UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE
ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR

SÉBASTIEN CLAVEAU

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE PERMETTANT L'ÉVOLUTION DIRIGÉE PAR AMPLIFICATION D'ACIDE NUCLÉIQUE

OCTOBRE 2004

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Je dois mentionner que mon séjour dans le laboratoire de Marc Beauregard a été une expérience enrichissante et valorisante autant du point de vue personnel que professionnel. Le dynamisme que Marc a su faire régner dans son labo pendant mes études graduées m'a beaucoup inspiré et ses aptitudes de leader sont pour une source d'inspiration. Pour cela, je le félicite et le remercie sincèrement.

Je tiens aussi à souligner le grand professionalisme du personnel chargé de la direction du programme d'études avancées en biophysique et biologie cellulaires. Je pense entre autres à madame Margo Tourigny qui fait tout pour nous simplifier la tâche, ainsi qu'à monsieur Pierre Tancrède qui dirige le programme avec un doigté de maître.

Je salue également le travail des professeurs du département. Votre enseignement de grande qualité ainsi que vos questions et commentaires ont contribué de façon déterminante à ma formation.

Je prends également le temps de saluer mes collègues de laboratoire avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à collaborer et qui ont fait en sorte que mon séjour dans le labo a été si agréable. Je tiens à remercier spécialement Catherine St-Louis avec qui j'ai passé de bons moments ainsi que Maxime Sasseville qui m'a accueilli lors de mon arrivée au laboratoire et qui m'a permis d'obtenir un emploi dans ce passionnant milieu qu'est la recherche scientifique.

Je n'aurais évidemment pu réussir cette étape de ma vie sans l'appui inconditionnel de ma famille qui m'a permis de devenir qui je suis aujourd'hui. Une note toute spéciale revient également à ma copine Véronique pour le support qu'elle m'apporte dans la vie de tous les jours.

Je termine ce préambule en rappellant le moment le plus fou de ma maîtrise : le rally automobile sur le Mont-Royal en compagnie d'Habib (co-pilote) et Marc (chauffeur).

RÉSUMÉ

Ce projet de recherche avait comme but la mise au point d'une méthode permettant de générer de la diversité au sein d'une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) par le biais du ''Polymerase Chain Reaction'' (PCR), méthode permettant une amplification exponentielle d'une séquence d'ADN déterminée. L'intérêt d'un PCR mutagène réside dans sa capacité à générer des séquences uniques qui autrement n'auraient jamais été présentes, ou encore trouvées, dans la nature. Lorsque rassemblées sous forme de banque, ces séquences peuvent être triées sur la base de leurs caractéristiques suite à un criblage qui élimine les mutants sans intérêt au profit de ceux possédant les caractéristiques recherchées. L'hypothèse sur laquelle reposait le projet était qu'en ajoutant un agent dénaturant dans le cocktail du PCR, en l'occurrence un alcool, le stress chimique induirait une modification de la structure tertiaire de l'ADN polymérase qui, dans certaines conditions, se traduirait par l'introduction de mutations dans les amplicons. Pour vérifier cette hypothèse, plusieurs agents (isopropanol, propan-1-ol, butan-1-ol, urée) ont été testés à différentes concentrations, et ce avec trois ADN polymérases distinctes. Pour chaque condition PCR testée, les analyses suivantes ont été réalisées: la mesure du taux de mutation, la taille maximale des molécules d'ADN pouvant être amplifiées, le profil des mutations obtenues et le rendement d'amplification des polymérases. L'hypothèse de départ a été confirmée par nos résultats expérimentaux. Avec la polymérase Vent exo- en présence de propanol à 7 ou 8% (v/v), il est possible d'atteindre une fréquence de mutation allant jusqu'à $1x10^{-2}$ mutation/paire de base/PCR. De plus, le profil des mutations générées par cette nouvelle méthode est radicalement différent de celui obtenu avec les méthodes de PCR mutagène utilisant la Taq polymérase. Cette différence au niveau de l'espace séquence confère un intérêt certain à l'application de cette nouvelle méthode à des fins d'évolution dirigée. D'abord parce que le biais des mutations favorise les nucléotides guanine (G) et cytosine (C), ce qui facilite l'évolution dirigée des séquences riches en G et C et aussi parce qu'elle favorise l'apparition de codons encodant un acide aminé essentiel, ce qui trouve une utilité dans le design de protéines nutritives.

PRÉCISIONS

L'article scientifique présenté dans la section Résultats de ce mémoire s'intitule : ''Alcohol Mediated Error-Prone PCR''. Les coauteurs de cet article sont Marc Beauregard, Maxime Sasseville et moi-même, Sébastien Claveau, figurant comme premier auteur. Marc Beauregard a participé activement à la rédaction de l'article scientifique en effectuant de multiples corrections et en apportant plusieurs suggestions constructives. Maxime Sasseville a participé au projet en amenant des suggestions quant à l'orientation des expériences et a participé a plusieurs discussions concernant l'analyse des résultats obtenus. Pour ma part, j'ai réalisé la totalité des expériences reliées au projet, j'ai analysé les résultats obtenus et j'ai écrit l'article scientifique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS i

RÉSUMÉ ii

PRÉCISIONS iii

TABLE DES MATIÈRES iv

LISTE DES TABLEAUX vi

LISTE DES FIGURES vii

LISTE DES ABRÉVIATIONS vii

CHAPITRE I INTRODUCTION 1

1.1 Les technologies de l'ADN recombinant et la biotechnologie 1

1.2 L'évolution naturelle 1

1.3 L' évolution dirigée 2

1.3.1 Méthodes de mutagénèse d'acides nucléiques. 4

1.3.2 Exemples d'application de l'évolution dirigée 5

1.3.3 Sélection 5

1.3.4 Criblage 6

1.4 Projet d'évolution dirigée dans le cadre de la maîtrise 8

1.4.1 Présentation de la protéine MB-1 8

1.4.2 Problème d'apport en AAE de la vache laitière 8

1.4.3 Améliorations de MB-1 9

1.5 Objectifs du projet de maîtrise 11

1.5.1 Choix de l'ADN polymérase 13

1.5.2 Choix du gène 14

1.5.3 Choix de l'agent mutagène 14

CHAPITRE II RÉSULTATS 16

2.1 Présentation de l'article scientifique 16

2.1.2 Résumé de l'article scientifique 16

2.2 L'article scientifique 18

Abstract 19

Introduction 20

Materials and methods 22

Results 24

Discussion 29

Acknoledgements 32

References 33

Tables 37

CHAPITRE III DISCUSSION 40

3.1 Remise en contexte de mes travaux de maîtrise 40

3.2 Discussion des résultats. 41

3.2.1 Comparaison avec le protocole de PCR mutagène standard (Taq et $MnCl_2$) 42

3.2.2 Applications pratiques du nouveau biais des mutations 43

3.2.3 Comparaison entre les effets du propanol et du chlorure de manganèse 45

3.3 Effet des agents dénaturants sur les ADN polymérases 47

3.3.1 Effet mutagène du propanol 48

CHAPITRE IV CONCLUSION 50

4.1 Avenues de recherches futures 50

4.1.1 Élucidation du mécanisme de mutagénèse du propanol 50

4.1.2 Exploitation du potentiel mutagène du propanol 51

BIBLIOGRAPHIE 52

ANNEXE A 56

LISTE DES TABLEAUX

2.1 Selected alcohol properties and critical concentrations leading to inhibition of various DNA polymerases. 37

2.3 Mutational analysis of various error-prone PCR conditions. 38

3.1 Fréquence d'apparition des codons avec différentes conditions de PCR mutagène 46

LISTE DES FIGURES

1.1 Les quatre étapes nécessaires à l'évolution dirigé d'une protéine 3

1.2 Principe de la sélection par expression phagique 7

1.3 Métabolisme stomacal de la vache. 12

3.1 Impact du biais des mutations sur la fréquence d'apparition des acides aminés. 44

LISTE DES ABRÉAVIATIONS

AAE	acide aminé essentiel
ADN	acide désoxyribonucélique
PCR	polymerase chain reaction
pb	paire de base
MB-1 His	Milk Bundle-1 Histidine
A	adénine
T	thymine
G	guanine
C	cytosine
N	A, T, G ou C
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
kb	kilobase
mM	millimolaire
$MnCl_2$	chlorure de manganèse
NTA	nitrilotriacetic acid
StEP	staggered extension process
% $^{v}/_{v}$	pourcentage volume par volume

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Les technologies de l'ADN recombinant et la biotechnologie

Depuis trois décennies, les chercheurs se sont affairé au développement d'outils toujours plus précis et performants dans le domaine de la biologie moléculaire. Il est maintenant possible de s'immiscer dans la programmation même de la vie en modifiant les séquences d'ADN qui définissent chaque organisme vivant. Les découvertes dans ce domaine ont donné naissance à ce que l'on appelle aujourd'hui les biotechnologies. L'application des biotechnologies a eu et continue d'avoir un impact positif dans plusieurs sphères d'activité comme par exemple la médecine, l'industrie papetière, la défense et l'industrie agroalimentaire pour n'en nommer que quelques-unes.

1.2 L'évolution naturelle

C'est à l'évolution naturelle que l'on doit la biodiversité de notre planète : par exemple, les premiers animaux terrestres sont venus de la mer et se sont adaptés progressivement aux conditions climatiques régnant hors de l'eau. Les organismes vivants subissent constamment des pressions de leur milieu de vie, de façon à ce que les individus qui sont les mieux adaptés aient une plus grande chance de transmettre leur matériel génétique à leur descendance. Chez les métazoaires, ce transfert se fait par division : la majorité des cellules se divisent pour donner naissance à deux cellules filles. Cette division cellulaire passe obligatoirement par un stade de synthèse d'ADN, le matériel génétique dans lequel est inscrit le plan métabolique de la cellule. L'ADN

cellulaire est synthétisé par des protéines appartenant à une classe spéciale d'enzymes : les ADN polymérases. Il existe différentes classes d'ADN polymérases, certaines sont spécialisées dans la réparation de l'ADN, d'autres dans la correction des mutations et d'autres servent à la réplication du matériel génétique en vue de la division cellulaire. Il arrive que ces enzymes introduisent des mutations par erreur lors de la polymérisation de l'ADN et que ces mutations échappent au système de correction de l'organisme. Les mutations résultantes peuvent ne pas avoir de conséquence, mais il est également possible que leur effet soit néfaste ou avantageux pour la cellule ou pour l'organisme entier. En fait, les mutations sont à la base de l'évolution naturelle; elles sont le fruit des différents stress environnementaux qui agissent sur les organismes vivants. Les bactéries constituent un bon exemple pour illustrer l'évolution naturelle. Ces micro-organismes sont ubiquitaires, certains genres de bactéries se sont adaptés à des conditions de haute salinité ce qui fait qu'on en retrouve dans le Mer Morte où la teneur en sel est très élevée. D'autres se sont adaptés à des températures extrêmes et vivent dans les sources thermales où l'eau atteint la température d'ébullition. Il est intéressant de noter que les ADN polymérases thermostables utilisées pour le PCR proviennent de ces organismes thermophiles.

1.3 L'évolution dirigée

Par opposition à l'évolution naturelle, il est aujourd'hui possible d'appliquer ce que l'on appelle l'évolution dirigée. Le principe sur lequel repose l'évolution dirigée, illustré à la figure 1.1, est rigoureusement le même que celui de l'évolution naturelle. Appliquée à une enzyme, l'évolution dirigée débute par la mutation du gène de la séquence codante par PCR mutagène. Les acides nucléiques porteurs de mutations doivent être traduits en protéines car c'est sur celles-ci que s'applique l'effet des mutations. Ensuite, l'application d'une pression sélective permet d'éliminer les mutants mal adaptés au profit de ceux qui possèdent les mutations avantageuses. La différence majeure existant entre l'évolution naturelle et l'évolution dirigée est le facteur temps.

