Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etablissement d'une banque d'ADNc de Scytalidium acidophilum en vue de cloner des gènes d'hydrolases d'intérêt industriel

DUCHENE, Cedric

Award date:
2004

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

ETABLISSEMENT D'UNE BANQUE D'ADNc DE *SCYTALIDIUM ACIDOPHILUM* EN VUE DE CLONER DES GENES D'HYDROLASES D'INTERET INDUSTRIEL

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Cédric DUCHENE
Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Etablissement d'une banque d'ADNc de *Scytalidium acidophilum* en vue de cloner des hydrolases d'intérêt industriel

DUCHÊNE Cédric

Résumé

Scytalidium acidophilum est un champignon extrémophile capable de vivre à des pH compris entre 0,4 et 6,0. Le clonage de gènes codant différentes enzymes acidorésistantes de cet organisme permettrait leur emploi notamment dans le processus de blanchiment des pâtes à papier. Ce procédé requiert l'utilisation de différents oxydants pouvant être polluants et comporte une étape en milieu acide. Il a été démontré qu'une action préalable d'une β-mannanase et d'une α-galactosidase en complément d'une xylanase sur les pâtes à papiers réduit l'usage de ces agents chimiques au cours du blanchiment. Dès lors, l'emploi de ces hydrolases acidorésistantes présenterait de nombreux avantages tant d'un point de vue économique qu'environnemental.
Dans le but de cloner des gènes de *S. acidophilum*, deux banques d'ADNc ont été réalisées et leur validation préalable au clonage des gènes d'intérêt est en cours.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2004
Promoteur : Professeur J. Vandenhaute

Remerciements

A tout seigneur tout honneur, je commencerai par remercier le Professeur Vandenhaute pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin et me permettre d'y effectuer mon mémoire. Je le remercie également pour « sa porte toujours ouverte » pour différentes explications et conseils. Merci également pour la passion qu'il insuffle à ses cours .

Je remercie Isa pour son encadrement, pour sa patiente et pour être toujours restée zen face a mon élocution parfois complexe. Merci également de m'avoir appris que « dans le milieu » c'est bien de réfléchir mais que c'est encore mieux d' agir.

Merci aux membres du jury Mesdames et Messieurs M.Delory, C.Lambert B.Damien, et B.Masereel pour leur lecture attentive de ce travail ainsi que pour leurs remarques et conseils qui me permettront de progresser dans ma formation ainsi que dans le passionant exercice que constitue la rédaction scientifique.

Merci à tous les membres de l'équipe Gemo pour leur acceuil et leur aide.

Merci à Matija pour ses précieux conseils et ses « multiples encouragements », Benoît pour m'avoir souvent rappelé « en bio faut pas avoir peur d'y aller franchement », Max pour les débriefings de réunion et ses conseils pour la rédaction, l'hybride Allan-lionel pour ses nombreux coups de main et services, le docteur G pour son aide et pour avoir toujours répondu à mes questions, Bassam pour ses réponses quand j'avais des problèmes avec *Scytalidium*, Damien pour le précieux article envoyé, Rose-Ma et Monique pour leur gentillesse et leur dévouement lorsque j'avais quelque chose à leur demander.

Merci a toutes les gens du labo pour leur sympathie et leur accueil.

Merci à la dream team des mémorants URBM : Richard, Julien, Johan et Aurore . Je vous remercie pour tous ces moments passés ensemble.

Merci à toutes les stagiaires Anne-Michèle, Stéphanie, Laurence pour la bonne ambiance que vous avez amenée pendant votre stage.

En tant que « coach », je tiens à féliciter et remercier tous les étudiants de seconde licence pour tout les moments de rigolades et pour avoir toujours constitué un formidable public me forçant chaque fois à me surpasser au cours de mes présentations. Sans votre soutien à toutes et tous elles n'auraient jamais été aussi mémorables.

Merci à tous les membres de l'Empire Bauchau : Jon, Nico, Stéphane, Johan, Stéphanie, Yeliz, Robert et tous les autres.

Merci à C. Dernoncourt et à l'URPHYM pour l'ARN de souris généreusement prêté.
Merci à S.Zdanov et à l'URBC pour m'avoir permis d'effectuer les analyses au Bioanalyser.
Merci à J. Messiaen et P.Cambier et à l'URBV pour les scans que j'ai pu réaliser chez eux.
Merci à S.Remy pour les nombreux ouvrages prêtés

Je crois, je pense, je suis sûr et certain que j'oublie certaines personnes, ne m'en veuillez pas mais j'ai vécu quelques journées hitchkochiennes dignes d'épisode de la série «Mission impossible » et « 24H » qui m'ont fait quelque peu perdre la mémoire.

Enfin je tiens à remercier mes parents et ma famille pour leur soutien dans les moments difficiles rencontrés au cours de ces années. Merci d'avoir toujours été là et de m'avoir permis de mener à bien ces études. Je terminerai en citant quelqu'un qui gagne à être connu et qui disait « les plus belles victoires commencent souvent par une défaite» ce qui illustre peut être un peu mon parcours.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES *1*
I INTRODUCTION *4*
1. AVANT PROPOS 5
2. SCYTALIDIUM ACIDOPHILUM 6
2 .1 Taxonomie et description générale 6
2.2 Caractéristiques physiologiques 7
3. UNE APPLICATION : LA FABRICATION DU PAPIER 8
3 .1 Le bois 8
3.1.1 La paroi végétale 8
3.1.1.1 Composition de la paroi *8*
3.1.1.2 Organisation de la paroi *9*
3.1.2 Croissance végétale : rappels 10
3.1.3 Croissance secondaire: mise en place du bois 11
3.1.4 En résumé 11
3.2 La fabrication du papier 11
3.2.1 Introduction 11
3.2.2 Les pâtes à papier 12
3.2.2.1Les pâtes mécaniques *12*
3.2.2.2 Les pâtes chimiques *12*
3.2.3 Le blanchiment des pâtes à papier 14
3.2.3.1 Caractéristique d'une pâte *15*
3.2.3.2 Les différents agents oxydants *16*
3.2.3.3 Le bioblanchiment *17*
3.2.4 En résumé 17
3.3 Les Hydrolases de *S. acidophilum* d'intérêt industriel 17
II OBJECTIFS ET STRATEGIE DU TRAVAIL *20*
III RESULTATS *22*
1. INTRODUCTION 23
2. DETECTION D'ACTIVITÉ DE DEGRADATION DU GALACTOMANNAN 23
2.1 Préparation des échantillons 23
2.2 Mise en évidence d'activité β-mannanase et/ou α-galactosidase 24
2.2.1 Principe du test d'activité 24
2.2.2 Détection de l'activité de dégradation du galactomannan 25
3. EXTRACTION d'ARN 28
3,1 Spectres d'ARN 28
3.2 Electrophorèse d'ARN 29
3.2.1 Gel d'agarose 29
3.2.2 Gel d'agarose formaldéhyde 29
3.3 Analyse au BIOANALYSER 30
3.4 Conclusion 32
4. BANQUE d'ADNc 32
4.1Synthèse d'ADNc 32
4.2 Traitement à la protéinase K et restriction de l'ADNc 34
4.3 Ligation de l'ADNc 34
4.4 Titre de la banque 35
4.4.1 Titre de la banque 35
4.4.2. Titre de la banque après amplification 36
4.5 Contrôle de la banque 37
4.5.1 Récupération de l'ADN plasmidique 39

4.5.2 Sondage test pour un gène de xylanase 40
4.6 Conclusion 42
IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES *43*
V MATÉRIELS ET MÉTHODES *47*
1. Matériels 48
1.1 Solutions et tampon 48
1.1.1Solutions et tampons pour les tests d'activités 48
1.1.2 Solutions et tampons pour électrophorèse en gel d'agarose 48
1.1.3 Solutions et tampons pour extraction et gel d'ARN 49
1.1.3.1Extraction d'ARN *49*
1.1.3.2 Gel formamide *49*
1.1.4 Solutions et tampons pour la banque d'ADNc 50
1.1.5Tampons et solutions pour minipréparation d'ADN plasmidique 50
1.1.6 Solution pour criblage de la banque 51
1.2 Milieux 51
1.2.1 Milieux pour *S. acidophilum* 51
1.2.1.1 Milieux liquides *51*
1.2.1.2 Milieux solides *52*
1.2.2 Milieux pour bactéries 52
2. Méthodes 53
2.1 Techniques relatives aux acides nucléiques 53
2.1.1 Minipréparation d'ADNplasmidique 53
2.1.2 Restriction d'ADN 54
2.1.3 Electrophorèse en gel d'agarose 54
2.1.4 Extraction d'ARN total de *S .acidophilum* 55
2.1.5 Gel d'agarose formaldéhyde 56
2.2 Techniques relatives au test d'activité 56
2.2.1 Séparation des fractions 56
2.2.2 Test d'activité selon la méthode DNS 57
2.3 Techniques relatives au criblage de la banque 57
2.3.1 Technique de criblage 58
2.3.2Séchage et pré-hybridation de la membrane 58
2.3.4 Marquage et hybridation de la sonde 58
2.3.5 Lavages 59
2.3.6Détection et révélation 59
2.4 Techniques relatives à l'élaboration de la banque d'ADNc 59
VI BIBLIOGRAPHIE *60*

I INTRODUCTION

1. AVANT PROPOS

« Le XXI^{ème} siècle sera celui de la Biologie ou ne sera pas », tel pourrait être ainsi énoncé le leitmotiv de tout chercheur en sciences de la vie. La Biologie et les sciences en découlant telles que la Génétique, la Biochimie, la Neurobiologie, la Bioinformatique..., s'apprêtent à connaître un essor et une renommée comparable à celle que connurent la Chimie et la Physique au début du siècle passé. Globalement cet essor est lié à ce qu'on a appris sur le support de l'information génétique : l'ADN.

Effectivement, que de chemins parcourus en 50 ans depuis la découverte par J.Watson et F.Crick, de la structure en double hélice de l'ADN !
De nos jours, outre les incréments nombreux de « savoirs », des capacités nouvelles d'action ont aussi émergé. Ainsi, grâce au développement du génie génétique il nous est possible d'exploiter à des fins technologiques les gènes de divers organismes. Parmi ceux-ci, l'étude et l'exploitation des gènes d'organismes extrémophiles s'avèreraient en particulier intéressante d'un point de vue industriel. En effet, il serait possible de tirer profit des protéines de ces organismes dans la mesure où leurs propriétés physicochimiques sont adaptées à des environnements extrêmes (enzymes thermorésistantes, psychrorésistantes, acidorésistantes,...) (Demirjian*et al.*, 2001). Autrefois, on pouvait seulement tenter d'extraire de telles enzymes de ces organismes, à présent on peut cloner les gènes codant ces enzymes et les surproduire dans un organisme hôte « domestique » en fermenteur. Certains de ces gènes ont déjà été clonés et les enzymes recombinantes introduites dans des procédés industriels ont permis d'améliorer le rendement de ceux-ci (ex : l'α–amylase thermorésistante de *B.licheniformis* pour la dégradation de l'amidon). De nombreux procédés industriels sont en attente, pour des raisons économiques et environnementales, de ce type d'applications, telle par exemple l'industrie papetière. Dans la fabrication du papier de nombreux agents polluants sont employés pour blanchir la pâte à papier. L'un de ces processus s'effectue en milieu acide. Dès lors afin de réduire l'emploi de ces polluants et donc d'améliorer le procédé, nous tenterons de cloner les gènes d'hydrolases d'un champignon acidophile.

Scytalidium acidophilum est un champignon filamenteux découvert au début des années 70 dans les sols et effluents acides d'une mine d'Uranium au Canada (Carmichael and Sigler, 1974). Ce champignon, comme son nom l'indique, est capable de croître et se développer dans des environnements particulièrement acides.

Nous exposerons d'abord sommairement l'état actuel des connaissances disponibles sur cet organisme. Ensuite, après présentation et description des domaines d'application potentiels, nous préciserons notre objectif et définirons notre stratégie de travail. Nous présenterons alors l'ensemble des données et résultats acquis ainsi que les techniques et moyens mis en œuvre pour y parvenir.
Enfin, après discussion des résultats obtenus, nous conclurons et envisagerons d'éventuelles perspectives quant à la poursuite de ce travail.

2. SCYTALIDIUM ACIDOPHILUM

2 .1 Taxonomie et description générale

Scytalidium acidophilum est un eucaryote appartenant au règne des Fungi (Figure1). Il appartient à l'embranchement des Ascomycètes mitosporiques (également appelés Deutéromycètes ou champignons imparfaits) classe des Hyphomycètes, ordre des Arthroconidiaceae genre *Scytalidium*. (Outre *S. acidophilum,* on dénombre 5 autres espèces appartenant au genre *Scytalidium* : *Scytalidium dimidiatum, Scytalidium hyalinum, Scytalidium lignicola, Scytalidium thermophilum et Scytalidium vaccini*).

Les Deutéromycètes sont un assemblage artificiel d'environ 15000 espèces différentes de champignons dont on ne connaît que la phase de reproduction asexuée (ou pour lesquels la reproduction sexuée n'est pas utilisée pour la classification). Parmi ceux-ci, on retrouve les genres *Aspergillus* et *Penicillium* (ex : *Penicillium notatum,* champignon à l'origine de la production de pénicilline).

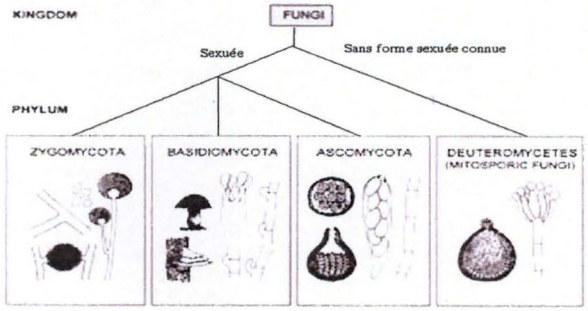


Figure 1 : Présentation schématique de la classification des *Deutéromycètes* au sein du règne des champignons (Guiguen, 2002).

Chez *S. acidophilum* aucun mode de reproduction sexuée n'est, à ce jour, connu. Sa division s'opère par mitose. On observe la formation d'arthroconidies (spores de reproduction asexuée formées à partir de filaments particulier se cloisonnant en cellules) par fragmentation du mycélium au sein duquel apparaissent des septums (Figure 2 et 3). Les chlamidiospores (forme différenciée des arthroconidies) sont caractérisées par une paroi mélanisée épaisse et par la présence de nombreux pigments noirs cytoplasmiques.

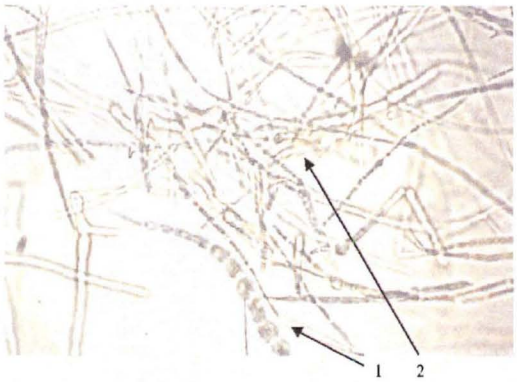


Figure 2 : Photo de *S. acidophilum* en microscopie optique. Un chapelet d'arthroconidies (1) est observé ainsi que des cellules de mycéliums segmentés (2) (Calcus, 1996).

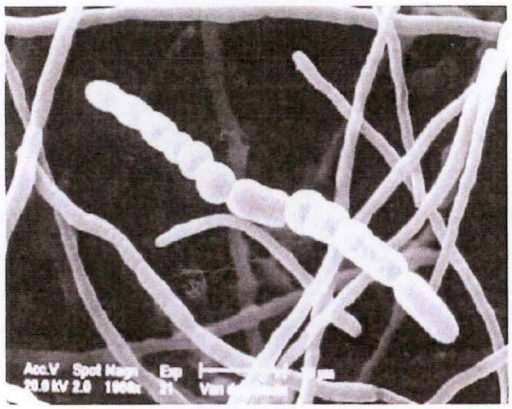


Figure 3 : Photo de *S. acidophilum* en microscopie électronique à balayage
Un chapelet d'arthroconidies peut à nouveau être observé au premier plan et entouré de mycéliums segmentés (Calcus, 1996).

Aucune information d'ordre génomique (taille du génome, nombre de chromosomes, nombre de gènes....) n'est actuellement publiée.

2.2 Caractéristiques physiologiques

Divers travaux préliminaires effectués au sein de notre laboratoire ont permis d'établir un milieu de culture liquide pour *S. acidophilum* et d'observer la capacité de croissance de cet organisme pour des pH allant de 0,4 à 6 avec un optimum de croissance à pH 2.
Parmi les diverses sources de carbone (glucose, fructose, mannose, éthanol,...) et différents milieux de cultures préalablement testés, l'un d'entre eux s'est révélé particulièrement intéressant en vue d'une application industrielle. Il s'agit du milieu à base de sciure de résineux. La croissance de *S. acidophilum* dans ce milieu a été démontrée (Calcus, 1996) (Figure 4a et b).

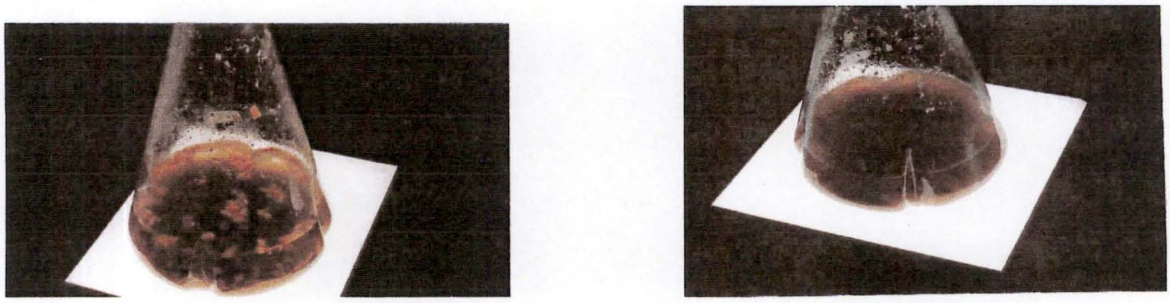


Figure 4 : Photo d'une culture de *S .acidophilum* avec de la sciure de résineux comme source de carbone. A gauche (4 a) au début de la culture et à droite (4b) après 2 semaines de culture (Calcus, 1996).

