

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Purification et caractérisation de la protéine BxIE de *Streptomyces lividans*

Par
Valérie Hay

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

Jury d'évaluation

Directeur de recherche

François Shareck, CMB
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur interne

Réjean Beaudet, CMB
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Luc Gaudreau
Département de biologie
Université de Sherbrooke

(juin 2001)

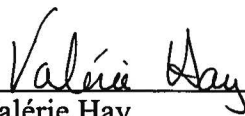
Résumé

Le xylane est un hétéropolymère abondant dans la biomasse végétale que *Streptomyces lividans* est en mesure d'utiliser comme source de carbone. Les enzymes du complexe xylanolytique sont sécrétées afin de dégrader cet hétéropolymère et ainsi générer des produits ayant des degrés de polymérisation variant entre un et trois monomères de xylose. Ces sucres peuvent ensuite être transloqués à travers la paroi bactérienne à l'aide du système de transport du complexe xylanolytique. Une des premières protéines interagissant avec les saccharides provenant de la dégradation de l'hémicellulose lors de leur transport est BxlE, une lipoprotéine. Les gènes codant pour le système de translocation des sucres se retrouvent au sein de l'opéron *bxl* qui ont été séquencés par Larocque en 1998.

Le premier objectif du projet était l'étude de cette lipoprotéine, BxlE. La purification de BxlE à l'aide d'une protéine de fusion et une certaine caractérisation ont été réalisées. Cette caractérisation était importante puisqu'elle permettait d'identifier les sucres pouvant interagir avec BxlE et ce, afin de connaître les inducteurs potentiels du système de dégradation du xylane. La fluorescence intrinsèque de la protéine de fusion a été utilisée afin de détecter la liaison entre le domaine BxlE et différents sucres. Par cette méthode, il a été déterminé que les différents polymères de xylose étaient en mesure de se lier à BxlE avec différentes affinités. Ainsi, le xylopentaose (X5) n'interagit pas avec BxlE. L'ordre de préférence qui a pu être déterminé est : $X5 < X4 < X < X3 < X2$. Des monomères comme le glucose (G1) et le galactose ont aussi été essayés. De plus, des dimères de sucres tel le cellobiose (G2), le maltose, le melibiose et le lactose ont été testés en plus du xylobiose (X2), afin de déterminer s'ils étaient en mesure d'interagir avec la lipoprotéine BxlE.

La deuxième facette du projet consistait à utiliser le peptide signal de BxlE afin de diriger, vers la paroi, une protéine d'intérêt industriel. L'ancrage d'une telle protéine permettrait son couplage à un support solide sans méthode chimique risquant d'altérer ses propriétés biochimiques. Le modèle utilisé fut celui de la xylanase A₂ (domaine catalytique de la xylanase A de *S. lividans*). Le mycélium de *S. lividans* exprimant cette

nouvelle protéine de fusion (peptide signal de BxlE et xylanase A₂ : fusionEA) a été inactivé à l'aide de deux méthodes: azoture de sodium et formaldéhyde. Par la suite, une caractérisation a été réalisée afin de s'assurer que la protéine fusionEA demeurait associée au mycélium et que l'activité xylanasiq ue était conservée. Étant donné que le mycélium était métaboliquement inactif et qu'une activité de dégradation était détectée, l'enzyme devait logiquement être associée à la membrane, vers l'extérieur de la bactérie. Par conséquent, la microscopie électronique a été utilisée afin de tenter d'observer la densité de protéines fusionEA à la surface de la bactérie. Malheureusement, aucune enzyme n'a pu être détectée. Ces résultats paraissaient contradictoires, mais l'activité mesurée était faible et les parois ont pu être altérées lors des différentes étapes de conservation. De nouvelles expériences devront donc être envisagées afin d'établir la bonne méthode de conservation de cette souche ou d'établir les éléments génétiques nécessaires à l'expression de ce type de protéine de fusion chez *S. lividans*.


Valérie Hay


François Shareck
Directeur de recherche

Remerciements

Au cours des deux dernières années, plusieurs personnes m'ont aidé et supporté. La première personne à qui j'aimerais adresser des remerciements bien spéciaux qui est également celle qui m'a permis de réaliser l'un de mes objectifs les plus importants en ce qui concerne mes études, est mon directeur de recherches, François Shareck. En plus de m'avoir accueilli si gentiment dans son laboratoire, il m'a enseigné, aidé, conseillé et supporté. Il faut également mentionner Lise Trempe, la technicienne du laboratoire, ensemble, ils m'ont donné un lieu d'apprentissage que je ne pourrai certes pas retrouver de sitôt.

Je voudrais aussi dire à tous ceux qui m'ont encouragé tout au long de ces dernières années un gros merci. Ainsi, toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce projet ont droit à ma reconnaissance la plus sincère. Ce serait un manque grave de ne pas mentionner les précieux conseils en purification de protéines qui m'ont été fournis par Lisette Duval et, le cadeau si gentiment offert par Pascal Fex : les xylo-oligosaccharides qu'il a si patiemment purifiés.

Également, je ne peux passer sous silence la patience de mes parents et de mes frères qui se sont avérés toujours prêts à me donner un petit coup de pouce. Ils ont crû en moi, même dans les moments les plus pénibles et pour toute cette aide, je leur dois donc une fière chandelle.

Table des matières

	Page
RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
1 INTRODUCTION	1
2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
2.1 <i>Streptomyces lividans</i> 66	5
2.2 Le complexe xylanolytique de <i>Streptomyces lividans</i>	6
2.2.1 Le système enzymatique extracellulaire.....	6
2.2.2 Le système de perméases.....	9
2.3 Les bactéries Gram-positives vs Gram-négatives	11
2.4 Le rôle des lipoprotéines chez les bactéries Gram-positives.....	14
2.5 Le système de transport chez les Streptomycètes et les bactéries Gram-positives	15
2.6 La lipoprotéine du complexe xylanolytique de <i>Streptomyces lividans</i>	20
2.7 Système d'expression et de purification chez <i>Escherichia coli</i>	22
2.8 Analyse de protéines sans activité enzymatique	25
2.9 Immobilisation de protéines	27
2.10 Application de l'immobilisation de protéines à la membrane de bactéries Gram-positives.....	28
3 APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	30
3.1 Liste des produits chimiques et des troussees commerciales utilisées.....	31

3.1.1 Produits chimiques	31
3.1.2 Trousses commerciales.....	34
3.2 Souches et vecteurs	35
3.3 Milieux et conditions de culture.....	39
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	39
3.3.2 <i>Streptomyces lividans</i>	39
3.3.2.1 Milieux liquides.....	39
3.3.2.2 Milieux solides	40
3.4 Amplification élective <i>in vitro</i> (PCR)	41
3.4.1 Oligonucléotides.....	41
3.4.2 PCR.....	42
3.5 Manipulation et analyse de l'ADN.....	42
3.5.1 Digestion enzymatique	42
3.5.2 Migration en gel d'agarose.....	43
3.5.3 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	43
3.5.4 Ligation.....	44
3.6 Transformation de bactéries	44
3.6.1 <i>Escherichia coli</i>	44
3.6.1.1 Cellules compétentes	44
3.6.1.2 Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	45
3.6.2 <i>Streptomyces lividans</i>	45
3.6.2.1 Préparation des protoplastes.....	45
3.6.2.2 Transformation de <i>Streptomyces lividans</i>	46
3.7 Isolement de plasmide	46
3.7.1 Isolement de plasmide chez <i>Escherichia coli</i>	46
3.7.2 Isolement de plasmide chez <i>Streptomyces lividans</i>	47
3.8 Purification de protéines.....	47
3.8.1 Détermination de la température optimale d'induction.....	47
3.8.2 Purification par chromatographie d'affinité	48
3.8.3 Purification par chromatographie échangeuse d'anion	49
3.8.4 Digestion à l'entérokinase	49
3.8.5 Séparation des deux domaines de la protéine de fusion	50
3.9 Analyses biochimiques.....	50
3.9.1 Dosage des protéines	50
3.9.2 Détermination de la concentration en NaCl	50
3.9.3 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	51
3.9.3.1 Coloration au nitrate d'argent.....	51

3.9.3.2 Transfert de type Western	52
3.9.3.3 Immunodétection à l'aide de la phosphatase alcaline	53
3.9.3.4 Immunodétection à l'aide de la peroxydase de raifort (POD).....	53
3.9.5 Test enzymatique.....	54
3.10 Spectrométrie de masse	55
3.10.1 Digestion des protéines à l'aide de la trypsine	55
3.10.2 Purification des peptides à l'aide de Zip Tip C ₁₈	56
3.10.3 Analyse des peptides	57
3.11 Détection de la liaison protéine-sucre	57
3.11.1 Analyse par fluorescence.....	57
4 RÉSULTATS	59
4.1 Purification de la protéine BxlE	60
4.1.1 Amplification élective <i>in vitro</i> du gène <i>bxlE</i>	60
4.1.2 Reconstitution du gène <i>bxlE</i>	65
4.1.3 Expériences pilotes d'expression protéique	73
4.1.4 Purification de la protéine de fusion MBP-BxlE.....	79
4.1.5 Digestion de la protéine de fusion à l'aide de l'entérokinase.....	84
4.1.6 Purification de la protéine BxlE	85
4.1.7 Analyse de la protéine BxlE en spectrométrie de masse	88
4.1.8 Détermination des sucres capables d'interagir avec la protéine BxlE	95
4.2 Construction d'une protéine de fusion ancrée à la paroi de <i>Streptomyces lividans</i>	106
4.2.1 Clonage du gène <i>fusionEA</i>	106
4.2.2 Analyse de la souche IAF-EA	111
5 DISCUSSION	116
5.1 Purification de BxlE	117
5.1.1 Clonage du gène <i>bxlE</i> dans le vecteur pMal-c2E.....	117
5.1.2 Expression et purification de la protéine MBP-BxlE	118
5.1.3 Digestion de la protéine MBP-BxlE par l'entérokinase et purification de BxlE	120
5.1.4 Détermination des sucres liés par la lipoprotéine BxlE.....	122
5.1.4.1 Interaction des sucres avec la protéine MBP.....	122
5.1.4.2 Interaction des sucres avec le domaine BxlE	124
5.2 Construction d'une protéine de fusion ancrée à la membrane de <i>S. lividans</i>	129
5.2.1 Clonage du gène <i>fusionEA</i> chez <i>S. lividans</i>	129
5.2.2 Analyse de la souche IAF-EA	129

6 CONCLUSION.....	133
APPENDICE A.....	136
7 RÉFÉRENCES	139

Liste des figures

	Page
Figure 1: Les enzymes extracellulaires et la β -xylosidase intracellulaire qui participent à la biodégradation complète de l'hétéroxylane chez <i>Streptomyces lividans</i>	8
Figure 2: Système de translocation des sucres proposé pour <i>Streptomyces lividans</i>	9
Figure 3: L'organisation génétique de l'opéron <i>bxl</i> de <i>Streptomyces lividans</i>	10
Figure 4: Comparaison de l'organisation membranaire des bactéries Gram-négatives (A) et des bactéries Gram-positives (B).....	13
Figure 5: L'organisation génétique des opérons <i>ceb</i> de <i>Streptomyces reticuli</i> (A), <i>msm</i> de <i>Streptococcus mutans</i> (B) et <i>mal</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> (C).....	17
Figure 6: Alignement de séquences avec BxlE de <i>Streptomyces lividans</i>	19
Figure 7: Séquences nucléotidique et en acides aminés de BxlE de <i>Streptomyces lividans</i>	21
Figure 8: Carte génétique du vecteur pMal-c2E.....	23
Figure 9: Principe de purification du système pMal TM	24
Figure 10: Réaction enzymatique de glycosynthèse.....	29
Figure 11: Représentation partielle de la carte génétique du phagemide pSL1180.	37
Figure 12: Carte génétique du plasmide pC109MCS.....	38
Figure 13: Montage pour le transfert de protéines sur membrane de nylon en condition semi-sèche.....	52
Figure 14: Séquence nucléotidique du gène <i>bxlE</i> de <i>Streptomyces lividans</i> et les amorces utilisées pour son amplification.	62
Figure 15: Amplification par PCR des extrémités 5' et 3' de <i>bxlE</i> et analyse en gel d'agarose 0,7 %.	63
Figure 16: Séquence nucléotidique de la cassette de clonage multiple du vecteur pSL1180.....	64
Figure 17: Reconstruction théorique du gène <i>bxlE</i> dans le vecteur pSL1180.....	66

Figure 18: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de cinq transformants obtenus lors du clonage de l'extrémité 3' de <i>bxlE</i> dans le vecteur pSL1180.....	67
Figure 19: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de la reconstitution de <i>bxlE</i> dans le plasmide pSL1180.....	68
Figure 20: Clonage de <i>bxlE</i> dans pMal-c2E.....	70
Figure 21: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de transformants obtenus lors du clonage de <i>bxlE</i> dans le vecteur pMal-c2E.....	71
Figure 22: Séquences des extrémités 5' et 3' du gène <i>bxlE</i> cloné dans pMal-c2E entre les sites de restriction <i>KpnI</i> et <i>EcoRI</i> et en fusion avec le gène <i>malE</i>	72
Figure 23: Suivi des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à 37 °C par les souches IAF-101 et IAF-102E en fonction du temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 % coloré au bleu de Coomassie.	75
Figure 24: Suivi des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à 30 °C par les souches IAF-101 et IAF-102E en fonction du temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.	76
Figure 25: Suivi des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à 25 °C par les souches IAF-101 et IAF-102E en fonction du temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.	77
Figure 26: Comparaison des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à différentes températures et à différents temps de culture par les souches IAF-101 et IAF-102E. Transfert de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-MBP.	78
Figure 27: Fractions de la purification de la protéine de fusion MBP-BxlE à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.	81
Figure 28: Transfert de type Western et immunodétection des protéines réagissant aux anticorps de lapin anti-MBP lors de l'induction de la souche IAF-102E et de la purification de la protéine MBP-BxlE par chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose.	82
Figure 29: Fractions analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 % lors de la purification de la protéine de fusion MBP-BxlE par chromatographie échangeuse d'anion.	83
Figure 30: Analyse de la digestion de la protéine de fusion MBP-BxlE par l'entérokinase par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.	84

Figure 31: Fractions analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 % lors de la purification de la protéine BxlE à l'aide d'une deuxième chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose.	86
Figure 32: Transfert de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-MBP des fractions obtenues lors de la deuxième colonne d'amylose pour la purification de BxlE.....	87
Figure 33: Profil des masses sur la charge (m/z) obtenu lors de la digestion tryptique en gel de BxlE.	91
Figure 34: Spectre de fragmentation du pic à m/z de 473.	92
Figure 35: Spectre de fragmentation du pic à m/z de 746.	93
Figure 36: Séquence en acides aminés de la lipoprotéine BxlE de <i>S. lividans</i> et les peptides ayant été identifiés (en gras) par spectrométrie de masse.....	94
Figure 37: Spectre d'émission des protéines MBP et MBP-BxlE en solution lorsqu'excité à 280 nm.	96
Figure 38: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de maltose.....	99
Figure 39: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de cellobiose (C2)	100
Figure 40: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de xylobiose (X2).....	101
Figure 41: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de xylopentaose (X5)	102
Figure 42: Construction théorique du gène <i>fusionEA</i>	107
Figure 43: Analyse en gel d'agarose 0,7 % des produits d'amplification des deux fragments d'ADN pour la construction du gène <i>fusionEA</i>	108
Figure 44: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de l'amplification PCR réalisée pour obtenir le gène <i>fusionEA</i>	109
Figure 45: Analyse en gel d'agarose 0,7 % d'un transformant obtenu lors du clonage du gène <i>fusionEA</i> dans le vecteur pC109MCS possédant une activité d'hydrolyse sur le milieu RBB-xylane.....	110
Figure 46: Détection de la protéine fusionEA par transfert de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-XlnA ₂	113

Figure 47: Analyse de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-XlnA ₂ de la stabilité de la protéine fusionEA.....	114
Figure 48: Activité xylanasique au cours du temps en fonction du traitement du mycélium.....	115

Liste des tableaux

	Page
Tableau I Les souches et les vecteurs.....	35
Tableau II Oligonucléotides utilisés pour les amplifications électives <i>in vitro</i>	41
Tableau III Séquences et masses théoriques correspondant aux pics ayant fait l'objet d'une tentative de fragmentation lors de la confirmation de la purification de BxlE.....	90
Tableau IV Résumé des données obtenues lors des expériences de fluorescence avec les protéines MBP et MBP-BxlE en présence de différents sucres.	105

1 Introduction

Depuis de nombreuses années, plusieurs groupes de recherches s'intéressent aux bactéries du genre *Streptomyces*. Leur capacité à produire une panoplie de métabolites secondaires comme des antibiotiques et des enzymes hydrolytiques ayant un intérêt industriel a été le point de départ de l'étude de leur physiologie. Elles ont été isolées du sol, puisqu'elles font partie intégrante des processus de dégradation de la biomasse végétale. Par conséquent, elles sont capables de sécréter une grande quantité d'enzymes hydrolytiques. De plus, le genre *Streptomyces* n'est pas pathogène pour l'homme, ce qui en fait un candidat sécuritaire pour les manipulations au laboratoire (Anné et Van Mellaert, 1993). Le groupe de recherches sur les Streptomycètes de l'INRS-Institut Armand-Frappier utilise *Streptomyces lividans* 66 comme modèle. Cette souche de Streptomycètes fait l'objet d'études pour ses capacités de dégradation de certains biopolymères composés de sucres comme la cellulose et le xylane.

La découverte de l'opéron *bxl* et l'étude des différentes enzymes sécrétées ont permis de mieux comprendre le système xylanolytique chez *S. lividans* (Morosoli *et al.*, 1986, Kluepfel *et al.*, 1990, Kluepfel *et al.*, 1992, Vats-Mehta *et al.*, 1990, Shareck *et al.*, 1991., Arcand *et al.*, 1993., Dupont *et al.*, 1996., Vincent *et al.*, 1997, Larocque, 1998). Cet opéron est composé de six cadres de lecture ouverts identifiés selon l'homologie de séquence et codant pour six protéines : deux protéines de régulation (BxlR et BxlS), une lipoprotéine (BxlE), deux protéines transmembranaires (BxlF et BxlG) et une β -xylosidase (BxlA). Cette dernière protéine a fait l'objet d'études en 1999 et il a été démontré que cette enzyme ne possède pas d'activité β -glucosidase détectable et que son spectre d'activité est limité aux xylo-oligosaccharides de faible masse moléculaire comme le xylobiose (X2) et le xylotriose (X3) (Lam, 1999). De plus, la protéine BxlR a été étudiée à l'aide des méthodes de « DNA footprinting » et de retardement de la mobilité électrophorétique. Ces recherches ont démontré qu'elle se lie à une région de 51 paires de base en amont de l'ATG de départ de BxlE, comprenant une séquence palindromique pouvant être impliquée dans la régulation de l'opéron *bxl* (Raposo, 2000). Finalement, les sites +1 de l'initiation de la transcription ont aussi été déterminés pour *bxlE* et *bxlR* de l'opéron *bxl*, ainsi que pour certains gènes du complexe xylanolytique (Hernandez, 2000). La caractérisation de l'opéron *bxl* n'en est qu'à ses débuts. L'étude de BxlE devient donc

importante, puisque cette protéine est la première à participer au transport des sucres de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule bactérienne.

Afin d'étudier la protéine BxlE, le premier objectif du projet était de la purifier. Comme second objectif, une certaine caractérisation devait être réalisée afin de déterminer quels sont les sucres capables d'interagir avec cette lipoprotéine. Étant donné que la protéine BxlE ne possède pas d'activité enzymatique détectable, sa fluorescence intrinsèque a été utilisée pour sa caractérisation.

De façon plus appliquée, le peptide signal de BxlE pourrait servir à ancrer, vers l'extérieur de la bactérie, des protéines ayant un intérêt industriel afin de leur conférer un support solide. Présentement, l'immobilisation d'enzymes se fait à l'aide de méthodes chimiques (Gawande et Kamat, 1998). Cette immobilisation permet de produire des colonnes ayant une activité enzymatique spécifique. Malheureusement, les méthodes chimiques modifient les enzymes et une perte de l'activité enzymatique ou un changement dans les caractéristiques biochimiques peuvent souvent être observés. Il y avait donc lieu de vérifier si un couplage *in vivo* pouvait permettre de contourner le problème de la perte d'activité enzymatique. Donc, le troisième objectif était de tenter de faire produire à *Streptomyces lividans* une protéine connue possédant une activité enzymatique qui serait retenue à sa membrane. C'est pour cette raison que le peptide signal de BxlE a été utilisé afin de diriger une protéine vers la paroi de *S. lividans* afin qu'elle s'y ancre de la même manière que les lipoprotéines des bactéries Gram-positives. La protéine choisie a été le domaine catalytique de la xylanase A qui est normalement sécrétée dans le milieu de culture par cette bactérie.

2 Revue de la littérature

2.1 *Streptomyces lividans* 66

Streptomyces lividans 66 (souche 1326) est une bactérie provenant du sol et vivant en contact étroit avec la matière en décomposition. Cette bactérie fait partie de la famille des *Actinomycetales*. Observée au microscope, cette bactérie Gram-positive possède un aspect filamenteux. Son métabolisme est de type chimioorganotrophe et aérobie strict (Gusek et Kinsella, 1992).

S. lividans 66 et *Streptomyces coelicolor* A3(2) sont deux bactéries très étudiées qui présentent de grandes similitudes. Leurs génomes sont composés d'environ 73 % de guanine (G) et de cytosine (C) et leur chromosome est linéaire (Wright et Bibb, 1992 ; Kieser *et al.*, 1992 ; Lin *et al.*, 1993). La cartographie physique a permis de déterminer que *S. coelicolor* A3(2) et *S. lividans* 66 possèdent des génomes semblables (Leblond *et al.*, 1993). En plus de la carte physique, une carte génétique de *S. coelicolor* A3(2) a été réalisée afin d'être en mesure de déterminer l'emplacement exact des gènes sur le chromosome bactérien (Kieser *et al.*, 1992). Une banque de 319 cosmides contenant un insert d'une moyenne de 37,5 kb provenant du chromosome de *S. coelicolor* A3(2) a aussi été créée. Ces cosmides sont ordonnés, se chevauchent et représentent tout le chromosome de *S. coelicolor* A3(2). L'hybridation de tous nouveaux gènes ou marqueurs à la banque cosmidique permet de situer le nouvel élément génétique sur le chromosome de *S. coelicolor* A3(2) et, par homologie, sur celui de *S. lividans* 66 (Redenbach *et al.*, 1996).

Outre les études de nature génétique, d'autres recherches sont effectuées avec *S. lividans* afin d'évaluer ses capacités de dégradation des bio-polymères issus de sources végétales. La matière ligno-cellulosique est composée de trois éléments principaux: la lignine, la cellulose et l'hémicellulose. La cellulose est un polymère composé d'environ 1 500 monomères de glucose unis par des liens β -1,4 sans embranchement. L'hémicellulose - ou hétéroxylane - est quant à lui un polymère d'en moyenne 200 résidues de xylose, unis par des liens β -1,4 et possédant différents embranchements (Clarke, 1997). Les enzymes servant à dégrader ces polymères doivent être sécrétées par la bactérie, puisque ces sources d'énergie ne peuvent entrer dans la cellule en raison de

leur taille. *S. lividans* fait parti des procédés naturels de dégradation, comme le compostage, et a développé un système de sécrétion efficace qui lui permet d'hydrolyser la cellulose et l'hétéroxylane afin d'exploiter leur potentiel énergétique (Gilbert *et al.*, 1995).

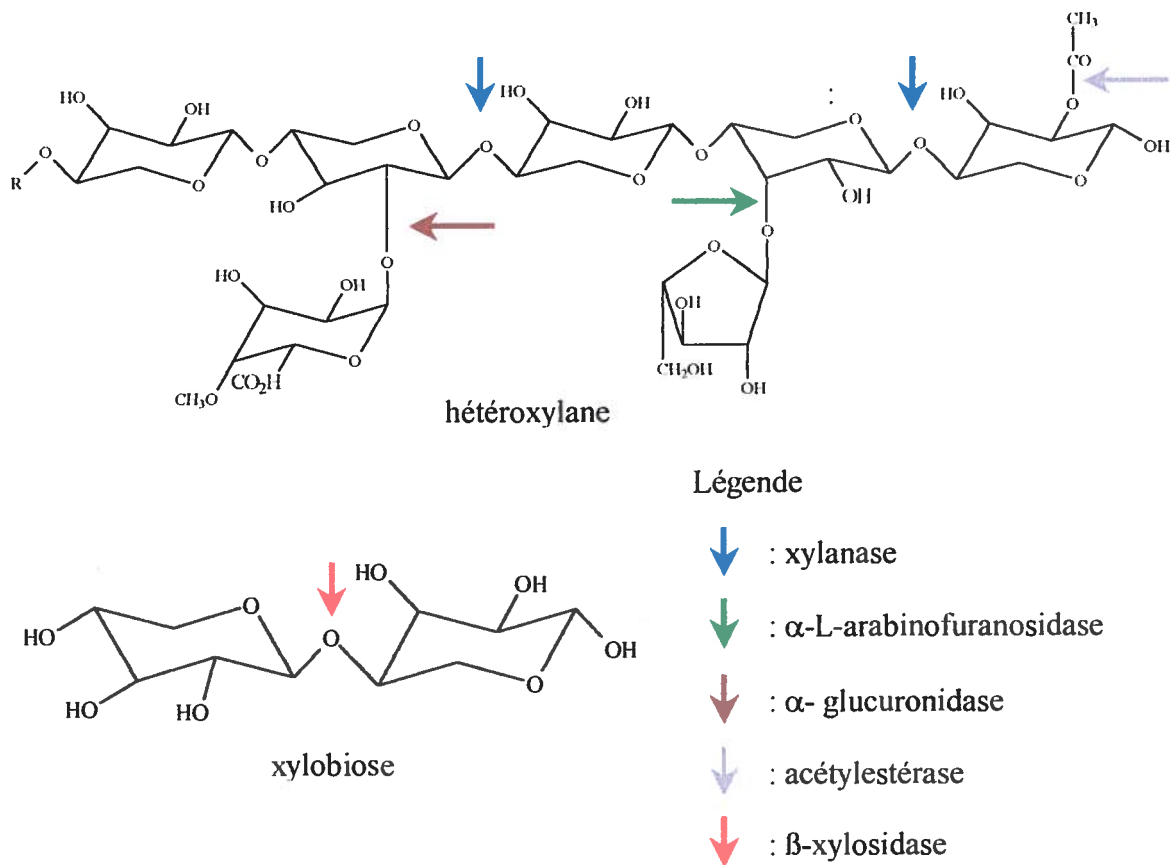
La capacité de *S. lividans* à dégrader la cellulose et le xylane a donc fait l'objet de recherches dans l'optique d'en établir les applications industrielles possibles. Il a ainsi été déterminé que les enzymes sécrétées par *S. lividans* pouvaient servir dans le bio-blanchiment des pâtes à papier, la clarification des jus ou pour l'assouplissement des tissus tel le denim (Kluepfel *et al.*, 1993, Novo, Dyadic, Lyven).

2.2 Le complexe xylanolytique de *Streptomyces lividans*

2.2.1 Le système enzymatique extracellulaire

L'hétéroxylane est un polymère formé de résidus de xylose comportant différents embranchements (Figure 1). Ces derniers peuvent être des groupements acétyles, des arabinofuranoses ou des acides glucuroniques (Clarke, 1997). Les premières enzymes qui participent au processus de dégradation de l'hétéroxylane chez *S. lividans* éliminent les substitutions de la chaîne principale composée de xylose. Les groupements acétyles et arabinofuranoses du polymère de xylose sont hydrolysés par deux enzymes sécrétées : l'acétyl xylane estérase et la L-arabinofuranosidase B (Dupont *et al.*, 1996, Vincent *et al.*, 1997). Pour libérer complètement la fibre de xylane de ses embranchements, *S. lividans* devrait aussi sécréter une glucuronidase afin d'éliminer les acides glucuroniques, mais cette enzyme demeure encore inconnue chez cette bactérie.

Une fois les embranchements éliminés, les différentes xylanases A, B et C sécrétées par *S. lividans* rendent possible la dégradation complète du xylane (Shareck *et al.*, 1991). L'action combinée de ces trois xylanases mènent à l'hydrolyse des liens β -1,4 du polymère de xylose. Les produits générés sont du xylose (X), du xylobiose (X2), du xylotriose (X3), du xylo tétraose (X4) et du xylopentaose (X5) (Morosoli *et al.*, 1986, Kluepfel *et al.*, 1990 et Kluepfel *et al.*, 1992). Les oligosaccharides de faible masse moléculaire ainsi libérés peuvent par la suite entrer dans la bactérie afin de servir de source d'énergie et de carbone.



Adaptation de Clarke, 1997, p 25

Figure 1: Les enzymes extracellulaires et la β -xylosidase intracellulaire qui participent à la biodégradation complète de l'hétéroxylane chez *Streptomyces lividans*.

2.2.2 Le système de perméases

Les résidus de xylobiose et xylotriose générés à l'extérieur de la cellule par les xylanases doivent par la suite entrer dans la cellule bactérienne afin d'être métabolisés. Ces saccharides sont transloqués à l'aide d'un système de transport actif (Figure 2). D'après le modèle présenté, la première étape du transport des sucres résultant de la dégradation du xylane serait leur capture par la lipoprotéine BxlE. Cette protéine ancrée à la membrane permettrait la translocation efficace des saccharides par les deux protéines transmembranaires BxlF et BxlG. L'énergie nécessaire à la translocation des sucres serait fournie par la protéine MsiK qui est capable de lier l'ATP (Penzès, 1995).

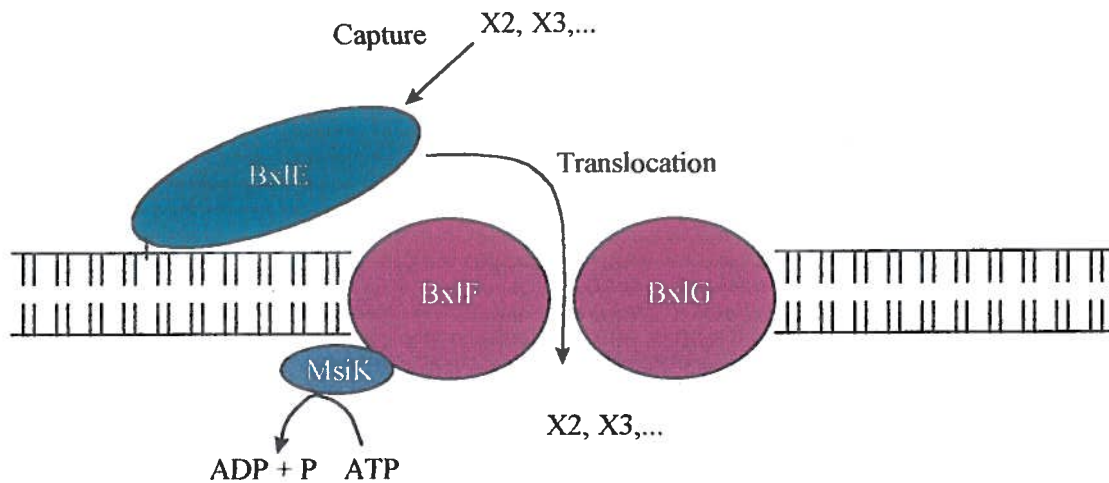


Figure 2: Système de translocation des sucres proposé pour *Streptomyces lividans*.

Les gènes codant pour les protéines du système de translocation des sucres ont été découverts en 1998 par Larocque. Ils sont organisés en opéron, retrouvé dans le cosmide 1H10, à l'exception du gène *msiK* (Redenbach *et al.*, 1996). Ce dernier gène se retrouve dans une région différente du chromosome et codé par le cosmide D8A (The Sanger Center). D'après l'homologie de la séquence en acides aminés, il a été déterminé que l'opéron *bxl* code pour deux protéines de régulation (*bxlR* et *bxlS*), une lipoprotéine liant les sucres (*bxlE*), deux perméases (*bxlG* et *bxlF*) et une β -xylosidase (*bxlA*) (Figure 3).

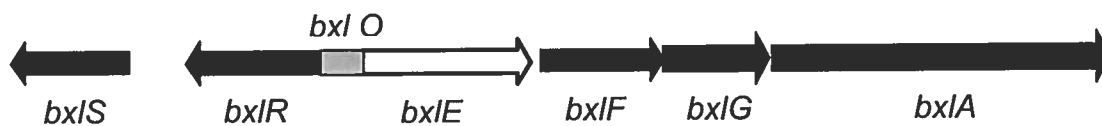


Figure 3: L'organisation génétique de l'opéron *bxl* de *Streptomyces lividans*.

Les deux seules protéines codées par l'opéron *bxl* ayant fait l'objet d'études sont la β -xylosidase BxlA et la protéine de régulation BxlR. Lam en 1999 a purifié la protéine BxlA, a déterminé qu'elle possédait une activité β -xylosidique et une préférence d'action pour le xylobiose (X2) et le xylotriose (X3). Pour ce qui est de la protéine de régulation, il a été déterminé que BxlR lie une région de 51 paires de base dans la région *bxlO* de l'opéron *bxl* (Raposo, 2000).

La protéine MsiK représentée à la figure 2 a aussi fait l'objet d'études. Le phénotype cellulase et xylanase négatif du mutant *S. lividans* 10-164 est expliqué par la mutation de cette protéine (Morosoli *et al.*, 1986 et Hurtubise *et al.*, 1995). Ce mutant a été obtenu en 1986 à l'aide de l'agent mutagène *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine provoquant des mutations aléatoires. Cependant, ce n'est qu'en 1995 que la localisation et l'origine du phénotype du mutant *S. lividans* 10-164 furent élucidées. La protéine mise en cause, *msiK*, possède une mutation ponctuelle qui la rend incapable de lier et, par conséquent, d'hydrolyser l'ATP (Penzès, 1995). Les perméases BxlF et BxlG ne peuvent donc pas transporter dans le cytoplasme les inducteurs des différentes enzymes du système xylanolytique.

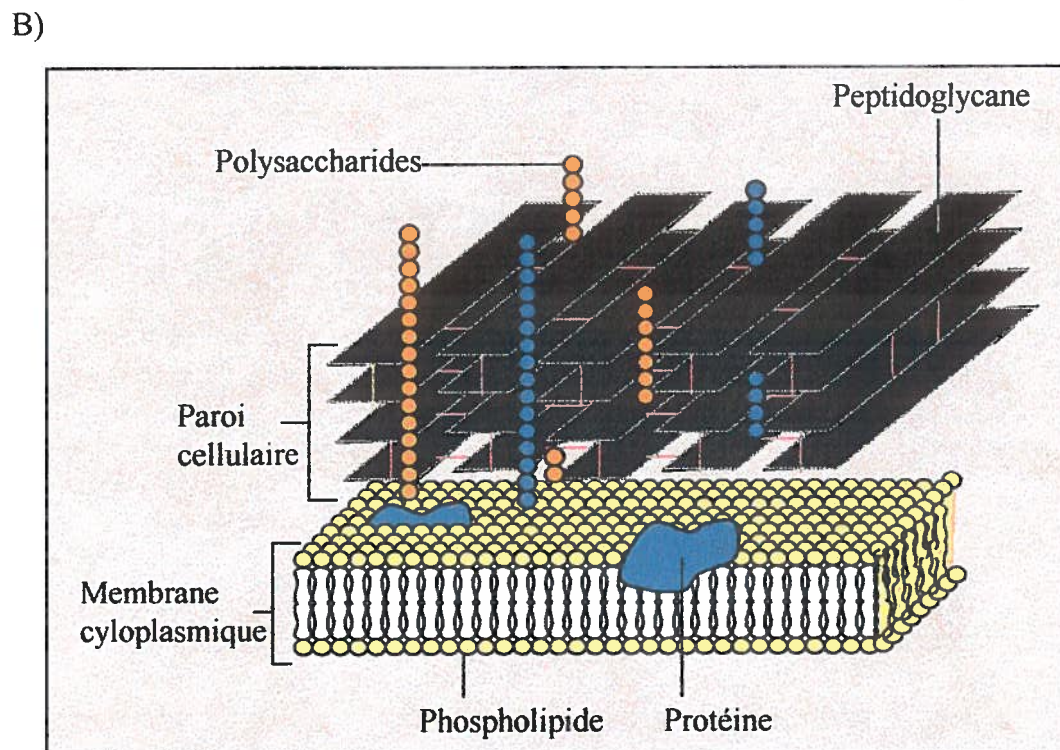
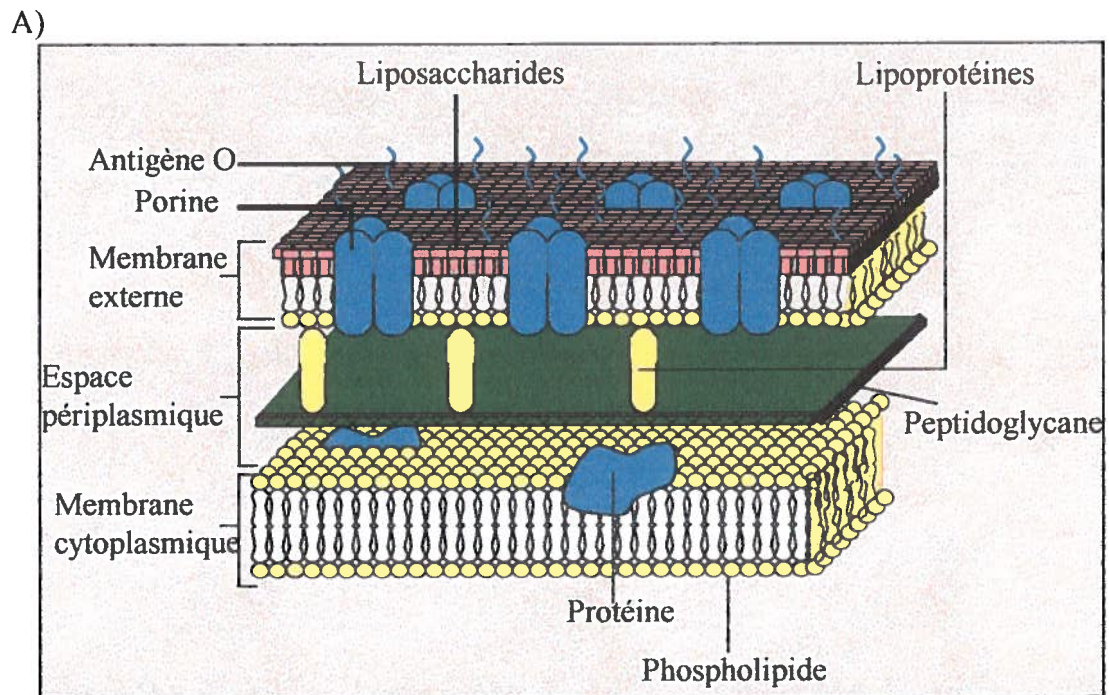
La compréhension du phénotype cellulase/xylanase négatif du mutant *S. lividans* 10-164 et la découverte d'un système de translocation des sucres permirent de mieux saisir le transport des différents produits de dégradation du xylane. Le modèle présenté à la figure 2 est basé sur l'homologie de séquences des protéines codées par l'opéron avec d'autres systèmes de transport des sucres chez les bactéries Gram-positives et les Streptomycètes.

2.3 Les bactéries Gram-positives vs Gram-négatives

Le système typique de transport des nutriments (sucres, polypeptides, etc.) chez les bactéries comporte deux protéines transmembranaires semblables, deux protéines cytoplasmiques liant l'ATP et une protéine soluble ou fixée à la membrane (Ames, 1986). Cette organisation se retrouve autant chez les bactéries Gram-positives que Gram-négatives. Par contre, ces deux types bactériens présentent des différences au niveau du fonctionnement du système de transport découlant de l'organisation structurale de leur paroi cellulaire.

Chez les bactéries Gram-négatives, les molécules hydrosolubles, comme les sucres ou les peptides, doivent traverser deux bicouches de phospholipides: la membrane plasmique et la membrane externe (Darnell *et al.*, 1993). Entre ces deux membranes, l'espace périplasmique comprend une panoplie de protéines, chacune étant spécifique à un type de molécules. Certaines de ces protéines servant à capter et à transporter les nutriments d'une membrane à l'autre sont présentes de façon constitutive, tandis que les autres sont inductibles. Les protéines faisant partie des différents systèmes de transport sont libres dans l'espace périplasmique (Figure 4a).

