

Université du Québec  
INRS-Intitut Armand-Frappier)

Construction d'un vecteur d'expression et de sécrétion de protéines homologues et  
hétérologues chez *Streptomyces lividans*.

Par  
Donald Tremblay

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maître ès science (M. Sc.)  
en microbiologie appliquée.

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Dr François Denis,  
Centre de recherche en santé humaine

Examineur externe

Dr Josée Harel,  
Institut de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr Rolf Morosoli,  
Centre de recherche en microbiologie et biotechnologie

## Résumé

Les streptomycètes peuvent être considérés comme une alternative pour la production extracellulaire de protéines recombinantes puisqu'ils possèdent un mécanisme efficace de sécrétion. Un vecteur, pIAF911-A.8 dérivé de pIJ702, constitué du promoteur de la xylanase A et du peptide signal long muté de la cellulase A de *Streptomyces lividans*, permet la production de 2,35 g/L de xylanase A2. Ce haut taux de production obtenu avec ce vecteur est essentiellement lié aux propriétés de son peptide signal. En effet, celui-ci possède deux codons d'initiation de la traduction (ATG) utilisés conjointement pour la synthèse protéique et une séquence de 8 nucléotides complémentaires à l'ARNr 16S qui augmente encore le niveau de traduction. Cette construction a été utilisée pour la production de protéines homologues et hétérologues.

Comme les manipulations génétiques chez les streptomycètes sont plus difficiles que chez *Escherichia coli*, des vecteurs navettes ont été construits. Ces vecteurs permettaient les manipulations rapides chez *E. coli* puis l'expression des gènes chez *S. lividans*. Un premier vecteur, pDOT7, contenant le vecteur pIJ702 accompagné du vecteur pTZ19 d'*E. coli* a été construit. Les premières modifications apportées au vecteur ont été l'élimination des sites de restriction *Pst*I, *Kpn*I, *Sac*I et *Eco*RI pour l'insertion d'une cassette de clonage synthétique, puis l'insertion du promoteur de la xylanase A et du peptide signal long muté de la cellulase A suivi du gène de la xylanase A2. Les clones contenant le vecteur pDOT7 produisent deux fois moins de xylanase que le contrôle lorsque le mycélium est ensemencé. Dans le cas de la croissance à partir des spores, seulement des traces de xylanase A sont produites. Ce résultat indique que la sporulation des clones est détrimentale pour la production de xylanase.

Certains des facteurs qui auraient pu réduire la production de xylanase ont été analysés. Premièrement, pour contrer l'accumulation d'ADN simple brin chez *S. lividans*, le fragment *Sti* du vecteur pIJ101, permettant l'initiation de l'ADN double brin a été inséré dans le vecteur. Aucun changement sur la production de xylanase A à partir du vecteur navette n'a été observé. Deuxièmement, la réinsertion des sites *Kpn*I et *Pst*I, situés dans une région reconnue comme essentielle à la stabilité des plasmides n'a pas entraîné de changement dans la production. Finalement, l'élimination du site d'initiation de l'ADN simple brin présent

dans la section *E. coli* du vecteur pTZ19 n'a eu qu'un effet restreint sur la production de xylanase A2. Ainsi, la chute de production est imputable à un élément inconnu présent dans l'ADN de *E. coli* qui provoque la réduction massive du nombre de copies des vecteurs lors de la sporulation. Le nombre de copies des vecteurs navettes passe d'environ 150 copies dénombrées dans le mycélium à seulement quelques traces dans les spores.

Suite à ces résultats, il a été conclu que la construction de vecteurs qui se répliquent uniquement chez les streptomycètes est plus adéquate. Ils possèdent le gène de résistance au thiostrepton comme marqueur de sélection, le promoteur de la xylanase A, le peptide signal long muté de la cellulase A et une cassette de clonage multiple synthétique composée des sites *KpnI*, *HindIII*, *BglII*, *EcoRI*, *XbaI*, *SphI* et *PstI*. De plus, divers éléments permettant la récupération rapide des protéines sécrétées ont été introduits dans les vecteurs, soit une séquence codant pour six histidines en amont (pDOT41) et en aval (pDOT42) de la cassette de clonage et le domaine de fixation à la cellulose de la cellulase B (pDOT43). La production de xylanase A à l'aide du vecteur pDOT42 a été évaluée à plus de 1 g/L. Cependant, la queue de six histidines placée en aval de la protéine n'a pas permis la récupération de la protéine. Cette queue serait éliminée par des enzymes protéolytiques probablement localisés dans le milieu de culture.

Le vecteur pDOT42 a été utilisé pour l'essai de la production de la cellulase B de *S. lividans*, des antigènes de 38 et 19 kDa de *Mycobacterium tuberculosis*, des protéines EspD et PAA d'*E. coli*, de la MMP9 de *Mus musculus* (souris) et d'un ORF de *Streptococcus suis*. Aucune production de la MMP9 de souris, des protéines EspD et PAA d'*E. coli* et de l'ORF de *S. suis* n'a été détectée dans les différents surnageants de culture. Le gène codant pour l'ORF de *S. suis* présente des séquences répétitives qui mèneraient à l'instabilité de la structure. L'absence de production de la MMP9 et des protéines EspD et PAA serait due à la présence, dans les gènes codant pour les différentes protéines, de plusieurs codons TTA rarement retrouvés chez *S. lividans*. Cependant, le remplacement de deux codons dans le gène de la MMP9 n'a pas mené à la production de la protéine. La production de cellulase B de *S. lividans* était de 100 mg/L ce qui est 100 fois plus élevé que les résultats obtenus antérieurement. Finalement, les protéines de 38 et 19 kDa de *M. tuberculosis* ont été produites à des quantités supérieures à 0,5 g/L. Étant donné que ces deux antigènes sont des lipoprotéines, il fallait éliminer une cystéine voisine du site de reconnaissance de la signal

peptidase pour éviter leur attachement à la membrane par une queue lipidique. Les deux protéines de *M. tuberculosis* présentent cependant une hétérogénéité de leur N-terminal, ayant perdu 7 ou 8 acides aminés dans le cas de la protéine de 38 kDa et 24 ou 26 acides aminés pour la protéine de 19 kDa. Malgré une certaine protéolyse, ces résultats démontrent que *S. lividans* peut être un hôte efficace pour la production de grandes quantités de protéines de *M. tuberculosis* et que le vecteur pDOT42 est utilisable pour la production de protéines homologues et hétérologues.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>6</b>
<b>1.0 PRODUCTION DE PROTÉINES CHEZ LES STREPTOMYCÈTES. ....</b>	<b>7</b>
1.1 Souches de streptomycètes. ....	7
1.2 Disponibilité des vecteurs.....	8
1.2.1 Réplication des vecteurs.....	10
1.3 Promoteur. ....	11
1.4 Peptide signal.....	13
1.4.1 Variation des charges du peptide signal.....	14
1.4.2 Effet du remplacement du peptide signal.....	14
1.5 Usage des codons.....	16
1.6 Termineur de transcription. ....	17
1.7 Mécanismes de sécrétion des streptomycètes.....	18
1.7.1 Le système Sec dépendant.....	18
1.7.2 Le système TAT .....	19
1.7.3 Autres. ....	19
<b>2.0 PRODUCTION DE PROTÉINES HOMOLOGUES ET HÉTÉROLOGUES. ....</b>	<b>20</b>
2.1 Cellulase B de <i>S. lividans</i> . ....	20
2.2 Protéines de <i>M. tuberculosis</i> .....	20
2.2.1 Protéines de choc thermique. ....	22
2.2.2 Lipoprotéines.....	24
2.2.3 Protéines sécrétées. ....	26
2.2.4 Enzymes. ....	28
2.3 Métalloprotéinase de matrice de type 9 (MMP9).....	28
2.4 Protéines d' <i>E. coli</i> .....	29
2.4.1 La protéine EspD.....	30
2.4.2 La protéine PAA.....	31
2.5 Protéine de <i>S. suis</i> . ....	32
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>33</b>
<b>1.0 LISTE DE MATÉRIEL .....</b>	<b>34</b>

2.0 SOUCHES BACTÉRIENNES.....	36
2.1 <i>E. coli</i> .....	36
2.2 <i>S. lividans</i> .....	36
3.0 MILIEUX DE CULTURE.....	36
3.1 Milieu de culture pour <i>E. coli</i> .....	36
3.2 Milieu de culture pour <i>S. lividans</i> .....	37
4.0 MANIPULATION DE L'ADN.....	38
4.1 Précipitation à l'éthanol.....	38
4.2 Extraction phénol/chloroforme.....	38
4.3 Digestion d'ADN par une enzyme de restriction.....	38
4.4 Déphosphorylation de vecteurs.....	39
4.5 Extrémités franches par le fragment Klenow de la polymérase I d' <i>E. coli</i> .....	39
4.6 Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur.....	40
4.7 Isolement d'ADN.....	40
4.7.1 Technique « Miniprep » chez <i>E. coli</i> .....	40
4.7.2 Purification de plasmide d' <i>E. coli</i> sur gradient de chlorure de césium.....	41
4.7.3 Technique "Mini-prep" chez <i>S. lividans</i> .....	41
4.7.4 Purification de plasmide de <i>S. lividans</i> sur gradient de chlorure de césium.....	42
4.7.5 Extraction d'ADN total chez <i>S. lividans</i> .....	42
4.8 Détermination du nombre de copies des plasmides.....	43
4.9 Séquençage de l'ADN.....	43
4.10 Préparation des oligonucléotides.....	44
4.11 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	45
5.0 TRANSFORMATION DES CELLULES.....	45
5.1 Transformation de <i>E. coli</i> .....	45
5.2 Transformation de <i>S. lividans</i> .....	46
5.3 Préparation des spores de <i>S. lividans</i> .....	46
6.0 MANIPULATION DES PROTÉINES.....	47
6.1 Dosage de l'activité enzymatique.....	47
6.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	48
6.3 Zymographie.....	48
6.4 Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose (Western blotting).....	49
6.5 Immunodétection des protéines.....	50
6.6 Purification de protéines sur colonne de nickel.....	50
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>51</b>
1.0 CONSTRUCTION DE VECTEURS NAVETTES.....	52
1.1 Construction des plasmides pDOT1, pDOT2, pDOT3, pDOT4 et pDOT5.....	52
1.2 Construction des plasmides pDOT6 et pDOT7.....	55
1.3 Construction des plasmides pDOT8, pDOT9 et pDOT10.....	57
1.4 Construction des plasmides pDOT31 pDOT32 et pDOT33.....	60
1.5 Production de xylanase par les clones contenant les vecteurs navettes pDOT7 et pDOT10.....	63

1.6 Construction du vecteur pDOT 13.....	65
1.7 Construction d'un vecteur navette pIAF911-A.8 et pUC19.....	66
1.8 Détermination du nombre de copies des différents vecteurs de l'étude.....	68
<b>2.0 CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION/SÉCRÉTION DE <i>STREPTOMYCES</i>.</b> .....	<b>69</b>
2.1 Construction des plasmides pDOT41, pDOT42 et pDOT43.....	69
2.2 Production de xylanase par les clones contenant les vecteurs de <i>Streptomyces</i> .....	71
<b>3.0 PRODUCTION DE PROTÉINES HOMOLOGUES ET HÉTÉROLOGUES.</b> .....	<b>73</b>
3.1 Production de la cellulase B de <i>S. lividans</i> .....	75
3.2 Production de la MMP9 de <i>M. musculus</i> (souris).....	77
3.3 Production de protéines de <i>M. tuberculosis</i> .....	83
3.3.1 Production de la protéine de 38 kDa.....	84
3.3.2 Production de la protéine de 19 kDa.....	84
3.4 Production de l'EspD et de la PAA d' <i>E. coli</i> .....	89
3.5 Production de l'ORF de <i>S. suis</i> .....	93
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>96</b>
<b>APPENDICE A</b> .....	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>110</b>

## **Liste des tableaux**

Tableau I : Principaux antigènes de <i>M. tuberculosis</i> classés selon leur groupe.....	21
Tableau II : Marquage des différents nucléotides. ....	44
Tableau III : Préparation des gels pour SDS-PAGE.....	49
Tableau IV : Activité xylanasiq ue produite par les clones de <i>S. lividans</i> contenant les vecteurs navettes pDOT7 et pDOT10.....	65
Tableau V : Activité xylanasiq ue produite par les clones de <i>S. lividans</i> contenant les vecteurs navettes pDOT13 et pIAF911-A.8 + pUC19.....	68
Tableau VI : Nombre de copies présentes dans les clones de <i>S. lividans</i> contenant les divers vecteurs.....	69
Tableau VII : Activité xylanasiq ue produite par les clones de <i>S. lividans</i> contenant les vecteurs se répliquant uniquement chez <i>S. lividans</i> .....	72
Tableau VIII : Structure attendue des différentes constructions effectuées pour la production des protéines homologues et hétérologues. ....	74

## Liste des figures

Figure 1 : Modèle de la réplication sous le mode de cercle roulant.....	11
Figure 2 : Élimination des sites uniques de restriction du vecteur navette pC209 pour l'introduction d' une cassette de clonage contenant plusieurs sites de restriction. ....	54
Figure 3 : Insertion du promoteur et du peptide signal dans le vecteur navette pour l'expression et la sécrétion de protéines homologues et hétérologues. ....	56
Figure 4 : Insertion dans le vecteur navette du fragment Sti pour l'initiation du double brin. ....	59
Figure 5 : Construction des cassettes de clonage des vecteurs d'expression et de sécrétion de <i>S. lividans</i> .....	61
Figure 6 : Insertion des cassettes de clonage des vecteurs navettes d'expression et de une sécrétion de <i>S. lividans</i> . ....	62
Figure 7 : Construction de vecteurs d'expression et de sécrétion de <i>S. lividans</i> .....	70
Figure 8 : Peptide signal long muté de la cellulase A. ....	73
Figure 9 : Activité de la cellulase B dans le surnageant de culture de transformants de <i>S. lividans</i> 10-164 possédant le plasmide pDOT42 + <i>celB</i> . ....	76
Figure 10: Construction d'un vecteur d'expression et de sécrétion de la MMP9 de souris chez <i>S. lividans</i> . ....	78
Figure 11 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture d'un clone de <i>S. lividans</i> exprimant la MMP9 de souris. ....	80
Figure 12 : Immunodétection des protéines du surnageant de culture d'un clone de <i>S. lividans</i> exprimant la MMP9 de souris. Les protéines sont détectées par des anticorps anti-HisTag.....	81
Figure 13 : Analyse par zymographie de l'activité de la gélatinase B (MMP9) dans le surnageant de culture du clone de <i>S. lividans</i> exprimant les protéines MMP9 et MMP9 $\Delta$ TTA. ....	82
Figure 14 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture d'un clone de <i>S. lividans</i> exprimant la protéine de 38 kDa de <i>M. tuberculosis</i> .....	85
Figure 15 : Hétérogénéité du N-terminal lors de la production de la protéine de 38 kDa de <i>M. tuberculosis</i> .....	86

- Figure 16: SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture d'un clone de *S. lividans* exprimant la protéine de 19 kDa de *M. tuberculosis*. ..... 88
- Figure 17 : Purification sur colonne de nickel de la protéine de 19 kDa de *M. tuberculosis* produite par un clone de *S. lividans* transformé avec le vecteur pDOT42. Le vecteur fournit les histidines en C-terminal des protéines recombinantes. Analyse des fractions d'élution de la colonne par SDS-PAGE. .... 90
- Figure 18 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture de *S. lividans* exprimant la protéine EspD d'*E. coli* dans le vecteur pDOT42. .... 91
- Figure 19 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture de *S. lividans* exprimant la protéine PAA d'*E. coli* dans le vecteur pDOT42. .... 92
- Figure 20 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture de *S. lividans* exprimant la protéine ORF de *S. suis* dans le vecteur pDOT42. .... 95

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
ARN	Acide ribonucléique
cm <sup>2</sup>	centimètre carré
Da	Dalton
D.O.	Densité optique
dsDNA	Acide désoxyribonucléique double brin
g	Gramme
kb	Millier de paires de bases
kDa	Millier de Dalton
kg	Kilogramme
L	Litre
M	Mole
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	milli mole
ORF	Open Reading Frame
pb	paire de base
p/v	poids par volume
rpm	révolution par minute
ssDNA	Acide désoxyribonucléique simple brin
TAT	Twin-arginine translocation
µg	microgramme
UI	Unité internationale
µl	microlitre
°C	degré Celsius
%	pourcent
v.i.	volume initial
v/v	volume par volume

## **Introduction**

Les streptomycètes sont des bactéries aérobies strictes, à Gram positif, qui colonisent les différents habitats du sol. Selon Mendez *et al.* (1985), le cycle de vie des streptomycètes qui poussent sur un milieu solide implique la formation de deux types de mycélium. Le premier, un mycélium végétatif croît à la surface et dans le milieu de culture mais, c'est un second type de mycélium, aérien, qui formera finalement des spores pour la dissémination de la bactérie. Le mycélium végétatif est composé d'un réseau d'hyphes entremêlés qui pénètrent et solubilisent la matière organique en sécrétant des enzymes hydrolytiques. Les éléments du mycélium végétatif sont ensuite utilisés pour la croissance du mycélium aérien. Pendant la lyse du mycélium végétatif, ce dernier est sensible à l'invasion par des bactéries présentes dans le sol et il a été montré que les streptomycètes réduisent ce risque d'infection par la production d'antibiotiques. En effet, plus de 60% des antibiotiques connus, d'origine microbienne, sont produits par ces organismes (Anné et Van Mellaert, 1993).

L'intérêt pour l'utilisation de ces micro-organismes s'est accru en grande partie à cause de leur important rôle dans le processus de compostage et de leur grande capacité à produire des enzymes extracellulaires qui indiquent que ces bactéries possèdent un mécanisme efficace de sécrétion des protéines (Gilbert *et al.*, 1995). Ils sont maintenant considérés comme une alternative pour la production de protéines recombinantes même si, actuellement, l'hôte le plus souvent utilisé est *Escherichia coli*. Bien qu'un haut niveau d'expression peut être atteint chez cette bactérie, les protéines hétérologues produites sont soit retenues dans l'espace périplasmique ou s'accumulent dans le cytoplasme sous la forme de corps d'inclusions insolubles. Ces agrégats sont souvent biologiquement inactifs et nécessitent une renaturation de la protéine d'intérêt (Payne *et al.*, 1990). Par comparaison, la simple couche de peptidoglycane de la membrane des streptomycètes et autres bactéries à

Gram positif faciliterait la libération des protéines dans leur environnement extracellulaire à la condition que ces protéines possèdent une séquence signal de sécrétion (Gilbert *et al.*, 1995). Jusqu'à maintenant, plusieurs essais d'expression de gènes codant pour des protéines homologues et hétérologues ont été effectués chez *Streptomyces lividans*. Les résultats varient de quelques µg/L à plusieurs g/L de protéines sécrétées selon la force du promoteur et du peptide signal utilisés, du type de protéine et de sa stabilité dans le milieu de culture. L'extrême variabilité de ces facteurs ne permet pas, à ce jour, d'assurer le plein succès de la production de protéines chez les streptomycètes (Morosoli *et al.*, 1997).

L'intérêt grandissant de *S. lividans* pour la production de protéines homologues vient de l'utilisation de certaines enzymes qui dégradent efficacement les composés lignocellulosiques. Ces enzymes peuvent être utilisées pour la transformation de biomasses de faible valeur, comme des déchets de l'agriculture et de la foresterie, en produits utiles comme de l'alcool ou de la nourriture pour les animaux (Coughlan, 1985). Par leur spécificité de substrat, certaines enzymes peuvent éliminer les composantes hémicellulosiques de la pulpe de papier et ont été utilisées avec succès comme agents de bio-blanchiment dans l'industrie des pâtes et papiers (Viikari *et al.*, 1991).

Cependant, l'intérêt de *S. lividans* ne se situe pas seulement dans la production de protéines homologues. Par exemple, *S. lividans* pourrait servir à la production de protéines hétérologues provenant de *Mycobacterium tuberculosis*. Produites en grandes quantités, ces protéines pourraient servir de vaccins et être étudiées plus intensivement au niveau biologique. En effet, la recrudescence de cette maladie dans les pays développés, couplée à une forte augmentation des cas dans les pays d'Afrique chez les personnes atteintes du virus d'immunodéficience humaine (VIH) (Dolin *et al.*, 1994) et à l'apparition de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antibiotiques incitent les milieux médicaux au développement de

nouveaux traitements et moyens de prévention de la tuberculose. La préparation de vaccins est compliquée par l'instabilité de la souche bactérienne atténuée qui peut avoir subi de nombreuses délétions génomiques qui affectent ensuite l'efficacité du vaccin. Le vaccin actuel BCG (Bacille Calmette-Guérin) montre une efficacité variant de 0 à 80% suite aux nombreuses manipulations effectuées chez les souches filles et il induit automatiquement une réaction à la tuberculine, le test cutané de détection de la maladie (Behr et Small, 1997). Plusieurs protéines intracellulaires et extracellulaires de *M. tuberculosis* sont des candidates dans le développement de nouveaux vaccins et sont des cibles de premier choix dans le développement de nouveaux antibiotiques. Cependant, *M. tuberculosis* est un organisme à croissance lente et sa manipulation comporte des risques élevés pour la santé et nécessite un confinement strict. En pratique, l'évaluation de protéines, pour leur utilisation dans un vaccin ou comme cible pour certaines drogues, nécessite leur production sous une forme recombinante dans un hôte non pathogène, à croissance rapide et dont les techniques de fermentation sont bien établies (Harth *et al.*, 1997). Cet exemple démontre l'importance, en recherche fondamentale et au niveau industriel, de posséder un système d'expression et de sécrétion permettant la production en grande quantité de protéines hétérologues.

Ainsi, les connaissances acquises sur la surexpression des gènes et la sécrétion de protéines chez les streptomycètes permettent maintenant le développement de systèmes de production de protéines d'importance industrielle. L'objectif des travaux présentés ici est la construction d'un vecteur d'expression et de sécrétion pour la production de protéines homologues et hétérologues chez *S. lividans*. Ce vecteur doit permettre l'insertion de gènes recombinants au moyen d'une cassette de clonage comportant plusieurs sites de restriction unique, leur expression efficace par un promoteur fort, la sécrétion des produits des gènes dans le milieu extracellulaire et finalement, leur récupération facile dans le surnageant de

culture. Les différents essais de production de protéines recombinantes seront effectués à partir de gènes qui codent pour les protéines suivantes : la cellulase B de *S. lividans*, la métalloprotéinase de matrice de type 9 (MMP9) de *Mus musculus* (souris), différentes protéines provenant de souches bactériennes responsables de certaines maladies chez le porc et finalement, certains gènes de la bactérie *M. tuberculosis*. Ces gènes seront insérés dans les vecteurs appropriés et la production des protéines correspondantes dans le milieu de culture sera évaluée.

## **Revue de littérature**

## 1.0 Production de protéines chez les streptomycètes.

Cette revue de littérature présente l'état actuel des connaissances sur la production de protéines par les streptomycètes et les efforts qui ont été mis en œuvre pour en faire des hôtes de choix pour la production de protéines possédant un potentiel industriel important.

L'expression et la sécrétion de protéines homologues et hétérologues chez les streptomycètes sont dépendantes de la souche utilisée et de la disponibilité des vecteurs. *S. lividans* étant la souche la plus utilisée, le choix des articles traités sera guidé par les modifications apportées à cette bactérie et par les différents vecteurs construits pour l'amélioration du taux de production de différentes protéines chez cette souche. Plus précisément, les travaux concernant le promoteur, le peptide signal, l'usage de certains codons et la présence d'un terminateur seront rapportés. Certaines particularités du mécanisme de sécrétion seront ensuite exposées.

### 1.1 Souches de streptomycètes.

La plupart des études du génome concernant les streptomycètes ont été effectuées sur *Streptomyces coelicolor* A3(2), dont la carte génétique et physique a été déterminée (Kieser *et al.*, 1992). Mais, en général, *S. lividans* 66 (souche 1326) est utilisée pour l'expression d'ADN exogènes. En effet, de nombreuses souches de streptomycètes possèdent un système de restriction/modification très efficace qui empêche leur transformation par de l'ADN étranger. Cependant, *S. lividans* semble en être dépourvue et c'est la principale raison de son utilisation (Hopwood *et al.*, 1985). De plus, *S. lividans* TK24 produit très peu de protéases (Engels et Koller, 1992) ce qui facilite la récupération de protéines actives dans le milieu de culture.

Certaines études ont fait la comparaison entre les taux de production par *S. lividans* et par d'autres espèces de streptomycètes. Kendall et Cullum (1984) ont démontré que la production d'agarase par *S. lividans*, lorsque le gène est introduit dans un vecteur à copies multiples, était 500 fois plus grande que par *S. coelicolor*, le producteur original. Hoshiko *et al.* (1987) ont effectué la production d' $\alpha$ -amylase par *S. hygrosopicus* AA69-4 et *S. lividans* 1326 pour une étude du contrôle de l'expression des gènes. Le gène *amy* cloné dans un

plasmide à copies multiples permet la production d'une plus grande quantité d' $\alpha$ -amylase par *S. hygroscopicus*. La souche *S. hygroscopicus* AA69-4, qui a été sélectionnée comme surproductrice, semble donc avoir un mécanisme d'expression et de sécrétion d' $\alpha$ -amylase beaucoup plus efficace que celui de *S. lividans*. Dans une autre étude, on a isolé de *S. griseus* ATCC 10137 un fragment d'ADN codant pour le gène *saf* qui augmente la production d'au moins cinq enzymes sécrétées chez *S. lividans*, *S. coelicolor* et *S. griseus*. L'effet suggéré était non seulement au niveau de la sécrétion mais aussi au niveau de la synthèse de l'enzyme et proviendrait de la présence, en grande concentration dans la cellule, du polypeptide Saf (Daza *et al.*, 1991). Le gène *saf* est présent à une seule copie dans le chromosome de *S. griseus* ATCC 10137 et des séquences homologues ont été retrouvées chez toutes les espèces de streptomycètes testées, ce qui laisse croire à un important rôle du gène dans le métabolisme (Daza *et al.*, 1990). Lors de la production d'aculeacine A acylase par six espèces différentes de streptomycètes, *S. lividans* montrait un taux similaire à celui du producteur original, *Actinoplanes utahensis* NRRL12052. Cependant, un plus haut niveau de production était atteint par *S. griseus* ATCC23345. L'excellente productivité de l'acylase par cette souche pourrait aussi être attribuable à l'effet du gène *saf* (Inokoshi *et al.*, 1993).

## 1.2 Disponibilité des vecteurs.

Les streptomycètes peuvent contenir une grande variété de plasmides dont la taille varie de 10 kb (pIJ101; voir appendice A, page 102) jusqu'à 1700 kb pour le plasmide géant SCP1 (Kinashi *et al.*, 1993). Le nombre de copies des plasmides de la famille de pIJ101 (40 à 300 copies) est parmi les plus élevés (sans amplification artificielle) décrits jusqu'à maintenant chez les bactéries (Gusek et Kinsella, 1992). La possibilité d'amplification de gènes clonés, en utilisant les plasmides de la série pIJ101, a mené à la construction de vecteurs possédant des marqueurs phénotypiques et des sites de restriction unique dans des régions non essentielles du vecteur. Ces vecteurs sont particulièrement stables, même en l'absence de facteurs de sélection. Cependant, une région de 500 paires de bases, se situant entre le site *Pst*I en position 31 et le site *Sac*II en position 33, semble essentielle à la stabilité des plasmides dérivés de pIJ101 puisque des délétions dans cette région peuvent mener à la perte de plus de 55% du plasmide après un cycle de croissance sur un milieu de culture sans sélection (Kieser *et al.*, 1982).

Le vecteur pIJ350 a été construit par l'insertion dans le vecteur pIJ102 (4,0 kb) d'un fragment de *S. azureus* possédant le gène de résistance au thiostrepton (*tsr*) (Kieser *et al.*, 1982). La résistance au thiostrepton est un marqueur important car presque tous les streptomycètes sont sensibles à cet antibiotique.

La capacité de synthétiser la mélanine ou des pigments semblables est une autre propriété des streptomycètes (Dietz, A., 1986). Le développement du plasmide pIJ702 (voir appendice A, page 103) par Katz *et al.* (1983) a facilité le clonage de gènes pour leur surexpression. Le gène de la tyrosinase (*mel*) provenant de *S. antibioticus* fut cloné dans pIJ350. La caractérisation du plasmide a permis de déterminer que trois sites de restriction unique (*Bgl*II, *Sph*I et *Sac*I) se trouvaient dans l'insertion. Le clonage d'ADN, à n'importe quel de ces trois sites, interrompt le phénotype Mel<sup>+</sup> et il en résulte l'absence de pigmentation noire des colonies. Le plasmide pIJ702 et ses dérivés ont été utilisés pour le clonage de gènes de plusieurs protéines de procaryotes et d'eucaryotes. Le nombre de copies du plasmide pIJ702 permet une production efficace d'enzymes extracellulaires. De plus, le nombre de copies du plasmide a une influence sur la stabilité génétique durant les stades subséquents de croissance et de sporulation (Gusek et Kinsella, 1992). En effet, des essais à l'aide de bromure d'éthidium, pour vérifier la stabilité des plasmides selon leur nombre de copies, ont permis de déterminer que pIJ702, avec ses multiples copies, était réfractaire à l'effet de l'agent intercalant (Cramer *et al.*, 1986). pIJ702 a aussi été utilisé pour la construction de vecteurs navettes. Moreau *et al.* (1991) ont effectué la construction d'un vecteur navette pour les streptomycètes et *E. coli* comme outil de travail en mutagenèse dirigée. Après mutagenèse et criblage des mutants chez *E. coli*, les plasmides peuvent être utilisés directement pour transformer les streptomycètes. Un autre vecteur navette, pFD666, a été construit à l'aide de l'origine de réplication du vecteur pJV1 de *S. phaeochromogenes* et permet la réplication chez *S. lividans* et *E. coli* (Denis et Brzezinski, 1992). Ce vecteur emploie le gène modifié de la néomycine phosphotransférase (*neo*) comme marqueur de sélection (Denis et Brzezinski, 1991). Il a été utilisé pour la caractérisation d'un gène codant pour une chitosanase de la souche N174 de *Kitasatosporia*, une actinomycète (Fink *et al.*, 1991). Cependant, dans plusieurs cas, les vecteurs navettes montrent une certaine instabilité sous forme de délétions probablement dues à une interaction entre le gène inséré et le vecteur (Lee *et al.*, 1986; Ghangas et Wilson, 1987).

### 1.2.1 Réplication des vecteurs.

Un autre facteur d'instabilité recensé pour les vecteurs de streptomycètes serait l'accumulation d'ADN simple brin (ssDNA) dans les souches transformées (Pigac *et al.*, 1988). En effet, les différents plasmides retrouvés chez les streptomycètes se répliqueraient sous le mode de cercle roulant (figure 1). Selon Khan (1997), ce système de réplication débute par l'interaction entre le site d'origine du double-brin (DSO ou *ori*) et la protéine initiateur Rep. La protéine Rep vient exciser l'ADN à un site spécifique de coupure et se fixe de façon covalente à l'extrémité 5' phosphate de cet ADN. Le phénomène de coupure et de réparation de l'ADN est probablement régulé par la présence de différentes protéines de réplication tels une hélicase, une protéine de liaison du ssDNA et une polymérase. L'ADN polymérase III vient ensuite étendre la coupure Rep-dépendante et la fourche de réplication avance le long du cercle jusqu'à la régénération du site de coupure. Une série de coupure et de liaison permet ensuite la libération d'un ssDNA, de la protéine Rep inactive et de l'ADN double brin (dsDNA) initial. Le ssDNA est ensuite convertie en dsDNA à partir du site primaire d'initiation du dsDNA (SSO ou *ssi*). Les vecteurs ayant perdu le SSO peuvent se répliquer à un certain degré mais ont tendance à être instable et à avoir un nombre de copies inférieur lorsqu'ils sont comparés aux vecteurs intacts. Ainsi, les vecteurs ayant perdu le site primaire d'initiation du dsDNA, dont pIJ702 fait partie, accumuleraient le ssDNA (Zaman *et al.*, 1993; Muth *et al.*, 1995). Le haut taux de recombinaison génétique de cet ssDNA explique le haut niveau d'instabilité de la structure. Les vecteurs possédant le site d'initiation du dsDNA dans l'orientation retrouvée dans pIJ101 n'accumulent pas de ssDNA, et semblent avoir un nombre de copies plus grand que d'autres vecteurs ne possédant pas ce site ou l'ayant inséré en sens inverse (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993). Dyson et Evans (1996) ont construit un vecteur navette dans lequel le site d'initiation de l'ADN double brin a été conservé. Le vecteur semble être stable et possède un nombre de copies, entre 200 et 400, de loin supérieur à celui d'autres vecteurs navettes basés sur pIJ101.



promoteurs de deux gènes de *S. plicatus* codant pour des chitinases montre qu'ils contiennent des sites de liaison de l'ARN polymérase semblables à ceux du promoteur végétatif qui interagit avec la forme la plus abondante d'ARN polymérase. Ces deux promoteurs partagent aussi une séquence répétitive de 12 pb qui borde le site de liaison de l'ARN polymérase. Il a été démontré que cette séquence est reconnue par un ligand, probablement un répresseur, impliqué dans la régulation négative au niveau de la transcription (Délic *et al.*, 1992). Cependant, lors de la production d'agarase, Parro et Mellado (1994) ont démontré que la répression par le glucose affectait la synthèse d'agarase au niveau de la sécrétion plutôt qu'au niveau de la transcription. La pré-agarase était dégradée à l'intérieur de la cellule, suggérant une régulation négative du glucose sur le mécanisme de sécrétion.

Même s'il est reconnu que le promoteur des gènes clonés doit être efficace pour la production en grande quantité des protéines, les diverses expériences jusqu'à maintenant effectuées n'ont pas permis de définir les caractéristiques essentielles d'un promoteur fort chez les streptomycètes. La surproduction est généralement attribuée au nombre de copies du gène lorsqu'il est introduit dans un vecteur à copies multiples (Gilbert *et al.*, 1995). Dans la plupart des cas de gènes de streptomycètes clonés dans *S. lividans*, le gène d'intérêt a été introduit avec son propre promoteur. Très peu d'études portent sur la modification du promoteur pour l'optimisation de l'expression. Koller et Riess (1989) ont déterminé que, dans le cas du gène de l'inhibiteur d' $\alpha$ -amylase (tendamistat) de *S. tendae*, l'arrangement de promoteurs hétérologues en tandem stimule le niveau d'expression. En combinant le promoteur du gène *melC* de pIJ702 et le gène de tendamistat, on augmente de 10 fois le taux de production. Cependant, l'introduction du gène dans le vecteur pIJ350 mène à une expression encore plus forte qui serait probablement attribuable à des promoteurs qui ne sont pas identifiés sur le vecteur. Vigal *et al.* (1991) ont remplacé le promoteur du gène de l' $\alpha$ -amylase (de *S. griseus*) par 4 différents promoteurs : le promoteur du gène *neo* (néomycine phosphotransférase) de Tn5, un promoteur, régulé par le phosphate, provenant d'un fragment de 114 pb de *S. lividans*, le promoteur du gène *saf* de *S. griseus* ATCC 10137 et le promoteur *lacZ* de *E. coli* (vecteur navette). Une augmentation de la production de l' $\alpha$ -amylase de plus de 16 fois a été obtenue à l'aide des promoteurs des gènes *saf* et *neo*, ce qui suggère que ces promoteurs sont plus facilement reconnus par l'ARN polymérase de *S. lividans*. Schmitt-John et Engels (1992) ont testé cinq promoteurs différents pour la production de tendamistat,

une exoprotéine de *S. tendae*. Le promoteur *ermE-up*, donnant les meilleurs résultats à plus de 400 mg/L, provient du gène de résistance à l'érythromycine et montre une délétion de 3 pb dans la région -35. Cependant, la transcription du promoteur *melC* du gène de la tyrosinase de *S. antibioticus* semblait être la plus forte et dans ce cas, la production plus faible de tendamistat proviendrait d'une diminution dans la croissance des cellules.

Certaines études sur l'expression de gènes d'actinomycètes, ayant été introduits avec leur propre promoteur, ont permis de déterminer que *S. lividans* pouvait reconnaître ces promoteurs, ce qui n'est pas surprenant puisque ces organismes sont étroitement reliés.