Les différentes enzymes acido-résistantes sécrétées par *S. acidophilum*, et lui conférant la capacité de dégrader le bois, pourraient donc présenter un intérêt biotechnologique et industriel important pour toutes applications nécessitant la dégradation du bois. Nous envisagerons dès lors l'une de ces applications en particulier, celle du blanchiment de la pâte

à papier. Après une présentation sommaire du bois, nous aborderons la fabrication du papier et mentionnerons les enzymes d'intérêt potentiel dans le processus papetier.

3. UNE APPLICATION : LA FABRICATION DU PAPIER

3 .1 Le bois

Le bois est un des constituants majeurs des plantes ligneuses. Quelques notions de morphologie et de biochimie de ces plantes seront rappelés ici.

3.1.1 La paroi végétale

3.1.1.1 Composition de la paroi

La paroi végétale est principalement constituée de glucides (90%) sous forme de polysaccharides, et de protéines (10%). On y distingue 3 groupes de polysaccharides.

- La cellulose :

Il s'agit du composant principal des parois cellulaires végétales. La cellulose est un polymère de glucoses liés en β-1,4. Les différentes molécules de cellulose se lient entre elles via la formation de ponts H et s'assemblent en fibrilles élémentaires, lesquelles s'assembleront en microfibrilles. Les microfibrilles constituent, à leur tour, par assemblage, les macrofibrilles (Figure 5). Les espaces laissés vacants entre les macrofibrilles pourront contenir de l'eau, des hémicelluloses et de la lignine. Cette structure générale assurera la rigidité de la paroi de la cellule végétale (Raven*et al.*, 2000).

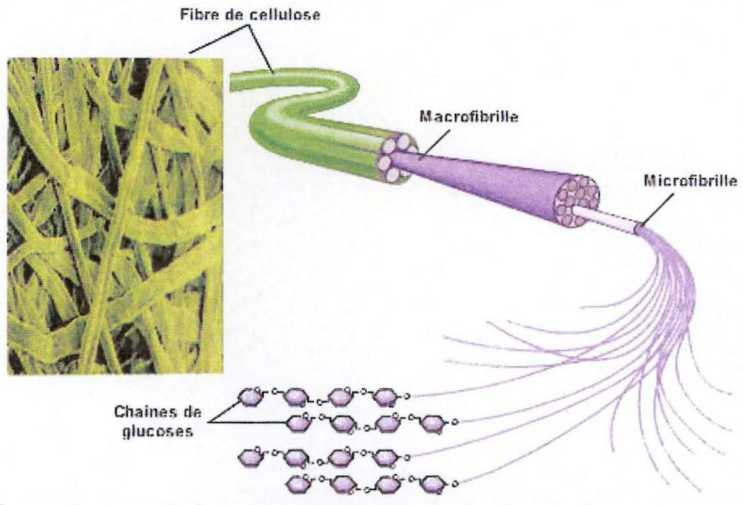


Figure 5 : Photo de la cellulose et représentation schématique de son arrangement

- Les hémicelluloses :

Il s'agit d'un ensemble d'hétéropolysaccharides constitués de polymères de pentoses (xylose, arabinose) et d'hexoses (glucose, galactose, mannose). Les principaux types d'hémicelluloses sont les galacto(gluco)mannanes et les xylanes.

-Les galacto(gluco)mannanes sont des polymères de mannoses (et de glucoses) liés en β-1,4 et ramifiés par des unités galactose.

-Les xylanes sont des hétéropolymères constitués d'un axe de xyloses liés en β-1,4 ramifié par différents groupements (arabinose, acide glucuronique,....)

- Les pectines :

Il s'agit d'un mélange de polysaccharides constitué principalement de polymères d'acide D-galacturonique (Figure 6).

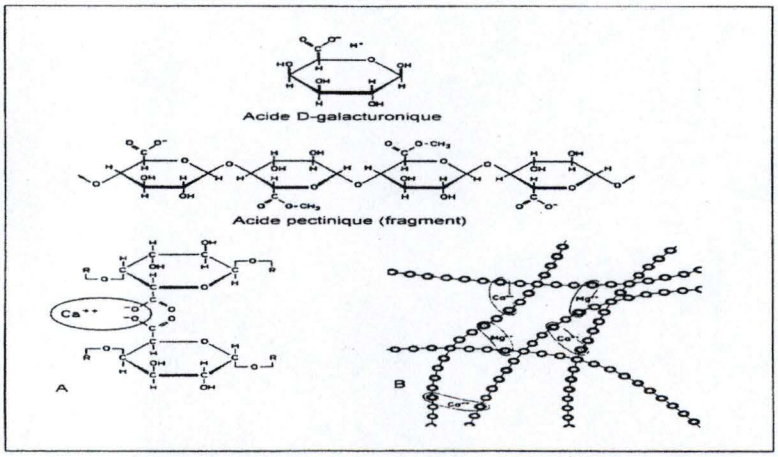


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des pectines

La lignine elle même est une substance phénolique se présentant sous la forme d'un polymère constitué de monomères de p-coumaryle, de coniféryle et d'alcool synapique. Sa composition monomérique diffère d'une espèce végétale à l'autre.

3.1.1.2 Organisation de la paroi

La paroi possède une structure multicouche, au sein de laquelle on retrouve :

- la lamelle mitoyenne

Celle-ci est formée à la fin de la division cellulaire et constitue une couche riche en pectines cimentant les parois primaires de cellules contiguës.

- la paroi primaire

Elle se constitue par un dépôt de cellulose s'organisant en microfibrilles sur la lamelle mitoyenne. Elle est également composée d'hémicellulose, de substances pectiniques et de glycoprotéines. Les microfibrilles se disposent sans arrangement particulier (Figure 7).

Figure 7 : Arrangement aléatoire des microfibrilles dans la paroi primaire

- la paroi secondaire

Ce composant est constitué de plusieurs couches de cellulose dont les fibrilles se disposent en faisceaux parallèles (au sein d'une même couche) entrecroisés avec ceux des couches adjacentes (Figure 8). La cellulose y est plus abondante que dans la paroi primaire et les pectines peuvent en être absentes. La paroi secondaire est particulièrement importante dans les cellules ayant une fonction de soutien et dans les cellules intervenant dans la conduction de l'eau (Raven*et al.*, 2000).

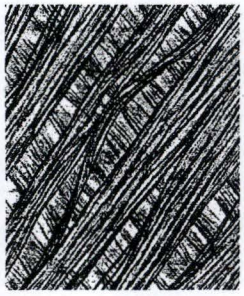


Figure 8 : Arrangement en structure parallèle des microfibrilles dans la paroi secondaire

3.1.2 Croissance végétale : rappels

Chez les plantes vasculaires, les différents types cellulaires sont différenciés à partir de tissus embryonnaires appelés méristèmes. Ces tissus, formés de cellules restant jeunes indéfiniment, conservent des capacités de division longtemps après la fin de l'embryogenèse. On distingue les méristèmes apicaux (situés aux extrémités des racines et des tiges) des méristèmes primaires et secondaires.

Les méristèmes apicaux donnent naissance aux méristèmes primaires (protoderme, méristème fondamental et procambium) élaborant après différenciation les tissus primaires (tissus de revêtements, tissus fondamentaux et tissus conducteurs) de la plante. Ce mode de croissance, impliquant l'extension de la plante et la production des tissus primaires est appelé croissance primaire et la partie de la plante formée de ces tissus est la structure primaire.
Les plantes herbacées ne connaissent qu'une croissance primaire et sont constituées uniquement de structures primaires. Les plantes ligneuses, par contre, subissent un accroissement en taille (croissance primaire) et en épaisseur grâce aux méristèmes secondaires (voir point 3.1.3). Cet épaississement porte le nom de croissance secondaire.

3.1.3 Croissance secondaire: mise en place du bois

Les tissus méristématiques secondaires (assurant la croissance secondaire) sont de deux types et se présentent comme deux cylindres emboîtés parcourant toute la hauteur de la plante. On distingue :

- le cambium, interne, qui intervient dans la production des éléments conducteurs secondaires : le bois (ou xylème secondaire) vers l'intérieur et le liber (ou phloème secondaire) vers l'extérieur.

- le phellogène, en périphérie, qui produit du liège vers l'extérieur et du phelloderme vers l'intérieur

3.1.4 En résumé

Le bois est un constituant des plantes ligneuses et est composé de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et d'autres substances. La proportion et l'abondance de chacun de ces composés diffèrera d'une espèce végétale à l'autre. La structure générale du bois sera considérée comme étant une agglomération et un assemblage de longues fibres maintenues ensemble par la lignine. Celle-ci agit comme une colle naturelle et confère au bois ses propriétés physiques.

Le bois est la source principale de fibres pour la production du papier. De nombreuses étapes sont nécessaires pour obtenir à partir du bois une feuille de papier. Le rendement de certaines de ces étapes pourra être amélioré par l'adjonction de différentes hydrolases.
Cette démarche est présentée au point suivant.

3.2 La fabrication du papier

3.2.1 Introduction

Le papier est une matière fabriquée avec des fibres végétales réduites en pâte, étendue et séchée pour former une feuille mince. Celui-ci a été inventé en l'an 105 en Chine et était à l'origine fabriqué à partir de vieux chiffons et d'écorces d'arbre. Les fibres contenues dans ces matériaux étaient martelées jusqu'à être complètement séparées, puis mélangées à de l'eau

pour constituer une pâte et tamisée sur un grillage fin. Le matériau obtenu était une feuille de fibres entremêlées qu'il fallait alors presser et sécher. Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que l'on abandonne l'utilisation de chiffons comme matière première de fabrication du papier pour se tourner vers le bois.

Les grandes étapes du processus de fabrication du papier à partir de bois n'ont pas changé depuis cette époque. Il y'a une étape d'écorçage du bois, une étape de réduction de celui–ci en une pâte et différentes étapes de blanchiment et purification de cette pâte avant séchage et mise sous presse pour obtenir une feuille.

La fabrication du papier peut donc conceptuellement se résumer en 2 grandes étapes.

1) L'obtention d'une pâte

2) La transformation de cette pâte en une feuille

Nous nous focaliserons exclusivement sur la 1ère étape en décrivant les différents types de pâtes et les différents processus utilisés pour l'obtenir ainsi que le traitement qu'elle devra subir. Enfin, nous préciserons à quel endroit du processus des hydrolases, par exemple de *S. acidophilum,* pourraient intervenir.

3.2.2 Les pâtes à papier

On distingue deux types de pâtes à papier : les pâtes mécaniques et les pâtes chimiques.

3.2.2.1Les pâtes mécaniques

Les pâtes mécaniques sont obtenues à partir de rondins de bois dont l'écorce est enlevée par simple frottement de ceux-ci les uns sur les autres. Ensuite, ces rondins sont râpés contre une meule appelée défibreuse (Figure 9). La pâte sortant des défibreuses contient encore de nombreuses impuretés (particules de bois de tailles diverses), cette pâte subit alors différents filtrages et raffinages avant d'être séchée et pressée en balles. Ce type de pâte interviendra entre autres dans la composition du papier journal, du papier pour magazines et des papiers sanitaires et domestiques.

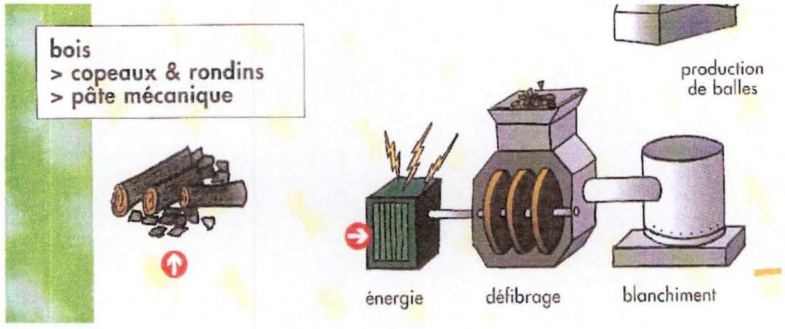


Figure 9 : Schéma représentant de manière générale l'obtention de pâtes mécaniques

3.2.2.2 Les pâtes chimiques

Les pâtes chimiques sont obtenues en cuisant des copeaux de bois à haute température (130 à 180°C) et sous haute pression pendant 2 à 5 heures dans un réacteur appelé lessiveur en présence d'une « liqueur blanche » (liquide contenant les agents chimiques) (Figure 13). Selon le type de produits chimiques utilisés on distinguera deux types de processus. Le processus Kraft ou alcalin est majoritairement employé (90%). Dans ce cas la cuisson s'effectue dans un milieu alcalin en présence d'une solution de soude. Ce processus mène à une dépolymérisation de la lignine (Figure 10a).

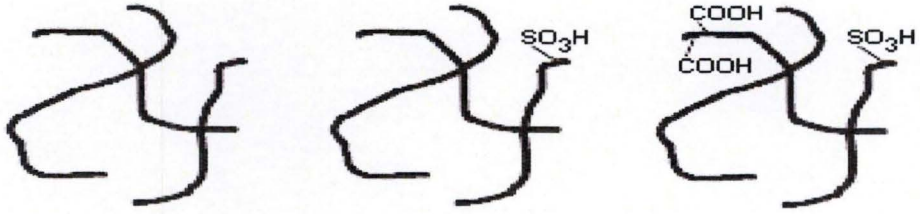
La lignine dans le processus Kraft

Lignine dans le bois Lignine dans la pâte Lignine dissoute

Figure 10 : Schéma représentant les différentes transformations de la lignine via le processus Kraft

Le processus acide s'effectue avec du bisulfite. (figure 10b)

La lignine dans le processus acide



Lignine dans le bois Lignine dans la pâte Lignine dissoute

Figure 10b : Schéma représentant les différentes transformations de la lignine via le processus acide.

Ces lessivages donnent une cellulose relativement pure. Les pâtes chimiques sont de meilleure qualité que les pâtes mécaniques, car les procédés chimiques ont l'avantage de ne pas détruire les fibres de celluloses (Figure 12). Les pâtes chimiques serviront donc à produire du papier de meilleure qualité tel que du papier d'impression-écriture.

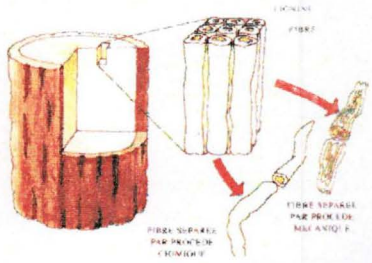


Figure 12 : Représentation schématique des fibres obtenues dans la pâte chimique et dans la pâte mécanique.

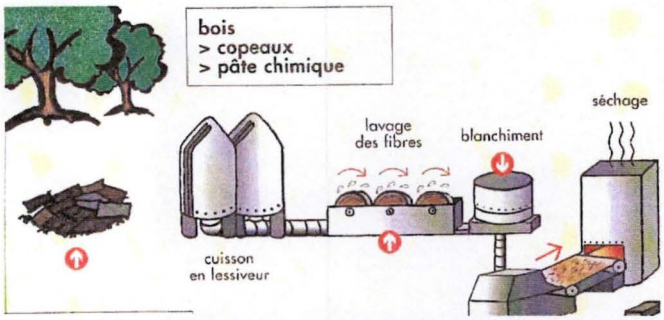


Figure 13 : Schéma représentant de manière générale l'obtention de pâtes chimiques

Toutefois, les pâtes obtenues présentent un aspect brunâtre ; on parlera de pâte écrue. Cet aspect est dû à la présence résiduelle de lignine et à la formation de résidus secondaires (chromophores). Les pâtes devront dès lors subir un blanchiment avant de pouvoir être utilisées (Figure 14a et b).

Figure 14a : Pâte écrue

Figure14b : Pâte blanchie

Figure 14 : Aspect d'une pâte à papier écrue (non blanchie) (14a) et d'une pâte à papier, comprimée et séchée après blanchiment (14b)

3.2.3 Le blanchiment des pâtes à papier

Afin d'améliorer leur blancheur, les pâtes à papier vont subir une série de traitements chimiques appelés « séquence de blanchiment ».

Le blanchiment permet, tout en préservant au maximum la structure cellulosique, l'élimination quasi-totale de la lignine résiduelle. Diverses normes permettent de caractériser le blanchiment de la pâte.

3.2.3.1 Caractéristique d'une pâte

Indice Kappa

On a défini un indice en rapport avec la quantité de lignine encore présente au sein d'une pâte : l'indice kappa. Cet indice correspond au volume de $KMnO_4$ 0,1N réduit par la lignine contenue dans 1 g de pâte sèche. Donc, un traitement délignifiant efficace se traduira par un indice Kappa faible. La mesure de cet indice est un moyen de suivi rapide et efficace des essais de cuisson et de blanchiment utilisé dans l'industrie du papier.

Le niveau de brillance

Le niveau de brillance de la pâte est une mesure de la lumière réfléchie par l'échantillon à une longueur d'onde fixée (457nm) (Figure 15). Celui-ci est une indication de l'efficacité du traitement de blanchiment pour une pâte déjà fortement blanchie et ayant déjà un indice kappa très faible.

L'index de viscosité

Enfin, l'index de viscosité donnera une indication quant à la qualité cellulosique de la pâte. Une diminution de la viscosité sera le signe d'une dégradation et d'une diminution de la longueur moyenne des chaînes de celluloses. Ceci aura pour effet de diminuer les caractéristiques physiques du papier (papier moins résistant, déchirures,....)

