



Université du Québec

Mémoire

Présenté à  
L' Institut Armand-Frappier  
Comme exigence partielle  
de la Maîtrise en  
Microbiologie Appliquée

Étude de la régulation du  
complexe ligno-cellulolytique  
de *Streptomyces lividans*

par

Francisco Bizouarn

Hiver 1996

## Table des matières

TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES FIGURES .....	ix
SOMMAIRE .....	xii
INTRODUCTION .....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
1.0 Les streptomycètes	
1.1 Source .....	5
1.2 Cycle de vie .....	6
1.3 Enzymes lignocellulolytiques .....	9
1.4 Importance industrielle .....	12
2.0 La génétique des streptomycètes	
2.1 Usage des nucléotides dans les gènes .....	13
2.2 Taux d'usage des codons chez les streptomycètes .....	13
2.3 Triplet d'initiation TTG .....	15
2.4 Codon TTA .....	18
2.5 Codon AAA .....	22
3.0 Les cellulases de <i>Streptomyces lividans</i> .....	23
3.1 Cellulase A .....	23
3.2 Cellulase B .....	26
4.0 Mutagenèse dirigée .....	29
4.1 Mutagenèse par la méthode du simple-brin poly uracil .....	31
4.2 Mutagenèse par l'élimination d'un site de restriction unique .....	34
4.3 Mutagenèse par amplification à la polymérase (PCR) .....	37
OBJECTIFS .....	41

MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	42
1.0 Produits	
1.1 Produits chimiques .....	43
1.2 Trousses .....	45
1.3 Enzymes de modification de l'ADN .....	45
2.0 Souches bactériennes .....	46
3.0 Oligonucléotides synthétiques .....	46
4.0 Vecteurs et phages .....	46
5.0 Milieux de culture .....	46
5.1 Milieu 2XTY .....	46
5.2 Milieu Bennett modifié .....	50
5.3 Milieu H .....	50
5.4 Milieu LB .....	50
5.5 Milieu LB de Miller .....	50
5.6 Milieu M14 .....	51
5.7 Milieu R-5 .....	51
5.8 Milieu SOC .....	52
5.9 Milieu Stewart-CMC .....	52
5.10 Milieu TSB .....	52
6.0 Isolement d'ADN plasmidique	
6.1 Isolement de plasmides d' <i>E. coli</i>	
6.1.1 Minipréparation .....	53
6.1.2 Maxipréparation .....	53
6.1.2.1 Isolement de l'ADN: .....	54
6.1.2.2 Isolement du plasmide par centrifugation en gradient de CsCl .....	55
6.2 Isolement de plasmides de <i>S. lividans</i> .....	55
7.0 Transformations	
7.1 Transformation d' <i>E. coli</i> .....	56
7.2 Transformation de <i>S. lividans</i> .....	57
8.0 Préparation d'ADN simple brin	
8.1 Par clonage dans le phage M13 .....	58
8.2 À l'aide du phage auxiliaire M13K07 .....	59
9.0 Analyses et manipulations de l'ADN	
9.1 Digestion enzymatique .....	61
9.2 Migration en gel d'agarose .....	61



9.3	Électroéluéon de fragments d'ADN du gel d'agarose . . . . .	61
9.4	Ligation . . . . .	62
9.5	Déphosphorylation de l'extrémité 5' de l'ADN . . . . .	62
9.6	Phosphorylation à la T4 DNA kinase. . . . .	62
10.0	Mutagéneé dirigée	
10.1	Mutagéneé via simple-brin poly-uracil . . . . .	63
10.2	Mutagéneé par l'élimination d'un site de restriction unique . . . . .	64
10.3	Mutagéneé par l'amplification élective à la polymérase . . . . .	65
11.0	Criblage des mutants . . . . .	66
11.1	Criblage à l'aide d'une amorce marquée à la DIG . . . . .	67
11.2	Criblage à l'aide d'une amorce marquée au <sup>32</sup> P . . . . .	67
12.0	Construction de gènes hybrides . . . . .	68
13.0	Séquençage . . . . .	69
14.0	Conditions de culture . . . . .	69
15.0	Immunodétection des enzymes . . . . .	70
15.1	Immunobuvardage de type Western . . . . .	70
15.2	Immunobuvardage de type dotblot . . . . .	71
16.0	Dosage de l'activité enzymatique . . . . .	71
17.0	Dosage du contenu protéique . . . . .	72
18.0	Calcul des structures secondaires possibles de l'ARN messenger . . . . .	72
	<b>RÉSULTATS . . . . .</b>	<b>73</b>
1.0	Mutagéneé des gènes codant la cellulase B et la cellulase A	
1.1	Mutagéneé de <i>celB</i> . . . . .	74
1.1.1	Mutagéneé de <i>celB</i> par l'amplification élective à la polymérase . . . . .	74
1.2	Mutagéneé de <i>celA</i> . . . . .	80
1.2.1	Mutagéneé de <i>celA</i> par l'amplification élective à la polymérase . . . . .	80
1.3	Clonage avec le fragment de 3.7 kb de pSUR . . . . .	92
1.4	Transformation dans <i>S. lividans</i> . . . . .	99

1.5	Sécrétion de cellulases et de xylanases .....	100
1.5.1	Mutants du gène <i>celA</i> .....	100
1.5.2	Mutants du gène <i>celB</i> .....	109
1.5.3	<i>S. lividans</i> 1326 vs J1725 .....	119
2.0	Gènes hybrides	
2.1	Construction des gènes hybrides .....	122
2.1.1	Hybride xylanase A-cellulase A .....	122
2.1.2	Hybride xylanase A-cellulase B .....	125
2.2.	Clonage avec le fragment de 3.7 kb de pSUR .....	125
2.3	Expression des cellulases .....	132
	DISCUSSION .....	138
	CONCLUSION .....	152
	REMERCIEMENTS .....	156
	BIBLIOGRAPHIE .....	157

## Liste des abréviations

A	Adénine
AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN <sub>BC</sub>	Acide désoxyribonucléique brin complémentaire
Amp <sup>r</sup>	Résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	Acide ribonucléique messenger
ARN <sub>t</sub>	Acide ribonucléique de transfert
ARN <sub>ti</sub>	Acide ribonucléique de transfert initiateur
ARN <sub>t</sub> <sub>leu-UUA</sub>	Acide ribonucléique de transfert pour le codon leucine UUA
ARN <sub>t</sub> <sub>AAA</sub>	Acide ribonucléique de transfert pour le codon lysine AAA
ARN <sub>t</sub> <sub>AAG</sub>	Acide ribonucléique de transfert pour le codon lysine AAG
ATP	Adénosine triphosphate
bps	paires de bases
C	Cytosine
Ci	Curie
CMC	Carboxyméthylcellulose
DIG	Digoxigénine
G	Guanine
Kan <sup>r</sup>	Résistance à la kanamycine
kb	kilo paire de bases
kDa	kilo Daltons
PCR	Amplification élective à l'aide de la polymérase (polymerase chain reaction)
pfu	unités formant des plages
<i>plac</i>	Promoteur du gène <i>lac</i>
rpm	rotations par minute
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulphate de sodium
SRU	Site de restriction unique, méthode de mutagenèse de la compagnie Pharmacia (trousse USE)
T	Thymine
Tsr <sup>r</sup>	Résistance à la thiostreptone
U	Uracil

## Liste des tableaux

Tableau I: Taux d'usage des codons pour chacun des acides aminés de <i>Streptomyces</i> et le nombre de fois que ceux-ci sont utilisés lors de la traduction des gènes <i>celA</i> et <i>celB</i> .....	14
Tableau II: Souches bactériennes utilisées .....	47
Tableau III: Composition et longueur des amorces utilisées lors des travaux de mutagenèse, de la construction de gènes hybrides et pour le séquençage..	48
Tableau IV: Vecteurs et phages utilisés .....	49

## Liste des figures

Figure 1: Cycle de vie des Streptomycètes . . . . .	7
Figure 2: Composantes de la paroi cellulaire des plantes . . . . .	10
Figure 3: Séquence partielle des dix gènes ayant un triplet d'initiation TTG . . . . .	16
Figure 4: Séquence en nucléotides contenue dans l'ARN <sub>i</sub> de <i>S. griseus</i> . . . . .	19
Figure 5: Séquence en nucléotides du gène <i>celA</i> et acides aminés déduites correspondant à la protéine complète . . . . .	24
Figure 6: Séquence en nucléotides du gène <i>celB</i> et acides aminés déduites correspondant à la protéine complète . . . . .	27
Figure 7: Diagramme de la mutagenèse dirigée par la méthode du simple brin poly uracil . . . . .	32
Figure 8: Diagramme de la mutagenèse dirigée par la méthode de sélection pour l'élimination d'un site de restriction unique (Deng et Nickoloff, 1992) . .	35
Figure 9: Diagramme de la mutagenèse dirigée par amplification élective à la polymérase	38
Figure 10: Schéma de l'approche utilisée lors des essais de mutagenèse dirigée par PCR pour la production des mutants T1, T2 et T3 de <i>celB</i> . . . . .	75
Figure 11: Profil électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplifications pour muter le gène <i>celB</i> . . . . .	78
Figure12: Profil électrophorétique en gel d'agarose des amplifications pour le brin complet du mutant T2 en présence de divers agents (Taq Enhancer Solution et protéine du gène 32) pour passer au delà des structures secondaires . . . . .	81
Figure 13: Profil électrophorétique en gel d'agarose des fragments obtenus suite à la digestion avec l'enzyme <i>HindIII</i> et <i>KpnI</i> des plasmides vecteurs des gènes <i>celB</i> mutés en T1, T2, T3 et du vecteur d'origine pTZ19U/ <i>celB</i> . . . . .	83
Figure 14: Schéma de l'approche utilisée lors des essais la mutagenèse dirigée par PCR pour la production des mutants M, K et MK du gène <i>celA</i> . . . . .	85

Figure 15: Profil électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus suite aux expériences de mutagenèse dirigée du gène <i>celA</i> .....	88
Figure 16: Profil électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification complets pour les mutations M, K et MK de <i>celA</i> .....	90
Figure 17: Profil électrophorétique en gel d'agarose des fragments obtenus suite à la digestion avec l'enzyme <i>SphI</i> des plasmides vecteurs des gènes <i>celA</i> mutés en M, K, MK et non muté . . . . .	93
Figure 18: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de répllication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/ <i>celA</i> . . . . .	95
Figure 19: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de répllication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/ <i>celB</i> . . . . .	97
Figure 20: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase A (M, K, MK, WT et pSUR) .....	101
Figure 21: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase B (M, K, MK, WT et pSUR) .....	103
Figure 22: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase A (M, K, MK, WT et pSUR) .....	105
Figure 23: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase B (M, K, MK, WT et pSUR) .....	107
Figure 24: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase B (T1, T2, T3, WT et pSUR) .....	110
Figure 25: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase A (T1, T2, T3, WT et pSUR) .....	112
Figure 26: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase A (T1, T2, T3, WT et pSUR) .....	114

Figure 27: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase B (T1, T2, T3, WT et pSUR) . . . . .	116
Figure 28: Détection par immunobuvardage de type Western de la production de cellulase B par les divers mutants dans les souches <i>S. lividans</i> J1725 (souche <i>bld</i> ) et 1326 . . . . .	120
Figure 29: Stratégie utilisée pour la construction du gène hybride <i>xlnA-celA</i> . . . . .	123
Figure 30: Stratégie utilisée pour la construction du gène hybride <i>xlnA-celB</i> . . . . .	126
Figure 31: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de répllication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/Hyb XA. . .	128
Figure 32: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de répllication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/Hyb XB. . .	130
Figure 33: Détection par immunobuvardage de la cellulase A, et dosages protéiques et de l'activité enzymatique des surnageants de culture de <i>S. lividans</i> 1326 transformées avec les vecteurs contenant les gènes <i>celA</i> mutés et modifiés . . . . .	133
Figure 34: Détection par immunobuvardage de la cellulase B, et dosages protéiques et de l'activité enzymatique des surnageants de culture de <i>S. lividans</i> 1326 transformées avec les vecteurs contenant les gènes <i>celB</i> mutés et modifiés . . . . .	135
Figure 35: Structures secondaires possibles de l'ADN du gène <i>celB</i> lors des étapes de mutagénèse dirigée . . . . .	140

## Sommaire

Trois méthodes de mutagenèse ont été utilisées lors de ces travaux: la mutagenèse par élimination d'un site de restriction unique (SRU), la méthode de Kunkel (simple brin polyuracil) et la mutagenèse par amplification élective à l'aide de la polymérase (PCR). La méthode la plus puissante était cette dernière car elle permet de produire facilement des mutants. Cette méthode permet entre autre, l'examen de la progression de la mutagenèse à chaque étape.

Le gène codant pour la biosynthèse de la cellulase A de *S. lividans* 1326 a été muté afin de modifier le codon d'initiation TTG en ATG et le codon suivant AAA en AAG. La mutation du codon de départ double la production de cellulase A comparée à celle du gène sauvage. Par contre, la mutation du codon AAA en AAG diminue la production de cellulase A à 50% de celle du sauvage. Le double mutant ATG-AAG donne une production de cellulase A approximativement équivalente à celle du clone sauvage.

Le gène de la cellulase B a dans sa séquence codant le peptide signal deux codons TTA dont l'ARNt est codé par le gène *bldA* qui n'est exprimé que lors du métabolisme secondaire. La production de cellulase B par la souche sauvage est extrêmement faible due à cette régulation. Les clones dont l'un des codons TTA est remplacé par un CTG produisent la cellulase B dès le départ en quantités nettement supérieures à celle de la souche sauvage mais de façon encore relativement faible. Par ailleurs, le double mutant n'ayant plus la restriction imposée par l'ARNt produit huit fois plus de cellulase B que la souche sauvage. Le clonage des gènes mutés T1 (mutant pour le premier codon TTA), T2 (double mutant), T3 (mutant pour le deuxième codon TTA), du gène sauvage (WT) et du contrôle négatif (pSUR) dans la souche *S. lividans* J1725 (souche *bldA*<sup>-</sup>) donne un taux de sécrétion de cellulase B similaire à celui produit par *S. lividans* 1326.

Deux gènes hybrides ont été construits comportant la séquence du promoteur, du site de fixation des ribosomes et du peptide signal de *xlnA* et la séquence codant la protéine mature de la cellulase A ou de la cellulase B. Ces gènes hybrides ont été construits afin d'outrepasser



les restrictions imposées par les codons du peptide signal des gènes *celA* et *celB* et pour profiter de la puissance du promoteur de *xlnA*. Dans la souche *S. lividans* 1326, le clone porteur du gène hybride *xlnA-celA* produit deux fois plus de cellulase A que le gène *celA*. Enfin, le clone avec le gène *xlnA-celB* produit au delà de 40 fois plus de cellulase B que le clone avec le gène sauvage *celB*.

## **Introduction**

Les streptomycètes sont des microorganismes à structure filamenteuse retrouvés abondamment dans la nature. Ils ont un système de sécrétion puissant et produisent de façon naturelle de grandes quantités de protéines extracellulaires. Ces microorganismes, pour la plupart, ne sont pas pathogènes chez l'homme et sont un outil de choix pour la production à l'échelle industrielle de protéines et de métabolites.

Les enzymes lignocellulolytiques ont une valeur commerciale non négligeable. Des cellulases sont couramment utilisées dans l'industrie des détergents à textiles et des xylanases sont employées pour le désencrage du papier. Le groupe de recherche sur les streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier travaille depuis plusieurs années à la caractérisation d'enzymes lignocellulolytiques de *S. lividans*. La surproduction de cellulases à partir des constructions géniques déjà présentes ne donne pas un rendement aussi bon qu'espéré (100UI/ml). La production de cellulase A est relativement bonne (0.56 UI/ml) mais celle de la cellulase B est un peu faible (0.081UI/ml). La production de cellulases est directement liée à la régulation et pour changer l'un il faut modifier l'autre. En modifiant la régulation de la biosynthèse de ces enzymes, on espère en augmenter leur production.

L'étude génétique des streptomycètes est parfois difficile due au haut pourcentage en G+C de l'ADN chromosomique. L'usage des codons pour la traduction des ARNm est souvent fortement biaisé en faveur de ceux qui sont riches en G+C. Certains codons peu communs sont parfois réservés pour la régulation de gènes ou de groupes de gènes.

Les gènes de la cellulase A et de la cellulase B de *S. lividans* présentent dans leur séquence des codons, qui par leur taux d'usage faible chez les streptomycètes, pourraient servir comme méthode de régulation de ces gènes. La cellulase A a pour le départ de sa

traduction un codon TTG suivi d'un codon AAA. La cellulase B a dans son peptide signal deux leucines codées par des triplets TTA dont l'ARN de transfert est sous le contrôle de gènes du métabolisme secondaire. La mutagenèse des codons rares potentiellement limitant par des codons plus communs devrait permettre une augmentation de la production de ces deux enzymes.

Les techniques classiques de biologie moléculaire de l'ADN telles que le séquençage d'ADN, la mutagenèse et les amplifications électives à la polymérase sont souvent difficiles avec les gènes de streptomycètes due à leur haute teneur en G+C. Il est donc important de mettre au point les outils qui permettent de faciliter ces tâches.

## **Revue bibliographique**

## 1.0 Les streptomycètes

### 1.1 Source

Les streptomycètes font partie de la famille des Actinomycètes qui est un regroupement de micro-organismes Gram positif possédant une structure filamenteuse. On les retrouve dans le sol et les eaux de tous genres, où il y a de la matière végétale en dégradation (Kutzner, 1981). En général, les streptomycètes sont des saprophytes chimio-organotrophes ne nécessitant qu'une source de carbone, de l'azote inorganique et quelques sels minéraux pour croître. La plupart des souches ne requièrent pas de vitamines ni de facteurs supplémentaires externes pour leur croissance (Kutzner, 1981). Les streptomycètes sont extrêmement bien adaptés à leur environnement, car ils sécrètent plusieurs enzymes qui hydrolysent la matière lignocellulosique, relativement difficile à dégrader, pour en produire des sucres simples plus facilement assimilables. Ainsi, ils peuvent utiliser différentes sources de carbone leur donnant un avantage dans leur environnement. Les streptomycètes sont résistants à plusieurs antibiotiques (pénicilline G, oléandomycine, etc.) et en produisent d'autres (streptomycine, tétracenomycine) (Weber *et al.*, 1979). Comme autre adaptation, plusieurs espèces produisent des spores leur permettant de résister aux conditions de dessiccation et de s'éparpiller dans leur voisinage. Les spores demeurent dormantes dans le sol pendant de longues périodes de temps et germent seulement quand les conditions redeviennent favorables (Mayfield *et al.*, 1972). Leurs mécanismes d'adaptation et la simplicité de leurs besoins font que l'on retrouve les streptomycètes un peu partout à travers la nature.

## 1.2 Cycle de vie

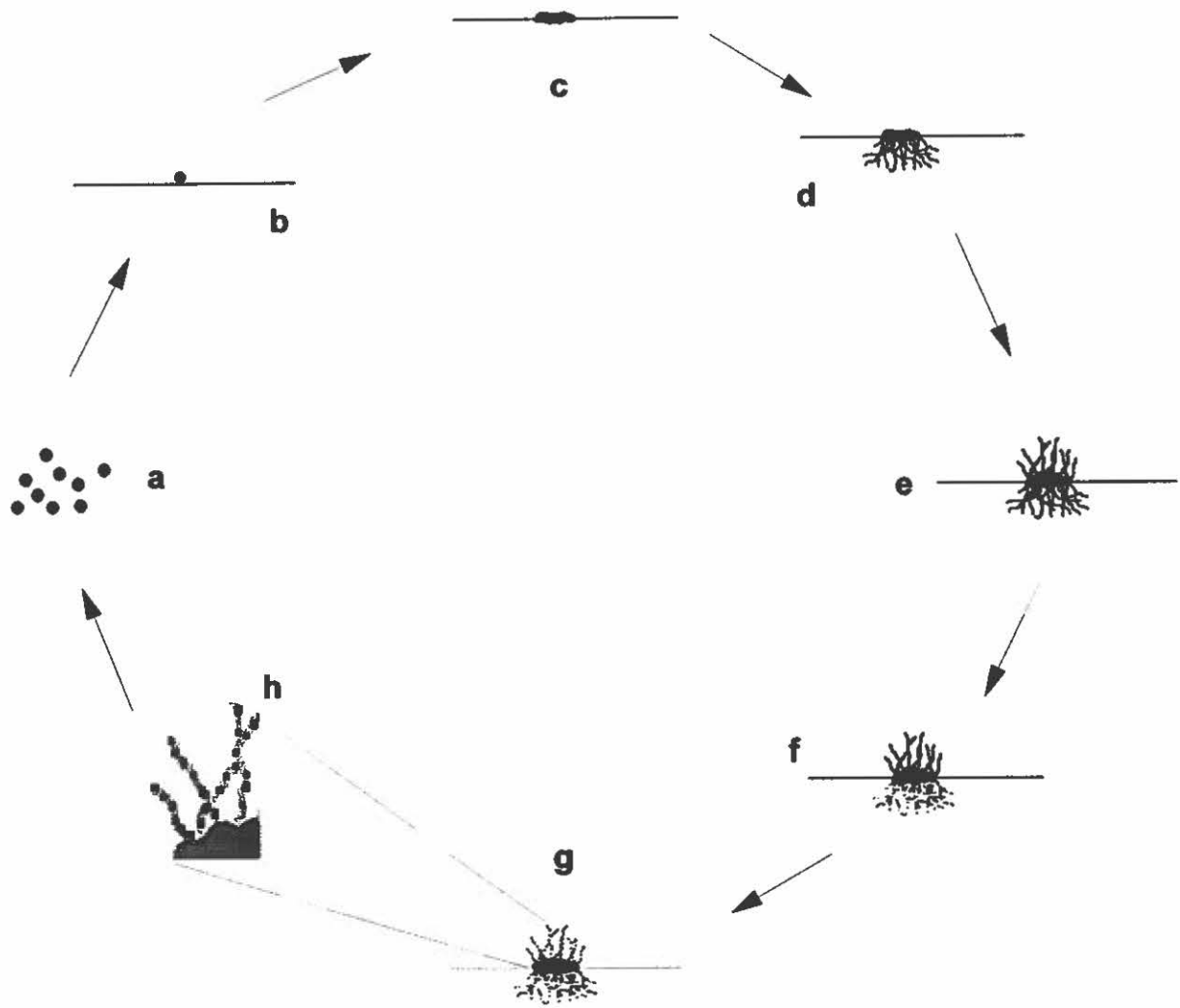
Sur milieu solide, le cycle de vie des streptomycètes passe par trois phases distinctes: l'état de mycélium végétatif, de mycélium aérien et de spores. Typiquement une spore qui se retrouve dans un milieu propice germe, commence à croître, se divise et se multiplie en produisant des hyphes. La croissance de la colonie se fait par extension de la paroi cellulaire à chaque extrémité des hyphes. On y retrouve souvent de multiples copies du génome qui ne sont pas séparées par des septa. La croissance se fait par extension longitudinale et par des embranchements latéraux. Cette croissance rapide et presque exponentielle produit une structure d'hyphes semblable à un tapis tressé (Chater, 1993). Initialement, ce tapis d'hyphes se développe en surface. Par la suite, les hyphes s'infiltrant dans le substrat et ancre la colonie. Cet ancrage permet l'utilisation maximale du substrat et des minéraux à proximité de la colonie (Mendez *et al.*, 1985). Ce stade démarque l'état de mycélium végétatif.