#### **1.4 Peptide signal.**

Chez les streptomycètes, comme chez plusieurs autres bactéries à Gram positif, les protéines sont sécrétées dans le milieu de culture tandis que chez les bactéries à Gram négatif, elles sont accumulées dans le périplasme ou le cytoplasme. Cependant, dans la grande majorité des cas, la sécrétion des protéines s'effectue à l'aide d'une extension au NH2 terminal, le peptide signal, qui est éliminé lors de la translocation (Morosoli *et al.*, 1997). Des bactéries, aux plantes et aux mammifères, les peptides signaux partagent des propriétés communes (Von Heijne, 1985). Le peptide signal typique est caractérisé par une courte région NH2 terminale chargée positivement (domaine N), suivie par un centre hydrophobique (domaine H) et une région plus polaire en C terminal (domaine C) qui contient le site de coupure par la signal peptidase. Malgré ces caractéristiques conservées, des comparaisons ont démontré que les peptides signaux des eucaryotes montrent des différences par rapport à ceux des procaryotes (Von Heijne, 1984) et que ceux des bactéries à Gram positif ont tendance à être plus longs que ceux des bactéries à Gram négatif (Abrahmsen *et al.*, 1985). En moyenne, les peptides signaux des bactéries à Gram positif sont de 29 à 31 acides aminés tandis que ceux des bactéries à Gram négatif sont de 24 à 25 acides aminés. Cependant, chez les streptomycètes, une moyenne de 35 acides aminés a été calculée (Gilbert *et al.*, 1995).

### 1.4.1 Variation des charges du peptide signal.

Il a été déterminé que les acides aminés supplémentaires des peptides signaux des streptomycètes sont regroupés dans le domaine N du peptide signal et consistent, en général, en quatre résidus chargés positivement, des arginines, qui sont étroitement reliés. Avant l'insertion du peptide signal dans la couche lipidique, le domaine N a un rôle important à jouer dans la sécrétion puisqu'il est en interaction avec la membrane chargée négativement (Nesmeyanova *et al.*, 1997, Phoenix *et al.*, 1993). Fab et Engels (1996) ont testé l'effet des charges positives sur la production de l'inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase (tendamistat) de *S. tendae* par *S. lividans*. À partir du peptide signal original du gène de la tendamistat possédant une charge de +3, 10 variantes ont été construites avec des charges de 0 à +6 dans le domaine N. Toutes les constructions, sauf celle de +6, ont permis la sécrétion de la protéine. La production maximale a été atteinte lorsque la charge positive du domaine N était de 2 et une diminution progressive de la production a été observée lors de l'ajout ou de l'enlèvement de charges. Lors de la production de la protéine de fusion Vis-mTNF, une charge de +2 du peptide signal de l'inhibiteur de la subtilisine de *S. venezuelae* permettait aussi d'obtenir la meilleure production (Lammertyn *et al.*, 1997). Cependant, lors de la production de l' $\alpha$ -amylase de *S. griseus* à l'aide de son peptide signal (Vigal *et al.*, 1991) et celle du mTNF à l'aide du peptide signal de l' $\alpha$ -amylase de *S. venezuelae* (Lammertyn *et al.*, 1998), une charge de +3 permettait d'obtenir une augmentation de la production et ce, malgré le fait que les deux peptides signaux montraient très peu d'homologie entre eux. Ces données ne permettent pas de déduire une règle générale sur la charge mais elles ont permis de définir qu'un certain nombre de charges positives était nécessaire pour la sécrétion efficace des protéines, puisque des charges inférieures à +2 menaient à la diminution de la production.

### 1.4.2 Effet du remplacement du peptide signal.

Pagé *et al.* (1996a), ont déterminé que le peptide signal intact est nécessaire à la sécrétion des protéines car lorsque le peptide signal de la xylanase A était éliminé ou lorsque que le site de reconnaissance de la peptidase était muté, il y avait absence de l'enzyme dans le milieu de culture. De plus, aucune trace de l'enzyme ne subsistait dans la cellule, démontrant la présence d'une voie de dégradation protéolytique des protéines immatures chez *S. lividans*.

Le remplacement du peptide signal de la xylanase A par six autres peptides signaux de protéines sécrétées par *S. lividans* a ensuite été effectué. En comparaison avec le contrôle, les peptides signaux de la mannanase A, de l'acétylxylane estérase et de la xylanase B ont donné sensiblement le même taux de production. De plus, le peptide signal de la cellulase A, possédant un codon d'initiation de la traduction TTG, produit lui aussi la même quantité de xylanase A et démontre que ce codon est utilisé efficacement par *S. lividans*. Cependant, les faibles résultats obtenus à l'aide du peptide signal de la xylanase C, qui ne montre que très peu de similitude avec les peptides signaux habituellement retrouvés chez *S. lividans* et du peptide signal de la cellulase B, possédant deux codons TTA, permettent de conclure que le remplacement du peptide signal affecte la production de xylanase A. Toutefois, il est difficile de prédire que l'utilisation d'un quelconque peptide signal mènerait à la surproduction d'une protéine donnée.

Il a cependant été démontré que certains peptides signaux des streptomycètes possèdent deux sites de liaison du ribosome (RBS) plus ou moins conservés, couplés à la présence de deux codons d'initiation de la traduction. Lorsque le peptide signal de la xylanase A est remplacé par les peptides signaux longs de la mannanase A (Man A) (Arcand *et al.*, 1993) et de la cellulase A (CelA) (Théberge *et al.*, 1992), les deux codons d'initiation de la traduction de ces peptides signaux peuvent être utilisés conjointement par *S. lividans* pour la production de xylanase A, augmentant ainsi la quantité d'enzyme produite (Pagé *et al.*, 1996b). La distance entre les deux codons d'initiation semble avoir un effet sur leur utilisation puisque, suite à une mutation dans l'un ou l'autre des codons d'initiation de la traduction du peptide signal de l'inhibiteur de la subtilisine, qui contient lui aussi deux codons d'initiation, aucune baisse de la production de la protéine n'a été observée (Taguchi *et al.*, 1991). En effet, seulement six nucléotides séparent les deux codons d'initiation de la traduction du peptide signal de l'inhibiteur de la subtilisine comparativement à 24 pour celui de la *manA* et 54 pour celui de la *celA*. Étant donné qu'un ribosome protège une région de 30 à 40 nucléotides sur l'ARN messager, l'espacement doit être suffisant pour l'attachement de deux ribosomes pour qu'il y ait utilisation conjointe des deux codons d'initiation de la traduction (Pagé *et al.*, 1996b). De plus, lorsque le peptide signal long de la cellulase A est utilisé, l'augmentation de la production de xylanase A est le double de celle obtenue avec le

peptide signal long de la mannanase A, indiquant qu'un facteur supplémentaire contenu dans ce peptide signal stimulerait la production.

Un tel élément a été retrouvé dans le gène *cell* de *S. reticuli* sous la forme d'un palindrome ( 5'-TGGGAGGCGCTCCCA) qui est probablement un site de liaison d'un répresseur (Walter et Schrepf, 1996). Une séquence similaire a été retrouvée dans le gène de la cellulase A, sauf que le G souligné dans le palindrome de *cell* est remplacé par un A. De plus, l'alignement des séquences du peptide signal et de l'ARN 16S ribosomal a permis d'identifier une séquence complémentaire de 5 nucléotides (TCCCA) pouvant mener à l'augmentation de la traduction chez *S. lividans* (Kébir *et al.*, 2000). Il a ensuite été démontré, par mutagenèse dirigée, que l'élimination de la séquence palindromique et de la séquence complémentaire à l'ARN 16S diminuait de 75 % la production de xylanase A. De plus, une séquence de 8 nucléotides complémentaires à l'ARN 16S placée à 15 nucléotides du codon d'initiation était la construction qui menait à la production maximale de xylanase A (1,9 fois le contrôle). Les effets du palindrome et de la séquence complémentaire à l'ARN 16S sur l'augmentation de la production n'ont pu être dissociés, puisque la séquence complémentaire se retrouve dans le palindrome (Kébir *et al.*, 2000).

### 1.5 Usage des codons.

Le génome des streptomycètes est caractérisé par un contenu en G-C très élevé (70 à 74%) (Chater et Hopwood, 1984). L'usage de certains codons reflète l'effet d'une pression de mutations biaisés (Sueoka, 1988) ou la sélection de codons qui permettent une traduction plus efficace ou plus précise par des ARN de transfert qui sont plus abondants (Ikemura, 1981; Bennetzen et Hall, 1982). En comparant 64 gènes de 27 espèces de streptomycètes, Wright et Bibb (1992) ont démontré que le contenu en G-C à la troisième position des codons (GC3) variait de 76 à 98 %, affectant ainsi la proportion de ces deux bases dans les différents gènes. De plus, 15 gènes hautement exprimés chez *S. coelicolor* possèdent un GC3 de plus de 90 %, ce qui démontre que l'efficacité de traduction est influencée par l'usage des codons.

Enfin, certains codons, tel le codon TTA (leucine), sont rarement retrouvés dans les gènes des streptomycètes et peuvent influencer la production de protéines recombinantes chez *S. lividans*. En effet, Ueda *et al.* (1993) ont observé une diminution de 40% dans la production de l'inhibiteur de la subtilisine (SSI) lorsque deux codons leucine (CTG et CTC)

ont été remplacés par des codons TTA. La diminution de la production serait attribuable à la faible disponibilité de l'ARN de transfert (Leu) (UUA), un produit du gène *bldA* qui est exprimé tardivement dans le cycle de croissance de *S. lividans*. En effet, bien qu'il ne soit pas nécessaire lors de la croissance végétative des streptomycètes, le tARN qui code pour le codon UUA semble jouer un rôle dans la régulation de la différenciation (Kataoka *et al.*, 1999). Leskiw *et al.* (1991) ont démontré que le changement de deux codons TTA en CTC (leucines) dans le gène *carB* résultait en une expression indépendante de *bldA*. Ces résultats laissent supposer que la présence de codons rares, comme TTA, dans des gènes devraient être remplacés par des codons plus communément utilisés pour qu'ils soient exprimés efficacement chez *S. lividans* (Gilbert *et al.*, 1995).

## 1.6 Termineur de transcription.

Chez les organismes procaryotes, le termineur de transcription implique un signal d'ADN spécifique qui marque l'arrêt de la polymérisation et détermine le relâchement de l'ARN messenger synthétisé (Adhya et Gottesman, 1978). Certains termineurs sont caractérisés par une séquence inverse répétée, riche en G-C, pouvant former une structure en épingle à cheveux dans l'ARN messenger. Cette structure semble être impliquée dans la stabilité de l'ARN messenger (Holmes *et al.*, 1983) et peut influencer l'efficacité de la traduction. Chez les streptomycètes, des termineurs de transcription ont été retrouvés dans les gènes *aph* (Thompson et Gray, 1983), *vio* et *tsr* (Bibb *et al.*, 1985), *hyg* (Zalacain *et al.*, 1986) et *msiK* (Schlosser *et al.*, 1997), ce qui suggère un rôle important dans la régulation de l'expression. Lorsque le gène de l'interféron- $\alpha 2$  (*HinF $\alpha$ 2*) a été introduit chez *S. lividans* avec le termineur du gène *aph* de *S. fradiae*, Pulido et Jimenez (1987) ont observé que la séquence inverse répétée détermine efficacement la terminaison de la transcription et qu'il y a augmentation de la production de *HinF $\alpha$ 2*. De plus, lors de l'analyse par des délétions du gène de la SSI par Taguchi *et al.* (1993), deux séquences inverses répétées, en aval du codon stop, ont été retrouvées. La délétion d'une des séquences a permis d'augmenter de 3,5 fois la production de SSI chez *S. lividans*. Dans ces deux cas, l'augmentation pourrait refléter une plus grande stabilité de l'ARN messenger. Cependant, contrairement aux résultats obtenus par

Pulido et Jimenez, Schmitt-John et Engels (1992) n'ont pas remarqué d'augmentation de la production de tendamistat lorsqu'un terminateur synthétique a été introduit à la fin du gène.

## 1.7 Mécanismes de sécrétion des streptomycètes.

### 1.7.1 Le système Sec dépendant.

Les mécanismes de translocation des protéines ont été étudiés en détail chez *E. coli* (Pugsley, 1993). Le principal mécanisme de transport des protéines est la voie générale "Sec dépendante", qui requiert un minimum de sept protéines «Sec» (SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, SecG et SecY) pour le transport des protéines à travers la membrane. Les protéines "Sec dépendantes" sont caractérisées par un peptide signal à l'extrémité N-terminale, qui retarderait le repliement de la pro-protéine et la dirigerait vers la membrane (Gilbert *et al.*, 1995). Jusqu'à maintenant, des homologues de SecA, SecY, SecE, SecD et SecF ont été retrouvés chez les streptomycètes mais SecG et SecB n'ont toujours pas été mises en évidence chez les bactéries à Gram positif (Morosoli *et al.*, 1997). De plus, deux homologues du gène *groEL* et trois protéines homologues à GroEL de *E. coli* ont été retrouvés chez plusieurs espèces de streptomycètes. La protéine GroEL, une protéine de choc thermique, servirait de chaperon pour empêcher le repliement de la protéine dans une conformation incompétente à la sécrétion (Anné et Van Mellaert, 1993). Des gènes codant pour différentes protéines de streptomycètes ont déjà été exprimés chez d'autres organismes à Gram positif et négatif. Ainsi, Cadenas *et al.* (1992) ont exprimé le gène *amy* de *S. griseus* chez *Brevibacterium lactofermentum*, une bactérie à Gram positif, pour la production d' $\alpha$ -amylase. La protéine était sécrétée dans le milieu de culture et le séquençage du N-terminal a permis de déterminer que le peptide signal était coupé au même site que chez *S. lividans*. De plus, les peptides signaux d'une estérase de *S. scabies* (Hale *et al.*, 1992), des xylanase A, B et C, des cellulases A et B et de l'acétyl xylane estérase de *S. lividans* (Gilbert *et al.*, 1995) ont permis de récupérer les différentes protéines dans l'espace périplasmique de *E. coli*. Ces résultats semblent indiquer que le système de sécrétion des streptomycètes possède de grandes similitudes avec celui "Sec dépendant" décrit chez *E. coli*.

### 1.7.2 Le système TAT.

Un autre système général de sécrétion décrit par Berks *et al.* (2000), le système TAT (pour "twin-arginine translocation"), permettrait à des protéines de dimension variable d'être sécrétées à l'aide, elles aussi, d'un peptide signal. Dans la plupart des cas, ce système est utilisé par des protéines qui se lient à des co-facteurs dans le cytoplasme ou qui requièrent des facteurs du cytoplasme pour leur repliement. Ces protéines sont donc repliées avant leur sécrétion dans le milieu de culture. Le signal peptide du système TAT est composé, tout comme celui du système Sec, de trois parties (N,H et C) mais possède une séquence (S/T)-R-R-x-F-L-K conservée à la frontière entre les régions N et H. Les deux résidus arginines sont invariables, tandis que les autres résidus sont retrouvés à une fréquence de plus de 50%. De plus, les peptides signaux du système TAT ont en moyenne 14 acides aminés de plus que les peptides signaux du système Sec. *In vitro*, il n'y a aucune preuve directe que ce système de sécrétion bactérien permet la translocation d'une protéine repliée. Plusieurs évidences d'études *in vivo* supportent cependant cette idée. Chez les streptomycètes, un exemple de co-translocation de protéines multiples par un peptide signal qui contient deux arginines a été retrouvé pour la sécrétion de l'apoprotéine de l'enzyme tyrosinase (MelC2) qui nécessite la présence de la protéine chaperon MelC1 qui porte le peptide signal. Suite à l'insertion d'un ion cuivre pour l'activation de la tyrosinase, MelC1 est libérée après la translocation (Chen *et al.*, 1992; Leu *et al.*, 1992).

### 1.7.3 Autres.

Finalement, certaines protéines sans peptides signaux seraient sécrétées par un mécanisme indépendant, les transporteurs ABC, qui regroupent des familles de protéines partageant des fonctions semblables et un domaine de liaison de l'ATP commun. Ces transporteurs sont classifiés sous trois grandes catégories : les importateurs bactériens (les perméases périplasmiques), les transporteurs eucaryotes et les exportateurs bactériens (Fath et Kolter, 1993).

## **2.0 Production de protéines homologues et hétérologues.**

La production de protéines de *S. lividans*, de *M. tuberculosis*, d'*E. coli*, de *Streptococcus suis* et de souris est l'objectif ultime de cette étude. Pour cette raison, les protéines servant de modèle à cette étude ainsi que les essais jusqu'à maintenant effectués pour leur production seront présentés en détail. Dans la plupart des cas, les protéines décrites n'ont jamais été produites chez *S. lividans*. Les résultats obtenus lors de la production de ces protéines par d'autres micro-organismes seront donc présentés et les raisons permettant de croire qu'une production chez *S. lividans* donnerait de meilleurs ou de moins bons résultats seront exposées.

### **2.1 Cellulase B de *S. lividans*.**

*S. lividans* sécrète toutes les enzymes hydrolytiques nécessaires pour la dégradation de la biomasse ligneuse (Kluepfel *et al.*, 1986). Deux endoglucanases ont jusqu'à maintenant été caractérisées chez cette bactérie, soit les cellulases A et B. Avec une activité spécifique de 12 UI/ml, Théberge *et al.* (1992) ont réussi à obtenir une surproduction de cellulase A (CelA) de plus de 850 fois en comparaison à la production de la souche sauvage. Cependant, à l'aide du même vecteur et des mêmes conditions de culture, Wittmann *et al.* (1994) n'ont réussi qu'à obtenir une production de 0,1 UI/ml dans le cas de la cellulase B (CelB). En considérant que l'activité de la CelB est dix fois moindre que celle de la CelA, la production de CelB est tout de même dix fois plus faible.

### **2.2 Protéines de *M. tuberculosis*.**

La tuberculose a été la première maladie classée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme urgence globale puisqu'il a été déterminé qu'environ 30 millions de personnes vont mourir de la tuberculose dans les 10 prochaines années. Le déclin de l'efficacité du vaccin BCG actuel et l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques ont stimulé la recherche pour le développement de nouvelles alternatives dans la lutte contre cette maladie. Jusqu'à maintenant, plusieurs protéines intracellulaires et extracellulaires de *M. tuberculosis* ont été choisies comme des candidates potentielles pour le développement de

vaccins et comme cibles de nouveaux antibiotiques (tableau I). Devant le besoin d'obtenir rapidement une grande quantité de ces protéines, des essais ont été effectués chez différents

Tableau I : Principaux antigènes de *M. tuberculosis* classés selon leur groupe.

Groupe et masse moléculaire (kDa)	Désignation ou homologues	Production Hétérologue	Sécrétion	Séquence N-terminale
<b>Protéines de choc thermique</b>				
65	<b>GroEL</b> , MbaA	<i>E. coli</i>	-	KTIAY
14	<b>antigène 18 kDa de <i>M. leprae</i></b>	<i>E. coli</i>	-	ATTLPV
12	<b>GroES</b> , BCG-a, MPT 57	-	-	AKVNI
<b>Lipoprotéines</b>				
38	<b>PhoS</b> , ag5 U.S.-J, Pab	<i>E. coli</i>	-	CGSKP
19	-	<i>M. vaccae</i> , <i>M. smegmatis</i> , levure, <i>E. coli</i>	-	CSSNK
<b>Protéines sécrétées</b>				
Ag85	31,5	MPT45, 85C	<i>C. glutamicum</i>	Oui
	31	MPT44, 85A, P32	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	- -
	30	MPT59, 85B, ag6 U.S.-J, $\alpha$ -ag	<i>M. smegmatis</i>	oui
23,5	MPT64	<i>E. coli</i>	-	APKTY
		<i>M. smegmatis</i>	oui	
6	ESAT-6	-	-	-
<b>Enzymes</b>				
44	<b>PstA</b> , ag88	-	-	-

micro-organismes tels que *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium vaccae* et *Corynebacterium glutamicum* pour l'obtention de protéines recombinantes.

Dans la classification des différents antigènes de *M. tuberculosis*, il faut d'abord noter que la nomenclature des antigènes mycobactériens est compliquée et que plusieurs désignations sont couramment utilisées pour les différentes protéines. L'identification à l'aide des poids moléculaires est souvent utilisée mais ne peut constituer le seul critère (Wiker et Harboe, 1992). Un exemple des limites de cette technique est le cas de la lipoprotéine de 19 kDa, dont le cadre de lecture de 159 acides aminés code pour une protéine de 15,1 kDa de masse moléculaire. L'attachement d'une queue lipidique à l'extrémité N-terminale expliquerait la différence entre la valeur calculée et la masse moléculaire de la protéine mature (Ashbridge *et al.*, 1989). L'identification est donc effectuée par caractérisation de la protéine et par comparaison avec des gènes présentant des homologues de séquence. Les protéines isolées de *M. tuberculosis* sont désignées par le terme MPT, suivi d'un numéro qui indique la mobilité de la protéine sur SDS-PAGE (7,7% acrylamide).

### 2.2.1 Protéines de choc thermique.

Les protéines de choc thermique ont été ainsi nommées à cause de leur production lors d'une élévation soudaine de la température. Une caractéristique majeure de ces protéines est la nature hautement conservée de leur séquence parmi les différentes espèces (Wiker et Harboe, 1992). Les deux principales protéines de choc thermique de *M. tuberculosis*, les protéines de 65 kDa et de 12 kDa, ont été longuement étudiées pour leur capacité à induire une réponse immunitaire.

La protéine de choc thermique de 65 kDa de *M. tuberculosis* correspond à l'antigène commun des bactéries GroEL, qui a été découvert chez *E. coli* et qui interagit avec les anticorps de plus de 50 différentes espèces de bactéries dans des épreuves de précipitation sur gel (Thole et Van der Zee, 1990). Une comparaison de la séquence en nucléotides des gènes codant pour les protéines de 65 kDa de *M. leprae*, *M. tuberculosis* et *M. bovis* a démontré que les trois gènes sont identiques (Thole *et al.*, 1988). Shinnick (1987) a observé que le contenu en G-C du gène codant pour cette protéine n'est pas distribué également dans le gène : le contenu en G-C est de 55% dans les deux premières positions des codons alors qu'il est de

87% en troisième position. Cette stratégie retrouvée dans la plupart des gènes de *M. tuberculosis* a été interprétée comme étant une méthode permettant à la bactérie d'avoir un haut contenu en G-C, sans pour autant être limitée dans le code de certains acides aminés dont les deux premiers nucléotides sont des A et T.

La protéine de 65 kDa a été largement étudiée par l'utilisation de différents anticorps. On y a défini au moins 14 épitopes présents à la surface de la molécule réagissant avec ses anticorps (Buchanan *et al.*, 1986). Pour l'identification des épitopes de la protéine de 65 kDa (MbaA), Thole *et al.* (1988) ont cloné le gène *mbaA* de *M. bovis* chez *E. coli* K-12. Pour obtenir l'expression par induction de la protéine MbaA complète ou après délétion de diverses régions, le gène a été inséré à la suite du gène *cro-lacZ* dans le plasmide pEX2 de *E. coli*. Les différentes constructions ont permis l'expression efficace de la protéine intacte ou tronquée.

Une autre protéine de choc thermique retrouvée chez *M. bovis* et *M. tuberculosis*, la protéine de 12 kDa (BCG-a), montre une homologie de séquence de 43% avec la protéine GroES de *E. coli*. Chez *E. coli*, la protéine GroES est une protéine exprimée d'un opéron qui contient également la protéine GroEL. Cependant, chez *M. tuberculosis*, les protéines de 65 et 12 kDa sont exprimées de différents opérons (Shinnick *et al.*, 1989). Barnes *et al.* (1992) ont démontré que BCG-a est un composé provenant du milieu de culture de *M. tuberculosis* qui pourrait entraîner une réponse immunitaire. Bien qu'elle soit retrouvée dans le milieu de culture dans les 72 heures initiales, ce qui indique la sécrétion de la protéine, la séquence en acides aminés de la protéine ne contient aucun peptide signal. Le mécanisme de sécrétion de la protéine reste à définir.

Une autre protéine de choc thermique, la protéine de 14 kDa, a été identifiée comme antigène potentiel. Verbon *et al.* (1992) ont inséré le gène de la protéine dans le vecteur pEX2 d'*E. coli* pour la production de la protéine de fusion *lacZ-14K*. Ainsi, il a été déterminé que cette protéine appartient à la famille alpha-crystalline des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire. Bien que ce type de protéine soit fréquemment retrouvé chez les eucaryotes, le seul autre exemple retrouvé chez les procaryotes est l'antigène de 18 kDa de *M. leprae*. Le gène de cette protéine présente une fréquence élevée en G-C typique de *M. tuberculosis*. Malgré l'absence d'un peptide signal, des expériences d'immunodétection ont permis de détecter la protéine à l'extérieure de la paroi cellulaire. De plus, malgré son

appartenance à la famille alpha-crystalline des protéines de choc thermique, les tests ont permis de détecter une certaine spécificité des anticorps pour certaines régions de la protéine. Cette spécificité est d'importance puisqu'une des difficultés potentielles pour l'inclusion de protéines de choc thermique dans un vaccin est le fait que celles-ci soient hautement conservées chez les différentes espèces. Les protéines de choc thermique de mycobactéries sont étroitement reliées à des protéines humaines, ce qui pourrait induire une maladie auto-immunitaire. En effet, la protéine de 65 kDa montre une homologie de séquence avec la protéine P1 des mitochondries humaines qui aurait un rôle à jouer dans l'apparition de l'arthrite auto-immunitaire (Dudani et Gupta, 1989).

### 2.2.2 Lipoprotéines.

Young et Garbe (1991) ont observé qu'une quantité significative (mais moins de 5%) des protéines totales, lors de l'extraction de *M. tuberculosis*, était récupérée dans le détergent lors du traitement au Triton X-114. Par cette méthode, deux principales protéines de 38 et 19 kDa sont extraites et représentent des lipoprotéines.

La protéine de 38 kDa est un des antigènes les plus étudiés des mycobactéries (Harboe et Wiker, 1992). Le séquence du gène (*pab*) comprend un peptide signal typique des protéines activement sécrétées chez les mycobactéries et possède un contenu en G-C de 55,7% dans les deux premières positions des codons et de 82,3% en troisième position. La séquence comprend notamment une séquence lipidique qui suggère que la cystéine en N-terminal est acylée par l'ajout d'une queue de lipides qui est probablement responsable de l'attachement de la protéine à la surface riche en lipides des mycobactéries (Young et Garbe, 1991). Andersen et Hansen (1989) ont défini qu'une homologie de séquence de 30% est retrouvée entre la protéine de 38 kDa et la protéine PhoS de *E. coli*, cette dernière étant essentielle au transport du phosphate chez cette bactérie. Un rôle similaire serait joué par la protéine de 38 kDa puisque dans un milieu faible en phosphate, il y a augmentation de l'expression de la protéine qui est localisée principalement à la surface de la cellule (Andersen *et al.*, 1990 ; Espitia *et al.*, 1992). Pour identifier la région de la protéine à laquelle les anticorps s'attachaient, le gène *pab* entier et tronqué a été introduit dans le vecteur pBR322 de *E. coli* pour la production d'une protéine de fusion Pab- $\beta$ -galactosidase. Les protéines produites ont permis de définir qu'un groupe d'anticorps reconnaissait les 91

derniers acides aminés de la protéine, tandis qu'un autre groupe reconnaissait un domaine antigénique localisé dans la portion médiane de la protéine. Aucun anticorps ne se liait aux 117 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Andersen et Hansen, 1989).

La seconde lipoprotéine retrouvée, celle de 19 kDa, a été identifiée comme un antigène majeur de *M. tuberculosis* par l'utilisation d'anticorps monoclonaux de muridés. Elle a par la suite été identifiée comme une cible des anticorps et des cellules T lors d'une infection de tuberculose et une vaccination au BCG chez l'humain (Abou-Zeid *et al.*, 1997). Les essais pour la production de l'antigène de 19 kDa chez *E. coli* et les levures ont démontré qu'il y avait agrégation et insolubilité de la protéine probablement dues à l'ajout d'une queue lipidique au résidu cystéine (Cys) suite à l'enlèvement du peptide signal par une signal peptidase de type 2 (type-2 SPase). De plus, la protéine était hyperglycosylée (Ashbridge, 1991). Prestidge *et al.* (1995) ont effectué la production de l'antigène chez *E. coli* en apportant certaines modifications au peptide signal de la protéine. Les mutations introduites remplaçaient le site de reconnaissance de la type-2 SPase par le site de reconnaissance de la type-1 SPase, éliminant ainsi le résidu Cys. Les modifications ont permis la sécrétion à un taux de 2 à 5 mg/L de culture, dans l'espace périplasmique de la bactérie, d'une protéine de 17 kDa non-glycosylée et montrant l'extrémité N-terminale attendue pour la protéine modifiée. Les changements effectués sur le gène de cette protéine pourraient mener à une réponse immunitaire montrant des différences entre la protéine native et la protéine recombinante qui proviendraient des modifications apportées à la protéine lors de la maturation. Garbe *et al.* (1993) et Abou-Zeid *et al.* (1997) ont effectué la production de la protéine de 19 kDa chez *Mycobacterium smegmatis* et *M. vaccae*. De faibles productions (moins de 1% des protéines totales) ont été récupérées intracellulairement et se liaient à la concanavaleine A, démontrant une glycosilation post-traductionnelle de la protéine. Les protéines recombinantes ont induit une réponse immunitaire *in vitro* en stimulant la prolifération de cellules T, la production d'anticorps et la production d'interféron gamma. Cependant, aucune protection contre *M. tuberculosis* n'a été démontrée lorsque des souris immunisées avec l'antigène de 19 kDa ont été mises en contact avec le pathogène. En fait, la présence de l'antigène de 19 kDa semblait annuler le faible effet protecteur de *M. vaccae* (Abou-Zeid *et al.*, 1997).

### 2.2.3 Protéines sécrétées.

La distinction, entre les protéines activement sécrétées par *M. tuberculosis* et les protéines intracellulaires libérées lors de la lyse des cellules, a été effectuée à l'aide de la quantification simultanée de marqueurs enzymatiques, tel l'isocitrate déshydrogénase, dans les surnageants de culture de moins de 72 heures et la lyse des cellules par sonification (Wiker et Harboe, 1992). Les cinq protéines sécrétées activement par *M. tuberculosis* présentées dans le tableau I possèdent un peptide signal typique et sont les principales candidates pour le développement de vaccins.

Le composé majeur du surnageant de culture de *M. tuberculosis*, l'antigène 85 (Ag85) est un complexe de trois protéines : les protéines 85A (31 kDa), 85B (30 kDa) et 85C (31,5 kDa) (Wiker et Harboe, 1992). L'Ag85 est un inducteur d'interleukine-2, d'interféron  $\gamma$  et de lymphocytes T chez des sujets sains avec une infection primaire par *M. tuberculosis* (Salim *et al.*, 1997). La protection efficace contre la tuberculose que confère l'Ag85 a mené à plusieurs essais pour la production de protéines recombinantes. Harth *et al.* (1997) ont déterminé, à l'aide de plusieurs constructions, l'efficacité de production des antigènes 85A et 85B par *E. coli* et *B. subtilis*. Aucune production de ces protéines n'a été détectée chez *B. subtilis*, pourtant une bactérie à Gram positif comme *M. tuberculosis*. Jusqu'à maintenant, des protéines de choc thermique de *M. tuberculosis* hautement conservées chez les procaryotes et les eucaryotes ont été efficacement produites intracellulairement chez *E. coli* (Mehlert et Young, 1989). Mais les protéines plus spécifiques à *M. tuberculosis* comme les antigènes 85A et 85B, ont été produites à de faibles quantités chez *E. coli* (<1 mg/L). Par comparaison, lorsque les gènes codant pour les protéines 85A et 85B ont été introduits chez *M. smegmatis*, qui possède une homologie de séquence de l'ADN de seulement 15% avec *M. tuberculosis*, la production de ces protéines a été de 2,5 mg/L à 7,5 mg/L. Cela laisse supposer que l'expression et la sécrétion à un haut niveau de protéines spécifiques au genre *Mycobacterium* requièrent une mycobactérie comme hôte (Harth *et al.*, 1997). Cependant, une production efficace de l'antigène 85A par *Corynebacterium glutamicum*, un actinomycète à Gram positif, a été obtenue par Salim *et al.* (1997). La protéine se retrouvait dans des extraits de parois cellulaires et dans le surnageant de culture, sous une forme active et provoquait une réponse immunitaire dans des cellules de la rate de souris vaccinées.

La huitième protéine la plus abondante dans le milieu de culture de *M. tuberculosis*, MPT64, est une protéine de 23,5 kDa. La protéine est produite et sécrétée par les souches virulentes qui provoquent la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. bovis*). Cependant, la stimulation du système immunitaire par la MPT64 ne se fait que chez les patients déjà faiblement atteints de tuberculose (Ulrichs *et al.*, 1998; Boesen *et al.*, 1995). Cinq anticorps monoclonaux reconnaissant quatre épitopes sur la MPT64 ont été retrouvés récemment (Andersen *et al.*, 1991). Pour la localisation de divers épitopes à la surface de la protéine, Oettinger et Andersen (1994) ont effectué différentes constructions dans le vecteur pMAL-*p* de *E. coli*. Diverses parties du gène étaient fusionnées au gène *malE*, codant pour la protéine de liaison au maltose. L'immunodétection des protéines du périplasme a permis de déterminer que les protéines recombinantes étaient produites et de localiser les épitopes. Roche *et al.* (1996), ont effectué la production de MPT64 chez *M. smegmatis*. Bien que la protéine soit exprimée à l'aide de son propre promoteur, les taux de production ont été doublés, pour atteindre 3,8 mg/L, lors de l'utilisation du promoteur *pBlaF* isolé d'une souche de *M. fortuitum* résistante à l'amoxicilline. Cependant, Harth *et al.* (1997) ont effectué la production de MPT64 chez *M. smegmatis* par l'insertion du gène dans un vecteur navette *E. coli/M. smegmatis*. Le peptide signal de 23 acides aminés a permis la sécrétion, à un taux de 7,5 mg/L, de la protéine dans le milieu de culture. Chez *M. tuberculosis*, la protéine la plus abondante dans le milieu de culture est la protéine 85B faisant partie de l'antigène 85. Par contre, lors de leur production chez *M. smegmatis*, il semble que MPT64 est exprimée à un taux deux fois plus élevé que le taux de production de 85B.

Lors d'essais sur la réponse immunitaire chez des souris atteintes de tuberculose, deux fractions de protéines sécrétées ont été identifiées comme cible: la première, la protéine 85B faisant partie de l'antigène 85, et la seconde, une protéine de 6 kDa, désignée ESAT-6 (Andersen et Heron, 1993; Andersen *et al.*, 1995). Ulrichs *et al.* (1998) ont déterminé que la protéine de 6 kDa induisait la stimulation des cellules T chez des patients atteints de tuberculose ou positifs au test de la tuberculine, alors qu'aucune réaction n'était observée chez les patients sains, en faisant ainsi une candidate potentielle pour un test de détection de la tuberculose. Il est toutefois à considérer que plusieurs antigènes sont nécessaires pour le développement d'un test possédant la sensibilité adéquate pour la détection de la maladie.

### 2.2.4 Enzymes.

Parmi les nombreuses protéines présentant une activité enzymatique retrouvées chez *M. tuberculosis*, une seule fait partie du tableau 3 : la protéine de 44 kDa. Braibant *et al.* (1994) ont cloné puis déterminé la séquence du gène de cette protéine. La protéine possède une homologie de séquence de 76,7% dans les six hélices transmembranaires en C-terminale avec la protéine PstA de *E. coli* et une courte séquence en N-terminale qui présente une homologie de séquence de 90% avec la protéine PstC. La séquence de la protéine ne présente aucune des caractéristiques d'un peptide signal typique et la protéine fait probablement partie intégrante de la membrane. Chez *E. coli*, les deux protéines PstA et PstC, qui sont des sous-unités d'une phosphate perméase, formeraient le canal d'entrée du mécanisme de transport du phosphate et seraient essentielles pour des bactéries se développant dans un environnement faible en phosphate. Les gènes de ces protéines font partie d'un opéron comprenant la protéine PhoS dont un homologue (la protéine de 38 kDa) a été retrouvé chez *M. tuberculosis*. Cependant, aucun homologue de la protéine PstC n'a été retrouvé chez cette dernière. Des études plus poussées sur la protéine de 44 kDa pourraient mener au développement d'inhibiteurs des fonctions de cette protéine ou à la reconnaissance d'immunogènes à la surface de la membrane, pour le développement de vaccins.

