

Génération d'une inosine-uridine nucléoside hydrolase (IU-NH)
par évolution moléculaire dirigée capable de mieux fonctionner en solvant organique

par

Maurice Dieudonné BOUITY-VOUBOU

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2002

Le 30/05/02, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.

Président-rapporteur : M. Brian Talbot
Département de biologie

Membre : M. Ryszard Brzezinski
Département de biologie

Membre : M. Denis Groleau
Institut de recherche en biotechnologie

Membre : M. Denis LeBel
Vice-doyen

À la mémoire de mon père,
Maurice Romuald BOUITY-VOUBOU (1938-1981)

Sommaire

L'approche d'évolution moléculaire dirigée, laquelle est un ensemble de méthodes *in vitro* et *in vivo* basées sur la génération d'une bibliothèque de chimères suivie d'une méthode rapide de sélection, a été utilisée pour modifier et améliorer diverses propriétés d'une protéine comme la thermostabilité, la solubilité, le niveau d'expression du gène et l'activité dans un environnement naturel ou non-naturel. Nous avons utilisé la mutagenèse dirigée et le "DNA shuffling", une technique d'évolution dirigée, pour tenter de convertir la nucléoside hydrolase en une enzyme capable d'opérer dans un milieu pauvre en eau, la réaction inverse de l'hydrolyse, ouvrant de ce fait la porte à la synthèse d'agents antiviraux ou antitumoraux. Cette protéine suscite beaucoup d'intérêt au niveau de la chimie médicinale.

Le projet est basé sur un gène synthétique de 985 paires de bases codant pour l'inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) comparable au gène du protozoaire *Crithidia fasciculata*, préalablement assemblé et cloné dans *Escherichia coli*. Ce gène fut placé dans le vecteur pGEX-4T3 sous le contrôle du promoteur *tac*, qui peut être induit par l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). Après induction de cellules *Escherichia coli* (BL21) contenant le plasmide, ces cellules produisent la nucléoside hydrolase fonctionnelle dans la bactérie transformée. La mutagenèse dirigée et le criblage ont donné des variantes qui hydrolysent le substrat *p*-nitrophényl riboside (pNPR) de 10 à 30% de moins que l'enzyme de départ dans 10 et 30% de diméthylformamide (DMF) pour les mutants à la position 39. Par contre, les

variantes à la position 14 ont montré une faible activité pour le même substrat. Aussi, l'effet de mutations ponctuelles sur le gène IU-NH aux positions 14 et 39 n'a pas permis d'améliorer l'activité de la protéine avec le *p*-nitrophényl désoxyriboside (pNPD) comme nouveau substrat spécifique.

Nos travaux ont aussi utilisé une approche innovatrice connue sous le nom "DNA shuffling" pour l'ingénierie de protéines. Cette approche comprend des étapes multiples de mutagenèse aléatoire, de recombinaison et de criblage des meilleurs clones. La première ronde selon l'approche "DNA shuffling" fut appliquée en combinaison avec un criblage de la banque des mutants résultants. Le criblage était basé sur un essai enzymatique à haut rendement dans des plaques de 96 puits avec 300 μ M de *p*-nitrophényl riboside (pNPR) pour déterminer l'activité enzymatique dans des lysats de cellules. Parmi les clones générés lors de la première ronde de recombinaison, 1-SH2 (D54N et R137G) a montré une amélioration de l'activité catalytique de l'enzyme par rapport à celle obtenue avec le gène synthétique de départ, avec le *p*-nitrophényl riboside (pNPR) comme substrat. Les deux substitutions d'acide aminé obtenues sur le gène ont permis de tripler l'activité de l'inosine-uridine nucléoside-hydrolase (IU-NH) en présence de 30% de diméthylformamide (DMF). La variante 1-SH2 montre également une activité appréciable dans 40 et 50% de DMF avec le *p*-nitrophényl riboside (pNPR), contrastant avec le gène synthétique de départ qui n'a montré aucune activité dans ces concentrations de diméthylformamide (DMF).

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans la contribution de plusieurs personnes et institutions. Mes remerciements s'adressent d'abord aux Drs Roland Brousseau, Denis Groleau et Robert Lortie pour m'avoir initié à la recherche et dirigé durant le projet. Particulièrement au Dr Roland Brousseau pour son inestimable disponibilité, ses encouragements, sa rigueur scientifique et son profond humanisme, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude. Et aux deux autres directeurs, Drs Denis Groleau et Robert Lortie, pour leurs sympathies et surtout pour leurs conseils qui m'ont permis de progresser durant ce travail. J'aimerais aussi remercier spécialement plusieurs agents techniques de l'Institut de recherche en biotechnologie (IRB), notamment Mr Jean-François Jetté et Madame Gabrielle Préfontaine, pour m'avoir dirigé tout au long de ma formation, et aussi de m'avoir apporté autant de conseils tout au long du projet et également à Mr Michael Trani de l'équipe du Dr Robert Lortie pour avoir fait la synthèse chimique du substrat, le *p*-nitrophényl riboside (pNPR).

J'aimerais remercier par la même occasion mes parents pour l'amour et l'encouragement qu'ils ont manifesté depuis le début de ma formation académique. Et aussi ma fille Bintou Maguy Yasmina pour son soutien moral, son appui et son humour.

Je ne pourrais pas terminer sans remercier les personnes que j'ai beaucoup côtoyées à IRB, spécialement le Dr Luke Masson, Daniel Tessier, Alberto Mazza et Wayne Levadoux, à qui

j'adresse un gros merci pour l'aide technique et le climat chaleureux qu'ils m'ont apporté au sein de l'Institut.

Enfin, je remercie le Dr Traian Sulea, CNRC-IRB, d'avoir rendu possible la partie mutagénèse dirigée en analysant la structure tridimensionnelle de l'enzyme IU-NH, et finalement, le Dr Ryszard Brzezinski de l'Université de Sherbrooke pour avoir accepté d'être le co-directeur de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 - PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	25
1.1. Souche et milieu de culture.....	26
1.1.1. Souche bactérienne.....	26
1.1.2. Vecteur d'expression.....	26
1.1.3. Milieu de culture.....	27
1.1.4. Bactéries compétentes d' <i>Escherichia coli</i> (BL 21).....	27
1.2. Techniques de biologie moléculaire.....	28
1.2.1. Technique d'isolement de l'ADN plasmidique.....	28
1.2.1.1. Miniprep.....	28
1.2.1.2. Maxiprep.....	29
1.2.2. Détermination de la pureté de l'ADN.....	30
1.2.3. Analyse de l'ADN.....	30
1.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	30

1.2.5.	Récupération de la bande d'ADN.....	31
1.2.6.	Mutagenèse dirigée.....	32
1.2.6.1.	Purification des oligonucléotides.....	32
1.2.6.2.	Phosphorylation des oligonucléotides.....	33
1.2.6.3.	Procédure de mutagenèse dirigée.....	33
1.2.7.	Procédure de la technique "DNA shuffling"	34
1.2.7.1.	Préparation des gènes.....	34
1.2.7.2.	Digestion à la DNase I en présence de Mn ²⁺	35
1.2.7.3.	Réassemblage des fragments sans amorces	36
1.2.7.4.	Amplification par PCR des produits réassemblés.....	36
1.2.8.	Clonage des produits de PCR du "DNA shuffling"	37
1.2.8.1.	Ligation.....	37
1.2.8.2.	Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	38
1.3.	Criblage et sélection des protéines recombinantes	39
1.4.	Réaction de séquençage	43
1.5.	Analyse informatique des mutations.....	43
1.6.	Cinétique des enzymes mutées en présence du diméthylformamide (DMF)	44
1.7.	Expression des gènes	45
1.7.1.	Préparation des échantillons.....	45
1.7.2.	Lyse cellulaire.....	46
1.7.3.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant ("SDS-PAGE").....	47

1.7.4.	Coloration, décoloration et conservation.....	49
1.7.5.	Dosage de protéines.....	49
CHAPITRE 2 -	RÉSULTATS	51
2.1.	Caractérisation du gène de départ et étude de la protéine Correspondante	52
2.1.1	Étude de la protéine IU-NH et mise au point d'un système de lyse cellulaire	55
2.1.2.	Optimisation du temps d'incubation du système d'expression de la protéine IU-NH	58
2.1.3.	Activité spécifique des extraits cellulaires contenant l'enzyme IU-NH non-mutée	60
2.1.4.	Activité de l'enzyme de départ en présence de diméthylformamide	61
2.2.	Effets des substitutions d'acide aminé aux positions 14 et 39 après mutagenèse dirigée.....	62
2.3.	Analyse des clones obtenus par "DNA shuffling"	67
2.3.1.	Réassemblage du gène inosine uridine nucléoside hydrolase	67
2.3.2.	Stratégie de criblage des variantes de l'IU-NH après évolution dirigée.....	73
2.3.3.	Caractérisation des mutants 1-SH1 et 1-SH2 obtenus lors du premier cycle d'évolution dirigée et effet de mutations	

	sur l'activité de l'IU-NH améliorée.....	77
1.2.1.	Combinaison des gènes sélectionnés pour une autre ronde d'évolution dirigée.....	85
CHAPITRE 3 -	DISCUSSION.....	88
3.1.	Analyse des variantes obtenues par mutagenèse dirigée.....	90
3.2.	Analyse des variantes obtenues par "DNA shuffling"	94
3.3.	Effets de substitutions d'acide aminé sur l'efficacité catalytique de l'inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) dans les mélanges eau-DMF	100
3.4.	Développement d'une technique de criblage	104
3.5.	Recombinaison des mutations positives et perspectives.....	104
CHAPITRE 4 -	CONCLUSION.....	109
CHAPITRE 5 -	BIBLIOGRAPHIE	112

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp ^r	Résistance à l'ampicilline
D.O.	Densité optique
DMF	Diméthylformamide
GST	Glutathione S-transférase
IAG-NH	Inosine adénine guanine nucléoside hydrolase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
IU-NH	Inosine-uridine nucléoside hydrolase
μg	Microgramme (10 ⁻⁶ g)
μD.O.	Microdensité optique
μl	Microlitre (10 ⁻⁶ l)
μM	Micromolaire
μM/min	Microdensité optique par minutes
KDa	Kilo Dalton
Kb	Kilo base
K _M	Constante de Michaelis-Menten
l	Litre
M	Molaire (mole/litre)

mg	Milligramme (10^{-3} g)
mDO	Milli-unité de densité optique
mDO/min	Milli-unité de densité optique par minute
min	Minute
ml	Millilitre
nm	Nanomètre (10^{-9} m)
pb	Paire de bases
pH	Logarithmique à la base 10 de l'inverse de la concentration de l'ion H_3O^+ dans une solution aqueuse
P.M.	Poids moléculaire
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pNPR	<i>p</i> -nitrophényl riboside
pNPD	<i>p</i> -nitrophényl désoxyriboside
SDS-PAGE	Gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

LISTES DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Coefficients de conversion entre les unités d'extinction mDO en μM déterminés expérimentalement en fonction de la concentration de diméthylformamide présent42
- Tableau 2.** Substitutions des acides aminés de l'enzyme IU-NH évoluée par "DNA shuffling"80
- Tableau 3.** Changements introduits au niveau de certains nucléotides conduisant à certaines substitutions d'acides aminés de l'enzyme IU-NH et effectués par mutagenèse dirigée92
- Tableau 4.** Constantes cinétiques de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase mesurées pour l'hydrolyse du *p*-nitrophényl riboside dans 50 mM HEPES, pH 8,0 contenant 0, 10, 30 et 40% de DMF à température de la pièce98

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Organigramme de l'ingénierie biomoléculaire et stratégie pour générer une nouvelle biomolécule par évolution moléculaire dirigée.....	5
Figure 2	Les étapes de l'évolution moléculaire dirigée.....	9
Figure 3	Illustration schématique du processus de "DNA shuffling" utilisé dans cette étude.....	11
Figure 4	Structure du plasmide pGEX-4T3 permettant l'expression du gène inosine uridine nucléoside hydrolase dans <i>Escherichia coli</i> (BL 21) avec le gène de structure de la glutathion-S-transférase (GST) placé en amont de l'insert.....	53
Figure 5	Analyse du plasmide pGEX-4T3-IU-NH par digestion avec les enzymes de restriction <i>EcoR</i> I et <i>Not</i> I de l'ADN plasmidique isolé suivie d'une migration en gel d'agarose 1,5%	54
Figure 6	Expression de l'inosine uridine nucléoside hydrolase dans <i>E. coli</i> (BL21).....	57
Figure 7	Détermination de la masse moléculaire de la protéine de fusion inosine uridine nucléoside hydrolase avec la GST (IU-NH-GST).....	59

Figure 8	Étude cinétique de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase de départ en fonction des différentes concentrations du solvant organique, le diméthylformamide, et du substrat, le <i>p</i> -nitrophényl riboside	63
Figure 9	Structure du site actif de l'enzyme montrant les positions Asp14 et Asn39 du côté de l'interaction entre l'enzyme IU-NH, le Ca ²⁺ et l'état de transition avec l'inhibiteur, le <i>p</i> -aminophényliminoribitol (pAPIR).....	65
Figure 10	Substitutions de nucléotides produites dans le gène inosine uridine nucléoside hydrolase par mutagenèse dirigée et par "DNA shuffling"	66
Figure 11	Activité des enzymes mutées (variantes) obtenues par mutagenèse dirigée, avec ou sans diméthylformamide.....	68
Figure 12	Activité des enzymes mutées (variantes) obtenues par mutagenèse dirigée, avec ou sans diméthylformamide.....	69
Figure 13	Réassemblage des fragments de 50 à 100 pb d'un gène d'environ 1,0 kb	71
Figure 14	Les principales étapes de l'évolution moléculaire dirigée de l'enzyme IU-NH	72
Figure 15	Les étapes expérimentales de criblage après évolution moléculaire dirigée de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase	74

Figure 16	Lecture d'activité au spectrophotomètre à plaque, "SpectraMax", de la bibliothèque des variantes dans des plaques de 96 puits	76
Figure 17	Criblage des mutants obtenus par "DNA Shuffling" avec le <i>p</i> -nitrophényl riboside à une concentration finale de 300 μ M.....	78
Figure 18	Activité des enzymes mutées (variantes) 1-SH1 et 1-SH2 obtenues par "DNA shuffling" dans 0, 10, 30, 40 et 50% DMF	82
Figure 19	Étude cinétique de deux enzymes IU-NH mutées (les variantes 1-SH1 et 1-SH2) en fonction des différentes concentrations du substrat <i>p</i> -nitrophényl riboside et de la concentration de diméthylformamide	84
Figure 20	Famille des variantes d'inosine uridine nucléoside hydrolase obtenues par évolution moléculaire dirigée.....	86
Figure 21	Structure du substrat, le <i>p</i> -nitrophényl riboside, et structure de l'état de transition incluant la protonation du groupe partant, le caractère de l'ion ribooxocarbenium du ribose et la pré-association de l'eau.....	95
Figure 22	Représentation graphique de la position des mutations dans les variantes 1-SH1 et 1-SH2	101

Figure 23 Position des mutants obtenus en fonction d'un alignement multiple de
séquences de nucléosides hydrolases..... 105

INTRODUCTION

Le concept d'ingénierie des protéines. Selon Ménez (1996), l'exploitation de principes scientifiques à des fins pratiques définit le concept direct de l'ingénierie. L'ingénierie des protéines est le fruit d'une conception rationnelle et fonctionnelle fondée sur la mise en œuvre d'un ensemble d'activités scientifiques complémentaires. Ainsi, la biologie moléculaire et le génie génétique sont des aspects clés de l'ingénierie des protéines; ils permettent de modifier un gène afin de le rendre capable de produire des protéines optimisées.

La première époque de l'ingénierie des protéines : les mutagénèses dirigées et aléatoires.

Au cours de millions d'années, les molécules du vivant ont été façonnées par le jeu des mutations et de sélection pour accomplir des tâches hautement spécialisées. Mais, vers la fin des années 80 et 90, les protéines ont été souvent modifiées par mutation des gènes correspondants ; une première période de l'ère de l'ingénierie des protéines s'ouvrit alors (Reetz et Jaeger, 2000 ; Vernet et Brousseau, 1996 ; Wagner et Benkovic, 1990 ; Balland et al., 1985). La mutagénèse dirigée est basée sur la structure tridimensionnelle de la biomolécule et peut être réalisée après modélisation graphique sur ordinateur afin d'apporter des changements individuels des acides aminés sur un gène. Pour augmenter l'exploitation de la diversité biomoléculaire, de nouvelles stratégies ont été essayées visant la création de bibliothèques combinatoires possédant un ensemble de mutations ponctuelles individuelles, comme celle utilisée par Ke et Madison (1997) basée sur la répétition des cycles par "PCR prédisposée aux erreurs". La PCR prédisposée aux erreurs emploie une étape de reproduction de basse fidélité pour créer des mutations ponctuelles aléatoires à chaque ronde

d'amplification. Dans ce type de mutagenèse, on trouve deux facteurs qui sont très importants à considérer : la fréquence de mutation et la polarisation des mutations.

La fréquence de mutation est le nombre moyen de mutations par gène et est habituellement exprimée en pourcentage. La fréquence de mutation peut être calculée à partir de la longueur de la séquence programmée d'ADN et d'une évaluation du nombre de mutations désirées dans les séquences. Par exemple, un niveau souhaitable de mutations pour l'évolution dirigée est d'environ 2 à 5 substitutions de bases par gène (Arnold, 1998a; Kuchner et Arnold, 1997 ; Moore et al., 1997). Ainsi, pour une séquence de 1 kb, selon Zhao et ses collaborateurs (1999), la fréquence de mutation devrait être de 0,2 à 0,5% environ. La fréquence de mutation peut être contrôlée (de 0,1 à 0,5%) simplement en modulant la concentration de chlorure de manganèse (Mn^{2+}) dans le mélange réactionnel (Shafikhani et al., 1997 ; Lorimer et Pastan, 1995). Le problème de polarisation découle du fait que la PCR ne crée pas des substitutions véritablement aléatoires dans l'ADN (par exemple, une polarisation commune avec la PCR est une occurrence élevée des substitutions de A à G (Zhao et al., 1999). Une certaine polarisation peut être tolérée dans des expériences d'évolution moléculaire dirigée, mais de grandes variations dans la fréquence d'erreur entre les bases (A, C, G et T) peuvent être problématiques. La polarisation affecte l'emplacement des mutations (par exemple, avec la PCR, des mutations sur les paires de base AT se produisent beaucoup plus fréquemment que des mutations sur les paires de bases CG) (Zhao et al., 1999). On pourra dire que la PCR fait muter le A sur les deux brins d'ADN pendant la synthèse, effectivement en doublant le nombre des mutations. Shafikhani et ses collaborateurs (1997) ont observé une polarisation

dans le type de changements de paire de base avec A et T étant mutés beaucoup plus fréquemment que C et G.

Pour augmenter la diversité des molécules explorées, les molécules sélectionnées peuvent être obtenues par la mutagenèse aléatoire. Les molécules générées par mutagenèse sont alors amplifiées par la PCR ou d'autres méthodes d'amplification. L'expérience est souvent répétée pour plusieurs cycles jusqu'à ce qu'on obtienne des molécules avec des propriétés désirées.

La deuxième époque de l'ingénierie des protéines : l'évolution moléculaire dirigée. Les biomolécules ont commencé à être développées par des nouvelles techniques pratiques de mutagenèse aléatoire. L'efficacité des nouvelles techniques d'évolution moléculaire dirigée d'enzymes vise à imiter le processus d'amélioration normale d'enzymes. Normalement, les techniques d'évolution moléculaire dirigée diffèrent sur deux aspects principaux : (i) opportunité de définir les propriétés à optimiser, et (ii) le processus d'évolution pourrait avoir lieu dans une période relativement courte. Ainsi, les nouvelles méthodes recombinatoires et non-recombinatoires qui ont vu le jour sont devenues des techniques nécessaires pour la création d'une bibliothèque d'enzymes mutées (figure 1). Toutes ces méthodes, comme le démontrent la figure 1, empruntent le même chemin pour générer des nouvelles biomolécules. La recombinaison dans un sens génétique signifie la rupture de l'ADN et sa reconstitution pour donner de nouvelles combinaisons.

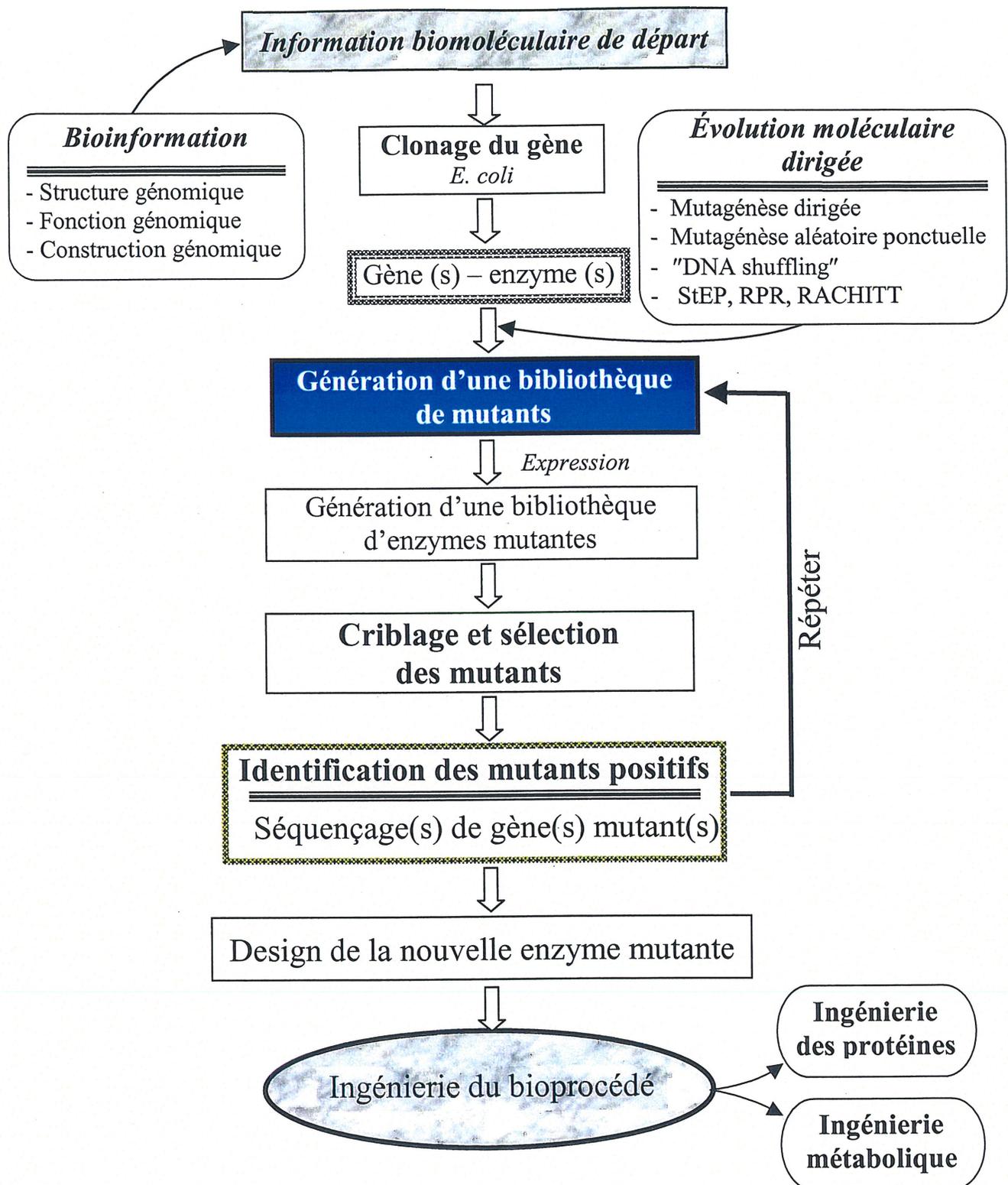


Figure 1. Organigramme de l'ingénierie biomoléculaire et stratégie pour générer une nouvelle biomolécule par évolution moléculaire dirigée. L'ingénierie biomoléculaire cherche à créer de nouvelles enzymes et est basée sur les connaissances et des techniques développées dans le vaste domaine de la biologie moléculaire, y compris la bioinformatique, les techniques d'évolution moléculaire dirigée, l'ingénierie des protéines, l'ingénierie métabolique, et l'ingénierie des bioprocédés.

L'information génétique liée à la molécule d'ADN qui doit être modifiée peut être liée à une molécule d'ADN différente, source de nouvelle information génétique. Diverses approches ont été développées pour imiter *in vitro* la recombinaison naturelle. Un des éléments essentiels a été reporté par l'équipe de Leung en 1989, laquelle a décrit la technique des réactions de polymérase en chaîne (PCR) dans lesquelles les conditions d'une PCR classique ont été changées (par exemple, la concentration en $MgCl_2$) afin d'atteindre le taux désiré de mutation. Ce procédé, induisant des mutations ponctuelles, a été suivi en 1994 par la méthode de recombinaison *in vitro* développée par Stemmer, le "DNA shuffling", en 1998 et 1999, par les deux autres méthodes de recombinaison développées par l'équipe de Frances Arnold, le StEP (*Staggered Extension Process*) et le RPR (*Random Priming in vitro Recombination*), et en 2001 par la méthode RACHITT (*Random Chimeragenesis on Transient Template*). Toutes ces méthodes fondées sur la PCR ont toutes comme conséquence de créer une banque de gènes mutants de diversité élevée. Le "DNA shuffling" et le StEP (*Staggered Extension Process*) sont deux méthodes de recombinaison par PCR qui présentent les mêmes défauts, comme les cycles répétés de PCR qui peuvent induire des mutations supplémentaires et un taux de recombinaison qui peut être limité par la taille des fragments formés lors de la digestion à la *DNase I*. À part les méthodes citées, le "DNA shuffling" (Stemmer, 1994a) ou les deux nouvelles méthodes recombinatoires, le RPR (Shao et al., 1998) et le StEP (Zhao et al., 1998) ou encore le RACHITT (Coco et al., 2001), d'autres méthodes se sont ajoutées aux méthodes d'évolution moléculaire dirigée, telles que la méthode utilisée dans ce projet, la mutagénèse dirigée avec les amorces dégénérées, permet aussi d'obtenir une bibliothèque d'enzymes mutantes avec une activité et une stabilité

améliorées, si la structure tridimensionnelle de l'interaction a été bien analysée. La revue de Zhao et collaborateurs (1999) décrit suffisamment les différentes méthodes de l'évolution moléculaire dirigée qui peuvent être utilisées pour optimiser les enzymes d'intérêt industriel ou pharmaceutique.

Bien que le futur soit imprévisible, il est fortement probable que l'ingénierie des protéines jouera un rôle beaucoup plus visible et plus significatif au 21ème siècle qu'au 20ème siècle. Ces dernières années, l'évolution moléculaire dirigée, aussi appelée "**évolution *in vitro***", est devenue une des approches les plus pertinentes pour adapter des biocatalyseurs aux conditions que nous désirons leur imposer. Cette approche permet leur utilisation pour créer des molécules avec des nouvelles propriétés ou améliorées à des fins médicales (développement de médicaments et des nouveaux anticoagulants) (Hall, 1999), industrielles, environnementales et de recherche fondamentale et est aujourd'hui très répandue et beaucoup utilisée (Kikuchi et al., 1999). L'évolution moléculaire dirigée d'enzymes imite les processus principaux de l'évolution darwinienne dans un tube à essai, combinant ainsi la mutagenèse aléatoire et/ou la recombinaison avec le criblage ou la sélection des variantes d'enzymes qui ont acquis des propriétés désirées (Hall, 1999 ; Schmidt-Dannert et Arnold, 1999 ; Arnold et Volkov, 1999 ; Arnold, 1998b). Les efforts pour développer et optimiser les techniques permettant de générer des mutations dirigées ou aléatoires dans un segment d'ADN ont facilité les premières expériences sur l'évolution dirigée des enzymes (Kuchner et Arnold, 1997).

La méthode de recombinaison *in vitro* pour l'évolution des enzymes développée par Stemmer est souvent nommée "PCR sexuelle" (Zhang et al., 1999 ; Arnold, 1998a ; Smith, 1994 ; Stemmer, 1994b) ou "DNA shuffling" (Coco et al., 2001 ; Sun, 1999 ; Stemmer, 1994a) ou encore évolution moléculaire (Punnomen, 2000). Les expressions "DNA shuffling" ou "PCR sexuelle", ou encore évolution *in vitro*, évoquent le fait que la méthode simule le processus de recombinaison sexuelle dans l'évolution de la vie (Ryu et Nam, 2000 ; Arnold, 1998b). Cette méthode mène habituellement à l'amélioration d'un gène unique. Les recombinants améliorés seront obtenus par des mutations aléatoires conventionnelles créées dans le segment d'ADN (Stemmer, 1994a). Ainsi, les méthodes de recombinaison *in vitro* offrent généralement une efficacité plus élevée de recombinaison et de flexibilité expérimentale que l'approche *in vivo* (Zhao et al., 1998). Contrairement aux techniques de mutation conventionnelle, le "DNA shuffling" échange largement les domaines fonctionnels des séquences et de ce fait joue un rôle clé dans l'ingénierie biomoléculaire visant à obtenir une meilleure molécule. La capacité de concevoir directement des protéines qui accompliront efficacement des tâches prédéfinies aura un impact profond sur la science et sur la vie quotidienne des êtres humains. Les protéines ainsi créées pourraient permettre de synthétiser de nouvelles biomolécules tout en permettant aux industries d'utiliser les ressources naturelles de façon plus efficace.

Autres que les méthodes utilisées durant la première époque de l'ingénierie des protéines, une séquence de méthodes de recombinaison peut être utilisée pour améliorer les enzymes dans des expériences *in vitro* (Encell et al., 1999). D'une façon générale, le processus de

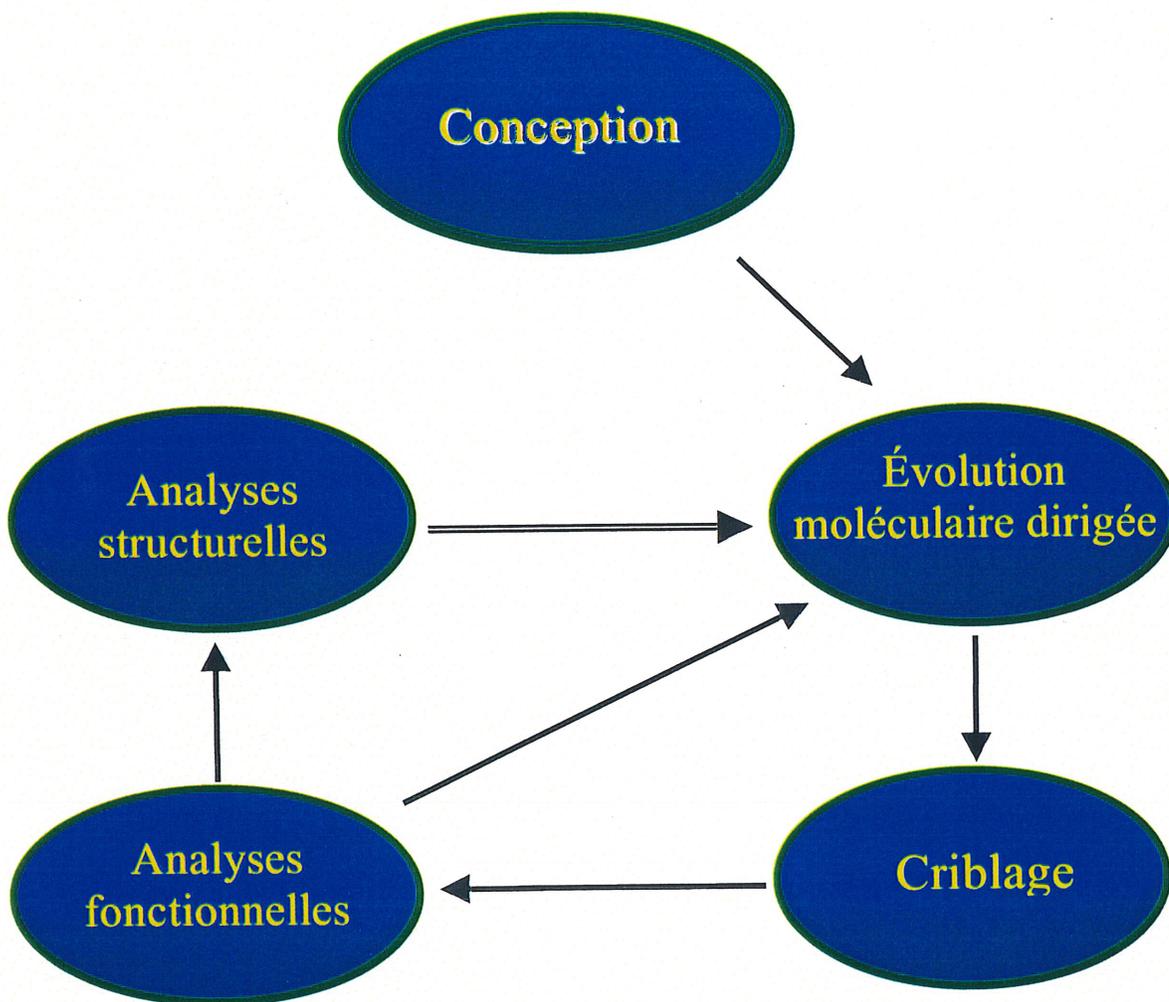


Figure 2. Les étapes de l'évolution moléculaire dirigée

l'évolution moléculaire dirigée comme il a été illustré dans la figure 2 comprend les étapes suivantes :

- (i) Créer une bibliothèque composée de gènes mutés à partir d'un gène cible ou d'une famille de gènes par mutagenèse aléatoire ponctuelle et/ou par recombinaison par recombinaison *in vitro* (Zhao et Arnold, 1997a ; Giver et Arnold, 1998).
- (ii) Cribler et sélectionner des variantes d'enzymes avec les propriétés améliorées.
- (iii) Analyser les données, les mutants positifs sélectionnés pouvant être de nouveau soumis à d'autres générations d'évolution.