Quand la colonie vieillit et commence à manquer de certains éléments, il y a accumulation dans le mycélium végétatif de certains composés, dont du glycogène et du tréhalose (Brana *et al.*, 1986). En même temps, il y a début de croissance verticale des hyphes. Au fur et à mesure que ce mycélium aérien devient plus imposant, la dégradation du mycélium végétatif s'amorce et les macromolécules (protéines et acides nucléiques) sont recyclées. On remarque également un transport des matériels entreposés (sucres et sels) du mycélium végétatif vers le mycélium aérien en formation (Mendez *et al.*, 1985).

Éventuellement, les nutriments viennent à manquer. Les hyphes cessent de croître et les diverses copies du génome présentes dans les hyphes s'espacent. Des doubles parois transversales se forment de chaque côté des génomes afin de former des compartiments individuels. Ensuite, ces compartiments se séparent et deviennent ellipsoïdaux pour former

Figure 1: Cycle de vie des Streptomycètes. (a) spores (b) spore en contact avec la matière lignocellulosique (c) début de croissance sous forme de mycélium (d) propagation du mycélium dans le substrat (e) production de mycélium aérien (f) dégradation du mycélium végétatif (g) formation de spores (h) agrandissement de l'image précédente.





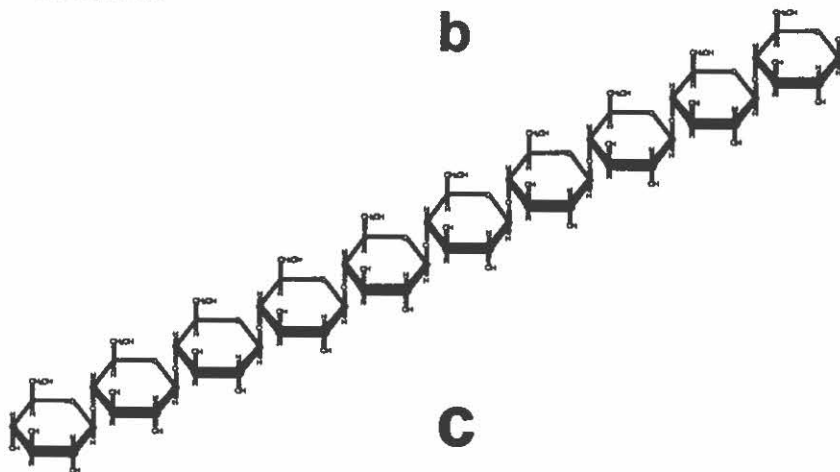
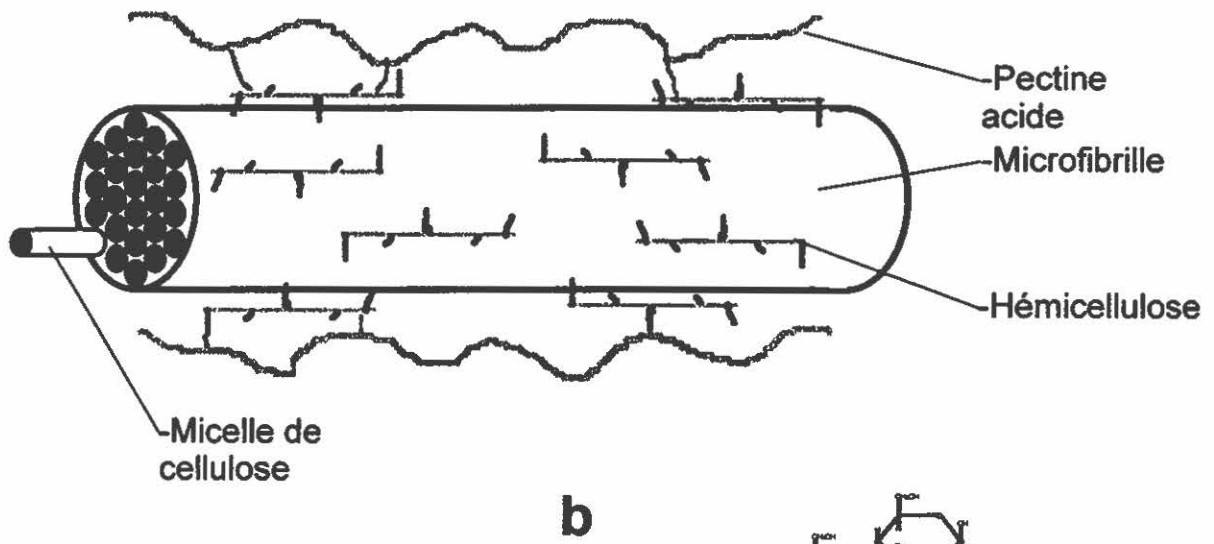
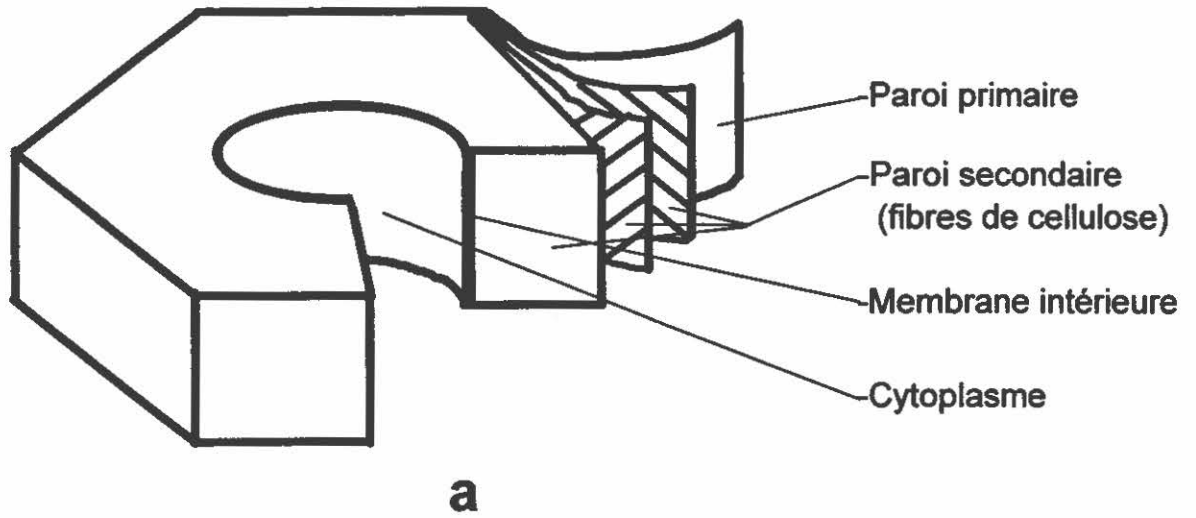
des spores (Chater, 1993). Enfin, les spores se répandent par l'entremise du vent et d'autres vecteurs tels que les animaux. Dans le sol, les spores restent dans un état latent jusqu'à ce les conditions redeviennent propices à la croissance afin que le cycle de vie puisse se répéter.

### 1.3 Enzymes lignocellulolytiques

Le matériel lignocellulosique forme la plus grande source de carbone organique terrestre du globe. On en retrouve dans les cellules des végétaux dans lesquelles la lignocellulose sert à donner la forme physique ainsi qu'à contribuer à la structure du système de translocation de la sève. Des fibres de cellulose entourées d'hémicellulose sont déposées en couches successives, dont les fibres se croisent à 90°, pour former les parois secondaires des cellules végétales (Figure 2a). La matière lignocellulosique est composée d'un mélange de divers sucres dont du glucose, du xylose et du mannose. Dans les plantes, plusieurs molécules de cellulose sont unies et entourées d'une gaine d'hémicellulose pour former une micelle de cellulose (Figure 2b). Plusieurs de ces micelles sont unies pour former des microfibrilles qui sont elles-mêmes réunies pour former les fibres de cellulose. La cellulose est un polymère de glucopyranose relié par des liens  $\beta$ 1-4 (Figure 2c) dont la longueur est estimée entre 300 et 2500 unités (White *et al.*, 1973). L'hémicellulose est un hétéropolymère composé de molécules de xylopyranose liées en positions  $\beta$ 1-4 avec des embranchements latéraux contenant des molécules d'arabinose, de galactose, de mannose et de divers acides organiques (Wilkie, 1979). Ces embranchements latéraux se lient entre eux et avec la cellulose pour former une structure tridimensionnelle très complexe.

La complexité de la structure de l'hémicellulose est telle qu'elle ne peut être dégradée par un seul enzyme. En effet, tous les micro-organismes lignocellulolytiques, y compris les streptomycètes, produisent une panoplie d'enzymes spécifiques à la dégradation du matériel

Figure 2: Composantes de la paroi cellulaire des plantes. (a) section d'une cellule végétale (b) diagramme de la structure d'une microfibrille (Darnell *et al.*, 1990) (c) polymère de glucopyranose (cellulose).



lignocellulosique. La plupart de ces enzymes (arabinofuranosidases, acétylxylanesterases, etc.) servent à libérer les sucres formant les embranchements secondaires du polymère de xylane (polymère composé d'unités de xylose liés par des liens  $\beta$ 1-4) et à dégrader le xylane lui-même (xylanases). Cette dégradation permet aux cellulases d'avoir accès au cellulose.

Il y a plusieurs groupes de recherche qui étudient la production d'enzymes lignocellulolytiques par les streptomycètes. À l'Institut Armand-Frappier, le groupe de recherche sur les streptomycètes a isolé, cloné et caractérisé deux cellulases (Théberge *et al.*, 1992, Wittmann *et al.*, 1994), trois xylanases (Mondou *et al.*, 1986, Vats-Mehta *et al.*, 1990, Kluepfel *et al.*, 1993), une mannanase (Arcand *et al.*, 1993), une acétylxylanestérase (Shareck *et al.*, 1995) et deux arabinofuranosidases (Manin *et al.*, 1994, Vincent *et al.*, non publié) toutes provenant de *Streptomyces lividans*.

#### 1.4 Importance industrielle

Les streptomycètes ont toujours été des micro-organismes importants du point de vue industriel car ils sont couramment utilisés pour la production d'antibiotiques (streptomycine, gentamycine, etc.). Récemment, ils ont été examinés de plus près comme système pour la production d'enzymes homologues (protéine inhibitrice de  $\beta$ -lactamase; Paradkar *et al.*, 1994) et hétérologues (toxine pertussique; Paradis *et al.*, 1995). La plupart des enzymes et protéines ayant une valeur commerciale ou une importance médicale sont produites à partir des organismes dont ils proviennent. La quantité ainsi produite est souvent très faible due aux restrictions imposées par le métabolisme de l'organisme lui-même. Les enzymes ou protéines se trouvent diluées avec d'autres protéines et molécules qui rendent la purification très coûteuse. L'avantage des streptomycètes réside en leur système de sécrétion puissant et leur production de façon naturelle de grandes quantités de protéines

extracellulaires. Des souches exemptes de protéases ont été isolées afin de récupérer la protéine sécrétée dans son intégrité (Butler *et al.*, 1993). Dû à leur capacité élevée de sécrétion et au fait que la plupart des streptomycètes ne sont pas pathogènes chez l'homme, les streptomycètes sont maintenant devenus des outils de choix pour produire des enzymes déjà présents dans les souches elles-mêmes ainsi que des protéines d'autres organismes.

## **2.0 La génétique des streptomycètes**

### **2.1 Usage des nucléotides dans les gènes**

Les streptomycètes ont un génome riche en nucléotides guanine et cytosine (G+C). Le pourcentage moyen de G+C dans le chromosome des streptomycètes est estimé à 74%. Cependant ce pourcentage peut varier, entre 61% et 78%, dépendant des espèces et des gènes. À l'intérieur des gènes, il y a une préférence marquée pour la présence de guanine et de cytosine comme troisième nucléotide dans les triplets de traduction (Wright et Bibb, 1992). Cette préférence pour les nucléotides G ou C en troisième position est en moyenne de 84%, mais peut atteindre jusqu'à 98%. Certains chercheurs déterminent la présence de cadres de lecture ouverts potentiels d'après ce pourcentage (logiciel Frame de Bibb).

### **2.2 Usage des codons chez les streptomycètes**

En 1992, Wright et Bibb ont publié l'usage des divers codons par les streptomycètes (Tableau I). Ce tableau démontre que l'usage des codons synonymes pour un acide aminé est fortement biaisé en faveur de ceux qui ont un nucléotide guanine ou cytosine en troisième position. Chez les codons synonymes qui diffèrent pour le premier et le deuxième nucléotide, il y a une préférence pour ceux qui contiennent le plus de G et C. Dans les codons synonymes pour les deux acides aminés leucine et arginine, dont les nucléotides

Tableau I: Taux d'usage des codons pour chacun des acides aminés. D'après la compilation de 63 gènes de *Streptomyces* (Wright et Bibb 1992) et le nombre de fois que ceux-ci sont présents dans chacun des gènes de la cellulase A et cellulase B incluant leur peptide signal.

AA	Codon	%	Cel A	CelB	AA	Codon	%	Cel A	CelB	AA	Codon	%	Cel A	CelB	AA	Codon	%	Cel A	CelB
Phe	UUU	1.4	-	-	Tyr	UAU	4.6	2	-	Ser	UCU	1.2	-	-	Cys	UGU	12.9	1	2
	UUC	98.6	16	17		UAC	95.4	13	9		UCC	39.6	10	13		UGC	87.1	5	4
Leu	UUA	0.2	-	2	His	CAU	6.4	1	-		UCA	2.8	-	2	Trp	UGG	100	12	11
	UUG	2.8	2	1		CAC	93.6	5	2	UCG	26.3	10	12	Arg		CGU	6.3	-	-
	CUU	2.4	2	-	Gln	CAA	6.7	1	1	AGU	2.7	3	-			CGC	46.2	11	6
	CUC	38.5	10	6		CAG	93.3	13	13	AGC	27.4	17	7	CGA	3.9	1	1		
	CUA	0.3	-	-	Pro	CCU	3.2	-	-	Asn	AAU	4.2	1	-	CGG	36.5	5	7	
	CUG	55.7	18	10		CCC	43.2	7	11	AAC	95.8	19	19	AGA	1.3	-	-		
Ile	AUU	4.3	-	-	CCA	1.3	1	-	Lys	AAA	4.9	1	-	AGG	5.7	3	2		
	AUC	92.7	13	10	CCG	53.2	18	15	Asp	AAG	95.1	9	1	Gly	GGU	8.1	8	1	
	AUA	2.9	1	1	Thr	ACU	2.1	1		-	GAU	4.2	5		-	GGC	64	35	38
Met	AUG	100	6	3		ACC	66.2	23	24	GAC	95.8	28	18		GGA	9.3	-	3	
	Val	GUU	3.4	-		1	ACA	2.2	2	1	Ala	GCU	2.9	2	1	GGG	18.6	8	3
		GUC	55.6	18	20	ACG	29.4	14	18	GCC		59.4	31	23	Ter	UGA	81	1	-
		GUA	0.2	1	-	Glu	GAA	18.6	1	1		GCA	4.2	1		4	UAA	3.2	-
GUG	39	18	11	GAG	81.4		13	6	GCG	33.6	20	20	UGA	15.9	-	-			

varient en première et troisième position, il y a une préférence pour les codons débutant avec le nucléotide cytosine. Par contre, il faut noter que ces statistiques n'ont été compilées qu'à partir de 63 gènes qui provenaient de diverses souches de streptomycètes. Ces valeurs ne tiennent pas compte du fait que très peu de gènes qui servent au maintien cellulaire ont été séquencés, ni des variations entre les diverses souches (Wright et Bibb, 1992).

### 2.3 Triplet d'initiation TTG

Le codon TTG code pour une leucine et est généralement peu utilisé chez les streptomycètes. Environ 3% des résidus leucine sont codés par le triplet TTG (Wright et Bibb, 1992) lorsque ces derniers sont localisés à l'intérieur d'un gène (Tableau I). De plus, son usage comme codon d'initiation est encore plus rare. Il n'y a que dix références à cette situation répertoriées dans la littérature et dans la banque de donnée GenBank. De ces dix protéines rapportées avec un TTG comme codon initiateur de leur traduction, il y a deux cellulases, deux protéases, une glutamine amidotransférase, une intégrase/transposase, une dTDP-glucose déshydratase, une  $\beta$ -kétacyl synthétase/acétyltransférase, une protéine impliquée dans la production de la lincomycine et une sous-unité de l'ATP synthétase (Figure 3). Vu la diversité des protéines, il ne semble pas y avoir de lien direct entre l'initiation par un codon TTG et un type de fonction particulier.

Suite à l'analyse de 746 séquences d'ADN de streptomycètes disponibles dans GenBank, le taux d'usage des divers codons pour le départ de la traduction est d'environ 68.2 % pour le triplet ATG, 30.4 % pour GTG et seulement 1.3 % pour TTG. Normalement le triplet TTG code pour une leucine, mais comme il s'agit du triplet d'initiation, celui-ci permet l'adhésion d'une méthionine formylée pour démarrer la transcription. Chez les procaryotes, Ganoza *et al.* (1985) ont remarqué que toute initiation de transcription se fait à



Figure 3: Séquence partielle des 10 gènes ayant un triplet d'initiation TTG; *tpap* tripeptidylaminopeptidase (Butler *et al.*, 1994), *hisH* glutamine amidotransférase (Limauro *et al.*, 1990), **IS116** intégrase transposase présumptif (Leskiw *et al.*, 1990), *celA* endoglucanase (Théberge *et al.*, 1992), *t1p* protéase de type trypsine (Hintermann, 1994), *strE* dTDP glucose déshydratase (Pissowotzki *et al.*, 1991), **actIORF1**  $\beta$ -kétocoacyl synthétase acyl transférase (Fernandez-Moreno *et al.*, 1992), *lmbV* gène de la biosynthèse de la lincomycine (Pesche *et al.*, 1994), *celA1* endoglucanase (Fernandez-Abalos *et al.*, 1992), *atpC* synthétase de transporteur d'ATP-H<sup>+</sup> (Hensel *et al.*, 1991).

*tpap* CAGCGGCGAGGATCCCCGTACTTGTCGCGAACACGTACGGGGAGGGCCACT**TTGAGGAAGAGCAGCATA**CGGCGG

*hisH* GGCGGGGCATGTGCCTGCTCGCGGGCGTCCTGAGGCTGGAGGTCTGGAG**TTGACCGCCGCAGTCCCCGCCGGC**

IS116 TTCTCCGGGCCACGGAATGCTGGTCACGGTGGTGGAACGGAGCGAGGCGGTT**GAGCACGCGGCATGATCGGATA**

*celA* TTGGGAGCGCTCCCATCGCGTTGTGTCGCCTTCGCACGAGGAGGAACGCT**TTGAAACGCCTTTTGGCCCTGCTC**

*tlp* CGTCTGATCACATACTGCGAGCCGCCAACCCCCACGAAAGGACGTACGTTGACCCATACCACGACCATCGCC

*StrE* TCCCGTCGAACCGATCCGATCCCTCCCGACAAGAAGCGGAGCCTGTTGCCT**TTGACCACCCATCTGCTCGTCACC**

*actIORF1* CCGACGATGACGACGACCACCGGACGAACGCATCGAAGGAGCTGTTCGGAT**TGAAGCGCAGAGTCGTCATCAG**

*lmbV* TTCCGCGTCGTACACCCGGAAGCTGGGAGAGAGCCATTTACGCCATCGAG**TTGCAGCGCAAGGGACTGGCCCCGG**

*celA1* TCCAGTGGGAGCGCTCCCAAAGTCACGTCCTCTGAAATCGAGGTACTGTCT**TTGAGCCGCAA**ACTTCGTACCCTG

*atpC* TTGTAACCAACACCCGGCTCTCCCGCCGGGTGGTGACCCGAGGAGCCACCT**TTGGCTGCTGAGCTGCACGT**CGCG

l'aide d'une méthionine formylée. La boucle anticodon de l'ARN de transfert initiateur ARN<sub>t</sub>, se lie avec les triplets AUG et GUG pour démarrer l'initiation. Toutefois, dans le cas du codon UUG, il y aurait une interaction et une liaison avec la boucle T du même ARN<sub>t</sub>, (Figure 4). Il faut donc que l'ARN se replie et se contorsionne pour se placer au bon endroit (Kuchino *et al.*, 1982). Ce manque d'appariement et repliement de l'ARN<sub>t</sub> pourrait causer une diminution ou un ralentissement dans le départ de la traduction de l'ARN<sub>m</sub> par les ribosomes.