### 2.3 Métalloprotéinase de matrice de type 9 (MMP9).

Les métalloprotéinases de matrice (MMP) représentent une famille d'enzymes, reliées par leur structure et leur fonction, qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire chez différents organismes (Rawlings et Barrett, 1995) et qui sont caractérisées par la présence d'un domaine de liaison du zinc. L'attachement d'un atome de zinc permet l'attaque, par une molécule d'eau nucléophile, lors de la coupure des peptides par l'enzyme. Les MMPs sont exprimées sous la forme d'une préproenzyme avec une extension à l'extrémité N-terminale permettant la sécrétion de la protéine à l'extérieur de la cellule et qui est éliminée lors de la translocation de la protéine. La forme sécrétée de la protéine, communément appelée zymogène contient, elle aussi, une extension à l'extrémité N-terminale qui coordonne le domaine de liaison du zinc en le rendant inaccessible. Une

maturation de la protéine à l'aide d'enzymes protéolytiques permet la libération du domaine de liaison du zinc donnant ainsi à l'enzyme son activité catalytique (Woessner, 1991). Habituellement, il existe une balance homéostatique entre l'expression de ces protéines et de leurs inhibiteurs. En exemple, lorsque la MMP2 est sécrétée par des cellules cancéreuses, la protéine est récupérée sous la forme d'un complexe zymogène-inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases de matrice (TIMP). Les membres de la famille des TIMPs sont des protéines de faible poids moléculaire (20 kDa) qui sont retrouvées dans plusieurs tissus (Woessner, 1991). Cependant, certaines maladies sont attribuées à la surexpression des MMP, comme la destruction du cartilage par l'arthrite et la dissémination des métastases dans certains cancers (Liotta *et al.*, 1980). Les mécanismes thérapeutiques, permettant une intervention contre ces maladies, seraient le développement des petites molécules inhibitrices qui permettraient de retrouver l'équilibre homéostatique. Jusqu'à maintenant, les inhibiteurs synthétiques ayant donné les meilleurs résultats sont ceux possédant un groupement carboxyl, sulfhydryl ou hydroxamate qui, coordonnés avec l'atome de zinc, peuvent bloquer la catalyse (Woessner, 1991).

La MMP9 (collagénase/gélatinase de type IV) est une protéine de 92 kDa sécrétée sous la forme zymogène, qui est ensuite partiellement dégradée par protéolyse générant des polypeptides actifs de poids moléculaire de 83 ou 67 kDa. Cette enzyme est capable de dégrader des composantes de la membrane basale. Elle est impliquée dans l'invasion des tumeurs et la dissémination par métastases, ce qui en fait une cible de choix pour le développement d'inhibiteurs. Pour rencontrer les besoins en MMP9 requis pour les études de laboratoire, plusieurs méthodes de purification dans différentes cellules humaines ont été développées (Okada *et al.*, 1992; Morodomi *et al.*, 1992). George *et al.* (1997) ont effectué la production de MMP9 par des cellules d'insectes via un système d'expression de baculovirus. À l'aide de ce système, la quantité d'enzymes produites sous forme de zymogène est de 300 mg/L. Une fois activée, l'enzyme présentait la même activité que la MMP9 purifiée de cellules humaines.

## **2.4 Protéines d'*E. coli*.**

Certaines souches pathogènes d'*E. coli*, responsables d'infections entériques chez les

humains et les animaux, possèdent un système de sécrétion de type III. Ce type de système de sécrétion de protéines virulentes, caractérisé par l'absence d'un peptide signal, a été retrouvé chez plusieurs micro-organismes responsables de maladies entériques chez l'humain. La production de protéines est influencée par les conditions environnementales et par le contact avec les cellules de l'hôte ou avec certaines protéines de l'hôte. Le système de sécrétion ainsi que les protéines sécrétées sont codés, dans la bactérie, par un groupe de gènes se trouvant sur un plasmide ou dans un îlot pathogénique (Mecsas et Strauss, 1996).

Un tel îlot, la région LEE (pour Locus of Enterocyte Effacement) a été retrouvé chez *E. coli*. Cette région code pour un système de sécrétion de type III et pour plusieurs protéines d'*E. coli*, soit les protéines EspA, EspB, EspD, EspE et Tir, qui sont requises pour l'attachement aux cellules hôtes et la formation de lésions AE (pour Attaching and Effacing). L'interruption de n'importe quel de ces gènes résulte en l'abolition de la transduction des signaux essentiels à l'interaction avec la cellule d'eucaryote lors du processus d'infection. Le phénomène AE est caractérisé par la perte de microvilli et par l'attachement de la bactérie sur des piédestaux en forme de coupe composés d'éléments provenant du cytosquelette protéique de la cellule hôte. Ces structures sont composées, entre autre, d'actine, d' $\alpha$ -actinine et de chaînes légères de myosine. Plus précisément, l'attachement des bactéries à la surface des cellules membranaires débute par la phosphorylation d'une protéine de membrane de 90 kDa (Hp90) de l'hôte qui, une fois activée, se lie à l'intimine, une protéine de membrane externe codée par le gène *eae* localisé dans la région LEE (Lai *et al.*, 1997).

#### **2.4.1 La protéine EspD.**

La protéine EspD, retrouvée chez les souches entérohémorragiques (EHEC) et entéropathogéniques (EPEC) d'*E. coli* avec une homologie de séquence de 80,36 % aurait un rôle à jouer dans la formation des lésions AE. En effet, selon Lai *et al.* (1997), une mutation dans le gène *espD*, qui code pour une protéine de 39,492 Da et qui est localisée dans la région LEE, interrompt la phosphorylation de la protéine Hp90, supprimant ainsi la capacité de la bactérie de produire des lésions AE. De façon plus précise, Kresse *et al.* (1999) ont déterminé que la protéine EspD, localisée en grande partie dans la fraction provenant de la membrane cytoplasmique des cellules infectées, aurait un rôle à jouer dans l'attachement de

la bactérie à la cellule hôte. En effet, les mutants ayant perdu *espD* n'effectuent plus l'accumulation d'actine à la surface de la cellule lors de l'adhérence de la bactérie. De plus, la formation d'appendices qui servent de canaux de translocation de molécules à l'intérieur du cytosol des cellules infectées est interrompue. Ces appendices sont formés en grande partie de filaments de la protéine EspA. Ainsi, le rôle principal de la protéine EspD serait d'établir un lien direct entre la bactérie et la cellule eucaryote, via les appendices de surface et de, peut-être, faciliter la translocation de protéines requises pour la formation des lésions AE.

#### **2.4.2 La protéine PAA.**

Selon An *et al.* (1999), le gène *paa* coderait pour une protéine sécrétée de 27,6 kDa qui aurait un rôle important dans le développement de maladies entériques induites par *E. coli*. En effet, lors de l'inactivation de gènes par mutagenèse par transposons, un mutant *paa*<sup>-</sup> d'une souche d'EPEC porcin (PEPEC) ne possédait plus la capacité d'induire des lésions AE. Son rôle dans la pathogénécité des souches de PEPEC n'a pas encore été élucidé. Cependant, la corrélation de la présence, chez 15 souches d'*E. coli* causant des lésions AE, des gènes *paa* et *eae* et l'absence du gène *paa* chez des souches AE négatives démontre l'importance de ce gène dans le développement des lésions. De plus, la corrélation faite entre la présence du gène *paa* et du gène *eae* chez des isolats provenant d'humains ou de différentes espèces animales a permis de déterminer que le gène *paa* aurait un rôle plus important dans l'activité AE de l'EHEC et d'isolats de chien, et un rôle moins déterminant chez les isolats d'EPEC du lapin, du porc, et de l'humain.

## 2.5 Protéine de *S. suis*.

*S. suis* est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultative, qui est la cause de plusieurs maladies porcines. Cette bactérie est répandue mondialement, mais représente un grand problème dans les pays exerçant des pratiques intensives d'élevage du porc. Le syndrome causé par *S. suis* chez le porc inclut l'arthrite, les méningites, la pneumonie, la septicémie, l'endocardite, l'avortement et des abcès. De plus, la bactérie peut causer certaines maladies chez l'humain, spécialement chez les employés des abattoirs et les personnes travaillant en relation avec l'industrie porcine. Chez l'humain, *S. suis* de type 2 peut induire des méningites, résultant en des pertes auditives, des septicémies, des endocardites et la mort. Le mécanisme pathologique de *S. suis* n'est pas bien défini. Plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés, mais leurs rôles dans la pathogenèse et les maladies ne sont pas élucidés. Étant donné le peu de connaissances, la lutte contre *S. suis* repose en grande partie sur l'utilisation d'antibiotiques (Staats *et al.*, 1997). Plusieurs protéines ORF (pour «open-reading-frame») sont présentement à l'étude pour leur rôle dans la virulence de *S. suis* de type 2.

## **Matériel et méthodes**

## 1.0 Liste de matériel

Acétate de potassium	American Chemical Ltd
Acétate de sodium	J.T. Baker
Acide acétique	Fisher
Acide chlorhydrique	J.T. Baker
Acide dinitrosalicylique	BDH
Acrylamide	Bio-Rad Laboratories Ltd
ADN ligase du phage T4	Bio-Rad Laboratories Ltd
Agar	Difco
Agarose	Boehringer Mannheim
Alcool isoamylique	J.T. Baker
Ampicilline	Sigma Chemical Co.
ATP	Pharmacia
Bacto-tryptone	Difco
Bisulfite de sodium	J.T. Baker
Bleu de bromophénol	Anachemia
Bromure d'éthydiium	Sigma Chemical Co.
Carboxyméthylcellulose	Sigma Chemical Co.
Casamino acids	Difco
Chloroforme	American Chemical Ltd
Chlorure de calcium	Fisher
Chlorure de césium	BDH
Chlorure de cobalt	Analar
Chlorure de cuivre	Fisher
Chlorure de magnésium	J.T. Baker
Chlorure de potassium	Merck
Chlorure de sodium	American Chemical Ltd
Coomassie Brilliant Blue R250	Gibco BRL
2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate	Pharmacia
2'-désoxycytidine 5'-triphosphate	Pharmacia
2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate	Pharmacia
2'-désoxythymidine 5'-triphosphate	Pharmacia
Dithiothréitol	Sigma Chemical Co.
EDTA	J.T. Baker
Enzymes de restriction	Pharmacia
Éthanol	SAQ
Extrait de bœuf	Difco
Extrait de levure	Difco
Filtres Millex-GP 0,22 µm	Millipore
Gélatine	Bio-Rad Laboratories Ltd
Glucose	American Chemical Ltd
Glycérol	J.T. Baker
Glycine	BDH
Hydroxyde de sodium	Fisher
Hydroxyquinoline	Sigma Chemical Co.
Imidazole	BDH

Isopropanol	Fisher
Klenow polymérase	Dupont
Lait écrémé en poudre	Difco
Lysozyme	Sigma Chemical Co.
Maltose	American Chemical Ltd
Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder	Gibco BRL
Méthanol	SAQ
Méthionine	Sigma Chemical Co.
N-Z amine A	Sheffield Products
Persulfate d'ammonium	Bio-Rad Laboratories Ltd
PFU ADN polymérase	Stratagene
Phénol	Gibco BRL
Phosphatase alcaline	Pharmacia
Phosphate de potassium	J.T. Baker
Polyéthylène glycol 6000	J.T. Baker
Propionamide	Aldrich Chemical Co.
L-Proline	Sigma Chemical Co.
RNase A	Sigma Chemical Co.
Sephadex G-50	Pharmacia
Sodium dodécyl sulfate	IBI
Spermidine	Sigma Chemical Co.
Sucrose	Fisher
Sulfate d'ammonium	BDH
Sulfate de cuivre	Sigma Chemical Co.
Sulfate de fer	Merck
Sulfate de magnésium	J.T. Baker
Sulfate de manganèse	J.T. Baker
Sulfate de potassium	American Chemical Ltd
Sulfate de zinc	Sigma Chemical Co.
Tampon Laemmli	Bio-Rad Laboratories Ltd
Tampon One-Phor-All <i>Plus</i> 10X	Pharmacia
Tampon PFU	Stratagene
Tampon TES	Sigma Chemical Co.
Tartrate de sodium de potassium	J.T. Baker
TEMED	Bio-Rad Laboratories Ltd
Thiostrepton	Bristol-Myers Squibb
Tris	Bio-Rad Laboratories Ltd
Triton X100	Bio-Rad Laboratories Ltd
Tween 80	American Chemical Ltd
Tyrosine	Gibco BRL
Xylane de bouleau	Sigma Chemical Co.
Xylose	Sigma Chemical Co.

## 2.0 Souches bactériennes.

### 2.1 *E. coli*.

La souche *E. coli* DH11S F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr hsdRMS mcrBC)  $\Delta$ (lac-proAB)  $\Delta$ (recA1398) deoR supE rpsL srl thi/F' proAB+ lacIqZ  $\Delta$ M15 (Lin *et al.*, 1991) vendue par Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada) a été utilisée pour la construction des vecteurs. Cette souche est recA 1398, ce qui augmente la stabilité des insertions. L'efficacité de transformation de cette souche est de  $> 1 \times 10^8$  transformants/ $\mu$ g d'ADN du vecteur pUC19 dans une réaction de 100  $\mu$ l.

### 2.2 *S. lividans*.

La souche 10-164 (cellulase et xylanase négative) de *S. lividans* a été utilisée pour l'expression et la sécrétion de protéines homologues et hétérologues. Cette souche possède une mutation dans le gène *msiK* au site B, qui lie l'ATP. Cette protéine mutée ne peut plus fournir l'énergie nécessaire aux systèmes de transport du xylose, du cellobiose et du xylobiose (Hurtubise *et al.*, 1995). Ces sucres doivent être transportés dans la cellule pour que les gènes de xylanase et de cellulase soient induits. Cette souche a été utilisée pour le clonage homologue des gènes de cellulase et xylanase. En outre, elle semblerait sécréter moins de protéases, ce qui facilite la récupération des protéines sécrétées dans le surnageant de culture.

## 3.0 Milieux de culture.

### 3.1 Milieu de culture pour *E. coli*.

Le milieu de culture 2x TY a été utilisé pour les cultures d'*E. coli*. Ce milieu contient 16 g de bacto-tryptone, 10 g d'extrait de levures et 5 g de NaCl par litre d'eau. Pour les milieux solides, 15 g de bacto-agar sont ajoutés. Après stérilisation, lorsque le milieu est refroidi à environ 50°C, on ajoute de l'ampicilline à 100  $\mu$ g/ml dans le milieu pour la

sélection des transformants d'*E. coli*. La croissance bactérienne est de 16 heures dans un incubateur à 37 °C avec agitation à 240 rpm.

Le milieu TB est utilisé pour la culture des cellules pour la technique "Miniprep". Ce milieu contient 12 g de bacto-tryptone, 24 g d'extrait de levures et 4 ml de glycérol par litre.

### 3.2 Milieu de culture pour *S. lividans*.

Les cellules sont cultivées et conservées sur milieu solide Bennett-thiostrepton (BT). Ce milieu contient 1 g d'extrait de levures, 1 g d'extrait de bœuf, 2 g de NZ amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre. Le pH est ajusté à 7,3 avec du NaOH. Après stérilisation, selon le besoin, 4 ml de thiostrepton (solution stock de 50 mg/ml) est ajouté.

Après transformation, les protoplastes sont étalés sur le milieu solide R5 (Hopwood *et al.*, 1985) qui contient 103 g de sucrose, 0,25 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10,12 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10 g de glucose, 0,1 g de casamino acid (Difco), 5 g d'extrait de levures, 14,33 g de TES, 22 g d'agar et 2 ml de la solution de sels de Mandel (pour 100 ml : 0,14 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,16 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,5 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) dans un volume d'eau de 955 ml. Le volume est complété à 1 litre en ajoutant 10 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5%), 4 ml CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (5M), 1 ml CuSO<sub>4</sub> (5 mg/ml), 15 ml de L-proline (20%), 10 ml de méthionine (1%) et 5 ml de tyrosine (8% dans du NaOH 1N). Le milieu est réparti dans des pétris (20 ml/pétri) qui sont ensuite séchés à la température de la pièce pendant 5 jours, jusqu'à la perte de 15% de leur poids initial. L'intérêt de ce milieu réside dans le fait qu'il est hypertonique ce qui évite aux protoplastes de subir un choc osmotique. De plus, étant riche en glucose et en sels minéraux, ce milieu favorise la régénération des protoplastes.

Le milieu liquide Tryptic Soy Broth (TSB) est utilisé pour la culture des transformants. Ce milieu contient 17 g de bacto-tryptone, 3 g de bacto-soytone, 5 g de NaCl et 2,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> par litre d'eau. Après stérilisation, le thiostrepton est ajouté à une concentration de 5 µg/ml.

Le milieu M14-Xylose est utilisé pour la production de protéines. Ce milieu est constitué, par litre, de 1,4 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml des sels de Mandel et 2 ml de Tween 80. Le pH est ajusté à 7,4. Pour une culture de 20 ml, on ajoute

200  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  (solution stock 3%), 120  $\mu$ l de  $\text{MgSO}_4$  (solution stock 5%), 20  $\mu$ l de thioestrepton (solution stock de 5 mg/ml) et 1 ml de xylose (solution stock de 20 %). La quantité totale de spores à ajouter au 20 ml de solution est de  $4 \times 10^7$ .

## **4.0 Manipulation de l'ADN.**

### **4.1 Précipitation à l'éthanol.**

La précipitation de l'ADN est effectuée avec 0.1 volume de Na acétate 3M et 2,5 volumes d'éthanol 95%. La précipitation est presque instantanée. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 13 K rpm. Le surnageant est décanté puis l'échantillon est recentrifugé pendant 2 minutes. Pour obtenir un culot à sec, il suffit d'enlever le liquide restant à l'aide d'un capillaire puis de laisser sécher l'échantillon pendant 5 minutes. Le culot est suspendu à nouveau dans le volume d'eau désiré.

### **4.2 Extraction phénol/chloroforme.**

Pour une purification rapide de l'ADN,  $\frac{1}{2}$  volume de phénol et  $\frac{1}{2}$  volume de chloroforme: isoamyl alcool (24:1) sont ajoutés à l'échantillon puis mélangés au vortex. Le mélange est ensuite centrifugé 3 minutes à 13 K rpm. La phase aqueuse supérieure est récupérée et contient l'ADN.

### **4.3 Digestion d'ADN par une enzyme de restriction.**

Pour un volume final de 10 à 50  $\mu$ l, une unité de l'enzyme de restriction (Pharmacia) est utilisée pour la digestion de 1  $\mu$ g d'ADN dans le tampon "one-phor-all Buffer *Plus*" (OPA) 10x (100 mM Tris-acétate pH 7,5, 100 mM acétate de magnésium et 500 mM acétate de potassium) à la concentration recommandée (0,5X à 2X). Le volume est ajusté avec de l'eau et le mélange est incubé 1 heure à la température optimale de l'enzyme (généralement 37 °C).

Les fragments d'ADN peuvent être ensuite récupérés par électrophorèse sur un gel d'agarose à la concentration désirée (0,7 à 2% (p/v)) dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM pH 8,0, 20 mM acide acétique, EDTA 1mM).

#### **4.4 Déphosphorylation de vecteurs.**

Après digestion d'un vecteur par l'enzyme de restriction appropriée, la déphosphorylation par la phosphatase alcaline empêche le vecteur de se religuer sur lui-même. Tout d'abord, on ajuste le volume à 50 µl avec de l'eau et le tampon OPA de façon à obtenir une concentration finale de OPA de 1x. On inactive à la température recommandée (65 °C ou 85 °C) l'enzyme de restriction et on laisse refroidir 20 minutes à la température de la pièce. Ensuite, on ajoute 0,1 U de phosphatase alcaline (phosphatase d'intestin de veau) de Pharmacia. Le mélange est incubé 30 minutes à la température de la pièce puis la phosphatase est inactivée en chauffant 15 minutes à 85 °C. Après une extraction phénol/chloroforme, le vecteur est précipité à l'éthanol puis suspendu à nouveau dans le volume d'H<sub>2</sub>O nécessaire.

#### **4.5 Extrémités franches par le fragment Klenow de la polymérase I d'*E. coli*.**

La réparation de l'ADN, pour créer des extrémités franches, a été réalisée selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989). Après la digestion de l'ADN à l'aide de l'enzyme de restriction appropriée, on ajoute la quantité de tampon OPA 10X nécessaire pour l'obtention d'une concentration de 1X, 1 µl d'un mélange de dNTP à une concentration de 2 mM, 1 µl du fragment Klenow polymérase I de *E. coli* et on ajuste le volume à 25 µl avec de l'eau. Le mélange est ensuite incubé à température de la pièce pendant 30 minutes et la réaction est arrêtée par l'ajout de 1 µl d'EDTA 0,5 M, pH 8,0. L'ADN est ensuite extrait au phénol/chloroforme. Bien que cette étape ne soit pas essentielle, on peut ensuite éliminer les dNTP non incorporés par une centrifugation de 1000g pendant 4 minutes à travers une colonne de Sephadex G-50 équilibrée dans du tampon TE contenant 0,1 M NaCl.

## 4.6 Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur.

Après l'amplification par PCR d'un fragment que l'on désire insérer dans un vecteur, le vecteur (à une concentration de 0,2 µg) et le fragment (à une concentration minimale de 0,4 µg) sont digérés avec les enzymes appropriées. Le vecteur est ensuite déphosphorylé (si nécessaire) et les différents fragments sont récupérés après électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est récupéré en utilisant le QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen). Le vecteur et le fragment sont récupérés dans un volume final de 40 µl de Tris-HCl, pH 8,2 puis précipités à l'éthanol. Suite à la précipitation, le vecteur est redilué dans 7,5 µl d'eau et l'insertion est laissée à sec. Le volume total de 7,5 µl du vecteur est mélangé au fragment à insérer. On ajoute ensuite 1 µl de tampon OPA 10X, 1 µl d'ATP 10 mM et 3,75 unités d'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia). Le mélange est ensuite incubé à 14 °C pour un minimum de 4 heures. La ligase génère des liens phosphodiester, en présence d'ATP, entre les extrémités 5'-phosphate d'un fragment et 3'-hydroxyl de l'autre fragment.

## 4.7 Isolement d'ADN.

### 4.7.1 Technique « Miniprep » chez *E. coli*.

La méthode « miniprep », pour la récupération des plasmides en tubes eppendorf (Liu et Mishra, 1995), a été utilisée pour l'extraction rapide des plasmides chez *E. coli*. Les colonies récupérées d'un pétri sont inoculées individuellement dans des tubes eppendorf de 1,5 ml contenant 0,2 ml de milieu TB avec ampicilline et incubées de 8 à 18h à 37 °C. Les cultures sont centrifugées de 10 à 15 secondes et le surnageant est aspiré. On ajoute ensuite 30 µl de solution STT (8% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5% Triton X100) contenant 1 mg/ml de lysozyme fraîchement préparé, puis le culot est suspendu en vortexant 5 à 10 secondes. L'échantillon est ensuite bouilli 60 secondes puis centrifugé 5 minutes à 13 K rpm. Pour la vérification des plasmides par digestion avec des enzymes de restriction, 5 µl de surnageant peut être utilisé. De plus, une extraction subséquente au phénol/chloroforme permet l'utilisation de ces plasmides pour la transformation dans *E. coli* ou *S. lividans*.

#### 4.7.2 Purification de plasmide d'*E. coli* sur gradient de chlorure de césium.

La purification de plasmides, en grande quantité, a été effectuée selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989). À partir d'une culture 100 ml de 2x TY avec ampicilline incubée pendant 16 heures, les cellules sont récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 5 K rpm et le culot est suspendu à nouveau dans 2,5 ml de tampon glucose (50 mM glucose, 25 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA). La lyse des cellules est effectuée par l'incubation successive des cellules dans 5,5 ml de tampon sodium dodecyl sulfate (SDS) (1% SDS, 0,2 N NaOH) et 2,5 ml de tampon acétate de potassium (60 ml acétate de potassium 5 M, 11,5 ml acide acétique, 28,5 ml H<sub>2</sub>O). Après centrifugation de 10 minutes à 10 K rpm, le surnageant est récupéré puis l'ADN est extrait au phénol/chloroforme, précipité par l'ajout de 0,6 volume d'isopropanol. Le culot d'ADN est repris dans 1 ml de TE. Le volume de 1 ml est placé dans un tube Falcon de 15 ml contenant 1,75 g de chlorure de césium et 0,5 ml d'eau, en présence de 7,5 µl de bromure d'éthidium. Le mélange est ensuite placé dans un tube Quick seal, de 3,9 ml contenant 1,8 ml d'une solution de chlorure de césium 65%. Suite à une centrifugation de 3 heures sur l'ultracentrifugeuse Beckman, TL-100 à 100 K rpm, une bande d'ADN visible aux ultraviolets est récupérée à l'aide d'une seringue. L'extraction du bromure d'éthidium a été effectuée selon Song *et al.* (1999). Cette technique permet l'élimination de bromure d'éthidium par plusieurs étapes successives de précipitation à l'éthanol et l'ADN est suspendu dans 50 µl de TE. Le dosage de l'ADN est effectué par spectrophotométrie, à 260 nm.

#### 4.7.3 Technique "Mini-prep" chez *S. lividans*.

La technique "miniprep", pour l'extraction d'ADN plasmidique chez *S. lividans*, a été faite selon Hopwood *et al.* (1985). Le mycélium est cultivé 48 heures dans 10 ml de milieu TSB, à une température de 34 °C et une agitation de 240 rpm. 1,5 ml de culture est centrifugé à 13 K rpm pour la récupération des cellules. Au culot de cellules, 300 µl de solution I (50 mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) sont ajoutés puis le tout est incubé 30 minutes à 37 °C. On ajoute ensuite 400 µl de solution II fraîchement préparée (0,2 N NaOH, 1% SDS) et le mélange est incubé à la température de la pièce pendant 10 minutes. 400 µl de solution III (60 ml acétate de potassium 5 M, 11,5 ml acide acétique, 28,5 ml H<sub>2</sub>O) sont ensuite ajoutés puis, le mélange est incubé sur la glace pendant

10 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé 14 K rpm 15 minutes et le surnageant est récolté. L'ADN est précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol 95%, et incubé 15 minutes. L'ADN est récupéré par centrifugation de 15 minutes à 14 K rpm. Le culot est finalement rincé avec de l'éthanol 70%, séché à l'air 5 minutes puis suspendu dans 50 µl de TE.

#### **4.7.4 Purification de plasmide de *S. lividans* sur gradient de chlorure de césium.**

La purification de plasmides, en grande quantité chez *S. lividans*, a été effectuée selon la méthode de Hopwood *et al.* (1985) et toutes les centrifugations sont faites à 3000 g. Les cellules sont cultivées de 24 à 48 heures dans 100 ml de milieu TSB auquel sont ajoutés 1% glucose et 5 µg/L de thiostrepton. Les cellules sont récupérées par une centrifugation de 2 minutes. Le volume initial (v.i.) de cellules est déterminé. Suite à un lavage des cellules dans 5 volumes de tampon I (10,3% sucrose, 25 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8,0), on suspend à nouveau le culot dans 5 volumes de solution I contenant 2 mg/ml de lysozyme puis on incube 45 minutes à 37 °C. Après incubation, on ajoute 2,5 volumes de solution II (0,3 M NaOH, SDS 2%) et on incube 20 minutes à 70 °C. 1 volume de solution III (5 g phénol Analar, 5 ml chloroforme, 1 ml H<sub>2</sub>O, 5 mg d'hydroxyquinoline) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé 10 minutes. Le surnageant est ensuite récolté, mélangé à 1 volume d'isopropanol et à 1 volume de acétate de sodium 3 puis incubé 5 minutes à la température de la pièce. Suite à une centrifugation de 10 minutes, le culot est suspendu dans 0,5 x le v.i. de TE, 0,05 x le v.i. de NaAc 3 M et ½ volume final de phénol neutre. Après une centrifugation de 3 minutes, la phase aqueuse supérieure est récoltée, mélangée à 1 volume d'isopropanol et incubée 5 minutes à la température de la pièce. Finalement, le mélange est centrifugé 3 minutes et le culot est suspendu dans 1 ml de TE. L'étape de purification sur gradient de Chlorure de Césium telle que décrite chez *E. coli* est ensuite effectuée.

#### **4.7.5 Extraction d'ADN total chez *S. lividans*.**

L'extraction d'ADN total chez *S. lividans* a été effectuée selon la méthode rapide décrite par Hopwood *et al.* (1985). Pour commencer, 50 mg de mycélium sont suspendus et incubés 30 minutes à 37 °C dans une solution lysozyme (2 mg/ml de lysozyme et 50 µg/ml de RNase, dans 0,3 M sucrose, 25 mM Tris, pH 8,0 et 25 mM EDTA). On ajoute ensuite 250

µl de solution SDS 2 % et on mélange jusqu'à ce que la viscosité du mélange ait diminué de façon notable. Ensuite, une série de deux extractions phénol/chloroforme permet d'éliminer les débris cellulaires. On ajoute au surnageant récupéré, 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 1 volume d'isopropanol, on incube 5 minutes et on centrifuge 2 minutes à 13 K rpm. Suite à l'élimination du surnageant, le culot est suspendu à nouveau dans 500 µl de tampon TE et 25 µl de spermidine-HCl 100 mM, incubé 5 minutes et le mélange est centrifugé 2 minutes à 13 k rpm. On élimine le surnageant et le culot est suspendu et incubé 1 heure dans 300 µl de solution contenant 0,3 M d'acétate de sodium, 10 mM MgCl<sub>2</sub> et 700 µl d'éthanol 95 %. Suite à l'incubation, on centrifuge 2 minutes et le culot est finalement suspendu dans 500 µl de tampon TE.

#### 4.8 Détermination du nombre de copies des plasmides.

La détermination du nombre de copies des plasmides a été effectuée selon la méthode décrite par Wrigley-Jones *et al.* (1992). Au départ, 1 µg d'ADN total est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium. La lecture de l'intensité des différentes bandes est effectuée par illumination du bromure d'éthidium aux ultraviolets. À l'aide de l'intensité des bandes, donnée arbitrairement par densitométrie, le nombre de copies des plasmides par chromosome est calculé selon la formule :

$$\text{Nombre de copies} = \frac{\text{Intensité des bandes plasmidiques} \times \text{poids moléculaire du chromosome}}{\text{Intensité de la bande d'ADN chromosomal} \times \text{poids moléculaire du plasmide}}$$

#### 4.9 Séquençage de l'ADN.

Le séquençage des constructions plasmidiques a été effectué par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier sur l'appareil ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corporation, USA). La méthode utilisée est celle des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). Le fragment à séquencer est amplifié, à l'aide d'amorces spécifiques ou universelles, et les différentes bases sont colorées à l'aide de deux marqueurs fluorescents. Le maximum d'excitation est celui du marqueur donneur, le 6-carboxyfluoresceine (6-FAM) qui est lié à un marqueur accepteur, le dichlororhodamine (dRhodamine). Chaque nucléotide

est lié à un dRhodamine différent, possédant un spectre d'émission qui lui est propre (Tableau II). Les échantillons sont soumis à une électrophorèse dans un système de capillaires. Leur exposition à des ions d'argon pour l'excitation du 6-FAM permet de déterminer les différentes bases par leur spectre d'émission.

Tableau II : Marquage des différents nucléotides.

Nucléotides	Marqueurs accepteurs	Couleurs d'émission
<b>A</b>	<b>dR6G</b>	<b>Vert</b>
<b>C</b>	<b>DROX</b>	<b>Rouge</b>
<b>G</b>	<b>DR110</b>	<b>Bleu</b>
<b>T</b>	<b>DTAMRA</b>	<b>Noir</b>

#### 4.10 Préparation des oligonucléotides.

Les oligonucléotides servant aux PCR ont été produits sur un synthétiseur automatique d'ADN (Gene assembler, Pharmacia LKB). Le principe de fonctionnement de l'appareil repose sur les réactions de synthèse chimique développées par Sinha *et al.* (1984). Ces réactions ont été utilisées avec succès pour la synthèse d'oligodéoxynucléotides et utilisent des  $\beta$ -cyanoethylphosphoramidites (dont la  $\beta$ -cyanoethyl-N, N-dialkylamino-/N-morpholinophosphoramidite) qui sont appropriées pour la synthèse automatisée d'ADN grâce à leur grande stabilité en solution.

#### 4.11 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'amplification de 0,1 µg d'ADN à l'aide de deux oligonucléotides par la technique de PCR est effectuée dans un tampon d'amplification (dNTP 0,2 mM, tampon 1X pour Pfu (10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-Cl, pH8,75, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, 0,4% Tween 20) en présence de 2,5 unités de Pfu ADN polymérase dans un volume de 100 µL. L'ajout de propionamide (4%) permet de diminuer la force des liens G-C de l'ADN. En effet, *S. lividans* étant un organisme dont les gènes sont riches en G-C, il peut y avoir formation de structures secondaires nuisant à la réaction de PCR. La réaction est effectuée sur l'appareil Genius (Techne). L'ADN est dénaturé par un chauffage à 95 °C pendant 5 minutes, puis l'appariement des oligonucléotides sur la matrice s'effectue à 55 °C pendant 5 minutes. La synthèse d'un brin complémentaire s'effectue ensuite pendant 3 minutes à 72 °C. Ces trois réactions sont répétées à 30 reprises (dénaturation 1 minute 94 °C, appariement 1 minute 55 °C, synthèse 3 minutes 72 °C).

### 5.0 Transformation des cellules.

#### 5.1 Transformation de *E.coli*.

Les cellules d'*E. coli* sont d'abord rendues compétentes par un traitement au CaCl<sub>2</sub> (Mandel et Higa 1970). A partir d'une culture des cellules en phase exponentielle dans le milieu 2x TY, on récupère les cellules par centrifugation 5 minutes à 5 K rpm. Les cellules sont ensuite suspendues dans 50 ml de MgCl<sub>2</sub> 100 mM puis récupérées par centrifugation. Les cellules sont ensuite délicatement suspendues à nouveau dans 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. On ajoute ensuite 100 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM puis les cellules sont incubées sur la glace pendant 30 minutes. Après le temps d'attente, le mélange est centrifugé, puis les cellules sont récupérées. Les cellules sont suspendues dans 12,5 ml d'un mélange de CaCl<sub>2</sub> 85 mM et de glycérol 15%. Des aliquots de 500 µl sont ensuite congelés dans un mélange de glace sèche et d'éthanol 95% et conservés à -70 °C.

Pour la transformation des cellules, les cellules compétentes sont lentement dégelées sur la glace. Dans un tube Falcon de 15 ml, 100 µl de cellules sont mélangées à l'ADN (0,1 µg d'ADN pure, 10 µl de mélange de ligation). Le tube est ensuite laissé sur la glace pour 30 minutes. Les cellules sont ensuite exposées à un choc thermique en les incubant dans un bain-marie à 42 °C pendant 2 minutes. Suite à l'incubation, 400 µl de milieu 2x TY sont ajoutés et le mélange est incubé à 37 °C pendant une heure. 125 µl de mélange est finalement étalé sur 4 Pétris contenant du milieu solide 2x TY avec ampicilline et incubés 16 heures à 37 °C. Les colonies qui poussent contiennent le plasmide qui confère la résistance à l'antibiotique.

## **5.2 Transformation de *S. lividans*.**

Les manipulations génétiques chez les streptomycètes sont décrites par Hopwood *et al.* (1985). Pour pouvoir transformer des streptomycètes, il faut produire des protoplastes qui sont des cellules dépourvues de leur paroi cellulaire. Afin de préparer les protoplastes, les streptomycètes sont cultivés dans un milieu R-5 qui fragilise la paroi cellulaire, facilitant la digestion ultérieure de celle-ci par du lysozyme. La transformation des protoplastes a été faite en mettant en contact 50 µl de protoplastes à  $1 \times 10^{10}$  cellules/ml avec le mélange de ligation ou avec le plasmide en présence de 200 µl de PEG 25% . Le mélange est incubé 2 minutes à la température de la pièce, puis les protoplastes sont étalés sur du milieu R-5 solide pour permettre leur régénération. Les Pétris sont incubés 16 heures à 30 °C, puis recouverts de 1 ml de thiostrepton à 200 µg/ml et incubés à nouveau à 30 °C pour la sélection des transformants.

## **5.3 Préparation des spores de *S. lividans*.**

Les transformants sélectionnés sont étalés sur un milieu Bennett-thiostrepton (BT) solide et incubés à 30 °C durant sept jours. Ensuite le mycélium est gratté puis étalé sur deux Pétris de milieu BT solide qui sont incubés à 30 °C durant sept jours. Le mycélium est ensuite gratté à son tour et étalé sur neuf Pétris de milieu BT solide qui sont incubés à 30 °C pendant sept jours. Finalement, les spores sont récoltées en ajoutant 10 ml de glycérol 20%

stérile sur un premier pétri . Les spores sont grattées avec le bout d'une pipette. Le liquide est ensuite récolté et transféré sur un second pétri. 10 ml de glycérol peut servir pour la récolte des spores de trois pétris. Le liquide est ensuite transféré dans un tube contenant des billes de verre stériles. Le tube est ensuite vigoureusement tourbillonné 2 minutes afin de séparer les spores du mycélium. La suspension est filtrée sur laine de verre pour éliminer le mycélium et les débris cellulaires. La quantité de spores est ensuite évaluée par mesure de la densité optique à 660 nm. Les spores sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **6.0 Manipulation des protéines.**

### **6.1 Dosage de l'activité enzymatique.**

La méthode des sucres réducteurs (Miller, 1959) a été utilisée pour la mesure de l'activité enzymatique produite par les clones produisant de la xylanase A ou de la cellulase B. Pour commencer, 1 ml de culture est centrifugée à 13 K rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est récolté. 0,1 ml du surnageant (tel quel ou dilué) est ensuite incubé 10 minutes dans une solution de 0,5 ml de xylane de bouleau 1% (activité xylanolytique) ou de CMC 1% (activité cellulolique) en présence de 0,1 ml de tampon citrate-phosphate 0,05 M, pH 6,0, à une température de  $60^{\circ}\text{C}$ . Une série de tubes témoins sans surnageant est aussi incubée. Suite à l'incubation, on mélange 100  $\mu\text{l}$  d'une solution filtrée sur papier Whatman d'acide dinitrosalicylique (DNS) (10 g NaOH, 10 g acide dinitrosalicylique, 2 g phénol, 200 g sodium potassium tartrate, dans un volume de 1 L d' $\text{H}_2\text{O}$ ) à 0,5 ml de bisulfite de sodium (10 g dans 100 ml d' $\text{H}_2\text{O}$ ) et on ajoute 1 ml du mélange dans tous les tubes (échantillons, témoins et courbe standard) pour l'arrêt de la réaction. On ajoute ensuite 0,1 ml de surnageant de culture (tel quel ou dilué) dans les tubes témoins. Un chauffage à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes permet le développement d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs libérés par l'activité de l'enzyme sur le xylane de bouleau ou le CMC. En utilisant une courbe standard de xylose ou de glucose, une lecture de la densité optique (DO) à 540 nm (DO échantillon – DO témoin) permet de déterminer l'équivalence en  $\mu\text{moles}$ . Une unité internationale (UI) est définie comme étant la quantité d'enzymes qui libère 1  $\mu\text{mole}$  d'équivalent par minute dans ces conditions.