Ce processus d'évolution peut être répété jusqu'à ce que le but soit accompli ou jusqu'il n'y ait aucune autre amélioration possible.

Le "DNA Shuffling" est la méthode la plus largement utilisée et celle que nous avons retenue pour ce projet. Cette approche, dans un premier temps, permet la recombinaison *in vitro* d'un gène ou d'une population de molécules d'ADN, préalablement fragmenté par une nucléase (*DNase I*), pour créer un regroupement de courts fragments d'ADN qui seront rassemblés dans l'intégralité du gène par thermocyclage répété en présence de l'ADN polymérase (Punnomen, 2000 ; Zhao et Arnold, 1997a). La fragmentation est suivie d'un réassemblage sans amorce externe qui va permettre que chaque fragment d'ADN dénaturé s'hybride à un autre fragment dans une région de séquence complémentaire et serve d'amorce ou de matrice pour l'élongation. Quelques dizaines de cycles PCR vont permettre la reconstitution plus ou moins totale du gène à partir des différents fragments. Puis une autre PCR spécifique avec

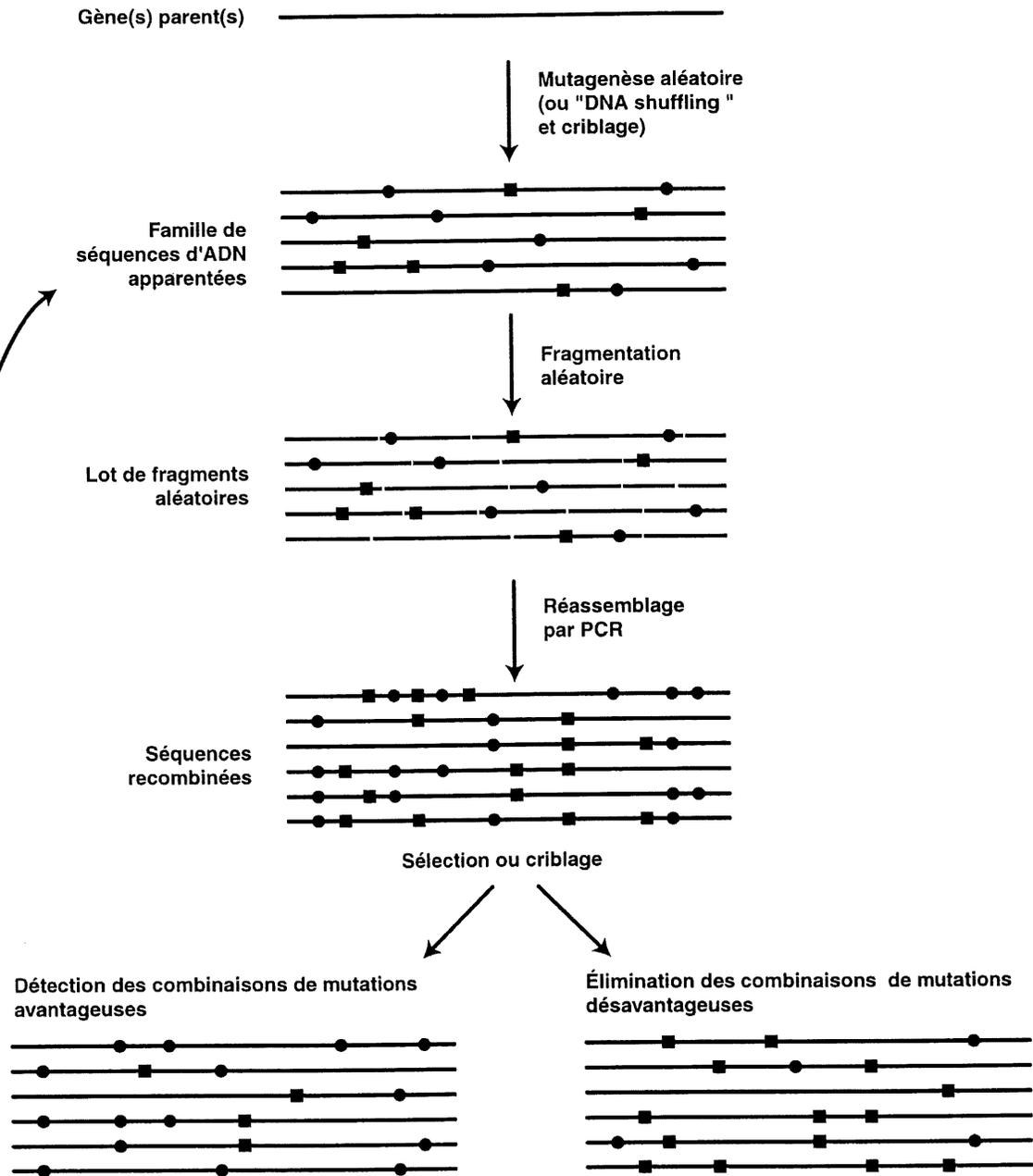


Figure 3. Illustration schématique du processus de "DNA shuffling" utilisé dans cette étude. Le fragment du gène parent a été réassemblé par PCR, ce qui va introduire des mutations supplémentaires. Les fragments sont allongés au cours d'une réaction PCR et donnent naissance à une librairie de séquences d'ADN contenant différentes combinaisons des mutations contenues dans l'ensemble du gène de départ. Les mutations avantageuses sont accumulées et les mutations néfastes sont éliminées au cours de l'enchaînement des cycles de *shuffling* et de criblage (figure adaptée à partir des références Zhang et al., 1999; Zhang et al., 1997; Kuchner et Arnold, 1997).

des amorces situées aux extrémités devrait permettre d'amplifier des gènes reconstitués en entier. Ainsi, on obtient un mélange de nouveaux gènes recombinants dont le (s) meilleur(s) peu(ven)t ensuite être soumis à une nouvelle étape d'évolution (figure 3). Le "DNA shuffling" est considéré comme une des méthodes de mutagenèse simulant le mieux les mécanismes naturels de l'évolution tout en produisant des mutants et plus stables (Kuchner et Arnold, 1997). Actuellement, la technique de "DNA shuffling", combinée avec une procédure de sélection bien développée, permet de développer rapidement des gènes pour une large variété d'applications industrielles. Cette technique a été appliquée avec succès pour étudier le mode d'action des β -lactamases (Smith, 1994 ; Stemmer, 1994a, b ; Stemmer, et al., 1995 ; Zhang et al., 1997 ; Crameri et al., 1997 ; Kuchner et Arnold, 1997), pour aider au développement de produits pharmaceutiques et de vaccins (Punnomen, 2000 ; Chartrain et al., 2000 ; Encell et al., 1999 ; Hall, 1999 ; Christians et al., 1999 ; Chang et al., 1999 ; Patten et al., 1997) et pour optimiser différentes enzymes industrielles (Ness et al., 1999 ; Kuchner et Arnold, 1997 ; Arnold et Moore, 1997), et pour distinguer les mutations fonctionnelles des mutations nonfonctionnelles (Zhao et Arnold, 1997c). Récemment, la technique "DNA shuffling" a été utilisée aussi pour recombinaison une famille de molécules provenant d'espèces diverses (Crameri et al., 1998).

L'application de l'évolution moléculaire dirigée à la nucléoside hydrolase.

Généralités sur les nucléosides hydrolases des protozoaires. Les nucléosides et une variété de leurs analogues synthétiques sont des cibles d'intérêt pour les chercheurs et les industries vu qu'ils peuvent être utilisés comme des antibiotiques, des antiviraux ou des antitumoraux

(Koga et al., 1997). Les nucléosides N-ribohydrolases sont des enzymes présentes chez les procaryotes et chez des eucaryotes unicellulaires libérant des bases de purines et de pyrimidines à partir des nucléosides, bases qui seront récupérées par la phosphoribosyltransférase (Parkin et al., 1997 ; Miller et al., 1984). L'enzyme inosine-uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) est un homotétramère de sous-unités identiques de 34 kDa et elle ne présente aucune propriété allostérique connue (Gopaul et al., 1996 ; Parkin et al., 1991). Les nucléosides hydrolases sont communes chez les parasites protozoaires et sont largement répandues parmi les bactéries, les levures et les protozoaires (Furneaux et al., 1999) mais ne sont pas présentes chez les mammifères (Miles et al., 1999 ; Furneaux et al., 1999).

Plusieurs parasites de la famille des trypanosomes ont la capacité de produire les nucléosides hydrolases. Chez les trypanosomes, les nucléosides hydrolases sont impliquées dans la voie de récupération de purines (Gopaul et al., 1996). Une des particularités métaboliques qui distingue les parasites protozoaires est que ceux-ci dépendent exclusivement de la voie de récupération des purines (donc déficience en synthèse de *novo* des purines) pour la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), voie que les organismes qu'ils infectent ne possèdent pas (Shi et al., 1999a ; Parkin et al., 1997 ; Gopaul et al., 1996). Les nucléosides hydrolases jouent donc un rôle majeur chez le parasite protozoaire. Aucune activité catalytique de ces enzymes n'a été identifiée chez les mammifères, ni chez les insectes (Braunhein et al., 1999 ; Degano et al., 1998 ; Deng et al., 1996 ; Estupiñan et Schramm, 1994). Cette dichotomie métabolique entre le parasite et l'hôte offre ainsi une opportunité pour développer des

médicaments antiparasitaires (Versées et al., 2001 ; Gopaul et al., 1996 ; Degano et al., 1996).

Le trypanosome *Crithidia fasciculata*, parasite protozoaire dont l'information génétique a servi de point de départ à notre projet, est un parasite du moustique qui n'infecte pas les mammifères. Ce parasite protozoaire est un organisme utile pour la production d'enzymes trypanosomales car il porte un génome riche en bases G+C qui est comparable en composition de bases à ceux d'espèces de *Trypanosoma* et de *Leishmania* (Gopaul et al., 1996 ; Estupiñan & Schramm, 1994 ; Parkin et al., 1991). Ce parasite produit au moins deux (2) types de nucléoside hydrolase qui diffèrent dans leur spécificité vis-à-vis le substrat et dans leur mécanisme catalytique (Degano et al., 1996). L'inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) est la plus abondante des nucléosides hydrolases chez *Crithidia fasciculata*. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du lien N-ribosyl de toutes les purines et pyrimidines naturelles pour libérer le ribose et la base associée selon la réaction suivante (Braunhein et al., 1999 ; Miles et al., 1999 ; Schramm, 1998 ; Deng et al., 1996 ; Schramm et al., 1996 ; Parkin et Schramm, 1995) :



Chez *Crithidia fasciculata*, une deuxième enzyme a été identifiée et est plus active avec la guanosine et l'inosine mais est presque inerte avec les nucléosides de pyrimidine et de

l'adénosine (GI-nucléoside hydrolase) (Gopaul et al., 1996 ; Estupiñan et Schramm, 1994). Plus de 90% des nucléosides récupérés de *Crithidia fasciculata* est le résultat de l'activité de ces deux enzymes [l'inosine-uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) et la guanosine-inosine nucléoside hydrolase (GI-NH)], établissant ainsi le rôle primordial de ces isozymes dans la voie de récupération des nucléosides (Pellé et al., 1998). L'enzyme inosine-uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) semble la plus abondante des enzymes chez *Crithidia fasciculata* (Gopaul et al., 1996).

Trois nucléosides hydrolases ont été identifiées chez *Leishmania donovani*, et chez un autre parasite protozoaire, *Trypanosoma cruzi*, on en a identifié quatre (Gopaul et al., 1996). Autre que *Crithidia fasciculata*, organisme d'origine de l'enzyme que nous étudions, les nucléosides hydrolases ont aussi été trouvées chez plusieurs parasites protozoaires comme *Trypanosoma brucei brucei* (Parkin et al., 1997 ; Mazzella et al., 1996), *Trypanosoma brucei gambiense* (Parkin et al., 1991), *Trypanosoma cruzi* (Parkin et al., 1991), *Leishmania donovani* (Gopaul et al., 1996), et *Leishmania mexicana* (Pellé et al., 1998). Ces parasites protozoaires causent de multiples infections soit plus d'un million de morts attribuables chaque année à la malaria, à la trypanosomiase, à la maladie de Chagas, à la maladie du sommeil et à d'autres infections qui peuvent être causées par ces parasites (Versées et al., 2001 ; Shi et al., 1999a ; Degano et al., 1996 ; Gopaul et al., 1996). D'où l'intérêt de disposer éventuellement de nouveaux ribosides et désoxyribosides anti-parasitaires de synthèse, qui pourraient être fabriqués industriellement par des nucléosides hydrolases modifiées et converties en synthases, ce qui constitue le but ultime de notre travail.

Les mécanismes d'action de l'IU-NH et des enzymes protozoaires apparentées. On identifie deux types d'isozymes de nucléoside hydrolase chez les protozoaires : celles qui sont spécifiques aux purines et celles qui sont nonspécifiques aux nucléosides de purines et de pyrimidines et aussi au *p*-nitrophényl β -D-ribofuranoside (*p*-nitrophényl riboside ou pNPR) (Versées et al., 2001). Ces deux types d'enzymes correspondent en fait à des mécanismes d'action distincts.

Les nucléosides hydrolases nonspécifiques (NNHs) catalysent l'hydrolyse des nucléosides de purines et de pyrimidines et elles hydrolysent également le *p*-nitrophényl β -D-ribofuranoside (*p*-nitrophényl riboside) de façon efficace (Furieux et al., 1999 ; Miles et al., 1999 ; Gopaul et al., 1996). À partir des bases de données, 78% de la séquence de la nucléoside hydrolase de *Leishmania major* est identique à celle de la nucléoside hydrolase nonspécifique de *Crithidia fasciculata*. Les nucléosides hydrolases (IU-NH) de *Leishmania major* et de *Crithidia fasciculata* ont été identifiées comme des nucléosides hydrolases nonspécifiques (NNHs) (Furieux et al., 1999 ; Miles et al., 1999 ; Schramm, 1998). De plus, les enzymes nonspécifiques catalysent l'hydrolyse des nucléosides naturels de purines et de pyrimidines (Miles et al., 1999). Les enzymes nonspécifiques hydrolysent efficacement le *p*-nitrophényl β -D-ribofuranoside parce qu'elles utilisent la stabilisation de l'ion ribooxocarbenium en tant que contributeur majeur à la catalyse (Mazzella et al., 1996). Shi et al. (1999b), Mazzella et al. (1996) et Parkin et al. (1997) ont démontré que le *p*-nitrophényl β -D-ribofuranoside est l'un des meilleurs substrats pour ce type d'enzyme pour distinguer les mécanismes des cinq (5) membres de la famille des N-ribohydrolases. Le *p*-nitrophényl est un bon groupe partant

puisque'il ne présente pas d'atomes d'azote sur le noyau de pyrimidine et de purine lesquels sont des accepteurs de proton dans la solvolysé catalysée par l'acide (Miles et al., 1999 ; Mazzella et al., 1996). Si l'activation au substrat exigeait la protonation (liens hydrogènes) à l'azote du groupe partant, le *p*-nitrophényl riboside (pNPR) serait un substrat inefficace. En revanche, une activité enzymatique substantielle avec le *p*-nitrophényl riboside (pNPR) pourrait indiquer la présence d'un mécanisme par lequel l'enzyme interagit avec le ribosyl seulement pour former un état de transition qui facilite le départ de l'ion *p*-nitrophénolate. Ainsi, le substrat *p*-nitrophényl riboside (pNPR) ne peut pas être protoné sur le groupe partant, mais il est susceptible à la décomposition quand le groupe ribosyl est converti en ion oxocarbenium (Shi et al., 1999b). Par contre, les nucléosides hydrolases spécifiques (SNHs), comme celles qui sont présentes chez *Trypanosoma brucei-brucei*, démontrent une spécificité vis-à-vis les nucléosides de purines et aussi vis-à-vis l'inosine, l'adénosine et la guanosine, lesquels sont de bons substrats (IAG-nucléoside hydrolase) (Mazzella et al., 1996), mais elles sont des catalyseurs médiocres pour les nucléosides de pyrimidines ou pour le nitrophényl riboside (Miles et al., 1999 ; Shi et al., 1999). Cette différence sur laquelle nous venons d'élaborer se situe au niveau de l'état de transition. On a aussi observé que les deux nucléosides inosine et uridine sont des bons substrats pour les enzymes nonspécifiques ; ces enzymes présentent aussi une activité catalytique significative avec tous les nucléosides naturels de purines et de pyrimidines.

Les mesures cinétiques d'effet isotopique ont permis d'établir la structure de l'état de transition pour l'enzyme IU-NH de *C. fasciculata* et que cette structure est caractérisée par

une liaison glycosidique C-N allongée, donnant un caractère carbocationique au ribose (Deng et al., 1996 ; Degano et al., 1996 ; Mazzella et al., 1996) et montrant ainsi l'ion oxycarbonium comme structure de l'état de transition (Mazzella et al., 1996 ; Gopaul et al., 1996). Ces informations sur le mécanisme catalytique sont utiles pour la conception des antibiotiques antitrypanosomaux. (Schramm, 1998 ; Gopaul et al., 1996). Les études sur la structure de la nucléoside hydrolase (IU-NH) de *Leishmania major* ont révélé la présence dans le site actif d'un ion Ca^{2+} lié avec cinq (5) atomes d'oxygène [Asp-10, Asp-15 (bidentate)], Thr-126 (carbonylique), et Asp-241 (Shi et al., 1999b ; Degano et al., 1998). Cette structure est similaire à l'apoenzyme inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) de *Crithidia fasciculata* (Shi et al., 1999b).

L'utilisation des enzymes en milieu non-aqueux. La possibilité d'utiliser des enzymes dans des solvants organiques et en milieux non-aqueux accroît considérablement l'intérêt industriel pour ces enzymes et ce pour plusieurs raisons (Klibanov, 1997 ; Shubhada et Sundaram, 1993 ; Gupta, 1992 ; Chen et al., 1991 ; Zaks et Klibanov, 1988), comme :

- (a). Le milieu non-aqueux est souvent approprié pour améliorer la stabilité thermique de l'enzyme (l'eau inactive les enzymes à des températures élevées).
- (b). Plus grande solubilité des substrats non polaires.
- (c). L'immobilisation n'est souvent pas nécessaire : les enzymes peuvent être récupérés par simple filtration.

- (d). Le milieu non-aqueux permet dans certains cas d'inverser la réaction normale et de transformer une hydrolase en synthase (certains réactions sont facilitées par un système faible en eau).
- (e). Élimine toute contamination microbienne.

Bien que les enzymes catalysent un certain nombre de transformations chimiques importantes dans les industries chimiques et pharmaceutiques, elles jouissent seulement d'une utilisation limitée en tant que catalyseurs industriels à grande échelle (Chen et Arnold, 1991). Très souvent, les enzymes naturelles ne sont pas bien adaptées aux exigences des procédés industriels. L'application potentielle des enzymes dans la synthèse chimique va considérablement augmenter si les enzymes peuvent fonctionner dans des solvants organiques polaires dans lesquels les substrats organiques sont beaucoup plus solubles (Chen et Arnold, 1991).

Au cours des quinze dernières années, diverses études ont démontré que ce changement d'environnement est possible et peut permettre à l'enzyme d'être plus stable et de catalyser des réactions impossibles en milieu aqueux. Pour réaliser ce changement d'environnement, la molécule d'enzyme doit souvent être modifiée, soit par mutagenèse dirigée ou aléatoire ou encore par recombinaison, pour donner une nouvelle protéine qui accepte mieux le solvant organique comme milieu réactionnel. Considérons les travaux du docteur F. H. Arnold et de ses collaborateurs sur la subtilisine E : en plaçant cette enzyme dans un solvant organique polaire, le diméthylformamide (DMF), ils ont constaté que l'enzyme avait une activité très

inférieure à celle dans l'eau. Mais, en réalisant une des premières expériences d'évolution dirigée, l'équipe a obtenu une nouvelle version modifiée de la subtilisine E possédant une activité correspondant à 60% de celle de l'enzyme native dans un milieu aqueux (Chen et Arnold, 1993). Cela se traduit par une augmentation d'efficacité catalytique d'un facteur 500 dans un milieu organique (milieu non-aqueux) (You et Arnold, 1994). Dans un deuxième cas, l'équipe du docteur Arnold (1996 à 1998), travaillant sur un autre type d'enzyme, la para-nitrobenzyl estérase (pNB), une enzyme utilisée dans la voie de synthèse d'un antibiotique, a pu améliorer significativement l'activité de cette enzyme d'un facteur 100 dans 30% de diméthylformamide (DMF) (Giver et al., 1998 ; Moore et al., 1997 ; Moore et Arnold, 1996). Plus récemment, d'autres auteurs comme Kampen et Egmond (2000), ont amélioré l'activité de leur enzyme (phospholipase) d'un facteur 11 par rapport à l'enzyme native en milieu aqueux. Dans l'éventualité des résultats de recherches cités, il serait envisageable d'améliorer l'efficacité de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) en condition de synthèse dans un milieu non-aqueux, comme première étape menant éventuellement à son utilisation industrielle comme synthase. Et dans la plupart des cas des travaux qui ont été réalisés dans ce domaine, la modification de l'enzyme a entraîné une amélioration de l'efficacité catalytique suite à une baisse substantielle de la constante de dissociation (Song et Rhee, 2000 ; Sidhu et Borgford, 1996).

L'adaptation de l'enzyme IU-NH aux milieux non-aqueux par l'ingénierie des protéines.

La plupart des enzymes ont évolué en milieu aqueux, et ne sont pas adaptées à fonctionner dans des solvants organiques. Les enzymes fonctionnant en milieu non-aqueux s'avèreront

nécessaires pour inverser la réaction d'hydrolyse et ainsi obtenir une réaction de synthèse (Klibanov, 2001 ; Lortie, 1997). Car, en milieu non-aqueux, les enzymes éviteront toute possibilité de contamination microbienne et pourront améliorer leur stabilité, plus particulièrement la stabilité thermique, et l'activité catalytique (Koops et al., 1999 ; Ducret et al., 1998 ; Stevenson et Storer, 1991). De telles enzymes seraient extrêmement utiles pour certaines opérations pharmaceutiques évoquées plus haut (Zaks, 2001 ; Desantis et Jones, 1999 ; Shubhada et Sundaram, 1993).

L'absence de l'eau est en soi souvent immédiatement favorable aux nouvelles réactions enzymatiques (Klibanov, 2001 ; Stevenson et Storer, 1991 ; Klibanov, 1989). Car l'utilisation des solvants organiques comme milieu de réaction peut considérablement augmenter le répertoire des transformations par l'enzyme utilisée. Pour un certain nombre d'applications, des réactions enzymatiques qui peuvent ou ne pas être faisables dans l'eau, peuvent devenir tout à fait possibles et commercialement attrayantes dans des solvants organiques. Par exemple, dans un milieu non-aqueux, les lipases, les estérases et les protéases deviennent capables de nouvelles réactions comme la transestérification, l'aminolyse ou la synthèse d'esters à partir d'acides et d'alcools (Klibanov, 2001).

Les objectifs de mon projet visent donc, par les méthodes d'évolution moléculaire dirigée, d'une part, à inverser le rôle normal de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) afin de synthétiser des nucléosides nouveaux plus actifs en solvant organique et, d'autre

part, de permettre à cette enzyme de pouvoir accepter les désoxyribonucléosides comme substrats.

La conversion de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) en désoxyribonucléoside hydrolase. L'une des caractéristiques fondamentales des enzymes est leur spécificité vis-à-vis le substrat. La capacité de modifier cette spécificité, par exemple afin de pouvoir utiliser d'autres substrats, peut devenir un but très important pour des applications industrielles ultérieures. Dans le cas qui nous intéresse, les nucléosides synthétiques dérivés du désoxyribose peuvent s'avérer plus intéressants que ceux provenant du ribose. Les enzymes naturelles du type inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) n'ayant aucune activité sur les désoxyribosides, il faudrait donc modifier leur spécificité vis-à-vis du substrat. Or, Ohnuma et ses collaborateurs (1996) ont démontré que l'évolution dirigée peut intervenir sur l'étendue du spectre de substrats pouvant être utilisés par une enzyme. Ils ont converti par mutagénèse aléatoire la diphosphate farnésyl synthase en diphosphate géranylgeranyl synthase. Zhang et ses collaborateurs (1997) ont aussi obtenu par évolution dirigée de la β -galactosidase une variante de cette enzyme dotée d'une activité accrue envers les substrats dérivés du fucose, suite à sept (7) rondes de "DNA shuffling". L'enzyme évoluée après la ronde finale a montré une spécificité accrue de 1000 fois pour le substrat *o*-nitrophényl fucopyranoside et de 300 fois pour le *p*-nitrophényl fucopyranoside, en comparaison avec l'enzyme de départ. La séquence d'ADN pour le gène évolué de la fucosidase a montré une accumulation de six substitutions d'acides aminés. Les auteurs Beuve et Danchin (1992), quant à eux, ont isolé un mutant de l'adénylate cyclase dont la

spécificité vis-à-vis le substrat avait été élargie. L'activité de l'enzyme en tant que guanylate cyclase avait été augmentée d'un facteur 4,5. Par contre, l'activité originale de l'adénylate cyclase avait subi une baisse par rapport à celle de l'enzyme de départ. Une deuxième mutation sur ce même gène a permis de rétablir l'activité adénylate cyclase tout en obtenant une augmentation de l'activité guanylate cyclase de 10 fois par rapport à l'enzyme de départ. Les travaux de l'équipe de Frances Arnold et de J. H. Zhang cités plus haut ont démontré que les mutations générées par différentes techniques d'évolution moléculaire dirigée sur le gène permettent d'obtenir des enzymes à spectre de substrats élargi. Dans le cas des travaux de l'équipe de Frances Arnold sur la *p*-nitrobenzyl estérase (pNB), les chercheurs ont pu obtenir une enzyme possédant une double adaptation à de nouveaux substrats (*p*-nitrophényl acétate, Loracarbef *p*-nitrobenzyl (pNP-LCN) ou *p*-nitrophényl Loracarbef) et ce, dans un milieu artificiel sans qu'aucune mutation ne soit localisée à proximité de la zone de contact de l'enzyme avec le substrat (Moore et al., 1997). C'est dire que toute modification est possible mais qu'on ne doit pas se limiter à tenter de modifier uniquement le site de liaison au substrat. Yano et ses collaborateurs (1998) ont réussi par évolution dirigée à permettre à l'enzyme aspartate aminotransférase d'utiliser un nouveau substrat à chaîne ramifiée. Après cinq (5) rondes de recombinaison par "DNA shuffling", ils ont obtenu une protéine mutée contenant 13 substitutions d'acides aminés, laquelle a montré une augmentation de 10^5 fois de son activité vis-à-vis le substrat à chaîne ramifiée et vis-à-vis le 2-oxovaline.

Objectif du projet de recherche. L'objectif à long terme de cette partie du projet visait à développer l'inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) en une protéine capable de

synthétiser des désoxynucléosides nouveaux offrant un intérêt au niveau de la chimie médicinale. Cette famille de molécules fera partie des agents antiviraux ou antitumoraux qui pourraient permettre de supprimer de façon spécifique les répliquions virales ou de cellules tumorales sans affecter le métabolisme normal des cellules (Utagawa, 1999). Nous voulions inverser le rôle normal de cette enzyme pour synthétiser, dans un milieu faible en eau, des nucléosides nouveaux ; nous cherchions aussi à rendre cette enzyme capable d'accepter les désoxyribonucléosides comme nouveaux substrats. Pour ce faire, nous avons utilisé les techniques d'évolution moléculaire dirigée afin de tenter de modifier les propriétés fonctionnelles de l'enzyme IU-NH.

Nous nous sommes basés sur le gène synthétique de 985 paires de bases codant pour l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH), comparable à celui du parasite *Crithidia fasciculata*, précédemment construit dans le laboratoire du Dr Roland Brousseau à partir d'oligonucléotides de synthèse. Ce gène a subséquemment été cloné et exprimé dans *Escherichia coli* (BL21) utilisant le vecteur d'expression pGEX-4T3 pour donner une protéine de fusion.

1. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

1.1. Souche et milieu de culture

1.1.1. Souche bactérienne

La souche bactérienne *Escherichia coli* (BL21) (Pharmacia Biotech) a été utilisée pour l'expression du gène codant pour la protéine inosine-uridine nucléoside hydrolase (IU-NH).

1.1.2. Vecteur d'expression

Le vecteur *pGEX-4T3* (Pharmacia Biotech) a été utilisé pour l'expression efficace chez *E. coli* de protéines recombinantes IU-NH fusionnées. Le gène inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) est cloné en aval du gène de fusion, le gène pour la glutathione S-transférase (GST). D'autres composantes ont été incluses dans le vecteur comme le promoteur *tac* qui permet un haut niveau d'expression après induction à l'IPTG et le gène *lacI^f* qui est utilisé pour contrôler l'expression des protéines hétérologues. Entre le gène de fusion et celui pour la IU-NH, a été inséré un site de clivage par la thrombine qui va permettre de récupérer la protéine d'intérêt durant la purification. Ce plasmide contient également un gène de résistance à l'ampicilline.

Le gène synthétique IU-NH de 985 paires de bases a été cloné dans le plasmide *pGEX-4T3* entre les sites de restriction *Not I* et *EcoR I*.

1.1.3. Milieu de culture

Le milieu nutritif complet 2xYT constitué de bacto-tryptone, 16 g/l, d'extrait de levure, 10 g/l, et de NaCl, 5 g/l, a servi pour la croissance bactérienne. Le pH du milieu a été ajusté à 7 avec du NaOH 5N avant stérilisation à 121°C pour 20 minutes à l'autoclave. Pour la croissance bactérienne dans un milieu solide, 15 g/l d'agar-agar ont été ajoutés au milieu avant de répartir le milieu dans des boîtes de pétri. L'ampicilline fut ajoutée après refroidissement du milieu à une concentration finale de 100 mg/l.

Pour la sélection des recombinants transformés, les clones furent cultivés dans des plaques de 24 puits, chaque puits contenant 2 ml de milieu 2xYT, et les plaques ont été incubées à 37°C à un taux d'agitation de 125 rpm.