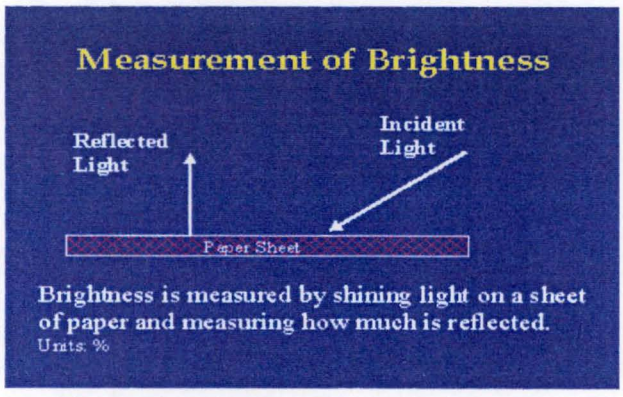


Figure 15 : Schéma représentant la mesure de la brillance

Le processus de blanchiment consiste en une oxydation de la lignine résiduelle afin qu'elle soit solubilisée et éliminée (Figure 16). Différents agents oxydants peuvent être utilisés

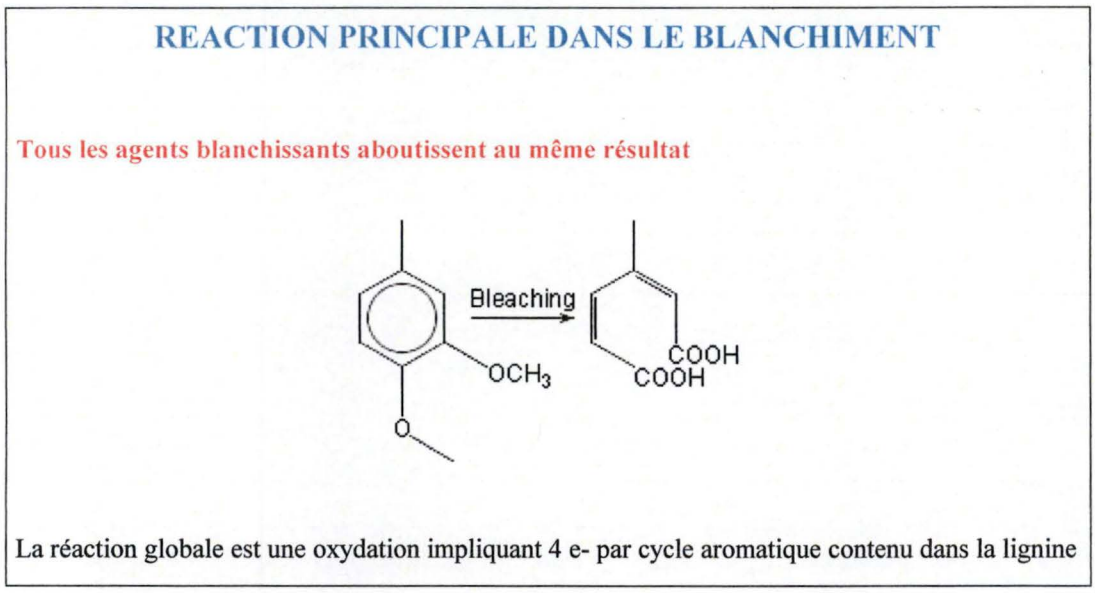


Figure 16 : Schéma représentant la réaction principale d'une étape de blanchiment

3.2.3.2 Les différents agents oxydants

Le Cl_2 était largement employé et fournissait une pâte blanchie de grande qualité car il réagit uniquement avec la lignine et n'attaque pas la cellulose. Son utilisation a été diminuée à cause de la formation de composés toxiques organochlorés (dioxine) au cours du processus (Rochefort*et al.*, 2004).

Aujourd'hui, on utilise des séquences de blanchiment dénommées ECF (Elemental Chlorine Free) basées sur l'utilisation du ClO_2 et TCF (Totally Chlorine Free) n'impliquant que des réactifs oxygénés (oxygène, ozone, peroxyde).

Parmi tous ces procédés l'agent oxydant ozone est le plus puissant. Celui-ci réagit avec les doubles liaisons et les cycles aromatiques présents dans la lignine. On peut combiner une séquence de délignification à l'oxygène suivie d'une étape d'ozonisation ; ceci permet une diminution des coûts de production et une meilleure qualité des eaux rejetées après traitement (Bokström and Tuomi, 1996).

Toutefois, les séquences de blanchiment incluant une étape d'ozonisation peuvent entraîner une diminution de la viscosité de la pâte (reflet d'une dégradation de la cellulose). Ce phénomène n'est pas dû à une action directe de l'ozone contre la cellulose mais à la production de radicaux OH° formé durant l'ozonisation de la pâte. Ces radicaux entraînent alors la dégradation de la cellulose et de l'ozone (Roncero *et al.*, 2003).
Par, ailleurs il a été démontré que l'ozone se décompose plus facilement avec une augmentation du pH et ce suite à une réaction avec les radicaux OH°. Il a également été montré qu'un pH supérieur à 5 entraîne une diminution du taux d'élimination de lignine, du

taux d'élimination des chromophores et que le taux de dégradation de la cellulose augmente Ce processus doit donc se dérouler à un pH acide.

3.2.3.3 Le bioblanchiment

On sait que certains types de champignons sont capables de dégrader la lignine du bois. Ces champignons vivent en effet sur du bois mort et le dégradent. Ces champignons sont également capables de dégrader la lignine résiduelle des pâtes non blanchies via des oxydases (les laccases, les lignines péroxydases,...) (Rochefort *et al.*, 2004).

Des hydrolases peuvent également être utilisées concomitament et constituer une alternative à l'utilisation de chlore dans les séquences de blanchiment. On les utilise principalement dans une étape de préblanchiment. Les xylanases, par exemple, agissent sur la dégradation du xylan dans les pâtes à papier et sont utilisées depuis de nombreuses années dans l'industrie du papier (Tolan, 1996). Ces enzymes ne blanchissent pas le papier mais peuvent dégrader l'hémicellulose, ce qui facilite secondairement l'action des agents oxydants et permet donc de réduire leur taux d'utilisation. Il a été montré qu'une action préalable d'une xylanase dans une séquence de blanchiment à l'ozone améliore de la sorte ce processus. Par ailleurs, une action concomitante plutôt que séquentielle de plusieurs hydrolases différentes est susceptible d'améliorer également l'efficacité du blanchiment subséquent (Clarke*et al.*, 2000). Comme nous le verrons au point 3.3
Dès lors, nous pourrions envisager d'employer différentes hydrolases de *S. acidophilum* dans une séquence de blanchiment à l'ozone et tirer parti de l'acidorésistance de celles-ci, ce qui les rend compatibles avec les conditions de pH dans les étapes où leur action est souhaitée. Il en résulterait une pâte blanchie riche en cellulose par l'utilisation d'un processus peu polluant et à moindre coût de production.

3.2.4 En résumé

Les pâtes à papier obtenues au cours de la fabrication du papier doivent subir une séquence de blanchiment. Différents types d'oxydants tels que l'ozone peuvent être utilisés. Un processus à l'ozone pourrait être amélioré d'un point de vue rendement et environnemental par l'emploi d'hydrolases acidorésistantes.
Nous préciserons dès lors au point suivant quelles hydrolase(s) de *S. acidophilum* pourraient améliorer ce processus.

3.3 Les Hydrolases de *S. acidophilum* d'intérêt industriel

Parmi les nombreuses hydrolases existantes chez les Fungi, la mannanase présente un intérêt pour des applications industrielles telles que le blanchiment des pâtes à papier. Une action concomitante de cette enzyme et de la xylanase améliore de manière significative ce processus (Kansoh and Nagieb, 2004).
La β-mannanase (1,4-β-d-mannan, mannanohydrolase ; EC 3.2.1.78) catalyse l'hydrolyse des liens mannosidique β-1,4 dans le β-1,4-mannan, le glucomannan et le galactomannan (Ademark*et al.*, 1998).
Pour rappel, les polysaccharides contenant du mannan sont un des composants majeurs de la fraction hémicellulosique à la fois du bois de feuillus et du bois de résineux mais également

de l'endosperme de nombreuses légumineuses. Le mannan et le galactomannan sont des polymères constitués d'unités mannopyranoses liées en β-1,4 (Figure 17). Dans le galactomannan, on retrouve de plus des unités galactopyranoses branchées latéralement et liées en α-1,6 au polymère de mannan. Pour l'hydrolyse du galactomannan en sucres simples pouvant êtres facilement utilisés comme source d'énergie trois enzymes différentes pourront intervenir : l'endo-1,4-β-mannanase (E.C.3.2.1.78), l'exo-β-mannosidase (E.C.3.2.1.25) et l'α-galactosidase (E.C.3.2.1.22) (Figure 18) (Xu, 2002).

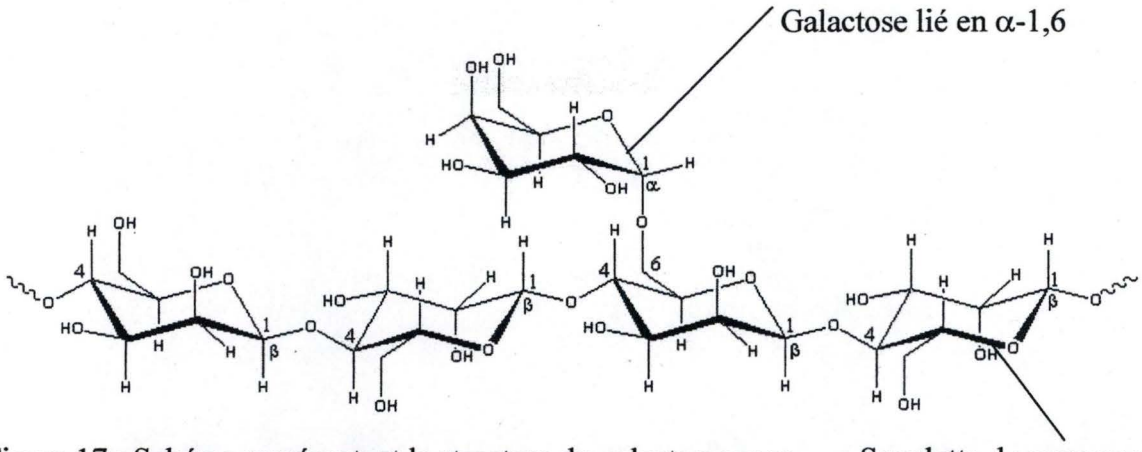


Figure 17 : Schéma représentant la structure du galactomannan

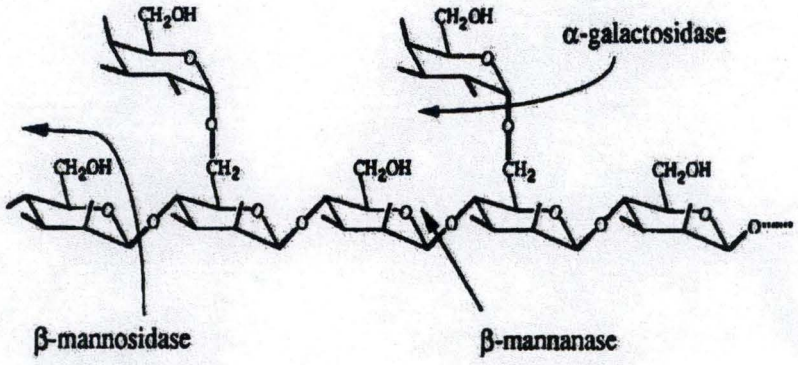


Figure 18 : Schéma représentant l'action des 3 hydrolases sur le galactomannan. L'exo-β-mannosidase clive un mannose à l'extrémité du polymère, l'endo-1,4-β-mannanase clive à l'intérieur du polymère et l'α-galactosidase enlève les résidus galactose branchés (Duffaud*et al.*, 1997).

Les Fungi sécrètent un grand nombre d'hémicellulases diverses vers le milieu extérieur, lesquelles vont agir de manière synergique afin de dégrader complètement les polymères en monosaccharides ou en disaccharides (Shallom and Shoham, 2003). Ceux-ci pourront être utilisés par les microorganismes avoisinants. En clonant certaines hémicellulases (β-

mannanase et α-galactosidase) et les utilisant ensemble dans une étape de préblanchiment, nous ne ferions que copier un mécanisme effectué naturellement par ces organismes. Toutefois on ne connaît pas encore à l'heure actuelle quel(s) mécanisme(s) se déroule(nt) exactement au cours de cette étape de pré blanchiment. Les hémicellulases permettent sans doute un accès plus aisé à la lignine résiduelle pour les agents de blanchiment en dégradant les différentes liaisons entre lignine et hémicellulose.

Notons qu'outre ces applications au niveau du préblanchiment des pâtes à papier, ce type d'enzymes peut-être également utilisées dans l'extraction de l'huile d'olive, dans l'amélioration des produits de pâtisseries, la fabrication du vin, l'amélioration des aliments pour le bétail (une nourriture contenant moins de fibres et donc plus digeste) (Bhat, 2000).

II OBJECTIFS ET STRATEGIE DU TRAVAIL

L'objectif de ce mémoire est de réaliser une banque d'ADNc de *S. acidophilum* en vue de cloner des gènes d'hydrolases présentant un intérêt industriel. Ce type de banque n'est pas représentative de l'ensemble du génome et sera enrichie en ADNc correspondant aux ARNm les plus activement transcrits et dont la proportion sera la plus importante au moment de l'extraction. Dès lors, nous allons d'abord établir les conditions de cultures adéquates pour réaliser une extraction d'ARN total, c'est-à-dire celles où des tests d'activités enzymatiques nous auront montré l'activité désirée. Lorsque nous aurons établi les conditions de culture et extrait l'ARN total de *S. acidophilum*, nous analyserons cet ARN avant de l'engager dans la réalisation de la banque d'ADNc. La banque obtenue sera alors testée et contrôlée quant à sa diversité. Enfin, nous tenterons de cloner les gènes d'intérêt avant de pouvoir les exploiter.

III RESULTATS

1. INTRODUCTION

Un ADN complémentaire (ADNc) est la copie sous forme d'ADN d'un ARN messager (ARNm) suite à la rétrotranscription de celui-ci par une enzyme d'origine virale dénommée reverse transcriptase. Une protéine d'intérêt d'origine eucaryotique, codée par un ADNc et donc dépourvu d'introns, pourra (après insertion de l'ADNc dans un plasmide et transformation dans une cellule hôte) être produite et surexprimée au sein d'un hôte procaryotique modèle tel *Escherichia coli.*

Une banque d'ADNg (ADN génomique) d'un organisme cible est une collection de vecteurs (plasmides, phages, ...) contenant chacun un insert correspondant à une courte séquence du génome de l'espèce considérée. Dans le cas d'une banque génomique, l'entièreté du génome sera en principe représentée et retrouvée dans cet ensemble de vecteurs. A l'inverse, dans le cas d'une banque d'ADNc, seule une partie du génome sera présente. Cette sous-représentation du génome s'explique par les caractéristiques intrinsèques de l'ADNc. Seules figureront au sein de ce type de banque les séquences exprimées sous forme d'ARNm au moment de l'extraction d'ARN total. Une banque d'ADNc sera donc spécifique du type et du stade de développement cellulaire et physiologique de l'organisme de choix. On comprend que la population d'ARNm d'un extrait cellulaire n'est donc jamais qu'une représentation partielle des gènes de la cellule et qu'il importe donc d'établir une banque d'ADNc à partir d'extraits susceptibles de contenir les produits de transcription des gènes (sous forme d'ADNc) qu'on voudra cloner.

Dès lors, en vue d'exploiter certaines hydrolases d'intérêt industriel, leur présence sera testée dans les cultures avant de décider de se servir de celles-ci pour l'extraction d'ARN.
Une banque, une fois obtenue doit être testée et validée.

2. DETECTION D'ACTIVITÉ DE DEGRADATION DU GALACTOMANNAN

2.1 Préparation des échantillons

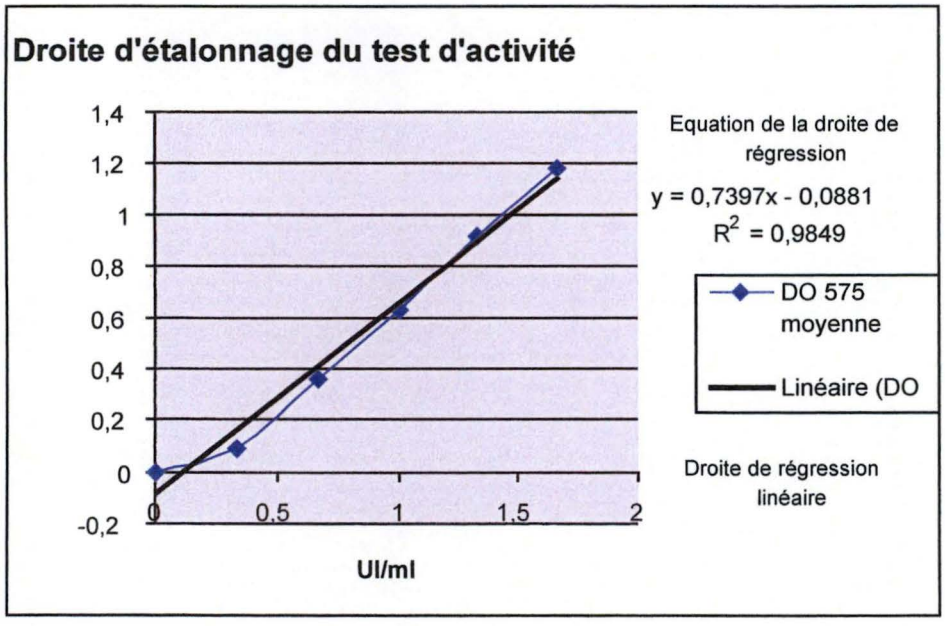
Deux cultures liquides de *S. acidophilum* ont été réalisées avec comme source de carbone soit du galactose 2 %, soit du galactomannan 2 %.
Après 4, 6 et 8 jours d'incubation à 30°C, 10ml ont été prélevés dans chaque culture. Lors de chaque prélèvement, le surnageant et le culot mycélien ont été séparés par centrifugation. Le surnageant est ensuite filtré, récupéré et conservé sur glace. Le culot, après resuspension et lavage dans du tampon citrate 50 mM pH 4 a été lysé par pressurisation.