Les bactéries Gram-positives sont dépourvues de l'espace périplasmique. Par contre, elles possèdent une épaisse couche de peptidoglycane dont la fonction consiste à protéger l'intégrité cellulaire. Les protéines ayant le même rôle que celles situées dans l'espace périplasmique des bactéries Gram-négatives doivent donc être retenues à la membrane afin de jouer leur rôle (Figure 4b). La liaison entre la protéine servant à capter les molécules solubles et l'unique membrane cellulaire des bactéries Gram-positives met en jeu un résidu cystéine retrouvé à l'extrémité N-terminal de la protéine. Ce lien chimique entre le soufre de la cystéine et le lipide est de type glycéride (Hayashi et Wu, 1990). Ce groupe de protéines ancrées à la membrane est nommé lipoprotéine. Ces dernières ont une multitude de rôles et peuvent être identifiées par différentes méthodes comme la comparaison de séquences, le marquage à l'aide d'acide gras radioactif (généralement l'acide palmitique) ou l'arrêt de la maturation des protéines par la globomycine (Sutcliffe et Russell, 1995).



Adaptation de Pelczar, 1993, p. 123.

Figure 4: Comparaison de l'organisation membranaire des bactéries Gram-négatives (A) et des bactéries Gram-positives (B).

2.4 Le rôle des lipoprotéines chez les bactéries Gram-positives

Les lipoprotéines des bactéries Gram-positives sont retrouvées ancrées à la membrane vers l'extérieur. Une bactérie possède un éventail de lipoprotéines remplissant des fonctions diverses.

En 1982, la première protéine liée aux lipides chez les bactéries Gram-positives fut mise en évidence. Elle provenait de *Bacillus licheniformis* et il s'agissait d'une pénicillinase ancrée à la membrane. On observa un clivage de la pénicillinase par une exo-enzyme et on supposa qu'elle était d'abord ancrée à la membrane, avant de se retrouver sous forme soluble dans le milieu (Nielsen et Lampen, 1982). Une enzyme homologue a été retrouvée chez *Staphylococcus aureus*, mais dans ce cas, aucune fraction libre ne fut détectée (Sutcliffe et Russel, 1995 et Navarre *et al.*, 1996).

Le premier lien entre le système de transport des bactéries Gram-négatives et celui des bactéries Gram-positives a été établi par Gilson et ses collaborateurs (1988). Leurs expériences les amenèrent à étudier spécifiquement les systèmes de transport du maltose et des oligopeptides chez les différents types bactériens. Chez la bactérie Gram-négative *Escherichia coli*, la protéine MalE lie le maltose (Duplay *et al.*, 1984) et OppA lie les oligopeptides (Higgins et Hardie, 1983 et Hogarth et Higgins, 1983). Des protéines ayant des séquences similaires à ces deux dernières ont été retrouvées chez la bactérie Gram-positif *Streptococcus pneumoniae* et ont été nommées MalX et AmiA. Les protéines MalE et MalX sont homologues à 67 % et jouent le même rôle, soit celui de lier le maltose. Pour ce qui est d'OppA et d'AmiA, elles sont homologues à 40 % et ont aussi le même rôle au sein de la bactérie, soit celui de lier spécifiquement les oligopeptides (Gilson *et al.*, 1988).

Dans tous les systèmes de transport identifiés jusqu'à ce jour chez les bactéries Gram-positives, une protéine fixée à la membrane était invariablement présente. Cette lipoprotéine possède une affinité particulière envers la molécule transloquée. Par exemple, *Streptococcus mutans* possède un système de transport spécifique à un éventail de sucres tels le melibiose, le raffinose et l'isomaltosaccharide. La protéine MsmE

(*msmE*), codée par l'opéron *msm*, est inductible et retrouvée en quantité supérieure chez les bactéries ayant été mises en croissance dans un milieu contenant du raffinose comme seule source de carbone (Sutcliffe *et al.*, 1993).

Les lipoprotéines des bactéries Gram-positives n'interviennent pas uniquement dans le transport de nutriments comme des sucres ou des oligopeptides. Chez certaines bactéries Gram-positives, des rôles d'adhésion, de médiation de signalisation et/ou de senseur (par exemple, le locus *spo0* de *Bacillus subtilis* qui agit dans l'initiation de la sporulation) ont été attribués à des lipoprotéines. Cette dernière catégorie de protéines peuvent aussi remplir des rôles de conjugaison, d'autolyse, de biogenèse des parois et de phosphorylation oxydative. Les gènes codant pour ce type de protéines peuvent être retrouvés autant sur le chromosome bactérien que sur un plasmide (Sutcliffe et Russell, 1995 et Tjalsma *et al.*, 1999).

2.5 Le système de transport chez les Streptomycètes et les bactéries Gram-positives

L'organisation de l'opéron *bxl* (Figure 3) de *S. lividans* ainsi que le type de protéines pour lequel il code n'est pas unique en son genre. Ainsi, les gènes d'autres streptomycètes sont aussi organisés de la même manière. Par exemple, il a été rapporté que *Streptomyces reticuli* possède un opéron organisé comme celui de *S. lividans*. L'opéron *ceb* est composé de cinq gènes codant respectivement pour une lipoprotéine liant le cellobiose/cellotriose (*cebE*), deux perméases (*cebF* et *cebG*), une β -glucosidase (*bglC*) et une protéine de régulation (*cebR*) (Figure 5a). Les fonctions de toutes ces protéines ont été déterminées à l'aide d'alignements de séquences (Schlösser *et al.*, 1999). Seule la protéine CebE a été purifiée et caractérisée (Schlösser et Schrempf, 1996).

L'organisation de l'opéron *mal* de *S. coelicolor* A3(2) est aussi similaire à celle de l'opéron *bxl*. L'opéron *mal* code, entre autres, pour les protéines MalEFG (Figure 5c) qui sont homologues à celles retrouvées dans les systèmes de transport pour le maltose/maltodextrine chez d'autres bactéries comme *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli* (van Wezel *et al.*, 1997).

L'opéron *msm* de *Streptococcus mutans*, mentionné à la section 2.4, a aussi été caractérisé (Russell *et al.*, 1992). Après le séquençage du locus, une fonction fut attribuée à chacun des différents cadres de lecture. Cet opéron code donc pour : un gène de régulation (*msmR*), une α -galactosidase (*aga*), une lipoprotéine liant les sucres (*msmE*), deux protéines membranaires (*msmF* et *msmG*), une phosphorylase du sucrose (*gtfA*), une protéine liant l'ATP (*msmK*) et une glucosidase du dextran (*dexB*) (Figure 5b). Ces chercheurs démontrèrent qu'il était possible de cloner et de surexprimer les protéines MsmR, MsmE, MsmF, MsmG et MsmK chez *Escherichia coli*. Par la suite, MsmE a fait l'objet de recherches plus approfondies sur son ancrage à la membrane. Ainsi, cette protéine fut surexprimée chez *E. coli* et marquée à l'aide de [¹⁴C]acide palmitique. De plus, il est apparu que la maturation de cette protéine était affectée par l'ajout de globomycine (inhibiteur spécifique de l'enzyme signal peptidase II) dans le milieu. Toutes ces expériences permirent de déterminer que MsmE est bien ancrée à la membrane de *S. mutans* (Sutcliffe *et al.*, 1993).

Lors de l'analyse des opérons *bxl* de *S. lividans*, *mal* de *S. coelicolor* et de *ceb* de *S. reticuli*, aucune ATPase ne fut trouvée dans ces loci, contrairement à l'opéron *msm* de *S. mutans* (Figure 3 et Figure 5). Par contre, il a été rapporté que *S. reticuli* possède un homologue du gène *msiK* de *S. lividans* qui n'est pas codé par l'opéron *ceb* (Schlösser *et al.*, 1997).

Il convient également de remarquer que la fonction de CebE de *S. reticuli*, de MsmE de *Streptococcus mutans*, de MalE de *S. coelicolor* et de MalX de *Streptococcus pneumonia* est très semblable à celle de BxlE attribuée par homologie de séquences. Lors de la recherche d'homologie de séquences, les protéines MsmE et MalE se révélèrent homologues à 43 % (identiques à 26 %) et à 36 % (identiques à 25 %) respectivement avec BxlE. Par contre, les protéines CebE et MalX n'ont pas suffisamment d'homologie avec BxlE pour faire partie du résultat donné par le logiciel Blast (<http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?.Jform=0>). Par contre, lorsque l'alignement de séquences a été réalisé à l'aide du logiciel PRETTY, retrouvé sur le serveur GCG (Genetic Computer Group), la protéine MalX a pu être incluse (Figure 6).

CebE de *S. reticuli* possède encore trop peu d'homologie pour faire partie d'un tel alignement de séquence avec BxlE.

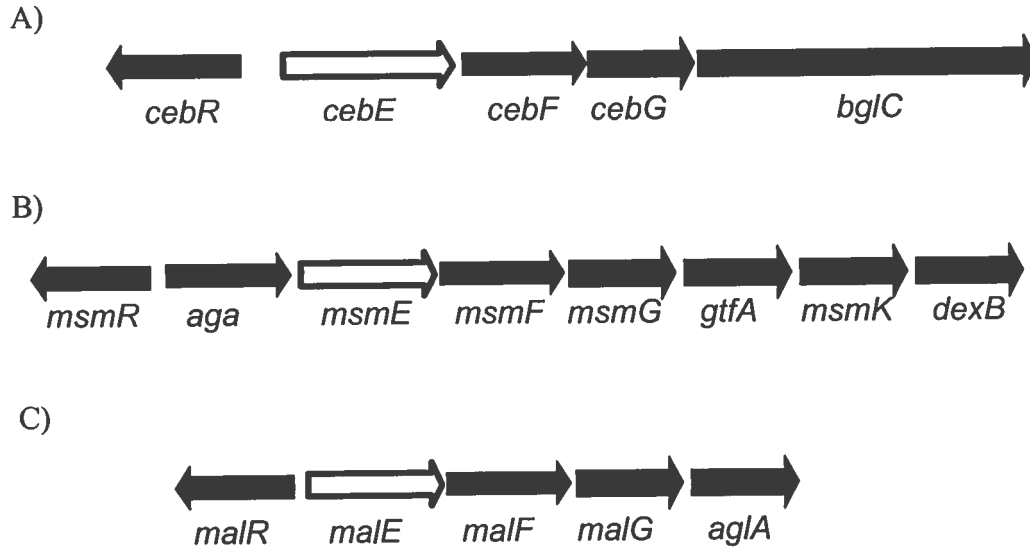


Figure 5: L'organisation génétique des opérons *ceb* de *Streptomyces reticuli* (A), *msm* de *Streptococcus mutans* (B) et *mal* de *Streptomyces coelicolor* (C).

```

1                                     50
SlBxlE mktrarlpri vatgatla.l aLslsACgd. .gdggassdd gk.ihvlvyg
ScMalE ~~~~~mrrg iaatalvasl aLaatACg.. .gdgdsdses ggpvtit.yw
SpMalX msskfmksta vlgtvtlasl lL..vACgsk tadkpadsgs sevkeltyyv
SmMsmE ~-mkwykkig llgivgltsv lLa..ACnks ngsqskddk. ...vtieyf.
Consensus ----- -L---AC--- -----

51                                     100
SlBxlE dasnki.eqq ivdtfnK... ..tsdvkavl dtipgadyqt klqtiintpq
ScMalE dtsnatneap tykalvKefe aankgvkvnf vnvpdfdaqn kfdtaagskg
SpMalX degyksyiee vakayeKe.. ...agvkvtl ktgdalggld klsldnqsgn
SmMsmE ..nqkkemda tlkkiiKdfe renpkihvkm tsvp..dagt vlktrvlsgd
Consensus ----- -K--- -----

101                                    150
SlBxlE aPDifynwgg gs.ikpfvda dlllplddfi kkdpglkdnf lpsvfnsavv
ScMalE aPDvlrs.ev gw.tpafakk gfflpld..g tealaeqdkf qpnlieqaky
SpMalX vPDvmma.py dr.vgslgsd gqlsevk..l sdg.aktddt tkslvtaa..
SmMsmE vPDviniypq nmfdqewska gyfynm.... .tgkaylnhl knhyaneykv
Consensus -PD----- -----

151                                    200
SlBxlE dgKpYgiPmr gtqpvlflhN Kkvledagvq pPkTwdel.. laavgKlkda
ScMalE egKtYgvPl. vtdtlafoyN Kelfekagve aPkTwddlkk aaatvKdk.t
SpMalX ngKvYgaPa. vieslvmyyN Kdlvk....d aPkTfadlen lakdsKyafa
SmMsmE nqKvYsvPlt anvs.giyyN Ktkfkelglk vPeTwdefvk lveeiKakk.
Consensus --K-Y--P-- -----N K----- -P-T----- -----K-----

201                                    250
SlBxlE gvtpialggg dvwptqmwfq ylydriaG.p elfakaiggd ksawesadsk
ScMalE gvdg...yw as..tagyya qpflygeG.t dtv...dada kkvtv..naa
SpMalX gedgkttafI adw.tnfytt ygllagnG.a yvfgqngkda kdiglandgs
SmMsmE .etpfalagt egwtlngyhq lsliSVtGsa naankylrfs qpnsiktsdk
Consensus ----- -----G-- -----

251                                    300
SlBxlE kaldmiselv dsgafgknyd svkytnggsv ql...vasgK agfelmgSwy
ScMalE aakkgg.tw lsldfgkglh kadttadaya hiqeafvsgK vasiigGpW.
SpMalX iaginyaksw yekwp.kgmq dteagani.. .igtqfgegK taaiidGpW.
SmMsmE ilkedmvrl. .nlladdgnq qknwkgasyn dalvafaneK almtpnGSwP
Consensus ----- -----K -----G-W-

301                                    350
SlBxlE ysqqltdhke faeKdpryt. afptv.eggk GdpgnvaGnp nnyysvmkkt
ScMalE ..eitnfykg tafKd.knnl giatvpagst GkagaptGgh nlsvyagsdk
SpMalX .....ka qafKdakvny gvatiptlpn GkeyaafGgg kawvipqavk
SmMsmE cqllnn.... ...Kipnfei gtfafpgkkt Gn.gitvGag dlalsisakt
Consensus ----- ---K----- G-----G-- -----

351                                    400
SlBxlE khpeaaaaeFl k.lysdefvk a.hldignlp ttt.tdkfid dsatpey.tr
ScMalE ahgeaalkFv nfmtsaksqe tvalknstlp trddayt.ak vkadpgi.ag
SpMalX .nleasqkFv dflvateqqk vlydktneip antearsyae gkndelt.ta
SmMsmE khlkeaekFv kymttaramq kyydvdgspv avkgvredkn splqpltkla
Consensus -----F- -----

```

```

          401                                     450
SlBxlE fgydlvsdap nfqlswdqay pqkassdmhk aiqqffnGql dtdgfikamq
ScMalE fgtvlpaaqp rpalpeyssl wtplddelpq ia....gGkk sldegldgae
SpMalX vikqfkntqp lpnisqmsav wdpaknmlfd av....sGqk daktaandav
SmMsmE fthkhyvwlg qhwnseddlf tattnylmtk nakgladGln ffnpmkadvd
Consensus -----G-----

          451             463
SlBxlE alpte~~~~~ ---
ScMalE taiaklvpd. fsk
SpMalX tliketikqk fge
SmMsmE ~~~~~~ ---
Consensus -----

```

Figure 6: Alignement de séquences avec BxlE de *Streptomyces lividans*.

Les acides aminés de la séquence consensus correspondent aux résidus identiques dans les quatre protéines.

Légende :

SlBxlE : protéine BxlE de *Streptomyces lividans* (NCBI : 3941369)

ScMalE : protéine MalE de *Streptomyces coelicolor* (NCBI : 1524333)

SpMalX : protéine MalX de *Streptococcus pneumoniae* (NCBI : 479206)

SmMsmE : protéine MsmE de *Streptococcus mutans* (NCBI : 282317)

2.6 La lipoprotéine du complexe xylanolytique de *Streptomyces lividans*

À la suite de la découverte des différents cadres de lecture ouverts constituant l'opéron *bxl* par Larocque en 1998, les séquences en acides aminés furent analysées. Lors de cette analyse, un seul résidu cystéine fut retrouvé en position 26, à partir de la méthionine de départ, chez BxlE (Figure 7). De plus, l'environnement de cette unique cystéine (LSAC₂₆G) s'est révélé caractéristique et correspond à la famille des lipoprotéines. Cette dernière est répertoriée sur le site PROSITE qui présente une classification et une caractérisation des différentes familles de protéines. La catégorie des lipoprotéines procaryotes se distingue par son site d'ancrage à un lipide (PDOC00013). La séquence consensus définie pour cette catégorie de protéines est :[LIVMFIRSTAG]-[LIVMFYSTAGCQ]-[AGS]-C [C est le site d'attachement au lipide]. De plus, le résidu cystéine doit être situé entre les acides aminés 15 et 35 à partir de la méthionine de départ. Les sept premières positions de la séquence doivent contenir au moins un résidu lysine ou arginine. La séquence nommée « lipobox » - L(S,A)(A,G)↓C(S,G) - correspond à la séquence consensus qui est retrouvée chez les protéines modifiées de façon post-traductionnelle à l'aide d'un lien thioéther de type glycéride (Hayashi et Wu, 1990 et Sutcliffe et Russell, 1995). Par conséquent, la protéine BxlE possède toutes les caractéristiques pour faire partie de la famille des lipoprotéines procaryotiques.

Lors de la maturation de ces protéines chez d'autres bactéries Gram-positives comme *Bacillus subtilis*, seule l'enzyme signal peptidase de type II est responsable de la maturation de la pré-protéine. Elle élimine le peptide signal de la méthionine de départ jusqu'à la cystéine de la séquence consensus. La cystéine demeurant associée à la protéine mature est attachée au lipide et par conséquent elle demeure ancrée à la membrane (Tjalsma H. *et al.*, 1999). Aucune donnée expérimentale n'a encore été rapportée sur la maturation des lipoprotéines chez les *Streptomyces*, mais en tant que bactérie Gram-positive, il est possible de supposer un processus identique.

CTGGGGGCGGAGAAAGCGGTGGAGCCGGTCCCAGTG
 GACCCCCGCTCTTTTCGCCACCTCGGCCAGGGTCACCCGGGCGCCACCTCAACTTCATCGTGCATGCAGGA
 V G A E K A V E A L T M
 AGGATAGCCATGCGATCGATAACGTTTGTAGTCGGCAGCCGCACGGCCATTGACCAGAAATCCGGTCTCAC
 TTTACTGTCCGACCAGCATGGACTTTCGGTGATGGTGCCGAAACTTTCGAAAGCGAACGATGAAGACACGT
 M K T R 4
 GCGCGCTTGCCAGACTGGTCGCCACCGGTGCGACGCTCGCCCTGGCGCTGAGCCTGTGCGGCTGCGGTGAC
 A R L P R L V A T G A T L A L A L S L S A C G D 28
 GGGGACGGCGGGCGTCGTCGGACGACGGCAAGATCCATGTCTGGTCTACGGGGACGCCAGCAACAAGATC
 G D G G A S S D D G K I H V L V Y G D A S N K I 52
 GAACAGCAGATCGTCGACACCTTCAACAAGACCTCCGACGTCGCAAGGCGGTCTCGACACCATCCCCGGTGCC
 E Q Q I V D T F N K T S D V K A V L D T I P G A 76
 GACTACCAGACGAAGCTCCAGACGATCATCAACACCCCGCAGGCCCCGGACATCTTCTACAACCTGGGGCGGC
 D Y Q T K L Q T I I N T P Q A P D I F Y N W G G 100
 GGCAGCATCAAGCCGTTCTCAAGGCGGACCTGCTGCTGCCGCTCGACGACTTCATCAAGAAGGACCCGGGC
 G S I K P F V K A D L L L P L D D F I K K D P G 124
 CTCAAGGACAACCTTCCTGCCGTCCGTCTTCAACAGCGCCGTCGTCGACGGAAGCCGTACGGCATAACCGATG
 L K D N F L P S V F E N S A V V D G K P Y G I P M 148
 CGCGGACCCAGCCGGTCTGCTCTTCCACAACAAGAAGTCTCGAGGACGCGGGCGTCCAGCCGCCCCAAG
 R G T Q P V L L F H N K K V L E D A G V Q P P K 172
 ACCTGGGACGAACCTGCTCGCCGCGGTGGGCAAGCTCAAGGACGCGGGTGTACGCCGATCGCGCTCGGCGGC
 T W D E L L A A V G K L K D A G V T P I A L G G 196
 GGCGACGTGTGGCCGACCCAGATGTGGTTCCAGTACCTCTACGACCGCATCGCCGGTCCGGAGCTGTTTCGCG
 G D V W P T Q M W F Q Y L Y D R I A G P E L F A 220
 AAGGCCATCGGCGGACACAAGAGCGCCTGGGAGAGCGCGGACAGCAAGAAGGCCCTGGACATGATCAGCGAG
 K A I G G D K S A W E S A D S K K A L D M I S E 244
 CTGGTCGACTCCGGCGCCTTCGGCAAGAACTACGACTCCGTCAAGTACACCAACGGCGGCTCGGTCCAGCTG
 L V D S G A F G K N Y D S V K Y T N G G S V Q L 268
 GTGGCCTCGGGCAAGGCCGCTTCGAGCTGATGGGCTCCTGGTACTACTCCAGCAGCTCACGGACCACAAG
 V A S G K A G F E L M G S W Y Y S Q Q L T D H K 292
 GAGTTCGCCGAGAAGGACCCTCGCTACACCGCCTTCCGACCGCTCGAGGGCGGCAAGGGCGACCCGGGCAAC
 E F A E K D P R Y T A F P T V E G G K G D P G N 316
 GTCGCCGGCAACCCCAACAATACTACTCGGTGATGAAGAAGACCAAGCACCCCGAGGCGCGCGCGAGTTC
 V A G N P N N Y Y S V M K K T K H P E A A A E F 340
 CTGAAGCTCATGTACTCCGACGAGTTCTGTCGAAGGCCACCTCGACATCGGCAACCTGCCGACCACGACCAAC
 L K A L M Y S D E F V K A H L D I G N L P T T T N 364
 ACCGACAAGTTCATCGACGACTCGGCCACCCCGAGTACACGCGCTTCCAGTACGACCTCGTCTCCGACGCC
 T D K F I D D S A T P E Y T R F Q Y D L V S D A 388
 CCGAACTTCCAGCTGTCTGGGACGAGCGTATCCCGCAGAAGGCCAGCTCGGACATGCACAAGGCCATCCAG
 P N F Q L S W D Q A Y P Q K A S S D M H K A I Q 412
 CAGTTCTTCAACGGACAGCTCGACACGGACGGCTTCATCAAGGCCATGCAGGCCCTCCCGACCGAGTGA
 Q F F N G Q L D T D G F I K A M Q A L P T E - 434

Figure 7: Séquences nucléotidique et en acides aminés de BxlE de *Streptomyces lividans*.

Légende :

Flèche → : direction de la transcription de *bxlR* et *bxlE*

Flèche → : RBS

Flèche → : séquence palindromique

Flèche → : -10 de l'initiation

Flèche → : -35 de l'initiation

Acides aminés : séquence en acides aminés de la « lipobox » de BxlE

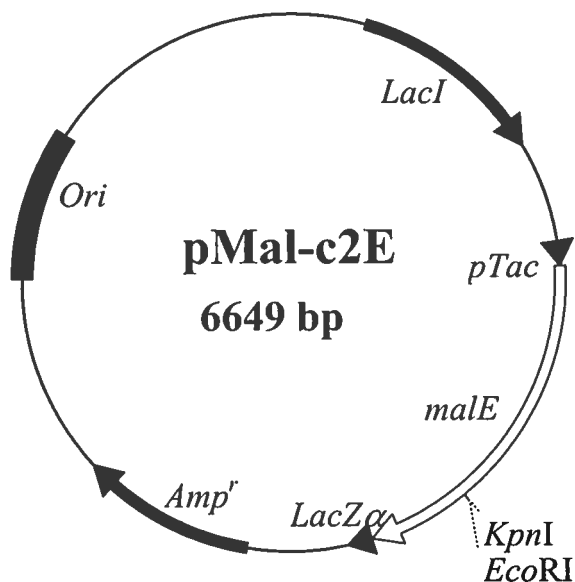
2.7 Système d'expression et de purification chez *Escherichia coli*

Certains vecteurs commerciaux combinent un système puissant d'expression à une méthode de purification rapide. Une des méthodes les plus courantes est la chromatographie d'affinité. Elle est rapide, simple et permet généralement d'obtenir une protéine hautement purifiée en une seule étape de purification. La production de protéines de fusion utilisant le domaine de liaison à un polymère est de plus en plus commune. Ainsi, les domaines de liaison à la chitine, à la cellulose ou à l'amylose ont été exploités commercialement dans le but de fournir une méthode de purification rapide et spécifique de la protéine de fusion.

Le domaine de liaison à l'amylose est exploité par New England Biolabs. Cette compagnie a commercialisé une série de vecteurs comprenant le plasmide pMal-c2E (Figure 8). Dans ce dernier, le gène d'intérêt est cloné en aval et en phase avec le gène *malE* d'*Escherichia coli*. Le gène de fusion est sous le contrôle du promoteur pTac, inductible à l'aide d'IPTG. La séquence du peptide signal du gène *malE* a été légèrement modifiée de façon à permettre l'expression cytoplasmique de la protéine de fusion qui, de façon naturelle, irait se loger dans l'espace périplasmique d'*E. coli*. Les protéines de fusion produites par ce vecteur vont s'accumuler dans le cytoplasme. Après la surexpression de la protéine de fusion ainsi que la lyse des cellules, une première chromatographie d'affinité peut être effectuée. La protéine de fusion possédant le domaine de liaison au maltose (MBP) est retenue spécifiquement par la résine d'amylose et éluée à l'aide de maltose.

Le vecteur pMal-c2E insère le site de reconnaissance de l'entérokinase entre les deux domaines de la protéine de fusion. Cette protéase doit donc être employée afin de séparer les deux domaines de la protéine. Pour séparer la portion MBP de la protéine d'intérêt après digestion à l'aide de la peptidase, une deuxième chromatographie doit être réalisée; celle-ci peut être une colonne d'amylose, si le maltose a été éliminé par une chromatographie échangeuse d'anion, ou toute autre méthode de séparation permettant de récupérer la protéine d'intérêt pure et exempte de MBP (Figure 9).

A)



B)

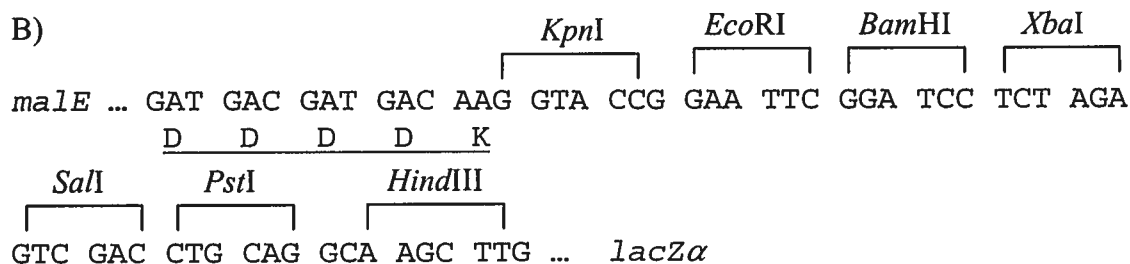


Figure 8: Carte génétique du vecteur pMal-c2E.

Légende :

A) Carte génétique

B) Séquence du site de multiclonage. Les acides aminés soulignés correspondent au site de reconnaissance de l'entérokinase

pTac : promoteur inductible à l'IPTG*LacI* : répresseur Lac d'*E. coli**malE* : gène de la protéine liant le maltose d'*E. coli**LacZα* : gène de la sous unité α de la β-galactosidase d'*E. coli**Amp^r* : gène de la β-lactamase provenant d'*E. coli* et conférant aux bactéries la résistance à l'ampicilline*Ori* : origine de réplication chez *E. coli*

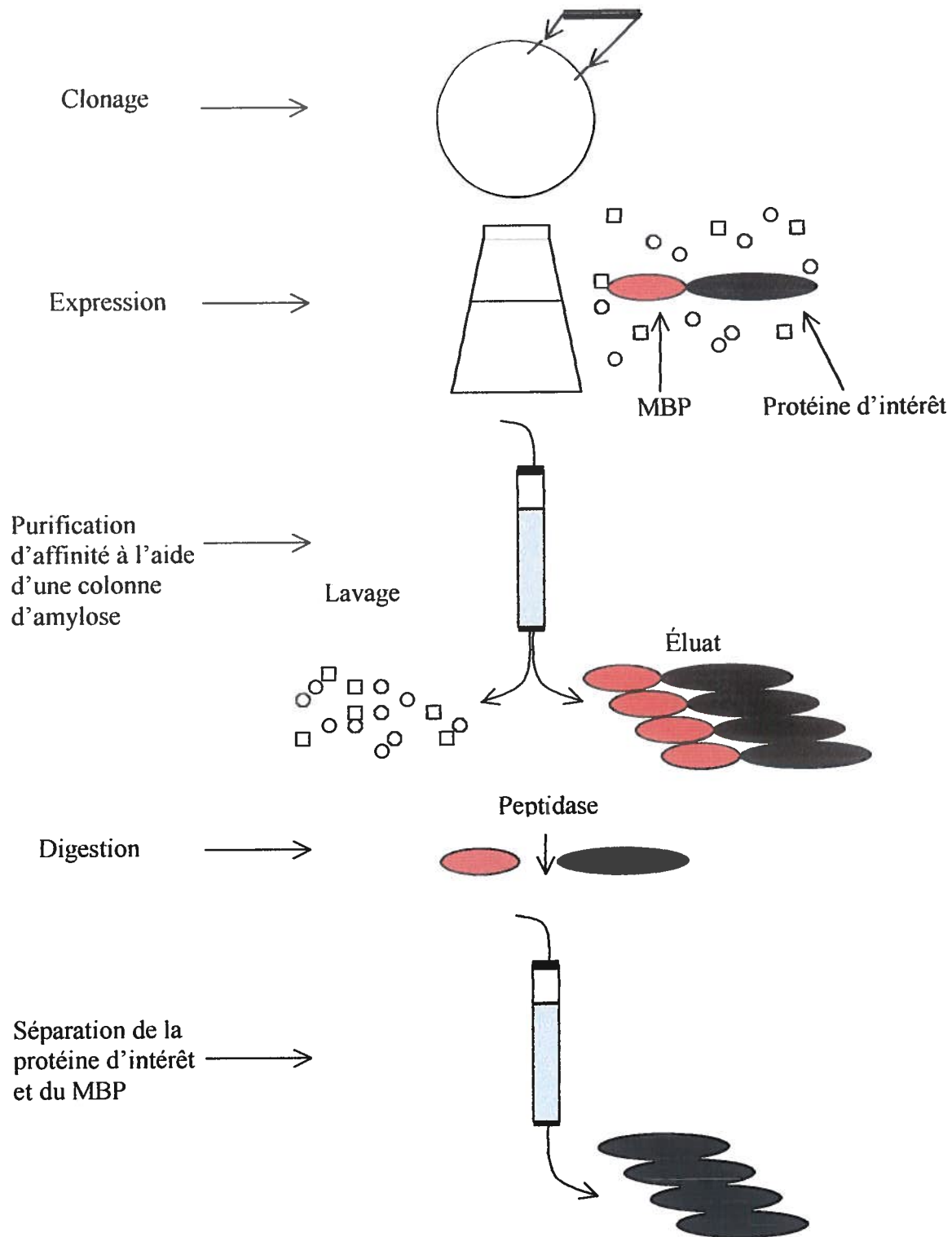


Figure 9: Principe de purification du système pMal™.

2.8 Analyse de protéines sans activité enzymatique

L'absence d'activité enzymatique associée à une protéine soulève des difficultés au cours de sa caractérisation. De plus, le degré de dénaturation de ce type de protéine n'est pas facile à évaluer de façon directe.

Deux techniques sont utilisées pour l'analyse de telles protéines. La plus récente est l'analyse par spectrométrie de masse, méthode qui s'est révélée des plus utiles. La liaison d'une protéine avec son ligand, en majorité des liens covalents, est détectée par une augmentation du poids moléculaire de la protéine (Gillet *et al.*, 1996). Cette méthode d'analyse des protéines a servi aussi à démontrer l'importance des ions métalliques comme le Mg^{2+} ou le Zn^{2+} chez certaines protéines (Briand *et al.*, 1997). La spectrométrie de masse a permis de confirmer la présence de sites de fixation sur la calmoduline, qui jusque-là n'était qu'hypothèse. De plus, à l'aide de cette technique de précision, il est possible de déterminer des constantes d'affinité et plus récemment des cinétiques de réaction (Lafitte *et al.*, 1995 et Lu *et al.*, 1999). Toutefois, cette méthode d'analyse nécessite des conditions bien précises qui doivent être établies et mises au point pour chacune des protéines étudiées.

La deuxième technique, qui a également fait ses preuves, est la fluorescence. Cette méthode est basée sur la fluorescence intrinsèque des protéines qui possèdent des résidus tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Ces trois acides aminés permettent la détection d'une protéine en fluorescence. Dans la majorité des cas, l'acide aminé tryptophane d'une protéine est le résidu le plus étudié, car sa fluorescence est importante en intensité et un changement de son micro-environnement peut être facilement détecté par une modification de son spectre d'émission. La littérature fait état de plusieurs cas d'étude d'interaction entre une protéine et un ligand. L'une d'entre elles a porté sur les critères spectraux de la protéine liant le maltose de *Thermotoga maritima* (Wassenberg *et al.*, 2000).

Les résidus tryptophane d'une protéine sont souvent présents dans l'interaction protéine-ligand, en particulier lorsque le ligand est un polymère de sucres tels la cellulose

et le xylane (Xu *et al.*, 1997 et Roberge *et al.*, 1999). La mutation de ces résidus et l'étude de la nouvelle protéine en fluorescence peuvent permettre de déterminer quels sont les résidus tryptophane qui participent à la liaison de la protéine avec le ligand (Mus-Veteau et Leblanc, 1996). La fluorescence intrinsèque des protéines a été utilisée par ailleurs pour étudier la dénaturation des protéines (Markovié-Housley *et al.*, 1994 et Xu *et al.*, 1997).

Lors de l'analyse de résultats d'expériences en fluorescence, le spectre d'émission d'une protéine peut varier de différentes manières. Ainsi, lorsque le sucre est lié par la protéine et que le microenvironnement des résidus tryptophane est affecté, la fluorescence est modifiée. L'effet de quenching est majoritairement rencontré. Ce phénomène est expliqué par une absorption plus importante de l'énergie de fluorescence par les molécules environnantes. Ainsi, après l'excitation des molécules, leur retour à leur état fondamental¹ (« ground state ») pourra être fait par l'émission de chaleur, de fluorescence, de phosphorescence, de radiation ou par transfert inter ou intra-moléculaire. Le lien peptidique, certains acides aminés comme les cystéines, le solvant ou certaines ions comme l'iode sont capables d'absorber cette énergie (Eftink, 1991 et Chen *et al.*, 1996). Lors de la liaison d'un ligand à une protéine, un changement conformationnel a souvent lieu, qui fait varier le microenvironnement des résidus émettant la fluorescence. Il y aura alors diminution ou augmentation de la fluorescence du complexe protéine-sucre comparativement à celle de la protéine seule (Chen et Barkley, 1998).

L'ajout d'un sucre à une protéine peut aussi avoir un effet sur la longueur d'onde maximale d'émission ($\lambda_{\max}$). Ce qui sera observé est un déplacement du maximum de la parabole vers des longueurs d'onde plus longues (« red shift ») ou plus courtes (« blue shift ») lors de l'ajout du sucre. L'explication de ce phénomène est plus compliquée et moins bien défini par les scientifiques que le phénomène de quenching de l'émission de la fluorescence. Les changements de $\lambda_{\max}$ sont associés aux variations de pH et de polarité des groupements chimiques à proximité de l'acide aminé fluorescent. Ces variations de

¹ Chimie quantique : état le plus stable représentant l'énergie minimale que peut posséder une molécule ou un atome.

pH et de polarité sont provoquées par l'absorption d'une partie de l'énergie d'excitation par les molécules avoisinant le résidu tryptophane excité (Weber, 1997).

2.9 Immobilisation de protéines

Depuis plusieurs années, l'immobilisation des protéines pures ayant diverses fonctions a été tentée sur une multitude de supports, autant d'origine naturelle (cellulose) que synthétique (Eudragit S-100, hydroxyapatite). La fonction des protéines immobilisées varie énormément. Ainsi, des phosphorylases (Eis *et al.*, 1997), des chaperonines (Teshima *et al.*, 2000), des héparinases (Shpigel *et al.*, 1999), des lipases (Pencrease *et al.* et Baratti, 1997), des pullulanases (Ohba *et al.*, 1978) et des xylanases (Gawande et Kamat, 1998) ont été immobilisées et leur activité a été comparée avec les enzymes libres, en solution. Toutefois, dans ces méthodes d'immobilisation de protéines, seules des enzymes pures peuvent être utilisées. Donc, de nouvelles méthodes sont en développement afin d'éviter l'étape de purification, lorsque l'immobilisation d'une protéine démontre un intérêt.

Depuis quelques années, un système d'expression et d'immobilisation de protéines à la paroi bactérienne a été développé chez *E. coli* avec succès (Francisco *et al.*, 1992, Francisco *et al.*, 1993a et Francisco *et al.*, 1993b). Ce système utilise les protéines Lpp et OmpA afin de diriger et ancrer la protéine d'intérêt à la membrane externe de la paroi. Pour réaliser cette construction, les neuf premiers acides aminés ainsi que le peptide signal de la lipoprotéine majoritaire d'*E. coli* (Lpp) sont nécessaires et suffisent pour la localisation de la protéine de fusion dans l'espace périplasmique (Ghrayeb et Inouye, 1984). La protéine OmpA a aussi été étudiée et ses différents domaines ont été analysés de manière à connaître ceux pouvant accueillir des modifications dans leur composition et leur longueur en acide aminé (Francisco *et al.*, 1992). Cette protéine est nécessaire afin d'ancrer la protéine de fusion à la membrane externe de la paroi d'*E. coli* qui comprend deux membranes lipidiques (Figure 4a).

En plus de tenter d'immobiliser la β -lactamase et un fragment d'anticorps, la cellulase et le domaine de fixation à la cellulose de *Cellulomonas fimi* ont aussi été ancrés à la paroi d'*E. coli* par le même système. Les auteurs rapportent que les protéines ainsi exprimées possèdent toutes leurs activités et leurs fonctions (Francisco *et al.*, 1993b).

Par la suite, Freeman et ses collaborateurs ont exploité ce système de protéines de fusion à trois domaines afin d'immobiliser les bactéries exprimant la β -lactamase à leur paroi (1999). Les mêmes auteurs ont utilisé, avec succès, des inhibiteurs faibles et réversibles afin de diminuer l'effet négatif du glutaraldéhyde sur l'activité de l'enzyme (Freeman *et al.*, 1999). Ces auteurs sont optimistes de voir cette nouvelle technique être utilisée afin d'ancrer à la paroi d'*E. coli* une panoplie de protéines et ainsi immobiliser ces dernières sur un support solide.

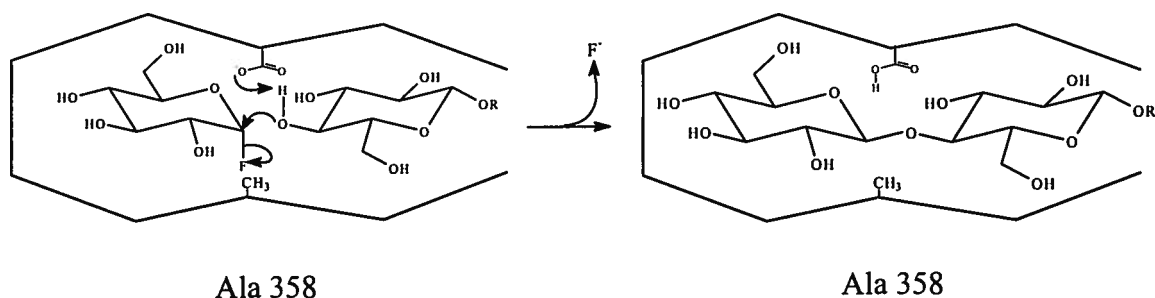
En voulant utiliser la même orientation que les derniers travaux mentionnés, le peptide signal des lipoprotéines des bactéries Gram-positives pourrait aussi être employé afin d'ancrer à la membrane différentes protéines. Les bactéries Gram-positives ne possèdent pas de membrane externe donc une protéine du même type qu'OmpA n'est probablement pas nécessaire dans ce cas-ci. En théorie, seul le peptide signal de la lipoprotéine et une courte séquence comprenant le résidu cystéine impliqué dans le lien thioéther devraient être nécessaires à la localisation à la membrane de la protéine et à son ancrage vers l'extérieur de la bactérie. Cette dernière affirmation est possible, car chez *E. coli* seuls les neuf premiers acides aminés sont nécessaires à la bonne localisation de la lipoprotéine Lpp (Inukai *et al.*, 1983 et Ghayeb et Inouye, 1984).

