MARTIN LEDUC

ANALYSE MOLÉCULAIRE DU COMPLEXE XYLANOLYTIQUE DE *Streptomyces lividans* PAR DISLOCATION GÉNÉTIQUE

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

Jury d'évaluation:

François Shareck, Ph.D.
Jean-François Laliberté, Ph.D.
Patrick Hallenbeck, Ph.D.

Hiver 1999
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

TABLE DES MATIÈRES

Page

TABLE DES MATIÈRES ii

LISTE DES TABLEAUX vi

LISTE DES FIGURES viii

LISTE DES ABRÉVIATIONS xi

SOMMAIRE xiii

1. INTRODUCTION 1

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4

2.1 Les streptomycètes 5
2.1.1 Généralités 5
2.1.2 Cycle de vie 5
2.1.3 Génétique 7
2.1.4 *Streptomyces lividans* 7
2.1.5 Importance industrielle 8

2.2 Dégradation du xylane par *S. lividans* 9
2.2.1 Le xylane 9
2.2.2 Organisation génétique et protéines du complexe xylanolytique 10
2.2.2.1 Les xylanases A, B et C 14
2.2.2.2 L'α-L-arabinofuranosidase B et l'acétyl xylane estérase 14
2.2.2.3 Le système des perméases 15
2.2.2.4 L'arabinofuranosidase A et la β-xylosidase 17
2.2.2.5 Les protéines de régulation 17

2.3 Dislocation génétique 20
2.3.1 Principe 20
2.3.2 Dislocation génétique de *xlnA, xlnB* et *xlnC* 21

3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE 25

3.1 Liste des produits utilisés 26

3.2 Souches bactériennes 29

3.3 Vecteurs 30

3.4 Milieux de culture 34
3.4.1 *Streptomyces* 34
3.4.1.1 Pression sélective 34
3.4.1.2 Milieu liquide riche pour la croissance 34
3.4.1.3 Milieu liquide minimal pour la croissance 34
3.4.1.4 Milieu solide pour la croissance 35
3.4.1.5 Milieu pour la production des protoplastes 35
3.4.1.6 Milieu pour la régénération des protoplastes 36
3.4.1.7 Milieu solide pour la détection de l'activité xylanasique 36
3.4.2 *Escherichia coli* 37
3.4.2.1 Pression sélective 37
3.4.2.2 Milieu pour la croissance 37

3.5 Conditions de culture 37
3.5.1 *Streptomyces* 37
3.5.2 *Escherichia coli* 38

3.6 Oligonucléotides synthétiques 39

3.7 Amplification élective *in vitro* d'ADN de *Streptomyces* 42

3.8 Analyse et manipulation de l'ADN 43
3.8.1 Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction 43
3.8.2 Migration par électrophorèse en gel d'agarose 43
3.8.3 Purification de fragments d'ADN d'un gel d'agarose 44
3.8.4 Ligation 45
3.8.5 Délétion par la nucléase *Bal*31 45
3.8.6 Dénaturation alcaline de plasmides 46

3.9 Transformation de bactéries 46
3.9.1 Cellules compétentes d'*Escherichia coli* 46
3.9.2 Protoplastes de *Streptomyces* 47

3.10 Isolement et purification d'ADN 49
3.10.1 Isolement de plasmides d'*Escherichia coli* 49
3.10.2 Préparation d'ADN simple brin de plasmides d'*Escherichia coli* 50
3.10.3 Isolement d'ADN chromosomique de *Streptomyces* 51

3.11 Hybridation de l'ADN par buvardage de Southern 52
3.11.1 Buvardage de l'ADN 52
3.11.2 Marquage des sondes d'ADN à la digoxigénine 53
3.11.3 Hybridation 53
3.11.4 Détection des sondes marquées à la digoxigénine 54

3.12 Analyse des protéines 55
3.12.1 Dosage du contenu protéique 55
3.12.2 Préparation des échantillons de protéines 55
3.12.3 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 56
3.12.4 Transfert des protéines 57
3.12.5 Immunodétection des protéines 57
3.12.6 Évaluation de l'activité enzymatique 58
3.12.6.1 Activité xylanasique 58
3.12.6.2 Activité ß-xylosidasique 59

4. RÉSULTATS 60

4.1 Construction des vecteurs pour obtenir des intégrants 61
4.1.1 Construction des plasmides pSL1180t, pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 61
4.1.2 Amplifications de portions internes des gènes cibles par PCR 61
4.1.3 Construction de plasmides intégratifs 65

4.2 Transformation de protoplastes pour obtenir des intégrants 65
4.2.1 Sélection de souches résistantes à la thiostreptone 67
4.2.2 Analyse génomique des souches résistantes à la thiostreptone 67

4.3 Repiquages sans sélection pour obtenir des délétions 75
4.3.1 Sélection de souches devenues sensibles à la thiostreptone 75
4.3.2 Analyse génomique des souches sensibles à la thiostreptone 77

4.4 Construction des vecteurs pour obtenir des délétions génomiques 80
4.4.1 Délétions dans *bxlA* 80
4.4.2 Délétions dans *bxlR* 83
4.4.3 Délétions dans *bxlS* 86

4.5 Transformation des protoplastes pour obtenir des délétants 89
4.5.1 Transformants de *S. lividans* obtenus 89
4.5.2 Transformants de *S. coelicolor* obtenus 89
4.5.3 Analyse génomique des souches sélectionnées 92
4.5.4 Repiquages sans sélection des souches R4-4 et R4-5 94

4.6 Caractérisation des souches obtenues 98
4.6.1 Activité xylanasique sur milieu RBB-xylane 98
4.6.2 Analyse des protéines par immunodétection 100
4.6.2.1 Immnunodétection de l'AbfB 101
4.6.2.2 Immunodétection des xylanases 101
4.6.2.3 Immunodétection de MsiK 105
4.6.2.4 Immunodétection de protéines homologues à CcpA 105
4.6.3 Évaluation de l'activité xylanasique 112
4.6.4 Évaluation de l'activité ß-xylosidasique 112

5. DISCUSSION 116

5.1 Faible nombre de transformants 117

5.2 Problème de certaines constructions plasmidiques 119

5.3 Souche ΩabfB 122

5.4 Souches ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4 124

5.5 Souches ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 et ΩbxlR5 127

5.6 Souche R4-4 130

6. CONCLUSION 133

REMERCIEMENTS 137

BIBLIOGRAPHIE 138

LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau 1:	Description des souches bactériennes utilisées	29
Tableau 2:	Description des vecteurs utilisés et construits	30
Tableau 3:	Nom et séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés comme amorces pour amplifier un fragment d'ADN par PCR	39
Tableau 4:	Nom et séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés comme amorces pour amplifier un fragment d'ADN par PCR servant de sonde marquée à la DIG	41
Tableau 5:	Description du nombre de transformations de *S. lividans* 1326 effectuées avec les différents plasmides intégratifs sous forme d'ADN simple brin ou d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone (tsr^R) qui en ont résulté	68
Tableau 6:	Liste des souches résistantes à la thiostreptone obtenues suite à une transformation de *S. lividans* 1326 avec des plasmides intégratifs	69
Tableau 7:	Amorces et matrice d'ADN utilisées pour faire des sondes marquées à la DIG par amplification élective *in vitro*	70
Tableau 8:	Description du nombre de transformations de *S. lividans* 1326 effectuées avec les différents plasmides à délétion sous forme d'ADN simple brin ou d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine qui en ont résulté	90
Tableau 9:	Liste des souches résistantes à la thiostreptone obtenues suite à une transformation de *S. lividans* 1326 avec des plasmides à délétion. Le nom du plasmide à l'origine de la transformation est indiqué	90
Tableau 10:	Description du nombre de transformations de *S. coelicolor* J1501 effectuées avec les différents plasmides à délétion sous forme d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine qui en ont résulté	91

Tableau 11: Liste des souches résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine obtenues suite à une transformation de *S. coelicolor* J1501 avec des plasmides à délétion 91

Tableau 12: Évaluation de l'activité xylanolytique par le dépôt de surnageant de culture en milieu M14-glucose, xylane ou les deux dans des puits d'un agar RBB-xylane 100

Tableau 13: Évaluation de l'activité xylanolytique par le dépôt de surnageant de culture en milieu M14-glucose ou xylane dans des puits d'un agar RBB-xylane 100

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1:	Cycle de vie de *Streptomyces lividans*	6
Figure 2:	Représentation d'un polymère d'hétéroxylane avec les sites d'attaque d'enzymes xylanolytiques	11
Figure 3:	Organisation moléculaire des gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans*	12
Figure 4:	Carte génétique et physique du chromosome de *S. coelicolor* M145	13
Figure 5:	Modèle hypothétique de la dégradation du xylane par *S. lividans*	18
Figure 6:	Mutation d'un gène chromosomique par sa dislocation	22
Figure 7:	Mutation d'un gène chromosomique par son remplacement	23
Figure 8:	Carte physique du plasmide *d'E. coli* pSL1180t	62
Figure 9:	Carte physique des plasmides *d'E. coli* pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2	63
Figure 10:	Analyse des plasmides pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 par leur digestion avec des endonucléases de restriction suivie d'une migration en gel d'agarose 0,7%.	64
Figure 11:	Représentation schématique des portions de gènes qui ont été amplifiées par PCR pour réaliser leur dislocation	66
Figure 12:	Localisation des sondes marquées à la DIG par PCR par rapport aux régions du chromosome sondées	71
Figure 13:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par l'endonucléase de restriction *Sac*I aux sondes abfB-2 et tsr	72
Figure 14:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par des endonucléases de restriction aux sondes bxlR-5 et tsr	74
Figure 15:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Kpn*I aux sondes msiK-2 et tsr	76

Figure 16:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Nco*I et *Sfu*I aux sondes bxlR-5 et tsr	78
Figure 17:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Nco*I et *Sfu*I à la sonde bxlR-5	79
Figure 18:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Kpn*I à la sonde msiK-2	81
Figure 19:	Construction du plasmide pBxlA à partir du plasmide pML16 par un traitement à l'exonucléase *Bal*31	82
Figure 20:	Analyse des plasmides pBxlA1 à pBxlA12 par leur digestion avec les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Eco*RI suivie d'une migration en gel d'agarose 0,7%	84
Figure 21:	Construction des plasmides pBxlR6789, pNeoR1 et pNeoR2	85
Figure 22:	Construction des plasmides pBxlS6789 et pNeoS1	87
Figure 23:	Construction des plasmides p1H10 et p1H10R	88
Figure 24:	ADN chromosomique de souches de *S. lividans* digéré par des endonucléases de restriction et séparé par migration dans un gel d'agarose 0,7%	93
Figure 25:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par l'endonucléase de restriction *Not*I aux sondes bxlR-5 et tsr	95
Figure 26:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par différentes endonucléases de restriction avec la sonde bxlA-2	96
Figure 27:	Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par l'endonucléase de restriction *Not*I avec la sonde bxlR-5	97
Figure 28:	Gélose RBB-xylane avec thiostreptone ensemencée avec différentes souches de *S. lividans*	99
Figure 29:	Immunodétection des protéines AbfB et XlnA des surnageants de culture M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-AbfB et anti-$XlnA_1$	102

Figure 30:	Immunodétection de la protéine XlnA du surnageant d'une culture de 72 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-$XlnA_2$	103
Figure 31:	Immunodétection de la protéine XlnB du surnageant de culture en milieu M14-xylane ou M14-glucose de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-$XlnB_2$	104
Figure 32:	Immunodétection de la protéine XlnC du surnageant d'une culture de 72 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-XlnC	106
Figure 33:	Immunodétection de la protéine MsiK du mycélium de cultures de 48 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-MsiK	107
Figure 34:	Immunodétection de la protéine BxlR du mycélium de cultures de 24, 48, 72 et 96 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-CcpA	108
Figure 35:	Immunodétection de la protéine BxlR du mycélium de cultures de 24 h (a) et 48 h (b) en milieu M14-glucose de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-CcpA	110
Figure 36:	Immunodétection à l'aide d'anticorps anti-CcpA de protéines du mycélium des souches 1326 et 10-164 provenant de cultures de 48 h en milieu M14 supplémenté de différentes sources de carbone	111
Figure 37:	Comparaison de l'activité xylanasique spécifique du surnageant de cultures en milieu M14-xylane de 48 et 72 h de différentes souches de *S. lividans*	113
Figure 38:	Comparaison de l'activité ß-xylosidasique spécifique du mycélium de cultures en milieu M14-xylane de 48 h de différentes souches de *S. lividans*	115
Figure 39:	Représentation schématique illustrant l'intégration et la délétion des plasmides pML01 à pML21 dans le chromosome	121
Figure 40:	Organisation des régions du chromosome de souches de *S. lividans* où des intégrations de plasmides ont eu lieu	123

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide(s) aminé(s)
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ATP	adénosine triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BT	Bennett-thiostreptone
CSPD	disodium 3-(4-méthoxyspiro{1,2-dioxétane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) phényl phosphate
°C	degré Celsius
dATP	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate
DIG	digoxigénine
DIG-11-dUTP	digoxigénine-11-désoxyuridine 5'-triphosphate
DMSO	diméthylsulfoxide
DO	densité optique
dTTP	2'-désoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
HPLC	chromatographie liquide sous haute pression
IPTG	isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside
kb	kilopaire(s) de base(s)
kDa	kilodalton(s)
M	molaire
mM	millimolaire(s)
µg	microgramme(s)
µl	microlitre(s)
NA	agar nutritif (Nutrient Agar) de Difco
NBT	chlorure de nitro bleu tétrazolium
PAHBAH	acide p-hydroxybenzoïque hydrazide
pmol	picomole(s)
pbs	paires de base
PCR	amplification élective in vitro
PEG	polyéthylène glycol
PMSF	phénylméthyl sulfonylfluoride
pNP	p-nitrophénol
pNPX	p-nitrophénol ß-D-xylopyranoside
p/v	poids/volume
RBB	bleu brillant de Rémazol
rpm	révolutions par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
TBE	tampon Tris-borate EDTA
TE	tampon Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TES	acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique
Tris	tris(hydroxyméthyl) aminométhane
TSB	bouillon tryptone de soya (Tryptic Soy Broth) de Difco
UI	unité internationale
UV	ultra-violet
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranoside

SOMMAIRE

Streptomyces lividans est une bactérie du sol capable de dégrader la matière lignocellulosique, dont le xylane. Étant donné la complexité du substrat, cette bactérie produit une panoplie de protéines permettant l'hydrolyse complète du xylane. Des expériences de dislocation génétique de certains gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans* ont été réalisées dans le but d'approfondir le rôle des protéines correspondantes. Des plasmides intégratifs ont été construits afin de disloquer ces gènes. Peu de transformants ont été obtenus, mais des souches ayant intégré le plasmide dans les gènes *abfB*, *bxlR* et *msiK* ont été générées. La souche disloquée en *abfB* ne produisait plus d'AbfB, les souches disloquées en *msiK* avaient une activité xylanasique réduite et le phénotype des souches disloquées en *bxlR* était similaire à celui de la souche sauvage. Des tentatives de délétion chromosomique ou de remplacement des gènes *bxlA, bxlR* et *bxlS* suite à une double recombinaison homologue avec d'autres constructions plasmidiques ont été infructueuses, mais on permis d'obtenir la souche R4-4 qui semble avoir subie une amplification d'une portion de son chromosome comprenant le gène *bxlA*. Cette souche avait une activité ß-xylosidasique spécifique plus de cinq fois supérieure à celle de la souche sauvage.

1. INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des micro-organismes que l'on retrouve dans le sol et le compost. Étant donné leur habitat naturel, ces bactéries sont capables de dégrader la biomasse végétale pour en soutirer une source de carbone permettant leur propre croissance. Cette biomasse végétale est principalement composée de cellulose et d'hémicelluloses, dont la principale est le xylane. Pour dégrader le substrat complexe qu'est le xylane, les streptomycètes sécrètent une panoplie d'enzymes telles des xylanases, une arabinofuranosidase et une acétyl xylane estérase. À ces enzymes s'ajoutent d'autres protéines comme des perméases et des protéines fournissant de l'énergie pour permettre l'assimilation des produits de dégradation du xylane à l'intérieur de la cellule. Ces derniers sont éventuellement dégradés en un sucre simple, le xylose, qui peut servir de source de carbone. Finalement, des protéines de régulation modulent l'expression des gènes impliqués dans la dégradation du xylane selon la présence ou non du substrat.

Il existe plusieurs applications biotechnologiques relatives au système xylanolytique des streptomycètes, comme par exemple la diminution de l'utilisation du chlore dans la fabrication du papier, la clarification des jus ou encore l'augmentation de la valeur nutritive de céréales servant à l'alimentation animale. C'est dans le but de mettre en pratique ces applications biotechnologiques ou d'en développer de nouvelles que le groupe de recherche en biotechnologie des streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier s'intéresse depuis plus de dix années au système xylanolytique de l'espèce *Streptomyces lividans*. Des souches de *S. lividans* génétiquement améliorées, capables de surproduire des enzymes du système xylanolytique adaptées aux conditions industrielles, pourraient avoir un impact intéressant. Pour atteindre cet objectif, il est d'abord nécessaire d'avoir une bonne connaissance du système xylanolytique.

Au cours des années, plusieurs gènes du système xylanolytique de *S. lividans* ont été clonés et séquencés, et certaines des protéines associées à ces gènes ont été purifiées et caractérisées. Selon les connaissances accumulées à ce jour, le système xylanolytique serait composé de trois xylanases, deux arabinofuranosidases, une acétyl xylane estérase,

un système de transport membranaire impliquant quatre protéines et une ou deux protéines de régulation.

Toutefois, la dégradation du xylane demeure complexe et le rôle des protéines qui en sont responsables pourrait être approfondi. Plus particulièrement, les protéines BxlE-F-G-R-S n'ont pas encore été purifiées ni caractérisées et la fonction qui leur a été attribuée n'est basée que sur des alignements de séquences. Une façon d'analyser le rôle d'une protéine consiste à disloquer le gène l'encodant pour ensuite constater l'effet de l'absence de la protéine. Une première étape a été réalisée en ce sens en disloquant les trois xylanases (Arhin *et al.*, 1994), permettant de constater que l'expression de deux des xylanases était corrélée et de mieux comprendre le rôle individuel de chaque xylanase.

D'autre part, l'obtention de souches ne produisant pas certaines des protéines du système xylanolytique serait très utile dans le cadre d'autres études ou pour accumuler certains produits de dégradation du xylane.

Les objectifs de ce projet de recherche sont donc d'effectuer la dislocation des gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans* mise à part les xylanases (*abfA, abfB, axeA, bxlA-E-F-G-R-S* et *msiK*) et de caractériser le phénotype des souches mutantes afin d'approfondir le rôle des protéines correspondantes. Globalement, les étapes pour atteindre ces objectifs sont:

- la construction de vecteurs permettant la dislocation des gènes ciblés
- la transformation de *S. lividans* avec ces vecteurs
- la vérification de la dislocation par une analyse génomique
- la caractérisation des souches mutantes

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 LES STREPTOMYCÈTES

2.1.1 Généralités

Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses qui sont retrouvées dans le sol et le compost. Ces bactéries sont Gram positif et aérobes et font partie de l'ordre des Actinomycétales. Ce sont des saprophytes chimio-organotrophes non fastidieux, ne nécessitant qu'une source de carbone appropriée, une source d'azote inorganique, des sels minimaux ainsi qu'un pH près de la neutralité (Gusek et Kinsella, 1992). Ils produisent une grande variété de métabolites secondaires, dont environ 60% des antibiotiques connus (Volff et Altenbuchner, 1998). De plus, les streptomycètes sécrètent plusieurs enzymes hydrolytiques leur permettant de dégrader la matière organique du sol.

2.1.2 Cycle de vie

Les streptomycètes possèdent un cycle de différenciation morphologique complexe pour des procaryotes comprenant trois principales formes sur un milieu de culture solide: mycélium végétatif, mycélium aérien et spores (figure 1). Une spore qui se retrouve dans un milieu favorable germe et se développe en mycélium végétatif caractérisé par des hyphes coenocytiques à embranchements contenant de rares septums; chaque compartiment contient plusieurs copies du chromosome (Gusek et Kinsella, 1992). La croissance se fait par prolongement de la paroi cellulaire au bout des hyphes et le mycélium pénètre et solubilise la matière organique en sécrétant des enzymes hydrolytiques. Le mycélium végétatif forme éventuellement un tapis bactérien, puis une croissance d'hyphes aériennes émerge de la surface des colonies. La croissance aérienne semble impliquer une réutilisation de matériel préalablement assimilé dans le mycélium végétatif, soit sous forme de macromolécules (ADN et protéines), ou encore sous forme de matériel entreposé (Chater, 1993). Ainsi, à mesure que l'hyphe aérienne croît, il y a mort cellulaire au niveau du mycélium végétatif. En présence de conditions défavorables

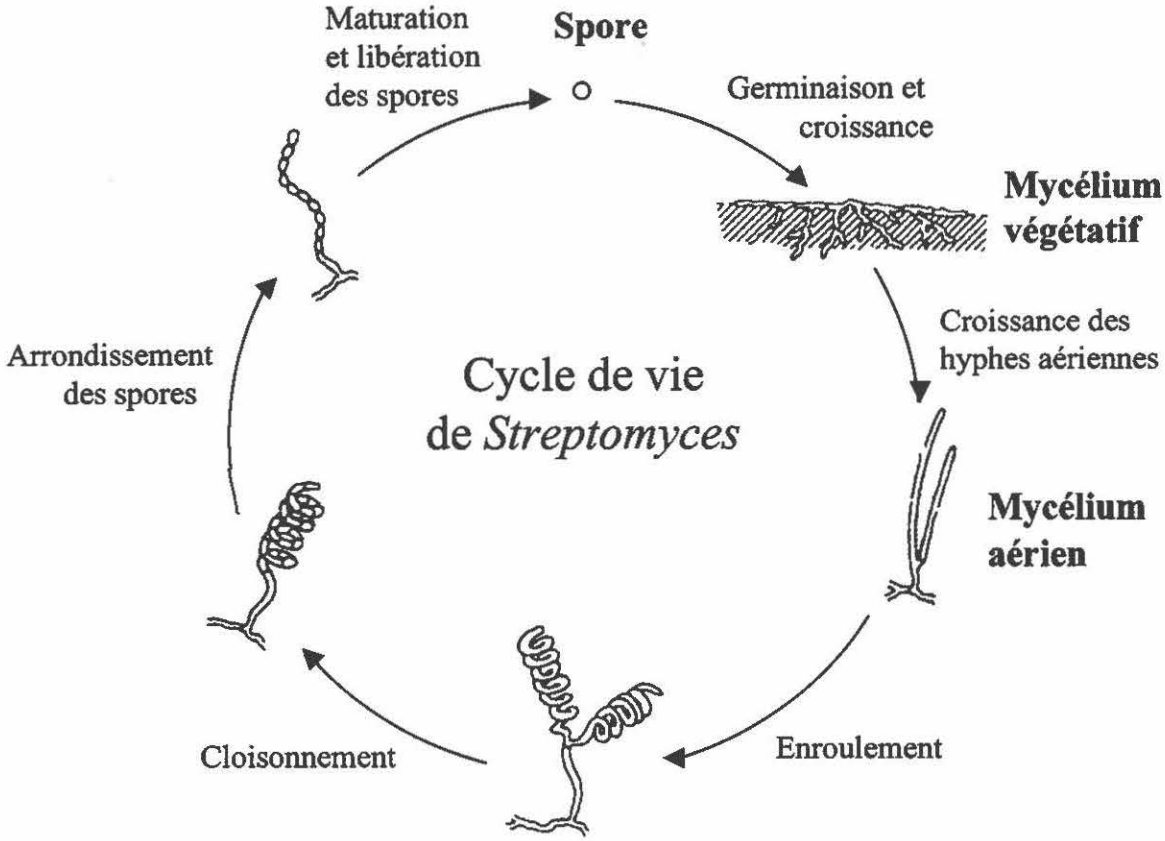


Figure 1: Cycle de vie de *Streptomyces lividans*. Une spore germe tout d'abord pour former un mycélium végétatif, lisse et brillant sur gélose. La croissance du mycélium aérien donne un aspect blanc et poilu aux colonies. Les spores se forment en quelques étapes (enroulement de l'extrémité de l'hyphe, cloisonnement et arrondissement des compartiments formés) et ont une coloration grisâtre.

(dessiccation, diminutiondes nutriments, accumulation de substances inhibitrices), la croissance de l'hyphe aérienne arrête et il y a formation de parois transversales dans les extrémités des hyphes. Ceci a pour effet d'engendrer des compartiments unigénomiques destinés à former les spores (Chater, 1993).

2.1.3 Génétique

Génétiquement, les streptomycètes sont caractérisés par un génome riche en nucléotides guanine (G) et cytosine (C), ayant un pourcentage de G+C moyen de 72% (Volff et Altenbuchner, 1998). Des analyses de l'ADN de plusieurs streptomycètes par électrophorèse en champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) a permis de déterminer la présence d'un chromosome unique et linéaire d'environ 8 Mb (Lin *et al.*, 1993). Les extrémités du chromosome sont très instables; des délétions allant jusqu'à 2 Mb et des amplifications du chromosome y sont fréquentes (plus de 0,1% des spores) (Leblond et Decaris, 1994; Volff et Altenbuchner, 1998). Récemment, Redenbach *et al.* (1996) ont construit une banque ordonnée de 319 cosmides se chevauchant et contenant tout le chromosome de *S. coelicolor* A3(2), avec des inserts moyens de 37,5 kb. Plus de 170 gènes ou groupe de gènes ont ainsi pu être localisés sur un fragment spécifique du chromosome par hybridation à l'encyclopédie de cosmides.

2.1.4 *Streptomyces lividans*

L'espèce *S. lividans* 66 (souche 1326) est une souche de streptomycète qui est un très proche parent de *S. coelicolor* A3(2), qui est l'actinomycète qui a été le plus étudié génétiquement (Redenbach *et al.*, 1996). *S. lividans* présente plusieurs avantages comme hôte pouvant remplacer *E. coli* pour le clonage et l'expression d'ADN exogène. Cette souche possède un puissant système de sécrétion permettant l'expression de protéines étrangères, peut reconnaître un grand nombre de promoteurs et produit de très faibles quantités de protéases (Gusek et Kinsella, 1992). *S. lividans* possède aussi l'avantage

d'être non restrictif envers l'ADN d'*E. coli*, contrairement à *S. coelicolor* A3(2) (Kieser et Hopwood, 1991). *S. lividans*, tout comme *S. coelicolor* A3(2), est considéré comme étant une souche appartenant à l'espèce *S. violaceoruber* (Monson *et al.*, 1969; Chater et Hopwood, 1984 dans Gusek et Kinsella, 1992).

2.1.5 Importance industrielle

Les streptomycètes sont parmi les groupes de micro-organismes les plus importants pour leur application industrielle. Ils produisent une vaste gamme de métabolites secondaires tels que des antibiotiques (chloramphénicol, streptomycine, mitomycine C, néomycine, tétracycline, etc.), des inhibiteurs d'enzymes, des herbicides ou des agents pharmaceutiques actifs (Redenbach *et al.*, 1996). Parmi les 6000 antibiotiques d'origine microbienne qui ont été caractérisés, plus de 60% sont produits par des streptomycètes (Gusek et Kinsella, 1992). L'utilisation des streptomycètes n'est pas problématique car aucun n'est reconnu comme étant un pathogène ou un commensal des animaux et des humains (à l'exception de *S. somaliensis*) (Gusek et Kinsella, 1992).

D'autre part, les streptomycètes sont des producteurs de plusieurs enzymes d'importance industrielle, dont les xylanases et cellulases. Les xylanases pourraient être utilisées comme agents blanchissants dans la fabrication du papier. L'industrie papetière utilise la cellulose, mais cette dernière est mêlée à la lignine qui la colore (Flandroy, 1991). L'élimination des hémicelluloses (dont le xylane), qui relient la cellulose et la lignine, permet de libérer les fibres de cellulose. L'utilisation de xylanase en absence de cellulase pourrait diminuer ou même remplacer l'utilisation du chlore qui sert actuellement au blanchiment des pâtes de papier (Kluepfel *et al.*, 1993). Les xylanases ont aussi des applications dans le domaine de l'alimentation. L'utilisation des xylanases avec des cellulases et des pectinases permet la clarification des jus et la liquéfaction de fruits et légumes (Biely, 1985). L'utilisation de xylanases et d'arabinofuranosidases dans le prétraitement de céréales servant à l'alimentation animale comme l'orge, le seigle et le

maïs permet d'en augmenter la valeur nutritive (Wong *et al.*, 1988; D. Kluepfel, communication personnelle). L'addition de xylanases à la pâte à pain entraîne une augmentation du volume du pain, permettant l'utilisation d'une farine de blé de qualité inférieure (D. Kluepfel, communication personnelle). Les xylanases et autres enzymes du complexe xylanolytique pourraient aussi servir à préparer du matériel pour la recherche scientifique, tel que des xylo-oligosaccharides courts ou longs, substitués ou non (Wong *et al.*, 1988).

2.2 DÉGRADATION DU XYLANE PAR *S. lividans*

2.2.1 Le xylane

Les parois cellulaires des plantes constituent le réservoir majeur de carbone fixé dans la biosphère. Elles sont principalement composées de trois différents polymères : la cellulose (des fibres insolubles de ß-1,4-glucane), les hémicelluloses (des polysaccharides non cellulosiques) et la lignine (un composé polyphénolique complexe) (Wong *et al.*, 1988). L'hémicellulose lie la cellulose à la lignine en s'imbriquant dans les régions amorphes de la lignine et en entourant les microfibrilles de cellulose (Flandroy, 1991). Le xylane est un des composés majeurs de l'hémicellulose des parois primaires des plantes monocotylédones et des parois cellulaires secondaires qui forment le bois dans les tissus vasculaires (Wong *et al.*, 1988). Après la cellulose, le xylane est le polysaccharide renouvelable le plus abondant de la biosphère (Biely, 1985). Il s'agit d'un polymère de D-xylopyranosyl relié par des liens ß-1,4 et qui peut être substitué par différentes chaînes latérales d'α-L-arabinofuranose, d'acide α-D-glucuronique et d'acide *O*-méthyl-α-D-glucuronique. Les résidus de xylopyranose peuvent également être *O*-acétylés. Enfin, la structure du xylane peut varier d'une espèce de plante à l'autre (Biely, 1985).

2.2.2 Organisation génétique et protéines du complexe xylanolytique

Étant donné la complexité de la molécule, l'hydrolyse complète du xylane en monosaccharides pouvant servir de source de carbone requièrt l'action de plusieurs enzymes spécifiques (figure 2). Jusqu'à présent, les gènes correspondants à trois endo-β-1,4-xylanases (*xlnA-B-C*) (Morosoli *et al.*, 1986 ; Mondou *et al.*, 1986 ; Kluepfel *et al.*, 1990 ; Vats-Mehta *et al.*, 1990 ; Shareck *et al.*, 1991 ; Kluepfel *et al.*, 1992), deux α-L-arabinofuranosidases (*abfA-B*) (Manin *et al.*, 1994 ; Vincent *et al.*, 1997), une acétyl xylane estérase (*axeA*) (Shareck *et al.*, 1995 ; Dupont *et al.*, 1996), une ß-xylosidase (*bxlA*) (Larocque, 1998), deux perméases (*bxlF-G*) (Larocque, 1998), une protéine de fixation aux sucres (*bxlE*) (Larocque, 1998) et une protéine liant l'ATP et impliquée dans l'importation de sucres (*msiK*) (Hurtubise *et al.*, 1995) ont été clonés et séquencés chez *S. lividans*. Plusieurs des protéines correspondant à ces gènes ont été purifiées et caractérisées, soit les XlnA-B-C, AbfA-B, AxeA et MsiK. Une α-glucuronidase serait aussi nécessaire à la dégradation complète du xylane, mais cette enzyme n'a pas encore été identifiée chez *S. lividans*.

Contrairement à ce qui est observé chez plusieurs micro-organismes, la plupart des gènes codant pour les enzymes lignocellulolytiques ne sont pas organisés en opéron chez *S. lividans*. Il existe cependant des exceptions (figure 3), dont les gènes *bxlA, bxlE, bxlF* et *bxlG* qui font tous partie du même opéron. Les gènes *xlnB* et *axeA* sont également organisés sous forme d'opéron tandis que les gènes *abfB* et *xlnA* forment un divergon, c'est-à-dire qu'ils sont transcrits en direction opposée à partir d'un promoteur qui serait commun et situé entre les deux gènes. Les gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans* ont pu être hybridés à la banque cosmidique du génome de *S. coelicolor* A3(2) réalisée par Redenbach *et al.* (1996) (voir section 2.1.3), ce qui a permis de les localiser sur le chromosome (figure 4). Ils ne sont pas localisés dans une région particulière du chromosome mais plutôt distribués tout au long du génome.

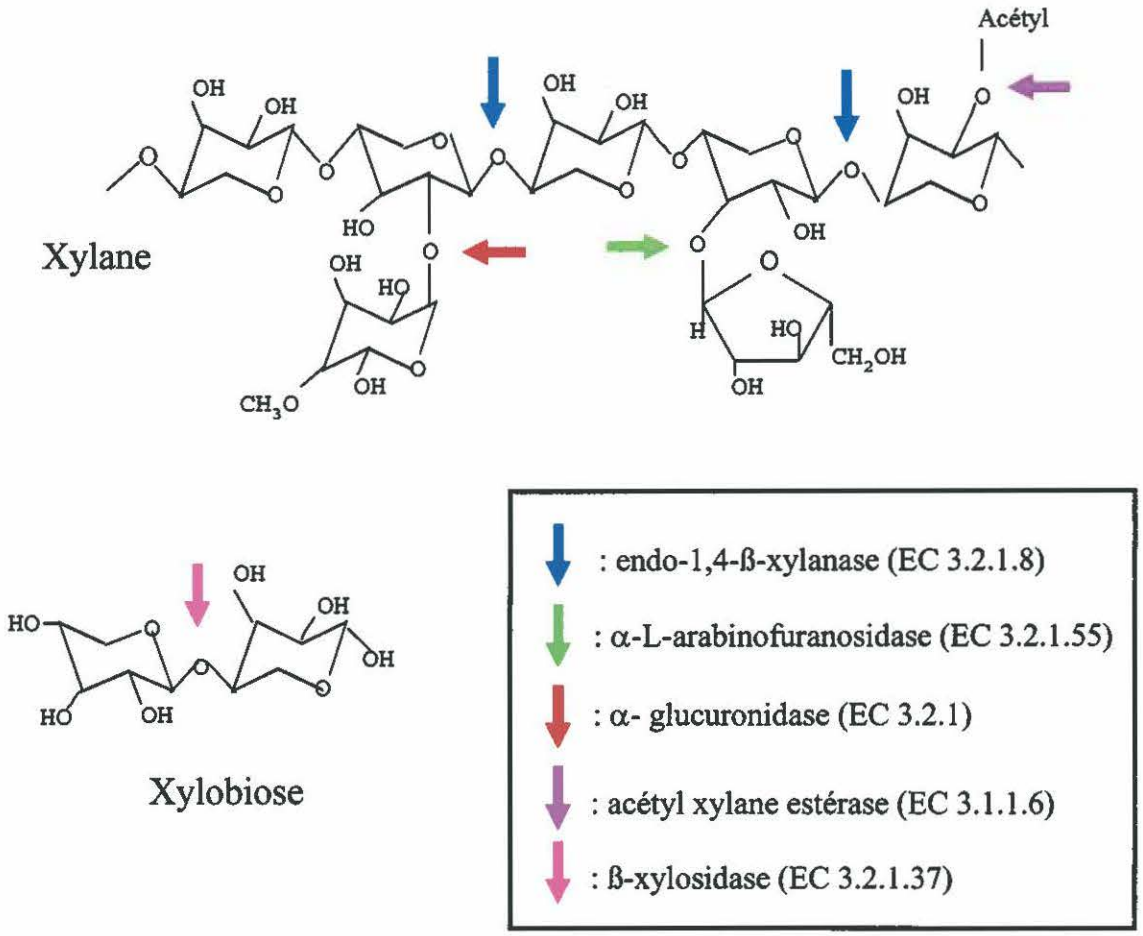


Figure 2 : Représentation d'un hétéroxylane avec les sites d'attaque d'enzymes xylanolytiques. Une portion d'un hétéroxylane comprenant 5 unités de D-xylose substituées par un L-arabinofuranose, un acide 4-O-méthyl-D-glucuronique et un groupement acétyl est représenté, ainsi qu'un xylobiose.

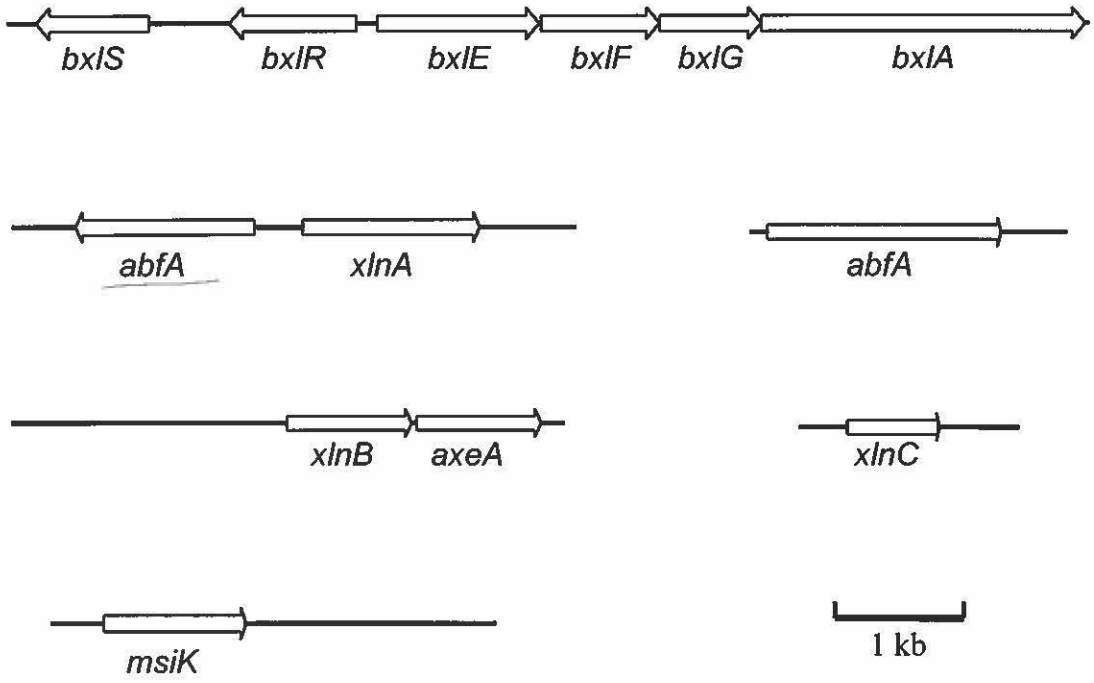


Figure 3. Organisation moléculaire des gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans*. Les flèches représentent les cadres de lecture ouverts et l'orientation de leur transcription tandis que les lignes représentent l'ADN qui a été séquencé.

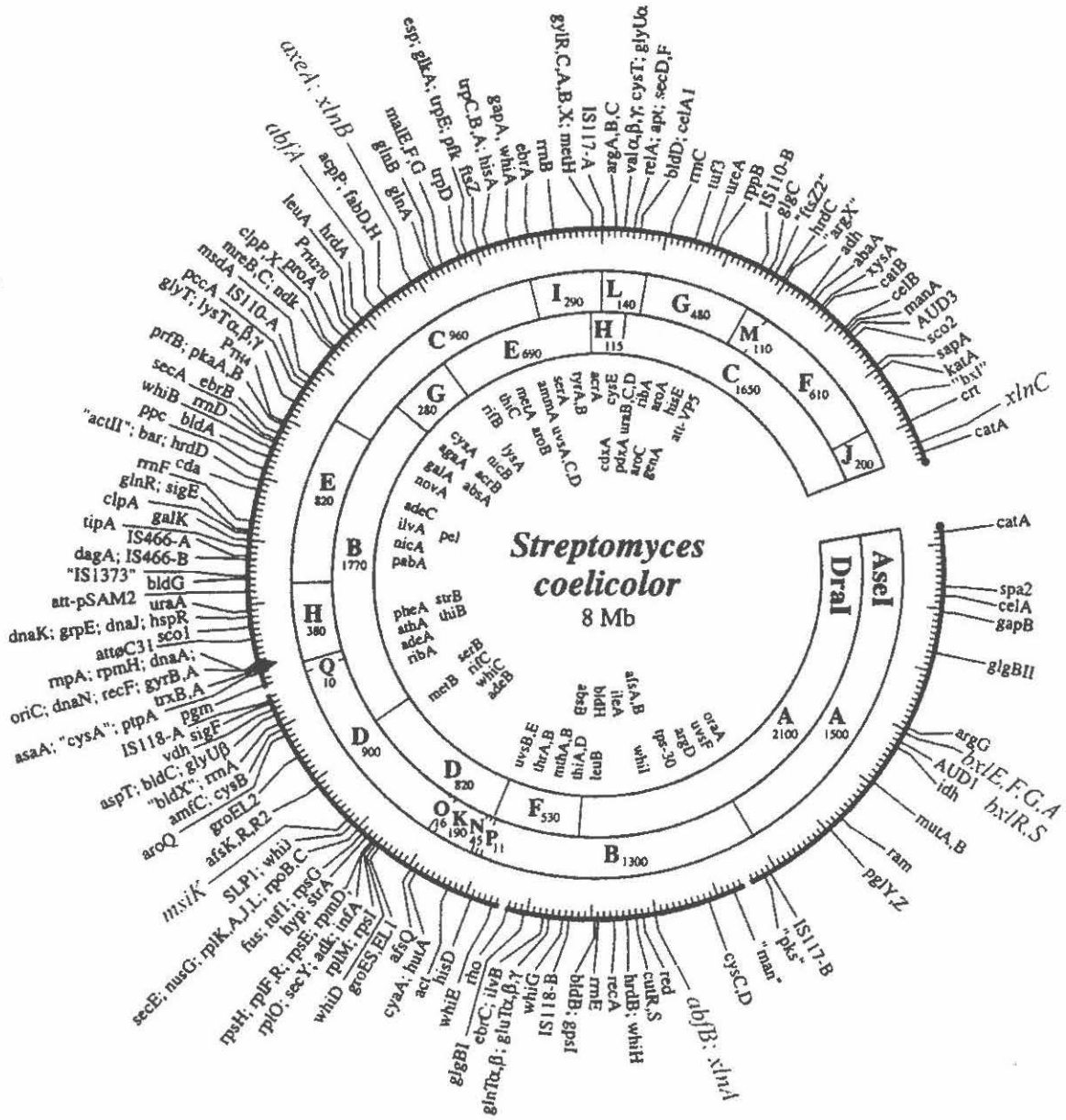


Figure 4: Carte génétique et physique du chromosome de *S. coelicolor* M145. La position des marqueurs à l'extérieur du cercle a été déterminée grâce à une banque cosmidique ordonnée. Les marqueurs à l'intérieur du cercle ont été cartographiés génétiquement seulement et leur position approximative par rapport aux marqueurs cartographiés physiquement a été déterminée par interpolation. La grosseur des fragments obtenus suite à une digestion par *Dra*I ou *Ase*I sont en kb. Les noms des gènes du complexe xylanolytique ont été agrandis et sont en italiques pour les mettre en évidence. •, 'télomères' du chromosome; ♦, origine de réplication bidirectionnelle du chromosome. Tiré de Redenbach *et al.*, 1996, p. 90.