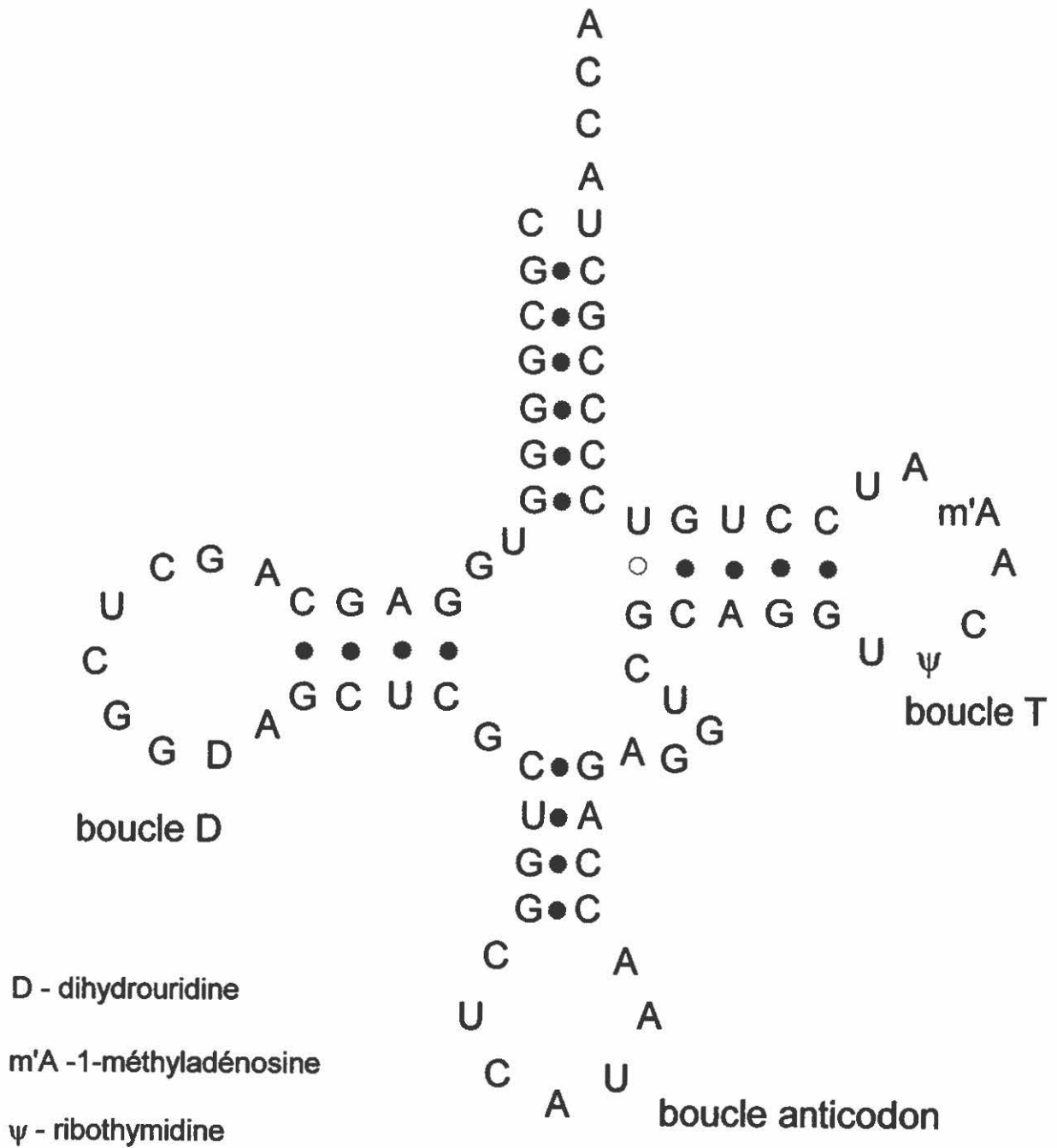
Par le passé, Fernandes-Abalos *et al.* (1991) ont muté le gène codant la synthèse de la cellulase A<sub>1</sub> de *S. halstedii* pour changer le codon TTG en ATG afin de produire la protéine chez *E. coli*, mais ils n'ont fait aucune mention de l'effet de cette modification chez les streptomycètes. L'effet provoqué par le changement du codon de départ du gène *celA* sur le taux de production de cellulase A chez les streptomycètes est inconnu.

## 2.4 Codon TTA

Lors de la cartographie préliminaire du chromosome de *S. coelicolor*, fait par Hopwood et ses collaborateurs (1967), plusieurs mutants isolés présentaient le phénotype chauve, car ils avaient de la difficulté à produire du mycélium aérien et des spores. Une série de ces mutants nommée *bld* (*bld* pour bald) étaient aussi incapables de produire plusieurs des antibiotiques que produisait la souche sauvage. Outre cette inhabilité de passer à leur phase de croissance secondaire, ces mutants avaient le phénotype normal de leur espèce pour la croissance primaire.

Avec l'arrivée des techniques de biologie moléculaire modernes, les chercheurs du John Innes Institute en Angleterre ont rapporté avoir isolé un fragment d'ADN, provenant d'une banque génomique, qui reconférait le phénotype sauvage aux mutants *bldA* (Piret et

Figure 4: Séquence en nucléotides contenue dans l'ARN<sub>u</sub> (sous forme de trèfle) de *Streptomyces griseus* (Kuchino *et al.* 1982).



Chater, 1985). Ils ont par la suite séquencé les mutants *bldA* et remarqué que dans cinq des mutants, les mutations étaient délimitées à l'intérieur d'une région de 16 nucléotides. Suite à l'analyse de cette région, ils ont postulé qu'il existait possiblement une séquence codant pour un ARN<sub>t</sub> qui reconnaîtrait les codons UUA et permettrait la traduction de ce codon pour l'acide aminé leucine (Lawlor *et al.* 1987). D'autre part, Babcock et Kendrick en 1990 ont tenté de reconferer l'activité sporulante d'un autre type de mutant *bld* chez *S. griseus*. Ils ont isolé un fragment d'ADN, par complémentation de mutants, qui reconferait cette activité et qui contenait un cadre de lecture potentiel pour une protéine de 55.5 kDa. Ce cadre de lecture possédait un codon leucine TTA. La sporulation passait donc par l'entremise d'une protéine qui était au moins sous le contrôle de l'ARN<sub>t</sub><sub>UUA</sub>.

Les études sur les codons TTA se sont intensifiées par la suite. En 1991, Leskiw *et al.* (1991a et 1991b) ont présenté des études de la dépendance au gène *bldA*, des gènes *carB*, *lacZ*, *ampC*, *hyg* et *aad* contenant un ou plusieurs codons TTA. Les gènes *carB*, *lacZ* et *ampC* étaient fortement dépendants du *bldA* pour leur expression. Les gènes *hyg* et *aad* (résistance à l'hygromycine et à la spectinomycine) avaient une dépendance partielle au *bldA*, probablement due à l'appariement imparfait du codon UUA avec un autre ARN<sub>t</sub> leucine. Ils ont aussi noté que le remplacement du codon TTA pour CTC (leucine) rendait le gène *carA* indépendant du *bldA*. Fernandez-Moreno *et al.* (1991) ont trouvé des codons TTA dans deux des gènes responsables de la production d'actinorhodine. Un de ces gènes, *actII-ORF4*, un gène responsable de l'activation de la transcription fut muté et le codon TTA remplacé par un codon TTG qui est aussi un codon minoritaire pour la leucine. Suite à la mutagenèse, le mutant avait perdu la régulation temporelle présente avec le gène sauvage et d'actinorhodine était produite lors du métabolisme primaire. En 1991, Leskiw *et al.* proposent que les codons TTA seraient impliqués dans la régulation des gènes contrôlant la production de protéines permettant le développement du métabolisme secondaire. Les gènes

nécessaires pour la croissance végétative ne devraient pas comporter de codons TTA; l'usage de ces codons serait réservé aux gènes régulateurs du métabolisme secondaire et de la production d'antibiotiques.

Au début de 1993, Leskiw *et al.* ont publié des résultats démontrant que la production de  $\beta$ -lactamase à partir d'un gène rapporteur *ampC* (*S. coelicolor*) contenant plusieurs codons TTA était favorisée lors du métabolisme secondaire. Ils ont aussi noté qu'il y avait très peu d'ARNt<sub>UUA</sub> dans les cultures jeunes mais qu'il y en avait une surabondance dans les cultures plus vieilles. Quelques mois plus tard, Gramajo *et al.* (1993) ont rapporté qu'en culture liquide, il y avait traduction des codons UUA du gène d'actinorhodin (*S. coelicolor*) dès le départ des cultures (pendant le métabolisme primaire) et qu'il n'y avait pas d'augmentation dans la production d'ARNt pendant la culture. Ceci contredit les résultats précédents et une divergence d'opinion existe présentement entre ces deux groupes.

## 2.5 Codon AAA

Il y a deux codons synonymes pour la synthèse de l'acide aminé lysine (AAA et AAG). D'après les statistiques de Wright et Bibb (1992), l'usage du codon AAG est majoritaire à 95% et le codon AAA est utilisé à 5% lors de la traduction de l'acide aminé lysine. Il y a donc encore une préférence marquée pour l'usage des nucléotides G+C versus A+T. Ces données sont en accord avec la théorie de pression directionnelle de mutation de Sueoka (1992).

En 1993, Ueda et ses collaborateurs ont muté le codon AAA minoritaire (position Lys89) du gène *ssi* (streptomyces subtilisin inhibitor) pour le remplacer par le codon AAG majoritaire. Ils ont remarqué que la mutation produisait une faible diminution de la

production de cet enzyme. Ils en ont conclu que la présence du codon AAA intervenait probablement pas dans la régulation de l'expression du gène *ssi* chez les streptomycètes.

### 3.0 Les cellulases chez *Streptomyces lividans*

En 1987, Shareck *et al.* ont isolé quatre clones (IAF9, IAF12, IAF74 et IAF82), qui confèrent une activité endoglucanolytiques aux souches mutantes *S. lividans* 10-164 et 8-83, à partir d'une banque génomique de *S. lividans* 1326 d'approximativement 30 000 clones. Les cartes de restriction préliminaires de ces clones ont montré: que l'insert du clone IAF9 était un sous fragment de l'insert du clone IAF12 et que les clones IAF74 et IAF82 avaient une région commune. Le clone IAF9, qui contient le gène *celB* (Wittmann *et al.*, 1994), produit 16 fois plus de cellulase B que la souche sauvage de *S. lividans* 1326. Par ailleurs le clone IAF74 (Théberge *et al.*, 1992), qui contient le gène *celA*, produit 850 fois plus de cellulase A que la même souche sauvage (Shareck *et al.*, 1987). Ceci est dû au fait que les gènes *celA* et *celB* ont été clonés dans des vecteurs à copies multiples.

#### 3.1 Cellulase A

La cellulase A a été purifiée, caractérisée et le gène séquencé en 1992 par Théberge *et al.* à partir du clone IAF74 (Figure 5). Le gène de la cellulase A est composé de 1380 nucléotides et on retrouve en amont du gène une séquence de 14 nucléotides complémentaire et inversée que l'on retrouve fréquemment dans les gènes de cellulases. En amont du gène *celA*, il y a deux séquences à -35 et -10 qui permettent le départ de la transcription. Le départ de la traduction se fait avec un codon TTG au lieu du codon ATG typique. On retrouve un site favorable à la fixation des ribosomes à sept nucléotides en



Figure 5: Séquence en nucléotides du gène *celA* et acides aminés déduites correspondant à la protéine complète.

Légende:

- la séquence inversée est en souligné double,
- le site de fixation des ribosomes est souligné,
- les codons rares sont encadrés,
- le peptide signal correspond au 1<sup>er</sup> bloc ombré,
- le domaine de fixation à la cellulose suit,
- le linker est indiqué par le 2<sup>ième</sup> bloc en ombré et
- le domaine catalytique continue jusqu'à la fin.

#nt		#aa
1	C CGC GGT GGC CGG CAG GCC GCG GAC GGG GGC GAG CCG CGG CCT GGC GCC ATT GCG GGC	
59	CTC GTC CGG CGA TGC ACC GGG CTC GGC GCG AAG CAG TGA CAG CAA CGC GCG TGG TCG TCG	
119	CGG CCC CAC CGG CCG CGC GCG CCG GTC GCC CCG CGC ACC CGG CCG GGG TCC GAC ACC GAC	
179	TGC GGA AGG CGC ATC GTG GAA CGG AAC ATC GCG TCC GCG GGT CGG CGC GTG GCC GAC GAG	
239	CCG GCC GCC ACC GGC GCC CGA CGG CAG CAG GGG CCG ATT GCT CCT CAC GGG CGG GGA GTT	
299	CGC GTT CCA CAC CCT GTC GGC CAC CGG CTG CGC CGG GTG TAC GGT CTC GGG CCG ATG GGC	
359	TTT GGG AGC GCT CCC ATC GCG TTG TGT CGC CTT CGC ACG AGG AGG AAC GCT TTT AAA CGC	
	L K R	3
419	CTT TTG GCC CTG CTC GCG ACC GGC GTG TCG ATC GTC GGC CTG ACT GCG CTC GCC GGC CCC	
	L L A L L A T Q V S I V G L T A L A G P	23
479	CCG GCA CAG GCC GCC ACC GGC TGC AAG GCC GAG TAC ACG ATC ACC AGC CAG TGG GAG GGC	
	F A Q A A T G C K A E Y T I T S Q W E G	43
539	GGC TTC CAG GCC GGG GTG AAG ATC ACC AAC CTG GGC GAT CCC GTC AGT GGC TGG ACG CTC	
	G F Q A G V K I T N L G D P V S G W T L	63
599	GGG TTC ACG ATG CCG GAT GCC GGG CAG CGG CTC GTC CAG GGC TGG AAC GCG ACC TGG TCG	
	G F T M P D A G Q R L V Q G W N A T W S	83
659	CAG TCC GGC TCC GCG GTC ACC GCC GGC GGC GTC GAC TGG AAC CGC ACC CTG GCC ACC GGC	
	Q S G S A V T A G G V D W N R T L A T G	103
719	GCG TCG GCC GAC CTG GGG TTC GTG GGC TCC TTC ACG GGC GCC AAT CCC GCG CCC ACG TCC	
	A S A D L G F V G S F T G A N P A P T S	123
779	TTC ACG CTC AAC GGC CCG ACG TGC AGC GGS TCC GTC ACC GAT CCG CCG ACG GAC CCG CCG	
	F T L N G A T C S G S V T D P P T D P P	143
839	ACC GAT CCG CCC GCG ACC GGG ACA CCG GCC GGC GTC AAC GGC CAA CTG CAC GTC TGC GGC	
	T D P P A T G T P A A V N G Q L H V C G	163
899	GTG CAT CTG TGC AAC CAG TAC GAC CGC CCG ATA CAG CTG CGC GGC ATG AGC ACG CAC GGC	
	V H L C N Q Y D R P I Q L R G M S T H G	183
959	ATC CAG TGG TTC GGC CCG TGC TAC GGC GAC GCG TCC CTG GAC CGC CTG GCG CAG GAC TGG	
	I Q W F G P C Y G D A S L D R L A Q D W	203
1019	AAG TCG GAC CTG CTC CGC GTC GCC ATG TAC GTC CAG GAG GAC GGC TAC GAA ACC GAC CCG	
	K S D L L R V A M Y V Q E D G Y E T D P	223
1079	GCG GGC TTC ACC AGC CGG GTG AAC GGC CTG GTC GAC ATG GCT GAG GAC CGC GGC ATG TAC	
	A G F T S R V N G L V D M A E D R G M Y	243
1139	GCG GTG ATC GAC TTC CAC ACA CTG ACG CCG GGC GAC CCG AAC TAC AAC CTC GAC CGC GCC	
	A V I D F H T L T P G D C P N Y N L D R A	263
1199	AGG ACG TTC TTC TCC TCC GTA GCC GCC CGC AAC GAC AAG AAG AAC GTG ATC TAC GAG ATC	
	R T F F S S V A A R N D K K N V I Y E I	283
1259	GCC AAC GAG CCC AAC GGG GTG AGC TGG ACG GCC GTG AAG AGC TAC GCC GAG CAG GTC ATC	
	A N E P N G V S W T A V K S Y A E Q V I	303
1319	CCG GTG ATC CGG GCC GCC GAC CCG GAC GCC GTC GTC ATC GTC GGC ACC CGC GGC TGG TCC	
	P V I R A A D P D A V V I V G T R G W S	323
1379	TCG CTG GGC GTC TCG GAC GGC GCC AAC GAG AGC GAG GTG GTC AAC AAC CCG GTG AAC GCG	
	S L G V S D G A N E S E V V N N P V N A	343
1439	ACC AAC ATC ATG TAC GCG TTC CAC TTC TAC GCC GCC AGC CAC AAG GAC GAC TAC CGG GCG	
	T N I M Y A F H F Y A A S H K D D Y R A	363
1499	GCG GTG AGG CCA GCG GCC ACC CGA CTT CCC CTG TTC GTG TCG GAG TTC GGC ACG GTG AGC	
	A V R P A A T R L P L F V S E F G T V S	383
1559	GCC ACC GCG TGG TCG GTG GAC CGG TCG AGC AGC GTC GCC TGG CTG GAT CTG CTC GAC GAC	
	A T A W S V D R S S S V A W L D L L D Q	403
1619	CTC AAG ATC AGT TAT GCG AAC TGG ACG TAT TCC GAC GCC GAC GAG GGG AGC GCC GCG TTC	
	L K I S Y A N W T Y S D A D E G S A A F	423
1679	AGG CCG GGC ACC TGT GAG GGC ACC GAC TAC AGC AGC AGT GGC GTG CTG ACC GAG TCG GGT	
	R P G T C E G T D Y S S S G V L T E S G	443
1739	GCT CTC GTG AAG AGC CGC ATC AGC ACC ACC GAC GAC TTC CCG ACG AGC TGA CCC GGC GAG	
	A L V K S R I S T T D D F P T S *	460
1799	ACG GGA GGA GCG GAC GCG CAA CGA GGT GGG CCG CGG CTC CGG TTC CGC CGG TCA CCG ACC	
1859	GCC CCC GAA GTG GTC CCG GAG TTC CTC GTC GCA GTC GTC CGC GGC ACC GCC CTC GAC TCG	
1919	CGA GAA CGT CAG CAC CCC GTC GTC GCC TTC CCG CCC GGT CTT GGC CAG TTG CTT CTC GAT	
1979	GTC CGC GAT GGC CTC GGC GAC ACC GCG CTG ACG GGT TCC TC	

amont de ce triplet TTG. Il y a également un triplet ATG dans le même cadre de lecture à 57 nucléotides en amont du codon TTG. Toutefois, il ne semble pas y avoir de site propice à la fixation des ribosomes en amont de cet ATG (Théberge *et al.*, 1992).

La cellulase A est une endoglucanase de 46 kDa et dont le point isoélectrique est de 3.3. L'activité optimale de l'enzyme est à 50°C et à un pH de 5.5. La protéine complète est composée de 459 acides aminés dont 27 forment le peptide signal. La protéine mature est composée de deux domaines. Il y a un domaine catalytique du côté N-terminal et un domaine de fixation à la cellulose du côté C-terminal. D'après son site catalytique, la cellulase A ferait partie de la famille des endoglucanases de type A. La cellulase A dégrade la cellulose en cellobiose et autres oligoglucosides, mais ne produit pas de glucose. Les épreuves de dégradation démontrent que la cellulase A semble être capable de transglycosyler les petits oligoglucosides et produire du cellohexaose. Cette transglycosylation n'est probablement pas très utilisée dans la nature, car les fragments de cellulose seraient absorbés par le micro-organisme au fur et à mesure qu'ils seraient produits (Théberge *et al.*, 1992).

### 3.2 Cellulase B

La cellulase B a été purifiée, caractérisée et le gène séquencé par Wittmann *et al.* en 1994 à partir du clone IAF9 (Figure 6). Le gène de la cellulase B est composé de 1143 nucléotides. On retrouve en amont du gène *celB* des séquences de 13 nucléotides répétées et inversées. Les sites à -35 et -10 du promoteur permettent le départ de la transcription. Le départ de la traduction se fait avec le codon typique ATG en amont duquel on retrouve un site favorable à la fixation des ribosomes. La séquence qui code le peptide signal contient deux triplets TTA codant pour deux résidus de leucine. Tel que décrit à la section 2.4, ce

Figure 6: Séquence en nucléotides du gène *celB* et acides aminés déduites correspondant à la protéine complète.

Légende:

- la séquence inversée est en souligné double,
- le site de fixation des ribosomes est souligné,
- les codons rares sont encadrés,
- le peptide signal correspond au 1<sup>er</sup> bloc ombré,
- le domaine catalytique suit,
- le linker est indiqué par le 2<sup>ième</sup> bloc en ombré et
- le domaine de fixation à la cellulose continue jusqu'à la fin.

