. Ouvrir le logiciel Spectro
3. Choisir le programme PAHBAH (lecture à 405nm – 600nm)
4. Après la lecture des échantillons, transférer les données avec un cut and paste dans le fichier excel dans dossier/labo beauregard/vicky/template/template criblage.

DURÉE DU PROTOCOLE : 40 Minutes

20 minutes + 10 minutes à 110 °C + 10 minutes sur glace + H₂O + 10 minutes pour le transfert des plaques suivi de la lecture des plaques (10 minutes)

Total de 1 test = 50min.

Note : Si un autre test est parti immédiatement à la suite d'un précédent pendant que les plaques chauffent... 2 tests peuvent prendre 1h20.

Programme

Criblage de mutants de la PG dans une solution tampon

```

<PECTINASE2> criblage 16
Initial Configuration
// Incubateur droit à T°C souhaitée
// 400uL/puit de PGA 1% dans colonnes 1 à 6 de la plaque A6
// 400uL/puit d'eau dans colonnes 7 et 8 de la plaque A6
// 20mL tampons 1x dans réservoir en B1 position D
// 20mL tampons 5x dans réservoir en B1 position C
// Remplir la plaque de préparation :
// 300uL/puit colonne 1 et 2 d'enzyme purifiée et diluée dans acétate 50mM pH 5,0
// 600uL/puit de GA 40mM dans H2O dans colonne 3
// 400uL/puit de PGA 1% dans colonne 4
// 3 x 100mL de PABAH frais
Reset Tip Rack at A3 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A4 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at A5 to A1 (0 tips used)
Reset Tip Rack at B2 to A3 (16 tips used)
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
// Préparation du dosage initial
Pipette 200.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
Pipette 200.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
Pipette 200.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
Pipette 200.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
Tip Change
Pipette 100.00 µl from B1 to B3 using MP200 - P250
Reset Tip Rack at B2 to C1 (2 tips used)
Pipette 100.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 85.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 60.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 50.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 40.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 30.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 15.00 µl from B1 to B3 using P200L - P250
Pipette 15.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 40.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 50.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 60.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 70.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 85.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250

```

Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using P200L - P250
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
Pipette 50.00 µl from B3 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from B3 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from B3 to B4 using MP200 - Test no.3
// Test
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
Reset Tip Rack at B2 to A5 (32 tips used)
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B1 to A6 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B3 to B3 using MP200 - P250
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Tip Change
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.1
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Tip Change
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.2
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
Tip Change
Pipette 100.00 µl from B3 to A6 using MP200 - Test no.3
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:05
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15

Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:04
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:17
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Pause for = 00:00:20
Pipette 50.00 µl from A6 to B6 using MP200 - Test no.1
System: Pause for = 00:00:31
Pipette 50.00 µl from A6 to B5 using MP200 - Test no.2
System: Pause for = 00:00:32
Pipette 50.00 µl from A6 to B4 using MP200 - Test no.3
System: Message until cancelled
END

```
-PICTINASE> Transfer criblage  
Initial Configuration  
System: Pause until cancelled, Message, Alarm  
Reset Tip Rack at B2 to A1 (0 tips used)  
Pipette 200.00 µl from B3 to A3 using MP200 blowout - P250  
Pipette 200.00 µl from B4 to A4 using MP200 blowout - P250  
Pipette 200.00 µl from B5 to A5 using MP200 blowout - P250  
Tip Change  
Pipette 200.00 µl from B3 to A3 using MP200 blowout - P250  
Tip Change  
Pipette 200.00 µl from B3 to A3 using MP200 blowout - P250  
Tip Change  
Pipette 200.00 µl from B4 to A4 using MP200 blowout - P250  
Tip Change  
Pipette 200.00 µl from B4 to A4 using MP200 blowout - P250  
Tip Change  
Pipette 200.00 µl from B5 to A5 using MP200 blowout - P250  
Tip Change  
Pipette 200.00 µl from B5 to A5 using MP200 blowout - P250  
System: Message until cancelled, Alarm  
END
```

ANNEXE If
Protocole de préparation

Criblage de 4 ou 40 mutants dans la pâte

INCUBATEURS À PARTIR

Les deux incubateurs du robot doivent être équilibrés à la température souhaitée (indépendamment l'un de l'autre si nécessaire) avec les blocs chauffants noirs pour les plaques de 2mL, et l'incubateur 2 places doit être mis à 110°C avec du papier d'aluminium sur les blocs chauffants noirs pour les plaques de 1,2mL.

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

A2 (Réservoir "Quarter")

4mL de tampon acétate 50mM pH 5,0 ou de surnageant inactivé 5minutes dans l'eau bouillante si l'enzyme utilisée n'a pas été purifiée (= blanc) (A2)

pour 4 mutants seulement

2mL du clone 1 en B1, du clone 2 en B2, du clone 3 en C1 et du clone 4 en C2

B2 (plaques axygen 1,2mL 96 puits en polypropylène) pour 40 mutants seulement

200µL d'enzyme à la dilution souhaitée dans les puits 1 à 40
12uL sera ajouté à 1,2mL de filtrat

A1 et A6 (plaques axygen 2mL 96 puits en polypropylène)

1,2mL de filtrat mis avec le dispenser Eppendorf (position 6) colonnes 1 à 6
Pour 4 mutants : 1 filtrat par ligne jusqu'à concurrence de 8pH

1,2mL d'eau dans les colonnes 7 et 8

UTILISATION DES EMBOUTS

1 boîte de P250	Position A3	9 colonnes utilisées pour 4 mutants
		11 colonnes utilisées pour 40 mutants

MANIPULATION DE PLAQUE À FAIRE

Pour chacune des plaques de 2mL... celle de gauche (A1), puis celle de droite (A6)

Lorsque l'alarme sonne (après presque 6 minutes du début du pipetage)

1. Mettre le tapis hermétique dessus la plaque
2. Mettre à 110°C pour exactement 2 minutes (inactivation de l'enzyme)
3. Mettre sur glace 2 minutes

DURÉE DU PROTOCOLE : 15 minutes + 5 min. à 110°C + 5 min. sur glace

ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Procéder à l'analyse de la demande cationique sur le détecteur de charge Mütek. Diluer exactement 1 mL provenant d'un puit dans 9mL d'eau dd, puis titrer avec du poly-DADMAC 0,001N. Noter les volumes de titrant obtenus dans le document Excel approprié (gabarit existant).

Programmes

Criblage de 4 et 40 mutants dans la pâte

```

->PICTINASI > Criblage 4
Initial Configuration
System: Pause until cancelled, Message
Reset Tip Rack at A3 to A1 [0 tips used]
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
System: Pause for = 00:20:00
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
System: Pause until cancelled, Message
END

```

```

->PECTINASI > Criblage 40
Initial Configuration
System: Pause until cancelled, Message
Reset Tip Rack at A3 to A1 [0 tips used]
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A1 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A6 using MP200 - P250
Pipette 12.00 µl from B2 to A6 using MP200 - P250
System: Pause for = 00:20:00
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
System: Pause until cancelled, Message
END

```

ANNEXE Ig
Protocole de préparation

Test de stabilité de la PG dans la pâte

INCUBATEURS À PARTIR

Les deux incubateurs du robot doivent être équilibrés à la température souhaitée (indépendamment l'un de l'autre si nécessaire) avec les blocs chauffants noirs pour les plaques de 2mL, et l'incubateur 2 places doit être mis à 110°C avec du papier d'aluminium sur les blocs chauffants noirs pour les plaques de 1,2mL.

SOLUTIONS À PRÉPARER ET QUANTITÉS À METTRE DANS LES RÉSERVOIRS

A2 (plaques axygen 1,2mL 96 puits en polypropylène)

400µL de tampon acétate 50mM pH 5,0 ou de surnageant inactivé 5minutes dans l'eau bouillante si l'enzyme utilisée n'a pas été purifiée (= blanc) **colonne 1**

200µL d'enzyme à la dilution souhaitée dans la **colonne 2** ...
12µL sera ajouté à 1,2mL de filtrat

A1 et A6 (plaques axygen 2mL 96 puits en polypropylène)

1,2mL de filtrat mis avec le dispenser Eppendorf (position 6) colonnes 1 à 6
1 filtrat par ligne jusqu'à concurrence de 8pH (pour une T°C)

1,2mL d'eau dans les colonnes 7 et 8

\temps	0'	0'	1'	2'30s	5'	6' [5X]	H ₂ O	H ₂ O					
Clone 1	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 2	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 3	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 4	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 5	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 6	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 7	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							
Clone 8	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL	1,2mL							

MANIPULATION DE PLAQUE À FAIRE

Pour chacune des plaques de 2mL... celle de gauche (A1), puis celle de droite (A6)

Lorsque l'alarme sonne (après presque 6 minutes du début du pipetage)