Après la lyse, les fractions solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation. La fraction insoluble a été lavée avec du tampon citrate. Ces deux fractions (soluble et insoluble) ont également été conservées sur glace.
En résumé, pour chacun des jours de prélèvement, trois fractions ont été obtenues pour chacune des deux cultures (galactose et galactomannan), soit six échantillons.

2.2 Mise en évidence d'activité β-mannanase et/ou α-galactosidase

2.2.1 Principe du test d'activité

La présence d'une activité β-mannanase et/ou α-galactosidase au sein de ces différentes fractions (surnageant, soluble et insoluble) va être testée en utilisant la méthode DNS (voir Matériels et Méthodes 2.2.2). Celle-ci consiste dans son principe en une réaction colorimétrique reflétant la quantité de sucres réducteurs libérés au départ d'un polymère après une étape d'incubation avec une hydrolase. En pratique, chaque fraction est mise en présence de galactomannan dans du tampon citrate à pH 4 et incubée à 50°C. Au cours de cette étape, les enzymes présentes hydrolysent le polysaccharide. Le DNS ajouté se fixe alors sur les extrémités –OH libres des sucres libérés suite à l'action enzymatique. Cette réaction s'effectue à 100°C, température permettant également l'inactivation des enzymes. Après refroidissement et centrifugation, on mesure la coloration obtenue en réalisant une lecture de DO à 575nm. L'intensité de la coloration mesurée par la DO à 575nm est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs libérés suite à l'activité de l'enzyme. Cette DO est transformée en concentration de mannose puis en Unités Internationales à l'aide d'une droite d'étalonnage (pour laquelle une DO est associée à une concentration de mannose).



Le test d'activité au DNS exprime le degré d'activité de l'enzyme en DO. Pour l'exprimer en unités internationales d'activité enzymatique (UI/ml), il est nécessaire d'établir une droite étalon à l'aide d'une solution de mannose 1,8g/l. Cette droite a été réalisée avec différents volumes de cette solution, à savoir, 20, 40, 60, 80, 100 µl. Ces volumes sont portés à 500 µl avec de l'eau. 500µl de DNS sont ensuite ajoutés. Le tout est incubé 15' à 100°C, 5 minutes sur glace, et la DO est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 575nm.

Les valeurs obtenues pour construire la droite étalon sont reprises dans le tableau ci-dessous.

µg/µl	volume	µg	µmole	µmole/min	µmole/min*ml	DO 575 moyenne	µmole/min*ml
1,8	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
1,8	20	36	0,2	0,02	0,33	0,09	0,33
1,8	40	72	0,4	0,04	0,67	0,36	0,67
1,8	60	108	0,6	0,06	1,00	0,63	1,00
1,8	80	144	0,8	0,08	1,33	0,91	1,33
1,8	100	180	1	0,1	1,67	1,18	1,67

Avec ces valeurs, la droite des moindres carrés y = ax+b est tracée. Les paramètres a et b interviennent dans l'équation qui permet le passage d'unités d'absorbance en unités enzymatiques.

Une Unité Internationale correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une µmole de sucres réducteurs par minute. Pour calculer l'activité réelle on effectuera la différence des DO obtenues avec incubation et DO obtenues sans incubation pour les fractions considérées.

2.2.2 Détection de l'activité de dégradation du galactomannan

Après 4 jours d'incubation, le surnageant et les fractions solubles et insolubles ont été séparés au départ de deux cultures, l'une en condition galactose 2 % et l'autre en condition galactomannan 2 %. L'activité β-mannanase/α-galactosidase a été testée dans les 6 conditions en utilisant du galactomannan 0,5 % comme substrat. Les réactions ont été réalisées en triplicat, d'une part avec incubation de 10 min à 50°C puis ajout du DNS et incubation 15 min à 100°C et, d'autre part, sans incubation à 50°C mais en ajoutant directement le DNS et en incubant 15 min à 100°C. La différence entre la DO moyenne avec incubation et la DO moyenne sans incubation reflète la quantité de sucres réducteurs libérés par l'activité enzymatique de la fraction testée. Cette DO est utilisée pour déterminer l'activité en UI/ml au départ de la droite étalon. La préparation des 3 fractions (insoluble, soluble, surnageant) a été répétée après 6 et 8 jours d'incubation des 2 cultures. Les tests d'activités ont été réalisés dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus.
Les résultats obtenus sont présentés aux Figure 19a et 19 b

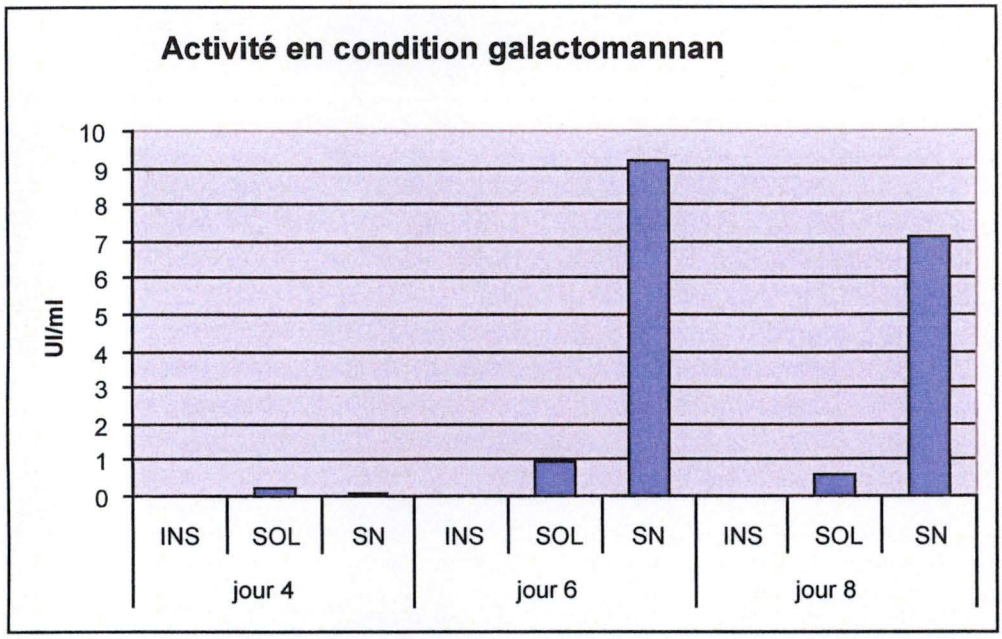


Figure 19a : Histogramme représentant l'évolution de l'activité de dégradation du galactomannan en UI/ml après 4, 6 et 8 jours de culture au sein des différentes fractions (INS : fraction insoluble, SOL: fraction soluble, SN : fraction surnageant) en condition de culture galactomannan 2% .

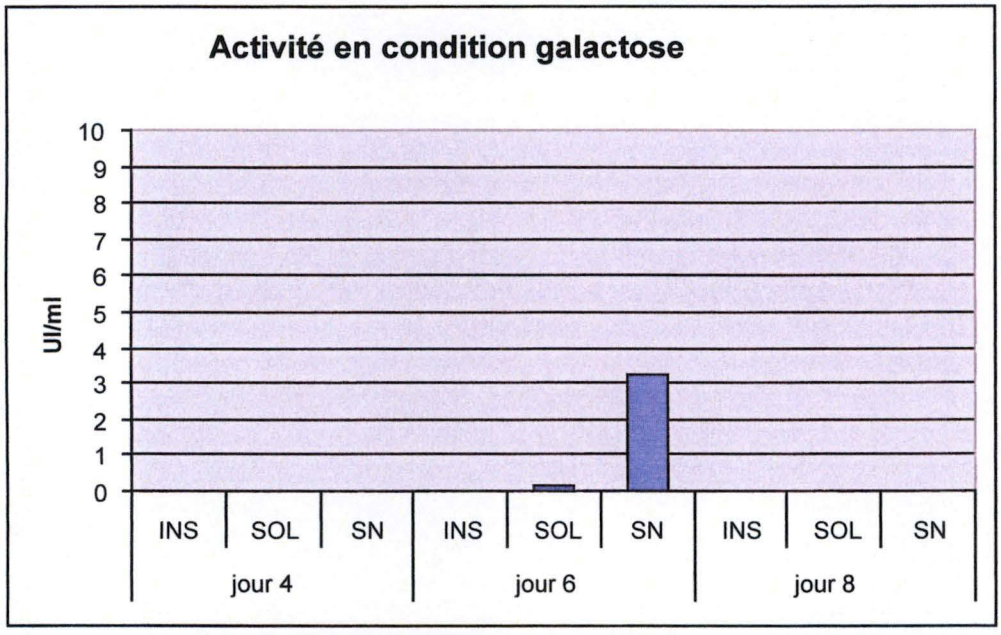


Figure 19b : Histogramme représentant l'évolution de l'activité de dégradation du galactomannan en UI/ml après 4, 6 et 8 jours de culture au sein des différentes fractions (INS : fraction insoluble, SOL: fraction soluble, SN : fraction surnageant SOL) en condition de culture galactose 2% .

Les figures 19a et 19b montrent que l'activité de dégradation du galactomannan est maximale le jour 6 et ce tant dans la fraction soluble que dans la fraction surnageant. Cette donnée est observée dans les deux conditions de culture. Pour la condition galactose (Figure 19 b) les résultats des jours 4 et 8 sont non détectables (tout comme les fractions INS dans chaque condition). La comparaison des deux conditions de culture renseigne une activité enzymatique

plus importante dans le surnageant que dans la fraction soluble; ceci semble indiquer une sécrétion extracellulaire des enzymes de dégradation du galactomannan.

Les résultats obtenus indiquent une activité de dégradation du galactomannan dans les conditions de culture galactomannan 2 % et dans une moindre mesure en condition galactose 2 %. Une extraction d'ARN sera réalisée au départ du mycélium de *S. acidophilum* pour ces 2 conditions.
Une condition de culture en glucose 2 % est évitée en raison du phénomène de la répression glucose observée sur certains gènes du métabolisme carboné (De vries and Visser, 2001) tel par exemple le gène codant pour la xylanase.

◆

◆ ◆

◆

Pour rappel, le but à terme du travail vise l'obtention à grande échelle d'enzymes d'intérêts au départ d'un organisme *S. acidophilum*. Ceci impose de cloner les gènes, de les exprimer et d'obtenir à bon rendement la sécrétion de la protéine active dans le milieu de culture de telle sorte que l'on puisse envisager par la suite une production en masse en fermenteur. Notre choix s'est porté sur la production d'enzymes recombinantes dans l'hôte *Pichia. pastoris,*(Xu*et al.*, 2002) levure connue pour la bonne efficience de production et de sécrétion dans le milieu extérieur.
Les étapes à suivre sont schématiquement les suivantes :

1. Réalisation d'une banque d'ADNc pour l'expression et la sécrétion d'hydrolases d'intérêt. La présence d'introns chez *S. acidophilum* impose la nature ADNc de la banque. L'expression sera sous le contrôle d'un promoteur susceptible de fonctionner à haute efficience chez *P. pastoris*. La sécrétion efficace est conditionnée par des séquences d'exportation adéquates.
2. La transformation de la banque dans l'hôte *P. pastoris* et la sélection de clones positifs, c'est-à-dire montrant une expression de l'enzyme recherchée.
3. L'évaluation de l'activité enzymatique dans le surnageant de culture de la souche transformante.

L'obtention d'une fraction d'ARN susceptible de contenir l'ARNm des gènes d'hydrolases ciblées est le pré-requis pour établir une banque d'ADNc. Le caractère partiel de toute banque de ce type impose de choisir adéquatement des conditions de culture de *S. acidophilum*, c'est-à-dire des conditions où l'enzyme est effectivement exprimée.
Pour augmenter les chances de se trouver dans les conditions d'induction d'hydrolases de galactomannan, nous avons utilisé une culture en condition galactomannan ainsi qu'une autre en condition galactose dont nous avons vérifié qu'elles permettaient d'observer une activité de dégradation du galactomannan.

3. EXTRACTION d'ARN

L'ARN total a été extrait au départ de mycélium de *S. acidophilum* obtenu d'une part après croissance en milieu liquide galactose 2 % et, d'autre part, après croissance en milieu liquide galactomannan 2 %.
L'extraction d'ARN a été réalisée selon une méthode au phénol acide chaud suivi d'une étape au chloroforme (voir Matériels et Méthodes 2.1.4). Cette technique a pour effet de dénaturer et éliminer l'ADN mais aussi d'entraîner l'élimination des protéines.
Afin de s'assurer de l'abondance, de la pureté et de l'intégrité de l'ARN total obtenu avant de l'engager dans le processus de synthèse d'ADNc, il a été soumis à différentes analyses :

3,1 Spectres d'ARN

Afin de s'assurer de la pureté de la fraction nucléique extraite, des échantillons ont été soumis à un scan au spectrophotomètre pour les longueurs d'ondes allant de 200 à 300nm. L'observation du spectre obtenu permet de se rendre compte d'une contamination protéique (ex: ribonucléoprotéine,...) et d'éventuelles traces résiduelles des solvants utilisés au cours de l'extraction (phénol, éthanol,...).
Les acides nucléiques (ARN, ADN) ont un maximum d'absorption à 260nm, les protéines à 280nm et les solvants à 230nm. Pour une préparation pure d'acides nucléiques, le pic obtenu pour 260nm doit être double des valeurs obtenues à la fois pour 230nm et 280nm.

Les scans obtenus pour l'analyse des extractions d'ARN en condition galactomannan 2 % (figure 20a) et galactose 2 % (figure 20b) présentent le type de profil d'un ARN relativement pur.

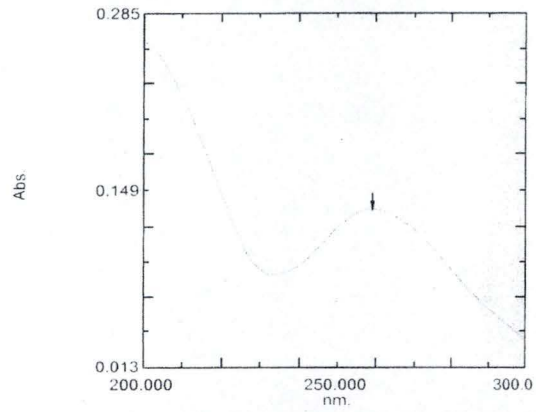


Figure 20a : Spectre de l'ARN total extrait d'une culture en condition galactomannan.

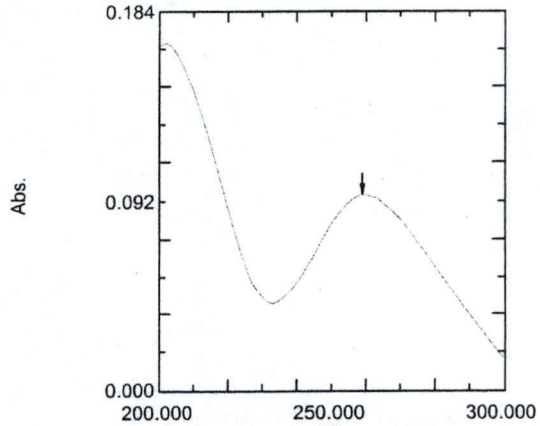


Figure 20b : Spectre de l'ARN total d'une culture en condition galactose.

3.2 Electrophorèse d'ARN

3.2.1 Gel d'agarose

Un gel d'agarose 1% a permis de s'assurer rapidement de la présence d'ARN.
Deux bandes majeures sont observées (Figure 21) correspondant à de l'ARNr 25s et 18s.

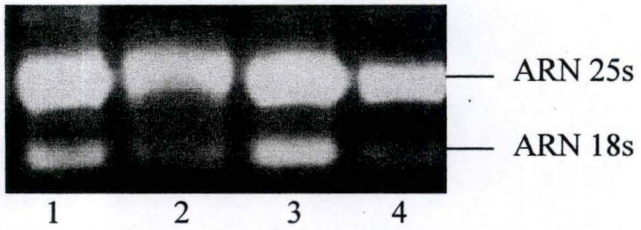


Figure 21 : Photo d'un gel d'agarose de l'ARN extrait au phénol acide chaud

Piste 1 et 2 : ARN total extrait d'une culture en galactose
Piste 3 et 4 : ARN total extrait d'une culture en galactomannan

3.2.2 Gel d'agarose formaldéhyde

L'ARN a été dénaturé par adjonction de formamide et de formaldéhyde puis migré sur un gel d'agarose contenant du formaldéhyde (voir Matériels et Méthodes 2.1.5)
Pour *S. acidophilum*, deux bandes majeures sont observées (voir Figure 22 pistes 1 à 4), l'une correspondant à de l'ARNr 18s et une autre à de l'ARNr 25s. La piste 5 correspond à de l'ARN total de souris et les deux bandes observées correspondent à de l'ARNr 28s et 18s. Le nombre de molécules d'ARNr présents dans un extrait cellulaire pour l'ARNr L doit être égal au nombre d'ARNr S (small) et donc présenter un ratio de 1. En ce qui concerne la quantité pondérale le rapport des ARNr doit être proche de 2 puisque l'ARNr 25s a une taille approximativement double de celle de l'ARNr 18s. Cette estimation semble être observée dans les pistes 1, 2 et 5. Les « smears » observés sous l'ARNr 18s (particulièrement conséquent dans les pistes 3 et 4) correspondent à d'autres types d'ARN (ARNm, ARNt, ARNs, ...) ou à une dégradation de l'ARNr provoquant un enrichissement en fragment de plus petites tailles.