## 6.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

La séparation des protéines selon leur poids moléculaire est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Pour commencer, 1 ml de culture est centrifugé à 13 K rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est récolté. 20  $\mu$ L d'échantillon est mélangé à 10  $\mu$ L de tampon de chargement (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0,1% bleu de bromophénol, 10% glycérol) puis bouilli 5 minutes à 100 °C. Le mélange est ensuite appliqué sur un mini-gel à la concentration d'acrylamide désirée comprenant un gel de regroupement 4% (tableau III). La migration est effectuée à 90 Volt pendant 10 minutes puis à 200 Volt pendant environ 45 minutes (la migration est arrêtée 15 minutes après que le bleu de bromophénol ait migré hors du gel) dans 500 ml de tampon Tris-glycine (25 mM Tris, 250 mM glycine, pH 8,3, 0,1% SDS). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 dans 90 ml méthanol:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), 10 ml acide acétique glacial) pendant 30 minutes puis lavé dans une solution décolorante (40% méthanol, 10% acide acétique) pendant 2 heures. Les protéines présentes sur le gel conservent la coloration bleue.

## 6.3 Zymographie.

La zymographie est une technique qui permet de révéler l'activité enzymatique d'une protéine sur gel de polyacrylamide après électrophorèse. La MMP9 est une protéase qui dégrade la gélatine, donc lors de la préparation du gel à la concentration d'acrylamide de 8%, 0,1% de gélatine est ajoutée au mélange. Les échantillons sont chargés sans être bouillis dans le tampon Laemmli (1:1 v/v) puis la migration s'effectue telle que décrite auparavant. Suite à la migration, les protéines sont renaturées pendant 2 heures avec un changement de tampon au bout d'une heure, avec agitation, dans le tampon de renaturation (50 mM Tris, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 2,5% Triton X-100) et incubées 16 heures à 37 °C dans le tampon de digestion (50 mM Tris, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 1% Triton X-100). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie pendant 1 heure, puis placé dans la solution décolorante jusqu'à l'apparition d'une zone blanche, témoin de la dégradation du substrat par l'enzyme.

Tableau III : Préparation des gels pour SDS-PAGE.

	Gel de séparation 8% (ml)*	Gel de séparation 12% (ml)*	Gel de séparation 15% (ml)*	Gel de regroupement 4% (ml)**
Acrylamide/bis (30% T, 2,67% C)	2,67	4	5	0,325
Eau distillée	4,675	3,345	2,345	1,51
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5	-
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	-	-	-	0,625
SDS 10%	0,1	0,1	0,1	0,025
Ammonium persulfate 10%	0,05	0,05	0,05	0,0125
TEMED <sup>1</sup>	0,005	0,005	0,005	0,0025
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>2,5</b>

\* Appliquer 3,6 ml

\*\* Appliquer 1 ml

#### 6.4 Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose (Western blotting).

Cette méthode consiste au transfert de protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose par l'action d'un courant électrique en milieu semi-liquide. Le transfert est effectué sur l'appareil Multiphor II Novablot Unit (Pharmacia). Le gel à transférer est déposé sur une membrane de nitrocellulose entre deux couches de papier filtre. La membrane et les filtres sont préalablement trempés dans la solution Continuous buffer system (39 mM glycine, 48 mM Tris, 0,0375 % sodium dodécyl sulphate, 20 % méthanol, dans 1 litre d'eau) puis insérés entre les deux plaques de graphite de l'appareil. Le transfert s'effectue pendant 1 heure à 0,8 mAmpère/cm<sup>2</sup> de la membrane. Une fois le transfert terminé, la membrane de nitrocellulose est séchée à l'air.

## 6.5 Immunodétection des protéines.

Pour la détection de protéines à l'aide d'anticorps, une immunodétection peut être effectuée sur les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose. Suite à trois lavages de la membrane de nitrocellulose dans la solution TBS (7,9 g Tris, 8,8 g NaCl par litre d'eau, pH 7,5), on incube la membrane 30 minutes dans la solution de blocage 5 % (2 g de lait écrémé en poudre, 40 ml de solution TBS). La membrane est ensuite incubée 16 heures à 4 °C dans la solution d'anticorps primaires (2 ml solution de blocage 5 %, 8 ml solution TBS, concentration nécessaire d'anticorps primaires spécifiques à la protéine à détecter). La membrane est ensuite rincée par 8 lavages dans le tampon TBS, et incubée 30 minutes dans la solution d'anticorps secondaires (2 ml solution de blocage 5 %, 8 ml solution TBS, concentration nécessaire d'anticorps secondaires anti-IgG de lapin ou de souris). La membrane est ensuite rincée par 8 lavages dans la solution TBS, puis incubée dans la solution de révélation Lumilight (Roche) pendant 5 minutes. La membrane est finalement exposée avec un écran intensifiant Biomax TransScreen-LE (Kodak) sur un film, Kodak Scientific Imaging Film (Eastman Kodak Company). La durée d'exposition est de 1 minute, et peut être raccourcie ou prolongée suite au résultat obtenu lors de la première exposition.

## 6.6 Purification de protéines sur colonne de nickel.

Pour la purification des protéines auxquelles on a ajouté une queue d'histidines, les échantillons sont passés à travers une colonne de nickel His Trap (Pharmacia Biotech). Pour commencer, les échantillons de surnageant de culture sont centrifugés à 13 K rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est récolté. Les différents échantillons sont ensuite filtrés sur un filtre Millex-GP 0,22 µm (Millipore). La colonne est d'abord équilibrée à l'aide de 10 ml de tampon de départ (3 ml tampon phosphate 8x [1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1,11 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 23,38 g NaCl], 0,12 ml de 2M Imidazole, dans un volume total de 24 ml, pH 7,4), puis l'échantillon est passé dans la colonne à l'aide d'une seringue à une vitesse de 1 à 4 ml par minute. Suite à un lavage à l'aide de 10 ml de tampon de départ, les protéines liées sont séparées de la colonne avec 5 ml de tampon d'élution (1 ml de tampon phosphate 8x, 2 ml de 2M Imidazole, dans un volume total de 8 ml). Cinq fractions de 1 ml chacune sont récupérées. Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE.

## **Résultats et Discussion**

## 1.0 Construction de vecteurs navettes.

Étant donné l'efficacité du système de sécrétion des streptomycètes, ces micro-organismes sont maintenant considérés comme des hôtes potentiels pour la production de protéines recombinantes. Mais bien que des efforts aient été mis en œuvre pour l'amélioration des techniques de manipulations génétiques, ces bactéries présentent certains inconvénients lors de leur utilisation pour la construction de vecteurs et l'insertion d'ADN. Premièrement, de nombreuses souches de streptomycètes possèdent un système de restriction/modification très efficace qui empêche leur transformation par de l'ADN étranger. Il semble cependant que *S. lividans* en soit dépourvu. Deuxièmement, le temps de croissance sur milieu solide de ces bactéries est de 5 à 7 jours, augmentant ainsi le temps d'attente lors des constructions. Finalement, la récupération de plasmides est ardue et la pureté des échantillons laisse parfois à désirer. Ainsi, dans la plupart des études effectuées jusqu'à maintenant, les manipulations génétiques se font chez *E. coli* d'abord et les constructions finales sont ensuite transférées chez les streptomycètes. En effet, *E. coli* possède comme avantage d'être facilement transformable et, de grandes quantités de plasmide hautement purifié peuvent en être rapidement et efficacement extraites. La construction de vecteurs navettes *S. lividans/E. coli* a été effectuée pour le clonage de gènes homologues et hétérologues chez *E. coli* et leur expression chez *S. lividans*.

### 1.1 Construction des plasmides pDOT1, pDOT2, pDOT3, pDOT4 et pDOT5.

Les différentes constructions de vecteurs ont été effectuées à partir du plasmide pC209 (8093 paires de bases; voir appendice A, page 107), un vecteur navette *E. coli/ S. lividans*. Ce plasmide est dérivé de la fusion de la région essentielle à la répllication chez les streptomycètes, du plasmide pIJ702 et du plasmide pTZ19 (Mead *et al.*, 1986). Le plasmide pTZ19 se réplique chez *E. coli* et porte le gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection. Pour la sélection des transformants chez *S. lividans*, le plasmide possède le gène de résistance au thiostrepton du plasmide pIJ702. La première modification apportée sur le vecteur pC209 a été l'élimination des sites *KpnI*, *PstI*, *SacI* et *EcoRI* présents dans le

vecteur (figure 1). Cette étape permet l'insertion d'une cassette de clonage synthétique possédant les sites uniques de restriction *XbaI*, *SphI*, *SacI*, *EcoRI*, *BglII*, *HindIII* et *KpnI*. Cependant, certains sites uniques ont été volontairement laissés dans le vecteur. C'est le cas notamment, du site *BamHI* qui est inclus dans le gène *rep*, essentiel à la présence du plasmide comme réplicon extrachromosomal (Kendall et Cohen, 1988) de *S. lividans*. De plus, les sites *HindIII* et *SphI*, étant nécessaires à l'insertion des composantes de sécrétion du vecteur et ont, eux aussi, été conservés dans le plasmide et seront éliminés plus tard au cours des constructions.

Au départ, le plasmide pDOT1 (8097 paires de bases) a été construit par l'élimination du site *KpnI* du plasmide pC209. Le plasmide a d'abord été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *KpnI*, puis traité à la Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches. Suite à la recircularisation du vecteur, des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec les plasmides résultants. Pour la vérification du plasmide, une double digestion, avec les enzymes de restriction *KpnI* et *SacI*, a permis de linéariser le vecteur ayant perdu le site *KpnI* et d'identifier les clones positifs.

En parallèle, le plasmide pDOT2 (8096 paires de bases) a été construit par l'élimination du site *PstI* du plasmide pC209. Le plasmide pC209 a d'abord été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *PstI*, traité à la Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches puis recircularisé. Des cellules d'*E. coli* ont ensuite été transformées avec les plasmides résultants. Une double digestion avec les enzymes de restriction *PstI* et *SacI* a permis d'identifier les clones positifs possédant le vecteur linéarisé.

Les sites *KpnI* et *PstI* sont situés dans une région de 500 paires de bases qui semble essentielle à la stabilité des plasmides dérivés de pIJ101. En effet, des délétions dans la région concernée peuvent mener à la perte de plus de 55% du plasmide, après un cycle de croissance sur un milieu de culture sans sélection (Kieser *et al.*, 1982). Cependant, aucun ORF (pour open reading frame) qui possède les caractéristiques attribuées aux streptomycètes n'a été détecté dans cette région (Kendall et Cohen, 1988). Pour vérifier l'effet de la délétion de ces sites sur le taux de transformation, la souche 10-164 de *S. lividans* a été transformée avec une quantité égale des plasmides pDOT1, pDOT2 et pIJ702.

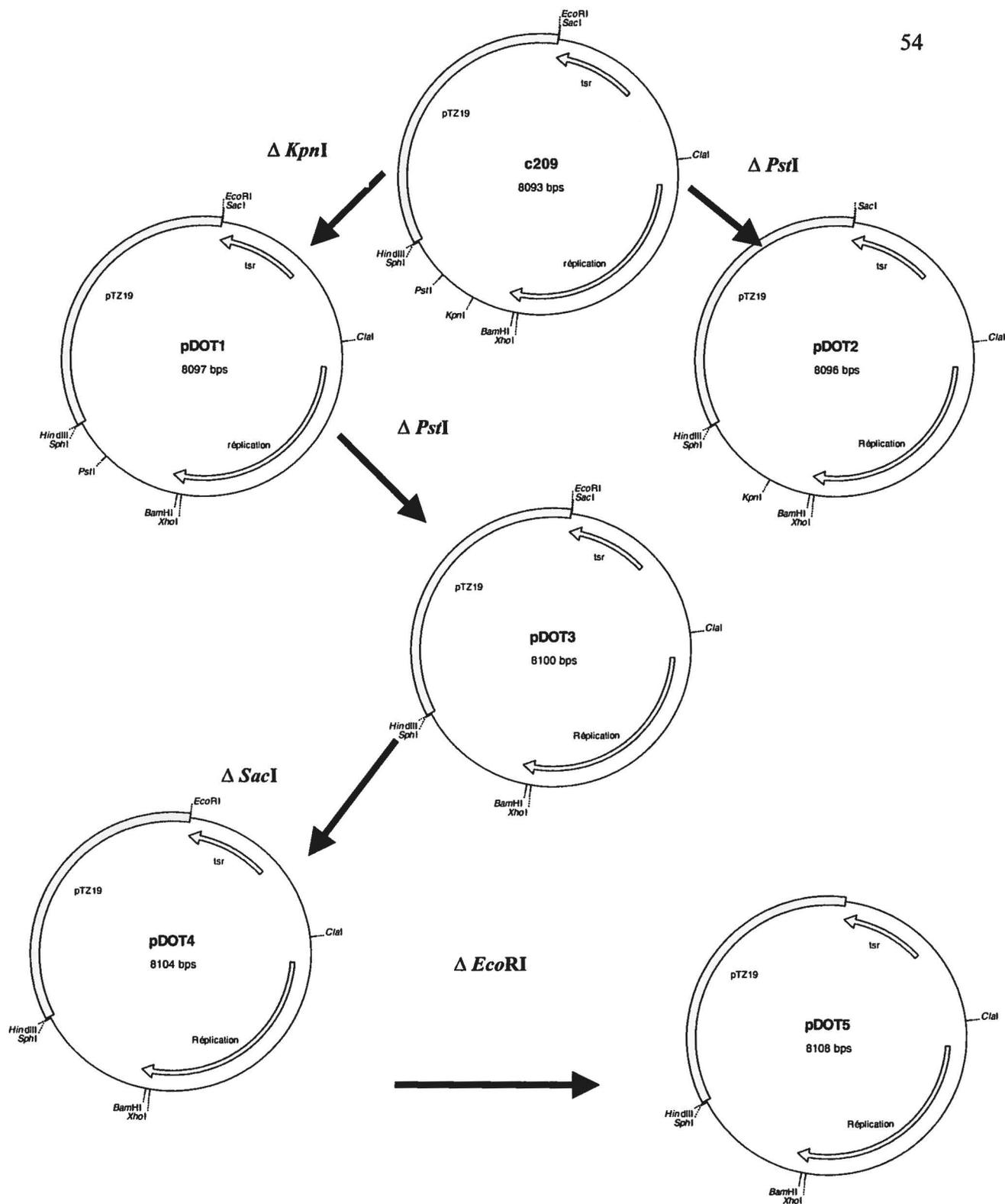


Figure 2 : Élimination des sites uniques de restriction du vecteur navette pC209 pour l'introduction d'une cassette de clonage contenant plusieurs sites de restriction.

Le taux de transformation obtenu à l'aide des différents vecteurs était sensiblement le même, soit environ  $10^6$  transformants/ $\mu\text{g}$  d'ADN. Il est permis d'affirmer que l'absence des sites *KpnI* et *PstI* n'influence pas le taux de transformation de *S. lividans* sur milieu R5, en présence de thiostrepton.

La construction d'un vecteur ne possédant plus les sites *PstI* et *KpnI* a ensuite été effectuée. L'élimination du site *PstI* par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction appropriée et de traitement à la Klenow polymérase du vecteur pDOT1 ont permis la formation du vecteur pDOT3 (8100 paires de bases). Suite à la recircularisation du vecteur, des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec les plasmides résultants. Pour la vérification des plasmides, une double digestion avec les enzymes de restriction *PstI* et *SacI* a permis de linéariser les vecteurs et d'identifier les clones positifs.

Les sites *SacI* et *EcoRI* du vecteur pDOT3 ont ensuite été éliminés par une série de digestions à l'aide des enzymes de restriction appropriés et de traitement à la Klenow polymérase pour la formation des vecteurs pDOT4 (8104 paires de bases) et pDOT5 (8108 paires de bases). Ces deux sites sont situés dans une région non-essentielle du vecteur, soit la cassette de clonage du vecteur pTZ19. Des cellules d'*E. coli* ont ensuite été transformées avec les vecteurs recircularisés. Le vecteur pDOT4 a été vérifié par une double digestion avec les enzymes de restriction *SacI* et *HindIII*. Dans le cas du vecteur pDOT5, une double digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI* a été utilisée pour la vérification du plasmide. La linéarisation des vecteurs a permis d'identifier les clones positifs.

## **1.2 Construction des plasmides pDOT6 et pDOT7.**

Pour l'obtention d'un vecteur d'expression/sécrétion de *S. lividans*, les différentes composantes, permettant l'expression des gènes et la sécrétion de protéines homologues et hétérologues, devaient être insérées dans le vecteur pDOT5 (figure 2). Ces éléments sont le promoteur de la xylanase A et le peptide signal long muté de la cellulase A. Le peptide signal possède deux codons d'initiation de la traduction ATG qui peuvent être utilisés conjointement par *S. lividans* pour la production de protéines (Pagé *et al.*, 1996). De plus, il possède une «downstream box» constituée d'une séquence de 8 nucléotides complémentaires

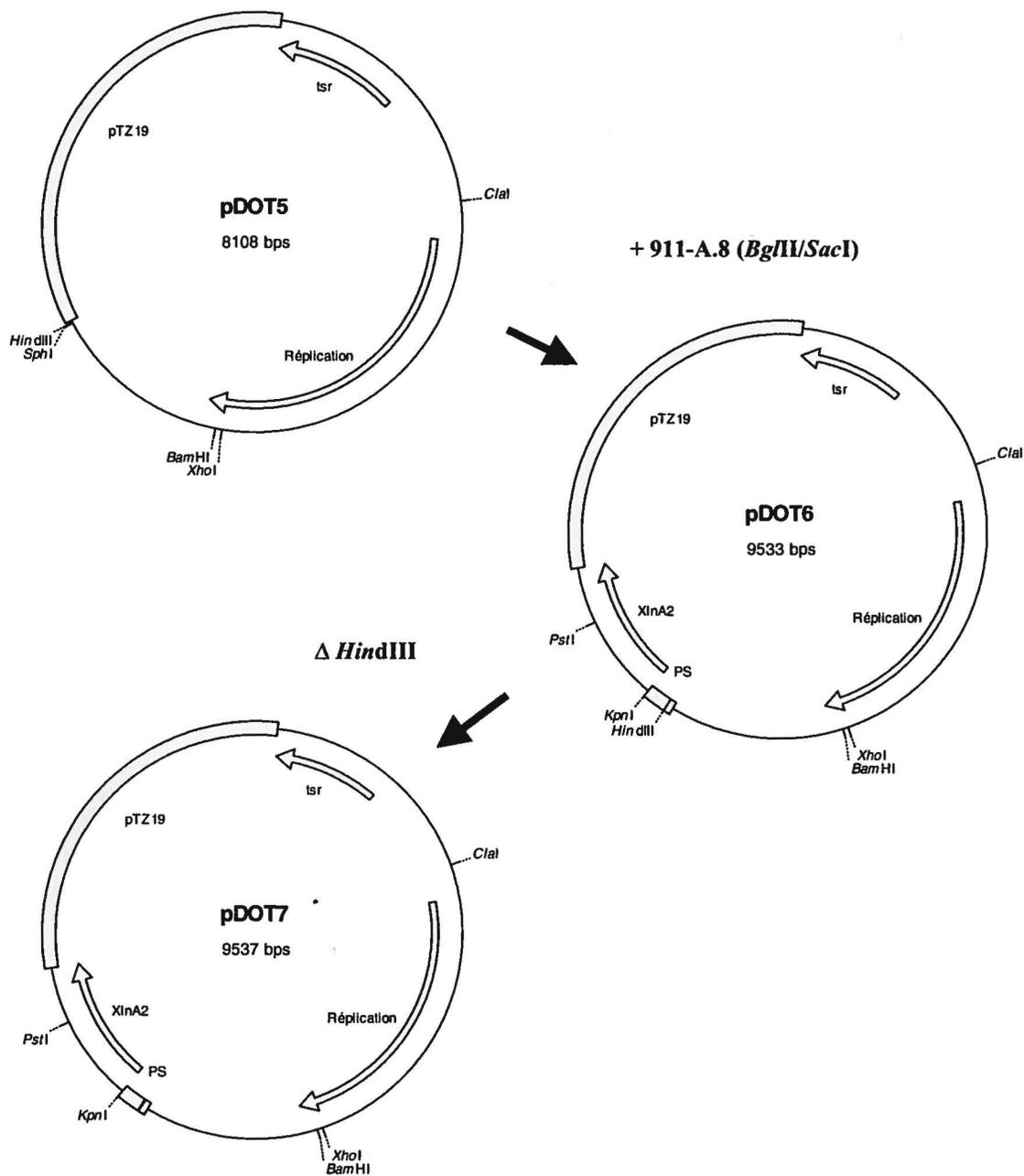


Figure 3 : Insertion du promoteur et du peptide signal dans le vecteur navette pour l'expression et la sécrétion de protéines homologues et hétérologues.

à l'ARN 16S ribosomal, qui mène à l'augmentation de la traduction chez *S. lividans* (Kébir *et al.*, 2000). Finalement, le fragment inséré possède un site *HindIII*, en amont du peptide signal, qui devait être éliminé puisque ce site de restriction figure dans la cassette de clonage.

Le plasmide pDOT6 (9533 paires de bases) a été construit par l'insertion du fragment *SacI/BglIII* (1412 paires de bases) du vecteur pIAF911-A.8 (Kébir *et al.*, 2000; voir appendice A, page 109) aux sites *HindIII/SphI* du vecteur pDOT5. Le fragment inséré contient le promoteur de la xylanase A, le peptide signal long de la cellulase A modifié et le gène de la xylanase A duquel a été éliminé le domaine de fixation au xylane (xylanase A2). Suite à la digestion du vecteur pDOT5 à l'aide des enzymes de restriction *HindIII/SphI*, ce dernier a été traité à la Klenow polymérase puis déphosphorylé pour éviter sa recircularisation. Le fragment de 1412 paires de bases venant de pIAF911-A.8 a été digéré à l'aide des enzymes de restriction *SacI/BglIII*, récupéré sur gel d'agarose et traité à la Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches. Des cellules d'*E. coli* ont ensuite été transformées avec le produit de ligation des fragments. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une double digestion avec les enzymes de restriction *PstI* incluse dans l'insert et *BamHI* incluse dans le vecteur, a permis d'identifier un clone positif possédant le fragment attendu de 2191 paires de bases. En effet, cette digestion permet de confirmer l'insertion du fragment dans l'orientation désirée. Le site *HindIII*, présent en amont du peptide signal du fragment de 1412 paires de bases introduit dans le vecteur pDOT5, figure dans la cassette de clonage synthétique. Pour cette raison, le plasmide pDOT7 (9537 paires de bases) a été construit par l'élimination de ce site du plasmide pDOT6. Le plasmide a d'abord été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *HindIII*, puis traité à la Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches. Suite à la recircularisation du vecteur, des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec les plasmides résultants. Une double digestion avec les enzymes de restriction *HindIII* et *PstI* a permis l'identification des clones positifs. La linéarisation des vecteurs indiquait la perte du site *HindIII*.

### **1.3 Construction des plasmides pDOT8, pDOT9 et pDOT10.**

Dans la plupart des vecteurs dérivés de pIJ101 (voir appendice A, page 102)

construits jusqu'à maintenant, le site primaire d'initiation du double-brin (*ssi*) a été perdu. Originellement, ce site se situe dans une région non-codante du vecteur pIJ101 appelée Sti, à environ 1200 paires de bases en aval du gène de la réplicase et dans la même orientation. Une conséquence de la perte de *ssi* est l'accumulation d'une grande quantité d'ADN simple brin (ssDNA) dans la cellule. Le haut taux de recombinaison génétique de cet ssDNA expliquerait le haut niveau d'instabilité de la structure (Dyson et Evans, 1996). Pour vérifier l'effet de l'accumulation de ssDNA sur la production de protéine, le fragment Sti de 671 paires de bases du vecteur pIJ2745 (voir appendice A, page 108), contenant le site primaire d'initiation de l'ADN double brin (Deng *et al.*, 1988), a été inséré dans le vecteur pDOT5 (figure 3). Pour être efficace, ce fragment doit être dans la même orientation que dans le vecteur original pIJ101. De plus, dans le vecteur pIJ2745, la présence du fragment Sti serait responsable de la présence du plasmide en un plus grand nombre de copies (1000 copies), lorsqu'il est comparé à d'autres vecteurs dérivés de pIJ101 (300 copies) (Deng *et al.*, 1988).

Le plasmide pDOT8 (9663 paires de bases) a été construit par l'insertion du fragment Sti *PstI/KpnI* (671 paires de bases) du vecteur pIJ2745 aux sites *HindIII/SphI* du vecteur pDOT5. Suite à la digestion du vecteur pDOT5 à l'aide des enzymes de restriction *HindIII/SphI*, ce dernier a été traité à la Klenow polymérase puis déphosphorylé pour éviter sa recircularisation. Le fragment venant de pIJ2745 a été digéré à l'aide des enzymes de restriction *PstI/KpnI*, récupéré sur gel d'agarose et traité à la Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches. Des cellules d'*E. coli* ont ensuite été transformées avec le produit de ligation des fragments. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une double digestion avec les enzymes de restriction *XbaI* incluse dans l'insert et *BamHI* incluse dans le vecteur, libérant un fragment de 1161 paires de bases, a permis d'identifier un clone positif possédant l'insertion dans le sens désiré.

Les différents éléments, permettant l'expression des gènes clonés et la sécrétion des produits des gènes, ont ensuite été introduits dans le vecteur (figure 3). Le plasmide pDOT9 (10211 paires de bases) a été construit par l'insertion du fragment *SacI/BglII* du vecteur pIAF911-A.8 (voir appendice A, page 109) au site *XbaI* du vecteur pDOT8. Suite à la digestion du vecteur pDOT8 à l'aide de l'enzyme de restriction *XbaI*, ce dernier a été traité à la Klenow polymérase puis déphosphorylé. Le fragment venant de pIAF911-A.8 a été digéré à l'aide des enzymes de restriction *SacI/BglII*, récupéré sur gel d'agarose et traité à la

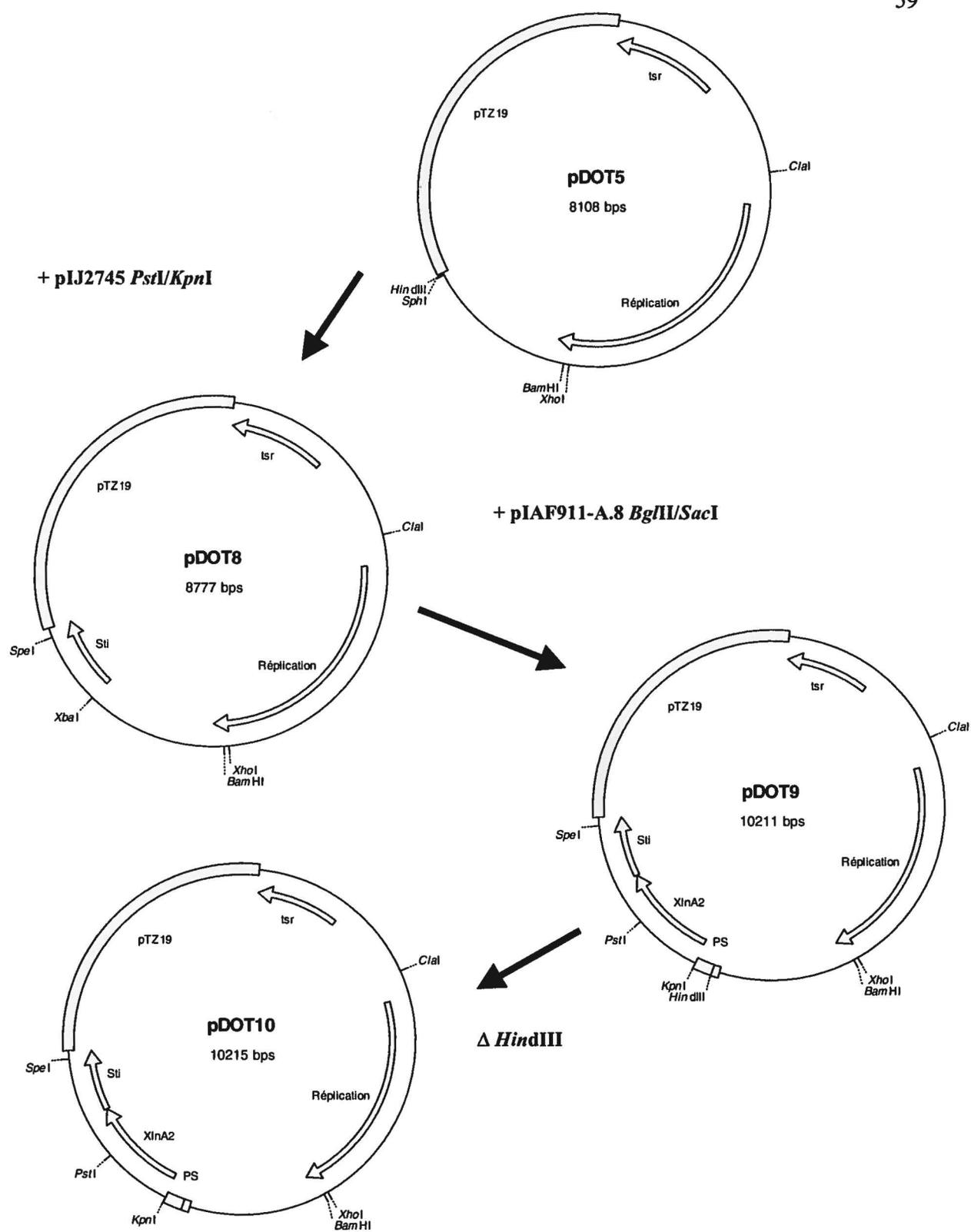


Figure 4 : Insertion dans le vecteur navette du fragment *StuI* pour l'initiation du double brin.

Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches. Des cellules d'*E. coli* ont ensuite été transformées avec le produit de ligation des fragments. Une double digestion à l'aide des enzymes de restriction *Pst*I inclus dans l'insert et *Bam*HI inclus dans le vecteur devait isoler un fragment de 2191 paires de bases, identifiant les clones positifs possédant l'insertion dans le sens désiré.

Un dernier site de restriction devait être éliminé du vecteur puisqu'il figure dans la cassette de clonage, soit le site *Hind*III en amont du peptide signal de la cellulase A. Le plasmide pDOT9 a d'abord été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *Hind*III, puis traité à la Klenow polymérase pour la formation d'extrémités franches. Suite à la recircularisation des vecteurs, des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec les plasmides résultants. Le plasmide pDOT10 a été linéarisé par une double digestion avec les enzymes de restriction *Hind*III et *Pst*I.

#### **1.4 Construction des plasmides pDOT31 pDOT32 et pDOT33.**

Le vecteur pDOT10 peut maintenant être utilisé pour la construction de vecteurs navettes permettant l'essai de production de protéines homologues et hétérologues. En effet, ce vecteur possède le fragment *Sti* pour l'initiation de l'ADN double brins, le promoteur de la xylanase A et le peptide signal modifié de la cellulase A. De plus, il possède les sites *Kpn*I et *Pst*I qui seront utilisés pour l'insertion d'une cassette de clonage dans le vecteur. Cette dernière, synthétisée avec des extrémités cohésives (figure 4), peut être insérée dans le vecteur digéré, en aval du peptide signal. Deux méthodes de récupération rapide des protéines produites ont aussi été envisagées soit, une queue de six histidines (permettant la récupération des protéines sur une colonne de nickel) et un domaine de fixation à la cellulose (permettant la récupération des protéines sur une colonne de cellulose) (figure 5).

Deux nouveaux vecteurs, pDOT31 (9627 paires de bases) et pDOT32 (9630 paires de bases) ont été construits par l'insertion d'une cassette de clonage et d'une queue de six histidines aux sites *Kpn*I et *Pst*I du vecteur pDOT10. Les oligonucléotides synthétisés formant la cassette de clonage ont été chauffés à 100 °C pendant 10 minutes et refroidis graduellement à la température de la pièce pour permettre leur hybridation. Après la digestion du vecteur pDOT10 par les enzymes de restriction appropriées,

His tag en amont, vecteur pDOT31 :

*KpnI*            His Tag                    *HindIII*    *BglII*    *EcoRI*    *XbaI*    *SacI*    *SphI*    *PstI*

C CATCACCATCACCATCAC AAGCTT AGATCT GAATTC TCTAGA GAGCTC GCATGC CTGCA  
CATG GTAGTGGTAGTGGTAGTG TTCGAA TCTAGA CTTAAG AGATCT CTCGAG CGTACG G

His tag en aval, vecteur pDOT32:

*KpnI*    *HindIII*    *BglII*    *EcoRI*    *SacI*    *SphI*    *XbaI*                    His Tag                    Stop    *PstI*

C AAGCTT AGATCT GAATTC GAGCTC GCATGC TCTAGA CATCACCATCACCATCAC TGA CTGCA  
CATG TTCGAA TCTAGA CTTAAG CTCGAG CGTACG AGATCT GTAGTGGTAGTGGTAGTG ACT G

Figure 5 : Construction des cassettes de clonage des vecteurs d'expression et de sécrétion de *S. lividans*.

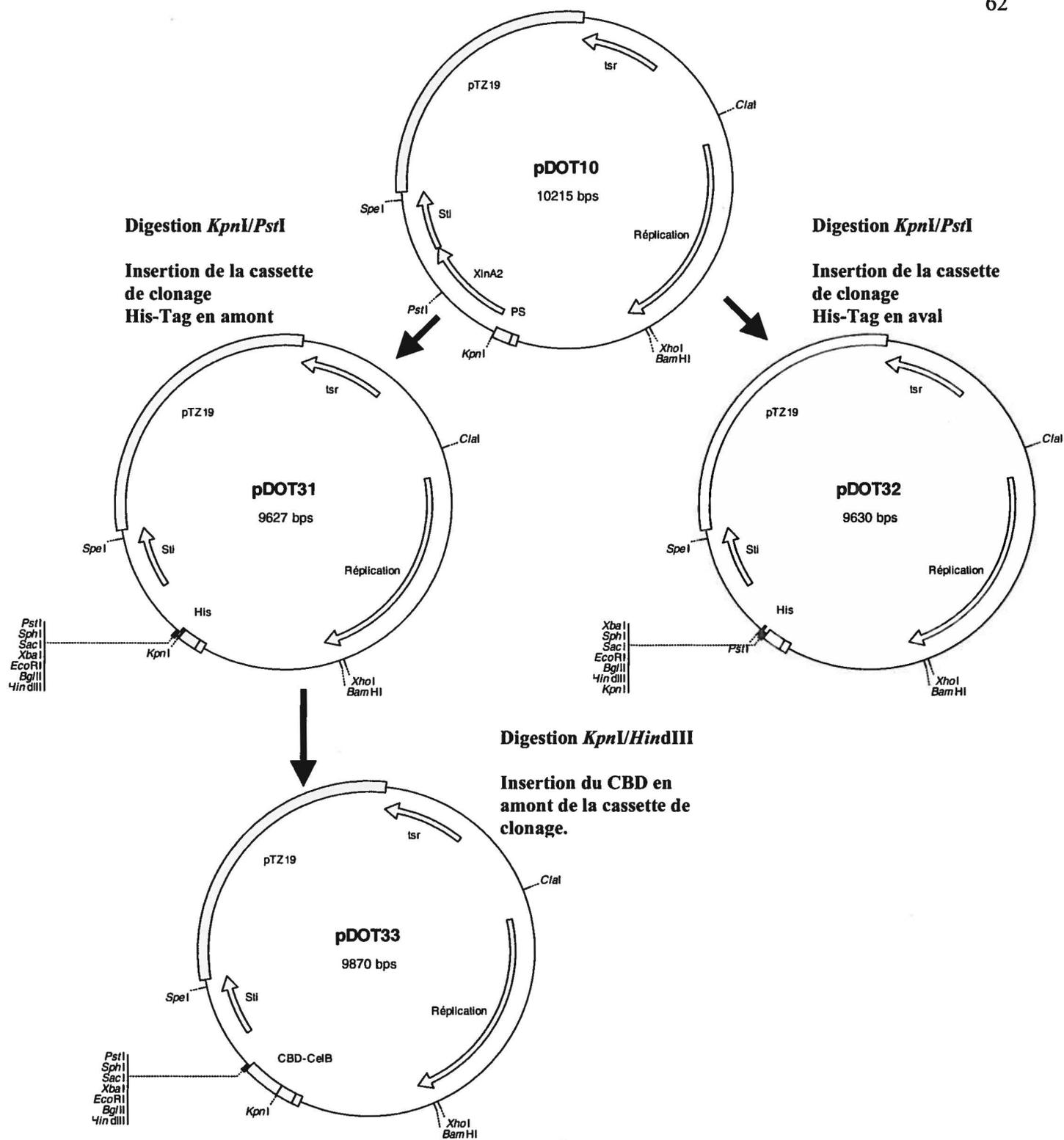


Figure 6 : Insertion des cassettes de clonage des vecteurs navettes d'expression et de une sécrétion de *S. lividans*.

des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec le produit de ligation. Les vecteurs obtenus sont pDOT31, avec queue de six histidines en amont de la cassette de clonage et pDOT32 avec une queue de six histidines en aval de la cassette de clonage. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une double digestion avec les enzymes de restriction *Bam*HI du vecteur et *Eco*RI de la cassette a permis de libérer des fragments de 1579 (pDOT31) et 1561 (pDOT32) paires de bases et d'identifier les clones positifs.