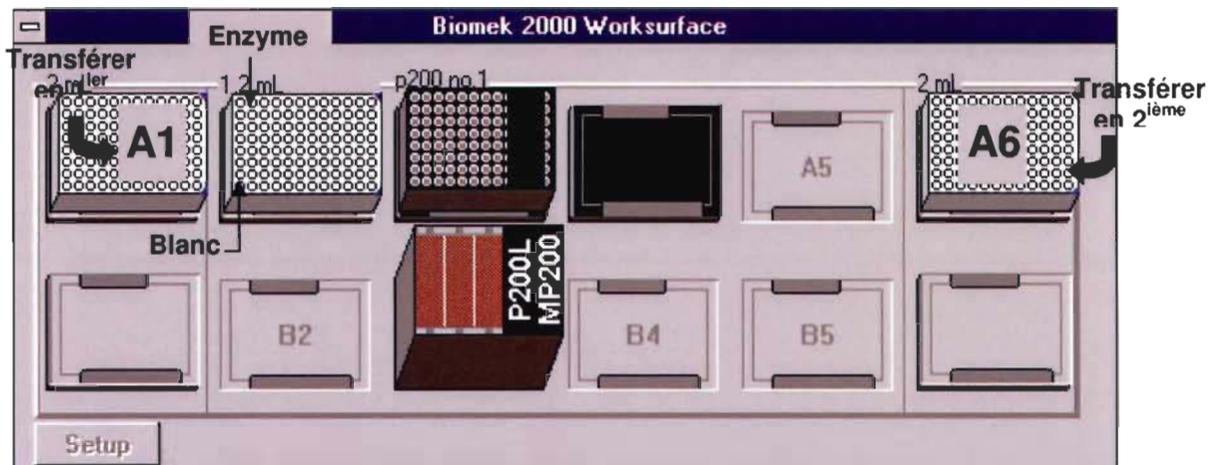
1. Mettre le tapis hermétique dessus la plaque
2. Mettre à 110°C pour exactement 2 minutes (inactivation de l'enzyme)
3. Mettre sur glace 2 minutes

UTILISATION DES EMBOUTS

1 boîte de P250

Position A3

9 colonnes utilisées



DURÉE DU PROTOCOLE : 7m30s minutes + 5 min à 110°C + 5 min. sur glace

ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Procéder à l'analyse de la demande cationique sur le détecteur de charge Mütek. Diluer exactement 1 mL provenant d'un puit dans 9mL d'eau dd, puis titrer avec du poly-DADMAC 0,001N. Noter les volumes de titrant obtenus dans le document Excel approprié (gabarit existant).

Programme

Test de stabilité de la PG dans la pâte

```

=>ECTMSE> Stabilité Pâte
Initial Configuration
Reset Tip Rack at A3 to A1 [0 tips used]
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1
System: Pause for = 00:01:24
Pipette 60.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1
System: Pause for = 00:00:25
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1
Pipette 12.00 µl from A2 to A1 using MP200 - p200 no.1
System: Pause for = 00:00:15
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1
System: Pause for = 00:00:15
System: Message until cancelled, Alarm
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1
System: Pause for = 00:00:07
Pipette 12.00 µl from A2 to A6 using MP200 - p200 no.1
System: Pause for = 00:00:53
System: Message until cancelled, Alarm
System: Pause until cancelled, Message, Alarm
END

```

ANNEXE II

SÉQUENCES DE LA PG ISOLÉE DE *Sc*

Séquence nucléotidique (1086 bases)

ATGATTTCTGCTAACTCCTTGCTTATTTCCACTTTGTGCGCTTTTGCGATCGCAACACCTTTG
TCAAAAAGAGATTCCTGTACCTAACAGGATCTTCTTTGTCTTCACTCTCAACCGTGAAAAAAT
 GTAGCAGCATCGTTATTAAGACTTAACTGTCCCAGCTGGACAGACTTTAGATTTAACTGGGT
 TAAGCAGTGGTACTACTGTTACGTTTGAAGGCACAACCACATTTAGTACAAGGAATGGAGCG
 GCCCTTTAATTTCAATCTCAGGGTCTAAAATCAGCGTTGTTGGTGCTTCGGGACATAACCATTG
 ATGGTCAAGGAGCAAAATGGTGGGATGGCTTAGGTGATAGCGGTAAAGTCAAACCGAAGTTT
 GTAAAGTTGGCGTTGACGGGAACATCTAAGGTCACCGGATTGAATATTAATAATGCTCCACAC
 CAAGTCTCAGCATCAATAAATGTTGAGATTTAACCATCAGCGACATAACAATTGATATCAGAG
 ACGGC**G**ATTTCGGCTGGTGGTCATAATACGGATGGGTTT**GATGTTGGTAGTTCTAGTAACGTC**
 TTAATTCAAGGATGTACTGTTTATAATCAGGATGACTGTATTGCTGT **GAATTC**CGGTTCAACT
 ATAAATTTATGAACA**ACTACTGCTACAATGGCCATGGTATTTCTGTAGGTTCTGTTGGTGGC**
 CGTTCTGATAATACAGTCAATGGTTTCTGGGCTGAAAATAACCATGTTATCAACTCTGACAAC
 GGGTTGAGAATAAAAACCGTAGAAGGTGCGACAGGCACAGTCACTAATGTCAACTT**CATCAGT**
 AATAAAATTAGCGGCATAAAAAGTTATGGTATTGTTATCGAAGGCGATTATTTGAAT**G**GTAAAG
 ACTACTGGA**ACTGCTACAGGTGGCGTTCCATTT**CGAATTTAGTAATGAAGGATATCACCGGG
 AGCGTGA**ACTCCACAGCGAAGAGGGTTAAAATTTTGGTGAAAAACGCTACTA**ACTGGCAATGG****
 TCTGGGGTGTCAATTACCGGTGGTTCTTCTATTCTGGATGTTCTGGAATCCCATCTGGATCT
 GGTGCAAGCTGTAA

Séquence primaire (361 aa)

MISANLLISTLCAFAIATPLSKRDSCTLTGSSLSLSTVKKCSSIVIKDLTVPAGQTLDLTGLSSGT
 TVTFEGTTTTFYKEW**SGPLISISGSKISVWGASGHTIDGQAK**WWDGLGDSGKVKPKFVKLALT
 GTSKVTGLNIKNAPHQVFSINKSDLTISDITIDIRDGDSAGGHNTDGFVDVSSSNVLIQ**GCTVY**
 NQDDCIAVNSG**STIKFMN**NYCYNGHGISVGSVGGRS**DNTVNGFWAENNHVINS**D**NGLRIKTVE**
 GATGTVTNVNFISNKISG**IKSYGIVIEGDYLN**GKTTGTATGGVPISNLV**MKDITGSV**N**STAKRVKI**
 LVK**N**ATNWQWSGV**SITGGSSYS**GC**SGIPSGSGASC***

Notes

1. La séquence surlignée en gris correspond à la séquence signal.
2. La guanine du site EcoRI (en rouge) a été remplacée par une thymine afin d'enlever le site de restriction non-souhaité tout en conservant la valine encodé par le codon **GTG/GTT**.
3. Les bases nucléotidiques et les acides aminés qui sont différents par rapport au gène de *Sc* correspondant au numéro d'accèsion NC_001142 sont soulignés et en caractère gras.
4. Les asparagines en rouge sont glycosylées (Blanco *et al.* 2002; résultats du présent projet).

ANNEXE III

SÉQUENCES DE LA PG ISOLÉE DE *Km*

Séquence nucléotidique (1089 bases)

ATGTTTTCIGCAACACCTTATTGATCGCAGCAGCTAGTGCATTATTAGCTGAGGCTTCTCCA
TTGGAAAAGAGAGACAGTTGTACCTTGAGTGGGAAGACAGCCGGAGGTGGTTTTGTCCAACTG
 TGCCACGGTCACTGTCAACAACGTGCAAGTCCCATCTGGTAAGACTTTGGACTTGACAGGCTT
 GCAAGACGGTGCAGTAAATTTTCGTCGGGCAGGTTACCTTTGATTACGATGAATGGGTGG
 GTCCATTGGTCTCCATCTCCGTAACAACATCAAGGTGGTAGGTAATCTGGCCACTTGTTAG
 ATGGTGATGGTGCACGTTGGTGGGACGGGAAGGGTGACAGTGGTAAAAAGGTGAAGCCTAA
 GTTCATGAGCTTGAAATTGACTGGCAACTCAGATGTCCGGTGGGTTGCAAATCAAGAATACCCC
 AATTCAAGCTATCTCAGTGAACCTTGTAGTGACTGTAAATTCACGATGTCACCATTGACAAC
 AGTGATGGTGACAAGGACAGCTTGGGTCAACAACACTGACGGTTTTCGATGTTGGTAGCGTTAA
 CAACGTCACCATTGAGAACTGTCATGTCTACAACCAAGATGACTGTATCGCCGTCAACTCCGG
 TACCGGTGTCTACTTCAAGAACAACACTACTGTTCTGGTGGTCATGGTGCTTCCATTGGTTCAGT
 CGGTCTTCGCTCAACAATGTGGTTGACACCGTTTACTTCGAGAACAACCAAATTGTCAACTC
 TGACAACGGTTTTGAGAATTAAGACCATTCAAAGGCCACTGGTCCGTCAACAACGTGCACTT
 CTTGTCCAACACTATCTCCGGCATCAGAAAGTTCGGAATTGTTGTTGAAACTGATTACAGCAA
 TGGATCCACCACCGGTACCCAGGTAGCAAGGTCCCAATCACCAACTTCGAAGTCGATGGTTT
 GACTGGTTCAGTTGACTCTTCCGCTTACAGAGTCAAGATCTTGGTTGCTGGTGCTTCTAAGTG
 GACTTGGAAAGGATGTTGATATCACTGGTGGTTCTTCTTCGGTTCATGTAAGTGGTATTCCATC
 TGGTAGCGGAGTCTTCTGTAA