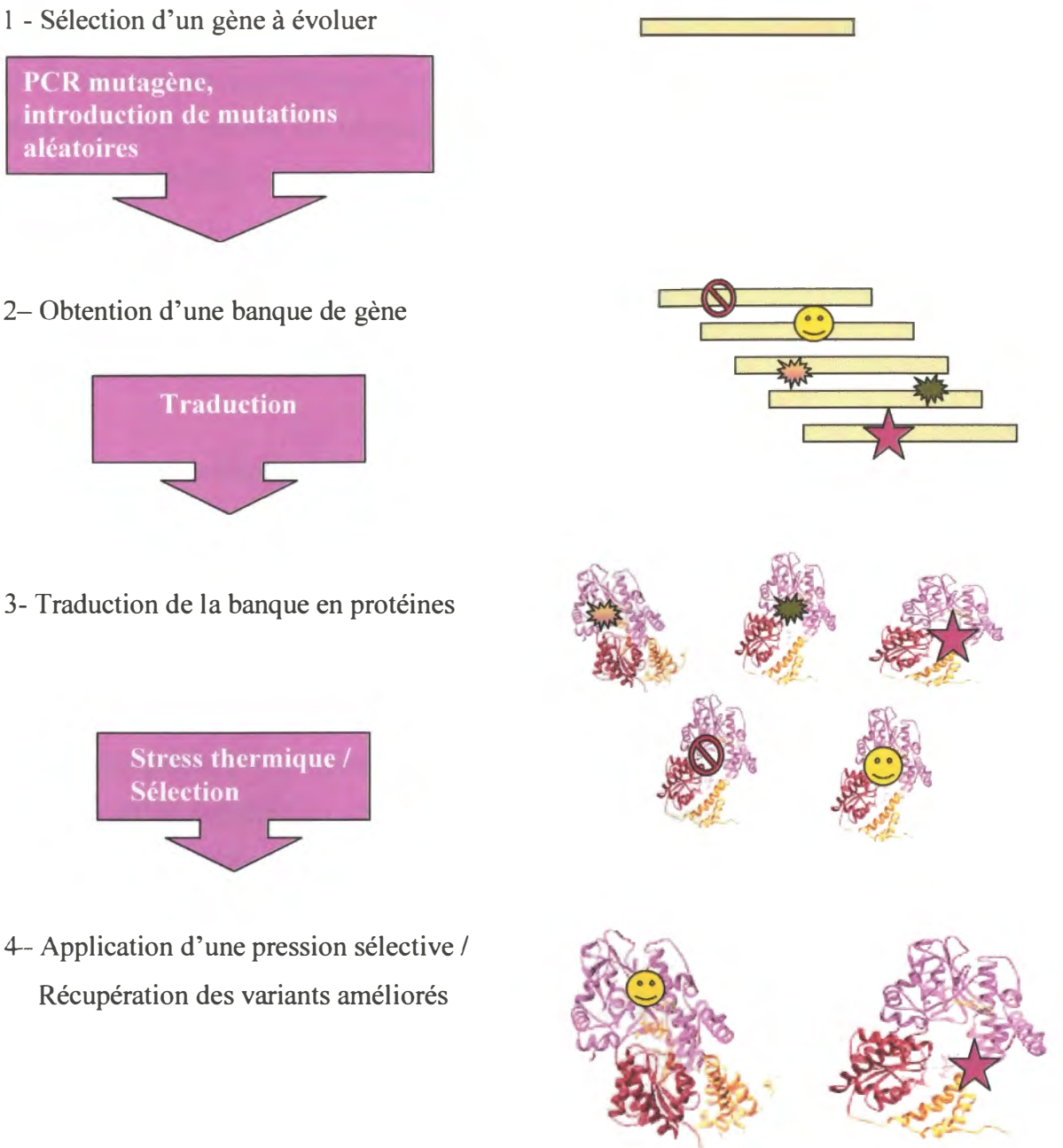


FIGURE 1.1 Les quatre étapes nécessaires à l'évolution dirigé d'une protéine.
Le gène à évoluer est soumis à un PCR mutagène pour obtenir une banque de variants. Cette banque est ensuite traduite en protéines. Une pression sélective adéquate permet de discriminer les protéines selon un critère de sélection tel l'affinité à un substrat ou l'activité par exemple.

L'évolution naturelle est un processus à long terme qui s'accomplit sur plusieurs générations d'individus alors que l'évolution dirigée livre des résultats à l'intérieur d'un mois grâce aux travaux en laboratoire où les expériences sont effectuées dans des conditions contrôlées.

1.3.1 Méthodes de mutagénèse d'acides nucléiques

Plusieurs méthodes ont été développées pour générer des mutations au sein des acides nucléiques, incluant la mutagénèse chimique (1), le clonage de gènes dans des souches bactériennes mutagènes (2), l'incorporation d'analogues de bases dans l'ADN (3), l'utilisation d'oligonucléotides mutagènes (4) et le PCR mutagène (5,6). Les deux dernières méthodes sont les plus utilisées pour la pratique de l'évolution dirigée (7). Les oligonucléotides mutagènes sont utilisés pour introduire une ou plusieurs mutations dans un site précis d'une séquence d'ADN. Par exemple, ils peuvent être utilisés pour muter un codon encodant un acide aminé que l'on sait responsable de l'activité d'une enzyme dans le but de la désactiver. Quant au PCR mutagène, il amplifie une séquence d'ADN déterminée en y introduisant des mutations aléatoires. La réaction produit donc une banque de gène contenant des codons non-sens, des mutations déstabilisantes mais aussi des mutations qui améliorent les caractéristiques de la protéine d'intérêt. Une sélection adéquate permet d'obtenir ces protéines. La plupart des protocoles de PCR mutagène décrits dans la littérature utilisent la Taq polymérase en combinaison avec le chlorure de manganèse ($MnCl_2$) et une variation dans le ratio des dNTPs (déoxynucléotide triphosphate) (5, 6) ce qui permet d'obtenir des fréquences de mutation allant jusqu'à 10^{-1} mutation / paire de base / PCR (mutation / pb / PCR), i.e. une fréquence menant à un taux de mutation de l'ordre de 10% du gène muté (8). L'utilisation de la Taq polymérase engendre un biais au niveau des mutations obtenues. En condition standard (i.e. non-mutagène), où le taux de mutation est très faible (3.3×10^{-4}) (9), la Taq polymérase mute préférentiellement les nucléotides A (adénine) et T (thymine) et les remplace par les nucléotides G (guanine) et C (cytosine) (10). En

condition mutagène, le recours a des proportions déséquilibrées de dNTP permet d'augmenter le taux de mutation obtenu. Par contre, cette pratique accentue le biais des mutations générées par la Taq polymérase et diminue le rendement de la réaction, i.e. une moins grande quantité d'ADN est synthétisée pendant la réaction (6, 8).

1.3.2 Exemples d'application de l'évolution dirigée

La mutagénèse aléatoire d'ADN est un outil versatile pouvant servir à élucider les relations séquence-structure au sein de ribozymes ou de protéines (11, 12), ou encore réaliser des expériences d'évolution dirigée sur des enzymes (13, 14). Le couplage du PCR mutagène avec des techniques permettant la recombinaison d'ADN *in vitro* (comme la PCR sexuelle (15) et le "Staggered Extension Process" (StEP) (16)) constitue un outil puissant ayant engendré une véritable révolution dans le domaine de l'évolution dirigée. Les réalisations dans ce domaine sont très variées : l'augmentation de 50 fois de la stabilité thermique d'une protéase (16), le changement de spécificité de substrat d'une aldolase (17) et le changement du site de reconnaissance d'une recombinase (14) sont quelques exemples parmi une multitude. L'identification des protéines possédant les caractéristiques recherchées peut s'effectuer selon deux manières : la sélection et le criblage.

1.3.3 Sélection

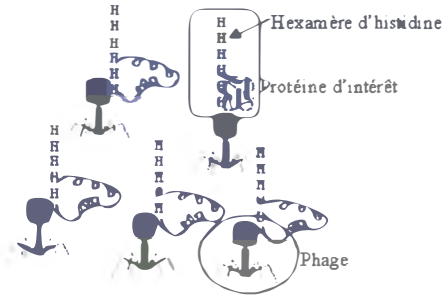
La sélection est généralement faite en fonction d'une caractéristique de la protéine, par exemple l'affinité à un métal ou la résistance à un antibiotique qu'une telle protéine confère à l'organisme hôte. Plusieurs méthodes permettent de procéder à la sélection de protéines suite à la génération d'une banque par PCR mutagène, dont l'expression phagique et l'expression par ribosome qui sont quelques exemples. Ces deux systèmes

permettent un lien physique entre la séquence d'acide nucléique codant pour l'enzyme et l'enzyme en question. La figure 1.2 illustre le principe de l'expression phagique. Une banque de phage peut compter un milliard de clones distincts. Ainsi, les phages exprimant une protéine munie d'un hexamère d'histidine à une extrémité (qui confère une affinité aux ions nickel) peut être mise en contact avec une solution de protéases qui vont hydrolyser les protéines instables. En liant les clones de la banque sur une résine NTA (nitrilo triacetic acid) chargée en ions nickel, seuls les phages ayant résisté à la pression des protéases seront récupérés grâce à leur hexamère d'histidine toujours présent. L'ADN des phages peut ensuite être séquencé pour obtenir la séquence codant pour une protéine résistante aux protéases.

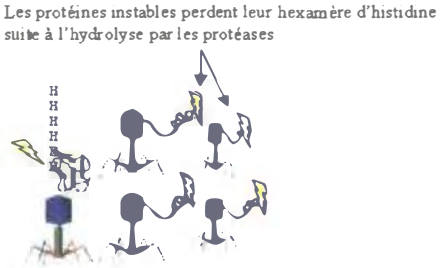
1.3.4 Criblage

Le criblage fonctionne avec un support différent de l'expression phagique. Pour ce faire, les amplicons issus du PCR mutagène sont clonés dans un vecteur d'expression de façon à obtenir une banque de plasmides recombinants. Cette banque est utilisée pour transformer un micro-organisme (il peut s'agir d'une levure, d'une bactérie ou d'un champignon). Une fraction des micro-organismes transformés est choisie aléatoirement puis ces clones sont mis en cultures individuelles dans une plaque à multi-puits (96 puits). Cette plaque est soumise à une pression sélective (stress thermique, traitement aux rayons UV, etc.) suivie d'un essai permettant de quantifier l'activité des enzymes de chacune des cultures de la plaque à multi-puits. Les cultures démontrant de l'activité enzymatique sont récupérées et leur matériel génétique fait l'objet d'un PCR pour obtenir la séquence de l'enzyme ayant résisté à la pression sélective.

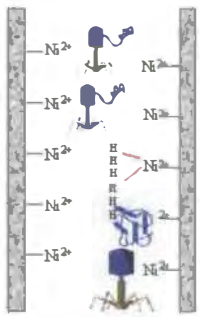
1- Banque de variants exprimée à la surface du phage



2-Traitement avec une solution de protéase



3- Passage sur une résine chargée en nickel



4- Lavage des phages protéolysés

Phages fusionnés à une protéine ayant perdu l'hexamère d'histidine

5- Élution des phages exprimant une protéine stable

Phage fusionné à une protéine résistante aux protéases

Figure 1.2 Principe de sélection par expression phagique

1- Les bactériophages expriment la protéine d'intérêt en fusion avec une protéine de la capside. Le gène de la protéine exprimée à la surface se trouve à l'intérieur du virion dans le génome du phage. 2- La pression sélective est exercée par une solution de protéases qui hydrolysent les protéines aux conformations instables. 3- La banque de phage est appliquée sur une résine Ni-NTA qui retient les protéines ayant conservé leur hexamère d'histidine situé en C-terminal. 4- Un lavage permet de se débarasser des phages exprimant une protéine instable. 5- L'élution permet de récupérer les phages exprimant une protéine résistante aux protéases, le gène de cette protéine sera obtenu par PCR à partir du phage.

1.4 Projet d'évolution dirigée dans le cadre de la maîtrise

L'équipe du professeur Beauregard s'intéresse entre autres choses au design de protéines. Par le passé, plusieurs travaux de conception rationnelle de protéines ont été réalisés par mutagénèse dirigée dans son laboratoire. Considérant les nombreux avantages qu'offre l'évolution dirigée, il a été décidé que mon projet de maîtrise mène au développement d'une méthode originale permettant de générer des mutations par PCR, adaptée à des besoins précis. Ainsi, les travaux de ce mémoire porteront sur la mise au point d'un nouveau protocole de PCR mutagène mieux adapté à l'évolution dirigée de la protéine Milk-Bundle-1 (MB-1).

1.4.1 Présentation de la protéine MB-1

En 1995, l'équipe du professeur Beauregard a créé une protéine de design *de novo* appelée MB-1 (18). La séquence de cette protéine a été conçue de façon à spécifier un repliement en noeud de quatre hélices α. De plus, une sélection d'acides aminés essentiels (AAEs) a été incorporée à sa séquence primaire aussi souvent que possible afin de conférer à MB-1 une valeur nutritive supérieure à la majorité des protéines naturelles. L'idée derrière MB-1 était en fait d'offrir une alternative au problème d'apport en AAE à la vache laitière dans l'industrie agro-alimentaire.

1.4.2 Problème d'apport en AAE à la vache laitière

La vache laitière présente un problème particulier se rapportant à son apport en AAE. Cet animal, en plus d'avoir à synthétiser les protéines nécessaires à sa survie, doit produire la grande quantité de protéines présentes dans le lait. Cette situation exige un

excellent apport en nutriments et plus particulièrement en AAE. La croissance et la productivité de la vache laitière est limitée principalement par quatre acides aminés, soient la méthionine, la lysine, la thréonine et la leucine; ces acides aminés sont essentiels car la vache ne possède pas les enzymes nécessaires à leur synthèse et par conséquent, c'est la diète qui fournit aux vaches ces nutriments. Ces quatre AAEs sont présents en faible proportion dans la diète journalière de la vache. De plus, environ 70% des protéines de son alimentation sont mobilisés par l'importante flore bactérienne qui peuple le rumen (19). Le rumen constitue la porte d'entrée des aliments dans le système digestif de la vache laitière. Ce compartiment stomacal totalise près de 80% du volume total des différents estomacs. Le rôle des bactéries du rumen est de synthétiser les enzymes qui permettent la digestion des fibres végétales, composante principale du régime alimentaire de la vache. La majorité des protéines destinées aux tissus de la vache provient de l'anabolisme des bactéries du rumen, celles-ci produisant des protéines au profil en acides aminés peu adapté au régime de l'animal, tel qu'illustré à la figure 1.3. Une moulée à base de MB-1 pourrait solutionner le problème d'apport en AAE des vaches laitières, mais à condition que la protéine résiste à l'intense catabolisme de la flore du rumen.