L'utilisation du domaine de fixation à la cellulose (CBD) dans le vecteur d'expression/sécrétion présente plusieurs avantages. Premièrement, elle permet la récupération rapide, peu coûteuse et efficace des protéines produites sur une colonne de cellulose (Shpigel *et al.*, 1998). Deuxièmement, étant donné que le CBD de la cellulase B de *S. lividans* possède une structure stable, l'interaction entre la protéine recombinante et le domaine peut avoir un effet stabilisateur sur les protéines hétérologues sécrétées dans le milieu de culture (Richins *et al.*, 2000). Finalement, la présence du CBD au N-terminal de la protéine produite peut empêcher la dégradation de la protéine par des enzymes protéolytiques produites par la souche. Ainsi, le vecteur pDOT33 (9870 paires de bases) a été construit par le remplacement de la queue de six histidines du vecteur pDOT31 aux sites *Kpn*I et *Hind*III par le domaine de fixation à la cellulose (CBD) du gène de la cellulase B. Suite à l'amplification par PCR du CBD du gène de la cellulase B, à l'aide d'oligonucléotides synthétisés, le fragment de 357 paires de bases et le vecteur pDOT31 ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction appropriées et les deux fragments ont été ligués. Des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec le produit de ligation et le plasmide, extrait des transformants, a été vérifié par une double digestion avec les enzymes de restriction *Kpn*I et *Hind*III libérant le fragment de 357 paires de bases.

### **1.5 Production de xylanase par les clones contenant les vecteurs navettes pDOT7 et pDOT10.**

Les différents vecteurs navettes construits jusqu'à maintenant devaient être testés pour leur capacité à produire une protéine témoin. Ainsi, la production de xylanase A des vecteurs navettes pDOT7 et pDOT10 qui possèdent déjà le gène en aval du peptide signal a été évaluée. La xylanase A de *S. lividans* est sécrétée par un mécanisme de sécrétion

similaire à la voie générale "Sec dépendante" d'*E. coli* caractérisée par la présence d'un peptide signal au N-terminal (Pugsley *et al.*, 1993). Plusieurs études effectuées sur l'amélioration des peptides signaux pour la sécrétion de protéines ont utilisé la xylanase comme modèle (Pagé *et al.*, 1996; Kébir *et al.*, 2000). Ainsi, la souche témoin de *S. lividans* transformée avec le plasmide pIAF911-A.8 produit une grande quantité de xylanase A (980 UI/ml) à la fin d'une période d'incubation de 144 heures. Si l'on considère l'activité spécifique de cette enzyme, qui est de 400 UI/mg, la quantité de protéines produites par le vecteur pIAF911-A.8 est de 2,45 g/l (Kébir *et al.*, 2000). Afin de comparer le potentiel de production des différents vecteurs navettes construits dans cette étude, l'activité de la xylanase a été mesurée après 144 heures de culture. À ce temps d'incubation, la xylanase est stable et les cultures ont atteint leur maximum de croissance.

La souche 10-164 de *S. lividans* a été transformée avec les vecteurs pDOT7 et pDOT10. La transformation des cellules avec l'un ou l'autre de ces plasmides n'a pas entraîné de différence significative dans le nombre de transformants. Les colonies de transformants ont été séparées en deux, une moitié mise en culture dans le milieu M-14 xylose et l'autre, étalée sur le milieu solide Bennett-thiostrepton pour la sporulation. Une fois récoltées,  $4 \times 10^7$  spores ont été mises en culture dans le milieu M-14 xylose. Des échantillons des différentes cultures ont été pris à 144 heures de culture. L'activité enzymatique a été mesurée par le test des sucres réducteurs (Miller, 1959) pour l'ensemble des expériences. Les résultats sont présentés au tableau IV.

Dans chacun des cas, la quantité de xylanase produite à partir d'un inoculum de spores contenant les différents vecteurs navettes est d'environ 100 fois moins que la production obtenue avec le vecteur témoin. Cependant, le vecteur témoin, pIAF911-A.8, n'est pas un vecteur navette et ne contient aucune séquence d'un vecteur d'*E. coli*. Par ailleurs, si l'on effectue la production à partir d'une colonie de transformants, sans passer par la sporulation, l'activité enzymatique de la xylanase produite par les vecteurs pDOT7, pDOT10 ne diminue que d'environ la moitié. Ces résultats indiquent que les vecteurs navettes subissent des changements lors du cycle de différenciation de *S. lividans*.

Tableau IV : Activité xylanasiqne produite par les clones de *S. lividans* contenant les divers vecteurs. Culture de 144 heures dans le milieu M14-xylose. Les cultures ont la même croissance qui a été mesurée par un test d'ADN (résultats non montrés). ND : non-déterminé.

Vecteurs	Activité xylanasiqne (UI/ml)	
	Colonies	Spores ( $4 \times 10^7$ )
<b>pIAF911-A.8</b>	ND	<b>928</b>
<b>pDOT7</b>	<b>401 ± 14</b>	<b>13 ± 2</b>
<b>pDOT10</b>	<b>369 ± 16</b>	<b>6 ± 1</b>

Dans le cas du vecteur pDOT10, l'ajout du site primaire d'initiation de l'ADN double brin (*ssi*) n'améliore pas la quantité de xylanase A produite par les colonies et les spores des vecteurs navettes. Ainsi, l'absence du fragment *Sti* dans les vecteurs construits n'est pas un facteur déterminant dans l'expression des gènes et la sécrétion de protéines par *S. lividans*. Ce résultat n'est pas surprenant, puisque le vecteur témoin pIAF911-A.8 ne possède pas ce fragment et produit tout de même plus de 2 g/L de xylanase (928 UI/ml).

### 1.6 Construction du vecteur pDOT 13.

À la suite des résultats obtenus pour la production de xylanase A à l'aide des vecteurs navettes pDOT7 et pDOT10, il est maintenant nécessaire de déterminer l'élément principal qui influence la chute de production lors de la différenciation des cellules. Un premier aspect des différents vecteurs navettes construits jusqu'à maintenant pourrait expliquer la chute de production. En effet, il a été démontré que l'élimination des sites *KpnI* et *PstI* n'avait aucun effet sur le taux de transformation des cellules de *S. lividans* même si il a été observé, que la région où sont situés ces sites influence la stabilité du plasmide (Kieser *et al.*, 1982). De ce principe, on peut donc se demander si l'instabilité des vecteurs se ferait plutôt sentir lors de la différenciation des cellules. Ainsi, pour tester l'effet de ces modifications sur la quantité de xylanase produite par les vecteurs navettes, les sites de restriction *PstI* et *KpnI* ont été réintroduits dans le vecteur navette pDOT9.

Le plasmide pDOT13 (10565 pbs) a été construit par l'insertion du fragment *Bam*HI/*Hind*III du vecteur pIAF906 (Pagé *et al.*, 1996; voir appendice A, page 105) aux sites *Bam*HI/*Hind*III du vecteur pDOT9. Cette étape permet la réinsertion des sites de restriction *Kpn*I et *Pst*I présents dans le vecteur pIAF906. Suite à la digestion du fragment et du vecteur par les enzymes de restriction appropriées, des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec le produit de ligation. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une double digestion des plasmides avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III, libérant un fragment de 1715 paires de bases, a été effectuée.

Pour vérifier le taux de production de la xylanase A par le vecteur pDOT13, la souche 10-164 de *S. lividans* a été transformée avec le vecteur navette et mise en culture. La transformation des cellules avec le plasmide n'a pas entraîné de différence significative dans le nombre de transformants. Les cellules ont été traitées tel que décrit auparavant pour la production de xylanase A à partir des colonies et des spores. L'activité enzymatique a été mesurée par le test des sucres réducteurs (Miller, 1959). Les résultats sont présentés au tableau V.

Le vecteur navette pDOT13, dans lequel les sites *Kpn*I et *Pst*I ont été réintroduits, ne montre aucune amélioration de la production de xylanase par les colonies ou les spores. En effet, les résultats sont comparables à ceux obtenus à l'aide des vecteurs navettes pDOT7 et pDOT10. Bien que les sites *Kpn*I et *Pst*I aient été identifiés comme étant essentiels à la stabilité du plasmide, ils ne semblent pas avoir une importance notable dans la production de xylanase.

### **1.7 Construction d'un vecteur navette pIAF911-A.8 et pUC19.**

Un second facteur des vecteurs navettes construits jusqu'à maintenant pourrait expliquer la chute de production lors de la différenciation des cellules. Au départ, le vecteur navette C209 a été construit par la fusion du vecteur de *S. lividans* pIJ702 et du vecteur pTZ19 de *E. coli*. Cependant, le vecteur pTZ19 possède la région intergénique (IG) du phage f1 qui permet la synthèse d'ADN simple brin, lorsque la cellule est infectée par le phage M13K07 (Mead *et al.*, 1986). Puisque les vecteurs dérivés de pIJ101, dont fait partie pIJ702, ont tendance à accumuler de l'ADN simple brin dans la cellule (Dyson et Evans, 1996), il se

peut que la présence d'un site d'initiation du simple brin influence la production de protéines chez *S. lividans*.

Pour tester cette hypothèse, un vecteur navette constitué des vecteurs pUC19 (2,69 Kbs; voir appendice A, page 104) et pIAF911-A.8 (7,6 Kbs) a été construit. Le vecteur pUC19 possède les mêmes caractéristiques que pTZ19, mais sans le site d'initiation du simple brin. Il se réplique chez *E. coli* et porte le gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection. Les deux vecteurs ont été digérés au site *SacI*, et suite à la déphosphorylation du vecteur pIAF911-A.8, les deux vecteurs ont été ligués. Des cellules d'*E. coli* ont été transformées avec le produit de ligation. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une digestion avec l'enzyme de restriction *SacI* a permis d'identifier les clones positifs possédant l'insertion du vecteur pUC19 de 2690 paires de bases qui était désirée.

Pour vérifier le taux de production de la xylanase A par le vecteur pIAF911-A.8 + pUC19, la souche 10-164 de *S. lividans* a été transformée avec le vecteur navette et mise en culture. La transformation des cellules avec le plasmide n'a pas entraîné de différence significative dans le nombre de transformants. Les cellules ont été traitées tel que décrit auparavant pour la production de xylanase A à partir des colonies et des spores. L'activité enzymatique a été mesurée par le test des sucres réducteurs (Miller, 1959). Les résultats sont présentés au tableau V.

La construction d'un vecteur navette pIAF911-A.8+ pUC19 donne une légère augmentation de la production en comparaison des autres vecteurs navettes. Il est à noter que ce vecteur ne possède pas l'origine de synthèse d'ADN simple brin du phage  $\phi$ 1 et qu'aucune modification n'a été effectuée sur les deux vecteurs initiaux. Cependant, par comparaison au vecteur pIAF911-A.8 seul, la diminution significative de l'activité enzymatique indique qu'un autre élément provenant de l'ADN d'*E. coli* est responsable de l'importante diminution de la production de protéines. Cet élément n'a pu être identifié par les tests qui ont été effectués.

Tableau V : Activité xylanasiqne produite par les clones de *S. lividans* contenant les divers vecteurs. Culture de 144 heures dans le milieu M14-xylose. Les cultures ont la même croissance qui a été mesurée par un test d'ADN (résultats non montrés). ND : non-déterminé.

Vecteurs	Activité xylanasiqne (UI/ml)	
	Colonies	Spores ( $4 \times 10^7$ )
PIAF911-A.8	ND	928
PDOT13	$321 \pm 10$	$6 \pm 1$
PIAF911-A.8 + pUC18	ND	$36 \pm 2$

### 1.8 Détermination du nombre de copies des différents vecteurs de l'étude.

Lors de l'extraction des différents plasmides des cellules mises en culture, aucune différence dans leur taille n'a été observée. Il est possible que de courtes délétions internes du plasmide aient pu se produire et créer ce changement dans l'activité. Il aurait donc fallu faire la séquence complète des vecteurs navettes pour les détecter. Une autre hypothèse expliquant la diminution de la production est que le nombre de copies du gène soit affecté. Ainsi, les vecteurs navettes seraient intacts mais présents en un nombre de copies inférieures au vecteur témoin. Le faible nombre de copies des vecteurs navettes aurait un impact direct sur la quantité de xylanase produite. Pour tester cette hypothèse, la détermination du nombre de copies des plasmides a été effectuée. Les résultats sont présentés au tableau VI.

Les résultats obtenus démontrent que le nombre de copies des plasmides navettes diminue fortement lors de la différenciation des cellules. La présence d'ADN étranger dans les différents vecteurs navettes provoquerait l'élimination des plasmides chez *S. lividans* par un mécanisme de restriction qui n'a pas encore été retrouvé chez cette bactérie.

Cependant, le nombre de copies du vecteur navette pIAF911-A.8 + pUC19 semble être conservé lors de la différenciation des cellules. Ce résultat concorde avec le fait que ce plasmide produit plus de xylanase en comparaison des autres vecteurs navettes. L'orientation

Tableau VI : Nombre de copies présentes dans les clones de *S. lividans* contenant les divers vecteurs. Culture de 48 heures dans le milieu TSB. Le nombre de copies a été déterminé à partir d'une migration de 1 µg d'ADN total par électrophorèse sur gel d'agarose.

Vecteur	Nombre de copies du plasmide/chromosome	
	Colonies	Spores
pIAF911-A.8	133	131
pDOT7	268	Traces
pDOT10	104	Traces
pDOT13	123	Traces
pIAF911-A.8 + pUC19	145	111

du plasmide pUC19 dans la construction, qui n'a pas été déterminée, aurait peut-être une influence sur le mécanisme de restriction. Finalement, d'autres éléments de l'ADN d'*E. coli* présents dans les vecteurs navettes auraient une influence sur la production. Ces éléments n'ont pu être déterminés par les tests qui ont été effectués.

## 2.0 Construction de vecteurs d'expression/sécrétion de *Streptomyces*.

### 2.1 Construction des plasmides pDOT41, pDOT42 et pDOT43.

Les différents tests effectués auparavant ont permis de déterminer qu'un vecteur navette *E. coli/S. lividans* ne permettait pas la production, en grande quantité, de xylanase. En effet, un élément inconnu de l'ADN plasmidique d'*E. coli* diminue le nombre de copies des vecteurs lors de la différenciation chez *S. lividans*. Ainsi, la construction de vecteurs se répliquant essentiellement chez *S. lividans* semble plus adéquate pour les essais de production de protéines homologues et hétérologues. Pour cette raison, les vecteurs pDOT41 (6139 paires de bases), pDOT42 (6142 paires de bases) et pDOT43 (6455 paires de bases) ont été construits (figure 6).

La construction de ces vecteurs, en une seule étape, a été effectuée par l'insertion du fragment *Bam*HI/*Pst*I des vecteurs pDOT31, pDOT32 et pDOT33 aux sites *Bam*HI/*Pst*I du

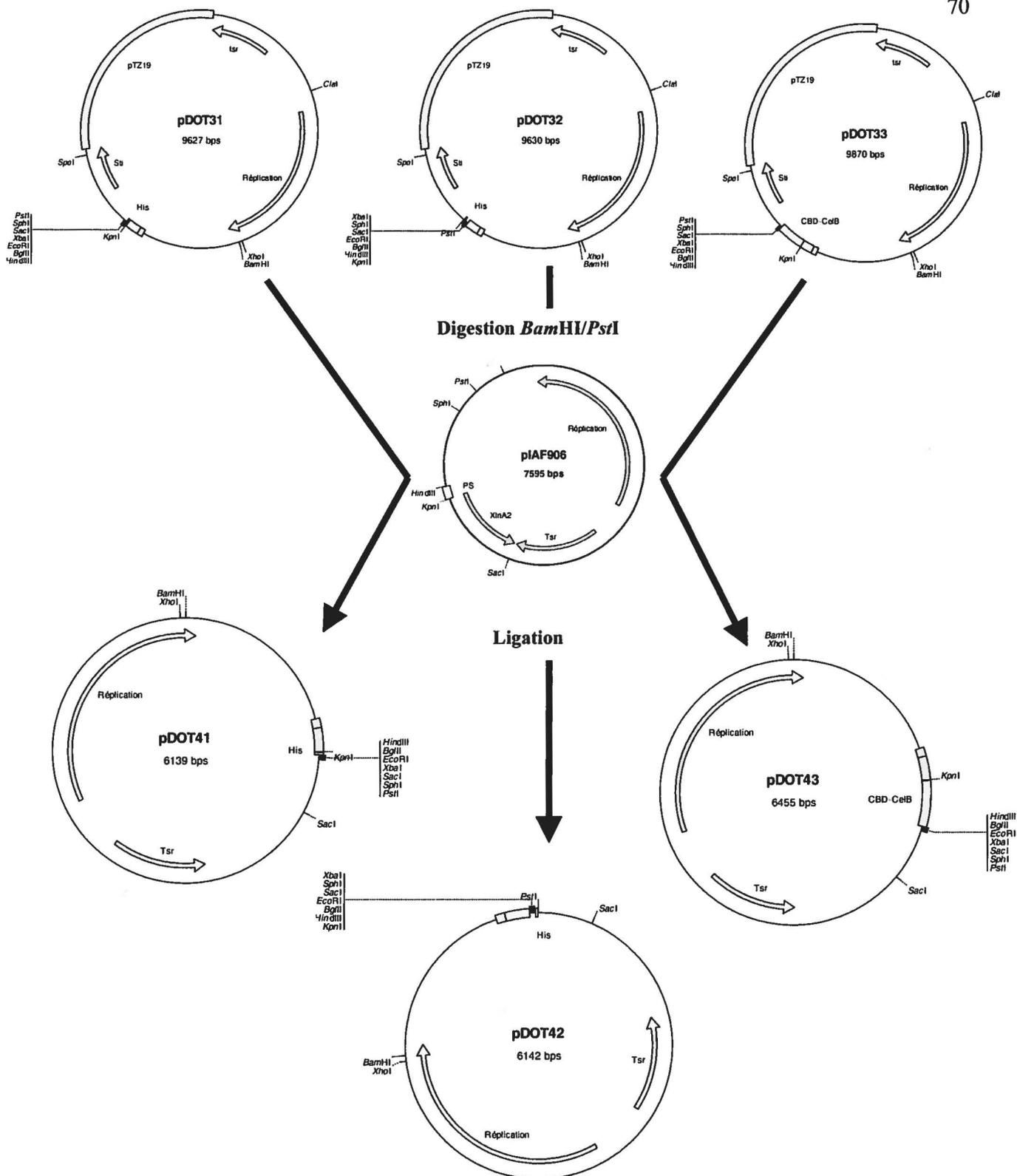


Figure 7 : Construction de vecteurs d'expression et de sécrétion de *S. lividans*.

vecteur pIAF906 (Pagé *et al.*, 1996). Après la digestion des fragments à insérer et du vecteur pIAF906 par les enzymes de restriction appropriées, des cellules de *S. lividans* ont été transformées avec le produit de ligation. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, deux digestions avec les deux enzymes de restriction *EcoRI* et *SacI* ont permis d'identifier les clones positifs possédant l'insertion désirée (1603 paires de bases pour pDOT41 et pDOT42; 1919 paires de bases pour pDOT43).

## **2.2 Production de xylanase par les clones contenant les vecteurs de *Streptomyces*.**

Pour vérifier la production de xylanase par les vecteurs strictement streptomycètes, le gène de la xylanase A2 a été introduit dans le vecteur pDOT42. Après la digestion du gène à insérer et du vecteur pDOT42 par les enzymes de restriction appropriées, des cellules de *S. lividans* ont été transformées avec le produit de ligation. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une digestion double avec les enzymes de restriction *HindIII* et *SacI* a permis d'identifier les clones positifs possédant l'insertion de 1209 paires de bases désirée. Les clones contenant le gène de la xylanase ont été étalés sur le milieu solide Bennett-thiostrepton pour la sporulation. Une fois les spores récoltées,  $4 \times 10^7$  spores ont été mises en culture dans le milieu M-14 xylose. Des échantillons de culture ont été pris à 144 heures de culture. L'activité enzymatique a été mesurée par le test des sucres réducteurs (Miller, 1959). Les résultats sont présentés au tableau VII.

La production de xylanase A, à partir des spores d'un clone contenant le vecteur pDOT42, est similaire aux taux de production obtenus lors de la production de xylanase par les colonies des différents vecteurs navettes. Ainsi, la diminution de la production lors de la différenciation des cellules est attribuable à un élément retrouvé dans l'ADN d'*E. coli*. Cependant, la production de 403 UI/ml, qui représente une diminution de plus de la moitié de xylanase A par rapport au vecteur pIAF911-A.8, pourrait être attribuable à l'élimination des sites *KpnI* et *PstI* du vecteur. En effet, ce résultat concorde avec les résultats de Kieser *et al.* (1982) qui, suite à l'élimination du site *PstI* du vecteur pIJ101, ont obtenu une perte de 13 à 55 % des vecteurs. De plus, lors de la purification de l'ADN plasmidique, une bande d'environ 2100 paires de bases est retrouvée. Cette bande peut être expliquée par des

Tableau VII : Activité xylanasiqne produite par les clones de *S. lividans* contenant les divers vecteurs. Culture de 144 heures dans le milieu M14-xylose. Les cultures ont la même croissance qui a été mesurée par un test d'ADN (résultats non montrés).

Vecteurs	Activité xylanasiqne (UI/ml)
pIAF911-A.8	928
PDOT42	403 ± 10

délétions dans certaines régions du vecteur dues à son instabilité.

Si l'on considère l'activité spécifique de la xylanase A de *S. lividans*, qui est de 400 UI/mg, il y a production d'environ 1 g/L de xylanase par les spores contenant le vecteur pDOT42. Ce vecteur est ainsi utilisable pour la production de grandes quantités de protéines homologues à partir de spores de *S. lividans*. Grâce à sa cassette de clonage, il permet l'insertion de gènes dans le cadre de lecture du peptide signal long muté de la cellulase A.

De plus, la présence d'une queue de six histidines devait permettre la récupération de la xylanase A2 lors d'un passage du surnageant de culture dans une colonne de nickel. Cependant, après le passage de 10 ml de surnageant de culture pour la purification sur colonne, aucune protéine n'a été retenue. La queue d'histidines serait donc éliminée par des enzymes protéolytiques présentés dans le milieu de culture. La dégradation de fragments se rattachant au domaine catalytique de la xylanase A a déjà été observée. En effet, lors d'expérimentations pour l'identification de la région du gène permettant encore la production d'une xylanase active, Paradis *et al.* (1996) ont effectué des délétions sur le domaine de fixation au xylane (XBD) en 3' du gène codant pour la xylanase. Chacune des délétions a entraîné la dégradation totale du XBD et la production du domaine catalytique de la xylanase de 32 kDa et ce, malgré l'insertion d'un codon de terminaison à la fin de chacune des délétions. Finalement, il semblerait qu'une région de la protéine qui aurait une structure altérée soit immédiatement dégradée.

### 3.0 Production de protéines homologues et hétérologues.

La fusion du gène codant pour les diverses protéines avec le peptide signal long muté de la cellulase A (figure 8) a été effectuées par l'introduction des différents gènes dans les vecteurs pIAF911-A.8 ou pDOT42. À l'exception de l'ORF de *S. suis*, la structure attendue des protéines qui ont été mises à l'essais dans cette étude est décrite au tableau VIII. La prochaine section décrit plus en détail les différentes étapes de clonage et les résultats obtenus pour la production de la cellulase B de *S. lividans*, de deux lipoprotéines de *M. tuberculosis*, de la MMP9 de *M. musculus*, de deux protéines de *E. coli* et finalement d'un ORF de *S. suis*.

**ATG** GGC TTT GGG AAC agT CCC **ATC** GCG TTG TGT CCG CTT CGC ACG **AGG**  
 M G F G S S P I A L C P L R T R

**AGG** AAC GCT **ATG** AAA CGC CTT TTG GCC CTG CTC GCG ACC GGC GTG TCG  
 R N A M K R L L A L L A T G V S

ATC GTC GGC CTG ACT GCG CTC GCC GGC CCC CCG GCA CAG GCC *GCC GAG*  
 I V G L T A L A G P P A Q A A E

*AGC ACG CTC* GGT ACC  
*S T L A*

Figure 8 : Peptide signal long muté de la cellulase A. La boîte complémentaire à l'ARNr 16S est soulignée avec les petites lettres; La séquence Shine Dalgarno et les codons d'initiation de la traduction sont soulignés en gras; Le site *KpnI* est souligné; La séquence en italique représente le début du gène de structure de la xylanase; Le site de reconnaissance de la signal peptidase est en caractère gras; En amont du premier ATG il y a une boîte Shine-Dalgarno et le promoteur de la XlnA

Tableau VIII : Structure attendue des différentes constructions effectuées pour la production des différentes protéines homologues et hétérologues. Il est à noter qu'en l'absence d'une queue d'histidines, seuls les cinq premiers et les trois derniers acides aminés des différentes protéines sont présentés. Dans le cas de la présence d'une queue d'histidines, seulement les trois premiers et les deux derniers acides aminés sont présentés. Pointillés : continuité du gène; caractère gras : sites de restriction utilisés pour l'insertion des gènes dans le vecteur; souligné : queue de six histidines.

Organisme	Protéine	Structure attendue
<i>S. lividans</i>	Cellulase B	5' <b>AAGCTT</b> GACACCACGATCTGC.....ACCGACCCCGAATTC 3' <i>HindIII</i> D T T I C T D P <i>EcoRI</i>
<i>M. musculus</i>	MMP9	5' <b>GGTACC</b> AGTCCCTGGCAGCCC.....CAGTGCCTGAGCTC 3' <i>KpnI</i> S P W Q P Q C P <i>SacI</i>
	MMP9 $\Delta$ TTA	5' <b>GGTACC</b> AGTCCCTGG.....TGCCCT <u>CATCACCATCACCATCAG</u> GAGCTC 3' <i>KpnI</i> S P W C P <u>His TAG</u> <i>SacI</i>
<i>E. coli</i>	PAA	5' <b>AAGCTT</b> GATATCAATCTGTAT.....AAAGGCACTGAATTC 3' <i>HindIII</i> D I N L Y K G T <i>EcoRI</i>
	EspD	5' <b>AAGCTT</b> CTTAATGTAAATAGC.....GGTCGAGTTGAATTC 3' <i>HindIII</i> L N V N S G R V <i>EcoRI</i>
<i>M. tuberculosis</i>	38 kDa	5' <b>GGTACC</b> CATCACCATCACCATCACTCGAAACCA...TCCAGCTAGGAGCTC 3' <i>KpnI</i> <u>His TAG</u> S K P S S Stop <i>SacI</i>
	19 kDa	5' <b>GGTACC</b> CATCACCATCACCATCAGGACTGACG...TGTTCCTAAGAGCTC 3' <i>KpnI</i> <u>His TAG</u> G L T C S Stop <i>SacI</i>
	19 kDa $\Delta$ Cystéine	5' <b>GGTACC</b> CATCACCATCACCATCAAGCAAC...TGTTCCTAAGAGCTC 3' <i>KpnI</i> <u>His TAG</u> S S N C S Stop <i>SacI</i>

### 3.1 Production de la cellulase B de *S. lividans*.

L'intérêt grandissant envers *S. lividans* pour la production de protéines homologues vient de l'utilisation de certaines enzymes qui dégradent efficacement les composés lignocellulosiques. Ces enzymes peuvent être utilisées pour la transformation de biomasse de faible valeur, comme des déchets de l'agriculture et de la foresterie, en produits utiles comme de l'alcool ou de la nourriture pour les animaux (Coughlan, 1985). Ainsi, Whittman *et al.* (1994) ont cloné et séquencé le gène de la cellulase B (*celB*) et caractérisé l'enzyme. Comparativement à la cellulase A de *S. lividans*, la CelB possède une affinité quatre fois plus grande pour son substrat, la carboxyméthylcellulose. Cependant, la faible production obtenue jusqu'à maintenant ne permet pas l'utilisation de cet enzyme dans des procédés à grande échelle.

Ainsi, le gène de la cellulase B, sans le domaine de fixation à la cellulose (700 pb), a été amplifié par PCR et le fragment a été inséré aux sites *HindIII/EcoRI* du vecteur pDOT42. Suite à une double digestion du fragment à insérer et du vecteur pDOT42 par les enzymes de restriction appropriées et la récupération des fragments sur gel d'agarose, des cellules de *S. lividans* ont été transformées avec le produit de ligation. Pour la vérification des plasmides extraits des transformants, une double digestion à l'aide des enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* a permis d'identifier les clones possédant l'insertion de 700 paires de bases désirée. Suite à la production de spores sur milieu Bennet-thiostrepton, une culture de 144 heures dans le milieu M-14 xylose a été effectuée pour la production de cellulase B. Des échantillons de culture ont été prélevés à des intervalles de 24 heures. L'activité enzymatique de chacun des échantillons a été mesurée par le test des sucres réducteurs (figure 7).

Les résultats obtenus pour la production de cellulase B à l'aide du vecteur pDOT42, de 10,6 UI/ml à 144 heures de culture, représentent une augmentation de plus de 100 fois du résultat de 0,1 UI/ml obtenus par Wittman *et al.* (1994). Cette quantité avait été obtenue à la suite de l'introduction du gène de la souche sauvage dans un vecteur multicopies. La faible production pouvait s'expliquer par l'utilisation d'un promoteur faible et de la présence de deux codons rares TTA dans le peptide signal de la cellulase B. Bien que ce codon soit sous le contrôle du gène *bldA* exprimé tardivement chez *S. lividans*, cette enzyme est détectée dans le surnageant de culture d'une souche qui croît sur la cellulose.

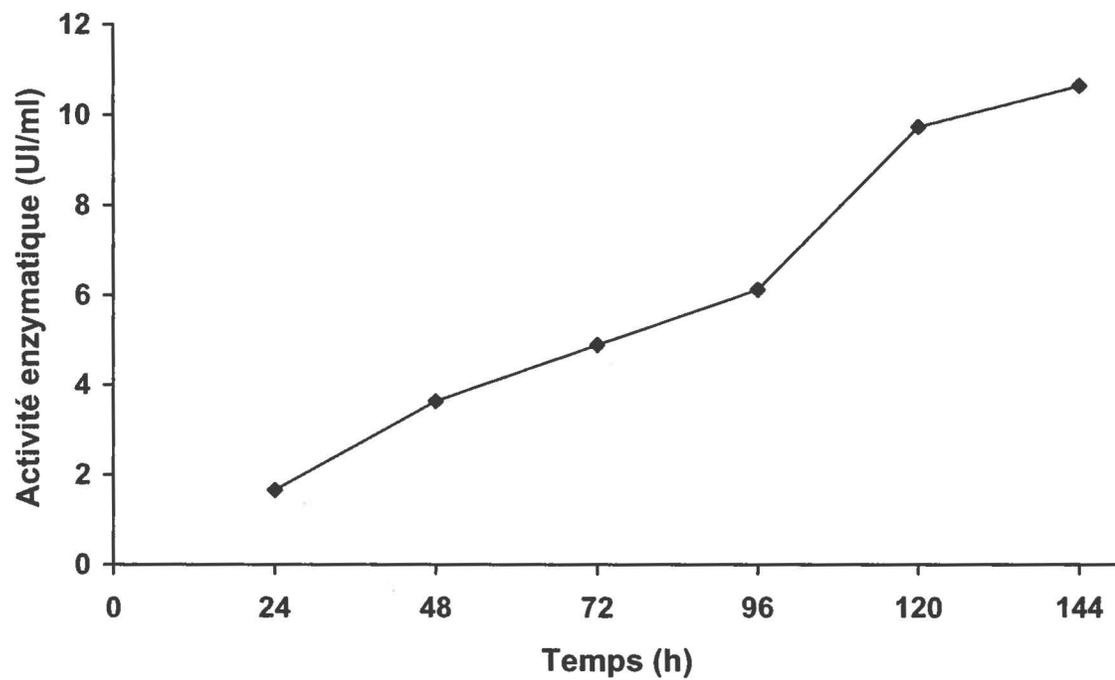


Figure 9 : Activité de la cellulase B dans le surnageant de culture de transformants de *S. lividans* 10-164 possédant le plasmide pDOT42 + *celB*.

Suite à la surproduction de la protéine obtenue dans cette étude, on observe que le changement de peptide signal améliore grandement la production de cellulase B. De plus, dans les résultats obtenus à l'aide du vecteur pDOT42, l'activité spécifique de la protéine doit être prise en considération pour comparer les résultats avec une autre cellulase de *S. lividans* produite auparavant, soit la cellulase A. En effet, l'activité de la cellulase B est de 98 UI/mg soit, dix fois plus faible que celle de la cellulase A de *S. lividans* (Wittman *et al.*, 1994). Ainsi, les résultats de la production de cellulase B à l'aide du vecteur pDOT42 de 100 mg/L sont d'autant plus significatifs. En comparaison de la production de 12 UI/ml de cellulase A obtenue par Théberge *et al.* (1992), la production de cellulase B est 8 fois plus grande.

### **3.2 Production de la MMP9 de *M. musculus* (souris).**

Le développement de systèmes de production de protéines à faible coût est nécessaire en raison de la grande demande de certaines protéines à des fins de recherche. Par exemple, dans le cas des études impliquant la MMP9 dans certains cancers, le coût prohibitif de la protéine est une contrainte majeure dans le développement d'inhibiteurs efficaces. Ainsi, le système de sécrétion de *S. lividans* a été testé pour la production de la MMP9.