1.1.4. Bactéries compétentes d'*Escherichia coli* (BL 21)

La préparation de bactéries compétentes d'*E. coli* (BL21) a été faite selon la méthode usuelle du laboratoire. Une colonie de la souche à transformer d'*E. coli* (BL21) fut transférée dans un tube stérile de 10 ml contenant 5 ml de milieu de culture 2xYT avec 100 mg/l d'ampicilline, et le tube incubé à 37°C toute la nuit avec agitation (250 rpm). Par la suite, 500 µl de la culture furent ajoutés à 50 ml de milieu 2xYT dans une fiole "Erlenmeyer" de 500 ml et le tout incubé à 37°C avec agitation (125 rpm) jusqu'à obtention d'une densité optique à 600 nm (D.O._{600nm}) entre 0,8-0,9. La suspension bactérienne fut transférée dans des

bouteilles en polyéthylène stériles et les bouteilles ont été gardées pendant 20 minutes sur glace après centrifugation à 5000 rpm (3836 xg) pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse Beckman modèle J2-21M, rotor SLA). Les culots furent resuspendus dans 2 à 4 ml de solution de lavage composée de glycérol stérile 10%. Les cellules furent ensuite lavées trois (3) fois dans un même volume de solution de lavage. Avant le 3ème lavage, les culots furent regroupés dans une seule bouteille de centrifugation et resuspendus dans un volume final de 4 ml de solution de lavage froide. Avant répartition des aliquotes de bactéries compétentes dans des tubes stériles de 1,5 ml, la densité optique à 600 nm variait de 200 à 300. Les tubes furent placés dans un bain de glace sèche-éthanol. Pour une conservation prolongée, les cellules compétentes furent placées à -80°C.

1.2. Techniques de biologie moléculaire

1.2.1. Technique d'isolement de l'ADN plasmidique

1.2.1.1. Miniprep

La trousse de purification d'ADN de plasmide "QIAprep Miniprep" (QIAGEN) a permis de purifier des petites quantités d'ADN plasmidique.

À l'aide de cure-dents stériles les colonies bactériennesensemencées sur du milieu solide furent transférées dans des tubes "Falcon" stériles de 10 ml contenant 5 ml de milieu 2xYT + Ampicilline (100 mg/l de concentration finale) et incubés à 37°C toute la nuit avec agitation.

Chaque culture fut transférée par étape successive dans un microtube (tube "Eppendorf") stérile de 1,5 ml et centrifugée pendant 3 minutes à vitesse maximale à chaque transfert. L'ADN des culots fut extrait avec la trousse de purification d'ADN de plasmide tel qu'indiqué par le manufacturier.

1.2.1.2. Maxiprep

La trousse de purification d'ADN de plasmide " QIAprep Maxiprep " (QIAGEN) conçue pour l'extraction des grandes quantités d'ADN a servi à extraire l'ADN plasmidique de la souche du départ et des recombinants.

La (es) colonie(s) bactérienne(s)ensemencée(s) fut (furent) transférée (es) à l'aide de cure-dents dans des tubes "Falcon" stériles de 10 ml contenant 5 ml de milieu 2xYT+ampicilline (100 mg/l) et les tubes furent incubés à 37°C toute la nuit avec agitation. Puis, 100 µl de la suspension bactérienne furent transférés dans des fioles stériles de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture 2xYT avec ampicilline (100 mg/l) et les fioles furent incubées à 37°C toute la nuit avec agitation (250 rpm).

Chaque culture fut transférée dans un tube stérile à centrifugation et centrifugée pendant 5 minutes à vitesse maximale. L'ADN des culots fut extrait avec la trousse de purification d'ADN de plasmide tel qu'indiqué par le manufacturier.

1.2.2. Détermination de la pureté de l'ADN

La concentration ainsi que la pureté de l'ADN ont été déterminées par absorbance à 260 nm et à 280 nm dans le spectrophotomètre Beckman DU 640. La concentration d'ADN fut calculée en tenant compte qu'une densité optique à 260 nm de 1 équivalait à 50 µg/ml d'ADN double brin. Le ratio des densités optiques 260 nm sur 280 nm permettait d'évaluer la pureté de l'ADN. Un ratio entre 1,8 et 2,0 indiquait que la préparation d'ADN était relativement pure.

1.2.3. Analyse de l'ADN

Les produits d'élution obtenus par les techniques d'isolement d'ADN plasmidique furent analysés avec les enzymes de restriction.

La digestion de l'ADN par les enzymes de restriction a été réalisée dans un volume final de 10 µl pour une unité d'enzyme de restriction par µg d'ADN dans les conditions de tampon et de température suggérées pour chaque enzyme (*Not* I et *EcoR* I) par la compagnie biolabs. La digestion a été réalisée à 37°C pendant 1 heure.

1.2.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments de l'ADN digéré ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%

dans du tampon TAE 1 X (0,04 M Tris-acétate pH 8,0 et 0,001 M EDTA). L'agarose fut solubilisé par chauffage au micro-onde et, après un léger refroidissement, 0,5 µg/ml d'une solution contenant du bromure d'éthidium, 20 µg/ml, et 1,0 mM MgCl₂ fut ajouté pour la coloration du gel. Le gel d'agarose fut solidifié à température de la pièce pendant 15 minutes environ.

Les échantillons d'ADN à analyser provenant de 10 µl de produits de digestion contenant 1 µg d'ADN furent déposés sur le gel après addition de 2 µl de solution "6 X Tracking Dye" contenant 0,25% de Bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol FF et 30% de glycérol dans l'eau. Un marqueur de poids moléculaires "1 kb Ladder" a été aussi déposé dans un puits distinct pour estimer la taille des bandes. La migration a été réalisée dans du tampon d'électrophorèse TAE 1 X à l'aide du système d'électrophorèse à gel horizontal de Bio-Rad. La migration fut réalisée sous une tension de 100 volts pendant une heure. Le gel d'agarose a été alors exposé sous une lampe ultraviolette pour la détection des bandes d'ADN et ensuite une photo du gel a été prise avec un appareil Polaroid.

1.2.5. Récupération de la bande d'ADN

Les fragments d'ADN utilisés pour la recombinaison par "DNA shuffling" ont été excisés après digestion avec les enzymes de restriction. L'ADN digéré a été d'abord séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose "Low melting" de 2%, puis les bandes présentant le

fragment d'intérêt ont été extraites du gel à l'aide d'une lame de rasoir et transférées dans des microtubes (tubes "Eppendorf") stériles de 1,5 ml préalablement pesés.

L'extraction et la purification de l'ADN furent réalisées avec les solutions et selon les recommandations du protocole fourni avec la trousse d'extraction QIAEX II (QIAGEN).

1.2.6. Mutagenèse dirigée

1.2.6.1. Purification des oligonucléotides

La colonne SEP-Pak (Waters) a permis de purifier les oligonucléotides utilisés pour les deux approches d'évolution moléculaire (mutagenèse dirigée et "DNA shuffling").

Les oligonucléotides de mutagenèse dirigée, à savoir, **41NNB14** de 41 bases (5' -GAC TGT GAC CCA GGT TTG NNB GAC GCT GTT GCT ATT CTG CT- 3'), **44NNB39** de 44 bases (5' -ATT ACT ACT GTT GTT GGT NNB CAA ACT TTG GCT AAG GTT ACT AG- 3') ainsi que l'amorce de sélection **RVSAC** avec 33 bases (5' -CGC GTT GGT GCG GAG CTC TCG GTA GTG GGA TAC - 3') servant à créer un site de restriction pour *EcoR* V, ont été purifiés suivant la procédure suivante : à l'aide d'une seringue, 5 ml de méthanol ont été transférés aux colonnes pour faire un premier lavage de colonne puis 10 ml d'eau Zénopure stérile ont été ajoutés pour éliminer toute trace de méthanol dans la colonne. Après avoir transféré une quantité voulue d'oligonucléotides à chaque colonne, 10 ml d'eau Zénopure ont été ajoutés pour laver les oligonucléotides fixés dans la colonne. La

récupération des oligonucléotides a été faite avec 150 μ l de solution d'éluion (un mélange de 1 ml de méthanol et de 1 ml d'eau stérile). Les aliquotes récupérées ont été évaporées au "Speed-Vac" et resuspendues dans 50 μ l d'eau stérile.

1.2.6.2. Phosphorylation des oligonucléotides

Les oligonucléotides de mutagénèse dirigée (1 μ g) contenant la mutation désirée ont été phosphorylés dans 2 μ l de tampon T4 kinase 10 X (500 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT et 10 mM ATP), 1 μ l de 10 unités/ μ l de T4 polynucléotide kinase, dans un volume final de 20 μ l. Après avoir bien mélangé, les réactions ont été incubées à 37°C pendant 1 heure, puis les réactions furent arrêtées en chauffant à 65°C pendant 15 minutes. Finalement, 2 μ l de chaque mélange réactionnel ont été utilisés pour les réactions de mutagénèse et le reste des oligonucléotides phosphorylés a été placé à -20°C .

1.2.6.3. Procédure de mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée a été réalisée avec les solutions et selon le protocole fourni avec la trousse de Clontech "TransformerTM Site-Directed Mutagenesis kit (2nd version) " et a servi à créer une banque de mutants ponctuels.

1.2.7. Procédure de la technique "DNA shuffling"

1.2.7.1. Préparation des gènes

Le "DNA shuffling" selon la figure 2 a été réalisé tel que décrit par Minagawa et Kaneko (2000), Abécassis et Trian (2000), Whang et al. (2000), Zhao et Arnold (1997a), Lorimer et Pastan (1995) et Stemmer (1994a), après des modifications mineures.

Environ 10 µg du plasmide contenant le gène synthétique pour la IU-NH ont été digérés à 37°C avec les enzymes de restriction *EcoR* I et *Not* I pendant une (1) heure. Les fragments d'ADN de taille ~1 kb ont été purifiés dans un gel d'agarose "Low Melting" à 2% en utilisant le kit d'extraction de gel QIAEX II (QIAGEN Inc.). Les fragments d'ADN ont été élués dans du tampon EB [10 mM Tris-HCl (pH 8,5)] suivant les indications de QIAGEN. Les concentrations en ADN ont été estimées soit par électrophorèse (en comparant l'intensité de la bande avec celle du marqueur) soit par spectrophotométrie tel qu'indiqué dans la section 1.2.2.

Les fragments d'ADN de taille ~1 kb ont été amplifiés par PCR avec les amorces purifiées. **MBV1** ("amorce forward" 5'- GAT CCC CGA ATT CAC GTG GCC CAG CCG GCC AAA TG -3') et **MBV2** ("amorce reverse" 5'- TCA CGA TGC GGC CGC TTG TGG GTC ACC AAT TCT TTC -3') furent les oligonucléotides utilisés pour cette partie du projet et furent purifiés avec la colonne SEP-Pak (Waters) tel que décrit précédemment dans la section 1.2.6.1 pour la purification des oligonucléotides.

L'amplification a été faite dans le but d'augmenter la quantité d'ADN qui sera utilisée pour l'étape suivante. Le mélange réactionnel fut préparé dans des microtubes (tubes "Eppendorf") stériles compatibles avec l'appareil PCR, dans un volume de 50 µl contenant : 30 pmoles de chaque amorce MBV1 et MBV2, puis du tampon *Taq* 1 X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP et 1 µl d'ADN polymérase *Taq* 2,5 U. Le tout a été bien mélangé. Le programme de PCR utilisé fut le suivant : 2 minutes à 96°C ; 30 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C, 4 minutes à 72°C, et le programme de PCR se terminait par une incubation à 72°C pendant 7 minutes. Un échantillon de 3 µl de l'ADN amplifié fut d'abord vérifié sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN amplifié par PCR a été ensuite purifié avec les solutions et selon les recommandations du protocole fourni avec la trousse de purification QIAquick (QIAGEN). Une autre vérification sur 3 µl de l'ADN amplifié purifié fut faite sur gel d'agarose 1,5%, pour vérifier l'efficacité de récupération de la trousse commerciale.

1.2.7.2. Digestion à la DNase I en présence de Mn²⁺

Le mélange réactionnel a été dilué dans 45 µl de Tampon EB [10 mM Tris-HCl (pH 8,5)] et 5 µl de tampon de digestion 10 X [500 mM Tris-HCl (pH 8,5) et 100 mM MnCl₂] furent alors ajoutés. Ce mélange a été équilibré à 15°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur avant d'ajouter 0,030 U de DNase I (1 U/µl ; Boehringer Mannheim). La digestion a été faite à 15°C et terminée après une minute en chauffant à 90°C pendant 10 minutes.

Les fragments attendus de 50-100 bp furent confirmés sur gel "Low melting" à 2% contenant du bromure d'éthidium (20 µg/ml) et furent ensuite excisés tel qu'indiqué dans la section 1.3.5 puis purifiés en utilisant la trousse d'extraction QIAEX II (QIAGEN). Un échantillon de 5 µl a été prélevé pour vérification du résultat de purification des fragments sur gel d'agarose 1,5%.

1.2.7.3. Réassemblage des fragments sans amorces

Dix (10) µl des fragments purifiés avec la trousse QIAEX II furent combinés avec 5 µl de tampon *Pfu* 10 X contenant 0,4 mM de chaque dNTP (Pharmacia) et 0,05 U/µl de l'ADN polymérase *Pfu* clonée. Pour la deuxième ronde de "DNA shuffling", on a utilisé de l'ADN polymérase *Taq* à 0,05 U/µl. La réaction PCR fut faite selon le programme suivant : 3 minutes à 96°C, suivi de 40 cycles de 1 minute à 94°C, de 1 minute à 55°C, et de 1 minute à 72°C, se terminant par 7 minutes à 72°C après le cycle final. Un échantillon de 5 µl fut prélevé pour vérifier le résultat de cette étape sur gel d'agarose 1,5%.

1.2.7.4. Amplification par PCR des produits réassemblés

L'amplification des produits réassemblés a été faite en diluant les produits de la PCR de l'étape précédente d'un facteur 35. Le mélange réactionnel fut préparé avec 30 pmoles de chaque amorce purifié, MBV1 et MBV2, puis du tampon *Taq* 1 X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP et 2,5 U du mélange d'ADN polymérase *Taq/Pfu* (1:1). La réaction PCR fut

faite selon le programme suivant : 2 minutes à 96°C ; 30 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C, 4 minutes à 72°C, et finalement, 7 minutes à 72°C. Un échantillon de 5 µl fut prélevé pour vérifier sur gel d'agarose 1,5% si le programme nous a donné une bande unique de la taille correcte.

1.2.8. Clonage des produits de PCR du "DNA shuffling"

1.2.8.1. Ligation

Les produits de la PCR ou le gène obtenu par la méthode précédente, tel qu'indiqué à la section 1.2.7.4, furent sous-clonés dans le vecteur d'expression pGEX 4T3 selon la méthode de ligation décrite ci-bas.

Pour ce faire, les produits de la PCR et le plasmide pGEX 4T3 ont été digérés séparément avec les deux enzymes de restriction *EcoR* I et *Not* I et les produits furent purifiés en utilisant la trousse de purification QIAquick (QIAGEN). Avant la purification, les produits réactionnels furent d'abord chauffés à 65°C pendant 20 minutes pour désactiver les enzymes de restriction.

La ligation entre les sites de restriction *EcoR* I/*Not* I du vecteur d'expression des produits de PCR purifiés ou des gènes reconstitués en entier obtenus par la méthode précédente fut réalisée dans un volume de 20 µl contenant 100 ng d'ADN, 2 µl de tampon de T4 ADN

ligase 10 X et 2 μ l d'ATP 10 mM et 1 μ l de T4 ADN ligase (NEB 400 U/ μ l). Tout le mélange a été incubé à 16°C pendant 18 heures.

1.2.8.2. Transformation d'*Escherichia coli*

Les produits de ligation ont été transformés dans les cellules compétentes *Escherichia coli* (BL21) (conservées à -80°C) avec un électroporateur "Bio Rad" : lors des expériences, les cellules compétentes et les cuvettes stériles compatibles à la transformation par électroporation ont été gardées sur glace. Un (1) μ l du produit de ligation et 40 μ l de cellules compétentes ont été déposés dans le fond de la cuvette compatible pour la transformation. Après transformation, 1 ml de milieu de culture 2xYT fût ajouté dans la cuvette et le contenu a été transféré dans un tube "Falcon" stérile de 10 ml, puis incubé à 37°C sous agitation pendant une heure. Après incubation, des volumes de 20, 50 et 100 μ l de la suspension bactérienne transformée ont été étalés sur des boîtes de pétri contenant du milieu solide 2xYT avec ampicilline (100 mg/l). Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C toute la nuit. Les colonies ont été à nouveau repiquées sur d'autres géloses du même milieu pour caractérisation ultérieure et conservées à 4°C. Le reste des cellules transformées a été conservé à -20°C pour un usage ultérieur si nécessaire.

1.3. Criblage et sélection des protéines recombinantes

Le test d'activité enzymatique effectué avec les 100–200 transformants obtenus après chaque ronde d'évolution moléculaire dirigée fut effectué à température ambiante en utilisant les deux substrats, le *p*-nitrophényl riboside (pNPR) et le *p*-nitrophényl désoxyribose (pNPD), chacun à 300 μ M, dans du tampon HEPES (50 mM, pH 8,0). Le test d'activité de l'inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) avec le substrat *p*-nitrophényl riboside (pNPR) était basé sur un changement de coloration vers le jaune et quantifié au spectrophotomètre à 400 nm de longueur d'onde.

Les transformants isolés sur milieu solide ont été utilisés pour le test de criblage. À l'aide de cure-dents stériles, les colonies de transformants ont été transférées dans des plaques de 24 puits contenant 2 ml de milieu 2xYT avec ampicilline (100 mg/l), puis les plaques ont été incubées toute la nuit à 37°C avec un taux d'agitation de 125 rpm. Par la suite, 40 μ l de la suspension bactérienne de chaque puits de la plaque ont été transférés dans un puits d'une autre plaque de 24 puits contenant du milieu 2xYT avec ampicilline (100 mg/l) pour un volume final de 2,5 ml. Les plaques ont été incubées à 37°C avec agitation jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm des cellules soit entre 0,2-0,4 (en phase exponentielle), avant induction des cultures avec 1,0 mM d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) pour 24 heures à 37°C à 125 rpm.

Quarante (40) μl de chaque suspension cellulaire induite après une durée donnée d'induction ont été transférés dans des plaques de 96 puits en quartz contenant diverses concentrations de diméthylformamide (DMF) (10, 30, 40 ou 50% v/v) tout en utilisant le tampon HEPES (50 mM, pH 8,0) pour compléter le volume final à 300 μl . Après 5 minutes d'incubation avec agitation pour permettre la lyse cellulaire, on a ajouté, à proximité du spectrophotomètre à plaques, 300 μM de concentration finale de substrat [*p*-nitrophényl riboside (pNPR) ou *p*-nitrophényl désoxyriboside (pNPD)]. L'hydrolyse du substrat a été suivie en mesurant la production du *p*-nitrophénylate au spectrophotomètre à plaque "SpectraMax" (Molecular Devices) à 400 nm pendant 5 minutes. Le logiciel de lecture des plaques de 96 puits employé était le "SOFTmax PRO".

Pour mesurer l'activité dans un milieu aqueux (milieu sans DMF) des cellules induites, les cellules ont été lysées pendant 5 minutes avec 1% (v/v) de toluène, puis analysées de la même manière que les cellules dans un milieu non aqueux (dans le diméthylformamide). L'activité avec et sans diméthylformamide (DMF) était lue en unité mDO/min. Les facteurs de conversion d'unités mDO/min en unités $\mu\text{M}/\text{min}$ en fonction de la concentration de DMF se retrouvent dans le tableau I.

Les vitesses de réaction mesurées à 400 nm sur une période de 5 minutes ont été divisées par la densité optique à 600 nm de la suspension cellulaire correspondante après induction, afin de tenir compte en variation de concentration en fonction du temps ($\mu\text{M}/\text{min}$) rapporté à une densité optique de 1 avant induction dans la plaque à 24 puits.

Pour confirmer le résultat du test d'activité enzymatique des mutants sélectionnés avec les plaques de 96 puits, un recriblage a été effectué comme suit. Les colonies sélectionnées présentant une meilleure activité ont été transférées dans des tubes stériles de 10 ml contenant 5 ml de milieu de culture 2xYT avec ampicilline (100 mg/l) puis les tubes furent incubés toute la nuit à 37°C avec un taux d'agitation de 250 rpm. Par la suite, un (1) ml de chacune des suspensions bactériennes a été transféré dans une autre fiole "Erlenmeyer" stérile de 250 ml contenant du milieu 2xYT avec 100 mg/l d'ampicilline pour un volume final de 50 ml. Les fioles "Erlenmeyer" ont été incubées à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm des cellules soit entre 0,4-0,6 avant induction. Les cellules ont été induites avec 1,0 mM d'IPTG pour 24 heures à 37°C avec agitation. L'activité enzymatique a été mesurée à 400 nm dans des cuvettes en quartz pendant 3 minutes comme suit. Pour la lecture d'activité enzymatique sans DMF, la suspension bactérienne induite a été lysée pendant 5 minutes avec du toluène ; par contre, pour la lecture d'activité en milieu non-aqueux, 40 µl de la suspension bactérienne induite ont été directement transférés dans les cuvettes en quartz contenant diverses concentrations de diméthylformamide (DMF) (10, 30, 40 et 50% v/v) en utilisant du tampon HEPES 50 mM (pH 8,0) pour compléter le volume final à 3 ml. Après 5 minutes d'incubation pour favoriser la lyse cellulaire par le diméthylformamide (DMF), on ajoutait le substrat [*p*-nitrophényl riboside (pNPR) ou *p*-nitrophényl désoxyriboside (pNPD)] permettant d'initier ainsi la réaction.

Cette technique de criblage de la banque des mutants a été utilisée pour tous les transformants obtenus par évolution moléculaire dirigée (les quelques 250 transformants obtenus par

Tableau 1. Coefficients de conversion entre les unités d’extinction mDO en μM déterminés expérimentalement en fonction de la concentration de diméthylformamide (DMF) présent

	Sans DMF	10 % DMF	30% DMF	40% DMF
1 mDO égale :	0,0595 μM	0,0598 μM	0,0649 μM	0,0649 μM

mutagénèse dirigée et les 100 à 300 transformants suite aux rondes d'évolution dirigée par "DNA shuffling").

1.4. Réaction de séquençage

Les oligonucléotides de séquençage, soit l'amorce **MBpl1** de 20 bases ("amorce forward" 5'-ACC ATC CTC CAA AAT CGG AT-3') et l'amorce **MBpl2** de 20 bases ("amorce reverse" 5'-TCA CCG AAA CGC GCG AGG CA-3'), ont été purifiés avec la colonne SEP-Pak (Waters) tel qu'indiqué précédemment dans la section 1.2.6.1. La technique de purification des plasmides a été réalisée comme indiquée précédemment dans la section 1.2.1.1.

Les mutations obtenues ont été vérifiées suivant le protocole de séquençage décrit par la compagnie PE Applied Biosystems pour son produit "ABI PRISMTM Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit". La réaction PCR fut faite selon le programme suivant: 2 minutes à 96°C, suivi de 25 cycles de 10 minutes à 96°C, de 5 minutes à 50°C, et de 4 minutes à 60°C, se terminant à 4°C après le cycle final. La purification des produits de la réaction de séquençage a été faite avec une colonne Centri-sep (Princeton Separations Inc.) tel qu'indiqué par le manufacturier.

1.5. Analyse informatique des mutations

Les mutations produites ont été vérifiées par analyse informatique avec le logiciel développé

par Staden (1996).

1.6. Cinétique des enzymes mutées en présence du diméthylformamide (DMF)

La cinétique des enzymes mutées a été déterminée en mesurant la production du *p*-nitrophénylate en fonction de la concentration du substrat *p*-nitrophényl riboside (pNPR) variant de 10 à 510 μM .

Les vitesses initiales de réaction ont été déterminées en mesurant l'augmentation de la densité optique à 400 nm sur une période de 5 minutes. Les vitesses mesurées ont été divisées par la densité optique à 600 nm de la suspension cellulaire correspondante après induction, afin de tenir compte en variation de concentration en fonction du temps ($\mu\text{M}/\text{min}$) rapporté à une densité optique de 1 avant induction dans la plaque à 24 puits. Les vitesses initiales ont été déterminées par régression linéaire de même que l'erreur sur leur valeur.

Des colonies de la souche non mutée et des colonies des transformants ont été transférées dans des tubes stériles de 10 ml contenant 5 ml de milieu 2xYT avec 100 mg/l d'ampicilline à l'aide de cure-dents et les tubes ont été incubés toute la nuit à 37°C avec un taux d'agitation de 250 rpm. Cent (100) μl de la suspension bactérienne de chaque tube furent transférés dans une fiole "Erlenmeyer" stérile de 250 ml contenant du milieu de culture 2xYT avec 100 mg/l d'ampicilline pour un volume final de 50 ml. Les fioles ont été incubées à 37°C avec un taux

d'agitation de 250 rpm jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit entre 0,4 et 0,6 avant induction avec 1mM d'IPTG.

L'activité enzymatique a été mesurée à 400 nm dans une plaque à 96 puits en quartz pendant 5 minutes au spectrophotomètre tel qu'indiqué dans la section 1.3, "Criblage et sélection des protéines recombinantes". Pour ce faire, quarante (40) µl de la suspension bactérienne préalablement lysée pendant 5 minutes avec 1% (v/v) de toluène furent transférés dans une plaque à 96 puits en quartz contenant le substrat *p*-nitrophényl riboside (pNPR) à une concentration allant de 10 à 510 µM et diverses concentrations de diméthylformamide (DMF) (0, 10, 30 et 40%). Le tout fut complété à 300 µl avec du tampon HEPES (50 mM, pH 8,0).

1.7. Expression des gènes

1.7.1. Préparation des échantillons

Les clones portant le gène de l'inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH) ont été transférés dans des tubes stériles de 10 ml contenant du milieu 2xYT+ampicilline (100 mg/l) et incubés sous agitation à 37°C toute la nuit. Puis 100 µl de cette suspension furent transférés dans des fioles "Erlenmeyer" de 250 ml contenant 50 ml du milieu 2xYT et 100 mg/l d'ampicilline. Les cultures ont été incubées à 37°C avec agitation (250 rpm) et l'induction à l'IPTG (1,0 mM) fut faite en phase de croissance logarithmique à une densité

optique de 0,6-0,8 à 600 nm. L'échantillonnage fut fait selon le temps d'induction désiré (entre 5 et 25 heures) et pouvait varier selon les expériences.

1.7.2. Lyse cellulaire

Pour extraire la protéine d'intérêt, on a utilisé différentes approches de lyse cellulaire comme la sonication, la presse de French, les billes de verre ou encore la perméabilisation avec le toluène à 1% (v/v).

Comme il a été mentionné à la section précédente, la suspension bactérienne a été récoltée après induction selon le temps d'induction désiré à 37°C. La procédure utilisée pour la lyse cellulaire (sonication ou "presse de French") est celle qui a été décrite par Gopaul et al. (1996) avec quelques modifications.

Vingt (20) ml de la suspension bactérienne ont été transférés dans un tube à centrifugation puis centrifugés à 15 000 rpm à 4°C pendant 30 minutes. Le culot a été resuspendu dans du tampon "TDEP" contenant 20 mM Tris-HCl, (pH 7,4), 1 mM DTT, 1 mM EDTA et 15 µM PMSF. La lyse cellulaire a été effectuée avec 6 cycles de 30 secondes de sonication avec une minute entre chaque cycle, dans de la glace.

Pour la lyse cellulaire avec la "presse de French", le culot des 20 ml d'échantillon centrifugés a été resuspendu dans le même tampon auquel on a ajouté du lysozyme à une concentration

finale de 0,5 mg/ml et du Triton X-100 à une concentration finale de 1%. La lyse cellulaire a été effectuée avec 7 cycles de 30 secondes à une pression de 1000 psi avec une minute entre chaque cycle, dans de la glace.

Quant à la technique de lyse cellulaire avec les microbilles de verre, vingt (20) ml d'échantillon ont été centrifugés à 4000 rpm à 4°C pendant 15 minutes. Le culot fut resuspendu dans du tampon "TDEP" puis la suspension a été soumise à trois (3) cycles de 1,5 minutes de lyse avec une minute de repos entre chaque cycle dans de la glace.

Pour les trois techniques de lyse cellulaire, une vérification par examen microscopique a été nécessaire pour évaluer le succès de la lyse cellulaire. Les préparations furent de nouveau centrifugées à 4°C afin de récupérer les surnageants (15 000 rpm pendant 30 minutes après le traitement par sonication et "presse de French" et 4000 rpm pendant 15 minutes après traitement aux microbilles de verre). Les surnageants récupérés furent utilisés pour différentes analyses protéiques ou conservés à -20°C pour des analyses ultérieures.

Une autre approche utilisée fut la perméabilisation de la membrane bactérienne au toluène (concentration finale 1%, v/v) pendant 5 minutes.

1.7.3. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant ("SDS-PAGE")

L'analyse des protéines a été réalisée sur gel de polyacrylamide à gradient de concentration

10-20% dans du Tris-HCl (Bio Rad). Pour l'analyse des protéines totales, on a resuspendu le culot des échantillons de 1 ml de culture centrifugée à 13000 rpm (17 949 xg) à 4°C pendant 10 minutes dans 200 µl de tampon SB ("sample buffer") préalablement chauffé pendant 2-10 minutes à 40°C. Le tampon SB est préparé de la façon suivante : 2,00 ml de glycérol 100%, 2,00 ml de SDS 10%, 2,5 ml de 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2,5 ml de Bleu de bromophénol (1%) et 40 µl de 2-β-mercaptoéthanol, le volume étant complété à 20 ml avec de l'eau Zénopure. Les échantillons ont été dénaturés par ébullition dans un bain-marie pendant 10 minutes, puis centrifugés pendant 5 minutes à 13000 rpm (17 949 xg) à la température de la pièce. Vingt (20) µl d'échantillons dénaturés ont été chargés sur le gel à l'aide d'une seringue Hamilton.

Par contre, pour l'analyse de la protéine d'intérêt, vingt (20) µl du surnageant des échantillons lysés par les techniques mécaniques (sonication, "presse de French" ou microbilles de verre), ou encore perméabilisés avec 1% (v/v) de toluène pendant 5 minutes, ont été mélangés avec 10 µl de tampon SB puis l'échantillon fut dénaturé par ébullition dans un bain-marie pendant 5 minutes. Les échantillons ont été centrifugés pendant une minute à 13000 rpm (17 949 xg) à température de la pièce. Dix (10) µl d'échantillons ont été chargés sur le gel tel que décrit pour les protéines totales.

Un standard de masse moléculaire de protéines a été chargé sur le gel. La migration a été réalisée avec le tampon d'électrophorèse RB 1 X ("Running Buffer"). Le tampon RB 1 X ("Running Buffer") fut préparé de la façon suivante: 3,00 g "Tris base", 14,4 g de glycine et

1,00 g de SDS dans 1000 ml d'eau Zénopure. L'électrophorèse a été faite pendant une heure environ ; pour les premières 15 minutes, la migration était faite avec une différence de potentiel de 70 volts puis de 140 volts pour le reste du temps.

1.7.4. Coloration, décoloration et conservation

Afin de visionner les bandes de protéines séparées après électrophorèse, les gels furent colorés au Bleu de Coomassie. Le gel de polyacrylamide fut d'abord incubé pendant 20 minutes avec agitation dans la solution colorante (composé de 1 g de Bleu de Coomassie R-250 dans 40% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial). Puis, le gel fut ensuite lavé trois (3) fois avec une solution de décoloration contenant 30% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial. Les deux premiers lavages de décoloration avaient une durée de 30 minutes. Le dernier lavage durait toute la nuit avec agitation. Le gel était finalement saturé dans une solution de conservation (1,0% de glycérol et 10% d'acide acétique glacial) puis placé entre deux feuilles de cellophane préalablement trempées dans la même solution de conservation. Le séchage du gel s'effectuait sous vide sur un cadre de séchage.

1.7.5. Dosage de protéines

La concentration des protéines a été déterminée selon la méthode courante de Bradford (1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) dissoute dans 50 mM HEPES, (pH 8,0) comme standard. Le réactif de Bradford utilisé pour doser la protéine d'intérêt fut celui de la

trousse commerciale "Bio-Rad Protein Assay". L'absorbance fut mesurée à 595 nm tel qu'indiqué par le fabricant en utilisant des volumes de 20 μ l des divers échantillons.