2.2.2.1 Les xylanases A, B et C

Les xylanases ont la propriété de cliver les liens ß-1,4 du xylane. Chez *S. lividans*, trois endo-ß-1,4-xylanases (XlnA, XlnB, XlnC) sont sécrétées et agissent de façon synergique pour hydrolyser le xylane en sucres assimilables. La xylanase A dégrade préférentiellement le substrat en petits oligoxylosides, générant principalement du xylobiose (X_2) et du xylotriose (X_3). Les xylanases B et C sont deux enzymes au mode d'action presque identique : ils clivent le xylane pour engendrer une multitude d'oligoxylosides plus longs, diminuant le degré de polymérisation du substrat (Kluepfel *et al.*, 1992). Ces oligoxylosides longs serviraient de substrat à la xylanase A. Les xylanases A et B sont composées de deux domaines distincts, soit un domaine catalytique et un domaine de liaison au xylane. Les protéines entières sont désignées $XlnA_1/XlnB_1$ tandis que les domaines catalytiques seuls sont nommés $XlnA_2/XlnB_2$. La xylanase C ne possède qu'un domaine catalytique.

2.2.2.2 L'α-L-arabinofuranosidase B et l'acétyl xylane estérase

Étant donné que le xylane possède plusieurs chaînes latérales d'arabinosyl, d'acide glucuronique et de groupements acétyls, plusieurs enzymes spécifiques autres que les xylanases sont nécessaires pour sa dégradation complète. En effet, *S. lividans* possède une α-L-arabinofuranosidase qui est sécrétée (AbfB). Cette enzyme peut débrancher les groupements arabinofuranoses de différents arabinoxylanes. Elle peut également, mais beaucoup plus lentement, hydrolyser des oligoxylosides. Tout comme les xylanases A et B, l'AbfB est composée de deux domaines: catalytique et de liaison au xylane. De plus, l'AbfB possède une action synergique avec les xylanases A et C (et probablement la XlnB), augmentant la dégradation du xylane en petits oligoxylosides (Vincent *et al.*, 1997). Ceci s'explique par le fait que les xylanases ont un meilleur accès à leur substrat une fois que l'AbfB a libéré la chaîne de xylose de ses groupements arabinoses.

L'acétyl xylane estérase (AxeA) est une enzyme sécrétée qui permet l'hydrolyse des liens esters qui relient les groupements acétyls au xylose en position 2 et/ou 3. La libération des groupements acétyls du xylane permet l'accès des xylanases au substrat, puisque le xylane acétylé n'est complètement hydrolysé par les xylanases qu'en présence de l'acétyl xylane estérase (Dupont *et al.*, 1996). Cette enzyme est également composée d'un domaine catalytique et d'un domaine de liaison au substrat.

2.2.2.3 Le système des perméases

Une fois que le xylane a été dégradé en sucres assimilables dans le milieu extracellulaire, ces sucres doivent entrer à l'intérieur de la cellule pour servir de source de carbone. Une première protéine impliquée dans le transport des sucres (MsiK) a été identifiée en 1995 par Hurtubise *et al.* Un gène complémentant l'activité xylanasique et cellulasique a été isolé à partir d'une banque génomique homologue construite dans le mutant pléiotropique (xylanase/cellulase négatif) *S. lividans* 10-164. L'alignement de la séquence de la protéine correspondante avec d'autres protéines révèle une homologie à la famille des protéines de liaison à l'ATP. Parmi les séquences homologues entre ces protéines se retrouvent deux régions hautement conservées, les boîtes A (GPSGCGKST) et B (VFLMDEP). Ce sont les séquences consensus de liaison aux nucléotides nommées motif de Walker (Higgins *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1982). Le séquençage du gène *msiK* chez la souche *S. lividans* 10-164 a révélé la présence d'une mutation changeant l'acide aspartique (D) de la protéine sauvage en un résidu asparagine (N); cette mutation est située au niveau de la boîte B du motif de Walker (Hurtubise *et al.*, 1995). Plus particulièrement, l'acide aspartique serait impliqué dans la liaison du MgATP (Karkaria *et al.*, 1990; Rosen *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1993) et son remplacement par un résidu asparagine empêcherait l'hydrolyse de l'ATP, ce qui expliquerait que le système de transport actif du cellobiose et du xylobiose est inefficace chez la souche *S. lividans* 10-164. Ainsi, la protéine MsiK permet l'apport d'énergie nécessaire au système d'importation de plusieurs sucres, dont le cellobiose, le xylobiose et le xylose dans une moindre mesure. Le cellobiose et le xylobiose sont

respectivement des inducteurs de cellulase et de xylanase une fois à l'intérieur de la cellule. Étant donné que les inducteurs des cellulases et xylanases ne peuvent pas entrer dans les cellules de *S. lividans* 10-164, cette souche a un phénotype cellulase et xylanase négatif. En outre, il a aussi été démontré que MsiK est impliquée dans le transport du maltose (Schlösser *et al.*, 1997).

En plus de la protéine MsiK, des perméases sont nécessaires à l'entrée des sucres dans la cellule. L'opéron *bxl* contient deux cadres de lecture ouverts, *bxlF* et *bxlG*, qui pourraient coder pour des perméases (Larocque, 1998). En effet, l'alignement de la séquence en acides aminés de BxlF et BxlG avec des séquences homologues provenant des banques GenBank et SwissProt a démontré une forte similarité avec des perméases bactériennes du transport des sucres. BxlF et BxlG sont particulièrement homologues aux sous-familles MalF et MalG, qui comprennent des perméases de dissacharides (Dassa et Hofnung, 1985; Saurin *et al.*, 1994). Des profils d'hydrophobicité ont démontré que BxlF et BxlG étaient hydrophobes et possédaient six portions trans-membranaires (Larocque, 1998). De plus, ces protéines contiennent une région conservée d'une vingtaine d'acides aminés appelée région EAA qui est reconnue comme étant intracytoplasmique et impliquée dans la liaison à une ATPase (Mourez *et al.*, 1997).

Un autre cadre de lecture ouvert de l'opéron *bxl*, nommé *bxlE*, pourrait correspondre à une lipoprotéine associée à la membrane. En effet, la comparaison de la séquence de la protéine BxlE avec celles de GenBank démontre une homologie avec la séquence signal de lipoprotéines de bactéries Gram positives; la protéine serait à l'extérieur de la cellule et ancrée dans la membrane grâce à la séquence signal hydrophobe. BxlE possède également de l'homologie avec des protéines fixatrices de sucres et chimiotactiques envers les sucres (Larocque, 1998).

En résumé, les petits oligoxylosides obtenus suite à l'action des enzymes xylanolytiques sécrétées pourraient être reconnus par BxlE et transportés à l'intérieur de la cellule via les perméases BxlF et BxlG; ce transport serait actif et l'énergie fournie par l'hydrolyse de

l'ATP par MsiK (figure 5). Ce modèle demeure toutefois hypothétique et d'autres études devront être menées pour confirmer le mode d'entrée des oligoxylosides.

2.2.2.4 L'arabinofuranosidase A et la β-xylosidase

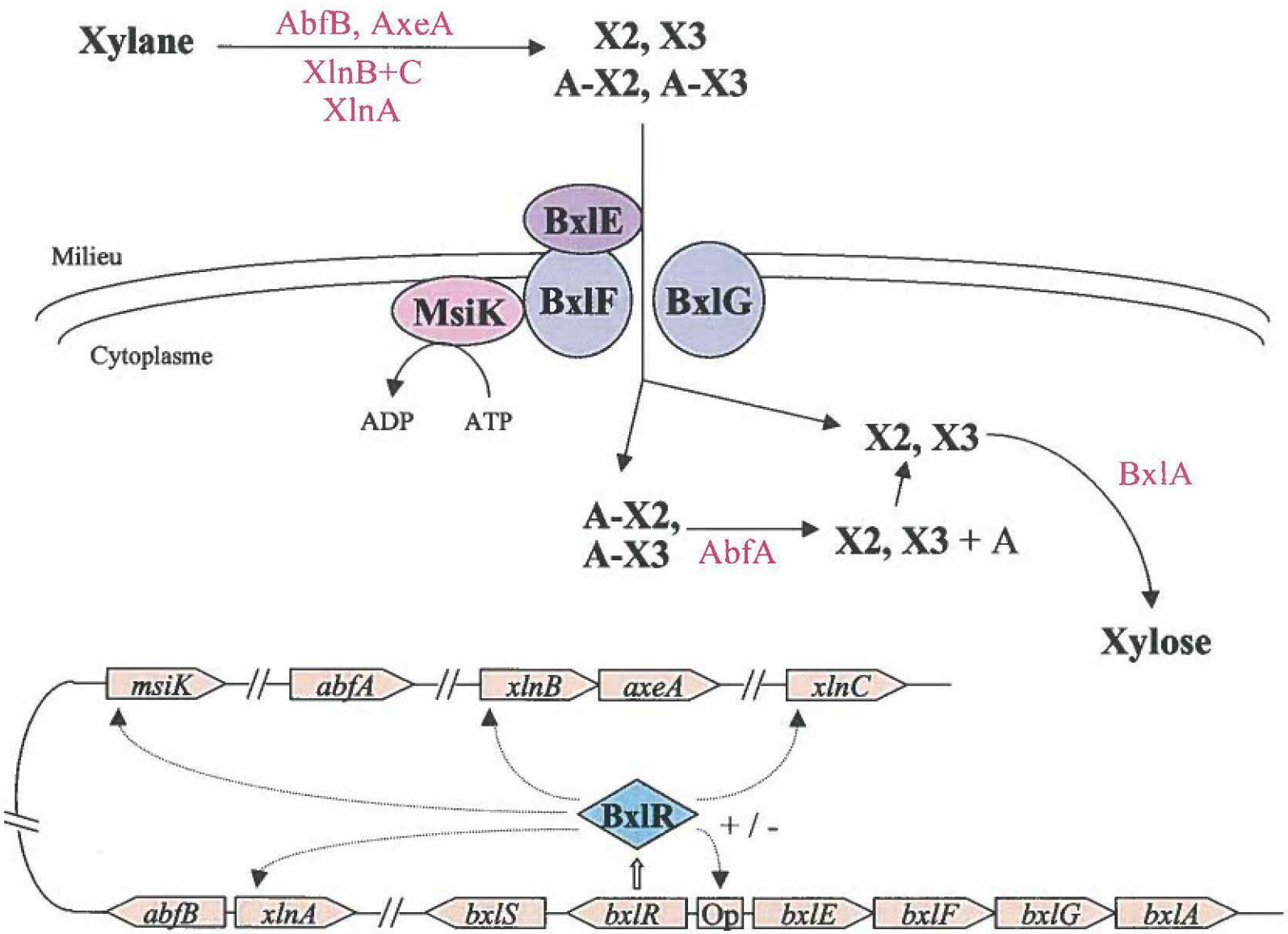
L'α-L-arabinofuranosidase A (AbfA) est une enzyme intracellulaire située au niveau du cytoplasme qui agirait sous forme d'hexamère. L'enzyme hydrolyse les arabino-oligoxylosides (de l'arabino-xylobiose à l'arabinoxylohexaose) pour libérer l'arabinose et l'oligoxyloside correspondant, mais n'a pas d'action sur le xylane (Manin *et al.*, 1994). Ceci laisse supposer que l'AbfB sécrétée n'hydrolyse pas la totalité des arabinofuranoses du xylane et que des arabino-oligoxylosides entrent dans la cellule (figure 5). La spécificité de substrat des deux arabinofuranosidases de *S. lividans* reste à démontrer; il est possible que ces enzymes hydrolysent chacune différents isomères d'une même molécule.

Une autre enzyme intracellulaire impliquée dans la dernière étape de l'hydrolyse complète du xylane en xylose est la ß-xylosidase. Cette enzyme peut hydrolyser les xylotrioses ou les xylobioses en xylose. La protéine serait transcrite à partir du gène *bxlA* de l'opéron *bxl* (Larocque, 1998). La séquence protéique de BxlA a des homologies avec des protéines faisant partie de la famille 3 des glycosyles hydrolases selon la classification de Henrissat et Bairoch (1996). Récemment, des essais enzymatiques réalisés dans le laboratoire ont démontré que BxlA avait une activité de ß-xylosidase (T. Lam, communication personnelle). La purification et la caractérisation de l'enzyme sont présentement en cours.

2.2.2.5 Les protéines de régulation

L'expression des enzymes du système xylanolytique est inductible par leur substrat et sensible à la présence de glucose dans le milieu de culture (D. Kluepfel, communication

Figure 5: Modèle hypothétique de la dégradation du xylane par *S. lividans*. La bactérie sécrète l'acétyl xylane estérase (AxeA) et l'arabinofuranosidase (AbfB) dans le milieu extracellulaire. Ces enzymes hydrolysent les chaînes latérales de la molécule de xylane substituée, permettant aux trois xylanases (XlnA, B et C) d'accéder au squelette de xylose. Les xylanases agissent de façon synergique pour générer du xylobiose (X2) et du xylotriose (X3) substitué ou non d'arabinose (A). Ces sucres se fixeraient à la lipoprotéine BxlE pour ensuite être pompés dans la cellule via les perméases BxlF et BxlG. La protéine MsiK, capable de fixer l'ATP, fournit l'énergie nécessaire à ce transport actif. À l'intérieur de la cellule, une deuxième arabinofuranosidase (AbfA) hydrolyse les molécules d'arabinoxylobiose et d'arabinoxylotriose, puis une ß-xylosidase (BxlA) clive le xylobiose et le xylotriose en xylose. Les gènes codant pour les protéines du complexe xylanolytique sont représentés sur le chromosome. La protéine BxlR régulerait la transcription de l'opérateur *bxl* (Op) ainsi que les gènes *xlnA, B, C* et *msiK*. Le rôle de la protéine BxlS reste à préciser.


Xylane
AbfB, AxeA
XlnB+C
XlnA
X2, X3
A-X2, A-X3
BxlE
Milieu
MsiK
BxlF
BxlG
Cytoplasme
ADP
ATP
X2, X3
BxlA
A-X2,
A-X3
AbfA
X2, X3 + A
Xylose
msiK
abfA
xlnB
axeA
xlnC
BxlR
+ / -
abfB
xlnA
bxlS
bxlR
Op
bxlE
bxlF
bxlG
bxlA

personnelle; Giannotta *et al.*, 1996). Il y aurait donc une régulation génétique des gènes du complexe xylanolytique. Le gène *bxlR*, récemment séquencé par Larocque (1998), pourrait coder pour une protéine impliquée dans la régulation du complexe xylanolytique. En effet, la séquence protéique de BxlR a une forte similarité avec des régulateurs d'opérons bactériens de la famille LacI-GalR. Les membres de cette famille possèdent deux domaines fonctionnels: un domaine à l'extrémité N-terminale de type hélice-tour-hélice (HTH) responsable de la fixation de l'ADN et un domaine C-terminal plus grand responsable de la fixation d'un effecteur et impliqué dans l'oligomérisation (homodimère ou tétramère) de la protéine (Weickert et Adhya, 1992). La protéine BxlR a été purifiée en fusion avec la protéine de liaison au maltose (MBP) d'*E. coli* (Larocque, 1998). Cette protéine de fusion a ensuite été utilisée dans des expériences d'altération de la mobilité électrophorétique afin de démontrer que BxlR se liait spécifiquement à l'opérateur de l'opéron *bxl*, le palindrome CGAAACTTTCG située en amont de *bxlE* (Larocque, 1998). Un hydrolysat de xylane est capable d'inhiber la liaison BxlR-ADN, mais la molécule effective de l'hydrolysat n'a pas encore été identifiée. D'autre part, l'analyse de l'ADN en amont des autres gènes du système xylanolytique a révélé la présence de palindromes similaires à celui de l'opérateur *bxl* en amont des gènes *xlnA, xlnB, xlnC* et *msiK*. Des tests d'altération de la mobilité électrophorétique ont permis de démontrer que BxlR liait spécifiquement l'ADN en amont de ces gènes (Larocque, 1998). Ainsi, la protéine BxlR semble avoir un rôle dans la régulation du système xylanolytique de *S. lividans*.

Le cadre de lecture *bxlS* du locus *bxl* pourrait coder pour une autre protéine de régulation. En effet, la comparaison des protéines de la banque GenBank avec la séquence de BxlS a révélé une forte similarité avec des régulateurs transcriptionnels de la famille LysR (Larocque, 1998). Les membres de cette famille ont la capacité de fixer l'ADN grâce à un motif hélice-tour-hélice et d'activer la transcription d'autres gènes (Henikoff et al. 1988). BxlS semble posséder un motif hélice-tour-hélice dans sa portion N-terminale et un domaine de liaison à un ligand dans sa portion centrale (Larocque, 1998). La fonction précise de cette protéine reste toutefois à être déterminée; la purification de la protéine pour faire des tests de liaison à l'ADN est actuellement en cours dans le laboratoire.

2.3 DISLOCATION GÉNÉTIQUE

2.3.1 Principe

Avec l'avènement des techniques automatisées de séquençage d'ADN, de plus en plus de cadres de lecture ouverts de fonction inconnue sont découverts. Plusieurs projets de séquençage de génomes entiers sont actuellement en cours, dont celui de séquencer le génome de *S. coelicolor* A3(2) d'ici l'an 2001 (www.sanger.ca.uk). Une des méthodes permettant d'attribuer une fonction à ces nouveaux gènes est la dislocation génétique (aussi appelée *gene knockout* ou *gene disruption* en anglais), qui consiste à interrompre la séquence codante d'un gène pour empêcher son expression. Cela peut permettre de déduire la fonction du gène en comparant le phénotype de la souche disloquée à celui de la souche normale. Pour effectuer la dislocation d'un gène, des vecteurs intégratifs sont utilisés. Il peut s'agir de plasmides, de cosmides ou encore de phages qui possèdent un marqueur de sélection permettant d'identifier les bactéries ayant intégré le vecteur. Un système qui engendre des mutants stables et qui peut s'appliquer aux streptomycètes consiste à utiliser des plasmides d'*Escherichia coli* ne possédant pas d'origine de réplication de *Streptomyces*. L'utilisation de plasmides d'*E. coli* contenant de l'ADN de *S. lividans* permet un clonage rapide et une isolation d'ADN plasmidique efficace. Lorsque le plasmide est introduit chez *S. lividans*, le plasmide n'est maintenu que s'il y a recombinaison entre l'insert plasmidique de *S. lividans* et son homologue du chromosome. Cependant, le nombre de transformants obtenus en utilisant de tels plasmides sous forme double brin est habituellement très faible. Hillemann *et al.* (1991) ont démontré que l'efficacité d'intégration de plasmides simple brin circulaires d'*E. coli* contenant un insert de 4 kb d'ADN de *Streptomyces viridochromogenes* par recombinaison homologue était de 10 à 100 fois plus élevée que pour le même plasmide double brin. Cette méthode peut toutefois être problématique pour certaines constructions plasmidiques qui génèrent peu d'ADN sb. Pour contourner ce problème, Oh et Chater (1997) ont découvert que la recombinaison homologue était également favorisée par l'utilisation d'ADN double brin dénaturé. La dislocation génétique par l'intégration d'un plasmide dans la séquence

codante d'un gène est illustrée à la figure 6. Une fois le plasmide intégré, des repiquages sans sélection peuvent mener à l'excision du plasmide suite à une deuxième recombinaison homologue. Si l'insert plasmidique contenait une mutation ou une délétion par rapport à son homologue chromosomique, la deuxième recombinaison peut mener à une mutation ou une délétion du gène sur le chromosome.

Une autre façon d'inactiver un gène consiste à le remplacer en tout ou en partie par un marqueur de sélection. Pour ce faire, le plasmide intégratif contient deux marqueurs de sélection, dont un est flanqué d'ADN homologue à la région ciblée du chromosome. Le remplacement de gène se fera s'il y a double recombinaison homologue entre l'insert (entrecoupé du marqueur de sélection) et sa contrepartie chromosomique (figure 7). Si la bactérie est résistante aux deux antibiotiques présents sur le plasmide, c'est qu'il y a eu une seule recombinaison menant à l'intégration du plasmide au complet dans le chromosome.

2.3.2 Dislocation génétique de *xlnA, xlnB* et *xlnC*

Une étude visant à comprendre la régulation du système xylanolytique et à attribuer des rôles spécifiques aux trois xylanases présentes chez *S. lividans* a déjà été réalisée. En effet, Arhin *et al.* (1994) ont étudié les effets de la dislocation génétique des gènes *xlnA, xlnB* et *xlnC* sur le système xylanolytique. Des souches de *S. lividans* possédant une interruption des gènes *xlnA* (IAF101) et *xlnB* (IAF102) et ayant une portion du gène *xlnC* délétée (IAF103) ont été obtenues. Un double mutant interrompu en *xlnA* et délété en *xlnC* (IAF104) a également été obtenu. Les bactéries ayant subi la dislocation génétique d'un gène de xylanase ne produisaient plus l'enzyme correspondante. Cette étude a permis de déterminer que les trois xylanases sont requises pour assimiler complètement le xylane. Il semble que parmi les trois xylanases, c'est la XlnA qui joue le rôle le plus important dans la dégradation du xylane en sucres assimilables (Arhin *et al.*, 1994). Les XlnB et XlnC doivent toutes les deux être présentes pour qu'il y ait expression de *xlnB* et

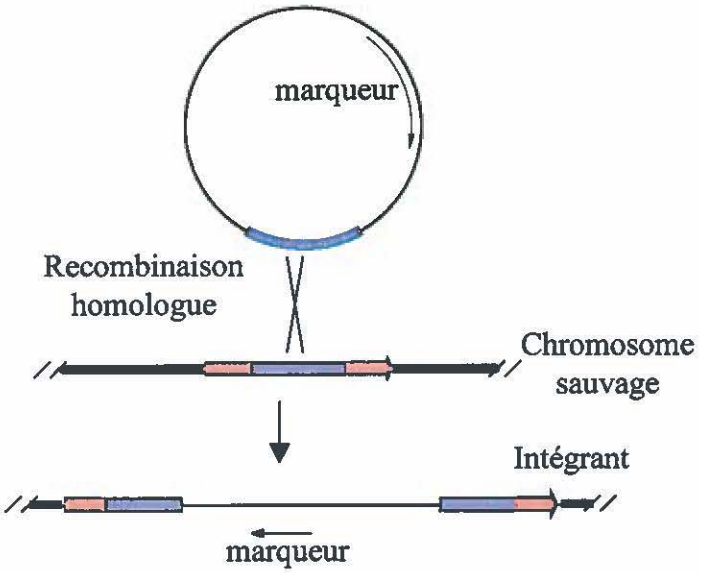


Figure 6. Mutation d'un gène chromosomique par sa dislocation génétique. Un plasmide non-réplicatif s'intègre dans le chromosome par recombinaison homologue, interrompant la séquence codante du gène cible. Les intégrants sont détectables grâce à la présence d'un marqueur de sélection dans le plasmide. La ligne noire fine représente l'ADN plasmidique, la ligne noire épaisse l'ADN chromosomique. La flèche rouge représente le gène cible et la boîte bleue des séquences d'ADN homologues.

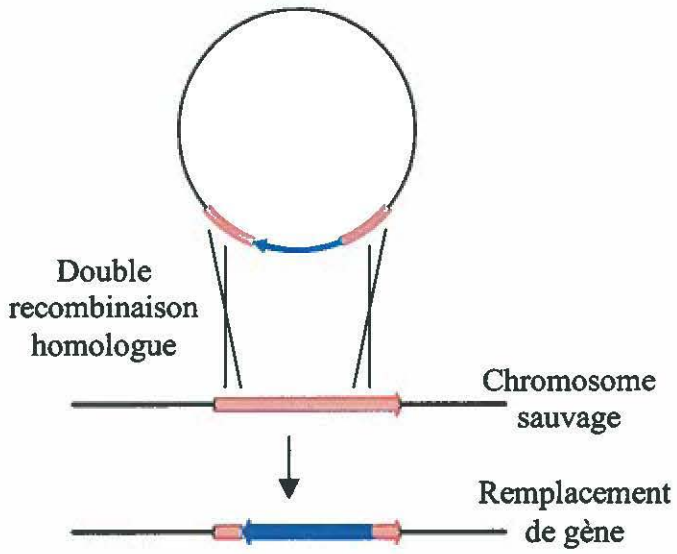


Figure 7. Mutation d'un gène chromosomique par son remplacement. Une double recombinaison homologue mène au remplacement d'une partie ou de la totalité du gène cible (flèche rouge) par un gène marqueur (flèche bleue).

xlnC lorsque le xylane est utilisé comme source de carbone; l'expression de *xlnA* est indépendante. Des hydrolysats de la XlnB ou de la XlnC sont nécessaires pour induire à la fois *xlnB* et *xlnC*. Le gène *xlnA* n'est pas induit par ces hydrolysats et la XlnA ne joue pas de rôle dans l'induction de *xlnB* et *xlnC*. Ce sont des xylo-oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) supérieur à celui de X_{11} qui stimulent *xlnB* et *xlnC*, probablement en se liant à la membrane cellulaire pour activer un facteur qui permet l'induction (Arhin *et al.*, 1994).

En se basant sur ces observations et sur celles de Kluepfel *et al.* (1992), un modèle de l'hydrolyse du xylane par les xylanases de *S. lividans* a pu être proposé. Les trois xylanases seraient exprimées à un faible niveau sans induction en absence du substrat. Lorsque le substrat est présent, les XlnB et XlnC agiraient de concert, en reconnaissant des sites de clivage différents, pour produire des xylo-oligosaccharides de haut poids moléculaire (DP >5). La reconnaissance de ces xylo-oligosaccharides par la cellule lui indique la présence du substrat et mène à l'induction de *xlnB* et *xlnC*. Les xylo-oligosaccharides serviraient ensuite de substrat à la XlnA et seraient clivés en sucres assimilables.

3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

3.1 LISTE DES PRODUITS UTILISÉS

Acétate d'ammonium (American Chemicals)
Acétate de sodium (Sigma)
Acrylamide (ICN)
Acétone (BDH)
Acide borique (Mallinckrodt)
Acide chlorydrique (Anachemia)
Acide éthylènediaminetétraacétique (Sigma)
Acide maléique (BDH)
Acide molybdique (Sigma)
Acide p-hydroxybenzoïque hydrazide (ICN)
Adénosine 5'-triphosphate (Pharmacia)
ADN Ligase T4 (Pharmacia)
ADN polymérase *Pfu* clonée (Stratagene)
ADN polymérase *Taq* (Pharmacia)Agar (Difco)
Agarose (Boehringer Mannheim)
Agent bloquant (Boehringer Mannheim)
Ampicilline (Boehringer Mannheim)
Anticorps Anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim)
Anticorps Anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim)
Bactotryptone (Difco)
N,N'-méthylène-bis-acrylamide (Bio-Rad)
Bleu brillant de Rémazol (Aldrich)
Bleu de bromophénol (Bio-Rad)
Bleu Brillant de Coomassie (Bio-Rad)
Borate de sodium (Fisher)
Bromure d'éthidium (Boehringer Mannheim)
N-butanol (Fisher)
Carbonate de sodium (Baker)
Casamino acids (Difco)
Chloroforme (Baker)
Chlorure de calcium (BDH)
Chlorure de cobalt (Baker)
Chlorure de cuivre (Fisher)
Chlorure ferrique (Fisher)
Chlorure de manganèse (Baker)
Chlorure de magnésium (BDH)
Chlorure de potassium (Mallinckrodt)
Chlorure de sodium (Sigma)
CSPD (Boehringer Mannheim)
2'-Désoxyadénosine 5'-triphosphate (Pharmacia)
2'-Désoxycytidine 5'-triphosphate (Pharmacia)

2'-Désoxyguanosine 5'-triphosphate (Pharmacia)
2'-Désoxythymidine 5'-triphosphate (Pharmacia)
Dihydrogéno-orthophosphate de potassium (BDH)
Diméthylsulfoxide (Sigma)
DNase I (Pharmacia)
Endonucléases de restriction (Pharmacia), sauf *Bst*EII et *Sfu*I (Boehringer Mannheim)
Éthanol (Gouvernement du Québec)
Extrait de boeuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Ficoll type 400 (Sigma)
Gélatine (Bio-Rad)
γ-Globuline de bovin (Bio-Rad)
Glucose (Fisher)
Glycérol (ICN)
Glycine (BDH)
Hydroxyde de sodium (Baker)
Isopropanol (Baker)
Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
Kanamycine sulfate (Boehringer Mannheim)
Lysozyme (Pharmacia)
Maltose (Difco)
Marqueur de poids moléculaire 1 kb (Gibco BRL)
Marqueur de poids moléculaire 1 kb + (Gibco BRL)
Marqueur de poids moléculaire Low Molecular Weight (Gibco BRL)
Marqueur de poids moléculaire Rainbow (Amersham)
Marqueur de poids moléculaire Rainbow Full Range (Amersham)
Mélange de marquage à la DIG pour le PCR (Boehringer Mannheim)
ß-Mercaptoéthanol (Bio-Rad)
L-Méthionine (Sigma)
NBT/BCIP (Boehringer Mannheim)
p-Nitrophénol (Sigma)
p-Nitrophénol ß-D-xylopyranoside (Sigma)
N-Z-amine A (Sheffield)
Paraffine liquide (BDH)
Persulfate d'ammonium (Bio-Rad)
Phénol (Boehringer Mannheim)
Phénylméthyl sulfonylfluoride (Gibco BRL)
Phosphate de potassium (Fisher)
Phosphate de sodium monobasique (Fisher)
Phosphate de sodium dibasique (Baker)
Polyéthylène glycol 1500 dans Hepes 75 mM (50%, p/v) (Boehringer Mannheim)
Polyéthylène glycol 8000 (Sigma)
L-Proline (Sigma)
Propionamide (Aldrich)
Ribonucléase I "A" (Pharmacia)

Saccharose (BDH)
Sarkosyl (IBI)
Sodium dodécyl sulfate (Anachemia)
Spermidine (Sigma)
Sulfate d'ammonium (Fisher)
Sulfate de cuivre (Baker)
Sulfate de fer (Baker)
Sulfate de magnésium (BDH)
Sulfate de manganèse (Baker)
Sulfate de potassium (Anachemia)
Sulfate de zinc (Sigma)
Tampon One-Phor-All 10x (Pharmacia)
Tampon 10x pour la polymérase *Pfu* clonée (Stratagene)
Tampon de réaction 10x pour la polymérase *Taq* (Pharmacia)
TEMED (Bio-Rad)
TES (Sigma)
Tris (Boehringer Mannheim)
Thiostreptone (Squibb)
Tryptic soy broth (Difco)
Tween 20 (Bio-Rad)
Tween 80 (Aldrich)
L-Tyrosine (Gibco BRL)
X-Gal (Bio-Rad)
Xylane de bouleau (Sigma)
Xylane d'épeautres d'avoine (*oat spelt*) (Sigma)
Xylène cyanol (BDH)
D-Xylose (Sigma)

3.2 SOUCHES BACTÉRIENNES

Les souches bactériennes de *Streptomyces* et d'*Escherichia coli* utilisées lors des travaux sont décrites au tableau 1.

Tableau 1. Description des souches bactériennes utilisées.

Souche	Génotype/phénotype	Source/référence
***S. lividans* 66**		
1326	souche sauvage	sir D. A. Hopwood (John Innes Institute, Angleterre)
10-164	*msiK*$^-$	Hurtubise *et al.*, 1995
ΩabfB8	interrompue dans *abfB*	Ce travail
ΩbxlR18-3	interrompue dans *bxlR*	Ce travail
ΩbxlR4	dérivée de ΩbxlR18-3, interrompue dans *bxlR*	Ce travail
ΩbxlR5	dérivée de ΩbxlR18-3, interrompue dans *bxlR*	Ce travail
ΩmsiK24-2	interrompue dans *msiK*	Ce travail
ΩmsiK24-3	interrompue dans *msiK*	Ce travail
ΩmsiK24-4	interrompue dans *msiK*	Ce travail
R4-4	souche ayant subie une réorganisation génétique	Ce travail
***S. coelicolor* A3(2)**		
J1501	*hisA1, uraA1, strA1, pgl*	sir D. A. Hopwood (John Innes Institute, Angleterre)
E. coli		
DH11S	F$^-$ *mcr*A Δ(*mrr-hsd* RMS-*mcr*BC) Δ(*lac-pro*AB) Δ(*rec*A1398) *deo*R *sup*E *rps*L *srl*$^-$ *thi*/F' *pro*AB$^+$ *lac*I^{q}ZΔM15	Gibco BRL
DM1	F$^-$ *dam*$^-$ 13::Tn9(Cm^R) *dcm*$^-$ *mcr*B *hsd*R$^-$M$^+$ *gal*1 *gal*2 *ara*$^-$ *lac*$^-$ *thr*$^-$ *leu*$^-$ *ton*^{R} *tsx*^{R} *su*$^\circ$ λ$^-$	Gibco BRL

3.3 VECTEURS

Les vecteurs utilisés comme matrices pour des amplifications électives *in vitro* ou dans les expériences de dislocation génétique sont décrits au tableau 2.

Tableau 2. Description des vecteurs utilisés et construits.

Vecteur	Description	Source
pIJ702	Vecteur multicopie se répliquant dans *Streptomyces* et contenant le gène de résistance à la thiostreptone (*tsr*)	sir D. A. Hopwood
pIAF2	pIJ702 avec un insert de 3,1 kb provenant de *S. lividans* cloné au site *Bgl*II et comprenant *bxlA* et une partie de *bxlG*	Pronovost, 1991; Larocque, 1998
pIAF31	pIJ702 avec un insert de 7 kb provenant de *S. lividans* cloné au site *Bgl*II et comprenant *abfB* et *xlnA*	Vincent *et al.*, 1997
pIAF42	pIJ702 avec un insert de 7,5 kb provenant de *S. lividans* cloné au site *Bgl*II et comprenant *axeA* et *xlnB*	Shareck *et al.*, 1995
pIAF48	pIJ702 avec un insert de 5,9 kb provenant de *S. lividans* cloné au site *Bgl*II et comprenant *msiK*	Hurtubise *et al.*, 1995
pIAF116	pIJ702 avec un insert de 11,4 kb provenant de *S. lividans* cloné au site *Bgl*II et comprenant *abfA*	Manin *et al.*, 1994
RF5	Forme réplicative de M13mp18 contenant le fragment *Bgl*II-*Sac*I de 1,6 kb provenant de pIAF2	Larocque, 1998
RF5b	Forme réplicative de M13mp19 avec un insert *Kpn*I-*Bam*HI de 4,3 kb provenant de *S. coelicolor* et comprenant *bxlS, bxlR* et *bxlE*.	Larocque, 1998
RF40	Forme réplicative de M13mp19 contenant le fragment *Sac*I de 3,9 kb provenant de pIAF31	Vincent *et al.*, 1997

Tableau 2 (suite)

pTZ18R	Vecteur multicopie d'*E. coli* dérivé de pUC118 et contenant le promoteur T7	Pharmacia
pTZ18Rt1	pTZ18R avec un insert de 1,08 kb contenant le gène *tsr* cloné au site *Hin*dIII (direction vers site *Eco*RI)	Ce travail
pTZ18Rt2	pTZ18R avec un insert de 1,08 kb contenant le gène *tsr* cloné au site *Hin*dIII (direction opposée à celle dans pTZ18Rt1)	Ce travail
pSL1180t	pSL1180 avec un fragment *Bcl*I de 1,05 kb provenant de pIJ702 et contenant le gène *tsr* cloné au site *Bgl*II	Arhin *et al.* (1994)
pML01	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 893 pbs de *bxlA*	Ce travail
pML02	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 893 pbs de *bxlA*	Ce travail
pML03	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 798 pbs de *bxlR*	Ce travail
pML04	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 798 pbs de *bxlR*	Ce travail
pML05	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 752 pbs de *msiK*	Ce travail
pML06	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 752 pbs de *msiK*	Ce travail
pML09	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 817 pbs de *abfB*	Ce travail
pML10	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 817 pbs de *abfB*	Ce travail
pML11	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 438 pbs de *axeA*	Ce travail
pML12	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 438 pbs de *axeA*	Ce travail

Tableau 2 (suite)

pML13	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 641 pbs de *bxlS*	Ce travail
pML14	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 641 pbs de *bxlS*	Ce travail
pML15	pTZ18Rt1 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 971 pbs de *bxlA* avec des codons d'arrêt ajoutés	Ce travail
pML16	pTZ18Rt2 avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 971 pbs de *bxlA* avec des codons d'arrêt ajoutés	Ce travail
pML17	pSL1180t avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 817 pbs de *abfB*	Ce travail
pML18	pSL1180t avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 438 pbs de *axeA*	Ce travail
pML19	pSL1180t avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 893 pbs de *bxlA*	Ce travail
pML20	pSL1180t avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 798 pbs de *bxlR*	Ce travail
pML21	pSL1180t avec un insert *Bam*HI-*Eco*RI d'une portion interne de 752 pbs de *msiK*	Ce travail
pBxlA1, 2, 3, 5, 6 et 12	pML16 avec des délétions bidirectionnelles générées par l'exonucléase *Bal*31 d'environ 50 à 150 pbs à partir du site *Sac*I	Ce travail
pBxlR6789	pSL1180t avec un insert *Sac*I-*Pst*I de 586 pbs de la région 5' de *bxlR* et un insert *Pst*I-*Kpn*I de 590 pbs de la région 3' de *bxlR*	Ce travail
pBxlS6789	pSL1180t avec un insert *Sac*I-*Pst*I de 631 pbs de la région 5' de *bxlS* et un insert *Pst*I-*Kpn*I de 626 pbs de la région 3' de *bxlS*	Ce travail

Tableau 2 (suite)

pFD666	Vecteur navette d'*E. coli* et *Streptomyces* contenant le gène de la néomycine phosphotransférase (*neo*) du transposon Tn5	Denis et Brzezinski, 1992
pNeoR1	pBxlR6789 avec un insert *Pst*I de 1021 pbs amplifié par PCR à partir de pFD666 et contenant le gène *neo* dans l'orientation contraire à *tsr*	Ce travail
pNeoR2	pBxlR6789 avec un insert *Pst*I de 1021 pbs amplifié par PCR à partir de pFD666 et contenant le gène *neo* dans la même orientation que *tsr*	Ce travail
pNeoS1	pBxlR6789 avec un insert *Pst*I de 1021 pbs amplifié par PCR à partir de pFD666 et contenant le gène *neo* dans l'orientation contraire à *tsr*	Ce travail
cosmide 1H10	Cosmide Supercos-1 avec un insert d'environ 40 kb au site *Bam*HI provenant du chromosome de *S. coelicolor* M145 digéré par *Sau*3AI	Redenbach *et al.*, 1996
p1H10	pTZ18Rt2 avec un insert *Kpn*I-*Pst*I de 4,6 kb provenant du cosmide 1H10 et comprenant les gènes *bxlE-R-S*	Ce travail
p1H10R	p1H10 délété d'un fragment *Bst*EII de 427 pbs	Ce travail

3.4 MILIEUX DE CULTURE

3.4.1 *Streptomyces*

3.4.1.1 Pression sélective

Afin de sélectionner les bactéries qui ont intégré un plasmide contenant le gène de résistance à la thiostreptone (*tsr*), cet antibiotique (dilué dans le DMSO) a été ajouté à une concentration de 50 µg/ml en milieu solide et 5 µg/ml en milieu liquide (Hopwood *et al.*, 1985). Pour sélectionner les bactéries résistantes à la kanamycine, cet antibiotique a été ajouté à une concentration de 40 µg/ml en milieu solide.

3.4.1.2 Milieu liquide riche pour la croissance

Le milieu riche TSB a servi à la croissance des streptomycètes en milieu liquide et est composé de 27,5 g de Tryptic Soy Broth sans glucose de Difco par litre d'eau distillée. Le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave.

3.4.1.3 Milieu liquide minimal pour la croissance

Le milieu minimal M14 a été utilisé pour faire croître les streptomycètes avec différentes sources de carbone. Ce milieu contient 1,4 g de $(NH_4)_2SO_4$, 5 g de K_2HPO_4, 1 g de KH_2PO_4, 2 ml de Tween 80 et 1 ml de sels de Mandels par litre d'eau distillée. Le pH doit être d'environ 7,4.

La solution de sels minéraux de Mandels est composée de 140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 160 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ par 100 ml d'eau distillée (Mandels et Reese, 1957).