La construction du vecteur d'expression et de sécrétion de la MMP9 est illustrée à la figure 8. Le gène de la métalloprotéinase de matrice de type 9 (MMP9) de souris, fourni par l'équipe du Dr Yves St-Pierre (INRS-IAF, Laval), est doté des sites *KpnI-SacI* aux extrémités. Ce gène a été inséré dans le plasmide pIAF811-A.10 (Kébir *et al.*, 2000; voir appendice A, page 106) suite à l'enlèvement du gène de structure de la xylanase A par digestion aux sites *KpnI* et *SacI*. Le gène d'intérêt se retrouve donc en aval de la séquence du peptide signal long muté de la cellulase A. Ensuite, le peptide signal et le gène de la xylanase A du vecteur à copies multiples pIAF906 ont été enlevés par digestion aux sites *HindIII-SacI* et remplacés par le gène codant pour la MMP9. Le vecteur pIAF906, un dérivé de pIJ702, possède deux sites de restriction de chaque côté du peptide signal de la xylanase A soit les sites *HindIII* en amont du RBS et *KpnI* à 15 nucléotides du site de coupure de la signal

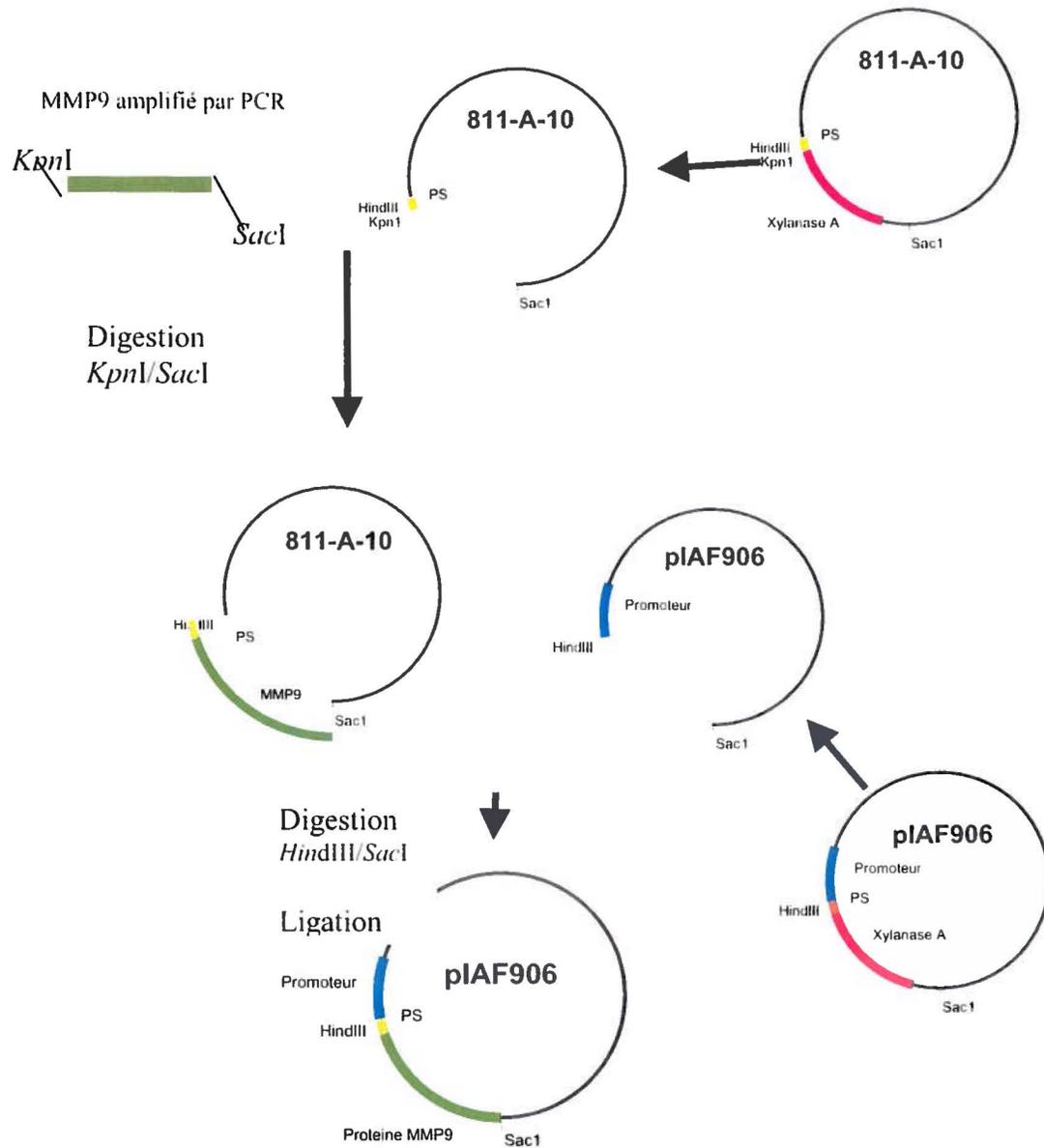


Figure 10: Construction d'un vecteur d'expression et de sécrétion de la MMP9 de souris chez *S. lividans*.

peptidase. Il contient aussi le gène de résistance au thiostrepton pour permettre la sélection des transformants. Le fragment *HindIII-SacI* de 811-A.10/MMP9 est inséré dans le vecteur en aval du promoteur de la xylanase A.

Le plasmide résultant a été introduit dans la souche *S. lividans* 10-164. Un transformant contenant le gène codant pour la MMP9 a été inoculé dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivé à une température de 34 °C. Des échantillons de 1 ml du surnageant de culture ont été récoltés à des intervalles de 24 heures pour une durée totale de 144 heures. Des échantillons de 20 µL ont été utilisés pour tester la présence de la protéine par SDS-PAGE (figure 9). Des tests d'immunodétection à l'aide d'anticorps anti-MMP9 n'ont pas permis de détecter la MMP9 dans le surnageant de culture de *S. lividans*.

Une des raisons pour expliquer ces résultats serait la présence de deux codons rares TTA (leucine) dans le gène de la MMP9. Pour vérifier l'effet de ces deux codons sur la production de la protéine, ils ont été éliminés. Une série d'amplifications par PCR à l'aide des différents oligonucléotides a permis de remplacer les deux codons. De plus, une queue de six histidines a été introduite en C-terminal pour la récupération éventuelle de la protéine. Une fois le gène modifié, il a été réinséré dans le plasmide pIAF906. Le plasmide résultant a été introduit dans la souche *S. lividans* 10-164. Le transformant contenant le gène de la MMP9 modifié a été inoculé dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivé à une température de 34 °C. Suite à la séparation des protéines par SDS-PAGE et au transfert sur une membrane de nitrocellulose, la présence de MMP9 a été testée par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-histidines (figure 10). Aucune production de MMP9 n'a pu être détectée par les anticorps dans le surnageant de culture de *S. lividans*. Trois facteurs peuvent influencer ces résultats. Premièrement, il se peut que la queue d'histidines ait été éliminée suite à la translocation de la protéine. Deuxièmement, la quantité de protéines produites était trop faible pour qu'elle soit détectable par cette méthode. En effet, les anticorps anti-histidines ne détectent que des quantités supérieures à 125 ng (les tests ont été effectués sur une protéine contenant une queue de six histidines, résultats non présentés). Finalement, d'autres facteurs comme la présence du pro-domaine de la MMP9 peuvent influencer la production de la protéine.

Une autre technique, la zymographie (figure 11), a été utilisée pour la détection de la protéine. Cette méthode de détection, plus sensible que les anticorps, permet la détection

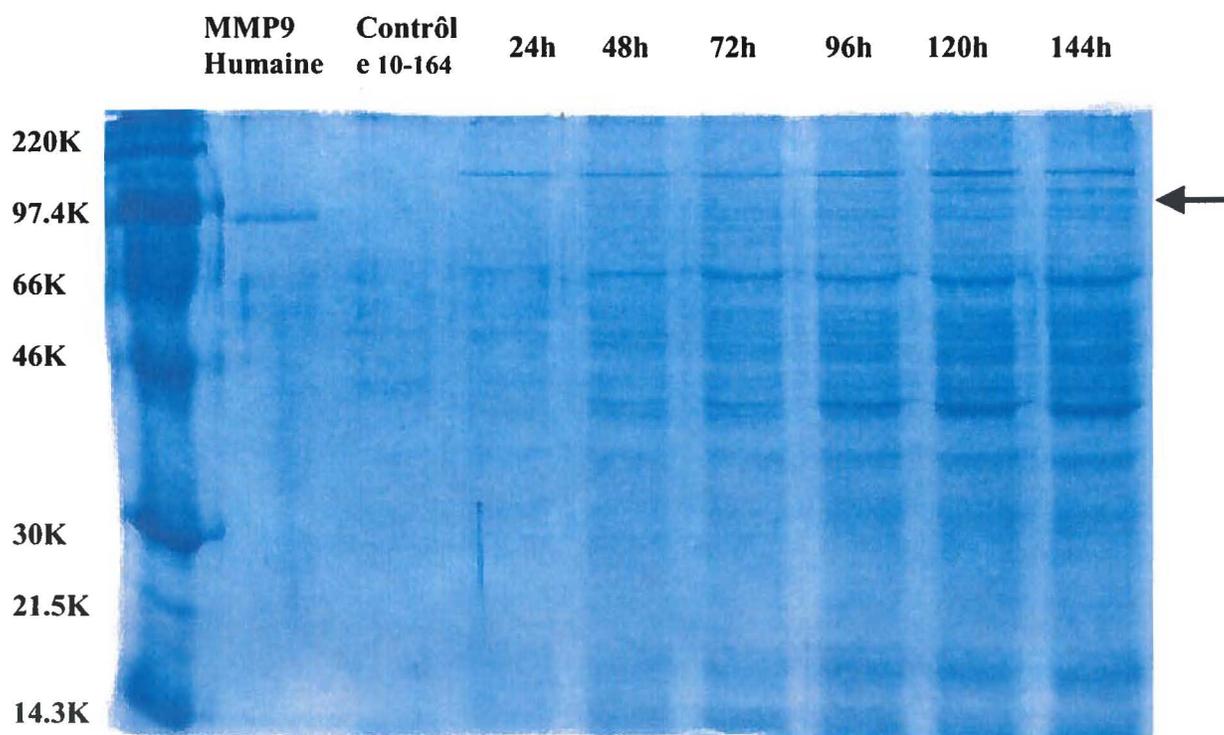


Figure 11 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture d'un clone de *S. lividans* exprimant la MMP9 de souris. La flèche indique le poids moléculaire attendu de la protéine.

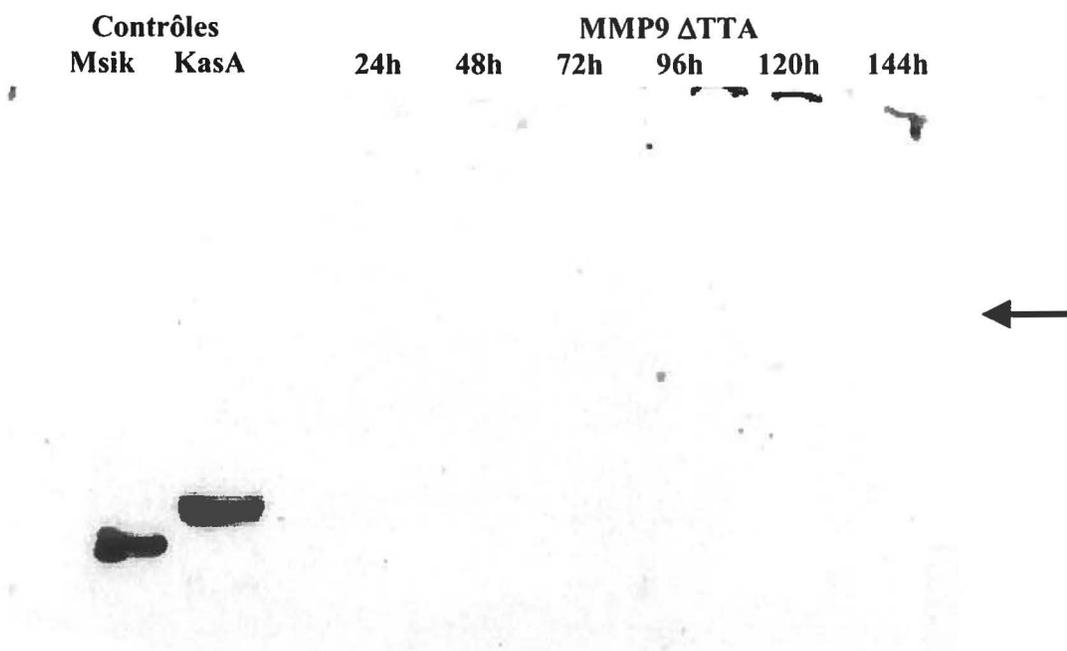


Figure 12 : Immunodétection des protéines du surnageant de culture d'un clone de *S. lividans* exprimant la MMP9 de souris. Les protéines sont détectées par des anticorps anti-HisTag. La flèche indique le poids moléculaire attendu.

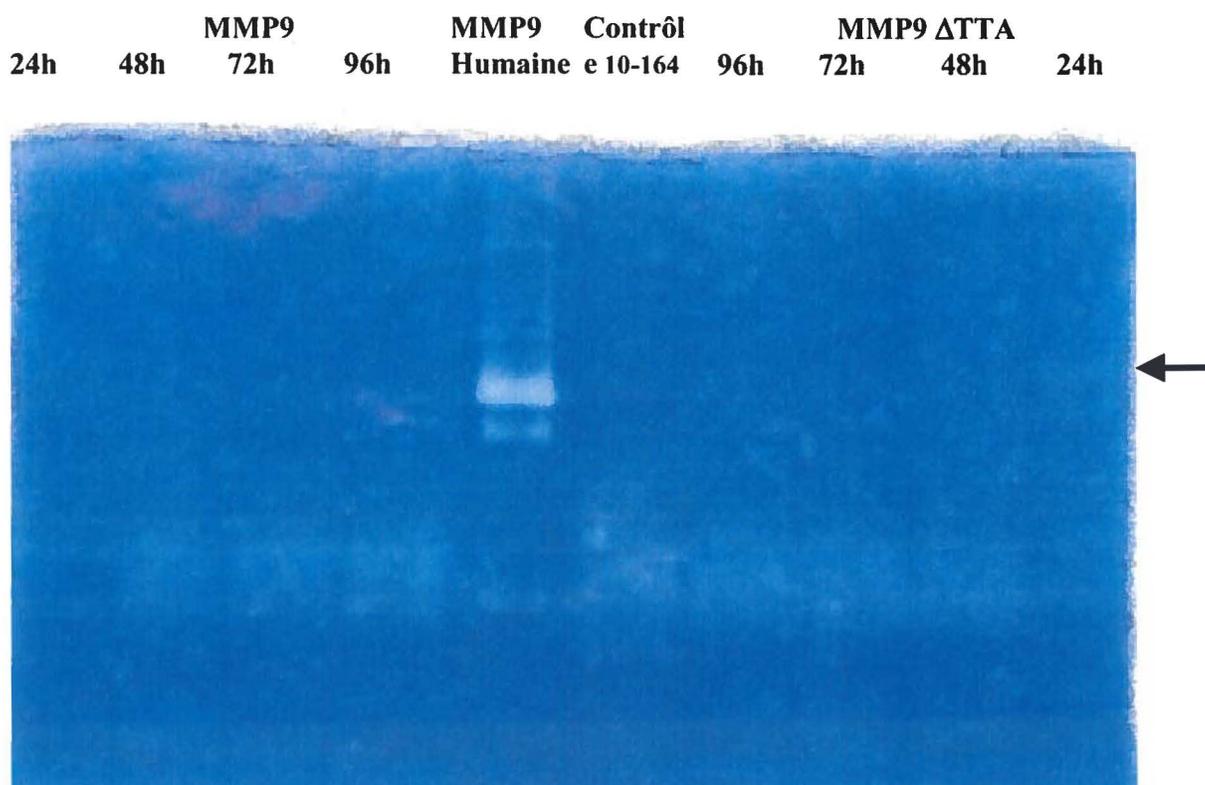


Figure 13 : Analyse par zymographie de l'activité de la gélatinase B (MMP9) dans le surnageant de culture du clone de *S. lividans* exprimant les protéines MMP9 et MMP9  $\Delta$ TTA. La flèche indique l'activité de la MMP9 attendue selon son poids moléculaire.

d'environ 1 ng de protéines car elle détecte l'activité de l'enzyme en présence de son substrat. Aucune activité n'a été détectée à l'aide de ce test. Bien que la protéine soit sécrétée par les cellules de souris, il semble qu'il n'y ait aucune production de MMP9 par *S. lividans*.

### **3.3 Production de protéines de *M. tuberculosis*.**

Un but important dans la recherche sur les mycobactéries est l'identification d'antigènes ayant un rôle à jouer dans l'induction de la réponse immunitaire contre la tuberculose et le développement d'outils pour diagnostiquer la maladie. Récemment, plusieurs gènes présentant un potentiel immunitaire ont été isolés de *M. tuberculosis*. Cependant, ce micro-organisme à croissance lente doit être manipulé dans des conditions strictes principalement à cause des dangers qu'il représente pour la santé. Ainsi, de nouvelles méthodes sont envisagées pour la production rapide et en grande quantité de ces protéines.

Dans cette étude, deux gènes codant pour des protéines de *M. tuberculosis*, soit les lipoprotéines de 38 et 19 kDa, ont été insérés dans le vecteur pDOT42 pour la production des protéines correspondantes par *S. lividans*. Ce vecteur possède le promoteur de la xylanase A, le peptide signal long muté de la cellulase A, une cassette de clonage incluant les sites de restriction *KpnI*, *HindIII*, *BglII*, *EcoRI*, *SphI* et *XbaI*, une queue de six histidines en aval de la cassette de clonage et un codon stop. Les gènes ont été fournis par le Dr Michel Gilbert (CNRC, Ottawa). Au départ, ces gènes étaient insérés dans un plasmide d'*E. coli*. Lors des tests préliminaires, ils avaient été amplifiés par PCR et les sites *KpnI* et *SacI* avaient été introduits aux extrémités. Pour permettre l'insertion des gènes dans le vecteur pDOT42, dans lequel le site *SacI* n'est pas disponible, une première insertion dans la cassette de clonage du vecteur navette pDOT32 a été effectuée. Les gènes ont ensuite été récupérés par digestion aux sites *KpnI* et *XbaI*. Les fragments insérés dans le vecteur pDOT42, aux sites *KpnI/SacI*, sont placés en aval du promoteur de la xylanase A et du peptide signal long muté de la cellulase A.

### 3.3.1 Production de la protéine de 38 kDa.

Le gène de la protéine de 38 kDa a été amplifié par PCR. Le site *KpnI* et une queue de six histidines ont été introduits en 5' de la séquence et un codon de terminaison suivi du site *SacI* en 3'. Étant donné que le site de restriction *SacI* n'est pas disponible dans le vecteur pDOT42, le gène a d'abord été inséré aux sites *KpnI* et *SacI* de la cassette de clonage du vecteur navette pDOT32. La récupération du gène par une double digestion *KpnI/XbaI* a ensuite permis son insertion dans le vecteur pDOT42. Le plasmide résultant a été introduit dans la souche *S. lividans* 10-164. Un transformant a été inoculé dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivé à une température de 34 °C. Des échantillons de 1 ml du surnageant de culture ont été récoltés à des intervalles de 24 heures pour une durée totale de 120 heures. Des échantillons de 20 µL ont été utilisés pour tester la présence de la protéine par SDS-PAGE (figure 12).

L'analyse par SDS-PAGE de la production de la protéine de 38 kDa a permis de détecter la présence d'une protéine majeure au poids moléculaire attendu pour cette protéine. La quantité de protéine produite est évaluée à environ 0,5 g/L. Cependant, une analyse de la séquence en acides aminés du N-terminal a démontré qu'il y avait hétérogénéité de la protéine (figure 13). En effet, jusqu'à 8 acides aminés de la protéine mature, ceux situés immédiatement en aval du site de coupure de la signal peptidase, ainsi que la queue de six histidines ont été éliminés lors de la translocation de la protéine. Ces pertes seraient attribuables à des protéases présentes dans le milieu de culture de *S. lividans* et qui empêcheraient la purification de la protéine par la fixation de la queue d'histidine à une colonne de nickel. Par ailleurs, puisqu'aucun anticorps testé jusqu'à maintenant sur la protéine ne se lie aux 117 acides aminés retrouvés à l'extrémité N-terminale (Andersen et Hansen, 1989), cette hétérogénéité ne devrait pas influencer la réponse immunitaire induite par la protéine.

### 3.3.2 Production de la protéine de 19 kDa.

Étant donné que le site de restriction *SacI* avait été inséré en 3' du gène qui code pour la protéine de 19 kDa, le gène a d'abord été inséré aux sites *KpnI* et *SacI* du vecteur

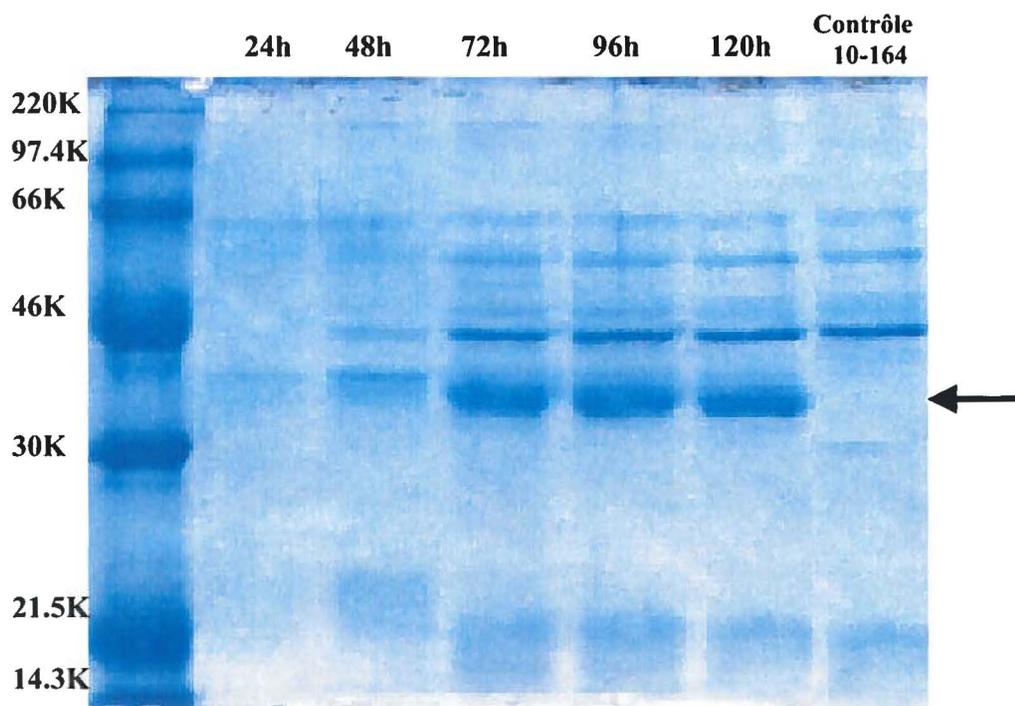


Figure 14 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture d'un clone de *S. lividans* exprimant la protéine de 38 kDa de *M. tuberculosis*. Le poids moléculaire attendu de la protéine est identifié par la flèche.

Séquence attendue :

TCG AAA CCA CCG AGC GGT TCG CCT GAA ACG GGC GCC GGC GCC GGT ACT GTC  
 AESTLGHHHHH S K P P S G S P E T G A G A G T V

Deux principales séquences retrouvées :

\_\_\_\_\_ E T G A G A G

et

\_\_\_\_\_ P E T G A G A G T V

Figure 15 : Hétérogénéité du N-terminal lors de la production de la protéine de 38 kDa de *M. tuberculosis*.

pDOT32, pour ensuite être récupéré par une double digestion *KpnI/XbaI* pour son insertion dans le vecteur pDOT42. Le plasmide résultant a été introduit dans la souche *S. lividans* 10-164. Un transformant a été inoculé dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivé à une température de 34 °C. Des échantillons de 1 ml du surnageant de culture ont été récoltés à des intervalles de 24 heures pour une durée totale de 144 heures. Des échantillons de 20 µL ont été utilisés pour tester la présence de la protéine par SDS-PAGE.

Aucune production de la protéine de 19 kDa n'a été détectée dans le surnageant de culture de *S. lividans*. Pourtant, la protéine de 19 kDa, une lipoprotéine, appartient à la même classe d'antigènes que la protéine de 38 kDa décrite auparavant et qui a été produite à plus de 0,5 g/L de protéine. L'absence de la protéine de 19 kDa dans le surnageant de culture peut être attribuable à l'ajout d'une queue lipidique au résidu cystéine (Cys) suite à l'enlèvement du peptide signal par une signal peptidase de type 2 (type-2 SPase) tel que décrit par Ashbridge (1991). Cette queue lipidique fixerait la protéine à la membrane, empêchant ainsi sa sécrétion. Le résidu cystéine présent au N-terminal de la protéine de 38 kDa avait été éliminé lors de l'amplification du gène correspondant. Pour tester cette hypothèse, le gène de la protéine de 19 kDa a été amplifié à partir des nucléotides codant pour l'acide aminé qui est situé à la suite de la cystéine.

Une double digestion *HindIII/SphI* a permis l'insertion du gène dans la cassette de clonage du vecteur pDOT42. Le plasmide résultant a été introduit dans la souche *S. lividans* 10-164 et les spores obtenues à partir des transformants ont été inoculées dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivées dans les conditions décrites auparavant. Des échantillons de 1 ml du surnageant de culture ont été récoltés à des intervalles de 24 heures pour une durée totale de 144 heures. Des échantillons de 20 µL ont été utilisés pour tester la présence de la protéine par SDS-PAGE (figure 14).

Le gène de la protéine de 19 kDa sans la cystéine en N-terminal a permis la production d'une protéine d'environ 14 kDa dans le surnageant de culture de *S. lividans*. Cette valeur est un peu plus faible que celle de 15,1 kDa attendue pour la protéine sans la queue lipidique (Ashbridge *et al.*, 1989). Cependant, comme dans le cas de la protéine de 38 kDa, l'analyse du N-terminal a permis de déterminer que jusqu'à 26 acides aminés avaient été éliminés lors de la translocation de la protéine. Ce résultat pourrait affecter la réponse immunitaire induite par la protéine puisqu'elle est habituellement hyperglycosylée à son

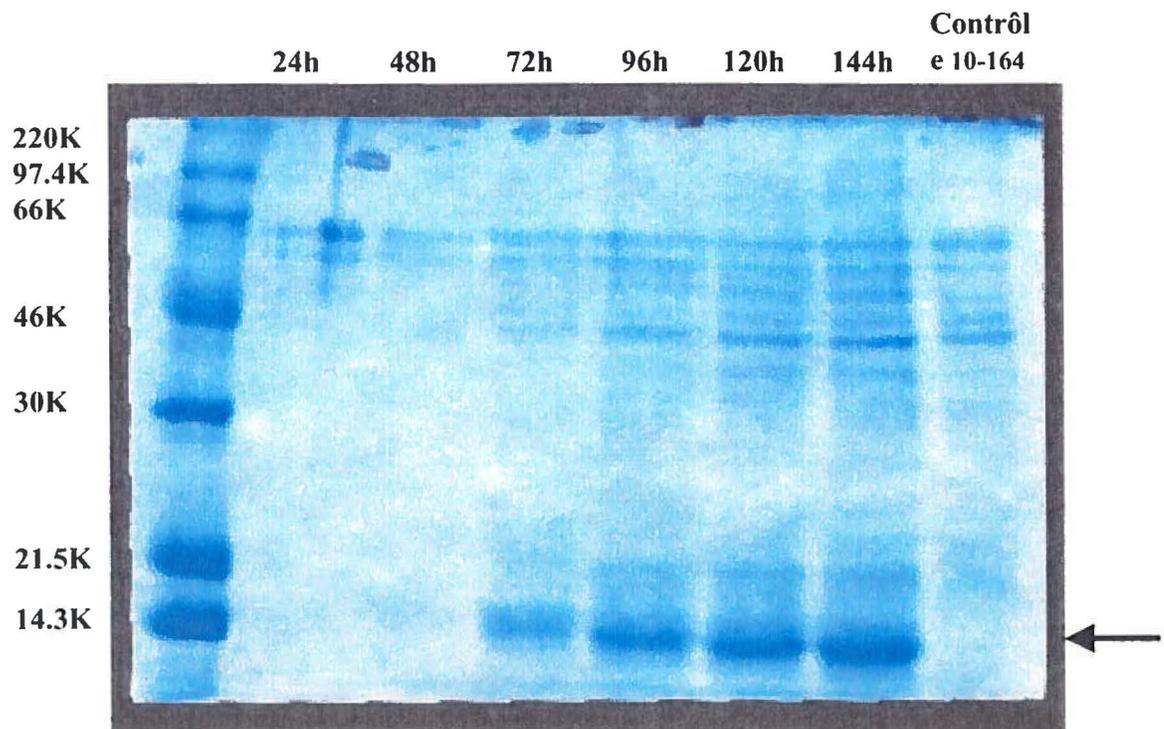


Figure 16: SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture d'un clone de *S. lividans* exprimant la protéine de 19 kDa de *M. tuberculosis*. Le poids moléculaire attendu de la protéine est identifié par la flèche.

extrémité N-terminale chez *M. tuberculosis* (Ashbridge, 1991).

Finalement, 10 mL de surnageant à 144 heures de culture à travers une colonne de nickel n'a pu permettre la récupération de la protéine (figure 15). Ainsi la queue de six histidines (His Tag) insérée en C-terminal de la cassette de clonage ne permet pas de purifier les protéines sécrétées dans le milieu de culture. Le His Tag est probablement éliminé par des protéases de *S. lividans* lors de la maturation des protéines.

### **3.4 Production de l'EspD et de la PAA d'*E. coli*.**

Dans l'étude des souches pathogènes d'*E. coli* responsables d'infections entériques, plusieurs gènes codant pour des protéines sécrétées ont été identifiés. Cependant, des conditions particulières sont nécessaires pour la sécrétion de ces protéines. En effet, elles ne présentent aucun peptide signal et leur sécrétion est influencée par les conditions environnementales et par le contact avec les cellules de l'hôte. Ainsi, l'utilisation de systèmes alternatifs, comme celui de *S. lividans*, peut s'avérer essentielle dans l'obtention de large quantité de ces protéines.

Les gènes codant pour les protéines PAA et EspD d'*E. coli* ont été fournis par l'équipe du Dr Josée Harel (Institut de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe). Ces gènes sont amplifiés par PCR et ont les sites *Hind*III et *Eco*RI aux extrémités. Les deux gènes ont été insérés par une double digestion à l'aide des enzymes de restriction appropriées dans le vecteur pDOT42. Les plasmides résultant ont été introduits dans la souche *S. lividans* 10-164. Les transformants ont été inoculés dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivés à une température de 34 °C. Des échantillons de 1 ml du surnageant de culture ont été récoltés à des intervalles de 24 heures pour une durée totale de 144 heures. Des échantillons de 20 µL ont été utilisés pour tester la présence de la protéine par SDS-PAGE (figure 16 et 17).

Lors de l'analyse par SDS-PAGE, aucune protéine n'a été observée au poids moléculaire de 40 kDa pour EspD et 28 kDa pour PAA. De plus, les tests d'immunodétection effectués n'ont révélé aucune production des protéines EspD et PAA par *S. lividans*. La présence de deux codons rares TTA dans le gène qui code pour la protéine PAA et de neuf codons TTA dans le gène qui code pour la protéine EspD peut empêcher

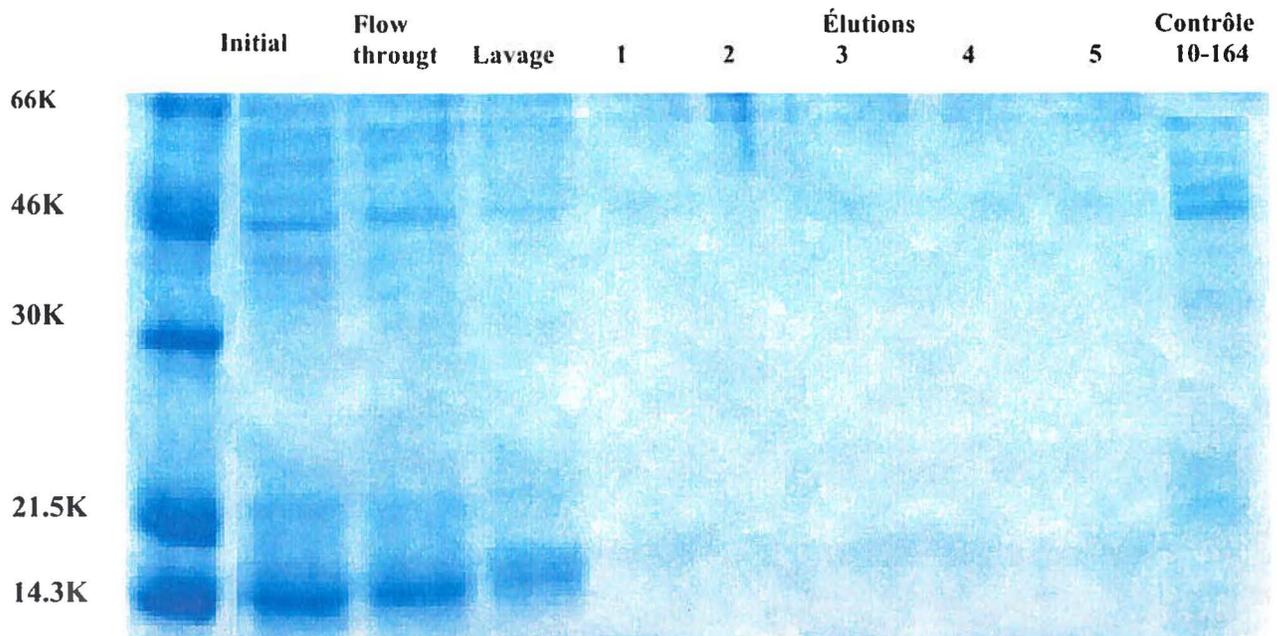


Figure 17 : Purification sur colonne de nickel de la protéine de 19 kDa de *M. tuberculosis* produite par un clone de *S. lividans* transformé avec le vecteur pDOT42. Le vecteur fournit les histidines en C-terminal des protéines recombinantes. Analyse des fractions d'élution de la colonne par SDS-PAGE.

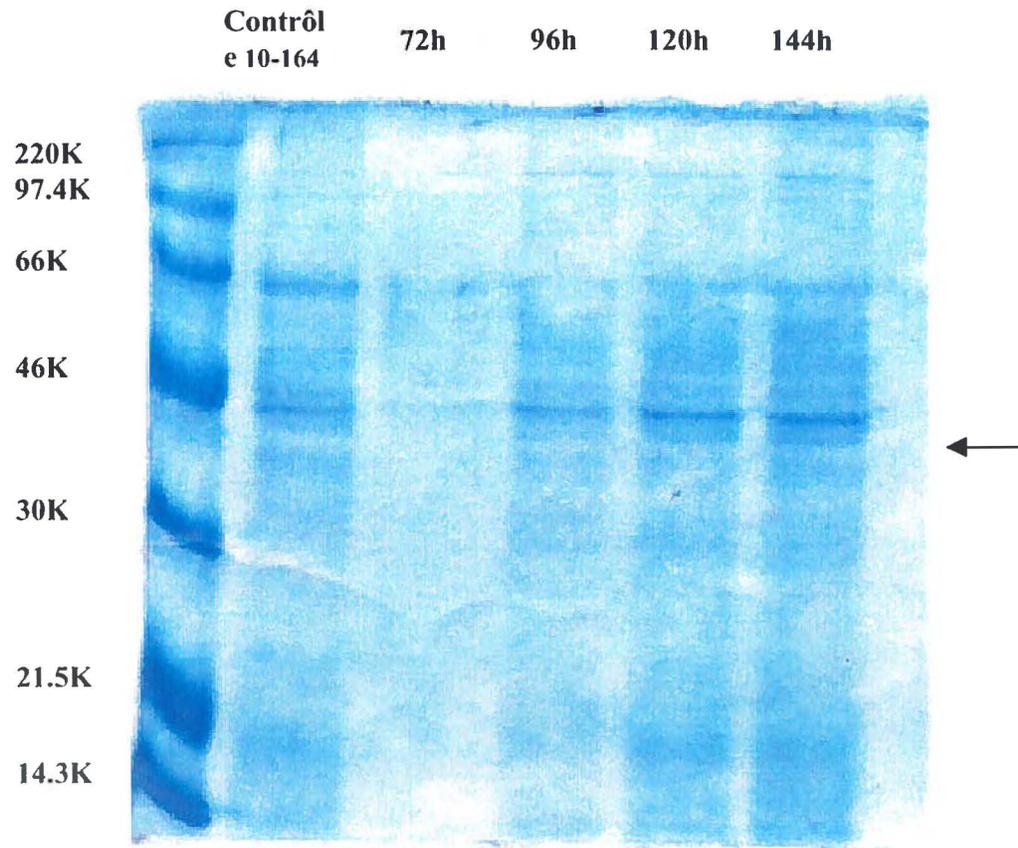


Figure 18 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture de *S. lividans* exprimant la protéine EspD d'*E. coli* dans le vecteur pDOT42. La flèche indique le poids moléculaire attendu pour la protéine.

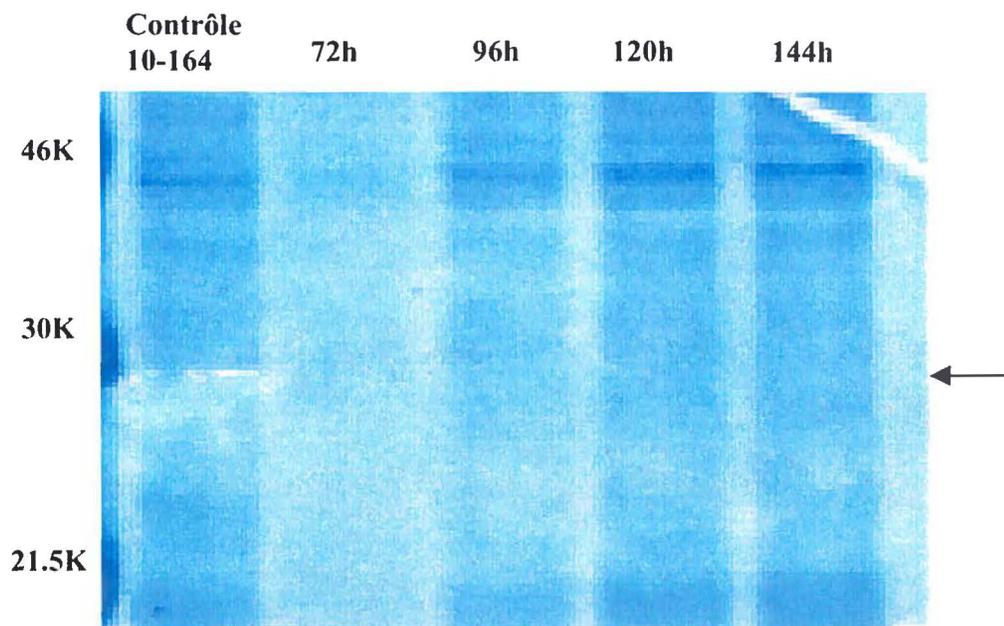


Figure 19 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture de *S. lividans* exprimant la protéine PAA d'*E. coli* dans le vecteur pDOT42. La flèche indique le poids moléculaire attendu pour la protéine.

l'expression des protéines chez *S. lividans*. Cependant, tel qu'observé lors des essais effectués pour la production de la MMP9 de souris, la présence de codons rares dans les gènes ne permet pas à elle seule d'expliquer entièrement les résultats. Ainsi, selon Wainwright et Kaper (1998), une protéine chaperone, CesD, serait nécessaire pour la sécrétion efficace de la protéine EspD et contribuerait à la stabilité de la protéine. L'absence de la protéine CesD chez *S. lividans* pourrait empêcher la sécrétion de la protéine EspD dans le milieu de culture. Dans le cas de la protéine PAA, bien qu'il soit prédit que la protéine possède un peptide signal, l'absence de production pourrait être expliquée par une forte instabilité du produit final et donc, par une dégradation rapide de la protéine dans le milieu de culture.