2.10 Application de l'immobilisation de protéines à la membrane de bactéries Gram-positives

Les études faites avec les bactéries Gram-négatives sur l'ancrage de protéines à la membrane permettent d'envisager d'appliquer cette méthode aux bactéries Gram-positives tel *S. lividans*. L'immobilisation de protéines peut avoir différentes conséquences sur les protocoles expérimentaux utilisés. Ainsi, certaines étapes de purifications protéiques ou d'ultrafiltration pourraient être éliminées si les protéines utilisées étaient ancrées à la membrane d'une bactérie métaboliquement inactive.

Un exemple de modification de protocole pouvant être associé à l'ancrage de protéine à la membrane bactérienne est illustré ici avec les travaux réalisés par Mackenzie et collaborateurs (1998). Ils ont démontré que la synthèse d'oligosaccharides pouvait être réalisée à l'aide d'une glycosidase spécifiquement mutée (glycosynthase). Cette enzyme capable de former des liens glycosidiques sans être en mesure de les hydrolyser amène ces chercheurs à tenter de synthétiser des oligosaccharides. Cette enzyme soluble est mise en présence d'un sucre donneur α -glycosyl activé à l'aide d'un groupe partant comme le fluore et d'un sucre accepteur possédant un excellent groupement sortant (Figure 10). Ces auteurs ont utilisé l' α -galactosyl fluoré comme sucre activé et une série de 15 sucres accepteurs. Après la réaction de synthèse, la procédure a fait appel à l'ultrafiltration et la lyophilisation afin d'éliminer l'enzyme et le tampon volatil pour être en mesure de purifier, par HPLC, les différents produits de synthèse.

Dans le dernier protocole expérimental, l'étape d'ultrafiltration utilisée pour éliminer l'enzyme n'est pas très compatible avec la production à grande échelle. L'utilisation d'une enzyme glycosynthase ancrée à une membrane aurait pu modifier le protocole présenté afin qu'il utilise une simple centrifugation pour éliminer les protéines du milieu réactionnel. Cette méthode aurait alors pu être directement appliquée à l'échelle industrielle. Dans le cas particulier de la synthèse d'oligosaccharide, il faut s'assurer que les bactéries sont bien métaboliquement inactives afin que les produits synthétisés ne soient pas dégradés ou utilisés par celles-ci.



Adaptation de Mackenzie *et al.*, 1998.

Figure 10: Réaction enzymatique de glycosynthèse.

3 Approche expérimentale

3.1 Liste des produits chimiques et des troussees commerciales utilisées

3.1.1 Produits chimiques

p-hydroxybenzoïc acid hydrazide, PAHBAH (Sigma)
 β-mercaptoéthanol (Biorad)
 Acétate de potassium (Sigma)
 Acétate de sodium (Sigma)
 Acétonitrile (EM Science)
 Acide 3- (N- morpholino) propane-sulphonique, MOPS (BDH)
 Acide acétique (BDH)
 Acide borique (BDH)
 Acide d'éthylènediaminetétra acétique, EDTA (Fisher)
 Acide trifluoroacétique, TFA (Fisher)
 Acrylamide (ICN)
 Adénosine 5'triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech)
 Agarose (Biorad)
 Ampicilline (Roche Diagnostic)
 Anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline (Roche Diagnostic)
 Anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la POD (Biorad)
 Azoture de sodium (Fisher)
 Bacto-agar (Difco)
 Bacto-tryptone (Difco)
 Bleu de bromophénol (Biorad)
 Bleu de Coomassie (Bio Rad)
 Borate de sodium (Fisher)
 Bromure d'éthidium (Biorad)
 Carbonate d'ammonium (MCIB)
 Carbonate de sodium (BDH)
 Casamino acid (Difco)
 Cellobiose (Sigma)
 Chloroforme (Aldrich)
 Chlorure de calcium (BDH)
 Chlorure de cobalt (J.T. Baker chemical)
 Chlorure de cuivre (Fisher)
 Chlorure de fer (Fisher)
 Chlorure de magnésium (BDH)
 Chlorure de manganèse (J.T. Baker chemical)
 Chlorure de potassium (Fisher)
 Chlorure de sodium (BDH)
 Chlorure de zinc (Fisher)
 Colonne Hi Trap Q (Amersham Pharmacia Biotech)

Cyanol de xylène (Biorad)
 Déoxyadénine-5'triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech)
 Déoxycytosine-5'triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech)
 Déoxyguanine-5'triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech)
 Déoxythymine-5'triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech)
 Dithiothréitol, DTT (Biorad)
 DNA T₄ ligase (Amersham Pharmacia Biotech)
 DNA *Taq* polymérase (Amersham Pharmacia Biotech)
 Échelle de longueur : 1Kb plus DNA ladder (Gibco BRL)
 Endonucléases de restriction (Amersham Pharmacia Biotech)
 Entérokinase (New England Biolabs et Novagen)
 Extrait de levure (Difco)
 Extrait de viande (Difco)
 Ficoll de type 400 (Amersham Pharmacia Biotech)
 Formaldéhyde (Fisher)
 Galactose (Difco)
 Gélatine (Bio Rad)
 Glucose (Sigma)
 Glycérol (ICN)
 Glycine (Biorad)
 Hydroxide de sodium (BDH)
 Hydroxyquinoline (Sigma)
 Iodoacétamide (Sigma)
 Isopropanol (J.T. Baker chemical)
 Isopropyl-β- D- thiogalactopyranoside, IPTG (Roche Diagnostic)
 Lactose (Anachemia)
 Lait écrémé (Difco)
 L-proline (Gibco BRL)
 Lysozyme (Amersham Pharmacia Biotech)
 Maltose (Difco)
 Marqueur de poids moléculaire: Full range rainbow (Amersham Pharmacia Biotech)
 Marqueur de poids moléculaire: SDS-PAGE molecular weight standards, Broad Range (Biorad)
 Melibiose (Difco)
 Membrane de nylon (Roche Diagnostic)
 Méthanol (Alcool de commerce du Québec)
 Méthionine (Sigma)
 Molybdate d'ammonium (Fisher)
 N, N, N',N',-tétra méthyléthylènediamine (Bio-Rad)
 N,N'-méthylène-bis-acrylamide (Bio-Rad)
 N.Z. Amine (Sheffield)
 Nitrate d'argent (Aldrich)

Nitro blue tetrazolium chloride et sel de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate toluidine:
 NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostic)
 PEG 1000 (Roche Diagnostic)
 Phénol Analar (BDH)
 Phosphate de potassium basique (BDH)
 Phosphate de potassium dibasique (BDH)
 Propionamide (Aldrich Chemical Company inc.)
 RBB : Rémozol Brillant Blue (Aldrich)
 Réactif de Folin (BDH)
 Résine d'amylose (New England Biolabs)
 Sodium dodécyl sulphate, SDS (BDH)
 Sucrose (BDH)
 Sulfate d'ammonium (Fisher)
 Sulfate de cuivre (J.T. Baker)
 Sulfate de fer (J.T. Baker)
 Sulfate de magnésium (J.T. Baker)
 Sulfate de manganèse (J.T. Baker)
 Sulfate de potassium (Anachemia)
 Sulfate de zinc (J.T. Baker)
 Tampon 10X pour *Taq* polymérase (Amersham Pharmacia Biotech)
 Tampon One-Phor-All 10X (Amersham Pharmacia Biotech)
 Tampon TES (Sigma)
 Tartrate de potassium et sodium (BDH)
 Thiostrepton (Squibb Canada Ltée)
 Tris-HCl (Roche Diagnostic)
 Trypsine (Promega)
 Tryptic soy broth w/o dextrose (Difco)
 Tween 20 (Bio-Rad)
 Tween 80 (Aldrich Chemical Company inc.)
 Tyrosine (Gibco BRL)
 Xylane de bouleau (Sigma)
 Xylobiose
 Xylopentaose
 Xylose (Sigma)
 Xylotétraose
 Xylotriose
 Zip Tip C₁₈ (Millipore)

3.1.2 Trousses commerciales

GFXTM PCR DNA and Gel band purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)

Lumi-Light^{Plus} Western Blotting substrate (Roche Diagnostic)

pMalTM (New England Biolabs)

3.2 Souches et vecteurs

Les souches et vecteurs utilisés lors de ce travail sont décrits au tableau suivant :

Tableau I

Souches	Génotype	Origine
<i>Escherichia coli</i> DH11S	<i>F'</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>recA1398</i>) <i>deoR supE rpsL srl thi/F'</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15	Gibco BRL
<i>Escherichia coli</i> DM1	<i>F</i> <i>dam</i> ⁻¹³ : :Tn9(Cm ^r) <i>dcm</i> ⁻ <i>mcrB hsdR</i> ^M ⁺ <i>gal1 gal2 ara</i> ⁻ <i>lac</i> ⁻ <i>thr</i> ⁻ <i>leu</i> ⁻ <i>ton</i> ^R <i>tsx</i> ^R <i>su</i> ^o λ ⁻	Gibco BRL
<i>Streptomyces lividans</i> 10-164	<i>msiK</i> ⁻	Hurtubise <i>et al.</i> , 1995
<i>Streptomyces lividans</i> C109MCS	Plasmide pC109MCS sans insert dans la souche <i>Streptomyces lividans</i> 10-164	Ce laboratoire
Plasmides	Caractéristiques	Origine
Cosmide 1H10	Cosmide supercos-1 ayant un insert de 33279 pb au site <i>Bam</i> HI provenant du chromosome de <i>S. coelicolor</i> M145 digéré par <i>Sau</i> 3AI	Redenbach <i>et al.</i> , 1996
pSL1180	Phagemide de 3421 pb, ori M13, une cassette de multiclonaage de 64 sites et <i>amp</i> ^r	Amersham Pharmacia Biotech
pIAF18	Fragment d'ADN chromosomique provenant de <i>S. lividans</i> de 5,7 kb cloné dans le vecteur pIJ702 au site de restriction <i>Bgl</i> II et codant pour la xylanase A.	Mondou <i>et al.</i> , 1986

pMal-c2E	Plasmide de 6646 pb, <i>amp^r</i> , <i>lacI^q</i> , ori M13, promoteur P _{tac} , peptide signal modifié du gène <i>malE</i> , la séquence codant pour le site de reconnaissance de l'entérokinase.	New England Biolabs
<i>bxlE</i> /pSL1180	Le gène <i>bxlE</i> de <i>S. lividans</i> inséré entre les sites <i>KpnI</i> et <i>EcoRI</i> dans le phagmide pSL1180	Ce travail
pIAF-102E	Vecteur pMal-c2E ayant le gène <i>bxlE</i> de <i>S. lividans</i> inséré entre les sites <i>KpnI</i> et <i>EcoRI</i> de la cassette de multiclonage.	Ce travail
pC109MCS	Plasmide de 5296 pb, <i>tsr^r</i> , pC109, réplication possible uniquement chez <i>S. lividans</i> .	Ce laboratoire
pIAF-EA	Le gène <i>fusionEA</i> cloné entre les sites <i>SphI</i> et <i>SacI</i> du plasmide C109MCS	Ce travail

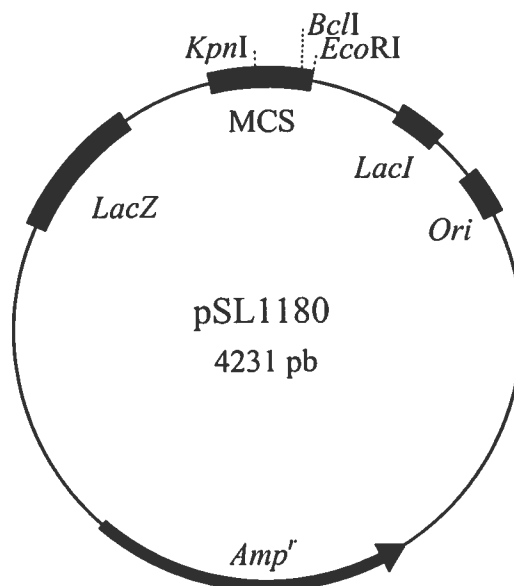


Figure 11: Représentation partielle de la carte génétique du phagemide pSL1180.

Légende :

MCS : site de clonage multiple

LacI : répresseur LacI

Ori : origine de réplication chez *E. coli*

Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline

LacZ : gène de la β -galactosidase

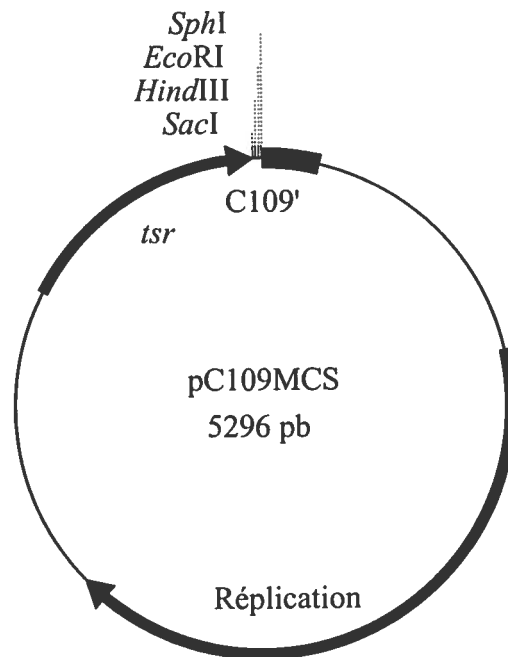


Figure 12: Carte génétique du plasmide pC109MCS.

Légende :

tsr : gène de résistance au thiostrepton

C109 : promoteur non réprimé par le glucose

Réplication : région essentielle pour la réplication chez les streptomycètes

3.3 Milieux et conditions de culture

3.3.1 *Escherichia coli*

Le milieu 2XTY et le milieu R + glucose ont été utilisés pour la croissance des différentes souches d'*E. coli*. Le milieu 2XTY est constitué de 16 g/L de Bacto-tryptone, 10 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de chlorure de sodium. Il est possible d'y ajouter 15 g/L de Bacto-agar pour obtenir des milieux solides.

Le milieu R + glucose a été utilisé lors de la production de protéines de fusion afin de réprimer l'expression de la copie chromosomique du gène *malE* (New England Biolabs). Ce milieu est constitué de 10 g/L de Bacto-tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de chlorure de sodium et 2 g/L de glucose.

Après la stérilisation des milieux à 121 °C pendant 20 min, de l'ampicilline a été ajoutée à une concentration finale de 100 µg/ml afin d'obtenir un milieu sélectif pour les bactéries exprimant la β-lactamase. Une concentration identique a été utilisée pour les plats de Pétri.

Les conditions optimales de croissance pour les cellules d'*E. coli* sont une température de 37 °C et une aération (agitation à 250 rpm).

3.3.2 *Streptomyces lividans*

La croissance des Streptomycètes a été réalisée à 34 °C en conditions aérobies. Le thiostrepton a été utilisé afin de sélectionner les bactéries possédant un plasmide, car les Streptomycètes sont sensibles à cet antibiotique. Il a été utilisé à une concentration de 5 µg/ml dans les milieux liquides et de 50 µg/ml dans les milieux solides.

3.3.2.1 Milieux liquides

Le milieu TSB (Tryptic soy broth w/o dextrose) a été utilisé pour la culture des différentes souches de *S. lividans*. Pour reconstituer ce milieu, 27,5 g/L de TSB ont été dissous dans de l'eau déionisée. Le tout a été stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes.

Le milieu minimal M14 (1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de KH_2PO_4 , 1 ml/L de sel de Mandel², 2 ml/L de Tween 80 et pH 7,4) a été utilisé pour la production de protéines. Une fois le milieu stérilisé, 6 ml/L de MgSO_4 5 % p/v, 10 ml/L de CaCl_2 3 % p/v et 1 % d'une source de carbone ont été ajoutés stérilement.

Lors de la préparation des protoplastes, le milieu R5 liquide a été utilisé. Ce milieu contient : 103 g/L de sucrose, 0,25 g/L de K_2SO_4 , 10,12 g/L de MgCl_2 , 10 g/L de glucose, 0,1 g/L de Casamino acid, 2 ml/L d'éléments traces³, 5 g/L d'extrait de levure, 5,73 g/L de tampon TES. Après la stérilisation, 10 ml/L d'une solution de KH_2PO_4 0,5 %, 4 ml/L d'une solution de CaCl_2 5 M, 1 ml/L d'une solution de CuSO_4 5 mg/L, 15 ml/L d'une solution de L-proline 20 %, 10 ml/L d'une solution de méthionine 1 % et 14 ml/L d'une solution de NaOH 1 N ont été ajoutés de façon stérile.

3.3.2.2 Milieux solides

Le milieu R5 a été utilisé pour la régénération des protoplastes. Sa composition est identique à celle du milieu liquide R5 pour la préparation des protoplastes, à l'exception des 14 ml/L de NaOH 1 N qui ont été remplacés par 0,4 g/L de tyrosine dissous dans une solution de NaOH 1 N. Afin d'obtenir des milieux solides, 22 g/L d'agar ont été ajoutés. Après avoir coulé les plats de Pétri, ils ont été incubés à 25 °C pendant 5 jours afin d'obtenir une perte d'environ 15 % de leur poids.

La conservation des souches de Streptomycètes a été réalisée sur le milieu de Bennett (1 g/L d'extrait de levure, 1 g/L d'extrait de viande, 2 g/L de N.Z. amine, 10 g/L de maltose, 20 g/L de Bacto-agar et pH 7,2). Après stérilisation, le thiostrepton dissous dans du DMSO a été ajouté de manière à obtenir une concentration finale de 50 µg/ml.

Le milieu Stewart a été utilisé afin de révéler l'activité hydrolytique des transformants. Ce milieu contient 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4 g/L de KH_2PO_4 , 5 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L d'extrait de levure, 0,5 g/L de KCl, 1 ml/L de sels de Mandel, pH 7,2 et

² Sels de Mandel : 140 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 160 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ par 100 ml.

³ Éléments traces : 10 mg de ZnCl_2 , 200 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, et 10 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ par litre d'eau (Hopwood *et al.*, 1985).

20 g/L d'agar. Avant de couler les plats de Pétri, 10 ml/L d'une solution de $MgSO_4$ 5 %, 50 $\mu g/ml$ de thiostrepton et 0,4 % de RBB-xylane ont été ajoutés stérilement. Les plats de Pétri contenant du RBB-xylane (xylane ayant été couplé au bleu brillant de Rémazol) permettent de visualiser l'activité xylanolytique, puisqu'une zone claire est visible autour des colonies capables d'hydrolyser le xylane.

3.4 Amplification élective *in vitro* (PCR)

3.4.1 Oligonucléotides

Les amorces permettant les différentes amplifications électives *in vitro* ont été synthétisées à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (Gene Assembler, Amersham Pharmacia Biotech). Les séquences des amorces utilisées sont énumérées au tableau suivant :

Tableau II Oligonucléotides utilisés pour les amplifications électives *in vitro*.

NOM	SÉQUENCE
BxlEKpnI5'	5' CAC GGT ACC GAT GAA GAC ACG TGC GCG CTT 3'
BxlEBcII5'	5' AG CTC GCT GAT CAT GTC CAG G 3'
BxlBcII3'	5' C CTG GAC ATG ATC AGC GAG CT 3'
BxlEEcoRI3'	5' AAA GAA TTC TCA CTC GGT CGG GAG GGC CT 3'
BxlD5'	5' GGC GGC ATG CGC ACA CGT GCG CGC TTG CCC AGA 3'
FusA2	5' CCC GAG CGT GCT CTC GGC CTT GCC GTC GTC CGA CGA 3'
FusB2	5' GGG CTC GCA CGA GAG CCG GAA CGG CAG CAG GCT GCT 3'
BxlD3'	5' ATA TAG AGC TCT CAG CCG TTG AGT GC 3'

3.4.2 PCR

L'amplification élective *in vitro* est une technique qui permet d'amplifier une région d'ADN. Deux amorces bordant la région génétique d'intérêt sont utilisées pour l'amplification. La matrice d'ADN double brin est dénaturée et les deux amorces s'y hybrident de façon spécifique. Par la suite, il y a polymérisation du brin complémentaire à partir de l'amorce. Ce cycle est répété 30 fois afin d'obtenir une quantité suffisante du fragment d'ADN pour son clonage.

Pour faire la réaction d'amplification, un microtube de 250 µl à paroi mince permettant un meilleur échange de chaleur entre l'élément chauffant de l'appareil et le milieu réactionnel a été utilisé. Dans le microtube pour PCR, 58 µl d'eau stérile, 10 µl de tampon 10X pour *Taq* polymérase, 2 µl de chacun des différents nucléotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) à une concentration de 10 mM chacun, 8 µl de propionamide 50 % p/v, 1 µl de Tween 20 5 %, 3 µl de MgSO₄ 100 mM et 1 µl de la matrice (environ 1 ng) ont été ajoutés dans l'ordre. Afin de compléter le volume à 100 µl, 5 µl de chacune des deux amorces diluées à 10 pmole/µl et 2,5 U de *Taq* polymérase ont été ajoutés juste avant le début de l'amplification. Une fois la réaction de PCR terminée, 10 µl du milieu réactionnel a été migré en gel d'agarose de façon à visualiser le résultat de l'amplification (section 3.5.2).

3.5 Manipulation et analyse de l'ADN

3.5.1 Digestion enzymatique

La digestion enzymatique a été réalisée dans un volume final de 20 µl. Le tampon One-Phor-All (Amersham Pharmacia Biotech) a été utilisé afin d'obtenir une activité maximale des enzymes de restriction. Ces dernières nécessitent une concentration de 1X ou de 2X de tampon One-Phor-All, celui-ci étant fourni à une concentration de 10X. Le volume d'ADN digéré est de 5 µl, soit environ 0,5 µg d'ADN. La digestion est réalisée à 37 °C pendant 2 h.

3.5.2 Migration en gel d'agarose

Afin d'analyser les différentes préparations d'ADN (produits d'amplification, de digestion, extraction de plasmides), une migration en gel d'agarose a été réalisée. Un gel ayant une concentration de 0,7 % en agarose a été préparé dans du tampon TBE (10,8 g/L de Tris-HCl, 5,5 g/L d'acide borique et 2 mM d'EDTA). L'agarose a été dissous et refroidi à environ 45 °C, puis 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium a été ajouté au gel pour la visualisation de l'ADN. Une fois coulé, le gel a été laissé à la température de la pièce jusqu'à ce que l'agarose soit complètement solidifié. Le gel a été placé dans une cuve à électrophorèse Bio-Rad (DNA SUB CELL™) contenant suffisamment de tampon TBE pour recouvrir le gel de 3 mm.

À chacun des échantillons d'un volume de 20 µl, 3 µl du tampon de chargement 6X (0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % cyanol xylene et 15 % de Ficoll 400 dilué dans l'eau) ont été ajoutés. Après le chargement des échantillons et de l'échelle de longueur 1 Kb Plus DNA Ladder, la migration a été réalisée à 30 volts pendant 16 h ou à 100 volts pendant 3 h. À la suite de la migration, il a été possible de visualiser l'ADN sous les ultraviolets à l'aide du Gel Doc 1000 de Bio-Rad.

3.5.3 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

La trousse GFX™ PCR DNA d'Amersham Pharmacia Biotech a été utilisée afin d'extraire l'ADN du gel d'agarose. Après avoir découpé et récupéré la bande d'agarose dans un microtube, 250 µL de la solution de capture ont été ajoutés. Le tout a été mélangé et incubé à 60 °C jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous. Ensuite, le contenu du microtube a été transféré sur la mini-colonne GFX™, incubé pendant 1 min à la température de la pièce et centrifugé à 13 800 g pendant 30 sec. Le filtrat a été éliminé et la colonne a été lavée à l'aide de 500 µL de tampon de lavage (10 mM Tris-HCl à pH 8, 1 mM EDTA et 80 % éthanol). Cette dernière étape a éliminé les sels et l'ADN a été élué de la colonne à l'aide de 50 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM d'EDTA et pH 8,0).

3.5.4 Ligation

La ligation entre deux fragments d'ADN se fait dans un volume final de 20 μ l. Pour réaliser cette manipulation, 5 μ l de vecteur (200 ng), 5 μ l d'insert (200 ng), 2 μ l d'ATP à une concentration de 10 mM, 2 μ l de tampon One-Phor-All, 7 μ l d'eau et 1 U de DNA T₄ ligase ont été mélangés. Les tubes ont ensuite été incubés à la température de la pièce pendant 16 h.

3.6 Transformation de bactéries

3.6.1 *Escherichia coli*

3.6.1.1 Cellules compétentes

Le protocole d'Amersham Pharmacia Biotech a été utilisé afin de préparer des cellules compétentes des souches d'*E. coli* DH11S et DM1.

La première étape consiste à inoculer 5 ml de milieu 2XTY à l'aide d'une colonie de la souche à transformer, puis de laisser croître à 37 °C avec une agitation de 250 rpm. Après 16 h d'incubation, 100 ml de milieu frais ont été inoculés à l'aide de 1 ml de la suspension bactérienne et incubés à 37 °C avec une agitation de 250 rpm.

Lorsque la densité optique à 600 nm de la suspension bactérienne a atteint environ 0,5, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 756 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans 33 ml de tampon CMI (100 mM KCl, 30 mM CH₃COOK, 60 mM de CaCl₂, 15 % de glycérol et pH 5,8).

Après une incubation de 1 h sur glace, les cellules ont été récupérées à nouveau, mais cette fois à 1100 g pendant 15 min à 4 °C, puis resuspendues dans 4 ml de tampon CMII (10 mM de MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glycérol et pH 6,8). À la suite d'une incubation de 15 min sur glace, les cellules sont prêtes à être utilisées dans le protocole de transformation (section 3.6.1.2) ou à être réparties à raison de 300 μ L par microtube stérile, congelées rapidement dans un mélange de méthanol/glace sèche et conservées à -80 °C.

3.6.1.2 Transformation d'*Escherichia coli*

Dans un tube stérile, 300 µl de cellules compétentes dégelées sur glace ont été ajoutées à 5 µl d'ADN et maintenues sur glace pendant 40 min. Les cellules ont ensuite été placées à 42 °C pour une durée de 2 min. Après ce choc thermique, 1 ml de milieu 2XTY a été ajouté. Une incubation de 45 min à 37 °C a été réalisée afin de permettre l'expression phénotypique, puis 100 µl ont été étalés sur une gélose 2XTY contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les plats de Pétri ont été incubés à 37 °C pendant 16 h.

3.6.2 *Streptomyces lividans*

3.6.2.1 Préparation des protoplastes

Les protoplastes sont préparés selon une adaptation de la technique d'Hopwood et ses collaborateurs (Hopwood *et al.*, 1985).

La souche devant servir à la préparation des protoplastes a été mise en culture dans le milieu nutritif TSB. Après 24 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 250 rpm, 100 ml de milieu R5 liquide contenant 0,5 % de glycine ont été inoculés à l'aide de 8 % de la pré-culture en TSB. Après 24 à 30 h de croissance, le mycélium a été récupéré à 9 800 g pendant 15 min. Le culot de mycélium a été lavé deux fois à l'aide de 10,3 % de sucrose. À la suite de la dernière centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans du tampon P contenant 1 mg/ml de lysozyme et incubées à 37 °C. Le tampon P est constitué de 103 g/L de sucrose, 0,25 g/L de K₂SO₄, 2,02 g/L de MgCl₂·6H₂O, 2 ml/L d'élément de traces (section 3.3.2.2.). Par la suite, 1 ml de KH₂PO₄ 5 g/L, 10 ml de CaCl₂·2H₂O 36,8 g/L et 10 ml de tampon TES 5,73 % à pH 7,2 ont été ajoutés stérilement à 80 ml de tampon P (Hopwood *et al.*, 2000, p. 415). La digestion au lysozyme de la paroi bactérienne a été arrêtée lorsque 95 % des cellules sont devenues des protoplastes. Par la suite, les protoplastes ont été filtrés sur de la laine de verre stérile de façon à éliminer les cellules possédant encore leur paroi. Les protoplastes ont été centrifugés à 3 000 g pendant 7 min. Le culot a été resuspendu dans le volume résiduel et 40 ml de tampon P ont été ajoutés. Les protoplastes ont été lavés deux fois dans le tampon P. Après le deuxième lavage, la densité optique a été prise de manière à connaître

la concentration de protoplastes. La suspension de protoplastes a été aliquotée à raison de 200 µl par microtubes stériles et congelée à -80°C .

3.6.2.2 Transformation de *Streptomyces lividans*

Dans un microtube stérile, 50 µl de protoplastes ont été ajoutés à 5 µl d'ADN. Puis 250 µl de PEG 1000 25 % ont été ajoutés. Après environ 90 sec, des volumes différents (50, 75 et 125 µl) ont été étalés sur le milieu R5 solide (section 3.3.2.2). Les plats de Pétri ont été incubés à 34°C pendant 16 h. Ensuite, chacun des plats de Pétri a été recouvert de 1 ml d'eau stérile contenant 50 µg de thiostrepton et réincubés à 34°C pendant 48 h.

3.7 Isolement de plasmide

3.7.1 Isolement de plasmide chez *Escherichia coli*

L'extraction de plasmide a été réalisée afin d'analyser les clones ayant poussé sur le milieu sélectif. Chaque clone d'intérêt a été mis en culture liquide pendant 16 h afin de pouvoir réaliser l'isolement du plasmide selon la méthode de la lyse alcaline. Après la croissance, les cellules d'une culture bactérienne de 1,5 ml ont été récupérées dans un microtube par centrifugation à 13 800 g pendant 1 min et resuspendues dans 200 µl de la solution 1 (50 mM de glucose, 25 mM de Tris-HCl à pH 8,0 et 10 mM d'EDTA). Par la suite, un volume identique de solution 2 (1 % SDS et 0,2 N NaOH) a été ajouté, puis les microtubes ont été mélangés doucement par inversion afin de lyser les bactéries. À ce lysat, 200 µl de solution 3 (3 M potassium et 5 M acétate) ont été ajoutés et mélangés doucement par inversion afin de précipiter les protéines. Après une centrifugation de 5 min à 13 800 g, tout le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube. L'ADN a été précipité à l'aide de 420 µl d'isopropanol pendant 10 min et récupéré par centrifugation à 13 800 g pendant 10 min. Le culot d'ADN a été dissous dans 50 µl de TE stérile (10 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM d'EDTA).

3.7.2 Isolement de plasmide chez *Streptomyces lividans*

L'extraction plasmidique chez *S. lividans* a été réalisée à partir de 500 µl de mycélium provenant d'une culture liquide. Ce dernier a été lavé avec 500 µl de tampon I (10,3 % de sucrose, 25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA et pH 8,0). Ensuite, le mycélium a été traité à l'aide de 400 µl de tampon I contenant 2 mg/ml de lysozyme pendant 30 min à 37 °C. Après cette incubation, 250 µl de solution II (0,3 M NaOH et 2 % SDS) ont été ajoutés et l'incubation s'est poursuivie à 70 °C pendant 15 min dans un bain chauffant. Par la suite, le bain a été éteint et les tubes ont été laissés jusqu'à ce que la température atteigne 25 °C. Une fois les tubes refroidis, 80 µl de phénol acide (5 g de phénol Analar, 5 ml de chloroforme, 1 ml d'eau et 5 mg d'hydroxyquinoline) ont été ajoutés. Les tubes ont été vortexés 10 sec et centrifugés pendant 3 min. Le surnageant a été transféré dans un microtube propre et l'ADN a été précipité à l'aide de 70 µl d'acétate de sodium 3 M et 700 µl d'isopropanol. Après la centrifugation, le culot a été dissous dans 50 µl de TE et 5 µl d'acétate de sodium 3 M, et ensuite 25 µl de phénol neutre (500 g de phénol, 120 ml d'eau, 7 ml de Tris-HCl 1 M à pH 8 et 15 ml de NaOH 1 N, Hopwood *et al.*, 2000, p. 164) ont été ajoutés. La phase aqueuse a été récupérée et l'ADN a été précipité à l'aide de 50 µl d'isopropanol. Ensuite, le culot a été dissous dans 50 µl d'eau stérile.

3.8 Purification de protéines

3.8.1 Détermination de la température optimale d'induction

Avant d'induire les cellules à l'IPTG, une pré-culture de 4 ml a été réalisée dans le milieu R + glucose contenant 100 µg/ml d'ampicilline. La croissance a été réalisée à 37 °C et avec une agitation de 250 rpm. Après 16 h d'incubation, une dilution de 1/100 dans un volume final de 25 ml a été faite avec du milieu frais. L'incubation a été poursuivie à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,5. Lorsque plusieurs températures ont dû être testées, plusieurs Erlenmeyers ont été ensemencés. L'IPTG a ensuite été ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 0,3 mM, puis les différents Erlenmeyers ont été placés à différentes températures.

Avant l'induction, une aliquote de 1 ml de culture a été prise comme contrôle de cellules non-induites. Les cellules ont été centrifugées pendant 1 min à 13 800 g. Le surnageant a été éliminé et le culot de cellules congelé. Après avoir ajouté l'inducteur, les cultures ont été placées à différentes températures (25, 30 ou 37 °C) et des aliquotes ont été prises après 1, 2, 3 et 4 h d'induction.

Les différents culots de cellules ont été resuspendus dans du tampon de chargement pour SDS-PAGE (62,5 mM Tris-HCl à pH 6,8, 10 % de glycérol, 2 % de SDS, 5 % de β -mercaptoéthanol et 0,0075 % p/v de bleu de bromophénol).

3.8.2 Purification par chromatographie d'affinité

À la suite des résultats obtenus lors des essais préliminaires, 2,5 L de milieu de culture ont été utilisés afin d'induire une plus grande quantité de bactéries. Après la production des protéines, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4 400 g pendant 20 min. Les culots ont été combinés et resuspendus dans 25 ml de tampon C (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM NaN₃ et pH 7,4). Ensuite, la suspension bactérienne a été congelée rapidement à l'aide d'un mélange méthanol/glace sèche. Les cellules ont été maintenues à une température de -20 °C pendant 16 h. La suspension bactérienne a été décongelée dans de l'eau froide et les cellules ont été brisées à l'aide d'ultrasons (3 X 1 min). L'échantillon a été centrifugé à 8 700 g pendant 30 min et le surnageant de cette centrifugation a été considéré comme étant l'extrait brut. Ce dernier a été dilué cinq fois avec du tampon C et filtré sur une membrane ayant une porosité de 0,8 μ m. L'échantillon a alors été déposé sur une colonne d'amylose équilibrée avec du tampon C ayant un diamètre de 1 cm et 15 cm de long. La pompe a été réglée de manière à obtenir un débit de 1 ml/min.

À la suite du dépôt complet de l'échantillon, la colonne a été lavée à l'aide de 12 volumes de colonne de tampon C. Les protéines ayant été retenues par la colonne ont été éluées à l'aide du tampon C contenant 10 mM de maltose. Des fractions de 3 ml ont été récoltées et la protéine d'intérêt a été éluee dans les 10 premières fractions.

3.8.3 Purification par chromatographie échangeuse d'anion

La colonne HiTrap Q de 1 ml d'Amersham Pharmacia Biotech a été utilisée lors de la chromatographie échangeuse d'anion. Cette colonne permet d'éliminer le maltose contenu dans le tampon provenant de l'élution des protéines de la colonne d'amylose ainsi qu'une deuxième étape de purification.

Afin d'équilibrer la colonne, celle-ci a été lavée avec 5 ml de tampon LIS (20 mM Tris-HCl et 25 mM NaCl à pH 8.0). Avant de charger les protéines sur la colonne, elles ont été diluées dix fois avec du tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8,0 afin de diminuer la concentration en NaCl à 20 mM et ajuster le pH. Une fois les protéines chargées sur la colonne, celle-ci a été lavée avec 5 volumes de tampon LIS. L'élution des protéines a été réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl. Pour une colonne de 1 ml, 25 ml de tampon LIS et un volume égal de tampon HIS (20 mM Tris-HCl et 500 mM NaCl à pH 8.0) ont été utilisés pour le gradient qui a été réalisé à l'aide d'un appareil de type Bio-Rad (modèle 385). Les manipulations ont été effectuées à 4 °C et un débit de 0,5 ml/min a été utilisé. Des fractions de 1 ml ont été récupérées lors de l'élution. Chacunes des fractions correspondant à chacun des pics du chromatogramme obtenu lors de la détection par densité optique à 280 nm ont été testés par électrophorèse en gel de polyacrylamide afin de déterminer l'identité de la protéine présente.

3.8.4 Digestion à l'entérokinase

Afin de séparer les deux domaines de la protéine de fusion, l'entérokinase recombinante de la compagnie Novagen a été employée. Après le dosage des protéines (section 3.9.1), l'entérokinase a été ajoutée de manière à obtenir 1 U d'enzyme par 50 µg de protéine de fusion. Du chlorure de calcium a aussi été ajouté à une concentration finale de 2 mM à partir d'une solution-mère de 200 mM. De plus, la concentration en NaCl a été déterminée (section 3.9.2) et ne devait pas dépasser 250 mM. La digestion a été réalisée à une température de 23 °C avec une agitation douce pendant 24 h à 48 h.

3.8.5 Séparation des deux domaines de la protéine de fusion

Après la digestion de la protéine de fusion, la protéine d'intérêt et le MBP ont été séparés à l'aide d'une deuxième colonne d'amylose. Cette colonne contenait suffisamment de résine pour lier tout le MBP produit lors de la digestion de la protéine de fusion. D'après la compagnie New England Biolabs, la résine d'amylose est capable de lier 3 mg de protéines par millilitre.

3.9 Analyses biochimiques

3.9.1 Dosage des protéines

La méthode de Lowry *et al.* (1951) a été utilisée afin de quantifier les protéines. Cette méthode utilise le réactif de Folin et la fraction V de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard.

Après avoir fait des dilutions appropriées du standard ainsi que de l'échantillon dans un volume final de 500 μ l, un volume égal de solution A (1 M de Na_2CO_2 dans 250 mM NaOH) a été ajouté. Par la suite, 200 μ l de solution B (0,1 % CuSO_4 et 0,2 % de tartrate de potassium et de sodium) ont été ajoutés et le tout a été mélangé. Après une incubation de 15 min à la température de la pièce, 375 μ l du réactif de Folin dilué à raison d'une partie pour quatre d'eau distillée ont été ajoutés et bien mélangés. Ensuite, les tubes ont été réincubés à la température de la pièce pendant 15 min, puis la densité optique a été lue à une longueur d'onde de 700 nm.

3.9.2 Détermination de la concentration en NaCl

La détermination du taux en sel des différents échantillons se fait à l'aide de la mesure de la conductivité en micro Svenberg (μ S). Une courbe standard a été réalisée en utilisant les mêmes solutions que pour l'élution des protéines (chromatographie sur colonne de Q-Sépharose, section 3.8.3). Ainsi, pour chacun des échantillons à doser, une dilution de 50 μ l dans 10 ml d'eau a été réalisée. Après avoir bien mélangé, la lecture a

été prise à l'aide du conductimètre. La courbe standard doit être une droite et posséder une équation du type :

$$\mu S = m [\text{NaCl mM}] + b$$

Où m = pente de la droite
 b = l'ordonnée à l'origine

3.9.3 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les gels pour fin d'analyse ont été réalisés en conditions dénaturantes, d'après le protocole de Laemmli, U. K. (1970). Le gel de compression contient 4 % d'acrylamide, tandis que le gel de séparation en contient 12,5 %.