Après stérilisation du milieu à 121°C pendant 20 minutes, 0,6 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5%, 1 ml de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ et 1% (concentration finale) du sucre servant de source de carbone ont été ajoutés par 100 ml. Pour induire la production des protéines impliquées dans la dégradation du xylane, 1 g de xylane d'épeautres d'avoine (*oat spelt*) soluble a été ajouté par 100 ml de milieu avant stérilisation.

3.4.1.4 Milieu solide pour la croissance

Le milieu de Bennett (Jones, 1949) légèrement modifié a été utilisé pour la croissance et la sporulation de *S. lividans* et pour la conservation des souches. Il est composé de 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de bœuf, 2 g de N-Z-amine A, 10 g de maltose et 22 g d'agar par litre d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 7,3 avec du NaOH puis le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave.

Le milieu Nutrient Agar (NA) de Difco a été utilisé pour la croissance, la sporulation et la conservation des souches de *S. coelicolor*. Pour le réhydrater, 23 g ont été ajoutés à un litre d'eau distillée et le tout a été chauffé jusqu'à dissolution. Le milieu a ensuite été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave.

3.4.1.5 Milieu pour la production des protoplastes

Le milieu R5 liquide a été utilisé pour la production des protoplastes (Hopwood *et al.*, 1985). Ce milieu contient 103 g de saccharose, 250 mg de K_2SO_4, 10,12 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 g de glucose, 100 mg de Casamino Acids, 5 g d'extrait de levure, 5,73 g de tampon TES et 2 ml de solution d'éléments traces par litre d'eau distillée.

La solution d'éléments traces est composée de 40 mg de $ZnCl_2$, 200 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ et 10 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ par litre d'eau distillée (Hopwood *et al*, 1985).

Le milieu a été réparti en aliquots de 100 ml et stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Par la suite, 1 ml de KH_2PO_4 0,5%, 400 µl de $CaCl_2$ 5M, 1,5 ml de L-proline 20%, 1,4 ml de NaOH 1N et 2,5 ml de glycine 20% ont été ajoutés stérilement aux aliquots de 100 ml.

3.4.1.6 Milieu pour la régénération des protoplastes

Le milieu R5 solide (Hopwood *et al.*, 1985, modifié par Kluepfel) a servi à la régénération des protoplastes. Il est composé de 515 g de saccharose, 1,25 g de K_2SO_4, 50,6 g de $MgCl_2$, 50 g de glucose, 500 mg de Casamino Acids de Difco, 10 ml de solution d'éléments traces (voir section 3.4.1.5), 25 g d'extrait de levure, 28,65 g de tampon TES et 110 g d'agar par 4775 ml d'eau distillée. Après stérilisation du milieu à 121°C pendant 20 minutes, les solutions stériles suivantes ont été ajoutés : 50 ml de KH_2PO_4 0,5%, 20 ml de $CaCl_2$ 5M, 5 ml de $CuSO_4$ 5 mg/ml, 75 ml de L-proline 20%, 50 ml de méthionine 1% et 2 g de tyrosine préalablement dissout dans 25 ml de NaOH 1N. Le milieu a été réparti en plats de Pétri puis a été séché à température de la pièce jusqu'à une perte de 15% de son poids.

3.4.1.7 Milieu solide pour la détection de l'activité xylanasique

La détection de l'activité xylanolytique a été réalisée sur un milieu minimal solide contenant du xylane couplé au bleu brillant de Rémazol (RBB-xylane). Ce milieu est composé de 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 g de KH_2PO_4, 5 g de K_2HPO_4, 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de KCl, 1 ml de sels minéraux de Mandels (voir section 3.4.1.3) et 17 g d'agar par 750 ml d'eau distillée; le pH a été ajusté à 7,2.

Parallèlement à cela, 2 g de RBB-xylane ont été dissouts pendant 30 minutes dans 250 ml d'eau distillée chaude. Les deux solutions ont été stérilisées à 121°C pendant 20 minutes

séparément puis combinées après leur refroidissement à 55°C. Ensuite, 10 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5% ont été ajoutés stérilement et le milieu a été réparti en plats de Pétri.

3.4.2 *Escherichia coli*

3.4.2.1 Pression sélective

La sélection et le maintient des clones de *E. coli* contenant un plasmide possédant le gène *bla* (β-lactamase) conférant une résistance à l'ampicilline a été fait par l'ajout d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml. Les souches contenant un plasmide possédant le gène *aph* (aminoglycoside phosphotransférase) donnant une résistance à la néomycine et la kanamycine ont été sélectionnées et maintenues par l'ajout de kanamycine sulfate à une concentration finale de 50 µg/ml.

3.4.2.2 Milieu pour la croissance

Le milieu 2x TY a été utilisé pour la croissance de *E. coli*. Ce milieu contient 16 g de Bacto tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée. Il est possible de solidifier le milieu en y ajoutant 15 g/L d'agar. Le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave.

3.5 CONDITIONS DE CULTURE

3.5.1 *Streptomyces*

Après croissance sur milieu nutritif Bennett, R5 ou NA, le mycélium et les spores ont été récoltés à l'aide d'un fil de platine et déposés dans un microtube de 1,5 ml contenant 500 µl de milieu TSB; le mycélium a été rendu homogène avec un homogénéisateur et a servi d'inoculum à une pré-culture de 12 ml en milieu TSB dans un flacon Erlenmeyer de 125

ml. Trois à cinq billes de verre stériles (3 à 5 mm de diamètre) ont été ajoutées dans le flacon Erlenmeyer afin d'éviter l'agrégation du mycélium. Après 24 h (ou plus si la croissance n'est pas suffisante) d'incubation avec agitation à 240 rpm, 5 à 8 ml de cette pré-culture ont été centrifugés 10 minutes dans une centrifugeuse de table (IEC Clinical Centrifuge) pour récolter le mycélium; ce dernier est resuspendu pour ensemencer le milieu de croissance de 100 ml. Les cultures ont été incubées à 30°C ou 34°C selon le cas.

Pour obtenir une suspension de spores, 3 ml d'eau distillée stérile ont été déposés sur du mycélium ayant sporulé sur un milieu solide dans un plat de Pétri. Les spores ont été grattées à l'aide d'une pipette et la suspension a été récoltée.

Pour faire des répliques sur velours, une suspension de spores a été diluée puis ensemencée sur un agar Bennett afin d'obtenir des colonies isolées. Après incubation jusqu'à l'obtention de colonies sporulées, la surface de l'agar a été appuyée contre un morceau de velours. Un agar Bennet-thiostreptone (BT) a ensuite été appuyé contre le même morceau de velours puis incubé jusqu'à ce que les colonies poussent.

3.5.2 *Escherichia coli*

Des cultures de 1,5 ml ont été préparées en piquant une colonie sur agar 2x TY à l'aide d'un cure-dent stérile; le cure-dent a été introduit dans un tube contenant le milieu de culture 2x TY et le tout a été incubé à 37°C avec une agitation de 240 rpm pour 16 heures.

Pour conserver les souches, 15% (concentration finale) de glycérol a été ajouté aux cultures de 1,5 ml après 16 h d'incubation et le tout a été congelé à -70°C.

3.6 OLIGONUCLÉOTIDES SYNTHÉTIQUES

Les oligonucléotides servant d'amorces dans les réactions de PCR ont été synthétisés avec le Gene Assembler de Pharmacia LKB. Une liste détaillée des oligonucléotides utilisés ainsi que leurs séquences est présentée aux tableaux 3 et 4. Certains sites de restriction ont été ajoutés aux extrémités des séquences des oligonucléotides pour permettre le clonage des amplicons.

Tableau 3. Nom et séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés comme amorces pour amplifier un fragment d'ADN par PCR. Les séquences de reconnaissance des enzymes de restriction sont soulignées. Les codons d'arrêt ajoutés (TGA) ou leur complément (TCA) sont en caractères gras. La longueur attendue du produit de PCR est indiqué dans la colonne de droite en nombre de paires de bases (pbs).

Nom	**Séquence (5'→3')**	**pbs**
AbfA5	GGCGGATCCGAGGACTCGGTCGGCCCG *Bam*HI	948
AbfA3	GGCGAATTCGAGGACCTCGCCGCGGCC *Eco*RI	
AbfB5	GGCGGATCCTGGTCCTCGACGGGGGTTCTG *Bam*HI	835
AbfB3	GGCGAATTCCTTGCCCTGGTAGAGGAACTG *Eco*RI	
AxeA5	GGCGGATCCTTCGACGACGGCCCCTCCGG *Bam*HI	456
AxeA3	GGCGAATTCCCAGTCGTGCATGAGGATG *Eco*RI	
BxlA5	GGCGGATCCGGCGCCACCTTCGACCCG *Bam*HI	911
BxlA3	GGCGAATTCGGCGGCGTTGGGGCCGATC *Eco*RI	
BxlA5-stop	GGGGATCC**TGATTGATTGA**CAAGCACTTCGTGGGCTAC *Bam*HI	1008
BxlA3-stop	GGGAATTC**TCAATCAATCA**GGGTGAGGGATTCGGCGTC *Eco*RI	
BxlR5	CCCGGATCCAGCACCACCAGGGCCAGGGTG *Bam*HI	815
BxlR3	CCCGAATTCCTCCTCGGCCATGTGCCGCAG *Eco*RI	

Tableau 3 (suite)

BxlR6	GCGGAGCTCTCGACGACGGCGCTGTTGAAG *Sac*I	604
BxlR7	GCGCTGCAGCCGGGCGCCCACCTCAACTTC *Pst*I	
BxlR8	GCGCTGCAGGCGGACGCCTGACGAGGGTCC *Pst*I	608
BxlR9	GCGGGTACCCCCGGACTCCTAGCGTCGGCG *Kpn*I	
BxlS5	GGGGGATCCCCCGTCAGATGGCCGCGCTGG *Bam*HI	659
BxlS3	GGGGAATTCCCGGGGAGGCCGTGGTGACGC *Eco*RI	
BxlS6	GCGGAGCTCAGCCGCACGGACGCCTGGCGA *Sac*I	650
BxlS7	GCGCTGCAGCTCGGCCACCTCACGCAGCAC *Pst*I	
BxlS8	GCGCTGCAGGACACGGACGACCCTCCCCTG *Pst*I	646
BxlS9	GCGGGTACCGGACGAGCCGCAGACCGTCGC *Kpn*I	
MsiK5	GGCGGATCCCACCTGCCGCCGAAGGACCGG *Bam*HI	770
MsiK3	GGCGAATTCGGTCTCCTCCACGACGTTCAC *Eco*RI	
neo1	GCGCTGCAGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTA *Pst*I	1021
neo2	GCGCTGCAGGAATCAAATTATCGAGGTTGACAT *Pst*I	
neo3	GCGGGTGACCCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTA *Bst*EII	1023
neo4	GCGGGTCACCGAATCAAATTATCGAGGTTGACAT *Bst*EII	
tsr5-2	CCGAAGCTTTGATCAAGGCGAATACTTC *Hind*III *Bcl*I	1078
tsr3-2	CCGAAGCTTTGATCATCACTGACGAATCG *Hind*III *Bcl*I	

Tableau 4. Nom et séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés comme amorces pour amplifier un fragment d'ADN par PCR servant de sonde marquée à la DIG. La longueur attendue du produit de PCR en nombre de paires de bases (pbs) et le nom de la sonde sont indiqués dans les deux colonnes de droite.

Nom	**Séquence (5'→3')**	**pbs**	**Sonde**
AbfB5	GGCGGATCCTGGTCCTCGACGGGGGTTCTG	835	abfB-1
AbfB3	GGCGAATTCCTTGCCCTGGTAGAGGAACTG		
AbfB5-2	GCATGCGGTGCGGCGAGCGGCGTA	326	abfB-2
AbfB3-2	CTGCTGCACGACGGGACCGTCACC		
AxeA5	GGCGGATCCTTCGACGACGGCCCCTCCGG	456	axeA-1
AxeA3	GGCGAATTCCCAGTCGTGCATGAGGATG		
BxlA5-4	GCTGTAGAGACCACCCCCGAAATC	380	bxlA-2
BxlA3-4	CGTGGCGCCCCAAGGCGCGAAGCC		
BxlR5	CCCGGATCCAGCACCACCAGGGCCAGGGTG	815	bxlR-1
BxlR3	CCCGAATTCCTCCTCGGCCATGTGCCGCAG		
BxlR5-5	ACGAGGGGCCGCACGGCCCTATGA	412	bxlR-5
BxlR3-5	ACGTCTTCCACGAGGTCACGGACG		
BxlS5	GGGGGATCCCCCGTCAGATGGCCGCGCTGG	356	bxlS-1
BxlS4	GCCGGGAGGTCAAAAGCGCCAGGT		
MsiK5-2	TCCTGCTCAGCTTCACCC	204	msiK-2
MsiK3-2	GACCAGGACGAGGAACTCG		
tsr1	ATGACTGAGTTGGACACC	809	tsr
tsr2	TTATCGGTTGGCCGCGAG		

3.7 AMPLIFICATION ÉLECTIVE *IN VITRO* D'ADN DE *Streptomyces*

L'ADN des streptomycètes a pu être amplifié de façon élective par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Dans un microtube de 500 µl à paroi mince ont été ajoutés dans l'ordre : 61 µl d'eau distillée, 10 µl de tampon à PCR 10x pour l'ADN polymérase *Taq* ou *Pfu*, 2 µl de chacun des quatre nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, tous à 10 mM), 8 µl de propionamide 50%, 1 µl de Tween 20 5%, 5 µl de chacune des deux amorces diluées à 10 pmol/µl, 1 µl de matrice d'ADN diluée (50 à 100 ng) et 1 µl d'ADN polymérase *Taq* ou *Pfu* pour un volume final de 100 µl. De plus, 75 µl de paraffine liquide ont été ajoutés afin d'éviter l'évaporation lors de la réaction. La PCR a ensuite eu lieu dans le LKB Gene ATAQ Controller de Pharmacia. Lors du premier cycle, l'ADN a été dénaturé à 95°C pendant cinq minutes, l'appariement a été fait pendant cinq minutes à 55°C et l'élongation s'est déroulée pendant trois minutes à 72°C. Ensuite, un cycle composé d'une étape d'une minute à 94°C, d'une minute à 55°C et de trois minutes à 72°C a été répété 30 fois, suivi d'une élongation finale de sept minutes à 72°C. La présence du produit de PCR a pu être vérifiée par la migration de 4 µl de la réaction sur gel d'agarose. Afin d'éliminer les amorces, la paraffine liquide, les sels, les nucléotides non incorporés et la polymérase, le produit de PCR a ensuite été purifié à l'aide de la trousse *High Pure* PCR Product Purification Kit de la compagnie Boehringer Mannheim selon les indications du manufacturier. Ainsi, 500 µl de tampon de liaison (guanidine-thiocyanate 3 M, Tris-HCl 10 mM, EtOH 5% (v/v), pH 6,6) ont été ajoutés à une réaction de PCR de 100 µl. Après avoir été vortexé, le mélange a été transféré dans une colonne *High Pure* insérée dans un tube de collection. Le tout a été centrifugé à vitesse maximale (13 000 rpm dans une microcentrifugeuse Biofuge *pico* de Heraeus Instruments) pendant 30 secondes. Le tube de collection a été vidé, puis 500 µl de tampon de lavage (NaCl 20 mM et Tris-HCl 2 mM, pH 7,5 dans 80% d'éthanol) ont été ajoutés à la colonne qui a de nouveau été centrifugée 30 secondes. Après un deuxième lavage avec 200 µl de tampon de lavage, la colonne a été transférée dans un microtube. Pour éluer l'ADN, 100 µl de tampon d'élution (TE, pH 8,5) ont été ajoutés à la colonne qui a ensuite été centrifugée 30

secondes. L'efficacité de la purification a été vérifiée par la migration de 4 µl de l'éluat en gel d'agarose.

3.8 ANALYSE ET MANIPULATION DE L'ADN

3.8.1 Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction

L'ADN a été digéré avec les endonucléases de restriction de la compagnie Pharmacia Biotech. Le volume de réaction était de 20 µl et comprenait 2 ou 4 µl de tampon One-Phor-All *PLUS* 10x (100 mM Tris-acétate, pH 7,5, 100 mM acétate de magnésium et 500 mM acétate de potassium) selon la concentration optimale des enzymes de restriction, 0,2 à 1 µg d'ADN, 1 µl d'enzyme et un volume d'eau distillée autoclavée permettant de compléter à 20 µl. Le tout a été incubé à 37°C pendant deux heures. Pour les digestions avec l'enzyme *Not*I, du Triton X-100 a été ajouté à une concentration finale de 0,1% (v/v) ainsi que du NaCl à 100 mM. Les digestions avec *Bst*EII ont été réalisées à 60°C pendant une heure sous paraffine liquide. Lorsque nécessaire, les enzymes de restriction ont été inactivées par une incubation de 15 minutes à 85°C.

3.8.2 Migration par électrophorèse en gel d'agarose

L'ADN a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose. Ce dernier était composé de 0,7% (p/v) d'agarose dissout par chauffage dans un tampon TBE 1x (Tris-HCl 89 mM, EDTA 20 mM à pH 8 et acide borique 89 mM). Lorsque la solution a refroidie (environ 50°C), du bromure d'éthidium a été ajoutée au gel à une concentration de 0,5 µg/ml pour permettre la visualisation de l'ADN aux ultraviolets. Après solidification pendant une heure, le gel a été déposé dans une cuve à électrophorèse "DNA Sub Cell" de Bio-Rad contenant suffisamment de tampon TBE 1x pour submerger le gel.

Le tampon d'échantillon (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol et 15% de Ficoll de type 400) a été ajouté à l'ADN digéré dans un rapport 1:5 et les échantillons ont été chargés dans les puits du gel d'agarose. L'ADN a migré dans le gel sous une tension de 30 V pendant 16 heures ou sous une tension de 100 V pendant trois heures. Le marqueur utilisé pour évaluer la longueur des fragments linéaires d'ADN double brin était le 1 kb DNA ladder ou le 1 kb PLUS DNA ladder de Gibco BRL. Les photos de l'ADN dans les gels ont été réalisées avec l'appareil Gel Doc 1000 de Bio-Rad.

3.8.3 Purification de fragments d'ADN d'un gel d'agarose

L'extraction et la purification des fragments d'ADN d'un gel d'agarose ont été réalisées en utilisant les trousses GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ou Sephaglas™ BandPrep Kit de Pharmacia Biotech selon les instructions du manufacturier. Pour la trousse GFX, le bloc d'agarose contenant le fragment d'ADN à purifier a été découpée au scalpel et déposée dans un microtube pour ensuite être pesée (maximum 300 mg). Pour chaque mg de la bande d'agarose, 1 µl de tampon de capture (solution tamponnée contenant de l'acétate et un chaotrope) a été ajouté. Le tout a été vortexé puis incubé à 60°C pendant 15 minutes. L'échantillon a ensuite été transféré dans une colonne GFX insérée dans un tube de collection, incubé une minute et centrifugé 30 secondes à vitesse maximale. Après avoir vidé le tube de collection, 500 µl de tampon de lavage (TE dans 80% d'éthanol) ont été ajoutés à la colonne qui a de nouveau été centrifugée 30 secondes. La colonne a ensuite été transférée dans un microtube et 50 µl de TE ont été ajoutés à la colonne pour éluer l'ADN. Après une incubation d'une minute, l'ADN purifié a été récupéré suite à une centrifugation d'une minute. L'efficacité de l'extraction était vérifiée par migration de 4 µL de l'éluat en gel d'agarose.

De légères modifications ont été apportées au protocole de la trousse Sephaglas™ BandPrep: la bande d'ADN à extraire a été découpée au scalpel (maximum 250 mg) puis déposée dans un microtube, auquel 250 µl de solubilisateur de gel (solution tamponnée de NaI) ont été ajoutés. Le tout a été vortexé avant d'être incubé à 60°C pendant 10 minutes.

Ensuite, 10 µl de la matrice de verre Sephaglas BP préalablement vortexé ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes avec agitation légère à chaque minute puis centrifugé à vitesse maximale pendant 30 secondes. Le surnageant a été jeté puis le culot a été lavé à trois reprises par l'ajout de 80 µL de tampon de lavage (Tris-HCl 5,7 mM, pH 8,0, EDTA 0,29 mM et NaCl 29 µM dans 71,5% d'éthanol) suivi de 30 secondes de centrifugation. Le culot a ensuite été séché pendant 10 minutes, resuspendu par vortex dans 20 µL de TE et incubé 5 minutes avec agitation périodique. Finalement, après une centrifugation d'une minute à vitesse maximale, 20 µL du surnageant contenant l'ADN ont été transférés dans un microtube propre. L'efficacité de l'extraction était vérifiée par migration de 3 µL du surnageant en gel d'agarose.

3.8.4 Ligation

L'ADN de l'insert (un produit de PCR) et du vecteur a été digéré avec les enzymes de restriction appropriées, puis ces dernières ont été inactivées (section 3.8.1). L'ADN digéré a été séparé par migration en gel d'agarose (section 3.8.2), puis les bandes à liguer ont été extraites du gel et purifiées (section 3.8.3). Par la suite, 400 à 600 ng de vecteur et 600 ng d'insert ont été ajoutés à 2 µl d'ATP 10 mM, 2 µl de tampon One-Phor-All *PLUS* 10x, 1 µl d'ADN ligase T4 et un volume d'eau distillée permettant de compléter à 20 µl. Le tout a été incubé à 14°C de une à seize heures.

3.8.5 Délétion par la nucléase *Bal*31

Des digestions par la nucléase *Bal*31 ont été effectuées afin d'introduire une délétion dans des plasmides. Cette enzyme possède une activité endodésoxyribonucléase/ exonucléase sur les extrémités 5' et 3' d'ADN double brin ayant des extrémités franches ou protubérantes. Les plasmides (9 µg d'ADN chacun) ont tout d'abord été digérés (section 3.8.1) à leur site de restriction unique *Sac*I, puis 20 µl de tampon *Bal*31 2x ($CaCl_2$ 24 mM, $MgCl_2$ 24 mM, NaCl 400 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8,0 et EDTA 2 mM) ont été

ajoutés à la réaction de digestion de 20 µl. Le tout a été pré-incubé trois minutes à 37°C, puis 1,5 U de *Bal*31 ont été ajoutés. Des prélèvements de 13 µl ont été réalisés après 1, 3 et 5 minutes. La réaction a été arrêtée en mettant les échantillons sur la glace et en ajoutant 1,3 µl d'EGTA 500 mM. Les prélèvements ont ensuite été réunis en un seul tube auquel 60 µl d'eau distillée ont été ajoutés. Afin d'isoler l'ADN, 50 µl de phénol et 50 µl de chloroforme ont été ajoutés et le tout a été vortexé puis centrifugé deux minutes à 13 000 rpm. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau microtube et l'ADN a été précipité par l'ajout de 0,1 volume de NaOAc 3 M, 5 µl de polyacrylamide linéaire 0,25% et 2,5 volume d'éthanol 95% (Gaillard et Strauss, 1990). Le mélange a été incubé 30 minutes à -70°C, puis centrifugé 10 minutes à vitesse maximale. Le culot d'ADN a été resuspendu dans 40 µl de TE. Le plasmide a ensuite été religué sur lui-même (section 3.8.4) avant d'être introduit dans des cellules compétentes de *E. coli* DH11S (voir section 3.9.1).

3.8.6 Dénaturation alcaline de plasmides

Des plasmides *d'E. coli* isolés avec la trousse Flexi-Prep (section 3.10.1) ont été dénaturés par traitement alcalin avant leur transformation dans des protoplastes de *S. lividans* (Oh et Chater, 1997). Dans un microtube, 9 µl d'ADN et 2 µl de NaOH 1 M ont été mélangés puis incubés à 37°C pendant 10 minutes. Les microtubes ont alors été refroidis dans de la glace et 2 µl de HCl 1 M ont été ajoutés.

3.9 TRANSFORMATION DE BACTÉRIES

3.9.1 Cellules compétentes d'*Escherichia coli*

Des bactéries compétentes de souche *E. coli* DH11S ont été préparées selon la méthode décrite dans la trousse U.S.E. Mutagenesis Kit de Pharmacia Biotech. Les cellules compétentes d'*E. coli* DM1 ont été obtenues de la compagnie Gibco BRL.

Les cellules compétentes ont été transformées à partir d'un produit de ligation qui portait un gène de résistance à un antibiotique. Dans un tube Falcon stérile, 300 µl de cellules compétentes et 5 µl du produit de ligation (200 à 300 ng d'ADN) ont été mélangés doucement. Suite à une incubation sur glace de 40 minutes, les cellules ont été soumises à un traitement à la chaleur de deux minutes à 42°C. Le tube a été remis sur glace et 1 ml de milieu 2x TY a été ajouté. Le tout a été incubé à 37°C avec agitation pour 45 minutes afin de permettre l'expression phénotypique du gène de résistance à un antibiotique présent sur le vecteur. Pour obtenir des colonies isolées, 100µl de la culture ont été étalés sur des plats de Pétri contenant du milieu 2x TY et l'antibiotique approprié à l'aide de quatre billes de verre; les géloses ont ensuite été incubés à 37°C pour la nuit. Lorsque le criblage par l'expression du gène rapporteur *lacZ* était possible, 50 µl de X-Gal 20 mg/ml (dans du diméthyl formamide) et 10 µl d'IPTG 100 mM ont préalablement été étalés sur les géloses.

3.9.2 Protoplastes de *Streptomyces*

L'introduction d'ADN étranger de façon naturelle chez les streptomycètes est difficile en raison de leur épaisse paroi cellulaire. Des protoplastes doivent donc être préparés pour transformer *S. lividans*, selon la méthode décrite par Hopwood *et al.* (1985) légèrement modifiée. Toutes les étapes doivent se faire de façon stérile. Tout d'abord, une culture de 100 ml de milieu R5 liquide a été inoculée à partir d'une pré-culture de 12 ml en milieu TSB. Le tout a été incubé à 30 ou 34°C avec une agitation de 200 rpm pendant 24 heures. Si nécessaire, la culture a été homogénéisée puis centrifugée dans des tubes de 50 ml à 10 000 g pendant 15 minutes (centrifugeuse Beckman J2-21, rotor JA20). Le mycélium a été lavé à deux reprises dans une solution de saccharose 10,3% puis resuspendu à l'aide d'une pipette dans 40 ml de tampon P contenant 1 mg/ml de lysozyme. Le tout a été incubé pendant 30 minutes à 37°C et a été mélangé doucement à l'aide d'une pipette après 15 et 30 minutes d'incubation.

Le tampon P est composé de 103 g de saccharose, 250 mg de K_2SO_4, 2,02 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, et 2 ml d'une solution d'éléments traces (voir section 3.1.4) par 800 ml d'eau distillée. Le tampon a été réparti en aliquots de 80 ml puis stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave. Par la suite, 1 ml de KH_2PO_4 0,5%, 10 ml de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3,68% et 10 ml de tampon TES 5,73% (pH 7,2) ont été ajoutés de façon stérile à chaque aliquot.

Après les 30 minutes d'incubation avec le lysozyme, une lame a été préparée pour observation au microscope à contraste de phase. Lorsqu'environ 95% de protoplastes ont été observés, ces derniers ont été filtrés sur laine de verre dans des tubes à centrifugation de 50 ml. Suite à une centrifugation de sept minutes à 5000 g (rotor JA-20), le surnageant a été décanté. Le culot a été resuspendu dans le volume résiduel, lavé dans 40 ml de tampon P et centrifugé à 5000 g pendant sept minutes (rotor JA-20). Après un deuxième lavage, le culot a été resuspendu dans le volume résiduel. Une quantité de tampon P permettant d'obtenir entre 10^8 et 10^9 protoplastes/ml a finalement été ajoutée. La concentration en protoplastes a pu être estimée par spectrophotométrie à une densité optique de 600 nm à l'aide d'une courbe standard de l'absorbance en fonction du nombre de protoplastes par ml. Les protoplastes pouvaient ensuite être directement utilisés ou encore congelés à -70°C pour utilisation subséquente.

Les protoplastes ont été transformés avec de l'ADN plasmidique isolé d'*E. coli* sous forme simple brin ou double brin dénaturé selon la méthode à petite échelle décrite par Hopwood *et al.* (1985). Dans un microtube, 50 µl de protoplastes et 5 à 10 µl d'ADN ont été déposés. Ensuite, 200 µl de tampon T ont été ajoutés et le tout a été mélangé à la pipette puis incubé de une à deux minutes.

Pour préparer le tampon T, les solutions stériles suivantes doivent d'abord être mélangés: 25 ml de saccharose 10,3%, 75 ml d'eau distillée, 0,2 ml de solution d'éléments traces (section 3.4.1.5) et 1 ml de K_2SO_4 2,5%. À 9,3 ml de ce mélange, 0,2 ml de $CaCl_2$ 5M et 0,5 ml de tampon Tris-acide maléique 1M (pH 8,0) ont été ajoutés. Un volume de cette

nouvelle solution a ensuite été ajouté à un volume de polyéthylène glycol (PEG) 1500 dissout dans de l'Hepes 75 mM (PEG 50%, p/v) pour obtenir une concentration finale de 25% de PEG.

La suspension de protoplastes (100 et 150 µl) a ensuite été étalée à l'aide de quatre billes de verre sur deux géloses R5 (section 3.4.1.6). Après une incubation de 16 heures à 30°C, chaque gélose a été recouverte de 1 ml d'eau distillée stérile contenant l'antibiotique approprié. La sélection des bactéries ayant intégré le gène de résistance à la thiostreptone (*tsr*) a été réalisée en ajoutant 500 µg de cet antibiotique par plat de Pétri, tandis que la sélection des bactéries ayant intégré le gène de résistance à la néomycine (*neo*) a été effectuée en ajoutant 4 mg de kanamycine sulfate par plat de Pétri. Les géloses ont de nouveau été incubées à 30°C de deux à cinq jours, jusqu'à l'apparition de colonies résistantes.

3.10 ISOLEMENT ET PURIFICATION D'ADN

3.10.1 Isolement de plasmides d'*Escherichia coli*

L'ADN plasmidique d'*E. coli* a pu être isolé avec la trousse FlexiPrep de Pharmacia Biotech en suivant les instructions du manufacturier pour les Minipreps. Une culture de 1,5 ml d'*E. coli* ayant crû 16 heures a été transférée dans un microtube puis centrifugée à vitesse maximale pendant 30 secondes. Le culot a été resuspendu dans 200 µl de solution I (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, 400 µg/ml de ARNase I) en vortexant vigoureusement. Les cellules ont subi une lyse alcaline par l'ajout de 200 µl de solution II (NaOH 1 M, SDS 5,3%) suivi d'un mélange par inversion des tubes à quelques reprises. Le pH du lysat a ensuite été neutralisé par l'ajout de 200 µl de solution III (potassium 3 M, acétate 5 M) et par un mélange des tubes par inversion. Le mélange a été centrifugé à vitesse maximale pendant 5 minutes, puis le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube auquel 420 µl (0,7 volume) d'isopropanol ont été ajoutés. Après avoir été vortexé, le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température de la pièce et

centrifugé 10 minutes à vitesse maximale. Le surnageant a été éliminé et le culot asséché d'ADN plasmidique a été dissout dans 50 µl de TE.

3.10.2 Préparation d'ADN simple brin de plasmides d'*Escherichia coli*

Hilleman *et al.* (1991) ont démontré que la fréquence d'intégration dans le chromosome de *Streptomyces* était 10 à 100 fois supérieure lorsque l'ADN donneur était simple brin plutôt que double brin. L'ADN plasmidique sous forme réplicative (double brin) a donc été converti en ADN simple brin à l'aide du phagemide auxiliaire M13K07 d'*E. coli*. Le plasmide que l'on vise à obtenir sous forme d'ADN simple brin doit posséder un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication du phage M13 et doit avoir été transformé dans la souche *E. coli* DH11S. Cette souche transformée possédant la forme réplicative du plasmide a servi à ensemencer 1,5 ml de milieu 2x TY contenant 100 µg/ml d'ampicilline; la pré-culture a été incubée à 37°C avec agitation pour la nuit. Par la suite, une nouvelle culture de 1,5 ml de 2x TY contenant 150 µg/ml d'ampicilline a été inoculée avec 1% de la pré-culture puis incubée à 37°C avec agitation pour 30 minutes. Ensuite, 10 µl du phage auxiliaire M13K07 ont été ajoutés et l'incubation continuée pendant une heure. Ce phage possède un gène de résistance à la kanamycine permettant de sélectionner les bactéries infectées. De la kanamycine a donc été ajoutée à une concentration finale de 75 µg/ml pour sélectionner les bactéries infectées par le phagemide et l'incubation a été reprise pendant 45 minutes. Un volume de 150 µl de cette culture a alors servi à inoculer 11 ml de milieu 2x TY contenant 0,2% de glucose, 75 µg/ml de kanamycine et 150 µg/ml d'ampicilline. Cette culture a été incubée pour la nuit à 37°C avec agitation.

La culture a alors été centrifugée dans un tube Corex à 10 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et le phage a été précipité avec 1 ml de PEG_{8000} 50% et 500 µl de NH_4OAc 7,5 M; le tout a été incubé une heure à 4°C puis centrifugé pendant 15 minutes à 8000 rpm. Après qu'il ait séché complètement, le culot a

été resuspendu dans 400 µl de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) et transféré dans un microtube. Le tout a été traité avec 10 U de DNase I et 1 µl de RNase A à 10 mg/ml et incubé à 37°C pendant 15 minutes. Un demi volume de phénol a alors été ajouté et 15 minutes plus tard, le même volume de chloroforme a été ajouté. Après un délai de 5 minutes, il y a eu centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes et la phase aqueuse a été récupérée. L'extraction phénol/chloroforme a été répétée de 3 à 4 fois jusqu'à l'obtention d'une interface claire. Un volume de chloroforme a alors été ajouté et le tout a été centrifugé une minute. La phase aqueuse a été récupérée et l'ADN a été précipité à –20°C pour la nuit suite à l'ajout de 0,1 volume de NaOAc 3M et de deux volumes d'éthanol 95%. Finalement, le mélange a été centrifugé 10 minutes à 13 000 rpm; le culot a été récupéré, séché et resuspendu dans 50 µl de TE. La quantité d'ADN a pu être estimée par l'absorbance à 260 nm; une unité de DO correspond approximativement à 40 µg/ml d'ADN simple brin.

3.10.3 Isolement d'ADN chromosomique de *Streptomyces*

L'ADN chromosomique total des différentes souches de *Streptomyces* a été isolé selon la méthode à petite échelle de Hopwood *et al.* (1985) légèrement modifiée. Une culture de 5 ml en milieu TSB a été préparée. Après une incubation de 24 à 48 heures à 30°C avec agitation, 50 mg de mycélium ont été récupérés par centrifugation dans un microtube de 1,5 ml. Le mycélium a été resuspendu dans 500 µl de solution de lysozyme (2 mg/ml de lysozyme et 50 µg/ml de RNase dans du saccharose 0,3 M, Tris 25 mM (pH 8), et EDTA 25 mM (pH 8)) et incubé 30 minutes à 37°C. Par la suite, 250 µl de SDS 2% ont été ajoutés et le tout a été vortexé une minute. Une extraction de l'ADN au phénol-chloroforme a ensuite été réalisée: 500 µl d'une solution 1:1 de phénol neutre et de chloroforme ont été ajoutés et le mélange a été vortexé 30 secondes. Après une centrifugation de 2 minutes à 13 000 rpm, la phase aqueuse a été récupérée. L'extraction a été répétée trois à quatre fois (jusqu'à ce que très peu de matériel blanc ait été visible à l'interface), suite à quoi 500 µl de chloroforme ont été ajoutés. La phase aqueuse a de

nouveau été récupérée par centrifugation et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8) a été ajouté. Après mélange au vortex, un volume d'isopropanol a été ajouté. Suite à une incubation de 5 minutes, le mélange a été centrifugé et le surnageant retiré. Une brève centrifugation a permis de retirer le surnageant résiduel. Le culot a ensuite été resuspendu dans 500 µl de tampon TE, auquel 25 µl de spermidine 100 mM ont été ajoutés. Le tout a été vortexé et incubé 5 minutes, puis de nouveau centrifugé 2 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a encore été retiré, et une brève centrifugation a permis d'éliminer le liquide restant. Le culot a été dissout dans 300 µl d'acétate de sodium 0,3 M contenant 10 mM de $MgCl_2$, auxquels 700 µl d'éthanol 95% ont été ajoutés. Après vortex et incubation pendant 60 minutes, le culot a été récupéré par une centrifugation de 2 minutes à 13 000 rpm. Le culot a finalement été dissout dans 50 à 75 µl de tampon TE pour la nuit. La quantité d'ADN a pu être estimée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm; une unité de DO équivaut à approximativement 50 µg/ml d'ADN double brin.

3.11 HYBRIDATION DE L'ADN PAR BUVARDAGE DE SOUTHERN

3.11.1 Buvardage de l'ADN

Le buvardage de l'ADN d'un gel d'agarose à une membrane de nylon a été fait selon la technique développée par Southern (1975). Afin de dénaturer l'ADN avant son transfert, le gel d'agarose a été submergé dans une solution de dénaturation (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M) pour 30 minutes. Le gel a ensuite été submergé dans une solution neutralisante (NaCl 3 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5) pendant 30 minutes.

Le transfert de l'ADN du gel d'agarose à une membrane de nylon (Boehringer Mannheim) a été fait par capillarité dans un tampon 20x SSC (NaCl 3 M, citrate de sodium 300 mM, pH 7). Le gel recouvert par la membrane de nylon et une épaisse couche de papier buvard a été déposé sur un papier buvard qui trempait dans un réservoir de 20x SSC. Le tampon monte par capillarité du réservoir au papier buvard, entraînant l'ADN du gel sur la membrane de nylon. Après 22 heures de transfert, l'ADN a été fixé à la

membrane de nylon par exposition à 150 mJ de rayons UV dans le GS Gene Linker UV Chamber de BIO-RAD.

3.11.2 Marquage des sondes d'ADN à la digoxigénine

L'ADN des sondes a été marqué de façon non-radioactive en utilisant une méthode chimioluminescente à l'aide du mélange de nucléotides PCR DIG labeling mix (Boehringer Mannheim). Les sondes ont été préparées en amplifiant une portion d'ADN par PCR à partir d'une matrice d'ADN appropriée. Le mélange de nucléotides contient de la DIG-11-dUTP qui est incorporé dans la portion d'ADN amplifiée pendant la PCR.

Les éléments suivants ont été mélangés dans un microtube de 500 µl à paroi mince stérile pour ensuite faire la PCR: 10 µl de tampon à PCR 10x pour l'ADN polymérase *Taq*, 10 µl de mélange à marquage PCR DIG (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP 1,9 mM dTTP, 0,1 mM DIG-11-dUTP), 5 µl de chacune des deux amorces diluées à 10 pmol/µl, 1 µl de matrice d'ADN diluée 1 :10, 1 µl d'ADN polymérase *Taq* et 68 µl d'eau distillée stérile permettant d'obtenir un volume final de 100 µl. En dernier lieu, 75 µl de paraffine liquide ont été ajoutés afin d'éviter l'évaporation lors de la réaction. La réaction de PCR a ensuite eu lieu tel que décrit à la section 3.7.

3.11.3 Hybridation

Après le buvardage de l'ADN sur une membrane de nylon, l'ADN a pu être hybridé avec la sonde marquée à la DIG. La membrane de nylon a été introduite dans un tube à hybridation de 3,5 cm x 15 cm contenant 20 ml de tampon de préhybridation (5x SSC, sarkosyl 0,1%, SDS 0,02%, agent bloquant 1%) par 100 cm^2 de surface de membrane et préincubée au moins une heure à 68°C dans un four rotatif à hybridation (Turbo Speed™ de Bio/Can Scientific).

La sonde a été dénaturée à 95°C pendant 10 minutes puis refroidie immédiatement sur de la glace. La sonde a été ajoutée au tampon de préhybridation de façon à obtenir une concentration finale de 25 ng/ml, formant le tampon d'hybridation. Le tout a été incubé 16 heures à 68°C dans le four à hybridation. Le tampon d'hybridation a été retiré et conservé à -20°C pour des hybridations subséquentes. La membrane a été lavée à deux reprises pendant 5 minutes à la température de la pièce avec un tampon de lavage 2x (2x SSC, SDS 0,1%) pour éliminer les sondes qui n'avaient pas hybridé. La membrane a ensuite été lavée deux fois 15 minutes à 68°C avec un tampon de lavage 0,1x (SSC 0,1x , SDS 0,1%).

3.11.4 Détection des sondes marquées à la digoxigénine

La sonde marquée par la DIG a été détectée en utilisant l'anticorps (fraction Fab) anti-digoxigénine conjugué à la phosphatase alcaline; la détection colorimétrique s'est faite avec le substrat CSPD. La méthode de détection est basée sur le protocole décrit dans la trousse DIG Nucleic Acid Detection Kit de Boehringer Mannheim. La membrane a tout d'abord été équilibrée dans 20 ml de tampon 1 (acide maléique 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) pour une minute. Les sites libres de la membrane ont ensuite été bloqués pendant 30 minutes avec 20 ml de tampon 2 (tampon 1 contenant 1% d'agent bloquant). Par après, 4 µl d'anticorps anti-DIG conjugués à la phosphatase alcaline (750 U/ml) ont été ajoutés au tampon 2 et la membrane a été incubée 30 minutes. La membrane a alors été lavée 2 fois 15 minutes avec le tampon 1 contenant 0,3% de Tween 20 puis elle a été équilibrée pendant 5 minutes avec 20 ml de tampon 3 (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM). La membrane a été placée entre deux feuilles d'acétate et 400 µl de tampon 3 contenant 4 µl de CSPD ont été répartis sur la membrane. Après une incubation de quinze minutes à 37°C, un film a été exposé sur la membrane de 30 minutes à 3 heures.