2. RÉSULTATS

2.1. Caractérisation du gène de départ et étude de la protéine correspondante

La première partie de ce projet consistait à vérifier l'expression du gène synthétique et à vérifier si l'insert était bien placé sur le vecteur d'expression *pGEX 4T3-IUNH*. Le gène synthétique d'environ 1 kb codant pour l'IU-NH a été cloné dans le plasmide *pGEX-4T3* et exprimé dans *Escherichia coli* (BL21). Le gène IU-NH a été placé en aval du gène de fusion GST. Sur le gène de fusion et en amont du gène IU-NH, on avait la présence d'un site de clivage par la thrombine, ce qui permettra de récupérer la protéine d'intérêt; le vecteur d'expression confère en plus une résistance à l'ampicilline (Figure 4). La présence du promoteur *tac* induit par l'IPTG va permettre d'induire la production de la protéine. La figure 4 illustre la position du gène synthétique dans le vecteur *pGEX 4T3* entre les sites de restriction *EcoR I* et *Not I*. La première rangée "gène de départ" de la figure 23 illustre la séquence originale de la protéine produite par le gène synthétique.

Le plasmide a été d'abord extrait par mini-préparation à l'aide de la trousse QIAprep Miniprep de QIAGEN comme indiqué dans la section 1.2.1.1. Par la suite, la construction du vecteur *pGEX 4T3-IU-NH* a été vérifiée par digestion avec les enzymes de restriction *EcoR I* et *Not I*, suivie d'une migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% afin de vérifier la présence de l'insert (Figure 5). La bande attendue de 1 kb environ était effectivement présente.

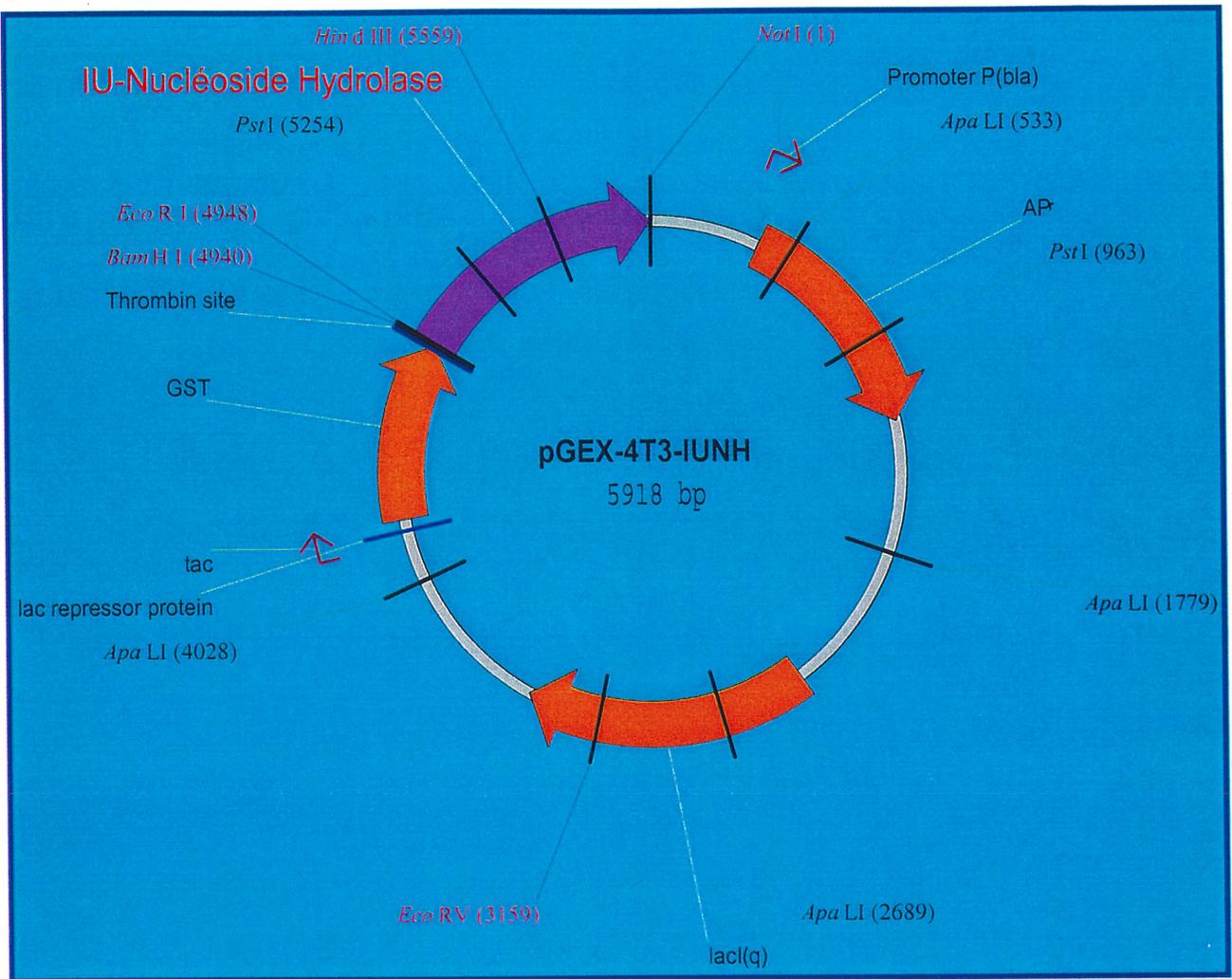


Figure 4. Structure du plasmide pGEX 4T3 permettant l'expression du gène inosine uridine nucléoside hydrolase dans *Escherichia coli* (BL21) avec le gène de structure de la glutathion-S-transferase (GST) placé en amont de l'insert. L'introduction du gène codant s'est faite entre les sites *Eco*R I et *Not* I.

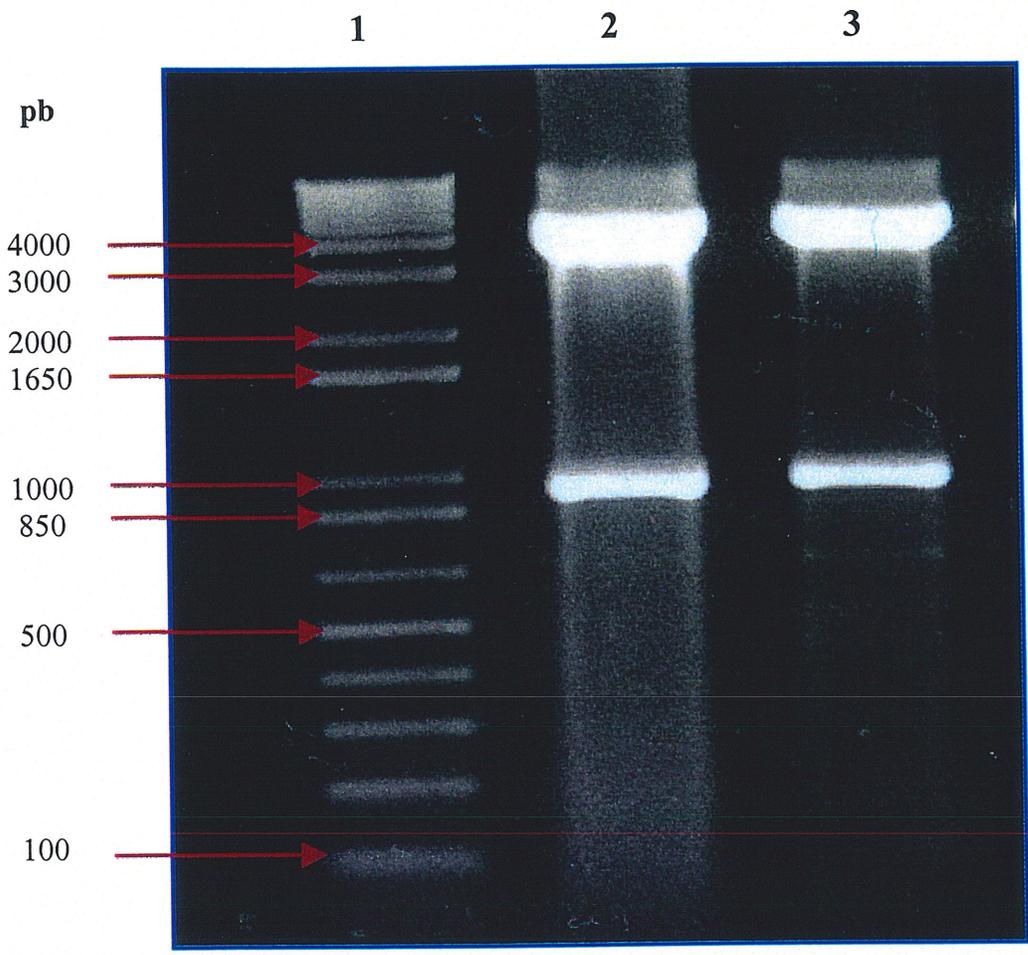


Figure 5. Analyse du plasmide *pGEX 4T3-IU-NH* par digestion avec les enzymes de restriction *EcoR* I et *Not* I suivie d'une migration en gel d'agarose 1,5%. Le gène de l'inosine uridine nucléoside hydrolase donne une bande à 985 pb, et celle du vecteur *pGEX 4T3* à 4933 pb. Le puits 1 indique le poids moléculaire du marqueur de 1 kb Plus "DNA Ladder" de GIBCO BRB. Les puits 2 et 3 contiennent l'ADN plasmidique digéré avec les enzymes *EcoR* I et *Not* I.

2.1.1. Étude de la protéine IU-NH et mise au point d'un système de lyse cellulaire

Comme il a été mentionné à la section 1.7.1, les cultures incubées à 37°C pendant 24 heures ont été récoltées après diverses durées de l'induction. Le système de production *pGEX 4T3* donne des protéines intracellulaires, protéines qu'il faut ensuite libérer par lyse cellulaire avant de pouvoir tester leur activité biologique.

Plusieurs essais de procédés mécaniques ont été effectués pour l'extraction de la protéine IU-NH dans sa forme native. Parmi les procédés mécaniques cités à la section 1.7.2, la lyse cellulaire avec le sonicateur (6 cycles de 30 secondes et une minute entre chaque cycle, dans de la glace), la lyse cellulaire avec la "presse de French" (7 cycles de 30 secondes avec une minute entre chaque cycle, dans de la glace) et les microbilles de verre (avec 3 cycles de 1,5 minutes et une minute entre chaque cycle, dans de la glace), ne nous ont pas permis de solubiliser facilement la protéine, probablement dû à son emprisonnement à l'intérieur de particules subcellulaires rendant sa libération difficile. Normalement, ces méthodes devraient rendre les parois cellulaires perméables et libérer l'enzyme de son site de fixation. Ceci laissa croire qu'il y avait formation de corps d'inclusion. La lyse cellulaire a été régulièrement vérifiée par examen au microscope afin de nous assurer de son succès et par gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Toutefois, la perméabilisation avec 1% (v/v) de toluène pendant cinq (5) minutes nous a donné les meilleurs résultats (Figure 6B). La mise au point de cette approche de lyse cellulaire a été réalisée de manière à ce que la protéine d'intérêt ne soit pas dénaturée par le toluène.

Des prélèvements des échantillons selon le temps d'incubation ont été effectués afin d'optimiser l'expression du gène. Suite à l'expression de la protéine, comme il a été mentionné aux sections 1.7.1 et 1.7.2, la protéine d'intérêt a été extraite selon la technique de perméabilisation avec le toluène. Des cellules sans l'insert IU-NH ont servi de témoin et présentaient la bande attendue pour la protéine de fusion GST (Figure 6 A, B et C, puits 2). La bande pour l'IU-NH (Figure 6C, puits 4) sembla être moins importante dans l'extrait cellulaire après lyse par le toluène que dans le cas des autres extraits de protéine totale (Figure 6A et B, puits 4), ce qui pourrait être dû à une solubilisation incomplète de la protéine lors de la lyse cellulaire avec le toluène, ce qui ne serait pas surprenant.

Les cellules d'*Escherichia coli* transformées avec le plasmide pGEX 4T3-IUNH et mises en croissance à 37°C ont accumulé la protéine IU-NH fusionnée. Lors de l'analyse des gels (cellules lysées au toluène et protéines totales), les cellules lysées au toluène ont accumulé la protéine IU-NH à un niveau équivalent à 5 à 10% de la protéine totale. Cette technique de lyse cellulaire par perméabilisation a permis néanmoins de conclure qu'une partie seulement de la protéine était libérée après induction, le reste étant toujours emprisonné dans les particules subcellulaires rendant ainsi difficile la libération de la protéine. Il est intéressant de noter qu'un faible niveau d'expression est visible même pour les cellules avec insert IU-NH non induites (figure 6A, B et C, puits 3).

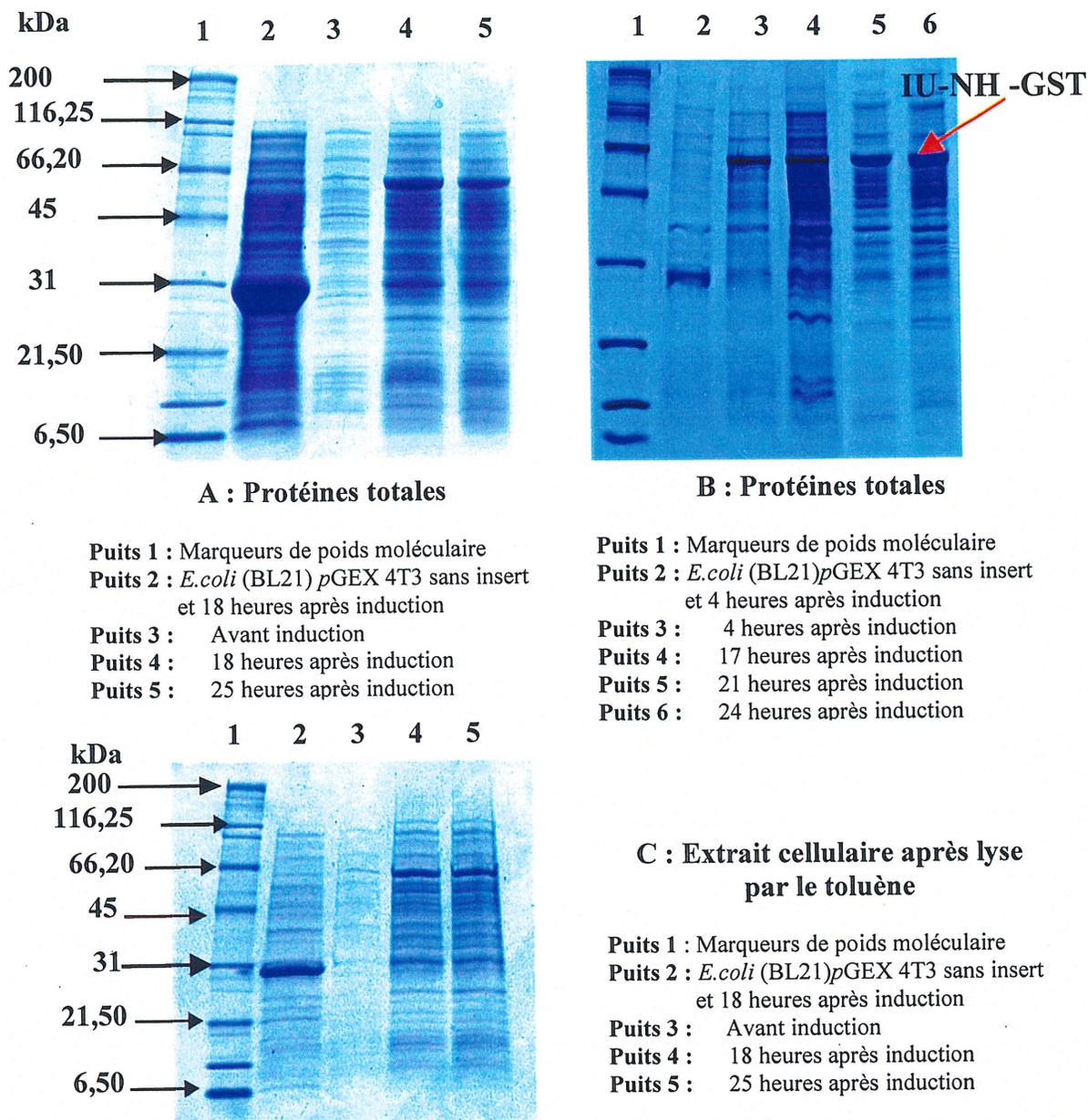


Figure 6. Expression de l'inosine uridine nucléoside hydrolase dans *E. coli* (BL21). **Puits 1 :** marqueurs du poids moléculaire (du haut en bas) : Myosine, 200 000 ; β -galactosidase, 116 250 ; phosphorylase B, 97 400 ; albumine de sérum bovin, 66 200 ; ovalbumine, 45 000 ; anhydrase carbonique, 31 000 ; inhibiteur de trypsine de la fève de soja, 21 500 ; lysozyme, 14 400 et aprotinine du pancréas de bovin, 6 500.

Puits 2 : Extraits cellulaires de la souche de départ *E. coli* (BL21) transformée avec le vecteur d'expression pGEX 4T3 sans l'insert IU-NH.

Puits 3, 4, 5 et 6 : Extraits cellulaires de la souche départ *E. coli* (BL21) pGEX 4T3 contenant la région codante IU-NH après divers temps d'induction. Les échantillons ont été dénaturés dans du dodécyl sulfate de sodium ou encore appelé Lauryl sulfate de sodium (SDS) 10% contenant du 2- β -mercaptoéthanol et soumis à l'électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide avec SDS. Les protéines ont été colorées au Bleu de Coomassie.

2.1.2. Optimisation du temps d'incubation du système d'expression de la protéine IU-NH

Les échantillons ont été prélevés après divers temps d'induction afin d'optimiser l'expression de la protéine IU-NH. Des prélèvements ont été effectués jusqu'à 25 heures à 37°C avec agitation (250 rpm) après induction à l'IPTG (1,0 mM) en phase de croissance logarithmique, une fois que la densité optique avait atteint 0,6-0,8 à 600 nm. Normalement, une incubation plus longue permettait de produire une plus grande quantité de l'IU-NH même si une quantité non négligeable de l'enzyme était obtenue avant même induction. Ainsi, nous avons constaté que l'expression du gène a été rapide dès les premières heures d'induction à 37°C après l'ajout de l'IPTG (figure 6B, puits 3). Après induction, nous pouvons visualiser sur les gels une intensification de la bande correspondant à la protéine d'intérêt. Il a été évident qu'une meilleure expression de la protéine a été obtenue après 18 heures (figure 6A, B, puits 4, 5 et 6). Des prélèvements ont été effectués jusqu'à 25 heures d'incubation, cependant la différence au niveau de la quantité de protéines entre 4 et 24 heures d'expression était significative (figure 6B, puits 3, 4, 5 et 6).

La figure 7 nous permet de donner une estimation de la masse moléculaire de la protéine de fusion IU-NH à partir de la quantité de protéines totales mesurée par le test de Bradford tel qu'indiqué à la section 1.7.5 et de l'intensité de la bande IU-NH du puits 4 ou 5 du gel de protéines totales de la figure 7A. L'analyse par densitométrie des gels de protéines pour les cellules non-lysées ainsi que pour les cellules perméabilisées avec du toluène a permis

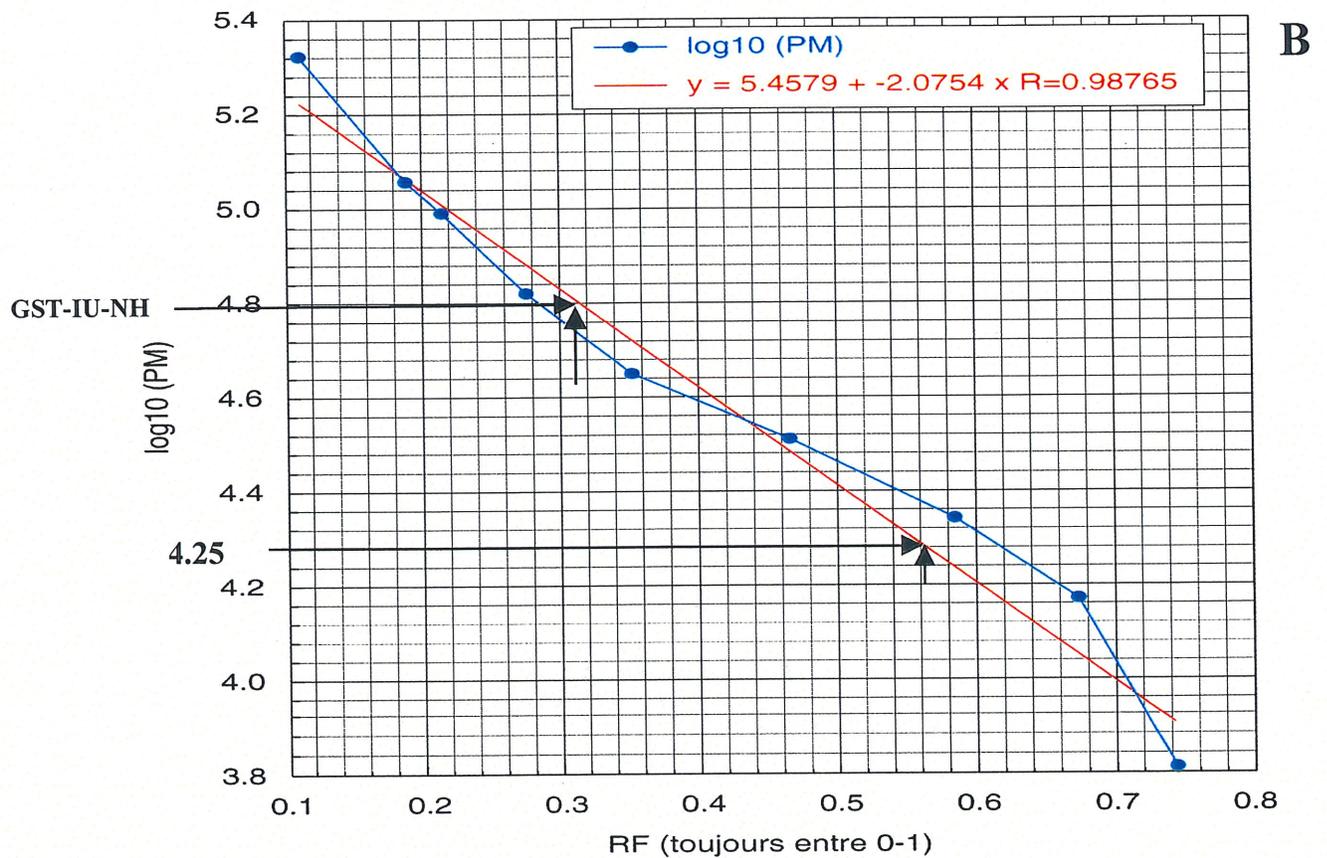
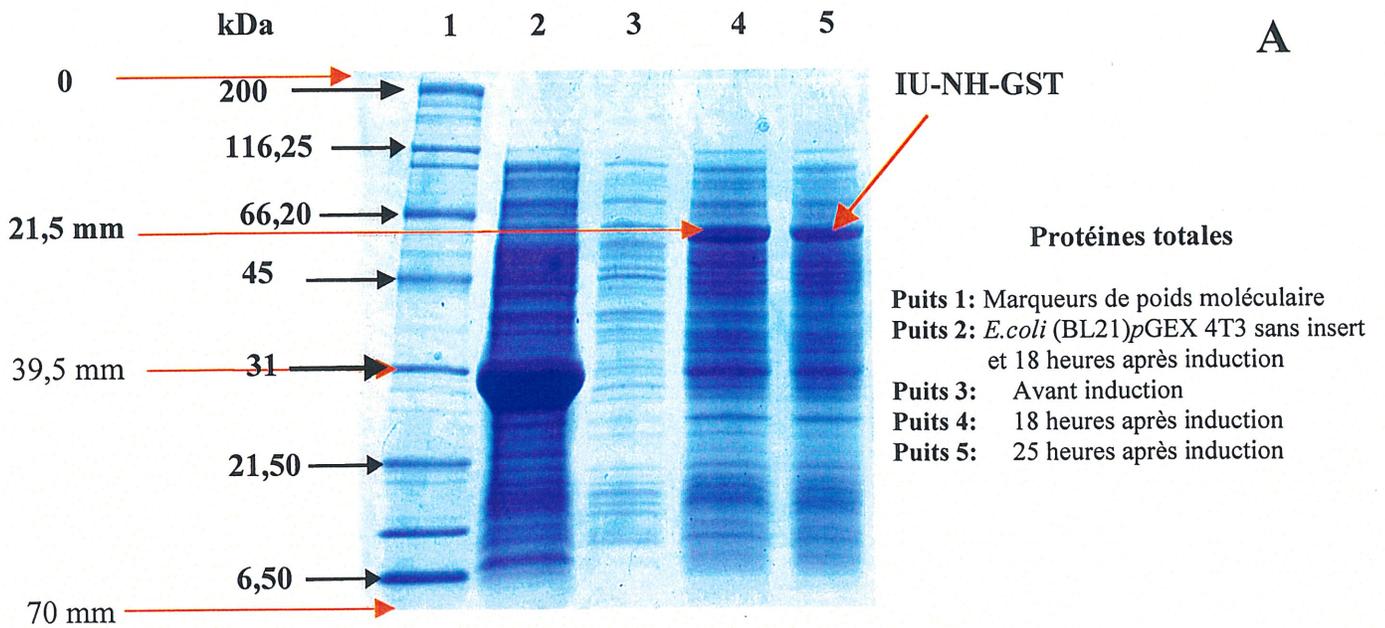


Figure 7. Détermination de la masse moléculaire de la protéine de fusion inosine uridine nucléoside hydrolase avec la GST (IU-NH-GST). RF (mobilité relative) est égale à la distance de migration de la protéine divisée par la distance de migration du Bleu de bromophénol.

d'identifier la durée optimale de l'induction, soit 18 heures (Figure 6C, puits 4 et Figure 7A, puits 4). À ce moment, la protéine IU-NH correspondait à environ 10% des protéines totales. La masse moléculaire théorique de la protéine IU-NH fusionnée avec le gène de fusion (GST) a été estimée à 60 kDa (la masse moléculaire prédite pour la GST présente dans le vecteur pGEX 4T3 est de 26 kDa et celle de l'enzyme IU-NH est de 34 kDa). Les résultats obtenus par analyse "SDS-PAGE" 10-20% en se référant à la figure 7B, ont indiqué un poids moléculaire de 63 kDa. Ce résultat est raisonnablement proche de la masse moléculaire théorique de la protéine de fusion.

2.1.3. Activité spécifique des extraits cellulaires contenant l'enzyme IU-NH non-mutée

Suite aux nombreux essais, la méthode qui s'est avérée la plus efficace est celle qui a été décrite à la section 1.4 employant des plaques de 96 puits pour le test d'activité enzymatique de la protéine originale, et celle-ci a servi de méthode standard. L'activité obtenue a servi à identifier les mutants les plus prometteurs attendus des deux techniques d'évolution moléculaire dirigée envisagées dans cette étude.

Les travaux de Gopaul et collaborateurs (1996) ont rapporté une activité spécifique de 6,7 $\mu\text{mole min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pour l'IU-NH recombinante partiellement purifiée d'*Escherichia coli* avec le pNPR comme substrat. Un gène synthétique codant pour l'IU-NH de *Crithidia fasciculata*

a été précédemment assemblé dans le laboratoire du Dr Brousseau, à l'Institut de recherche en biotechnologie (IRB) par une stagiaire, Madame Frédérique Duthoit. Mme Duthoit avait mesuré une activité spécifique de $9 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Dans cette étude, nous avons employé des conditions différentes de celles utilisées lors des travaux susmentionnés : en utilisant une protéine non-purifiée ainsi qu'une lyse au toluène au lieu de la "presse de French" comme moyen de préparation de l'extrait cellulaire. Nous avons obtenu une valeur d'activité spécifique de l'ordre de $70 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, ce qui nous donne une amélioration d'un facteur 8 par rapport aux résultats obtenus précédemment et proche des résultats cités dans la littérature. Ce résultat suggère que la lyse cellulaire avec le toluène semble être plus efficace que les procédés mécaniques comme la rupture cellulaire avec "la presse de French" précédemment utilisée dans le laboratoire. L'absence d'activité appréciable sur le pNPD n'a pas permis d'obtenir une mesure significative de l'activité spécifique.

2.1.4. Activité de l'enzyme de départ en présence de diméthylformamide

Les constantes cinétiques de l'enzyme de départ ont été déterminées par la méthode de régression non-linéaire (Marquardt, 1963). L'erreur standard sur les paramètres identifiés a été estimée à partir de la matrice de co-variance des paramètres (Beck et Arnold, 1977). Les constantes cinétiques de l'enzyme de base sont comme suit : V_{max} de $20,03 \pm 0,1 \mu\text{M min}^{-1}$ et K_m de $182 \pm 18 \mu\text{M}$ (Tableau 4, page 97). Ces données sont tirées d'expériences avec un milieu aqueux et après perméabilisation des cellules avec du toluène. La figure 8 montre que

la vitesse initiale de l'enzyme dans un milieu aqueux avec 300 μM de substrat était d'environ 13 $\mu\text{M min}^{-1}$ alors que dans un milieu réactionnel contenant 30% DMF celle-ci fut réduite de 3,5 fois environ et de 0,5 fois avec 10% de DMF, ce qui suggérait fortement que l'enzyme perdait de son efficacité dans un milieu devenu plus organique. Le tableau 4 (page 97) confirme l'analyse évoquée plus haut, à partir des données de la figure 8, indiquant que l'activité de l'enzyme de départ est réduite appréciablement en présence de 10 et 30% de DMF. Nous avons constaté qu'avec le *p*-nitrophényl riboside la vitesse maximale (V_{max}) de l'enzyme de départ diminuait de 15-30% avec chaque accroissement de 10% de la concentration de DMF et que la valeur du K_m augmentait d'un facteur 1,5, indiquant ainsi que l'enzyme perdait de son affinité pour le substrat (Tableau 4). Avec le *p*-nitrophényl désoxyribose comme substrat, nous n'avons obtenu aucune activité enzymatique mesurable à cette étape du projet.