#nt		#aa
1	GAT CGG CCG CAC GAT GGT GCG GCT GCT GCC TGG AGG AGA TGG AGG ACG CCC CGG TCG CCT	
61	GCC GGC ACG TCA TCC TCC GTA CCG AGC TGG TAG TCC GGG ACT CCG CCT GAG CAA CCG GGC	
121	CGC CGG GAG CGC TCC CGG AGC GGG ACC CCT CCG ACC TGC GGC TTC GAG ATT CGT TCG ACA	
181	ACT CTG CCG CGC ACA GTC TTG TCA GGA ACA TGA ACC GCT TCT ACA GTC CCA TCA ACC GGT	
241	AAG TGG GAG CGC TCC CAT CAG TGG GGA GTT GGG AGC GCT CCC OCA CCG GCC CCC TCC CTC	
301	CCC CCA CAC CCT CCC GGA GAG GCC CCC ATG CGA ACG TTA CGG CCC CAG GCC CGC GCC CCG	
	M R T L R P Q A R A E	11
361	CGC GGC CTC TTG GCG GCC CTG GGC GCG GTC TTA GCG GCC TTC GCC CTC GTG TCG TCC CTG	
	R G L L A A L G A V L A A F A L V S S L	31
421	GTG ACA GCC GCC GCG CCC GCC CAG GCG GAC ACC ACG ATC TGC GAA CCC TTC GGA ACG ACG	
	V T A A A F A Q A D T T I C E P F G T T	51
481	ACG ATC CAG GGC AGG TAC GTC GTC CAG AAC AAC CGC TGG GGC TCC ACC GCC CCC CAG TGC	
	T I Q G R Y V V Q N N R W G S T A P Q C	71
541	GTC ACG GCC ACC GAC ACC GGC TTC CCG GTC ACG CAG GCC GAC GGC TCG GCA CCG ACC AAC	
	V T A T D T G F R V T Q A D G S A P T N	91
601	GGG GCG CCG AAG TCG TAC CCG TCG GTC TTC AAC GGC TGC CAC TAC ACG AAC TGT TCA CCG	
	G A P K S Y P S V F N G C E Y T N C S P	111
661	GCC ACG GAC CTC CCC GTC CCG CTC GAC ACC GTC TCC GCG GCG CCG TCC AGC ATC TCG TAC	
	G T D L P V R L D T V S A A P S S I S Y	131
721	GGC TTC GTC GAC GGC GCC GTC TAC AAC GCC TCG TAC GAC ATA TGG CTG GAC CCG ACG GCC	
	G F A V D G A V N A S Y D I W L D P T A	151
781	CGC ACC GAC GGG GTG AAC CAG ACC GAG ATC ATG ATC TGG TTC AAC AGG GTG GGT CCG ATC	
	R T D G V N Q T E I M I W F N R V G P I	171
841	CAG CCC ATC GGC TCA CCG GTG GGC ACG GCC TCC GTC GGC GGC CCG ACC TGG GAG GTG TGG	
	Q P I G S P V G T A S V G G R T W E V W	191
901	AGC GCG CCG AAC GGC TCG AAC GAC GTG CTG TCG TTC GTG GCA CCG TCG GCG ATC AGC GGC	
	S A A N H G S N D V L S F V A P S A I S G	211
961	TGG AGC TTC GAC ATG GAC TTC CCG GCG ACC GTC GCG CCG GGA CTC GCC GAG AAC	
	W S F D V M D F V R A T V A R G L A E N	231
1021	GAC TGG TAC CTG ACG AGC GTT CAG GCG GGG TTC GAG CCG TGG CAG AAC GGC GCC GGA CTG	
	D W Y L T S V Q A G F E P W Q N G A G L	251
1081	GCC GTG AAC TCC TTC TCC TCC ACC GTC GAG ACC GGC ACC CCC GGC GGC ACC GAC CCC GGC	
	A V N S F S S T V E T G T P G G T D P G	271
1141	GAC CCG GGC GGC CCG TCC GCG TGT GCG GTG TCG TAC GGC ACG AAC GTC TGG CAG GAC GGC	
	D F G G P S A C A V S Y G T N V W Q D G	291
1201	TTC ACC GCG GAC GTC ACC GTC ACC AAC ACG GGC ACG GCT CCC GTC GAC GGC TGG CAA CTC	
	F T A D V T V T N T G T A P V D G W Q L	311
1261	GCC TTC ACC CTG CCC TCC GGC CAG CCG ATC ACC AAC GCC TGG AAC GCG TCC CTG ACG CCC	
	A F T L P S G Q R I T N A W N A S L T P	331
1321	TCC TCG GGC TCC GTC ACG GCA ACC GGC GCG AGC CAC AAC GCC CCG ATC GCA CCG GGC GGC	
	S S G S V T A T G A S H N A R I A P G G	351
1381	AGC CTG TCG TTC GGC TTC CAG GGC ACC TAC GGC GGC GCG TTC GCC GAG CCG ACC GGC TTC	
	S L S F G F Q G T Y G G A F A E P T G F	371
1441	CGC CTG AAC GGC ACC GCC TGC ACC ACG GTG TAA CCG CCC CGC CTC CCC GCC CGT CCG GTC	
	R L N G T A C T T V *	382
1501	GAA GCG CCC GCC CCG GAC GGG CCG GGG TTC CAC GGG ACG TCC CCA CCA TTG TCA TGA ACT	
1561	GAT CA	

codon est très peu utilisé et servirait à réguler les gènes codant pour des protéines utilisées lors du métabolisme secondaire du micro-organisme (Wittmann *et al.*, 1994).

La cellulase B est aussi une endoglucanase 36 kDa et dont le point isoélectrique est de 4.2. L'activité optimale de l'enzyme est à 60°C et à un pH de 6.5. La protéine complète est composée de 381 acides aminés dont les 40 premiers forment le peptide signal. À l'inverse de la cellulase A, la cellulase B possède son domaine catalytique du côté N-terminal et son domaine de liaison à la cellulose du côté C-terminal. D'après sa séquence en acides aminés, la cellulase B ferait partie de la famille des endoglucanases de type H. L'enzyme dégrade la cellulose en divers oligoglucosides mais ne produit pas de glucose. Contrairement à la cellulase A, la cellulase B semble être dépourvue d'activité de transglycosylation des oligoglucosides (Wittmann *et al.*, 1994).

#### **4.0 Mutagenèse dirigée**

La science est la connaissance des conséquences et dépendance d'un fait sur un autre (Hobbes, 1651). La compréhension d'un mécanisme complexe ne peut se faire que par l'examen des sous-unités qui le composent. Plus les sous-unités sont isolées, plus il est facile de déterminer leur rôle dans le système complet. La mutagenèse dirigée est un outil indispensable pour déterminer comment fonctionnent les systèmes vivants. Cet outil permet la modification du code génétique qui dicte le fonctionnement de l'organisme vivant. En mutant avec précision des fragments d'ADN on tente de trouver des liens de cause à effet pour comprendre petit à petit les pièces du puzzle complexe qu'est la génétique.

Les premières tentatives pour faire des modifications dans un système génétique étaient réalisées à l'aide d'agents mutagènes dont des produits chimiques et des sources d'énergie puissante. Les mutants ainsi produits étaient aléatoires et il était difficile de trouver des liens directs de cause à effet car l'on ne pouvait pas déterminer le point exact de mutagenèse. On ne pouvait pas déterminer la cause exacte, mais on pouvait remarquer des différences et changements qui laissaient supposer qu'il y avait des causes spécifiques.

Avec les techniques de biologie moléculaire et le clonage dans des phages et plasmides, on a pu isoler des fragments d'ADN pour les modifier plus facilement. Ces premières modifications consistaient à déléter des régions d'ADN (Lai *et al.*, 1974, Carbon *et al.*, 1975) par des digestions et ligations. Par la suite, on pouvait faire de petites délétions partielles sur un des fragments d'ADN et le repolymériser (Flavell *et al.*, 1974). On pouvait produire plusieurs mutants de cette façon, mais encore de façon aléatoire.

Ce n'est qu'avec la possibilité de synthétiser des oligonucléotides que la mutagenèse dirigée devenait vraiment applicable (Hutchison *et al.*, 1978, Razin *et al.*, 1978). Cette méthode initialement laborieuse, due à la complexité de produire des oligonucléotides, pouvait changer spécifiquement un ou plusieurs nucléotides et permettait d'examiner plus facilement la modification d'un seul élément au lieu de plusieurs dans un système très complexe.

De nos jours, les méthodes de mutagenèse se sont raffinées et par conséquent simplifiées. Il y a plusieurs méthodes de mutagenèse, mais elles reposent toutes sur l'usage d'oligonucléotides incorporant les mutations voulues et de l'hybridation de ceux-ci avec un ADN matrice.

#### 4.1 Mutagénèse par la méthode du simple brin poly uracil

Cette méthode de mutagénèse a été développée par Kunkel *et al.* (1987). Elle consiste à polymériser *in vitro* un brin d'ADN complémentaire à un brin matriciel, simple brin polyuracilé, en utilisant une amorce mutée auquel on mélange des nucléotides, de la ADN ligase T4 et de la ADN polymérase T4.

Cette mutagénèse se fait en plusieurs étapes. Le phagemide contenant le gène à muter est transformé dans une souche d'*Escherichia coli dut ung* (souche *E. coli* CJ236) permettant l'incorporation de quelques résidus uracil en remplacement de thymine dans son ADN et dans les plasmides qu'il porte. La culture est surinfectée avec un phage auxiliaire, le phage M13K07, pour produire des phages contenant de l'ADN simple brin poly uracilé.

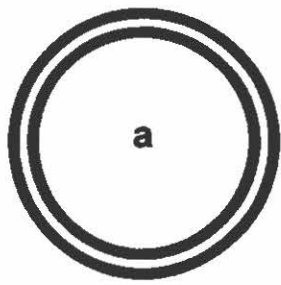
Il faut par la suite faire hybrider une amorce incorporant la mutation voulue et polymériser *in vitro* le brin complémentaire à l'aide de la T4 ou la T7 ADN polymérase, de nucléotides et de la T4 ADN ligase. Le produit de cette polymérisation est transformé dans une souche d'*E. coli ung*<sup>+</sup> qui va dégrader le brin d'ADN parental contenant les uraciles, et le remplacer avec un brin complémentaire au brin polymérisé *in vitro*. Ceci produira le phagemide sous forme d'ADN double brin muté à l'emplacement voulu. Un diagramme sommaire de cette méthode est présenté à la Figure 7.

Afin de vérifier les clones produits, l'étape finale consiste à cribler les mutants potentiels par hybridation avec l'oligonucléotide ayant servi à la mutagénèse. Les plus prometteurs doivent être séquencés pour déterminer si réellement la mutation est présente à l'emplacement voulu.

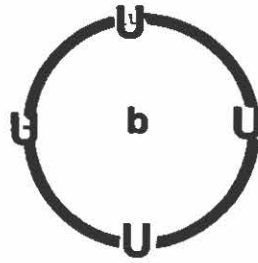
Cette méthode de mutagénèse est puissante et permet un taux de mutation spécifique allant jusqu'à 70 % (Kunkel *et al.*, 1987). Son point faible est la préparation de l'ADN simple



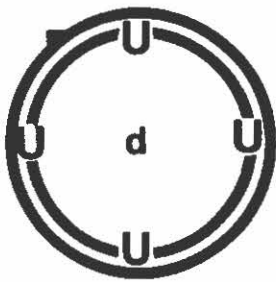
Figure 7: Diagramme de la mutagénèse dirigée par la méthode du simple brin poly uracil.  
(a) plasmide non muté (b) plasmide simple brin polyuracil (c) plasmide avec amorce hybridée (d) polymérisation du brin complémentaire (e) dégradation du brin polyuracil (f) plasmide muté.



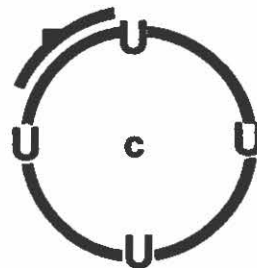
→  
-transformation dans  
*E. coli* CJ 236



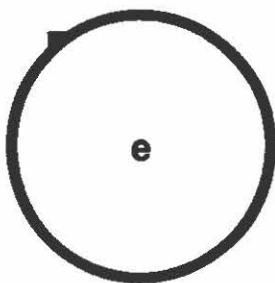
↓  
-isolement de l'ADN  
simple brin  
-hybridation avec amorce  
mutée (in vitro)



←  
-polymérisation du brin  
complémentaire (in vitro)



↓  
-transformation dans  
*E. coli* DH11S  
-dégradation du brin  
poly uracil (in vivo)



→  
-polymérisation du deuxième  
brin contenant la mutation.  
-criblage et sélection des  
mutants



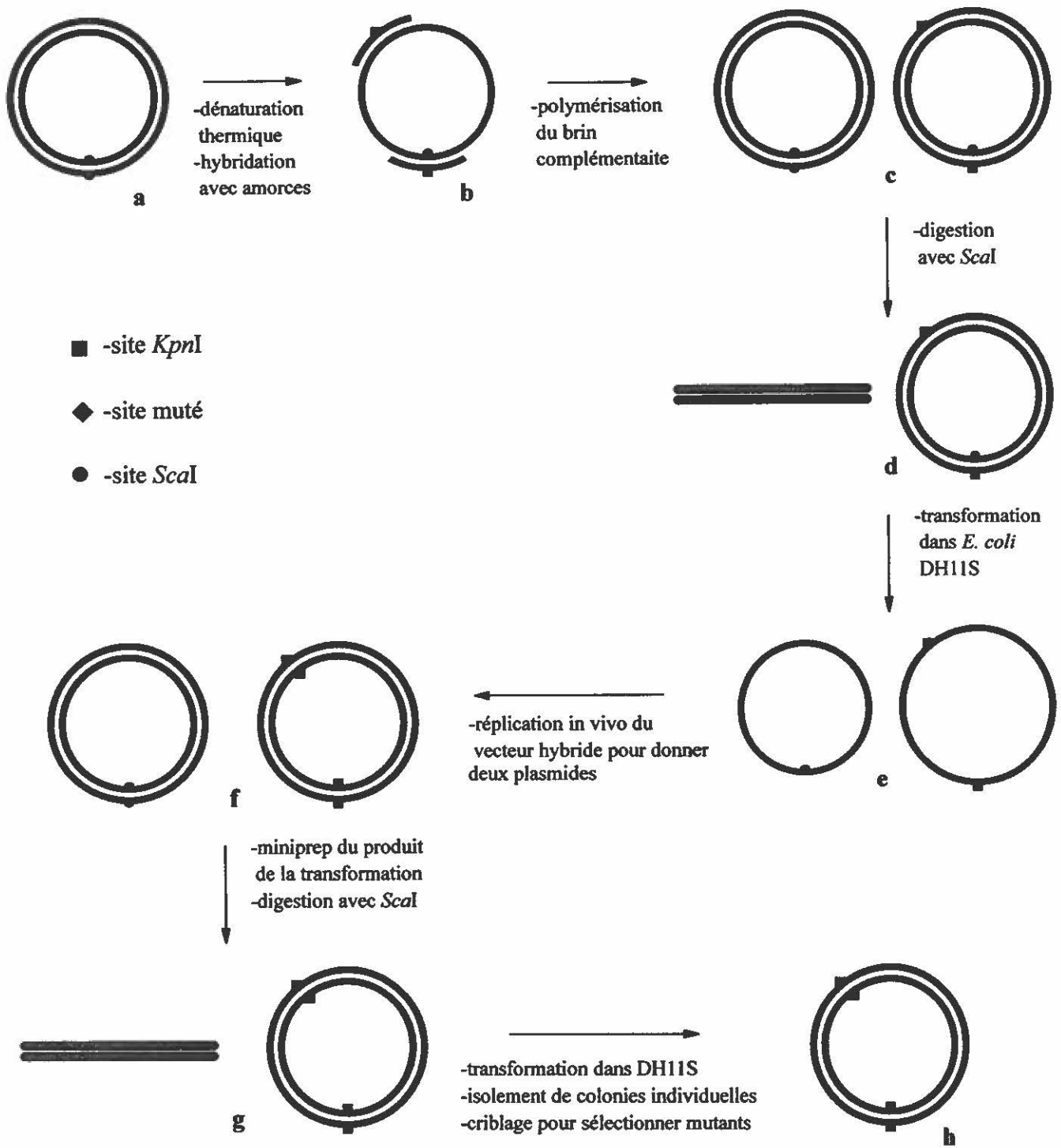
brin qui doit être préparé avec beaucoup d'attention, en quantité suffisante et très bien purifié avant son utilisation.

#### **4.2 Mutagenèse par l'élimination d'un site de restriction unique.**

Cette méthode de mutagenèse a été mise au point par Deng et Nickoloff (1992) et consiste à muter un plasmide par hybridation sur le plasmide de deux amorces mutantes, une pour le site que l'on veut muter et la deuxième pour éliminer un site de restriction unique. La sélection se fait pour les vecteurs ayant perdu ce site de restriction unique (Figure 8).

Les deux brins d'un plasmide sont séparés par dénaturation thermique puis la température redescend à la normale lentement en présence d'une surabondance des deux types d'amorces. Les nucléotides, l'ATP, la T4 ADN ligase et la T4 ADN polymérase sont ajoutés pour produire, *in vitro*, le brin d'ADN complémentaire au brin parental auquel se sont fixées les deux amorces. Le produit de la polymérisation est digéré avec l'enzyme de restriction qui digère l'ADN au site de restriction unique. Ce mélange est transformé dans une souche d'*E. coli* qui est déficiente au niveau du système de réparation d'ADN avec un mauvais appariement (*mut S*). Comme le taux de transformation d'ADN circulaire est de cent à mille fois plus efficace que celui de l'ADN linéaire (Conley et Saunders, 1984), la grande majorité des transformants sera le produit de l'étape de polymérisation avec un mauvais appariement au site de restriction unique. *In vivo*, le plasmide se réplique en produisant deux types de plasmides, le premier de type parental, et le deuxième de type muté. Les plasmides sont isolés à partir de la culture complète puis digérés et retransformés une deuxième fois pour ainsi éliminer le plasmide parental. Les clones produits de cette façon devraient majoritairement être mutés au site de restriction unique.

Figure 8: Diagramme de la mutagenèse dirigée par la méthode de sélection pour l'élimination d'un site de restriction unique (Deng et Nickoloff, 1992). (a) plasmide parental (b) plasmide après dénaturation thermique avec deux amorces hybridées (c) suite à la polymérisation il peut y avoir deux types de plasmides, un parental et le deuxième hybride (d) digestion du produit de l'étape de polymérisation donne deux structures, dont seulement la circulaire peut efficacement transformer (e) séparation des deux brins (in vivo) pour répliation (f) production de deux types de plasmides; un parental et l'autre avec une double mutation (g) digestion produit encore deux structures (h) plasmide muté.



Si la mutation ne produit pas un phénotype facilement identifiable, il faut alors cribler les mutants par hybridation à l'aide d'amorce mutée. Il est de rigueur de séquencer la région du gène muté pour s'assurer que la mutation soit présente à l'emplacement voulu.

Comparée à la méthode de Kunkel, cette méthode de mutagenèse a l'avantage de ne pas nécessiter une préparation spéciale de l'ADN avant son usage. Ceci permet de diminuer le matériel ainsi que le temps requis pour produire des mutants en donnant un taux de rendement d'environ 80% (Deng et Nickoloff, 1992). Par contre, il faut utiliser deux amorces au lieu d'une seule.

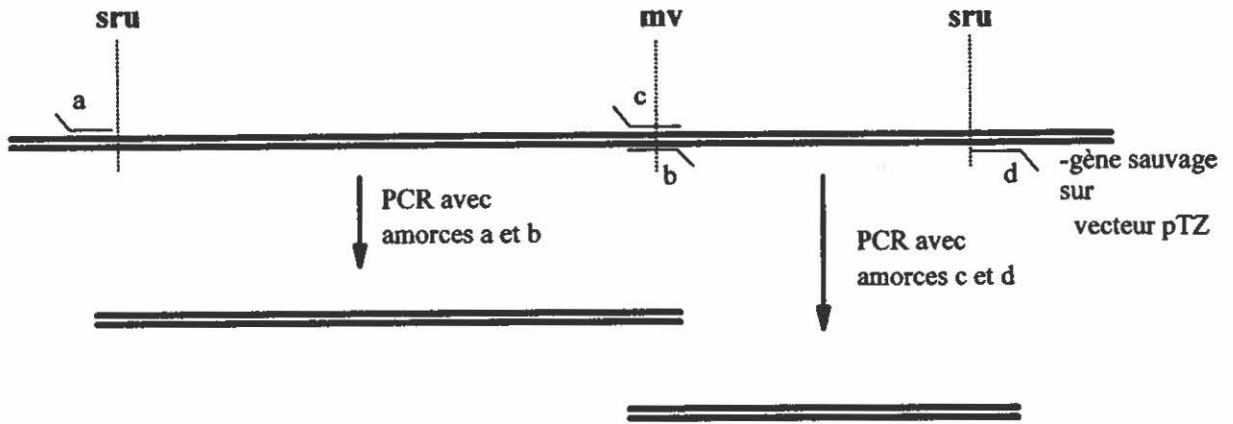
#### **4.3 Mutagenèse par amplification à la polymérase (PCR)**

La mutagenèse par amplification élective à la polymérase fut rapportée pour la première fois en 1989 par Ho *et al.* Cette méthode est presque complètement réalisée *in vitro* où on peut observer le rendement de chaque étape. La seule étape *in vivo* est une transformation suite à une simple ligation (Figure 9).

La mutagenèse est réalisée en deux étapes. Deux amplifications des régions en amont et en aval du site à être muté sont réalisées en se servant de quatre amorces dont deux pour le site à muter, une en amont d'un site de restriction unique et une en aval d'un autre site de restriction unique. Les produits des amplifications sont séparés et purifiés, puis mélangés pour servir comme matrice pour une deuxième étape d'amplification. Cette deuxième étape d'amplification se fait seulement avec les deux amorces aux extrémités. Le produit est purifié et reclone dans le vecteur d'origine via les deux sites de restriction uniques.