1.4.3 Améliorations de MB-1

Les premiers travaux de caractérisation de MB-1 ont consisté à étudier son comportement dans des conditions imitant l'environnement physico-chimiques du rumen de la vache. Ces conditions ont été imitées en utilisant un extrait de protéases de *Streptomyces griseus* standardisé (Pronase E). Ces expériences ont révélé que MB-1 était sensible à la dégradation protéolytique du rumen. Le T_m (température à laquelle 50% des protéines sont dénaturées) de MB-1 est 39°C(20), soit la température du rumen de la vache. Il est bien connu qu'une protéine dénaturée expose des sites qui sont normalement enfouis dans les poches hydrophobes de la forme native. Ces sites peuvent être des cibles potentielles pour les protéases du milieu environnant. Ces résultats ont

poussé notre équipe à trouver des solutions pour améliorer la performance de MB-1 afin de bien orienter les recherches à venir. Les travaux réalisés par le passé ont montré des améliorations substantielles par rapport à la protéine mère MB-1. Parmi les stratégies d'amélioration il y a d'abord eu l'insertion de ponts disulfures au sein de la protéine. Il est bien établi que de telles liaisons peuvent offrir une protection contre la dégradation protéolytique du rumen (20) en rigidifiant la structure tertiaire de la protéine tout en diminuant l'entropie de l'état dénaturé (21,22). En fait, les expériences de protéolyse menées par l'équipe de Beauregard qui comparaient la résistance de MB-1 au cytochrome c et à la RNAse A (deux protéines naturelles de poids moléculaire semblable à MB-1, mais qui contrairement à MB-1, possèdent des ponts disulfures) ont montré que MB-1 était moins stable que les deux protéines naturelles (20). L'emphase a dès lors été mise sur la construction de structures permissives à la formation de ponts disulfures au sein de MB-1. Des expériences ont été menées sur des constructions formant des ponts disulfures inter (23) et intramoléculaires (24). Par rapport à la protéine MB-1 originale, les résultats obtenus avec les mutants contenant des ponts disulfures ont démontré des augmentations significatives de la résistance à la protéolyse (23), des augmentations significatives de la stabilité conformationnelle ainsi qu'un contenu supérieur en hélices α. Une autre modification qui a permis d'améliorer substantiellement la stabilité de MB-1 implique la mutation tyr 62 trp (25). Le cœur hydrophobe contient une tyrosine en position 62, un acide aminé possédant une chaîne latérale phénolique qui a la propriété d'émettre de la fluorescence lorsqu'excitée à une longueur d'onde de 280 nm. Cette propriété peut être utilisée comme indicateur de l'état de la structure tertiaire. Une intensité forte indique que la tyrosine est exposée alors que celle-ci doit, en principe, être enfouie dans le noyau hydrophobe, ce qui suppose un relâchement partiel du noyau. En d'autres termes, il s'agit d'une protéine susceptible à la dégradation protéolytique. Il y a cependant un inconvénient à placer une tyrosine dans une zone appelée à participer à la formation d'un noyau hydrophobe, comme dans le cas de MB-1, car il est possible que son groupement hydroxyle provoque de l'instabilité au sein du noyau hydrophobe de la protéine. Le remplacement de la tyrosine par le tryptophane, un acide aminé fluorescent et hydrophobe, a été réalisé par l'équipe de Beauregard. Ce changement s'est avéré bénéfique, la protéine mutée a une stabilité

thermique plus élevée que MB-1 et sa résistance à la dégradation protéolytique est également plus élevée que la protéine mère (25). De plus, le tryptophane constitue une meilleure sonde fluorescente que la tyrosine.

1.5 Objectifs du projet de maîtrise

La prédiction de l'impact du changement d'un ou de plusieurs acides aminés au sein d'une protéine est difficile. Jusqu'à maintenant, les modifications apportées à MB-1 ont été élaborées de façon rationnelle. Les gains ont été encourageant, mais les progrès obtenus ont été coûteux en temps et en énergie. Il est logique d'envisager qu'une protéine nouvelle créée par l'homme et n'ayant pas vécu des millions d'années d'évolution ne puisse pas adopter un comportement naturel et désirable. L'intérêt de mon projet de maîtrise réside dans l'utlisation d'une méthode permettant de reproduire l'évolution naturelle au hasard, mais de façon accélérée. Le caractère aléatoire des mutations apportées au gène codant pour la protéine d'intérêt, et la grande quantité de mutations générée permet d'obtenir une énorme banque de nouvelles protéines dérivées de MB-1. L'application d'une méthode de sélection appropriée permettra de repêcher une protéine aux caractéristiques grandement améliorées. Il est à noter que l'évolution de la protéine MB-1 pose un problème particulier. En effet, on tente de maximiser la présence des AAEs dans sa séquence, et la méthode classique d'évolution par PCR conduit à un biais de mutation qui défavorise l'apparation des mutations vers des AAEs. Parmi les nombreuses polymérases thermostables disponibles, seule la Taq a été utilisée pour le PCR mutagène. Il devient donc intéressant d'explorer les possibités qu'offrent les autres ADN polymérases en frais de biais, d'enrichissement en AAE, et de taux de mutation. Une enzyme présentant un biais de mutation différent de celui de la Taq polymérase permettrait d'obtenir des mutations peu accessibles à la Taq polymérase, donnant accès à un espace séquence nouveau et inexploré. Ainsi, les objectifs de mon projet de maîtrise sont:

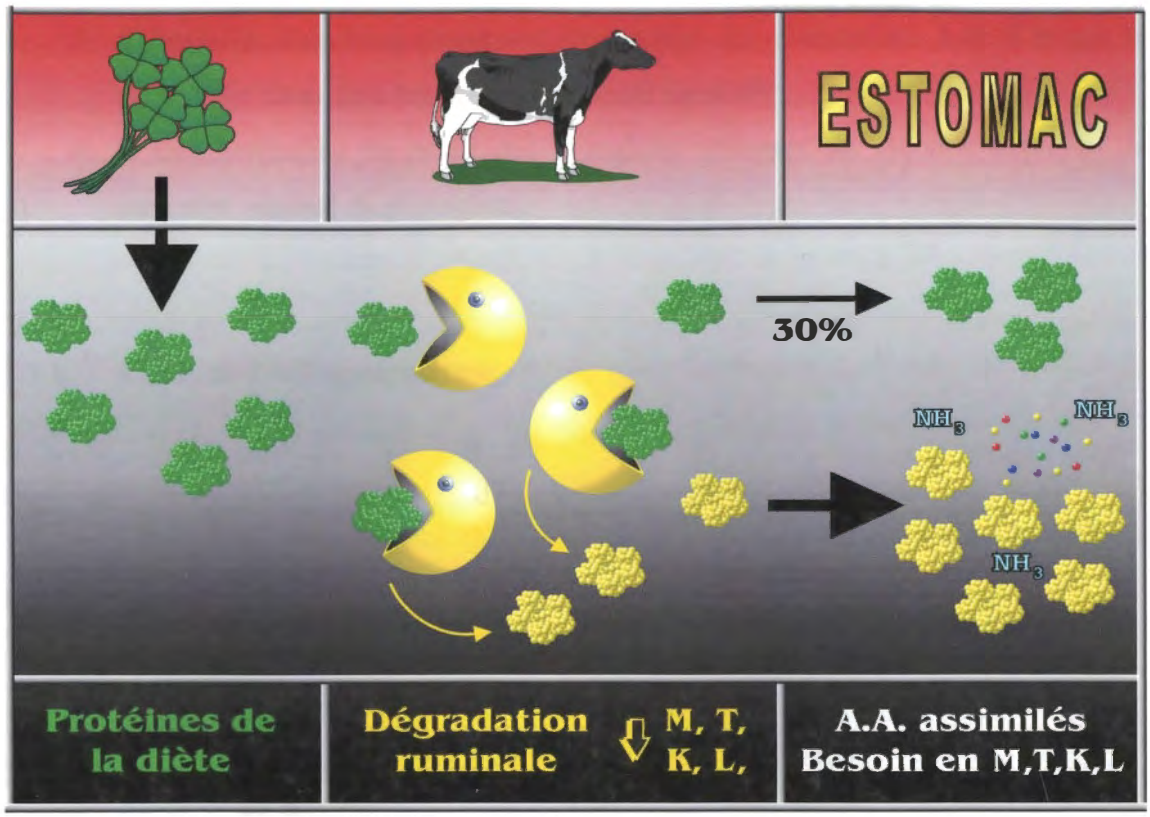


FIGURE 1.3 Métabolisme stomacal de la vache.

La nourriture ingérée par la vache transite d'abord par le rumen avant d'être assimilée par l'organisme. La flore bactérienne du rumen utilise une grande partie des protéines de la diète pour son propre métabolisme. Ainsi, seulement 30% des protéines de la diète sont utilisés directement par la vache. La balance des protéines de la diète provient de l'anabolisme de la flore ruminale qui produit des protéines au profil en acides aminés peu adapté au régime de l'animal. La stabilité et la valeur nutritive des protéines de la diète de la vache ont donc un impact significatif sur la qualité du lait qu'elle produit.

1. le développement d'un protocole de PCR mutagène original dont la fréquence de mutation atteint minimalement $2.0x10^{-3}$ mutation / paire de base / PCR;
2. l'obtention d'un rendement d'amplification similaire à celui d'un PCR standard;
3. l'obtention d'un biais favorisant l'apparition des nucléotides A et T et par le même fait favorisant les codons encodant un AAE;
4. la caractérisation du profil des mutations obtenues de façon à exploiter le caractère original du protocole.

1.5.1 Choix de l'ADN polymérase

Les trois ADN polymérases choisies pour la mise au point du protocole de PCR mutagène sont:

1. la Taq, provenant de *Thermus aquaticus;*
2. la $Vent_r$® exo-, provenant de *Thermococcus litoralis*;
3. la Deep $Vent_r$®exo-, provenant de *Pyrococcus species* GB-D.

Ces polymérases ont été sélectionnées pour les raisons suivantes:

1. elles ne possèdent pas d'activité exonucléase 3' → 5', une activité qui permet à la polymérase de corriger les erreurs d'appariement de bases lors de la polymérisation d'ADN;
2. elles proviennent d'organismes différents, il est donc possible qu'elles présentent un biais de mutation unique à chacune;
3. leur thermoréresistance sont différentes: le temps de demi-vie à 100°C de la Taq est de 0,1 heure, celui de la Vent exo- est de 1,8 heures et celui de la Deep Vent exo- est de 8 heures (9). Il est attendu que le comportement de ces trois polymérases en présence d'un agent dénaturant différera étant donné les différentes thermorésistances;
4. les trois enzymes fonctionnent de façon optimale dans le même tampon réactionnel, ce qui annule la variation de certaines conditions expérimentales.

1.5.2 Choix du gène

Le gène encodant la protéine MB-1 a été choisi pour la mise au point du protocole de PCR mutagène pour les raisons suivantes:

1. La protéine doit être améliorée par évolution dirigée. Par conséquent il est logique d'utiliser ce gène afin de caractériser les mutations obtenues avec le nouveau protocole de PCR mutagène. Cette caractérisation permettra d'évaluer le potentiel d'enrichissement en AAE du protocole, ce qui est primordial pour la préservation de la valeur nutritive de la protéine MB-1;
2. Le contenu en AT / GC du gène est relativement bien équilibré (52% AT 48% GC), ce qui est primordial lors de la caractérisation d'un biais mutationnel. Le recours à une séquence riche en G et C pour la caractérisation du biais des mutations engendrerait une erreur non-négligeable dans le profil des mutations obtenues.

1.5.3 Choix de l'agent mutagène

Les alcools sont des molécules amphiphiles ayant la propriété de déstabiliser les protéines en diminuant la force de l'effet hydrophobe qui stabilise la conformation native d'une protéine (26-29). L'hypothèse sur laquelle reposait mon projet était qu'à l'aide d'un alcool, il serait possible de perturber légèrement la structure tertiaire de l'ADN polymérase de façon à diminuer la fidélité de polymérisation pendant un PCR, sans la désactiver complètement, ce qui se traduirait par l'introduction de mutations aléatoires dans les séquences amplifiées. Cette stratégie n'a toujours pas été utilisée et pourrait apporter un biais et des propriétés mutagènes nouvelles comparées aux méthodes standard basées sur l'impact d'ions manganèses. Le but du PCR mutagène étant de générer la plus grande diversité possible, nous avons choisi d'évaluer l'effet d'un stress alcoolique provoquant une faible diminution de l'activité enzymatique afin

de maximiser la génération de diversité. Le propanol et le butanol ont été choisis pour vérifier leur potentiel mutagène lorsqu'ajoutés à un PCR car leur température d'ébullition est supérieure à la température requise pour dénaturer l'ADN lors du PCR (94°C), évitant ainsi l'évaporation des alcools durant le processus répétitif (cyclique) de la réaction PCR.