3.12 ANALYSE DES PROTÉINES

3.12.1 Dosage du contenu protéique

La concentration des protéines solubilisées dans les échantillons à analyser a pu être déterminée en utilisant la méthode de Bradford (1976) ou la méthode de Lowry (1951). Le réactif de Bradford utilisé était celui de la trousse Bio-Rad Protein Assay. La procédure pour le microtest décrite par le manufacturier a été utilisée et la γ-globuline a servi pour établir une courbe standard. Pour la méthode de Lowry, la protéine utilisée pour établir une courbe standard était l'albumine de sérum bovin.

3.12.2 Préparation des échantillons de protéines

La souche à analyser a été ensemencée dans 12 ml de milieu M14-xylose, qui a servi à inoculer une culture de 100 ml de milieu M14-glucose ou M14-xylane d'avoine soluble. À différents temps de croissance, 10 ml de la culture ont été prélevés et centrifugés 10 minutes à vitesse maximale dans une centrifugeuse de table. Selon que la protéine à détecter soit intracellulaire ou sécrétée, le culot ou le surnageant a été conservé. Les protéines du surnageant ont été précipitées pendant une heure à 4°C en présence de deux volumes d'acétone. Les protéines ont été récupérées par centrifugation à 13 000 rpm pendant dix minutes. Le culot a alors été resuspendu dans 75 µl de tampon d'échantillon 1x (4 ml d'eau distillée; 1 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 800 µl de glycérol; 1,6 ml de SDS 10% (p/v); 400 µl de 2-ß-mercaptoéthanol; 200 µl de bleu de bromophénol 0,05% (p/v)) (Laemmli 1970). Dans le cas d'une protéine intracellulaire, 50 à 100 mg de mycélium ont été resuspendus dans 300 µl de tampon d'échantillon 1x.

Afin de dénaturer les protéines avant leur séparation dans un gel de polyacrylamide, les échantillons ont été chauffés dans l'eau bouillante pendant 10 minutes.

3.12.3 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

La séparation des protéines dénaturées selon leur poids moléculaire a été réalisée dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode décrite par Laemmli (1970), légèrement modifiée. Le gel de séparation contenait 12% de polyacrylamide et a été polymérisé par l'ajout de 0,05% de TEMED et 0,05% de persulfate d'ammonium. Le gel de concentration avait quant à lui 4% de polyacrylamide et a été polymérisé par l'ajout de 0,1% de TEMED et 0,05% de persulfate d'ammonium.

Le système d'électrophorèse utilisé était le Mini-PROTEAN® II de Bio-Rad. Les gels ont été coulés entre deux plaques de verres séparées par des espaceurs de 0,75 mm. Du N-butanol saturé d'eau a été ajouté pour favoriser la polymérisation du gel de séparation. Pour les gels qui ont été colorés au bleu de Coomassie, le standard de poids moléculaire qui a été utilisé est le Low Molecular Weight de Bio-Rad, composé des protéines suivantes: phosphorylase b (97,4 kDa), albumine de sérum bovin (66 kDa), ovalbumine (46 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et lysosyme (14,3 kDa). Pour les gels ayant servi à un transfert de Western, le standard de poids moléculaire Rainbow de haut poids moléculaire ou le marqueur Rainbow Full Range de Amersham Life Science ont été utilisés; le premier est composé des mêmes protéines que le marqueur Low Molecular Weight de Bio-Rad décrit ci-haut, en plus de contenir la myosine (220 kDa). Le second est composé de protéines recombinantes de poids moléculaire déterminé (250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15 et 10 kDa). Les protéines ont été séparées sous un courant de 200 V pendant environ 60 minutes. Le gel a été coloré pendant 30 minutes dans une solution de coloration (0,1% (p/v) de bleu de Coomassie R-250 dans 40% de méthanol et 10% d'acide acétique) puis décoloré de une à trois heures dans une solution de décoloration (méthanol 40 % et acide acétique 10%).

3.12.4 Transfert des protéines

Les protéines du gel de polyacrylamide ont pu être transférées électrophorétiquement à une membrane de nitrocellulose en conditions semi-sèches (Kyhse-Anderson, 1984). L'appareil qui a été utilisé pour ce type de transfert est le Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad. Suite à l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide et la membrane de nitrocellulose ont été équilibrés pendant 15 minutes dans le tampon de transfert de Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Le gel et la membrane ont été placés entre deux papiers buvards et le transfert a été réalisé sous une tension de 20 V pendant 15 minutes.

3.12.5 Immunodétection des protéines

La membrane de nitrocellulose a été incubée dans 30 ml de solution de blocage (gélatine 3% (p/v) dans TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5)) pendant une heure. La membrane a ensuite été lavée pendant cinq minutes à trois reprises avec la solution de lavage (Tween 80 0,05% (v/v) dans TBS), puis a été incubée avec la solution d'anticorps primaires (10 à 100 µl d'antisérum polyclonal de lapin spécifique à la protéine à détecter, 29 ml de solution de lavage et 1 ml de solution de blocage) pendant une heure. L'étape de trois lavages décrite ci-haut a été répétée, puis la membrane a été incubée une heure en présence de la solution d'anticorps secondaires (15 µl d'anti-IgG de lapin (Boehringer Mannheim), 20 ml de solution de lavage, 10 ml de solution de blocage). Suite à une autre étape de trois lavages, la membrane a été incubée dans du TBS pendant 5 minutes. Finalement, la membrane a été incubée dans la solution de développement (15 µl de solution NBT/BCIP (Boehringer Mannheim), 10 ml de tampon 3 (section 3.11.4)) jusqu'à l'apparition du signal. La réaction a été arrêtée par deux lavages de cinq minutes à l'eau distillée.

3.12.6 Évaluation de l'activité enzymatique

3.12.6.1 Activité xylanasique

Les xylanases étant des enzymes sécrétées, leur activité a été déterminée à partir des surnageants de culture en milieu M14 contenant une source de carbone (section 3.4.1.3). L'activité spécifique des xylanases a été déterminée en incubant les enzymes avec du xylane de bouleau; les sucres réducteurs produits par cette hydrolyse ont ensuite été dosés par la méthode du PAHBAH (Lever *et al.*, 1984) adaptée aux microplaques. En effet, le PAHBAH réagit avec les sucres réducteurs dans des solutions alcalines et chaudes pour former des composés colorés.

En détails, des microtubes contenant 900 µl de xylane de bouleau (5,0 mg/ml dans un tampon citrate 50 mM, pH 6,0) ont tout d'abord été pré-incubés à 60°C. Ensuite, 100 µl de surnageant de culture ont été ajoutés et le tout a été incubé à 60°C pendant 10 minutes. Pour mettre fin à la réaction, 100 µl du mélange ont été prélevés puis ajoutés à 300 µl de PAHBAH 0,25% (dans du NaOH 0,5 M). Après des incubations de 5 minutes à 95°C et de 5 minutes dans un bain d'eau froide et de glace, 200 µl ont été déposés dans une microplaque de 96 puits Falcon. L'absorbance a ensuite été lue à 405 nm avec l'appareil Microplate Autoreader EL309 (Bio-Tek Instruments).

Un test témoin a été utilisé afin de soustraire les sucres réducteurs déjà présents dans le surnageant de culture de ceux obtenus suite à l'incubation de 10 minutes à 60°C. Pour le témoin, les 900 µl de solution de xylane ont été incubés 10 minutes à 60°C sans ajout d'enzyme, puis 90 µl ont été prélevés et ajoutés à 300 µl de PAHBAH 0,25%. À ce mélange, 10 µl de surnageant de culture ont été ajoutés. Le reste du test a été réalisé tel que décrit ci-haut. De plus, une courbe standard a été établie en utilisant des concentrations connues de xylose. Les activités enzymatiques ont été exprimées en unités internationales (UI), où une UI représente la quantité d'enzyme nécessaire à la production de une µmole de sucres réducteurs par minute.

3.12.6.2 Activité ß-xylosidasique

Les cellules ont tout d'abord été cassées selon la méthode de T. Lam (communication personnelle) légèrement modifiée. Des cultures de 20 ml ont été centrifugées à 9000 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse Beckman J2-21, rotor JA20). Le mycélium a ensuite été lavé à trois reprises dans 10 ml de tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 (tampon NaP). Entre chaque lavage, le mycélium a été centrifugé sept minutes à vitesse maximale dans une centrifugeuse de table (IEC Clinical Centrifuge). Le mycélium a ensuite été resuspendu dans un volume minimale de tampon NaP puis a été homogénéisé. Du PMSF a été ajouté à une concentration finale de 50 µg/ml. La suspension de cellules à été refroidie sur glace, puis les cellules ont été cassées par 3 à 4 passages à la presse de French (American Instrument) à une pression de 12 000 psi. La suspension a ensuite été transférée dans des microtubes puis centrifugée à 13 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré puis recentrifugé afin d'éliminer tous les débris cellulaires.

L'activité ß-xylosidasique a été évaluée selon la méthode utilisée par Pronovost (1991), légèrement modifiée par T. Lam. Le test repose sur la mesure de l'hydrolyse par la ß-xylosidase du pNPX incolore en p-nitrophénol (pNP) coloré. Tout d'abord, 80 µl de pNPX 25 mM (dans du tampon NaP) ont été déposés dans un microtube et le tout a été pré-incubé à 40°C. Une fois la température atteinte, 120 µl de l'échantillon ont été ajoutés; pour le témoin, 120 µl de tampon NaP ont été utilisés. La réaction a été arrêtée après 10 minutes à 40°C en transférant les microtubes sur glace et en y ajoutant 300 µl de Na_2CO_3 1 M. Un volume de 200 µl de ce mélange a été déposé dans le puits d'une microplaque de 96 puits Falcon, puis l'absorbance à 405 nm a été lue par l'appareil Microplate Autoreader EL309. Une courbe standard a été établie en utilisant des concentrations connues de pNP. L'activité enzymatique a été exprimée en UI, où une UI représente la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une µmole de pNP par minute.

4. RÉSULTATS

4.1 CONSTRUCTION DES VECTEURS POUR OBTENIR DES INTÉGRANTS

4.1.1 Construction des plasmides pSL1180t, pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2

Les plasmides utilisés pour faire la dislocation génétique des gènes *abfA, abfB, axeA, bxlA, bxlR, bxlS* et *msiK* de *S. lividans* sont des vecteurs de clonage usuels d'*E. coli*, incapables de se répliquer chez les streptomycètes. Un gène de résistance à la thiostreptone (*tsr*) a toutefois été ajouté afin de permettre une sélection des souches de *S. lividans* ayant intégré le plasmide dans leur chromosome. Le plasmide pSL1180t (figure 8) a été construit lors d'une étude précédente (Arhin *et al.*, 1994) en insérant le fragment *Bcl*I de 1,1 kb (comprenant *tsr*) de pIJ702 au site *Bgl*II de pSL1180.

Afin de construire les plasmides pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 (figure 9), le fragment *Bcl*I de 1,1 kb (comprenant *tsr*) de pIJ702 a été amplifié par PCR en utilisant les amorces tsr5-2 et tsr3-2. L'amplicon a été digéré par l'endonucléase de restriction *Hin*dIII, puis ligué au plasmide pTZ18R également digéré par *Hin*dIII. Après transformation dans la souche *E. coli* DH11S et sélection à l'ampicilline et au X-Gal/IPTG, des colonies blanches et bleues ont été obtenues. Les colonies blanches ont été repiquées afin d'en extraire les plasmides. La présence de l'insert de 1,1 kb dans ces derniers a été vérifiée par digestion avec *Hin*dIII et migration en gel d'agarose (figure 10a). L'orientation de l'insert a ensuite pu être déterminée par la digestion des plasmides avec l'enzyme *Pvu*II. Les plasmides engendrant des fragments de restriction *Pvu*II de 549, 861 et 2515 pbs ont été nommés pTZ18Rt1, tandis que les plasmides ayant des fragments de restriction *Pvu*II de 389, 1021 et 2515 pbs ont été désignés pTZ18Rt2 (figure 10b).

4.1.2 Amplifications de portions internes des gènes cibles par PCR

Des portions internes des gènes visant à être disloqués ont été amplifiées par PCR pour ensuite être clonées dans les plasmides décrits dans la section précédente.

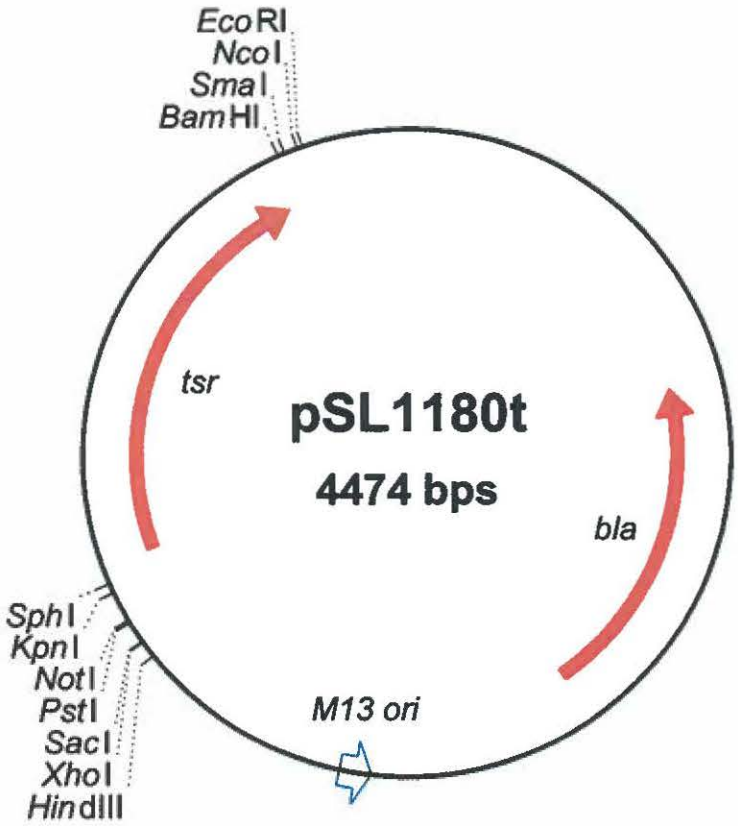


Figure 8. Carte physique du plasmide *d'E. coli* pSL1180t. Certains sites de restriction de la cassette de clonage sont indiqués. *bla*, gène de la ß-lactamase (résistance à l'ampicilline); M13 ori, origine de réplication du phage M13; *tsr*, gène de résistance à la thiostreptone.

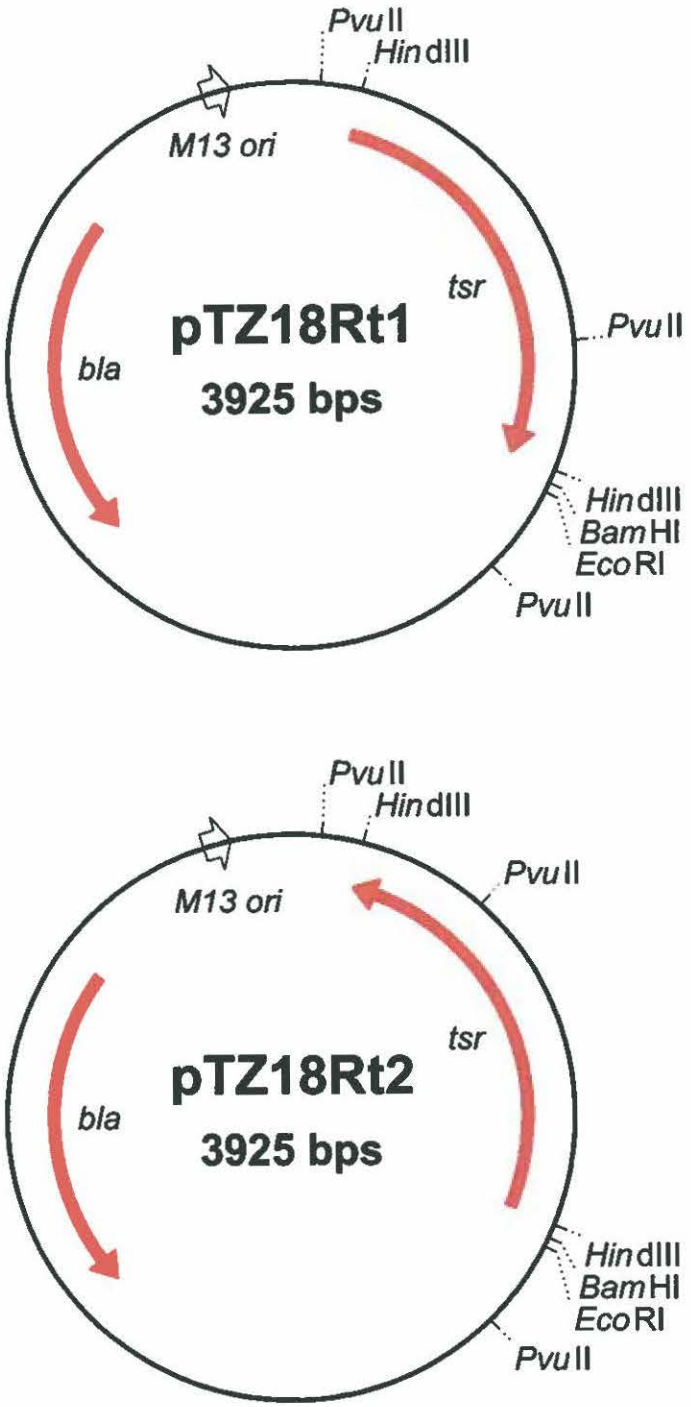


Figure 9. Carte physique des plasmides *d'E. coli* pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2. Certains sites de restriction sont indiqués. *bla*, gène de la ß-lactamase (résistance à l'ampicilline); M13 ori, origine de réplication du phage M13; *tsr*, gène de résistance à la thiostreptone.

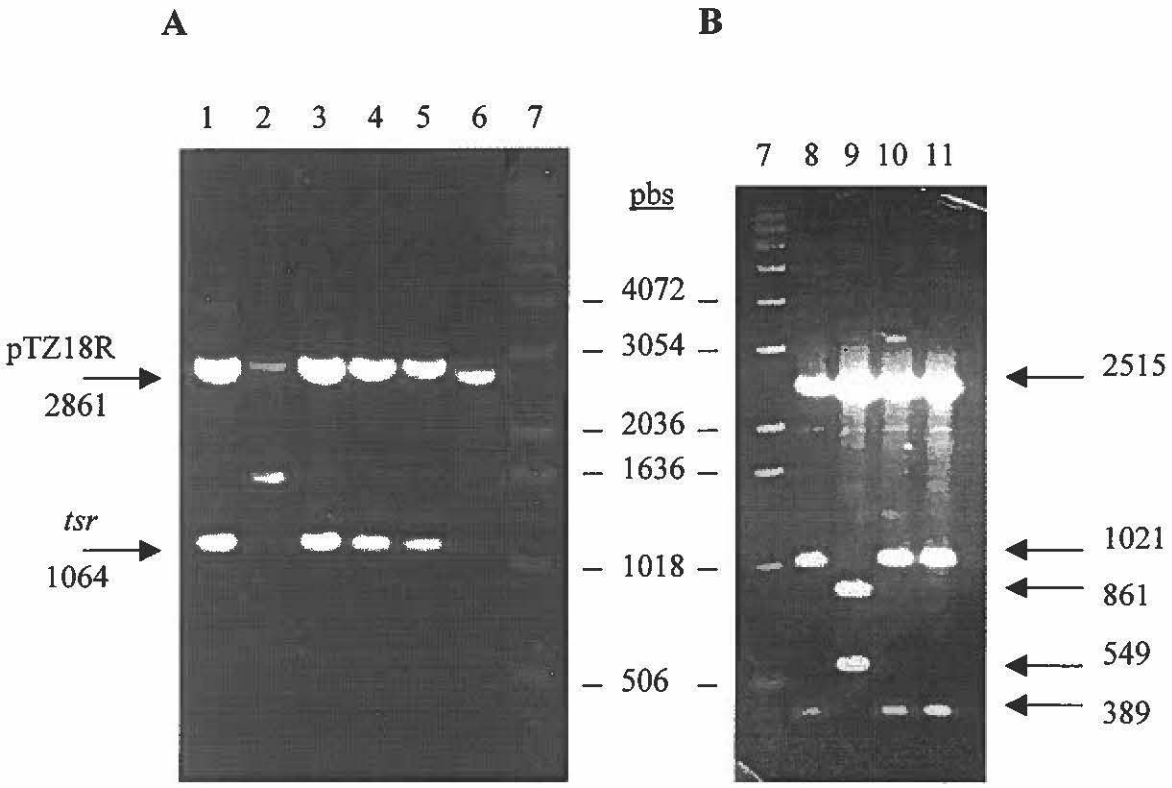


Figure 10. Analyse des plasmides pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 par leur digestion avec des endonucléases de restriction suivie d'une migration en gel d'agarose 0,7%.
a) Les plasmides de colonies blanches résistantes à l'ampicilline ont été isolés puis digérés par l'enzyme *Hin*dIII, séparant l'insert *tsr* (1064 pbs) du plasmide pTZ18R (2861 pbs). b) Les quatre plasmides ayant le bon patron de digestion en (a) on été digéré par l'enzyme *Pvu*II afin de déterminer l'orientation de l'insert *tsr*.

Légende:

1-6: plasmides provenant de six différentes colonies, digérés par *Hin*dIII
7: marqueur de poids moléculaire d'ADN 1 kb
8-11: mêmes plasmides qu'en 1,3,4 et 5 respectivement, digérés par *Pvu*II

Un schéma permettant de visualiser la portion de chaque gène qui a été amplifiée par PCR ainsi que les amorces et la matrice utilisées est présenté à la figure 11. L'efficacité de chaque amplification a été vérifiée par une migration en gel d'agarose et les produits de PCR ont tous été purifiés.

4.1.3 Construction de plasmides intégratifs

Les produits de PCR purifiés décrits dans la section précédente ont tous été digérés par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI. Les plasmides pSL1180t, pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 ont également été digérés par ces enzymes, puis après migration en gel d'agarose, les plasmides linéarisés ont été isolés du gel à l'aide de la trousse Band-Prep ou GFX. Ils ont été ligués aux produits de PCR digérés puis transformés dans *E. coli* DH11S. Les plasmides de colonies résistantes à l'ampicilline ont ensuite été isolés, digérés par *Bam*HI et *Eco*RI et séparés en gel d'agarose afin de vérifier la présence d'un insert du poids moléculaire attendu en plus du plasmide. De cette façon, tous les produits de PCR ont pu être clonés dans pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 à l'exception de l'amplicon de la portion interne d'*abfA*, pour lequel toutes les tentatives de clonage se sont révélées infructueuses. Les deux orientations de *tsr* retrouvées dans pTZ18Rt1 et pTZ18Rt2 ont été utilisées afin de s'assurer que la transcription du gène *tsr* n'aie pas d'effet polaire sur les séquences d'ADN situées en aval. D'autre part, seules les portions internes des gènes *abfB, axeA, bxlA* (sans les codons de terminaison ajoutés), *bxlR* et *msiK* ont été clonées dans pSL1180t. La liste décrivant les plasmides résultants est présentée au tableau 2.

4.2 TRANSFORMATION DE PROTOPLASTES POUR OBTENIR DES INTÉGRANTS

Les plasmides intégratifs ont été isolés *d'E. coli* DH11S puis dénaturés par traitement alcalin ou préparés sous forme d'ADN simple brin avant leur transformation dans *S. lividans*. Typiquement, les rendements en ADN simple brin variaient entre 0,1 et 1 μg/μl.

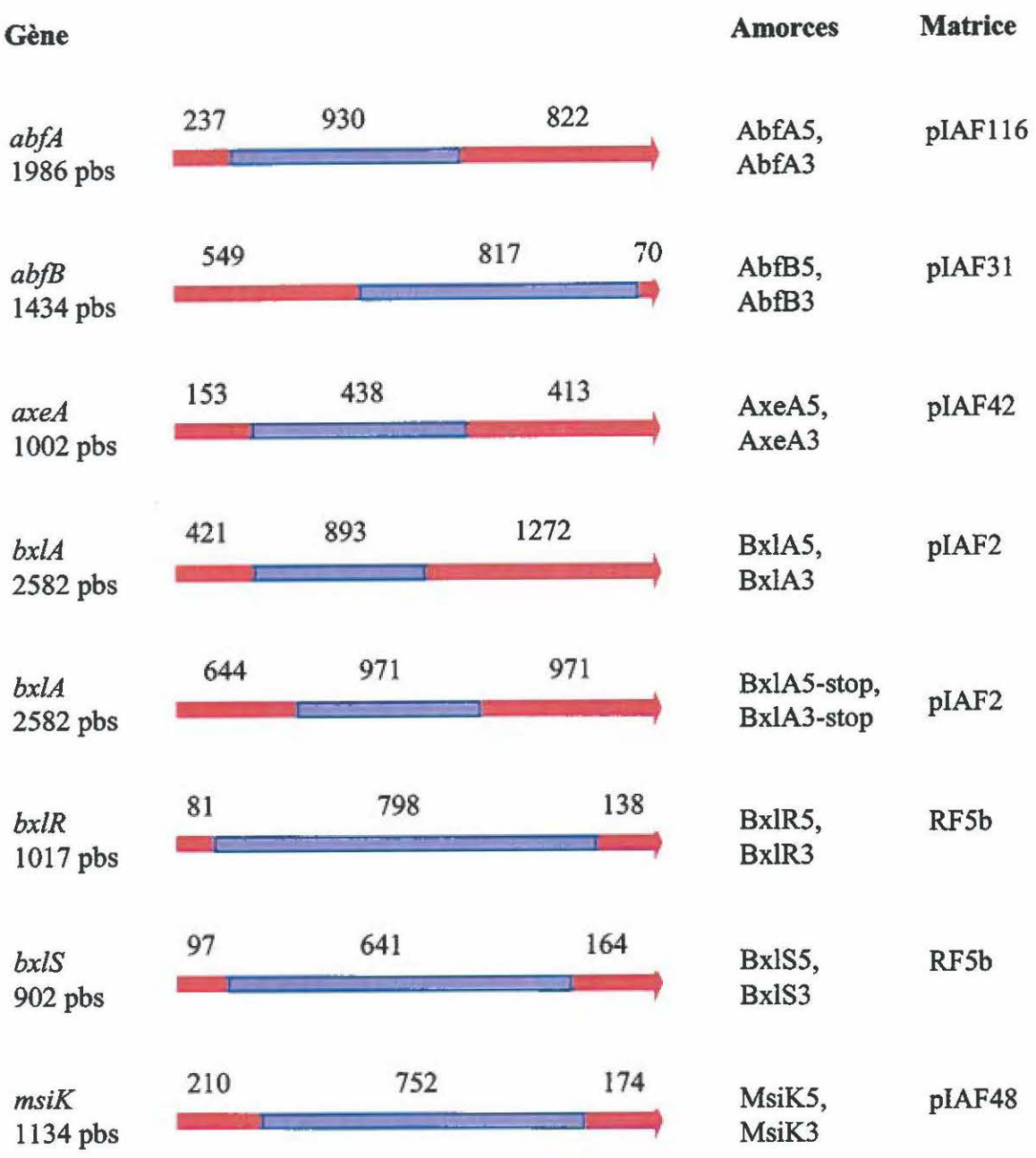


Figure 11. Représentation schématique des portions de gènes qui ont été amplifiées par PCR pour réaliser leur dislocation. Les gènes sont représentés par une flèche rouge et la portion amplifiée par PCR puis clonée dans un vecteur intégratif est en bleu. La longueur en paires de bases du segment bleu et des segments rouges qui le bordent est indiquée au-dessus des flèches. Le nom des gènes et leur longueur totale en paires de bases sont indiqués à gauche de chaque flèche. Le nom des amorces et de la matrice utilisées pour amplifier les portions en bleu est indiqué à la droite de chaque flèche. Les dessins ne sont pas à l'échelle.

Entre 1 et 10 µg d'ADN simple brin ou double brin dénaturé ont été utilisés pour chaque transformation.

4.2.1 Sélection de souches résistantes à la thiostreptone

Plusieurs transformations de protoplastes frais (préparés le jour même) ou décongelés de *S. lividans* 1326 ont été effectuées avec les différents plasmides intégratifs construits. Très peu de colonies résistantes à la thiostreptone ont été obtenues. Un résumé de toutes les transformations effectuées avec les différents plasmides sous différentes formes (ADN sb ou db dénaturé) et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone obtenues est présenté au tableau 5. À titre de comparaison, la transformation de protoplastes avec un plasmide se répliquant chez *Streptomyces* génère environ 10^6 transformants par µg d'ADN plasmidique utilisé.

Ainsi, un total de 106 transformations ont été effectuées pour engendrer quelques souches résistantes à la thiostreptone. Les colonies résistantes à la thiostreptone ont été repiquées sur un milieu solide BT pour s'assurer de leur résistance à cet antibiotique et pour obtenir plus de biomasse. Seules 24 souches ont poussé sur BT. Ces souches ont été générées tant par des transformations impliquant de l'ADN plasmidique simple brin que double brin dénaturé. La liste des souches, du plasmide à l'origine de la transformation et de la forme d'ADN de ce dernier est présentée au tableau 6.

Tableau 5. Description du nombre de transformations de *S. lividans* 1326 effectuées avec les différents plasmides intégratifs sous forme d'ADN simple brin ou d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone (tsr^R) qui en ont résulté. Le gène cible associé à chaque plasmide est indiqué entre parenthèses.

	ADN simple brin		**ADN double brin dénaturé**	
Plasmide (cible)	**Transform.**	**Colonies tsr^R**	**Transform.**	**Colonies tsr^R**
pML01 (*bxlA*)	3	-	4	-
pML02 (*bxlA*)	3	-	3	1
pML03 (*bxlR*)	2	-	2	1
pML04 (*bxlR*)	2	1	7	1
pML05 (*msiK*)	1	1	1	-
pML06 (*msiK*)	1	-	1	2
pML09 (*abfB*)	1	1	1	-
pML10 (*abfB*)	1	-	1	-
pML11 (*axeA*)	1	-	1	-
pML12 (*axeA*)	1	-	1	-
pML13 (*bxlS*)	4	-	3	5
pML14 (*bxlS*)	4	-	5	-
pML15 (*bxlA*)	2	-	1	-
pML16 (*bxlA*)	2	-	2	1
pML17 (*abfB*)	4	1	7	-
pML18 (*axeA*)	4	2	3	-
pML19 (*bxlA*)	2	-	2	1
pML20 (*bxlR*)	5	1	6	-
pML21 (*msiK*)	5	4	7	1
TOTAL	**48**	**11**	**58**	**13**

Tableau 6. Liste des souches résistantes à la thiostreptone obtenues suite à une transformation de *S. lividans* 1326 avec des plasmides intégratifs. Le nom du plasmide à l'origine de la transformation et la forme de son ADN (simple brin ou double brin dénaturé par traitement alcalin) est indiqué.

Souche	Plasmide	ADN	Souche	Plasmide	ADN
abfB6-3	pML17	sb	bxlS12-1	pML14	db
abfB8	pML09	sb	bxlS12-2	pML14	db
axeA22-4	pML18	sb	bxlS12-3	pML14	db
axeA28-2	pML18	sb	bxlS12-4	pML14	db
bxlA8-1	pML19	db	msiK5-2	pML21	sb
bxlA37-3	pML02	db	msiK13-1	pML05	sb
$bxlA_{stop}8$	pML16	db	msiK20-3	pML21	db
bxlR1-1	pML20	sb	msiK24-2	pML21	sb
bxlR16-1	pML03	db	msiK24-3	pML21	sb
bxlR18-1	pML04	sb	msiK24-4	pML21	sb
bxlR18-3	pML04	db	msiK33-1	pML06	db
bxlS10-2	pML13	db	msiK33-2	pML06	db

4.2.2 Analyse génomique des souches résistantes à la thiostreptone

Afin de vérifier si la résistance à la thiostreptone des 24 souches présentées au tableau 6 résultait d'une intégration d'un plasmide dans son gène cible, leur ADN chromosomique a été isolé pour effectuer un buvardage de Southern. L'ADN chromosomique a été digéré avec des endonucléases de restriction permettant d'obtenir un fragment d'ADN comprenant la région qui était susceptible d'intégrer le plasmide par recombinaison homologue. L'ADN digéré et séparé en gel d'agarose a été transféré sur une membrane de nylon avant d'être hybridé à une sonde marquée à la DIG. Les amorces et la matrice utilisées pour obtenir ces sondes sont décrites au tableau 7, tandis que la localisation des sondes et des sites de restriction utilisés par rapport aux différents gènes est montrée à la figure 12.

Tableau 7. Amorces et matrices d'ADN utilisées pour faire des sondes marquées à la DIG par amplification élective *in vitro*.

Sonde	Amorces	Matrice
abfB-1	abfB5, abfB3	RF40
abfB-2	abfB5-2, abfB3-2	RF40
axeA	axeA5, axeA3	pIAF42
bxlA-2	bxlA5-4, bxlA3-4	RF5
bxlR-1	bxlR5, bxlR3	RF5b
bxlR-5	bxlR5-5, bxlR3-5	RF5b
bxlS-2	bxlS5-2, bxlS3-2	RF5b
msiK-2	msiK5-2, msiK3-2	pIAF48
tsr	tsr1, tsr2	pML21

L'ADN chromosomique des souches abfB6-3 et abfB8, digéré par l'endonucléase de restriction *Sac*I, a été hybridé à la sonde abfB-2 (figure 13a). La souche sauvage (1326) a un fragment *Sac*I d'environ 4,7 kb sur lequel la sonde s'est hybridée, ce qui est également le cas de la souche abfB6-3; il n'y a donc pas eu intégration du plasmide dans le gène *abfB* de cette souche. Par contre, la souche abfB8 possède un fragment d'environ 10 kb qui hybride, ce qui indique l'intégration du plasmide pML09 (4,7 kb) dans ce fragment *Sac*I. La membrane a ensuite été décapée puis hybridée à la sonde tsr (figure 13b), et le fragment de la souche abfB8 a été détecté. L'ADN chromosomique de la souche abfB8 a également été digéré par l'enzyme *Pvu*II avant d'être hybridé à la sonde abfB-1. Pour la souche sauvage, un fragment de 1,6 kb a été détecté, tandis que chez la souche abfB8 il y avait ce même fragment en plus d'un autre de 1,4 kb (résultats non montrés). Ce résultat correspond aux fragments attendus dans le cas d'une intégration. Étant donné qu'il y a eu intégration du plasmide pML09 dans le bon locus, la souche a été renommée ΩabfB8, où le symbole Ω représente l'intégration.

L'analyse génomique des souches axeA22-4 et axeA28-2 par la digestion de leur ADN chromosomique avec l'enzyme *Sph*I suivie d'une hybridation à la sonde axeA-1 a été

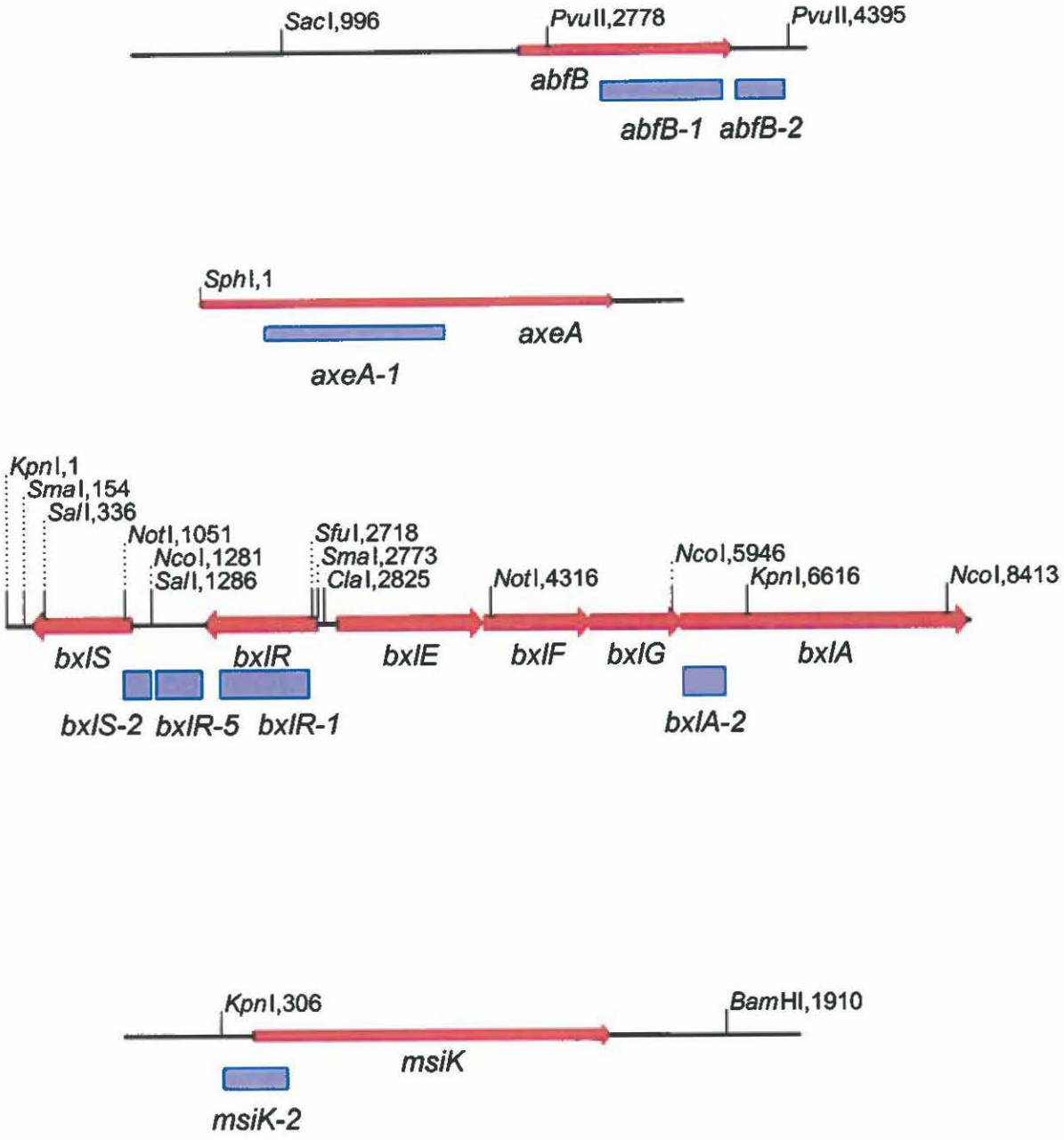


Figure 12. Localisation des sondes marquées à la DIG par PCR par rapport aux régions du chromosome sondées. Les gènes sont représentés par une flèche rouge, les sondes par des rectangles bleus. Les sites de restriction utilisés lors des buvardages de Southern sont indiqués par le nom de l'endonucléase de restriction et sa position dans la séquence.

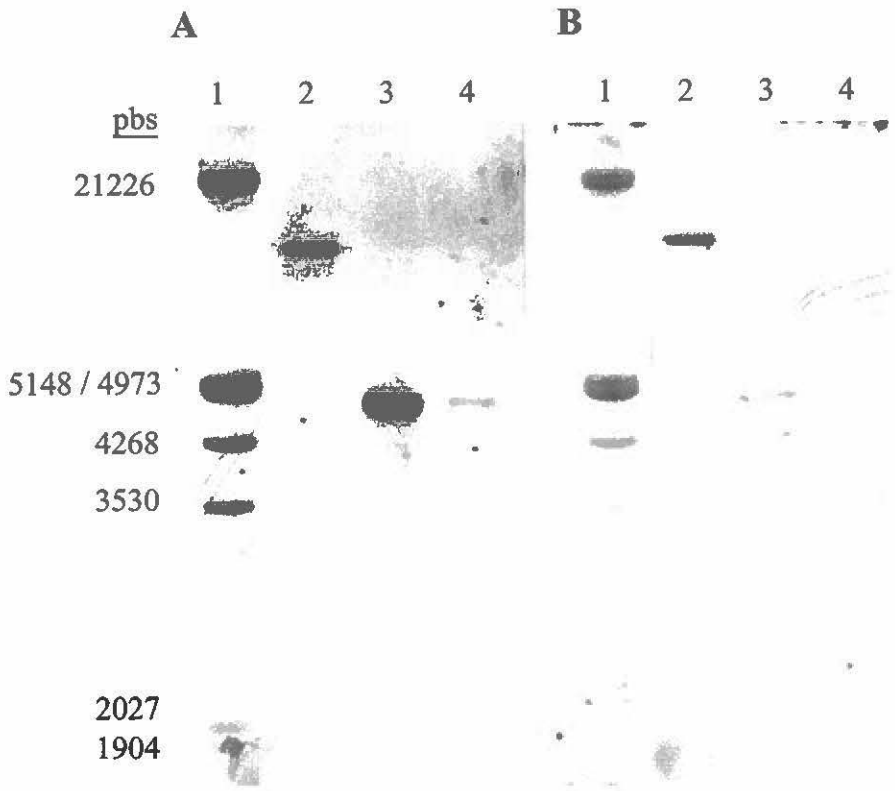


Figure 13. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par l'endonucléase de restriction *Sac*I. La membrane a tout d'abord été hybridée avec la sonde abfB-2 (a) puis, après décapage, avec la sonde tsr (b).

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche ΩabfB8
3 : souche 1326
4 : souche abfB6-3

réalisée. Ces souches ont un fragment *Sph*I de 1,3 kb qui hybride, comme c'est le cas de la souche 1326 (résultats non montrés). Il n'y a donc pas eu intégration du plasmide pML18 dans le gène *axeA* de ces souches.

L'ADN chromosomique des souches bxlA8-1, bxlA37-3 et bxlA$_{stop}$8 a été digéré par l'enzyme *Nco*I puis hybridé à la sonde bxlA-2. Des fragments de 2,5 kb ont été détectés chez les trois souches, tout comme pour la souche sauvage (résultats non montrés). Il n'y a donc pas eu intégration des plasmides pML19, pML02 et pML16 dans le gène *bxlA* de ces souches.