Cette méthode de mutagenèse a l'avantage d'être rapide, d'être effectuée presque entièrement *in vitro* et de permettre l'examen de chaque étape du processus. Elle ne

Figure 9: Diagramme de la mutagenèse dirigée par amplification éiective à la polymérase.



**sru**- site de restriction unique  
**mv**- site de la mutation voulue  
**m**- site de la mutation

-bandes migrées sur gel d'agarose  
 -bandes découpées et électroéluées  
 -les deux bandes servent de matrice pour PCR avec amorces a et d



-bande migrée sur gel d'agarose  
 -bande découpée et électroéluée  
 - fragment cloné dans le vecteur via les deux sites de restriction uniques



-gène muté sur vecteur pTZ



nécessite pas de souches spéciales ni de préparation antérieure de l'ADN matriciel. Par contre, cette méthode nécessite un thermocycleur, quatre amorces et un vecteur dont les sites de restriction permettent son usage. Initialement ces protocoles furent mis de côté car la seule polymérase thermorésistante était la polymérase Taq qui n'a pas d'activité exonucléase 3'-5' et ne pouvait pas corriger les erreurs qu'elle produisait (Keohavong et Thilly, 1989). Cette possibilité d'incorporation d'erreurs rendait la méthode peu populaire. Présentement, plusieurs polymérases thermorésistantes sont disponibles telles que la *Vent*, la *Pfu* et la *Pwo*, qui ont cette activité correctrice et donne des produits plus fidèles à la matrice de départ (Brail *et al.*, 1993).

Ce protocole peut être modifié légèrement pour produire des gènes hybrides (Horton *et al.*, 1989). Ceci se fait en construisant des amorces répétées inversées dont la partie 5' permet l'amplification de gènes différents. Les deux fragments de gène ainsi produits sont alors mélangés puis amplifiés à partir de chaque extrémité et il y a production d'un nouveau gène.

## Objectifs

- Mutation des deux codons TTA contenus dans le peptide signal de *celB* de *S. lividans* par des CTG. Vérifier la régulation que subit l'enzyme *celB* par *bldA* en examinant la production de cellulase B en fonction du temps de croissance et ceci par les divers mutants. Rapporter l'effet qu'ont ces modifications sur la production de cellulase B et sur celle d'autres enzymes lignocellulolytiques.
- Mutation du codon de départ à la traduction TTG et le codon suivant AAA de *celA* provenant de *S. lividans* par des codons plus communs à la génétique des streptomycètes. Déterminer quel effet ces modifications ont sur la production de cellulase A et sur d'autres enzymes lignocellulolytiques sécrétées.
- Produire deux gènes hybrides ayant le promoteur, le site de fixation des ribosomes, et le peptide signal du gène de la xylanase A et la séquence codant la protéine mature de la cellulase A ou cellulase B. Comparer la production de cellulases par les souches contenant un des gènes hybrides à celle de la souche contenant le gène sauvage.

## **Matériel et Méthodes**

## 1.0 Produits

### 1.1 Produits chimiques

Acétate de potassium -- BDH  
Acétate de sodium -- Baker  
Acétone -- Baker  
Acide acétique -- Fisher  
Acide borique -- Bio-Rad  
Acide citrique -- Baker  
Acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) -- Sigma  
Acide hydrochlorique -- Fisher  
Acide 3-N-morpholino propanesulphonique (MOPS) -- BDH  
Acide parahydroxy benzoïque hydrazine -- ICN  
Acide maléique -- BDH  
Acide trichloroacétique (TCA) -- Baker  
Acrylamide à électrophorèse -- ICN  
Adénosine tri-phosphate (ATP-<sup>32</sup>P 1.01 μCi/μl 37MBq) -- ICN  
Adénosine tri-phosphate (ATP) -- Pharmacia  
Agar pour milieu de culture -- DIFCO  
Agarose à électrophorèse -- ICN  
Albumine de sérum bovin (fraction V) (BSA) -- Sigma  
Ampicilline -- Boehringer Mannheim  
AMPPD -- Boehringer Mannheim  
Bacto-extrait de levure -- Difco  
Bacto-tryptone -- Difco  
Bleu de bromophénol -- Bio-Rad  
Bleu de Coomassie (R 250) -- Bio-Rad  
Borax -- Sigma  
Bromure d'éthidium -- Bio-Rad  
Butanol -- BDH  
Carbonate de sodium -- BDH  
Carboxyméthylcellulose (CMC) -- Sigma  
Casamino Acids -- DIFCO  
Chloramphénicol -- Boehringer Mannheim  
Chloroforme -- BDH  
Chlorure de calcium -- BDH  
Chlorure de césium -- ICN  
Chlorure de cobalt -- Baker  
Chlorure de cuivre -- Baker  
Chlorure de fer -- Baker  
Chlorure de magnésium -- Baker  
Chlorure de manganèse -- BDH

Chlorure de potassium -- Baker  
Chlorure de sodium -- BDH  
Chlorure de tétraméthylammonium -- BDH  
Chlorure de zinc -- BDH  
Citrate de sodium -- Baker  
2-Déoxyadénine-5-triphosphate (dATP) -- Pharmacia  
2-Déoxycytosine-5-triphosphate (dCTP) -- Pharmacia  
2-Déoxyguanine-5-triphosphate (dGTP) -- Pharmacia  
2-Déoxythymine-5-triphosphate (dTTP) -- Pharmacia  
2-Déoxyuracil-5-triphosphate (dUTP) -- Pharmacia  
Ethanol -- Gouvernement du Québec  
Extrait de viande -- DIFCO  
Ficoll 400 000 -- Sigma  
Glucose -- Baker  
Glycérol -- ICN  
Glycine -- ICN  
Huile de paraffine -- BDH  
Hydroxyquinoline -- Sigma  
Hydroxyde de sodium -- Baker  
Isopropanol -- BDH  
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) -- Boehringer Mannheim  
Kanamycine --Boehringer Mannheim  
Lait écrémé -- Difco  
Maltose -- Difco  
 $\beta$ -Mercaptoéthanol -- BDH  
Méthionine -- Sigma  
N'N' méthylène BIS acrylamide -- Bio-Rad  
molybdate d'ammonium tétrahydrate -- Aldrich  
N.-Z. amine A (caséine hydrolysée) -- Sheffield  
Persulfate d'ammonium -- Bio-Rad  
Phénol -- BRL  
Phénol-Analar -- BDH  
Phosphate de potassium dibasique -- BDH  
Phosphate de potassium monobasique -- Fisher  
Phosphate de sodium dibasique -- Anachemia  
Phosphate de sodium monobasique -- Fisher  
Polyéthylèneglycol -1600 (PEG) -- Boehringer Mannheim  
Polyvinylpyrrolidone (PVP 40) -- Sigma  
Proline -- Sigma  
Propionamide -- Aldrich  
Protéine A<sup>125</sup>I (1 $\mu$ Ci/ $\mu$ l 167TBq/mmol) -- ICN  
Rouge Congo -- Baker  
Saccharose -- BDH  
Sodium dodécyl sulfate (SDS) -- Boehringer Mannheim  
Sulphate d'ammonium -- Fisher

Sulphate de cuivre -- BDH  
 Sulphate de fer -- Baker  
 Sulphate de magnésium -- Baker  
 Sulphate de manganèse -- Baker  
 Sulphate de potassium -- Baker  
 Sulphate de zinc -- Baker  
 Tartrate double de sodium et potassium -- BDH  
 TES (acide N-tris[Hyroxyméthyl] méthyl-2-aminoéthanesulfonique) -- Sigma  
 Triton X-100 -- Sigma  
 Tétracycline --Boehringer Manheim  
 N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) --Bio-Rad  
 Thiostreptone -- Squibb  
 Tris --Boehringer Manheim  
 Tyrosine -- Sigma  
 Tryptic soy broth -- Difco  
 Tween 80 -- Aldrich  
 Urée --Bio-Rad  
 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosidase) -- Bio-Rad  
 Xylane de bouleau -- Sigma  
 Xylène cyanol -- Sigma

## 1.2 Trousses

Bio-Rad Protein Assay -- Bio-Rad  
 Kit de Mutagénèse USE -- Pharmacia  
 Kit de Mutagénèse T7 --Bio-Rad  
 Miniprep Kit Plus -- Pharmacia

## 1.3 Enzymes

ARNase A (Pharmacia)  
 ADNase I (Pharmacia)  
 Lysozyme (Pharmacia)  
*Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) ADN polymérase (Stratagene)  
 Phosphatase alcaline d'intestin de veau (Pharmacia)  
 S1 nucléase (Pharmacia)  
 T4 ADN ligase (Pharmacia)

T4 ADN polymérase (Bio-Rad)

T7 ADN polymérase (Bio-Rad)

T4 polynucléotide kinase (Pharmacia)

Enzymes de restriction (Pharmacia)

## **2.0 Souches bactériennes**

Une description des souches d'*E. coli* et *S. lividans* utilisées lors des travaux est présentée au Tableau II.

## **3.0 Oligonucléotides synthétiques**

Les oligonucléotides nécessaires pour la mutagenèse dirigée, pour le séquençage et pour les réactions de PCR ont été produits à l'aide d'un synthétiseur d'oligonucléotides modèle LKB Gene Assembler Plus de la compagnie Pharmacia. Une description de la composition des amorces synthétiques utilisées est présentée dans le Tableau III.

## **4.0 Vecteurs et phages**

La liste et la description des vecteurs et des phages utilisés lors des travaux sont présentées au Tableau IV.

## **5.0 Milieux de culture**

### **5.1 Milieu 2XTY**

Le milieu nutritif 2XTY est un milieu liquide ou solide utilisé communément pour la culture d'*E. coli*. Il contient 1.6% de Bacto-tryptone, 1% d'extrait de levure et 0.5% de NaCl.

Tableau II: Souches utilisées lors des travaux

Souche	Caractéristiques	Source
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	souche sauvage	Dr. David Hopwood (John Innes Institute)
<i>Streptomyces lividans</i> J1725	mutant <i>bldA</i> <sup>-</sup> (sporule avec difficulté)	Dr. Brenda Leskiw (U de l'Alberta)
<i>Escherichia coli</i> BMH 71-18 mut S	<i>thi supE</i> $\Delta(lac-proAB)$ [ <i>mutS</i> ::Tn10] F' [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Pharmacia
<i>Escherichia coli</i> CJ236	<i>dut1 ungl1 thi-1 relA1</i> pCJ105[ <i>cam</i> <sup>r</sup> F']	Bio-Rad
<i>Escherichia coli</i> DH11S	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr hsdRMS mcrBC)$ $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(recA1398)$ <i>deoR rpsL srI<sup>-</sup> thi<sup>-</sup></i> /F' <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> ZM15	Gibco BRL
<i>Escherichia coli</i> MV1190	$\Delta(lac-proAB)$ <i>thi supE</i> $\Delta(sr1-recA)$ 306::Tn10 ( <i>tet</i> <sup>r</sup> )' [F': <i>tra</i> D36 <i>pro AB lacI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]	Bio-Rad



Tableau III: Composition et longueur des amorces utilisées lors des travaux de mutagenèse, de la construction de gènes hybrides et pour le séquençage.

<b>Amorce</b>	<b>Séquence</b>	<b>Longueur</b>
CA-HN (sens)	5'-GAC GAA GCT TGA GCC GTC CGC ATG GGC AGC GA-3'	32
CA-HN2 (sens)	5'-GGG AAG CTT CTA GAG CCG GTC GCC CCG CGC AC-3'	32
CA-K (sens)	5'-ACG AGG AGG AAC GCT TTG AAG CGC CTT TTG GCC CTG-3'	36
CA-KC (anti-sens)	5'-CAG GGC CAA AAG GCG CTT CAA AGC GTT CCT CCT CGT-3'	36
CA-M (sens)	5'-ACG AGG AGG AAC GCT ATG AAA CGC CTT TTG GCC CTG-3'	36
CA-MC (anti-sens)	5'-CAG GGC CAA AAG GCG TTT CAT AGC GTT CCT CCT CGT-3'	36
CA-MK (sens)	5'-ACG AGG AGG AAC GCT ATG AAG CGC CTT TTG GCC CTG-3'	36
CA-MKC (anti-sens)	5'-CAG GGC CAA AAG GCG CTT CAT AGC GTT CCT CCT CGT-3'	36
CA-PC (anti-sens)	5'-ACG CCG CAG ACG TGC AGT TGG-3'	21
CA-XC (anti-sens)	5'-GGC CTT GCA GCC GGT GGC GGC GTG TGC CCC CGG CGG-3'	36
CA-XN (sens)	5'-CCG CCG GGG GCA CAC GCC GCC ACC GGC TGC AAG GCC-3'	36
CB-1C (anti-sens)	5'-GCG GGC CTG GGG CCG CAG CGT TCG CAT GGG GGC-3'	33
CB-1N (sens)	5'-GCC CCC ATG CGA ACG CTG CGG CCC CAG GCC CGC-3'	33
CB-2C (anti-sens)	5'-GAG GGC GAA GGC CGC CAG GAC CGC GCC CAG GGC-3'	33
CB-2N (sens)	5'-GCC CTG GGC GCG GTC CTG GCG GCC TTC GCC CTC-3'	33
CB-HN (sens)	5'-CGA CGA AGC TTG CCG CAC GAT GGT GCG GCT GCT GCC TG-3'	38
CB-MC (anti-sens)	5'-CGT CAG GGA CGC GTT CCA GGC-3'	21
CB-XC (anti-sens)	5'-TTC GAC GAT CGT GGT GTC GGC GTG TGC CCC CGG CGG-3'	36
CB-XN (sens)	5'-CCG CCG GGG GCA CAC GCC GAC ACC ACG ATC TGC GAA-3'	36
OLTOG (sens)	5'-TAT GAC CAT GAT TAC AGA TCT GAG CTC GGT ACC CGG -3'	36
RP (sens)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	17

Tableau IV: Vecteurs et phages utilisés.

Vecteur	Caractéristiques	Source
M13mp18	forme répliquative du phage M13 avec cassette de clonage multiple dans le gène <i>lacZ</i> ( <i>EcoRI</i> -- <i>HindIII</i> )	Pharmacia
M13mp19	forme répliquative du phage M13 avec cassette de clonage multiple dans le gène <i>lacZ</i> ( <i>HindIII</i> -- <i>EcoRI</i> )	Pharmacia
pST55#1	vecteur navette <i>E. coli</i> et streptomycètes: <i>tsr<sup>r</sup></i> , <i>amp<sup>r</sup></i> , ori pBR322, ori f1 et ori streptomycètes	Paradis et al, 1992
pTZ19U	vecteur multicopies <i>E. coli</i> <i>amp<sup>r</sup></i> , <i>lacZ</i> , ori <i>E. coli</i> , ori f1 et cassette de clonage multiple dans le gène <i>lacZ</i> ( <i>HindIII</i> -- <i>EcoRI</i> )	Pharmacia
pST55#1/ <i>celA</i>	<i>celA</i> cloné dans le vecteur pST55#1	Théberge et al. 1992
pTZ19U/ <i>celB</i>	<i>celB</i> cloné dans le vecteur pTZ19U	Wittmann et al. 1994
pTZ19U/ <i>xlnA</i>	<i>xlnA</i> cloné dans le vecteur pTZ19U	Moreau et al. 1994

## **5.2 Milieu Bennett modifié**

Ce milieu est une version modifiée du milieu Bennett. Il servait au maintien des souches de *S. lividans*. Il est composé de 0.1 % d'extrait de levure, de 0.1 % d'extrait de viande, de 0.2 % de N.Z. amine A, de 1 % de maltose et de 2 % d'agar.

## **5.3 Milieu H**

Le milieu H est composé de 1% tryptone, de 0.8% de NaCl et de 1.2 % d'agar. Il sert de milieu solide de base sur lequel on coule une gélose molle (1% tryptone, 0.8% NaCl, 0.8% d'agar, 300 $\mu$ M IPTG, 0.03% de X-gal et cellules de fond) contenant le produit d'une transformation avec le phage M13. Le milieu ainsi préparé permet la différenciation des phages avec ou sans insert suivant la coloration de la plage (bleue ou blanche).

## **5.4 Milieu LB**

Le milieu LB est utilisé pour la culture et l'isolement de clones produits suite aux transformations dans le protocole de mutagenèse dirigée de la compagnie Pharmacia. Ce milieu contient 1% de Bacto-tryptone, 0.5% de NaCl et 0.5% d'extrait de levure. Le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH 5N puis le mélange est stérilisé à l'autoclave. Pour obtenir des milieux solides, il faut ajouter 1.5% d'agar.

## **5.5 Milieu LB de Miller**

Ce milieu de culture est utilisé lors du protocole de mutagenèse dirigée de la compagnie Pharmacia. Le milieu contient 1% de Bacto-tryptone, 1% d'extrait de levure Bacto et 0.5% de NaCl.

## 5.6 Milieu M14

Le milieu M14 utilisé pour la culture de streptomycètes, est un milieu minimal, ne contenant que quelques sels minéraux et du Tween 80. Divers sucres comme le carboxyméthylcellulose (CMC), le cellobiose et le xylane y sont ajoutés pour fournir une source de carbone spécifique à la souche cultivée. Le Tween 80 agit comme un détergent et favorise la croissance en inhibant la formation de gros amas de mycélium. Ce milieu contient 0.14 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.55% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2% de Tween 80, et 0.1 % d'une solution de sels minéraux et la source de carbone. La solution de sels minéraux contient 1.40 g de  $\text{ZnSO}_4$ , 1.6 g de  $\text{MnSO}_4$ , 5 g de  $\text{FeSO}_4$  et 2 g de  $\text{CoCl}_2$  par litre. Le milieu est autoclavé pour le stériliser. Des concentrations de 0.03% de  $\text{CaCl}_2$  et 0.05% de  $\text{MgSO}_4$  sont ajoutées juste avant l'ensemencement.

## 5.7 Milieu R-5

Ce milieu solide est utilisé pour la régénération des protoplastes de streptomycètes suite à leur transformation. Ce milieu est préparé en mélangeant 103 g de saccharose, 0.25g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 10.12 g de  $\text{MgCl}_2$ , 10 g de glucose, 0.1 g de Casamino (caséine hydrolysée), 2 ml d'une solution de microéléments, 5 g d'extrait de levures, 5.73 g de tampon TES et 22 g d'agar dans 955 ml d'eau. Après autoclavage, il faut ajouter 10 ml de 0.5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 ml de  $\text{CaCl}_2$  5M, 1 ml de  $\text{CuSO}_4$  (5 mg/ml), 15 ml de L-proline à 20%, 10 ml de méthionine à 1% et 5ml de NaOH 1N contenant 0.4g de tyrosine. Après répartition du milieu en pétri, ceux-ci sont laissés à sécher à la température ambiante jusqu'à la perte de 15% de leur poids puis entreposés à 4°C. La solution de microéléments est composée de 1.4 g/l de

ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1.6 g/l de MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 5g/l de FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O et 2 g/l de CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (Hopwood *et al.*, 1985).

### **5.8 Milieu SOC**

Le milieu SOC est employé lors de l'expression phénotypique de cellules transformées. Son usage est préconisé dans le protocole de mutagenèse dirigée par l'élimination d'un site de restriction unique de la compagnie Pharmacia. Le milieu contient 2.5% de tryptone, 0.5% d'extrait de levure, 0.5 % de NaCl et 2.5 mM de KCl. Juste avant d'utiliser de ce milieu, il faut ajouter 10 mM de MgCl<sub>2</sub> et 40 mM de glucose.

### **5.9 Milieu Stewart-CMC**

Le milieu Stewart CMC est un milieu minimal avec du CMC comme principale source de carbone. Il est composé de 0.1% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de 0.15% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, de 0.5% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, de 0.05% d'extrait de levure, de 0.1% de sels minéraux, de 0.05% de KCl, de 1.7% d'agar et de 1% de CMC. Avant l'ensemencement, 0.025% de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O est ajouté au milieu.

### **5.10 Milieu TSB**

Le milieu TSB contient uniquement du Tryptic Soy Broth. Ce milieu permet l'obtention d'un taux de croissance élevé lors de la culture des streptomycètes en milieu liquide. Le milieu est préparé en réhydratant du Tryptic Soy Broth de la compagnie DIFCO selon leurs directives.

## **6.0 Isolement de l'ADN**

### **6.1 Isolement de plasmides d'*E. coli***

#### **6.1.1 Minipréparation**

L'extraction de plasmides à partir de petits volumes de cultures (1.5 ml) de *E. coli* a été effectuée par la méthode de lyse alcaline d'après la méthode de Birnboim et Doly (1979) à l'aide d'une trousse de la compagnie Pharmacia (Miniprep Kit Plus).

Une colonie isolée est prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile et ensemencée dans un tube contenant 1.5 ml de milieu 2XTY et un antibiotique approprié puis incubée 16 hrs à 37°C avec agitation. La culture est transférée dans un tube Eppendorf de 1.5 ml puis centrifugée à vitesse maximale pendant 1 min dans une microfuge. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 100 µl d'une solution Tris-HCl 50mM, glucose 50mM, EDTA 10mM et Kathion CG/IPC 0.15%. La suspension est incubée sur glace pendant 5 minutes avant l'ajout de 200 µl d'une solution NaOH 0.2M contenant Triton X-100 1%. Le contenu du tube est mélangé par inversion puis incubé sur glace pendant 5 minutes. 150 µl de NaAc 3M à pH 8.0 sont ajoutés et le tout est mélangé par inversion puis est incubé sur glace pendant 5 minutes et centrifugé à vitesse maximale pendant 5 min. Le surnageant est transféré dans un tube propre contenant 450 µl d'isopropanol. Le contenu du tube est mélangé par inversion, incubé à température ambiante pendant 5 à 10 min. et centrifugé 5 min. à vitesse maximale. Le culot est séché à l'air puis dissout dans 100 µl d'eau distillée.