Séquence primaire (362 aa)

MFFCNTLLIAAASALLAEASPLEKRDSCTLSGKTAGGGLSNCATVTVNNVEVPSGKTLDLTGLQD
 GATVNVFGQVTFDYDEWVGPLVSIIGNIKVVGKSGHLLDGDGARWWDGKGD**SGKKVKPKFM**
 SLKLTGNSDVGGLQIKNTPIQAISVNSCSDTVIHDVTIDNSDGDKDSLGHNTDGFVGS**SVNNVT**
 IEN**CH**VYNQDDCIAVNSGTGVYFKNNYCSGGHGASIGSVGLRSNNVVDTVYFENNQIVNSDNGL
 RIKTIQKATGSVNNVHFLSNTISGIRKFGIVETDYS**NG**STTGTPGSKVPITNFEVDGLTGSVDSS
 AYRVKILVAGASKWTWK**D**VDITGGSSFGSCTGIPSGSG**VFC***

Notes

1. La séquence surlignée en gris correspond à la séquence signal.
2. Les bases nucléotidiques et les acides aminés qui sont différents par rapport au gène de *Km* correspondant au numéro d'accèsion AJ000076 sont soulignés et en caractère gras.
3. Les asparagines en rouge sont des sites putatifs de glycosylation. L'asparagine en gras est glycosylée (résultat obtenu lors de cette étude).

ANNEXE IV

SÉQUENCES DE LA PG DE *Sp*

Séquence nucléotidique (1008 bases)

GCTACTTGCACAGTCAAATCTGTCGATGATGCCAAAGACATTGCAGGCTGCAGTGC GGTTACT
 CTAAACGGATTTACTGTACCTGCTGGAAATACCTTAGTGTTGAATCCCGACAAGGGCGCTACA
 GTTACCATGGCTGGCGATATTACATTGCAAAAACCACATTGGACGGTCCATTGTTTACTATT
 GACGGGACGGGTATCAACTTTGTTGGAGCCGATCATATCTTCGATGGAAACGGCGCTTTGTA
 TTGGGATGGCAAAGGAACCAACAATGGCACTCACAAGCCTCACCCATTCTTAAAGATTAAGG
 ATCTGGTACCTACAAGAAATTCGAAGTTTTGAATAGTCCTGCACAAGCAATTTTCAGTTGGCCC
 AACCGACGCACACTTAACCTTGGATGGGATCACTGTCGATGATTTTGGCTGGAGACACCAAAAA
 TTTGGGTACAACACTGATGGCTTCGACGTCTCTGCCAACAATGTA ACTATTCAAAAATTGTAT
 TGTTAAGAACCAAGATGACTGTATCGCAATTAATGATGGAAATAACATTAGATTTGAAAATAA
 CCAATGCTCTGGTGGCCATGGAATTTCTATTGGTTCAATCGCCACTGGCAAACATGTTTCTAA
 TGTTGTCATTAAGGTAACACGGTTACCAGATCCATGTACGGTGT CAGGATCAAAGCCCAAAG
 AACTGCTACCTCTGCCTCTGTGTCGGCGTGACCTATGACGCAAACACGATCTCTGGAATTGC
 TAAATACGGCGTCTTGATTTACAGTCTTACCCTGACGATGTTGGAAACCCTGGGACTGGTGC
 CCCATTTTCTGATGTCAACTTTACTGGAGGTGCCACTACAATCAAGGTCAATAATGCTGCAAC
 TAGAGTCACTGTTGAATGTGGTAACTGCTCTGGAAATTGGAATTGGTCCCAACTGACTGTCAC
 CGGTGGAAAGGCTGGTACAATTAAGTCTGATAAGGCCAAGATCACTGGTGGCCAGTACTTGT
 GA

Séquence primaire (335 aa)

ATCTVKSVDDAKDIAGCSAVTLNGFTVPAGNTLVLPDKGATVTMAGDITFAKTTLDGPLFTIDG
 TGINFGADHIFDGNALYWDGKGTNNGTHKPHPFLKIKSGTYKKFEVLNSPAQAISVGPTDA
 HLTLDGITVDDFAGDTKNLGHNTDGFVDSANVTIQNCIVKNQDDCIAINDGNNIRFENNQCSG
 GHGISIGSIATGKHVSNVVIKNTVTRSMYGVRIKAQRTATSASVSGVTYDANTISGIKYGLIS
 QSYRDDVGNPVTGAPFSDVNTFTGGATTIKVNNAATRVTVECGNCSGNWNWSQLTVTGGKAGTI
 KSDKAKITGGQYL*

Note

1. La séquence primaire est identique à celle encodée par l'ARNm du gène *cpg1* de *Sp* (no. d'accèsion D45072) sauf que la séquence signal et le C-terminal ont été enlevés. La séquence signal enlevée contient 24 aa soit : MTSFSSLFKLLILASATAAAPSKR. Le C-terminal enlevé contient 44 aa soit : ADQPASNDIEEMPAQDPNDPEDPTAMQEAEEAAAAGNSTTSG*.
2. Les asparagines en rouge sont des sites putatifs de glycosylation.

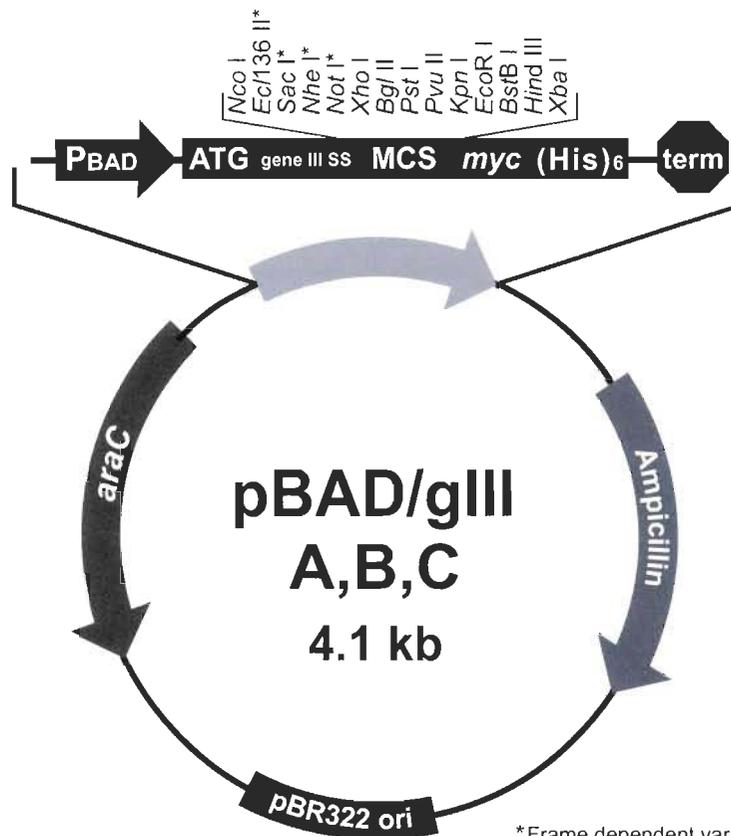
ANNEXE V

VECTEURS D'EXPRESSION COMMERCIAUX

- a) pBADgIII B
 - Carte
 - Site de clonages multiple

- b) pYES2/CT
 - Carte
 - Site de clonages multiple

- c) pGAPZa A
 - Carte
 - Site de clonages multiple



**Comments for pBAD/gIII A
4145 nucleotides**

araBAD promoter region: bases 4-276
 Initiation ATG: bases 319-321
 Gene III secretion signal: bases 319-373
 Multiple cloning site: bases 374-428
myc epitope: bases 427-456
 Polyhistidine region: bases 472-489
rrnB transcriptional termination region: bases 595-752
 Ampicillin resistance gene (ORF): bases 1032-1892
 pBR322 origin: bases 2037-2710
AraC ORF: bases 3241-4139 (opposite strand)

*Frame dependent variations.
 Version A contains *Sac* I and *Ec*136 II only.
 Version B contains *Nhe* I only.
 Version C contains *Not* I only.