CHAPITRE II

RÉSULTATS

2.1 Présentation de l'article scientifique

L'essentiel des résultats que j'ai obtenus pendant ma maîtrise a été soumis pour publication dans la revue ''DNA and Cell Biology'' sous le titre ''Alcohol mediated error-prone PCR''. La confirmation de la réception du manuscrit par l'éditeur nous a été acheminée le 19 mai 2004. L'éditeur nous a confirmé que l'article est accepté tel quel et qu'il paraîtra dans l'édition de novembre 2004. La méthode de PCR mutagène mise au point lors de ces travaux a également fait l'objet d'un brevet qui a été déposé au ''United States Patent Trademark Office''. La communication de l'éditeur faisant part de l'acceptation de l'article pour publication est présentée à l'annexe A du mémoire. Cet annexe contient également la copie du certificat de dépôt au bureau américain des brevets.

2.1.2 Résumé de l'article scientifique

L'effet de différents dénaturants de protéines incluant l'urée, l'isopropanol, le propan-1-ol et le butan-1-ol a été étudié avec trois différentes ADN polymérases pendant un PCR. En présence de ces agents dénaturants, les polymérases présentent une activité normale jusqu'à une concentration critique d'agent dénaturant qui marque le début d'une inhibition progressive de l'activité enzymatique. De manière générale, plus une polymérase est thermostable, plus élevée est la concentration d'alcool nécessaire à son inhibition. D'autre part, plus la chaîne aliphatique d'un alcool est longue, moins élevée

est la concentration d'alcool nécessaire pour inhiber une polymérase donnée. Ces résultats indiquent qu'un des aspects importants de l'inhibition de l'activité enzymatique implique la déstabilisation de la conformation native de la polymérase due à une diminution de l'effet hydrophobe, principal responsable de la conformation native des protéines. Lorsque la polymérase Vent exo- est en présence de 7 à 8% (v/v) en propane-1-ol, un effet mutagène survient. Cet effet se traduit par un taux de mutation qui peut atteindre 9.8×10^{-3} mutation par paire de base par PCR, selon les conditions expérimentales. Avec ces conditions, on remarque un remplacement plus fréquent des nucléotides G et C, par opposition aux protocoles de PCR mutagène standards où les nucléotides A et T sont les plus souvent changés. La comparaison de plusieurs conditions PCR indique que le propan-1-ol et le chlorure de manganèse ont des modes d'action différents et que la diminution de fidélité de polymérisation engendrée par le propan-1-ol résulte d'une déstabilisation partielle de l'ADN polymérase. Les conditions PCR développées dans cette étude offrent une alternative intéressante pour les travaux d'évolution dirigée en permettant d'explorer un espace séquence différent de celui accessible avec la Taq polymérase.

2.2 L'article scientifique

Title: Alcohol mediated error-prone PCR

Authors: Claveau S., Sasseville M.[1] and Beauregard M.[*],

Affiliation : Groupe de recherche en énergie et information biomoléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.

[1] Current address: Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Département de Sciences Animales, Université Laval, Québec G1K 7P4, Canada

[*]To whom correspondance should be sent. Marc Beauregard, Dép. Chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada. Tel: +1(819)376-5052, Fax: +1(819)376-5057, email: beaurema@uqtr.ca

Key words : accelerated evolution, alcohol denaturation, DNA polymerase, enzyme specifity, enzyme stability, error-prone PCR, random mutagenesis.

Abbreviations : A: adenine; bp: base pair; C: cytosine; dATP: deoxyadenine triphosphate; dCTP: deoxycytosine triphosphate; dGTP: deoxyguanine triphosphate; DNA: deoxyribonucleic acid; dNTP: deoxynucleotide triphosphate; dTTP: deoxythymine triphosphate; G: guanine; kb: kilobase; PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis; PCR: polymerase chain reaction; T: thymine.

Abstract

The effect of urea, isopropanol, propan-1-ol and butan-1-ol on PCR using three different DNA polymerases was investigated. In the presence of these agents, polymerases were active as expected up to a critical concentration where they became progressively inhibited. Critical concentrations of alcohols generally increased with thermoresistance of the polymerases and decreased with the hydrophobicity of the alcohols. These results indicate that an important aspect of the inhibition involved conformational loosening due to a decrease in the hydrophobic effect. A mutagenic effect occurred with $Vent_r^{®}$ (exo-) DNA polymerase in the presence of 7.0 to 8.0%$^{v}/_{v}$ propan-1-ol, affording mutation frequencies of up to 9.8×10^{-3} mutation / bp / PCR. Under these conditions the preferential replacement of Gs and Cs was observed, in opposition to standard error-prone PCR that favors replacement of As and Ts. Comparison of various PCR conditions indicates that propanol and $MnCl_2$ have different modes of action, and that the decrease in fidelity promoted by propanol is due to a finely tuned partial destabilization of the polymerase. The PCR conditions developped in this study provide a useful alternative for targeting different sequence space for directed evolution experiments.

Introduction

Several methods for promoting mutations in DNA have been used in the past (1-4), but the methods based on synthetic oligonucleotides pioneered by Smith (5) are currently the most widely used. Depending on the application, one can choose to mutate a single nucleotide in a controlled manner (site-directed mutagenesis) (6), mutate several positions at once at selected positions in a gene (e.g. combinatorial mutagenesis) (7), or perform random mutagenesis on parts or over the full length of the target gene (e.g. error-prone PCR) (8,9). To date, the most widely used method for generation of random mutant libraries and directed evolution of enzymes has been error-prone PCR (10).

The standard error-prone PCR method (8) is based on the ability to increase the mutation frequency of Taq polymerase-based PCR by adding manganese chloride ($MnCl_2$) and / or lowering dATP concentration compared to the other dNTPs. Modifying the PCR mixture in order to generate mutations has a number of negative consequences. 1- The generally observed decrease in yield has to be compensated by increasing the amount of polymerase, increasing extension periods, or increasing the number of PCR cycles. 2- By using sub-optimal concentrations of reagents, the maximal length of DNA amplified is typically lowered to less than 1 kb (11). 3- Increasing mutation rate to 10^{-1} error / bp / PCR or above (using hypermutagenic conditions) results in mutant libraries where no active genes are left (12). 4- Another major drawback of the method is the preferential mutation of As and Ts instead of an equal probability of mutating all four nucleotides (9). This mutational bias determines the sequence space explored (or limits the diversity generated). Subsequent improvement of error-prone PCR allowed for a reduction of the mutational bias by further modifiying the dNTP substrate ratio (9, 13). In spite of such improvements, the proportion of each possible mutation type cannot be entirely controlled and a decrease in yield due to specific mutations cannot be overcome by modifying dNTP concentrations (13). Further, such adjustments often contribute to reduce the overall yield or mutation rate.

Identifying mutagenic PCR conditions that do not involve the manipulation of chloride salts or dNTP concentrations might result in mutant libraries with a different set of characteristics (maximal length, mutation rate, bias, etc) and provide an alternative for various applications. Among the conditions leading to modified enzyme properties, denaturing environments might prove effective in changing polymerase specificity and/or activity. Amphiphilic molecules such as alcohols can destabilize proteins structure which may result in conformational changes at both secondary and tertiary structure levels (14-17). We hypothesized that the addition of alcohols in a PCR mixture would disturb the normal amplification process by inducing a stress on the DNA polymerase structure and by lowering the specifity of dNTP substrate selection by the enzyme.

In the present work, we succeeded in lowering the fidelity of selected thermostable DNA polymerases during PCR by inducing a chemical stress using alcohol-water mixtures. It will be shown that alcohols may be used to alter polymerase performance at the level of: (i) mutation frequency, (ii) mutational bias, and (iii) maximal length of amplification. In order to identify the distinctive features of this novel error-prone PCR approach, the method was tested and compared to normal error-prone PCR under various conditions.

Materials and methods

PCR biochemicals

DNA polymerases and dNTPs were purchased from New England Biolabs. Manganese chloride and alcohols were purchased from Sigma Aldrich.

Standard PCR condition

Two (2) units of DNA polymerase were used in a 50μL reaction volume containing 200μM of each dNTP, 10mM KCl, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 20mM tris-HCl pH 8.8, 2mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100, 0.2μM of each primer and 10ng of plasmid DNA. PCR were performed in a GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer) for 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of [30 s at 95°C, 30 s at 65°C, 2 min at 72°C].

Mutagenic PCR conditions

The buffer composition was the same as for the standard PCR except that $MnCl_2$ and / or propanol were added at specified concentrations as described in results. Alcohols were added prior to other reagents and aliquoted with a gastight Hamilton syringe to prevent innacurate pipetting due to their viscosities. When a modified dNTPs ratio was used, final concentrations were 200μM for dATP and dTTP and 800μM for dGTP and dCTP or as specified in the text. To detect the maximal length of DNA sequence that can be amplified, the PCR cycles were modified to: 7 min at 95°C followed by 30 cycles of [45 s at 95°C, 45 s at 53°C, 1 min at 72°C].

Template and primers

The template used for PCR is the 384 bp gene coding for MB-1 His (Milk-Bundle Histidine) (18) (140 A, 101 C, 82 G and 61 T: ratio AT/GC of 1.1) cloned in the New England Biolabs 6.6kb pMAL-c2 vector (19). Template was obtained by plasmid purification from *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene) using the Qiaprep spin® miniprep kit (Qiagen), followed by UV quantitation. PCR primer no. 1: 5'ATTCGAGCTCGAACAACAACAACAATA

ACAATAACAACACCTCGGGATCGAGGGAAGGATGGCTA-3' and primer no. 2: 5'GCCAAGCTTAGTGGTGGTGGT GGTGGTGAGCT-3' containing SacI and HindIII sites respectively (sites shown by underscored letters) were purchased from Invitrogen Life Technologies and purified by PAGE. For measuring the maximal length of DNA sequence that can be amplified, 100ng of genomic DNA from *Actinobacillus pleuropneumoniae* 4079 was used as template with conditions cited above using primer 1-2Flipo: 5'-AGCGATTGTAATGGTCAGCC-3' and primer L1-2 For: 5'-TTACCAACCTTTTACTACACCATC-3'.

Cloning

pMAL-c2 vector (New England Biolabs) was digested with SacI and HindIII endonucleases (New England Biolabs) and purified from a 1% agarose gel. The 384 bp PCR products were gel purified to ensure that no contaminants were carried over. The purified products were concatenated by phosphorylation / ligation (20) using T4 polynucleotide kinase and T4 DNA ligase (New England Biolabs) for 3 hours at room temperature followed by a restriction digestion using SacI and HindIII endonucleases for 5 hours at 37°C. Digested PCR products were purified and ligated with pMAL-c2 vector using T4 DNA ligase at 16°C overnight. Ligation product was transformed in *E. coli* by electroporation.

Determination of mutation frequency

Plasmids from transformed colonies were sequenced by the dye-terminator method with an ABI Prism 3100 automatic sequencer. The entire target sequence (384 bp) was analysed with LFASTA software (21) allowing for comparison of control and mutated DNA. Mutation frequency and mutation types were calculated from such a comparison.

Determination of amplification yield

Amplification yield of DNA polymerases was determined by comparison of DNA bands after ethidium bromide staining of agarose gel, as described earlier (13).

Results

The composition and experimental conditions that allow for an efficient PCR reaction are important factors when considering the use of an additional component such as an alcohol. First, the alcohol has to be miscible in water, and second, the mixture has to withstand heating at 95°C which allows for DNA denaturation. Considering these experimental limitations, we chose to investigate the use of ethanol, isopropanol, propan-1-ol (hereafter referred to as propanol), butan-1-ol (hereafter referred to as butanol) as potential mutagenic agents. Preliminary experiments showed that adding ethanol resulted in excessive evaporation, thus investigation with this alcohol were not pursued further. Mixtures containing isopropanol, which has a boiling point of 82°C, behave consistently like the normal PCR solution and were chosen for further investigations. Propanol has a boiling point of 98°C, is miscible in water, and consequently was selected for this investigation without any preliminary tests. Butanol has a boiling point of 118°C but is weakly miscibile in water (i.e. below 8%). Preliminary data revealed that such a low concentration was sufficient to induce a deleterious effect during PCR. Butanol is the alcohol with the longest alkyl chain retained for this study.

We selected Taq, $Vent_r^{®}$ (exo-) and Deep $Vent_r^{®}$ (exo-) DNA polymerases because 1- they perform well in the same reaction buffer, 2- they have no 3'→5' proofreading exonuclease activity and have similar error rates (22,23), 3- they belong to different polymerase families (Taq polymerase belongs to family A, Vent polymerases to family B) and have a very different structure, 4- they have different thermoresistance (their half-life at 95°C are 0.9 hour, 6.7 hours and 23 hours, respectively (19,24)). We expected this latter property to influence the behavior of polymerases under chemical stress induced by alcohols.

In order to assess the extent of the chemical stress induced by alcohols, we measured the amplification yield and compared it to that of a standard PCR. Under our

conditions, standard PCR yielded an average number of target duplication (13) of 13.2 for the three polymerases tested. The size of a library generated by error-prone PCR is proportional to the amplification yield, therefore it is of a paramount importance to maintain the yield as high as possible. Concentrations of alcohols leading to reduction in amplification yield (equal to or above 20%) were defined as ''critical'' concentrations (Table 2.1).

Data from Table 2.1 reveal that the hydrophobicity of the alcohol selected is an important parameter as shown by the inverted relationship between hydrophobicity (as indicated by logP, or more intuitively the aliphatic chain length) and the critical concentration. Thermal resistance was also determinant: in general, higher concentration of denaturant was required in order to inhibit the most thermostable Deep $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase as compared to the other polymerases. Note that the relationship was not perfect however: polymerisation with both $Vent_r^{®}$ (exo-) and Deep $Vent_r^{®}$ (exo-) was inhibited by 1.5% urea and 8% propanol although these enzymes have different thermostabilities.