Pour un gel de 0,75 mm d'épaisseur et de 5 cm de longueur, la séparation a été réalisée à 200 volts pendant 45 min ou jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. Puis le gel a été coloré pendant 40 min dans une solution contenant 40 % méthanol, 10 % acide acétique et 0,1 % bleu de Coomassie. À la suite de la coloration, le gel a été rincé avec de l'eau de manière à éliminer le surplus de colorant. Ensuite, le gel a été incubé dans la solution de décoloration (40 % méthanol et 10 % acide acétique) jusqu'à ce que l'échelle de poids moléculaire soit visible. Le gel a été digitalisé à l'aide du Scanner Umax Astra 600S et du logiciel Adobe PhotoDeluxe version 1.0.

Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le « Broad range molecular weight » et comprend les protéines suivantes : myosine (200 kDa), β -galactosidase (117 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), albumine (66,2 kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), inhibiteur de trypsine (21,5 kDa), lysozyme (14,4 kDa) et aprotinine (6,5 kDa).

3.9.3.1 Coloration au nitrate d'argent

Après la migration en gel de polyacrylamide, les protéines ont été fixées pendant 16 h à l'aide d'une solution contenant 50 % de méthanol et 5 % d'acide acétique. Ensuite, le gel a été incubé dans 50 % de méthanol pendant 10 min. Puis deux lavages de 10 min ont été réalisés avec de l'eau. Une solution de thiosulfate de sodium 0,02 % a été utilisée pour sensibiliser les protéines pendant une minute.

Ensuite, le gel a été rincé avec de l'eau pendant 1 min. La coloration a été réalisée à l'aide d'une solution de 0,2 % de nitrate d'argent pendant 20 min. Puis le gel a été rincé deux fois avec de l'eau pendant 1 min. La révélation des protéines a été effectuée à l'aide de 0,037 % de formaldéhyde dans une solution de 2 % de carbonate de sodium. Le développement a été arrêté à l'aide d'une solution de 5 % d'acide acétique. Avec cette technique, seules les protéines à la surface du gel sont colorées, ce qui permet une digestion des protéines dans le gel pour l'analyse en spectrométrie de masse (section 3.10.1).

3.9.3.2 Transfert de type Western

Après la migration en gel de polyacrylamide, le gel de compression a été éliminé et le gel de séparation a été équilibré pendant 20 min dans le tampon de transfert (48 mM Tris-HCl et 39 mM glycine).

Le montage pour le transfert a été réalisé avec deux morceaux de papier buvard et une membrane de nylon (Figure 13). Le montage a été fait de l'anode (+) à la cathode (-) de la façon suivante: tous les éléments du montage ont été imbibés de tampon de transfert.

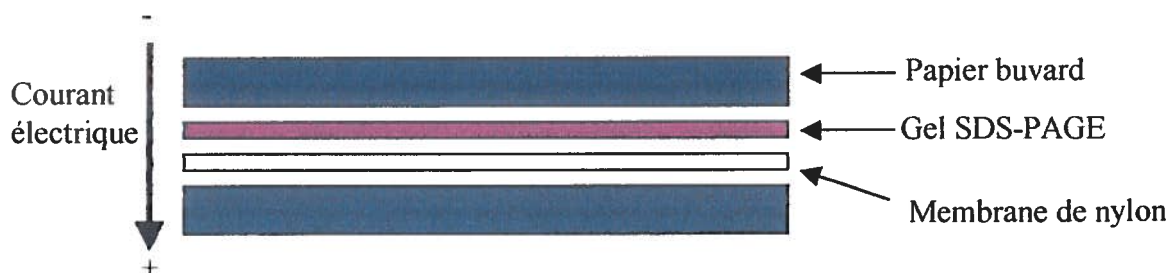


Figure 13: Montage pour le transfert de protéines sur membrane de nylon en condition semi-sèche.

Une fois le montage effectué dans le Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad, le transfert a été réalisé à 20 Volts pendant 15 min. Le marqueur de poids moléculaire Full Range Rainbow (Amersham Pharmacia Biotech) a été utilisé puisqu'il sera visible sur la membrane si le transfert s'est bien effectué. Ce type de standard permet d'obtenir une échelle de poids moléculaire sans aucune autre

coloration des protéines, car ces dernières sont pré-colorées. La membrane est alors prête à être traitée pour la révélation des protéines par immunodétection.

3.9.3.3 Immunodétection à l'aide de la phosphatase alcaline

Dans cette méthode de détection, la membrane a été bloquée pendant 60 min à l'aide d'une solution de 3 % (p/v) de gélatine préparée dans du TBS (20 mM Tris-HCl et 500 mM NaCl, à pH 7,5). Par la suite, la membrane a été lavée trois fois pendant 5 min avec du TBS. La solution d'anticorps primaire a été diluée dans une solution de gélatine 0,1 % (p/v) préparée dans du TBS. L'incubation avec les anticorps spécifiques a été réalisée pendant 16 h à 4 °C sans agitation.

Par la suite, la membrane a été lavée dans du TBS à trois reprises pendant 5 min. Les anticorps secondaires, des anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline, ont été dilués dans une solution de gélatine 0,1 % (p/v) préparée dans du TBS. L'incubation a été réalisée durant 1 h à la température de la pièce avec agitation. Puis, la membrane a été lavée pendant 5 min avec du TBS à trois reprises. La révélation a été effectuée à l'aide de 15 µl du substrat NBT/BCIP dilué dans 10 ml de solution de coloration (100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂·6H₂O et 100 mM NaCl). La réaction a été arrêtée à l'aide de trois lavages dans l'eau de 5 min chacun.

3.9.3.4 Immunodétection à l'aide de la peroxydase de raifort (POD)

Après le transfert, la membrane a été incubée pendant deux heures dans une solution de lait écrémé 10 % préparée dans le tampon T (65 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl, à pH 7,5) avec agitation. Ensuite, les anticorps primaires ont été ajoutés à 10 ml d'une solution de lait écrémé 1 % préparée dans le tampon T et l'incubation a été réalisée sans agitation, à 4 °C.

Après 16 h d'incubation, la membrane a été lavée huit fois pendant 5 min dans du tampon T. La membrane a été incubée avec 1,5 µl d'anticorps secondaires, anti-lapin couplés à la POD, dans 10 ml d'une solution de lait écrémé 1 % préparé dans le tampon T pendant 30 min avec agitation à la température de la pièce. Après cette dernière incubation, huit lavages dans du tampon T de 5 min chacun ont été effectués. Après avoir

égoutté la membrane afin d'éliminer le surplus de tampon, celle-ci a été plongée dans la solution de révélation « Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrate ». La solution de révélation a été constituée à l'aide d'un volume égal des solutions LLEnhancer et LL Stable Peroxide, ayant une température de 25 °C. Le mélange a été réalisé immédiatement avant son utilisation. La révélation a été effectuée pendant un minimum de 5 min et un maximum de 30 min.

Une fois la membrane incubée dans la solution de révélation, le développement doit être réalisé. Cette opération consiste à exposer un film à autoradiographie sur la membrane afin d'obtenir l'image de la production de lumière par le substrat transformé par la peroxydase. Le temps d'exposition varie selon la quantité de lumière émise, soit de 10 sec à 5 min.

3.9.5 Test enzymatique

L'activité enzymatique de la xylanase a été déterminée à l'aide du test PAHBAH (ρ -hydroxybenzoïc acid hydrazide) (Lever *et al.*, 1983). Ce test a servi à quantifier les sucres possédant une extrémité réductrice générés par l'hydrolyse du xylane.

Pour réaliser la courbe standard, 100 μ l de chacune des différentes concentrations de xylose, de 0 à 1 mM, ont été mélangés à 300 μ l de PAHBAH 0,25 % (0,25 g de PAHBAH dans 100 ml de NaOH 0,5 N).

Par la suite, afin de quantifier l'activité dans chacun des échantillons, 900 μl d'une solution de xylane 5 mg/ml ont été pré-incubés à 60 °C dans un microtube. Puis 100 μl de l'échantillon à tester ont été ajoutés au xylane pré-chauffé et bien mélangés. La réaction enzymatique a été réalisée à 60 °C pendant 10 min et a été arrêtée en transférant 100 μl du mélange réactionnel dans un deuxième microtube contenant 300 μl de PAHBAH 0,25 %. Les tubes ont été mélangés puis chauffés pendant 5 min à 95 °C. Après avoir refroidi les tubes rapidement dans un mélange glace/eau, 200 μl ont été prélevés et déposés dans une micro-plaque : la densité optique à 405 nm a été déterminée à l'aide du lecteur Microplate Autoreader EL 309 de la compagnie Biotek Instruments.

Des tubes témoins ont été réalisés en ajoutant aux 300 μl de PAHBAH 0,25 %, 100 μl de tampon phosphate 50 mM à pH 7. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicata.

3.10 Spectrométrie de masse

3.10.1 Digestion des protéines à l'aide de la trypsine

Le gel de polyacrylamide contenant la protéine à digérer et ayant été coloré au nitrate d'argent (section 3.9.3.1) a été découpé (dimensions approximatives du morceau de gel traité : 1 cm X 0,5 cm X 2 mm) et placé dans un microtube. La bande de gel de polyacrylamide a été lavée avec 500 μl de tampon T (100 mM NH_4CO_3) durant une heure à la température de la pièce. Après cette incubation, le tampon a été éliminé et 150 μl de tampon T ainsi que 10 μl de DTT 1 M ont été ajoutés. Après une incubation de 30 min à 60 °C, 20 μl d'iodoacétamide 500 mM ont été ajoutés et les microtubes ont été placés à la température de la pièce et à l'obscurité pendant 30 min. Après avoir éliminé tout le tampon, 500 μl d'une solution de 50 % d'acétonitrile dans le tampon T ont été ajoutés et incubés pendant une heure avec agitation. Après cette incubation, le tampon a été de nouveau éliminé, la bande de gel a été coupée en petits morceaux et resuspendues dans de l'acétonitrile 100 %. Après une déshydratation de 15 min à la température de la pièce, l'acétonitrile a été éliminé. Les morceaux de gel déshydratés ont été évaporés à l'aide du SpeedVac Concentrator de Savant pendant 10 min. Le gel a été réhydraté à l'aide de

20 µl d'une solution de trypsine ayant une concentration de 0,1 µg/µl d'enzyme. La réhydratation s'est poursuivie pendant environ 20 min ou jusqu'à ce que le tampon ait été complètement absorbé par le gel. Ce dernier doit toujours être recouvert de liquide. Par conséquent, si la quantité ajoutée au départ (20 µl) ne suffit pas à réhydrater le gel complètement, du tampon NH_4CO_3 25 mM doit être ajouté afin que les morceaux de gels réhydratés baignent complètement. La digestion à l'aide de la trypsine a été effectuée à 37 °C pendant 16 h.

Une fois la digestion effectuée, les peptides ont été extraits de la matrice de polyacrylamide. Le tampon de digestion a été récupéré dans un deuxième microtube et conservé. La matrice de polyacrylamide a été lavée à deux reprises pendant 20 min à 37 °C à l'aide de 50 µl d'une solution d'acétonitrile 60 % et de TFA 0,1 %. Les solutions de lavage ont été combinées au tampon de digestion. Tous les peptides ont été récupérés, puis concentrés et séchés à l'aide du SpeedVac Concentrator de Savant. Les peptides ont été congelés jusqu'à leur analyse.

3.10.2 Purification des peptides à l'aide de Zip Tip C_{18}

Les peptides séchés ont été dissous dans 20 µl d'une solution de TFA 0,2 %. La résine C_{18} contenue dans l'embout de pipette de type Zip Tip a été humidifiée à l'aide de 10 µl d'acétonitrile 50 % contenant du TFA 0,1 %. La résine a ensuite été lavée à l'aide de 100 µl d'une solution de TFA 0,1 %. Les peptides ont été fixés à la résine, puis celle-ci a été lavée de nouveau avec 100 µl d'une solution de TFA 0,1 %. L'élution des peptides de la résine a été réalisée à l'aide de 8 µl d'une solution d'acétonitrile 80 % contenant 0,1 % de TFA. L'échantillon contenant les peptides a ensuite été incubé pendant 5 min dans un bain à ultrasons Branson 1200, puis centrifugé 10 sec.

3.10.3 Analyse des peptides

L'échantillon a été analysé par nanoESI MS. Les peptides purifiés ont été injectés dans un capillaire recouvert d'or de la compagnie Micromass. Le capillaire a été inséré dans la source nanoflow Z SPRAY™ d'un spectromètre de masse à triple quadrupole (QuattroII, Micromass).

Le logiciel Masslynx/Biolynx version 3.3 de la compagnie Micromass a été utilisé pour la visualisation, la manipulation et l'analyse des différents spectres obtenus.

3.11 Détection de la liaison protéine-sucre

3.11.1 Analyse par fluorescence

Avant de commencer les expériences, la longueur d'onde maximale d'excitation des résidus tryptophane de la protéine à étudier a été déterminée, à l'aide de la protéine seule en solution, dans les mêmes conditions que celles prévues pour les expériences de liaison. Pour déterminer ce premier paramètre, la longueur d'onde d'émission de l'appareil a été fixée à 340 nm (la longueur d'onde maximale d'émission pour les résidus tryptophane) et le spectre d'excitation a été lu entre 250 et 300 nm (la longueur d'onde maximale d'excitation théorique des résidus tryptophane est de 280 nm). La longueur d'onde d'excitation pour la protéine à étudier a été choisie en fonction de ce premier spectre. Ensuite, les spectres d'émission pour chacune des expériences de liaison ont été enregistrés en utilisant la longueur d'onde d'excitation prédéterminée. Le spectre d'émission a été lu sur une plage de longueur d'onde couvrant 100 nm, soit entre 300 et 400 nm, afin de pouvoir observer l'effet du ligand sur le spectre de fluorescence des résidus tryptophane aux environs de 340 nm.

Pour la préparation de l'échantillon, 20 μg de protéines ont été ajoutés au tampon C (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA et 1 mM NaN_3 , à pH 7,4) dans un volume final de 200 μl . Lorsque des sucres devaient être ajoutés, une concentration finale de 5 mM a été utilisée et un contrôle sans protéine a été réalisé pour tous les ligands testés. Les différents mélanges ont été réalisés dans une plaque noire spécialement conçue pour la détection de la fluorescence. Les lectures ont été enregistrées à l'aide de l'appareil Spectra Max Gemini.

Après avoir obtenu les spectres à partir du programme Soft SPECTMax Pro 3.0, les données ont été traitées à l'aide des programmes informatiques Sigma Plot et Excel afin de soustraire le blanc (tampon + sucre) réalisé pour chacun des essais de l'expérience (tampon + sucre + protéine).

4 Résultats

4.1 Purification de la protéine BxlE

4.1.1 Amplification élective *in vitro* du gène *bxlE*

Le cosmide 1H10 de la banque cosmidique de Redenbach (1996) a été utilisé comme matrice afin d'amplifier par PCR le gène *bxlE*. Ceci a été possible étant donné que l'insert de ce cosmide comprend l'opéron *bxl* codant pour *bxlE* (Larocque, 1998). Les amorces BxlEKpnI5' et BxlEEcoRI3' (Tableau II) ajoutent les sites de restriction *KpnI* en 5' et *EcoRI* en 3' du gène, afin de permettre son clonage dans le vecteur pMal-c2E (Figure 8). Malheureusement, il a été impossible d'amplifier ce gène de 1305 pb en un seul amplicon. Après plusieurs tentatives infructueuses, deux amorces supplémentaires, BxlEBclI3' et BxlEBclI5' (Tableau II), ont été synthétisées afin d'amplifier le gène *bxlE* en deux fragments. Ces deux nouvelles amorces sont complémentaires à une séquence de 21 nucléotides dans le gène *bxlE* (Figure 14). Cette région a été utilisée, car il est possible d'y retrouver de façon naturelle le site de restriction unique *BclI*. Par conséquent, les amorces BxlEKpnI5' et BxlEBclI3' ont servi à amplifier les 744 premières paires de base du gène *bxlE*. Cet amplicon possède les sites de restriction *KpnI* en 5' et *BclI* en 3'. La seconde moitié de 597 pb a été amplifiée à l'aide des amorces BxlEBclI5' et BxlEEcoRI3' (Figure 15). Ce deuxième amplicon est bordé des sites de restriction *BclI* en 5' et d'*EcoRI* en 3'. Étant donné que le gène *bxlE* a été amplifié en deux amplicons, le site de restriction unique *BclI* permet d'assembler les deux produits d'amplification. Le vecteur pSL1180 (Figure 11) a été utilisé pour la reconstitution du gène *bxlE* puisqu'il possède un nombre important de sites de restriction uniques. De plus, les sites de restrictions *KpnI*, *BclI* et *EcoRI* sont dans l'ordre de manière à ce que le clonage des deux amplicons soit possible (Figure 16).

5' ATGAAGACACGTGCGCGCTTGCCCAGACTGGTCGCCACCGGTGCGACGCTCGCCCTGGCGCTG

KpnI

5' CACGGTACCGATGAAGACACGTGCGCGCTT 3'

3' TACTTCTGTGCACGCGGAACGGGTCTGACCAGCGGTGGCCACGCTGCCAGCGGGACCGCGAC
 1 10 20 30 40 50 60
 AGCCTGTCGGCCTGCGGTGACGGGGACGGCGGGGCGTCGTCGGACGACGGCAAGATCCATGTCTGGTCTACGGGG
 TCGGACAGCCGGACGCCACTGCCCCGCGCCCGCAGCAGCCTGCTGCCGTTCTAGGTACAGGACCAGATGCCCC
 70 80 90 100 110 120 130
 ACGCCAGCAACAAGATCGAACAGCAGATCGTCGACACCTTCAACAAGACCTCCGACGTCAAGGCGGTCTCGACAC
 TGGGTGCTGTTCTAGCTTGTCTAGCAGCTGTGGAAGTTGTTCTGGAGGCTGCAGTTCCGCCAGGAGCTGTG
 140 150 160 170 180 190 200 210
 CATCCCCGGTGCCGACTACCAGACGAAGCTCCAGACGATCATCAACACCCCGCAGGCCCCGGACATCTTCTACAAC
 GTAGGGGCCACGGCTGATGGTCTGCTTCGAGGTCTGCTAGTAGTTGTGGGGCGTCCGGGGCCTGTAGAAGATGTTG
 220 230 240 250 260 270 280 290
 TGGGGCGGGCGGAGCATCAAGCCGTTCTGTCAGGCGGACCTGCTGCTGCCGCTCGACGACTTCATCAAGAAGGACC
 ACCCCGCGCGCGTCTAGTTTCGGCAAGCAGTTCGCCTGGACGACGACGGCGAGCTGCTGAAGTAGTTCTTCTTGG
 300 310 320 330 340 350 360
 CGGGCCTCAAGGACAACCTTCTGCCGTCCGTCTTCAACAGCGCGTCTGTCGACGGAAGCCGTACGGCATAACCGAT
 GCCCGGAGTTCTTGTGAAGGACGGCAGGCAGAGTTGTGCGGGCAGCAGCTGCCTTTCCGGCATGCCGTATGGCTA
 370 380 390 400 410 420 430 440
 GCGCGGCACCCAGCCGGTCTGCTCTTCCACAACAAGAAGGTCTTCGAGGACGCGGGCGTCCAGCCGCCAAGACC
 CGCGCCGTGGGTGCGGCCAGGACGAGAAGGTGTTGTTCTTCCAGGAGCTCCTGCGCCCGCAGGTCGGCGGGTCTGG
 450 460 470 480 490 500 510 520
 TGGGACGAACTGCTCGCCGCGGTGGGCAAGCTCAAGGACGCGGGTGTACGCCGATCGCGCTCGGCGGGCGGCGACG
 ACCCTGCTTGACGAGCGGGCGCCACCCGTTTCGAGTTCTGCGCCACAGTGCGGCTAGCGCGAGCCGCCCGCTGC
 530 540 550 560 570 580 590
 TGTGGCCGACCCAGATGTGGTTCCAGTACCTCTACGACCGCATCGCCGGTCCGGAGCTGTTGCGGAAGGCCATCGG
 ACACCGGCTGGGTCTACACCAAGGTCATGGAGATGCTGGCGTAGCGCCAGGCCTCGACAAGCGCTTCCGGTAGCC
 600 610 620 630 640 650 660 670

BclI

3' CCTGTACTAGTCGCTCGA 5'

CGGCGACAAGAGCGCCTGGGAGAGCGCGGACAGCAAGAAGGCCCTGGACATGATCAGCGAGCTGGTCGACTCCGGC

5' GGACATGATCAGCGAGCT 3'

GCCGCTGTTCTCGCGGACCCTCTCGCGCTGTCGTTCTTCCGGGACCTGTACTAGTCGCTCGACCAGCTGAGGCCG
 680 690 700 710 720 730 740
 GCCTTCGGCAAGAATACTACGACTCCGTCAAGTACACCAACGGCGGCTCGGTCCAGCTGGTGGCTCGGGCAAGGCCG
 CGGAAGCCGTTCTTGATGCTGAGGCAGTTCATGTGGTTGCCGCCAGCCAGGTCGACCACCGGAGCCCGTTCCGGC
 750 760 770 780 790 800 810 820
 GCTTCGAGCTGATGGGCTCCTGGTACTACTCCAGCAGCTCACGGACCACAAGGAGTTCGCCGAGAAGGACCCTCG
 CGAAGCTCGACTACCCGAGGACCATGATGAGGGTCGTCGAGTGCCTGGTGTTCCTCAAGCGGCTCTTCTGGGAGC
 830 840 850 860 870 880 890
 CTACACCGCCTTCCCGACCGTCGAGGGCGGCAAGGGCGACCCGGGCAACGTCGCCGGCAACCCCACTACTAC
 GATGTGGCGGAAGGGCTGGCAGCTCCCGCCGTTCGCGCTGGGCGGCTTGCAGCGGCCGTTGGGGTTGTTGATGATG
 900 910 920 930 940 950 960 970
 TCGGTGATGAAGAAGACCAAGCACCCCGAGGCCGCCGAGTTCCTGAAGCTCATGTACTCCGACGAGTTTCGTCA
 AGCCACTACTTCTTCTGGTTCGTGGGGCTCCGGCGGGCGGCTCAAGGACTTCGAGTACATGAGGCTGCTCAAGCAGT
 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050

```

AGGCCCACCTCGACATCGGCAACCTGCCGACCACGACCAACACCGACAAGTTCATCGACGACTCGGCCACCCCGA
TCCGGGTGGAGCTGTAGCCGTTGGACGGCTGGTGTGTTGTGGCTGTTCAAGTAGCTGCTGAGCCGGTGGGGGCT
      |      |      |      |      |      |
      1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
GTACACGCGCTTCCAGTACGACCTCGTCTCCGACGCCCCGAACCTCCAGCTGTCCTGGGACCAGGCGTACCCGCAG
CATGTGCGCGAAGGTCATGCTGGAGCAGAGGCTGCGGGGGCTTGAAGGTCGACAGGACCTGGTCCGCATGGGCGTC
      |      |      |      |      |      |      |      |
      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
AAGGCCAGCTCGGACATGCACAAGGCCATCCAGCAGTTCTTCAACGGACAGCTCGACACGGACGGCTTCATCAAGG
TTCCGGTCGAGCCTGTACGTGTTCCGGTAGGTCGTCAAGAAGTTGCCTGTCGAGCTGTGCCTGCCGAAGTAGTTCC
      |      |      |      |      |      |      |      |
      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
      3' CGGGAGGGCTGGCTCACTCTTAAGAAA 5'
      |
      1290    1300
CCATGCAGGCCCTCCCGACCGAGTGA 3'
GGTACGTCCGGGAGGGCTGGCTCACT 5'
      |      |
      1290    1300

```

Figure 14: Séquence nucléotidique du gène *bxlE* de *Streptomyces lividans* et les amorces utilisées pour son amplification.

Légende :

Paire d'amorces BxlEKpnI5' et BxlEBclI3' utilisée pour amplifier la première moitié de 744 pb du gène *bxlE*

Paire d'amorces BxlEBclI5' et BxlE*Eco*RI3' utilisée pour amplifier la deuxième moitié de 597 pb du gène *bxlE*

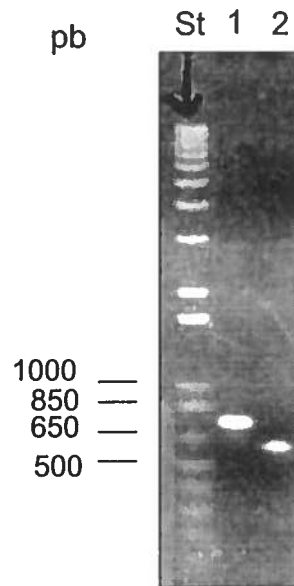


Figure 15: Amplification par PCR des extrémités 5' et 3' de *bxlE* et analyse en gel d'agarose 0,7 %.

Légende :

St : standard 1 Kb plus DNA ladder

1 : extrémité 5' de *bxlE* (744 pb)

2 : extrémité 3' de *bxlE* (597 pb)

5'AAGCTTAAGGTGCACGGCCCACGTGGCCACTAGTACTTCTCGAGCTCTGTA
 CATGTCCGCGGTTCGCGACGTACGCGTATCGATGGCGCCAGCTGCAGGCGGCC
 GCCATATGCATCCTAGGCCTATTAATATTCCGGAGTATACGTAGCCGGCTAAC
 GTTAACAACCGGTACCTCTAGAACTATAGCTAGCATGCGCAAATTTAAAGCG
 CTGATATCGATCGCGCGCAGATCTGTTCATGATGATCAATTGCAATTGGATCCAT
 ATATAGGGCCCCGGGTATAATTACCTCAGGTTCGACGTCCCATGCCATTCGAAT
 TC 3'

Figure 16: Séquence nucléotidique de la cassette de clonage multiple du vecteur pSL1180.

4.1.2 Reconstitution du gène *bxlE*

Après avoir obtenu les deux produits d'amplification, ils ont été clonés dans le vecteur pSL1180 afin de reconstituer le gène *bxlE* (Figure 17). Ceci permet de cloner les deux produits d'amplification indépendamment et de reconstituer le gène dans le bon cadre de lecture afin de pouvoir l'introduire dans un vecteur d'expression.

Le clonage du premier amplicon de 744 pb dans le vecteur pSL1180 a été réalisé entre les sites de restriction *KpnI* et *BclI* et la souche *E. coli* DM1 a été utilisée pour la transformation. L'utilisation de cette souche était essentielle pour la suite des travaux. En effet, cette souche (*dam*⁻ et *dcm*⁻) ne possède pas de méthylases et par conséquent son ADN n'est pas méthylé sur la base guanine des sites GATC et sur la première base cytosine des sites CC(A/T)GG. L'enzyme de restriction *BclI* ne peut couper son site (5'TGATCA3') lorsque la base guanine est méthylée par la méthylase. Par conséquent, cette souche permet l'utilisation du site de restriction *BclI* pour continuer la reconstruction de *bxlE*. L'ADN plasmidique a donc été extrait de cinq transformants, digéré à l'aide des enzymes appropriées et analysé en gel d'agarose 0,7 %. À la figure 18, il est possible de constater que deux clones sur cinq ont intégré le premier fragment de 744 pb de *bxlE*.

Pour continuer la reconstruction du gène *bxlE*, le clone #4 (Figure 18) ainsi que le deuxième produit d'amplification par PCR (Figure 15, puits 2) ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction *BclI* et *EcoRI*. Les deux produits de digestion ont été chargés sur un gel d'agarose 0,7 % et chacun a été ré-extrait du gel afin d'éliminer les extrémités pouvant nuire au clonage de la deuxième moitié du gène *bxlE*. Après le clonage de l'extrémité 5' de *bxlE* (fragment de 597 pb) et transformation dans la souche d'*E. coli* DH11S, 23 transformants ont été obtenus. La figure 19 montre le transformant qui a été utilisé pour extraire le gène *bxlE*. Il est facile de constater que le vecteur pSL1180 (3421 pb) a intégré la deuxième moitié du gène *bxlE*, puisqu'un insert de 1305 pb peut être extrait du plasmide lors de la digestion par les enzymes de restriction *KpnI* et *EcoRI*. Par ailleurs, la digestion n'est que partielle, car une troisième bande correspondant au plasmide *bxlE*/pSL1180 (4726 pb) linéarisé est observée.

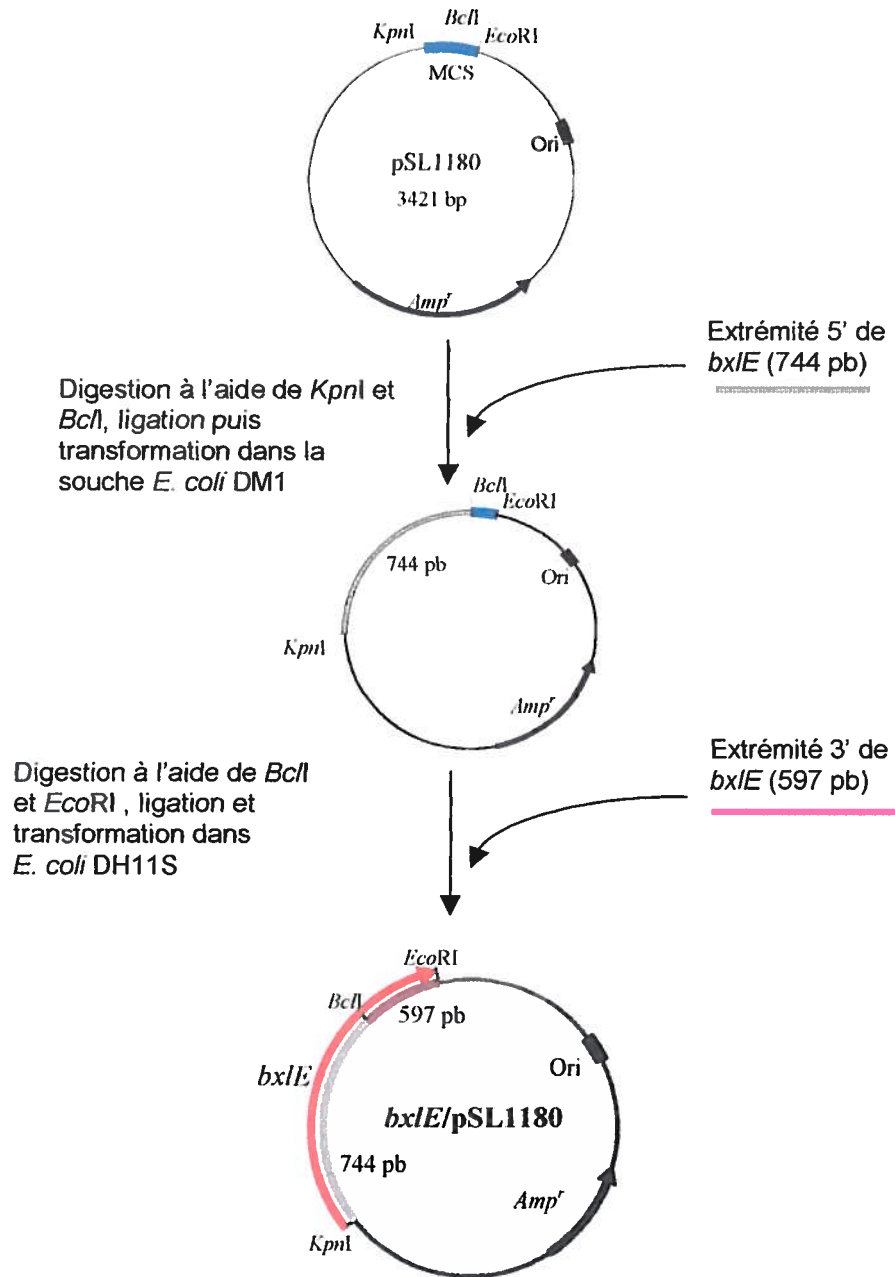


Figure 17: Reconstruction théorique du gène *bxlE* dans le vecteur pSL1180.

Légende :

Amp^r : gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline

Ori : origine de réplication

bxlE : gène *bxlE* de *S. lividans*

MCS : cassette de clonage multiple

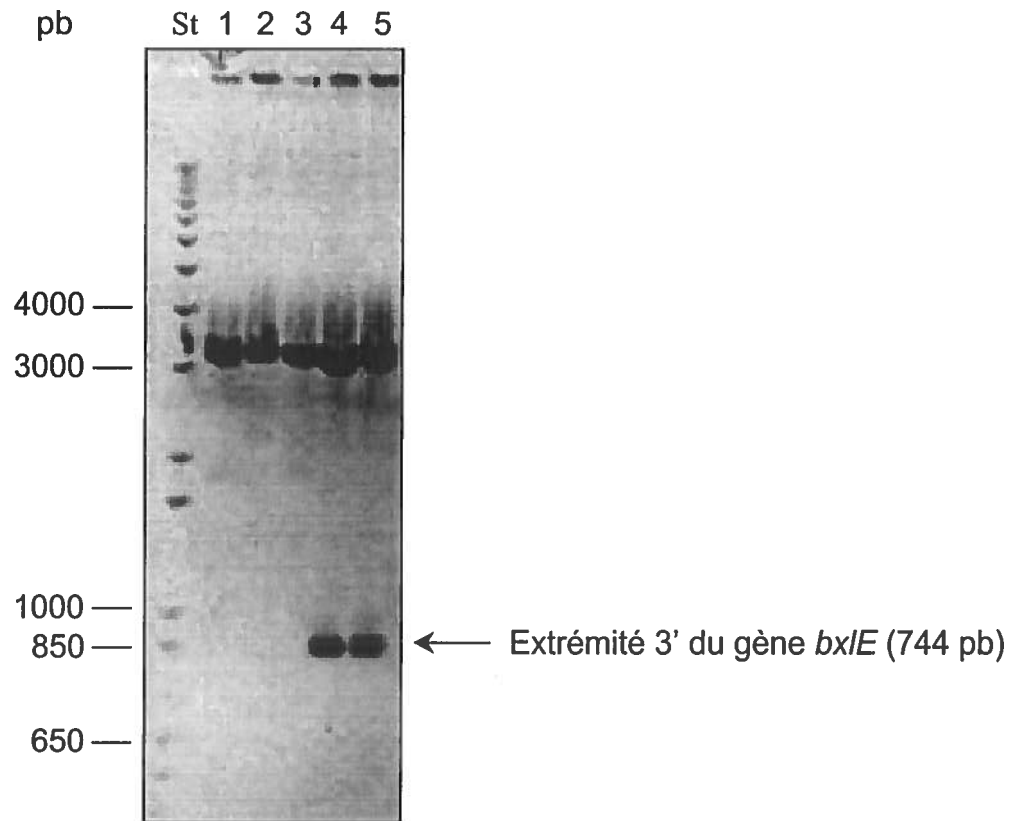


Figure 18: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de cinq transformants obtenus lors du clonage de l'extrémité 3' de *bxlE* dans le vecteur pSL1180.

Légende :

St : standard 1 Kb plus DNA ladder
1 à 5 : clones analysés

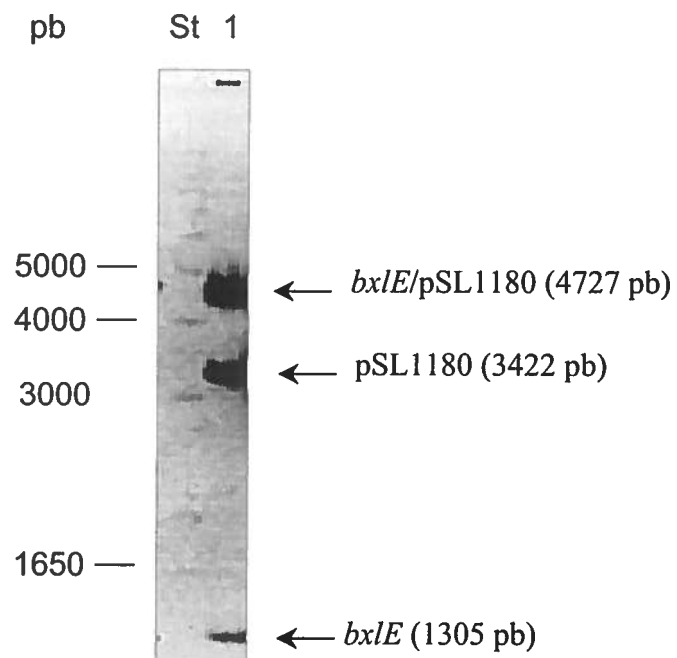


Figure 19: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de la reconstitution de *bxlE* dans le plasmide pSL1180.

Légende :

St : standard 1 Kb plus DNA ladder

1 : transformant utilisé pour récupérer *bxlE*

Après la reconstitution du gène *bxlE*, il a été extrait du plasmide pSL1180 et cloné dans le vecteur pMal-c2E entre les sites *KpnI* et *EcoRI* (Figure 20). Après transformation de la souche d'*E. coli* DH11S, 11 transformants des 15 clones analysés possédaient l'insert de 1305 pb (Figure 21). Les bandes observées en plus des bandes correspondant au plasmide sont fort probablement de l'ADN chromosomique extrait et digéré au même moment que le plasmide.

Les plasmides #1 et #2 montrés à la figure 21 ont été choisis pour la suite des travaux. Le plasmide #1 correspond au vecteur pMal-c2E, sans insert. Le plasmide #2 (pIAF-102E) possède le gène *bxlE* cloné dans le vecteur pMal-c2E entre les sites de restriction *KpnI* et *EcoRI*.

Les extrémités 5' et 3' de l'insert du plasmide pIAF-102E ont été séquencées afin de s'assurer que le gène avait été cloné dans le même cadre de lecture que le gène *malE*. Lors du séquençage, il a été possible de retrouver à l'extrémité 5' de l'insert : l'extrémité 3' du gène *malE*, la séquence pour le site de digestion à l'entérokinase, puis l'insert. À l'extrémité 3' de ce dernier, la séquence obtenue correspondait aux derniers codons du gène *bxlE* ainsi qu'à la suite du vecteur (Figure 22). Le séquençage a confirmé que tous les éléments génétiques étaient présents pour que la protéine BxlE soit produite et purifiée à l'aide du système pMalTM.