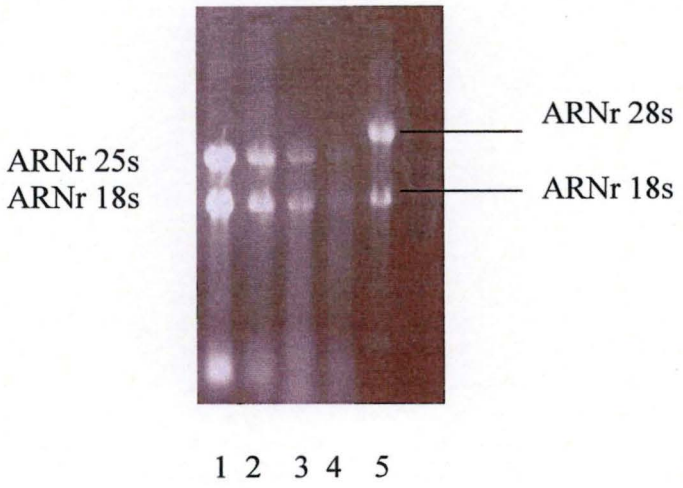


Figure 22 : Photo d'un gel d'agarose formaldéhyde d'ARN total extrait au phénol acide chaud

Piste 1 : ARN total extrait d'une culture en galactose
Piste 2 : ARN total extrait d'une culture en galactomannan
Piste 3 et 4 : ARN total issu d'une extraction échouée
Piste 5 : ARN total de souris

3.3 Analyse au BIOANALYSER

Une analyse électrophorétique complémentaire au bioanalyser a été effectuée. Cet appareil permet de s'assurer de l'intégrité et de la qualité de l'ARN extrait. Les échantillons d'ARN sont chargés sur une puce munie d'un gel précoulé contenant du bromure d'éthidium. Au cours d'une électrophorèse capillaire l'ARN est détecté par un faisceau laser. L'appareil fournit alors les résultats sous forme de pics d'ARN détectés au cours du temps. L'appareil effectue également le rapport des ARNr 25s et 18s (en calculant le rapport des aires obtenues sous chacun des pics détectés).

Les résultats des analyses correspondant aux extractions d'ARN pour les 2 cultures sont présentés en Figure 23a et 23b. La figure 23c représente les résultats obtenus pour une extraction qui révèle une dégradation manifeste des ARNr

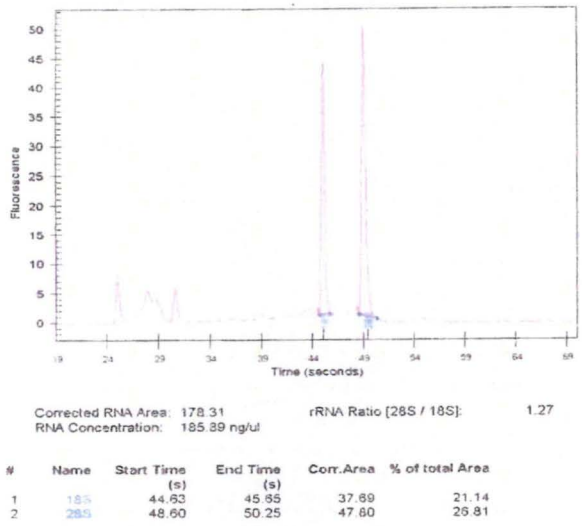
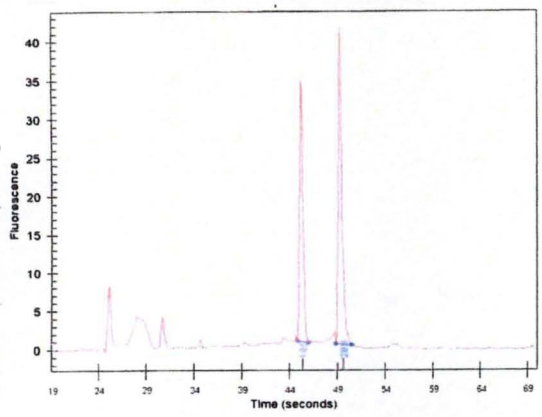


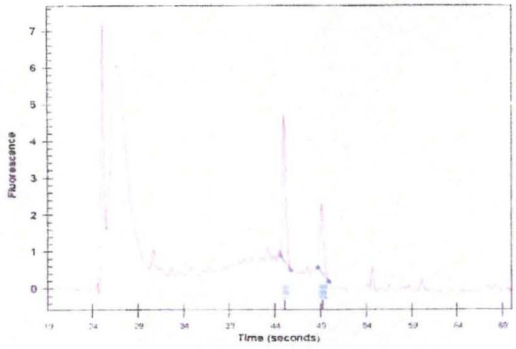
Figure 23 a : Fluorogramme obtenu au bioanalyser pour l'évaluation de l'intégrité de l'ARN extrait d'une culture de *S. acidophilum* en galactose



Corrected RNA Area: 139.32 rRNA Ratio [28S / 18S]: 1.28
RNA Concentration: 145.24 ng/ul

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr.Area	% of total Area
1	18S	44.79	45.95	31.08	22.31
2	28S	48.80	50.45	39.84	28.60

Figure 23 b : Fluorogramme obtenu au bioanalyser pour l'évaluation de l'intégrité de l'ARN extrait d'une culture de *S. acidophilum en* galactomannan.



Corrected RNA Area: 90.64 rRNA Ratio [28S / 18S] 0.54
RNA Concentration: 94.49 ng/ul

#	Name	Start Time (s)	End Time (s)	Corr.Area	% of total Area
1	18S	44.55	45.70	3.68	4.04
2	28S	48.65	49.85	1.96	2.17

Figure 23c : Fluorogramme obtenu au bioanalyser pour un échantillon d'ARN présentant de la dégradation

On observe qu'un ARN dégradé (Figure 23c) présente un pic d'ARN 18s plus élevé que le pic d'ARN 25s (ceci se traduisant par un rapport 25s/18s nettement inférieur à 2). En présence de nucléases, on s'attend à ce que les plus grandes molécules d'ARN soient clivées les premières en fragments plus petits. Il en résulte, dans ce cas, une diminution relative de l'ARNr L, au départ en équistoechiométrie avec l'ARNr S, et un enrichissement relatif de ce dernier, et des ARN de petites tailles (ARNt et autres ARNs). C'est ce que l'on observe à la Figure 23c. Les ARN analysés en figure 23a et 23b, extraits en condition galactose et galactomannan respectivement, présentent un profil correspondant à un ARN relativement intègre avec un pic d'ARNr 25s supérieur au pic d'ARNr 18s et peu d'ARN de petite taille.

3.4 Conclusion

L'ARN total provenant de 2 conditions de culture (galactomannan 2 % et galactose 2 %) obtenu après extraction au phénol acide chaud a été soumis à divers tests analytiques qui permettent de conclure qu'il est dans un état relativement intègre. La fraction d'ARNm contenue dans la préparation d'ARN total analysé servira de « template » à la synthèse d'ADN complémentaire de la banque d'expression.

4. BANQUE d'ADNc

Le protocole suivi pour la réalisation d'une banque d'ADNc (voir Matériels et Méthodes, protocole du kit, et Figure 24) est identique quelle que soit la source de l'ARN total employé (condition galactomannan ou galactose).

4.1Synthèse d'ADNc

L'ADNc a été synthétisé en utilisant le kit SMART cDNA Library Construction Kit de CLONTECH.
Selon cette méthode, l'ARN total obtenu sert de matrice pour la synthèse du 1er brin d'ADNc, le second brin étant obtenu par PCR. (Voir Figure 24).

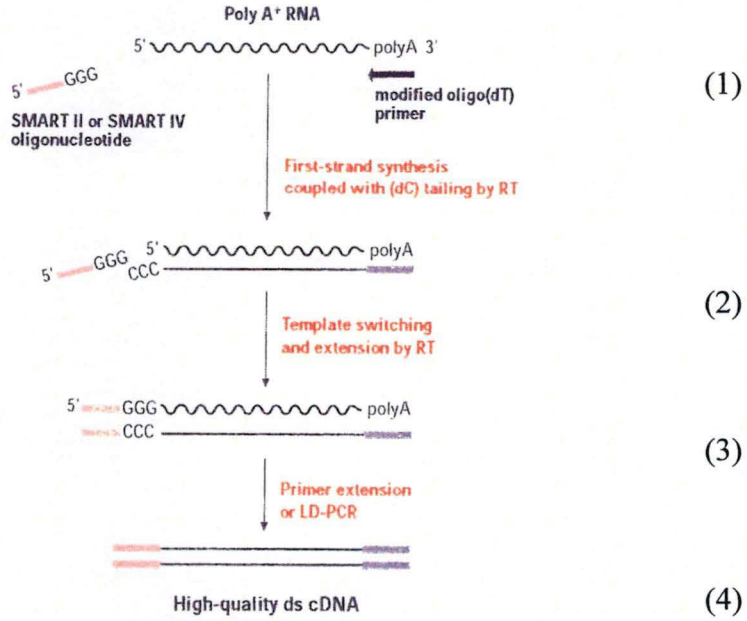


Figure 24 : Schéma de la synthèse d'ADNc selon le kit SMART cDNA Libray Construction Kit (détails dans le texte).

(1)Une amorce d'oligo (dT) possédant un site de restriction *Sfi*I (voir figure 26b) s'hybride à la queue polyA des ARNm présents. La reverse transcriptase (RT) fournie (Moloney murine

leukemia virus reverse transcriptase) synthétise le 1er brin d'ADNc en allongeant l'amorce et en se servant de l'ARNm comme modèle.

(2)-(3) Quand la RT a terminé la synthèse du 1er brin d'ADNc, elle additionne un oligo dC à l'extrémité 3' de ce brin. Un oligo dG contenant un site de restriction *Sfi*I, présent dans la solution, peut alors s'hybrider à cette extension et permettre à la RT de reprendre la synthèse et d'allonger le brin en se servant de cet oligo comme nouveau modèle (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript)

(4) Le résultat est un brin d'ADNc, correspondant à l'entièreté de l'ARNm matrice, flanqué de part et d'autre de séquences correspondant aux sites de restriction spécifiques *Sfi*I. Le second brin, complémentaire du 1er, sera obtenu via une PCR. L'amorce servant à réaliser cette PCR possèdera la même séquence que l'oligo dG. Cette amorce s'hybridera à l'extrémité 3' du brin d'ADNc et sera allongée par la polymérase formant ainsi le second brin d'ADNc.

Un gel d'agarose a été effectué afin de vérifier la présence d'ADNc. Les bandes observées (figure 25) correspondent à de l'ADNc avec des tailles allant de 0,1 à 4kb. Les pistes 1 et 5 correspondent aux étalons de poids moléculaire. Les autres pistes correspondent aux ADNc obtenus suite à la rétrotranscription d'ARN extrait de la culture galactose 2 % (3) et de la culture galactomannan 2 % (4). La piste (2) est le contrôle positif du kit, où l'on devrait voir l'ADNc. Il s'agit d'un ARN polyA dont la conversion en ADNc a été effectuée en parallèle (pour une raison inconnue ce contrôle ne donne rien).

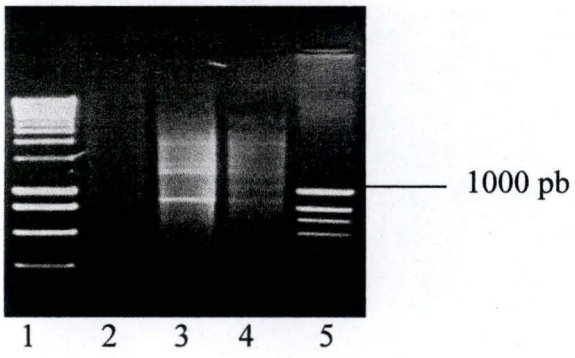
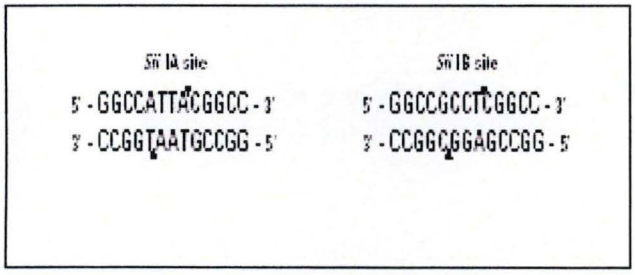


Figure 25 : Photo d'un gel d'agarose montrant l'ADNc obtenu.

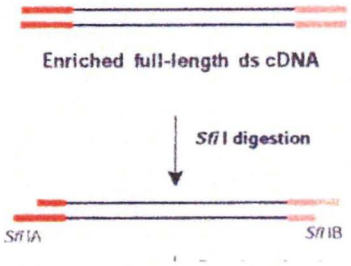
Piste 1 et 5 : Marqueurs de PM.
Piste 2 : ADNc obtenu pour un ARN poly A. C'est le contrôle positif du kit pour lequel les bandes obtenues correspondant à de l'ADNc sont nettement moins visibles qu'en piste 3 et 4.
Piste 3 : ADNc obtenu pour l'ARN total issu de la culture galactose.
Piste 4 : ADNc obtenu pour l'ARN total issu de la culture galactomannan.

4.2 Traitement à la protéinase K et restriction de l'ADNc

Le produit d'amplification après la LD-PCR contenant l'ADNc est soumis à une étape de digestion avec la protéinase K afin d'éliminer toutes les protéines encore présentes. Ce produit final enrichi en ADNc double brin est ensuite restreint par *Sfi*I. Les sites de restriction *Sfi*I sont rares. Il sera dès lors peu probable qu'une restriction se produise à l'intérieur des ADNc synthétisés. Les ADNc restreints à leur extrémité présentent donc des bouts collants permettant une insertion directionnelle au niveau du site multiple de clonage du vecteur utilisé (λTriplEx2) (figure 26a et b).



26b



26 a

Figure 26a : Schéma représentant l'ADNc double brin restreint à ses extrémités par SfiI et présentant des extrémités compatibles pour une insertion directionnelle au sein du vecteur λTriplEx2

Figure 26 b : Schéma des sites de restriction reconnus par *Sfi*I, dénommé *Sfi*IA et SfiIB, et permettant une insertion directionnelle.

Les ADNc restreints à leurs extrémités sont fractionnés sur colonne CHROMA SPIN 400 avant la ligation.

4.3 Ligation de l'ADNc

Les ADNc restreints à leurs extrémités ont été insérés au sein du vecteur déphosphorylé λTriplEx2 de CLONTECH, lequel permet une insertion directionnelle. Il s'agit d'un bactériophage λ au sein duquel on retrouve inséré une séquence plasmidique contenant le site multiple de clonage. La séquence plasmidique insérée dans l'ADN du phage est bordée de sites *loxP* pour permettre son excision par l'intermédiaire d'une recombinase *Cre* et sa recircularisation. Par ailleurs, une détection colorimétrique des phages recombinants est également possible avec ce vecteur par α-complémentation (Figure 27).
Après la ligation des inserts, les phages sont reconstitués suivant une étape de « packaging » (Matériels et Méthodes, protocole du kit) avant de pouvoir infecter les bactéries.

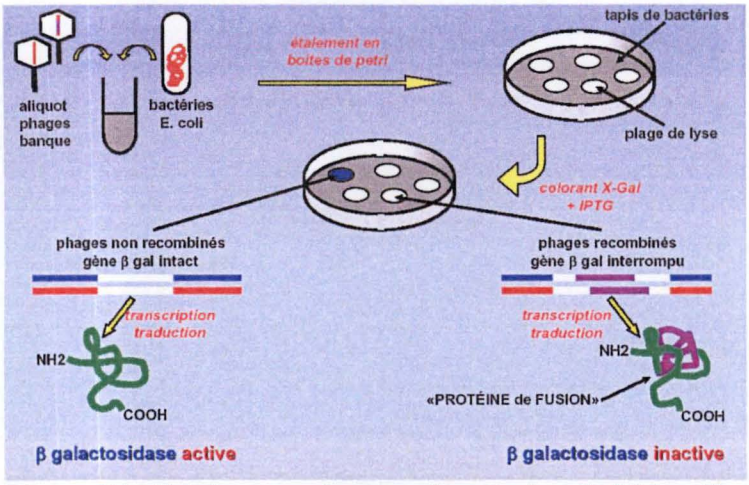


Figure 27 : Schéma représentant le principe de l'identification des phages recombinants et non recombinants permise par α-complémentation

4.4 Titre de la banque

4.4.1 Titre de la banque

Après ligation des inserts dans le λTriplEx2 et « packaging » des phages, une première infection a été réalisée. Une culture d'une nuit (en milieu LB $MgSO_4$-Maltose) d'*E.coli* XL1-Blue a été mise en présence 20min à 37°C avec les phages recombinants. Après incubation, de l'agar à 45°C (voir Matériels et Méthodes 1.2.2 et pro) avec l'X-Gal et l'IPTG ont été ajoutés. L'ensemble a été coulé et étalé sur boîtes de LB MgSo4 (90mm de diamètre). Après une nuit en étuve à 37°C, les boîtes ont été observées.
Le dénombrement de l'ensemble des plages de lyse obtenues a permis de calculer le titre de la banque. D'autre part une estimation du % de bactériophages recombinants a pu être calculé en effectuant le rapport des plages de lyse blanches et des plages de lyse bleues (les plages bleues correspondent à des phages n'ayant pas intégré d'insert) (figure 28).