The inhibition concentration of urea was also measured in order to illustrate the effect of a non-alcohol denaturant. The urea concentration used is rather low (approximately 0.2 M) when comparing to the urea concentration required to promote complete unfolding, but is sufficient to favour the existence of partially unfolded intermediate (25). For alcohols, the same rationale prevails: in the range of 5-10%, alcohols have been shown to partially unfold proteins (17). Taken together, these observations indicate that the inhibition of polymerase activity shown here is, at least in part, due to the partial destabilization of the enzymes conformation via an impact on the hydrophobic forces that maintain nativeness in globular proteins.

Amplicons resulting from denaturant doped PCR were cloned and sequenced. Among conditions investigated in Table 2.1, two gave rise to a significantly increased mutation rate in amplified DNA sequences (i.e. above 5×10^{-4}). First, for Taq polymerase in presence of 2.5% propanol, 3 mutations, including one single base

deletion, were detected out of 3049 nucleotides, resulting in a raw mutation frequency of $9.8x10^{-4}$ mutation/bp/PCR which is higher than the intrinsic Taq polymerase error rate by a factor of 3 to 4 (26). Considering the deletion-to-mutation ratio and the low mutation frequency obtained with Taq in presence of critical propanol concentration, we did not further investigate this condition, considering it unsuitable for error-prone PCR. Then, when performing PCR using $Vent_r^{®}$ (exo-) in the presence of 8.0% propanol, 24 mutations were detected over 4127 nucleotides sequenced, corresponding to a mutation frequency of $5.8x10^{-3}$ mutation / bp / PCR (see Table 2.2). This result clearly indicates that propanol had a significant mutagenic effect toward $Vent_r^{®}$ (exo-) DNA polymerase, and that the experimental conditions identified here could form the basis of a new error-prone PCR method.

Mutation rate, maximal length of amplification and mutational bias achieved with $Vent_r^{®}$ (exo-) in the presence of propanol were analysed as summarized in Table 2.2. Analysis of mutations revealed a random distribution throughout the sequence, with few mutations found in regions covered by the primers (data not shown). A concentration of 7.0% propanol resulted in a higher yield but a mutation frequency of only $2.7x10^{-3}$ error / bp / PCR with no deletions detected. PCR with 8.0% propanol resulted in a mutation frequency of $5.8x10^{-3}$ error / bp / PCR. The two base deletion detected corresponds to $4.8x10^{-4}$ deletion / bp / PCR which is roughly tenfold less frequent than the substitution mutation frequency. The maximal length of amplification achieved with $Vent_r^{®}$ (exo-) was assessed using a PCR reaction that allows for amplification of DNA molecules of 0.8kb, 1.6kb and 2.8kb simultaneously. In presence of 7.0% propanol, the enzyme was able to amplify amplicons of 2.8kb. With 8.0% propanol, the longest amplicon obtained was 0.8kb. Note that under standard PCR conditions, $Vent_r^{®}$ (exo-) can amplify DNA molecules as long as 15kb (19,24). Decreasing propanol concentration from 8 to 7% lead to higher yield but lower mutation rate, and increasing its concentration above 8% resulted in complete inhibition, indicating that the concentration range providing optimal error-prone PCR conditions is narrow. Note that with other alcohols and urea, varying their concentration around the critical concentration did not

result in higher error rate than the one observed at the critical concentration (data not shown).

Determination of the mutation profile obtained with propanol revealed that most mutations involved replacement of guanines and cytosines (G or C turns N), contrasting with previously published results showing that all three enzyme promote substitution of As and Ts, without mutagenic agent (22,23), or with $MnCl_2$-mediated mutagenesis using Taq polymerase (9). This phenomenon was confirmed using our experimental conditions with Taq and $MnCl_2$, as described in Table 2.2.

We then compared our error-prone PCR conditions with $MnCl_2$-mediated mutagenesis by studying the effect of $MnCl_2$ on $Vent_r^{®}$ (exo-) and Taq amplified products. With $Vent_r^{®}$ (exo-) in presence of 0.5mM $MnCl_2$, the amplicon yield was equivalent to 75% of the standard yield, the mutation frequency was $3.7x10^{-2}$ error / bp / PCR with no deletions or insertions and the maximal length of amplification was 0.8kb. Mutational bias was similar to the one obtained with propanol, favoring mutation of guanines and cytosines which represented 77% of mutations. The same condition applied to Taq polymerase lead to a similar effect on amplification yield but to a mutation frequency of $8.5x10^{-2}$ error / bp / PCR with a deletion frequency of $3.6x10^{-3}$ error / bp / PCR. The mutational bias obtained with Taq was totally different, favoring mutation of adenines and thymines which accounted for 75% of the mutations, in agreement with previously reported data (22).

Another factor that has been previously shown to impact on the mutational bias is the modification of the dNTPs ratio (9, 12, 13). To further compare propanol- and $MnCl_2$-mediated mutagenesis, we investigated the effect of dNTP ratio variations with $Vent_r^{®}$ (exo-) in the presence of either mutagenic agent. Using an AT / GC = $^1/_4$ ratio, major differences were observed between PCR with $MnCl_2$ and PCR with propanol as the mutagenic agent: 1- with $MnCl_2$ the mutational bias (related to the base that is removed from the sequence during substitution; X turns N) and replacement bias (related to the dNTP that is used to substitute the base removed; N turns X) were

practically inverted with adenines and thymines representing 88% of mutated nucleotides. The mutational bias stayed unchanged with propanol, in spite of the change in dNTP ratio, although the replacement bias decreased (N turns to A or T decreased from 67 to 51%). 2- The mutation frequency dropped to $5.2x10^{-3}$ error / bp / PCR in the presence of $MnCl_2$, while it increased when using propanol with the same AT / GC ratio of $^1/_4$. Clearly, these results demonstrate that the mode of action of propanol on $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase is different from the action of $MnCl_2$. Therefore, PCR using propanol combined with $Vent_r^{®}$ (exo-) DNA polymerase offers a genuinely different alternative to standard error-prone PCR.

The combination of propanol and $MnCl_2$ was tested with $Vent_r^{®}$ (exo-) in order to investigate interactions or synergy among the mutagenic agents. The combination of 8.0% propanol and 0.5mM $MnCl_2$ resulted in total inhibition of $Vent_r^{®}$ (exo-) DNA polymerase. This suggests an additive inhibitory effect of the mutagenic agents.

Reducing the propanol concentration from 8.0% to 7.0% allowed for partial polymerase activity. The resulting mutation frequency was $2.3x10^{-2}$ error / bp / PCR, slightly inferior to that using 0.5mM $MnCl_2$ alone, suggesting a protective effect of propanol toward $MnCl_2$ -mediated decrease in polymerase fidelity. The mutational bias was roughly equivalent to that obtained with 8.0% propanol or 0.5mM $MnCl_2$ (i.e. polymerase-dependant) and the maximal length of amplification was 0.4kb (data not shown). In fact, no advantage could be identified from the combination of propanol and $MnCl_2$ in PCR.

Discussion

The objective of this study was to identify new means of lowering the fidelity of thermostable DNA polymerases during PCR. We chose alcohols (and urea as a standard protein denaturant) to induce chemical stress on polymerase during PCR and we monitored the effect by analyzing amplicon yield and sequence. Experiments were conducted with three thermostable DNA polymerases having different thermoresistance. Concentration of alcohols in the PCR mix was increased to a level (i.e. from 1 to 10% v/v) where a substantial decrease in polymerization yield was observed. Then, sequence analysis of amplification products was performed in order to detect any change in mutation rate. Under our conditions, only propanol induced a 10 to 50-fold increase in mutation rate of $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase, when compared to published intrinsic error rates for this enzyme (27). Addition of propanol resulted in a mutation frequency ranging from $2.7x10^{-3}$ to $9.8x10^{-3}$ error / bp / PCR, a mutation rate that is lower than that offered by standard error-prone PCR (Taq polymerase and $MnCl_2$) but that is sufficient for directed evolution experiments (28).

The new method was compared to the standard error-prone PCR protocol applied under similar experimental conditions and new features were identified. Using 7% propanol and $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase, DNA molecules up to 2.8kb in length were amplified, which is longer than the maximal length of amplification achieved with error-prone PCR using Taq polymerase (13). Mutation profiles obtained with $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase and propanol generally favoured mutation of guanines and cytosines (69-86% of all mutations). This bias is opposite to the one achieved with the polymerase alone (22), or with standard error-prone PCR. This property has important practical consequences: 1- these PCR conditions would lead to higher mutation rates and less biased libraries when dealing with GC-rich templates; 2- by mixing proper amounts of PCR amplicons obtained with $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase / propanol and Taq polymerase / $MnCl_2$, one should control the bias in a library of mutations; 3- the

conditions presented here allow one to probe a different sequence space than with early error-prone PCR protocols (8,9) without any modification in dNTP ratio.

Comparison of the results obtained with propanol and $MnCl_2$ indicated that each mutagenic agent acted in a different manner: 1- mutation frequencies obtained with $MnCl_2$ were significantly higher than those obtained with propanol; 2- the mutagenic effect of propanol was obvious with $Vent_r^{®}$ (exo-) but marginal for Taq polymerase. This contrasts with $MnCl_2$ which substantially enhanced the mutation rate of both $Vent_r^{®}$ (exo-) and Taq DNA polymerase at a concentration of 0.5mM; 3- the response to a variation of dNTP ratio was also different for both mutagens. A ratio of AT / GC = $^1/_4$ enhanced the mutation frequency obtained with 8.0% propanol without modifying the mutational bias, whereas with $MnCl_2$ the same dNTP ratio lowered the mutation frequency by a factor 7 and practically reversed the mutational bias. Under our conditions, the ability to change bias with modified dNTP ratio appears to be dependant on the mutagenic agent.

The experimental conditions tested here allow to shed some light on the differences between the mode of action of either agent. Being well known denaturants, the alcohols tested here may have a general and deleterious effect on polymerase conformation, which is not expected from $MnCl_2$. Indeed, the impact of alcohols appears to include the partial destabilization of enzyme folded conformation via a decrease in the hydrophobic effect, a major force in protein folding (29,30). This is demonstrated here by the general relationship between hydrophobicity of the alcohols tested, thermoresistance of each polymerase and the resulting critical concentration required for inhibition. Further, the impact of the non-alcohol denaturant urea, and previous studies showing that 8% propanol is sufficient to partially unfold proteins (17), all support the view that the decrease in amplification yield shown here is due, at least in part, to polymerase destabilization.

While it was possible to decrease PCR yield using any of the alcohols tested here, only propanol induced an increased mutation rate at critical concentration. Various

scenarios may be considered in explaining the specific effect of propanol. First, one could argue that DNA polymerase have a specific binding site for propanol. Amphiphilic molecules like alcohols often bind proteins at sites allowing an optimal number of methyl groups (31). Thus, only propanol would promote a reduction in $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase accuracy because of a particular binding site. This hypothesis does not readily explains why Deep $Vent_r^{®}$ (exo-) did not respond to propanol, although this polymerase is closely related to $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase. Further, the polymerase used for PCR in the presence of mutagenic agent was shown to be a determinant factor. When using equimolar quantities of dNTPs, it was found that the bias obtained with $Vent_r^{®}$ (exo-) (from polymerase family B) was the same regardless of the mutagenic agent present during PCR (i.e. propanol or $MnCl_2$). Therefore, the bias in error-prone PCR appears to be polymerase dependant, not propanol dependant, and this argues against a specific site for propanol leading to mutations.

The differences in hydrophobicity among the three alcohols tested might be a key factor in determining the environment of the dNTP in PCR mixtures. The modification of the solvation network around oligonucleosides by alcohols was reported recently and it was proposed that this would interfere with the formation of complementary base pairs (32). Thus, propanol effect on PCR solvent polarity might have a determinant impact on polymerase accuracy via a change in nucleotide behavior. The reason why such impact on nucleotides behavior did not lead to mutations with other polymerases is not clear, unless other properties of polymerase such as thermostability have an importance in this phenomenon.

Indeed, the combination of solvent effect and a partial destabilization of polymerases by propanol could be the condition conferring mutagenicity to propanol. This particular set of conditions was reached only with $Vent_r^{®}$ (exo-) and to a lesser extent, for Taq polymerase. In this case, one can argue that Taq polymerase is not amenable to a high error rate because it is severely destabilized at low propanol concentration (2.5%) and that this is too low to provide the necessary solvent effect. In the case of Deep $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase, although a decrease in yield was observed

with 8% propanol, no mutations were detected. Under these conditions, the thermostable Deep $Vent_r^{®}$ (exo-) polymerase should not be destabilized as much as $Vent_r^{®}$ (exo-) is. In this case, the change in solvent polarity and the ensuing modification of the solvent network around nucleotides brought by propanol exists but may be insufficient to decrease the enzyme fidelity. These results suggest that mutagenicity of propanol, just like the decrease in amplification yield discussed above, requires a finely tuned partial structural destabilization of the target polymerase.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. M. Sirois for providing us with *Actinobacillus pleuropneumoniae* genomic DNA and oligonucleotides allowing to evaluate the maximal length of amplification of polymerases. Special thanks go to Drs F. Boucher (U. Q. T. R.) and J. Pelletier (U. Montréal) for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the National Research Council of Canada awarded to MB.