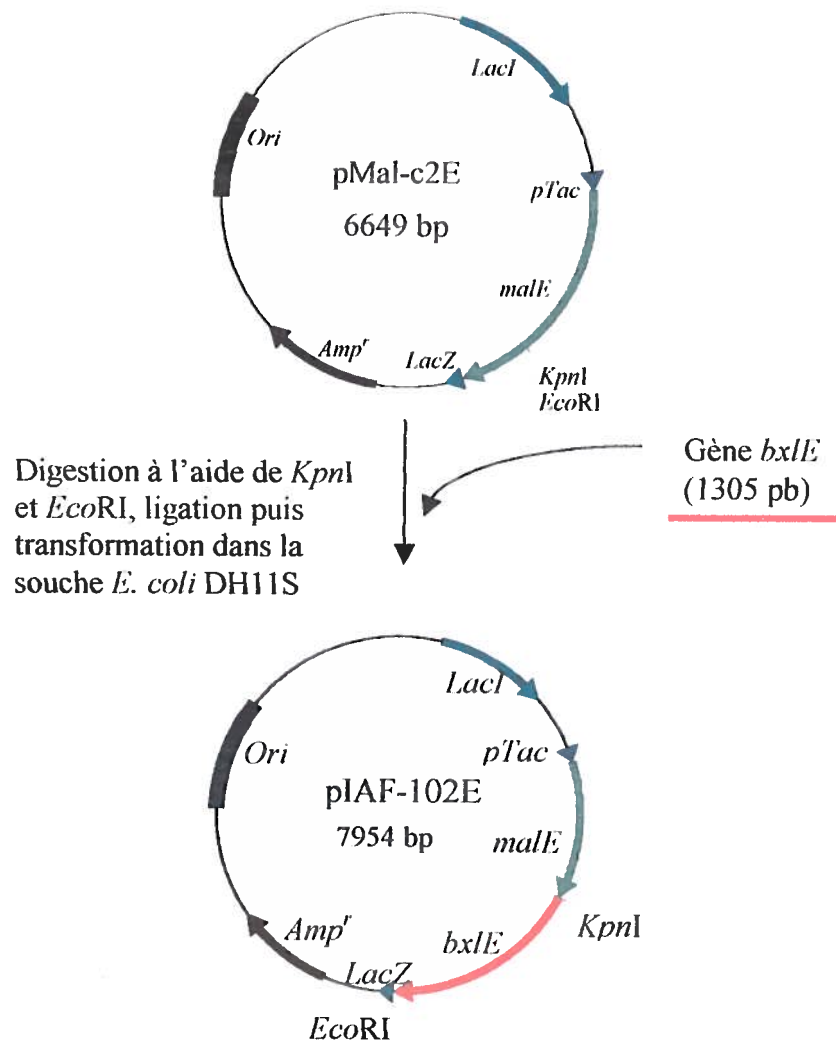


Figure 20: Clonage de *bxlE* dans pMal-c2E

Légende :

Amp^r : gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline

Ori : origine de répliation

bxlE : gène *bxlE* de *S. lividans*

MCS : cassette de clonage multiple

pTac : promoteur inductible à l'IPTG

LacI : répresseur Lac

LacZ : sous-unité α de la β -galactosidase

malE : gène codant pour la protéine liant le maltose (MBP)

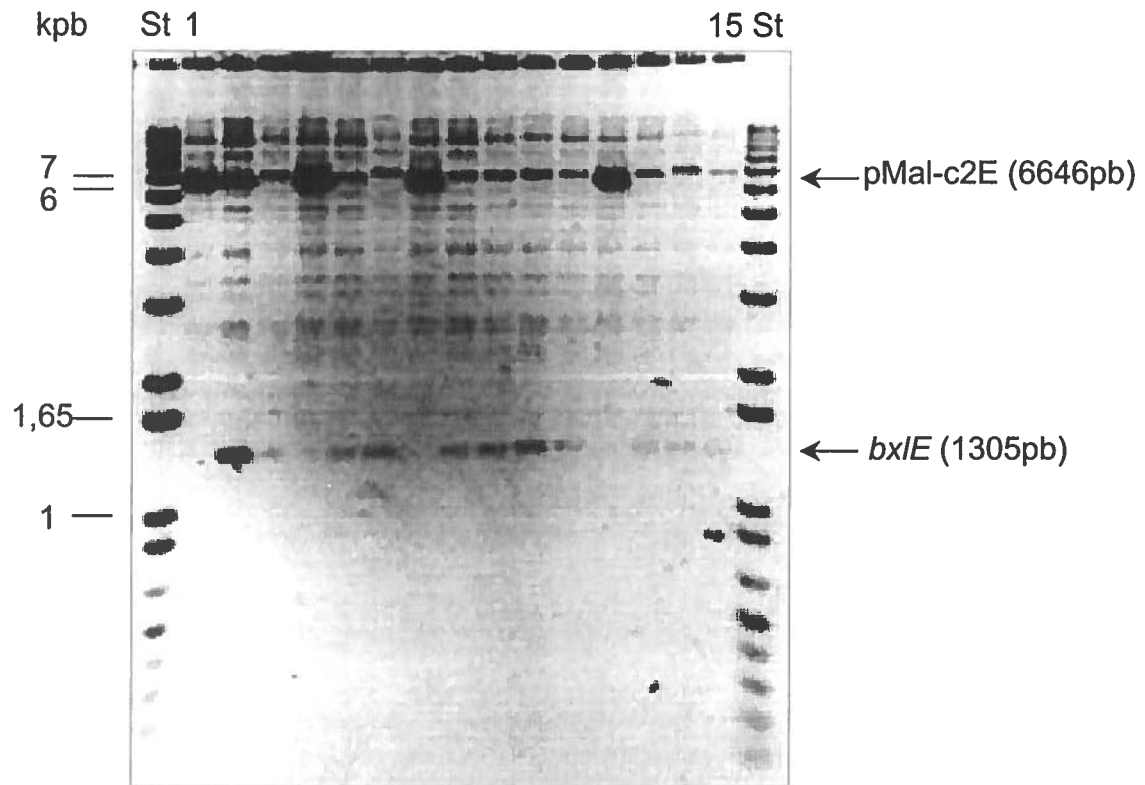


Figure 21: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de transformants obtenus lors du clonage de *bxlE* dans le vecteur pMal-c2E.

Légende :

St : standard 1 Kb plus DNA ladder

Puits 1-15 : 15 clones analysés

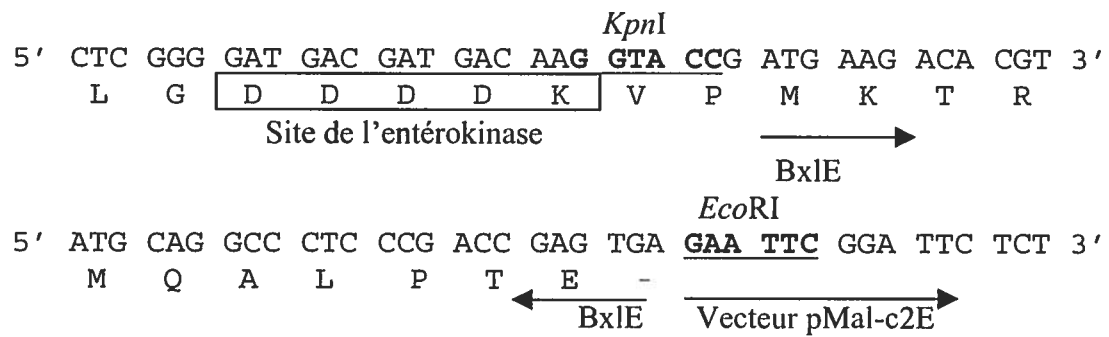


Figure 22: Séquences des extrémités 5' et 3' du gène *bxlE* cloné dans pMal-c2E entre les sites de restriction *KpnI* et *EcoRI* et en fusion avec le gène *malE*.

4.1.3 Expériences pilotes d'expression protéique

À la suite du clonage de *bxlE* en phase avec *malE* dans le vecteur pMal-c2E, des expériences d'induction de la protéine de fusion produite par la souche IAF-102E ont été réalisées. D'après la séquence en acides aminés de la protéine de fusion MBP-BxlE, cette souche devrait surexprimer une protéine ayant un poids moléculaire théorique de 90 016 Da. Cette valeur correspond à la somme du poids moléculaire du MBP (42 714 kDa) et de la protéine BxlE (47 302 Da). La souche IAF-101 (vecteur pMal-c2E dans la souche d'*E. coli* DH11S) a été utilisée comme contrôle d'induction et une protéine de 50 831 Da était attendue. Cette protéine correspond au poids moléculaire de la sous-unité α de la β -galactosidase fusionnée au MBP (MBP- α - β -gal).

La première expérience de production de protéines a été effectuée selon les indications de la compagnie New England Biolabs. Lorsque l'expérience a été réalisée à 37 °C (Figure 23), aucune protéine de 90 kDa n'a été observée (puits 2 et 8) lors de l'induction de la souche IAF-102E. Par contre, la souche contrôle IAF-101 surproduit une protéine de 51 kDa qui est visible en comparant le puits 1 (avant induction) avec les puits 3, 5 et 7 (après 1, 2 et 3 h d'induction).

Dans la seconde expérience, la culture bactérienne a été incubée à 30 °C après l'ajout de l'inducteur afin de tenter de visualiser la protéine de fusion (Figure 24). La protéine MBP-BxlE commence à être surproduite après 1 h d'induction (puits 2 et 4). Par contre, aux autres temps d'induction, cette protéine de 90 kDa n'est plus visible. La protéine contrôle de 51 kDa est toujours visible tout au long de l'expérience (puits 1, 3, 5 et 7).

Enfin, une troisième expérience a été réalisée et une température d'incubation de 25 °C après l'ajout de l'IPTG a été utilisée (Figure 25). L'expression protéique des cellules de la souche IAF-102E non-induites (puits 2) et induites (puits 4, 6 et 8) a été comparée. Il est facile d'observer l'induction d'une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 90 kDa aux différents temps après l'ajout de l'inducteur, l'IPTG. L'induction maximale est visible après 2 h (puits 6). La protéine de 51 kDa surexprimée par la souche IAF-101 est aussi observable à cette température (puits 1, 3, 5 et 7).

Afin de confirmer l'induction de la protéine de fusion MBP-BxlE, un transfert de type Western et une immunodétection à l'aide d'anticorps anti-MBP ont été réalisés. Il est possible d'observer à la figure 26 que la protéine de fusion de 90 kDa produite par la souche IAF-102E est majoritaire après 1, 2 et 3 h d'induction (puits 2 à 7 et 11 à 16). Pour ce qui est de l'induction du contrôle, soit la souche IAF-101, la protéine de 51 kDa est facilement détectée (puits 1 et 8 à 10). Les conditions de production de la protéine de fusion MBP-BxlE ont donc été déterminées à l'aide de ces résultats, soit une durée d'induction de 2 h et une température de croissance de 25 °C après l'ajout de l'IPTG.

Les anticorps fournis par la compagnie New England Biolabs sont spécifiques au MBP puisqu'ils ont été produits à partir de MBP purifié (New England Biolabs inc., 1997). Ces anticorps reconnaissent toutes les protéines contenant le domaine de liaison au maltose. Toutes les protéines de dégradation ainsi que le MBP d'origine chromosomique exprimée par la souche hôte d'*E. coli* peuvent donc être détectées à l'aide de ces anticorps. Ceci explique qu'à la figure 26 il est possible d'observer une série de bandes qui sont toutes de poids moléculaire inférieur à la protéine majoritaire : MBP- α - β -gal ou MBP-BxlE. Par conséquent, si la spécificité de l'anticorps était remise en compte, il serait possible de détecter des bandes ayant un poids moléculaire plus élevé que la protéine majoritaire.

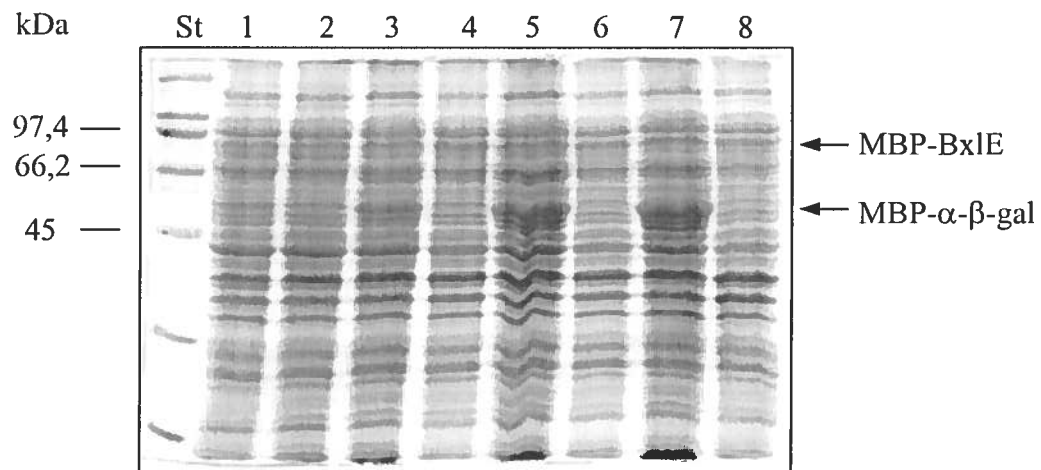


Figure 23: Suivi des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à 37 °C par les souches IAF-101 et IAF-102E, en fonction du temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 % coloré au bleu de Coomassie.

Légende :

St : standard de poids moléculaire
 1 : souche IAF-101 avant induction
 2 : " IAF-102E " "
 3 : " IAF-101 1 h post-induction
 4 : " IAF-102E 1 h "
 5 : " IAF-101 2 h "
 6 : " IAF-102E 2 h "
 7 : " IAF-101 3 h "
 8 : " IAF-102E 3 h "

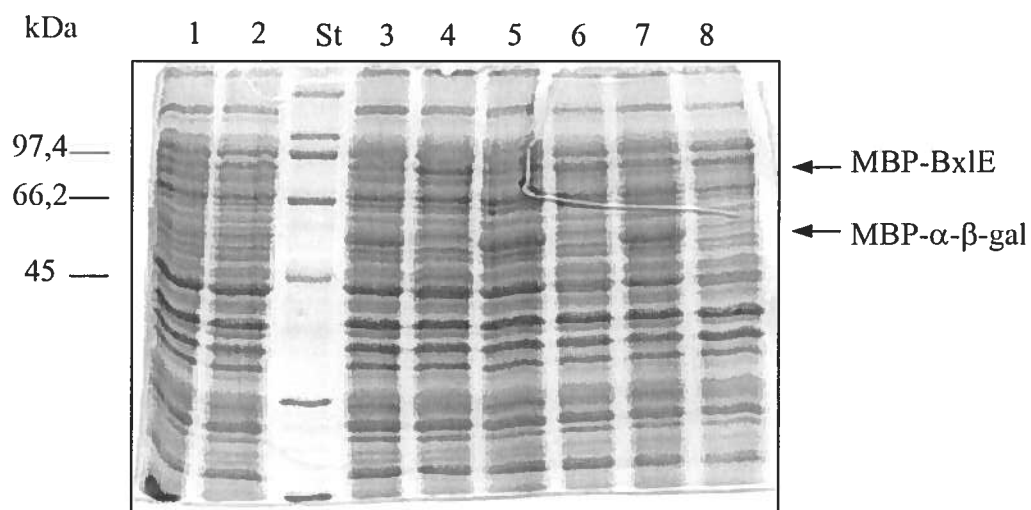


Figure 24: Suivi des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à 30 °C par les souches IAF-101 et IAF-102E, en fonction du temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.

Légende :

St : standard de poids moléculaire
 1 : souche IAF-101 avant induction
 2 : " IAF-102E " "
 3 : " IAF-101 1 h post-induction
 4 : " IAF-102E 1 h "
 5 : " IAF-101 2 h "
 6 : " IAF-102E 2 h "
 7 : " IAF-101 3 h "
 8 : " IAF-102E 3 h "

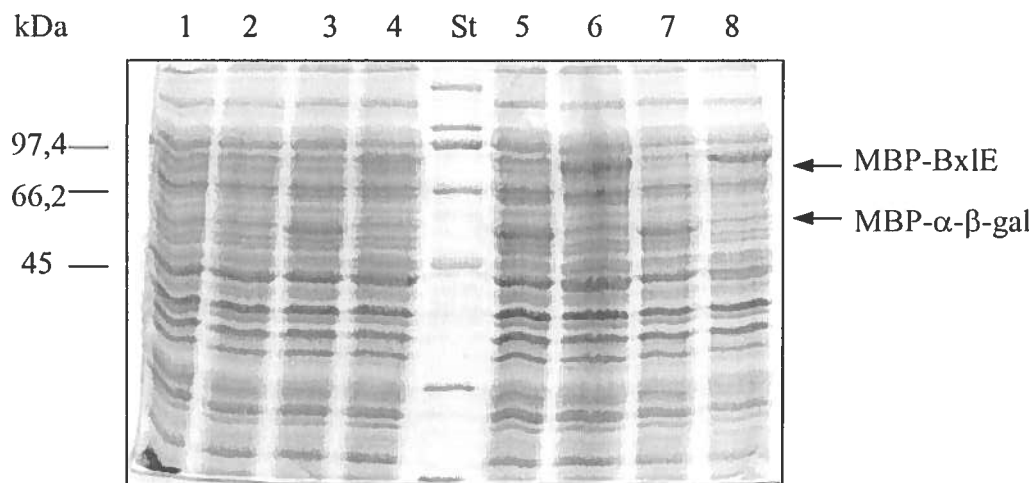


Figure 25: Suivi des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à 25 °C par les souches IAF-101 et IAF-102E, en fonction du temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.

Légende :

St : standard de poids moléculaire
 1 : souche IAF-101 avant induction
 2 : " IAF-102E " "
 3 : " IAF-101 1 h post-induction
 4 : " IAF-102E 1 h "
 5 : " IAF-101 2 h "
 6 : " IAF-102E 2 h "
 7 : " IAF-101 3 h "
 8 : " IAF-102E 3 h "

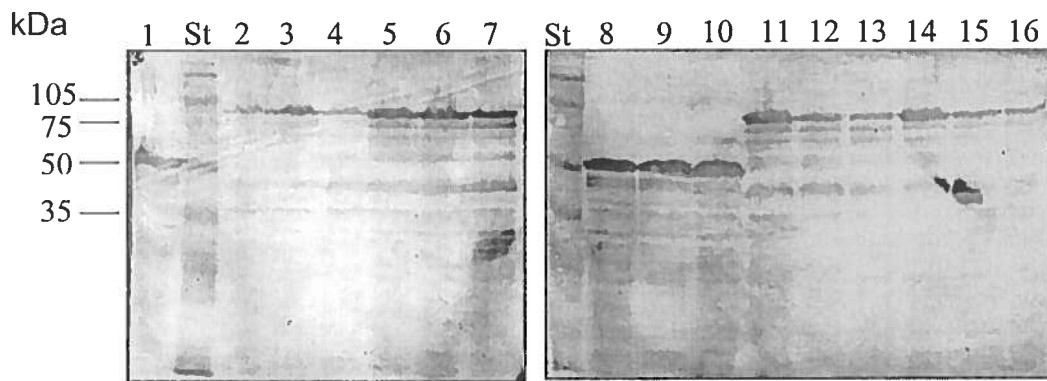


Figure 26: Comparaison des protéines cellulaires produites après l'ajout d'IPTG à différentes températures et à différents temps de culture par les souches IAF-101 et IAF-102E. Transfert de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-MBP.

Légende:

St: standard de poids moléculaire de protéines pré-colorées

1 : souche IAF-101 2h post-induction à 37 °C

2 : " IAF-102E avant l'ajout de l'inducteur

3 : " IAF-102E " "

4 : " IAF-102E " "

5 : " IAF-102E 1 h post-induction à 25 °C

6 : " " " " 30 °C

7 : " " " " 37 °C

8 : " IAF-101 2 h " 25 °C

9 : " " " " 30 °C

10 : " " " " 37 °C

11 : " IAF-102E " 25 °C

12 : " " " " 30 °C

13 : " " " " 37 °C

14 : " " 3 h " 25 °C

15 : " " " " 30 °C

16 : " " " " 37 °C

4.1.4 Purification de la protéine de fusion MBP-BxlE

Après avoir surexprimé la protéine MBP-BxlE dans 2,5 L de milieu R + glucose selon les conditions établies à la section précédente, la première étape de purification a été d'isoler la protéine de fusion par chromatographie d'affinité. Cette étape de purification utilise une résine d'amylose, puisque le domaine MBP de la protéine de fusion se liera à ce polymère de maltose. Le protocole de la compagnie New England Biolabs (section 3.8.2) a été réalisé sans modification.

À la figure 27, il est possible d'observer l'analyse des échantillons recueillis à chacune des étapes de la purification à l'aide de la colonne d'amylose. L'extrait brut (EB) correspond aux protéines retrouvées dans le cytoplasme des bactéries induites et par conséquent à ce qui a été chargé sur la colonne. Le puits suivant correspond aux protéines non accrochées (Ft) et il est possible d'observer que le patron est identique à celui de l'extrait brut. Les fractions de lavage d'un volume de 12 ml (L1 à L7) ont aussi été analysées. Seule la première fraction de lavage (L1) comprend une quantité de protéines facilement détectable dont le patron ressemble à celui de la fraction Ft. Les protéines retenues par la colonne d'amylose ont ensuite été éluées à l'aide de 10 mM de maltose. La figure 27b correspond aux fractions d'élution et deux protéines sont éluées (fractions E4 et E5), soit une d'environ 90 kDa correspondant à la protéine de fusion MBP-BxlE et une seconde protéine d'environ 44 kDa. Cette dernière protéine est probablement le MBP d'origine chromosomique produit par cette souche malgré la présence de glucose dans le milieu de culture. Dans ces conditions de purification, environ 4 mg de protéine totale par litre de culture ont été obtenus.

Afin de confirmer la purification de la protéine de fusion, un transfert de type Western et une immunodétection à l'aide d'anticorps anti-MBP ont été réalisés. À la figure 28, il est possible de constater l'induction de la protéine de fusion MBP-BxlE ayant un poids moléculaire de 90 kDa dans les puits 1 et 2. De plus, les patrons de protéines réagissant aux anticorps anti-MBP provenant de la souche IAF-102E induite (puits 2) et les fractions éluées de la colonne d'amylose (puits 3 à 7) sont identiques.

Une seconde étape de purification a été nécessaire afin de séparer les protéines de 90 et 44 kDa. Une chromatographie échangeuse d'anion (colonne Q-Sépharose) a été utilisée. On peut observer à la figure 29 que les deux protéines ont été séparées à l'aide de ce type de chromatographie. Les fractions de 9 à 14 contiennent la protéine de 44 kDa et de 16 à 20 la protéine de fusion MBP-BxlE de 90 kDa. Ces dernières fractions ont été combinées et une concentration en protéines de 140 µg/ml a été obtenue lors du dosage par la méthode de Lowry (section 2.9.1). Lors de l'analyse de la concentration en sel, une concentration de 230 mM a été obtenue. Donc aucune dialyse n'a été nécessaire puisque l'entérokinase est capable de supporter une concentration en NaCl de 250 mM.

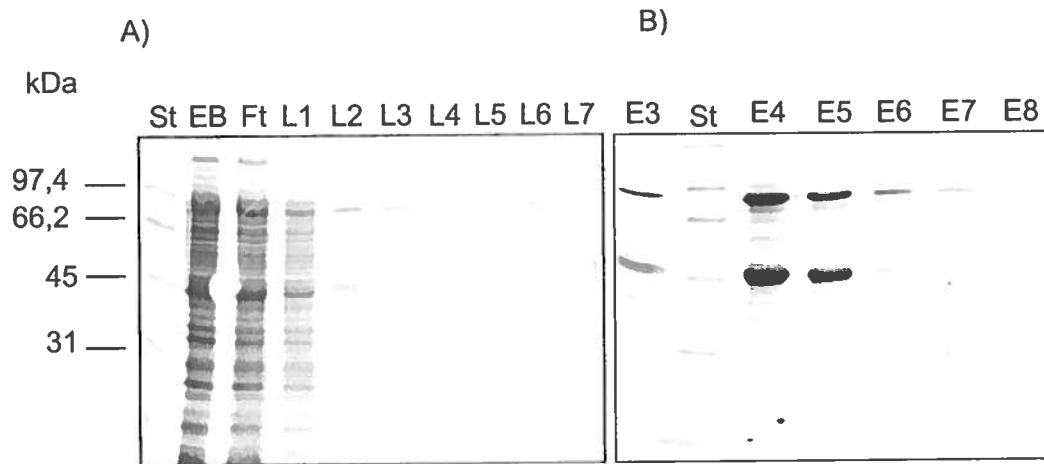


Figure 27: Fractions de la purification de la protéine de fusion MBP-BxlE à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.

Légende :

St : standard de poids moléculaire

A) EB : extrait brut de protéines

Ft : protéines non retenues par la colonne d'amylose

L1 à L7 : fractions de lavage

B) Fractions E3 à E8 correspondent à l'élution des protéines

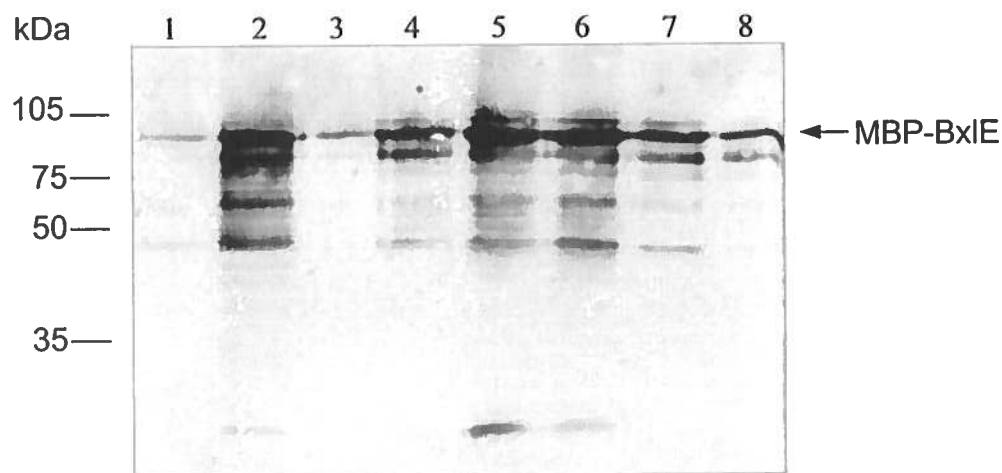


Figure 28: Transfert de type Western et immunodétection des protéines réagissant aux anticorps de lapin anti-MBP lors de l'induction de la souche IAF-102E et de la purification de la protéine MBP-BxlE par chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose.

Légende:

- 1 : souche IAF-102E avant induction
- 2 : " IAF-102E 2 h post-induction
- 3 : 3^{ème} fraction d'élution de la colonne d'amylose
- 4 : 4^{ème} " " " "
- 5 : 5^{ème} " " " "
- 6 : 6^{ème} " " " "
- 7 : 7^{ème} " " " "
- 8 : 8^{ème} " " " "

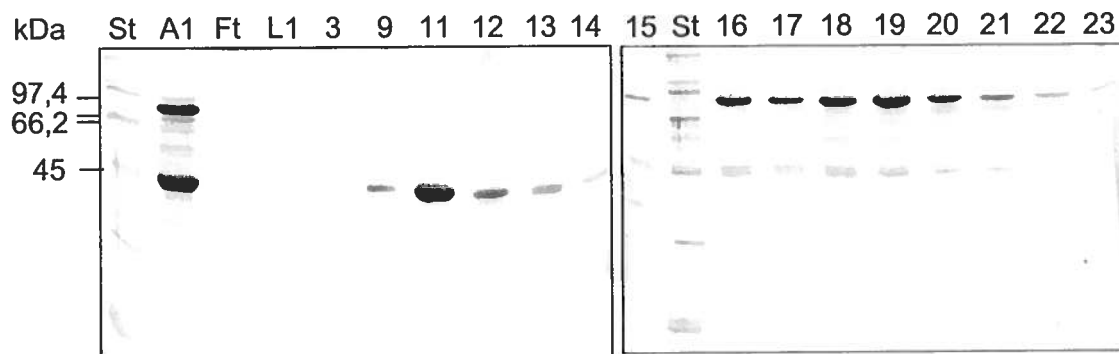


Figure 29: Fractions analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 % lors de la purification de la protéine de fusion MBP-Bx1E par chromatographie échangeuse d'anion.

Légende :

St : standard de poids moléculaire

A1 : pool des fractions E4 et E5 de la première colonne d'amylose (Figure 27b)

Ft : protéines non retenues à la colonne

L1 : 1^{ier} volume de lavage

Différentes fractions lors de l'élution à l'aide d'un gradient linéaire de 25 à 500 mM de NaCl.

4.1.5 Digestion de la protéine de fusion à l'aide de l'entérokinase

Après avoir purifié la protéine de fusion MBP-BxlE, le clivage des deux domaines (MBP et BxlE) à l'aide de l'entérokinase a été réalisé. La figure 30 montre qu'après 24 h de digestion à l'aide de l'entérokinase de la compagnie Novagen, plus de 90 % de la protéine de fusion a été digérée.

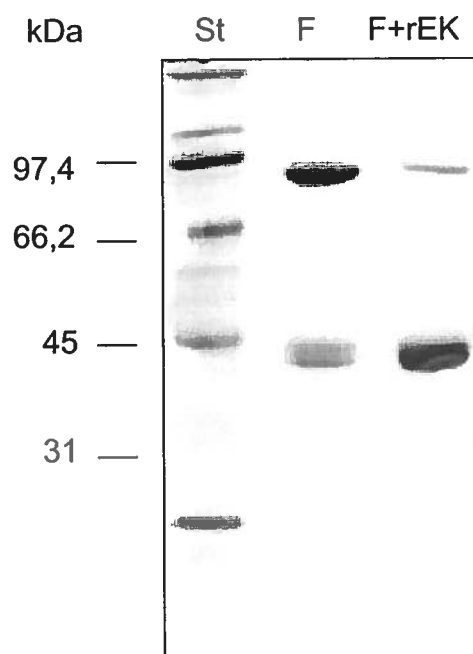


Figure 30: Analyse de la digestion de la protéine de fusion MBP-BxlE par l'entérokinase par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 %.

Légende :

St : standard de poids moléculaire

F : protéine de fusion MBP-BxlE purifiée correspondant aux fractions 16, 17, 18, 19 et 20 de la figure 29

F+rEK : fusion MBP-BxlE digérée pendant 24 h avec l'entérokinase

4.1.6 Purification de la protéine BxlE

Après la digestion de la protéine MBP-BxlE, une deuxième colonne d'amylose a été utilisée afin d'isoler la protéine BxlE. Le domaine MBP de la protéine de fusion ainsi que la fraction non digérée seront retenus à la colonne d'amylose.

À la figure 31, l'analyse par SDS-PAGE des différentes fractions récupérées lors de la deuxième chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose a été réalisée. Une seule protéine de 45 kDa, le domaine BxlE de la protéine de fusion, ne possède pas d'affinité pour la colonne d'amylose et se retrouve dans les fractions Ft et L1. L'élution de la protéine MBP (44 kDa) ainsi que de la protéine de fusion MBP-BxlE non digérée (90 kDa) a été réalisée à l'aide de 10 mM de maltose (puits 2, 3, 4 de la figure 31). Il est possible d'observer un doublet au environ de 44 kDa dans les fractions F+rEK, élution 3 et élution 4 (Figure 31). Ce doublet correspond aux deux formes du MBP qui ont été purifiées : chromosomique de 44 kDa et plasmidique de 42,7 kDa.

Afin de vérifier si la protéine présente dans la fraction Ft de cette deuxième colonne d'amylose est bien la protéine BxlE, une immunodétection de type Western à l'aide d'anticorps anti-MBP a été réalisée (Figure 32). Dans la fraction Ft contenant la protéine BxlE, aucune protéine ne réagit aux anticorps anti-MBP. Par contre, la fraction L1 a été contaminée par le MBP et la protéine de fusion MBP-BxlE.

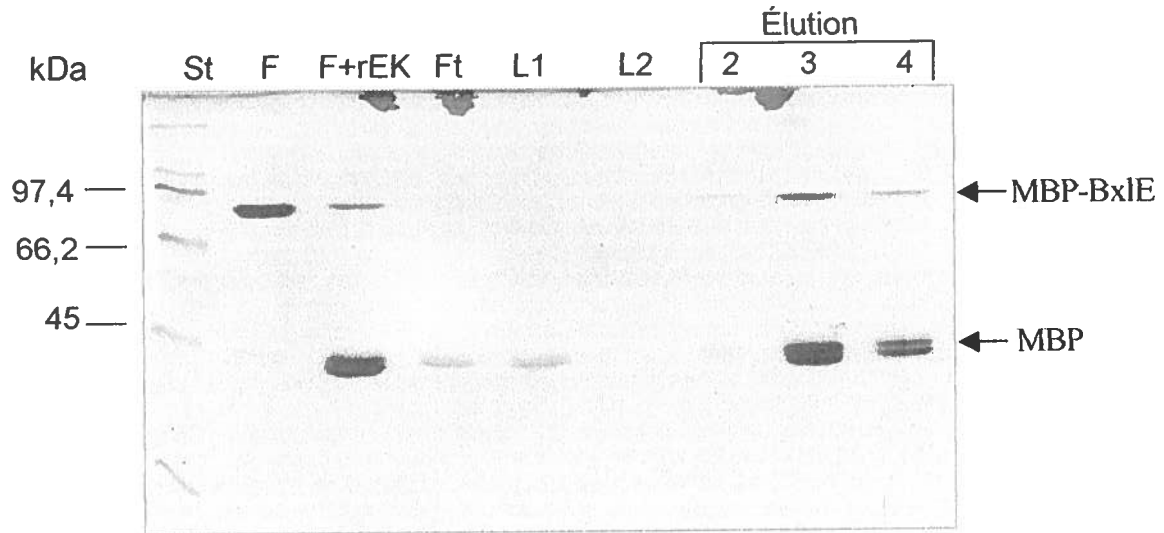


Figure 31: Fractions analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12,5 % lors de la purification de la protéine BxlE à l'aide d'une deuxième chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose.

Légende :

St : standard de poids moléculaire

F : protéine de fusion MBP-BxlE

F+rEK : fusion digérée pendant 24 h avec l'entérokinase

Ft : protéines non retenues par la colonne d'amylose

L1 et L2 : les deux premières fractions de lavage

2 à 4 : fractions récupérées lors de l'élution à l'aide de 10 mM de maltose

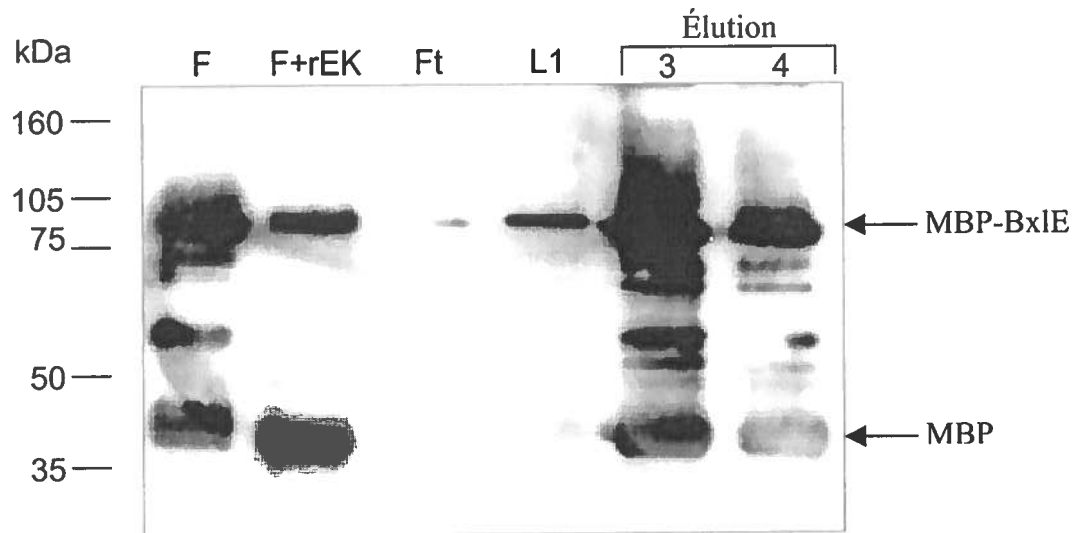


Figure 32: Transfert de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-MBP des fractions obtenues lors de la deuxième colonne d'amylose pour la purification de BxlE.

Légende:

F : protéine MBP-BxlE

F+rEK : fusion digérée pendant 24 h avec l'entérokinase

Ft : protéines non retenues par la colonne d'amylose

L1 : la première fraction de lavage

3-4 : fractions récupérées lors de l'élution à l'aide de 10 mM maltose

4.1.7 Analyse de la protéine BxlE en spectrométrie de masse

L'identité de la protéine purifiée a été confirmée à l'aide de la spectrométrie de masse. Cette méthode d'analyse a été employée puisque la protéine BxlE ne possède aucune activité enzymatique. Les premières tentatives d'identification par cette méthode a été l'utilisation de la protéine entière afin de déterminer sa masse exacte. Malheureusement, même après trois tentatives avec des lots de protéines différents, aucun signal protéique n'a pu être observé, car un contaminant d'origine inconnue masquait la détection et n'a pu être éliminé. Par conséquent, une deuxième alternative a été utilisée. La protéine ayant migré en gel de polyacrylamide a été digérée dans le gel à l'aide de la trypsine. Par la suite, les peptides extraits ont été purifiés à l'aide d'une colonne C18 (Zip Tip C₁₈) et analysés par spectrométrie de masse (Figure 33).

La digestion théorique complète de la protéine BxlE produit 42 peptides. Parmi ceux-ci, les ions correspondant à des m/z^4 de 473, 627, 657, 691 et 746 ont été observés lors de l'analyse du profil des masses sur la charge obtenu lors de la digestion de la protéine BxlE (Figure 33, Tableau III). La fragmentation de ces ions a été tentée afin d'en déduire la séquence en acides aminés. Seuls les pics ayant des m/z de 473, 627 et 746 ont pu être fragmentés et ont donc été analysés.

La correspondance entre la séquence en acides aminés théorique de ces peptides et le spectre de fragmentation obtenu a été tentée à l'aide du logiciel MassLynx/Biolynx. Aux figures 34 et 35, la concordance réalisée de manière informatique avec chacune des deux séquences théoriques (Tableau III) est présentée. Ainsi, il est possible d'observer que l'ion m/z de 473 correspond bien à la séquence IAGPELFAK puisque la différence entre les pics majoritaires du spectre donne la masse moléculaire des acides aminés prédit au début de la séquence (IAGPE) (Figure 34). Les derniers acides aminés n'ont pas été fragmentés et ils correspondent donc à un seul pic du spectre. À la figure 35, la correspondance pour le pic à m/z de 746 est présentée. Le logiciel MassLynx/Biolynx a été en mesure de faire une correspondance avec les premiers acides aminés de la séquence théorique de ce peptide, soit AVLDTIP. Le reste de la séquence n'a pas été fragmenté et

⁴ m/z : masse sur la charge de l'ion détecté

donne donc un seul pic correspondant au reste du peptide. En ce qui concerne le pic à m/z de 627, malgré une certaine fragmentation de ce peptide, aucune séquence continue en acides aminés n'a pu être dérivée.

Les deux peptides fragmentés ayant donné des résultats couvrent deux régions distinctes de la protéine BxlE et sont longs de 9 et 14 acides aminés (Figure 36). Ils permettent donc d'affirmer que la protéine présente dans la fraction Ft de la deuxième colonne d'amylose et digérée dans le gel est bien la protéine BxlE de *S. lividans*.

Tableau III Séquences et masses théoriques correspondant aux pics ayant fait l'objet d'une tentative de fragmentation lors de la confirmation de la purification de Bx1E.

# des résidus	Séquences	m	m/z
213-221	(R)IAGPELFAK(A)	944.53	473.27
150-160	(R)GTQPVLLFHNK(K)	1252.69	627.35
40-51	(K)IHVLVYGDA SNK(I)	1314.69	658.35
150-161	(R)GTQPVLLFHNKK(V)	1380.79	691.40
68-81	(K)AVLDTIPGADYQTK(L)	1490.76	746.39

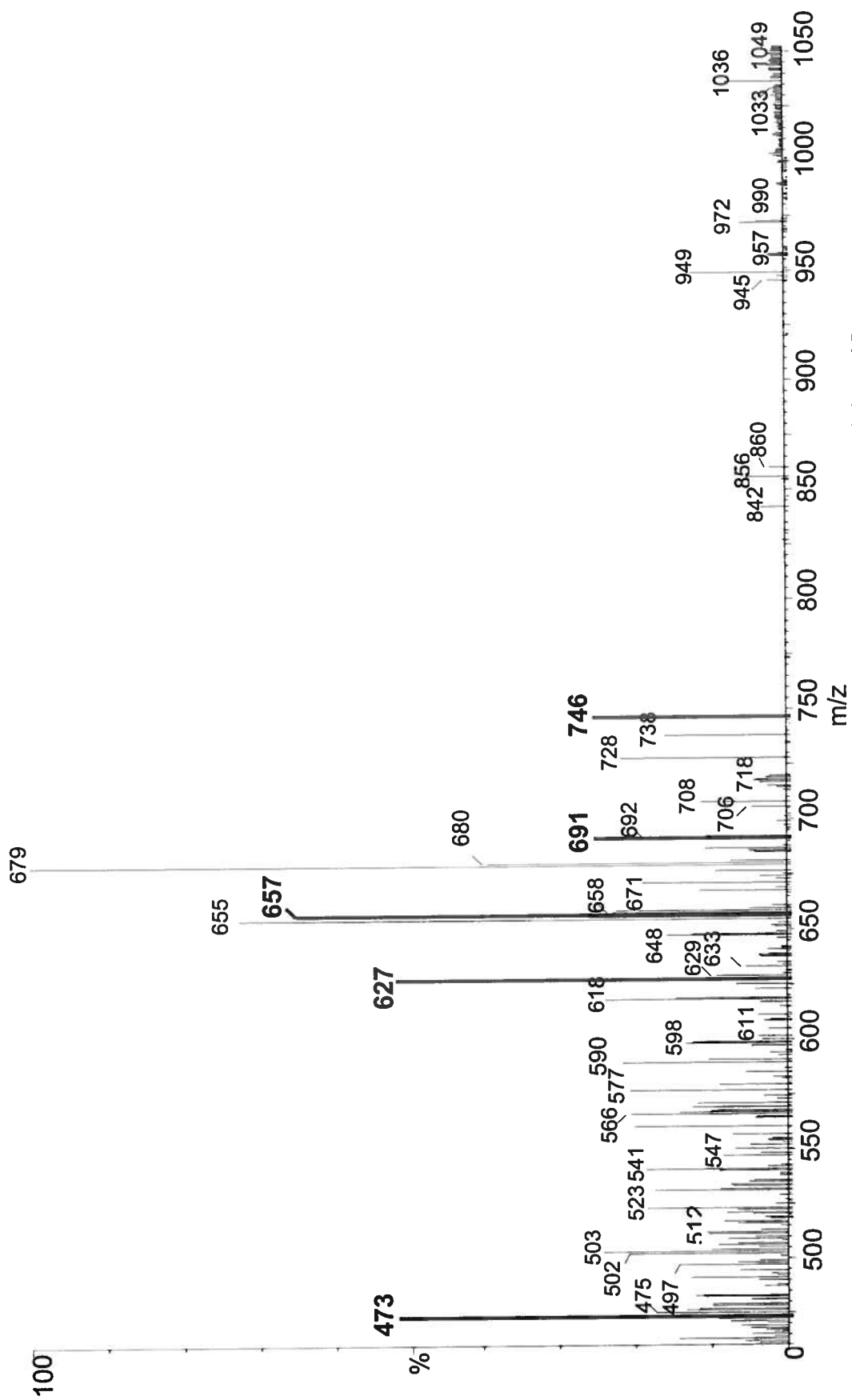


Figure 33: Profil des masses sur la charge (m/z) obtenu lors de la digestion tryptique en gel de BxIE.