2.2. Effets des substitutions d'acide aminé aux positions 14 et 39 après mutagénèse dirigée

La première étape du projet cherchait à rendre l'enzyme IU-NH capable d'accepter le pNPD comme substrat. Pour ce faire, nous devons modifier certaines positions sur le site actif du gène de départ en utilisant la mutagénèse dirigée de saturation. Pour réaliser ces mutations de saturation, le Dr Traian Sulea, chercheur à l'Institut de recherche en biotechnologie (IRB), a été consulté dans le but d'analyser la structure tridimensionnelle de l'enzyme IU-NH. Celui-

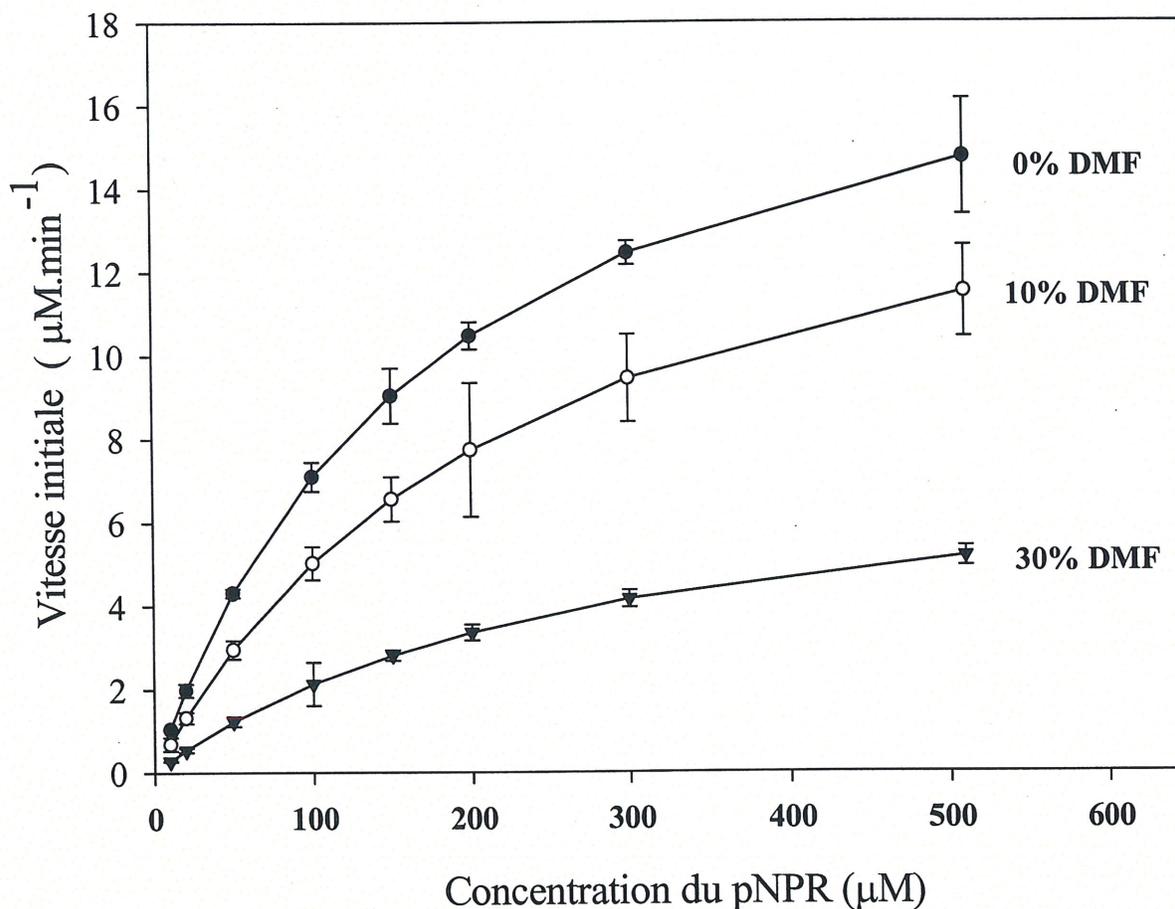


Figure 8. Étude cinétique de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase de départ en fonction des différentes concentrations du solvant organique, diméthylformamide, et du substrat, le *p*-nitrophényl riboside. Les paramètres cinétiques ont été déterminés par l'algorithme de régression non-linéaire de Marquardt, (1963). L'erreur standard sur les paramètres identifiés est estimée à partir de la matrice de co-variance des paramètres (Beck et Arnold, 1977). Pour la lecture dans un milieu aqueux (milieu sans DMF) les cellules bactériennes induites ont été traitées avec 1% (v/v) de toluène.

ci nous a indiqué que des mutations aux positions 14 et 39 seraient susceptibles de changer la spécificité du site actif pour accommoder un nouveau substrat, tel que pNPD (figure 9). L'utilisation des amorces de saturation devait pouvoir générer toutes les mutations d'acide aminé possibles à ces deux positions. Plusieurs tentatives de mutation aux deux positions en même temps ont été effectuées mais sans succès. Ainsi, nous avons donc dû procéder de manière individuelle. L'analyse des clones sélectionnés après séquençage de quelques clones choisis au hasard a prouvé que le taux de mutation obtenu était bas, surtout pour ceux de la position 14. Le séquençage des clones obtenus a permis d'identifier des clones portant une mutation pour chaque position et a donné quatre (4) types de mutants pour la position 14 : Asp14Trp, Asp14Ile, Asp14Met et Asp14Asn (figure 10), mais les autres mutants, c'est à dire, Asp14Arg, Asp14Gly et Asp14Leu, avaient subi une délétion à la 8^{ème} base avant le lieu de mutation, c'est à dire la deuxième base (C) du codon proline 11. En plus, cinq (5) mutants ont été obtenus pour la position 39 (Asn39Glu, Asn39Cys, Asn39Tyr, Asn39Ile, Asn39Val) (figure 10).

Après que nous ayons identifié les mutants, le criblage des variantes d'enzyme nous a permis de voir les effets de remplacement individuel d'un acide aminé sur l'activité de la IU-NH avec les autres clones (environ 200 clones) qui n'avaient pas encore été séquencés. Les variantes à la position 14, avec le pNPR, avaient perdu 70% leur activité, avec ou sans DMF, par rapport à l'enzyme de départ tandis que celles à la position 39 montraient une activité réduite par rapport l'enzyme de départ (figure 11). Avec le pNPD comme substrat, les deux groupes de variantes, tout comme l'enzyme originelle, ont présenté une activité très faible

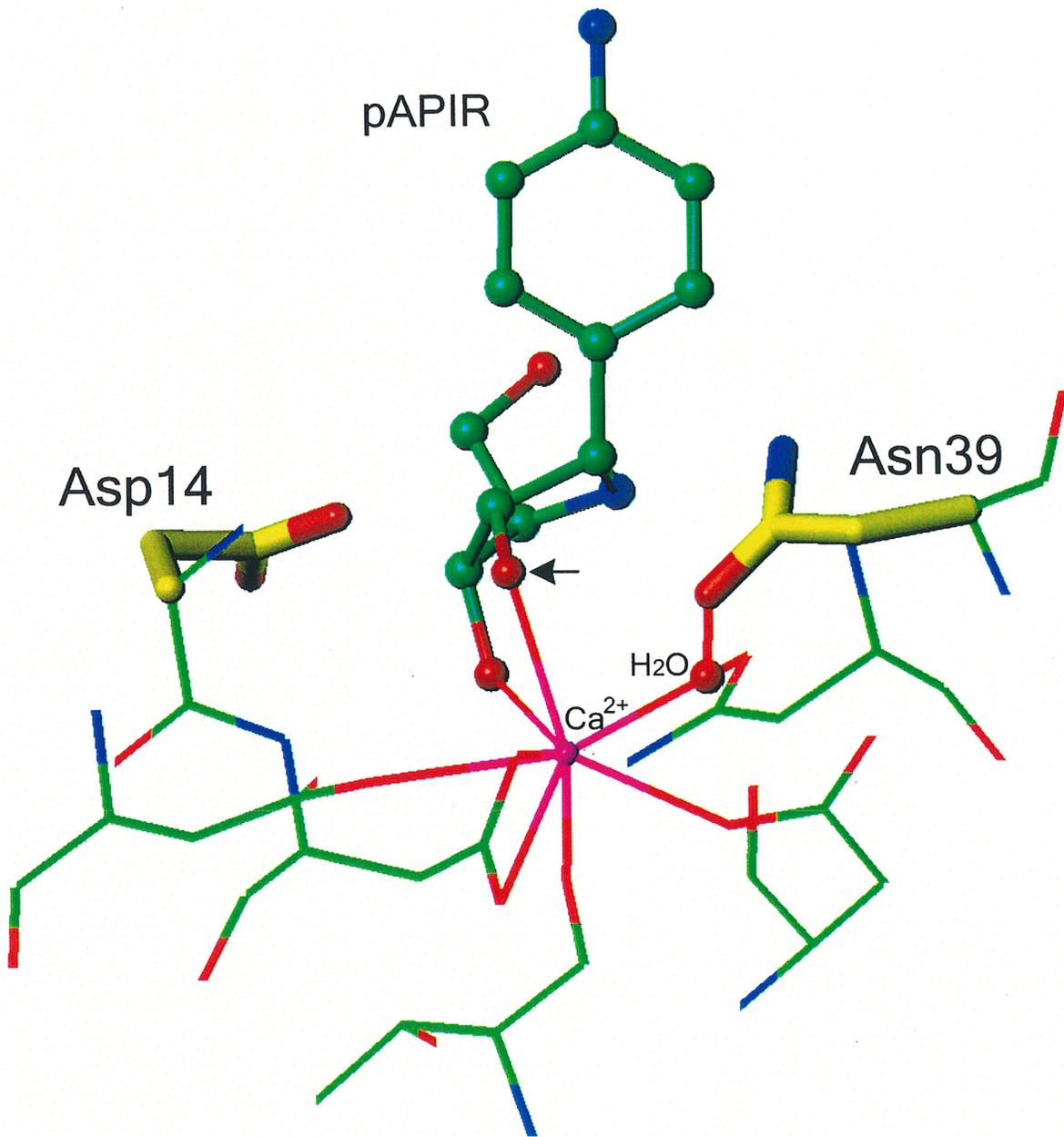


Figure 9. Structure du site actif de l'enzyme montrant les positions Asp14 et Asn39 du côté de l'interaction entre l'enzyme IU-NH, le Ca^{2+} et l'état de transition avec l'inhibiteur, le *p*-aminophényliminoribitol (pAPIR). La vue montre la géométrie d'octacoordination de l'ion métal Ca^{2+} et les interactions de divers acides aminés avec l'inhibiteur [figure adaptée à partir de la référence de Degano et al. (1998)]. La flèche indique l'oxygène en position C2 qui est absent dans le substrat le *p*-nitrophényl désoxyribose.

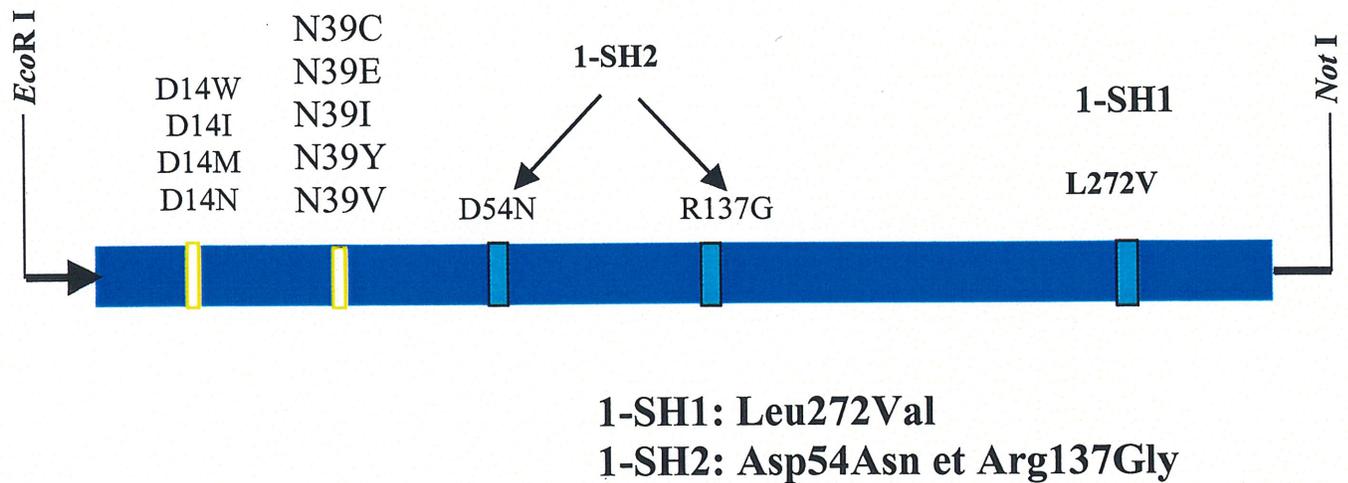


Figure 10. Substitutions de nucléotides produites dans le gène inosine uridine nucléoside hydrolase par mutagenèse dirigée et par "DNA shuffling". Les changements en acides aminés sont montrés selon une numérotation indiquant la position de l'acide aminé muté sur le gène. Les barres indiquent les positions de mutation créée par les deux techniques d'évolution moléculaire dirigée (les barres jaunes indiquent les mutants obtenus par mutagenèse dirigée et les barres bleue clair indiquent celles obtenues par "DNA shuffling". Les deux extrémités montrent le site d'action des deux enzymes de restrictions *EcoRI* et *NotI*.

(figure 12). Ces résultats ont été réalisés dans des plaques de 96 puits et en duplicata. Les mêmes résultats ont été obtenus d'expériences en fioles de 50 ml. Cette confirmation nous indique que les résultats obtenus avec les plaques de 96 puits sont fiables et reproductibles. Ainsi, certaines mutations ponctuelles n'ont aucunement amélioré l'activité enzymatique ni permis l'utilisation d'un nouveau substrat, le pNPD. Les variantes où nous avons observé des délétions de bases n'ont montré aucune activité biologique, ce qui est normal puisque que la délétion brise le cadre de lecture.

2.3. Analyse des clones obtenus par "DNA shuffling"

Le "DNA shuffling" a été utilisé comme alternative pour améliorer l'activité de l'enzyme en présence du solvant organique, le DMF, c'est à dire, tenter d'inverser le rôle normal de l'enzyme IU-NH et en même temps obtenir une variante d'enzyme qui sera capable d'accepter les désoxyribonucléosides comme substrat.

2.3.1. Réassemblage du gène inosine uridine nucléoside hydrolase

La figure 3 illustre les différentes étapes de la technique "DNA shuffling" ou "PCR sexuelle". Le gène synthétique IU-NH de 1 kb environ amplifié (figure 13A) fut, dans un premier temps, fragmenté avec une nucléase (DNase I) (figure 13B). Cette fragmentation a produit une population de fragments de 50 à 100 pb qui ont été par la suite purifiés (Figure 13C). Cette étape de fragmentation et de purification des fragments a été suivie d'une PCR sans

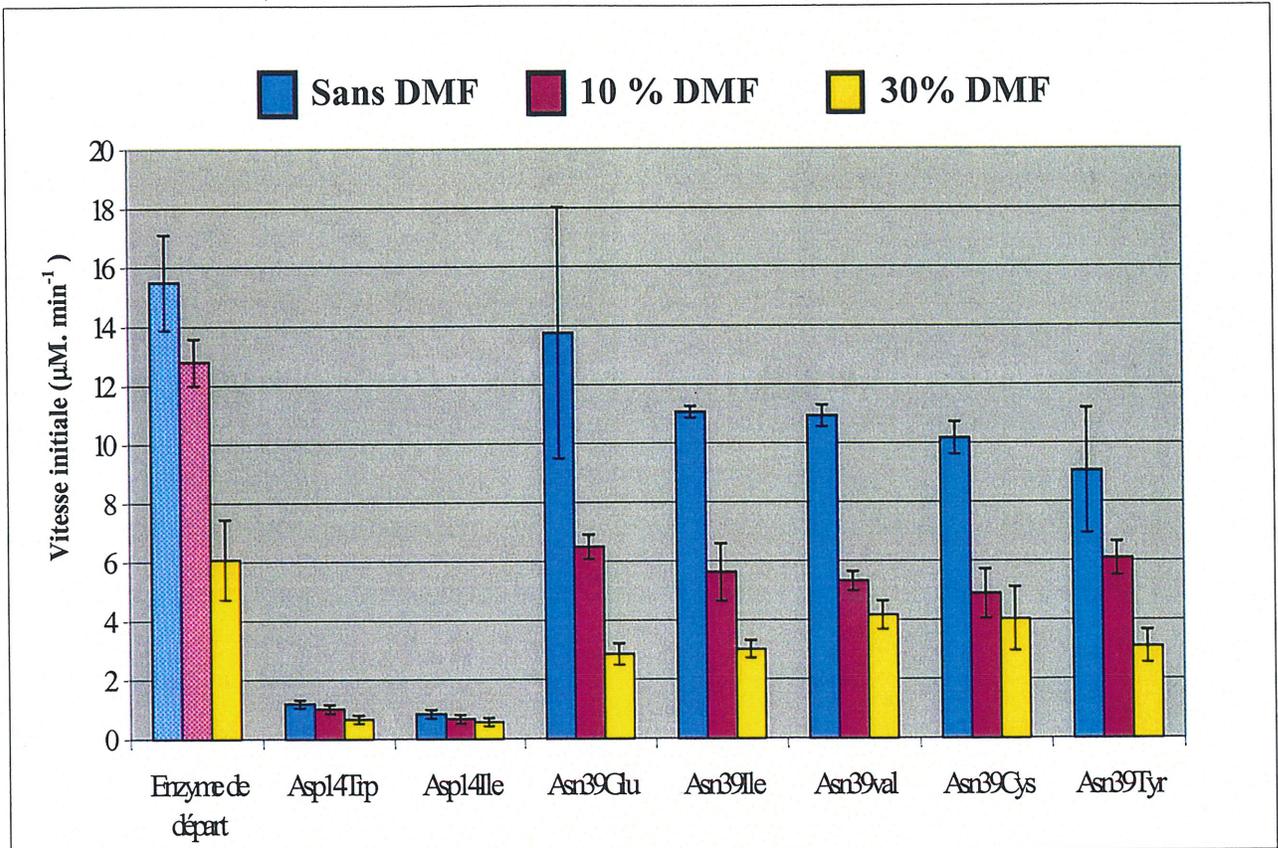


Figure 11. Activité des enzymes mutées (variantes) obtenues par mutagenèse dirigée, avec ou sans diméthylformamide. Expérience effectuée dans des plaques de 96 puits à une concentration finale en substrat de 300 μM (*p*-nitrophényl riboside). Les cellules bactériennes induites testées dans un milieu aqueux (milieu sans DMF) ont été perméabilisées avec du toluène à 1% (v/v) de concentration finale.

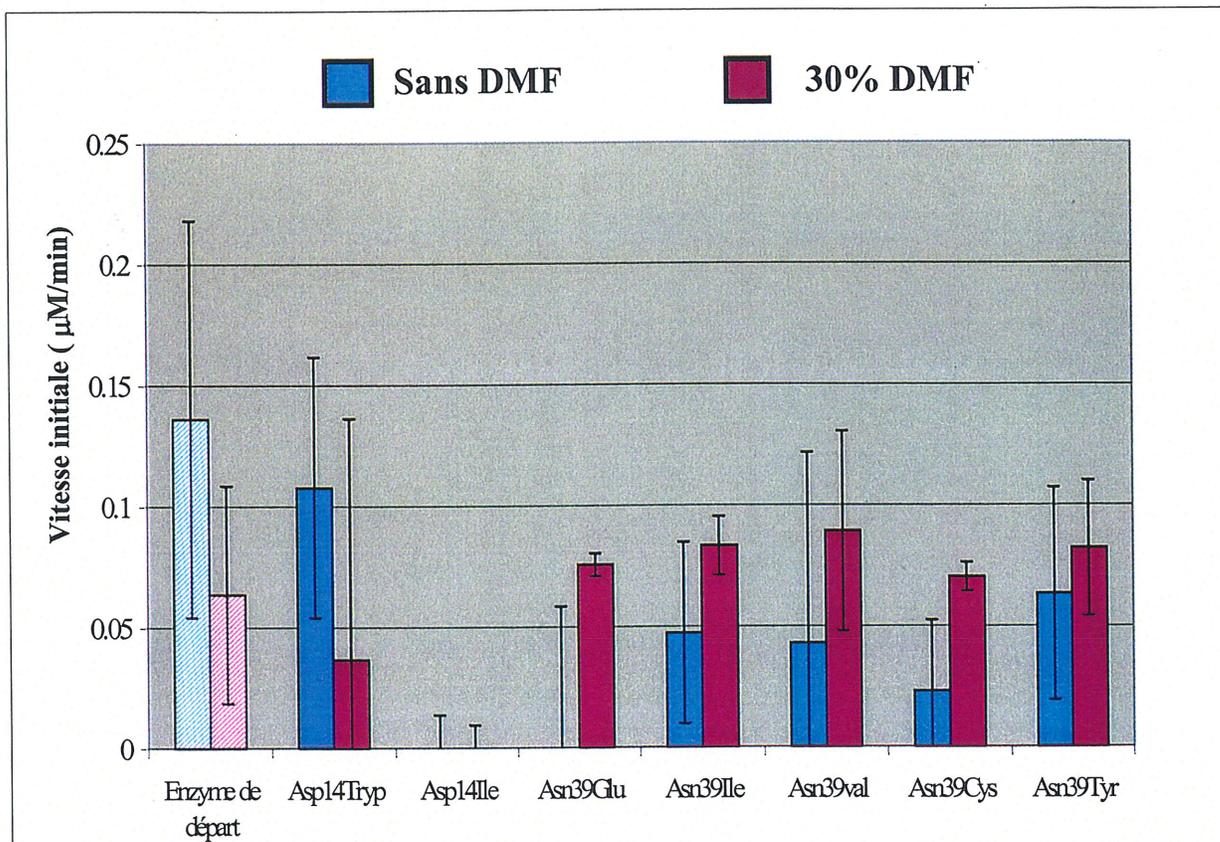


Figure 12. Activité des enzymes mutées (variantes) obtenues par mutagenèse dirigée, avec ou sans diméthylformamide. Expérience effectuée dans des plaques de 96 puits à une concentration finale en substrat de 300 μM (*p*-nitrophényl désoxyribose, pNPD). Les cellules bactériennes induites testées avec et sans DMF ont été perméabilisées avec du toluène à 1% (v/v) de concentration finale.

amorces externes (Figure 13D, colonne 2) : cette étape permettait que chaque fragment d'ADN dénaturé puisse s'hybrider avec un autre fragment, celui-ci servant de matrice pour l'élongation. Cette étape a été suivie d'une autre PCR spécifique avec des amorces (MBV1 et MBV2) situées aux extrémités du gène. Le résultat de cette PCR spécifique est présenté à la figure 13D, colonne 3 et 4, et on a pu ainsi reconstituer tel que prévu des gènes de taille correcte, soit 1 kb environ. Ce produit de la PCR a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI* (figure 13D, colonne 5) et cloné de nouveau dans le vecteur *pGEX-4T3*.

La figure 14 illustre les principales étapes pour la création de la banque des mutants par recombinaison. Les gènes furent ensuite clonés dans le plasmide *pGEX 4T3* puis transférés dans *Escherichia coli* (BL21). La sélection des transformants a été faite sur milieu solide 2xYT additionné d'ampicilline. Avec la technique de transformation par électroporation, nous avons obtenu un rendement acceptable de transformants par μg d'ADN pour un premier cycle de recombinaison. Les transformants ont été repiqués sur le même milieu de culture 2xYT+ampicilline afin de les identifier facilement. Une dizaine de clones de la librairie pris au hasard ont été soumis à des mini-préparations plasmidiques. Les plasmides isolés ont été digérés avec les mêmes enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI* afin de visualiser les bandes séparées sur gel d'agarose à 1,5% pour vérifier la présence de l'insert. Le premier test de séquençage de ces clones nous a permis de déterminer un taux de mutation faible, soit 0,2%. Les clones après séquençage portant des mutations ont été évalués par criblage à haut débit (plaques de 96 puits). Cette étape a servi à sélectionner non seulement le meilleur clone mais

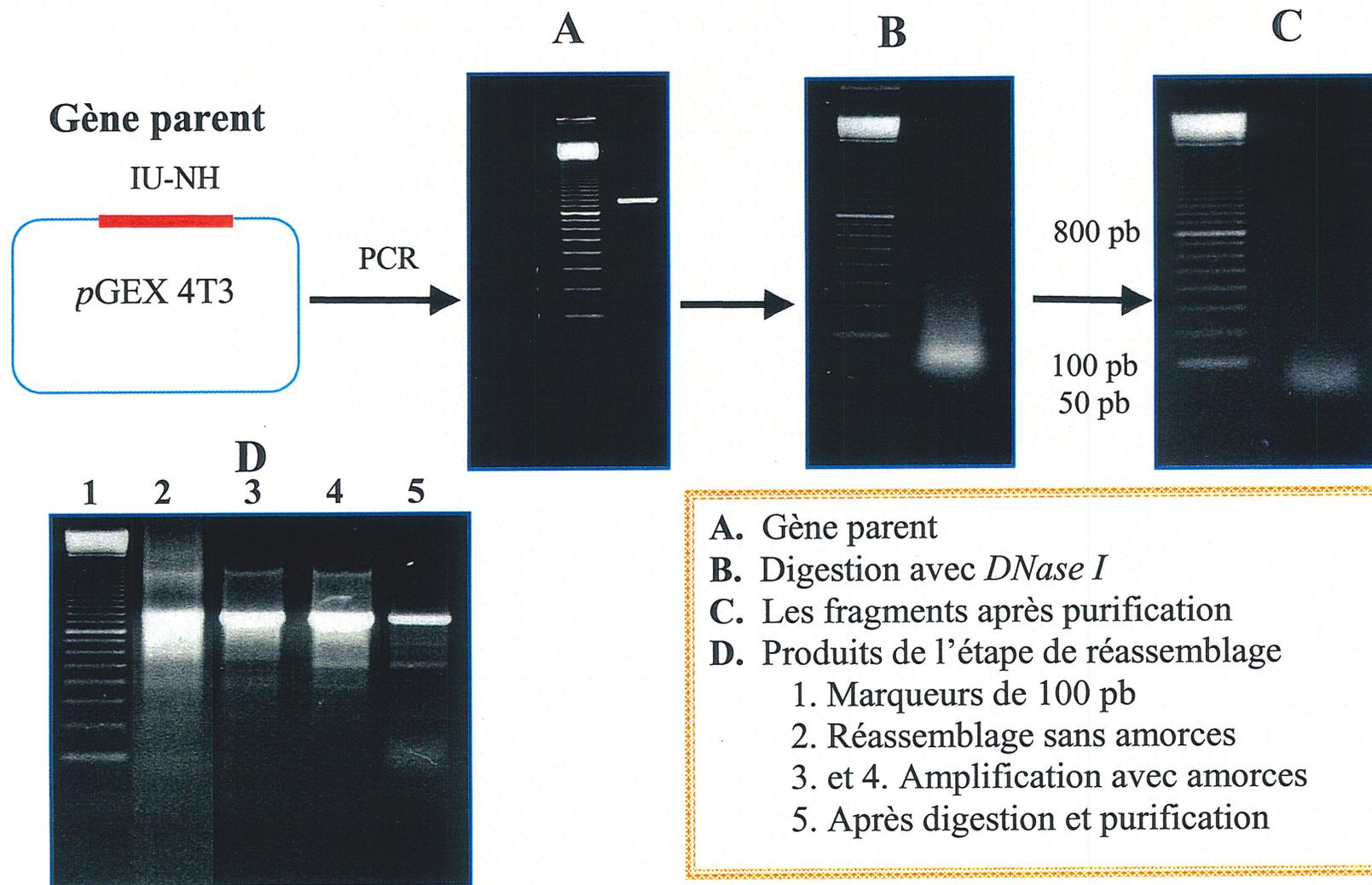


Figure 13. Réassemblage des fragments de 50 à 100 pb d'un gène d'environ 1,0 kb. (A) Le fragment d'ADN de 1,0 kb environ codant pour l'inosine uridine nucléoside hydrolase a été amplifié par PCR. Après digestion du gène avec 0,030 unité de DNase I pendant une (1) minute à 15°C (B), les fragments de 50-100 paires de bases confirmés au gel d'agarose furent excisés et purifiés avec la trousse d'extraction QIAEX II (QIAGEN) (C). (D2) Les fragments purifiés ont été réassemblés en l'absence des amorces. (D3) Après l'ajout des amorces et de cycles additionnels de PCR, les produits PCR produisent une bande unique de la taille correcte. (D5) Les produits PCR furent digérés et purifiés avant qu'ils soient clonés dans le plasmide.

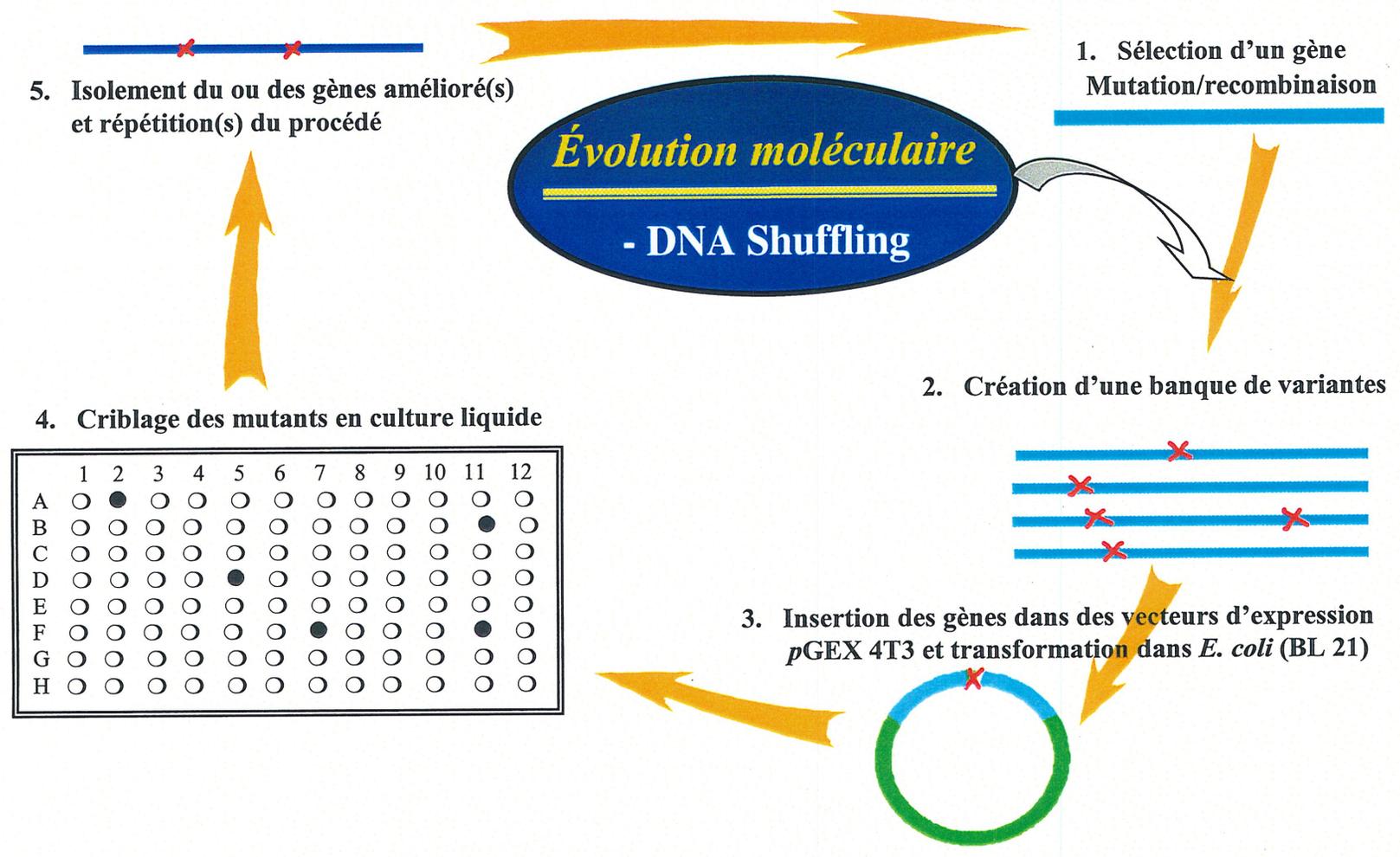


Figure 14. Les principales étapes de l'évolution moléculaire dirigée de l'enzyme IU-NH. La banque des mutants a été créée par mutagenèse dirigée et par recombinaison d'un gène par "DNA shuffling". Les gènes modifiés (mutants) furent clonés dans le plasmide pGEX 4T3 et transférés dans *E. coli* (BL21) par transformation. Les clones exprimant des enzymes améliorées furent identifiés par criblage dans des plaques de 96 puits où ils furent sélectionnés après séquençage. Les gènes codant pour l'enzyme améliorée et ceux qui ont obtenu une mutation par recombinaison furent isolés et soumis à une nouvelle étape d'évolution.

aussi les clones ou une sous-population de clones qui présentaient une amélioration quantifiable de l'activité enzymatique recherchée. Cette première sous-population criblée présentant une amélioration quantifiable a servi de référence aux autres clones qui n'avaient pas encore été criblés dans cet essai.

2.3.2 Stratégie de criblage des variantes de l'IU-NH après évolution dirigée

Le but premier de l'expérience était de déterminer si une amélioration substantielle de la spécificité et/ou de l'activité de l'enzyme pouvait être identifiée après criblage, dans des plaques de 96 puits, de la bibliothèque de mutants obtenus.

La caractérisation des 200-300 clones de la librairie de mutants obtenus par "DNA shuffling" préalablement repiqués a été effectuée avec les deux substrats selon la méthode décrite à la figure 15. Pour chaque test, les résultats obtenus avec les mutants étaient comparés avec ceux obtenus après expression du gène original. Les clones présentant une amélioration étaient sélectionnés pour un deuxième test de criblage. Les clones présentant une amélioration étaient également séquencés, ainsi que quelques clones qui n'avaient pas obtenu une meilleure activité, afin d'avoir une meilleure idée du taux de mutation obtenu avec le protocole de la première ronde de "shuffling". La figure 15 décrit la stratégie de criblage menant à identifier les variantes présentant une amélioration comme il a été mentionné à la section 1.3.