### 3.5 Production de l'ORF de *S. suis*.

Le mécanisme pathologique de *S. suis* n'est pas bien défini, et bien que plusieurs facteurs de virulence aient été identifiés, leur rôle dans la pathogenèse et les maladies ne sont pas élucidés. Plusieurs protéines codées par des ORF (pour «open-reading-frame») sont présentement à l'étude pour leur rôle dans la virulence de *S. suis* de type 2. L'obtention de ces protéines sous forme recombinante est présentement à l'essai. Puisque *S. suis* est une bactérie à Gram positif, le système de sécrétion de *S. lividans* représente une alternative à mettre à l'essai.

Le gène codant pour la protéine ORF de *S. suis* a été fourni par l'équipe du Dr Josée Harel (Institut de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe). Ce gène est amplifié par PCR et a les sites *Hind*III et *Sph*I aux extrémités. Le gène a été inséré par une double digestion à l'aide des enzymes de restriction appropriées dans le vecteur pDOT42. Plusieurs essais ont été nécessaires pour l'insertion du gène dans le plasmide. Une des causes de la difficulté d'insertion est la présence de plusieurs séquences répétées dans le gène. Un seul transformant ayant l'insert a été obtenu et inoculé dans le milieu de culture minimal M14-xylose et cultivé à une température de 34 °C. Des échantillons de 1 ml du surnageant de culture ont été récoltés à des intervalles de 24 heures pour une durée totale de 144 heures. Des échantillons de 20 µL ont été utilisés pour tester la présence de la protéine par SDS-PAGE (figure 18). Les tests effectués n'ont révélé aucune production de la protéine de 100

kDa attendue de *S. suis* par *S. lividans*. La présence de plusieurs séquences répétées peut mener à une instabilité du vecteur, expliquant ainsi les résultats. Le peu d'informations, relatives au gène codant pour la protéine, empêche l'étude plus poussée de la production.

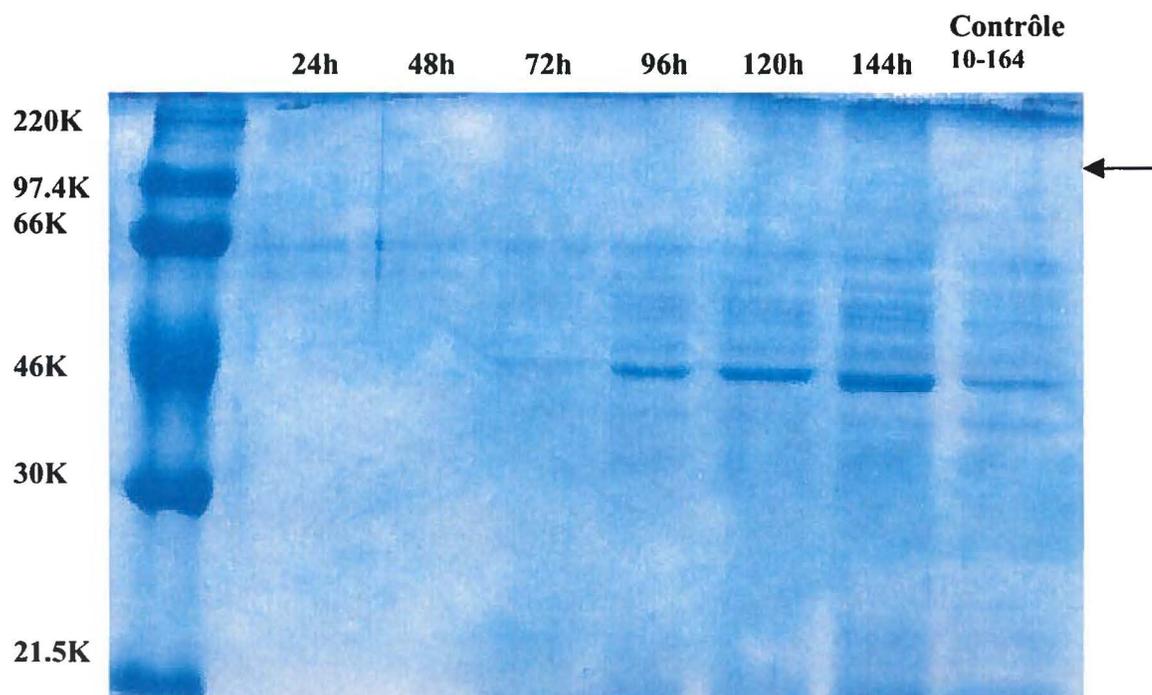


Figure 20 : SDS-PAGE des protéines du surnageant de culture de *S. lividans* exprimant la protéine ORF de *S. suis* dans le vecteur pDOT42. La flèche indique le poids moléculaire attendu pour la protéine.

## **Conclusion**

Dans cette étude, les améliorations des peptides signaux de *S. lividans* qui avaient été effectuées lors d'études antérieures devaient être utilisées pour la production de diverses protéines homologues et hétérologues. Ces modifications du peptide signal comportaient l'utilisation de deux codons d'initiation de la traduction (ATG) doublant la synthèse protéique et la présence d'une séquence de 8 nucléotides, complémentaire à l'ARNr 16S, permettant encore l'augmentation du taux de traduction (Kébir *et al.*, 2000). Jusqu'à maintenant, ce système avait été testé pour la production d'une xylanase de *S. lividans* et permettait d'obtenir un rendement de 2,35 g/L de cet enzyme.

Au départ, le vecteur pIAF911-A.8 construit pour l'étude de l'optimisation des peptides signaux comportait plusieurs éléments limitant son utilisation pour les essais envisagés dans cette étude. En effet, la présence d'un seul site de restriction en aval du peptide signal, le sites *KpnI*, ne permettait pas une versatilité dans le clonage de gènes recombinants. D'autre part, les diverses manipulations chez *S. lividans* étaient un obstacle à l'obtention rapide des clones. Ainsi, la construction de vecteurs navettes permettant l'insertion des gènes dans une cassette de clonage, le dépistage rapide des clones positifs chez *E. coli* puis l'expression des gènes chez *S. lividans* a été effectuée. La production de xylanase par les clones transformés avec ces vecteurs navettes pouvait ensuite être comparée à celle obtenue par un clone possédant le vecteur pIAF911-A.8.

La production de xylanase A des différents clones a été évaluée après l'inoculation des spores dans un milieu de culture minimal. Tous les clones possédant un vecteur navette ont montré une diminution de la production de près de 100 fois en comparaison du vecteur témoin. La diminution était toutefois moins grande lors de l'utilisation du mycélium des clones fraîchement transformés. Certains facteurs ont été analysés et n'ont pu expliquer les résultats. Premièrement, pour contrer l'accumulation d'ADN simple brin chez *S. lividans* (Pigac *et al.*, 1988; Dyson et Evans 1996), le fragment *Sti* du vecteur pIJ101, permettant l'initiation de l'ADN double brin a été inséré dans le vecteur. Aucun changement sur la production de xylanase A à partir du vecteur navette n'a été observé. Deuxièmement, la réinsertion des sites *KpnI* et *PstI*, situés dans une région reconnue comme essentielle à la stabilité des plasmides (Kieser *et al.*, 1982) n'a pas entraîné de changement dans la production. Finalement, l'élimination du site d'initiation de l'ADN simple brin présent dans la section *E. coli* du vecteur pTZ19 n'a eu qu'un effet restreint sur la production de xylanase

A2. Ainsi, la baisse importante de production serait imputable à un élément inconnu présent dans l'ADN de *E. coli* qui provoque la chute du nombre de copies des vecteurs navettes. En effet, dans les spores, si le nombre de copies des vecteurs se répliquant uniquement chez *S. lividans* a été évalué à environ 150 copies, seulement quelques traces sont présentes dans le cas des différents vecteurs navettes. Un seul vecteur navette, pIAF911-A.8-pUC19, a conservé un nombre élevé de copies du plasmide lors de la sporulation des cellules. Cependant, la faible production obtenue à l'aide de ce vecteur confirme le fait que la constructions de vecteurs navettes ne permet pas la production adéquate de protéines. Ces résultats corroborent le fait que bien que plusieurs vecteurs navettes *E. coli/S. lividans* aient été construits (Moreau *et al.*, 1991; Denis et Brzezinski, 1992; Dyson et Evans, 1996) aucun n'a été utilisé, jusqu'à maintenant, pour la production de protéines recombinantes chez *S. lividans*. Ils peuvent être utilisés dans une certaine mesure pour le dépistage rapide des protéines recombinantes si l'on utilise les colonies fraîchement transformées. Cependant, ils ne peuvent être utilisés pour une étude plus poussée de la production à l'aide de cellules physiologiquement identiques et la conservation des souches recombinantes sous la forme de spores. Ainsi, l'utilisation de vecteurs se répliquant uniquement chez *S. lividans* s'est montrée beaucoup plus adéquate pour les essais envisagés dans l'étude.

Le vecteur pDOT42, qui se réplique uniquement chez *S. lividans*, peut être utilisé pour la production de protéines recombinantes. Bien que les résultats obtenus à l'aide de ce vecteur pour la production de xylanase A sont de moitié ceux obtenus à l'aide du vecteur témoin pIAF911-A.8, il est plus versatile que ce dernier. En effet, le vecteur pDOT42 possède une cassette de clonage multiple constituée des sites de restriction unique *KpnI*, *HindIII*, *BglII*, *EcoRI*, *SphI* et *XbaI* et située en aval du peptide signal long muté de la cellulase A.

Lors des essais de production des diverses protéines homologues et hétérologues, les résultats obtenus permettent de confirmer ce qui avait été observé auparavant dans d'autres études. Premièrement, il faut remarquer que les protéines qui ont été produites en grande quantité proviennent de gènes possédant une séquence riche en G-C. En effet, le système utilisé a permis la surproduction de la cellulase B de *S. lividans* et de deux protéines de *M. tuberculosis*. De plus, ces gènes ne possédaient pas de codons TTA, rarement retrouvés chez *S. lividans* et qui auraient pu limiter la traduction. Dans le cas des protéines d'*E. coli*, les

gènes ne possédaient pas une séquence riche en G-C, telle que retrouvée chez *S. lividans*, et contenaient aussi plusieurs codons TTA pouvant expliquer les résultats. Cependant, dans le cas de la MMP9 de souris, le remplacement des deux codons TTA dans le gène n'a pas entraîné la production de la protéine. Ces résultats démontrent l'importance de l'usage des codons pour la production de protéines par *S. lividans*.

Deuxièmement, l'ajout d'une séquence codant pour six histidines en 5' ou 3' des gènes n'a pas permis la récupération des protéines. De plus, une hétérogénéité du N-terminal des protéines de 39 et 19 kDa de *M. tuberculosis* a été observée. Tel que décrit par Paradis *et al.* (1996), la souche de *S. lividans* utilisée sécrète des enzymes protéolytiques dans le milieu de culture qui peuvent éliminer des acides aminés au N-terminal et au C-terminal des protéines sécrétées. Ces résultats démontrent que le développement de souches qui ne produiraient pas de protéases serait un atout majeur dans la promotion de *S. lividans* comme alternative pour la production de protéines hétérologues. De plus, Il serait intéressant de tester l'utilisation d'une structure beaucoup plus stable, telle le CBD fusionné à la protéine recombinante, pour la récupération des protéines. Il est maintenant reconnu que l'interaction entre la protéine recombinante et le domaine peut avoir un effet stabilisateur sur les protéines hétérologues sécrétées dans le milieu de culture (Richins *et al.*, 2000).

Il est important de noter que les protéines produites en grande quantité dans cette étude sont celles qui se replient naturellement à la suite de leur translocation dans le surnageant de culture et dont la structure tertiaire est probablement la plus stable. Ainsi, le système Sec dépendant qui implique l'utilisation d'un peptide signal est efficace pour ce type de protéines. Dans le cas de la protéine EspD de *E. coli*, elle est habituellement sécrétée selon les conditions environnementales et le contact entre la cellule de l'hôte et la bactérie par un système de sécrétion de type III. Ainsi, cette protéine est peut-être exprimée par *S. lividans* mais le système utilisé ne permet pas leur sécrétion efficace dans le milieu de culture. Les protéines intracellulaires n'ont pas été prises en considération dans l'étude puisque l'utilisation de *S. lividans* comme système de production alternatif repose sur les capacités de son système de sécrétion.

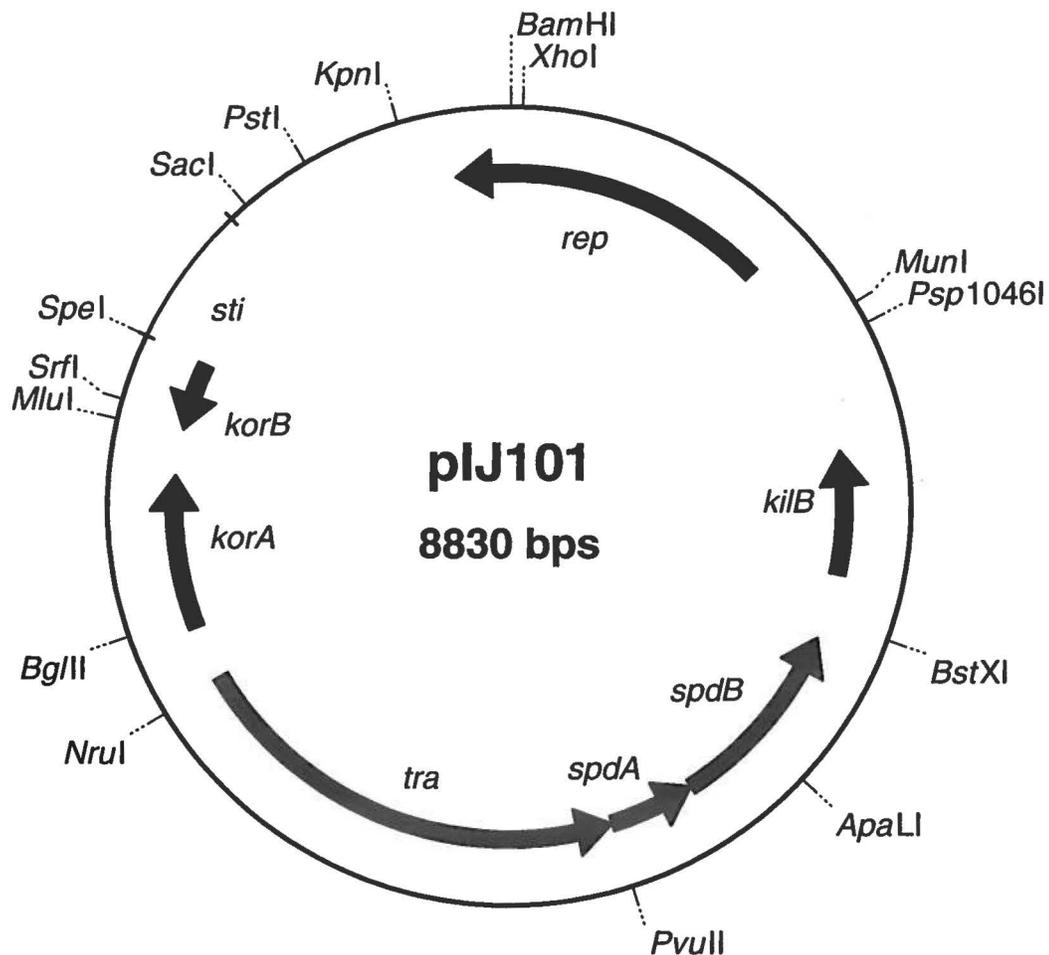
Malgré une certaine protéolyse, cette étude démontre pour la première fois la production de protéines de *M. tuberculosis* par *S. lividans*. Les quantités obtenues de près de 500 mg/L, jugées selon la coloration au bleu de Coomassie, dépassent grandement celles

obtenues à l'aide des autres systèmes utilisés jusqu'à maintenant. En effet, dans le cas de la lipoprotéine de 19 kDa, les meilleurs résultats dénotaient la production de 5 mg/L dans l'espace périplasmique d'*E. coli* (Prestidge *et al.* 1995). De plus, la sécrétion de ces protéines dans le milieu de culture et leur présence comme protéine majeure a permis leur purification avec un rendement de 200 mg/L après passage sur un tamis moléculaire (résultats non-présentés). Ces protéines peuvent maintenant être testées pour leur capacité à induire une réponse immunitaire.

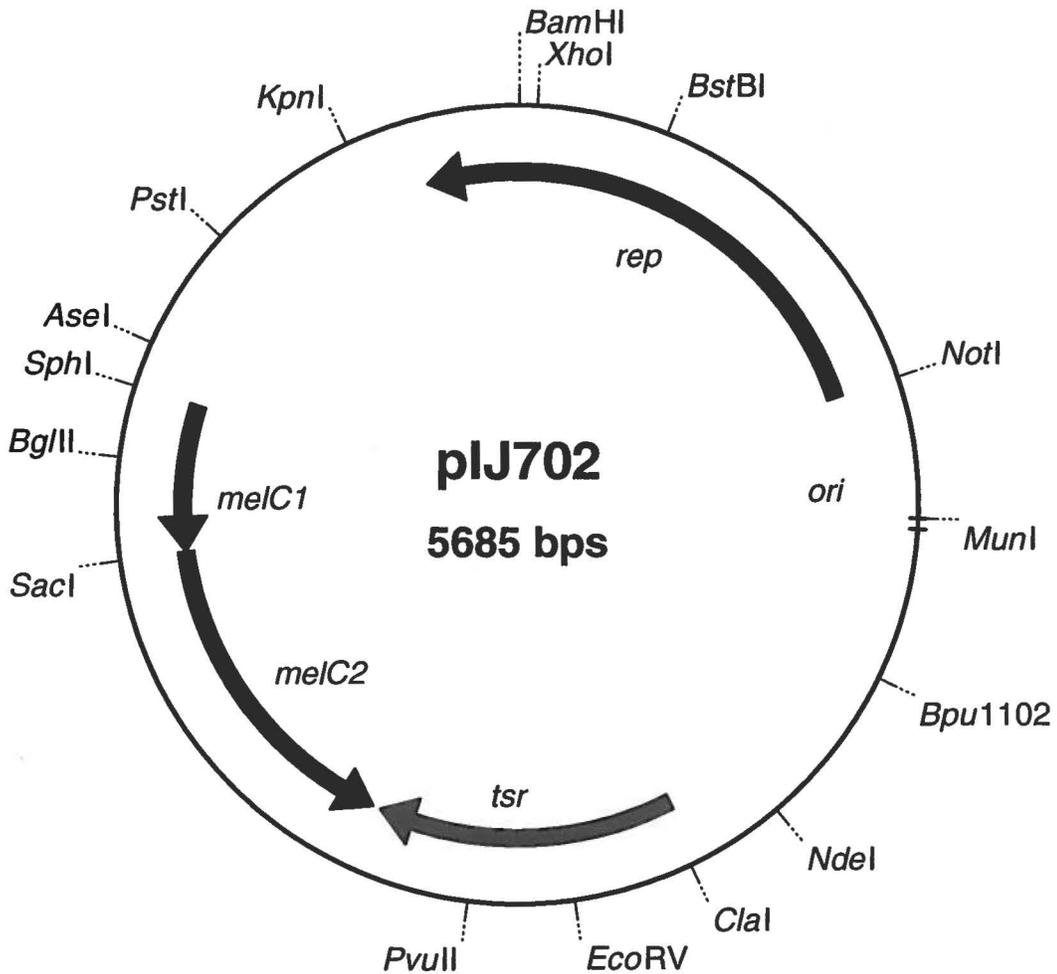
Il est important de noter que la production des protéines a été effectuée dans un milieu minimal. Si les conditions de culture sont optimisées, ce qui reste à réaliser, elles peuvent avoir un impact significatif sur la production de protéines (Bertrand *et al.*, 1989; Erpicum *et al.*, 1990; Lee et Lee, 1994). Finalement, même si leur capacité à glycosyler les protéines a déjà été démontrée (MacLeod *et al.*, 1992), les modifications apportées aux protéines par *S. lividans*, suite à leur translocation dans le milieu de culture, restent à être mieux définies.

## **Appendice A**

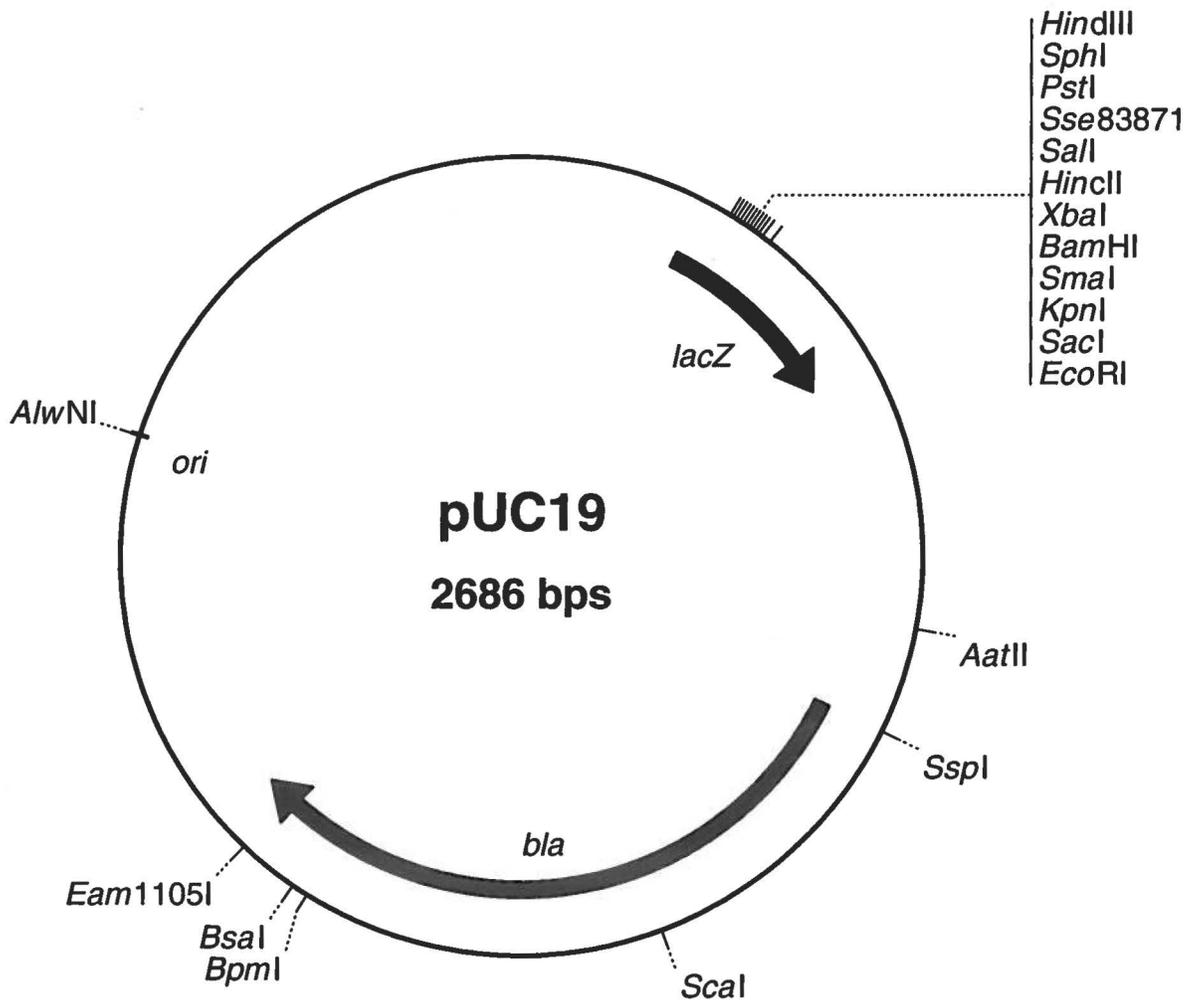
Vecteurs utilisés ou présentés dans l'étude.



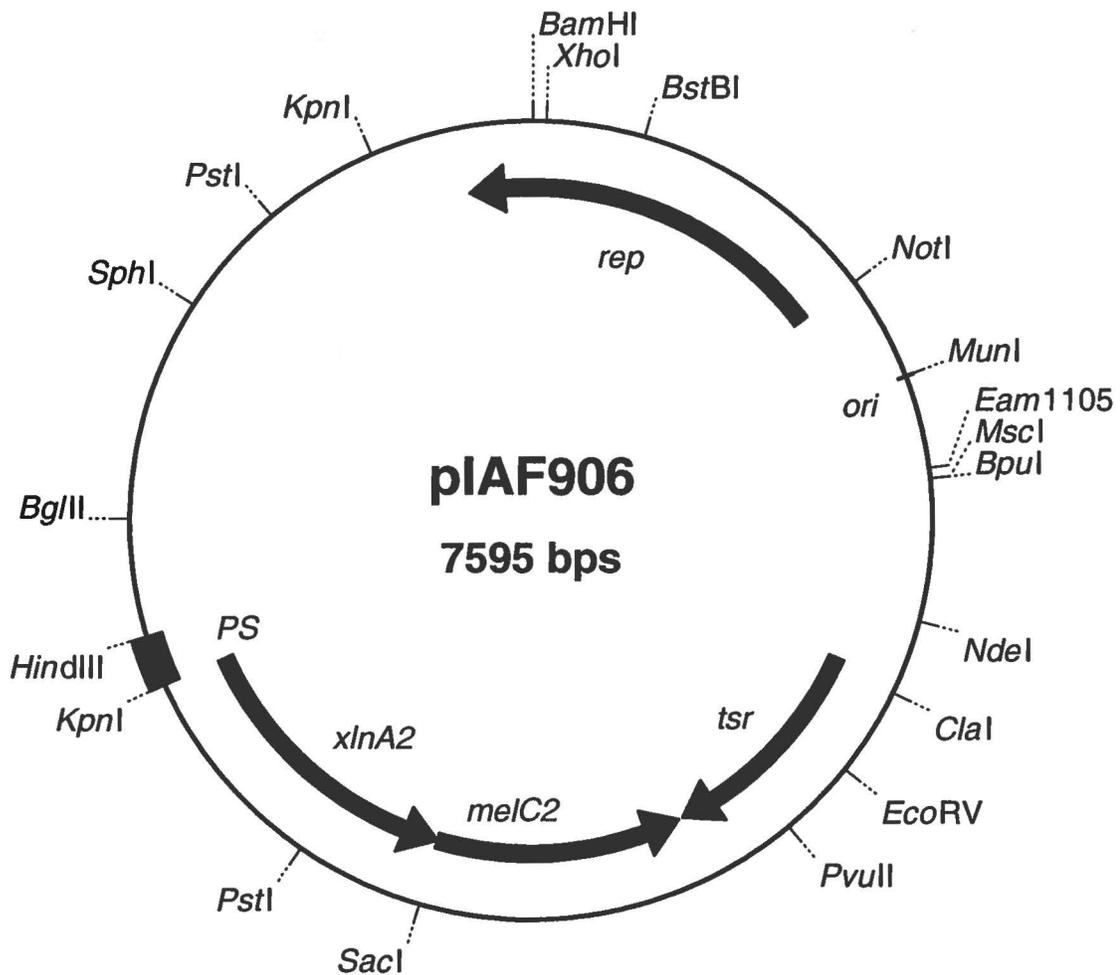
Carte de fonctions et des sites de restriction du vecteur pIJ101 (Kendall et Cohen, 1988) : *ori*, origine du double brins lors de la réplication sous le mode de cercle roulant; *rep*, protéine de réplication; *sti*, locus responsable d'une «forte incompatibilité»; *tra*, protéine de transfert; *korA*, répresseur pour *tra* et lui-même; *spdA*, gènes «spread»; *kilB*, gène léthal en l'absence de *korB*; *korB*, régulateur de *kilB*. Il est à noter que seuls les sites uniques de restriction sont représentés dans cette carte.



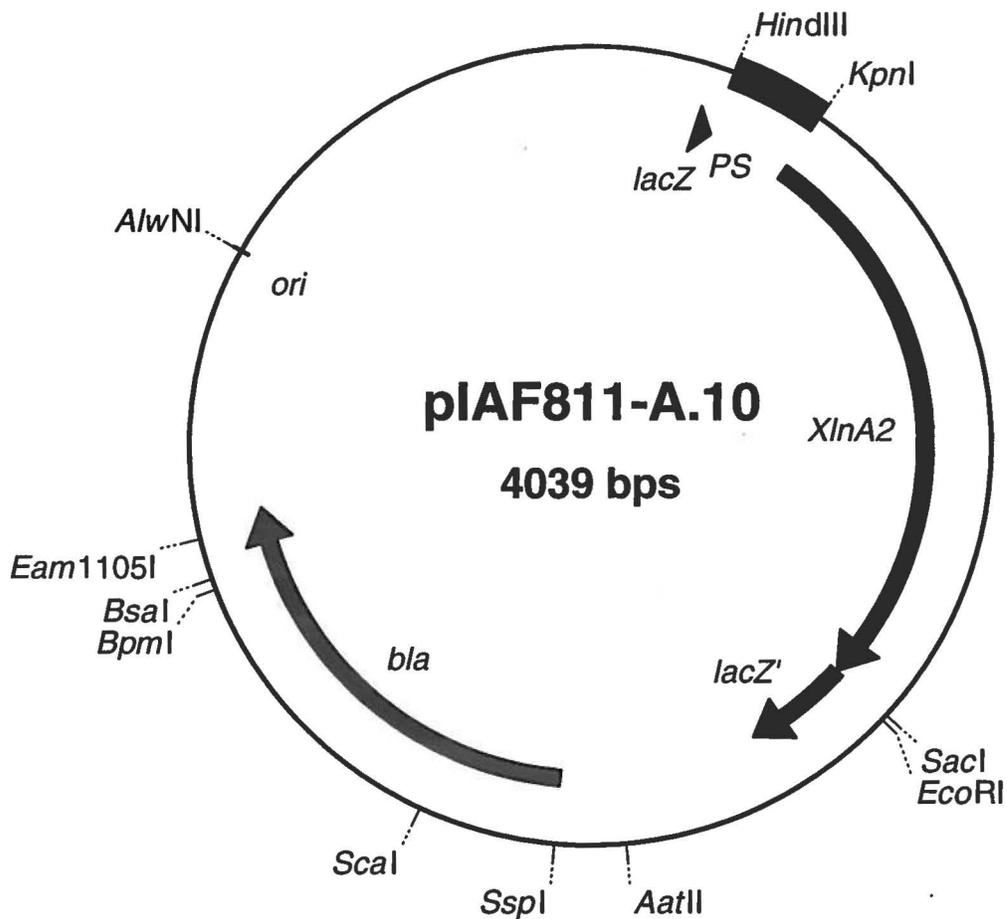
Carte des fonctions et des sites de restriction de pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) : *ori*, origine du double brins lors de la réplication sous le mode de cercle roulant; *rep*, protéine de réplication; *melC1*, *trans*-activateur de *melC2*; *melC2*, protéine apotyrosinase de *S. antibioticus*; *tsr*, gène de résistance au thioestrepton de *S. azureus*. Il est à noter que seuls les sites uniques de restriction sont représentés dans cette carte.



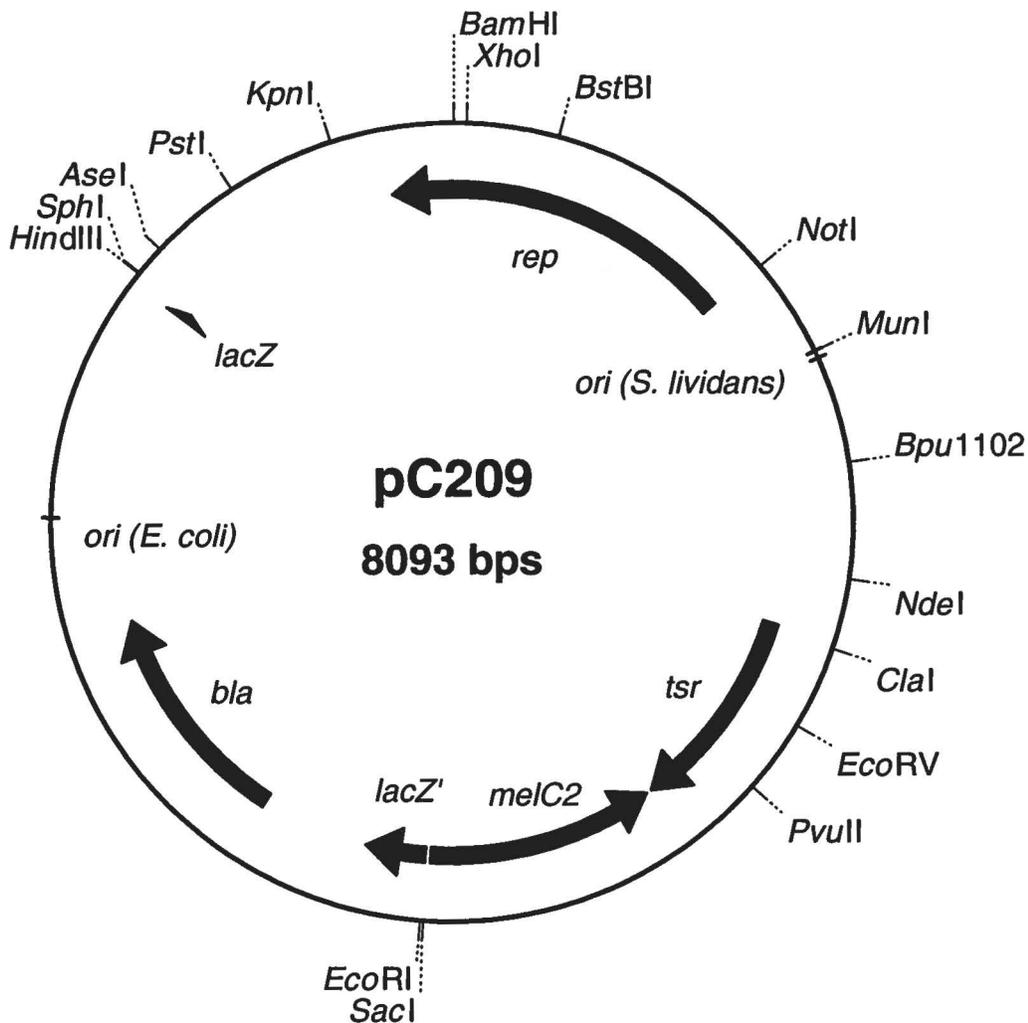
Carte des fonctions et des sites de restriction de pUC19 : *ori*, origine de répllication; *bla*, gène de résistance à l'ampicilline; *lacZ*, fragment amino-terminal du produit du gène *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase). Il est à noter que seuls les sites uniques de restriction sont représentés dans cette carte.