Le titre exprimant la richesse en phages recombinants se calcule comme suit :

$$\text{Calcul :} \quad \frac{\text{plages x (facteur de dilution) x } 10^3 \text{ µl/ml}}{\text{µl de phage dilué étalé}} = \text{Pfu/ml}$$

Le titre de la banque d'ADNc issue d'une culture en condition galactose est $2{,}36.10^8$ Pfu/ml

tandis que le titre de la banque d'ADNc issue d'une culture en condition galactomannan est $4{,}5.10^7$ Pfu/ml

Figure 28 : Photo d'une boîte de LB $MgSO_4$ on observe quelques plages bleues (non recombinantes) sur un fond de plages blanches (peu distinctes sur la photo)

Après cette étape, la banque a été amplifiée suite à une infection d'*E. coli* XL1-Blue et étalement sur boîtes de LB $MgSO_4$ et incubation une nuit en étuve à 37°C. Les phages ont été récupérés par ajout de tampon de dilution de phage dans les boîtes qui ont été soumises à une agitation constante (plateau agitant mécanique). Le tampon ajouté dans chaque boîte a été récupéré et l'ensemble a été « poolé » de manière à titrer la banque amplifiée.

4.4.2. Titre de la banque après amplification

Pour titrer la banque obtenue après amplification, on infecte une culture d'*E.coli* XL1-Blue en utilisant différentes dilutions de phages récupérés à partir de boîtes ayant servis à étaler la banque titrée. Dans différents falcons de 15ml, 200µl de culture bactérienne ont été mis en présence de xµl de phages (selon la dilution considérée). Après 20 min d'incubation à 37°C, 3 ml de soft agar à 45°C ont été ajoutés. Après étalement sur boîtes de LB $MgSO_4$ (150mm de diamètre) et incubation une nuit en étuve à 37°C, les plages obtenues pour les différentes dilutions ont été dénombrées et le titre de la banque a ainsi été établi.

Calcul titre : $\dfrac{\text{plages} \times \text{(facteur de dilution)} \times 10^3\ \mu l/ml}{\mu l \text{ de phage dilué étalé}} =$ Pfu/ml

Le titre de la banque d'ADNc amplifiée issue d'une culture en condition galactose est $3{,}4.10^8$ Pfu/ml.

Le titre de la banque d'ADNc amplifiée issue d'une culture en condition galactomannan est $3{,}6.10^8$ Pfu/ml.

Ce sont donc des aliquots de ces banques, dite amplifiées, qui seront utilisés par la suite pour cloner des gènes de *S. acidophilum*.

4.5 Contrôle de la banque

La qualité des banques d'ADNc obtenues demande à être contrôlée. Il faut s'assurer de la présence d'inserts, de leurs tailles suffisamment grandes pour correspondre à une séquence codante et de la variabilité des tailles observées, indicative de la diversité de la banque. Nous avons choisi de tester la banque galactomannan.

Diverses plages de lyse choisies au hasard ont été prélevées et resuspendues dans du tampon de dilution pour phage. Les phages récupérés ont servi pour infecter une autre souche de bactérie (*E.coli* BM 25.8) qui code une recombinase *Cre*. Au sein de ces bactéries infectées par les phages, il y aura excision grâce au système *Cre-loxP* de l'insert contenu dans le phage et reconstitution du plasmide pTriplEx2. Le plasmide inséré dans le phage est en effet bordé de sites *loxP* (Figure 29).

Un site *loxP* consiste en deux répétitions inverses de 13pb de longueur, séparées par un « bras » de 8 pb (Figure 30a). Les deux séquences de 13 pb constituent chacune un domaine de liaison pour une recombinase *Cre*. La réaction Cre-lox entre deux sites lox d'un même chromosome catalysera un clivage au niveau du bras de chaque site (Figure 29). Il y a alors recombinaison entre site *loxP* au niveau des bras de chaque site et excision du fragment d'ADN compris entre les deux sites (Figure 30 b)

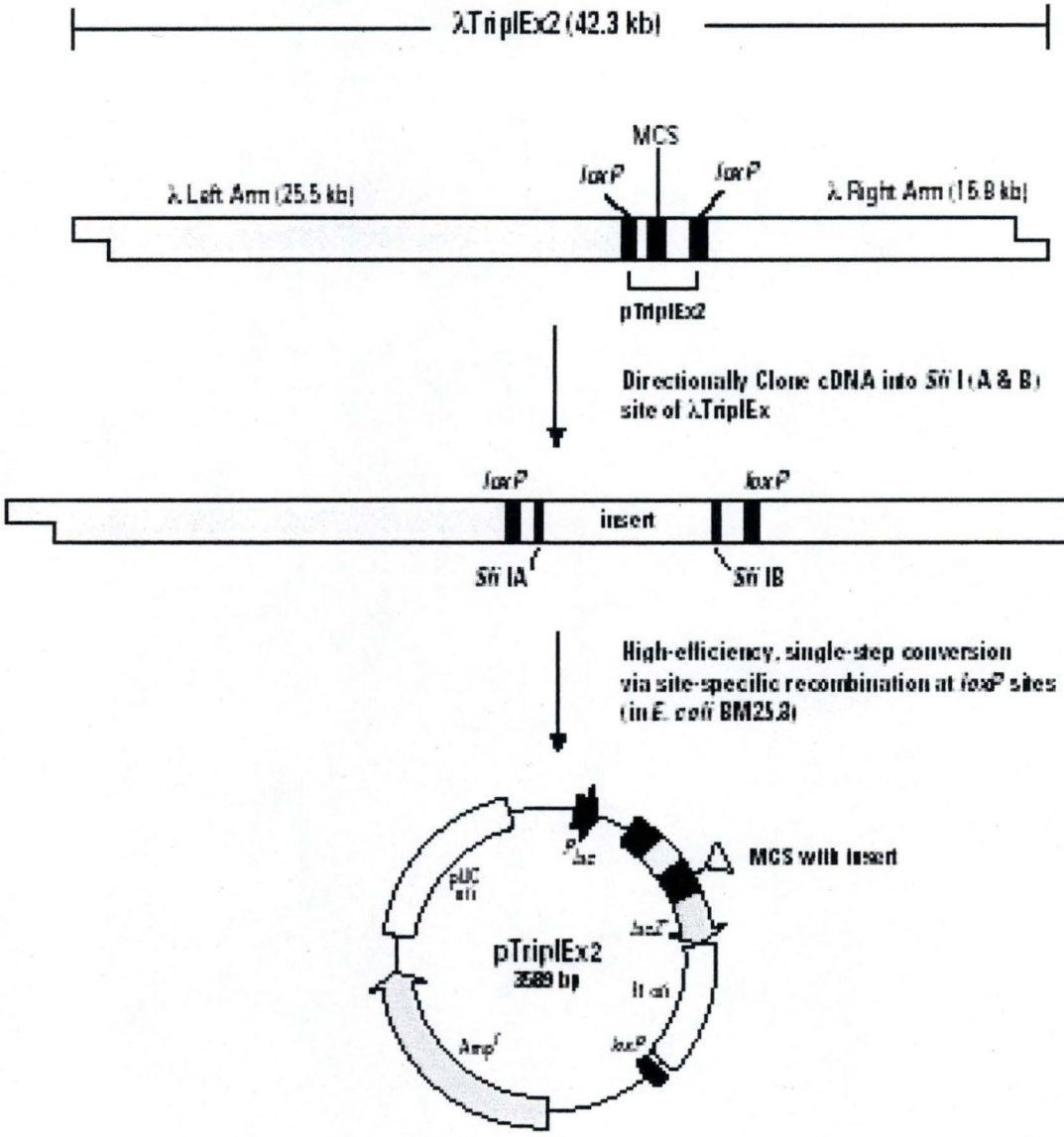


Figure 29 : Schéma représentant l'ADN du phage contenant un plasmide pTriplEX2 bordé de sites *loxP* et sa recircularisation sous l'action de la recombinase *Cre* (détails dans le texte).

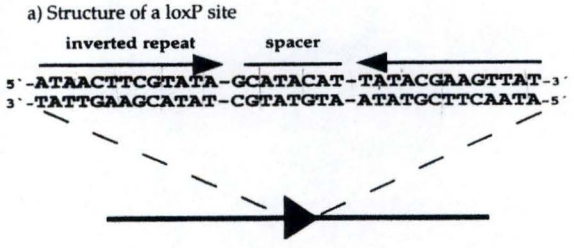


Figure 30a : Schéma représentant un site *loxP*

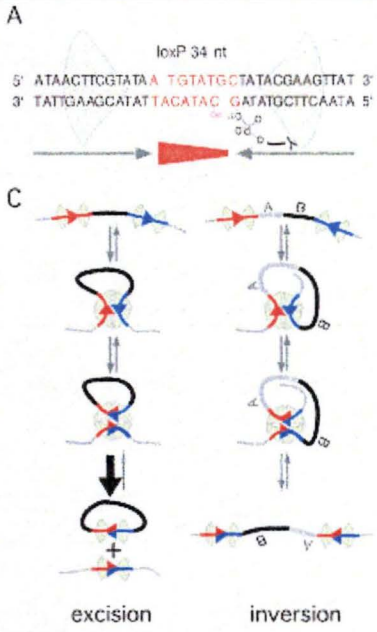


Figure 30 b : Schéma représentant une excision (ainsi qu'une inversion à droite sur le schéma) via le système *Cre-loxP* (détails dans le texte).

4.5.1 Récupération de l'ADN plasmidique

20 colonies d'*E. coli* BM 25.8 infectées par les phages ont été prélevées au hasard et soumises à une miniprep. Le but de cette manipulation est de récupérer l'ADN plasmidique et d'observer son profil de migration en gel d'agarose après restriction.

L'ADN plasmidique des 20 colonies a été récupéré et soumis à une double restriction par *Eco*RI et *Sac*I. Ces deux enzymes possèdent un seul site de restriction au niveau du site multiple de clonage du pTriplEx2.
Dès lors, deux bandes (par puits chargé) seront retrouvées sur le gel d'agarose. Une bande de 3500 pb (correspondant à la matrice) et une autre de taille variable en fonction de la taille de l'insert. Des bandes supplémentaires seront présentes si l'insert possède également un (ou des) site (s) de restriction pour *Eco*RI et-ou *Sac*I.

Sur la photo du gel d'agarose (figure 32), une bande de taille constante (3.5 kb) et généralement une bande de taille variable sont observées dans chaque piste. La photo n'est pas très nette, on peut cependant observer au niveau des pistes 5 à 10 des bandes de tailles diverses en plus de la bande constante de 3.5kb (matrice de l'insert) correspondant à des inserts de tailles variables . Des inserts sont présents dans 18 minipreps sur 20, (il y a donc 90 % de clones recombinants dans la banque) ceux-ci présentent des tailles différentes et suffisamment grandes pour constituer une séquence codante.

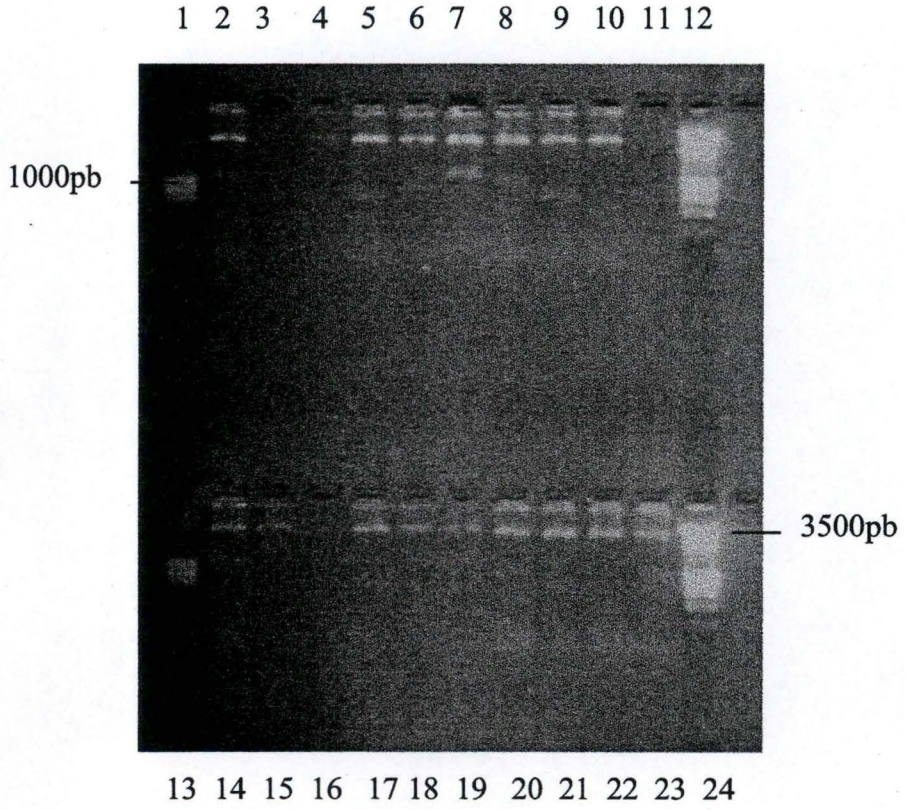


Figure 32 : Photo d'un gel d'agarose de la double restriction par *Eco*RI et *Sac*I de l'ADN plasmidiques, récupéré après la miniprep, pour vérifier la présence et la variabilité de tailles des inserts.

Pistes 1, 12, 13 et 24 : Marqueurs de PM

Pistes 2 à 11 et 14 à 23 : ADN plasmidiques restreints par *Eco*RI et *Sac*I

4.5.2 Sondage test pour un gène de xylanase

La détection d'un gène à l'aide d'une sonde radioactive a également été entreprise (Figure 33) pour tester la banque.

La banque d'ADNc (condition initiale galactomannan 2 %) a été étalée sur boîtes de LB $MgSO_4$. Les plages de lyse ont été répliquées sur filtre de nylon. L'ADN contenu dans les phages récupérés sur filtre a été dénaturé et hybridé avec une sonde radioactive correspondant à la séquence du gène de la xylanase de *S. acidophilum*. Les candidats révélés par autoradiographie devraient contenir la séquence complémentaire de la sonde c'est-à-dire la séquence d'un gène de xylanase.

La révélation des filtres a permis de localiser différents candidats.
Les phages correspondant aux candidats potentiels ont été repérés (localisation des plages de lyse illuminées sur filtre) et récupérés dans du tampon de dilution de phage. Afin de confirmer ces résultats et pour amplifier les candidats obtenus, une infection *d'E. coli* XL1-Blue a été réalisée avec différentes dilutions de ces phages (1X, 10X, 100X). Après incubation et ajout d'agar, chaque produit d'infection a été étalé sur boîtes LB $MgSO_4$ (comme précédemment) et placé en étuve à 37°C. Un crible a révélé des candidats ; comme précédemment ceux-ci ont été récupérés et leur ADN sera soumis au séquençage.

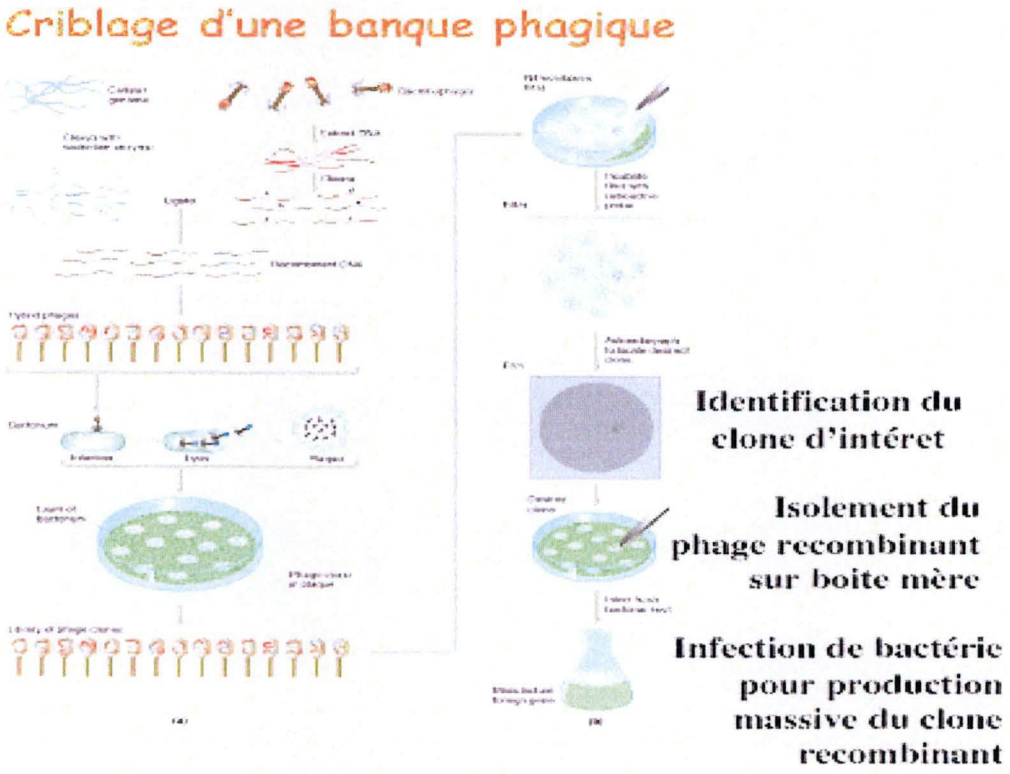


Figure 33 :Schéma représentant le criblage d'une banque phagique

4.6 Conclusion

Deux banques d'ADNc de *S. acidophilum* ont été réalisées. L'une à partir de l'ARN total extrait d'une culture en condition galactose l'autre à partir de l'ARN total extrait au départ d'une culture en condition galactomannan. En raison d'une activité de dégradation du galactomannan supérieure observée en condition galactomannan par rapport à la condition galactose, la banque en condition galactomannan a été la première testée en vue de progresser dans le clonage d'hydrolases d'intérêt industriel. Un premier examen de cette banque d'ADNc (condition galactomannan) révèle sa diversité pour les tailles d'insert. Si le test de clonage d'un gène de xylanase de *S. acidophilum* s'avère positif et valide la banque (condition initiale galactomannan) réalisée, le clonage des gènes de β-mannanase et d'α-galactosidase de *S. acidophilum* pourra raisonnablement être entrepris à partir de cette banque. La deuxième banque (condition initiale galactose) devra subir le même type de contrôle.

IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'obtention de l'ADNc d'un gène d'intérêt permet, après insertion de celui-ci dans un organisme hôte, sa production massive sans necessiter d'étape d'épissage. L'hydrolase ciblée au départ était une β-mannanase.

Afin de cloner le gène de la β-mannanase de *S. acidophilum* une approche bioinformatique a d'abord été envisagée au laboratoire. Différents alignements des séquences de mannanases séquencées chez différents organismes n'ont pas permis de retrouver une séquence suffisamment conservée pour élaborer des amorces nucléotidiques. Ce type d'approche a dès lors été rapidement abandonné (données non publiées).

Dans le cadre de ce travail en vue de cloner cette hydrolase et d'autres par la suite, l'établissement d'une banque d'ADNc de *S. acidophilum* s'est imposé en lieu et place de la réalisation d'une banque génomique de cet organisme. Une banque génomique représente l'ensemble du génome, mais comporte toujours des introns, et la présence de ceux-ci peut interférer voire rendre impossible la production et la sécrétion d'hydrolases dans le milieu extérieur par l'organisme hôte après insertion.

Toutefois, une banque d'ADNc est une banque partielle et seuls les ARNm présents au moment de l'étape de rétrotranscription seront représentés. Des tests d'activités enzymatiques ont dès lors été pratiqués en vue de déterminer les conditions de culture requises pour pouvoir effectuer une extraction d'ARN total contenant des ARNm d'hydrolases. Les tests d'activités ont été réalisés après différents temps d'incubation avec du galactomannan comme substrat. Celui-ci peut-être dégradé par une β-mannanase et une α-galactosidase. Il a été déterminé qu'une action conjointe de ces deux enzymes et d'une xylanase améliore le préblanchiment de la pâte à papier. Pour les différentes conditions de cultures testées, il s'est avéré qu'une activité de dégradation du galactomannan supérieure était observée au niveau du surnageant de culture en condition galactomannan 2 %. Ceci semblant indiquer une sécrétion d'hydrolases extracellulaires.

L'ARN total extrait à partir de deux conditions de cultures (galactomannan 2 % et galactose 2 %) a été soumis à différentes analyses qui ont permis d'estimer son intégrité et sa pureté. Ces ARN totaux ont donc servi pour l'élaboration de deux banques d'ADNc, l'une en condition initiale galactomannan et l'autre en condition initiale galactose. Le choix de la condition galactomannan s'est justifié par l'observation des résultats des tests d'activités. La condition galactose a également été choisie, afin d'élaborer une banque d'ADNc moins « spécifique » d'une activité galactomannanosidique et pouvant contenir d'autres types de gènes, lesquels pourraient servir pour d'autres types d'études et applications ultérieures.
Afin de tenter d'obtenir le plus rapidement possible le clonage des gènes d'intérêts, seul le contrôle de la banque en condition initiale galactomannan a été entrepris puisque la présence d'une activité de dégradation du galactomannan était dans ce cas supérieure à l'activité observée en condition galactose. Le contrôle effectué s'est révélé encourageant quant à la

présence d'inserts de tailles variables et suffisantes pour correspondre à des séquences codantes. L'identification, par criblage de cette banque, d'un gène de xylanase de *S. acidophilum* (déjà cloné antérieurement au laboratoire) a également été entreprise. L'ADN récupéré après ce crible est en séquençage.

Ce mémoire, touchant à sa fin, à donc permis l'obtention de deux banques d'ADNc de *S. acidophilum*, (dont l'une d'entre elles a été contrôlée) et laisse augurer de nombreuses applications et perspectives tant immédiates qu'à plus longue échéance.

La poursuite linéaire et logique de ce travail serait, outre le contrôle de la seconde banque, le clonage des gènes d'intérêts.
Afin de parvenir à cloner le gène de la β-mannanase, nous pourrions envisager d'avoir recours à un clonage fonctionnel. Diverses recherches et travaux dans le domaine des hydrolases ont permis d'élaborer des substrats colorés dont la dégradation peut être aisément visualisée (Fülöp and Ponyi, 1997). A titre d'exemple, le galactomannan peut être coloré avec du Remazol Brilliant Blue (RBB) (McCleary, 1988). On pourrait ainsi élaborer un milieu de culture solide (galactomannan) de coloration bleue grâce auquel l'apparition de halos de dégradation blanchâtre renseignerait la présence de clones d'intérêts au sein de notre banque. Des tests de détection de l'expression du gène de la xylanase de *S. acidophilum* chez *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisé de cette manière au laboratoire. Des plasmides contenant le gène de la xylanase ont été transformés chez *S. cerevisiae*. Les levures transformées ont été étalées sur un milieu contenant du RBB-Xylan. On observe des halos de dégradation du RBB-Xylan pour les levures ayant incorporé un plasmide permettant la sécrétion de la xylanase (Figure 34) (Vandamme, 2004).

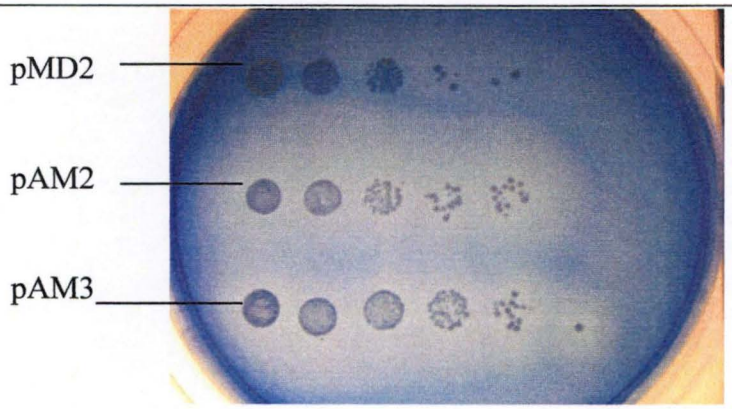


Figure 34 : Photo d'une boîte de milieu RBB-Xylan. Les cultures ont été déposées en gouttes avec des dilutions de 10 en 10 à partir de la gauche. La première ligne correspond à l'étalement de levures ayant incorporé un plasmide (pMD2) ne contenant pas le gène de la xylanase et l'on n'observe pas de halo. La seconde et la troisième ligne correspondent à l'étalement de levures ayant incorporé un plasmide (pAM2 et pAM3) contenant le gène de la xylanase. Les halos de dégradation observés dans ce cas renseignent la présence d'une xylanase.

Une autre technique pour localiser ce gène serait de rechercher le champignon ou l'organisme le plus proche d'un point de vue phylogénétique et/ou physiologique (acidophile) de *S.*

acidophilum et dont le gène de la mannanase serait déjà séquencé. Celui-ci pourrait servir de sonde et permettrait éventuellement de détecter un candidat.
En ce qui concerne le gène de l'α-galactosidase, l'approche bioinformatique qui s'était avérée infructueuse dans le cas de la mannanase pourrait à nouveau être envisagée. Nous pourrions rechercher l'ensemble des séquences d'α-galactosidases, effectuer un alignement de séquences, identifier des séquences ou des motifs présentant suffisamment d'homologie et sur cette base élaborer des amorces pour tenter d'amplifier ce gène à partir d'ADN génomique de *S. acidophilum*. En cas d'insuccès de cette méthode, les approches envisagées pour le gène de la mannanase pourraient également être employées.

Dès l'acquisition et séquençage du ou des gènes d'intérêts, un travail subséquent débuterait. Il s'agirait de réaliser l'insertion de ces gènes au sein d'organismes hôtes tels *P. pastoris* ou *S. cerevisiae* et déterminer les conditions de cultures nécessaires pour aboutir à une production extracellulaire (via éventuellement la fusion d'un peptide d'exportation) et en masse (sous contrôle d'un promoteur fort) au sein d'un fermenteur. Ensuite, il faudrait alors purifier et caractériser ces enzymes d'un point de vue biochimique (déterminer le pH et la température permettant une activité optimale,...).

Enfin, différents essais d'étapes de préblanchiment des pâtes à papier seront effectués afin de déterminer les conditions adéquates et optimales d'utilisation à savoir entre autres : concentration requise en enzyme, temps d'incubations nécessaires, action séquentielle ou concomitante des enzymes, contrôles en parallèle d'une amélioration effective de l'indice kappa, de la brillance et de la viscosité de la pâte (vérification de l'intégrité de la cellulose suite à ce traitement enzymatique) ainsi que d'autres tests pouvant inclure la xylanase déjà clonée par notre laboratoire. Par ailleurs, outre le blanchiment de la pâte à papier, ces enzymes pourraient également servir au recyclage des vieux papiers,(Sykes*et al.*, 1996) en améliorant et en réduisant également la quantité d'agents blanchissants utilisés, dans ce cas, pour le « désencrage » du papier (Marques*et al.*, 2003). De manière similaire aux étapes de blanchiments, ce recours à des hydrolases acidorésistantes diminuerait la quantité de polluants dégagés dans l'environnement et résulterait en de substantiels avantages économiques.
Un dernier volet, non moins important mais d'ordre fondamental, concernant les perspectives de ce travail pourrait être l'étude et la compréhension des mécanismes mis en place par *S. acidophilum* pour vivre dans un environnement aussi extrême.

V MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels

1.1 Solutions et tampon

1.1.1Solutions et tampons pour les tests d'activités

*DNS (Dinitrosalicylique) :

Acide dinitrosalicylique 1%
Tartrate de Na 20%
Sulfite de Na 0,05%
Phénol 0,2%
NaOH 1%

Préparer la solution dans de l'eau bidistillée, agiter à l'aide d'une puce magnétique et conserver le DNS dans une bouteille brune à 4°C.

*Tampon citrate 50mM pH 4 :

Dissoudre 1,05g d'acide citrique dans 100ml pour faire une solution 50mM et mettre à pH 4 avec une solution 50mM de citrate de sodium, faite préalablement en dissolvant 1,47g dans 100ml, autoclaver.

*Galactomannan 0,5% :

Dissoudre 0,25g de galactomannan dans 50 ml de tampon citrate 50Mm à pH 4. Transférer dans un flacon avec un barreau magnétique. Laisser une nuit à 4°C avec agitation avant de pratiquer les tests.

* Solution de mannose 10mM pour la droite d'étalonnage

0,18g dans 100 ml

* Solution de galactose 20 %

Peser 20g de galactose, dissoudre dans 80 ml d'H_2O et porter à un volume final de 100ml avec de l'H_2O. Autoclaver.

* Solution de glucose 20%

Peser 20g de glucose dissoudre dans 80 ml d'H2O et porter à un volume final de 100ml avec de l'H_2O. Autoclaver.

1.1.2 Solutions et tampons pour électrophorèse en gel d'agarose

*Tampon TBE 10x (Tris-Borate-EDTA) pour gel d'agarose :

Tris-Base 890mM
Acide borique 890mM
EDTA 19mM pH 8,3

*Solution d'agarose de 0,8 à 2% dans du TBE 1x

*Bromure d'éthidium : 2mg/ml d'eau bidistillée

*Alourdisseur/colorant bleu pour ADN pour migration sur gel d'agarose :

Bleu de bromophénol 0,25%
EDTA 25mM
Glycérol 50%

1.1.3 Solutions et tampons pour extraction et gel d'ARN

1.1.3.1Extraction d'ARN

* H_2O DEPC 0,1% : 1ml pour 1000ml H_2O. Ajouter sous hotte et bien agiter. Laisser une journée et autoclaver le soir.

* SDS 25 % : 25 g dans 100 ml H_2O. Agiter (barreau magnétique) et chauffer.

*Phénol acide pH 4

*AE buffer : 50mM NaAcetate pH5,2 ; 10mM EDTA. Pour 10 ml : 250 µl NaAc 2M ; 200 µl EDTA 0,5M. Mettre à pH 5,2 et porter à volume avec de l'H_2O DEPC.

*EDTA 0,5M : 18,6 g dans 100 ml d'H_2O DEPC.

*NaAc 2M 27,2g dans 100 ml d'H_2O DEPC.

*Chloroforme

*Isopropanol

*Ethanol 70%

1.1.3.2 Gel formamide

*10 X Running Buffer : 41,8g MOPS dans 800 ml d'H_20 DEPC
16,3ml NaAc 3M (DEPC)
Ajuster à pH 7 avec NaOH 10N
20 ml EDTA 0,5 M pH8
Porter à 1l avec de l'H_2O DEPC
Garder à l'abri de la lumière

*10 X Loading Buffer: EDTA 1 mM
50% glycérol
0,2% bleu de bromophénol
0,2% Xylène cyanole

*Formaldéhyde 37% pH 4

*Formamide

*Bromure d'ethidium à 400µg/ml

1.1.4 Solutions et tampons pour la banque d'ADNc

(non fournis dans le kit voir Protocole en annexe)

*Solution maltose 20%: 20g maltose dans 80ml d'H_2O et porter à volume. Stériliser sur filtre 0,22µm et conserver à 4°C

*Solution de $MgSO_4$ 1M : Dissoudre 24,65g de $MgSO_4$ dans 100 ml d'H_20

*IPTG (100mM) : Peser 0,0238g, dissoudre dans 1 ml d'H_20. Stériliser sur filtre 0,22µm, stocker à –20°C.

*X-GAL (100Mm) : Peser 0,0408 g, dissoudre dans 1 ml de diméthylformamide.

ATTENTION UTILISER GANTS ET PIPETTE EN VERRE ET PREPARER SOUS HOTTE (Diméthylformamide toxique)

*Xylène cyanol 1%

*Tampon dilution pour phages : Pour 100ml 0,58g Cl ; 0,2465g $MgSO_4$; 3,5ml de solution Tris HCL 1M pH 7,5 ; 0,5 ml de solution de gélatine 2%. Autoclaver

*Antibiotiques

Tétracycline solution stock : Peser 15mg/ml d'H_2O. Stocker à -20°C.

Kanamycine solution stock : Peser 25mgml d'H_2O. Stocker à –20°C.

Chloramphénicol solution stock : Peser 34mg/ml d'EtOH absolu. Stocker à –20°C

Carbénicilline solution stock : Peser 50mg/ml d'H_2O. Stocker à -20°C.

Ces solutions d'antibiotiques sont 1000 fois concentrées, il faut donc 1ml pour 1 litre de milieu. Les antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture après autoclave, quand celui-ci est à une température avoisinant les 55°C.

1.1.5Tampons et solutions pour minipréparation d'ADN plasmidique

*S1 : Tris/HCl 50mM
EDTA 10mM
RNase 100µg/ml (faire bouillir 15 minutes avant d'ajouter à la solution)
pH 8, stocker à 4°C

*S2 : NaOH 200mM
SDS 1%

*S3 : KAc 2,55M
pH 4,8

*Isopropanol 100%

*Éthanol 70% conservé à -20°C

1.1.6 Solution pour criblage de la banque

SSC 20X (NaCl 3 M, Citrate de sodium 300 mM)

Dissoudre 175,3 g de NaCl et 88,2 g de Citrate de sodium dans 800 ml d'eau distillée.

Ajuster le pH à 7,0 (avec quelques gouttes de NaOH 10M).

Amener le volume à 1 L.

Pour les différentes dilutions de SSC, diluer la solution stock de SSC 20X avec de l'eau distillée.

Solution de dénaturation (NaOH 500 mM, NaCl 1,5 M)

Dissoudre 20 g de NaOH et 87,7 g de NaCl dans 800 ml d'eau distillée.

Amener le volume à 1 L.

Solution de neutralisation (Tris 1 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5)

Dissoudre 121,1 g de Tris-base et 87,7 g de NaCl dans 800 ml d'eau distillée.

Ajuster le pH à 7,5 (avec de l'HCl concentré).

Amener le volume à 1L.

Denhart's Reagent 50X:

Dissoudre 5 g de ficoll, 5 g de polyvinylpyrrolidone et 5 g d'albumine de sérum bovin dans 500 ml d'eau distillée.

1.2 Milieux

1.2.1 Milieux pour *S. acidophilum*

1.2.1.1 Milieux liquides

Pour 1l de milieu : -Peser

2,5g KOH
2g NaOH
0,1g $FeCl_3$
2,5g $MgCO_3$

- Ajouter 200ml d'H_2O distillée

-Ajouter sous hotte chimique doucement

27ml H_2SO_4
5ml NH_4OH
6,3ml H_3PO_4

-Ajouter stérilement 2ml d'éléments en traces(*)

-Mettre à pH dans un berlin d'1l à pH 2 via ajout de NaOH 15N, porter à 1l avec de l'eau distillée

-Ajouter 3g de Yeast extract

-Autoclaver

(*) -Solution d'éléments en traces

H_3BO_3 0,12g
Na $MoO_4.2H_2O$ 0,5g
$CuSO_4.5H_2O$ 0,8g
$MnCl_2.4H_2O$ 0,15g

-Porter à1l avec de l'eau distillée

a) Culture liquide en milieu galactose

-Prélever 90ml de milieu de *S. acidophilum* et ajouter 10ml d'une solution galactose 20 % dans un erlen à contre pales de 500ml. Ajouter 1 ml de mycélium de *S. acidophilum* et incuber à 30°C avec agitation constante (90 rpm).

b) Culture liquide en milieu galactomannan

-Prélever 100 ml de milieu de *S. acidophilum* et ajouter directement dans le milieu 2 g de galactomannan dans un erlen à contre pales. Ajouter 1 ml de mycélium de *S. acidophilum* et incuber à 30°C avec agitation constante (90 rpm).