L'analyse génomique des souches bxlR1-1, bxlR16-1, bxlR18-1 et bxlR18-3 a été réalisée. Leur ADN chromosomique a été digéré par l'endonucléase de restriction *Nco*I en combinaison avec *Cla*I ou *Sfu*I, puis hybridé à la sonde bxlR-5. Les souches bxlR1-1, bxlR16-1, bxlR18-1 et 1326 ont tous un fragment de 1,5 kb qui hybride (résultats non montrés), indiquant qu'il n'y a pas eu intégration des plasmides pML20, pML03 et pML04 dans cette portion du chromosome. Après décapage, l'ADN des souches bxlR16-1 et bxlR18-1 a été hybridé à la sonde tsr, mais il n'y a pas de fragment détecté (résultat non montré). Par contre, la souche bxlR18-3 a un patron d'hybridation à la sonde bxlR-5 différent de celui de la souche sauvage (figure 14 a et b), avec des fragments d'environ 1,7 et 4,7 kb pour la digestion *Cla*I-*Nco*I et un fragment de plus de 21 kb pour la digestion *Nco*I-*Sfu*I. Des résultats identiques sont obtenus suite une hybridation avec la sonde bxlR-1 (résultats non montrés). Il semble donc qu'il y ait eu intégration de plus d'une copie du plasmide pML04 dans ce fragment d'ADN chez la souche bxlR18-3, renommée ΩbxlR18-3. Il y a également eu hybridation de fragments d'ADN de la souche bxlR18-3 à la sonde tsr (figure 14c).

L'ADN chromosomique des souches bxlS10-2, bxlS12-1, bxlS12-2, bxlS12-3 et bxlS12-4 a été digéré par l'enzyme *Sal*I puis hybridé à la sonde bxlS-2. Toutes ces souches ont un fragment de 1 kb qui est détecté, ce qui correspond à la souche sauvage (résultats non

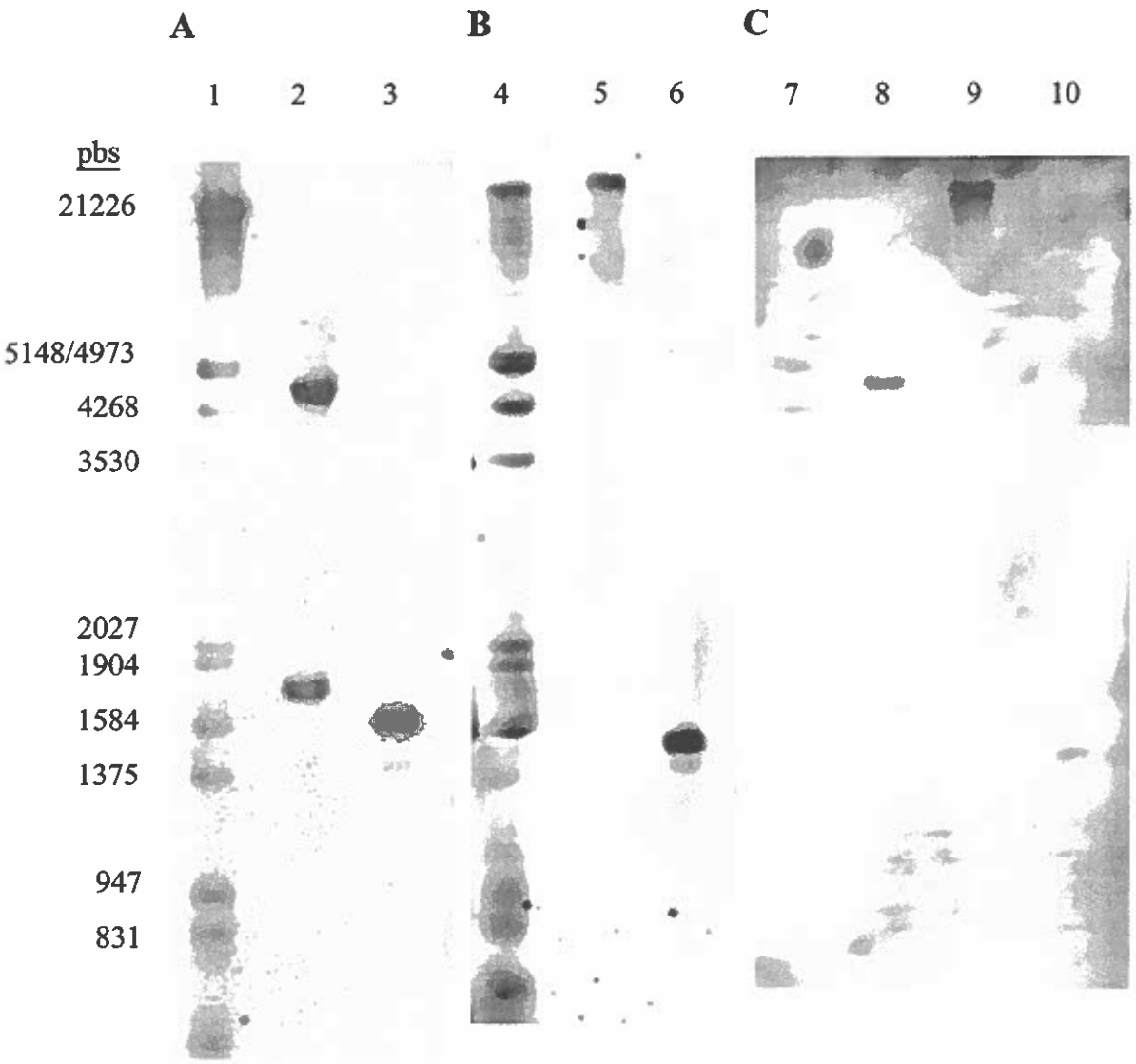


Figure 14. Hybridations de type Southern d'ADN chromosomique digéré par des endonucléases de restriction. Les membranes ont été hybridée avec la sonde bxlR-5 (a, b) et avec la sonde tsr (c).

Légende :

1, 4, 7 : marqueurs de poids moléculaire d'ADN marqués à la DIG
2, 8 : souche ΩbxlR18-3; digéré par les enzymes *Cla*I et *Nco*I
3 : souche 1326; digéré par les enzymes *Cla*I et *Nco*I
5, 9 souche ΩbxlR18-3; digéré par les enzymes *Nco*I et *Sfu*I
6, 10 : souche 1326; digéré par les enzymes *Nco*I et *Sfu*I

montrés). Il n'y donc pas eu d'intégration des plasmides pML13 et pML14 dans le gène *bxlS*.

Finalement, l'ADN chromosomique des souches msiK5-2, msiK13-1, msiK20-3, msiK24-2, msiK24-3, msiK24-4, msiK33-1 et msiK33-2 a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Kpn*I avant d'être hybridé avec la sonde msiK-2. Les fragments détectés pour les souches msiK5-2, msiK13-1, msiK20-3, msiK33-1 et msiK33-2 et 1326 étaient tous les mêmes, soit 1,6 kb. Ce résultat est présenté à la figure 18 pour les souches msiK13-1 et msiK33-1, les autres résultats n'étant pas montrés. Les plasmides pML05, pML06 et pML21 ne se sont donc pas intégrés dans le gène *msiK* de ces souches. Pour ce qui est des souches msiK24-2, msiK24-3 et msiK24-4, la sonde msiK-2 s'est hybridée à un fragment de 4,3 kb (figure 15a) tandis que la sonde tsr s'est hybridée à un fragment de 1,1 kb (figure 15b). Ces fragments sont attendus suite à une intégration du plasmide pML21 dans le gène *msiK*. Les souches ont été renommées ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4.

En résumé, cinq souches ayant intégré un plasmide dans le gène visé ont été obtenues: ΩabfB8, ΩbxlR18-3, ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4. Toutes ces souches sont capables de croître en présence de thiostreptone dû à l'intégration du gène *tsr* dans leur chromosome.

4.3 REPIQUAGES SANS SÉLECTION POUR OBTENIR DES DÉLÉTIONS

4.3.1 Sélection de souches devenues sensibles à la thiostreptone

Afin d'obtenir des délétions chromosomiques au niveau des gènes *abfB, bxlR* et *msiK*, des repiquages en absence de pression sélective ont été réalisés sur les souches ΩabfB8, ΩbxlR18-3, ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4. Après trois à cinq passages sur un milieu Bennett, les spores de chaque souche ont été récoltées, diluées et ensemencées sur milieu Bennett afin d'obtenir des colonies isolées. Des répliques sur velours ont ensuite été effectuées du milieu Bennett à un milieu BT. Après croissance sur ce deuxième

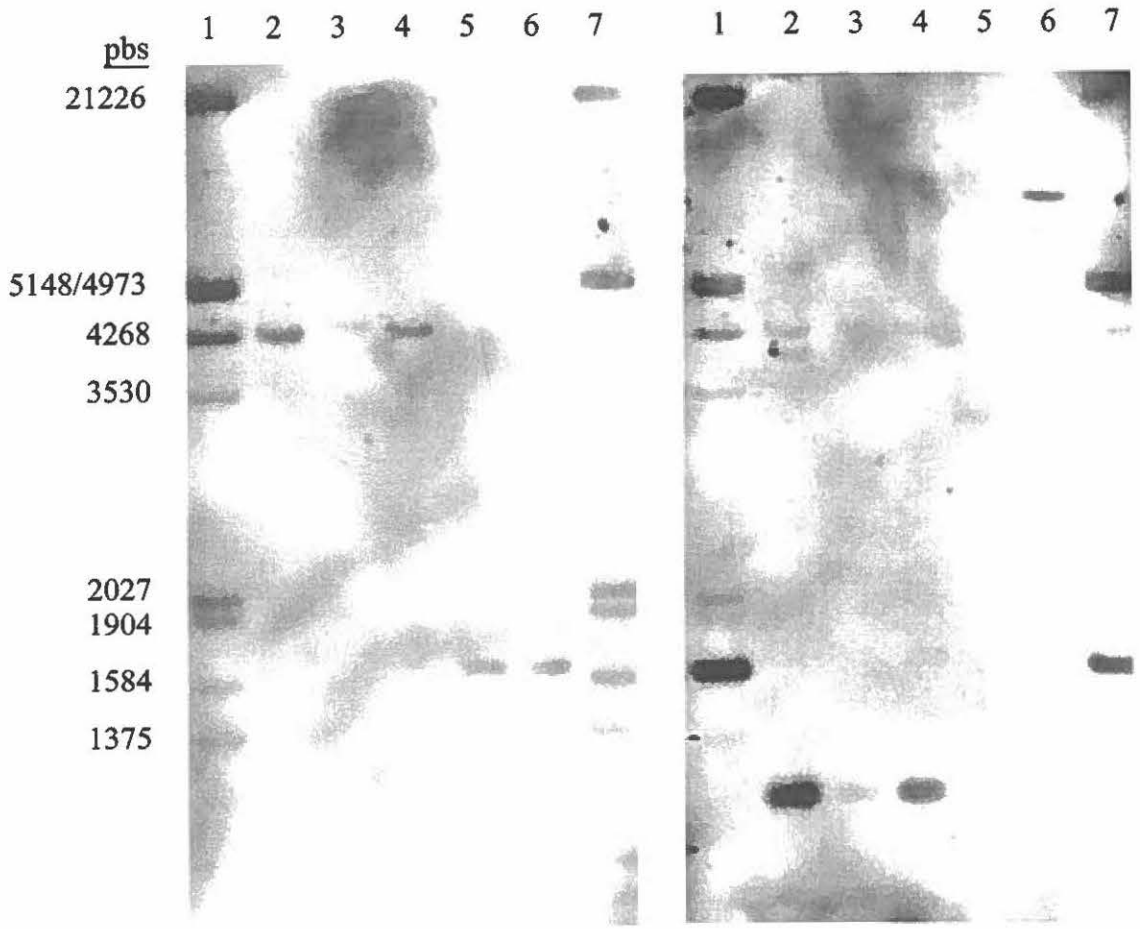


Figure 15. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Kpn*I. La membrane a tout d'abord été hybridée avec la sonde msiK-2 (a) puis, après décapage, avec la sonde tsr (b).

Légende :

1 et 7 : marqueurs de poids moléculaire d'ADN marqués à la DIG
2 : souche ΩmsiK24-2
3 : souche ΩmsiK24-3
4 : souche ΩmsiK24-4
5 : souche 1326
6 : plasmide pIAF48 (contrôle positif)

milieu solide, les colonies du milieu Bennett ont été comparées à celles du milieu BT pour vérifier si certaines colonies avaient perdu leur résistance à la thiostreptone, indiquant une délétion du plasmide et possiblement d'une partie du gène cible. De cette façon, 15 colonies dérivées de ΩbxlR18-3 et ne poussant pas ou très mal sur milieu BT ont été sélectionnées; 117 colonies dérivées d'une des trois souches ΩmsiK et ne poussant pas sur milieu BT ont également été repiquées. Aucune colonie sensible à la thiostreptone n'a pu être générée à partir de la souche ΩabfB8. Étant donné le grand nombre de colonies *tsr*^{S} obtenues à partir des souches ΩmsiK, un criblage a été effectué en repiquant les souches sur milieu RBB-xylane. Ainsi, huit souches ne produisant pas ou peu de zone d'hydrolyse ont été sélectionnées.

4.3.2 Analyse génomique des souches sensibles à la thiostreptone

L'ADN chromosomique des 15 souches dérivées de ΩbxlR18-3 (nommées ΔbxlR1 à 15) a été digéré par les enzymes *Nco*I et *Sfu*I puis hybridé à la sonde bxlR-5. Deux types de résultats ont été observés: les souches ΔbxlR1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 et 14 ont un fragment de 1,5 kb identique à celui de la souche 1326 sur lequel la sonde s'est hybridée; pour les souches ΔbxlR4, 5, 6, 10, 11 et 15, le fragment détecté est d'environ 6,1 kb (figures 16 et 17; les résultats pour certaines souches ne sont pas montrés). Ce fragment est celui attendu suite à l'intégration d'une seule copie de pML04. Le deuxième groupe de souches était capable de croissance en présence de thiostreptone. Ces souches avaient peut-être été mal repiquées sur velours vers un milieu BT, ce qui explique qu'elles ont été choisies comme étant sensibles à la thiostreptone au départ. Étant donné que certaines de ces souches semblaient avoir une copie du plasmide pML04 intégré dans *bxlR*, deux d'entre elles (ΔbxlR4 et ΔbxlR5) ont de nouveaux été soumises à trois rondes de croissance en absence de sélection. Ainsi, 15 souches sensibles à la thiostreptone ont été obtenues suite à des répliques sur velours d'un milieu Bennett à BT: ΔbxlR4-1, 2 ,3 4, 37 et ΔbxlR5-1, 2, 3, 4, 5, 6,10, 16, 26, 67. L'ADN chromosomique de ces souches a également été digéré par les enzymes *Nco*I et *Sfu*I puis hybridé à la sonde bxlR-5. Dans tous les cas, le même

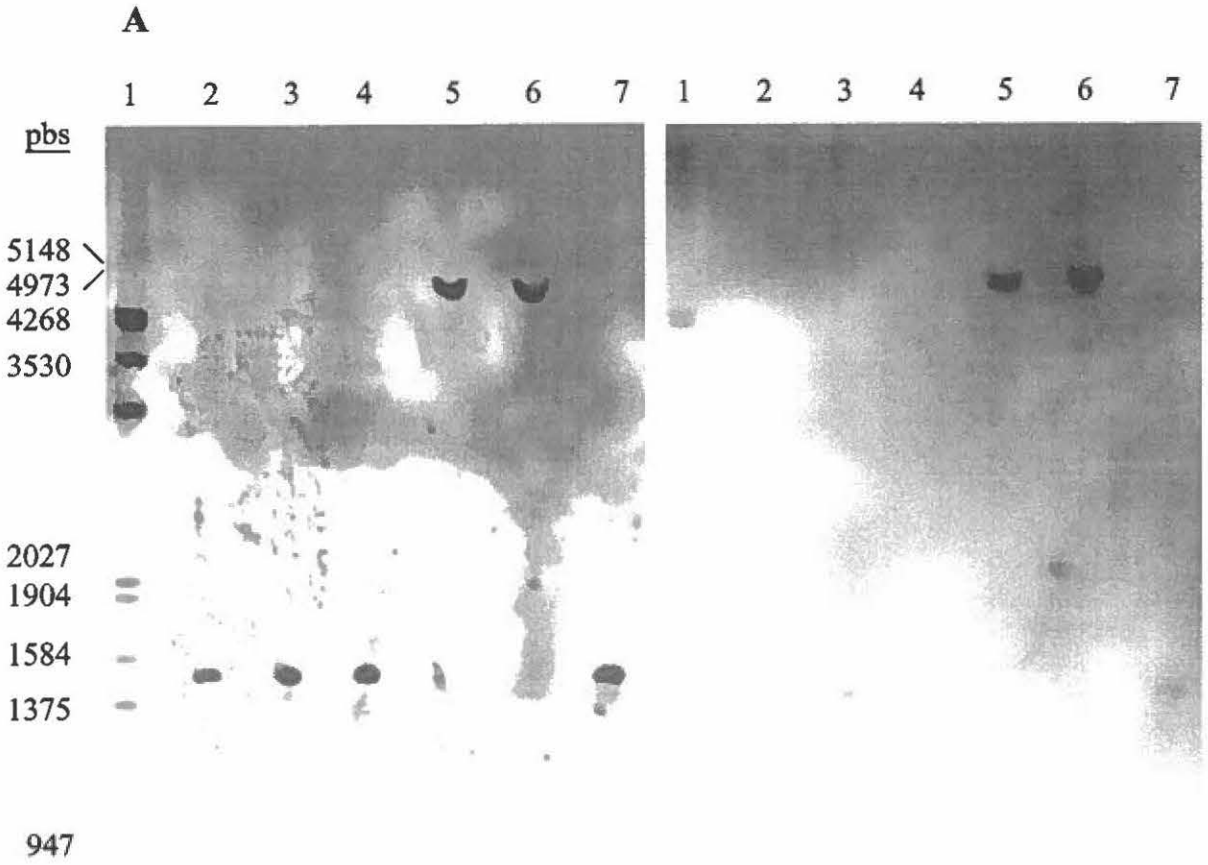


Figure 16. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Nco*I et *Sfu*I. La membrane a tout d'abord été hybridée avec la sonde bxlR-5 (a) puis, après décapage, avec la sonde tsr (b).

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche ΔbxlR1
3 : souche ΔbxlR2
4 : souche ΔbxlR3
5 : souche ΔbxlR4
6 : souche ΔbxlR5
7 : souche 1326

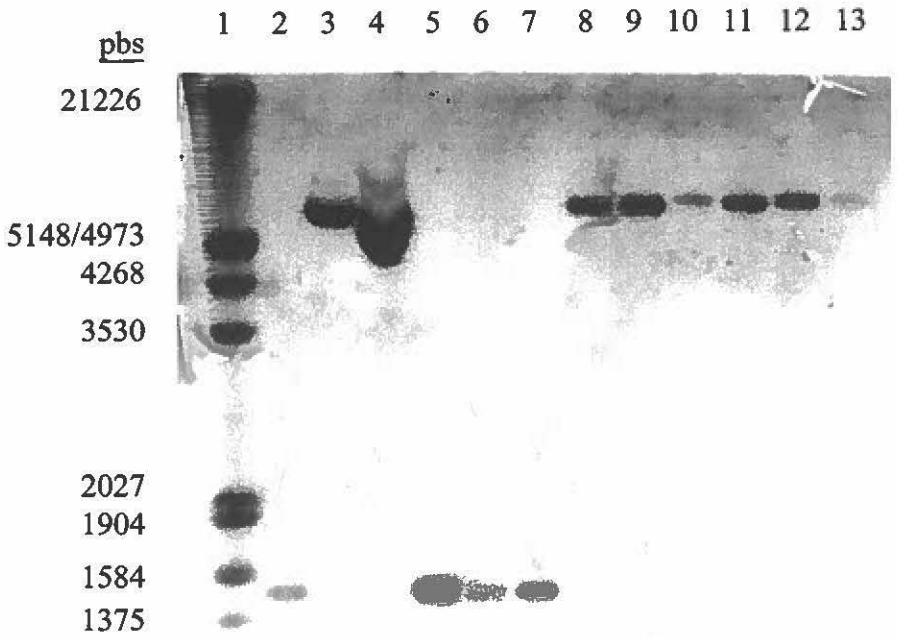


Figure 17. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Nco*I et *Sfu*I. La membrane a été hybridée avec la sonde bxlR-5.

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche ΔbxlR9
3 : souche ΔbxlR10
4 : souche ΔbxlR11
5 : souche ΔbxlR12
6 : souche ΔbxlR13
7 : souche ΔbxlR14
8 : souche ΔbxlR15
9 : souche ΔbxlR4-37
10 : souche ΔbxlR5-10
11 : souche ΔbxlR5-16
12 : souche ΔbxlR5-26
13 : souche ΔbxlR5-67

fragment de 6 kb présent chez les souches ΔbxlR4 et ΔbxlR5 a été détecté (figure 17; les résultats pour certaines souches ne sont pas montrés).

D'autre part, l'ADN chromosomique des huit souches dérivées de ΩmsiK ayant été sélectionnées sur RBB-xylane (nommées ΔmsiK8, 9, 39, 41, 45, 57, 60 et 63) a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Kpn*I puis hybridé à la sonde msiK-2 (figure 18; les résultats de la souche ΔmsiK8 ne sont pas montrés). Dans tous les cas, un fragment de 1,6 kb a été détecté, ce qui correspond au même fragment observé chez la souche 1326.

4.4 CONSTRUCTION DES VECTEURS POUR OBTENIR DES DÉLÉTIONS GÉNOMIQUES

Tel que décrit à la section précédente, les plasmides pML04, pML09 et pML21 qui se sont intégrés au niveau des gènes ciblés n'ont pas permis d'obtenir des délétions génomiques par la suite. Afin d'obtenir des délétions génomiques, une autre série de vecteurs a été construite. D'une façon générale, ces plasmides sont construits de manière à contenir deux portions d'ADN non continues sur le chromosome et bordant la région à déléter. La délétion peut être obtenue suite à une double recombinaison homologue menant au remplacement de la séquence chromosomique par la séquence plasmidique. La priorité a été mise sur les gènes *bxlA, bxlR,* et *bxlS.*

4.4.1 Délétions dans *bxlA*

Des plasmides visant à introduire une délétion dans le gène *bxlA* ont été construits à partir du plasmide pML16. Ce dernier a été digéré au site de restriction unique *Sac*I situé au milieu de l'insert provenant du gène *bxlA* (figure 19), puis traité à l'exonucléase *Bal*31. Le plasmide a ensuite été religué sur lui-même et transformé dans la souche *E. coli* DH11S. Le plasmide a été isolé de 12 colonies résistantes à l'ampicilline, digéré par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI puis séparé en gel d'agarose afin de visualiser la nature des délétions

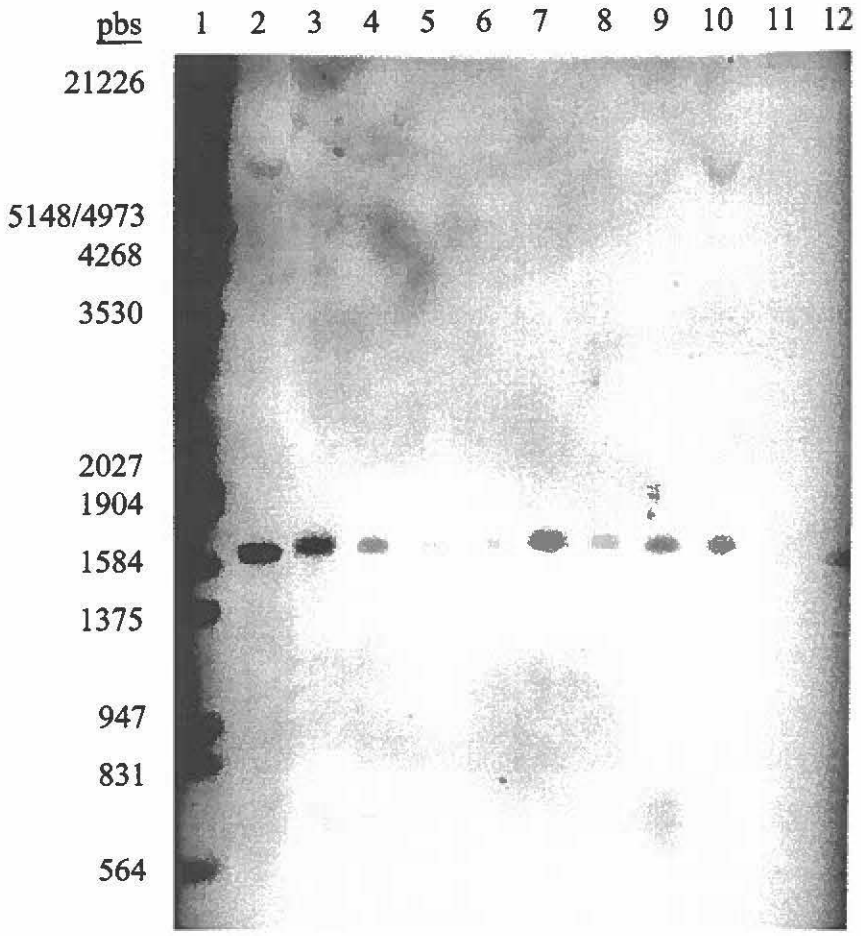


Figure 18. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Kpn*I. La membrane a été hybridée avec la sonde msiK-2.

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche msiK13-1
3 : souche msiK33-1
4 : souche ΔmsiK9
5 : souche ΔmsiK39
6 : souche ΔmsiK41
7 : souche ΔmsiK45
8 : souche ΔmsiK57
9 : souche ΔmsiK60
10 : souche ΔmsiK63
11 : souche 1326
12 : plasmide pIAF48 (contrôle positif)

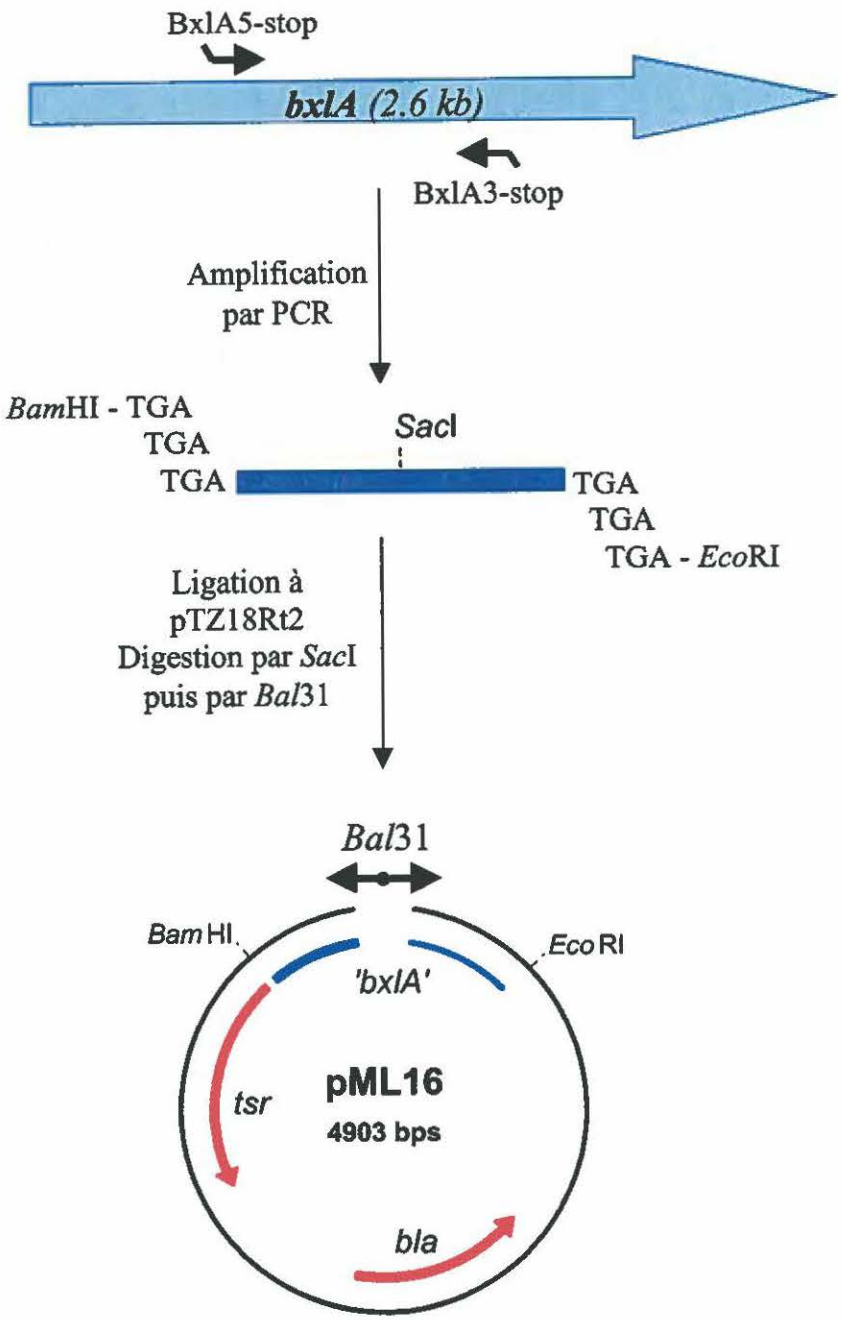


Figure 19. Construction du plasmide pBxlA à partir du plasmide pML16 par un traitement à l'exonucléase *Bal*31. Le plasmide pML16 a été construit en clonant un produit de PCR obtenu à l'aide des amorces BxlA5-stop et BxlA3-stop aux sites *Bam*HI et *Eco*RI du plasmide pTZ18Rt2. Ce plasmide a ensuite été linéarisé par l'endonucléase de restriction *Sac*I et traité à l'exonucléase *Bal*31 afin de créer une délétion. Le plasmide ainsi digéré a finalement été religué sur lui-même.

(figure 20). Les plasmides ayant des inserts d'environ 700 à 900 pbs (c'est-à-dire des délétions d'environ 100 à 300 pbs) ont été sélectionnés. Ces plasmides ont été nommés pBxlA1, pBxlA2, pBxlA3, pBxlA5, pBxlA6 et pBxlA12.

4.4.2 Délétions dans *bxlR*

Deux régions d'ADN bordant le gène *bxlR* ont été amplifiées par PCR. La région en 5' de *bxlR* a été amplifiée à partir d'ADN chromosomique de *S. lividans* en utilisant les amorces BxlR6 et BxlR7, tandis que la portion en 3' a été amplifiée à partir de la même matrice mais avec les amorces BxlR8 et BxlR9. Le premier produit de PCR a été digéré par les enzymes *Kpn*I et *Pst*I puis ligué au plasmide pSL1180t digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide résultant a été digéré par les enzymes *Pst*I et *Sac*I pour y incorporer le deuxième produit de PCR digéré par ces mêmes enzymes. Le plasmide obtenu, contenant les deux produits de PCR en continu, a été nommé pBxlR6789 (figure 21).

Afin de permettre le remplacement de la portion d'ADN chromosomique comprise entre les amorces BxlR7 et BxlR8 par un marqueur de sélection, le gène *neo* a été introduit dans le plasmide pBxlR6789. Ce gène code pour la néomycine phosphotransférase et confère une résistance à deux antibiotiques, la kanamycine et la néomycine. Il a pu être amplifié par PCR à partir du plasmide pFD666 (Denis et Brzezinski, 1992), qui contient le gène *neo* provenant du transposon Tn5 avec un promoteur optimisé pour l'expression chez *E. coli* et les streptomycètes; les amorces utilisées étaient neo1 et neo2. Le produit de PCR a été digéré par l'endonucléase de restriction *Pst*I puis cloné dans le plasmide pBxlR6789 digéré par la même enzyme (figure 21). Le plasmide résultant a été isolé, digéré par l'enzyme *Nco*I, puis séparé en gel d'agarose afin de déterminer l'orientation de l'insert. Les plasmides générant des fragments de 1155, 1290 et 4100 pbs ont un insert *neo* dans l'orientation contraire du gène *tsr*; ils ont été nommés pNeoR1. Les plasmides ayant des fragments de 831, 1290 et 4424 pbs ont un insert dans la même orientation que *tsr* et ont été nommés pNeoR2.

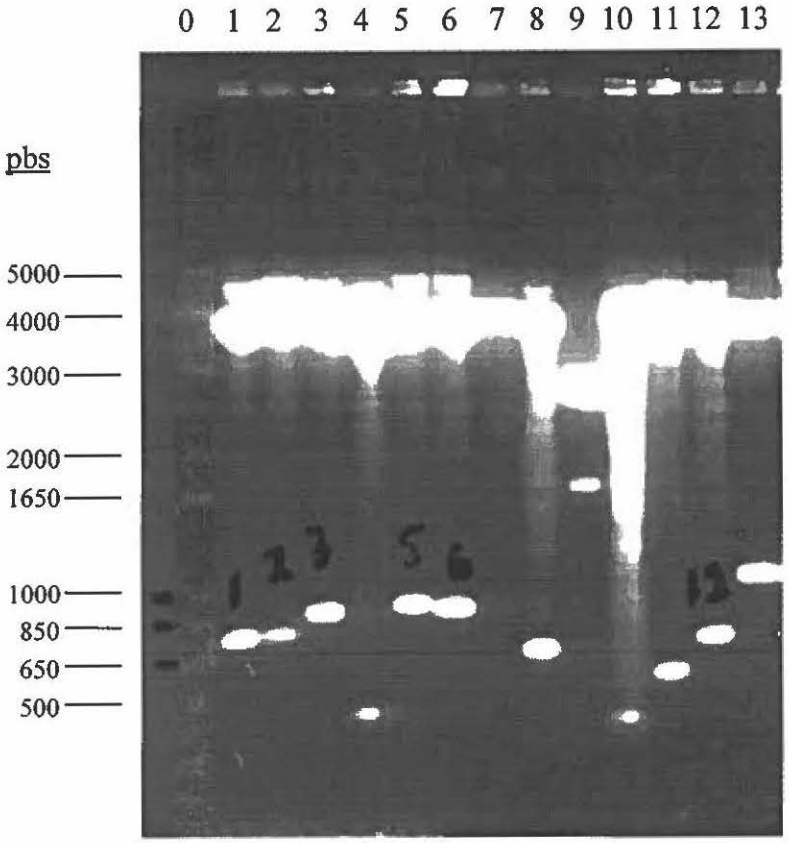


Figure 20. Analyse des plasmides pBxlA1 à pBxlA12 par leur digestion avec les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Eco*RI suivie d'une migration en gel d'agarose 0,7%. Ces plasmides proviennent du plasmide pML16 traité à l'exonucléase *Bal*31 puis religué sur lui-même. La digestion par *Bam*HI et *Eco*RI permet de visualiser la nature des délétions engendrées par *Bal*31.

Légende:

0 : marqueur de poids moléculaire d'ADN 1 kb PLUS

1-12 : plasmides pML16 après traitement à la nucléase *Bal*31 (pBxlA1 à 12), isolés de 12 colonies d'*E. coli* différentes

13 : plasmide pML16 non traité à la nucléase *Bal*31

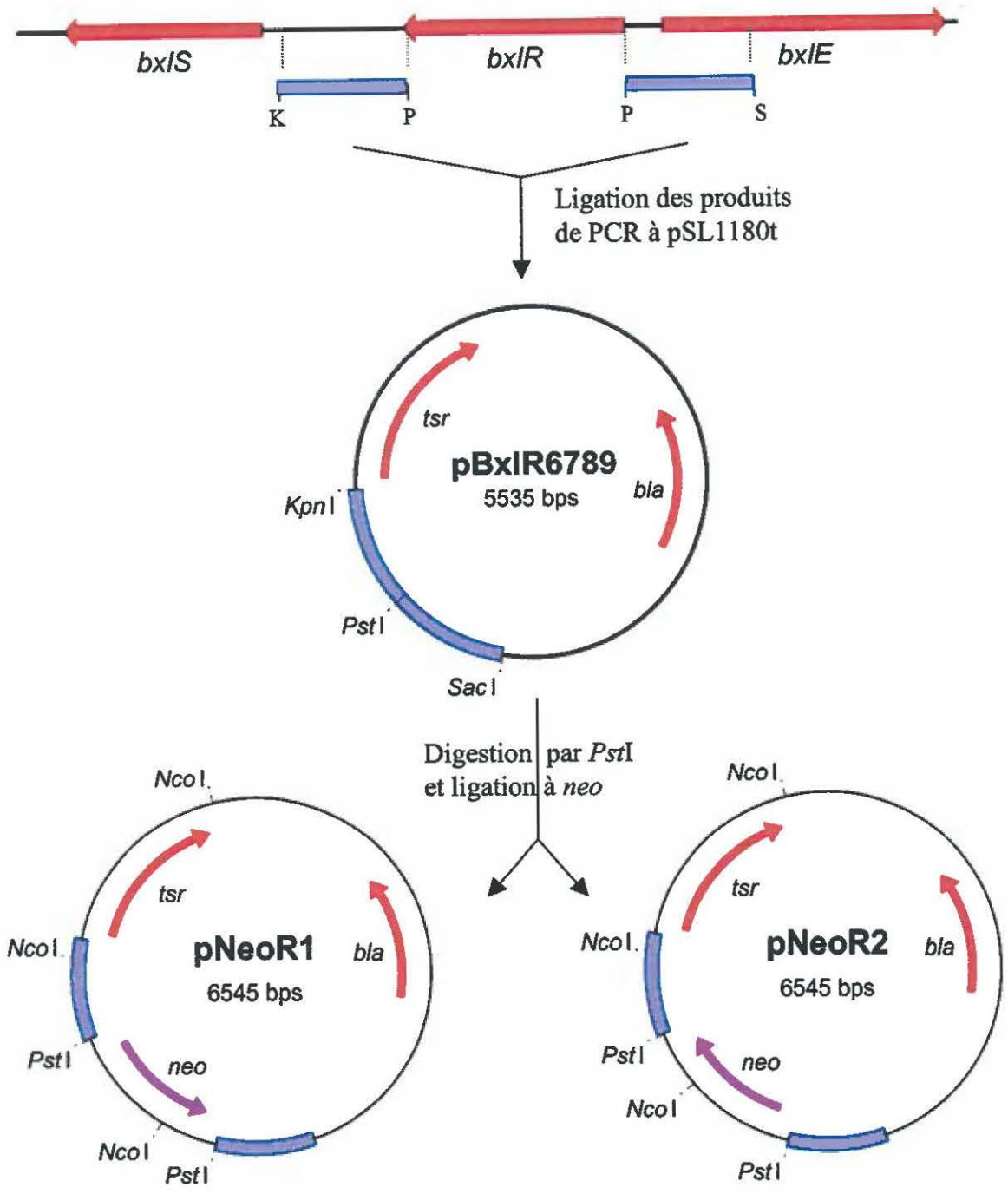


Figure 21. Construction des plasmides pBxlR6789, pNeoR1 et pNeoR2. Deux portions de l'opéron *bxl* ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces BxlR6 et BxlR7 ainsi que BxlR8 et BxlR9. Les produits de PCR (boîtes bleues) ont successivement été clonés dans le plasmide pSL1180t pour générer pBxlR6789. Un produit de PCR obtenu à l'aide des amorces neo1 et neo2 et comprenant le gène *neo* a ensuite été cloné au site *Pst*I de pBxlR6789 pour créer pNeoR1 et pNeoR2, selon l'orientation de l'insert. K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I.

Un autre plasmide possédant un plus grand insert d'ADN a été construit afin de favoriser la recombinaison homologue avec la région cible du chromosome. Ainsi, le fragment *Kpn*I-*Pst*I de 4,6 kb du cosmide 1H10 contenant le gène *bxlR* a été isolé puis cloné dans le plasmide pTZ18Rt2, formant le plasmide p1H10 (figure 22). Ce plasmide a ensuite été digéré par l'endonucléase de restriction *Bst*EII pour éliminer un fragment de 427 pbs du gène *bxlR* avant d'être refermer par ligation pour former le plasmide p1H10R.

Le gène *neo* a de nouveau été amplifié à partir du plasmide pFD666 mais avec les amorces neo3 et neo4 afin d'ajouter des sites de restriction pour l'enzyme *Bst*EII. De nombreuses tentatives de clonage de ce produit de PCR digéré par *Bst*EII au plasmide p1H10R digéré par la même enzyme ont été infructueuses.