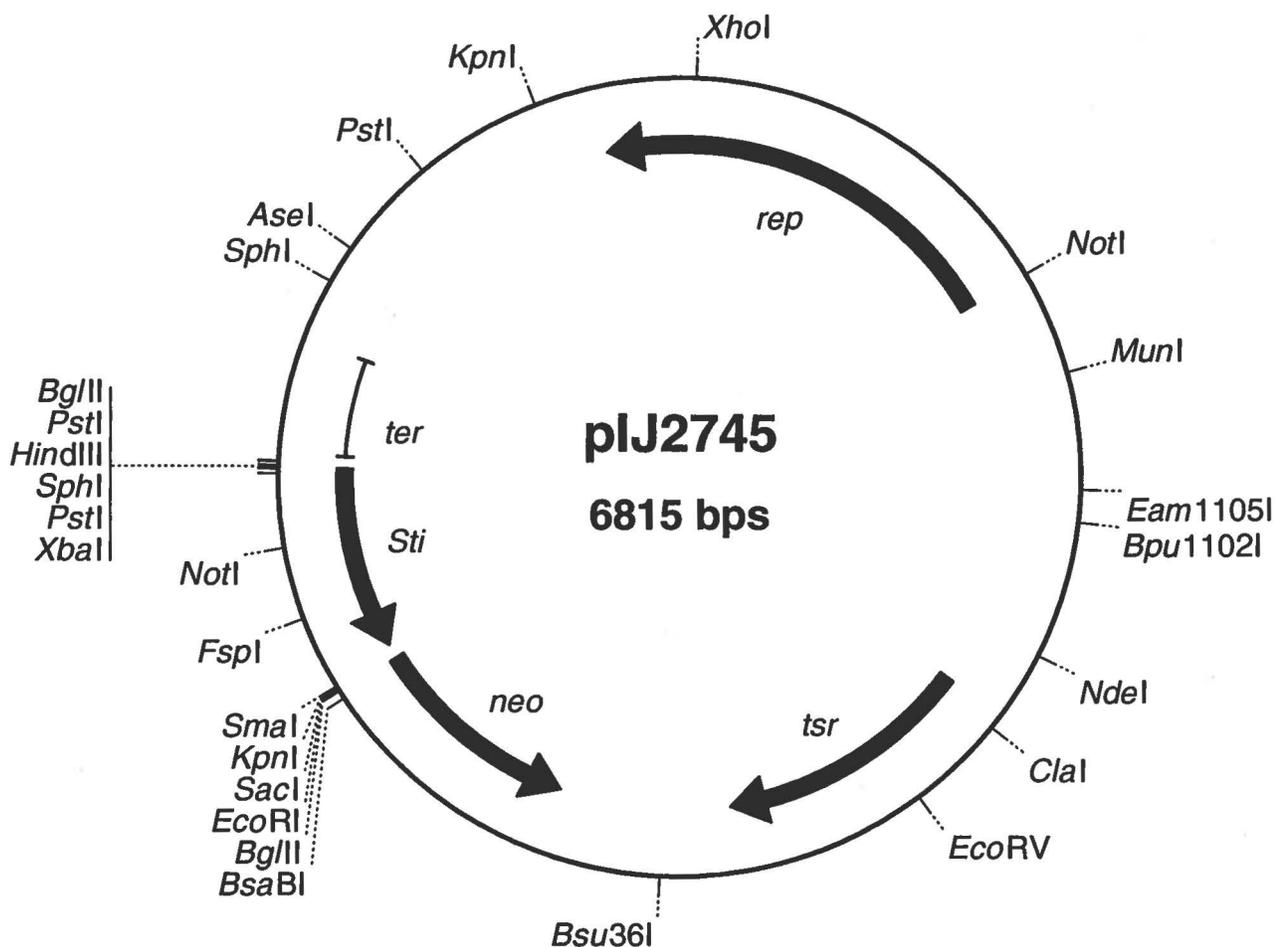
Carte des fonctions et des sites de restriction de pIAF906 (Pagé *et al.*, 1996) : *ori*, origine du double brins lors de la réplication sous le mode de cercle roulant; *rep*, protéine de réplication; *melC2*, protéine apotyrosinase de *S. antibioticus*; *tsr*, gène de résistance au thioestrepton de *S. azureus*; *xlnA2*, gène de la xylanase A tronquée de *S. lividans*; *PS*, peptide signal de la xylanase A.



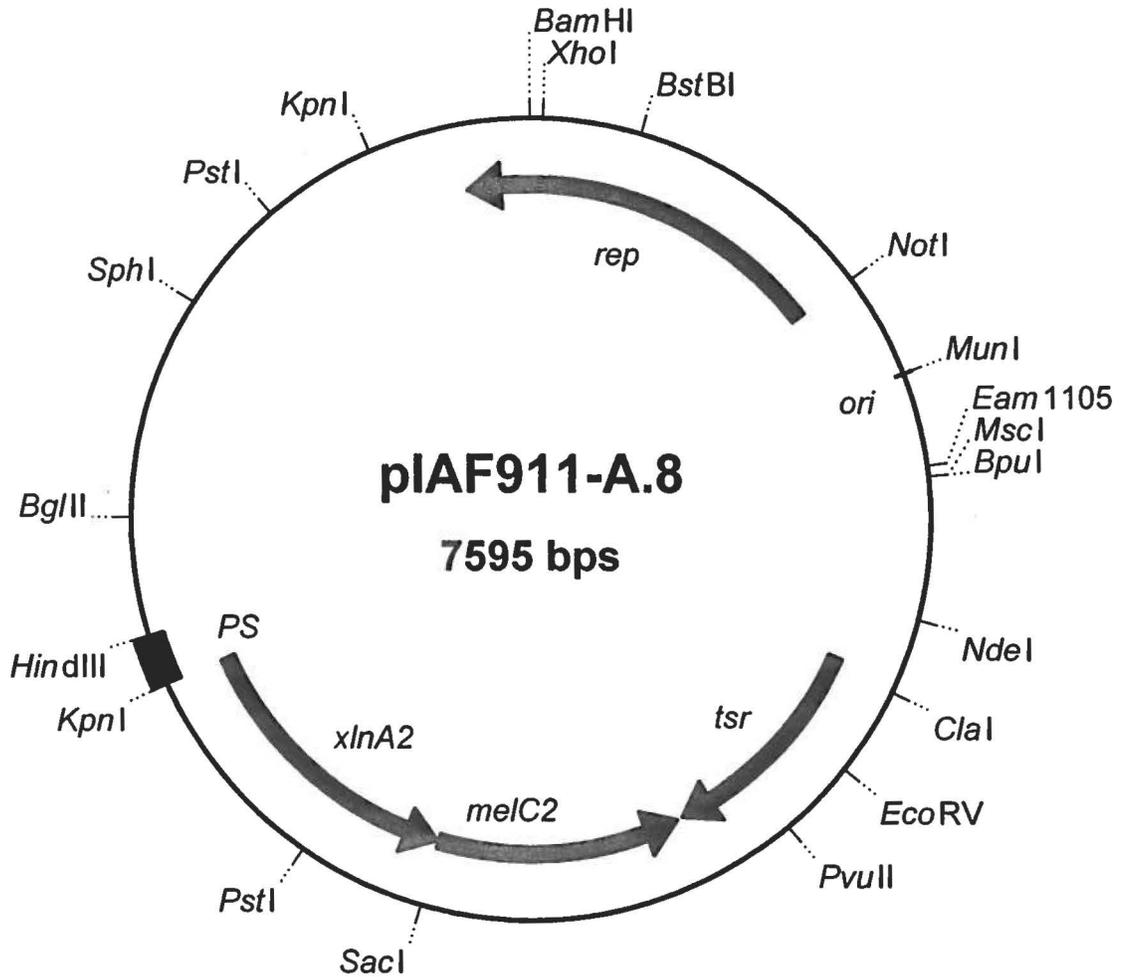
Carte des fonctions et des sites de restriction de pIAF811-A.10 (Kébir *et al.*, 2000) : *ori*, origine de réplication; *bla*, gène de résistance à l'ampicilline; *lacZ*, fragment amino-terminal du produit du gène *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase); *xlnA2*, gène de la xylanase A tronquée de *S. lividans*; *PS*, peptide signal de la cellulase A long muté (séquence de 10 nucléotides complémentaires à l'ARNr 16S). Il est à noter que seuls les sites uniques de restriction sont représentés dans cette carte.



Carte des fonctions et des sites de restriction de pC209 : *ori (S. lividans)*, origine du double brins lors de la réplication sous le mode de cercle roulant; *rep*, protéine de réplication; *ori (E. coli)*, origine de réplication; *bla*, gène de résistance à l'ampicilline; *lacZ*, fragment amino-terminal du produit du gène *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase); *melC2*, protéine apotyrosinase de *S. antibioticus*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton de *S. azureus*; Il est à noter que seuls les sites uniques de restriction sont représentés dans cette carte.



Carte des fonctions et des sites de restriction de pIJ2745 (Deng *et al.*, 1988) : *rep*, protéine de réplication; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton de *S. azureus*; *neo*, gène de la néomycine phosphotransférase, sans son promoteur; *Sti*, locus responsable d'une «forte incompatibilité»; *ter*, terminateur de transcription du phage fd.



Carte des fonctions et des sites de restriction de pIAF911-A.8 (Kébir *et al.*, 2000) : *ori*, origine du double brins lors de la réplication sous le mode de cercle roulant; *rep*, protéine de réplication;; *melC2*, protéine apotyrosinase de *S. antibioticus*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton de *S. azureus*; *xlnA2*, gène de la xylanase A tronquée de *S. lividans*; *PS*, peptide signal long muté de la cellulase A.

## **Bibliographie**

- ABOU-ZEID, C., M.-P. Gares, J. Inwald, R. Janssen, Y. Zhang, D. B. Young, C. Hetzel, J. R. Lamb, S. L. Baldwin, I. M. Orme, V. Yermeev, B. V. Nikonenko et A. S. Apt. 1997. «Induction of a Type 1 Immune Response to a Recombinant Antigen from *Mycobacterium tuberculosis* Expressed in *Mycobacterium vaccae*». Infection and Immunity, vol. 65, no. 5, p. 1856-1862.
- ABRAHMSEN, L., T. Moks, B. Nilsson, U. Hellman et M. Uhlen. 1985. «Analysis of signals for secretion in the staphylococcal protein A gene». EMBO Journal, vol. 4, p. 3901-3906.
- ADHYA, S., et M. Gottesman. 1978. «Control of transcription termination». Annual Review of Biochemistry, vol. 47, p. 967-996.
- AN, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels et J. Harel . 1999. «Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 473, p. 179-184.
- ANDERSEN A. B., et E. B. Hansen. 1989. «Structure and Mapping of Antigenic Domains of Protein Antigen b, a 38,00-Molecular-Weight Protein of *Mycobacterium tuberculosis*». Infection and Immunity, vol. 57, no. 8, p. 2481-2488.
- ANDERSEN, A. B., L. Ljungqvist et M. Olsen. 1990. «Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism». Journal of General Microbiology, vol. 136, p. 477-480.
- ANDERSEN, A. B., P. Andersen et L. Ljungqvist. 1991. «MPB64 Possesses "tuberculosis-complex"-specific B- and T-cell epitopes». Scandinavian Journal of Immunology, vol. 34, p. 365-372.
- ANDERSEN, P., et I. Heron. 1993. «Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*». Journal of Immunology, vol. 61, p. 844-851.
- ANDERSEN, P., A. B. Andersen, A. L. Sorensen et S. Nagai. 1995. «Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice». Journal of Immunology, vol. 154, p. 3359-3372.
- ANNÉ, J., et L. Van Mellaert. 1993. «*Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production». FEMS Microbiology Letters, vol. 114, p. 121-8.
- ARCAND, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli et F. Shareck. 1993. «Beta-Mannanase of *Streptomyces lividans* 66: clóning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme». Biochemical Journal, vol. 290, p. 857-863.

- ASHBRIDGE, K. R., R. J. Booth, J. D. Watson et R. B. Lathigra. 1989. «Nucleotide sequence of the 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*». Nucleic Acids Research, vol. 17, p. 1249.
- ASHBRIDGE, K. R. 1991. «The 19 kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*». Thesis, University of Auckland. New Zealand.
- BARNES, P. F., V. Mehra, B. Rivoire, S.-J. Fong, P. J. Brennan, M. S. Voegtline, P. Minden, R. A. Houghten, B. R. Bloom et R. L. Modlin. 1992. «Immunoreactivity of 10-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*». Journal of Immunology, vol. 148, no. 6, p. 1835-1840.
- BEHR, M. A., et P. M. Small. 1997. «Has BCG attenuated to impotence?». Nature, vol. 389, no. 6647, p. 133-134.
- BENNETZEN, J. L., et B. D. Hall. 1982. «Codon selection in yeast». Journal of Biological Chemistry, vol. 257, p. 3026-3031.
- BERTRAND, J. L., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel. 1989. «Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates». Biotechnology Engineering, vol. 33, p. 791-794.
- BERKS, B. C., F. Sargent et T. Palmer. 2000. «The Tat protein export pathway». Molecular Microbiology, vol. 35, no. 2, p. 260-274.
- BIBB, M. J., M. J. Bibb, J. M. Ward et S. N. Cohen . 1985. «Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces*». Molecular and General Genetics, vol. 199, no. 1, p. 26-36.
- BOESEN, H., B. N. Jensen, T. Wilcke et P. Andersen. 1995. «Human T-cell response to secreted antigen fraction of *Mycobacterium tuberculosis*». Infection and Immunity, vol. 63, no. 4, p. 1491-1497.
- BRAIBANT, M., L. De Wit, P. Peirs, M. Kalai, J. Ooms, A. Drowart, K. Huygen et J. Content. 1994. «Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 88, a protein related to the *Escherichia coli* PstA periplasmic phosphate permease subunit». Infection and Immunity, vol. 62, no. 3, p. 849-854.
- BUCHANAN, T. M., H. Nomaguchi, D. C. Anderson, R. A. Young, T. P. Gillis, W. J. Britton, J. Ivanyi, A. H. J. Kolk, O. Closs, R. Bloom et V. Mhera. 1986. «Characterization of mycobacterial species specificity of 14 separate epitopes which reacted with monoclonal antibodies to the 65,000 molecular weight protein molecule of *Mycobacterium leprae*». Leprae Review, vol. 57, no. 2, p. 63-66.

- BUTNER, M. J., K. F. Chater et M. J. Bibb. 1990. «Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2)». Journal of Bacteriology, vol. 172, p. 3367-3378.
- CADENAS, R. F., J. A. Gil et J. F. Martin. 1992. «Expression of *Streptomyces* genes encoding extracellular enzymes in *Brevibacterium lactofermentum*: secretion proceeds by removal of the same leader peptide as in *Streptomyces lividans*». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 38, p. 362-369.
- CHATER, K. F., et D. A. Hopwood. 1984. «*Streptomyces* genetics». The Biology of the Actinomycetes. London. Academic Press: M. Goodfellow, M. Mordarski et S. T. Williams., 229 p.
- CHEN, L.-Y., W.-M. Leu, K.-T. Wang et Y.-H. W. Lee. 1992. «Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its *trans*-activator MelC1». Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 28, p. 20100-20107.
- COUGHLAN, M. P. 1985. «The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application». Biotechnology and Genetic Engineering Review, vol. 3, p. 39.
- CRAMERI, R., J. E. Davies et R. Hutter. 1986. «Plasmid Curing and Generation of Mutations Induced with Ethidium Bromide in Streptomycetes». Journal of General Microbiology, vol. 132, p. 819-824.
- DAZA, A., J. A. Gil, T. Vigal et J. F. Martin. 1990. «Cloning and characterization of a gene of *Streptomyces griseus* that increase production of extracellular enzymes in several species of *Streptomyces*». Molecular and General Genetics, vol. 222, p. 384-392.
- DAZA, A., J. F. Martin, T. Vigal et J.A. Gil. 1991. «Analysis of the promoter region of *saf*, a *Streptomyces griseus* gene that increase production of extracellular enzymes». Gene, vol. 108, p. 63-71.
- DÉLIC, I., P. Robbins et J. Westpheling . 1992. «Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, p. 1885-1889.
- DENG, Z., T. Kieser et D. A. Hopwood. 1988. «"Strong incompatibility" between derivatives of the *Streptomyces* multi-copy plasmid pIJ101». Molecular and General Genetics, vol. 214, p. 286-294.

- DENIS, F. et R. Brzezinski. 1991. «An improved aminoglycoside resistance gene cassette for use in Gram-negative and *Streptomyces*». FEMS Microbiological Letters. Vol. 65, no. 3, p. 261-264.
- DENIS, F. et R. Brzezinski. 1992. «A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycètes». Gene. Vol. 111, no. 1, p. 115-118.
- DIETZ, A. 1986. «Structure and taxonomy of *Streptomyces*». The Bacteria: A Treatise on structure and function. New York. Academic Press: J. R. Sokatch et L. N. Ornston.
- DOLIN, P. J., M. C. Raviglone et A. Kochi. 1994. «Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000». Bulletin of the World Health Organization, vol. 72, p. 213-220.
- DUDANI, A. K., et R. S. Gupta, 1989. «Immunological characterization of a human homolog of the 65-kilodalton mycobacterial antigen». Infection and Immunity, vol. 57, no. 9, p. 2786-2793.
- DYSON, P. J., et M. Evans. 1996. «pUCS75, a stable high-copy-number *Streptomyces*-*Escherichia coli* shuttle vector which facilitates subcloning from pUC plasmid and M13 phage vectors». Gene, vol. 171, p. 71-73.
- ENGELS, J. W., et K.- P. Koller. 1992. «Gene expression and secretion of eukaryotic foreign proteins in *Streptomyces*». Transgenesis. New York. John Wiley & Sons: J. A. H. Murray.
- ERPICUM, T., B. Granier, M. Delcour, V. M. Lenzini, M. Nguyen-Distèche, J. Dusart et J.-M. Frère. 1990. «Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains : influence of culture conditions». Biotechnology Engineering, vol. 35, p. 719-726.
- ESPITIA, C., M. Elinos, R. Hernandez-Pando et R. Mancilla. 1992. «Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy». Infection and Immunity, vol. 60, p. 2998-3001.
- FAB, S. H., et J. W. Engels. 1996. «Influence of Specific Signal Peptide Mutations on the Expression and Secretion of the alpha-Amylase Inhibitor Tendamistat in *Streptomyces lividans*». Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 25, p. 15244-15252.
- FATH, M. J., et R. Kolter. 1993. «ABC transporters: bacterial exporters». Microbiological Reviews, vol. 57, no. 4, p. 995-1017.

- FINK, D., I. Boucher, F. Denis et R. Brzezinski. 1991. «Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of a chitosanase-encoding gene from the actinomycete *kitasatosporia* N174 isolated from soil». Biotechnology Letters, vol. 13, no. 12, p.845-850.
- GARBE, T., D. Harris, M. Vordermeier, R. Lathigra, J. Ivanyi et D. Young. 1993. «Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation» . Infection and Immunity, vol. 61, no. 1, p. 260-267.
- GEORGE, H. J., P. Marchand, K. Murphy, B. H. Wiswall, R. Dowling, J. Giannaras, G. F. Hollis, J. M. Trzaskos et R. A. Copeland. 1997. «Recombinant Human 92-kDa Type IV Collagenase/ Gelatinase from Baculovirus-Infected Insect Cells: Expression, Purification, and Characterization». Protein Expression and Purification, vol. 10, p. 154-161.
- GHANGAS, G. S., et D. B. Wilson. 1987. «Expression of a *Thermomonospora fusca* Cellulase Gene in *Streptomyces lividans* and *Bacillus subtilis*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 53, p. 1470-1475.
- GILBERT, M., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel. 1995. «Production and Secretion of Proteins by Streptomycetes». Critical Reviews in Biotechnology, vol. 15, no. 1, p. 13-39.
- GUSEK, T. W., et J. E. Kinsella. 1992. «Review of *Streptomyces lividans*/Vector pIJ702 System for Gene Cloning». Critical Reviews in Microbiology, vol. 18, no. 4, p. 247-260.
- HALE, V., M. McGrew, B. Carlson et J. L. Schottel. 1992. «Heterologous Expression and Secretion of a *Streptomyces scabies* Esterase in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*». Journal of Bacteriology, vol. 174, no. 8, p. 2431-2439.
- HARBOE, M., et H. G. Wiker. 1992. «The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review». Journal of Infectious Diseases, vol. 166, p. 874-884.
- HARTH, G., B.-Y. Lee et M. A. Horwitz. 1997. «High-Level Heterologous Expression and Secretion in Rapidly Growing Nonpathogenic Mycobacteria of Four Major *Mycobacterium tuberculosis* Extracellular Proteins Considered To Be Leading Vaccine Candidates and Drug Targets». Infection and Immunity, vol. 65, no. 6, p. 2321-2328.
- HOLMES, W. M., T. Platt et M. Rosenberg. 1983. «Termination of transcription in *Escherichia coli*». Cell, vol. 32, no. 4, p. 1029-1032.

- HOPWOOD, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward et H. Schrempf. 1985. Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual. Norwich. John Innes Foundation: R. Crowe.
- HOSHIKO, S., O. Makabe, C. Nojiri, K. Katsumata, E. Satoh et K. Nagaoka. 1987. «Molecular Cloning and Characterization of the *Streptomyces hygroscopicus* alpha-Amylase Gene». Journal of Bacteriology, vol. 169, no. 3, p. 1029-1036.
- HURTUBISE, Y., F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli. 1995. «A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins». Molecular Microbiology, vol. 17, no. 2, p. 367-377.
- IKEMURA, T. 1981. «Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes». Journal of Molecular Biology, vol. 146, p. 1-21.
- INOKOSHI, J., H. Takeshima, H. Ikeda et S. Ômura. 1993. «Efficient production of aculeacin A acylase in recombinant *Streptomyces* strains». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 39, p. 532-536.
- KATAOKA, M., S. Kosono et G. Tsujimoto. 1999. «Spatial and temporal regulation of protein expression by *bldA* within a *Streptomyces lividans* colony». FEBS Letters, vol. 462, no. 3, p. 425-429.
- KATZ, E., C. J. Thompson et D. A. Hopwood. 1983. «Cloning and Expression of the Tyrosinase Gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*». Journal of General Microbiology, vol. 129, p. 2703-2714.
- KÉBIR, H., C. Dupont et R. Morosoli. 2000. «Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide: dependence on box and inverted repeat sequence». Biochimica Et Biophysica Acta, vol. 1491, p. 177-184.
- KENDALL, K., et J. Cullum. 1984. «Cloning and expression of an extracellular-agarase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces lividans* 66». Gene, vol. 29, p. 315-321.
- KHAN, S. A. 1997. «Rolling-Circle Replication of Bacterial Plasmids». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 61, no. 4, p. 442-455.
- KIESER T., D. A. Hopwood, H. M. Wright et C. J. Thompson. 1982. «pIJ101, a Multi-Copy Broad Host-Range *Streptomyces* Plasmid: Functional Analysis and Development of DNA Cloning Vectors». Molecular and General Genetics, vol. 185, p. 223-238.

- KINASHI, H., M. Murayama, H. Matsushita et D. Nimi. 1993. «Structural analysis of the giant linear plasmid SCP1 in various *Streptomyces coelicolor* strains». Journal of General Microbiology, vol. 139, p. 1261-1269.
- KLUEPFEL, D., F. Shareck, F. Mondou et R. Morosoli. 1986. «Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 24, p. 230.
- KOLLER, K.-P., et G. Riess. 1989. «Heterologous Expression of the alpha-Amylase Inhibitor Gene Cloned from an Amplified Genomic Sequence of *Streptomyces tendae*». Journal of Bacteriology, vol. 171, no. 9, p. 4953-4957.
- KRESSE, A. U., M. Rohde et C. A. Guzman. 1999. «The EspD Protein of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Is Required for the Formation of Bacterial Surface Appendages and Is Incorporated in the Cytoplasmic Membranes of Target Cells». Infection and Immunity, vol. 67, no. 9, p. 4834-4842.
- LAI, L.-C., L. A. Wainwright, K. D. Stone et M. S. Donnenberg. 1997. «A Third Secreted Protein That Is Encoded by the Enteropathogenic *Escherichia coli* Pathogenicity Island Is Required for Transduction of Signals and for Attaching and Effacing Activities in Host Cells». Infection and Immunity, vol. 65, no. 6, p. 2211-2217.
- LAMMERTYN, E., L. Van Mellaert, S. Schacht, C. Dillen, E. Sablon, A. Van Broekhoven et J. Anné. 1997. «Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumour necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 1808-1813.
- LAMMERTYN, E., S. Desmyter, S. Schacht, L. Van Mellaert et J. Anné. 1998. «Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 49, p. 424-430.
- LEE, S. H. et K. J. Lee. 1994. «Kinetics of the repression of tylosin biosynthesis by ammonium ion in *Streptomyces fradiae*». Journal of biotechnology, vol. 32, no. 2, p. 149-156.
- LEE, Y.-H. W., Z.-Y. Tzecheng, S.-C. Wang, W.-L. Cheng et C. W. Chen. 1986. «Structural stability of heterologous genes cloned in *Streptomyces* plasmid pIJ702». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 140, no. 1, p. 372-378.

- LESKIW, B. K., E. J. Lawlor, J. M. Fernandez-Abalos et K. F. Chater. 1991. «TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 2461-2465.
- LEU, W-M., L-Y. Chen, L-L. Liaw et Y-W. W. Lee. 1992. «Secretion of the *Streptomyces* Tyrosinase Is Mediated through Its *trans*-Activator Protein, MelC1». The Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 28, p. 20108-20113.
- LIOTTA, L. A., K. Tryggvason, S. Garbisa, I. Hart, C. M. Foltz et S. Shafie. 1980. «Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen». Nature, vol. 284, p. 67-68.
- MACLEOD, A. M., N. R. Gilkes, L. Escote-Carlson, A. J. Warren, D. G. Kilburn et R. C. Miller Jr. 1992. «*Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi*». Gene, vol. 121, p. 143-147.
- MANDEL, M. et A. Higa. 1970. «Calcium-dependent bacteriophage DNA infection». Journal of Molecular Biology, vol. 53, no. 1, p. 159-162.
- MEAD, D. A., E. Szczena-Skorupa et B. Kemper. 1986. «Single-stranded DNA blue T7 promoter plasmids : a versatile tandem promoter for cloning and protein engineering». Protein Engineering, vol. 1, p. 67-74.
- MECSAS, J. J., et E. J. Strauss. 1996. «Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands». Emergence of Infection Disease, vol. 2, no. 4, p. 270-288.
- MEHLERT, A., et D. B. Young. 1989. «Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71 kD antigen, a member of the 70 kD heat-shock protein family». Molecular Microbiology, vol. 3, p. 125-130.
- MENDEZ, C. A., A. F. Brana, M. B. Manzanal et C. Hardisson. 1985. «Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*». Canadian Journal of Microbiology, vol. 31, p. 446-450.
- MILLER, G. L. 1959. «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar». Analytical Chemistry, vol. 31, p. 426-428.
- MOREAU, A., F. W. Paradis, R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel. 1991. «A novel shuttle vector for *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli* as a tool in site-directed mutagenesis». Canadian Journal of Microbiology, vol. 38, p. 350-353.
- MORODOMI, T., Y. Ogata, Y. Sasaguri, M. Morimatsu et H. Nagase. 1992. «Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells». Biochemical Journal, vol 285, no. 2, p. 603-611.

- MOROSOLI, R., F. Shareck et D. Kluepfel. 1997. «Protein secretion in streptomycetes». FEMS Microbiology Letters, vol. 146, p. 167-174.
- MUTH, G., M. Farr, V. Hartmann et W. Wohlleben. 1995. «*Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5: nucleotide sequence analysis of the self-transmissible minimal replicon and characterization of the replication mode». Plasmid, vol. 33, p. 113-126.
- NESMEYANOVA, M. A., A. L. Karamyshev, Z. N. Karamysheva, A. E. Kalinin, V. N. Ksenzenko et A. V. Kajva. 1997. «Positively charged lysine at the N-terminus of the signal peptide of the *Escherichia coli* alkaline phosphatase provides the secretion efficiency and is involved in the interaction with anionic phospholipids». FEBS Letters, vol. 403, p. 203-207.
- OETTINGER, T., et A. B. Andersen. 1994. «Cloning and B-Cell-Epitope Mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv». Infection and Immunity, vol. 62, no. 5, p. 2058-2064.
- OKADA, Y., Y. Gonoji, K. Naka, K. Tomita, I. Nakanishi, K. Iwata, K. Yamashita et T. Hayakawa. 1992. «Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT-1080 human fibrosarcoma cells». Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 21712-21719.
- PAGÉ, N., D. Kluepfel, F. Shareck et R. Morosoli. 1996. «Effect of Signal Peptide Alterations and Replacement on Export of Xylanase A in *Streptomyces lividans*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 1, p. 109-114.
- PAGÉ, N., D. Kluepfel, F. Shareck et R. Morosoli. 1996. «Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: Dependence on number of ribosome-binding sites». Nature Biotechnology, vol. 14, p. 756-759.
- PARADIS, F. W., F. Shareck, C. Dupont, D. Kluepfel et R. Morosoli. 1996. «Expression and secretion of  $\beta$ -glucuronidase and *Pertussis* toxin S1 by *Streptomyces lividans*». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 45, p. 646-651.
- PARRO, V., et R. P. Mellado. 1994. «Effect of glucose on agarase overproduction by *Streptomyces*». Gene, vol. 145, p. 49-55.
- PAYNE, G. F., N. Delacruz et S. J. Coppella. 1990. «Improved production of heterologous protein from *Streptomyces lividans*». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 33, p. 395-400.

- PHOENIX, D. A., R. Kusters, C. Hikita, S. Mizushima et B. de Kruijff. 1993. «OmpF-Lpp signal sequence mutants with varying charge hydrophobicity ratios provide evidence for a phosphatidylglycerol-signal sequence interaction during protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 23, p. 17069-17073.
- PIGAC, J., D. Vujaklija, Z. Toman, V. Gamulin et H. Schrempf. 1988. «Structural Instability of a Bifunctional plasmid pZG1 and Single-Stranded DNA Formation in *Streptomyces*». Plasmid, vol. 19, p. 222-230.
- PRESTIDGE, R. L., P. M. Grandison, D. W. W. Chuk, R. J. Booth et J. D. Watson. 1995. «Production of the 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* and its purification». Gene, vol. 164, p. 129-132.
- PUGSLEY, A. P. 1993. «The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria». Microbiological Reviews, vol. 57, no. 1, p. 50-108.
- PULIDO, D., et A. Jimenez. 1987. «Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator». Nucleic Acids Research, vol. 15, no. 10, p. 4227-4240.
- RAWLING, N. D., et A. J. Barrett. 1995. «Evolutionary families of metallopeptidases». Methods in Enzymology, vol. 248, p. 183-228.
- RICHINS, R.D., A. Mulchandani et W. Chen. 2000. «Expression, immobilization and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzymes». Biotechnology and Bioengineering, vol. 69, no. 6 p. 591-596.
- ROCHE, P. W., N. Winter, J. A. Triccas, C. G. Feng et W. J. Britton. 1996. «Expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in recombinant *Myco. smegmatis*: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis». Clinical and Experimental Immunology, vol. 103, p. 226-232.
- SALIM, K., V. Haedens, J. Content, G. Leblon et K. Huygen. 1997. «Heterologous Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* Gene Encoding Antigen 85A in *Corynebacterium glutamicum*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 11, p. 4392-4400.
- SAMBROOK, J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. «Molecular cloning : a laboratory manual, second edition». Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nancy Ford, Chris Nolan et Michele Ferguson [ed.].
- SANGER, F., S. Nicklen et A. R. Coulson. 1977. «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 74, p. 5463-5467.

- SCHLOSSER, A., T. Kampers et H. Schrempf. 1997. «The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport». Journal of Bacteriology, vol. 179, no. 6, p. 2092-2095.
- SCHMITT-JOHN, T., et J. W. Engels. 1992. «Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 36, p. 493-498.
- SHINNICK, T. M. 1987. «The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*». Journal of Bacteriology, vol. 169, p. 1080-1088.
- SHINNICK, T. M., B. B. Plikaytis, A. D. Hyche, R. M. Van Landingham et L. L. Walker. 1989. «The *Mycobacterium tuberculosis* BCG-a protein has homology with the *Escherichia coli* GroES protein». Nucleic Acids Research, vol. 17, no. 3, p. 1254.
- SHPIGEL, E., D. Elias, I. R. Cohen et O. Shoseyov. 1998. «Production and purification of a recombinant human hsp60 epitope using the cellulose-binding domain in *Escherichia coli*». Protein expression and purification, vol. 14, no. 2, p. 185-191.
- SINHA, N. D., J. Biernat, J. McManus et H. Koster. 1984. «Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII : use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product». Nucleic Acids Research, vol. 12, no. 11, p. 4539-4557.
- SONG, J., I. Kanazawa, K. Sun, T. Murata et K. K. Yokoyama. 1999. «Removal of ethidium bromide and cesium chloride from plasmid DNA by ethanol precipitation». Biotechniques, vol. 26, no. 6, p. 1056-1060.
- STAATS, J. J., I. Feder, O. Okwumabua et M. M. Chengappa. 1997. «*S. suis*: past and present». Veterinary Research Communications, vol. 21, no. 6, p. 381-407.
- STROHL, W. R. 1992. «Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters». Nucleic Acids Research, vol. 20, p. 961-974.
- SUEOKA, N. 1988. «Directional mutation pressure and neutral molecular evolution». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, p. 2653-2657.
- TAGUCHI, S., K.-I. Nishiyama, I. Kumagai, H. Momose et K.-I. Miura. 1991. «Relationship between utilization of dual translational initiation signals and protein processing in *Streptomyces*». Molecular and General Genetics, vol. 226, p. 328-331.

- TAGUCHI, S., Y. Yoshida, I. Kumagai, K. Miura et H. Momose. 1993. «Effect of downstream message secondary structure on the secretory expression of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor». FEMS Microbiology Letters, vol. 107, no. 2-3, p. 185-189.
- THÉBERGE, M., P. Lacaze, F. Shareck, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1992. «Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58, p. 815-820.
- THOLE, J. E. R., W. C. A. Van Schooten, W. J. Keulen, P. W. M. Hermans, A. A. M. Janson, R. R. P. De Vries A. H. J. Kolk et J. D. A. Van Embden. 1988. «Use of recombinant antigens expressed in *Escherichia coli* K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG». Infection and Immunity, vol. 56, no. 6, p. 1633-1640.
- THOLE, J. E. R., et R. van der Zee. 1990. «The 65 kD antigen: molecular studies on a ubiquitous antigen». Molecular biology of the mycobacteria. London. Surey University Press: J. McFadden., 37-67
- THOMPSON, C. J., et G. S. Gray. 1983. «Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphotransferase gene and its relationship to phosphotransferases encoded by resistance plasmids». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 80, no. 17, p. 5190-5194.
- UEDA, Y., S. Taguchi, K. Nishiyama, I. Kumagai et K. Miura. 1993. «Effect of a rare leucine codon, TTA, on the expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*». Biochimica Et Biophysica Acta, vol. 1172, no. 3, p. 262-266.
- ULRICH, T., M. E. Munk, H. Mollenkopf, S. Behr-Perst, R. Colangeli, M. L. Gennato et S. H. E. Kaufmann. 1998. «Differential T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors». European Journal of Immunology, vol. 28, p. 3949-3958.
- VERBON, A., R. A. Hartskeerl, A. Schuitema, A. H. J. Kolk, D. B. Young et R. Lathigra . 1992. «The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins». Journal of Bacteriology, vol. 174, no. 4, p. 1352-1359.
- VIGAL, T., A. G. José, M. D. Garcia-Gonzalez, P. Villadas et J. F. Martin. 1991. «Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of alpha-amylase by *Streptomyces lividans*». Molecular and General Genetics, vol. 231, p. 88-96.

- VIIKARI, M.-J., A. Kantelinen, M. Rättö et J. Sundquist. 1991. «Enzymes in pulp and paper processing». ACS Symposium Ser., vol. 460, p. 12.
- VON HEIJNE, G. 1984. «Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells». EMBO Journal, vol. 3, no. 10, p. 2315-2318.
- VON HEIJNE, G. 1985. «Signal sequences. The limits of variation». Journal of Molecular Biology, vol. 184, no. 1, p. 99-105.
- WAINWRIGHT, L. A. et J. B. Kaper. 1998. «EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*». Molecular Microbiology, vol. 27, no. 6, p. 1247-60.
- WALTER, S., et H. Schrempf. 1996. «The synthesis of *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase) is regulated by both activation and repression mechanisms». Molecular and General Genetics, vol. 251, p. 186-195.
- WIKER, H. G., et M. Harboe. 1992. «The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*». Microbiological Reviews, vol. 56, no. 4, p. 648-661.
- WITTMAN, S., F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli. 1994. «Purification and characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no. 5, p. 1701-1703.
- WOESSNER Jr, J. F. 1991. «Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling». FASEB Journal, vol. 5, p. 2145-2153.
- WRIGHT, F., et M. J. Bibb. 1992. «Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome». Gene, vol. 113, p. 55-65.
- WRIGLEY-JONES, C. A., H. Richards, C. R. Thomas et J. M. Ward. 1992. «A method for plasmid copy number determination in recombinant *Streptomyces*». Journal of Microbiological Methods, vol 16, p. 69-80.
- YOUNG, D. B., et T. R. Garbe. 1991. «Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*». Research in Microbiology, vol. 142, p. 55-65.
- ZALACAIN, M., A. Gonzalez, M. C. Guerrero, R. J. Mattaliano, F. Malpartida et A. Jimenez. 1986. «Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*». Nucleic Acids Research, vol. 14, no. 4, p. 1565-1581.

ZAMAN, S., L. Radnedge, H. Richards et J. M. Ward. 1993. «Analysis of the site for second-strand initiation during replication of the *Streptomyces* plasmid pIJ101». Journal of General Microbiology, vol. 139, p. 669-