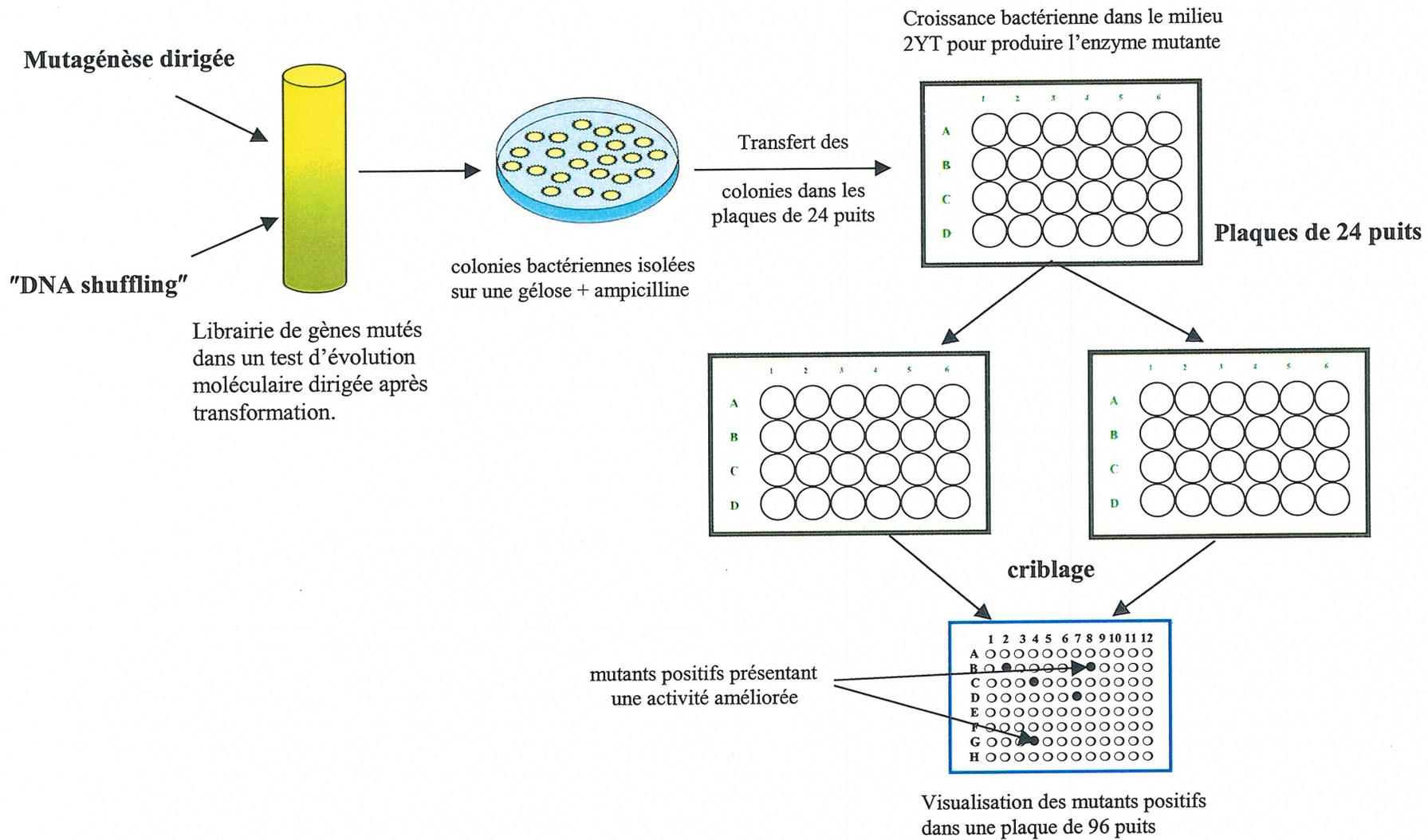


Figure 15. Les étapes expérimentales de criblage après évolution moléculaire dirigée de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase (IU-NH).

Les transformants obtenus par évolution dirigée ont été criblés en duplicata après culture dans des plaques de 96 puits par mesure de leur activité sur le substrat pNPR dans 10 à 30% de DMF. Nous avons aussi mesuré l'activité de la librairie des variantes avec l'autre substrat, le pNPD.

La figure 16 présente les résultats d'activité enzymatique obtenus avec la librairie d'enzymes mutées ; les résultats pour l'enzyme non-mutée y sont aussi inclus (colonne 1 rangée A et B). Les échantillons ont été toujours testés en duplicata ; sur la plaque qui a été testée, la rangée A donne les résultats pour les diverses enzymes mutées et leur duplicata est présenté dans la rangée B. La lecture d'activité de plaque de 96 puits présentée sur la figure 16 montre certaines enzymes mutées avaient perdu partiellement leur activité (G et H, colonne 2) tandis que d'autres avaient perdu ou presque complètement leur activité (A et B colonne 7 ; E et F colonne 7 ; ou encore G et H colonne 9) avec le pNPR. Cette même figure nous montre aussi des enzymes mutées qui possédaient une activité raisonnable et proche de celle obtenues avec le gène non-muté (E et F, colonne 1). D'une façon générale, les duplicatas ont montré une belle concordance pour chaque enzyme testée. À partir de ces résultats, nous pouvions élaborer une première étape de sélection. Une étape supplémentaire était nécessaire pour confirmer et préciser le niveau d'activité de chaque mutant par rapport au gène non muté. Cette étape a permis de mettre en relief l'activité mesurée de l'enzyme par rapport à la croissance après induction à l'IPTG. L'activité de l'enzyme obtenue fut ensuite divisée par la densité optique à 600 nm de la suspension bactérienne du mutant après induction, de façon à pondérer l'activité en fonction de la biomasse. Les deux histogrammes de la figure 17 nous

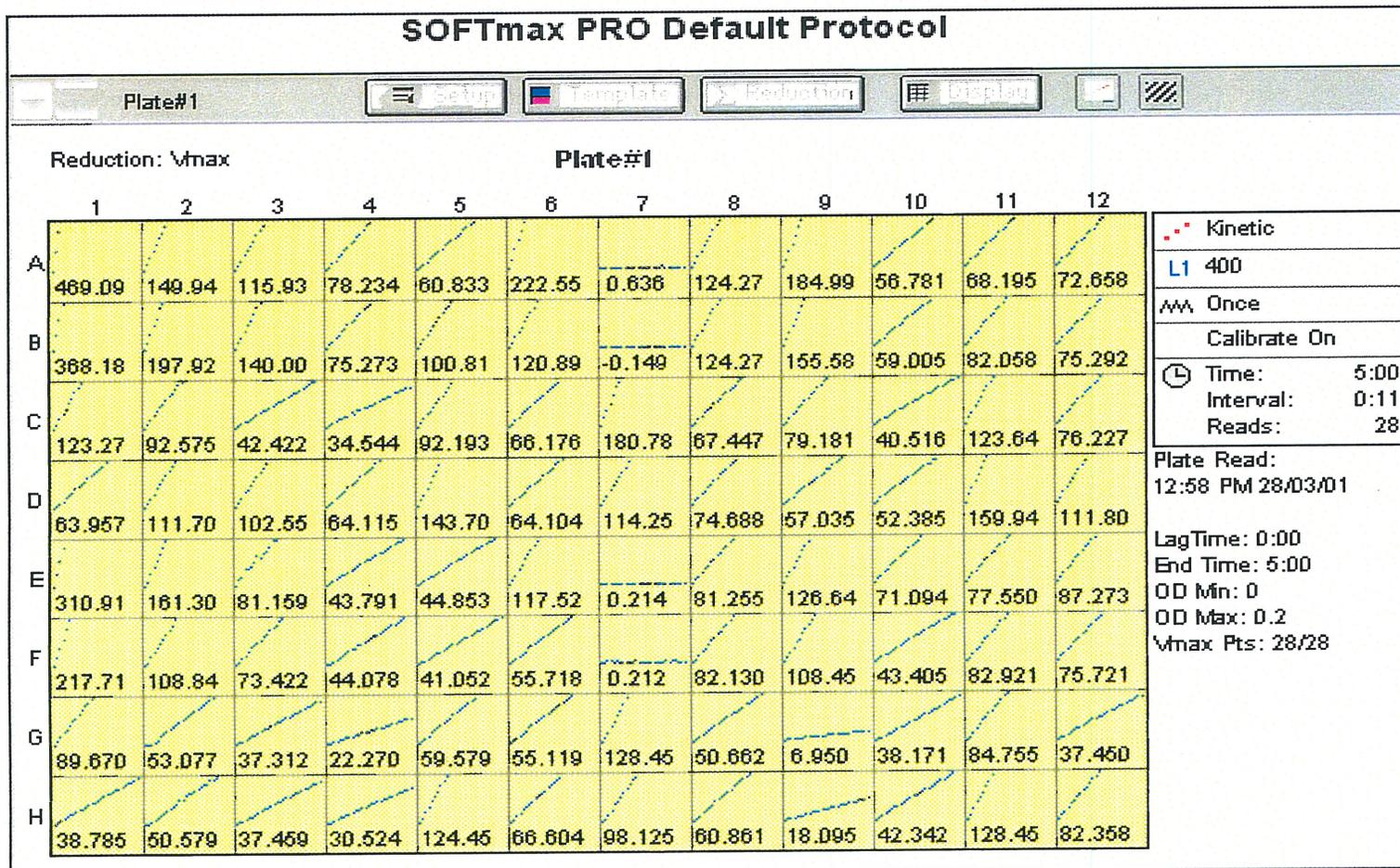


Figure 16. Lecture d'activité au spectrophotomètre à plaque, "SpectraMax", de la bibliothèque des variantes dans des plaques de 96 puits. Les valeurs d'activité des pentes sont lues en mOD/min. La figure illustre l'activité de la bibliothèque d'enzymes mutées dans le solvant organique (10% DMF) par rapport à celle de l'enzyme IU-NH de départ présentée dans les puits A1 et B1. Les autres puits présentent l'activité des enzymes mutées et leur duplicata. Les échantillons proviennent de cultures différentes et de plaques différentes. SOFTmaxPRO a été le logiciel de lecture de plaques.

ont permis de faire la sélection finale des mutants.

La majeure partie de la population des colonies transformées de la première ronde ont présenté une activité avec le pPNR (figure 17). Entre 10 et 20 clones sélectionnés pour le séquençage avaient une activité satisfaisante ou semblable par rapport à celle de l'enzyme de départ. Nous avons aussi sélectionné pour le séquençage des clones qui avaient obtenu une faible activité avec le pPNR pour se faire une idée du taux de mutation. Le séquençage des clones sélectionnés nous a indiqué que quelques clones présentaient des mutations silencieuses et d'autres étaient tout simplement identiques au gène synthétique.

2.3.3 Caractérisation des mutants 1-SH1 et 1-SH2 obtenus lors du premier cycle d'évolution dirigée et effet de mutations sur l'activité de l'IU-NH améliorée

Par comparaison avec l'activité de l'enzyme de départ sur le substrat pNPR, seul le clone 1-SH2 a montré une amélioration appréciable quelque soit le milieu qui a été utilisé (1-SH2 : le chiffre 1- indique la génération I de "DNA shuffling", SH indique "DNA shuffling" et le chiffre "2" indique le numéro de la colonie initiale). Un autre mutant, le mutant 1-SH1, a présenté une faible amélioration de l'activité dans un milieu aqueux (sans solvant organique). Aucune des variantes de la première génération n'a montré d'activité avec le nouveau substrat désiré, le pNPD (résultats non présentés). Une analyse par SDS-PAGE a montré que le taux d'expression de l'enzyme IU-NH améliorée était similaire à celui de la souche

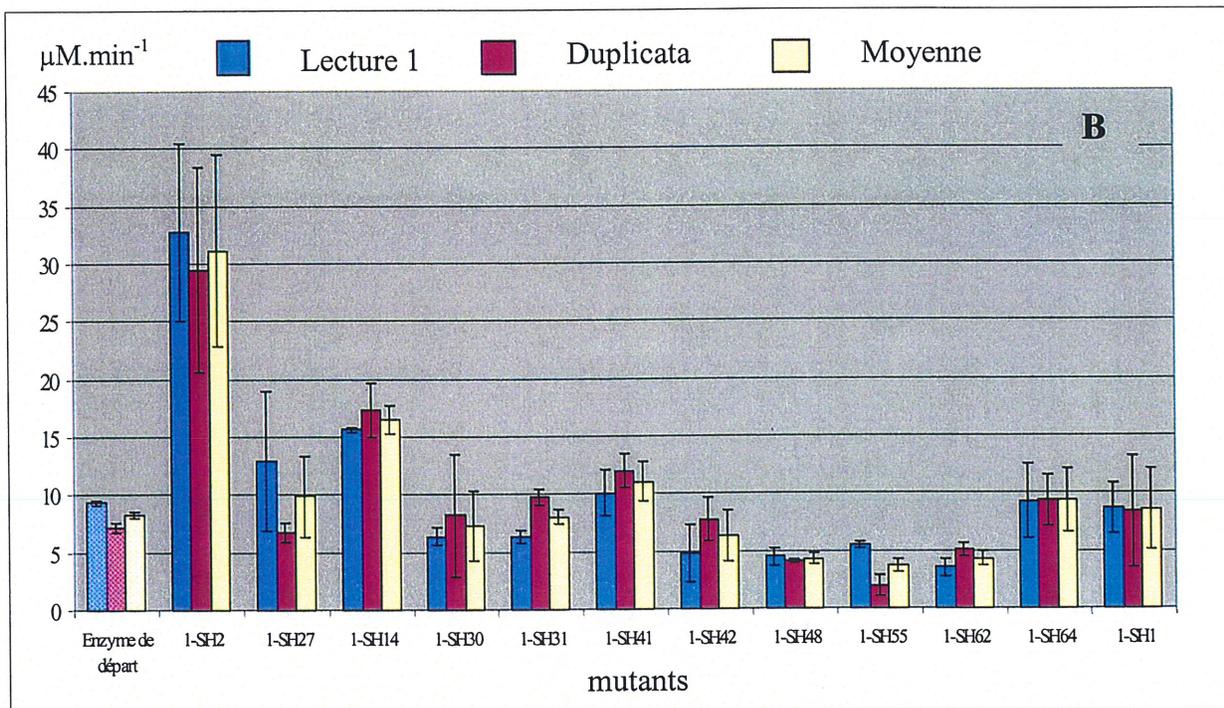
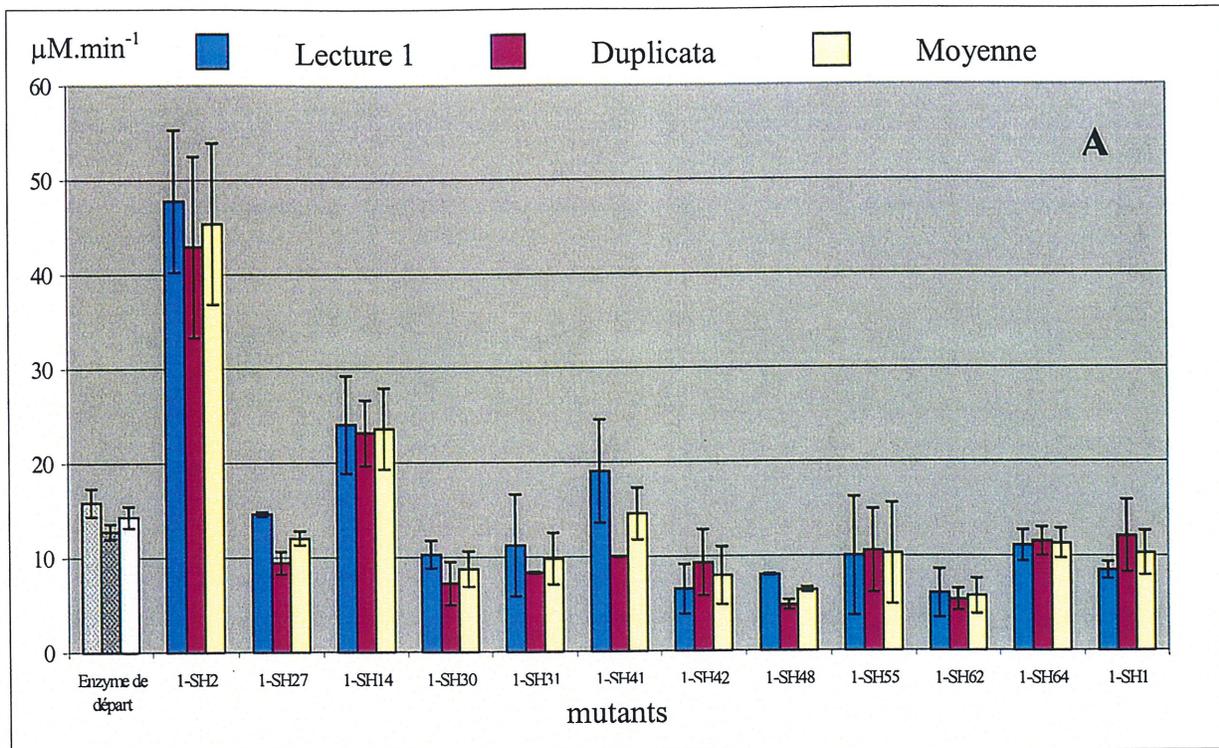


Figure 17. Criblage des mutants obtenus par "DNA Shuffling" avec le *p*-nitrophényl riboside à une concentration finale de 300 µM.

A : avec 10% DMF

B : avec 30% DMF.

contrôle (gel non présenté).

Le Tableau 2 présente les mutations obtenues avec les deux mutants, 1-SH2 et 1-SH1, et montre les substitutions de nucléotides créées sur le gène conduisant à des changements en acides aminés dans la séquence de l'IU-NH. Comparativement au gène de départ, le gène IU-NH du clone 1-SH2 a connu deux substitutions de bases dans sa région codante (Figure 10). On a constaté qu'une première substitution a été faite à la première base du codon pour l'acide aminé de la position 54 (G→A), et une deuxième substitution toujours à la première base du codon pour l'autre acide aminé 137 (A→G) menant ainsi à un remplacement de l'acide aspartique par l'asparagine à la position 54 puis de l'arginine par la glycine à la position 137. Par contre, le gène muté 1-SH1 n'avait connu qu'une seule substitution, soit à la première base du codon pour l'acide aminé 272 (T→G) conduisant au remplacement de la leucine par la valine. Ces résultats laissaient croire que le taux de mutation avait été faible.

Les clones 1-SH1 et 1-SH2 ont donc été soumis à une deuxième ronde d'analyse avec le pNPR et avec le pNPD, comme il a été mentionné dans la section 1.3.

Le changement dans les deux acides aminés menant à l'obtention du mutant 1-SH2 a semblé favoriser l'activité de l'enzyme IU-NH. L'activité de ce mutant était approximativement 3 fois plus élevée que celle obtenue avec l'enzyme IU-NH de départ pour ce qui est de l'hydrolyse du pNPR en milieu aqueux (figure 18). Par contre, le mutant 1-SH1, résultant d'une seule mutation, a montré qu'une légère augmentation d'activité par rapport à l'enzyme

Tableau 2. Substitutions des acides aminés de l'enzyme IU-NH évoluée par "DNA shuffling".

Clone	Position de l'acide aminé	Gène de départ	Enzyme mutée montrant une activité
1-SH1	272	TTG Leu (L)	GTG Val (V)
1-SH2	54	GAC Asp (D)	AAC Asn (N)
	137	AGA Arg (R)	GGA Gly (G)

de départ avec le même substrat dans un milieu aqueux (milieu sans solvant organique). Mais dans un milieu non-aqueux c'est à dire en présence du solvant organique (10 % DMF), nous avons amélioré d'environ 2,5 fois l'activité enzymatique avec le mutant 1-SH2 alors que le mutant 1-SH1 n'a montré qu'une légère baisse d'activité par rapport à l'enzyme de départ avec le même substrat, le pNPR. Les deux variantes d'enzymes ont montré une activité dans des concentrations élevées du solvant organique jusqu'à 40% de DMF ; cependant, seul le mutant 1-SH2 a semblé prometteur pour une réaction en solvant organique, montrant 4 fois plus d'activité dans 40% de DMF et 5 fois plus dans 50% de DMF que l'enzyme de départ (figure 18). Le mutant 1-SH1 sembla présenter une faible activité mesurable dans les conditions élevées de solvant organique.

Les paramètres cinétiques illustrés dans le tableau 4 pour l'enzyme originale et pour les enzymes mutées pour la réaction d'hydrolyse du pNPR ont été déterminés avec des enzymes non purifiées par la méthode de régression non-linéaire (Marquardt, 1963). L'erreur standard sur les paramètres identifiés a été estimée à partir de la matrice de co-variance des paramètres (Beck et Arnold, 1977). Les valeurs déterminées dans cette étude ne sont pas précises à cause du fait que le niveau d'expression peut avoir varié entre les divers clones. Si nous comparons les vitesses initiales des deux variantes dans un milieu aqueux (sans DMF) et non aqueux (avec DMF) en fonction de la concentration du solvant organique et du substrat (figure 19), nous remarquons que les deux variantes, 1-SH1 et 1-SH2, avaient une vitesse initiale de 2 à 3 fois supérieure que celle de l'enzyme de départ (figure 8). Et les deux enzymes mutées montrèrent des valeurs de vitesse initiale presque similaires même avec des concentrations

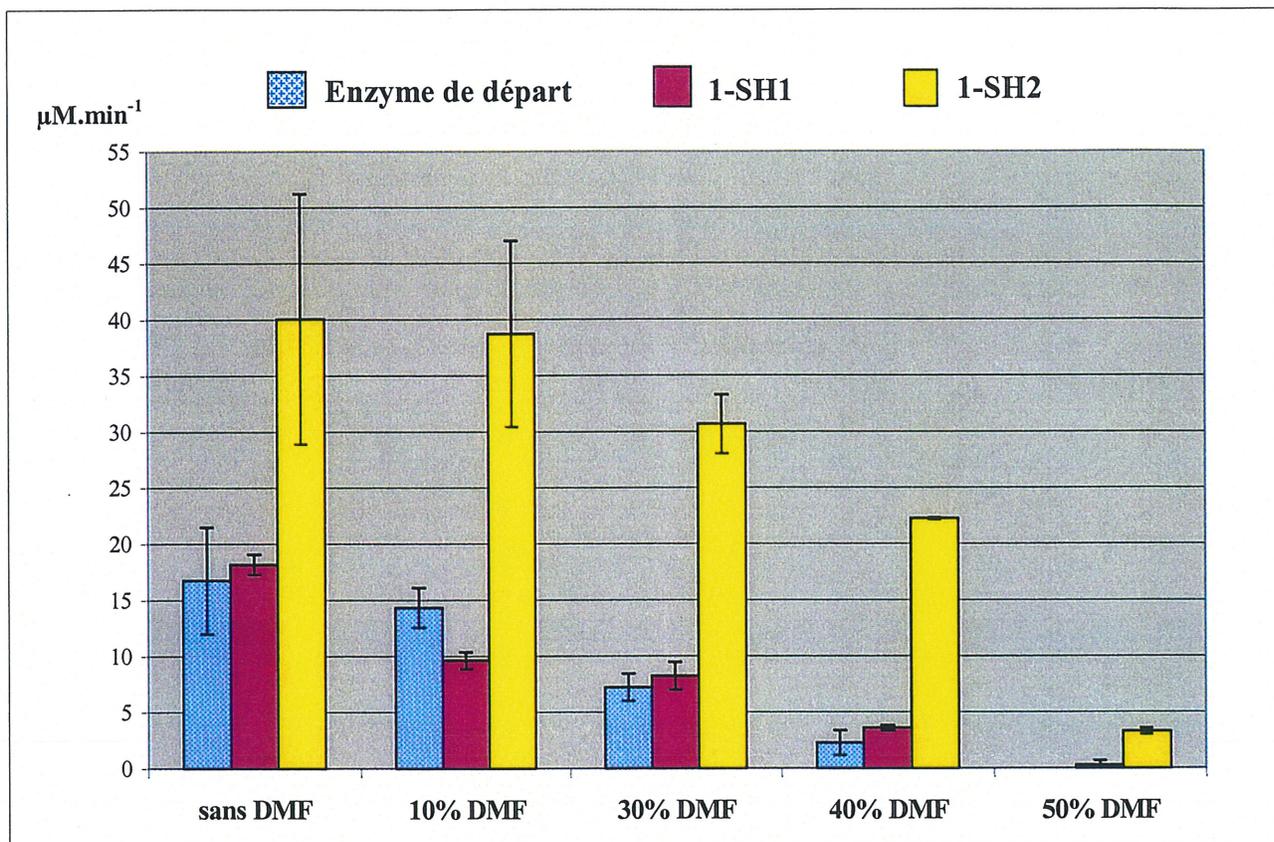


Figure 18. Activité des enzymes mutées (variantes) 1-SH1 et 1-SH2 obtenues par "DNA shuffling" dans 0, 10, 30, 40 et 50% DMF. Substrat : *p*-nitrophényl riboside (pNPR) à 300 μM (concentration finale). Chaque expérience fut faite en duplicata dans des plaques de 96 puits. Ces résultats représentent la moyenne de 4 à 6 tests pour chaque enzyme mutée. Pour le test dans un milieu aqueux (milieu sans DMF) les cellules bactériennes induites ont été traitées avec 1% (v/v) de toluène de concentration finale.

élevées en DMF (30%), avec 300 μM de substrat : 1-SH1 a 18,35 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ et 1-SH2, 18,03 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. L'enzyme de départ (figure 8), elle, avait une vitesse initiale environ cinq (5) fois moins élevée aux concentrations en DMF (10 et 30%) et avec 300 μM de pNPR, soit 9,45 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ et 4,16 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, alors que les enzymes mutées dans les mêmes conditions ont donné 34,7 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ et 18,35 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ pour 1-SH1, et pour 1-SH2, 29,30 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ et 18,03 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Dans un milieu aqueux et à de forte concentration de substrat, à 510 μM , l'enzyme mutée 1-SH2 a montré une vitesse initiale élevée atteignant 50,85 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, alors que l'enzyme de départ était environ 4 fois moins rapide (14,76 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) (figure 8). Par contre, la variante 1-SH1, qui a une seule mutation, a montré une vitesse initiale légèrement plus élevée à une concentration de 300 μM de substrat, pNPR, par rapport à celle du mutant 1-SH2 dans un milieu aqueux. En présence du solvant organique (DMF), et avec des concentrations en substrat entre 200 et 300 μM , les deux variantes 1-SH1 et 1-SH2 ont montré des vitesses initiales semblables dans les concentrations faibles en solvant organique (10% de DMF) ; pour 1-SH1, 22,50 et 29,30 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, et pour 1-SH2, 26,73 et 36,13 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Toutefois, dans des conditions plus élevées en solvant organique, soit à 40% DMF, l'enzyme mutée 1-SH2 a montré une vitesse initiale de même ordre que celle de 1-SH1 à 30% de DMF dans les mêmes concentrations de substrat. En présence du solvant organique (30% DMF), l'enzyme mutée 1-SH2 était quatre (4) fois plus rapide dans les mêmes conditions de solvant que l'enzyme de départ (4,16 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) et 6 fois plus rapide dans un milieu sans DMF. Remarquablement par rapport à l'enzyme de départ, l'enzyme

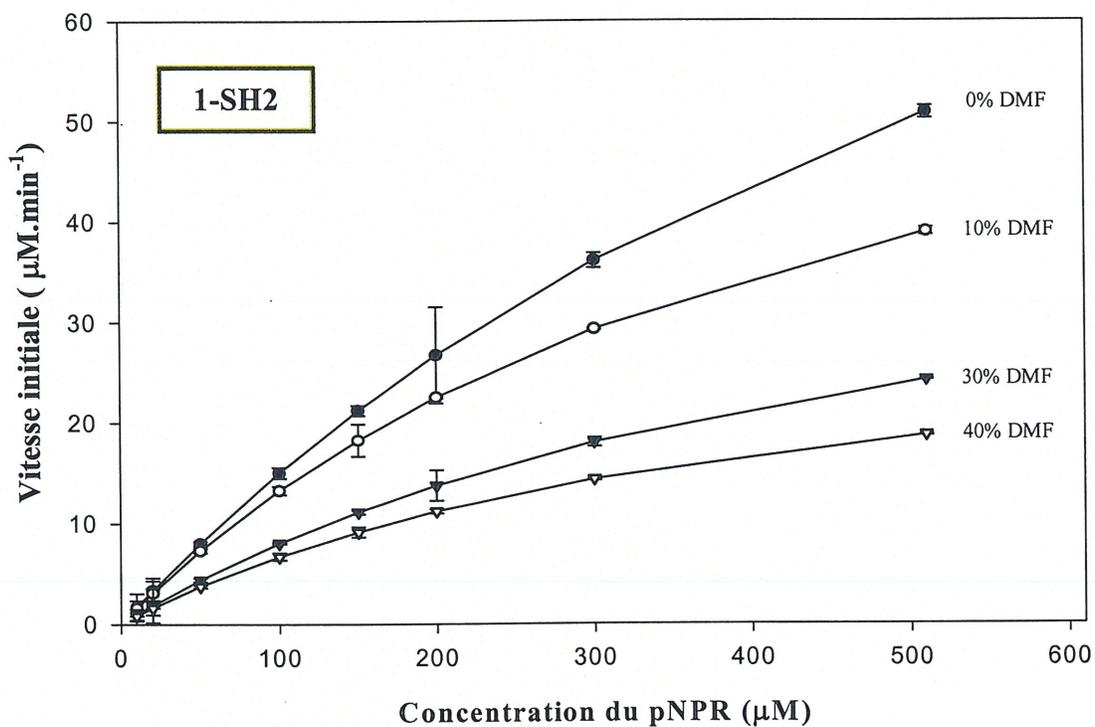
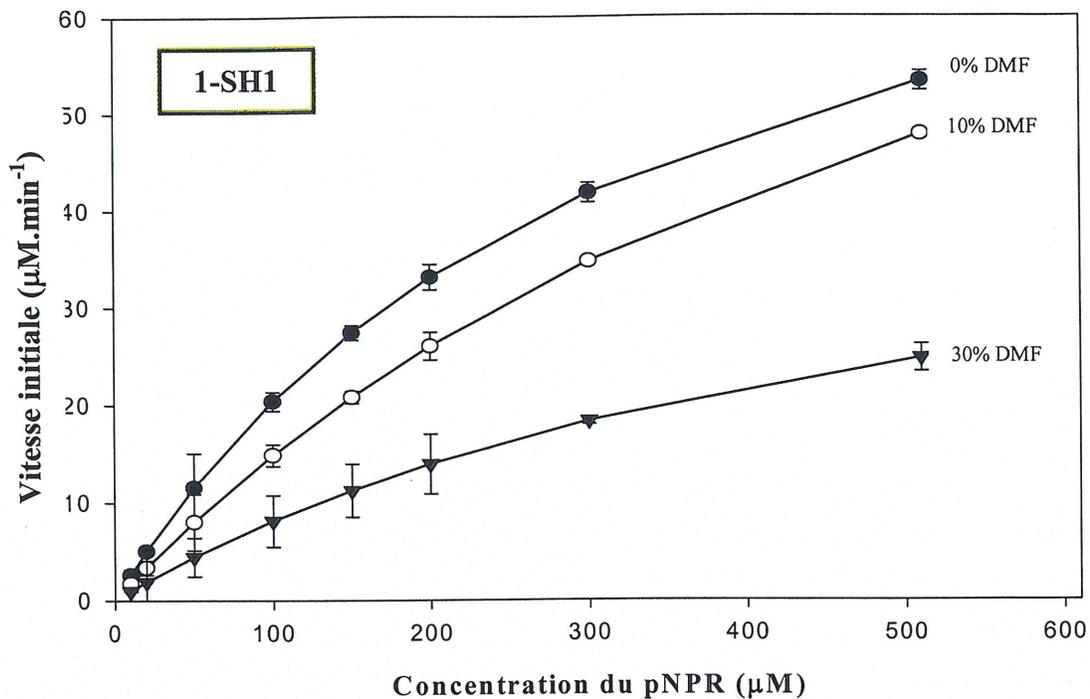


Figure 19. Étude cinétique de deux enzymes IU-NH mutées (les variantes 1-SH1 et 1-SH2) en fonction des différentes concentrations du substrat *p*-nitrophényl riboside et de la concentration de diméthylformamide. Les paramètres cinétiques ont été déterminés par l'algorithme de régression non-linéaire de Marquardt, (1963). L'erreur standard sur les paramètres identifiés est estimée à partir de la matrice de co-variance des paramètres (Beck et Arnold, 1977). Pour le test dans un milieu aqueux (milieu sans DMF), les cellules bactériennes induites ont été traitées avec 1% (v/v) de toluène de concentration finale.

mutée 1-SH2 a amélioré d'un facteur 100 la vitesse initiale dans 40% de solvant organique (DMF).