1 O₂ Region
 AAGAAACCAA TTGTCCATAT TGCATCAGAC ATFGCCGTCA CTGCGTCTTT TACTGGCTCT TCTCGCTAAC CAAACCGGTA

81 ACCCCGCTTA TTAAAAGCAT TCTGTAACAA AGCGGGACCA AAGCCATGAC AAAAACGCGT AACAAAAGTG TCTATAATCA

161 O₁ Region CAP binding site pBAD Forward priming site
 CGGCAGAAAA GTCCACATTG ATTATTTGCA CGGCGTCACA CTTTGCTATG CCATAGCATT TTTATCCATA AGATTAGCGG

241 -35 -10 RBS I₂ and I₁ Region
 ATCCTACCTG ACGCTTTTPTA TCGCAACTCT C TACTGTTC TCCATACCCG TTTTTGGGC TAACAGGAGG AATTAACC

319 gene III signal sequence Nco I Nhe I
ATG AAA AAA CTG CTG TTC GCG ATT CCG CTG GTG GTG CCG TTC TAT AGC CAT AGC AC CATGGCTAG
 Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser

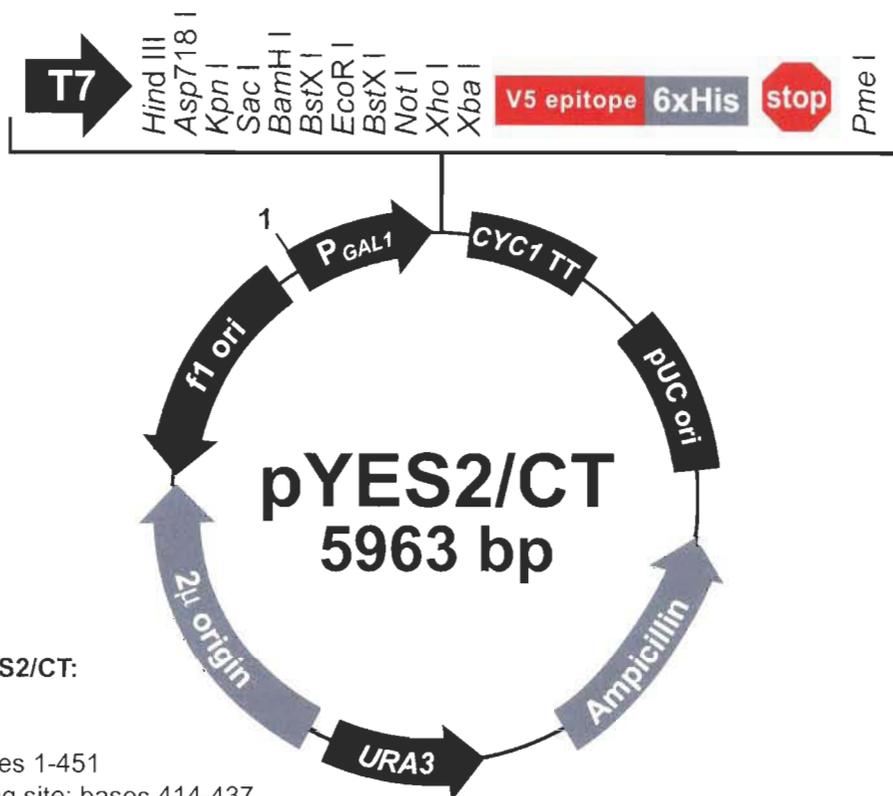
384 Xho I Bgl II Pst I Pvu II Asp718 I Kpn I EcoR I BstB I Hind III Xba I myc epitope
 CTCGAGATCT GCAGCTGGTA CCATATGGGA ATTCGAAGCT TTCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

456 Sal I Polyhistidine region Pme I
 CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTAA ACGGTCTCCA GCTTGGCTGT
 Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

521 TTTGGCGGAT GAGAGAAGAT TTTCAGCCTG ATACAGATTA AATCAGAACG CAGAAGCGGT CTGATAAAAC AGAATTTGCC

601 rrmB T₁ and T₂ transcriptional terminators
 TGGCGGCAGT AGCGCGGTGG TCCCACCTGA CCCCATGCCG AACTCAGAAG TGAACGCCG TAGCGCCGAT GGTAGTGTGG

681 GGTCTCCCA TGGGAGAGTA GGAACTGCC AGGCATCAAA TAAAACGAAA GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT



**Comments for pYES2/CT:
5963 nucleotides**

GAL1 promoter: bases 1-451

GAL1 forward priming site: bases 414-437

T7 promoter/priming site: bases 475-494

Multiple cloning site: bases 501-594

V5 epitope: bases 607-648

Polyhistidine (6xHis) region: bases 658-675

CYC1 transcription termination signal: bases 708-961

CYC1 reverse priming site: bases 725-743

pUC origin: bases 1145-1818

Ampicillin resistance gene: bases 1963-2823 (complementary strand)

URA3 gene: bases 2841-3948 (complementary strand)

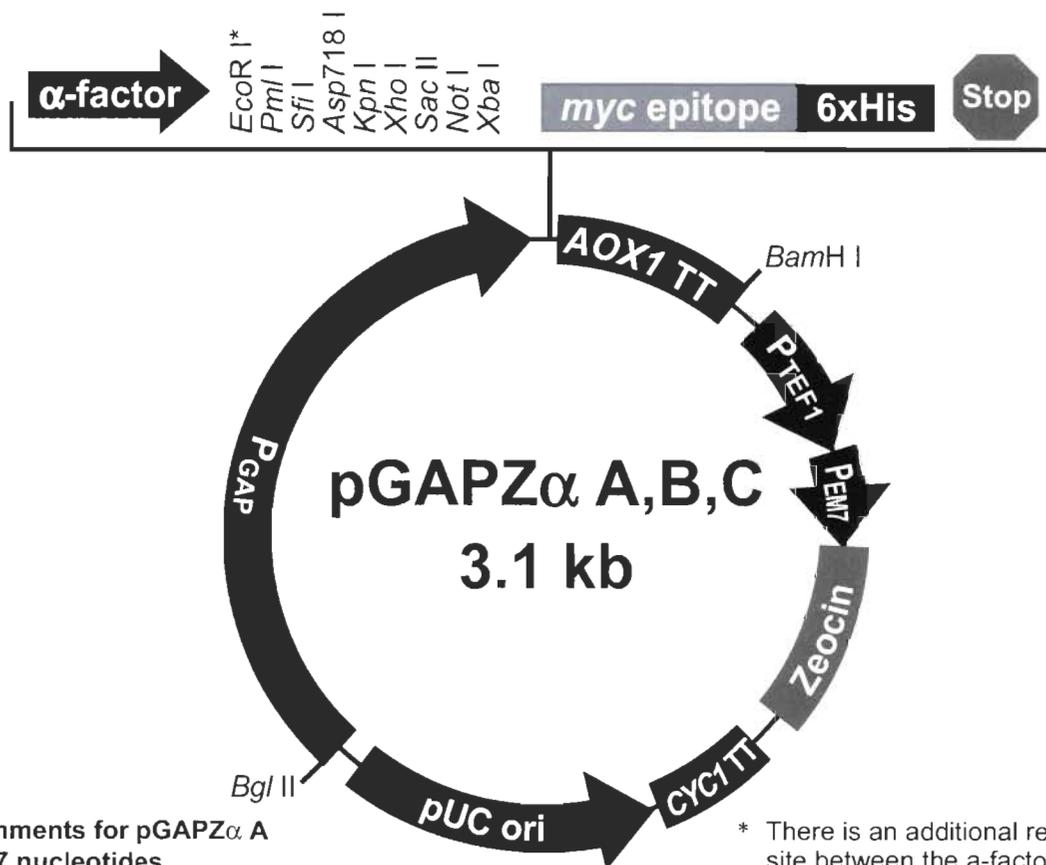
2 μ origin: bases 3952-5423

f1 origin: bases 5491-5946 (complementary strand)

GAL1 promoter
 TATA box
 300 TTAACAGATA TATAAATGCA AAAACTGCAT AACCACCTTTA ACTAATACTT TCAACATTTT
 start of transcription
 360 CGGTTTGTAT TACTTCTTAT TCAAATGTAA TAAAGTATC AACAAAAAAT TGTTAATATA
 GAL1 forward priming site 3' end of GAL1 promoter
 420 CCTCTATACT TTAACGTCAA GGAGAAAAAA CCCCGGATCG GACTACTAGC AGCTGTAATA
 T7 promoter/priming site Hind III Asp718 I Kpn I Sac I BamH I
 480 CGACTCACTA TAGGGAATAT TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TAACGGCCCGC
 BstX I* EcoR I BstX I* Not I Xho I Xba I†
 540 CAGTGTGCTG GAATTCTGCA GATATCCAGC ACAGTGGCGG CCGCTCGAGT CTAGAGGGCC
 V5 epitope
 600 CTTCGAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG
 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 Polyhistidine region Pme I
 649 CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTAAACCC GCTGATCCTA
 Arg Thr Gly His His His His His His ***
 CYC1 reverse priming site
 699 GAGGGCCGCA TCATGTAATT AGTTATGTCA CGCTTACATT CACGCCCTCC CCCACATCC

*Please note that there are two *BstX I* sites in the polylinker.

†The *Xba I* site is not unique in pYES3/CT.