4.4.3 Délétions dans *bxlS*

Deux portions d'ADN de la région du gène *bxlS* ont été amplifiées par PCR en utilisant de l'ADN chromosomique de *S. lividans* comme matrice et les combinaisons d'amorces BxlS6-BxlS7 et BxlS8-BxlS9. Le premier produit de PCR a été digéré par les enzymes *Sac*I et *Pst*I puis cloné dans le plasmide pSL1180t également digéré par ces enzymes. Le plasmide résultant a été digéré par *Pst*I et *Kpn*I et ligué avec le deuxième produit de PCR digéré par ces mêmes enzymes. Ce plasmide contenant les deux produits de PCR en continu a été nommé pBxlS6789 (figure 23);

Afin de permettre un remplacement de la séquence du chromosome située entre celles des amorces BxlS7 et BxlS8 par un marqueur de sélection, le gène *neo* a été introduit entre les deux produits de PCR du plasmide pBxlS6789. Ce dernier a donc été digéré par l'enzyme *Pst*I et ligué au même produit de PCR contenant le gène *neo* utilisé pour la construction de pNeoR1 et pNeoR2. Afin de vérifier l'orientation de l'insert *neo*, le plasmide a été digéré par l'endonucléase de restriction *Nco*I. Les plasmides générant des fragments de 556, 2483 et 3589 pbs ont un insert *neo* dans l'orientation contraire du gène

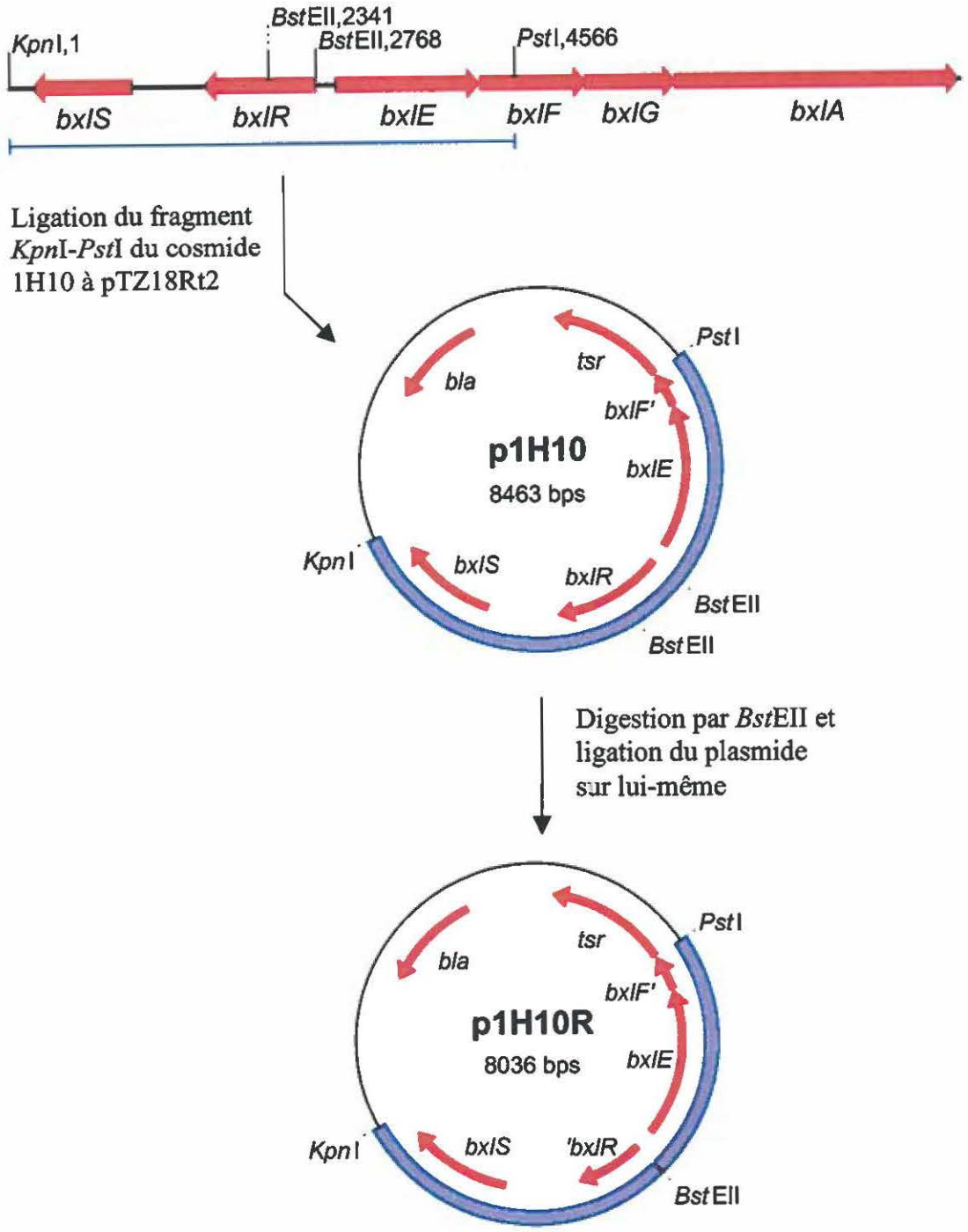


Figure 22. Construction des plasmides p1H10 et p1H10R. Un fragment de 4,6 kb digéré par les endonucléases de restriction *Kpn*I et *Pst*I a été isolé du cosmide 1H10 et a été ligué au plasmide pTZ18Rt2 digéré par les mêmes enzymes pour former le plasmide p1H10. Ce dernier a ensuite été digéré par l'enzyme *Bst*EII, éliminant un fragment de 427 pbs, puis refermé par ligation pour engendrer le plasmide p1H10R.

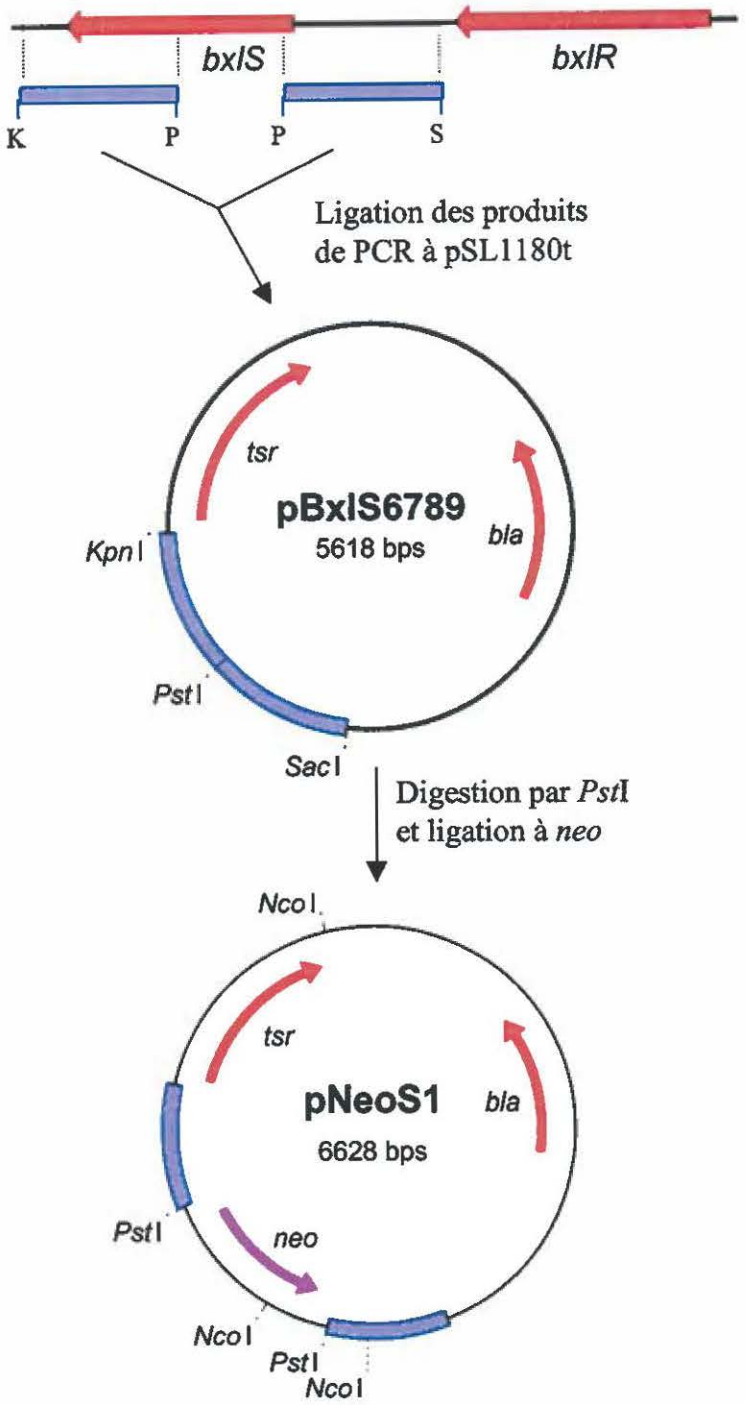


Figure 23. Construction des plasmides pBxlS6789 et pNeoS1. Deux portions de l'opéron *bxl* ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces BxlS6 et BxlS7 ainsi que BxlS8 et BxlS9. Les produits de PCR (boîtes bleues) ont successivement été clonés dans le plasmide pSL1180t pour générer pBxlS6789. Un produit de PCR obtenu à l'aide des amorces neo1 et neo2 et comprenant le gène *neo* a ensuite été cloné au site *Pst*I de pBxlS6789 pour créer pNeoS1. K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I.

tsr et ont été nommés pNeoS1. Des plasmides ayant un insert dans la même orientation que *tsr* n'ont pas été obtenus.

4.5 TRANSFORMATION DES PROTOPLASTES POUR OBTENIR DES DÉLÉTANTS

4.5.1 Transformants de *S. lividans* obtenus

Les plasmides à délétion ont été isolés d'*E. coli* DH11S puis ont été dénaturés par traitement alcalin ou préparés sous forme d'ADN simple brin avant d'être transformés dans *S. lividans* 1326. Plusieurs transformations ont été effectuées, en utilisant des protoplastes frais dans plus de 70% des cas. Peu de transformants ont été obtenus suite à une sélection à la thiostreptone; pour les transformations impliquant des plasmides contenant le gène *neo*, aucune colonie n'a été sélectionnée par l'ajout de kanamycine. La compilation du nombre de transformations effectuées et du nombre de colonies sélectionnées pour chaque plasmide est montrée au tableau 8. Une liste plus détaillée des souches obtenues et du plasmide à l'origine de la transformation est présentée au tableau 9.

4.5.2 Transformants de *S. coelicolor* obtenus

Les plasmides à délétion ont été isolés d'*E. coli* DM1 puis ont été dénaturés par traitement alcalin avant d'être transformés dans *S. coelicolor* A3(2) J1501. Il y a eu une exception, une transformation ayant été effectuée avec un plasmide isolé *d'E.* coli DH11S et préparé sous forme d'ADN simple brin. Un peu plus de colonies résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine (par rapport au nombre de transformations effectuées) ont été obtenues qu'avec *S. lividans*. Un résumé de toutes les transformations effectuées avec différents plasmides à délétion ainsi que le nombre de transformants obtenus est présenté au tableau 10, tandis que le nom des souches et le plasmide à l'origine de la transformation est indiqué au tableau 11. Plusieurs de ces souches produisent un pigment bleu sur milieu solide.

Tableau 8. Description du nombre de transformations de *S. lividans* 1326 effectuées avec les différents plasmides à délétion sous forme d'ADN simple brin ou d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine qui en ont résulté.

	ADN simple brin		ADN double brin dénaturé	
Plasmide	**Transformations**	**Colonies résist.**	**Transformations**	**Colonies résist.**
pBxlA1	4	1	5	3
pBxlA2	3	1	2	-
pBxlA3	3	1	5	1
pBxlA5	4	-	5	2
pBxlA6	5	-	3	1
pBxlA12	4	-	2	-
pBxlR6789	17	-	16	5
pNeoR1	-	-	5	-
pNeoR2	2	-	6	-
p1H10R	-	-	4	-
pBxlS6789	8	-	13	4
pNeoS1	-	-	5	-
TOTAL	**50**	**3**	**73**	**16**

Tableau 9. Liste des souches résistantes à la thiostreptone obtenues suite à une transformation de *S. lividans* 1326 avec des plasmides à délétion. Le nom du plasmide à l'origine de la transformation est indiqué.

Souche	**Plasmide**	**Souche**	**Plasmide**	**Souche**	**Plasmide**
A1-2	pBxlA1	A3-2	pBxlA3	R4-4	pBxlR6789
A1-3	pBxlA1	A5-1	pBxlA5	R4-5	pBxlR6789
A1-5	pBxlA1	A5-2	pBxlA5	R8-1	pBxlR6789
A1-6	pBxlA1	A6-1	pBxlA6	S5-1	pBxlS6789
A2-1	pBxlA2	R4-2	pBxlR6789	S5-1b	pBxlS6789
A3-1	pBxlA3	R4-3	pBxlR6789	S5-2	pBxlS6789
				S6-1	pBxlS6789

Tableau 10. Description du nombre de transformations de *S. coelicolor* A3(2) J1501 effectuées avec les différents plasmides à délétion sous forme d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin (sauf *, ADN simple brin) et du nombre de colonies résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine qui en ont résulté.

Plasmide	Transformations	Colonies résistantes
pBxlA1	5	16
pBxlA2*	1	1
pBxlA6	4	-
pBxlR6789	1	1
pNeoR1	3	-
pNeoR2	6	-
p1H10R	9	14
pBxlS6789	1	-
pNeoS1	6	2
TOTAL	**36**	**34**

Tableau 11. Liste des souches résistantes à la thiostreptone ou à la kanamycine obtenues suite à une transformation de *S. coelicolor* A3(2) J1501 avec des plasmides à délétion. Le nom du plasmide à l'origine de la transformation est indiqué.

Souche	Plasmide	Souche	Plasmide	Souche	Plasmide
A1-2	pBxlA1	A1-38	pBxlA1	1H10R-9	p1H10R
A1-7	pBxlA1	A1-41	pBxlA1	1H10R-10	p1H10R
A1-13	pBxlA1	A1-44	pBxlA1	1H10R-14	p1H10R
A1-15	pBxlA1	A1-48	pBxlA1	1H10R-21	p1H10R
A1-17	pBxlA1	A1-50	pBxlA1	1H10R-22	p1H10R
A1-18	pBxlA1	A2-1	pBxlA2	1H10R-29	p1H10R
A1-25	pBxlA1	R4-1	pBxlR6789	1H10R-33	p1H10R
A1-27	pBxlA1	1H10R-1	p1H10R	1H10R-34	p1H10R
A1-30	pBxlA1	1H10R-2	p1H10R	1H10R-39	p1H10R
A1-31	pBxlA1	1H10R-7	p1H10R	1H10R-43	p1H10R
A1-35	pBxlA1	1H10R-8	p1H10R	NS1-2	pNeoS1
				NS1-5	pNeoS1

4.5.3 Analyse génomique des souches sélectionnées

Afin de vérifier si les plasmides s'étaient intégrés dans la bonne région du chromosome, l'ADN chromosomique des souches présentées aux tableaux 9 et 11 a été isolé pour faire un buvardage de Southern. L'ADN des souches originant des plasmides pBxlA a été digéré par l'endonucléase de restriction *Nco*I puis hybridé à la sonde bxlA-2; l'ADN des souches originant d'une transformation avec le plasmide pBxlR6789 a été digéré par *Not*I et hybridé à la sonde bxlR-5; l'ADN des souches originant d'une transformation avec p1H10R a été digéré par *Kpn*I et hybridé à la sonde R5; finalement, l'ADN des souches provenant d'une transformation avec les plasmides pBxlS6789 ou pNeoS1 a été digéré par *Sma*I ou encore *Kpn*I-*Sfu*I avant d'être hybridé à la sonde bxlR-5. L'emplacement des sites de restriction et des sondes par rapport aux gènes est indiqué à la figure 12.

Presque toutes les souches analysées avaient un fragment d'ADN identique à celui de la souche sauvage qui hybridait, indiquant selon le cas que le plasmide ne s'était pas intégré au bon endroit ou encore qu'il n'y avait pas eu double recombinaison homologue menant au remplacement d'une séquence du chromosome par *neo*. Il y a toutefois trois exceptions: les souches A2-1, R4-4 et R4-5, tous de *S. lividans*, avaient quelque chose de particulier.

L'analyse de l'ADN chromosomique digéré de la souche A2-1 a révélé une amplification d'une portion du génome. De plus, cette souche avait une très mauvaise croissance en milieu M14-xylane: il semblait y avoir lyse cellulaire. Pour ces raisons, la souche A2-1 n'a pas été étudiée plus en profondeur.

La souche R4-4 avait aussi de l'ADN chromosomique d'apparence différente de la souche 1326. En effet, lorsque cet ADN a été digéré puis séparé en gel d'agarose, des bandes prédominantes de plus de 10 kb (digestion par *Not*I) et d'environ 2,5 + 4,5 kb (digestion *Nco*I) ont également été observées (figure 24). Ceci suggère encore une fois qu'il y a eu une amplification d'une portion du génome, étant donné que le reste des fragments de restriction est présent en très petite quantité. Il n'y a pas eu de signal d'hybridation entre

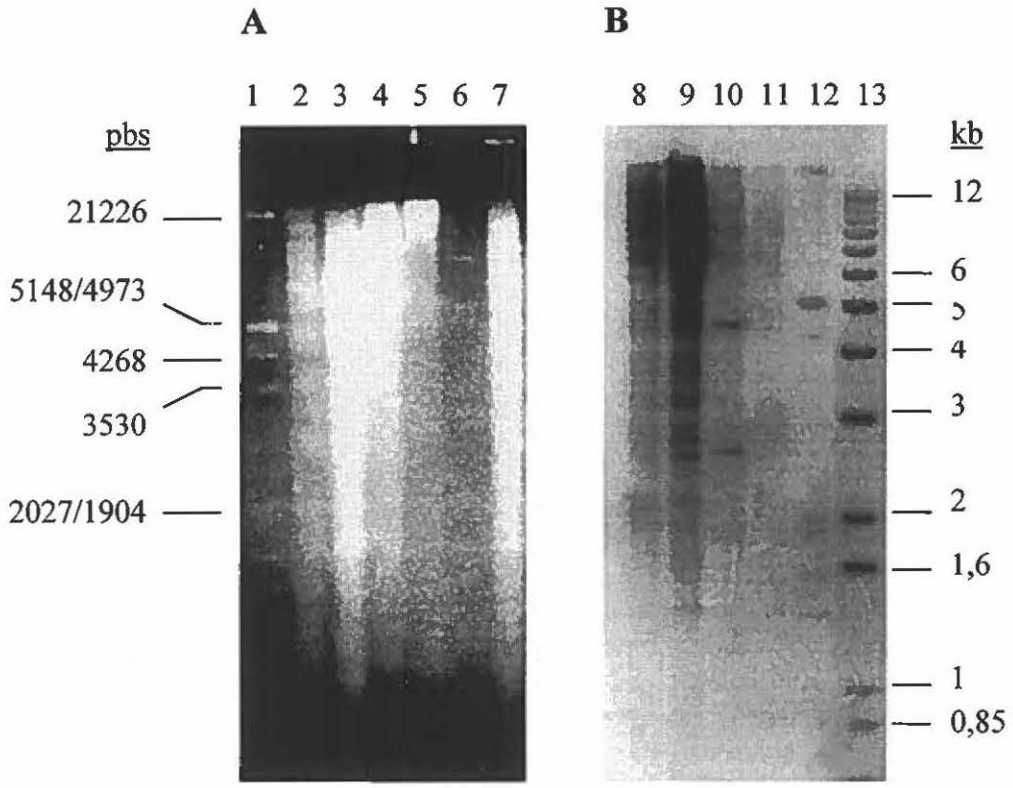


Figure 24. ADN chromosomique de souches de *S. lividans* digéré par des endonucléases de restriction et séparé par migration dans un gel d'agarose 0,7%.

Légende :

1, 12 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche A1-2; digéré par l'enzyme *Nco*I
3, 8, 11 : souche 1326; digéré par l'enzyme *Nco*I
4 : souche R4-2; digéré par l'enzyme *Not*I
5 : souche R4-3; digéré par l'enzyme *Not*I
6 : souche R4-4 ; digéré par l'enzyme *Not*I
7 : souche 1326; digéré par l'enzyme *Not*I
9 : souche A6-1; digéré par l'enzyme *Nco*I
10 : souche R4-4; digéré par l'enzyme *Nco*I
13 : marqueur de poids moléculaire d'ADN 1 kb+

l'ADN de cette souche et la sonde bxlR-5 (figure 25a), probablement en raison de la faible quantité d'ADN chromosomique. Par contre, il y a eu une faible hybridation aux sondes bxlR-1 et bxlS-1 (résultats non montrés). Lorsque l'ADN de la souche R4-4 a été hybridé à la sonde bxlA-2, une très forte bande a été détectée comparativement à la souche 1326 (figure 26). Les bandes révélées par buvardage de Southern sur les deux photos de la figure 26 correspondent à des bandes prédominantes de l'ADN en gel d'agarose visible à la figure 24. Dans le cas de la digestion par *Nco*I, seule la bande supérieure d'environ 4,5 kb s'est hybridée à la sonde bxlA-2. Finalement, il y a eu hybridation du même fragment d'ADN digéré *Not*I avec la sonde tsr (figure 25b).

En dernier lieu, plusieurs fragments d'ADN chromosomique de la souche R4-5 se sont hybridés à la sonde bxlR-5 (figure 25a), et il y a eu une très forte hybridation de la sonde tsr (figure 25b). Il y a possiblement eu digestion partielle de l'ADN.

4.5.4 Repiquages sans sélection des souches R4-4 et R4-5

Étant donné les résultats particuliers obtenus avec les souches R4-4 et R4-5, elles ont été repiquées sans sélection sur un milieu Bennett. Après trois passages, les spores ont été récoltées et étalées sur des agar Bennett afin d'obtenir des colonies isolées. Des répliques de velours vers un agar BT ont été effectuées afin d'identifier des colonies devenues sensibles à la thiostreptone. Six colonies dérivées de R4-4 (souches R4-4.1, 2, 5, 6, 7 et 11) et 13 autres dérivées de R4-5 (R4-5.1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, et 18), toutes devenues sensibles à la thiostreptone, ont été obtenues. Leur ADN chromosomique a été isolé, digéré par l'enzyme *Not*I, puis séparé en gel d'agarose. Cet ADN avait un aspect normal (figure 27a; l'ADN de certaines souches n'est pas montré), sans fragments prédominants comme c'est le cas de la souche R4-4. L'ADN chromosomique a ensuite été hybridé à la sonde bxlR-5 et un fragment de 3,3 kb identique à celui de la souche sauvage a été détecté pour toutes les souches (figure 27b). De plus, une hybridation avec la sonde

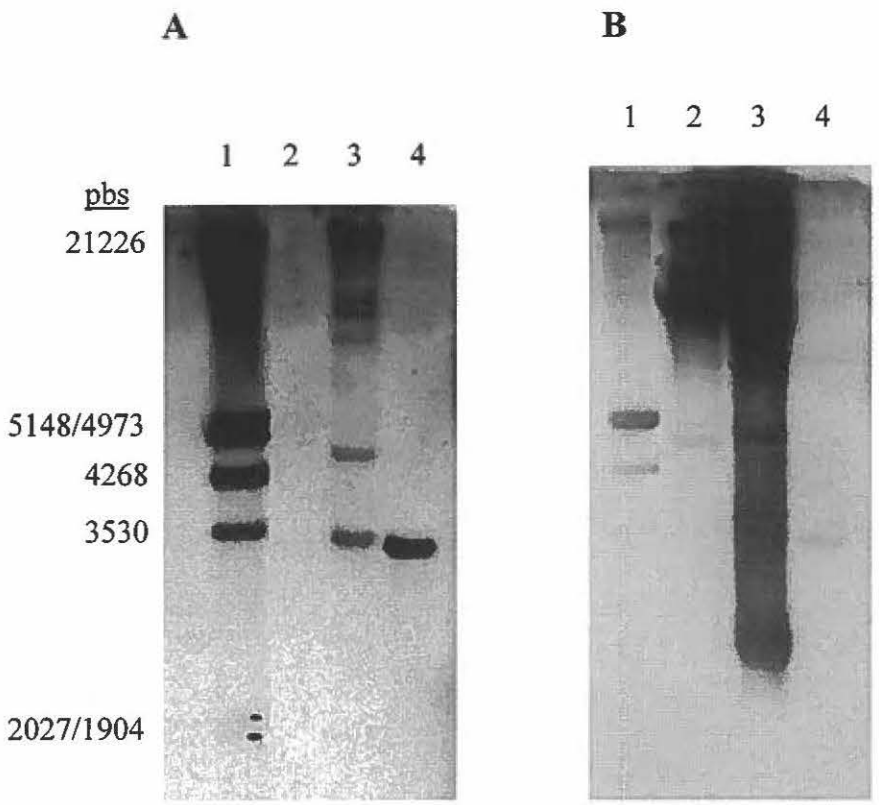


Figure 25. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par l'endonucléase de restriction *Not*I. La membrane a tout d'abord été hybridée avec la sonde bxIR-5 (a) puis, après décapage, avec la sonde tsr (b).

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche R4-4
3 : souche R4-5
4 : souche 1326

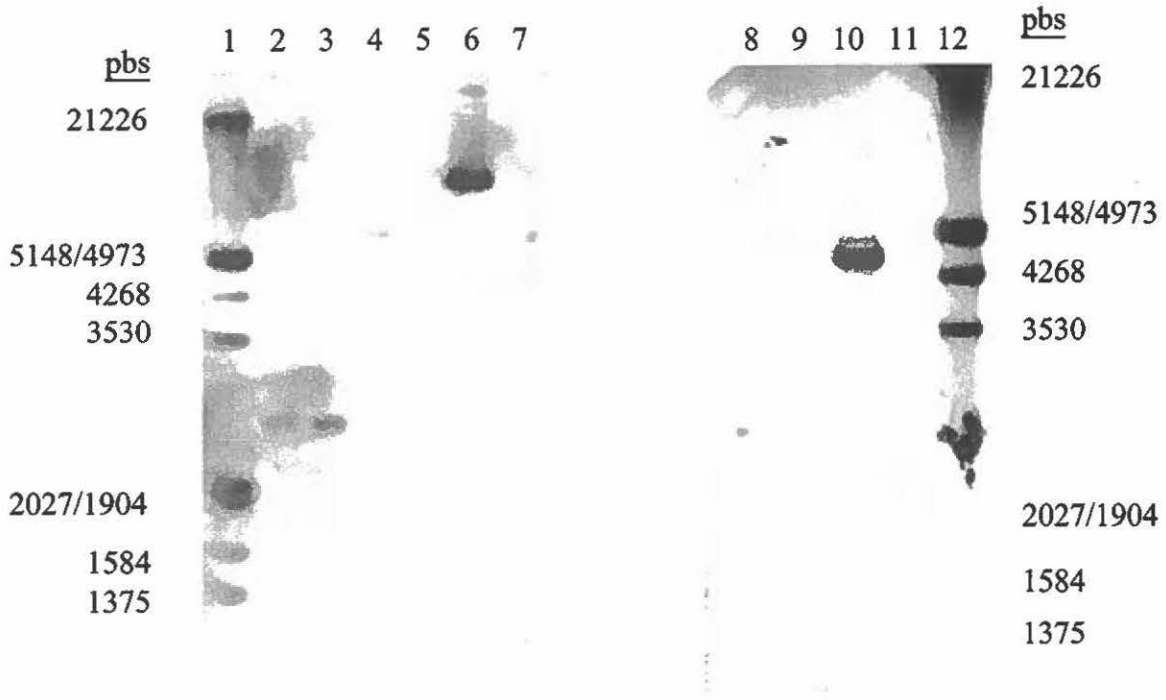


Figure 26. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par différentes endonucléases de restriction. La membrane a été hybridée avec la sonde bxlA-2.

Légende :

1, 12 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG
2 : souche A1-2; digéré par l'enzyme *Nco*I
3, 8, 11 : souche 1326; digéré par l'enzyme *Nco*I
4 : souche R4-2; digéré par l'enzyme *Not*I
5 : souche R4-3; digéré par l'enzyme *Not*I
6 : souche R4-4 ; digéré par l'enzyme *Not*I
7 : souche 1326; digéré par l'enzyme *Not*I
9 : souche A6-1; digéré par l'enzyme *Nco*I
10 : souche R4-4; digéré par l'enzyme *Nco*I

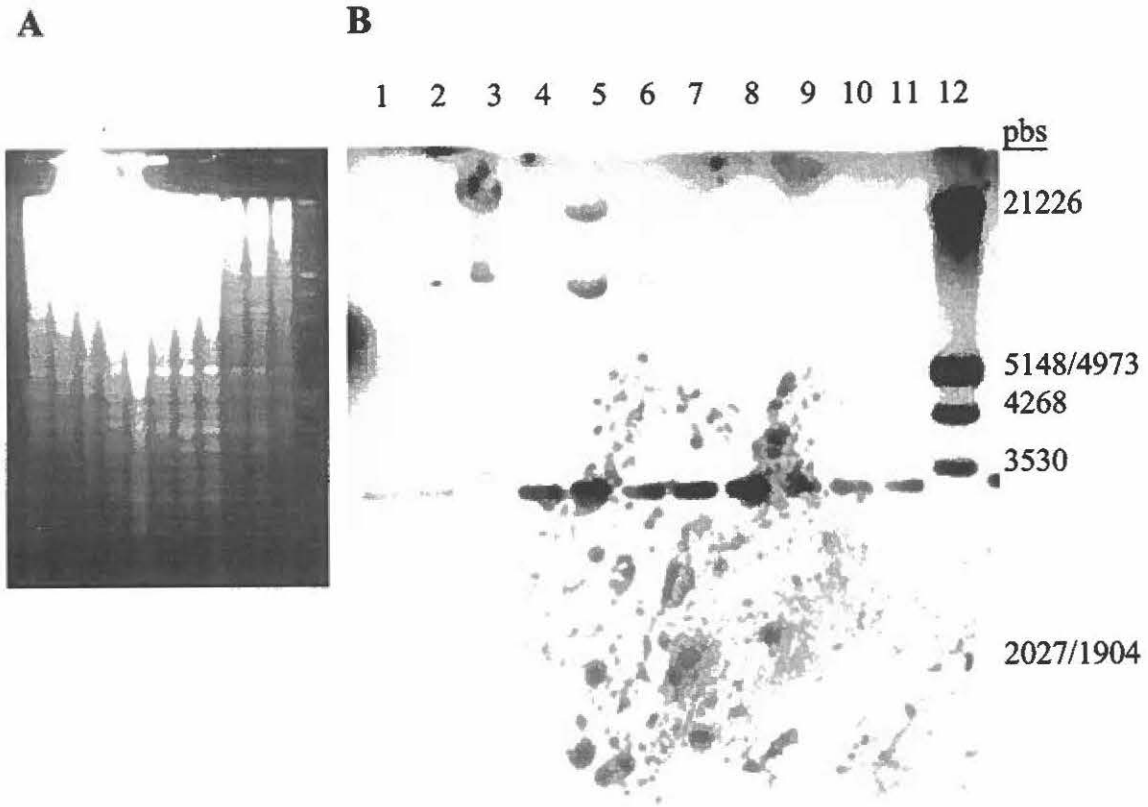


Figure 27. Hybridation de type Southern d'ADN chromosomique digéré par l'endonucléase de restriction *Not*I. a) l'ADN digéré a été séparé en gel d'agarose 0,7%; b) l'ADN du gel a été transféré sur une membrane de nylon qui a été hybridée avec la sonde bxlR-5.

Légende:

1 : souche R8-1
2 : souche R4-4.1
3 : souche R4-4.2
4 : souche R4-4.5
5 : souche R4-4.6
6 : souche R4-4.7
7 : souche R4-5.2
8 : souche R4-5.3
9 : souche R4-5.4
10 : souche R4-5.5
11 : souche 1326
12 : marqueur de poids moléculaire d'ADN marqué à la DIG

bxlA-2 après décapage de la sonde bxlR-5 a permis de détecter un fragment d'environ 6 kb identique à celui de la souche 1326 et de la même intensité (résultats non montrés).

4.6 CARACTÉRISATION DES SOUCHES OBTENUES

Les souches qui ont été retenues pour une caractérisation primaire sont les souches ΩabfB8, ΩbxlR18-3, ΔbxlR4, ΔbxlR5, R4-4, Ωmsik24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4 en raison des résultats obtenus lors des buvardages de Southern. Étant donné que les souches ΔbxlR4 et ΔbxlR5 n'ont pas de délétion au niveau du gène *bxlR* mais plutôt une intégration d'une copie du plasmide pML04 (voir section 4.3.2), elles seront dorénavant désignées comme les souches ΩbxlR4 et ΩbxlR5 afin de mieux refléter la réalité.

4.6.1 Activité xylanasique sur milieu RBB-xylane

Un premier test simple et rapide a consisté à ensemencer les différentes souches sur un milieu RBB-xylane, de couleur bleu. Les enzymes xylanolytiques des bactéries sont sécrétées et diffusent dans le milieu; lorsque le xylane est hydrolysé, une zone claire apparaît. Toutes les souches ont produit une zone claire après une incubation de 72 ou 96 h à 34°C à l'exception des souches ΩmsiK24-2 et ΩmsiK24-4 (figure 28). Les souches ΩmsiK24-3 et ΩbxlR4 ont de plus petites zones. Le contour des zones est plutôt floue, à l'exception de celle autour de la souche ΩbxlR5 qui est bien défini.

De plus, 50 µl de surnageant de culture ont été déposés dans des puits creusés dans un agar RBB-xylane. Le tout a été incubé à 34°C ou 37°C et les zones d'hydrolyse ont été comparées entre elles. Les résultats de deux de ces expériences qualitatives sont présentés aux tableaux 12 et 13.

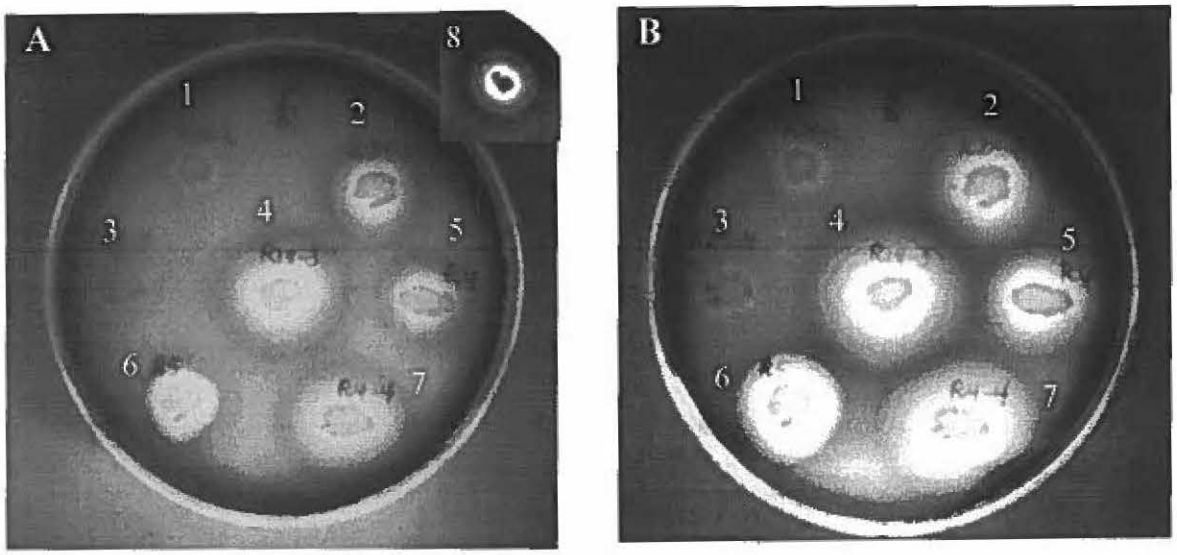


Figure 28. Gélose RBB-xylane avec thiostreptone ensemencée avec différentes souches de *S. lividans*. Les photos des plats de Pétri ont été prises après une incubation de 72 h (a) et de 96 h (b) à 34°C. Les zones claires sont le résultat de l'hydrolyse du RBB-xylane par les enzymes xylanolytiques sécrétées par le mycélium.

Légende:

1 : souche ΩmsiK24-2
2 : souche ΩmsiK24-3
3 : souche ΩmsiK24-4
4 : souche ΩbxlR18-3
5 : souche ΩbxlR4
6 : souche ΩbxlR5
7 : souche R4-4
8 : souche ΩabfB8

Tableau 12. Évaluation de l'activité xylanolytique par le dépôt de 50µl de surnageant de culture en milieu M14-glucose, xylane ou les deux dans des puits d'un agar RBB-xylane. Le tout a été incubé à 34°C pendant 24 h. G, glucose; X, xylane; G+X, glucose et xylane.

Temps	Milieu	ΩbxlR18-3	ΩbxlR4	ΩbxlR5	1326
40h	M14-G	-	-	-	-
	M14-X	++	++	-	+++
	M14-G+X	-	++	-	-
66h	M14-G	-	-	-	-
	M14-X	++	+++	++	+++
	M14-G+X	+	+	+	+

Tableau 13. Évaluation de l'activité xylanolytique par le dépôt de 50µl de surnageant de culture en milieu M14-glucose ou xylane dans des puits d'un agar RBB-xylane. Le tout a été incubé à 37°C pendant 24 h. G, glucose; X, xylane.

Temps	Milieu	ΩmsiK2 4-2	ΩmsiK2 4-3	ΩmsiK2 4-4	ΩbxlR 18-3	ΩbxlR4	ΩbxlR5	R4-4
24h	M14-G	-	-	-	-	-	-	-
	M14-X	-	++	+	+++	++	++	+++
48h	M14-G	-	-	-	-	-	-	+
	M14-X	++	++	+	+++	++	++	+++
72h	M14-G	-	-	-	-	-	-	+
	M14-X	+	+	+	++	++	+	+++

4.6.2 Analyse des protéines par immunodétection

Afin de vérifier si certaines protéines du complexe xylanolytique étaient produites chez les souches étudiées en présence de différentes sources de carbone dans le milieu de culture, des immunobuvardages ont été réalisés. Selon la localisation de la protéine sondée, les protéines ont été précipitées du surnageant ou libérées du mycélium.

4.6.2.1 Immnunodétection de l'AbfB

Les protéines du surnageant d'une culture en milieu M14-xylane ont été séparés par SDS-PAGE, puis la protéine AbfB a été détectée à l'aide d'anticorps anti-AbfB (figure 29a). L'AbfB a été détectée à environ 44 kDa pour la souche 1326 mais pas pour les souches 10-164 ou ΩabfB. Étant donné qu'il y a une réaction croisée entre les domaines de fixation au xylane de l'AbfB et de la XlnA (Vincent *et al.*, 1997), cette dernière a également été détectée à l'aide d'anticorps anti-$XlnA_1$ (figure 29b) afin de bien distinguer les deux protéines. La XlnA a été détectée à environ 46 kDa chez toutes les souches sauf 10-164.

4.6.2.2 Immunodétection des xylanases

La production des trois xylanases a été vérifiée chez les souches interrompues en *msiK*, en *bxlR* et pour la souche R4-4. Les souches 1326 et 10-164 ont également été utilisées comme contrôles. Les protéines du surnageant d'une culture en milieu M14-xylane ont été séparées par SDS-PAGE. Deux protéines ont été détectées par les anticorps anti-$XlnA_2$ chez toutes les souches (figure 30): une bande d'environ 32 kDa correspondant à la $XlnA_2$ et une autre bande d'environ 46 kDa correspondant à la $XlnA_1$. Les autres bandes faibles visibles pourraient être des produits de dégradation des $XlnA_1$ et $XlnA_2$.

Toutes les souches cultivées en milieu M14-xylane ont également réagi aux anticorps anti-$XlnB_2$, avec des bandes détectées à environ 22 kDa ($XlnB_2$) et environ 31 kDa ($XlnB_1$) (figure 31). Aucune bande n'a été détectée dans un des puits contenant les protéines de la souche R4-4 car une quantité insuffisante de protéine a été déposée dans ce gel (puits 5, figure 31). Une reprise de l'expérience avec plus de protéines a permis de détecter les $XlnB_1$ et B_2 en plus d'une bande d'environ 36 kDa de nature inconnue (puits 5'). Chez les souches cultivées en milieu M14-glucose, aucune protéine n'a été détectée par les anticorps anti-$XlnB_2$ (figure 31).

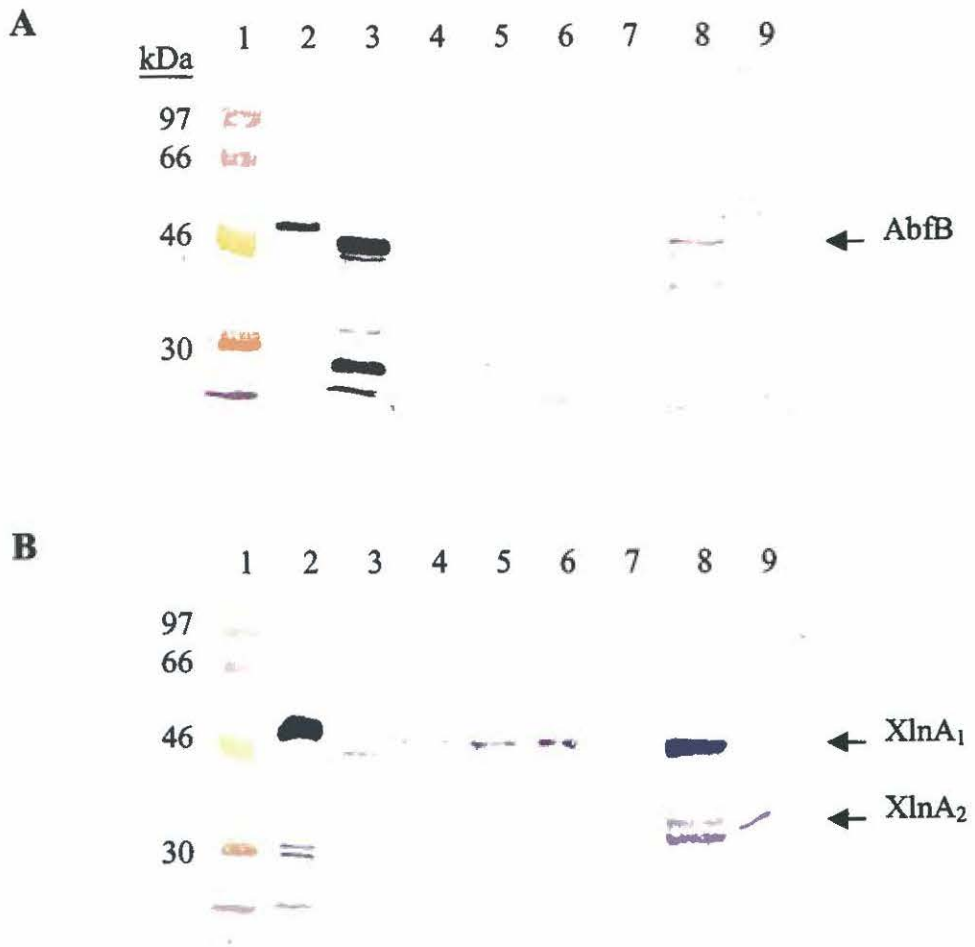


Figure 29. Immunodétection des protéines AbfB et XlnA des surnageants de culture M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-AbfB (a) ou anti-$XlnA_1$ (b).