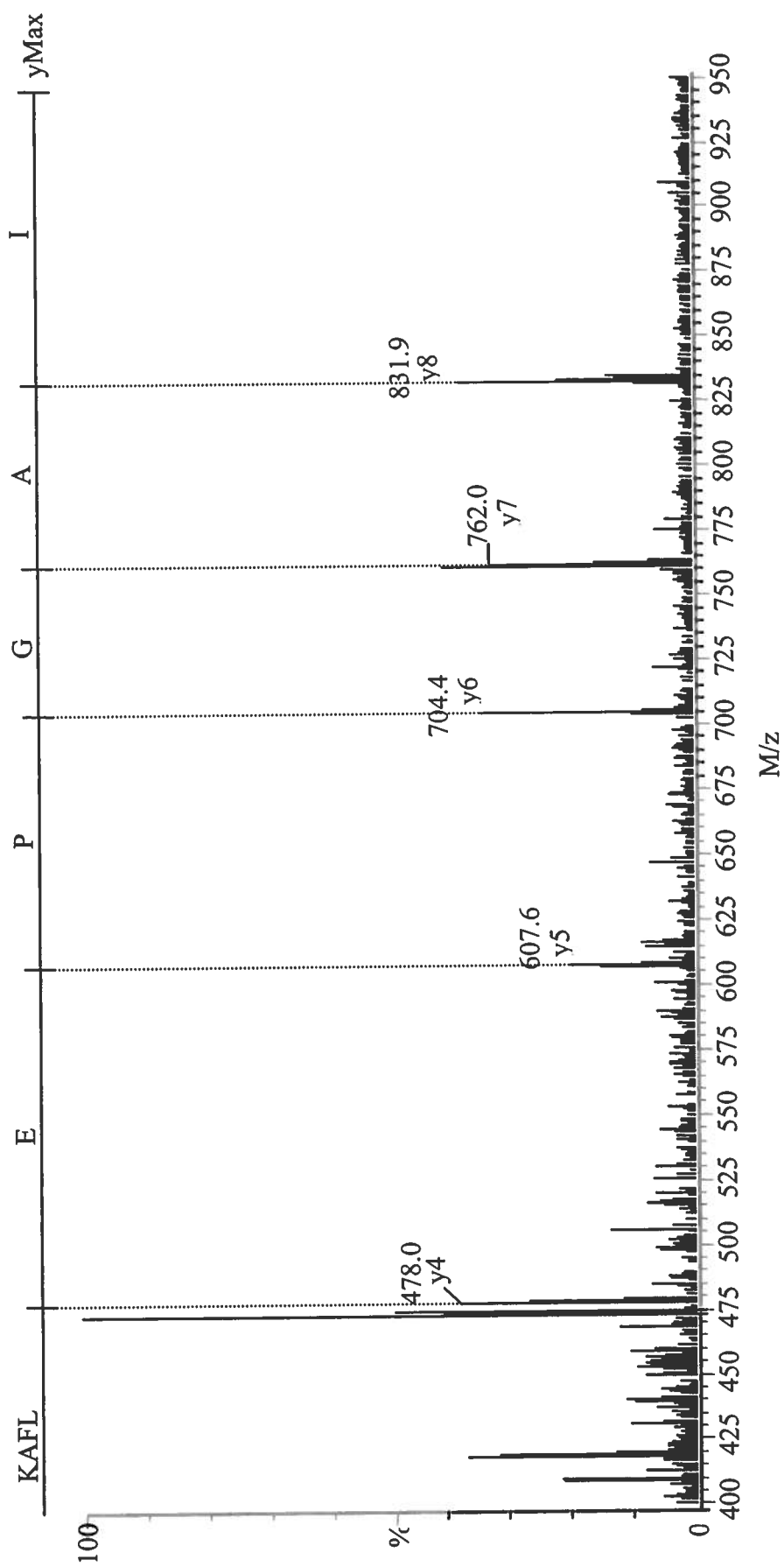


Figure 34: Spectre de fragmentation du pic à m/z de 473.

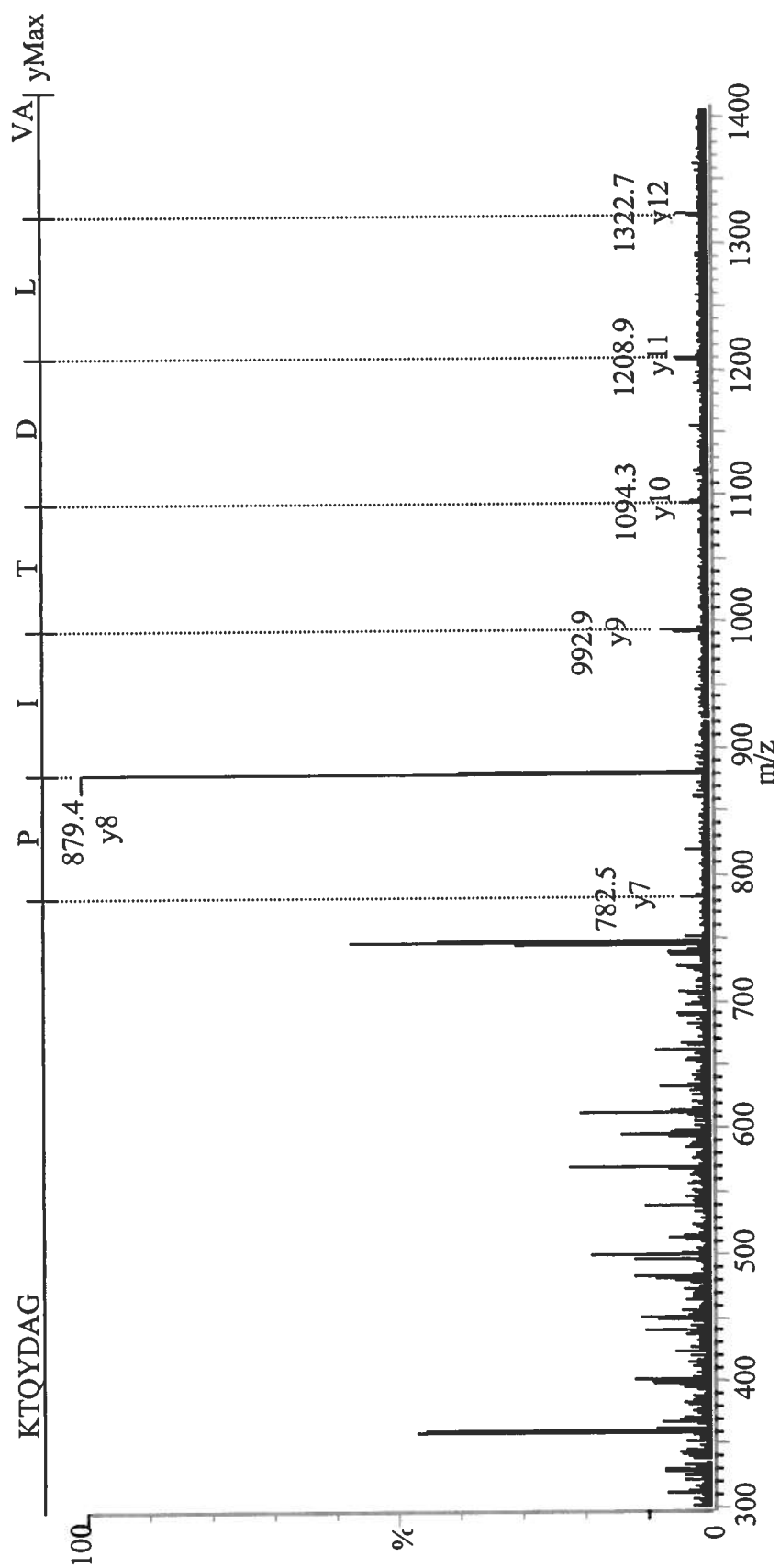


Figure 35: Spectre de fragmentation du pic à m/z de 746.

MKTRARLPRLVATGATLALALSLSACGDGDGGASSDDGKIHVLVYGDA SNKIEQQIVDTF
 NKTS DVK**AVLDTIPGADYQTKL**QTIINTPQAPDIFYNWGGGSIKPFVKADLLLPLDDFIK
 KDPGLKDNFLPSVFNSAVVDGKPYGIPMRGTQPVLLFHNKKVLEDAGVQPPKTWDELLAA
 VGKLKDAGVTPIALGGGDVWPTQMWFQYLYDRI**IAGPELFAKA**IGGDKSAWESADSKKALD
 MISELVDSGAFGKNYDSVKYTNGGSVQLVASGKAGFELMGSWYYSQQLTDHKEFAEKDPR
 YTAFTPVEGGKGD PGNVAGNPNNYYSVMKKTKHPEAAAEFLKLYSDEFVKAHLDIGNLPT
 TTTDKFIDDSATPEYTRFQYDLVSDAPNFQLSWDQAYPQKASSDMHKAIQQFFNGQLD TD
 GFIKAMQALPTE

Figure 36: Séquence en acides aminés de la lipoprotéine BxlE de *S. lividans* et les peptides ayant été identifiés (en gras) par spectrométrie de masse.

4.1.8 Détermination des sucres capables d'interagir avec la protéine BxlE

La purification de la protéine BxlE a été confirmée à l'aide d'un transfert de type Western et par spectrométrie de masse. La caractérisation de cette lipoprotéine devait ensuite être réalisée. Aucune activité enzymatique n'est associée à BxlE puisque son rôle serait de capter les sucres du milieu et faciliter leur transport (Figure 2). Deux méthodes étaient donc à notre disposition afin d'étudier cette protéine : la spectrométrie de masse et la spectrofluorométrie. La spectrométrie de masse ayant été essayée et n'ayant pas donné de résultats satisfaisants pour la protéine intacte (section 4.1.7), l'étude de l'interaction d'une série de sucres avec la protéine BxlE a été effectuée par spectrofluorométrie, afin de cibler ceux capables de passer le pore formé par les protéines BxlF et BxlG.

La protéine BxlE, exempte du domaine MBP, a été purifiée à quatre reprises pour l'étude de son spectre de fixation des sucres en fluorescence. Malheureusement, aucune des préparations de protéines n'émettait une fluorescence caractéristique de forme parabolique, dont le maximum se retrouve aux environs de 340 nm, lors de l'excitation des résidus tryptophane à 280 nm. Par conséquent, les études d'interaction protéine-sucre ont été réalisées avec la protéine de fusion MBP-BxlE. La protéine MBP ayant été purifiée dans les mêmes conditions que la protéine de fusion MBP-BxlE a été utilisée comme contrôle. À la figure 37, il est possible d'observer que les deux protéines ont une fluorescence différente suite à leur excitation par une longueur d'onde de 280 nm. Ainsi, le maximum d'émission de fluorescence se retrouve à 348 nm pour la protéine MBP et à 340 nm pour la protéine MBP-BxlE. L'aspect parabolique des courbes de la figure 37, étendue sur une plage d'environ 100 nm, est caractéristique de l'émission de fluorescence par les résidus tryptophane des protéines.

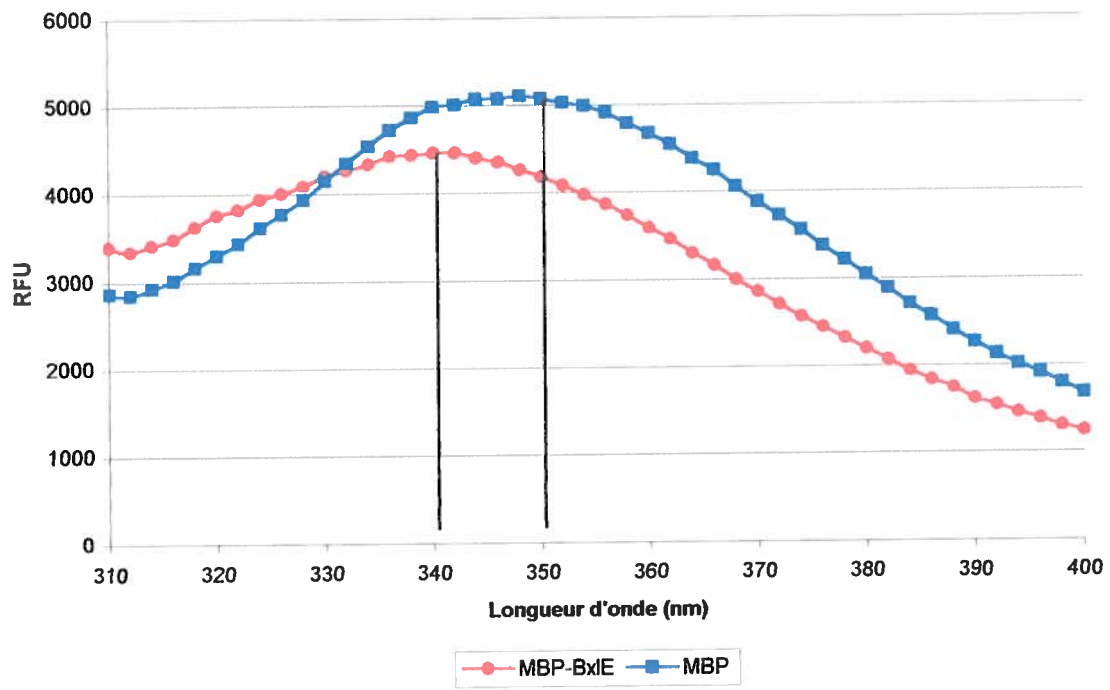


Figure 37: Spectre d'émission des protéines MBP et MBP-BxlE en solution lorsqu'excité à 280 nm.

Après avoir établi les conditions d'analyse de l'émission de la fluorescence pour les deux protéines d'intérêt, les expériences de liaison ont été effectuées. Pour ces dernières, les sucres suivants ont été ajoutés afin de vérifier leur effet sur la fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE : xylose, xylobiose, xylotriose, xylotétraose, xylopentaose, glucose, cellobiose, maltose, lactose, galactose et melibiose. La liaison d'un sucre par une protéine peut influencer, de différentes manières, son spectre d'émission de fluorescence. Ainsi, une augmentation (solvatation) ou une diminution (quenching) de l'intensité de la fluorescence peut avoir lieu. De plus le maximum de la parabole ($\lambda_{\max}$) peut se déplacer vers de plus longues (« red shift ») ou de plus courtes (« blue shift ») longueurs d'onde (Lee, 1997).

De la série de saccharides mentionnée ci-haut, l'influence sur l'émission de la fluorescence de quatre saccharides est présentée aux figures 38 à 42. L'excitation des protéines a été réalisée à 280 nm. Pour chacun des sucres, quatre spectres sont rapportés : les courbes de la fluorescence des deux protéines seules ainsi que celles des protéines avec le sucre. De cette manière, il est possible de comparer la variation de la longueur d'onde maximale ($\lambda_{\max}$) et de l'intensité de la fluorescence. Tous les sucres ont été testés au même moment et c'est ce qui explique que les courbes des deux protéines seules sont identiques pour trois des quatre spectres. Le xylopentaose (X5) fait exception, puisque son effet a été déterminé dans une seconde expérience comprenant le xylotriose (X3) et le xylotétraose (X4) (spectres non montrés).

Le premier spectre (Figure 38) est celui où le maltose a été ajouté. Il est possible d'observer que le $\lambda_{\max}$ du MBP ne varie pas, mais que l'intensité de fluorescence diminue lors de l'ajout de ce sucre. Pour ce qui est du spectre d'émission de la protéine de fusion, la variation d'intensité de fluorescence est positive au lieu d'être négative comme dans le cas de la protéine MBP. De plus, le $\lambda_{\max}$ est déplacé vers de plus courtes longueurs d'onde de 4 nm (« blue shift ») quand du maltose est additionné à la protéine MBP-BxlE.

Le cellobiose (G2) est le deuxième sucre utilisé (Figure 39) et son ajout à la protéine MBP à l'effet d'augmenter légèrement la fluorescence. Par contre, un faible effet de quenching est remarqué sur la protéine de fusion. Pour le déplacement de la longueur d'onde, seul le λ_{max} de la protéine MBP-BxlE est modifié de 2 nm vers une longueur d'onde plus longue (« red shift ») en présence de G2.

La figure 40 permet de constater l'effet de la présence de xylobiose (X2) sur le spectre de fluorescence des deux protéines. Ce sucre ne produit presque aucune variation dans l'intensité de la fluorescence et un « blue shift » de 2 nm est remarqué pour la protéine contrôle MBP. Pour son effet sur la protéine de fusion, ce sucre produit une augmentation importante de la fluorescence et un « red shift » de 2 nm.

Le dernier cas est celui du xylopentaose (X5) (Figure 41). Ce sucre est le seul de la série à émettre une fluorescence lorsque mis en solution dans le tampon C. Ceci explique pourquoi les courbes de l'émission de la fluorescence (MBP + X5 et MBP-BxlE + X5), après soustraction du blanc (tp + sucre), n'ont pas exactement le même profil que celles observées pour les sucres précédents (Figure 38 à 40). L'interaction de ce sucre produit des changements dans le spectre d'émission de fluorescence de la protéine MBP qui sont similaires à ceux observés pour le maltose (Figure 38) (quenching important et aucune variation du λ_{max}). De plus, ces variations sont aussi constatées lors de l'interaction du xylopentaose (X5) avec la protéine de fusion. Le spectre de fluorescence du complexe MBP-BxlE-X5 montre un fort quenching et aucune variation du λ_{max} comparativement à la protéine seule.

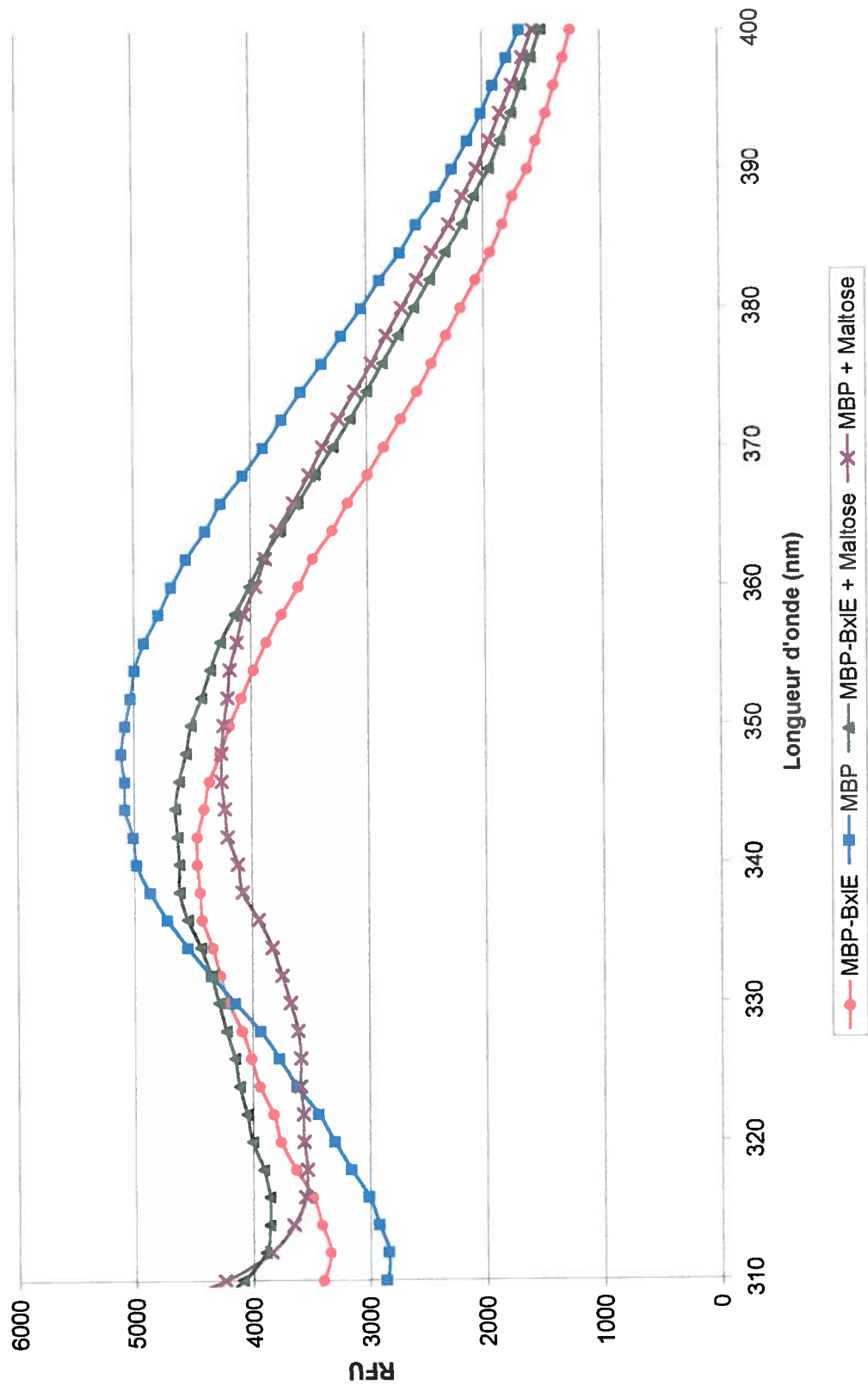


Figure 38: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de maltose.

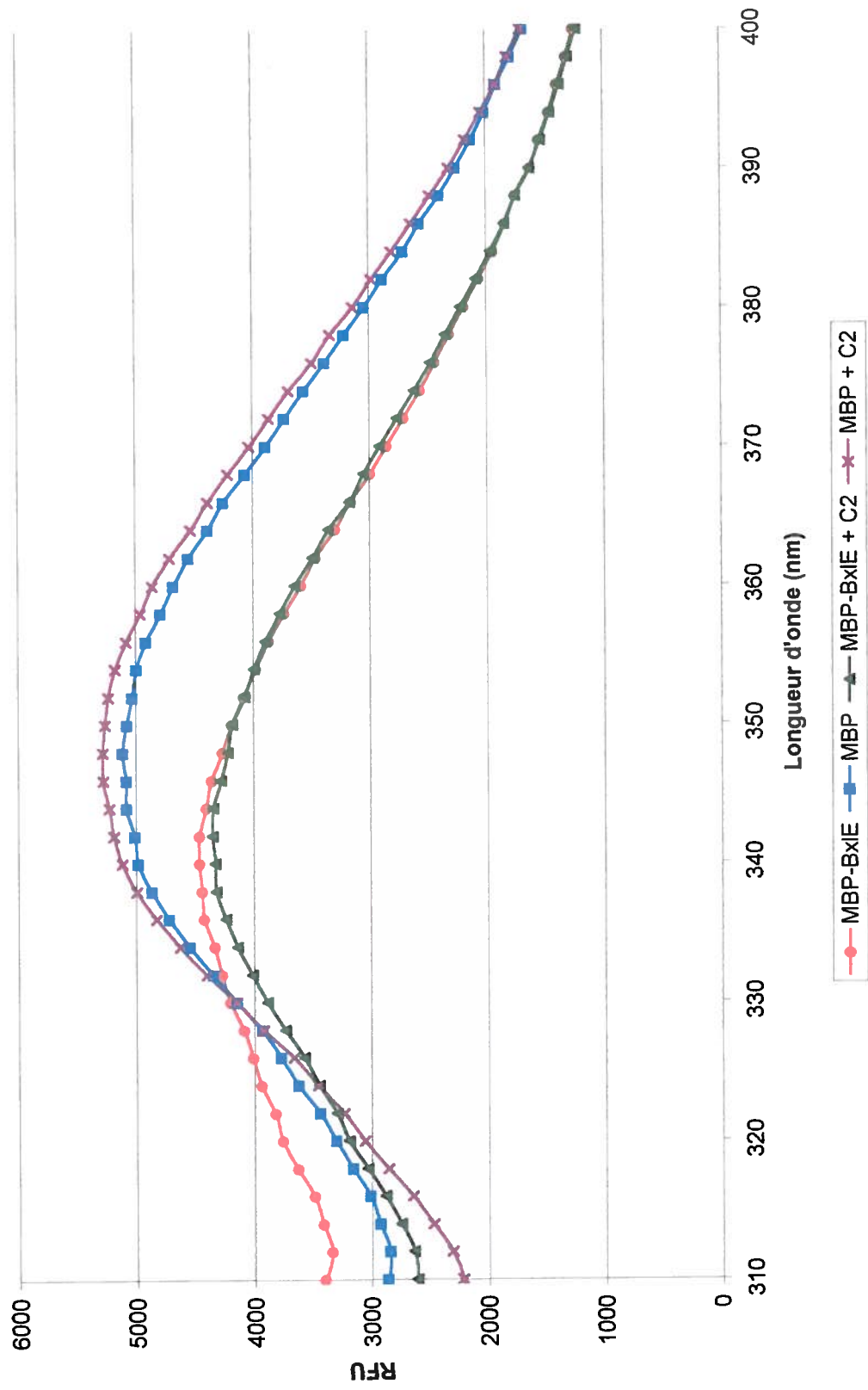


Figure 39: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxIE seules et lors de l'ajout de 5 mM de cellobiose (C2).

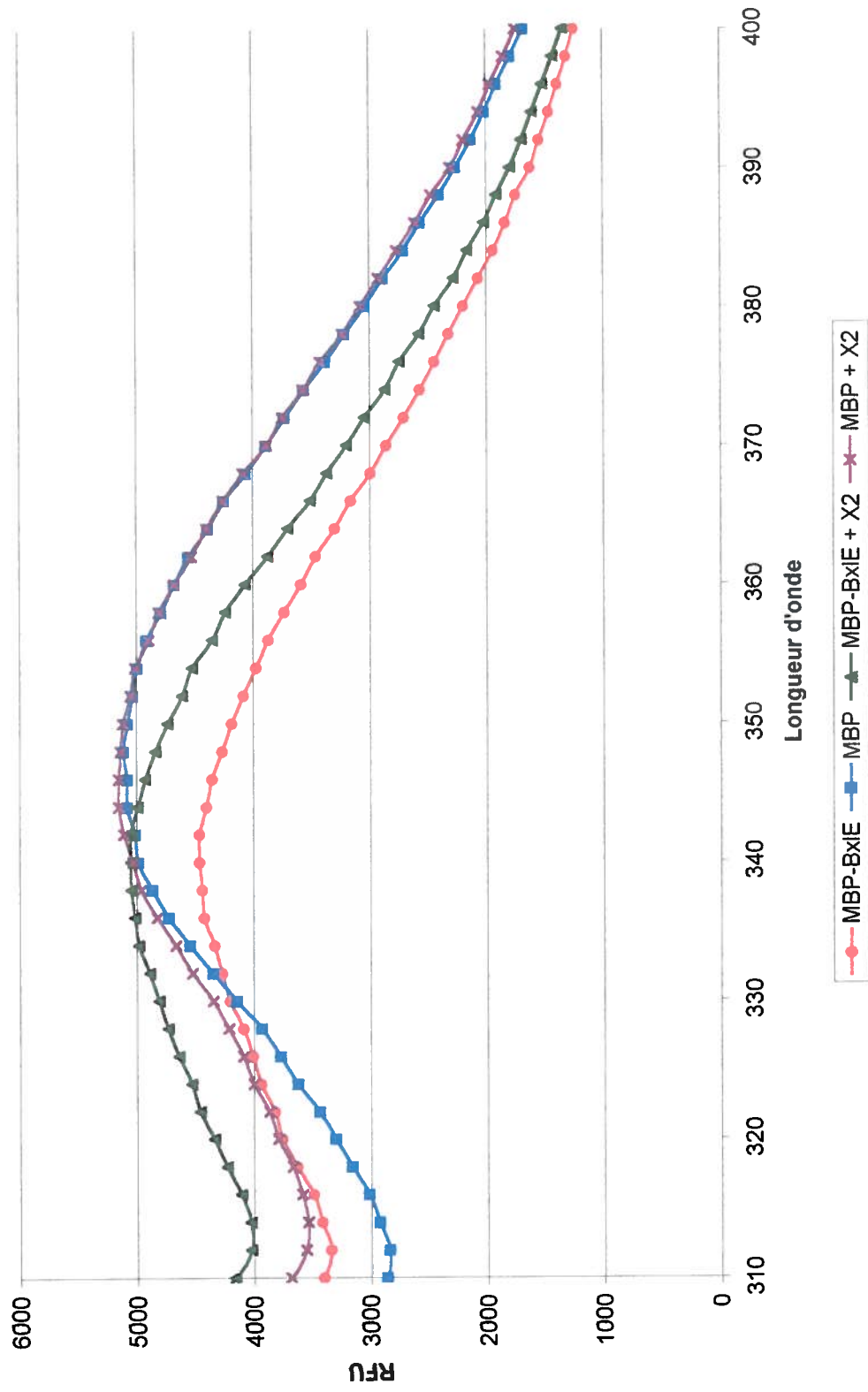


Figure 40: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de xylobiose (X2).

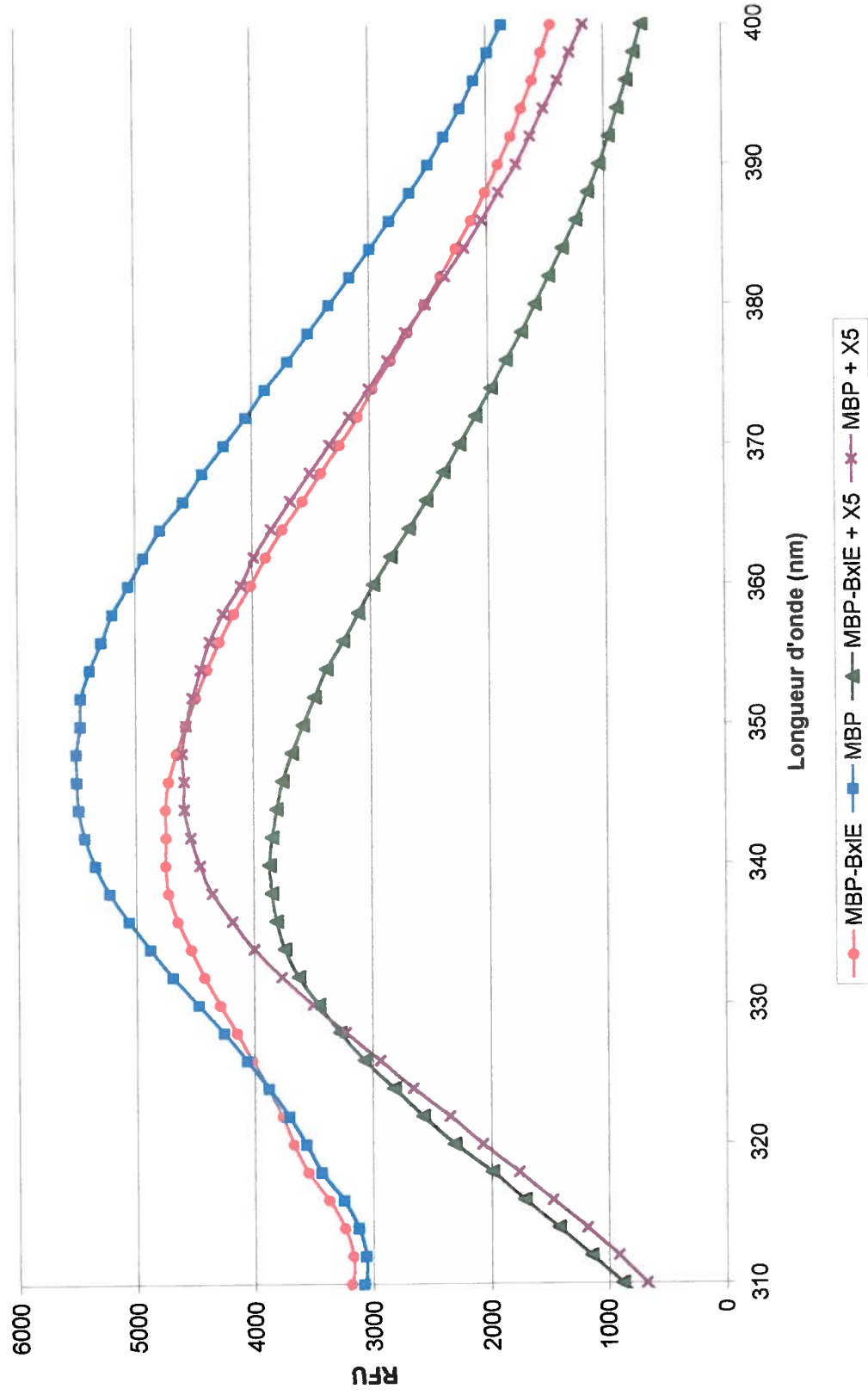


Figure 41: Spectre de fluorescence des protéines MBP et MBP-BxlE seules et lors de l'ajout de 5 mM de xylopentaose (X5).

Le résumé de tous les résultats obtenus en fluorescence est présenté au tableau IV. Lors de l'analyse de ces données, il a été remarqué que les différents xylo-oligosaccharides produisaient un quenching (entre 12 et 16 %) et un « blue shift » (2 nm) sur la fluorescence de la protéine MBP. Seul le xylobiose (X2) ne produit pas ce quenching. De plus, aucun déplacement de la longueur d'onde maximale n'est détecté pour les polymères de haute masse moléculaire (X4 et X5). Les différents xylo-oligosaccharides ont un effet variable de quenching sur la protéine de fusion MBP-BxlE (de 2 à 18 %). Il a été remarqué que cet effet s'accroît avec le degré de polymérisation. Seul le xylose (X) ne répond pas à cette tendance et induit un quenching de la fluorescence de 4 %, se situant entre le xylotriose (X3) (2 %) et le xylo-tétraose (X4) (9 %). De plus, le xylobiose (X2) provoque une augmentation de la fluorescence de la protéine MBP-BxlE. Ce résultat confirme la tendance selon laquelle les courts polymères de xylose produisent un très faible quenching de la fluorescence qui peut mener à une solvation (augmentation de l'intensité de la fluorescence). Par conséquent, l'effet de quenching des polymères de xylose peut se classer ainsi : $X5 > X4 > X > X3 > X2$. Pour ce qui est du déplacement de la longueur d'onde maximale de la protéine de fusion, les polymères de xylose ont une tendance à produire un « blue shift » de 2 nm. Deux sucres font exception à cette règle, le xylobiose (X2) qui produit une augmentation du $\lambda_{\max}$ (2 nm) et le xylopentaose (X5) qui ne fait pas varier ce paramètre.

En plus des polymères de xylose, différents mono- et di-saccharides ont aussi été testés pour leur capacité à interagir avec le domaine BxlE de la protéine de fusion. En comparant les variations de fluorescence et les $\lambda_{\max}$, il a été remarqué que certains sucres influencent de la même manière les protéines. Ainsi, le cellobiose et le melibiose font augmenter la fluorescence du MBP (3 et 2 %) sans modifier son $\lambda_{\max}$ et produisent un effet de quenching sur la protéine de fusion (3 et 20%) en provoquant aussi un « red shift » de 2 nm. Le glucose, le maltose, le lactose et le galactose ont tous le même effet sur la fluorescence des protéines : quenching de la fluorescence du MBP (entre 5 et 20 %) et solvation pour la protéine de fusion (entre 2 et 6 %). Pour ce qui est de la longueur d'onde maximale, le galactose et le lactose provoquent tous les deux un « blue shift » de 2 nm pour le MBP sans avoir d'effet sur la protéine de fusion. Le glucose provoque un

déplacement vers les plus courtes longueur d'onde pour les deux protéines (2 et 4 nm). Le maltose, quant à lui, n'influence pas le λ_{max} pour le MBP, mais provoque un « blue shift » de 4 nm pour la protéine de fusion.

Tableau IV Résumé des données obtenues lors des expériences de fluorescence avec les protéines MBP et MBP-BxlE en présence de différents sucres.

Sucre ^a	Différence de RFU en % ^b		Différence de $\lambda_{\max}$ ^d	
	MBP ^c	MBP-BxlE ^c	MBP ^c	MBP-BxlE ^c
Xylobiose (X2)	1	13	-2	2
Xylotriose (X3)	-12	-2	-2	-2
Xylose (X)	-12	-4	-2	-4
Xylotétraose (X4)	-16	-9	0	-2
Xylopentaose (X5)	-16	-18	0	0
Cellobiose (G2)	3	-3	0	2
Melibiose	2	-20	0	2
Galactose	-5	3	-2	0
Glucose	-8	2	-2	-4
Maltose	-17	4	0	-4
Lactose	-20	6	-2	0

^a La structure des différents sucres est illustrée à l'Appendice A.

^b Une valeur négative signifie une diminution de la fluorescence lors de l'ajout du sucre à la protéine.

^c Fluorescence de la protéine avec le sucre soustraite de la fluorescence de la protéine sans le sucre, exprimé en pourcentage.

^d $\lambda_{\max}$ de la protéine avec le sucre soustrait du $\lambda_{\max}$ de la protéine seule.

^e Une valeur négative signifie que le déplacement se fait vers des longueurs d'onde plus courtes (« blue shift ») et une valeur positive que le déplacement se fait vers des longueurs d'onde plus longues (« red shift »).

4.2 Construction d'une protéine de fusion ancrée à la paroi de *Streptomyces lividans*

4.2.1 Clonage du gène *fusionEA*

Les séquences nucléotidiques codant pour le peptide signal de BxlE et pour le domaine catalytique de la xylanase A (XlnA₂) de *S. lividans* ont été amplifiés afin de les fusionner en phase. Pour ce faire, les amorces BxlD5', FusA2, FusB2 et BxlD3' ont été synthétisées (Tableau II). L'extrémité 5' du gène *bxlE*, codant pour le peptide signal, a été amplifié à partir du cosmide 1H10. Le plasmide pIAF18 a été utilisé comme matrice lors du PCR afin d'obtenir le gène *xlnA₂*. L'amorce s'hybridant à l'extrémité 5' de la séquence nucléotidique du peptide signal (BxlD5') contient le site de restriction *SphI* (GCATGC). À l'extrémité 3' du gène *xlnA₂*, le site de restriction *SacI* (GAGCTC) a été introduit à l'aide de l'amorce BxlD3'. Ces deux sites de restriction, insérés à chacune des extrémités du gène de fusion, permettront son clonage directionnel. Afin de fusionner les deux sections de gène, l'amorce en 3' de la séquence nucléotidique du peptide signal de BxlE (FusA2) est complémentaire à l'amorce en 5' du gène *xlnA₂* (FusB2). La fusion des deux régions a été effectuée par une troisième amplification élective *in vitro* (Figure 42).

À la figure 43, il est possible d'observer les deux premiers produits de PCR, soit l'extrémité 5' du gène *bxlE* codant pour le peptide signal de BxlE (143 pb) et le gène *xlnA₂* (938 pb). Lors de la troisième amplification pour obtenir le gène de fusion, la présence d'amplification non spécifique a exigé la purification du produit de PCR à partir du gel d'agarose (Figure 44). Ensuite, le gène de fusion a été cloné dans le vecteur d'expression pC109MCS (Figure 12) entre les sites de restriction *SphI* et *SacI*. Le produit de ligation a été transformé dans la souche *S. lividans* 10-164 (section 3.2) qui possède une activité xylanolytique nulle. Ainsi, l'effet de la surexpression d'une xylanase ancrée à la paroi de la bactérie pourra facilement être observé. Les transformants ont été repiqués sur le milieu RBB-xylane et un des clones possédait une zone d'hydrolyse. L'ADN plasmidique a donc été extrait en duplicata (Figure 45) afin de s'assurer que l'insert de 1049 pb correspondant au gène *fusionEA* était bien présent dans le plasmide pC109MCS (plasmide pIAF-EA).