References

1. Mott, J., Van Arsdell, J., Platt, T., (1984) Targeted mutagenesis in vitro: lac repressor mutations generated using AMV reverse transcriptase and dBrUTP. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 4139-4152.

2. Cox, E.C., (1976) Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.*, **10**: 135-156.

3. Chu, C.T., Parris, D.S., Dixon, R.A., Farber, F.E., Schaffer, P.A., (1979) Hydroxylamine mutagenesis of HSV DNA and DNA fragments: Introduction of mutations into selected regions of the viral genome. *Virology*, **98**: 169-181.

4. Shortle, D., Bobstein, D., (1983) Directed mutagenesis with sodium bisulfite. *Methods Enzymol.*, **100**: 457-468.

5. Smith, M., (1989) In vitro mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.*, **19**: 423-462.

6. Chiang, L., Kovari, I., Howe, M., (1993) Mutagenic oligonucleotide-directed PCR amplification (Mod-PCR): An efficient method for generating random base substitution mutations in a DNA sequence element. *PCR Methods Applic.*, **2**: 210-217.

7. Kless, H., Vermaas, W., (1996) Combinatorial mutagenesis and structural simulations in the environment of the redox-active tyrosine YZ of photosystem II. *Biochemistry,* **51**: 16458-16464.

8. Leung, D.W., Ellson, C., Goeddel, D.V., (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, **1**: 11-15.

9. Cadwell, R.C., Joyce, G.F. (1992) Randomization of genes by *in vitro* mutagenesis. *PCR methods appl.*, **2**: 28-33.

10. Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H., (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.*, **10**: 433-437.

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

12. Vartanian, J.P., Henry, M., Wain-Hobson, S., (1996) Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 2627-2631.

13. Fromant, M., Blanquet, S., Plateau, P., (1995) Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **1**: 347-353.

14. Sundd, M., Kundu, S., Jagannadham, M.V., (2000) Alcohol-induced conformational transitions in ervatamin C. An alpha-helix to beta-sheet switchover. *J. Protein Chem.*, **3**: 169-176.

15. Khan, F., Khan, R.H., Muzammil, S., (2000) Alcohol-induced versus anion-induced states of alpha-chymotrypsinogen A at low pH. *Biochim. Biophys. Acta*, **2**: 229-236.

16. Kamatari, Y.O., Konno, T., Kataoka, M., Akasaka, K., (1996) The methanol-induced globular and expanded denatured states of cytochrome c: a study by CD fluorescence, NMR and small-angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.*, **3**: 512-523.

17. Velicebeli, G., Sturtevant, J.M., (1979) Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol-water mixtures. *Biochemistry*, **7**: 1180-1186.

18. Beauregard, M., Dupont, C., Teather, R.M., Hefford, M.A., (1995) Design, expression and initial characterization of MB1, a de novo protein enriched in essential amino acids. *Bio/Technol.*, **13**: 974-981.

19. New England Biolabs Inc. (2002-2003) Catalog & technical reference.

20. Kaufman, D.L., Evans, G.A., (1990) Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques*, **3**: 304-306.

21. Chao, K.M., Pearson, W.R., Miller, W., (1992) Aligning two sequences within a specified diagonal band. *Comput. Appl. Biosci.*, **8**: 481-487.

22. Keohavong, P., Ling, L., Dias, C., Thilly, W.G., (1993) Predominant mutations induced by the *Thermococcus litoralis*, Vent DNA polymerase during DNA amplification in vitro. *PCR Methods Applic.*, **2**: 288-292.

23. Huang, H., Keohavong, P., (1996) Fidelity and predominant mutations by Deep Vent wild-type and exonuclease-deficient DNA polymerases during *in vitro* DNA amplification. *DNA Cell. Biol.*, **15**: 589-594.

24. Kong, H., Kucera, B., Jack, W.E., (1993) Characterization of a DNA polymerase from hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 1965-1975.

25. Ayed, A., Duckworth, H.A., (1999) A stable intermediate in the equilibrium unfolding of *Escherichia coli* citrate synthase. *Protein Sci.*, **8**: 1116-1126.

26. Tindall, K.R., Kunkel, T.A., (1988) Fidelity of DNA synthesis by the T*hermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemisrty*, **27**: 6008-6013.

27. Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T., Pitkanen, K., (1991) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase — an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 4967-4973.

28. Zhao, H., Giver, L.,Shao, Z., Affholter, A., Arnold, F.H., (1998) Molecular Evolution by Staggered Extension Process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.*, **16**: 258-261.

29. Tanford, C., (1973) The hydrophobic effect. Wiley-Interscience, New York.

30. Dill, K.A., (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, **31**: 7133-7155.

31. Wick, M.J., Mihic, S.J., Ueno, S., Mascia, M.P., Trudell, J.R., Brozowski, S.J., Ye, Q., Harrison, N.L., Harris, R.A., (1998) Mutations of gamma-aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff: evidence for an alcohol receptor? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **11**: 6504-6509.

32. Ababneh, A.M., Large, C.C., Georghiou, S., (2003) Solvation of nucleosides in aqueous mixtures of organic solvents: relevance to DNA open basepairs. *Biophys. J.* **2**: 1111-1127.

TABLE 2.1 Selected alcohol properties and critical concentrations leading to inhibition of various DNA polymerases.

	Boiling point (°C)	log P[1]	Taq polymerase	Vent$_r$® (exo-) polymerase	Deep Vent$_r$® (exo-) polymerase
			Critical concentration (% $^v/_v$)		
Urea *	-	-	1.2	1.5	1.5
Isopropanol	82	0.13	N.D.	10.0	N.D.
Propanol	98	0.28	2.5 **	8.0 **	8.0
Butanol	118	0.75	1.0	4.0	6.0

[1]P is the octanol/water partition constant (32)

* 1.2% $^w/_v$ urea corresponds to 0.2M.

** Conditions providing mutations

TABLE 2.2 Mutational analysis of various error-prone PCR conditions.

Experimental condition	Mutation Frequency[a]	Deletion Frequency[b]	Maximal length of amplification	Sequenced Nucleotides	Amplification yield (% of C+)[c]	Bias indicator			
						A, T turns N[d]	G,C turns N	N turns A, T[e]	N turns G, C
$Vent_r^{®}$ (exo-)									
7% propanol Equimolar dNTPs	$2.7x10^{-3}$	$<4.0x10^{-4}$	2.8kb	2516	90	14%	86%	71%	29%
0.5mM $MnCl_2$	$2.3x10^{-2}$	$<8.7x10^{-4}$	0.8kb	1151	25	29%	71%	67%	33%
8% propanol Equimolar dNTPs	$5.8x10^{-3}$	$4.8x10^{-4}$	0.8kb	4127	75	27%	73%	77%	23%
AT / GC = 1/4	$9.8x10^{-3}$	$1.3x10^{-3}$	0.8kb	4608	75	31%	69%	62%	38%
0.5mM $MnCl_2$ Equimolar dNTPs	$3.7x10^{-2}$	$<6.5x10^{-4}$	0.8kb	1533	75	23%	77%	83%	17%
AT / GC = 1/4	$5.2x10^{-3}$	$<3.3x10^{-4}$	1.6kb	3072	75	88%	12%	25%	75%
Taq									
2.5% propanol Equimolar dNTPs	$9.8x10^{-4}$	N.D.	0.4kb	3049	75	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.5mM $MnCl_2$ Equimolar dNTPs	$8.5x10^{-2}$	$3.6x10^{-3}$	0.4kb	1687	75	75%	25%	44%	56%

[a] calculated as the number of mutation divided by the number of sequenced nucleotides.

[b] calculated as the number of insertion and deletion divided by the number of sequenced nucleotides. ‘‘<’’ means that the deletion frequency was beyond the detection limit.

[c] amplification yield as described under materials and methods.

[d] number of adenines and thymines mutated expressed in percentage of total mutations. "A, T turns N" includes mutations of A to T, G, or C, and mutations of T to A, G, or C. "A, T turns N" and "G, C turns N" are related to the ‘‘mutational bias’’ in the text.

[e] number of nucleotides mutated for adenines and thymines expressed in percentage of total mutations. Related to the ‘‘replacement bias’’ in the text.

CHAPITRE III

DISCUSSION

3.1 Remise en contexte de mes travaux de maîtrise

Tel que précisé au chapitre I, la protéine MB-1 a un contenu élevé (57%) en méthionine, thréonine, lysine, et leucine, quatre AAEs. Cette caractéristique confère à la protéine de design *de novo* une valeur nutritive qui la rend intéressante pour l'industrie agro-alimentaire. L'objectif à long terme avec cette protéine étant de l'intégrer à une moulée commerciale, il était donc impératif de développer un système de production capable de fournir de grandes quantités de protéines à un moindre coût. Pour ce faire, les concepteurs ont choisi de produire la protéine dans le procaryote *E. coli*. L'utilisation d'un bioréacteur pour la production de protéines recombinantes amène son lot d'obstacles. L'information génétique encodant la protéine doit d'abord être synthétisée et introduite dans un plasmide qui est à son tour introduit dans la bactérie qui agit à titre de bioréacteur. Par la suite, l'information est traduite en protéine et celle-ci entre en contact avec une multitude d'autres protéines naturelles incluant des protéases qui sont continuellement à l'affût des protéines présentant une conformation instable. La protéine MB-1 en est une qui présente des points faibles dans sa structure tertiaire, ce qui en fait une cible de choix pour les protéases avec comme conséquence un faible rendement de production dans *E. coli*. Les travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire de Marc Beauregard ont permis d'améliorer les performances de MB-1 dans *E. coli*, mais son efficacité pourrait être supérieure si sa thermostabilité était encore plus grande. Ces travaux ont aussi amené l'équipe du chercheur à envisager l'utilisation de l'évolution dirigée pour parvenir à obtenir des variantes très stable en un court laps de temps. Cependant, les méthodes de génération de mutation par PCR mutagène décrites dans la littérature sont mal adaptées à l'évolution accélérée de MB-1, car elles ne favorisent pas

l'apparition des AAEs. L'application pratique de MB-1 étant liée à son contenu élevé en AAE, il est primordial d'utiliser des méthodes permettant de maximiser son contenu en AAE. Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma maîtrise ont consisté à développer un protocole de PCR mutagène permettant d'obtenir un biais de mutation favorisant l'apparition d'AAEs. Pour ce faire, deux approches ont été combinées:

1- l'ajout d'agents dénaturants dans la mixture PCR;
2- l'utilisation d'ADN polymérases d'origine différentes.

Cette approche a mené à la découverte d'un protocole de PCR très bien adapté à l'évolution dirigée de MB-1 car il favorise l'apparition de codons encodant un AAE. Même si aucune pression sélective n'est appliquée sur une banque enrichie en AAEs, il n'en demeure pas moins que les variants qui la composent contiennent plus dAAEs, ce qui augmente les probabilités de récupérer des variants à valeur nutritive ajoutée après sélection.

3.2 Discussion des résultats

Le PCR mutagène est une technique largement utilisée pour les travaux d'évolution dirigée; toutefois, la littérature à ce sujet est limitée. L'exploration de ce terrain de recherche sous-exploité m'a incité à développer une méthode de PCR mutagène adaptée spécialement à l'évolution dirigée de MB-1. Différents alcools ainsi que l'urée ont été utilisés pour induire un stress chimique sur trois ADN polymérases distinctes pendant une réaction PCR. Le degré de stress chimique a été mesuré en évaluant le rendement en ADN polymérisé lors de la réaction ainsi que la qualité de la séquence des molécules synthétisées. Les concentrations d'alcool induisant une inhibition substantielle (environ 25%) de l'activité de l'enzyme ont été choisies pour évaluer l'effet du stress chimique. Parmi les différentes conditions expérimentales testées, seul le propanol a provoqué une augmentation variant de 10 à 50 fois du taux de mutation de la polymérase Vent exo-. L'addition de propanol à un PCR mené avec la Vent exo- génère un taux de mutation variant entre 2.7×10^{-3} et 9.8×10^{-3} mutation / paire

de base / PCR. Ce taux de mutation est inférieur à ce qui peut être obtenu avec le chlorure de manganèse, mais il est amplement suffisant pour générer des banques de mutants utiles à l'évolution dirigée des protéines. Appliqué à un gène de 1kilobase (kb), ce protocole permet de générer entre trois et dix mutations en moyenne par gène. Ce taux de mutation est suffisant, voire même trop élevé, pour des expériences d'évolution dirigée. Appliqué à une enzyme par exemple, un taux de mutation trop élevé peut prévenir la sélection de mutations favorables à cause d'un trop grand nombre de mutations déstabiliantes (30).