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire Rainbow
2 : $XlnA_1$ pure (1 µg)
3 : AbfB pure (40 ng)
4 : souche ΩabfB8, culture de 40 h
5 : souche ΩabfB8, culture de 66 h
6 : souche ΩabfB8, culture de 86 h
7 : souche 10-164, culture de 72 h
8 : souche 1326, culture de 72 h
9 : $XlnA_2$ pure (1 µg)

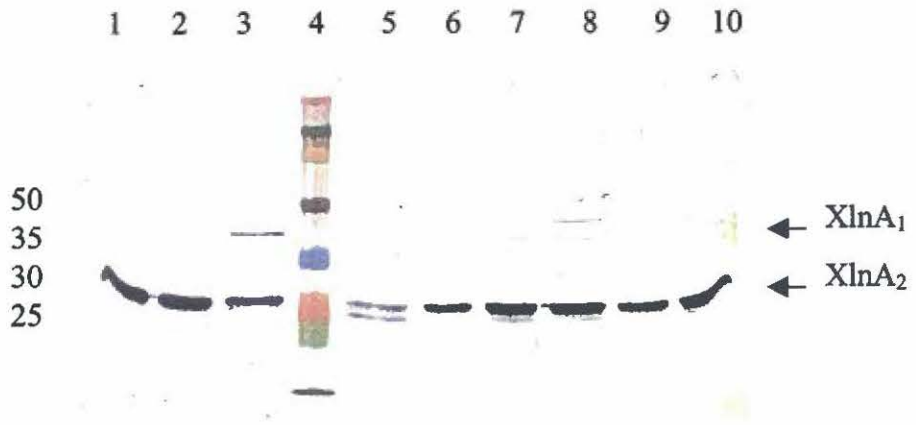


Figure 30. Immunodétection de la protéine XlnA du surnageant d'une culture de 72 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-$XlnA_2$.

Légende :

1 : souche ΩbxlR4
2 : souche ΩbxlR5
3 : souche R4-4
4 : marqueur de poids moléculaire Rainbow Full Range
5 : souche ΩmsiK24-2
6 : souche ΩmsiK24-3
7 : souche ΩmsiK24-4
8 : souche 1326
9 : souche 10-164
10 : souche ΩbxlR18-3

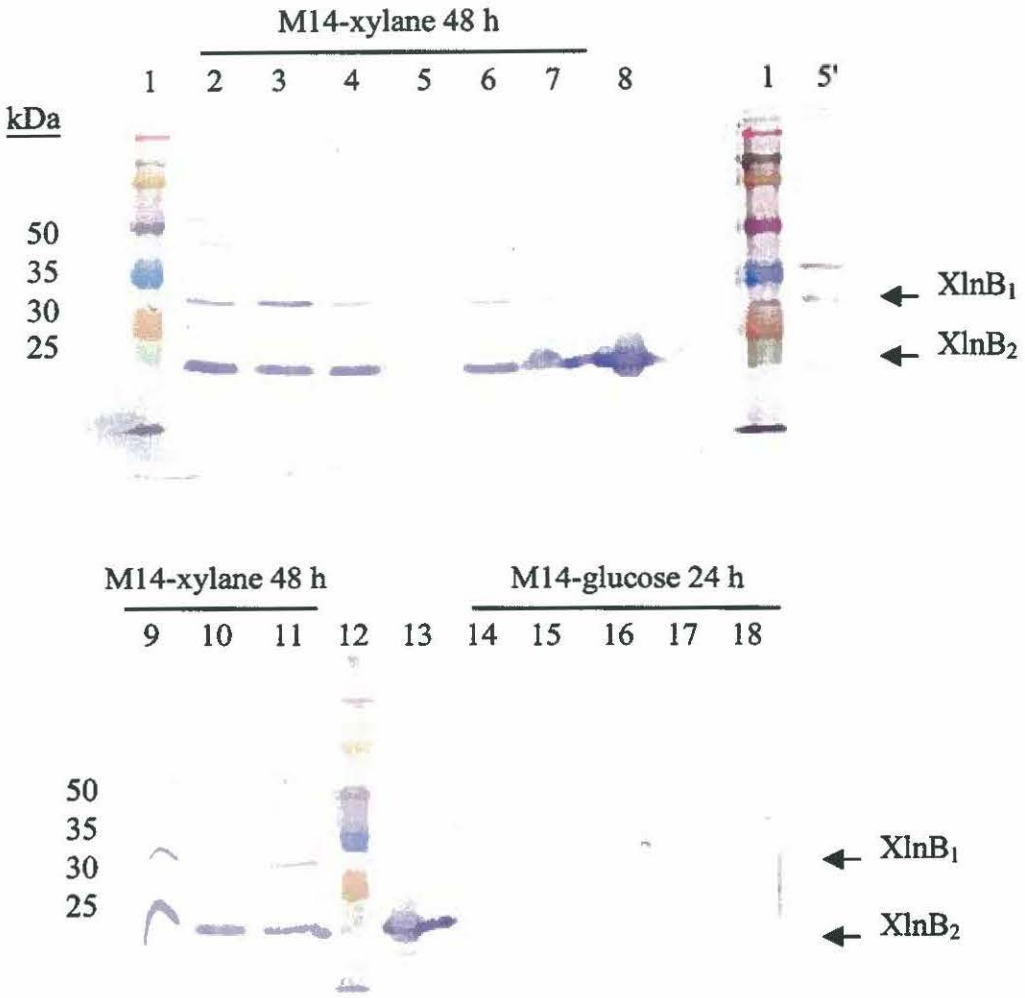


Figure 31. Immunodétection de la protéine XlnB du surnageant de culture en milieu M14-xylane ou M14-glucose de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-$XlnB_2$. L'immunodétection de l'échantillon du puits 5 a été reprise à partir d'un nouveau gel de polyacrylamide (puits 5') dans lequel plus de protéines ont été appliquées.

Légende :

1, 12 : marqueur de poids moléculaire Rainbow Full Range
2 : souche ΩbxlR18-3
3 : souche ΩbxlR4
4 : souche ΩbxlR5
5, 5' : souche R4-4
6 : souche 1326
7 : souche 10-164
8, 13 : protéine $XlnB_2$ pure
9 : souche ΩmsiK24-2
10: souche ΩmsiK24-3
11: souche ΩmsiK24-4
14: souche ΩbxlR18-3
15: souche ΩbxlR4
16: souche ΩbxlR5
17: souche R4-4
18: souche 1326

Toutes les souches cultivées en milieu M14-xylane ont également réagi aux anticorps anti-XlnC, affichant une bande d'environ 21 kDa (figure 32). Il semble qu'il y ait également eu une réaction croisée avec la $XlnB_1$ et la $XlnB_2$ (bandes d'environ 31 et 22 kDa). Une bande particulièrement prononcée correspondant à la XlnC a été détectée pour la souche R4-4, mais presque aucune réaction croisée n'est observée dans ce cas.

4.6.2.3 Immunodétection de MsiK

Les protéines intracellulaires des différentes souches cultivées en milieu M14-xylane pendant 48 h ont été séparées par SDS-PAGE. La protéine MsiK a été détectée chez toutes les souches à l'aide d'anticorps anti-MsiK, révélant une bande d'environ 40 kDa (figure 33). Plusieurs autres bandes ont également été détectées; elles pourraient correspondre à des produits de dégradation de MsiK ou à des protéines intracellulaires ayant de l'homologie avec MsiK.

4.6.2.4 Immunodétection de protéines homologues à CcpA

La protéine CcpA est une protéine impliquée dans la répression catabolique de plusieurs gènes chez *Bacillus megaterium* (Henkin *et al.*, 1991). Cette protéine a une forte homologie avec la protéine BxlR de *S. lividans* (Larocque, 1998). Étant donné que des anticorps anti-BxlR ne sont pas disponibles, les anticorps anti-CcpA (Küster *et al.*, 1996) ont été utilisés pour vérifier la présence de BxlR chez *S. lividans*. Il a été démontré que ces anticorps réagissaient avec la protéine de fusion BxlR-MBP purifiée (F. Shareck, communication personnelle).

Une première immunodétection de BxlR s'est faite à partir des protéines intracellulaires d'une culture en milieu M14-xylane de 24, 48, 72 ou 96 h (figure 34). Une bande d'environ 37 kDa a été détectée chez les souches ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 et ΩbxlR5 au temps 48 h. La même bande a été détectée pour la souche 1326 à 24 et 48 h, et sous forme

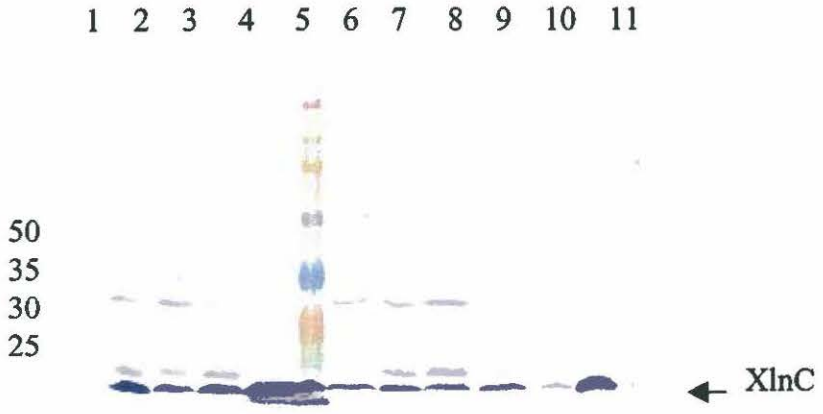


Figure 32. Immunodétection de la protéine XlnC du surnageant d'une culture de 72 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-XlnC.

Légende :

1 : souche ΩbxlR18-3
2 : souche ΩbxlR4
3 : souche ΩbxlR5
4 : souche R4-4
5 : marqueur de poids moléculaire Rainbow Full Range
6 : souche 10-164
7 : souche 1326
8 : souche ΩmsiK24-2
9 : souche ΩmsiK24-3
10 : souche ΩmsiK24-4
11 : protéine XlnC pure

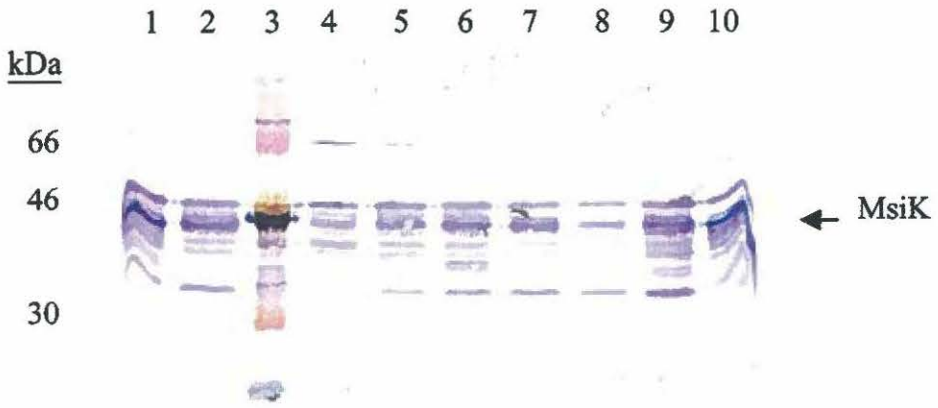


Figure 33. Immunodétection de la protéine MsiK du mycélium de cultures de 48 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-MsiK.

Légende :

1 : souche 10-164
2 : souche 1326
3 : marqueur de poids moléculaire Rainbow et protéine MsiK pure
4 : souche ΩmsiK24-2
5 : souche ΩmsiK24-3
6 : souche ΩmsiK24-4
7 : souche ΩbxlR18-3
8 : souche ΩbxlR4
9 : souche ΩbxlR5
10 : souche R4-4

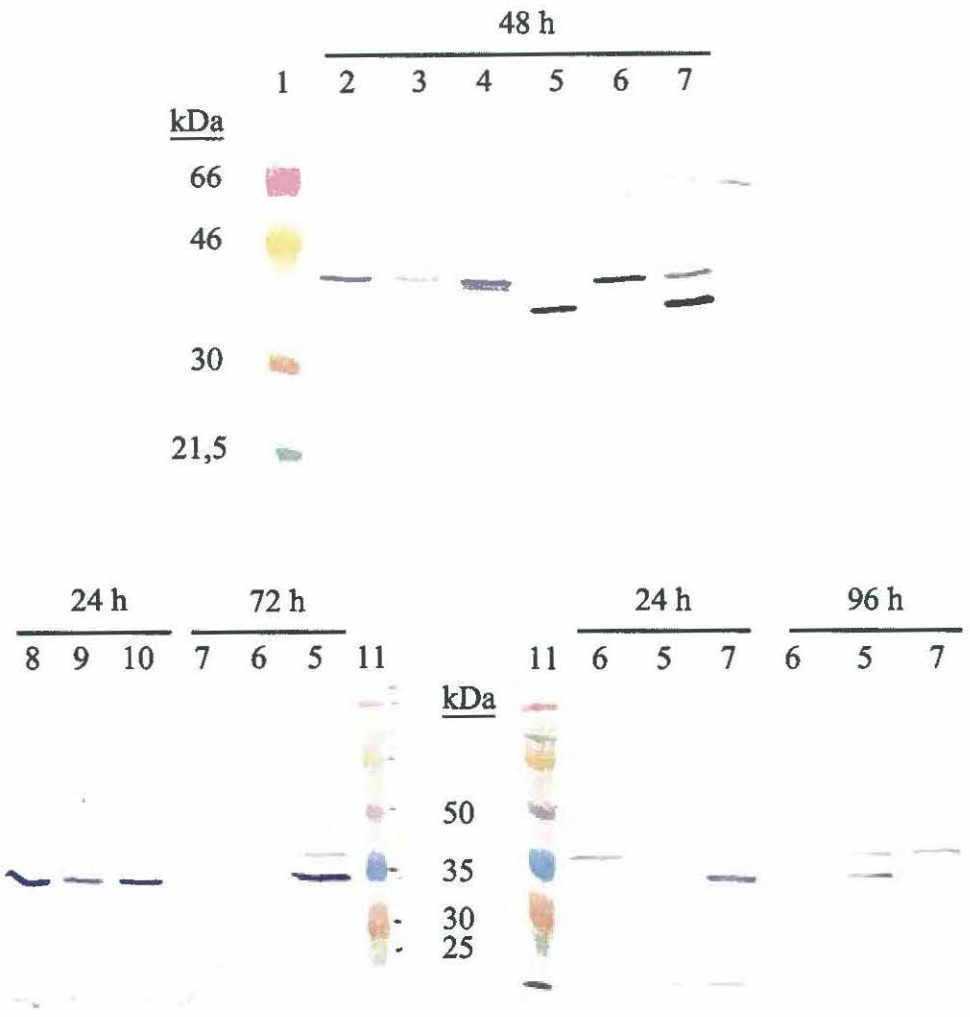


Figure 34. Immunodétection de la protéine BxlR du mycélium de cultures de 24, 48, 72 et 96 h en milieu M14-xylane de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-CcpA.

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire Rainbow
2 : souche ΩbxlR18-3
3 : souche ΩbxlR4
4 : souche ΩbxlR5
5 : souche R4-4
6 : souche 1326
7 : souche 10-164
8 : souche ΩmsiK24-2
9 : souche ΩmsiK24-3
10 : souche ΩmsiK24-4
11 : marqueur de poids moléculaire Rainbow Full Range

de traces à 72 et 96 h. Pour la souche R4-4, la bande d'environ 37 kDa est présente au temps 24 h mais est très faible aux temps 48, 72 et 96 h. Par contre, une seconde protéine plus abondante et de poids moléculaire inférieur (environ 34 kDa) est détectée à ces temps de culture. Pour la souche 10-164, la bande de poids moléculaire inférieur est détectée majoritairement à 24 h, puis les deux bandes sont présentes à 48 h. À 72 h et 96 h, la bande d'environ 34 kDa n'est pratiquement plus détectée, tandis que la bande d'environ 37 kDa est à peine détectable (72 h) ou présente (96 h). Finalement, les protéines des souches ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4 détectées par les anticorps étaient les mêmes que celle de la souche 10-164 au temps 24 h. D'autre part, seule la bande d'environ 37 kDa a été détectée chez toutes les souches analysées en milieu M14-glucose de 24 h (figure 35) ou 48 h (non montré).

Étant donné la présence inattendue de deux protéines différentes réagissant aux anticorps anti-CcpA chez la souche 10-164 en milieu M14-xylane par opposition à une seule en présence de glucose, d'autres immunodétections des protéines intracellulaires des souches 1326 et 10-164 ont été effectuées. Des cultures de 48 h en milieu M14 supplémenté de différentes sources de carbone (arabinose, cellobiose, galactose, glucose, glycérol, maltose, xylane et xylose) ont donc été préparées. La protéine d'environ 37 kDa pouvant correspondre à BxlR a été détectée dans toutes les conditions, mais à différents niveaux d'expression. Ainsi, elle semble moins exprimée chez les deux souches en présence d'arabinose ou de glucose, auxquels s'ajoutent le glycérol pour la souche 1326 (figure 36). Une deuxième protéine d'environ 34 kDa réagissant aux anticorps anti-CcpA est aussi produite dans certaines conditions. Pour la souche sauvage, cette protéine est exprimée en présence de galactose et, dans une moindre mesure, de xylane (figure 36a). Cette protéine n'avait pas été détectée lors d'une première immunodétection réalisée à partir d'une culture M14-xylane de 48 h (figure 34a). D'autre part, c'est en présence de cellobiose, de maltose ou encore de xylane que la protéine du poids moléculaire plus faible est fortement exprimée chez la souche 10-164; il y a aussi une faible expression en présence de xylose (figure 36b). Des bandes plus faibles observées à environ 43 kDa pourraient correspondre à la protéine MalR, qui a déjà été détectée à ce poids moléculaire chez *S. coelicolor* en

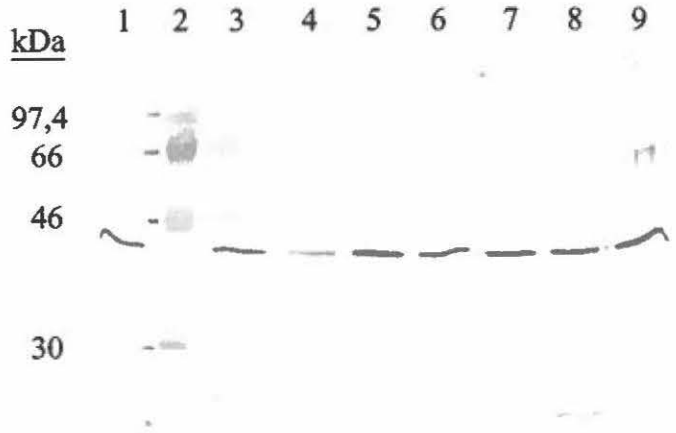


Figure 35. Immunodétection de la protéine BxlR du mycélium de cultures de 24 h en milieu M14-glucose de souches de *S. lividans* à l'aide d'anticorps anti-CcpA.

Légende :

1 : souche ΩmsiK24-3
2 : marqueur de poids moléculaire Rainbow
3 : souche ΩbxlR18-3
4 : souche ΩbxlR4
5 : souche ΩbxlR5
6 : souche R4-4
7 : souche 1326
8 : souche 10-164
9 : souche ΩmsiK24-4
10 : souche ΩmsiK24-2

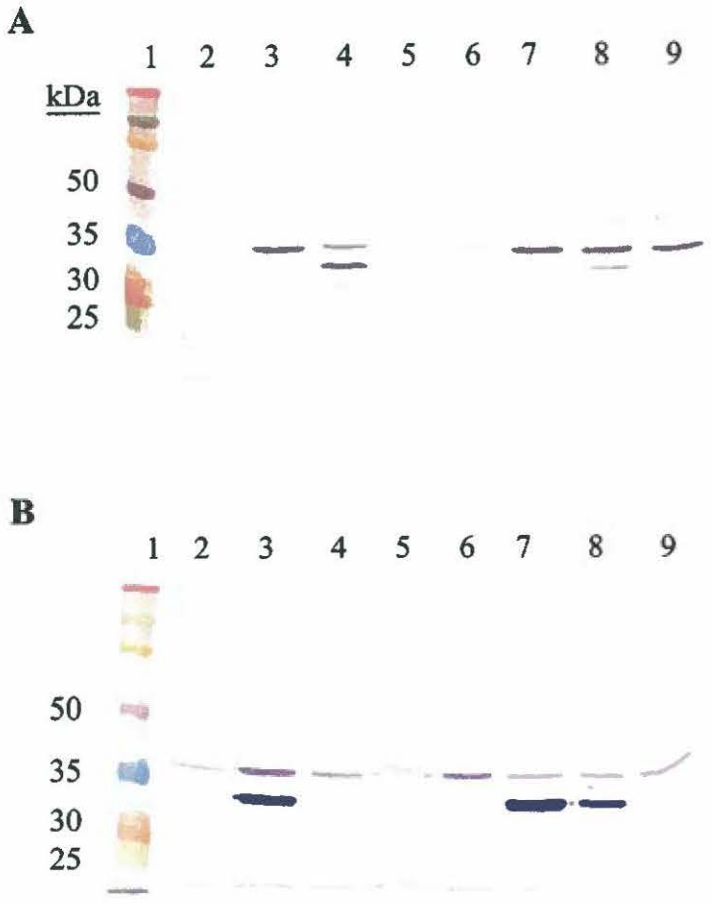


Figure 36. Immunodétection à l'aide d'anticorps anti-CcpA de protéines du mycélium des souches 1326 (a) et 10-164 (b) provenant de cultures de 48 h en milieu M14 supplémenté de différentes sources de carbone.

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire Rainbow Full Range
2 : M14-arabinose
3 : M14-cellobiose
4 : M14-galactose
5 : M14-glucose
6 : M14-glycérol
7 : M14-maltose
8 : M14-xylane
9 : M14-xylose

utilisant des anticorps anti-CcpA (van Wezel *et al.*, 1997). Ces auteurs ont aussi détecté une protéine d'environ 55 kDa qui est également visible lors de certaines immunodétections réalisées lors de la présente étude.

4.6.3 Évaluation de l'activité xylanasique

Afin de préciser les résultats d'activité xylanasique obtenus à l'aide du milieu RBB-xylane, des tests d'évaluation de l'activité spécifique des xylanases ont été réalisés à partir de surnageants de culture en milieu M14-xylane ou M14-glucose. Le contenu protéique des surnageants a été déterminé par la méthode de Lowry. L'activité spécifique des différentes souches en milieu M14-xylane a été déterminée à partir des surnageants de 48 et 72 h. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 37. Les souches ΩmsiK24-4 et 10-164 avaient l'activité la plus faible. D'autre part, il a été difficile de calculer l'activité spécifique des échantillons provenant de cultures en milieu M14-glucose. En effet, les faibles écarts entre l'absorbance obtenus pour les échantillons et leur témoin font en sorte que les valeurs d'activité enzymatique sont hors de la plage de valeurs de la courbe standard. Néanmoins, il est possible de constater que l'activité xylanasique semblait être nulle chez toutes les souches en milieu M14-glucose de 24 h selon les résultats obtenus en déposant du surnageant de culture dans des puits d'un milieu RBB-xylane (voir section 4.6.1).

4.6.4 Évaluation de l'activité ß-xylosidasique

L'effet des intégrations dans le gène *bxlR* (souches ΩbxlR) ou de la réorganisation génétique survenue chez la souche R4-4 sur l'expression d'un gène de l'opéron *bxl* a été vérifié en dosant l'activité ß-xylosidasique associée au gène *bxlA*. Le mycélium provenant de cultures M14-xylane de 48 h a été cassé, le maximum d'activité ß-xylosidasique étant obtenu à ce temps de culture (T. Lam, communication personnelle). Le contenu protéique intracellulaire a été déterminé par la méthode de Lowry. Les résultats d'activité spécifique

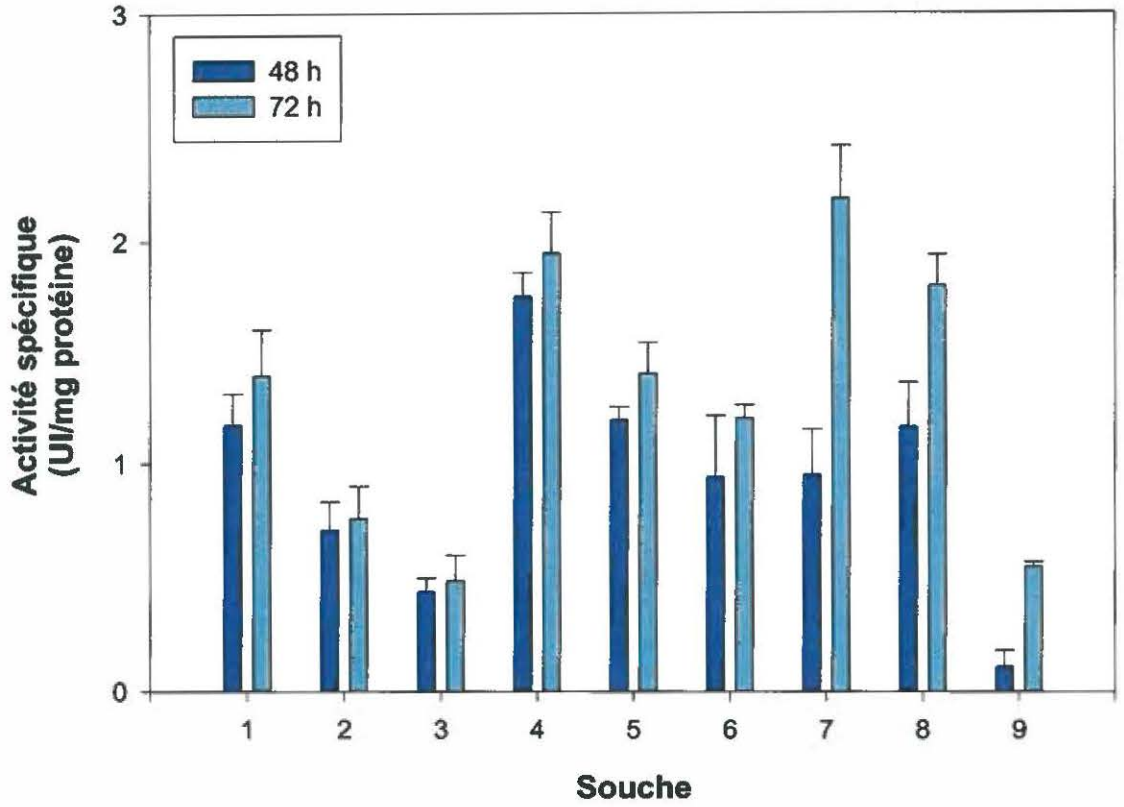


Figure 37. Comparaison de l'activité xylanasique spécifique du surnageant de cultures en milieu M14-xylane de 48 et 72 h de différentes souches de *S. lividans*. L'activité enzymatique et le contenu protéique des échantillons ont été évalués en triplicata; l'écart-type positif est indiqué par une barre d'erreur.

Légende :

1 : souche ΩmsiK24-2
2 : souche ΩmsiK24-3
3 : souche ΩmsiK24-4
4 : souche ΩbxlR18-3
5 : souche ΩbxlR4
6 : souche ΩbxlR5
7 : souche R4-4
8 : souche 1326
9 : souche 10-164

obtenus sont présentés à la figure 38. La souche R4-4 se distingue avec une activité spécifique 5,5 fois plus élevée que celle de la souche sauvage.

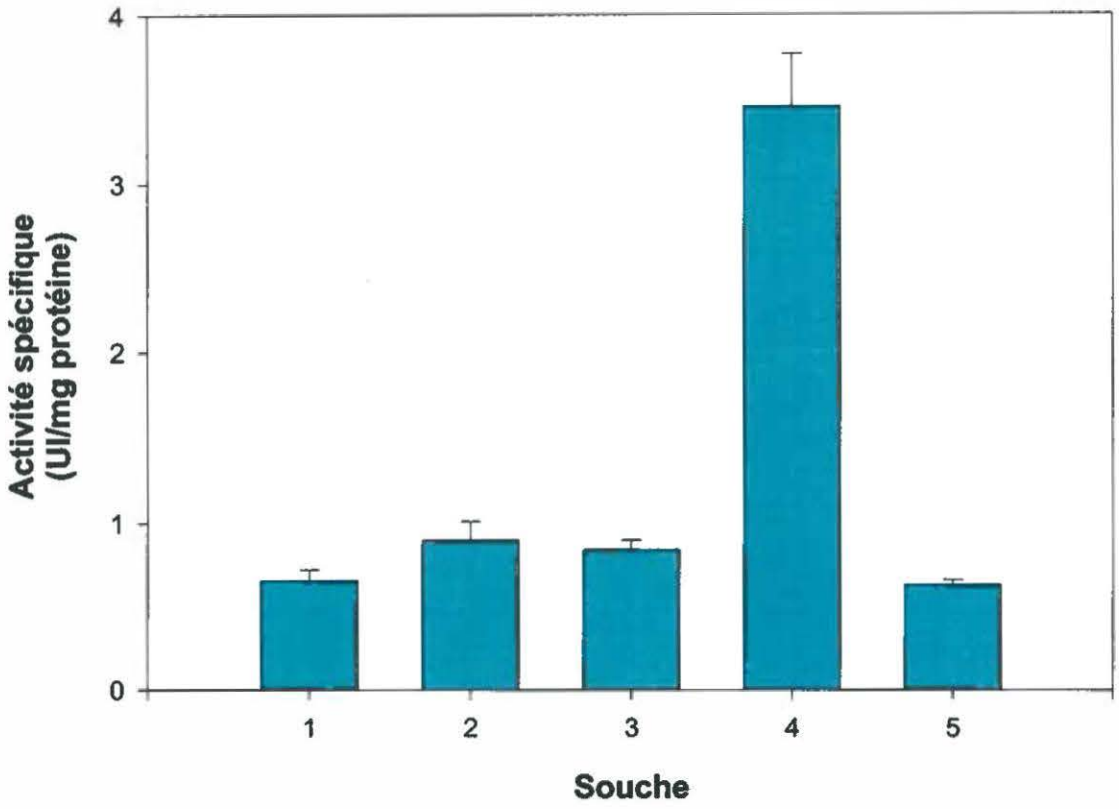


Figure 38. Comparaison de l'activité ß-xylosidasique spécifique du mycélium de cultures en milieu M14-xylane de 48 h de différentes souches de *S. lividans*. L'activité enzymatique et le contenu protéique des échantillons ont été évalués en triplicata; l'écart-type positif est indiqué par une barre d'erreur.

Légende :

1 : souche ΩbxlR18-3
2 : souche ΩbxlR4
3 : souche ΩbxlR5
4 : souche R4-4
5 : souche 1326

5. DISCUSSION

5.1 FAIBLE NOMBRE DE TRANSFORMANTS

L'embûche principale lors des expériences de dislocation génétique a été le faible nombre de transformants obtenus suite à une recombinaison homologue entre un plasmide et le chromosome. C'est ce qui explique que seul un nombre limité de souches ayant intégré un plasmide dans le gène cible ont été sélectionnées ou encore qu'aucune délétion chromosomique n'ait pu être obtenue avec la deuxième série de plasmides construits (section 4.4).

Cette difficulté n'était pas prévue au départ puisque d'autres expériences de dislocation génétique chez des streptomycètes avaient déjà été réalisées. Ainsi, Hillemann *et al.* (1991) ont obtenu 202, 623 et 78 transformants résistants à la thiostreptone par µg d'ADN simple brin utilisé lors de trois transformations réalisées avec trois préparations de protoplastes de *S. viridochromogenes* différentes. Le plasmide utilisé était un plasmide d'*E. coli* contenant un insert de 4 kb d'ADN chromosomique de *S. viridochromogenes*. Ils ont même obtenu l'intégration d'un plasmide contenant un insert d'ADN chromosomique de 200 pbs, mais la fréquence d'intégration n'a pas été indiquée. D'autre part, Oh et Chater (1997) ont obtenu 162, 448 et 246 transformants de *S. coelicolor* J1501 résistants à l'hygromycine par µg d'ADN double brin dénaturé par traitement alcalin lors de trois expériences indépendantes. Le plasmide utilisé contenait un insert d'ADN chromosomique de *S. coelicolor* de 11 kb. D'autres gènes situés ailleurs sur le chromosome ont également été testés et des résultats positifs ont été obtenus; les fréquences de transformation étaient plus faibles avec des inserts plus courts. Muth et *al.* (1997) ont réussi à obtenir des centaines de colonies de *S. lividans* TK24 ayant intégré des plasmides intégratifs thermosensibles contenant des inserts de 603 et 669 pbs par une sélection à la température. Par opposition, Hindle et Smith (1994) n'ont obtenu que 8, 7 et 31 transformants de la souche *S. coelicolor* MT1110 résistants à l'hygromycine par µg d'un plasmide contenant 2 kb d'ADN chromosomique. Plusieurs autres publications rapportent la dislocation ou le remplacement de gènes de streptomycètes mais ne font pas mention du taux de transformation obtenu.

Plusieurs plasmides utilisés dans ce travail avaient des inserts plus petits que 1000 pbs, ce qui pourrait expliquer en partie le faible nombre de transformants obtenus. Par contre, le plasmide p1H10R contenant un insert d'ADN chromosomique de 4,2 kb n'a pas généré de taux de transformation plus élevé.

L'espèce utilisée lors des expériences de dislocation génétique de ce travail était *S. lividans*, contrairement aux études réalisées par Hillemann *et al.* (1991) ou Oh et Chater (1997). Il se pourrait que *S. lividans* 1326 génère moins de transformants que *S. viridochromogenes* ou *S. coelicolor* J1501. Oh et Chater (1997) rapportent que le taux de transformation obtenu avec les souches dérivées de *S. coelicolor* A3(2), M600 et M145, était sensiblement inférieur à celui de la souche J1501. C'est pourquoi certains plasmides construits lors de cette étude ont été transformés dans *S. coelicolor* J1501. Les taux de transformation étaient toutefois très inférieurs à ceux décrits par Oh et Chater (1997). Tous les plasmides utilisés pour transformer *S. coelicolor* J1501 contenaient des inserts d'ADN chromosomique provenant de l'opéron *bxl*. L'opéron *bxl* est situé près d'une des extrémités du chromosome, cette région étant reconnue comme instable génétiquement (Volff et Altenbuchner, 1998). Il est donc possible qu'il y ait eu intégration des plasmides, mais que celle-ci ait été très instable. Au moment de faire la sélection à la thiostreptone (16 à 18 heures après la transformation), il est probable que le plasmide ait été perdu ou encore qu'une réorganisation génétique ait eu lieue (comme dans le cas des souches A2-1 et R4-4). La difficulté serait donc de récupérer une souche ayant intégré un plasmide au bon endroit et qui soit génétiquement stable. Autrement, la raison pour laquelle très peu de transformants ont été obtenus demeure inconnue.

En outre, la recombinaison homologue n'a pas eu lieu chez plusieurs colonies ayant été sélectionnées à l'aide de l'antibiotique approprié (thiostreptone ou kanamycine). En effet, l'analyse de Southern de l'ADN de ces souches a démontré qu'il n'y avait pas eu d'intégration du plasmide dans la région visée ou qu'il n'y avait pas eu de remplacement du gène cible par *neo* suite à une double recombinaison homologue. Ceci pourrait résulté

d'une résistance spontanée à la thiostreptone ou à la kanamycine suite à une mutation au niveau de la cible de l'antibiotique. Blanco *et al.* (1998) ont observé que seulement 10% des colonies de *S. lividans* sélectionnées par la thiostreptone avaient le phénotype correspondant à la dislocation génétique du gène *metF* (par l'intégration d'un plasmide dont la réplication est sensible à la température). Le reste des colonies était soit des mutants spontanés résistants à la thiostreptone ou des bactéries contenant encore le plasmide dans leur cytoplasme.

Une autre possibilité serait que les plasmides s'intègrent ailleurs dans le chromosome. Les streptomycètes ont un haut pourcentage de G+C dans leur ADN, favorisant les chances d'obtenir des séquences similaires. De plus, il semble y avoir eu une duplication de certains gènes sur le chromosome de *S. lividans*. Ces gènes se sont légèrement modifiés au cours de l'évolution mais ont encore de forts pourcentages d'homologie. Par exemple, les gènes *xlnB* et *xlnC* et les gènes *xlnA* et *abfB* ont de fortes homologies. Un autre opéron contenant des cadres de lecture ouverts homologues à l'opéron *bxl* a également été identifié sur le cosmide F79 à l'autre extrémité du chromosome (D. A. Hopwood, communication personnelle; voir fragment *Ase*I-F, figure 4). De plus, le fait que les anticorps anti-CcpA reconnaissent plus d'une protéine démontre aussi une homologie des gènes correspondants. Il se pourrait donc que certains transformants obtenus aient été sélectionnés suite à l'intégration d'un plasmide dans une autre région du chromosome contenant une séquence d'ADN homologue à la région visée. D'autre part, l'efficacité de la transformation et la capacité des protoplastes à se régénérer a souvent été vérifiée en parallèle par la transformation des protoplastes avec le plasmide pIJ702. À toutes ces occasions, un taux supérieur à 10^5 colonies résistantes à la thiostreptone a été obtenu.

5.2 PROBLÈME DE CERTAINES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES

Tel que mentionné à la section précédente, un des problèmes possibles avec certaines constructions plasmidiques utilisées est que l'insert d'ADN homologue à la région cible

est petit, ce qui favorise moins l'intégration du plasmide dans le chromosome. Ceci est surtout vrai pour la série de plasmides pML01 à pML21, conçus pour s'intégrer dans un gène pour en interrompre la séquence. Certaines intégrations ont toutefois pu être obtenues avec les plasmides pML04, pML09 et pML21 qui avaient respectivement des inserts chromosomiques de 798, 817 et 752 pbs, générant les souches ΩbxlR18-3, ΩabfB8 et ΩmsiK24-2, 3 et 4.

Un autre problème potentiel des plasmides pML01 à pML21, c'est qu'une bonne partie du gène peut toujours être transcrite malgré l'intégration du plasmide. En effet, les inserts chromosomiques de ces plasmides n'avaient pas de mutations ou de délétions, ce qui fait en sorte qu'après intégration, le gène peut être transcrit jusqu'à la fin de la séquence chromosomique choisie comme insert plasmidique. Ceci est illustré à la figure 39: dans cet exemple, le gène peut être transcrit jusqu'à la séquence représentée par la lettre "e". De plus, il n'est pas possible d'obtenir des délétions à partir de ce type d'intégration, comme l'illustre aussi la figure 39. Suite à l'intégration du plasmide, certaines séquences d'ADN se retrouvent en double. Une seconde recombinaison homologue entre ces séquences identiques mène à l'excision du plasmide. Il peut y avoir échange entre des séquences plasmidique et chromosomique ("D" remplacé par "d" à la figure 39), mais comme il n'y a pas de mutation ou de délétion introduite, la séquence du gène après excision du plasmide demeure identique à celle de la souche sauvage.

Pour corriger cette situation, les plasmides pBxlA1, 2, 3, 5, 6 et 12, pBxlR6789, pBxlS6789 et p1H10R ont été construits. Ces plasmides ont tous deux portions d'ADN homologue à deux portions d'ADN chromosomique flanquant une région à déléter. Une première recombinaison homologue permet l'intégration du plasmide dans une de ces deux portions homologues adjacente à la région cible. Des repiquages sans sélection peuvent alors mener à une deuxième recombinaison homologue; selon la localisation de cette recombinaison, il y a retour à la séquence sauvage ou excision de la région cible qui était bordée par les deux portions homologues. Pour sauver le temps nécessaire aux repiquages sans sélection et à la sélection de souches ayant perdu le plasmide, les

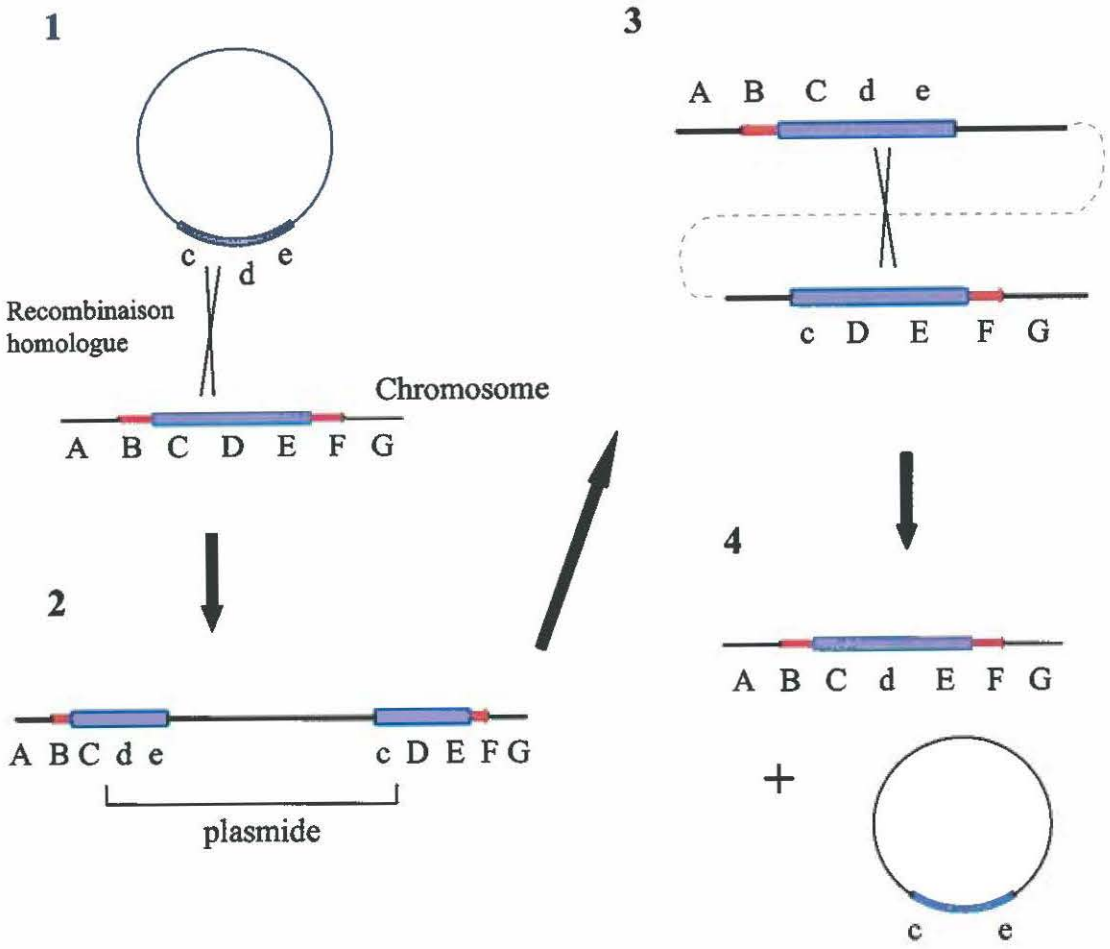


Figure 39. Représentation schématique illustrant l'intégration et la délétion des plasmides pML01 à pML21 dans le chromosome. Suite à une première recombinaison homologue (1), le plasmide s'intègre au complet dans le gène cible (2). Des repiquages en absence de sélection peuvent mener à une deuxième recombinaison homologue (3), ce qui excise le plasmide du chromosome (4). La flèche rouge représente un gène cible; les boîtes bleues représentent des portions d'ADN homologues. Les lettres représentent la séquence d'ADN, les majuscules étant la séquence chromosomique et les minuscules la même séquence amplifiée par PCR et clonée dans le plasmide.

plasmides pNeoR1, pNeoR2 et pNeoS1 ont été construits. Ces plasmides permettent le remplacement en une étape d'une séquence chromosomique par le gène *neo*, selon le principe illustré à la figure 7. Ainsi, une souche résistante à la kanamycine mais sensible à la thiostreptone aurait remplacé sa séquence chromosomique cible par le gène *neo* suite à une double recombinaison homologue. Malheureusement, ces deux stratégies n'ont pas mener aux délétions chromosomiques prévues faute de recombinaison homologue dans la région ciblée du chromosome. La seule façon d'améliorer ces constructions plasmidiques serait d'augmenter la longueur des inserts d'ADN homologue pour favoriser davantage la recombinaison avec le chromosome.