Toutefois, les deux mutants, 1-SH1 et 1-SH2, de même que tous les mutants obtenus après la première ronde de "DNA shuffling", n'ont montré aucune activité avec le pNPD (résultats non présentés). Les deux variantes les plus prometteuses, 1-SH1 et 1-SH2, sont donc devenues automatiquement candidates pour une seconde ronde de "DNA shuffling".

2.3.4. Combinaison des gènes sélectionnés pour une autre ronde d'évolution dirigée

Nous désirions améliorer le taux de mutation, qui était insuffisant lors de la première ronde. Le faible taux de mutation obtenu avait alors créé beaucoup de clones non-mutés, donnant ainsi un nombre important de faux positifs lors des essais enzymatiques avec le pNPR. Pour augmenter le taux de mutation, lors de la première étape de réassemblage (section 1.2.7.3), l'ADN polymérase *Pfu* a été remplacé par l'ADN polymérase *Taq*. De plus, lors de la deuxième étape de réassemblage (c'est à dire, section 1.2.7.4), le mélange *Taq/Pfu* a été remplacé par l'ADN polymérase *Taq*. Normalement, cette approche était sensée conduire à un taux d'erreur plus élevé (Zhao et Arnold, 1997a).

Ainsi, pour cette nouvelle ronde de recombinaison, nous avons associé aux deux clones de la première génération de "DNA shuffling", 1-SH1 et 1-SH2, trois clones obtenus par mutagenèse dirigée, i.e., Asn39Ile, Asn39Val et Asn39Tyr (figure 20). Bien que cette ronde

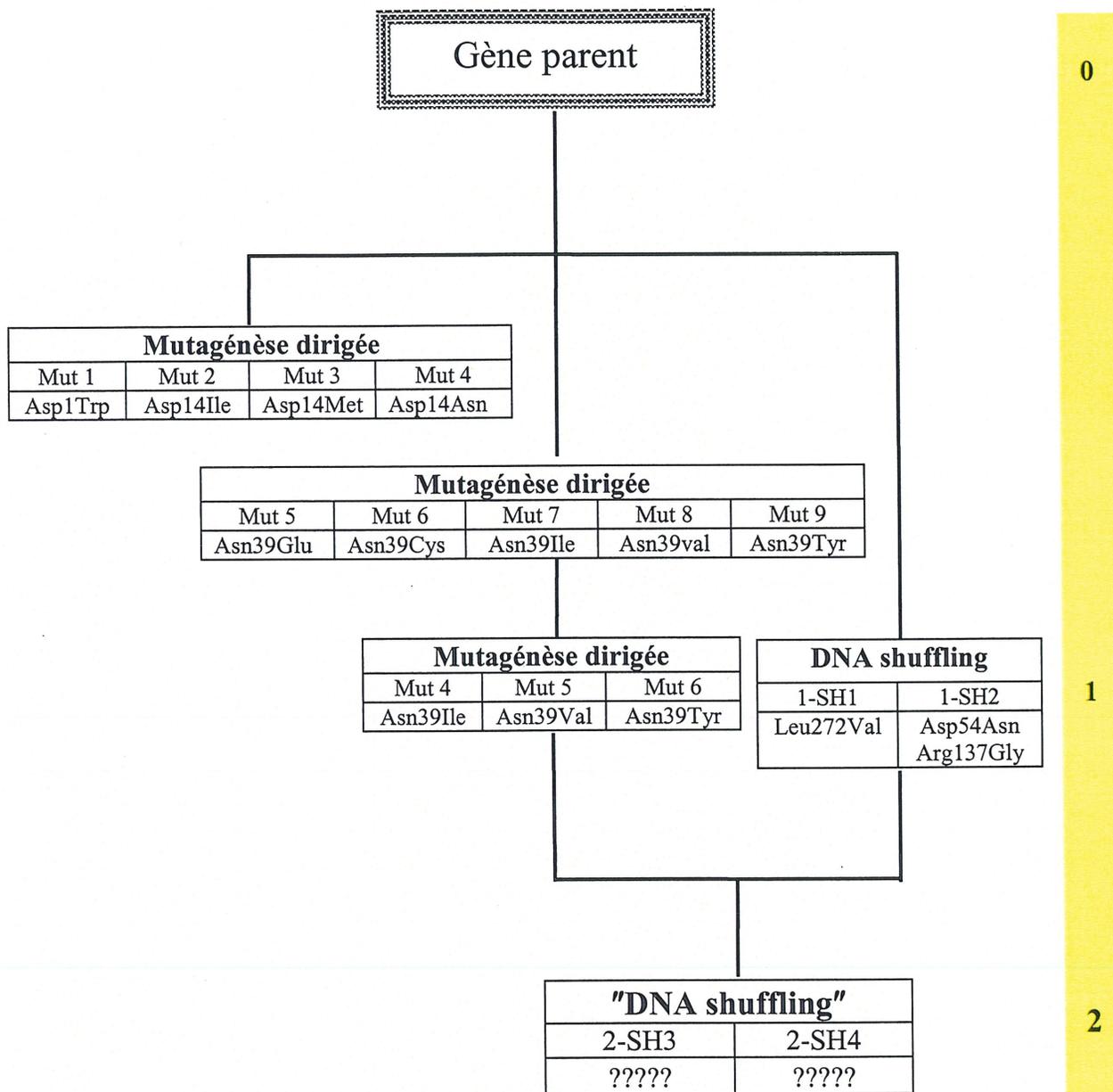


Figure 20. Famille des variantes d'inosine uridine nucléoside hydrolase obtenues par évolution moléculaire dirigée. Les variantes de l'enzyme sont indiquées selon le type de technique de mutation : Mut identifie les variantes obtenues par mutagenèse dirigée et SH celles obtenues par "DNA shuffling". Les substitutions en acides aminés sont précisées aussi pour chacune des variantes.

nous ait généré plus de 200 colonies, après analyse de l'ADN plasmidique de quelques clones, aucun de ces mutants a montré une incorporation de l'insert, et ce malgré plusieurs essais répétés avec des nouveaux lots d'enzymes et de nouveau stocks de vecteur. Le produit de la PCR après amplification avec les amorces avait montré une bande unique de 1 kb sur gel d'agarose comme celui qui a été présenté à la figure 13D (puits 5). Donc il ne s'agissait pas à priori d'un échec de réassemblage. Des travaux ultérieurs dépassant le cadre de l'étude présente seront nécessaires pour élucider ce problème.

3. DISCUSSION

Nous nous sommes engagés dans un projet d'ingénierie de protéine visant à rendre l'enzyme IU-NH capable non seulement d'hydrolyser le pNPD comme substrat mais aussi capable de synthétiser des nucléosides nouveaux en milieu non-aqueux. Nous avons décidé d'utiliser deux stratégies différentes d'évolution moléculaire dirigée pour réaliser ce projet. La première stratégie devait permettre à l'enzyme d'hydrolyser un nouveau substrat (*p*-nitrophényl désoxyribose) après mutagenèse dirigée de saturation. Deux positions sur le site actif du gène IU-NH pouvant faciliter l'interaction de l'enzyme avec le nouveau substrat ont été mutées dans cette optique. La deuxième stratégie d'évolution moléculaire devait permettre, en soumettant le gène entier au "DNA shuffling", de créer des mutations permettant d'améliorer l'activité enzymatique dans un milieu non-aqueux.

De nouvelles techniques développées vers la fin des années 80 et 90 m'ont permis d'obtenir deux enzymes mutées avec une activité améliorée en milieu non-aqueux. L'évolution dirigée d'enzymes vise à imiter le processus de l'évolution naturelle des enzymes. Les diverses approches disponibles permettent non seulement d'obtenir une amélioration spécifique mais aussi de l'obtenir sur une période relativement courte. Dans notre cas précis, la méthode recombinatoire, appelée "DNA shuffling", a été utilisée pour la création d'une librairie de gènes mutés. L'expression de ces gènes dans *Escherichia coli*, combinée au séquençage des variantes d'enzymes sélectionnées, nous a permis d'identifier quelques substitutions d'acides aminés qui ont permis d'améliorer l'activité de l'enzyme IU-NH en milieu non aqueux. La figure 1 résume l'approche que nous avons utilisée pour obtenir des variantes d'IU-NH possédant des propriétés améliorées par rapport à l'enzyme originelle. Diverses approches de

recombinaison *in vitro* étaient disponibles pour atteindre l'objectif du projet, comme les nouvelles méthodes recombinatoires d'Arnold citées plus haut, le StEP (*Staggered Extension Process*) et le RPR (*Random Priming in vitro Recombination*) et aussi RACHITT (*Random chimeragenesis on transient templates*) (Coco et al., 2001), qui ont toutes comme conséquence de créer une banque de gènes mutés de diversité élevée. Cependant, l'adaptation à un nouveau substrat était un élément particulièrement difficile à réaliser, dû au fait qu'il n'était pas clair si la stratégie adoptée pouvait fonctionner dans ce cas particulier.

3.1. Analyse des variantes obtenues par mutagenèse dirigée

La mutagenèse de saturation avec des amorces dégénérées s'est avérée une technique simple et pertinente pour produire une librairie de gènes mutés. Nous avons créé des mutations individuelles de façon à favoriser l'acceptation d'un nouveau substrat, le pNPD. Les résultats obtenus pour cette partie du projet nous amènent à conclure que les mutations obtenues n'ont aucunement amélioré l'activité enzymatique en présence des deux substrats. La mutation créée à la position 14 nous indique que cette mutation avait rendu l'enzyme inactive et/ou instable. Les mutants obtenus (Asp14Trp, Asp14Ile, Asp14Met et Asp14Asn) avaient perdu presque complètement leur activité biologique, soit 90% de perte avec le pNPR. La mutation à la position 14 semble donc affecter grandement l'activité de l'enzyme, avec ou sans DMF, avec ce substrat. La mutation n'a pas non plus permis à l'enzyme d'hydrolyser le nouveau substrat, le pNPD. Ce qui suggère fortement que le résidu à la position 14 est bien impliqué dans l'activité catalytique de la nucléoside hydrolase (IU-NH). Ce résidu est situé près de la

poche de liaison au substrat (2,8Å) (Degano et al., 1998) par rapport aux autres groupements hydroxyles faisant la liaison avec le carbone C-2 du substrat (figure 21). Ce qui nous amène à dire que Asp14 est directement impliqué dans la liaison de l'enzyme au substrat, et que le remplacement de cet acide aminé par un autre différent affecterait l'interaction avec le substrat. Le tableau 3 illustre les changements de base obtenus sur le gène, mais ceux-ci n'ont amené, tel que mentionné plus tôt, aucune des améliorations recherchées.

La figure 9 aide à mieux comprendre l'interaction entre l'inhibiteur *p*-aminophényl iminoribitol (pAPIR) apparenté aux deux substrats étudiés, le pNPR et le pNPD, et l'enzyme IU-NH. Cette structure illustre l'emplacement de l'ion calcium fortement lié dans le site catalytique et qui participe de concert avec l'eau nucléophile et le groupement riboxyl du substrat durant la formation de l'état de transition (Miles et al., 1999 ; Shi et al., 1999b). Shi et ces collaborateurs (1999b) ont indiqué que l'enzyme IU-NH exige la présence de ces trois groupements hydroxyles, (2'-, 3'-, et 5') pour assurer efficacement la liaison et la catalyse du substrat. L'attachement de l'ion calcium (Ca^{2+}) est en coordination avec les atomes d'oxygène contribués par les groupements hydroxyles 2' et 3' de l'inhibiteur (Miles et al., 1999). De plus les résidus Asp-14 (2,8 Å) et Asn-39 (3,1 Å) de l'enzyme IU-NH sont fortement impliqués dans la liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle 2' de l'inhibiteur (Shi et al., 1999b ; Degano et al. 1998). Il va de soi qu'une mutation à ces positions ne pouvait qu'entraîner une baisse significative de l'activité de l'enzyme IU-NH avec le pNPR, ou son absence avec le pNPD. L'absence d'un atome d'oxygène sur le C-2 du

Tableau 3. Changements introduits au niveau de certains nucléotides conduisant à certaines substitutions d'acides aminés de l'enzyme IU-NH et effectués par mutagenèse dirigée.

Position de l'acide aminé	Gène de départ	Enzyme mutée montrant une activité hydrolytique (avec le pNPR ¹)
14	GAC Asp (D)	TGG Trp (W) ATT Ile (I) AAC Asn (N) ATG Met (M)
39	AAC Asn (N)	TGC Cys (C) TGT Cys (C) GTT Val (V) ATT Ile (I) GAG Glu (E) TAC Tyr (Y)

pNPR¹ : *p*-nitrophényl riboside

substrat pNPD pourrait empêcher l'interaction avec l'enzyme au niveau de l'acide aminé Asp-14. Par contre, pour les mutants à la position 39 (Asn39Glu, Asn39Cys, Asn39Tyr, Asn39Ile, et Asn39Val), les résultats d'activité enzymatique obtenus avec le pNPR ont indiqué une baisse d'activité de l'ordre de 10 à 30% par rapport à l'enzyme de départ. Mais, avec le pNPD, l'activité a été inexistante comme ceux à la position 14. Ce qui suggère que le résidu à la position 39 (Asn-39) est aussi impliqué dans l'activité de l'enzyme mais certainement pas aussi fortement que celui de la position 14. On pourrait souligner que ce résidu, bien qu'il participe à l'activité de l'enzyme, est probablement plus éloigné du site de liaison (3,1Å versus 2,8Å) au substrat (Degano et al., 1998). Cette position semble mieux accepter les changements d'acide aminé que la position 14, bien qu'avec une activité enzymatique réduite avec le pNPR.

Vu que l'activité enzymatique obtenue avec les différents mutants, surtout ceux à la position 14, n'avait pas été satisfaisante, et considérant aussi le nombre de mutants qui montraient une délétion avant le site de mutation, nous avons conclu qu'il n'était pas justifié de poursuivre cette partie du projet. Cette étude a indiqué qu'il est difficile d'obtenir des modifications avantageuses au niveau de certains résidus participant à l'interaction avec le substrat, ou de modifier le site de liaison du substrat avec l'enzyme pour favoriser une activité biologique sur un autre substrat, comme le pNPD. En d'autres termes, l'absence d'activité enzymatique sur le pNPD pourrait s'expliquer par le fait que le contact (le couplage) avec l'enzyme était réduit à cause de l'absence d'un atome d'oxygène à la position C-2, un site important pour l'interaction avec l'enzyme.

L'état de transition de toutes les nucléosides hydrolases nonspécifiques est connu : il consiste à la formation de l'ion ribooxocarbenium (Degano et al., 1998). La figure 21 explique comment se forme l'état de transition avec la formation de l'ion ribooxocarbenium et la libération du *p*-nitrophénylate produit lors de l'interaction avec l'enzyme IU-NH. Si le site catalytique est suffisamment flexible autour du groupe partant, comme dans le cas du pNPR, des interactions favorables peuvent alors se réaliser facilement avec les trois groupements hydroxyles.

3.2. Analyse des variantes obtenues par "DNA shuffling"

Les enzymes jouent un rôle important en biotechnologie, que ce soit en recherche fondamentale ou appliquée. Cependant, l'ingénierie des enzymes par conception rationnelle est toujours un problème difficile. Toute prévision de modification de la spécificité d'une enzyme vis-à-vis un substrat, qui est basée sur l'information structurale de l'enzyme, est incertaine et pourrait conduire à aucun résultat positif.

Dans ce projet, l'évolution dirigée ("DNA shuffling") était une alternative attrayante puisqu'elle ne fait pas appel à l'utilisation de connaissances structurales. Avec cette approche, si le taux de mutation est satisfaisant et si les procédures de sélection sont correctement établies, la fonction désirée d'une enzyme augmente généralement avec chaque ronde. Nous avons donc employé le "DNA shuffling" comme stratégie pour faire évoluer une nucléoside hydrolase (IU-NH) vers une synthase possédant une activité améliorée.

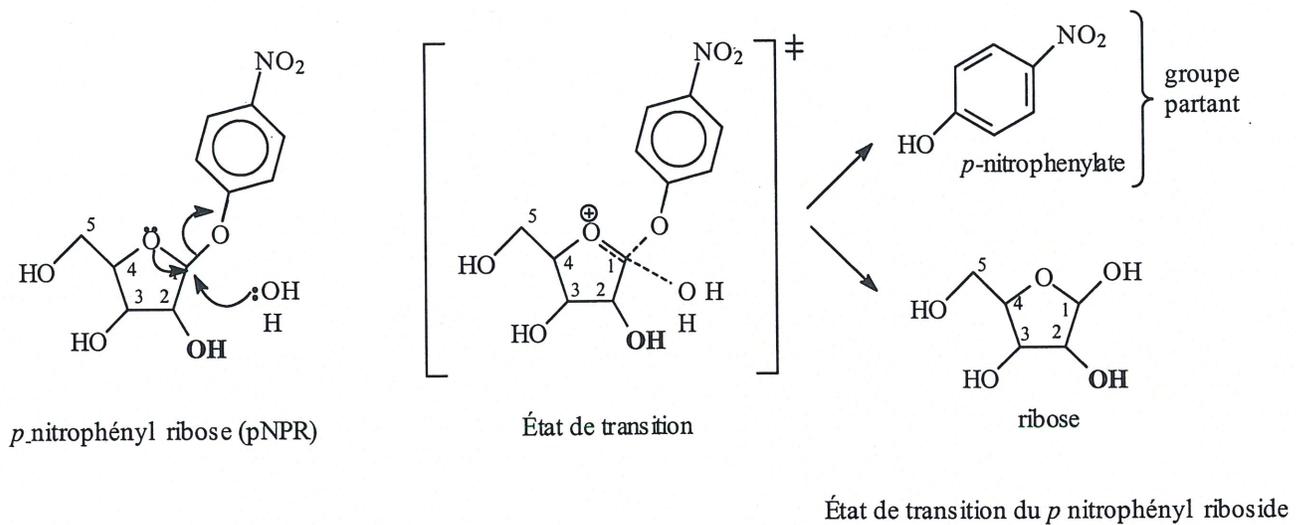


Figure 21. Structure du substrat, le *p*-nitrophényl riboside (pNPR), et structure de l'état de transition incluant la protonation du groupe partant, le caractère de l'ion riboxocarbenium du ribose et la pré-association de l'eau. L'ion riboxocarbenium du ribose est l'état de transition du substrat et se lie avec l'enzyme (inspiré Delgano et al., 1998).

L'approche utilisée devait nous permettre normalement d'obtenir, après un premier cycle de recombinaison, une basse fréquence de mutation qui devait générer une à deux mutations par variante obtenue. Ce résultat initial servirait ensuite à accumuler plus de mutations dans les cycles suivants de recombinaison. Bien que la librairie de première génération n'aie pas été très abondante, deux variantes améliorées ont été isolées après le premier cycle de PCR. En principe, la spécificité vis-à-vis le substrat est habituellement déterminée par plusieurs acides aminés, et l'introduction d'une mutation n'est pas toujours suffisante pour permettre une grande amélioration de l'activité enzymatique. Selon Stemmer (1994a), le taux de mutation devait normalement dépendre de la longueur des fragments obtenus lors de la fragmentation et qui sont utilisés pour l'étape de réassemblage. Zhao et Arnold (1997a) ont démontré que le taux de mutation dépend également de la fidélité des enzymes de polymérase utilisées pour le réassemblage ; ils ont obtenu 5 mutations sur un gène de 1kb, ce qui est un bas taux de mutation. Ces deux paramètres pourront être modifiés pour les prochaines expériences de "DNA shuffling" qui constitueront la suite de ce projet et viseront à obtenir davantage de mutations.

La procédure de "DNA shuffling" utilisée, et avec la taille des fragments obtenus allant de 50 à 100 pb (figure 13B), nous a permis d'isoler seulement deux variantes, 1-SH1 et 1-SH2. L'un des deux variantes a présenté une amélioration assez significative de l'activité avec le substrat, le pNPR, en comparaison avec celle de l'enzyme de départ. Le meilleur clone dérivé du premier cycle de "DNA shuffling" contenant des mutations intéressantes aux positions 54 et 137 du gène IU-NH, a montré une activité améliorée avec le pNPR. Cette variante, 1-SH2,

affichait 3 fois plus d'activité que l'enzyme de départ dans un milieu aqueux (sans DMF). Toutefois, la variante 1-SH2 fut sans aucune activité sur l'autre substrat, le pNPD.

Les paramètres cinétiques illustrés dans le tableau 4 pour l'enzyme de départ ainsi que des enzymes mutées 1-SH1 et 1-SH2 pour la réaction d'hydrolyse du pNPR ont été déterminés avec des enzymes non purifiées par la méthode de régression non-linéaire de Marquardt, (1963). L'erreur standard sur ces paramètres identifiés a été estimée à partir de la matrice de co-variance des paramètres (Beck et Arnold, 1977). Ainsi, la constante de dissociation de l'enzyme mutée 1-SH2, obtenue par l'algorithme de régression de Marquardt, est 4 fois plus élevée que l'enzyme de départ, dans un milieu aqueux (sans DMF), et sa vitesse maximale est fortement améliorée soit de 6 fois plus que l'enzyme de départ (Tableau 4). L'enzyme de départ ne montrait une activité mesurable que jusqu'à 30% en DMF, et très faible en plus, et la constante de dissociation obtenue par l'algorithme de régression de Marquardt augmentait en parallèle à la concentration de DMF, allant de 235,4 à 275 μM , pour 10 à 30% de DMF.

L'enzyme mutée 1-SH2, dans un milieu non aqueux (avec DMF), a montré une activité fortement améliorée par rapport à l'enzyme de départ dans des concentrations élevées de DMF. L'enzyme mutée 1-SH2, dans 30% de DMF, a montré une amélioration de sa vitesse maximale (V_{max}) de 6 fois et une valeur de K_m 1,78 fois plus élevées que les valeurs obtenues avec l'enzyme originelle et de 1,75 fois plus faible de cette même enzyme dans un milieu aqueux (Tableau 4). On a même noté une activité appréciable dans 50% de DMF pour ce mutant, ce qui n'était pas le cas avec l'enzyme de départ. Dans des concentrations croissantes

Tableau 4. Constantes cinétiques de l'enzyme inosine uridine nucléoside hydrolase mesurées pour l'hydrolyse du *p*-nitrophényl riboside dans 50mM HEPES pH 8,0 contenant 0, 10, 30 et 40% de DMF à température de la pièce.

Génération	0% DMF		10% DMF		30% DMF		40% DMF	
	V_{\max} $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	K_m μM	V_{\max} $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	K_m μM	V_{\max} $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	K_m μM	V_{\max} $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	K_m μM
Wild type	20,03±0,89	182±18	16,9±1,2	235,4±34	7,9±0,3	275±21	Pas d'activité suffisante	
1-SH1	88±5,2	331,5±36	104,2±18	600,5±161	50±9,5	509±157		
1-SH2	121,7±28,8	710,2±246	73,9±17,3	456,7±177	47,5±10	491,1±169	33,2±8,9	394,5±183

Constantes cinétiques de la littérature	Enzyme originelle	
	K_{cat} (S^{-1})	K_m (μM)
Shi et al. (1999)	220±17	185±32
Gopaul et al. (1996)	220±10	110±10
Mazella et al. (1996)	239±32	58±23

de solvant organique (DMF), la variante 1-SH2 a montré une nette amélioration, la vitesse maximale étant de 4,4 à 6 fois plus élevée que celle de l'enzyme originelle et des valeurs de K_m moins élevées à chaque ajout de solvant organique, ce qui indique que l'enzyme présente une affinité résiduelle très intéressante dans un milieu non-aqueux (Tableau 4). Ces résultats indiquèrent que la méthode d'évolution dirigée a grandement amélioré l'activité catalytique de la IU-NH en milieu organique (DMF). Il faut néanmoins tenir compte du fait que ces enzymes sont non-purifiées et que le niveau d'expression de l'enzyme a pu varier entre le wild-type et les mutants. Ces résultats devront être confirmés ultérieurement avec les enzymes purifiées.

L'autre variante intéressante, 1-SH1, a montré une amélioration de 4,4 fois plus de son activité avec le pNPR dans un milieu aqueux (sans DMF) que l'enzyme de départ. Cette variante, avec une seule mutation à la position 272, a montré, dans un milieu non-aqueux (avec DMF), 10% DMF, une vitesse maximale 6,2 fois plus élevée par rapport à celle de l'enzyme de départ avec le pNPR et un K_m légèrement plus élevé de 2,6 fois. Mais dans des concentrations croissantes de solvant organique (DMF), l'enzyme mutée 1-SH1 a montré des valeurs de K_m légèrement plus élevées que celles de l'enzyme mutée 1-SH2, soit 1,3 fois à 10% DMF et 1,03 fois à 30% DMF. Et par rapport dans un milieu aqueux, l'enzyme 1-SH1 présentent une constante de dissociation à 10% DMF plus élevée, ce qui laisse suggérer que l'enzyme perde son affinité résiduelle à 10% DMF.

3.3. Effets de substitutions d'acide aminé sur l'efficacité catalytique de l'IU-NH dans les mélanges eau-DMF

L'utilité technologique des enzymes peut être améliorée considérablement en les utilisant dans des solvants organiques plutôt que dans un milieu aqueux, leur environnement naturel. L'absence de l'eau souvent favorise la réalisation de nouvelles réactions enzymatiques. Une des principales méthodes pouvant mener à l'obtention de ce type d'enzymes capable de fonctionner dans un milieu non-aqueux est le "DNA shuffling". Bien que les solvants organiques polaires, comme le DMF, soient d'excellents milieux pour beaucoup de transformations chimiques, ces solvants souvent affectent grandement la stabilité et l'activité de l'enzyme naturelle. Le DMF a réduit considérablement l'efficacité catalytique de la nucléoside hydrolase (IU-NH) originelle tel qu'illustré dans la figure 18 et le tableau 4. On peut constater qu'il y a eu baisse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat dans le cas de l'enzyme naturelle testée en présence de DMF. Par rapport à la littérature, La valeur de K_m mesurée dans notre étude était tout à fait comparable ou presque identique aux résultats obtenus par Shi et al. (1999b) dans un milieu aqueux (Tableau 4).

Les substitutions d'acide aminé identifiées chez les deux variantes les plus prometteuses, 1-SH1 et 1-SH2, ont certainement joué un rôle positif dans l'amélioration de l'activité de l'enzyme en milieu organique (avec DMF). Les deux acides aminés, Asp54 tout comme Arg137 de 1-SH2, sont bien éloignés des acides aminés critiques à la catalyse (figure 22), alors que ceux des positions 14 et 39 sont situés à l'intérieur de la poche responsable et

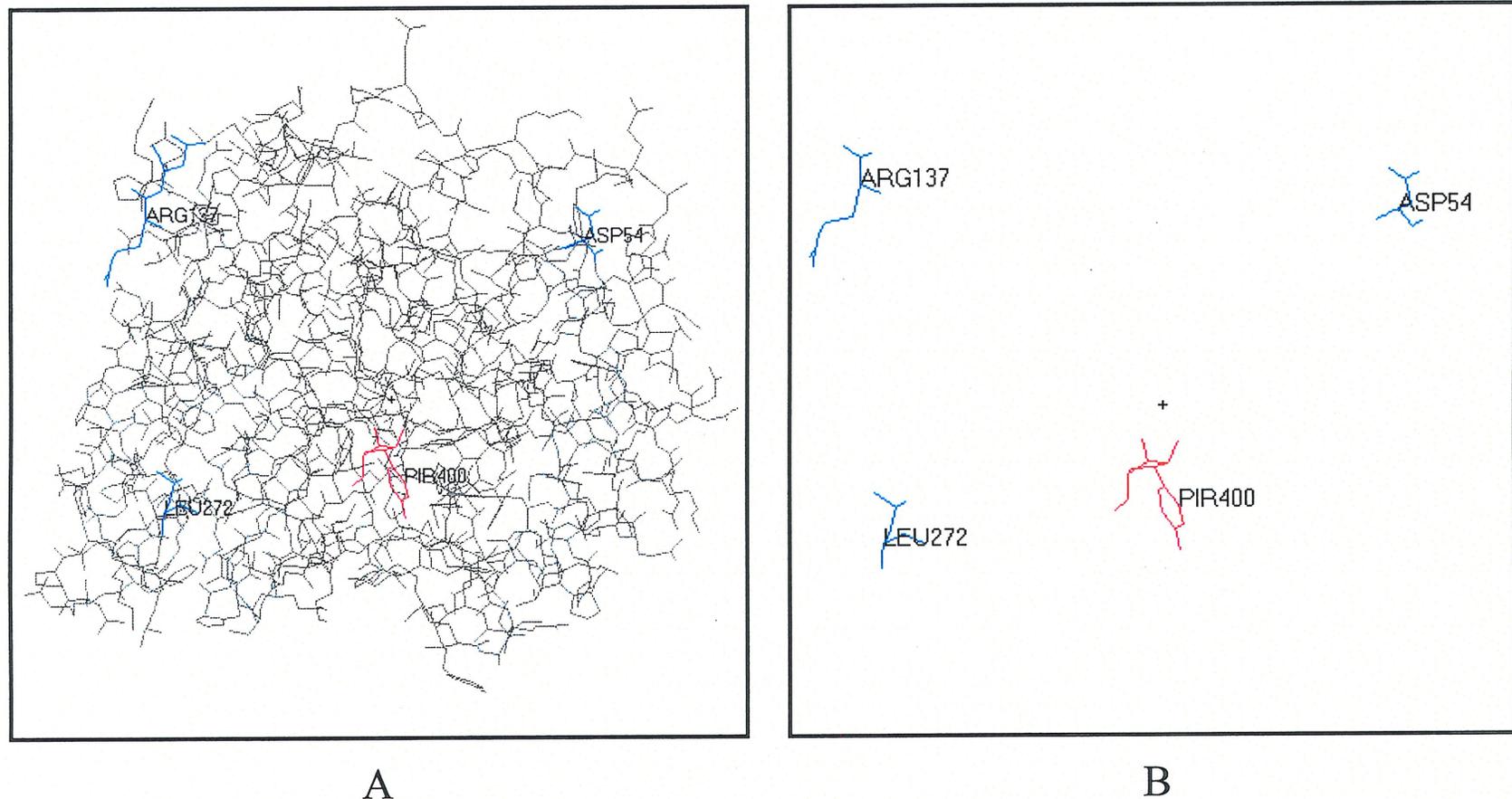


Figure 22. Représentation graphique de la position des mutations dans les variantes 1-SH-1 et 1-SH-2. La figure est basée sur la structure de l'IU-NH (Degano et al. (1996); fichier 2MAS.pdb; image réalisée avec le logiciel SwissPDB).