3.2.1 Comparaison avec le protocole de PCR mutagène standard (Taq et $MnCl_2$)

La comparaison du nouveau protocole de PCR mutagène (Vent exo- et propanol) avec les méthodes standard utilisant la Taq polymérase et le chlorure de manganèse a conduit à des découvertes intéressantes. En utilisant la Vent exo- en présence de 7 à 8% (v/v) en propane-1-ol, condition identifiée comme étant mutagène, des molécules d'ADN de 2.8 kilobases peuvent être amplifiées, ce qui est plus long que la longueur maximale d'amplification rapportée avec la Taq et le chlorure de manganèse (31). De manière générale, le profil des mutations obtenu avec la polymérase Vent exo- en présence de propanol favorise la mutation des nucléotides G et C qui comptent pour 69 à 86% des mutations, dépendant des conditions expérimentales. Il est intéressant de noter que le biais de mutation de cette même enzyme utilisée en condition standard favorise la mutation des nuclétides A et T (32). La Taq polymérase favorise également la mutation des nucléotides A et T en condition standard, mais le biais des mutations reste similaire en condition mutagène (i.e. avec chlorure de manganèse). Par conséquent, il semble impossible de prédire l'effet qu'aura un agent mutagène sur le biais de mutation d'une ADN polymérase.

3.2.2 Applications pratiques du nouveau biais des mutations

Le biais de mutation particulier obtenu avec la polymérase Vent exo- a des applications pratiques intéressantes:

1- Il peut être utilisé pour introduire des mutations dans des séquences riches en G et C avec une plus grande efficacité, donnant accès à un espace séquence différent de celui accessible avec la Taq polymérase;
2- En pratiquant un PCR mutagène avec les polymérases Taq et Vent exo- simultanément, il est possible d'accéder à un espace séquence jusqu'à maintenant inaccessible.

Les codons encodant les AAEs sont majoritairement riches en A et T : or les protocoles de PCR mutagènes publiés utilisent la Taq polymérase et favorisent la mutation des nucléotides A et T (5,6), diminuant ainsi les probabilités de générer des mutations résultant en AAEs. Les résultats obtenus avec la Taq polymérase et le chlorure de manganèse corroborent ce qui est décrit dans la littérature. La figure 3.1 illustre comment un biais au niveau de la mutation des nucléotides peut influencer le profil des acides aminés dans une protéine (une discussion de la figure 3.1 suit plus bas dans le texte). Le biais des mutations observé avec la polymérase Vent exo- en présence de propanol ne se limite pas à la mutation préférentielle de nucléotides, il favorise également l'apparition des nucléotides A et T, comptant pour 62 à 77%. En comparaison, la polymérase de Taq présente un biais favorisant la mutation des nucléotides A et T mais ne présente pas de biais particulier en ce qui a trait à la fréquence d'apparition des nucléotides. L'examen du ''Table 2.2'' du chapitre II facilite cette observation. On constate qu'avec la Taq polymérase en présence de chlorure de manganèse, la fréquence d'apparition des nucléotides A et T est de 44% versus 56% pour celle des nucléotides G et C, des proportions somme toute bien équilibrées. Le biais favorisant l'apparition des nucléotides A et T, propre à la polymérase Vent exo-, a également une application pratique intéressante puisqu'il favorise l'apparition de codons encodant un AAE, tel qu'illustré à la figure 3.1. Cette caractéristique cadre parfaitement

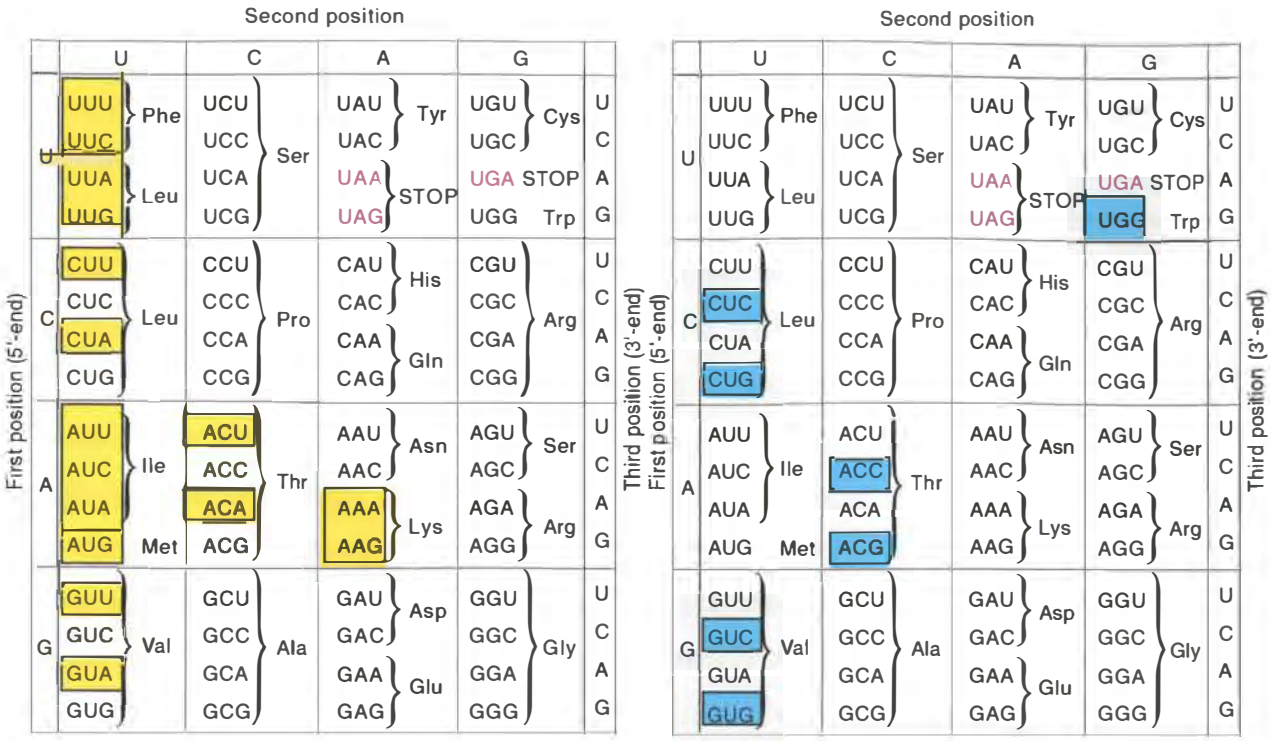


FIGURE 3.1 Impact du biais des mutations sur la fréquence d'apparition des acides aminés.

Le code génétique permet de visualiser l'effet d'un biais de mutation des nucléotides sur la probalité d'apparition des AAEs. Un protocole de PCR mutagène facilitant l'apparition des nucléotides A et T favoriserait l'apparition d'AAEs. Sur le code reproduit à gauche, sont encadrés en jaune les codons riches en A et / ou T encodant un AAE. Dans ce cas, sept des huit AAEs sont favorisés, seul le tryptophane ne l'est pas. Sur le code reproduit à droite, sont encadrés en bleu les codons riches en G et / ou C encodant un AAE. Dans ce cas, seulement quatre des huit AAEs sont favorisés. Notons que les huit acides aminés essentiels aux mammifères sont la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la valine, la thréonine, la lysine et le tryptophane.

avec les besoins de notre laboratoire puisque le nouveau protocole, appliqué à MB-1, permet de générer une banque de variants enrichie en AAEs, ce qui constitue l'objectif premier de mon projet. Les mutations de nucléotides obtenues expérimentalement avec les deux méthodes de mutagénèse ont été traduites au niveau des acides aminés pour vérifier si le nouveau protocole de PCR mutagène avait bien une tendance à favoriser l'apparition d'AAEs. Le tableau 3.1 regroupant ces données expérimentales démontre que 34.2% des mutations générées par la polymérase Vent exo- engendrent un AAE tandis que pour la Taq polymérase, cette valeur est de 27.5%. De plus, le protocole basé sur le $MnCl_2$ génère deux fois plus de codons menant à l'apparition d'AA non-essentiels. Le protocole de PCR mutagène avec la polymérase Vent exo- et le propanol offre donc une alternative intéressante pour enrichir une banque de variants en AAEs. On remarque que le pourcentage de mutation engendrant une mutation silencieuse est beaucoup plus élevé avec le protocole utilisant la polymérase Vent exo- et le propanol. Cependant, la répartition aléatoire des mutations dans la séquence amplifiée fait qu'une mutation peut survenir aussi bien à la première position d'un codon qu'à la troisième. La nature dégénérée du code génétique fait en sorte qu'une mutation à la première position d'un codon va presque toujours provoquer le changement d'un acide aminé alors qu'une mutation en troisième position, la plus dégénérée du code, provoquera beaucoup moins souvent le changement d'un acide aminé. L'écart entre les fréquences de mutations silencieuses est donc le fruit du hasard.

3.2.3 Comparaison entre les effets du propanol et du chlorure de manganèse

L'examen des résultats obtenus avec le propanol et ceux obtenus avec le chlorure de manganèse permet de constater que ces deux agents mutagènes agissent d'une manière différente. Pour une inhibition similaire de l'activité enzymatique d'une ADN polymérase, les taux de mutation obtenus avec le chlorure de manganèse sont supérieurs à ceux obtenus avec le propanol, cette différence atteint un ordre de grandeur. De plus,

TABLEAU 3.1 Fréquence d'apparition des codons avec différentes conditions de PCR mutagène.

Mutations comptabilisées	Vent exo- / Propan-1-ol		Taq pol / 0.5mM $MnCl_2$	
	Nombre	%	Nombre	%
Total	73	100	138	100
Mutations générant un AAE	25	34.2	38	27.5
Mutation générant un AA non-essentiel	20	27.4	76	55.1
Mutations silencieuses	22	30.1	17	12.3
Mutations générant un codon Stop	6	8.2	7	5.1

le chlorure de manganèse a un effet mutagène évident avec les polymérases Vent exo- et Taq, ce qui n'est pas le cas du propanol pour lequel l'effet mutagène sur la polymérase Vent exo- est clair, mais plutôt ambigu avec la Taq polymérase. D'autre part, les mutations résultant de la combinaison d'un ratio de dNTPs modifié avec le propanol ou le sel de manganèse sont totalement différentes. Avec la polymérase Vent exo-, un ratio de AT / GC d'un pour quatre combiné à 8.0%$^{v}/_{v}$ propanol a eu un impact minime sur le profil des mutation obtenues à comparer à la même concentration d'alcool sans modification dans le ratio des dNTPs. Par contre, le taux de mutation a augmenté, passant de 5.8×10^{-3} à 9.8×10^{-3} mutation / pb / PCR. Avec la polymérase Vent exo- toujours, la même modification dans le ratio des dNTPs combinée au chlorure de manganèse a eu un effet complètement différent. Le profil des mutations a pratiquement été inversé, la fréquence de mutation des A et T est passée de 23 à 88% et la fréquence d'apparition des A et T est passée de 83 à 25%. Ce changement de profil des mutations est accompagné d'une diminution drastique du taux de mutation, celle-ci est passée de 3.7×10^{-2} à 5.2×10^{-3}, une diminution d'un facteur 7. Ces résultats portent à penser que la possibilité de modifier le profil des mutations en variant la quantité relative des quatre nucléotides présents dans le cocktail à PCR dépend de la nature de l'agent mutagène utilisé.

3.3 Effet des agents dénaturants sur les ADN polymérases

Les résultats recueillis nous ont permis de faire la lumière sur les différences entre les modes d'action du propanol et du manganèse. Par opposition au chlorure de manganèse, les alcools testés dans mon projet ont des propriétés dénaturantes bien établies. Par conséquent, il était attendu que les alcools aient un effet nuisible sur l'ADN polymérase se traduisant par une modification de la conformation de l'enzyme, ce qui ne peu se produire avec le chlorure de manganèse. Les alcools semblent induire une déstabilisation partielle de l'enzyme par le biais d'une diminution de la force de l'effet hydrophobe. En effet, les résultats obtenus démontrent que plus l'alcool est hydrophobe

(i.e. plus sa chaîne aliphatique est longue) plus petite est la concentration nécessaire pour induire une inhibition de l'activité enzymatique (voir "Table 2.1" au chapitre II). D'ailleurs, d'autres travaux ont démontré qu'une concentration de 8% propanol était suffisante pour induire une perturbation de la conformation d'une protéine (33). La thermorésistance des ADN polymérases est également proportionelle avec la concentration d'alcool inhibitrice, bien que cette relation ne soit pas parfaite. Par exemple, les polymérases Vent exo- et Deep Vent exo- proviennent de deux organismes différents et ont des thermorésistances différentes: elles nécessitent par contre la même concentration critique de propanol. Étant donné que la polymérase Deep Vent exo- est plus thermostable que la Vent exo-, on devrait normalement observer une concentration critique plus élevée pour cette enzyme. Une explication de ce phénomène réside dans la possibilité que les autres ingrédients de la mixture PCR (oligonucléotides, dNTPs, ADN matrice) soient aussi affectés par la présence d'alcool et que ceux-ci deviennent l'élément qui limite la réaction de polymérisation d'ADN.