1.2.1.2 Milieux solides

Pour 100 ml de milieux Agar 2%
Yeast extract 0,3%
Source de carbone (glucose, galactose,...) 2%
Autoclaver
Ajouter 170µl d'Ac Tartrique après autoclave
Couler sur boîtes

1.2.2 Milieux pour bactéries

*Milieu LB (Luria-Bertani) :

Tryptone 1%
NaCl 0,5%
Yeast extract 0,5%

Dissoudre dans de l'eau bidistillée et autoclaver. Pour faire du milieu solide, ajouter avant autoclave 2% d'agar. Les antibiotiques, pour faire du milieu sélectif, sont ajoutés après autoclave quand la température est proche de 55°C (quand le milieu peut être pris en mains).

Le milieu solide est coulé stérilement en boîtes de Pétri. Après avoir été séchées sous hotte stérile, les boîtes sont conservées à 4°C.

*Milieu LB $MgSO_4$

Pour 400ml 4g Tryptone
2g Yeast extract
2g NaCl
4 ml solution$MgSO_4$
Autoclaver

*Milieu LB $MgSO_4$ maltose

Pour 400ml 4g Tryptone
2g Yeast extract
2g NaCl
4 ml solution$MgSO_4$ 1M
Autoclaver
4 ml solution maltose

*LB $MgSO_4$ soft top agar

Pour 400ml 4g Tryptone
2g Yeast extract
2g NaCl
2,88g Agar
4 ml solution$MgSO_4$
Autoclaver
Conserver à 65°C puis à 45°C avant utilisation

2. Méthodes

2.1 Techniques relatives aux acides nucléiques

2.1.1 Minipréparation d'ADNplasmidique

Cette technique permet de purifier les plasmides produits par *E.coli.* L'opération est conçue pour isoler l'ADN plasmidique de l'ADN génomique et des protéines bactériennes.
Une miniprep comprend 5 étapes: la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1.5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12.500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 □l de S1+ RNAaseA, ajouter 300 □l de S2 et mélanger doucement. Incuber 5 minutes à température ambiante.

- Ajouter 300 ml de S3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm) et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser et centrifuger 15 minutes à température ambiante (à 12500 rpm). Eliminer le surnageant.
- Laver l'ADN, c'est-à-dire ajouter 300 ml d'éthanol 70% (-20°C) et centrifuger 5 minutes à 12500 rpm à 4°C. Eliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher sous vide quelques minutes et resuspendre dans 20 à 50 ml d'H_2O distillée stérile (suivant le nombre de copies du plasmide récupéré).
- Stocker à -20°C.

2.1.2 Restriction d'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences palindromiques de 4 à 6 paires de bases. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Boehringer Mannheim.

- Placer dans un eppendorf :
  x ml d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée
  Tampon de restriction 10x: 1/10ème du volume final (livré avec l'enzyme de restriction)
  Enzyme de restriction: entre 2 et 10 unités d'enzyme par mg d'ADN (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 mg d'ADN du phage l en 1 heure).
- Amener au volume final avec de l'eau distillée
- Incuber 1 heure à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C)
-La réaction peut aussi être stoppée (enzyme inactivée) soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C) si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction phénol/chloroforme.

2.1.3 Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison d'un marqueur de taille contenant des fragments de tailles connues. L'ADN est visualisé par ajout de bromure d'éthidium au tampon de migration. Cette molécule s'intercalant dans la double hélice d'ADN apparaît fluorescente sous rayonnement UV, permettant ainsi la visualisation de l'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, il est possible d'estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Laisser refroidir la solution jusque 50°C (environ) et couler dans le support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de TAE, auquel on a ajouté quelques µl d'une solution de bromure d'éthidium (2 mg/ml).
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur.

- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré. En sachant que plus le voltage est élevé, plus la migration est rapide et la séparation des fragments d'ADN moins visible.

-Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm)

2.1.4 Extraction d'ARN total de *S .acidophilum* (Gurthie*et al.*)

-Centrifuger 10 min à 5000 rpm une culture de 60 ml de *S. acidophilum* en condition galactose 2 % ou galactomannan 2 %.

- Récupérer le culot, le filtrer sous vide et effectuer un broyage de celui-ci à l'azote liquide.

A partir de cette étape travailler en conditions Rnases free. Port de gants tout au long de la manipulation, toutes verreries DEPC, plastiques stériles, Tips avec filtre, eppendorf DEPC, pipette nettoyée à l'eau DEPC, étaler une feuille de papier aluminium sur la paillasse et l'humidifier avec de l'eau DEPC (environnement Rnases free).

-Transférer la poudre obtenue dans un falcon de 50 ml contenant déjà 12ml de phénol pH 4 à 65°C.

- Ajouter sous hotte aux 12ml de phénol 8ml phénol acide chaud (65°C)
20ml de tampon AE (65°C)
1500µl SDS 25%
4ml de billes de lyse
- Placer 20 min dans un bain à 65°C et vortexer 10 sec toutes les min.

- Séparer en deux falcons de 50ml. Dans le deuxième falcon remettre.
3 ml de phénol acide (65°C)
3 ml tampon AE (65°C)
400µl SDS 25%
4 ml billes de lyse
- Placer 10 min à 65°C et vortexer 10 sec toutes les min (la solution doit avoir au final un aspect blanchâtre).

-Laisser 5 min sur glace.

-Centrifuger 15min à 6000 rpm prélever la phase supérieure la mettre dans un nouveau falcon.

-Ajouter 15 ml de chloroforme, centrifuger 15 min à 6000 rpm, prélever la phase supérieure la mettre dans un nouveau falcon.

-Ajouter 1,5ml de NaAc et 15 ml d'Isopropanol (voir apparition d'un anneau blanchâtre), agiter et centrifuger 1 h.

-Lavage à l'éthanol, resuspendre la pellet avec 600µl d'EtOH 70 %. Transférer en eppendorf DEPC. Remettre 600µl EtOH dans le tube, bien rincer et ajouter au tube. Il faut aspirer la pellet avec la pipette (si beaucoup d'ARN récupéré, aliquoter et récupérer avec EtOH).

-Centrifuger 20 min à 14000 rpm.

-Enlever l'EtOH, laisser sécher sur table (éviter de sécher au speed-vac, risque que l'ARN soit trop sec).

-Resuspendre dans 500 µl d'H_2O DEPC.

2.1.5 Gel d'agarose formaldéhyde

Préparation du gel

Peser 1,2 g d'agarose, dissoudre dans 72 ml d'H_2O DEPC en chauffant au micro-onde. Laisser refroidir jusqu'à 50°C et ajouter 10ml de running buffer et 18 ml de formaldéhyde 37 % pH <4 (volume final 100ml). Couler le gel dans le support et placer le peigne adéquat.

Préparation des échantillons

Dans un eppendorf DEPC déposer :
10µl de formamide
4µl de formaldéhyde
2µl de running buffer
2µl de bromure d'éthidium à 400µg/ml
Xµl d'ARN (charger 10µg)

Laisser 10 min à 65°C. Mettre sur glace, effectuer un quick spin et ajouter 2µl de bleu de chargement. Charger les échantillons dans les puits et laisser migrer 2 à 3 h à 55-60 V.

2.2 Techniques relatives au test d'activité

2.2.1 Séparation des fractions (surnageant, fraction soluble et fraction insoluble)

- Prélever 10 ml d'une culture liquide de *S. acidophilum* et transférer en corex de 30ml.
- Centrifuger 30 min à 13000 rpm, récupérer le surnageant le filtrer et le conserver sur glace.
- Laver le culot dans 10 ml de tampon citrate 50mM à pH 4 et recentrifuger 30 min à 13000 rpm. Jeter le surnageant et de nouveau laver le culot dans 10 ml de tampon citrate 50Mm à pH 4 avant une dernière centrifugation de 30 min à 13000 rpm.
- Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de tampon citrate 50Mm à pH 4.
- Prendre le culot resuspendu et le soumettre au cell disruptor à une pression de 2 barr.

- Récupérer le culot lysé.
- Effectuer une dernière centrifugation à 13000 rpm pendant 30 min. Collecter le surnageant (il s'agit de la fraction soluble) et le conserver sur glace. Resuspendre le culot dans 2 ml de tampon citrate 50mM à pH 4 et conserver également cette fraction sur glace (fraction insoluble).

2.2.2 Test d'activité selon la méthode DNS (Miller, 1959), (Breuil and Saddler, 1985)

Test d'activité

- Dans un eppendorf mettre 440µl de galactomannan 0,5 % et ajouter 60µl de la fraction à tester.
- Incuber 10 min à 50°C.
- Ajouter 500µl de DNS conservé à 4°C.
- Incuber à 100°C pendant 15 min
- Mettre sur glace pendant 5 min.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 5 min et récupérer le surnageant.
- Lire la DO obtenue à 575nm.

Blanc

- Dans un eppendorf mettre 440µl de galactomannan 0,5 % et ajouter 60µl de la fraction à tester.
- Ajouter 500µl de DNS conservé à 4°C.
- Incuber à 100°C pendant 15 min
- Mettre sur glace pendant 5 min.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 5 min et récupérer le surnageant.
  Lire la DO obtenue à 575nm

2.3 Techniques relatives au criblage de la banque

Cette méthode a été utilisée pour le crible d'une banque d'ADNc de *Scytalidium acidophilum*. Elle utilise le principe de l'hybridation anticomplémentaire d'acides nucléiques afin de déterminer quel(s) phage(s) contiennent l'insert correspondant au gène recherché, dans notre cas un gène de xylanase.

Après avoir étalé une dilution de la banque transformée dans la souche XL1-Blue sur boîtes de LB $MgSO_4$, des répliques sur filtre de nitrocellulose sont réalisées. Les phages transférés sont lysés et l'ADN est fixé de façon covalente après chauffage à 80°C en étuve. Les filtres sont mis en présence d'une sonde marquée capable de s'hybrider avec l'ADN complémentaire d'intérêt. Après élimination de l'excès de sonde par lavages successifs, la localisation de la sonde liée de manière spécifique est examinée par autoradiographie. La localisation sur le filtre de la sonde liée correspond à la place sur la boîte de Pétri d'une plage de lyse contenant le clone désiré. Une culture de ce phage récupéré permettra de réaliser des tests diagnostiques divers.

2.3.1 Technique de criblage

Etalement de la banque

- étaler sur dix boites LB $MgSO_4$,une dilution de la banque transformée dans la souche XL1-Blue.
- placer les boîtes à 37°C une nuit.

Transfert

- déposer de manière homogène un filtre de nitrocellulose sur les boîte de LB $MgSO_4$ et réaliser des repères afin de pouvoir repositionner le filtre sur la boîte pour retrouver les plages,

Lyse des phages

La lyse des phages se réalise en quelques étapes simples :

- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de solution de dénaturation pendant 7 minutes,
- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de solution de neutralisation pendant 7 minutes,
- déposer la membrane sur un papier filtre saturé de SSC 20X pendant 3 minutes,

2.3.2Séchage et pré-hybridation de la membrane

Le séchage de la membrane s'éffectue dans une étuve à 80°C pendant une heure.
Lors de la pré-hybridation, la membrane est immergée dans une solution de pré-hybridation 2 heures à 68°C. Cette étape permet de réduire le bruit de fond par l'hybridations non spécifique de l'ADN de thymus de veau.

Solution de pré-hybridation :

- Denhard 50X :	5 ml
- SSC 20X :	12.5 ml
- SDS 10 %	0.5 ml
- ADN de thymus 100 µg / ml	3.3 ml
- H_2O	28.7 ml

L'ADN de thymus de veau est dénaturé dans de l'eau bouillante pendant 10 minutes et incubé sur glace avant d'être ajouté à la solution.

2.3.4 Marquage et hybridation de la sonde

Un fragment amplifié par PCR de 200pb du gène de la xylanase de *Scytalidium acidophilum* a servi pour l'élaboration de la sonde Après purification, ce produit PCR sert à son tour de matrice pour synthétiser la sonde marquée.
Pour la synthèse de la sonde marquée au [α-^{32}P]-dCTP, nous utilisons le kit Rad prime label system de Invitrogen et les α^{32}P dCTP (10 mCi/ ml, 3000 Ci/ mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.
La synthèse de cette sonde repose sur une fixation d'amorces aléatoires octamères, celles-ci sont anticomplémentaires de certaines portions de l'ADN matrice (ici le produit PCR purifié) et vont pouvoir initier la synthèse de la sonde par le fragment de Klenow de l'ADN

polymérase II. Le marquage radioactif est réalisé grâce à l'incorporation de [α-^{32}P]-dCTP dont le groupement phosphate α est remplacé par un phosphate radioactif. Suite à cette synthèse, des fragments de taille variable seront obtenus, ceux-ci pourront s'hybrider avec le brin anticomplémentaire de l'ADN
Mode opératoire :

- Placer 25 ng d'ADN du produit PCR purifié (ADN matrice) dans un volume 10 µl d'eau distillée stérile.
- Faire bouillir 10 minutes et conserver l'ADN matrice sur glace
- Ajouter 1 µl de dATP, dGTP, dTTP (500mM) et 20 µl d'amorces aléatoires (solution 2.5x)
- Ajouter 5 µl d'[α-^{32}P]-dCTP
- Porter le volume à 49µl avec de l'eau distillée stérile, et mélanger
- Ajouter 1 µl de la polymérase Klenow
- Incuber 10 min. à 37 °C

La sonde est ajoutée à la solution de préhybridation et la membrane et l'ensemble est placé à 68 °C sous agitation pendant une nuit.

2.3.5 Lavages

Après hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et conservé à –20 °C pour être réutilisé. La membrane est lavée deux fois, pendant 10 minutes, avec du SSC 2X, SDS 0.1%. Des lavages plus stringeant en SSC 0,2X, SDS 0.1% ont également été réalisés.

2.3.6Détection et révélation

La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette au contact d'un film autoradiographique. La cassette est maintenue à –80 °C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiograohique est immergé dans une solution de révélation pendant 10-15 secondes. Une fois les bandes révélées, le film est rincé à l'eau, puis trempé dans une solution de fixation.

2.4 Techniques relatives à l'élaboration de la banque d'ADNc

La banque et les techniques s'y rapportant ont été réalisées selon le protocole fourni par CLONTECH.

SMART cDNA Library Construction Kit User Manual
PT3000-1 (PR15738)
Published 08 June 2001
Catalog #:K105-1

Le packaging des phages a été effectué selon le kit Ready-To-Go Lambda Packaging Kit de Amersham Bioscience

VI BIBLIOGRAPHIE

Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Tjerneld, F. & Stalbrand, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from Aspergillus niger: purification and properties of a beta-mannanase. *J Biotechnol* **63**, 199-210 (1998).

Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv* **18**, 355-83 (2000).

Bokström, M. & Tuomi, A. (1996).

Breuil, C. & Saddler, J. N. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microb.Technol.* **7**, 327-332 (1985).

Calcus, J.-C. (1996). Etablissement d'une banque génomique et d'une banque d'ADNc du champignon extémophile *Scytalidium acidophilum* en vue de l'exploitation biotechnologique d'enzymes hyperstables. Mémoire en graduat de Biochimie, Institut Provincial D'Enseignement Supérieur Agricole et Technique, Ath

Carmichael, J. W. & Sigler, L. A new acidophilic *Scytalidium*. *CAN.J.MICROBIOL* **20**, 267-268 (1974).

Clarke, J. H., Davidson, K., Rixon, J. E., Halstead, J. R., Fransen, M. P., Gilbert, H. J. & Hazlewood, G. P. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and alpha-galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 661-7 (2000).

De vries, R. P. & Visser, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 497-522 (2001).

Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. & Cassidy, C. S. Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 144-51 (2001).

Duffaud, G. D., McCutchen, C. M., Leduc, P., Parker, K. N. & Kelly, R. M. Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium Thermotoga neapolitana 5068. *Appl Environ Microbiol* **63**, 169-77 (1997).

Fülöp, L. & Ponyi, T. Rapid sceening for endo-β-1,4-glucanase and endo-β-1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. *Journal ofMicrobiological Methods* **29**, 15-21 (1997).

Guiguen, A. (2002). Identification et clonage d'une laccase de *Scytalidium acidophilum*.Mémoire en Sciences biologiques, FUNDP.

Gurthie, C., Fink, G., Kohrer, K. & Domdey, H. *Guide To Yeast Genetics and Molecular Biology*.

Kansoh, A. L. & Nagieb, Z. A. Xylanase and mannanase enzymes from Streptomyces galbus NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**, 103-14 (2004).

Marques, S., Pala, H., Alves, L., Amaral-Collaco, M. T., Gama, F. M. & Girio, F. M. Characterisation and application of glycanases secreted by Aspergillus terreus CCMI 498 and Trichoderma viride CCMI 84 for enzymatic deinking of mixed office wastepaper. *J Biotechnol* **100**, 209-19 (2003).

McCleary, B. V. *Soluble, dye labelled polysaccharides for the Assay of Endohydrolases* (1988).

Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428 (1959).

Raven, H. P., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. *BIOLOGIE VEGETALE* (2000).

Rochefort, D., Leech, D. & Bourbonnais, R. Electron transfert mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* **6**, 14-24 (2004).

Roncero, M. B., Colom, J. F. & Vidal, T. Why oxalic acid protects cellulose during ozone treatments? *Carbohydrate Polymers* **52**, 411-422 (2003).

Shallom, D. & Shoham, Y. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* **6**, 219-28 (2003).
Sykes, M., Klungness, J. & Tan, F. in *Recycling Symposium* (New Orleans, 1996).
Tolan, J. S. *Industrial Enzymology* (ed. West, G. a.) (1996).

Vandamme, A. M.. La méthode de clonage Gateway : application à l'enzyme xylanase. Travail de fin d'étude en vue de l'obtention du titre de Technologue de Laboratoire, Haute Ecole Charleroi Europe, 2004.

Xu, B. Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, Mytilus edulis: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. *Faculty of Science and Technology* Uppsala(2002).

Xu, B., Sellos, D. & Janson, J. C. Cloning and expression in Pichia pastoris of a blue mussel (Mytilus edulis) beta-mannanase gene. *Eur J Biochem* **269**, 1753-60 (2002).

16 JUIN 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20