#### **6.1.2 Maxi-préparation**

L'extraction de plasmides à partir de cultures de 50 à 100 ml d'*E. coli*, est réalisée par la méthode de lyse alcaline dérivée du protocole de Birnboim et Doly (1979). Il y a deux

étapes dans ce protocole; l'isolement d'ADN et la purification du plasmide par ultra-centrifugation en gradient de chlorure de césium.

#### **6.1.2.1 Isolement de l'ADN**

Une colonie était isolée et utilisée pour ensemercer 5 ml de milieu 2XTY, puis incubée avec agitation à 37°C pendant 24 heures. Un volume de 50 ou 100 ml de milieu 2XTY était ensuite ensemençé avec 1% de la préculture. Le milieu était incubé sous agitation à 37°C pendant 16 heures puis centrifugé à 6 500 x g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot cellulaire était ensuite resuspendu dans 5 ml d'une solution froide contenant 50mM de glucose, 10mM de EDTA et 25mM de Tris-HCl à pH 8.0. La suspension était incubée à 4°C pendant 5 min., puis les cellules ont été lysées en ajoutant 10 ml d'une solution de NaOH 0.2N contenant 1% de SDS. Une lyse efficace était obtenue en mélangeant la solution NaOH-SDS par trois inversions brusques produisant un mélange hétérogène et en l'incubant sur glace pendant 15 minutes. Pour précipiter les protéines et autres composantes cellulaires, 7.5 ml d'une solution 3M de K et 5M d'acétate étaient ajoutés. Le mélange était vortexé à vitesse moyenne jusqu'à l'obtention d'une suspension hétérogène. La suspension était incubée sur glace pendant 30 min., puis centrifugée à 23 000 x g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant était récupéré et on ajoutait alors 12 ml d'isopropanol et en le mélangeant par inversion. Après 15 minutes d'incubation à la température de la pièce, le mélange était centrifugé à 15 000 x g pendant 20 min à 4°C. Finalement, le culot était lavé à l'éthanol 95%, séché sous vide pendant quelques minutes puis dissout dans 1.5 ml de tampon TE et conservé sur glace.

### 6.1.2.2 Isolement du plasmide par centrifugation en gradient de CsCl

À la préparation d'ADN étaient ajoutés 2.62 g de CsCl et 25 µl d'une solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml). Ce mélange était incubé à 37°C jusqu'à dissolution complète de tout le sel. Dans le fond d'un tube à ultracentrifugation de 4 ml, 1.5 ml d'une solution de chlorure de césium à 65% était déposé. Le volume du tube à centrifugation était complété en ajoutant avec une seringue la solution contenant l'ADN. Cette solution était plus dense que la solution de chlorure de césium à 65% et se déposait au fond du tube. Le tube était ensuite pesé, équilibré puis scellé. L'étape suivante consistait en une centrifugation à 350 000 x g pendant 3 heures suivie d'une décélération progressive. Puis, le tube était exposé sous rayonnement ultraviolet pour déterminer l'emplacement de la bande contenant le plasmide. Cette bande était extraite du tube à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de calibre G18, puis transférée dans un tube de type Eppendorf. Le bromure d'éthidium était extrait à l'isobutanol, puis l'ADN était précipité avec 2 volumes d'éthanol (70%) et entreposé à -70°C pendant 30 min. Le tube était par la suite centrifugé à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le culot était finalement dissout dans 180 µl de tampon TE et reprécipité deux fois en ajoutant 20 µl de NaAc (3M) et 400 µl d'éthanol (95%). Le culot final était dissout dans 400 µl d'eau.

## 6.2 Isolement de plasmides de *S. lividans*

Un volume de 500 µl d'une culture de 24 à 48 hrs de streptomycètes était prélevé et placé dans un tube à microfuge. Le mycélium était homogénéisé puis centrifugé à vitesse maximale pendant 10 secondes. Le culot était lavé avec 500 µl d'une solution saccharose-TE (10.3% de saccharose, 25 mM de Tris et 25 mM d'EDTA à pH 8.0), puis incubé 30 minutes à 37°C dans 400 µl de la solution saccharose-TE contenant 2 mg/ml de lysozyme. Le



mycélium était ensuite dénaturé par l'ajout de 250 µl d'une solution NaOH-SDS (0.3% NaOH et 2 % SDS) et mélangé 10 secondes au vortex. Le mélange était incubé à 70°C pendant 15 minutes dans un bain marie, puis refroidi lentement jusqu'à la température ambiante (30 minutes). Suite à l'incubation, 80 µl d'une solution phénol acide (5g de phénol Analar, 5 ml de chloroforme, 1 ml d'H<sub>2</sub>O et 5 mg d'hydroxyquinoline) étaient ajoutés, vortexés 10 secondes, et le mélange était centrifugé à vitesse maximale pendant 3 minutes. Un volume de 700 µl du surnageant était transféré dans un tube à microfuge contenant 70 µl de NaAc (3M) et 700 µl d'isopropanol. Le mélange était incubé 5 minutes à température de la pièce, puis centrifugé 2 minutes à vitesse maximale. Le culot était dissout dans 50 µl de tampon TE (10 mM de Tris-HCl et 1 mM d'EDTA à pH 8.0). Un volume de 5 µl de NaAC (3M) de même que 25 µl de phénol-neutre était ensuite ajouté et le mélange vortexé pendant 5 secondes. La phase aqueuse était récupérée et précipitée avec 50 µl d'isopropanol. Le culot était finalement dissout dans 50 µl d'eau.

## **7.0 Transformations**

### **7.1 Transformation d'*E. coli***

La transformation des cellules *E. coli* était obtenue par prétraitement au chlorure de calcium et choc thermique. La préparation de cellules compétentes des diverses souches d'*E. coli* et la transformation de celles-ci ont été faites selon le protocole présenté dans la trousse "Unique Site Elimination Mutagenesis Kit" de la compagnie Pharmacia.

Un volume de 1 ml d'une pré-culture de la souche d'*E. coli* à transformer était utilisé pour ensemercer 100 ml de milieu 2XTY. L'incubation à 37°C avec agitation était poursuivie jusqu'à ce que la DO<sub>600nm</sub> de la culture se situe entre 0.45 et 0.50. La culture était placée sur glace pendant 15 minutes puis centrifugée à 700 x g à 4°C pendant 15 minutes.

Le culot était resuspendu doucement dans 33 ml de tampon I (15% de glycérol, 100 mM de KCl, 30 mM de KAc et 60 mM de CaCl<sub>2</sub> à un pH de 5.8 ajusté avec de l'acide acétique) puis incubé sur glace pendant une heure. La suspension était ensuite centrifugée à 800 x g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot était resuspendu doucement dans 4 ml de tampon II (20 mM de MOPS, 10 mM de KCl, 75 mM de CaCl<sub>2</sub> et 15% de glycérol à pH 6.8 ajusté avec du NaOH) puis incubé sur glace pendant 15 minutes. La suspension de cellules compétentes était aliquotée puis entreposée à -80°C.

La transformation était réalisée comme suit: 200 µl de cellules compétentes et 30 µl d'ADN (300 ng) étaient mélangés et incubés sur glace pendant 30 minutes. Le mélange était incubé à 42°C dans un bain marie pendant 45 secondes puis refroidi sur glace pendant 2 minutes. Un volume de 1 ml de milieu 2XTY était ajouté et le mélange incubé à 37°C pendant 45 minutes. Pour isoler des clones individuels, 50, 25 ou 10 µl étaient étalés sur milieu solide 2XTY contenant l'antibiotique approprié.

## **7.2 Transformation de *S. lividans***

La transformation de protoplastes des diverses souches de streptomycètes était effectuée selon Hopwood *et al.* (1985).

Les protoplastes étaient préparés de la façon suivante: 200 ml de culture de 24 heures de streptomycètes produits à partir de milieu R5 liquide contenant 0.5% glycine étaient homogénéisés et centrifugés à 9000 x g pendant 15 minutes. Le culot cellulaire était lavé 2 fois avec une solution de 10.3% de saccharose. Le culot était suspendu dans 50 ml de tampon P contenant 1 mg/ml de lysozyme (stérilisé par filtration). La suspension était mélangée à la pipette doucement puis incubée à 34°C pendant 15 minutes. Cette dernière étape était répétée une seconde fois. Une observation microscopique permettait de visualiser

le taux de dégradation des parois. Si ce taux paraissait supérieur à 95%, 10 ml de tampon P était ajoutés et les cellules réincubées pendant 15 minutes. En cas contraire, l'incubation était prolongée. La suspension était ensuite filtrée sur laine de verre puis centrifugée à 2500 x g pendant 7 minutes. Le culot était lavé deux fois en le resuspendant doucement dans 40 ml de tampon P. Le culot était finalement resuspendu dans 20 ml de tampon P. Des aliquots de cette suspension étaient conservés à -80°C. (Le tampon P était préparé en mélangeant 103 g de saccharose, 0.25 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.03 g de MgCl<sub>2</sub>, 2 ml d'une solution de métaux dans 700 ml d'eau. Après l'autoclavage, 10 ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 3.68%, 10 ml d'une solution 250 mM TES à pH 7.2 et 1 ml d'une solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0.5% étaient ajoutés. La solution de métaux était composée de 40mg/l de ZnCl<sub>2</sub>, 200mg/l de FeCl<sub>3</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 20 µg/l de CuCl<sub>2</sub>, 10 mg/l de MnCl<sub>2</sub>, 10 mg/l de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*7H<sub>2</sub>O, et 10 mg/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O).

La transformation était réalisée en mélangeant dans l'ordre 50 µl de protoplastes, 5 µl d'ADN (environ 50 ng) et 200 µl de PEG 25% (1500). Le mélange était incubé à température ambiante pendant 90 secondes puis 25 à 100 µl étaient étalés sur des milieux solides R-5. Une fois le liquide incorporé dans la gélose, les pétris étaient incubés à 34°C. Après 16 heures d'incubation, 1 ml d'une solution 0.5 mg/ml de thiostreptone était étalé sur les pétris.

## **8.0 Préparation d'ADN simple brin**

### **8.1 Par clonage dans le phage M13**

Le fragment d'ADN était cloné dans le phage M13mp18 ou M13mp19 et transformé dans une souche d'*E. coli* contenant le F' (fertilité). Les transformants présentant des plages

blanches sur milieu H (section 5) étaient utilisés pour produire de l'ADN simple brin par la méthode suivante.

Une culture logarithmique d'*E. coli* était préparée à partir d'une préculture de 16 heures dans le milieu 2XTY. Un volume de 1.5 ml de culture était distribué dans des tubes stériles et une plaque blanche isolée était prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile et déposée dans le tube. La suspension était incubée 18 heures à 37°C avec agitation puis centrifugée 10 minutes à 13 000 rpm dans une microcentrifugeuse. Un volume de 1 ml de surnageant était transféré dans un tube de type Eppendorf auquel était ajouté 250 µl d'une solution de PEG 6000 à 20% et de NaCl à 2.5 M. Le mélange était incubé sur glace pendant 45 minutes ou 16 heures à 4°C avant d'être centrifugé 10 minutes à vitesse maximale. Le culot était dissout dans 100 µl de tampon TE. Un volume de 50 µl de phénol saturé au TE était ajouté et le mélange était homogénéisé en vortexant 10 secondes. Après 15 minutes d'incubation à la température de la pièce, 50 µl de chloroforme était ajouté. Le mélange était laissé 5 minutes à la température de la pièce avant d'être centrifugé 5 minutes à vitesse maximale. L'ADN de la phase aqueuse était ensuite précipité par l'ajout de 0.1 volume de NaAc (3M) et 2 volumes d'éthanol 95%. Le mélange était incubé à -20°C pendant 30 minutes puis centrifugé 10 minutes à vitesse maximale. Le culot était lavé à l'éthanol 70% puis séché à l'air. Enfin, le culot était dissout dans 30 µl d'eau distillée stérile.

## **8.2 Préparation d'ADN simple brin à l'aide du phage auxiliaire M13K07**

Cette méthode permet de produire de l'ADN simple brin pour le séquençage à partir de phagemides pTZ. Comme pré-requis, le vecteur devait avoir l'origine de répllication *f1* et les phagemides devaient être dans une souche bactérienne *F*<sup>+</sup>.

Une colonie isolée provenant d'une culture fraîche était prélevée et placée dans 1.5 ml de milieu 2XTY contenant 150 µg/ml d'ampicilline et 0.2% de glucose, puis incubée à 37°C pendant 15 min. Un aliquot de 5 µl du phage helper M13K07 (à  $3.5 \times 10^{11}$  pfu /ml) était ajouté et la culture était incubée pendant 45 minutes à 37°C avec agitation. Par la suite, 75 µg/ml de kanamycine étaient ajoutés et la culture était incubée à 37°C avec agitation pendant 45 minutes. Un volume de 100 µl de cette culture était prélevé et ajouté à 11 ml de milieu 2XTY contenant 0.2% glucose, 75 µg/ml de kanamycine et 150 µg/ml d'ampicilline. Cette nouvelle culture était incubée pendant 16 heures à 37°C avec agitation. La culture était centrifugée à 10 000 x g pendant 15 minutes et le surnageant obtenu était recentrifugé une deuxième fois. Un précipité se formait suite à l'ajout de 1/4 de volume d'une solution de PEG 6000 à 20% et de AcNH<sub>4</sub> à 3.5 M et à une incubation sur glace de 45 minutes. Après une centrifugation à 10 000 x g de 15 minutes, le culot était suspendu dans un tube de type Eppendorf à l'aide de 400 µl de tampon OPA<sup>+</sup> (100mM Tris acétate, 100mM acétate de magnésium et 500mM acétate de potassium) auquel étaient ajoutés 1 µl de RNase (10 mg/ml) et 2 µl de DNaseI (10 mg/ml). La suspension était incubée pendant 30 minutes à 37°C et la digestion stoppée par l'ajout de 4 µl d'EDTA (0.5 M) et 4 µl de SDS (20%). Par la suite, 500 µl de phénol et 500 µl de chloroforme étaient ajoutés successivement, le mélange étant vortexé 1 minute après chaque ajout. Une centrifugation à vitesse maximale pendant 4 minutes permettait de séparer la phase aqueuse contenant l'ADN. Une précipitation de celle-ci était obtenue après une incubation à -80°C en présence de 50 µl de NaAc (3 M) et 1 ml d'éthanol (95%). Une centrifugation de 15 minutes à vitesse maximale permettait d'isoler le culot d'ADN qui était lavé à l'éthanol 70% et séché à l'air avant d'être dissout dans 50 µl d'eau.

## **9.0 Analyses et manipulations de l'ADN**

### **9.1 Digestion enzymatique**

Les digestions enzymatiques étaient effectuées à l'aide d'enzymes de restriction de la compagnie Pharmacia. Le mélange réactionnel contenait de 50 à 1000 ng d'ADN, entre 3 et 10 unités d'enzyme et une concentration de tampon acétate appropriée (OPA<sup>+</sup>) pour l'enzyme, dans un volume de 20 ou 50 µl en fonction de la quantité d'ADN. Le mélange était incubé à 37°C pendant 2 heures. Une incubation du mélange à 80°C pendant 25 minutes permettait l'inactivation de l'enzyme, si nécessaire.

### **9.2 Migration en gel d'agarose**

Les gels d'agarose étaient préparés en dissolvant par chauffage 0.7% d'agarose dans du tampon TBE (0.09 M de Tris, 0.09 M d'acide borique et 0.002 M d'EDTA). Les échantillons étaient mélangés à raison d'un rapport de 5:1 avec du tampon d'échantillon (40% de sucrose, 0.25% de bleu de bromophénol et 0.25% de xylène cyanol). Le marqueur utilisé pour déterminer la dimension des fragments d'ADN était le "1kb ladder" de la compagnie BRL. Le marqueur était dilué avec le tampon TBE et mélangé avec le tampon d'échantillon. La migration sous une tension de 100 volts était poursuivie jusqu'à ce que le xylène cyanol atteigne le bas du gel.

### **9.3 Électroélution des fragments d'ADN du gel d'agarose**

Les bandes d'agarose contenant l'ADN de poids moléculaire souhaité étaient découpées des gels d'agarose. L'extraction des fragments d'ADN était réalisée par électroélution à l'aide d'un électroéluéur modèle LKB 2014 Extraphor Electrophoretic

Concentrator. Le produit de l'électroélution (400 µl) contenait l'ADN dans une solution de 0.75 M d'acétate de sodium. Ce produit était précipité avec 2 volumes d'éthanol à 70%, et congelé à -75°C pendant 20 minutes, puis centrifugé à vitesse maximale dans une micro-centrifugeuse pendant 10 minutes. Le culot ainsi récupéré était lavé avec 100 µl d'éthanol (95%), séché à l'air libre et dissout dans 20 µl d'eau.

#### **9.4 Ligation**

Les ligations étaient réalisées en mélangeant l'ADN, de l'ATP (1 mM concentration finale) et 4 unités de T4 ADN ligase dans du tampon OPA<sup>+</sup> (100mM de Tris acétate, 100mM d'acétate de magnésium et 500mM d'acétate de potassium). Le mélange était incubé à 12°C pendant 16 heures puis utilisé pour la transformation.

#### **9.5 Déphosphorylation de l'extrémité 5' de l'ADN**

Un traitement à la phosphatase alcaline était réalisé sur de l'ADN préalablement digéré pour inhiber la ligation d'extrémités cohésives d'un même vecteur et pour favoriser le clonage avec un autre fragment. Dans un volume de 20 µl, 0.1 unité de phosphatase alcaline était ajoutée à l'ADN digéré en présence de tampon OPA<sup>+</sup>. Le mélange était incubé pendant 30 minutes à 37°C puis l'enzyme inactivée par une incubation de 30 minutes à 80°C.

#### **9.6 Phosphorylation à la T4 ADN kinase**

La phosphorylation de l'extrémité 5' des oligonucléotides par traitement à la polynucléotide kinase était utilisée lors du marquage de l'oligonucléotide au <sup>32</sup>P pour les essais d'hybridation et lors de la préparation des oligonucléotides pour la mutagenèse dirigée. Le mélange réactionnel était composé de 25 à 300 pmol d'oligonucléotides, 1 mM

d'ATP ou d'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ , 5 unités de T4 polynucléotide kinase et de tampon OPA<sup>+</sup> dans un volume total de 30  $\mu\text{l}$ . Le mélange était incubé à 37°C pendant 30 minutes puis la réaction stoppée par une incubation de 20 minutes à 65°C.

## 10.0 Mutagénèse dirigée

### 10.1 Mutagénèse par la méthode du simple brin poly-uracil

Cette méthode de mutagénèse a été décrite par Kunkel *et al.* (1987). Les réactifs, souches et méthode expérimentale détaillée étaient disponibles commercialement auprès de la compagnie Bio-Rad dans la trousse "T7 Mutagenesis Kit".

Le vecteur servant de matrice pour la mutagénèse dirigée devait être transformé dans la souche *E. coli* CJ236. Après la transformation, une colonie était utilisée pour inoculer 2 ml de milieu 2XTY contenant 0.5% de glucose, 100 $\mu\text{g/ml}$  d'ampicilline et 30  $\mu\text{g/ml}$  de chloramphénicol (GAC). Cette préculture était incubée à 37°C pendant 16 heures. Un aliquot de 500 $\mu\text{l}$  de cette préculture servait à inoculer une culture de 10 ml du même milieu. La culture était incubée à 37°C avec agitation jusqu'à ce que la  $\text{DO}_{600}$  atteigne 0.5, puis infectée avec 10  $\mu\text{l}$  de phage auxiliaire M13KO7 ( $3.5 \times 10^{11}$  pfu/ml). La culture était réincubée avec agitation pendant une autre heure. Cette culture était ensuite transvidée dans 40 ml de milieu 2XTY GAC avec 70 $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine et 0.25 $\mu\text{g/ml}$  d'uridine. Ce mélange était incubé avec agitation pendant 20 heures à 37°C. L'ADN simple brin était précipité, récupéré et purifié tel que décrit à la section 8.2.

La réaction d'hybridation avec l'oligonucléotide servant à la mutagénèse était faite en mélangeant 1 pmol d'oligonucléotide phosphorylé et 0.1 pmol d'ADN simple brin dans 10  $\mu\text{l}$



de tampon d'hybridation composé de 0.07 M de Tris-HCl à pH 7.4, de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et de 50 mM de NaCl. Ce mélange était incubé à 80°C pendant 5 min puis refroidi lentement à 30°C (90 min). Le brin complémentaire était synthétisé en mélangeant le produit de la réaction d'hybridation avec 1 µl de tampon de synthèse (composé de 5 mM de chacun des nucléotides, 10 mM d'ATP, 100 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de MgCl<sub>2</sub> et 20 mM de dithiothreitol), 1 unité de T4 ADN ligase, 1 µg de protéine du gène 32 et une unité de T4 ADN polymérase. Des incubations successives de 5 min à 4°C, 5 min à 20°C et 90 min à 37°C étaient réalisées. Le produit de l'étape de synthèse du brin complémentaire était transformé dans *E. coli* DH11S et les clones criblés pour la présence de la mutation.

## 10.2 Mutagenèse par l'élimination d'un site de restriction unique

Cette technique de mutagenèse a été effectuée selon le protocole de Deng et Nickoloff (1992). Les souches bactériennes, réactifs et le protocole détaillé étaient disponibles commercialement auprès de la compagnie Pharmacia dans la trousse "U.S.E. Mutagenesis Kit".