Comments for pGAPZα A
3147 nucleotides

GAP promoter region: bases 1-483
α-factor signal sequence: bases 493-759
 Multiple cloning site: bases 760-828
myc epitope tag: bases 827-856
 Polyhistidine tag: bases 872-889
AOX1 transcription termination region: bases 893-1233
TEF1 promoter region: bases 1234-1644
EM7 promoter: bases 1645-1712
Sh ble ORF: bases 1713-2087
CYC1 transcription termination region: bases 2088-2405
 pUC origin: bases 2416-3089

* There is an additional restriction site between the *a*-factor signal sequence and the *EcoR* I site in versions B and C of pGAPZα:

Pst I in pGAPZα B
Cla I in pGAPZα C

ANNEXE VI

ARTICLE PUBLIÉ

Houle, V., Gagnon, M.C., Dubé, E., Hurtubise, Y. et Beauregard, M. (2008)

IMPACT OF GLYCOSYLATION ON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ENDOPOLYGALACTURONASE PGU1 ACTIVITY AND STABILITY.

The Open Biotechnology Journal 2(1) : 36-42.

Contribution des auteurs

Mylène C. Gagnon, auteure de la présente thèse, a choisi le projet, l'a planifié, coordonné et dirigé. C'est aussi sur elle que reposait la responsabilité de résoudre les problèmes qui survenaient.

Vicky Houle a effectué la plupart des travaux menant à la caractérisation de l'enzyme et a été la rédactrice principale de l'article. Cet article l'a menée à l'obtention de son diplôme de maîtrise.

Étienne Dubé et Yves Hurtubise ont contribué à la révision de l'article.

Marc Beauregard est le professeur et le directeur du laboratoire où les travaux de recherches ont eu lieu et le titulaire des subventions de recherche qui ont permis ces travaux, il a dirigé Madame Houle dans la rédaction de l'article et l'a corrigé.

Impact of Glycosylation on *Saccharomyces cerevisiae* Endopolygalacturonase PGU1 Activity and Stability

V. Houle^{1,3}, M.C. Gagnon^{1,3}, E. Dubé^{2,3}, Y. Hurtubise¹ and M. Beauregard^{1,3,*}

¹Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada; ²Centre intégré en pâtes et papiers, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada and ³Centre de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (CREFSIP), Université Laval, Québec, Canada, G1K 7P4

Abstract: Endopolygalacturonases are among the best selling enzymes for a number of commercial applications such as food processing. For such enzymes, a potentially important component of production cost is glycosylation. This important modification of endopolygalacturonase has been detected for a number of species, but its real importance has not been thoroughly studied. Here we investigated endopolygalacturonase PGU1 from *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1389 produced in *S. cerevisiae* INVSc 1. Combinatorial mutagenesis of recombinant *S. cerevisiae* PGU1 putative glycosylation sites was performed, where asparagines 318 and 330 were replaced with either aspartic acid or glutamine. Electrophoretic analysis of the different recombinant enzymes studied here demonstrates that the putative sites 318 and 330 are indeed glycosylated when produced in *S. cerevisiae* INVSc 1. The optimal activity of these enzymes was detected at pH 4.5 and 55-60 °C. As for stability, all enzymes studied were less than 50% active after an incubation of two hours at 50 °C and at pH between 4.5 and 6.0. Glycosylation did not provide any significant stabilisation of PGU1, but the replacement of Asn 330 with Gln had a deleterious effect on stability. The secondary structure spectra are characteristics of proteins mostly composed of beta sheets. The T_m values measured for PGU1, PGU1 deglycosylated with endo H, and three mutants ranged from 53 to 55.4°C, indicating that glycosylation had no impact on PGU1 conformation.

Key Words: Endopolygalacturonase, glycosylation, directed mutagenesis, *Saccharomyces cerevisiae*, activity, stability.

1. INTRODUCTION

Pectic substances, a major constituent of plant cell walls, are degraded by a wide range of enzymes called polygalacturonases [1, 2]. Among them, endopolygalacturonases (endoPG) (E.C. 3.2.1.15) catalyze the random hydrolysis of α -1,4-D-glucosidic bonds between two non-methylated galacturonic acid residues [3, 4]. EndoPG production has been widely reported in plants and microorganisms. Plant endoPGs are important in fruit ripening and senescence [5], whereas the microbial enzymes are deployed during infection of plants [6-8]. The presence of polygalacturonases enzymes has been reported in different yeasts. The genes coding for endoPG from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* have been cloned and characterised [7-9]. Amino acids sequence derived from these genes show high similarity with each other and with endoPG from filamentous fungi. Recombinant expression systems have allowed for major advances in characterising endoPG, namely the identification of active site critical residues in *Aspergillus niger* [1], *S. cerevisiae* [10] and *Stereum purpureum* [11]. It was also useful for the elucidation of structural features associated with processivity in crystallised *A. niger* endoPGs [12].

Generally speaking, protein glycosylation has been related to solubility, stability and proteolytic resistance [13-

15]. Although most endoPGs characterised to date have been found to have one glycosylation site or more, the role of this modification in defining endoPG properties is not clear yet. First, as indicated earlier by [16] the number and sequence location of putative glycosylation sites vary across endoPG from different organisms. Then, divergent results have been reported regarding the impact of removing the oligosaccharides from (or avoiding their addition to) mature endoPGs. Enzymatic removal of oligosaccharides from native *A. niger* endoPG and from recombinant *Phytophthora parasitica* endoPG completely inhibited enzymatic activity of both enzymes. At variance, it was reported that glycosylation had no impact on activity for recombinant *S. purpureum* endoPG expressed in *Escherichia coli* [17]. For this particular case, enzyme thermostability decreased as the extent of glycosylation increased. Glycosylation of *S. cerevisiae* endoPG also appears to be accessory, as mutagenesis of the two putative glycosylation sites lead to partial enzymatic inhibition, or had no effect at all depending on the combination of sites mutated when produced in two strains of *Pichia pastoris* [10]. Stratilova *et al.* [16] indicated that while several endoPG were glycosylated near the active site region, PGU1 from *S. cerevisiae* was not. This observation may provide a rationale for the different behaviours reported for different endoPGs. A possible interaction between endoPG putative oligosaccharides and its substrate is not completely out of the question. The recent observation that *S. cerevisiae* endoPG properties are modulated by the different glycosylation pattern afforded by *S. pombe* suggests such interaction [18].

*Address correspondence to this author at the Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7; Tel: +1(819)376-5053; Fax: +1 de 376-5084; E-mail: marc.beauregard@uqtr.ca

Clearly, the importance of glycosylation in defining specific endoPG properties has to be addressed: this post-translational modification increases the metabolic cost of producing the enzyme. Further, the functional importance of such post-translational modifications may decrease the validity of prokaryote-based strategies for protein engineering. Both aspects may have a deleterious impact on the costs associated with the development and the commercialisation of endo PG for various industries.

Here we describe the use of a commercial *S. cerevisiae* strain for the recombinant expression of PGU1 isolated from *S. cerevisiae* strain CECT 1389. This expression system will be used to investigate the impact of glycosylation on *S. cerevisiae* PGU1 activity and stability.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Strains and Plasmids

The gene coding for endoPG I (PGU1) and its native sequence signal were isolated from the strain *S. cerevisiae* CECT 1389 (ATCC). For polymerase chain reaction [19] gene amplification, the following primers were used 5' CCG CAA AGC TTG ATG ATT TCT GCT AAT TCA TTG C 3' and 5' CGC GCG GCC GCC TTA ACA GCT TGC ACC AGA TCC 3'. This strategy provided amplified gene flanked by *HindIII* and *NotI* restriction sites at their 5' and 3' ends, respectively. After PCR, the gene was cloned in pYES2/CT yeast vector (Invitrogen). The recombinant vector was transferred by electroporation in *Escherichia coli* DH5 α for cloning, and in *S. cerevisiae* INVSc I (Invitrogen) for production of the enzyme.

2.2. Media Composition and Growth Conditions

Bacterial cells were grown overnight at 37 °C on Lowry Broth medium containing ampicillin (100 μ g/mL) after transformation. INVSc I cells were grown on YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) for two days at 30 °C. After transformation, yeast clones were grown at 30 °C for three days on Sc minimal medium as per manufacturer's instructions (pYES2/CT manual, Invitrogen, Burlington, Ontario). For enzyme production, yeast clones were grown in liquid Sc minimal medium for 24 h, with agitation (300 rpm) at 30 °C. The induction was performed in Sc minimal medium with galactose (equivalent to Sc minimal medium except for glucose being replaced by galactose) for 20 h, 300 rpm. Secretion of the PGU1 by the new production host was verified on Sc minimal media gelose [20] equilibrated at pH 5.0 with sodium acetate buffer and which contained polygalacturonic acid (PGA) 1%.