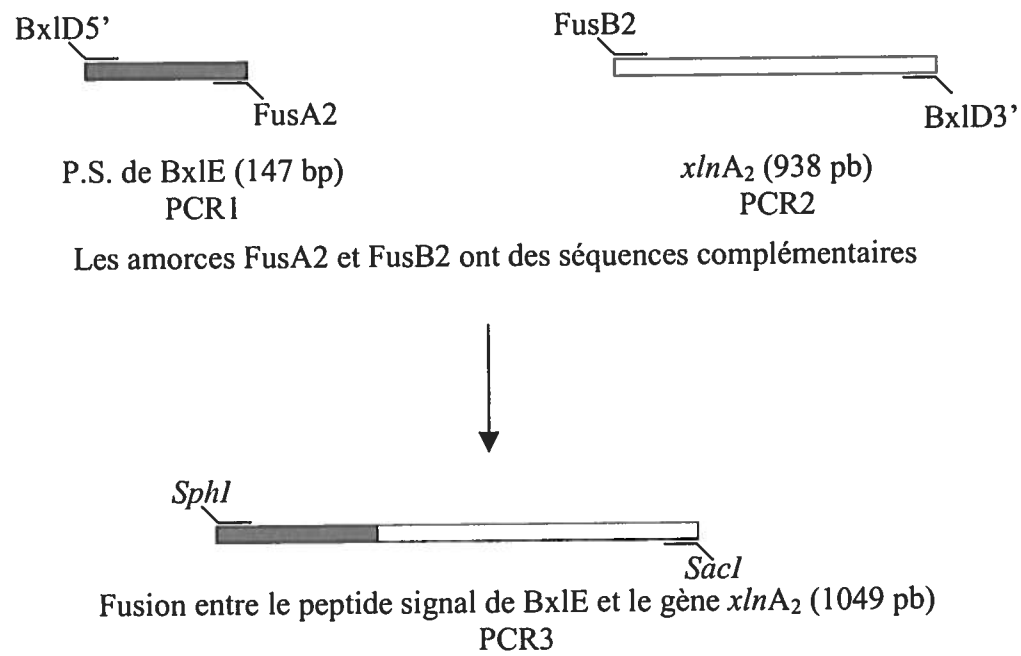


Figure 42: Construction théorique du gène *fusionEA*.

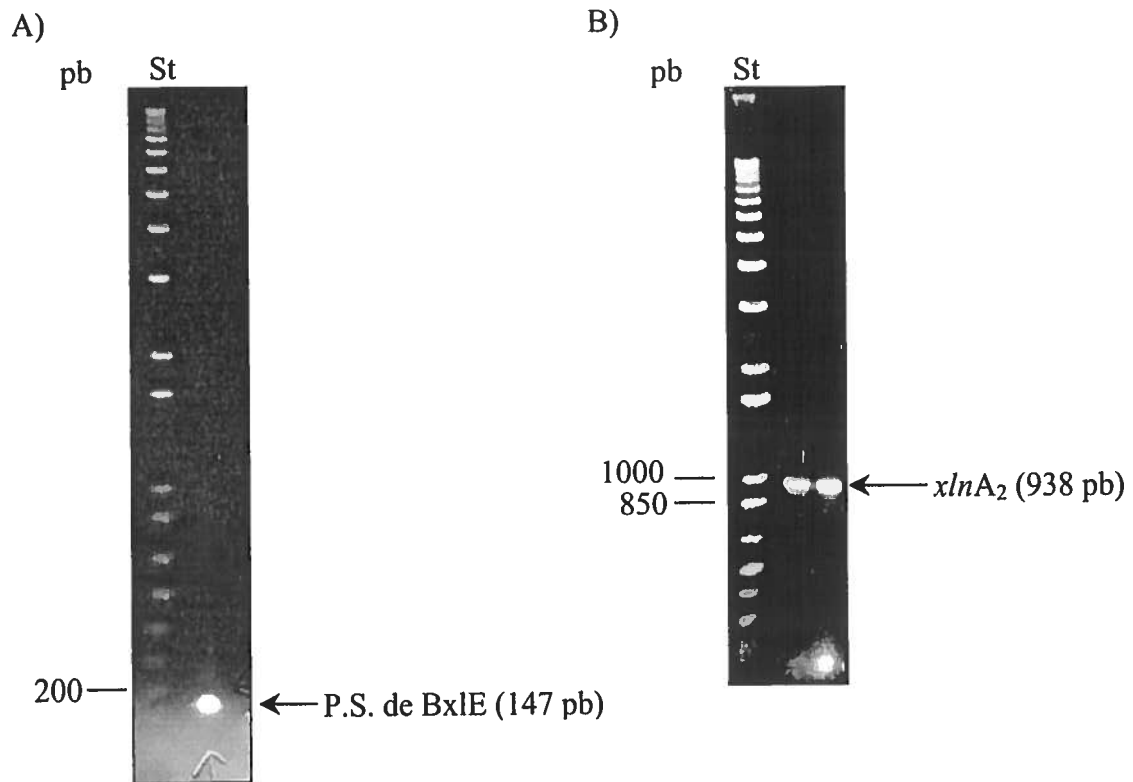


Figure 43: Analyse en gel d'agarose 0,7 % des produits d'amplification des deux fragments d'ADN pour la construction du gène *fusionEA*.

Légende :

St : standard 1 Kb plus DNA ladder

A : Amplification de la séquence nucléotidique codant pour le peptide signal de BxlE. Amplicon de 147 pb correspondant à la longueur attendue

B : Amplification de *xlnA2*. Amplicon de 938 pb correspondant à la longueur attendue

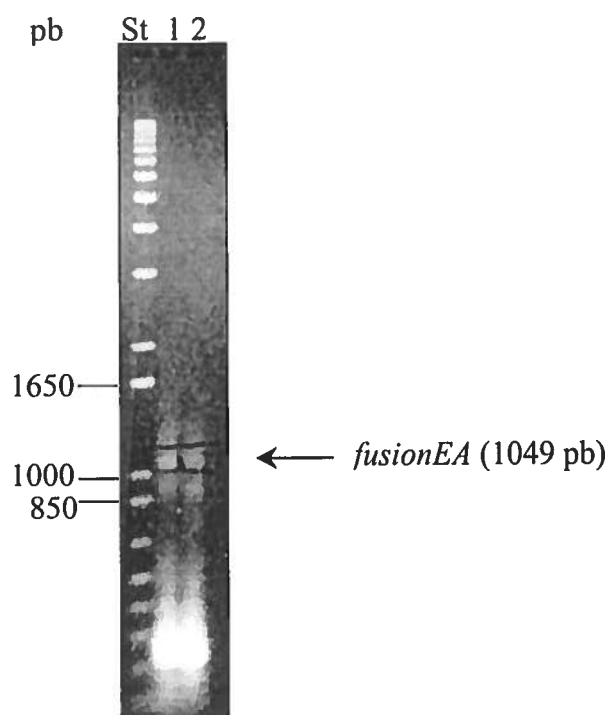


Figure 44: Analyse en gel d'agarose 0,7 % de l'amplification PCR réalisée pour obtenir le gène *fusionEA*.

Légende :

St: standard 1 Kb plus DNA ladder

1: essai #1

2: essai #2

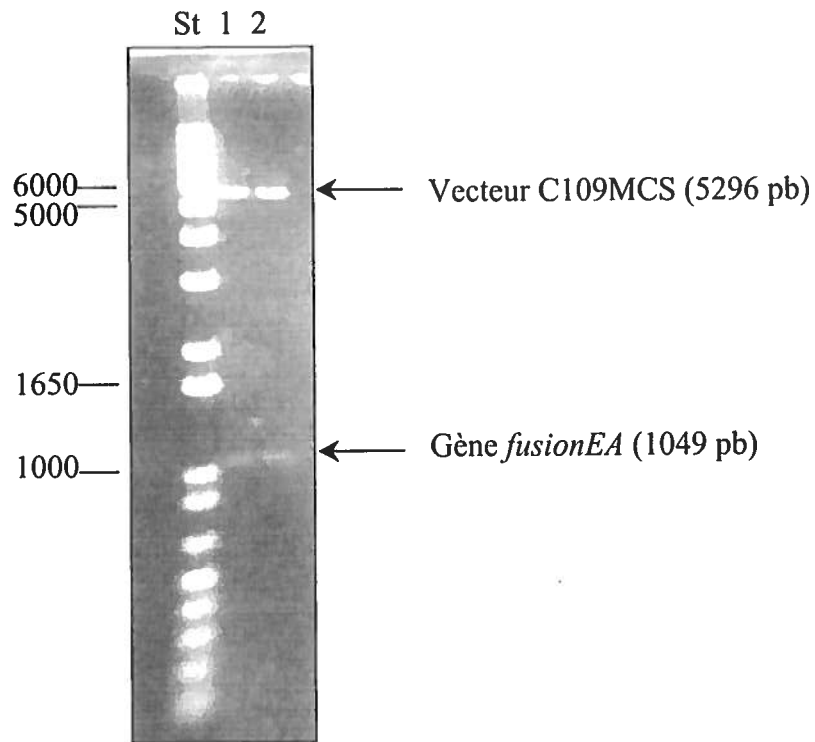


Figure 45: Analyse en gel d'agarose 0,7 % d'un transformant obtenu lors du clonage du gène *fusionEA* dans le vecteur pC109MCS possédant une activité d'hydrolyse sur le milieu RBB-xylane.

Légende :

St: standard 1 Kb plus DNA ladder

1: Essai #1

2: Essai #2

4.2.2 Analyse de la souche IAF-EA

La première étape de l'analyse de la souche IAF-EA a été de réaliser des immunodétections à l'aide d'anticorps anti-XlnA₂ afin de détecter la protéine fusionEA. La figure 46A montre que les anticorps anti-XlnA₂ réagissent avec trois protéines du mycélium de la souche IAF-EA (puits 3, 4 et 5). Les protéines de 31 kDa et 46 kDa se retrouvent autant au niveau du mycélium contrôle (puits 2) que celui de la souche IAF-EA. Dans ce dernier mycélium, une troisième protéine de 33 kDa a été retrouvée et possède le même poids moléculaire que la xylanase A₂ (puits 1). Après avoir déterminé que la protéine fusionEA (protéine de 33 kDa) était associée au mycélium de la souche IAF-EA, le surnageant de culture a été analysé. À la figure 46B, il a été possible d'observer qu'après 48 et 72 h de croissance, la protéine fusionEA est détectée dans le surnageant de culture. À l'inverse, après 24 h de croissance aucune protéine ne peut être détectée.

D'après les résultats de la figure 46, la protéine fusionEA demeure associée au mycélium durant les 24 premières heures de croissance en milieu liquide. Donc, des cultures de la souche IAF-EA ont été réalisées pendant 24 h afin d'effectuer des essais d'inactivation, de stabilisation et de conservation du mycélium. Pour ce faire, de l'azoture de sodium à une concentration de 50 mM et 0,1 % de formaldéhyde ont été utilisés pour voir leur effet sur les protéines et le mycélium de la souche IAF-EA.

Après le traitement des bactéries, des immunodétections ont été réalisées afin de visualiser l'emplacement des protéines (mycélium versus surnageant). L'effet recherché était la stabilisation de la protéine de fusion tout en conservant son activité enzymatique. À la figure 47, il est possible de constater que le même patron réagissant aux anticorps anti-XlnA₂ peut être retrouvé autant dans le surnageant que dans le mycélium lorsque les bactéries sont uniquement traitées à l'azoture de sodium (puits 1 et 2). La présence de formaldéhyde prévient le relâchement d'une partie des protéines. Par contre, dans ce cas, la protéine de 33 kDa se retrouve tout aussi bien dans le mycélium que dans le surnageant (puits 4 et 5). En se basant sur les résultats de la figure 46A), la protéine relâchée dans le surnageant semble être la fusionEA.

Par la suite, il était important de s'assurer que les protéines détectées étaient actives. Des tests d'activité enzymatique à l'aide de la méthode PAHBAH (section 3.3.2.1) ont donc été réalisés avec le mycélium ayant subi les deux traitements. Il est possible de constater à la figure 48 que la souche IAF-EA possède nettement plus d'activité xylanasiqque que le contrôle, soit la souche *S. lividans* C109MCS (section 3.2). Lorsque l'activité xylanasiqque est analysée au cours du temps, il est possible de constater que le traitement à l'azoture de sodium permet de conserver l'activité. L'ajout de formaldéhyde fait chuter l'activité de l'enzyme associée au mycélium de plus de 75 % en 15 jours.

La microscopie électronique a été utilisée afin de tenter de visualiser l'emplacement exact de la protéine fusionEA exprimée par la souche IAF-EA. Étant donné que toutes les immunodétections avaient été réalisées à l'aide des anticorps anti-XlnA₂, ces derniers ont aussi été utilisés dans cette dernière expérience. Par conséquent, le mycélium de la souche IAF-EA ainsi que celui du contrôle, la souche *S. lividans* C109MCS, ayant été traité uniquement à l'azoture de sodium ont été analysés par microscopie électronique à l'aide d'une détection indirecte. Cette technique consiste en l'utilisation d'un premier anticorps afin de reconnaître la protéine d'intérêt. Par la suite, une deuxième réaction immunologique est réalisée à l'aide d'un second anticorps couplé à des billes d'or colloïdales. Ainsi, il sera possible d'observer un point dense aux électrons pour chaque réaction immunologique. Malheureusement, aucune région de la bactérie ne possédait de billes d'or de manière à confirmer la localisation de la protéine fusionEA dans le mycélium de la souche IAF-EA. De plus, les bactéries visualisées étaient des cadavres. Ce dernier résultat est explicable par la présence d'azoture de sodium (Robert Alain, communication personnelle).

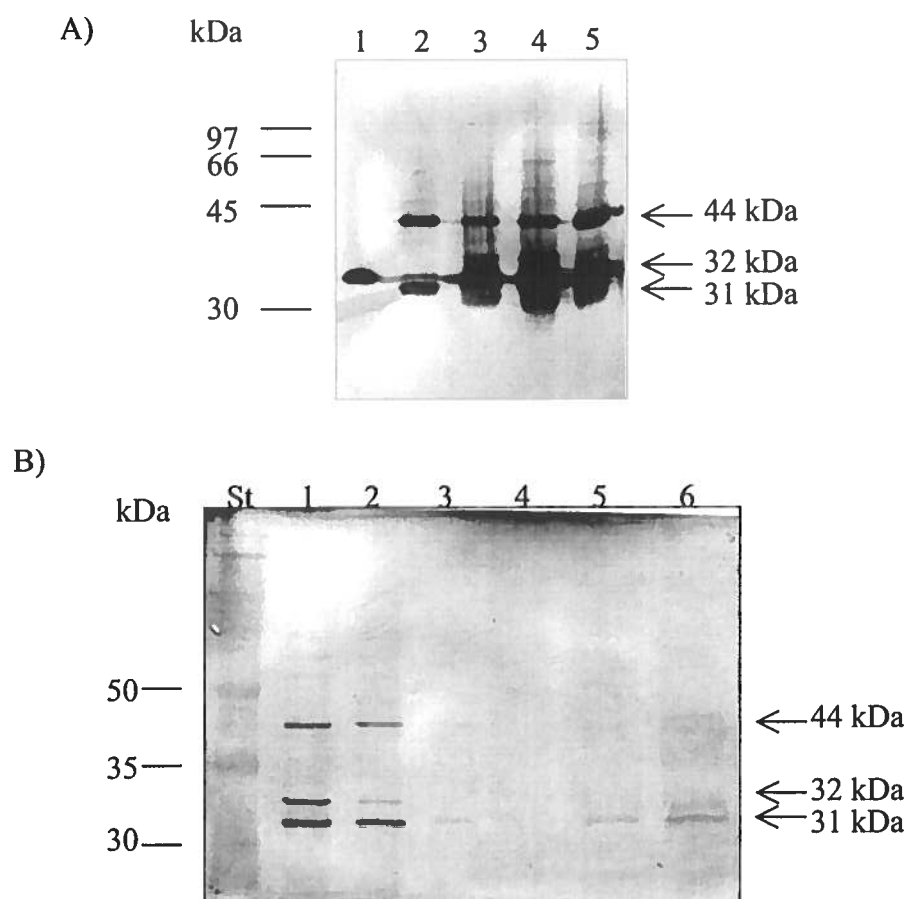


Figure 46: Détection de la protéine fusionEA par transfert de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-XlnA₂.

Légende :

A)

- 1 : xylanase A₂ pure
 2 : mycélium de la souche *S. lividans* 10-164 après 72h de croissance
 3 : " " IAF-EA " 24h "
 4 : " " IAF-EA " 48h "
 5 : " " IAF-EA " 72h "

B)

- 1 : mycélium de la souche IAF-EA après 24h de croissance
 2 : " " IAF-EA " 48h "
 3 : " " IAF-EA " 72h "
 4 : surnageant de culture de la souche IAF-EA après 24h de croissance
 5 : " " " IAF-EA " 48h "
 6 : " " " IAF-EA " 72h "

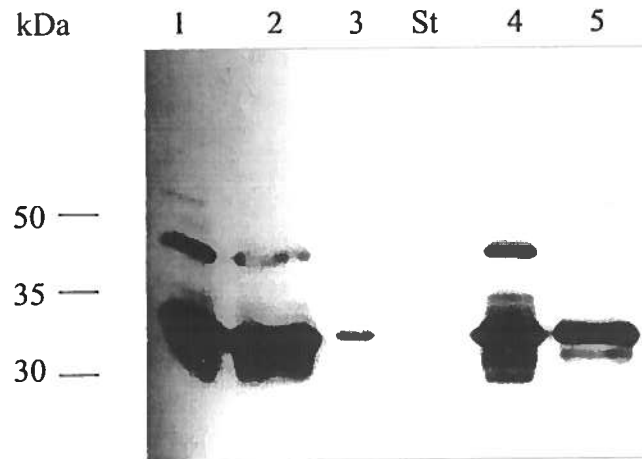


Figure 47: Analyse de type Western et immunodétection à l'aide d'anticorps de lapin anti-XlnA₂ de la stabilité de la protéine fusionEA.

Légende :

- St : standard de poids moléculaire pré-coloré
- 1 : mycélium traité à l'azoture de sodium
- 2 : surnageant du mycélium traité à l'azoture de sodium
- 3 : xylanase A₂
- 4 : mycélium traité à la formaldéhyde
- 5 : surnageant du mycélium traité à la formaldéhyde

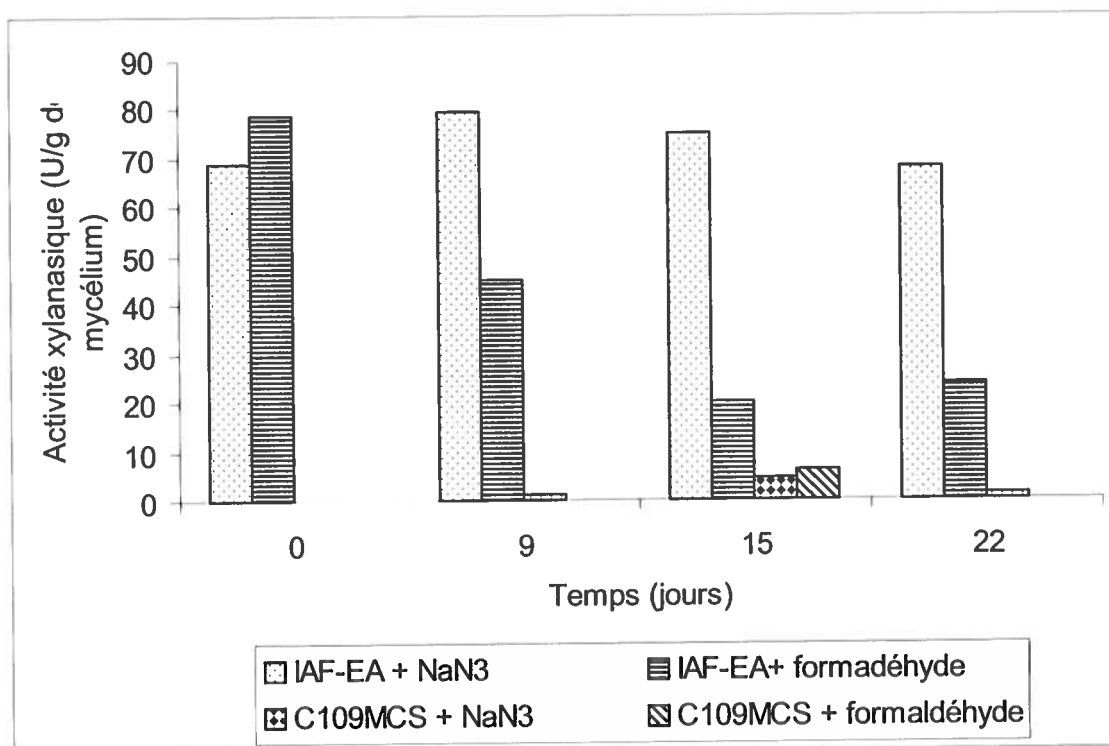


Figure 48: Activité xylanasique au cours du temps en fonction du traitement du mycélium.

Légende :

IAF-EA : souche IAF-EA

C109MCS : vecteur pC109MCS dans la souche *S. lividans* 10-164

NaN3 : azoture de sodium

Les données ont été rapportées en unité d'activité enzymatique par gramme de mycélium.

5 Discussion

5.1 Purification de BxlE

L'étude des différentes enzymes du système xylanolytique de *S. lividans* a été réalisée en majeure partie par clonage homologue, puisqu'elles sont sécrétées et peuvent facilement être purifiées à partir du surnageant de culture. Seules les deux protéines cytoplasmiques MsiK (Penzès, 1995) et BxlR (Larocque, 1998 et Raposo, 2000) ont été clonées de manière hétérologue chez *Escherichia coli* et purifiées. Les techniques d'étiquette de poly-histidines et de protéines de fusion ont été utilisées pour la purification des protéines MsiK et BxlR respectivement. Pour la lipoprotéine BxlE, l'approche du clonage hétérologue a aussi été employée puisque l'expression des lipoprotéines MsmE de *S. mutans*, XylF de *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E ou de Omp10, Omp16 et Omp19 de *Brucella* spp. a été réussi chez *E. coli* (Sutcliffe, *et al.*, 1993, Erbeznik *et al.*, 1998 et Tibor *et al.*, 1999).

5.1.1 Clonage du gène *bxlE* dans le vecteur pMal-c2E

La première approche employée a été l'expression de la protéine BxlE seule et sa purification à l'aide d'une queue de six histidines, de la même manière que Penzès l'avait réalisé pour MsiK en 1995. Malheureusement aucune expression et purification de BxlE n'ont pu être détectées par cette méthode. Dans la littérature, seul Martin et ses collaborateurs en 1989 ont rapporté que les protéines MalX et AmiA, deux lipoprotéines de *Streptococcus pneumoniae*, avaient un effet toxique sur *E. coli*. L'hypothèse émise par ces auteurs, pour cette toxicité apparente, était l'encombrement du système de sécrétion de l'hôte.

Afin de contourner le problème de toxicité apparente de la protéine BxlE exprimée chez *E. coli*, le système de protéines de fusion a été employé. De cette manière, la protéine BxlE n'était pas dirigée à la membrane de l'hôte par son peptide signal. Pour ce faire, *bxlE* a été cloné en aval du gène *malE* dans le vecteur d'expression pMal-c2E. Ce clonage permet d'obtenir une protéine formée de deux domaines, soit la protéine liant le maltose (MBP) pour la purification de la fusion et de BxlE, la protéine d'intérêt. La modification génétique du peptide signal présente au niveau du vecteur

pMal-c2E permet de retrouver une protéine de fusion cytoplasmique, ce qui est important pour la purification. Après avoir obtenu la souche IAF-102E et confirmé la présence de tous les éléments génétiques, les travaux d'expression ont débuté.

5.1.2 Expression et purification de la protéine MBP-BxIE

Dans la première expérience, une température de 37 °C a été utilisée autant pour la production de la biomasse que celle de la protéine de fusion. Ces essais ont été réalisés selon les indications du fournisseur du vecteur pMal-c2E (New England Biolabs). Lors des analyses en gel de polyacrylamide, aucune protéine ayant un poids moléculaire d'environ 90 kDa n'a pu être visualisée. L'hypothèse émise pour expliquer ce résultat est la formation de corps d'inclusion. Ces agrégats de protéines se retrouvent dans le cytoplasme et peuvent être solubilisés uniquement à l'aide d'agents dénaturants comme l'urée ou la guanidine. Afin de produire une protéine de fusion soluble, des températures de croissance plus basses (25 et 30 °C) ont été testées, après l'ajout de l'inducteur (Schein, 1989). Les analyses en gel de polyacrylamide et par immunodétections ont révélé que la production de protéines de fusion est plus importante lors de l'utilisation d'une température d'incubation de 25 °C après l'ajout de l'IPTG et d'un temps d'induction de 2 h. À l'aide de ces paramètres, la protéine de fusion a été exprimée sous forme soluble et a pu être purifiée.

Lors de la production de la protéine de fusion, 0,2 % p/v de glucose ont été ajoutés afin de réprimer la copie chromosomique du gène *malE* et ainsi purifier spécifiquement la protéine MBP-BxIE. Le gène *malE* d'*E. coli* fait parti de l'opéron *mal* qui est sujet à la répression catabolique par le glucose (Wiesmeyer et Cohn, 1960). Lors de la purification à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose, deux protéines ont été co-purifiées. Une première protéine de 90 kDa telle qu'attendue d'après le poids moléculaire théorique de la fusion MBP-BxIE et une seconde protéine de 44 kDa. Cette dernière protéine réagit aux anticorps anti-MBP, est capable de se lier à l'amylose et possède le même poids moléculaire que celui rapporté dans la littérature pour le MBP (Kellermann et Szmelcman, 1974). De plus, cette protéine se retrouve autant lors de la purification de la protéine de fusion contrôle MBP- α - β -galactosidase provenant de la

souche IAF-101 (résultat non montré) que dans la purification de MBP-BxlE. Cette protéine de 44 kDa correspondrait à l'expression du gène *malE* présent au niveau chromosomique de la souche hôte d'*E. coli* utilisée, malgré la présence de 0,2 % p/v de glucose au début des cultures.

Afin de purifier la protéine de fusion MBP-BxlE, une seule colonne d'amylose n'était donc pas suffisante afin d'obtenir une protéine de fusion pure. Une seconde chromatographie de type échangeuse d'anion (colonne de Q-Sépharose) a été utilisée. La protéine de 44 kDa a été éluée à une concentration d'environ 120 mM de NaCl, comme cité par la littérature fournie par la compagnie New England Biolabs pour la protéine MBP (New England Biolabs inc., 1997, p. 31). Ce résultat est un indice supplémentaire qui porte à croire que la protéine de 44 kDa est le MBP d'origine chromosomique d'*E. coli*. Pour ce qui est de la protéine de fusion MBP-BxlE, elle a été éluée à l'aide d'une concentration en NaCl de 230 mM. Cette dernière protéine n'est pas totalement pure, mais majoritaire.

La chromatographie sur colonne de Q-Sépharose a aussi permis d'éliminer le maltose du mélange de protéines en plus d'offrir une seconde étape de purification. Il a été alors possible d'employer une deuxième colonne d'amylose afin de séparer les protéines BxlE et MBP après la digestion de la protéine de fusion à l'aide de l'entérokinase.

5.1.3 Digestion de la protéine MBP-BxlE par l'entérokinase et purification de BxlE

Après la purification de la protéine de fusion, l'entérokinase a été utilisée afin de séparer les deux domaines de la protéine de fusion MBP-BxlE. Cette peptidase doit être employée puisque le vecteur pMal-c2E possède, à la fin du gène *malE* et avant le site de clonage multiple, la séquence codant pour le site de reconnaissance de l'entérokinase, soit D D D D K. La spécificité de coupure et la pureté des préparations commerciales minimisent la dégradation de la protéine par cette peptidase.

L'entérokinase provenant de deux fournisseurs a été employée afin de digérer la protéine MBP-BxlE et obtenir BxlE pure. La première entérokinase utilisée fut celle de la compagnie New England Biolabs et elle n'était pas très efficace, puisque la digestion était longue (72 h) et incomplète (moins de 75 %) (résultat non montré). L'entérokinase de la compagnie Novagen a aussi été essayée et de meilleurs résultats ont été obtenus. Avec la même quantité d'entérokinase, soit 1 U par 50 µg de MBP-BxlE, la digestion de la fusion se déroule en 24 h et environ 85 à 90 % de la protéine de fusion a été digérée.

Lorsque la digestion de la protéine de fusion MBP-BxlE à l'aide de l'entérokinase a été analysée, deux bandes étaient attendues: les protéines MBP et BxlE d'un poids moléculaire de 42 714 et 47 302 Da respectivement. Ici, le MBP produit par la digestion de la protéine de fusion possède une masse moléculaire théorique de 42 714 Da et non de 44 kDa comme celui d'origine chromosomique. La différence entre ces deux MBP provient du fait que celui d'origine plasmidique a été modifié afin que la protéine de fusion demeure cytoplasmique. Par contre, lorsque la digestion a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide, une seule bande, mais ressemblant fortement à un doublet, d'environ 43-44 kDa a pu être observée. Il est possible que les deux protéines co-migrent ou que la protéine BxlE ait été modifiée lors des étapes de purification et de digestion à l'entérokinase.

Afin de séparer les deux protéines produites par la digestion protéolytique, une deuxième chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose a été réalisée. Une protéine possédant un poids moléculaire apparent d'environ 44 kDa a été observée dans les

fractions Ft et L1 correspondant aux protéines non retenues par la colonne lors des analyses en gel de polyacrylamide. Le poids moléculaire de BxlE, prédit d'après sa séquence lors du clonage avec le peptide signal est de 47 302 Da. Par conséquent, le poids moléculaire observé est plus faible d'environ 3 kDa.

Afin d'expliquer la différence de poids moléculaire, le séquençage de l'extrémité N-terminal aurait pu être réalisé. Cette expérience n'a pas eu lieu, car elle demande une quantité importante de protéines et les rendements pour BxlE sont faibles. De plus, la modification de l'extrémité N-terminal n'est que très peu plausible puisque cette dernière extrémité faisait partie du centre de la protéine de fusion avant son clivage à l'aide de l'entérokinase. De plus, d'après la compagnie Novagen, la quantité de protéases encore présente après la purification de cette enzyme n'est pas détectable d'après leur test de contrôle de qualité. Il est également peu probable que l'extrémité C-terminal ait subi une dégradation puisque la protéine de fusion migre à son poids moléculaire théorique. Une deuxième explication pour cette différence est que la migration de la protéine en gel de polyacrylamide en présence de SDS soit biaisée. Cette protéine ne migrerait pas uniquement selon sa masse moléculaire. L'arabinofuranosidase B et la xylanase A sécrétées par *S. lividans* sont deux exemples de protéines qui ne migrent pas selon leur poids moléculaire théorique. Ainsi, ces deux enzymes ont des poids moléculaires apparent en gel de polyacrylamide en présence de SDS de 43 kDa, mais d'après leur séquence sont des protéines de 47 601 et 47 123 Da respectivement (Morosoli *et al.*, 1986, Shareck *et al.*, 1991 et Vincent *et al.*, 1997).

La spectrométrie de masse a ensuite été utilisée afin de confirmer que la protéine de 44 kDa ayant été purifiée et se retrouvant dans les fractions Ft et L1 de la deuxième colonne d'amylose est bien la protéine BxlE. Cette méthode a été employée avec trois lots de protéines ayant été traitées de différentes manières. Aucune donnée sur la protéine de 44 kDa n'a pu être recueillie à cause de la présence d'un contaminant d'origine inconnue masquant le signal de la protéine et n'ayant pu être éliminé.

N'ayant pas été capable d'obtenir de données sur la protéine BxlE (la protéine de 44 kDa retrouvée dans les fractions Ft et L1) lorsqu'utilisée intacte, une deuxième stratégie a été employée pour prouver l'identité de la protéine non retenue par la deuxième colonne d'amylose et ne réagissant pas avec les anticorps anti-MBP. Ainsi, la protéine de 44 kDa a été digérée dans le gel de polyacrylamide et les cinq peptides les plus intenses ont été analysés. De ces peptides, deux séquences en acides aminés ont pu être dérivées. D'une longueur de 9 et 14 acides aminés respectivement, ils couvrent deux régions distinctes de la protéine BxlE. À l'aide de cette technique, la confirmation de l'identité de la protéine ayant fait l'objet de la digestion a été réalisée. Par conséquent, la protéine de 44 kDa purifiée par la deuxième colonne d'amylose est bien la lipoprotéine BxlE de *S. lividans*.

5.1.4 Détermination des sucres liés par la lipoprotéine BxlE

La fluorescence intrinsèque de la protéine BxlE a été utilisée puisqu'aucune activité enzymatique n'y est associée. L'émission de fluorescence de quatre différents lots de protéines BxlE a été testée et aucune n'a donné de spectre d'émission typique, et ce malgré la présence de sept résidus tryptophane présents dans cette lipoprotéine. La protéine de fusion MBP-BxlE a donc été utilisée pour la caractérisation du domaine BxlE.

La protéine MBP a servi de contrôle afin de pouvoir déduire les variations du spectre d'émission de fluorescence attribuable à ce domaine de la protéine de fusion dans les conditions d'expérimentation utilisées. Lorsqu'excitée à 280 nm, la protéine MBP émet une fluorescence s'étalant sur environ 85 nm et la longueur d'onde d'émission maximale se retrouve à 348 nm. Cette dernière valeur correspond à celle retrouvée dans la littérature (Szmelcman *et al.*, 1976). Les expériences de liaison des sucres ont donc été réalisées avec les deux protéines : MBP et MBP-BxlE.

5.1.4.1 Interaction des sucres avec la protéine MBP

Les premiers résultats analysés provenant des expériences de fluorescence ont été ceux de la liaison du MBP avec différents sucres, puisque cette protéine a déjà fait l'objet d'études. Dans ces expériences, des polymères de maltose ou des analogues étaient testés

afin de déterminer leur affinité pour cette protéine. Il est intéressant de comparer ce qui a été décrit dans la littérature avec les résultats obtenus dans les conditions d'expérimentation particulières prévalant ici. Le système utilisé présente deux caractéristiques majeures: une concentration élevée en sucre (5 mM) et l'appareil n'utilisant pas de cuvettes, mais des plaques de type ÉLISA de 96 puits pour la lecture de la fluorescence. Dans la littérature, une concentration maximale de 1 mM a été retrouvée et la fluorescence est toujours lue avec un appareil comprenant : cuvette, agitation et contrôle de température couplé au spectrofluoromètre.

Dans la littérature concernant la protéine MBP, le maltose est le principal sucre étudié et se liant à cette protéine. La liaison MBP-maltose produit un quenching d'approximativement 20 % de la fluorescence et un « red shift » de 2 à 6 nm dépendant des auteurs (Szmelcman *et al.*, 1976 et Zukin, 1979). Ces modifications spectrales sont le résultat d'un changement conformationnel important de la protéine (Döring *et al.*, 1999). Les résultats obtenus ici concordent avec la littérature pour l'effet du quenching, mais pas pour la différence de λ_{max} qui n'a pas été observée. Cette différence vient sûrement du système de lecture de la fluorescence utilisé qui est de type non conventionnel.

En plus du maltose, trois sucres ont déjà aussi fait l'objet de recherche, soit le glucose, le galactose et le lactose. D'après la littérature, ces sucres ne modifient pas la fluorescence du MBP et par conséquent il a été établi qu'ils n'interagissent avec cette protéine (Kellermann et Szmelcman, 1974). Ces sucres sont souvent utilisés comme contrôle négatif. La discordance majeure entre les résultats obtenus ici et la littérature provient du quenching de la fluorescence enregistrée pour ces trois derniers sucres qui varient entre 5 et 20 %. De plus, une variation du λ_{max} de 2 nm pour les trois sucres ne se liant pas au MBP a été enregistrée. Cette différence entre les résultats présentés ici et la littérature origine fort probablement du système expérimental utilisé, soit une forte concentration en sucre. L'interaction entre le galactose, le glucose et le lactose et le MBP n'était pas détectée dans les expériences rapportées dans la littérature et ce probablement à cause de la concentration utilisée, soit 1 mM. Puisque le système employé ici comprends une forte concentration en sucre (5 mM), il est possible d'observer de faibles interactions, comme entre le glucose et le MBP.

Pour ce qui est des différents xylo-oligosaccharides, du cellobiose et du melibiose, ils n'ont jamais fait l'objet de recherche à notre connaissance et par conséquent, aucune littérature concernant leurs interactions avec le MBP n'est disponible. Une comparaison a donc été effectuée avec les sucres ayant déjà été étudiés comme le maltose. Ainsi, la liaison du MBP avec le xylo-tétraose (X4) ou le xylo-pentaose (X5) fait varier le spectre d'émission de fluorescence de cette protéine de manière similaire au maltose (quenching important et aucune variation du $\lambda_{\max}$). Il est donc possible de supposer que ces sucres (X4, X5 et maltose) ont le même type d'interaction avec la protéine MBP. Le spectre de fluorescence de cette dernière protéine est aussi influencé par le xylo-triose (X3) et le xylose (X), et ce, de façon identique au lactose (forte diminution de la fluorescence et variation de 2 nm du $\lambda_{\max}$). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que le xylo-triose, le xylose et le lactose interagissent de manière identique avec le MBP. Pour ce qui est du xylobiose (X2), du melibiose et du cellobiose (G2), leur interaction avec le MBP fait varier le spectre de fluorescence de manière ne ressemblant à aucun autre sucre. Ainsi, le xylobiose (X2) ne produit pas de quenching de la fluorescence, mais une variation de $\lambda_{\max}$ de 2 nm est enregistrée comme dans le cas du lactose. L'interaction du melibiose ou du cellobiose (G2) avec la protéine MBP fait varier très faiblement (2 et 3 %) l'intensité de la fluorescence sans modifier le $\lambda_{\max}$. Les résultats obtenus pour ces derniers sucres pourraient être expliqués par le fait que ces saccharides n'interagissent probablement pas avec le MBP même à une concentration aussi élevée que 5 mM.

5.1.4.2 Interaction des sucres avec le domaine BxlE

L'étude de la lipoprotéine BxlE de *S. lividans* était l'objectif principal de ce travail. Afin de déterminer le type d'interaction prenant part entre un sucre et le domaine BxlE de la protéine de fusion, la variation de la fluorescence de la protéine MBP a été « soustraite » de celle de la protéine MBP-BxlE. Par conséquent, lorsque les différents polymères de xylose ont été analysés pour en déduire leur affinité relative avec le domaine BxlE, il a été facile de constater que le X5 produit le même effet sur les deux protéines étudiées. La présence du domaine BxlE n'influence donc pas la variation du spectre d'émission et par conséquent, ce sucre n'interagirait probablement pas avec ce domaine (Tableau IV).

Avec la diminution du degré de polymérisation des xylo-oligosaccharides, il est possible d'observer que l'effet de quenching par ces sucres diminue pour la protéine de fusion et que le X2 amène une augmentation de l'émission de la fluorescence. Il est donc possible de conclure que le X2 serait le sucre ayant le plus d'affinité pour le domaine BxlE puisqu'il ne « quenche » pas la fluorescence. De plus, l'intensité de quenching produit par un sucre sur la fluorescence d'une protéine de fusion paraît être proportionnelle au nombre de monomères de xylose. Seul le xylose (X) ne répond pas à cette tendance puisqu'il produit un quenching intermédiaire entre le X4 et le X3. Une des explications possibles pour cette diminution de l'absorption de l'énergie de fluorescence par l'environnement des différents résidus tryptophane de la protéine est le changement conformationnel du domaine BxlE produit par les petits xylo-oligosaccharides. Ces derniers mèneraient à une absorption moins efficace de l'énergie de fluorescence et par conséquent une augmentation de ce paramètre. Donc après la « soustraction » de l'effet du domaine MBP sur la protéine de fusion, un ordre d'affinité des polymères de xylose a pu être proposé. Cette affinité peut se résumer ainsi : $X5 < X4 < X1 < X3 < X2$, où le X5 n'a aucune affinité pour le domaine BxlE et le X2 est le xylo-oligosaccharide testé qui en a le plus.