L'hybridation des oligonucléotides au vecteur était faite en mélangeant 0.025 pmol de plasmide, 25pmol de l'amorce mutante et 25 pmol de l'amorce pour l'échange d'un site de restriction dans 20 µl de tampon OPA<sup>+</sup>. Le mélange était incubé à 100°C pendant 5 min, immédiatement plongé dans un bain de glace et incubé à 0°C pendant encore 5 min avant entreposage à température de la pièce pendant 30 min. Pour synthétiser les brins mutants, 7 µl de mélange de nucléotides (2.86 mM de dATP, 2.86 mM de dCTP, 2.86 mM de dGTP, 2.86 mM de dTTP, 4.34 mM d'ATP et 1.43 x du tampon OPA<sup>+</sup> ) et 3 µl du mélange réactionnel (1 IU/µl de T4 ADN ligase, 1 IU/µl de T4 ADN polymérase et 0.2 µg/µl de protéine du gène 32) étaient ajoutés au produit de la réaction d'hybridation et le tout était

incubé pendant 1 heure à 37°C. La réaction de polymérisation était stoppée en incubant le mélange à 85°C pendant 15 min.

La deuxième amorce servait à muter un site de restriction unique. Deux rondes de restriction étaient faites avec un enzyme de restriction spécifique au site original que l'on échangeait à l'aide de la deuxième amorce. Dans un volume final de 50 µl, 5 à 10 unités d'enzyme de restriction, une quantité appropriée de tampon OPA<sup>+</sup> (spécifique à l'enzyme de restriction utilisée) et le produit de la réaction de mutagenèse (30 µl) étaient délicatement mélangés et centrifugés. Le mélange était incubé 2 heures à la température optimale de l'enzyme puis transformé dans la souche *E. coli* BMH 71-18 *mutS*. Un volume de 1 ml de milieu SOC était ajouté au produit de la transformation et la culture incubée à 37°C avec une agitation de 180 rpm. Après 1 heure, on ajoutait 3 ml de milieu SOC contenant un antibiotique approprié et cette culture était incubée à 37°C avec une agitation de 250 rpm jusqu'au lendemain. Le plasmide était par la suite extrait de cette culture par la méthode décrite à la section 6.1.1. Dans un volume final de 50 µl, 50 à 250 ng de plasmide était digéré avec 5 à 20 unités d'enzyme de restriction. Après une incubation de 2 heures à la température optimale de l'enzyme, 1 à 10 unités d'enzyme additionnelles étaient ajoutées et le mélange réincubé pendant 2 heures. Le produit de cette digestion était transformé dans *E. coli* et les clones étaient criblés pour la présence de la mutation voulue.

### **10.3 Mutagenèse par l'amplification élective à la polymérase**

Cette méthode de mutagenèse fut inspirée du protocole de Ho *et al.* (1989). La mutagenèse se faisait en trois étapes, détaillées à la section 4.3 de la revue de littérature: 1) amplification des fragments en amont et en aval du site à muter, 2) amplification du fragment

complet à partir des deux fragments isolés de la première amplification et, 3) reclonage du fragment muté dans le vecteur d'origine.

Les amplifications étaient effectuées dans un volume de 100  $\mu$ l contenant: du tampon Pfu, 20 nmoles de chaque dNTP, 0.05% de Tween 20, 4% de propionamide, 50 ng d'ADN matrice, 50 pmoles de chacune des amorces, 1  $\mu$ l de Taq Extender PCR Additive, 2  $\mu$ g de la protéine du gène 32 (Pharmacia) et 2.5 U de Pfu ADN polymérase. Ce mélange était aliquoté dans deux microtubes de 500  $\mu$ l et recouvert de 50  $\mu$ l d'huile minérale. Les cycles d'amplification étaient composés d'un cycle de 5 min. à 95°C, 5 min. à 60°C et 3 min. à 72°C, suivi de trente cycles de 1 min. à 94°C, 1 min. à 60°C et 3 min. à 72°C puis d'une incubation de 7 min. à 72°C.

Les produits des diverses amplifications étaient analysés par migration en gels d'agarose (0.7%). Les bandes d'agarose contenant d'ADN de longueur voulue étaient découpées, l'ADN était électroélué et précipité à l'éthanol. L'ADN ainsi récupéré et purifié, était utilisé lors de la deuxième réaction de PCR ou pour effectuer le clonage.

Le vecteur qui a servi de matrice était digéré avec les enzymes de restriction nécessaires pour effectuer le remplacement du fragment du gène sauvage par celui du gène muté. Après migration sur gel d'agarose du produit de cette digestion, le vecteur était récupéré par électroélution. Le fragment produit lors de l'étape de mutagenèse était digéré avec les mêmes enzymes puis cloné dans le vecteur d'origine.

## **11.0 Criblage des mutants**

Suite aux étapes de mutagenèse dirigée telles qu'effectuées selon les méthodes de simple brin poly uracil et de sélection pour un site de restriction unique, il était nécessaire de

faire un criblage préliminaire des mutants par hybridation avec une amorce marquée. Les amorces utilisées étaient identiques à celles ayant servi à la mutagenèse. Le marquage à l'aide de digoxigénine (DIG) ou avec de l'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P permettait l'obtention d'un signal avec les clones positifs.

### 11.1 Criblage à l'aide d'amorces marquées à la DIG

Le système DIG est un système non radioactif utilisé pour le marquage d'ADN et d'ARN. La digoxigénine est un stéroïde de source végétale qui peut être lié à un UTP par une liaison covalente. À l'aide d'une terminal transférase, la DIG-UTP est liée à l'amorce qui a servi à la mutagenèse. Ce complexe est utilisé pour faire l'hybridation avec l'ADN que l'on veut tester. La seconde étape correspond à une deuxième incubation en présence d'un anticorps monoclonal anti-DIG conjugué à une phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline réagit avec de l'AMPPD produisant de la chémiluminescence. Le marquage à la DIG a été réalisé selon le protocole et avec les composantes du kit "DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit" de la compagnie Boehringer Mannheim.

### 11.2 Criblage à l'aide d'une amorce marquée au <sup>32</sup>P

Un aliquot de 2  $\mu$ l d'une préparation d'ADN plasmidique (section 7.1) était déposé et séché sur une membrane de nylon (membrane chargée positivement provenant de la compagnie Boehringer Mannheim). L'amorce utilisée pour la mutagenèse dirigée était phosphorylée avec de l'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P par traitement à la polynucléotide kinase (section 8.5). L'amorce ainsi marquée était utilisée pour l'hybridation avec l'ADN fixé à la membrane de nylon suivant le protocole modifié de celui de Wood *et al.* (1985). Cette méthode utilise le

$\text{Me}_4\text{NCl}$  qui rend la température d'hybridation ADN-oligonucléotide indépendante de la composition en nucléotides. La température optimale était déterminée par la longueur de l'oligomère (18 mer à 58°C, 27 mer à 71°C, 32 mer à 76°C, etc.).

La membrane était préhybridée pendant 1 heure à 42°C dans un tampon 6X-SSC (0.9 M de NaCl et 90 mM de citrate de sodium à pH 7.0), 1% de SDS, 5X-Denhardt (1% de Ficoll, 1% de polyvinylpyrrolidone et 1% de BSA) et 0.1mg/ml de sperme de saumon dénaturé (Sigma). La sonde marquée (10 pmol) était ajoutée au tampon de préhybridation. L'incubation durait 16 heures à 42°C. La membrane était lavée 3 fois pendant 20 minutes à la température ambiante avec du tampon composé de 6X-SSC et 1% de SDS, puis rincée avec une solution  $\text{Me}_4\text{NCl}$  ( $\text{Me}_4\text{NCl}$  3M, Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM et SDS 1% à pH 8.0). La membrane était ensuite lavée 2 fois pendant 20 minutes avec la solution  $\text{Me}_4\text{NCl}$  à une température de 2°C inférieure à celle optimale pour l'hybridation. Finalement, la membrane était séchée et placée en contact avec un film X-OMAT AR (Kodak) afin d'obtenir un autoradiogramme.

## 12.0 Construction de gènes hybrides

Les gènes hybrides furent construits suivant le protocole de Horton *et al.* (1989), par une série d'amplifications à la polymérase similaires à celles utilisés lors des travaux de mutagenèse dirigée. Un choix judicieux d'oligonucléotides fut l'élément fondamental pour la réussite de ce protocole. Chacun des deux d'oligonucléotides pour le site de fusion des gènes ne devait permettre l'hybridation avec la matrice à amplifier qu'à partir de son centre jusqu'à son extrémité 3' (15 à 18 nucléotides). L'extrémité 5' devait être complémentaire à la région 3' de l'autre oligomère pour permettre l'hybridation entre les deux premiers fragments amplifiés. Les deux d'oligonucléotides aux extrémités devaient permettre le clonage

subséquent dans l'un des vecteurs d'origine. Si nécessaire, des sites de restriction pouvaient être ajoutés aux oligomères (du côté 5') pour faciliter le clonage.

Le mélange réactionnel et les cycles de température de dénaturation, d'appariement et d'extension furent identiques à ceux utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR (section 10.3). Une description de la série d'amplifications nécessaires et de la méthodologie est fournie dans la section 4.3 de la revue de littérature.

### **13.0 Séquençage**

Deux méthodes ont été employées pour le séquençage d'ADN plasmidique isolé par la méthode maxi-prep (section 6.1.2) des divers clones. La première méthode a été celle de Sanger *et al.* (1977) utilisant le <sup>35</sup>S comme marqueur radioactif. La deuxième méthode, le séquençage automatique, est dérivée de la première, et s'effectue avec le "ALF ADN Sequencer" de la compagnie Pharmacia. Les réactions de polymérisation et les migrations ont été réalisées par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier.

### **14.0 Conditions de culture**

Les cultures de streptomycètes pour la production de cellulases étaient réalisées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu M14, la source de carbone appropriée (cellulose, xylane, etc.) et 5 µg/ml de thiostreptone. Les milieux étaient incubés à 34°C avec agitation (240 rpm) dans un agitateur ayant un rayon de rotation de 2 pouces. Des échantillons étaient prélevés de façon aseptiques à des intervalles de temps réguliers afin d'examiner la production de cellulases en fonction du temps de croissance.

## 15.0 Immunodétection des enzymes

La présence d'enzymes a été détectée à l'aide d'anticorps spécifiques aux diverses enzymes lignocellulolytiques. Les anticorps anti-cellulase A ont été produits par Théberge *et al.* (1992), les anticorps anti-cellulase B par Wittmann *et al.* (1994), les anticorps anti-xylanase A par Mondou *et al.* (1986) et les anticorps anti-xylanase B par Vats-Mehta *et al.* (1990).

### 15.1 Immunodétection de type Western

La séparation des protéines du surnageant des cultures était obtenue par migration en gels de polyacrylamide (12.5%) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines étaient transférées du gel sur une membrane de nylon chargée positivement à l'aide de l'appareil "Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell" de la compagnie BIORAD. La membrane était séchée à température ambiante.

La membrane était incubée dans du tampon PBS (3.3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6.7 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 290 mM de NaCl et 0.13 mM d'EDTA à pH 7.2) contenant 3% de lait écrémé pendant 30 minutes sous agitation. Après l'addition de l'anticorps dans la solution de lait écrémé, l'incubation se poursuivait durant 2 heures sous agitation. La membrane était lavée 3 fois pendant 10 minutes avec du tampon PBS contenant 0.5% de Triton X100, puis pendant 15 minutes avec du tampon PBS. Ensuite, la membrane était incubée avec du tampon PBS contenant 3% de lait écrémé et 0.2  $\mu\text{Ci/ml}$  de protéine  $\text{A}^{125}\text{I}$  (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ). Ce mélange était incubé pendant 90 minutes sous agitation. La membrane était encore lavée 3 fois pendant 10 minutes avec du tampon PBS contenant 0.5% de Triton X100. Finalement la membrane était séchée et placée en contact avec un film X-OMAT AR (Kodak) pour autoradiographie.

## 15.2 Immunobuvardage de type dotblot

Le surnageant de culture était centrifugé dans une micro-centrifugeuse pendant 1 min. Un échantillon de 100  $\mu$ l était récupéré et déposé sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim). L'utilisation de l'appareil "Dot Blot Apparatus" de la compagnie BIORAD pour réaliser les dépôts permettait de concentrer le surnageant sur une surface réduite de la membrane. Une fois les divers échantillons déposés, la membrane était séchée avant d'effectuer la réaction avec les anticorps et par la suite l'autoradiogramme (section 15.1)

## 16.0 Dosage de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique cellulolytique a été estimée par quantification des sucres réducteurs selon une méthode dérivée de celle de Lever (1972). Cette méthode est basée sur l'interaction entre le groupement aldéhyde du sucre réduit et le groupement amine de l'acide parahydroxy-benzoïque hydrazine (PAHBAH) qui réagit pour former une imine. Cette dernière molécule subit un réarrangement qui conduit à la formation d'une molécule colorée présentant un maximum d'absorbance à 405 nm. Les réactions enzymatiques ont été réalisées dans un tampon citrate (0.05M) (au pH et à la température optimaux de l'enzyme), contenant 0.25% de cellulose auquel une quantité déterminée de surnageant de culture a été ajoutée. Des échantillons des réactions enzymatiques ont été recueillis à des intervalles réguliers de 2 à 3 minutes jusqu'à 15 min. La réaction a été stoppée par l'ajout d'une solution de 0.5 N de NaOH contenant 0.25% de PAHBAH. Les tubes ont ensuite été chauffés à 95°C pendant 5 minutes puis refroidis sur glace. Finalement, la densité optique a été lue à



405 nm et a permis de quantifier les sucres réducteurs à l'aide d'une courbe standard. Du glucose à de différentes concentrations a été utilisé pour établir la courbe standard.

### **17.0 Dosage du contenu protéique**

Le contenu protéique a été estimé par la méthode de Bradford (1976), basée sur l'augmentation de la densité optique à 595 nm due à la fixation du bleu de Coomassie aux acides aminés aromatiques et basiques. La solution et le protocole utilisés pour le dosage provenaient de la trousse "Bio-Rad Protein Assay" de la compagnie Bio-Rad. La courbe de référence a été établie avec de l'ovalbumine.

### **18.0 Calcul des structures secondaires possibles de l'ARN messenger**

Le calcul des structures secondaires possibles de l'ARN messenger a été effectué à l'aide du logiciel RNADRAW version 1.0. L'auteur et programmeur du logiciel est Ole Matzura du département de biophysique médicale de l'Institut Karolinska en Suède.

L'algorithme de base provient du "Vienna RNA package" (Hofacker *et al.* 1994) qui lui-même a été établi à partir de l'algorithme de Zuker et Stiegler (1981). Les paramètres d'énergies proviennent de Turner *et al.* (1988), Freier *et al.* (1986) et Jeager *et al.* (1989). Le calcul matriciel est basé sur le travail de McCaskill (1990) et les coordonnées d'énergies minimales calculées par un programme de Brucoleri et Hienrich (1988).

## **Résultats**

## **1.0 Mutagénèse des gènes codant la cellulase B et la cellulase A**

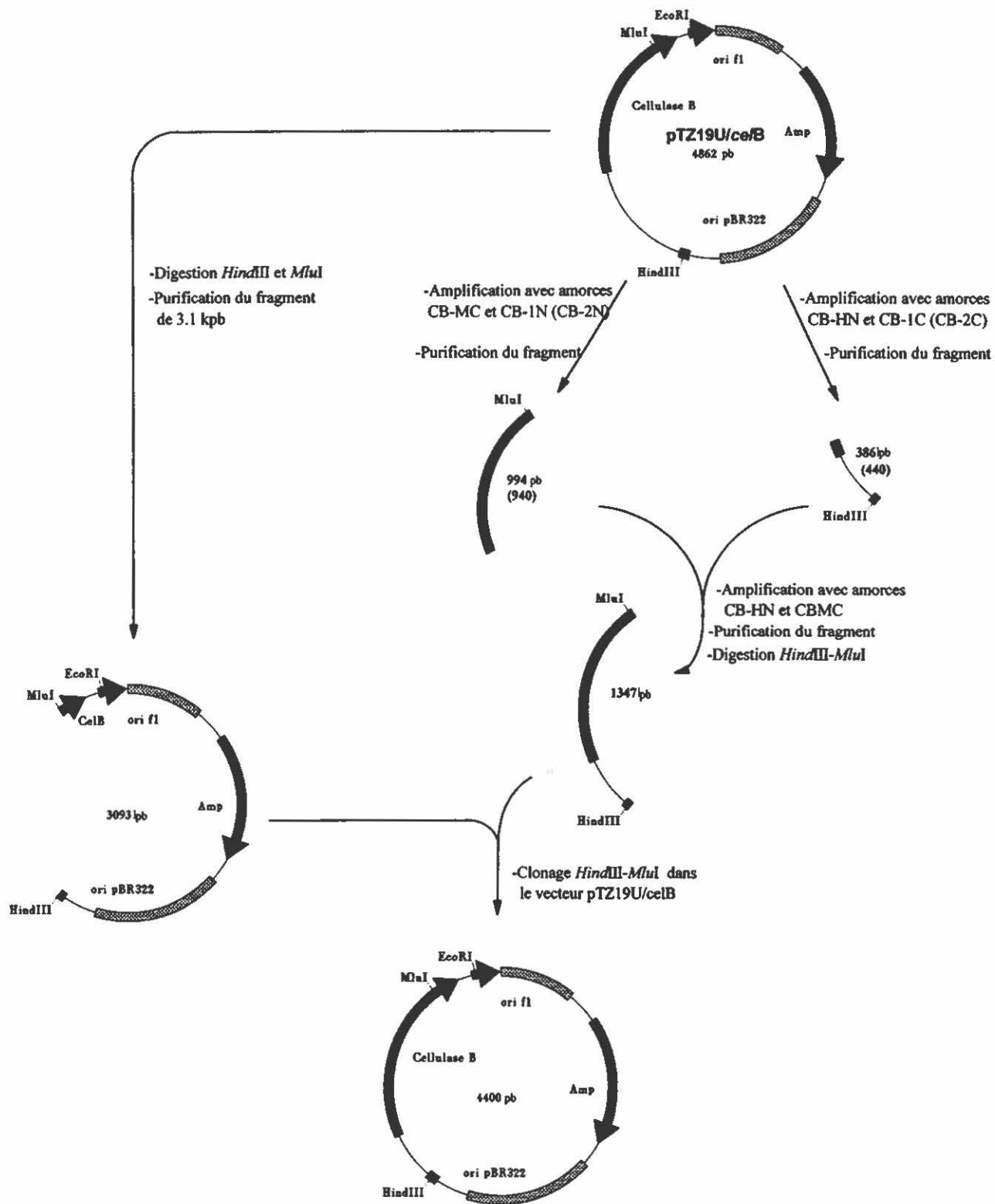
### **1.1 Mutagénèse du gène *celB***

La mutagénèse de *celB* avait pour but de produire trois mutants, dont le premier ou le second codon TTA était changé par un codon CTG et le troisième, dont les deux codons TTA étaient changés par des codons CTG (Figure 6). Des tentatives de mutagénèse ont été faites par deux méthodes, soient par l'élimination d'un site de restriction unique ou par amplification élective à l'aide de la polymérase. La première de ces méthodes, la mutagénèse par l'élimination d'un site de restriction unique, n'a pas permis de muter le gène *celB* même après plusieurs tentatives. La mutagénèse a donc été faite par amplification élective à l'aide de la polymérase.

#### **1.1.1 Mutagénèse du gène *celB* par amplification élective à l'aide de la polymérase**

La mutagénèse de *celB* a été faite en trois parties, deux étapes d'amplifications successives et une étape de ligation, tel que décrit à la Figure 10. La première étape d'amplification fut réalisée afin d'obtenir les sous-fragments en amont et en aval du site de mutagénèse. L'amorce CB-HN (sens) s'hybride à 330 nucléotides du triplet d'initiation ATG et contient un site *Hind*III à son extrémité 5'. L'amorce ainsi conçue permet une amplification qui produira un fragment d'ADN dont seront éliminés environ 460 nucléotides en amont du gène, réduisant ainsi la dimension du vecteur. Les amorces CB-1N (sens) et CB-1C (anti-sens) s'hybrident au premier codon TTA et les amorces CB-2N (sens) et CB-2C (anti-sens) s'hybrident au deuxième codon TTA. L'amorce CB-MC (anti-sens)

Figure10: Schéma de l'approche utilisée lors des essais de mutagenèse dirigée par PCR pour la production des mutants T1, T2 et T3 de *ceIB*.



s'hybride à quelques nucléotides en aval du site *Mlu*I. La matrice était le vecteur pTZ19U/*cel*B.

Des amplifications ont été faites avec les amorces CB-HN et CB-1C ou CB-2C pour amplifier les régions en amont de la mutation produisant des sous-fragments de 386 ou 440pb (Figure 11a puits ii et iv respectivement). Les amorces CB-MC et CB-1N ou CB-2N, pour amplifier la région en aval du gène, ont produit des sous-fragments de 994 ou 940 pb (Figure 11a puits i et iii respectivement). La deuxième série d'amplification a été faite avec les deux amorces aux extrémités CB-HN et CB-MC. Ces amplifications donnent des fragments de 1347 pb (Figure 11b) . Le produit de la mutagenèse pour le premier codon TTA a été utilisé comme matrice pour un deuxième cycle de mutagenèse avec les amorces internes pour muter le deuxième codon TTA et ainsi produire le double mutant.

Afin de standardiser les vecteurs mutants avec le contrôle non muté, celui-ci a aussi été amplifié à l'aide de la polymérase pour éliminer la région de 460 nucléotides en amont du gène. Le fragment a été produit par amplification avec les amorces CB-MC et CB-HN et a subi les mêmes étapes que les mutants.