2.3. Purification and Quantification

After induction the supernatant was collected by centrifugation for 10 minutes at 2057 g and filtered on a 0.2 μ m filter, then concentrated 10-fold using an ultrafiltration device (Amicon membrane 30 kDa, YM30). The proteins were then resuspended and conserved in sodium acetate buffer 50 mM at pH 5.0. Quantification of total proteins was carried out in a 96 multi-well plate (400 μ L well) format using a bicinchoninic acid test using BSA as the standard for the calibration. Absorbance was measured at 560 nm on a Mul-

tiskan Ascent spectrophotometer (from Thermo Electron Corporation).

2.4. DNA Manipulation, Cloning and Mutagenesis

The substitution of the Asn by either Asp or Gln in Sc HN gene (recombinant PGU1, hereafter named Sc HN) was performed using the Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) as per manufacturer's instructions. DNA extracts were sequenced and analysed with an ABI Prism 3100.

2.5. Electrophoresis and Proteins Detection

Protein electrophoresis was performed using tricine 10% ready gel, a tricine buffer system and the Silver stain SDS-PAGE Standard, low range calibration mix from Biorad. Silver nitrate staining was used for detection, using the Proteosilver Silver Stain Kit from Sigma.

2.6. Deglycosylation with Endoglycosidase H

1.4 mg of proteins was deglycosylated with 0.125 U of endoglycosidase H (endo H) at 37 °C over night.

2.7. Detection of endoPG Activity

INVSc I clones, obtained on Sc minimal media gelose, were isolated and grown on Sc minimal media gelose with galactose and supplemented with 1% PGA. The yeast *Kluyveromyces marxianus* Y-49 (ATCC) which produces an active endoPG, was used as a positive control, while *S. cerevisiae* INVSc I which does not produce endoPG, provided a negative control. The gelose was left at 30 °C for 3 days and endoPG activity was detected by reacting with ruthenium red 0.075% using the method described by [21].

2.8. Enzymatic and Stability Assay

Quantitative measurements of enzymatic reaction initial velocity were performed using a reducing sugar detection method adapted from [22]. The enzymatic assay was carried out in an acetate/bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl) methane) buffer 180 mM adjusted from pH 4.0 to 6.5 as specified. The temperature was maintained at 50, 55 or 60 °C using a Digital heat block modified to transfer heat to a multi-well plate (1.2 mL well). Note that these conditions mimic the ones found in a typical TMP pulp and paper plant where pectate has to be controlled. The PGA 0.67% solution and all the acetate/bis-tris buffers were equilibrated at the specified temperature before addition of the enzyme. The reaction mixture was sampled every 35 s for 3 min and mixed with 1 mL of PABAH (4-hydroxybenzoyl hydrazine) 0.5% (previously dissolved in 0.5 M NaOH) in multi-well plates (2 mL well). The reactions were then heated at 110 °C for 10 min., cooled on ice for 10 min. and transferred to multi-well plates for reading at 405 nm. One unit was defined as the production of 1 μ mole of galacturonic acid per minute. For thermostability measurements, endoPGs were equilibrated in the acetate/bis-tris buffers at the specified temperature and sampled every 30 min. Residual activity was then measured as indicated above, at a fixed temperature of 50 °C and pH 5.0. For sake of reproducibility, the reactions and incubations described in this section were auto-

mated using a Biomek 2000 workstation (Beckman Coulter) and all measures were performed in triplicates.

2.9. Circular Dichroism Measurements

For circular dichroism (CD) measurements enzymes were resuspended in sodium acetate buffer 50 mM (pH 5.0) at a concentration of 0.5 mg mL⁻¹. The samples were then degassed and equilibrated 20 minutes at 20°C before measurements. Spectra were measured with a Jasco J-720 spectropolarimeter, which was routinely calibrated with a 0.06% (W/V) ammonium (+)-10-camphorsulfonate solution. For measurements in the far-UV region a quartz cell with a path length of 0.01 cm was used. Ten scans were accumulated at a scan speed of 20 nm per minutes, with data being collected at every nm from 185 to 240 nm. Sample temperature was maintained at 20°C using a Neslab RTE-111 circulating water bath connected to the water-jacketed quartz cuvette. Spectra were corrected for buffer signal and conversion to $\Delta\epsilon_{MRW}$ (mean residue weight) was performed with the Jasco Standard Analysis software. In order to measure thermostability, temperature was increased from 45 to 70 °C at a rate of 20 °C per hour using a Neslab RTE-11 controlled by the Jasco spectropolarimeter software. For these experiments, data were collected at 215 nm using a 0.1 cm path quartz cell.

Thermal stability was calculated assuming a unimolecular, two-state process as previously described [23]. The $\Delta\epsilon_{MRW}$ calculated at various temperatures was used as the property (y) indicative of the extent of unfolding. In the folded state, the parameter $y = y_f$ and the fraction of folded protein f_f is equal to 1. When the protein is unfolded, the parameter $y = y_u$, and the fraction of unfolded protein f_u is equal to 1. For intermediate states, y is given by $y_f f_f + y_u f_u$. Thus, by measuring y , we can calculate the fraction of protein unfolded: $f_u = (y_f - y)/(y_f - y_u)$. The equilibrium constant for the unfolding process is $K_u = f_u/(1-f_u)$ and melting temperatures (T_m) are obtained at $K_u = 1$ [23].

2.10. 3D Structure Modelling

A hypothetical 3D structure of *S. cerevisiae* PGU1 was generated using Swiss-Model and Swiss-PDB Viewer [24, 25]. The crystallographic structures used for homology modelling were those of *Aspergillus niger* endoPG II [1], *A. aculeatus* PG [26] and *A. niger* endoPG I [27]. The RMS (Root mean square) calculated for the hypothetical 3D structure is 2.96 Å. The RMS calculated is an average of the backbone atoms positions of each crystallography structures, taken separately, and compared to the hypothetical 3D structure backbone position of PGU1 of *S. cerevisiae*.

3. RESULTS

3.1. Analysis on SDS-PAGE

PGU1 produced by *S. cerevisiae* has two putative glycosylation sites at positions 318 and 330. To verify that these two sites were indeed glycosylated in *S. cerevisiae*, those sites were mutated individually or in a combinatorial mode and the resulting enzymes were produced and purified. Electrophoretic investigation of PGU1 extracts (95% Sc HN purity) reveals that in *S. cerevisiae*, three bands separated by about 4 kDa are associated with endoPG activity (Fig. 1).

Mutating either of the two putative glycosylation sites resulted in the loss of the 45 kDa band, which is the heaviest species, while mutating both sites lead to disappearance of both bands at 45 and 41 kDa. For double mutated enzymes analysed, only one band at 37 kDa was detected on the gel, this could correspond to the molecular mass of deglycosylated PGU1 [28]. These results suggest that in *S. cerevisiae*, PGU1 exist as three populations: one non-glycosylated, one with one glycosylation and a third group with both sites glycosylated.



Fig. (1). SDS-PAGE analysis of Sc HN and all mutants. Lane 1: INVSc 1 (host without expression vector); lane 2: Sc HN deglycosylated with endo H; lane 3: Sc HN; lane 4: Sc N318D; lane 5: Sc N318Q; lane 6: Sc N330D; lane 7: Sc N330Q; lane 8: Sc N318D-N330D; lane 9: Sc N318D-N330Q; lane 10: Sc N318Q-N330D; lane 11: Sc N318Q-N330Q and lane 12: standards. Approximate size of proteins detected is indicated by arrows on the left.

3.2. Analysis of the Enzymatic Activity

The activity of Sc HN, Sc HN deglycosylated with endo H and all mutated enzymes was measured at various temperatures and pH. As shown in Fig. (2), all curves were characterised by a peak at pH 4.5-4.75 and a shoulder at pH 5.5. None of the enzymes were active at pH 6.5. These curves were similar for all enzymes studied at 50, 55 and 60 °C (not shown). Similar activity curves were obtained for another native endoPG from the laboratory strain *S. cerevisiae* IM1-8b. Removing one or both glycosylation sites resulted in no significant difference in enzymatic activity at all pH and at

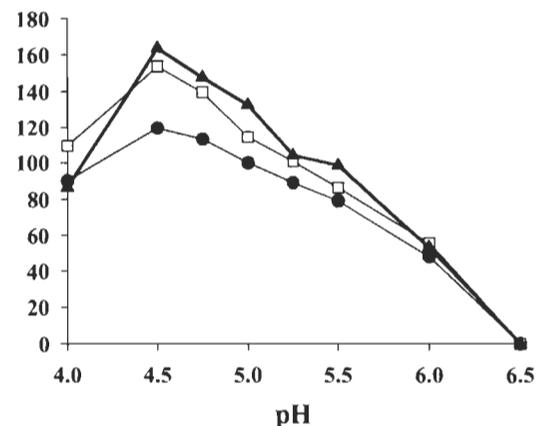


Fig. (2). Relative activity of Sc HN measured at various pHs and at 50 (♦), 55 (□) and 60 (▲) °C. Enzymatic activities were measured on a period of 3 min and expressed as percentage of enzymatic activity measured for Sc HN at 50 °C, pH 5.0 (defined as 100%). Only Sc HN results are shown for clarity. Average error margin: +/- 5%.

all temperatures studied except for the double mutated enzyme. At 60°C the activity was decreased by 10 to 20% depending on pH, for the double mutated enzymes. Removal of both oligosaccharides from Sc HN by treatment with endo H lead to a similar decrease in activity at 60°C (see also Table 1).