- La partie A représente la structure complète de l'une des sous-unités avec l'inhibiteur pAPIR qui occupe le site actif,
- La partie B montre seulement les positions mutées avec l'inhibiteur pAPIR.

participent à l'interaction avec le substrat (figure 9). Ces sites extérieurs pourraient être impliqués dans l'interaction de l'enzyme avec les solvants non-aqueux. La position de ces mutations, à l'extérieur de la structure, pourrait également être liée à un changement dans la stabilité de la structure homotétramérique de la forme active de l'enzyme dans les solvants non-aqueux. Les nouveaux acides aminés (Asp54**Asn** et Arg137**Gly**) ont conduit à une affinité plus élevée de l'enzyme pour le pNPR dans un milieu non-aqueux (avec DMF), tel qu'observé à partir des nouvelles valeurs de K_m (Tableau 4). Ce résultat est similaire à ceux obtenus par Moore et ses collaborateurs (1997), qui ont amélioré l'activité de l'enzyme *p*-nitrobenzyl estérase, une enzyme utilisée dans la voie de synthèse d'un antibiotique, d'un facteur 100 dans 30% de DMF avec des mutations obtenues loin de la zone de contact avec le substrat. Ceci nous amène à dire que ces deux résidus de 1-SH2, Asp54**Asn** et Arg137**Gly**, participent probablement à la stabilisation de l'enzyme en milieu non aqueux. Les valeurs de vitesse maximale (V_{max}) mesurées avec la variante 1-SH2 étaient plusieurs fois plus élevées que celle de l'enzyme de départ, avec ou sans DMF, et les valeurs de K_m baissaient dans des concentrations croissantes de solvant organique (DMF). Ce qui laisse présager que l'enzyme montra une meilleure affinité pour le substrat dans un milieu non-aqueux (avec DMF) que dans un milieu aqueux (sans DMF). Cette même enzyme mutée, 1-SH2, dans 40% de DMF, a vu sa valeur de K_m baisser de presque la moitié. Le K_m de la variante 1-SH2 est passé dans un milieu aqueux (sans DMF) de $710,2 \pm 246$ à $394,5 \pm 183$ μM dans un milieu non aqueux (avec 40% de DMF). Par rapport à l'enzyme de départ testée dans un milieu aqueux (sans DMF), la variante 1-SH2 montra une valeur de vitesse maximale (V_{max}) 1,7 fois plus élevée, et ce, en présence de 40% DMF.

Si nous considérons maintenant la variante 1-SH1, nous remarquons que dans un milieu aqueux (sans DMF) la valeur de K_m obtenue était de 1,82 fois plus élevée que celle de l'enzyme originelle, alors que sa vitesse maximale était 4,4 fois plus élevée. Mais avec 10% de DMF, nous constatons que la vitesse maximale de 1-SH1 augmenta de 5,2 fois que celle de l'enzyme originelle et un résultat similaire (2,5 fois) fut obtenu avec 30% DMF. Les valeurs de K_m pour la variante 1-SH1, toutefois, furent significativement plus élevées en présence de DMF.

Afin de déterminer si les mutations que nous avons identifiées dans 1-SH1 et 1-SH2 correspondent à des acides aminés conservés dans l'évolution des nucléosides hydrolases, cinq protéines proches dans cette famille ont été identifiées avec le logiciel BLAST et subséquemment alignées avec le logiciel ClustalW 1,6. Les mutants des positions 14, 39 ainsi que des clones SH1 et SH2 ont été ajoutés et visualisés sur cet alignement (figure 23). La figure 23 nous indique que les positions 14 et 39 sont totalement conservées dans les six protéines (indiqué par un astérisque sur la ligne consensus), ce qui peut expliquer que les mutants à ces positions n'aient pas été actifs. Par contre, la position du mutant 1-SH1 (272) n'est pas aussi fortement conservée (indiqué par un point dans la ligne consensus du logiciel ClustalW). Pour ce qui est des positions 54 et 137 du mutant 1-SH2, elles sont plus variables, ce qui peut expliquer que nos mutations peuvent être tolérées et même mener à une activité plus grande en milieu non-aqueux.

3.4. Développement d'une technique de criblage

Nous avons développé une méthode de criblage sensible et efficace pour les protéines intracellulaires permettant d'identifier facilement les mutants qui présenteront une amélioration de l'activité enzymatique dans le solvant organique employé. Cette technique de criblage pourrait s'avérer très utile dans le cas des bibliothèques de clones ne pouvant pas accumuler la protéine d'intérêt à l'extérieur de la cellule. Plusieurs étapes de criblage ont été réalisées ; la première étape impliqua des plaques de 24 puits pour la croissance bactérienne et l'étape d'induction à l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (figure 15). Le criblage final, fait pour mesurer l'hydrolyse des deux substrats désirés, a été suivi par la production du *p*-nitrophénylate dans des plaques en quartz de 96 puits, avec ou sans DMF (figures 15 et 16). Le séquençage d'ADN a été effectué à partir des colonies présentant les résultats les plus prometteurs, ceci afin de définir la position et la nature des substitutions d'acide aminé impliquées.

3.5. Recombinaison des mutations positives et perspectives

Les nombreuses études d'ingénierie de protéines ont prouvé que des mutations positives, identifiées par criblage de colonies ou par analyse de la structure tridimensionnelle, peuvent être souvent combinées pour des effets bénéfiques supplémentaires. La figure 23 résume aussi les séquences en acides aminés des mutants évolués obtenus dans cette étude, lesquels forment une première famille des variantes de l'IU-NH. Les séquences Asn39Val, Asn39Ile, Asn39Tyr ont été obtenues par mutagenèse dirigée et les séquences 1-SH1 et 1-SH2 ont été

```

1              14              39              54
Wild-type      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asp14Asn      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asp14Ile      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asp14Met      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asp14Trp      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asn39Val      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGVYQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asn39Ile      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGVYQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Asn39Tyr      --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGVYQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Mutant 1-SH1  --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Mutant 1-SH2  --MPKKIILDGCDPGLDDAVAILLAHGNPEIELLAITTVVGNQTLAKVTRNAQLVADIAGI
Leish_major   --MPRKIILDGCDPGIDDAVAIFLAHGNPEIELLAITTVVGNQSLEKVTQNARLVADVAGI
Leish_donov   --MPRKIILDGCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITTVVGNQTLKVTNRNARLVADVAGI
Mesor_loti    ---MEKIIILDGCDPGHDDAIAILLAAAGNPKIDLLGITTVSGNHNVENTTRNALSVCYAYGI
Mesor_loti2   MPQPRKIIIDTDPGQDDAVAILLAGSSELEIVGITAVAGNVPLKLTTEKNARKICELAGR
Paste_multo   ---MKKIIILDGCDPGHDDAIAILLAAHGNPEIDLLAITTVVGNQTLKVSARNALVAEIANI
Consensus     ***.*.*** **.* ** *   .... **.* ** .   ** ..

```

```

60              100
Wild-type      TGVPIAAGCDKPLVRKIMTAGHGHGSGMGTVAYPAEFKNKVDERHAVNLIIDLVMSEHP
Mutant 1-SH1   TGVPIAAGCDKPLVRKIMTAGHGHGSGMGTVAYPAEFKNKVDERHAVNLIIDLVMSEHP
Mutant 1-SH2   TGVPIAAGCDKPLVRKIMTAGHGHGSGMGTVAYPAEFKNKVDERHAVNLIIDLVMSEHP
Leish_major    VGVVPAAGCTKPLVRGVRNASHIHGETGMGNVSYPPPEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEP
Leish_donov    VGVVPAAGCTKPLVRGVRNASQIHGETGMGNVSYPPPEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEP
Mesor_loti     K-VPVAKGSPGLIIDQVLAVEIHGDTGLDGPVLP-PASFELDRRHAVDFIIDTVMAHEP
Mesor_loti2    PEMKVYAGAIRPLARTLVTAEEVHGKTGLNGPQLP-EPTMKLQEYAVDFIVETLMKEES
Paste_multo    LNVPIAKGCVRPLVREVEVAPSIHGSGMDGVPVLP-EPTLSLDSRHAVDLIELVMTHPP
Consensus     . . * . **   * .** .*   *   .   ** *.. .*

```

```

120            137            160
Wild-type      KTITLVPTGGLTNIAMARLEPRIVDRVKEVVLMMGGYHEG-NATSVAEFNIIDPEAAH
Mutant 1-SH1   KTITLVPTGGLTNIAMARLEPRIVDRVKEVVLMMGGYHEG-NATSVAEFNIIDPEAAH
Mutant 1-SH2   KTITLVPTGGLTNIAMAAELEPRIVDRVKEVVLMMGGYHEG-NATSVAEFNIIDPEAAH
Leish_major    KTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEVVLMMGGYHTG-NASVPAEFNVFIDPEAAH
Leish_donov    KTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEVVLMMGGYHTG-NASVPAEFNVFVDPEAAH
Mesor_loti     KTVTLVPGPYTNIALAVRKDPRIVERVKRVVAMGGSFTRG-NITPAAEFNVYADPEAAD
Mesor_loti2    GTITLCPGPLTNIALALIREPRIAPRIKEIVLMGGGFFEGGNVTPAAEFNIYVDPQAAD
Paste_multo    KTITLVPTGGLTNIAMAVRKEPRIVERVKEIVLMGGYHTG-NWSVAEFNIKIDPEAAH
Consensus     *.** * *   ****.*   .*** *.* .* *** .   * * .   ****.   **.**

```

```

180            200            230
Wild-type      IVFNESWQVTMVGDLDLTHQALATPPILQRVKEVDTNPARFMLEIMDYTKIYQSNRYMAA
Mutant 1-SH1   IVFNESWQVTMVGDLDLTHQALATPPILQRVKEVDTNPARFMLEIMDYTKIYQSNRYMAA
Mutant 1-SH2   IVFNESWQVTMVGDLDLTHQALATPPILQRVKEVDTNPARFMLEIMDYTKIYQSNRYMAA
Leish_major    IVFNESWNVTMVGDLDLTHLALATPAVQKRVREVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKE-HDTY
Leish_donov    IVFNESWNVTMVGDLDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKE-RNTY
Mesor_loti     VVFRAGWDVTMVGDLDLTHQALATPDLQDRVAVGGPMAKFIIDWAFIATTHGGLLQIEF
Mesor_loti2    LVFKSGIPIVMMPLDVTHKALTTTKRTQAFRALGTVKGIATAEMLEFFERYDEGKYGTDG
Paste_multo    IVFNEKWSLTMVGDLDLTHQALATEDVIKNIKIQTKPAKFVLELLAFFRKMVKQAQNFYD
Consensus     .**   . * . *** ** **.*

```


obtenues suite à une première ronde de "DNA shuffling". La recombinaison de ces mutants devrait permettre d'accroître la diversité des variantes en espérant que certaines des variantes présenteront soit une amélioration supplémentaire et/ou seront capables d'activité sur un nouveau substrat, le pNPD. La fréquence de mutation est un élément primordial pour améliorer toute protéine. Par exemple, un niveau souhaitable de mutations dans le cas de l'évolution dirigée est d'environ 2 à 5 substitutions de bases par gène (Arnold, 1998a ; Moore et al., 1997). Pour une séquence de 1 kb, selon Zhao et ses collaborateurs (1999), la fréquence de mutation devrait être de 0,2 à 0,5% environ.

Suite à nos premières expériences, nous avons trouvé en moyenne deux mutations par kilobase d'ADN et beaucoup de gènes portant de mutations silencieuses. Un tel taux de mutagenèse n'est pas optimal et a conduit à un nombre élevé de protéines "originelles". La deuxième ronde d'évolution par "DNA shuffling" ne nous a pas permis d'obtenir plus d'informations potentiellement utiles sur une génération de variantes qui pourraient être identifiées comme améliorées. Dans cette partie du travail, nous avons été trop ambitieux en voulant créer de nombreuses mutations et nous avons probablement obtenu un taux de mutation beaucoup plus élevé lors de cette deuxième génération et il est probable que les sites de restriction aient été perdus. Ou encore, l'introduction des amorces situées aux extrémités, lors de l'étape de réassemblage par PCR avec des amorces, a pu être telle que la reconstitution du gène fut empêchée malgré la présence de l'insert tel qu'illustré dans la figure 13D, (puits 4 et 5). Suite à l'analyse du plasmide isolé par Miniprep et digéré avec les mêmes enzymes, *EcoRI* et *NotI*, l'absence évidente de l'insert fut observée. Ainsi, les

produits PCR n'ont pas pu s'insérer dans le plasmide. Normalement, cette deuxième étape de recombinaison aurait dû donner une librairie abondante et diversifiée, découlant de la recombinaison des fragments dérivés de plusieurs variantes. Cette partie du travail de recombinaison nous a permis de comprendre que chercher à améliorer le taux de mutation en utilisant de l'ADN polymérase *Taq*, sensée créer plus d'erreurs, n'est pas nécessairement avantageux. Il sera peut être plus avantageux d'effectuer plusieurs rondes de recombinaison en utilisant de l'ADN polymérase *Pfu*, laquelle donne plus de fidélité, jusqu'à l'obtention non seulement d'un meilleur taux de mutation mais aussi d'une banque d'enzymes mutées et améliorées.

On peut également souligner à nouveau que les premières variantes de nucléoside hydrolase (IU-NH) ont déjà montré une activité significativement améliorée dans le solvant organique (DMF), ce qui pourrait mener au développement ultérieur de procédés enzymatiques de synthèse. Il reste toutefois encore beaucoup de questions à poser et beaucoup de problèmes à résoudre.

4. CONCLUSION

Le but ultime de ce projet était de produire par évolution moléculaire dirigée des variantes de nucléoside hydrolase (IU-NH) pouvant fonctionner non seulement en solvant non-aqueux, mais capables aussi d'accepter un nouveau substrat, le pNPD. Pour ce faire, la mutagenèse ponctuelle avec des amorces dégénérées ainsi que la technique du "DNA shuffling" ont été appliquées. Des travaux antérieurs nous ont montré qu'il était faisable de modifier une enzyme pour un autre substrat. Dans la plupart des travaux réalisés dans ce domaine, la modification des résidus constituant le site de liaison avec le substrat peut améliorer ou diminuer l'activité de l'enzyme. Zhang et ses collaborateurs (1997) ainsi que Moore et Arnold (1996) ont démontré que des mutations loin du site actif peuvent aussi mener à une adaptation à un nouveau substrat. Nous avons développé une méthode très intéressante de criblage dans des plaques de 96 puits afin d'évaluer des clones accumulant intracellulairement la protéine d'intérêt. L'approche "DNA shuffling" nous a permis d'obtenir une variante ayant des propriétés améliorées dans un solvant organique (DMF). Nous avons réussi à améliorer l'activité de l'enzyme IU-NH par rapport à l'enzyme originelle de 6,3 fois dans 40% de DMF (figure 18). Les nouvelles caractéristiques et les propriétés de la variante se rapprochaient des objectifs que nous nous sommes étions fixés même si nous n'avons pas obtenu un mutant pouvant hydrolyser le nouveau substrat, le pNPD. Les protocoles utilisés sont applicables à tout projet de ce genre mais il reste toujours la possibilité de faire varier la concentration de la nucléase (DNase I) lors la première étape de fragmentation.

Pour la suite de ce projet, il sera tout à fait concevable de procéder à plusieurs cycles additionnels de recombinaison tout en sélectionnant les clones en présence de concentrations croissantes du solvant organique. Cette approche permettra d'identifier d'autres enzymes mutées et améliorées fonctionnant de mieux en mieux dans ces concentrations élevées de solvant organique, certaines pouvant même améliorer leur stabilité par la même occasion. D'autres chercheurs ont déjà réalisé ce type de projet en utilisant plusieurs cycles de recombinaison, obtenant des mutants ayant un taux de mutation acceptable tout en améliorant l'activité désirée dans de fortes concentrations de solvant organique.

Dans le cas de la mutagenèse ponctuelle avec des oligonucléotides dégénérés, il apparaît peu probable qu'il sera utile de chercher à créer une deuxième mutation sur les mutants de la position 39 pour permettre l'utilisation du pNPD. Les résultats obtenus jusqu'ici nous indiquent que l'une des positions, particulièrement la position 14, est directement impliquée dans l'activité biologique de l'enzyme. À ce stade du projet, il sera nécessaire de continuer avec l'autre technique d'évolution, le "DNA shuffling", pour obtenir un (ou des) mutants qui sera susceptible de favoriser l'hydrolyse du pNPD tout en permettant d'améliorer encore davantage l'activité de l'enzyme IU-NH dans un milieu de concentration élevée en solvant organique.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. ABÉCASSIS, D. P. et G. TRIAN. 2000. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast : statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic. Acids. Res.* 28(20) : e88.
2. AGERSBORG, A., R. DAHL et I. MARTINEZ. 1997. Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food. Microbiol.* 35(3) : 275-280.
3. ARNOLD, F. H. 1998a. Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* 31(3) : 125-131.
4. ARNOLD, F. H. 1998b. When blind is better: Protein design by evolution. *Nat. Biotechnol.* 16(7) : 617-618.
5. ARNOLD, F. H. et A. A. VOLKOV. 1999. Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin Chem. Biol.* 3(1) : 54-59.
6. ARNOLD, F. H. et J.C. MOORE. 1997. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58 : 1-14.
7. BALLAND, A., M. COURTNEY, S. JALLAT, L.-H. TESSIER, P. SONDERMEYER, H. DE-LA-SALLE, R. HARVEY, E. DEGRYSE et P. TOLSTOSHEV. 1985. Use of synthetic oligonucleotides in gene isolation and manipulation. *Biochimie.* 67(7-8) : 725-36.
8. BEUVE, A. et A. DANCHIN. 1992. From adenylate cyclase to guanylate cyclase mutation analysis of a change in substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 225 : 933-938.
9. BECK, J., V. et K. J. ARNOLD. 1977. Parameter estimation in engineering and science. John Wiley et Sons, N.Y. 501 p.
10. BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
11. BRAUNHEIM, R. W. M., V. L. SCHRAMM, et S. D. SCHWARTZ. 1999. Prediction of inhibitor binding free energies by quantum neural networks. Nucleoside analogues binding to trypanosomal nucleoside hydrolase. *Biochemistry.* 38(49) : 16076-16083.

12. CHANG, C.-C. J., T. T. CHEN, B. W. COX, G. N. DAWES, W. P. C. STEMMER, J. PUNNOMEN, et P. A. PATTEN. 1999. Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat. Biotechnol.* 17(8) : 793-797.
13. CHARTRAIN, M., P. M. SALMON, D. K. ROBINSON et B. C. BUCKLAND. 2000. Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11(3) : 209-214.
14. CHEN, K. et F. H. ARNOLD. 1991. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Bio/Technology.* 9(11) : 1073-1077.
15. CHEN, K. et F. H. ARNOLD. 1993. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(6) : 5618-5622.
16. CHEN, K., A. C. ROBINSON, M. E. VAN DAM, P. MARTINEZ, C. ECONOMOU et F., H. ARNOLD. 1991. Enzyme engineering for nonaqueous solvents. II. Additive effects of mutations on the stability and activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnol. Prog.* 7(2) : 125-129.
17. CHRISTIANS, F. C., L. SCAPOZZA, A. CRAMERI, G. FOLKERS, et W. P. C. STEMMER. 1999. Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling. *Nat. Biotechnol.* 17(3) : 259-264.
18. COCO, W. M., W. E. LEVINSON, M. J. CRIST, H. J. HEKTOR, A. DARZINS, P. T. PIENKOS, C. H. SQUIRES et D. J. MONTICELLO. 2001. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.* 19(4) : 354-359.
19. CRAMERI A., E. A. WHITCHORN, E. TATE et W. P. C STEMMER. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14(30) : 315-319.
20. CRAMERI, A., G. DAWES, E. RODRIGUEZ Jr, S. SILVER, et W. P. C STEMMER. 1997. Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 15(5) : 436-438.
21. CRAMERI, A., S-A., RAILLARD, E. BERMUDEZ et W. P. C STEMMER. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature.* 391(1) : 288-291.

22. DEGANO, M., STEVEN C ALMO, JAMES C SACCHETTINI, et VERN L SCHRAMM. 1998. Trypanosomal nucleoside hydrolase. A novel mechanism from the structure with a transition-state inhibitor. *Biochemistry*. 37(18) : 6277-6285.
23. DEGANO, M., D. N. GOPAUL, G. SCAPIN, V. L. SCHRAMM, et J. C SACCHETTINI. 1996. Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside *N*-ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*. 35(9) : 5971-5981.
24. DENG, H., A. W.-Y CHAN, C. K. BAGDASSARIAN, B. ESTUPIÑAN, B. GAMEN, R. H. CALLENDER, et V. L SCHRAMM. 1996. Trypanosomal nucleoside hydrolase. resonance raman spectroscopy of a transition-state inhibitor complex. *Biochemistry*. 35(19) : 6037-6047.
25. DESANTIS, G. et J. B. JONES. 1999. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 : 324-330.
26. DUCRET, A., M. TRANI et R. LORTIE. 1998. Lipase-catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme. Microb. Technol.* 22(3) : 212-216.
27. ENCELL L.-P., D. M. LANDIS, L. A. LOEB. 1999. Improving enzymes for cancer gene therapy. *Nat. Biotechnol.* 17(2) : 143-147.
28. ESTUPIÑAN, B., et V. L., SCHRAMM. 1994. Guanosine-inosine-preferring nucleoside *N*-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* 269(37) : 23068-23073.
29. FURNEAUX, R. H., V. L. SCHRAMM et P. C. TYLER. 1999. Transition state analogue inhibitors of protozoan nucleoside hydrolases. *Bioorg. Med. Chem.* 7 : 2599-2606.
30. GIVER, L. et F. H. ARNOLD. 1998. Combinatorial protein design by *in vitro* recombination. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 : 335-338.
31. GIVER, L., A. GERSHENSON, P.-O. FRESKGARD et F. H. ARNOLD. 1998. Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 : 12809-12813.
32. GOPAUL, D. N., S. L. MEYER, M. DEGANO, J. C. SACCHETTINI, et V. L SCHRAMM. 1996. Inosine-uridine nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Genetic characterization, crystallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue. *Biochemistry*. 35(19) : 5963-5970.

33. GUPTA, M. N. 1992. Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.* 203 : 25-32.
34. HALL, K. 1999. Directed evolution of light-activated drugs. *Medical Hypotheses.* 53(6) : 504-506.
35. KAMPEN, M. D. V. et M. R. EGMOND. 2000. Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 102 : 717-726.
36. KE, S.-H. et E.-L. MADISON. 1997. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic. Acids. Res.* 25(16) : 3371-3372.
37. KIKUCHI, M., K. OHNISHI et S. HARAYAMA. 1999. Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene.* 236 : 159-167.
38. KLIBANOV, A. M. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* 14 : 141-144.
39. KLIBANOV, A. M. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. *Trends Biotechnol.* 15(3) : 97-101.
40. KLIBANOV ALEXANDER M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* . 409 : 241-246.
41. KOGA S., J. OGAWA, L.-Y. CHENG, Y.-M. CHOI, H. YAMADA, et S. SHIMIZU. 1997. Nucleoside oxidase, a hydrogen peroxide-forming oxidase, from *Flavobacterium meningosepticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (11) : 4282-4286.
42. KOOPS, B. C., H. M. VERHEIJ, A. J. SLOTBOOM, M. R. EGMOND. 1999. Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents. *Enzyme. Microb. Technol.* 25 : 622-631.
43. KUCHNER, O. et F. H. ARNOLD. 1997. Directed evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH.* 15 : 523-530.
44. LEUNG, D., E. CHEN et D. GOEDDEL. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique.* 1 : 11-15.
45. LORIMER IAN, A., J. et IRA PASTAN. 1995. Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn²⁺. *Nucleic Acids. Res.* 23(15) : 3067-3068.

46. LORTIE, R. 1997. Enzyme catalysed esterification. *Biotechnol. Adv.* 15(1) : 1-15.
47. MARQUARDT, D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 11 : 431-441.
48. MAZZELLA, L. J., D. W. PARKIN, P. C. TYLER, R. H. FURMEAU et V. L. SCHRAMM. 1996. Mechanistic diagnoses of N-Ribohydrolases and purine nucleoside phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc.* 118 : 2111-2112.
49. MENEZ, A. 1996. Préface (5-6 p.) dans l'ingénierie des protéines et ses applications. Éditeurs : HESLOT, H. Lavoisier, Technique et documentation. Paris. 623 p.
50. MILES, R. W., P. C. TYLER, G. B. EVANS, R. H. FURNEAUX, D. W. PARKIN, et V. L. SCRHRAMM. 1999. Iminoribitol transition state analogue inhibitors of protozoan nucleoside hydrolases. *Biochemistry.* 38(40) : 13147-13154.
51. MILLER, R. L., C. L. SABOURIN, T. A. KRENITSKY, R. L. BERENS et J. J. MARR. 1984. Nucleoside hydrolases from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 259 (8) : 5073-5077.
52. MINAGAWA, H. et H. KANEKO. 2000. Effect of double mutation on thermostability of lactase oxidase. *Biotechnol. Lett.* 22 : 1131-1133.
53. MOORE J. C. et F. H. ARNOLD. 1996. Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous organic solvents. *Nat. Biotechnol.* 14(4) : 458-467.
54. MOORE, J. C., H.-M. JIN, O. KUCHNER et F. H. ARNOLD. 1997. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function : enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J. Mol. Biol.* 272(3) : 336-347.
55. NESS JON E., M. WELCH, L. GIVER, M. BUENO, J. R. CHERRY, T. V. BORCHERT, W. P.C. STEMMER et J. MINSHULL. 1999. DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.* 17(9) : 893-896.
56. OHNUMA, S., T. NAKAZAWA, H. HEMMI, A. HALLBERG, T. KOYAMA, K. OGURA et T. NISHINO. 1996. Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl diphosphate synthase by random chemical mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271(17) : 10087-10095.
57. PARKIN, D. W., B. A HORENSTEIN, D. R. ABDULAH, B. ESTUPIÑAN et V. L. SCHRAMM. 1991. Nucleoside Hydrolase from *Crithidia fasciculata*: metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. *J. Biol. Chem.* 266(31) : 20658-20665.

58. PARKIN, D. W., G. LIMBERG, P. C. TYLER, R. H. FURNEAUX, X.-Y. CHEN, et V. L. SCHRAMM. 1997. Isozyme-specific transition state inhibitors for the trypanosomal nucleoside hydrolases. *Biochemistry*. 36(12) : 3528-3534.
59. PARKIN, D. W. et V. L. SCHRAMM. 1995. Binding modes for substrate and a proposed transition-state analogue of protozoan nucleoside hydrolase. *Biochemistry*. 34(42) : 13961-13966.
60. PATTEN, P. A., R. J. HOWARD et W. P. C. STEMMER. 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 : 724-733.
61. PELLE, R., V. L. SCHRAMM et D. W. PARKIN. 1998. Molecular cloning and expression of a purine-specific *N*-ribihydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.* 273(4) : 2118-2126.
62. PUNNONEN, J. 2000. Molecular breeding of allergy vaccines and antiallergic cytokines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121(3) : 173-182.
63. REETZ, M. T. et K.-E. JAEGER. 2000. Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution. *Chem. Eur. J.* 6(3) : 407-412.
64. RYU, D. D. Y et D.-H. NAM. 2000. Biomolecular engineering: a new frontier in biotechnology. *J. Mol. Catal B Enzym.* 10(1-3) : 23-37.
65. SCHMIDT-DANNERT, C. et F. H. ARNOLD. 1999. International business communications second international symposium on directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol.* 17(4) : 135-136.
66. SCHRAMM, V. L., B. A. HORENSTEIN, C. K. BAGDASSARIAN, S. D. SCHWARTZ, P. J. BERTI, K. A. RISING, J. SCHEURING, P. C. KLINE, D. W. PARKIN et D. J. MERKLER. 1996. Enzymatic transition states and inhibitor design from principles of classical and quantum chemistry. *Int. J. Quantum. Chem.:* *Quantum Biol. Symp.* 23 : 81-89.
67. SCHRAMM, V. L. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 693-720.
68. SHAFIKHANI, S., R. A. SIEGEL, E. FERRARI et V. SCHELLENBERGER. 1997. Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *BioTechniques.* 23 : 304-312.

69. SHAO, Z., H. ZHAO, I. GIVER et F. H. ARNOLD. 1998. Random-priming *in vitro* recombinant: an effective tool for directed evolution. *Nucleic. Acids. Res.* 26 (2) : 681-683.
70. SHI, W., C. M. LI, P. C. TYLER, R. H. FURNEAUX, S. M. CAHILL, M. E. GIRVIN, C. GRUBMEYER, V. L. SCHRAMM, et S. C. ALMO. 1999a. The 2.0 Å structure of malaria purine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analogue inhibitor. *Biochemistry* 38(31) : 9872-9880.
71. SHI W., V. L. SCHRAMM et S. C. ALMO. 1999b. Nucleoside Hydrolase from *Leishmania major*: Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure. *J. Biol. Chem.* 274(30) : 21114-21120.
72. SHUBHADA, S. et P. V. SUNDARAM. 1993. Borate ion-assisted stabilisation of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae* by polyhydroxy compounds in water-miscible organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 15(10) : 881-886.
73. SIDHU, S. S. et T. J BORGFORDE. 1996. Selection of *Streptomyces griseus* protease B mutants with desired alterations in primary specificity using a library screening strategy. *J. Mol. Biol.* 257 : 233-245.
74. SMITH, G. P. 1994. The progeny of sexual PCR. *Nature.* 370 (8) : 324-325.
75. SONG J. K. et J. S. RHEE. 2000. Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A1 by evolutionary molecular engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3) : 890-894.
76. STADEN, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5 : 233-241
77. STEMMER, W. P. C, A. CRAMERI, K. D. HA, J. M. BRENNAN et H. L. HEYNEKER. 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene.* 164(1) : 49-53.
78. STEMMER, W. P. C. 1994a. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(10) : 10747-10751.
79. STEMMER, W. P. C. 1994b. Rapid evolution of protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature.* 370(9) : 389-391.

80. STEVENSON, D. E. et A. C. STORER. 1991. Papain in organic solvents: determination of conditions suitable for catalysis and the effect on substrate specificity and inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 37 : 519-527.
81. SUN, F. 1999. Modeling DNA Shuffling. *J. Comp. Biol.* 6(1) : 77-90.
82. UTAGAWA, T. 1999. Enzymatic preparation of nucleoside antibiotics. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6(3) : 215-222.
83. VERNET, T. et BROUSSEAU, R. 1996. *In Vitro* mutagenesis, In: Protein Engineering and Design. Edited by Paul R. Carey. Academic Press Inc. USA. 360 p.
84. VERSÉES, W., K DECANNIERE, R. PELLÉ, J. DEPOORTER, E. BROSENS, P. W. PARKIN et J. STEYAERT. 2001. Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *J. Mol. Biol.* 307 : 1363-1379.
85. WAGNER, C.-R. et S.-J BENKOVIC. 1990. Site-directed mutagenesis : a tool for enzyme mechanism dissection. *Trends-Biotechnol.* 8(9) : 263-270.
86. WHANG, L.-J., X.-D. KONG, H.-Y. ZHANG, X.-P. WANG et J. ZHANG. 2000. Enhancement of the activity of L-aspartase from *Escherichia coli* W by directed evolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 : 346-349.
87. YANO, T., S. OUE et H. KAGAMIYAMA. 1998. Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(4) : 5511-5515.
88. YOU, L. et F., H. ARNOLD. 1994. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein. Eng.* 9(1) : 77-83.
89. ZAKS, A. et M. KLIBANOV. 1988. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 263(17) : 8017-8021.
90. ZAKS, A. 2001. Industrial biocatalysis. *Curr. Opin Chem. Biol.* 5(2) : 130-136.
91. ZHANG, J.-H., G. DAWES et W. P. STEMMER. 1997. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4) : 4504-4509.

92. ZHANG, H. Y, K. XIANGDUO et J. ZHANG. 1999. New strategies of protein engineering-directed evolution of enzyme *in vitro*. Chinese Sci. Bulletin. 44(18) : 1641-1648.
93. ZHAO, H., J. MOORE, A. A. VOLKOV et F. H. ARNOLD. 1999. Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution. Chapitre 49 (597-604 p). In : Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Editeurs: Arnold L. Demain et Julian E. Davies. 2nd edition. Amer. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 830 p.
94. ZHAO, H., L. GIVER, Z. SHAO, J. A. AFFHOTTER et F. H. ARNOLD. 1998. Molecular evolution by Staggered Extension Process (StEP) *in vitro* recombination. Nat. Biotechnol. 16(3) : 258-261.
95. ZHAO, H. et F. H. ARNOLD. 1997a. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. Nucleic Acids. Res. 25 (6) : 1307 1308.
96. ZHAO, H. et F. H. ARNOLD. 1997b. Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. Curr. Opin. Struct. Biol. 7 : 480-485.
97. ZHAO, H. et F. H. ARNOLD. 1997c. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 94(7) : 7994-8000.