5.3 SOUCHE ΩabfB

L'organisation de la région *abfB* du chromosome de la souche ΩabfB8 est illustrée à la figure 40a. L'intégration du plasmide pML09 dans le gène *abfB* interrompt la séquence codante du gène après les 456 premiers codons. Par contre, la traduction se poursuit dans la séquence plasmidique fusionnée jusqu'au premier codon d'arrêt rencontré, situé après le 494e codon. L'AbfB sauvage est une protéine de 478 acides aminés (aa). Les 22 derniers aa ne sont plus présents chez la souche ΩabfB8 mais sont remplacés par 38 autres aa différents. Cette différence semble être suffisante pour empêcher la formation de la protéine mature stable puisque celle-ci n'a pas été détectée par immunobuvardage. La souche était toujours capable d'hydrolyser le xylane, produisant des zones claires sur milieu RBB-xylane. Ceci est possible car les xylanases ont quand même accès à une bonne partie du squelette de xylane. Un xylane contenant beaucoup de groupements arabinoses serait probablement moins bien dégradé par la souche ΩabfB8 que la souche 1326, puisque l'AbfB agit normalement de façon synergique avec les xylanase. La souche ΩabfB8 n'a pas été davantage caractérisée afin de mettre tous les efforts sur l'obtention d'une délétion des gènes *bxlA, bxlR* et *bxlS*. L'analyse par HPLC des produits de dégradation du xylane par cette souche permettrait probablement de visualiser

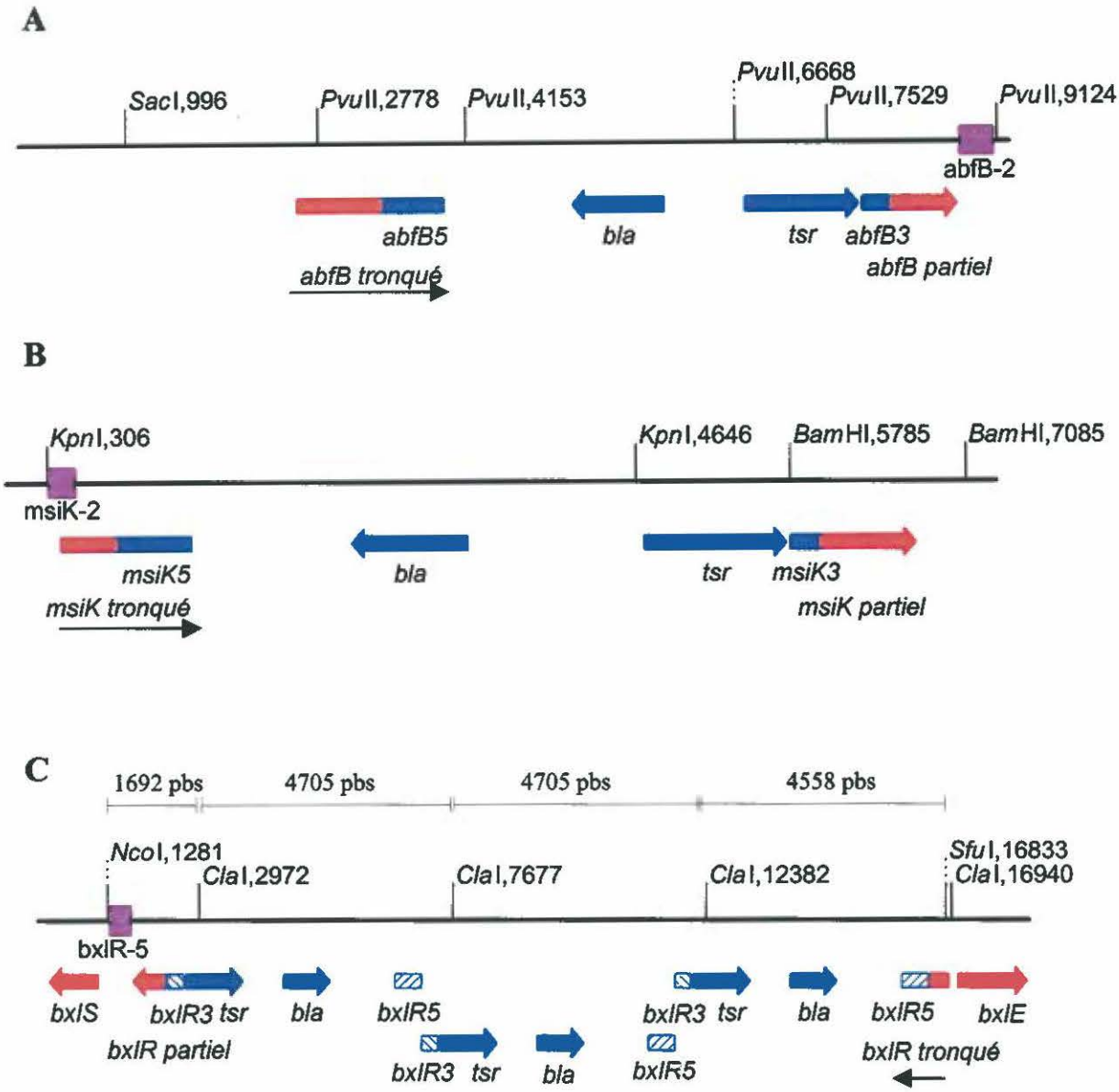


Figure 40. Organisation des régions du chromosome de souches de *S. lividans* où des intégrations de plasmides ont eu lieu. Les sites de restriction utilisés lors des analyses de Southern sont indiqués avec leur position en pbs dans la séquence. L'emplacement des sondes est montré par une boîte mauve. Les flèches et rectangles rouges représentent les gènes de la souche sauvage, les bleus ceux du plasmide. Les portions en 5' et en 3' des inserts plasmidiques ayant servi à la recombinaison homologue sont désignées par le nom du gène suivi du chiffre 5 ou 3, respectivement. a) intégration de pML09 dans le gène *abfB* de la souche ΩabfB8 b) intégration de pML21 dans le gène *msiK* des souches ΩmsiK24-2, 3 et 4. c) organisation possible de la région *bxlR* du chromosome de la souche ΩbxlR18-3 suite à l'intégration de plusieurs copies (trois sont ici représentées) du plasmide pML04 dans le gène *bxlR*.

l'accumulation d'arabinoxylobiose ou d'arabinoxylotriose, si ceux-ci ne sont pas activement transportés et hydrolysés subséquemment par l'AbfA intracellulaire.

5.4 SOUCHES ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 ET ΩmsiK24-4

Les souches ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-3 et ΩmsiK24-4 semblent toutes identiques génétiquement en se basant sur les analyses de Southern effectuées. L'organisation moléculaire de la région *msiK* du chromosome de ces souches est montrée à la figure 40b. L'intégration du plasmide pML21 dans le gène *msiK* interrompt la séquence du gène après 321 codons, le gène sauvage en comptant 378. La traduction peut toutefois se poursuivre jusqu'au prochain codon d'arrêt rencontré dans la séquence plasmidique, situé 30 codons plus loin. Ainsi, la protéine MsiK des souches ΩmsiK devrait être composée de 351 aa et ne posséderait pas les 57 derniers aa de la protéine sauvage. Seulement trois résidus conservés chez d'autres protéines de liaison de l'ATP bactériennes (Hurtubise *et al.*, 1995) sont ainsi perdus. Il se pourrait donc que les intégrants *msiK* conservent une partie de leur activité, étant donné que le motif de Walker (représentant les séquences responsables de la liaison de l'ATP) demeure intact.

En analysant les résultats obtenus lors de l'immunodétection de MsiK, on ne remarque pas de différence entre les souches ΩmsiK et la souche sauvage. Une grande quantité de protéines a été détectée lors des immunobuvardages anti-MsiK (figure 33). Il existe probablement plusieurs protéines de liaison à l'ATP différentes chez *S. lividans* et il est possible qu'il y ait eu une réaction croisée entre ces protéines et l'anticorps anti-MsiK. De plus, la protéine MsiK a peut-être été attaquée par des protéases, engendrant quelques produits de dégradation. Néanmoins, la protéine MsiK semble être présente chez les souches ΩmsiK. La protéine devrait être légèrement plus petite chez les souches ΩmsiK (27 aa en moins, soit 2,6 kDa), mais cette différence est possiblement trop petite pour être visualisée sur un minigel de polyacrylamide.

Le phénotype attendu des souches ΩmsiK est le même que la souche 10-164, soit une souche n'ayant pas d'activité xylanasique ou cellulasique. Une délétion au niveau du gène *msiK* permettrait d'avoir une souche semblable à 10-164 mais plus stable génétiquement, cette dernière souche devant son phénotype à une mutation ponctuelle. Le fait que les 57 derniers résidus de la protéine sauvage aient été remplacés par 30 autres résidus chez les souches ΩmsiK ne semble pas empêcher le repliement et une activité partielle de la protéine. En effet, une zone d'hydrolyse a été observée sur milieu RBB-xylane pour la souche ΩmsiK24-3 (figure 28). Toutefois, aucune zone n'est observée pour les souches ΩmsiK24-2, ΩmsiK24-4 et 10-164. De plus, l'évaluation de l'activité xylanasique spécifique a démontré qu'un certain pourcentage de l'activité était toujours présent chez les souches ΩmsiK (figure 37). La souche ΩmsiK24-4 est celle ayant la plus faible activité xylanasique. Le fait que les trois souches aient des différences d'activité xylanasique malgré le fait qu'elles semblent identiques génétiquement demeure inexpliqué. Cela pourrait être dû à des variations expérimentales ou encore aux niveaux de croissance de chacune des trois souches qui ne serait pas identique.

Des immunodétections des trois xylanases ont été réalisées pour vérifier si l'expression des gènes *xlnA, xlnB* et *xlnC* était affectée. Les trois protéines ont été détectées chez les trois souches ΩmsiK (figures 30, 31 et 32). Par contre, pour le contrôle négatif, la souche 10-164, les trois xylanases ont également été détectées. Ceci est probablement dû à la trop grande sensibilité de l'immunodétection à la phosphatase alcaline des protéines. En effet, les xylanases ne sont exprimées qu'à un très faible niveau de base non induit chez la souche 10-164; cette quantité minime semble être suffisante pour permettre une immunodétection des xylanases. L'absence d'activité xylanasique de la souche 10-164 est détectable visuellement sur un milieu RBB-xylane ou par des tests d'activité spécifique.

L'immunodétection de BxlR à l'aide d'anticorps anti-CcpA a été réalisée pour les intégrants *msiK* cultivés en présence de xylane pendant 24 h. Tout comme pour la souche 10-164, une protéine majoritaire d'environ 34 kDa et une deuxième protéine d'environ 37 kDa ont été détectées par les anticorps anti-CcpA, tandis que seule la protéine de 37 kDa a

été détectée chez la souche sauvage 1326 (figure 34). La protéine de 37 kDa correspondait au poids moléculaire attendu de BxlR, mais la protéine d'environ 34 kDa est de nature inconnue. Néanmoins, on constate que les souches ΩmsiK démontrent un profil semblable à celui de la souche 10-164 après 24 h en présence de xylane. En résumé, l'intégration du plasmide pML21 dans le gène *msiK* semble avoir permis l'abolition partielle de la fonction de la protéine MsiK, en particulier pour la souche ΩmsiK24-4, mais la mutation d'un codon essentiel de *msiK* chez la souche 10-164 demeure plus efficace pour en abolir l'activité.

Afin d'approfondir les différences observées dans l'expression de protéines homologues à CcpA entre les souches 10-164 et 1326, d'autres immunodétections de CcpA ont été réalisées sur des cultures faites avec différentes sources de carbone. Ceci a permis de détecter, en plus d'une protéine d'environ 37 kDa qui pourrait correspondre à BxlR, une deuxième protéine d'environ 34 kDa exprimée en présence de certaines sources de carbone. Chez la souche 10-164, la protéine était faiblement exprimée en présence de xylose et abondamment exprimée en présence de cellobiose, de maltose et de xylane (figure 36). Or, cette souche a un taux d'incorporation du xylose 10 fois plus faible que la souche sauvage et est totalement déficiente dans le transport du cellobiose, du maltose et du xylobiose (un produit de dégradation du xylane) (Hurtubise *et al.*, 1995; Schlösser *et al.*, 1997). La présence de la protéine d'environ 34 kDa homologue à CcpA semble donc être liée à l'effet pléïotropique de la mutation de *msiK*; l'absence de cellobiose, de maltose et de xylobiose dans la cellule semble déréprimer ou activer l'expression de la protéine de 34 kDa. D'autre part, cette protéine était exprimée en présence de galactose et de xylane (dans une moindre mesure) chez la souche sauvage. Pour l'instant, la nature exacte de ces deux protéines demeure incertaine. Par contre, il s'agit probablement de régulateurs, puisqu'il y a réaction avec les anticorps anti-CcpA. Il serait possible d'isoler ces deux protéines par des colonnes d'affinité utilisant des anticorps anti-CcpA pour ensuite déterminer leur séquence N-terminale. De plus, des tentatives de purification de BxlR sont actuellement en cours, de sorte que des anticorps anti-BxlR pourraient éventuellement être disponibles.

5.5 SOUCHES ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 ET ΩbxlR5

Suite à l'intégration du plasmide pML04 dans le gène *bxlR*, un fragment de 6,1 kb aurait dû être détecté par l'hybridation de la sonde bxlR-5 à l'ADN chromosomique de la souche bxlR18-3 digéré par les enzymes *Nco*I-*Sfu*I. Or, c'est plutôt un fragment de plus de 21 kb qui a été détecté. Ceci suggère que plus d'une copie de pML04 s'est intégrée dans *bxlR*, probablement cinq ou plus selon la longueur du fragment obtenu. L'intégration de plusieurs copies contiguës d'un plasmide dans un gène a été observée par Muth *et al.* (1997). L'organisation chromosomique possible de la région *bxlR* de la souche ΩbxlR18-3 est illustrée à la figure 40c. S'il y a eu intégration de *n* copies de pML04 chez cette souche, une hybridation à la sonde bxlR-1 de son ADN chromosomique digéré par les enzymes *Cla*I-*Nco*I devrait révélé un fragment de 1692 pbs, un fragment de 4558 pbs et (*n*-1) fragments de 4705 pbs. Rappelons que la sonde bxlR-1 correspond à la portion interne du gène clonée dans le plasmide utilisé pour l'intégration, soit les régions nommées *bxlR5* et *bxlR*3 à la figure 40c. Les résultats d'hybridation de type Southern présentés à la figure 14a ont été obtenus en utilisant la sonde bxlR-5, mais des résultats identiques (non montrés) ont été obtenus avec la sonde bxlR-1. Les fragments de 4558 et 4705 pbs ne sont pas suffisamment séparés en gel d'agarose pour bien les distinguer, ce qui explique que deux bandes (plutôt que trois) sont visibles à la figure 14a. Les fragments de 4558 et 4705 pbs peuvent hybrider avec une grande partie de la sonde tsr (figure 14c), tandis que seul le fragment de 1692 pbs devrait s'hybrider avec la sonde bxlR-5. Or, le résultat de l'hybridation de la sonde bxlR-5 à l'ADN chromosomique de la souche ΩbxlR18-3 est identique à celui de la sonde bxlR-1. Ce résultat demeure inexpliqué. Il y a peut-être de l'homologie entre la sonde bxlR-5 et une partie du plasmide pML04.

Des repiquages sans sélection ont permis d'obtenir des souches ayant perdu toutes les copies du plasmide; ces souches sont retournées à l'état sauvage et il n'y a pas eu de délétion chromosomique, tel qu'expliqué à la figure 39. D'autres souches obtenues suite

aux repiquages sans sélection ont perdu les plasmides supplémentaires intégrés dans *bxlR* pour n'en conserver qu'une seule copie (souches ΩbxlR4 et 5, entre autres). Ces souches auraient probablement aussi pu être obtenues par des repiquages en présence de thiostreptone. Il est même possible qu'à force de repiquages pour maintenir la souche ΩbxlR18-3, elle se retrouve maintenant avec une seule copie du plasmide pML04 intégrée dans *bxlR*, comme pour les souches ΩbxlR4 et ΩbxlR5.

L'intégration du plasmide pML04 dans le gène *bxlR* des souches ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 et ΩbxlR5 devrait résultée en la traduction d'une protéine BxlR tronquée fusionnée à 38 aa provenant de la séquence plasmidique. Cette protéine de 331 aa ne posséderait pas les derniers 45 aa des 338 aa qui composent la protéine sauvage. Des alignements de séquence entre BxlR et 19 autres protéines de la famille des régulateurs LacI-GalR réalisés par Larocque (1998) ont permis de localiser trois domaines conservés dans la protéine BxlR. L'intégration de pML04 dans *bxlR* n'affecte pas la traduction des domaines de fixation à l'ADN ou de liaison à un sucre, mais empêche la traduction de la moitié du domaine de dimérisation présent dans la portion C-terminale de la protéine. Il est difficile d'évaluer l'impact de cette portion de la protéine sur son activité globale. L'absence de la fin du domaine de dimérisation pourrait abolir complètement l'activité ou encore permettre une activité partielle ou même totale de la protéine BxlR des souches ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 et ΩbxlR5.

La caractérisation primaire des souches ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 et ΩbxlR5 a été réalisée. BxlR a de l'homologie avec des protéines de régulation et se lie à des palindromes d'ADN en amont des gènes des trois xylanases, de *msiK* et de l'opéron *bxl*. Une inactivation de BxlR pourrait donc avoir comme effet de modifier l'expression des xylanases, de MsiK ou de la ß-xylosidase selon la présence ou l'absence d'un substrat en relation avec ces protéines.

Tout d'abord, une protéine d'environ 37 kDa a pu être détectée par des anticorps anti-CcpA chez les intégrants *bxlR*, tout comme pour la souche sauvage, en milieu M14-

xylane 48 h et en milieu M14-glucose 24 h (figures 34 et 35). Cela correspond bien au poids moléculaire attendu de BxlR. La protéine BxlR tronquée et en fusion avec une séquence plasmidique n'a que 7 aa de moins que la protéine sauvage, ce qui fait qu'il est probablement impossible de les distinguer sur un minigel de polyacrylamide. Ainsi, le remplacement des 45 derniers aa de BxlR par 38 autres aa étrangers ne semble pas affecter le repliement et la stabilité de la protéine pour empêcher son immunodétection.

L'activité des xylanases a tout d'abord été évaluée sur milieu RBB-xylane. La souche ΩbxlR5 produit une zone d'hydrolyse au contour bien défini par opposition à un contour flou pour les autres intégrants *bxlR* ou pour la souche sauvage. Ce phénomène est également observé chez la souche *S. lividans* IAF18 qui possède un plasmide multicopie contenant le gène *xlnA*. On s'attend à ce que les trois souches intégrantes en *bxlR* aient un phénotype semblable; il demeure inexpliqué pourquoi la souche ΩbxlR5 produit de telles zones. Les mesures d'activité spécifique n'ont pas permis de révéler une différence particulière pour cette souche (figure 37). La souche ΩbxlR18-3 a une activité xylanasique spécifique légèrement supérieure à celle de la souche sauvage après 48 h mais similaire à 72 h. Pour les souches ΩbxlR4 et ΩbxlR5, l'activité xylanasique n'est pas significativement différente de celle de la souche sauvage après 48 h, mais lui est légèrement inférieure après 72 h. L'activité des souches ΩbxlR18-3, ΩbxlR4 et ΩbxlR5 devrait être similaire puisqu'elles ont toutes un gène *bxlR* interrompu. On remarque qu'avec le temps (i.e. de 48 h à 72 h), l'activité augmente chez toutes les souches. Les petites différences observées entre les intégrants et la souche sauvage pourraient être dues à la croissance qui peut être plus rapide dans une culture que dans l'autre, quoique des précautions ont été prises pour avoir les mêmes quantités d'inoculum. Il ne semble donc pas y avoir d'effet remarquable sur l'expression des xylanases en présence de xylane pour ces trois souches. Les surnageants de culture de 24, 48 et 72 h en milieu M14-glucose n'ont pas produit de zones d'hydrolyse sur milieu RBB-xylane, suggérant que la répression catabolique des xylanases est toujours efficace chez les souches ΩbxlR. Finalement, la présence des protéines XlnA, XlnB, XlnC et MsiK a été vérifiée par immunodétection. Ces protéines sont toutes exprimées chez les souches ΩbxlR18-3,

ΩbxlR4 et ΩbxlR5 en milieu M14-xylane. La protéine XlnB n'a pas été détectée en milieu M14-glucose 24 h (figure 31), en accord avec l'absence de zones claires sur milieu RBB-xylane (tableaux 12 et 13).

Pour ce qui est de l'activité ß-xylosidasique spécifique en milieu M14-xylane après 48 h, elle était pratiquement identique à la souche sauvage pour la souche ΩbxlR18-3. Les souches ΩbxlR4 et ΩbxlR5 avaient respectivement une activité de 143% et 133% de celle de la souche 1326 (figure 38). Encore une fois, il est difficile de conclure si cette augmentation d'activité est une conséquence de la dislocation de *bxlR* puisque la souche ΩbxlR18-3 n'a pas le même comportement. D'autre part, si BxlR est un répresseur de l'opéron *bxl*, l'effet d'une dislocation de *bxlR* pourrait ne pas être apparent dans des conditions où la ß-xylosidase n'est pas réprimée comme c'est le cas dans une culture M14-xylane. Il serait donc intéressant de vérifier l'activité ß-xylosidasique spécifique des intégrants *bxlR* à partir de cultures en milieu M14-xylose ou M14-glucose, où l'expression de *bxlA* est probablement réprimée.

En résumé, la caractérisation primaire des trois souches intégrantes en *bxlR* n'ont pas permis de déceler de différences marquantes avec la souche sauvage. Étant donné qu'il n'est pas certain que la dislocation de *bxlR* telle que produite chez ces souches abolisse totalement l'activité de BxlR, il serait plus intéressant d'obtenir une souche où *bxlR* est délété.

5.6 SOUCHE R4-4

La souche *S. lividans* R4-4 a été obtenue suite à une transformation de la souche sauvage avec le plasmide pBxlR6789 (figure 21). Ce plasmide visait l'introduction d'une délétion de 1 kb dans le gène *bxlR* suite à deux recombinaisons homologues successives. La souche R4-4 a tout d'abord été sélectionnée par sa résistance à la thiostreptone, indiquant qu'une première recombinaison homologue avait théoriquement permis l'intégration du

plasmide dans une région flanquant *bxlR*. L'ADN chromosomique de cette souche a donc été isolé afin de vérifier l'intégration du plasmide dans la région *bxlR*. L'ADN digéré par une endonucléase de restriction puis séparé en gel d'agarose n'avait pas un aspect régulier, puisqu'un ou deux fragment(s) (selon la digestion) était(ent) présent(s) en plus grande quantité que le reste des fragments du génome (figure 24). Ceci suggère qu'il y a eu amplification de ces fragments. De tels phénomènes de réorganisation génétique sont relativement fréquents chez les streptomycètes (Volff et Altenbuchner, 1998). L'analyse par Southern de cet ADN semble confirmer l'amplification d'une portion d'ADN comprenant la partie du gène *bxlA* correspondant à la sonde bxlA-2 (figure 26). En effet, une forte hybridation d'un fragment *Nco*I d'environ 4,5 kb et d'un fragment *Not*I d'environ 10 kb à cette sonde a été observée. Ces fragments ne correspondent pas aux fragments *Nco*I et *Not*I de 2,5 kb et 7 kb, respectivement, qui sont détectés par la sonde bxlA-2 chez la souche sauvage.

La réorganisation génétique de la souche R4-4 semble réversible. Des repiquages sans sélection ont mené à l'obtention de six souches sensibles à la thiostreptone; toutes avaient de l'ADN chromosomique d'aspect régulier lorsque digéré par l'enzyme *Not*I puis séparé en gel d'agarose. Lors d'analyses de Southern, il n'y a pas eu d'hybridation à la sonde tsr, confirmant la perte du plasmide. Cependant, il y a eu hybridation aux fragments identiques à ceux de la souche 1326 aux sondes bxlR-5 et bxlA-2. Il y a donc eu un retour à l'état sauvage, probablement suite à une deuxième recombinaison homologue permettant l'excision du plasmide et de la région amplifiée. Si le plasmide pBxlR6789 s'est intégré dans une des deux régions flanquant *bxlR* tel que prévu initialement, il serait peut-être possible d'obtenir une délétion de *bxlR* par une deuxième recombinaison homologue appropriée. Il faudrait isoler un plus grand nombre de colonies dérivées de R4-4 et devenues sensibles à la thiostreptone pour vérifier si cela est possible.

Compte tenu des écarts types, la souche R4-4 avait une activité xylanasique spécifique semblable à celle de la souche 1326 en milieu M14-xylane après 48 h et 72 h. Par contre, l'activité ß-xylosidasique spécifique de la souche R4-4 après 48 h en présence de xylane

était plus de cinq fois supérieure à celle de la souche sauvage. Ceci est en accord avec les résultats d'hybridation de Southern qui suggéraient une amplification du gène *bxlA*. Il reste toutefois à déterminer la nature de l'amplification survenue chez la souche R4-4 pour mieux comprendre son phénotype. Il serait possible d'isoler les fragments d'ADN qui prédominent en gel d'agarose pour ensuite les faire séquencer. Le gène *bxlA* étant situé à l'extrémité 3' de l'opéron *bxl*, son promoteur est probablement situé en amont du gène *bxlE*. Il n'est pas encore connu si ce promoteur a aussi été amplifié, non plus que le nombre de copies de *bxlA* que peut posséder la souche R4-4.

L'immunodétection des protéines XlnA, XlnB, XlnC et MsiK de la souche R4-4 n'a pas permis de déceler une différence par rapport à la souche sauvage. Par contre, la détection des protéines homologues à CcpA a montré des différences entre les souches R4-4 et 1326. Après 24 h de culture en milieu M14-xylane, les deux souches exprimaient la même protéine de 37 kDa réagissant aux anticorps anti-CcpA et correspondant probablement à BxlR. Après 48 h, une bande d'environ 37 kDa a été détectée pour la souche sauvage tandis que la souche R4-4 ne produisait qu'une protéine d'environ 34 kDa (figure 34). Tel que mentionné précédemment, la nature exacte de ces deux protéines n'est pas encore connue. La surexpression de BxlA chez la souche R4-4 pourrait être à l'origine des différences observées entre les souches R4-4 et 1326 quant à l'expression de ces deux protéines homologues à CcpA.

6. CONCLUSION

La dégradation du xylane par *S. lividans* est complexe et implique plusieurs protéines. Le rôle précis de certaines protéines du complexe xylanolytique restait à être approfondi. Dans ce but, des expériences de dislocation génétique par interruption, délétion ou remplacement de certains gènes du système xylanolytique ont été réalisées, pour ensuite caractériser les souches mutantes.

Les événements de recombinaison homologue entre des plasmides ne se répliquant pas chez *Streptomyces* et le chromosome de *S. lividans* se sont avérés très rares, contrairement à ce qui était attendu. D'autres études dans la littérature menées avec différentes espèces de streptomycètes rapportent des taux de recombinaison beaucoup plus élevés. La raison expliquant le faible nombre de transformants obtenus lors de cette étude demeure obscure. Néanmoins, des intégrants ont été générés pour les gènes *abfB, msiK* et *bxlR*.

La protéine AbfB n'était plus exprimée chez la souche interrompue en *abfB*. Cette souche pourrait servir à accumuler des oligoxyloarabinosides dans le surnageant de culture. Ces sucres pourraient avoir des applications pour d'autres études.

L'activité xylanolytique était réduite à différents degrés chez les trois souches interrompues en *msiK* qui ont été obtenues. La nature de l'intégration n'empêche pas la traduction des séquences responsables de la liaison de l'ATP, ce qui expliquerait qu'une activité partielle est toujours détectée. La souche 10-164, qui a une mutation ponctuelle au niveau de ces séquences, a une diminution plus radicale de son activité xylanasique et demeure la souche à utiliser lorsqu'un phénotype xylanase/cellulase négatif est requis. Pour avoir une souche de même phénotype que 10-164 mais plus stable génétiquement, il faudrait produire une délétion chromosomique de *msiK*. Le temps n'a pas permis de tenter de telles expériences dans le cadre de ce projet, mais elles sont actuellement en cours dans le laboratoire pour déléter *msiK* chez *S. coelicolor*.

Le phénotype des souches interrompues en *bxlR* était similaire à celui de la souche sauvage. L'intégration d'un plasmide dans ce gène élimine une partie de son domaine de

dimérisation mais n'affecte pas les domaines de fixation à l'ADN ou de liaison à un sucre. Il est donc possible que la protéine BxlR tronquée possède toujours une bonne partie de son activité. Afin d'éclaircir le rôle de BxlR, il faudrait obtenir une délétion de ce gène ou encore son remplacement par un marqueur de sélection. Des tentatives pour générer de telles souches ce sont avérées infructueuses. Il faudrait donc continuer les tentatives de transformation de la souche sauvage avec les plasmides permettant d'obtenir une délétion de *bxlR* pour éventuellement approfondir le rôle de ce gène, qui pourrait être l'élément clé de la régulation du système xylanolytique. Une autre façon qui pourrait mener à une meilleure compréhension du rôle de BxlR serait de surexprimer cette protéine à l'aide d'un plasmide multicopies. Selon les résultats obtenus suite à une surexpression de MalR (van Wezel *et al.*, 1997), on pourraitt s'attendre à une absence d'activité ß-xylosidasique et xylanasique suite à une forte répression de l'opéron *bxl*.

Pour ce qui est des autres gènes visés lors de cette étude, aucune tentative d'interruption des gènes *abfA, axeA, bxlA* et *bxlS* n'a été fructueuse. Les protéines AbfA et AxeA étant déjà bien caractérisés, la dislocation des gènes correspondants aurait eu des applications plus pratiques que théoriques. Des essais pour produire des délétions des gènes *bxlA* et *bxlS* n'ont pas fonctionné, faute de recombinaison homologue. Le temps n'a pas permis d'essayer d'introduire une délétion ou de remplacer les gènes *bxlE-F-G*. Si cela se fait dans le futur, une attention particulière devra être apportée à la nature de la délétion introduite afin de ne pas affecter la transcription des gènes de l'opéron *bxl* situés en aval de la mutation.

La souche R4-4 a subi une réorganisation génétique impliquant probablement une amplification de *bxlA*. Ceci a résulté en une activité ß-xylosidasique spécifique plus de cinq fois supérieure à celle de la souche sauvage. Il reste toutefois à séquencer l'ADN qui a été amplifié afin de comprendre la nature de la réorganisation génétique survenue; ceci permettrait une meilleure interprétation des résultats obtenus avec la souche R4-4.

Par ailleurs, d'autres moyens permettant de mieux comprendre le système xylanolytique sont également utilisés dans le laboratoire. Depuis le début de ce projet, la protéine BxlA a été partiellement purifiée et a pu être caractérisée par une étudiante du laboratoire pour approfondir son rôle. Il serait néanmoins intéressant d'obtenir une souche délétée en *bxlA*, car elle risquerait d'accumuler le xylobiose qui a une valeur commerciale importante. Des expériences d'altération de la mobilité électrophorétique et de protection à la DNaseI par la protéine BxlS sont également en cours afin de préciser si cette protéine est impliquée ou non dans le système xylanolytique. De plus, la purification de la protéine BxlE a été entreprise pour déterminer sa fonction. Enfin, malgré les difficultés rencontrées, la dislocation génétique demeure un outil essentiel à la compréhension de la fonction de certains gènes. Les tentatives de délétion de gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans* se poursuivront donc jusqu'à l'obtention des mutations souhaitées, permettant une meilleure conception de la dégradation du xylane par ce micro-organisme.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur François Shareck pour son expertise, ses nombreux conseils et sa présence à l'IAF la fin de semaine pour sortir des plats de Pétri de l'incubateur! Merci à Lise Trempe pour m'avoir montré plusieurs techniques et aidé dans mon travail. Merci à tous les membres du groupe des streptomycètes pour leurs commentaires et suggestions lors des rencontres de groupe. Merci à la gang du labo pour la bonne ambiance: Daniel, Thuy, Marco, Maité, Stéphanie, et Valérie. Je remercie également le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour la bourse qu'il m'a accordée pour la durée de ma maîtrise.

En dehors du labo, j'aimerais remercier tous les joueurs de volleyball qui venaient jouer le midi et aux 5 à 7 (Roberge, Steph, Marco, Pat, Louis, José, Christine, Pascale, M-C, Danielle, Raymonde, etc.) et tous ceux qui ont contribué à de bons souvenirs lors de différentes activités (party, canot-camping, carting, Killer). Merci également à Pascale et J-F (et quelques autres occasionnels) pour tous ces *lifts* entre chez moi et l'Institut. En terminant, merci à ma famille pour leur support et leurs encouragements tout au long de mes études.

BIBLIOGRAPHIE

Arhin, F. F., F. Shareck, D. Kluepfel, et R. Morosoli. 1994. Effects of disruption of xylanase-encoding genes on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. **176**: 4924-4930.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol. **3**: 286-290.

Biely, P., G. L. Côté, L. Kremnicky, R. V. Greene, C. Dupont, et D. Kluepfel. 1996. Substrate specificity and mode of action of acetylxylan esterase from *Streptomyces lividans*. FEBS Letters **396**: 257-260.

Biely, P., D. Kluepfel, R. Morosoli, et F. Shareck. 1993. Mode of action of three endo-ß-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. Biochim. Biophys. Acta **1162**: 246-254.

Blanco, J., J. J. R. Coque, et J. F. Martin. 1998. The folate branch of the methionine biosynthesis pathway in *Streptomyces lividans*: disruption of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene leads to methionine auxotrophy. J. Bacteriol. **180**: 1586-1591.

Chater, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. Ann. Rev. Microbiol. **47**: 685-713.

Dassa, E.,. et M. Hofnung. 1985. Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. EMBO J. **4**: 2287-2293.

Denis, F., et R. Brzezinski. 1992. A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. Gene **111**: 115-118.

Dupont, C., N. Daigneault, F. Shareck, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. Biochem. J. **319**: 881-886.

Flandroy, L. 1991. Industrie papetière: une page à tourner. Biofutur (juin): 21-35.

Gaillard, C., et F. Strauss. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. Nucleic Acids Res. **18**: 378.

Giannotta, F., J. Georis, A. Moreau, C. Mazyservais, B. Joris, et J. Dusart. 1996. A sequence-specific DNA-binding protein interacts with the *xlnC* upstream region of *Streptomyces* sp. strain EC3. FEMS Microbiol. Letters **142**: 91-97.

Gusek, T. W., et J. E. Kinsella. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. Crit. Rev. Microbiol. **18**: 247-260.

Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo, et J. C. Wallace. 1988. A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 6602-6606.

Henkin, T. M., F. J. Grundy, W. L. Nicholson, et G. H. Chambliss. 1991. Catabolite repression of α-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli lacI* and *galR* repressors. Mol. Microbiol. **5**: 575-84.

Henrissat, B., et A. Bairoch. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. **316**: 695-696.

Higgins, C. F., I. D. Hiles, K. Whalley, et D. J. Jameieson. 1985. Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding-protein-dependent transport system. EMBO J. **4**: 1033-1040.

Hillemann D, Pühler A, et Wohlleben W. 1991. Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. Nucleic Acids Res. **19**: 727-731.

Hindle, Z., et C. P. Smith. 1994. Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. Mol. Microbiol. **12**: 737-745.

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.

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. Mol. Microbiol. **17**: 367-377.

Jones, K. L. 1949. Fresh isolates of Actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. J. Bacteriol. **57**: 141-145.

Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. **10**: 203-209.

Karkaria, C. E., C. M. Chen, et B. P. Rosen. 1990. Mutagenesis of a nucleotide-binding site of an anion-translocating ATPase. J. Biol. Chem. **265**: 7832-7836.

Kluepfel, D., N. Daigneault, R. Morosoli, et F. Shareck. 1992. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**: 626-631.

Kluepfel, D., F. Shareck, D. J. Senior, R. L. Bernier, et R. Morosoli. 1993. Homologous gene expression and secretion of hemicellulases by *Streptomyces lividans* and their potential use in bleaching of paper pulps. Industrial Microorganisms: Basic Applied Molecular Genetics: 137-142.

Kluepfel, D., S. Vats-Mehta, F. Aumont, F. Shareck, et R. Morosoli. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. Biochem. J. **267**: 45-50.

Küster, E., E. J. Luesink, W. M. de Vos, et W. Hillen. 1996. Immunological crossreactivity to catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* is found in many Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Letters **139**: 109-115.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

Larocque, D. 1998. Analyse moléculaire du locus *bxl* de *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec. 184 pp.

Leblond, P., et B. Decaris. 1994. New insights into the genetic instability of streptomyces. FEMS Microbiol. Letters **123**: 225-232.

Lever, M., T. A. Walmsley, R. S. Visser, et S. J. Ryde. 1984. Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines. Anal. Biochem. **139**: 205-211.

Lin, Y. S., H. M. Kieser, D. A. Hopwood, et C. W. Chen. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. Mol. Microbiol. **10**: 923-933.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193** : 265-275.

Mandels, M., et E. T. Reese. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. J. Bacteriol. **73**: 269-278.

Manin, C., F. Shareck, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1994. Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). Biochem. J. **302**: 443-449.

Mondou, F., F. Shareck, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1986. Cloning of the xylanase of *Streptomyces lividans*. Gene **49**: 323-329.

Morosoli, R., J. L. Bertrand, F. Mondou, F. Shareck, et D. Kluepfel. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J. **239**: 587-592.

Mourez, M., N. Hofnung, et E. Dassa. 1997. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. EMBO J. **16**: 3066-3077.

Muth, G, D. Frese, A. Kleber, et W. Wohlleben. 1997. Mutational analysis of the *Streptomyces lividans recA* gene suggests that only mutants with residual activity remain viable. Mol. Gen. Genet. **255**: 420-428.

Oh, S. H., et K. F. Chater. 1997. Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. J. Bacteriol. **179**: 122-127.

Pronovost, M. 1991. Clonage homologue et expression d'une ß-xylosidase et d'une ß-glucosidase chez *Streptomyces lividans* 66. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec. 106 pp.

Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, et D. A. Hopwood. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol. Microbiol. **21**: 77-96.

Rosen, B. P., C. M. Hsu, J. B. Karkaria, J. B. Owolabi, et L. S. Tisa. 1990. Molecular analysis of an anion pump. Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. **326**: 455-463.

Saurin, W., W. Köster, E. Dassa. 1994. Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. Mol. Microbiol. **12**: 993-1004.

Schlösser, A., T. Kampers, et H. Schrempf. 1997. The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. J. Bacteriol. **179**: 2092-2095.

Shareck, F., P. Biely, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1995. Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. Gene **153**: 105-109.

Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. Gene **107**: 75-82.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.

Towbin, H., T. Staehelin, et J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.

Turner, L. H., J. C. Lara, D. N. Nunn, et S. Lory. 1993. Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **175**: 4962-4969.

van Wezel, G. P., J. White, P. Young, P. W. Postma, et M. J. Bibb. 1997. Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by *malR*, a member of the *lacI-galR* family of regulatory genes. Mol. Microbiol. **23**: 537-549.

Vats-Mehta, S., P. Bouvrette, F. Shareck, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1990. Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans* 66. Gene **86**: 119-122.

Vincent, P., F. Shareck, C. Dupont, R. Morosoli, et D. Kluepfel. 1997. New alpha-L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: Cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. **322**: 845-852.

Volff, J.N., et J. Altenbuchner. 1998. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. Mol. Microbiol. **27**: 239-246.

Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, et N. J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the α- and ß- subunits of ATP synthase, myosine, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. **1**: 945-951.

Weickert, M. J., et S. Adhya. 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. J. Biol. Chem. **267**: 15869-15874.

Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, et J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of ß-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. **52**: 305-317.