Table 1 summarises the results obtained for enzymatic activity at pH 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0, measured at 50, 55, and 60 °C. Most enzymes had their maximal activity at 60 °C and pH 4.5. Enzymes Sc N318Q-N330D and Sc N318Q-N330Q were more at 50-55 °C for all pH, with no significant difference in the enzymatic activity measured for both temperatures. For all proteins studied, it was found that as the pH increased (from 4.5 to 6.5), the activity decreased, with no activity left at pH 6.5. The impact of temperature was found to vary depending on pH and on the nature of mutations. The six first enzymes in Table 1 (i.e. with a single mutation or none) showed an increase of activity with the increase of temperature at all pH. Double mutants behaved differently. Mutants with D in position 318 (Sc N318D-N330D/Q) had similar activities at 55 and 60 °C, for most of the pH range studied. For the other double mutants (Sc N318Q-N330D/Q) the activity peaked at 55°C at all pH studied. Despite the moderate variations observed in Table 1, it remains that PGU1 activity is not dependant on glycosylation. Only a moderate impact on activity was detected when PGU1 was deglycosylated with endo H or when glycosylation sites were mutated individually, regardless of the residues chosen for the positions 318 and 330. The differences observed for the double mutated enzymes appear to be controlled by the residues chosen to replace the asparagines 318 and 330.

Sc HN enzymatic activity was compared with Sc HN deglycosylated with endo H at temperatures between 30 and

70 °C at pH 4.5, 5.0 and 6.0 (Fig. 3). The enzymatic activity of both enzymes was similar with a maximum at 60 °C for all pH studied. Activity was maximal at pH 4.5 and decreased by 60% at pH 6.0. These results corroborate those in Table 1.

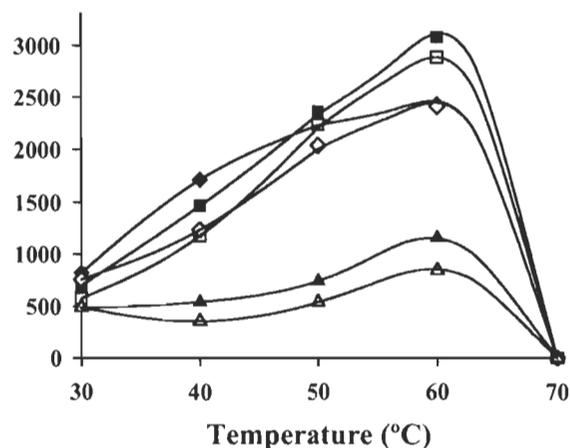


Fig. (3). Activity measured at different temperatures and pH 4.5 (■, □) 5.0 (◆, ◇) and 6.0 (▲, △) for Sc HN (filled symbol) and Sc HN deglycosylated with endo H (open symbol). Average error margin: +/- 5%

3.3. Analysis of Stability

The stability of Sc HN, Sc N318D, Sc N330D and Sc N318D-N330D exposed at 37 °C, pH 5.0 for one hour was measured (data not shown). After one hour treatment, all enzymes retained 100% of their initial activity. The stability of Sc HN, Sc HN deglycosylated with endo H and all mutated enzymes was then analysed after different incubation

Table 1. Enzymatic Activity of Sc HN, Sc HN Deglycosylated with Endo H and all Mutated Enzymes Measured at pH 4.5, 5.0 and 6.0 and at 50, 55 and 60 °C

Enzymes	Activity U/mg ^a											
	pH 4.5			pH 5.0			pH 5.5			pH 6.0		
	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
Sc HN	2300	3000	3200	2000	2200	2600	1500	1700	1900	940	1100	1000
Sc HN deglycosylated	2100	2100	2500	1900	1900	2200	1200	1600	1400	470	640	890
Sc N318D	1800	3000	3100	1500	2400	2700	1300	1900	2300	560	1100	1200
Sc N318Q	2500	2500	2700	1900	2000	2300	1500	1600	1800	640	700	800
Sc N330D	2600	2800	3000	2100	2200	2400	1600	1700	1800	900	920	630
Sc N330Q	2300	2500	3200	1900	2000	2600	1400	1400	2000	830	880	1200
Sc N318D-N330D	2000	2500	2400	1700	2200	2200	1400	1600	1700	660	640	630
Sc N318D-N330Q	2300	2300	2500	1900	2000	2100	1600	1700	1700	630	700	420
Sc N318Q-N330D	2600	2600	2200	2200	2200	1600	1600	1700	1200	870	860	570
Sc N318Q-N330Q	2400	2500	2200	2200	2200	1900	1800	1900	1500	760	800	370

^aOne unit is the concentration of GA produced in $\mu\text{mol per mL per minute}$ ($U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). The activity is expressed as $U \text{ mg}^{-1}$, with an error margin of 10%.

time during a two hours treatment at 50 °C from pH 4.5 to 6.0. The half-life of these enzymes differed depending on the mutation (Table 2). Sc HN, Sc HN deglycosylated and both mutants Sc N318D/Q lost 50% of their initial activity in 30 to 60 min. When Asn 330 was replaced by an Asp, the half-life increased between 60 and 90min at pH 4.5, 5.0 and 5.5. As for the enzymes with the mutation N330Q, the half-life was reached in less then 30 min for all pH. The stability was not dependant on glycosylation and like the activity, the differences observed were rather due to the amino acid replacing Asn 318 and 330. All of these enzymes are still active after the two hours treatment and their residual activity ranged from 5 to 50% (data not shown).

Table 2. Approximate Half-Life of Residual Enzymatic Activity of Sc HN, Sc HN Deglycosylated with endo H and all Mutants Measured at 50 °C at pH 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0. *: 0 to 30 min; **: 30-60 min; *** 60-90 min

Enzymes	Half-life (min)			
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
Sc HN	**	**	**	**
Sc HN deglycosylated	**	**	**	**
Sc N318D	**	**	**	**
Sc N318Q	**	**	**	**
Sc N330D	***	***	***	**
Sc N330Q	*	*	*	*
Sc N318D-N330D	***	***	***	**
Sc N318D-N330Q	*	*	*	*
Sc N318Q-N330D	***	***	***	**
Sc N318Q-N330Q	*	*	*	*

3.4. Analysis by Circular Dichroism

The secondary structures were analysed by circular dichroism. Spectra were indicative of significant beta sheet content, with a minimum around 217 nm and a maximum around 195 nm. This spectroscopic analysis fully supported the theoretical 3D structure obtained by modelling (Fig. 4). The secondary structures of selected mutants prepared here were measured under the same conditions. There was no significant difference in the spectra obtained for the enzymes Sc HN, Sc HN deglycosylated with endo H, Sc N318D, Sc N330Q and Sc N318D-N330D (not shown). This suggests that the oligosaccharides have little impact on the protein structure, providing a rationale for the absence of large differences in the activity and in the stability of these enzymes.

3.5. Analysis of the Melting Temperature

The melting temperatures (T_m) calculated for enzymes studied by CD were similar. The T_m of Sc HN deglycosylated with endo H was 55.3 °C, while the least stable enzyme studied by CD had a T_m of 52.6 °C (Sc N318D-N330D).

Other enzymes studied had intermediate melting temperature. Analysis of conformational stability appears to be closely related to the stability challenge performed at 37 and 50 °C. A direct comparison of T_m calculated from denaturation curves and results in Table 1 is not possible. One has to consider that for Table 1 activity data, enzymes were exposed to 60 °C (or any other temperature) only few minutes, while denaturation studied by CD were performed over 70 min.

DISCUSSION

The importance of glycosylation for protein stability is well established. Glycosylation may provide conformational stability by its steric impact on the denatured state entropy, and may protect otherwise exposed proteolytic targets from hydrolysis by proteases [14]. Glycosylation is also an important factor regarding protein engineering strategies as well as commercial application of enzymes. Examination of endoPGs sequences by Stratilova [16] revealed that, in comparison with several other endoPGs, putative glycosylation sites in *S. cerevisiae* PGU1 are remote from its active site, and according to homology-based 3D structure modelling, these sites point outward from the substrate binding cleft (Fig. 4). On the basis of this observation one would predict a limited impact of glycosylation in *S. cerevisiae* PGU1 activity. Obviously, an experimental verification of this postulate was mandatory before considering production of PGU1 in organism devoid of post-translational modification machinery.