Selon l'analyse des derniers résultats, le xylobiose et le xylotriose seraient les deux polymères de xylose ayant le plus d'affinité pour le domaine BxlE de la protéine de fusion. Ce résultat est semblable à ceux obtenus par Lam en 1999 pour le profil d'hydrolyse de la β -xylosidase intracellulaire de *S. lividans* (BxlA) codé par l'opéron *bxl*. Il a été démontré que BxlA est une enzyme ayant une préférence d'hydrolyse semblable à celle de transport du domaine BxlE, soit pour les xylo-oligosaccharides à degré de polymérisation faible, tel le X2 et le X3 (1999). Cette β -xylosidase est aussi capable d'hydrolyser les polymères plus longs tel le X4 et le X5, mais de façon beaucoup moins efficace. Il est par conséquent possible de constater que le profil de liaison du domaine BxlE et d'hydrolyse de BxlA se ressemblent. Ces deux protéines étant codées par le même opéron, il est plausible que leur activité soit étroitement reliées.

Pour connaître la spécificité de la liaison BxlE-sucre, différents mono et disaccharides ont aussi été testés dans les mêmes conditions que les xylo-oligosaccharides. Dans les expériences de purification, il a été remarqué que BxlE n'interagissait pas avec l'amylose. Par déduction logique, il a été établi que le maltose - l'unité de sucre formant ce polymère - ne pouvait pas former de complexe avec le domaine BxlE de la protéine de fusion. En partant de ce fait, tous les sucres ayant le même effet sur la variation des spectres de fluorescence des deux protéines étudiés seront considérées comme étant incapables d'interagir avec le domaine BxlE. D'après les résultats du tableau IV, ces sucres seraient le maltose, le glucose, le galactose et le lactose. Ces sucres provoquent tous un quenching de la fluorescence du MBP et une augmentation de celle de la protéine de fusion. L'effet observé sur la fluorescence de cette dernière protéine est attribuable à l'interaction entre le domaine MBP et le sucre. Malgré le fait qu'ils ne se lient probablement pas au domaine BxlE de la protéine de fusion, ces sucres ont un effet sur la fluorescence de la protéine de fusion puisqu'elles ne demeurent pas identiques à celle du MBP comme dans le cas du X5. Cette variation dans le spectre de la fluorescence pourrait être due à un effet coopératif de la liaison du sucre au domaine MBP de la protéine de fusion étant donné qu'il a été prouvé dans la littérature que le maltose interagit avec le MBP et qu'il amène un changement conformationnel (Zukin, 1979 et Döring *et al.*, 1999). Un tel changement se répercuterait sur le domaine BxlE et la fluorescence totale de la protéine de fusion augmenterait. Ce changement conformationnel ne se produirait pas lors de la liaison du X5. Ces variations dans les changements conformationnels du domaine MBP peuvent être expliquées par les deux différents modes (R et B) de liaison du MBP (Hall *et al.*, 1997). La liaison d'un ligand au MBP par le mode R provoque un « red shift » et un changement conformationnel et amène une translocation du sucre. Le meilleur exemple de la liaison par le mode R est le maltose. À l'opposé, les composés réduits, oxydés ou cyclisés comme le β -cyclodextrine se lient par le mode B, ce qui amènent un « blue shift » et aucune modification de la structure de la protéine. Ce dernier type de sucres ne sont pas transportés par le MBP. Donc, le X5 interagirait avec le domaine MBP par le mode B.

Pour ce qui est du cellobiose et du melibiose, la variation de fluorescence entre les deux protéines est différente de celles observées pour les autres sucres. Aucune variation importante de la fluorescence et du λ_{max} du MBP n'a été constatée. Pour ce qui est de la protéine de fusion, ces deux sucres amènent un quenching de la fluorescence et un « red shift » de 2 nm. Étant donné que ces résultats sont opposés à ceux du MBP et que ce dernier sucre ne se lie pas au domaine BxIE, il est probable que le cellobiose et le melibiose interagissent avec ce domaine. De plus, si l'intensité du quenching observée est un indice de l'affinité entre une protéine et un sucre, le domaine BxIE fixerait environ 10 fois plus fortement le melibiose que le cellobiose.

Pour presque tous les sucres, une légère différence de λ_{max} est observée entre les deux protéines étudiées. Pour déterminer la variation provoquée par l'interaction du sucre avec le domaine BxIE de la protéine de fusion, une simple soustraction de l'effet du saccharide testés sur le MBP a été réalisée, de la même manière que pour l'intensité de fluorescence. De cette manière, il est donc possible de déterminer que le xylose provoque un « blue shift » de 2 nm. L'interprétation de ces variations de λ_{max} est plus difficile puisque que le phénomène est plus difficile à étudier. Ils impliquent une modification du pH et de la polarité du microenvironnement avoisinant l'acide aminé fluorescent (section 2.8, Weber, 1997). En analysant les variations de λ_{max} obtenues ici, il semble que la présence d'un lien α -1,4 au niveau du maltose fasse une différence puisque le sucre est l'unique dimère provoquant un « bleu shift ». Les autres dissacharides ayant des liens β -1,4 ou α -1,6 présentent tous un « red shift ». La variation de λ_{max} est par contre plus marquée pour le X2. Ceci pourrait être un indice de l'interaction protéine-sucre et de la variation de pH et de polarité qui en découle.

Il faut aussi remarquer que les quatre sucres n'interagissant probablement pas avec le domaine BxlE : le glucose, le galactose, le lactose et le maltose, amènent une variation de $\lambda_{\max}$ de la protéine de fusion. Les deux sucres contenant un glucose, soit le glucose lui-même et le maltose provoquent un « blue shift » et les deux autres sucres font varier ce paramètre vers de plus longues longueurs d'onde de 2 nm. Ces variations de $\lambda_{\max}$ sont fort probablement dû à l'effet coopératif de la liaison du sucre au domaine MBP de la protéine de fusion qui provoque une modification conformationnelle de la structure de la protéine. Cette variation apporterait un changement du pH et de la polarité du microenvironnement des tryptophanes fluorescents des deux domaines de la protéine.

Malheureusement, aucune tendance n'a pu être constatée dans cette dernière série d'expériences quant à la préférence d'un lien ou d'un sucre en particulier pour établir la liaison entre le domaine BxlE et un saccharide. La seule affirmation pouvant être faite est que les polymères d'hexoses et de pentoses n'ont pas le même effet sur la fluorescence des différentes protéines testées avec le système expérimental utilisé.

5.2 Construction d'une protéine de fusion ancrée à la membrane de *S. lividans*

5.2.1 Clonage du gène *fusionEA* chez *S. lividans*

Dans le modèle présenté, *E. coli* ayant servi de modèle à différents groupes de recherche est remplacé par *S. lividans* (Freeman *et al.*, 1999, Francisco *et al.*, 1993a, Francisco *et al.*, 1993b, Ghayeb et Inouye, 1984 et Klose *et al.* 1988). L'unique membrane lipidique de *S. lividans* devrait faciliter l'exportation des protéines vers l'extérieur de la bactérie. Par conséquent, le peptide signal de BxlE et une courte séquence en N-terminal (13 acides aminés) de la protéine mature ont été utilisés pour diriger et ancrer une enzyme du système xylanolytique normalement sécrétée dans le milieu : la xylanase A₂. La seule étude rapportée sur les lipoprotéines des bactéries Gram-positives est celle de Mézes qui a prouvé que la cystéine de la lipobox était un élément essentiel et obligatoire de l'ancrage de ces protéines à la paroi (Mézes *et al.*, 1983). Malheureusement, aucune étude plus élaborée portant sur les acides aminés au voisinage de la cystéine impliquée dans le lien thioéther n'a été rapportée. Par conséquent, en se basant sur les connaissances obtenues à partir d'*E. coli* et de la lipoprotéine Lpp, les 13 premiers acides aminés de la lipoprotéine BxlE devaient être suffisants pour la bonne localisation et orientation de la protéine fusionEA (Ghayeb et Inouye, 1984).

Après avoir obtenu le gène *fusionEA* par PCR, il a été cloné dans le vecteur à copie multiple pC109MCS. Le plasmide pIAF-EA ainsi obtenu a été transformé dans la souche *S. lividans* 10-164. Un des clones possédait une activité xylanase sur le milieu RBB-xylane et le gène *fusionEA* était bien présent dans le plasmide. Cette activité devait donc être le résultat de l'expression de la protéine fusionEA.

5.2.2 Analyse de la souche IAF-EA

Une première caractérisation de la souche IAF-EA a été réalisée. Ceci dans le but de démontrer que la protéine fusionEA surexprimée chez cette souche était exposée au milieu extra-cellulaire, retenue à la paroi et active.

Après avoir confirmé l'association de la protéine fusionEA au mycélium de la souche IAF-EA, le surnageant de culture a été analysé afin de déterminer les protéines relâchées dans le milieu au cours du temps. Il a été constaté que la protéine fusionEA demeurait associée au mycélium durant les 24 premières heures de croissance de la bactérie et que par la suite, il était possible de la retrouver dans le surnageant. Ce phénomène de relâchement n'est pas nécessairement surprenant étant donné que certaines lipoprotéines peuvent se retrouver ancrées à la membrane et libres dans le surnageant de culture au même moment. Ainsi, en 1982, il fut rapporté que la pénicillinase de *Bacillus licheniformis* avait un état ancré avant de se retrouver sous forme soluble dans le milieu extra-cellulaire de la bactérie (Nielsen et Lampen, 1982). De la même manière, il fut établi en 1986 que la pullulanase extra-cellulaire de *Klebsiella pneumoniae* avait aussi ce double état : ancrée et libre (Pugsley *et al.*, 1986). Donc, les cultures ont été arrêtées avant que le relâchement n'ait lieu, soit après 24 h de croissance.

Par la suite, le mycélium devait être conservé. L'azoture de sodium qui inhibe la production d'énergie (Wiesmeyer et Cohn, 1960) et la formaldéhyde ont été utilisées afin de voir leur effet sur la protéine fusionEA. L'effet recherché était le maintien de l'intégrité cellulaire ainsi qu'une certaine stabilisation de la protéine de fusion et de son activité enzymatique. Le mycélium et le surnageant ont été analysés par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-XlnA₂ afin de déterminer le relâchement des protéines après traitement du mycélium de la souche IAF-EA. De cette manière, il a été déterminé que la formaldéhyde prévient le relâchement de certaines protéines dans le surnageant dont la protéine fusionEA, comparativement à l'azoture de sodium qui ne montre aucune capacité à retenir les protéines associées au mycélium.

Par la suite, des tests enzymatiques ont été réalisés sur les suspensions bactériennes afin de déterminer l'effet de ces produits chimiques sur l'activité de la fusionEA. Ces tests enzymatiques ont été réalisés à l'aide de la technique des sucres réducteurs de Lever et collaborateurs (1983). Avec ce test, la souche exprimant la protéine fusionEA possède environ sept fois plus d'activité xylanase que la souche témoin. Par contre, l'activité observée associée au mycélium de la souche IAF-EA est environ 10 fois inférieure à celle retrouvée pour les différentes xylanases purifiées

(Kluepfel *et al.*, 1992). Le test de Lever *et al.*, (1983) a été utilisé car il est simple, rapide et que seule une comparaison, entre le mycélium exprimant la protéine fusionEA et celui ne l'exprimant pas, était recherchée. Malgré le fait que la technique la plus sensible n'ait pas été utilisée, il a été possible d'observer que la formaldéhyde inhibe l'activité enzymatique au cours du temps comparativement à l'azoture de sodium qui a un effet moins marqué.

Toutes les expériences qui ont été réalisées montraient que la souche IAF-EA exprimait une protéine associée au mycélium qui possédait une activité xylanasiq. Il ne restait plus qu'à tenter de visualiser cette protéine qui devait être ancrée à la paroi de *S. lividans*. Deux moyens de visualisation étaient possibles : les microscopes à fluorescence ou électronique. Par contre, lorsque certains auteurs ont tenté de visualiser l'emplacement de leur protéine de fusion à l'aide du microscope à fluorescence, un haut niveau de bruit de fond ne permettait pas de tirer de conclusion. Ainsi, la microscopie électronique serait le meilleur moyen pour déterminer l'emplacement exact d'une protéine d'après ces auteurs (Stathopoulos *et al.*, 1996).

Afin de détecter la protéine fusionEA, une double réaction immunologique a été réalisée. Les anticorps anti-XlnA₂ ont été employés pour reconnaître la protéine fusionEA, ensuite un second anticorps couplé à des billes d'or colloïdales a été utilisé afin de visualiser les protéines en microscopie électronique. Malheureusement, aucune photo n'a été prise étant donné qu'aucun grain d'or ne pouvait être observé autant dans le contrôle négatif (souche *S. lividans* C109MCS) que sur les parois de la souche IAF-EA. Ces résultats ressemblent à ceux obtenus par Stathopoulos et ses collaborateurs lorsqu'ils ont cloné la phosphatase alcaline (PhoA) dans le système d'expression Lpp-OmpA(46-159) chez *E. coli* (1996). Dans leur cas, malgré le système d'exportation ciblant la membrane externe de la paroi d'*E. coli* et qui a été utilisé avec succès pour la β -lactamase par exemple, la protéine PhoA ne peut être révélée à l'aide d'anticorps spécifiques par microscopie électronique sans perméabilisation de la membrane externe. Ces auteurs ont tiré comme conclusion que la protéine PhoA est trop volumineuse ou que son repliement et sa dimérisation sont incomplets et que tous ces éléments font que cette protéine ne peut être exportée à la membrane externe d'*E. coli*. Par contre, dans notre

cas, cette explication ne peut être valable puisque la xylanase A₂ est déjà sécrétée. Par contre, il se peut que les 13 acides aminés ajoutés provenant de BxlE provoquent des problèmes de stabilisation de la protéine à la membrane, surtout lors de la préparation des échantillons pour la microscopie électronique.

6 Conclusion

La caractérisation du système xylanolytique de *S. lividans* est de plus en plus complète avec la purification et l'étude des différentes protéines extra et intracellulaires. L'étude du type de saccharides pouvant passer la barrière lipidique par le pore formé par les protéines BxlF et BxlG codé par l'opéron *bxl* permettrait de connaître les inducteurs du système xylanolytique. Pour ce faire, l'étude de la première protéine impliquée dans le transport des sucres, la lipoprotéine BxlE, a été réalisée.

Le premier objectif était donc de purifier la protéine BxlE pour son étude. Le gène *bxlE* a été cloné dans le vecteur pMal-c2E afin de purifier cette protéine à l'aide de la fusion MBP-BxlE. La purification du domaine BxlE a été réalisée, mais avec des rendements plutôt faibles. De plus, la protéine BxlE ne migre pas, en gel de polyacrylamide, au poids moléculaire attendu (47 302 Da), mais plutôt comme une protéine d'environ 44 kDa. Par conséquent, l'identité de la protéine ayant été purifiée a été confirmée par spectrométrie de masse. Cette technique sensible a permis de conclure que la protéine de 44 kDa était bien BxlE, mais n'a pas permis de déduire l'origine de cette différence de poids moléculaire.

Le second objectif était la caractérisation de la protéine BxlE afin de déterminer les sucres capables de former une liaison protéine-sucré. La fluorescence intrinsèque de la protéine a été choisie comme méthode d'analyse, car BxlE ne possède pas d'activité enzymatique et que la spectrométrie de masse s'est avérée inefficace dans ce cas. De plus, malgré la présence de sept résidus tryptophane dans la séquence en acides aminés de BxlE, cette protéine n'émet pas de fluorescence typique. Les études de liaison des sucres du domaine BxlE ont donc été réalisées avec la protéine de fusion MBP-BxlE. Afin de déduire l'effet des sucres sur le domaine BxlE, les mêmes expériences ont aussi été réalisées avec la protéine MBP. De ces expériences, il a été conclu que le domaine BxlE se lie plus fortement aux xylo-oligosaccharides à degré de polymérisation faible tels le X2 et le X3. Ces résultats permettent de corroborer les résultats de Lam en 1999 sur le spectre d'hydrolyse de la β -xylosidase intracellulaire et de confirmer l'hypothèse selon laquelle le système de transport codé par l'opéron *bxl* possède une certaine spécificité pour les produits du xylane de faible poids moléculaire. Par contre, la spécificité de cette liaison face à différents di-saccharides n'a pu être établie avec certitude. Par conséquent,

de nouvelles expériences de fluorescence devraient être réalisées avec une concentration moins élevée en sucre.

Le troisième objectif qui avait été fixé était d'utiliser le peptide signal de BxlE afin de tenter de produire une enzyme ancrée à la membrane de *S. lividans* de manière à retenir cette protéine à la paroi. La xylanase A₂ a bien été produite et son association au mycélium a été prouvée, mais l'instabilité de la fusionEA demeure encore inconnue. Le relâchement de la protéine fusionEA du mycélium dans le surnageant suggère que cette protéine, et que probablement BxlE par le fait même, ait une double localisation au cours du temps due à la différenciation cellulaire.

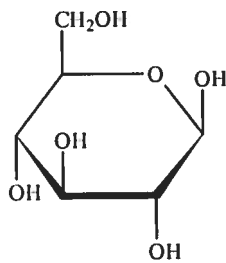
Ce projet a donc permis de déterminer, de manière préliminaire, les sucres capables d'interagir avec BxlE. Il serait donc intéressant de poursuivre la caractérisation de cette lipoprotéine en déterminant les constantes de dissociation pour les différents xylo-oligosaccharides. De plus, la protéine purifiée à l'aide du système hétérologue possède un poids moléculaire inférieur à celui prédit. Il serait approprié de déterminer l'origine de cette différence et de vérifier si la protéine BxlE purifiée de manière homologue possède les mêmes caractéristiques biochimiques.

Des anticorps reconnaissant BxlE seraient un atout. Ils permettraient de déterminer la localisation exacte de cette lipoprotéine à la paroi de *S. lividans* et dans le surnageant de culture. De plus, à l'aide d'immunodétection, il serait facile de déterminer dans quelles conditions de culture cette lipoprotéine est exprimée par la bactérie. Ces expériences pourraient donner un indice sur la régulation de l'opéron *bxl*.

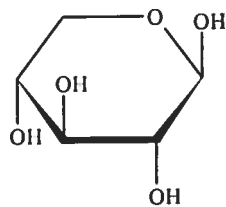
L'étude approfondie de la protéine fusionEA permettrait de déterminer les acides aminés exacts pour la bonne localisation et la stabilisation d'une protéine ancrée à la paroi de *S. lividans*. L'amélioration des colonnes possédant une activité enzymatique spécifique et l'élaboration de colonnes impossible à produire à cause de l'incapacité d'obtenir une protéine pure dériveraient de ces nouvelles connaissances.

Appendice A

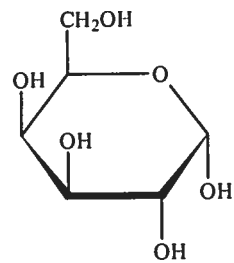
Structure chimique des sucres



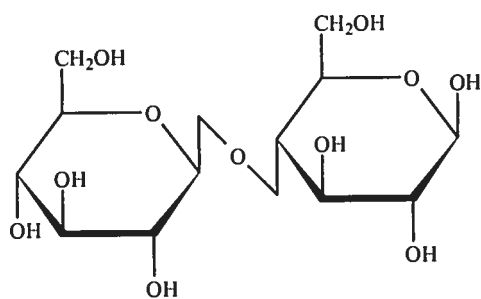
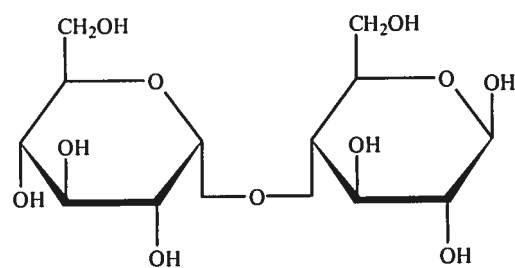
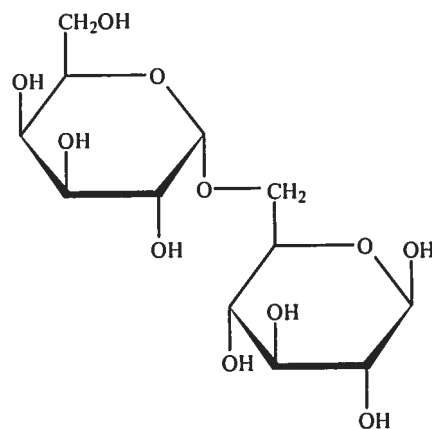
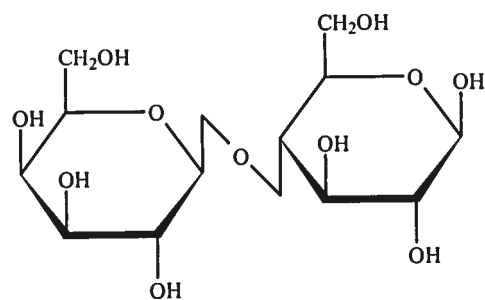
Glucose

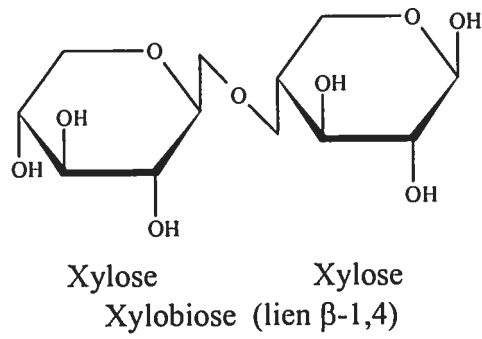


Xylose



Galactose

Glucose Glucose
Cellobiose (lien β -1,4)Glucose Glucose
Maltose (lien α -1,4)Galactose Glucose
Melibiose (lien α 1-6)Galactose Glucose
Lactose (lien β -1,4)



7 Références

AMES, G.F.-L. 1986. « Bacterial periplasmic transport systems : structure, mechanism, and evolution ». Annual reviews of biochemistry. Vol. 55. p. 397-425.

ANNÉ, J. et L. Van Mellaert. 1993. « *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production ». FEMS microbiology letters. Vol. 114. p. 121-128.

ARCAND, N., D. Kluepfel, F.W. Paradis, R. Morosoli et F. Shareck. 1993. « Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the manA gene and characterization of the enzyme ». Biochemical journal. Vol. 290. No. 3. p. 857-863.

BRIAND, G., V. Perrier, M. Kouach, M. Takahashi, A.-M. Gilles et O. Bâzu. 1997. « Characterization of metal and nucleotide liganded forms of adenylate kinase by electrospray ionisation mass spectrometry ». Archives of biochemistry and biophysics. Vol. 339. No. 2. p. 291-297.

CHEN, Y. et M.D. Barkley. 1998. « Toward understanding tryptophane fluorescence in protein ». Biochemistry. Vol. 37. p. 9976-9982.

CHEN, Y., B. Liu, H-T. Yu et M.D. Barkley. 1996 « The peptide bond quenches indole fluorescence ». Journal of american chemical society. Vol. 118. p. 9271-9278.

CLARKE, A.J. 1997. Biodegradation of cellulose. Enzymology and biotechnology. Technomic Publishing Company, Inc. USA. 272 p.

DARNELL, J., H. Lodish et D. Baltimore. 1993. Biologie moléculaire de la cellule. Traduit de l'anglais par Camille François. Bruxelles : De Boeck Université. 1102 p.

DÖRING, K., T. Surrey, P. Nollert et F. Jähnig. 1999. « Effects of ligand binding on the internal dynamics of maltose-binding protein ». European journal of biochemistry. Vol. 266. p. 477-483.

DUPLAY, P., H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin et M. Hofnung. 1984. « Sequences of the *malE* gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12 ». The journal of biological chemistry. Vol. 259. No. 16. p. 10606-10613.

DUPONT, C., N. Daigneault, F. Shareck, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1996. « Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans* ». Biochemical journal. Vol. 319. p. 881-886.

Dyadic. « Welcome To DYADIC INTERNATIONAL, INC. World Leaders in Biotechnology » <http://www.dyadic-group.com>

EFTINK, M.R. 1991. « Chapter 1: Fluorescence quenching reactions. Probing biological macromolecular structures ». In T. Gregory Dewey. Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy. Plenum Press. New York. p. 1-29.

EIS, C., R. Griessler, M. Maier, A. Weinhäusel, B. Böck, K.D. Kulbe, D. Haltrich, R. Schinzel et B. Nidetzky. 1997. « Efficient downstream processing of maltodextrin

phosphorylase from *Escherichia coli* and stabilization of the enzyme by immobilization onto hydroxyapatite ». Journal of biotechnology. Vol. 58. p. 157-166.

ERBEZNIK, M., H.J. Strobel, K.A. Dawson et C.R. Jones. 1998. « The D-xylose-binding protein, XylF, from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E : cloning, molecular analysis, and expression of the structural gene ». Journal of bacteriology. Vol. 180. No. 14. p. 3570-3577.

FRANCISCO, J.A., C.F. Earhart et G. Georgiou. 1992. « Transport and anchoring of β -lactamase to the external surface of *Escherichia coli* ». Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America. Vol. 89. p. 2713-2717.

FRANCISCO, J.A., C. Stathopoulos, R.A.J. Warren, D.G. Kilburn et G. Georgiou. 1993b. « Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains ». Bio/technology. Vol. 11. p. 491-495.

FRANCISCO, J.A., R. Campbell, B.L. Iverson et G. Georgiou. 1993a. « Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface ». Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America. Vol. 90. p. 10444-10448.

FREEMAN, A., S. Abramov, G. Georgiou. 1999. « Site-protected fixation and immobilization of *Escherichia coli* cells displaying surface-anchored β -lactamase ». Biotechnology and bioengineering. Vol. 62. No. 2. p. 155-159.

GAWANDE, P.V. et M.Y. Kamat. 1998. « Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eupradit S-100 ». Journal of biotechnology. Vol. 66. No. 2-3. p. 165-175.

GHAYEB, J. et M. Inouye. 1984. « Nine amino acid residues at the NH₂-terminal of lipoprotein are sufficient for its modification, processing, and localization in the outer membrane of *Escherichia coli* ». The journal of biological chemistry. Vol. 259. No 1. p. 463-470.

GILBERT, M., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel. 1995. « Production and secretion of proteins by Streptomyces ». Critical reviews in biotechnology. Vol. 15. No. 1. p. 13-39.

GILLET, S., C.B.M. Hoang, J.-M. Schmitter, T. Fukui, S. Blanquet et C. Hountondji. 1996. « Affinity labelling of *Escherichia coli* histidyl-tRNA synthetase with reactive ATP analogues. Identification of labelled amino acid residues by matrix assisted laser desorption-ionization mass spectrometry ». European journal of biochemistry. Vol. 241. p. 133-141.

GILSON, E., G. Alloing, T. Schmidt, J.-P. Claverys, R. Dudler et M. Hofnung. 1988. « Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in

Gram-positive bacteria and in *Mycoplasma* ». The EMBO journal. Vol. 7. No. 12. p. 3971-3974.

GUSEK, T.W. et J.E. Kinsella. 1992. « Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning ». Critical reviews in microbiology. Vol. 18. No. 4. p. 247-260.

HALL, J.A, K. Gehring et H. Nikaido. 1997. « Two modes of ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli* ». The journal of biological chemistry. Vol. 272. No. 28. p. 17605-17609.

HAYASHI, S. et H.C. Wu. 1990. « Lipoproteins in bacteria. Mini-review ». Journal of bioenergetics and biomembranes. Vol. 22. No. 3. p. 451-471.

HERNANDEZ, M. 2000. « Localisation du site d'initiation de la transcription de six gènes du complexe xylanolytique de *Streptomyces lividans* ». Mémoire de maîtrise. INRS-Institut Armand-Frappier. Université du Québec. Laval.

HIGGINS, C.F. et M.M. Hardie. 1983. « Periplasmic protein associated with the oligopeptide permeases of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* ». Journal of bacteriology. Vol. 155. No. 3. p. 1434-1438.

HOGARTH, B.G. et C.F. Higgins. 1983. « Genetic organization of the oligopeptide permease (*opp*) locus of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* ». Journal of bacteriology. Vol. 153. No. 3. p. 1548-1551.

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. Angleterre : John Innes foundation. 354p.

HOPWOOD, D.A., T. Keiser, M.J. Bibb, M.J. Buttner et K.F. Chater. 2000. Practical Streptomyces genetics. Angleterre : John Innes Foundation. 613 p.

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 protein ». Molecular microbiology. Vol. 17. No. 2. p. 367-377.

INUKAI, M., Y Masui, G.P. Vlasuk, M. Inouye. 1983. « Effects of inserting eight amino acid residues into the major lipoprotein on its assembly in the outer membrane of *Escherichia coli* ». Journal of bacteriology. Vol. 155. No. 1. p. 275-280.

KELLERMANN, O. et S. Szmecman. 1974. « Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein ». European journal of biochemistry. Vol. 47. p. 139-149.

- KIESER, H.M., T. Kieser, D.A. Hopwood. 1992. « A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome ». Journal of bacteriology. Vol. 174. No.17. p. 5496-5507.
- KLOSE, M., H. Schwarz, S. MacIntyre, R. Freudl, M.L. Eschback et U. Henning. 1988. « Internal deletions in the gene for an *Escherichia coli* outer membrane protein define an area possibly important for recognition of the outer membrane by the polypeptide ». The journal of biological chemistry. Vol. 263. No. 26. p. 13291-13296.
- KLUEPFEL, D., F. Shareck, D.J. Senior, R.L. Bernier et R. Morosoli. 1993. « Homologous gene expression and secretion of hemicellulase by *Streptomyces lividans* and their potential use in bleaching of paper pulps ». Chapitre 18. Industrial microorganisms : Basic and applied molecular genetics. Washington D.C. American Society for microbiology. p.137-142.
- KLUEPFEL, D., N. Daigneault, R. Morosoli, et F. Shareck. 1992. « Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66 ». Applied Microbiology and biotechnology. Vol. 36. p. 626-631.
- 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 ». Biochemical journal. Vol. 267. No. 5. p. 45-50.
- LAEMMLI, U.K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». Nature. Vol. 227. p. 680-685.
- LAFITTE, D., J.P. Capony, G. Grassy, J. Haiech et B. Calas. 1995. « Analysis of the ion binding sites of calmodulin by electrospray ionization mass spectrometry ». Biochemistry. Vol. 34. p. 13825-13832.
- LAM, T.D.T. 1999. « Purification et caractérisation de la protéine codée par le gène *bxlA* de *Streptomyces lividans* ». Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier. Université du Québec. Laval.
- LAROCQUE, D. 1998. « Analyse moléculaire du locus *bxl* de *Streptomyces lividans* ». Mémoire de maîtrise. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier. Université du Québec. Laval.
- LEBLOND, P., M. Redenbach, J. Cullum. 1993. « Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2) ». Journal of bacteriology. Vol. 175. No. 11. p. 3422-3429.
- LEE, C.Y. 1997. « Fluorescence spectrometry in studies of carbohydrate-protein interactions ». Journal of biochemistry. Vol. 121. p. 818-825.
- LEVER, M., T.A. Walmsley, R.S. Visser et S. J. Ryde. 1983. « Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of

carbohydrates, including ketosamines ». Annual reviews of biochemistry. Vol. 52. p. 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 ». Molecular microbiology. Vol. 10. No. 5. p. 923-933.

LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall. 1951. « Protein measurement with the Folin phenol reagent ». Journal of biological chemistry. Vol. 193. p. 265-275.

LU, W., Y. Sun, M.D. Bauer, S. Paule, P.M. Kownigs et W.G. Kraft. 1999. « Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with β -lactams using electrospray mass spectrometry ». Biochemistry. Vol. 38. p. 6537-6546.

Lyven. 1999. « Enzymes industrielles Lyven ». <http://www.lyven.com>

MACKENZIE, L.F., Q. Wang, R.A.J. Warren et S.G. Withers. 1998. « Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis ». Journal of american chemical society. Vol. 120. p. 5583-5584.

MARKOVIÉ-HOUSLEY, Z., A. Cooper, A. Lustig, K. Flükiger, B. Stolz et B. Erni. 1994. « Independent folding of the domain in the hydrophilic subunit IIAB^{man} of the mannose transporter of *Escherichia coli* ». Biochemistry. Vol. 33. p. 10977-10984.

MARTIN, B., G. Alloing, C. Boucraut et J.-P. Claverys. 1989. « The difficulty of cloning *Streptococcus pneumoniae* *mal* and *ami* loci in *Escherichia coli* : toxicity of *malX* and *amiA* gene products ». Gene. Vol. 80. p. 227-238.

MÉZES, P.S.F., W. Wang, E.C.H. Yeh et J.O. Lampen. 1983. « Construction of *penPA* Δ 1, *Bacillus licheniformis* 749/C β -lactamase lacking site for lipoprotein modification ». The journal of biological chemistry. Vol. 258. No. 18. p. 11211-11218.

MONDOU, F., F. Shareck, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1986. « Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* ». Gene. Vol. 49. p. 323-329.

MOROSOLI, R., J.L. Bertrand, F. Mondou, F. Shareck et D. Kluepfel. 1986. « Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans* ». Biochemical journal. Vol. 239. No. 3. p. 587-592.

MUS-VETEAU, I. et G. Leblanc. 1996. « Melibiose permease of *Escherichia coli*: structural organization of cosubstrate binding sites as deduced from tryptophan fluorescence analyses ». Biochemistry. Vol. 35. p. 1253-12060.

NAVARRE, W.W., S. Daefler et O. Schneewing. 1996. « Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus* ». Journal of bacteriology. Vol. 178. No. 2. p. 441-446.

New England Biolabs inc. 1997. « pMalTM protein fusion and purification system. Expression and purification of proteins from cloned genes. Instruction manual ». http://www.neb.com/neb/frame_cat.html . 62 p.

NIELSEN, J.B.K. et J.O. Lampen. 1982. « Glyceride-cysteine lipoproteins and secretion by Gram-positive bacteria ». Journal of bacteriology. Vol. 152. No. 1. p. 315-322.

Novo. « Welcome to the Novo Nordisk Enzyme Business website ». <http://enzymes.novo.dk/enzymes/>

OHBA, R., H. Chaen, S. Hayashi et S. Ueda. 1978. « Immobilization of *Streptomyces flavochromogenes* pullulanase on tannic acid and TEAE-cellulose ». Biotechnology and bioengineering. Vol. 20. No. 5. p. 665-676.

PELCZAR, M.J. Jr., E.C.S. Chan et N.R. Krieg. 1993. Microbiology concepts and applications. United States : Mc Graw-Hill inc. 896 p.

PENCREAE'H, G. et J.C. Baratti. 1997. « Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support ». Applied microbiology and biotechnology. Vol. 47. p. 630-635.

PENZÈS, C. 1995. « Purification et caractérisation de la protéine MsiK de *Streptomyces lividans* ». Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier. Université du Québec. Laval.

PROSITE. « Prosite. Database of protein families and domains ». Release 16.29, of 25-Nov 2000. <http://expasy.cbr.nrc.ca/prosite/>

PUGSLEY, A.P., C. Chapon et M. Schwartz. 1986. « Extracellular pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* is a lipoprotein ». Journal of bacteriology. Vol. 166. No. 3. p. 1083-1088.

RAPOSO, F.M. 2000. « Étude de la régulation du système xylanolytique de *Streptomyces lividans* » Mémoire de maîtrise. INRS-Institut Armand-Frappier. Université du Québec. Laval.

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 ». Molecular microbiology. Vol. 21. No. 1. p. 77-96

ROBERGE M., F. Shareck, R. Morosoli, D. Kluepfel et D. Dupont. 1999. « Characterization of active-site aromatic residues in xylanase A from *Streptomyces lividans* ». Protein engineering. Vol. 12. No. 3. p. 251-257.

RUSSELL, R.R.B., J. Aduse-Opoku, I.C. Sutcliffe, L. Tao et J.J. Ferretti. 1992. « A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism ». The journal of biological chemistry. Vol. 267. No. 7. p. 4631-4637.

SCHEIN, C.H. 1989. « Production of soluble recombinant proteins in bacteria. Review ». Bio/technology. Vol. 7. p. 1141-1147.

SCHLÖSSER, A. et H. Schrempf. 1996. « A lipid-anchored binding protein is a component of an ATP-dependent cellobiose/cellotriose-transport system from the cellulose degrader *Streptomyces reticuli* ». European journal of biochemistry. Vol. 242. p. 332-338.

SCHLÖSSER, A. J. Jantos, K. Hackmann et H. Schrempf. 1999. « Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli* ». Applied and environmental microbiology. Vol. 65. No. 6. p. 2636-2643.

SCHLÖSSER, A., T. Kampers et H. Schrempf. 1997. « The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport ». Journal of bacteriology. Vol. 179 No. 6. p. 2091-2095.

SHARECK, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1991. « Nucleotide sequence of the xylanase A, B and C genes of *Streptomyces lividans* ». Gene. Vol. 107. p. 75-84.

SHPIGEL, E., A. Goldlust, G. Efroni, A. Avraham, A. Eshel, M. Dekel et E. Shoseyov. 1999. « Immobilization of recombinant heparinase I fused to cellulose-binding domain ». Biotechnology and bioengineering. Vol. 65. No. 1. p. 17-23.

STATHOPOULOS, C., G. Georgiou et C.F. Earhart. 1996. « Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp-OmpA(46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane ». Applied microbiology in biotechnology. Vol. 45. p. 112-119.

SUTCLIFFE, I.C. et R.R.B. Russell. 1995. « Lipoproteins of Gram-positive bacteria. Minireview ». Journal of bacteriology. Vol. 177. No. 5. p. 1123-1128.

SUTCLIFFE, I.C., L. Tao, J.J. Ferretti et R.R.B. Russell. 1993. « MsmE, a lipoprotein involved in sugar transport in *Streptococcus mutans* ». Journal of bacteriology. Vol. 175. No. 6. p. 1853-1855.

SZMELCMAN, S., M. Schwartz, T.J. Silhaby et W. Boos. 1976. « Maltose transport in *Escherichia coli* K12. A comparison of transport kinetics in wild-type and λ -resistant mutants with the dissociation constants of the maltose-binding protein as measured by fluorescence quenching». European journal of biochemistry. Vol. 65. p. 13-19.

TESHIMA, T., J. Kohda, A. Kondo, H. Taguchi, M. Yohda et H. Fukuda. 2000. « Preparation of *Thermus thermophilus* holo-chaperonin-immobilized microspheres with high ability to facilitate protein refolding ». Biotechnology and bioengineering. Vol. 68. No. 2. p. 184-190.

The Sanger Center. <http://www.sanger.ac.uk/>

- TIBOR, A., B. Decelle et J.J. Letesson. 1999. « Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins ». Infection and immunity. Vol. 67. No. 9. p. 4960-4962.
- TJALSMA, H., V.P. Kontinen, Z. Prágai, H. Wu, R. Meima, G. Venema, S. Bron, M. Sarvas et J.M. van Dijk. 1999. « The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the Gram-positive eubacterium *Bacillus subtilis* ». The journal of biological chemistry. Vol. 274. No. 3. p. 1698-1707.
- van WEZEL, G.P., J. White, M.J. Bibb et P.W. Postma. 1997. « The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2) : characterization, disruption and transcriptional analysis ». Molecular general genetic. Vol. 245. p. 604-608.
- VATS-MEHTA S., P. Bouvrette, F. Shareck, R. Morosoli, D. Kluepfel. 1990. « Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans* ». Gene. Vol. 86. No. 1. p. 119-22.
- VINCENT, P., F. Shareck, C. Dupont, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1997. « New α -L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme ». Biochemical journal. Vol. 322. p. 845-852.
- WASSENBERG, D., W. Liebl et R. Jaenicke. 2000. « Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties ». Journal of molecular biology. Vol. 295. No. 2. p. 279-288.
- WEBER, G. 1997. « Fluorescence in biophysics: accomplishments and deficiencies ». Methods in enzymology. Vol. 278. p. 1-15.
- WIESMEYER, H. et M. Cohn. 1960. « The characterization of the pathway of maltose utilisation by *Escherichia coli*. A description of the concentrating mechanism ». Biochimica et biophysica acta. Vol. 39. p. 440-447.
- WRIGHT, F. et M.J. Bibb. 1992. « Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome ». Gene. Vol. 113. p. 55-65.
- XU, Y.B., S.Y. Quing et G. PeiJi. 1997. « Intrinsic fluorescence in endoglucanase and cellobiohydrolase from *Trichoderma pseudokoningii* S-38: effects of pH, quenching agents and ligand binding ». Journal of protein chemistry. Vol. 16. No. 7. p 681-688.
- ZUKIN, R.S.. 1979. « Évidence for a conformational change in the *Escherichia coli* maltose receptor by excited-state fluorescence lifetime data ». Biochemistry. Vol. 18. No. 11. p. 2139-2144.