3.3.1 Effet mutagène du propanol

Les trois alcools utilisés pour induire le stress chimique sur les polymérases possèdent chacun leur propres caractéristiques physiques. Même s'il a été possible d'induire un stress chimique sur l'ADN polymérase avec chacun de ces alcools, seul le propanol a présenté un effet mutagène à la concentration critique, et ce avec la polymérase Vent exo- seulement. Mes travaux n'ont pas permis d'élucider le mécanisme par lequel le propanol induit les mutations lors du PCR, par contre les résultats obtenus suggèrent certaines réponses au phénomène. Il est possible que le propanol se fixe à un site de liaison spécifique uniquement présent à la surface de la polymérase Vent exo-. Il existe une variété de sites de liaison protéiques bien adaptés aux molécules amphiphiles telles que les alcools. Ces sites accomodent un nombre optimal de groupements méthyls (34). La fixation du propanol à ce site pourrait induire une modification de la conformation de l'enzyme résultant à l'effet mutagène observé. Avec un ratio de dNTPs

normal, le biais des mutations observé avec la polymérase Vent exo- en condition mutagène avec le propanol ou le chlorure de manganèse est très similaire. Le biais des mutations semble lié à la polymérase utilisée et non au propanol, ce résultat va donc à l'encontre de l'hypothèse du site de liaison spécifique au propanol. Il est également possible que l'hydrophobicité des alcools soit un facteur clé influençant le comportement des dNTPs dans la mixture à PCR. Il a récemment été rapporté dans la littérature que les alcools interfèrent avec l'appariement des bases azotées présentes dans l'ADN (35). L'effet du propanol sur la polarité du solvant peut modifier le comportement des nucléosides en solution ce qui peut avoir un impact déterminant sur la spécificité de l'ADN polymérase. Toutefois, ce phénomène aurait dû avoir le même effet sur les polymérases Taq et Deep Vent exo-, ce qui n'est pas le cas. Les propriétés intrinsèques aux polymérases, comme par exemple la thermostabilité, jouent peut-être un rôle important. Dans cette optique, l'effet mutagène du propanol pourrait être le résultat d'une combinaison de son effet sur le solvant et de son effet déstabilisant sur l'ADN polymérase. La thermorésistance des polymérases expliquerait pourquoi seule la polymérase Vent exo- génère des mutations en présence d'une concentration critique de propanol. La Taq polymérase, l'enzyme la moins thermorésistante testée, présente une concentration critique de propanol de 2.5%$^{v}/_{v}$. Cette concentration provoque une déstabilisation évidente de l'enzyme mais peut être insuffisante pour induire une perturbation du solvant, qui peut être une condition de l'effet mutagène du propanol. Inversement, la polymérase Deep Vent exo-, l'enzyme testée ayant la plus grande thermorésistance, présente une concentration critique de propanol de 8.0%$^{v}/_{v}$. Cette concentration critique est identique à celle mesurée avec la polymérase Vent exo-, on peut donc admettre que l'effet du propanol sur le solvant est le même. Par contre, la polymérase Deep Vent exo- est probablement moins sensible à l'effet déstabilisant du propanol étant donné sa thermorésistance plus élevée. Ces observations suggèrent que l'effet mutagène du propanol résulte d'une combinaison de son effet déstabilisateur de protéines et de son effet sur le solvant, ce qui expliquerait pourquoi cet effet se manifeste uniquement avec la polymérase Vent exo-.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

4.1 Avenues de recherches futures

Le développement de ce protocole de PCR mutagène novateur nous amène à deux grandes avenues de recherche. D'un point de vue fondamental, l'élucidation du phénomène à la base de l'effet mutagène du propanol peut déboucher sur des découvertes intéressantes. D'un point de vue appliqué, l'exploitation du potentiel mutagène du propanol à des fins d'évolution dirigée donne accès à une infinité de possibilités.

4.1.1 Élucidation du mécanisme de mutagénèse du propanol

Le mécanisme par lequel le propanol induit des mutations dans les séquences d'ADN amplifiées n'a pu être découvert avec les résultats que j'ai accumulés, il demeure donc toujours nébuleux. L'élucidation de ce phénomène avec les techniques de caractérisation biophysique constitue un autre projet en soi. La compréhension de ce phénomène apporterait des informations intéressantes qui contribueraient à améliorer nos connaissances des protéines et les interactions qu'elles ont avec les alcools. D'autre part, l'étude de l'effet des alcools sur les autres composantes du cocktail à PCR constitue un aspect qui devrait être exploré.

4.1.2 Exploitation du potentiel mutagène du propanol

Le propanol ayant démontré des propriétés mutagènes avec la polymérase Vent exo-, l'étape suivante du projet a consisté à caractériser cet effet. Il est cependant possible que cet effet mutagène s'applique à d'autres ADN polymérases n'ayant pas été testées dans mes travaux. Il serait intéressant de cribler la vaste gamme de polymérases disponibles afin de découvrir des biais de mutations particuliers pouvant s'appliquer à des cas particuliers comme celui des AAEs et MB-1. D'autre part, le protocole de PCR mutagène développé au cours de ma maîtrise cadre parfaitement bien avec les besoins spécifiques d'un projet d'évolution dirigée sur la protéine MB-1. Le nouveau protocole de PCR mutagène servira à la génération de banques de variants qui feront ensuite l'objet d'une sélection par expression phagique, tel qu'illustré à la figure 1.2 de l'introduction. Le potentiel de la méthode mise au point ne se limite toutefois pas à des travaux sur la protéine MB-1. Le profil unique du biais des mutations obtenu avec la polymérase Vent exo- offre des possibilités intéressantes pour l'évolution dirigée de séquences riches en nucléotides G et C. Ainsi, toute enzyme provenant d'un organisme dont le génome est riche en G et C devient une cible intéressante pour des travaux d'évolution dirigée, et l'application de la méthode permettra en plus d'accéder à un espace séquence qui, jusqu'à maintenant, n'était pas accessible avec les méthodes de PCR mutagène décrites dans la littérature.

BIBLIOGRAPHIE

1. Shortle, D., Bobstein, D. (1983) ''Directed mutagenesis with sodium bisulfite'' Methods Enzymol. 100: 457-468.
2. Cox, E.C. (1976) ''Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation'' Annu. Rev. Genet. 10: 135-156.
3. Mott, J., Van Arsdell, J., Platt, T. (1984) ''Targeted mutagenesis in vitro: lac repressor mutations generated using AMV reverse transcriptase and dBrUTP'' Nucleic Acids Res. 12: 4139-4152.
4. Chiang, L., Kovari, I., Howe, M. (1993) ''Mutagenic oligonucleotide-directed PCR amplification (Mod-PCR): An efficient method for generating random base substitution mutations in a DNA sequence element'' PCR Methods Applic. 2: 210-217.
5. Leung, D.W., Ellson, C., Goeddel, D.V. (1989) ''A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction'' Technique 1: 11-15.
6. Cadwell, R.C., Joyce, G.F. (1992) ''Randomization of genes by *in vitro* mutagenesis'' PCR methods appl. 2: 28-33.
7. Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H. (2002) ''Optimizing lipases and related enzymes for efficient application'' Trends Biotechnol. 10: 433-437.
8. Vartanian, J.P., Henry, M., Wain-Hobson, S. (1996) ''Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions'' Nucleic Acids Res. 14: 2627-2631.
9. New England Biolabs Inc. (2002-2003) Catalog & technical reference.
10. Keohavong, P., Thilly, W.G. (1989) ''Fidelity of DNA polymerase in DNA amplification'' Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 9253-9257.
11. Bartel, B.P., Szostak, J.W. (1993) ''Isolation of New Ribozymes from a Large Pool of Random Sequences'' Science 261: 1411-1418.

12. Ting, A., Witte, K., Shah, K., Kraybill, B., Shokat, K., Schultz, P. (2001) ''Phage-Display Evolution of Tyrosine Kinase with Altered Nucleotide Specifity'' Biopolymers 60: 220-228.

13. Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H. (2002) ''Optimizing lipases and related enzymes for efficient application'' Trends in Biotechnology 10: 433-437.

14. Buchholz, F., Stewart, A. (2001) ''Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution'' Nat Biotechnol. 11: 1047-1052.

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

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

17. Wada, M., Hsu, C., Franke, D., Mitchell, M., Heine, A., Wilson, I., Wong C. (2003) ''Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions'' Bioorg Med Chem. 9 :2091-2098.

18. Beauregard M, Dupont C., Teather R.M., Hefford M.A. (1995) ''Design, expression and initial characterisation of MB-1, a *de novo* protein enriched in essential amino acids'' Biotechnology 13: 974-981.

19. Church, D.C. (1988) ''The ruminant animal: digestive physiology and nutrition'' Reston: Prentice Hall, ed.

20. MacCallum, J.D., Hefford, M.A., Omar, S., Beauregard, M. (1997) ''Prediction of folding stability and degradability of the *de novo* designed protein MB-1 in cow rumen'' Applied biochem. Biotechnol. 66: 83-92.

21. Mahadevan, S., Erfle, J.D., Sauer, F.D. (1980) ''Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease by rumen microorganisms'' J. anim. Sci. 4: 723-728.

22. Spencer, D., Higgins, T.J., Freer, M., Dove, H., Coombe, J.B. (1988) ''Monitoring the fate of dietary proteins in rumen fluid using gel elctrophoresis'' Br. J. Nutr. 2: 241-247.

23. Morrison, J.J., McNally, J.D., Navidzadeh, A., Beauregard, M. (2000) ''Development of an Optimized Feeding Technology for Dairy Cows'' Applied Biochemistry and Biotechnology 87: 247-264.

24. Doucet A., Williams, M., Gagnon, M.C., Sasseville, M., Beauregard, M. (2001) ''Engineering Nutritious Proteins: Improvement of Stability in the Designer Protein MB-1 via Introduction of Disulfide Bridges'' J. Agric. Food Chem. 50: 92-98.

25. Gagnon, M.C., Williams, M., Doucet, A. and Beauregard, M. (2000) ''Replacement of Tyr62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1 results in significant improvement of conformational stability'' FEBS letters 484: 144-148.

26. Velicelebi, G., Sturtevant, J. (1979) ''Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol-water mixtures'' Biochemistry 7: 1180-1186.

27. Sundd, M., Kundu, S., Jagannadham, M.V. (2000) ''Alcohol-induced conformational transitions in ervatamin C. An alpha-helix to beta-sheet switchover'' J Protein Chem. 3: 169-176.

28. Khan, F., Khan, R.H., Muzzammil, S. (2000) ''Alcohol-induced versus anion-induced states of alpha-chymotrypsinogen A at low pH'' Biochim Biophys Acta 2: 229-236.

29. Kamatari, Y.O., Konno, T., Kataoka, M., Akasaka, K. (1996) ''The methanol-induced globular and expanded denatured states of cytochrome c: a study by CD fluorescence, NMR and small-angle X-ray scattering'' J Mol Biol. 3: 512-523.

30. Moore, J.C., Jin, H.M., Kuchner, O., Arnold, F.H. (1997) ''Strategies for the *in vitro* evolution of protein function : enzyme evolution by random recombination of improved sequences'' J. Mol. Biol. 272 : 336-347.

31. Fromant, M., Blanquet, S., Plateau, P. (1995) ''Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction'' Anal. Biochem. 1: 347-353.

32. Keohavong, P., Ling, L., Dias, C., Thilly, W.G. (1993) ''Predominant mutations induced by the *Thermococcus litoralis*, Vent DNA polymerase during DNA amplification *in vitro*'' PCR methods appl. 2: 288-292.

33. Velicebeli, G., Sturtevant, J.M. (1979) ''Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol-water mixtures'' Biochemistry 7: 1180-1186.

34. Wick, M.J., Mihic, S.J., Ueno, S., Mascia, M.P., Trudell, J.R., Brozowski, S.J., Ye, Q., Harrison, N.L., Harris, R.A. (1998) ''Mutations of gamma-aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff: evidence for an alcohol receptor?'' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 11: 6504-6509.

35. Ababneh, A.M., Large, C.C., Georghiou, S. (2003) ''Solvation of nucleosides in aqueous mixtures of organic solvents: relevance to DNA open basepairs'' Biophys. J. 2: 1111-1127.

ANNEXE A

OGILVY
RENAULT

Lignes directes : (418) 640-5259/(418)640-5174
dturgeon@ogilvyrenault.com/ichabot@ogilvyrenault.com

EXPÉDIÉ PAR MESSAGER

Québec, le 25 février 2004

Monsieur Marc Beauregard
AgroTerra Biotech inc.
Département de chimie-biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
2008, Pavillon Pierre-Boucher
Trois-Rivières (Québec) G9A 5H7

OBJET : Demande de brevet aux États-Unis revendiquant la priorité américaine
N° 60/446,518 - 12 février 2003
METHOD OF MUTAGENIC CHAIN REACTION
Inventeurs : Marc Beauregard et autres
Titulaire : AgroTerra Biotech inc.
Notre référence : 15493-2US MG/al

Cher monsieur Beauregard,

Afin de faire suite à vos instructions, nous avons déposé une demande de brevet américaine auprès du Bureau des États-Unis le 12 février dernier.

Vous trouverez deux copies de la demande jointes à la présente, les formulaires de dépôt ainsi que notre note de frais pour honoraires et débours encourus. Nous attirons votre attention sur le fait que l'adresse figurant sur le formulaire de dépôt sous "Inventor Information" est erronée. Nous avons par erreur écrit votre ancienne adresse. Nous corrigerons cette erreur dès notre prochaine correspondance avec le Bureau des brevets.

DEMANDE DE BREVET AUX ÉTATS-UNIS

revendiquant la priorité américaine 06/446,518 déposée le 12 février 2003

Titre : METHOD OF MUTAGENIC CHAIN REACTION

Titulaire : AgroTerra Biotech inc.

Inventeurs : Marc Beauregard et Sébastien Claveau

Numéro de la demande : À venir