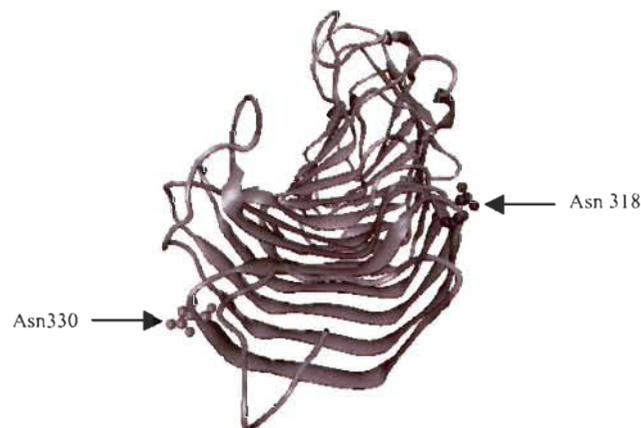


Fig. (4). Structural model of PGU1 from *S. cerevisiae*. Putative glycosylation sites Asn 318 and 330 are indicated by arrows.

Blanco *et al.* [10] have reported a partial characterisation of enzymes with their putative glycosylation sites (Asn 318, Asn 330) mutated for Asp in *S. cerevisiae* PGU1 from the strain IM1-8b produced in *P. pastoris* X-33 and KM71. Modification of pectinase activity was detected for N318D-N330D, with 50% activity left compared to the control, when produced in strain X-33. For the same enzyme produced in strain KM71, the activity detected was 12.5% compared to the control. Since nothing in this study proves that these sites were glycosylated in the native enzyme and not in the double mutated enzyme, interpretation is not straightforward: The possibility that this change in activity was due to deleterious mutations of Asn to Asp themselves was not addressed. In addition, since activity was calculated on the ba-

sis of volume used for the activity assay, one cannot rule out a possible difference in protein expression yield as an explanation for the apparent decrease in activity. Since glycosylation may offer protection against proteolysis, avoiding glycosylation by mutating both Asn may lead to increased proteolysis, reduced protein recovery and lower apparent endoPG activity. Also, depending on the *P. pastoris* strain used for the production, the activity detected was different. The organism chosen for the production seems to have a direct impact on the activity detected, that may explain the difference between their results and the ones we obtained.

Sieiro *et al.* [18] reported on the production of PGU1 from *S. cerevisiae* IM1-8b in *S. pombe*. Using this host, an endoPG with modified properties (optimal pH and temperature, stability) was generated. It was suggested that differences in glycosylation pattern between this host and *S. cerevisiae* was responsible for the modulation of optimal conditions for enzymatic activity. The authors suggested that glycosylation may affect *S. cerevisiae* PGU1 but such interpretation was not supported by experimental evidence. Further, actual glycosylation of Asn 318 and 330 was neither demonstrated nor characterised in this study.

We attempted here to shed some light on this important issue by reassessing the experimental strategy: First, a recombinant system based on *S. cerevisiae* as a host was chosen. The purpose was to use an organism which does not produce endoPG and which is close to the native organism Sc CECT 1389. Second, we compared all activities on the basis of endoPG concentration (mg L^{-1}), eliminating the impact of expression yield on measured endoPG activity. Third, we adapted an enzymatic assay for direct and continuous measurement of product accumulation, that can be carried out at the pH and temperature that one selects to investigate. Earlier works were based on the method of Somogyi [29] as modified by Nelson [30] where all measurements are "end point" and are carried out at 37 °C, after incubation under selected conditions. Obviously, as seen here, changing temperature greatly affect the outcome of activity measurements.

The successful expression of recombinant *S. cerevisiae* PGU1 in a commercial *S. cerevisiae* host was achieved. Expression yield in the range of 25-40 mg L^{-1} of broth was achieved, and recombinant PGU1 (Sc HN) was found to represent at least 95% of all secreted proteins. The electrophoretic analysis shown in Fig. (1) indicates that *S. cerevisiae* PGU1 was glycosylated at Asn 318 and 330 when produced in *S. cerevisiae* INVSc strain and that Sc HN secreted by *S. cerevisiae* were not homogeneously glycosylated. Depending of the presence of one, two or no putative glycosylation sites at 318 and 330, three forms of different masses were observed. The observation that most single and double mutated enzymes were found to be as active as Sc HN, is compatible with three isoforms having substantial endoPG activity. In a previous work, [9] characterized the native PGU1 produced by Sc CECT 1389. After partial purification of PGU1 by gel exclusion chromatography, only one active enzyme with a molecular mass of 39 kDa was isolated. This suggests that PGU1 from Sc CECT 1389 was not glycosylated when produced by this strain. Also, [9] measured the optimal pH and temperature of PGU1, which are pH 5.5 and 40 °C. At variance, we found here that when using INVSc I as production host, PGU1 has an optimal pH and temperature of 4.5 and

60°C. Comparison of our results and those of other researchers [10, 18] indicate that the production host has a significant impact on PGU1 glycosylation and enzymatic properties.

Eight enzymes were analysed, using a combinatorial approach for double mutations. All of them displayed substantial activity and all had a similar pH – activity curve. Glycosylation also had limited impact on the stability of the enzymes at 50 °C measured at four different pH. Only the replacement of Asn 330 with Gln had a negative effect on stability. These results are confirmed by the similarity of the secondary structure spectra measured for enzymes treated with endo H or with mutations. Also, the melting temperature was similar for all enzymes studied confirming that the oligosaccharides have no significant impact on enzyme conformation. This suggests that the structure is not affected by the presence or absence of glycosylation. Overall, this study clearly demonstrated that *S. cerevisiae* PGU1 does not need to be glycosylated for maintaining wild-type behaviour in the range of conditions studied here. Current work is under way with the goal of using simple bacterial expression system(s). Production of PGU1 in bacterial hosts is being investigated and new improvement strategies based on high-throughput protein engineering are being developed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by NSERC grants awarded to Marc Beauregard. Mylène Claude Gagnon acknowledges a stipend from NSERC industrial fellowship program.

REFERENCES

- [1] Van Santen Y, Benen JA, Schroter KH, *et al.* 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(43): 30474-80.
- [2] Willats WG, McCartney L, Mackie W, *et al.* Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 2001; 47(1-2): 9-27.
- [3] Gainvors A, Nedjaoum N, Gognies S, *et al.* Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 183(1): 131-5.
- [4] Serrat M, Bermudez RC, Villa TG. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Appl Biochem Biotechnol* 2002; 97(3): 193-208.
- [5] Hadfield KA, Bennett AB. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol* 1998; 117(2): 337-43.
- [6] Basset A, Khush RS, Braun A, *et al.* The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3376-81.
- [7] Blanco P, Sieiro C, Reboredo NM, *et al.* Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 164(2): 249-55.
- [8] Siekstele R, Bartkeviciute D, Sasnauskas K. Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1). *Yeast* 1999; 15(4): 311-22.
- [9] Blanco P, Sieiro C, Diaz A, *et al.* Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 1994; 40(11): 974-7.
- [10] Blanco P, Thow G, Simpson CG, *et al.* Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 210(2): 187-91.
- [11] Shimizu T, Nakatsu T, Miyairi K, *et al.* Active-site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* revealed by

- crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution. *Biochemistry* 2002; 41(21): 6651-9.
- [12] Pages S, Kester HC, Visser J, *et al.* Changing a single amino acid residue switches processive and non-processive behavior of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase I and II. *J Biol Chem* 2001; 276(36): 33652-6.
- [13] Kim BM, Kim H, Raines RT, *et al.* Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315(4): 976-83.
- [14] Van Berkel PH, Geerts ME, van Veen HA, *et al.* Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem J* 1995; 312 (Pt 1): 107-14.
- [15] Yanez E, Carmona TA, Tiemblo M, *et al.* Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem J* 1998; 329 (Pt 1): 65-71.
- [16] Stratilova E, Mislovicova D, Kacurakova M, *et al.* The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus* polygalacturonase. *J Protein Chem* 1998; 17(2): 173-9.
- [17] Shimizu T, Shibata H, Araya T, *et al.* Expression, purification, and crystallization of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2005.
- [18] Sieiro C, Poza M, Vilanova M, *et al.* Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(3): 1861-5.
- [19] Morgutti S, Negrini N, Nocito FF, *et al.* Changes in endopolygalacturonase levels and characterization of a putative endo-PG gene during fruit softening in peach genotypes with nonmelting and melting flesh fruit phenotypes. *New Phytol* 2006; 171(2): 315-28.
- [20] Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 1991; 194: 3-21.
- [21] McKay AM. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiology Letters* 1988; 56(3): 355-358.
- [22] Lever M, Walmsley TA, Visser RS, *et al.* Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines. *Anal Biochem* 1984; 139(1): 205-11.
- [23] Pace CN, Shirley, BA, *et al.* In: Creighton, TE, Ed. *Protein Structure-A practical approach*, IRL Press, Oxford 1990; 311-329.
- [24] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18(15): 2714-23.
- [25] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3381-5.
- [26] Cho SW, Lee S, Shin W. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *J Mol Biol* 2001; 311(4): 863-78.
- [27] Van Pouderooyen G, Snijder HJ, Benen JA, *et al.* Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* 2003; 554(3): 462-6.
- [28] Gognies S, Gainvors A, Aigle M, *et al.* Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1). *Yeast* 1999; 15(1): 11-22.
- [29] Somogyi M. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 1952; 195(1): 19-23.
- [30] Nelson N. Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol* 1957; 3: 85-86.