Lors de la production des mutants, les amplifications des sous-fragments en amont ou en aval de la mutation ont toujours donné de très bons résultats (Figure 11a puits i à iv ). L'amplification pour la production du fragment complet du mutant T1 (*cel*B muté au premier codon TTA) a produit une bande bien définie sur gel d'agarose à 1347 pb (Figure 11b, puits i). Par contre, l'amplification pour produire le mutant T2 (mutant T1 de *cel*B muté au deuxième codon TTA) et le mutant T3 (*cel*B muté au deuxième codon TTA) n'ont pas donné d'amplification (Figure 11b, puits ii) Diverses tentatives ont été faites en modifiant la température d'hybridation et en modifiant la concentration en propionamide lors des réactions d'amplifications mais sans succès. Il a été nécessaire d'ajouter de la protéine du

Figure 11: Profil électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplifications pour muter le gène *celB*.

(a) Amplifications des sous fragments en amont et en aval du premier et deuxième codon TTA .

(i) sous fragment en aval pour le mutant T1 (994 pb).

(ii) sous fragment en amont pour le mutant T1 (386 pb).

(iii) sous fragment en aval pour le mutant T3 (940 pb).

(iv) sous fragment en amont pour le mutant T3 (440 pb).

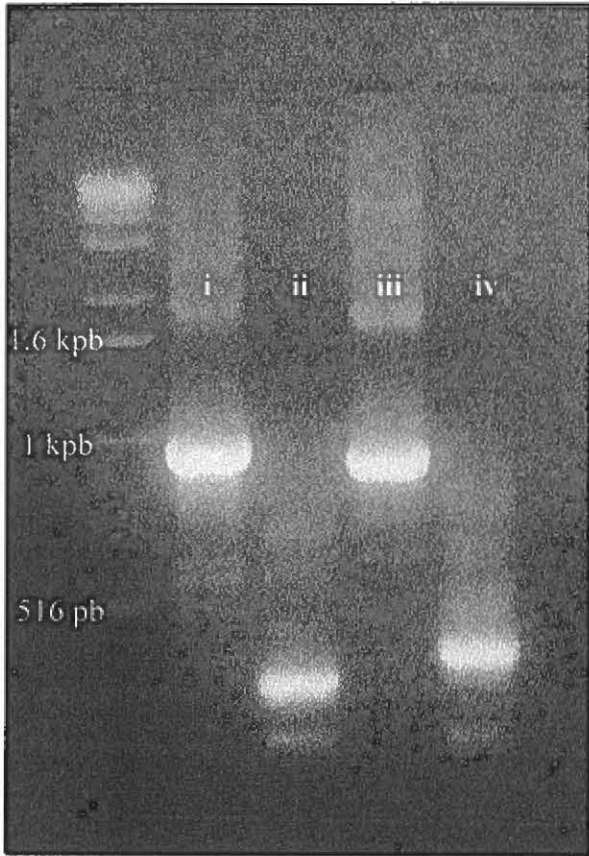
(b) Amplification des fragments complets produits à partir des sous fragments de la partie a.

(i) fragment complet T1 (mutation du premier codon TTA) (1347 pb)

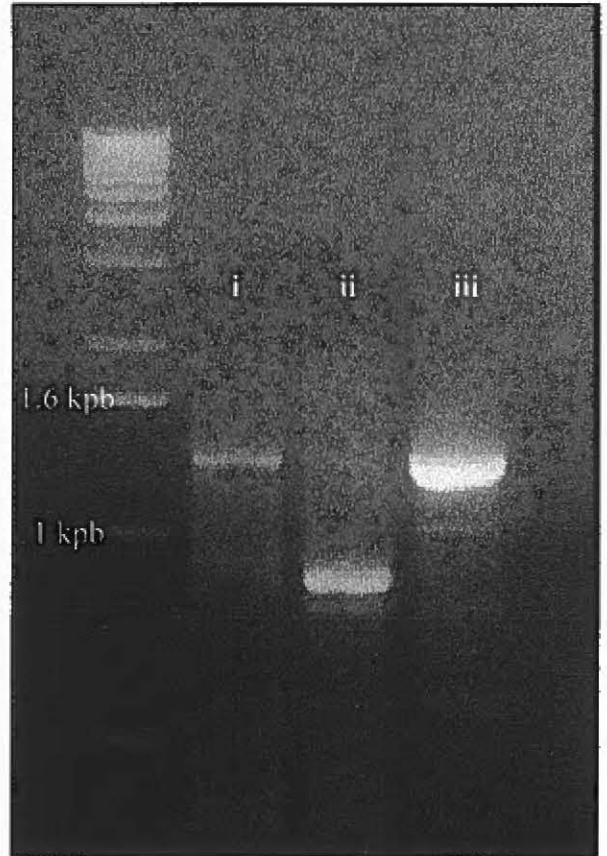
(ii) fragment complet T3 (mutation du deuxième codon TTA)

(iii) contrôle (amplification du gène sauvage) (1347 pb)

Image par balayage.



**a**



**b**



gène 32 et du Taq Enhancer solution (qui ne faisait pas partie du protocole original) pour pouvoir amplifier les fragments de 1347 pb afin de muter le deuxième codon TTA (Figure 12).

Les fragments ainsi produits ont été clonés dans le vecteur pTZ19U/*celB* de 3093 pb (Figure 10) qui avait été délété de 1769 pb suite à sa digestion par *HindIII-MluI*. L'obtention des constructions désirées a été confirmée par des digestions enzymatiques des plasmides obtenus avec les enzymes de restriction *HindIII* et *KpnI* (Figure 13) qui donnaient des fragments de 2827, 1029 et 544 pb.

## 1.2 Mutagenèse du gène *celA*

Les travaux de mutagenèse de *celA* avaient pour but de modifier le triplet de départ TTG en ATG, de changer le codon suivant AAA en AAG (Figure 5) et de produire le double mutant. Des tentatives de mutagenèse de *celA* ont été faites par deux méthodes, la méthode du simple brin poly uracil et par amplification élective à la polymérase. La méthode du simple brin poly uracil n'a pas permis la production de mutants du gène *celA*. La mutagenèse a donc été faite par amplification élective à l'aide de la polymérase.

### 1.2.1 Mutagenèse du gène *celA* par amplification élective à l'aide de la polymérase

La mutagenèse par amplification élective à la polymérase (PCR) a été faite en deux étapes d'amplification et une de clonage, tel que décrit à la Figure 14. Les trois essais de mutagenèse ont été faits en parallèle. L'amorce RP (sens) (l'amorce de séquençage universel "reverse primer") s'hybridait en amont du site *HindIII*. Les amorces CA-M (sens) et CA-MC (anti-sens) étaient complémentaires et mutaient le codon TTG de départ en codon

**Figure 12: Profil électrophorétique en gel d'agarose des amplifications pour le brin complet du mutant T2 en présence de divers agents (Taq Enhancer Solution et protéine du gène 32) pour passer au delà des structures secondaires. Image par balayage.**

- (i) amplification normale**
- (ii) amplification en présence de Taq Enhancer Solution**
- (iii) amplification en présence de protéine de gène 32**
- (iv) amplification en présence de protéine de gène 32 et Taq Enhancer Solution**
- (v) contrôle (amplification du gène sauvage) en conditions normales (1347 pb)**

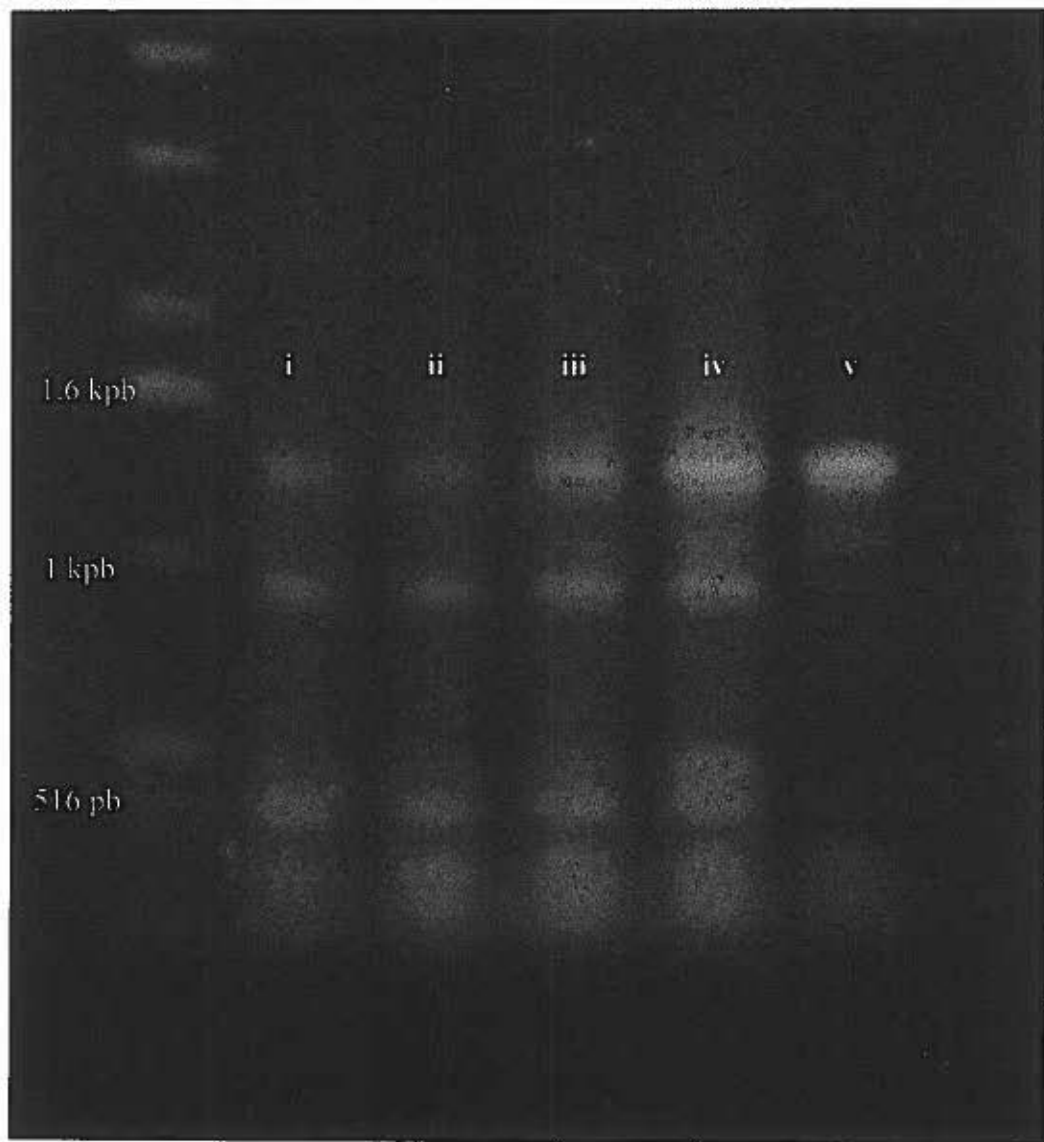


Figure 13: Profil électrophorétique en gel d'agarose des fragments obtenus suite à la digestion avec l'enzyme *Hind*III et *Kpn*I des plasmides vecteurs des gènes *ceiB* mutés en T1, T2, T3 et du vecteur d'origine pTZ19U/*ceiB*.

T1; *ceiB* muté au premier codon TTA (fragments de 2827 et 1029 pb),

T2; double mutant TTA (fragments de 2827 et 1029 pb),

T3; *ceiB* muté au deuxième codon TTA (fragments de 2827 et 1029 pb)

C; vecteur d'origine pTZ19U/*ceiB* (fragments de 2827 et 1491 pb pour le vecteur non muté)

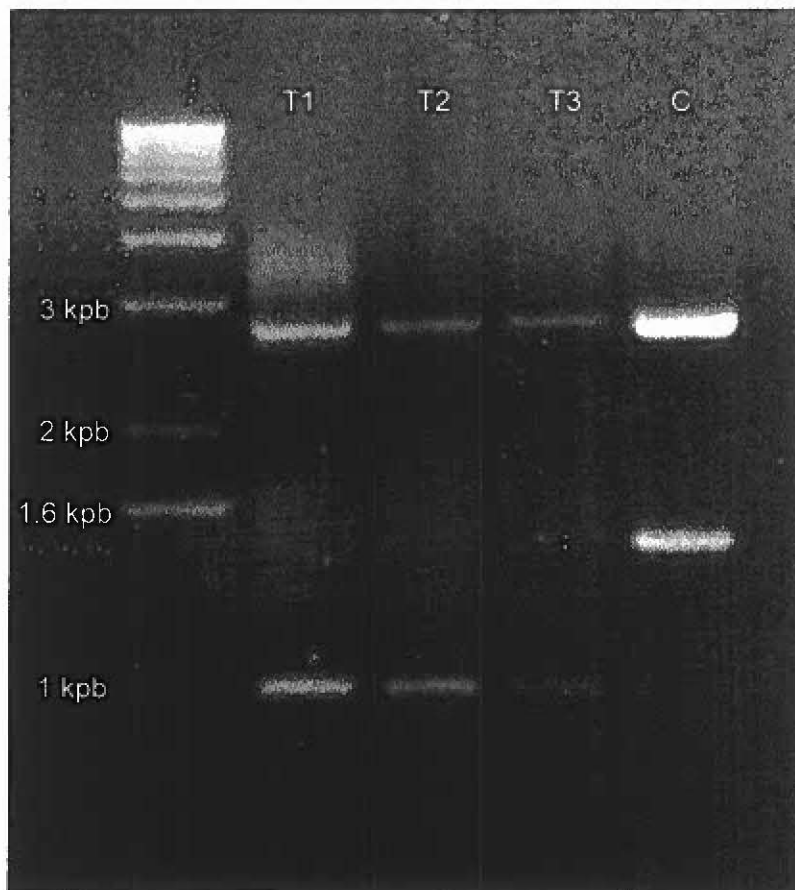
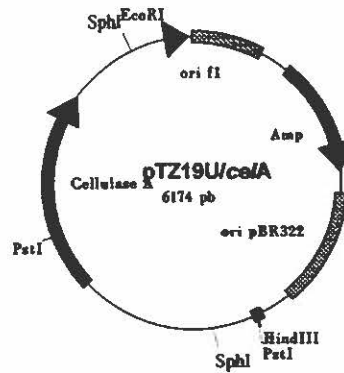


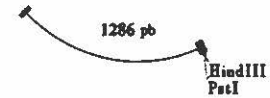
Figure14: Schéma de l'approche utilisée lors des essais la mutagenèse dirigée par PCR pour la production des mutants M, K et MK du gène *celA*.



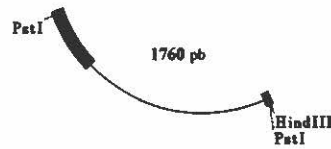
-Digestion *PstI*  
 -Purification du fragment *PstI* de 4.5 kpb  
 -Traitement à la Phosphatase Alcaline

-Amplification avec amorces CA-PC et CA-M (CA-K, CA-MK)  
 -Purification du fragment

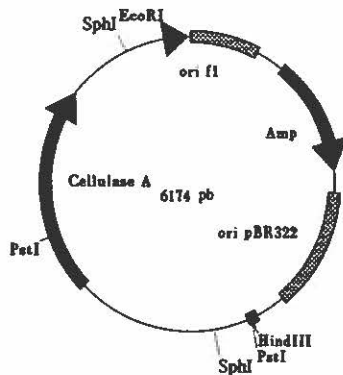
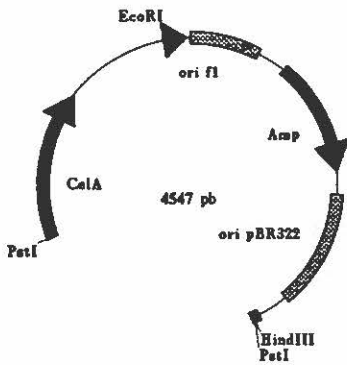
-Amplification avec amorces RP et CA-MC (CA-MC, CA-MKC)  
 -Purification du fragment



-Amplification avec amorces RP et CA-PC  
 -Purification du fragment



-Digestion *PstI*  
 -Clonage *PstI* dans le vecteur pTZ19U/celA



ATG (mutant M). Les amorces CA-K (sens) et CA-KC (anti-sens) étaient aussi complémentaires et mutaient le codon AAA en AAG (mutant K). Les codons CA-MK (sens) et CA-MKC (anti-sens) permettaient de muter les deux codons à la fois (mutant MK). L'amorce CA-PC (anti-sens) hybridait à quelques nucléotides en aval du site *Pst*I.

Les amplifications des fragments en aval du site de mutagenèse ont été faites avec les amorces CA-PC et CA-M, CA-K ou CA-MK et ont produit des fragments de 510 pb (Figure 15a puits ii, iv et vi). Les premières tentatives d'amplification pour le fragment en amont ont été faites avec les amorces CA-HN et CA-MC, CA-KC ou CA-MKC. L'amorce CA-HN comportait le site *Hind*III à son extrémité 5' et on voulait ainsi éliminer ici les 400 nucléotides en amont du gène qui n'avaient pas été séquencés. L'expérience n'a pas fonctionné tel que prévu et l'amplification d'un fragment de 650 pb a été obtenue au lieu d'un fragment de 391 pb (Figure 15a puits i, iii et v). Plusieurs essais d'amplification du bon fragment ont été tentés en variant les conditions de thermocyclage sans succès. Des essais d'amplification ont été effectués avec les deux amorces, CA-HN et CA-HN2, devant s'hybrider en aval de la région non séquencée, et avec l'amorce CA-PC. Ces essais n'ont pas donné les résultats escomptés (Figure 15b puits i et ii). D'autres essais d'amplification ont été répétés en se servant de l'amorce RP au lieu du CA-HN avec les amorces CA-MC, CA-KC et CA-MKC. Ces essais d'amplifications ont permis d'obtenir des fragments de 1286 pb allant d'en amont du site *Hind*III du vecteur pTZ19U jusqu'au site de mutation (Figure 15b puits iii à vi). Comme ces produits d'amplifications étaient bons et pouvaient servir pour les étapes suivantes, il fut décidé de les utiliser et de laisser la région non séquencée avec le gène.

La deuxième étape d'amplification fut réalisée à l'aide des amorces RP et CA-PC pour donner les fragments complets de 1760 pb (Figure 16). Ces fragments ont été isolés,



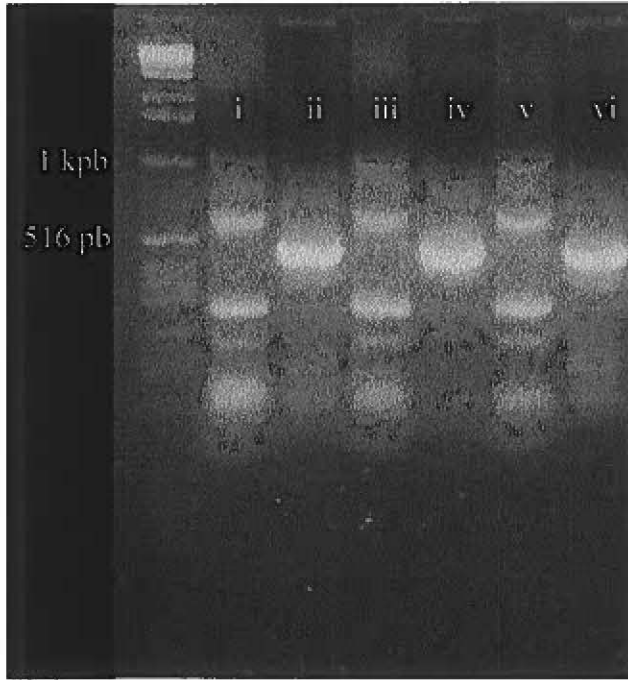
Figure 15: Profil électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus suite aux expériences de mutagenèse dirigée du gène *ceIA*. Images par balayage.

(a) première série d'amplifications.

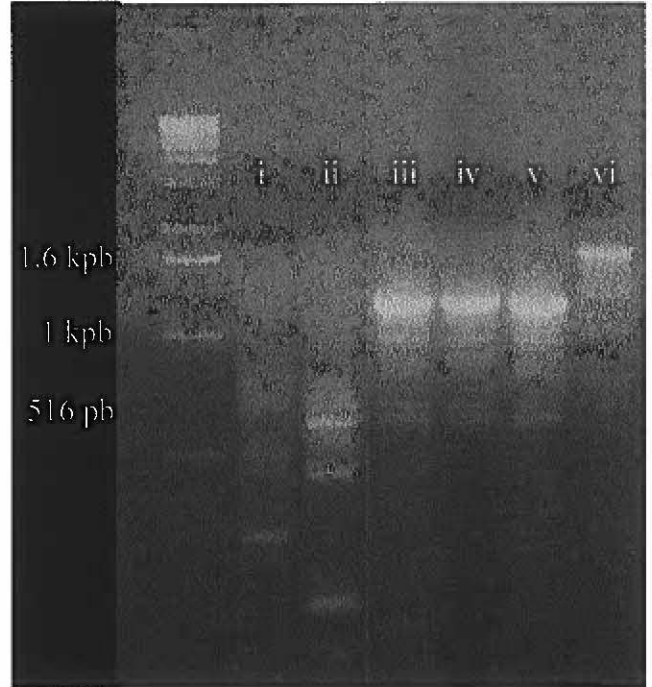
- (i) sous fragment en amont pour le mutant M (650 pb).
- (ii) " en aval pour le mutant M (510 pb).
- (iii) " en amont pour le mutant K (650 pb).
- (iv) " en aval pour le mutant K (510 pb).
- (v) " en amont pour le double mutant MK (650 pb).
- (vi) " en aval pour le double mutant MK (510 pb).

(b) deuxième série d'amplifications.

- (i) amplification avec amorces CA-HN et CA-PC
- (ii) " avec amorces CA-HN2 et CA-PC
- (iii) sous fragment en amont pour le mutant M (1286 pb).
- (iv) " en amont pour le mutant K (1286 pb).
- (v) " en amont pour le double mutant (1286 pb).
- (vi) fragment complet (contrôle) avec amorces RP et CA-PC (1760 pb).



**a**



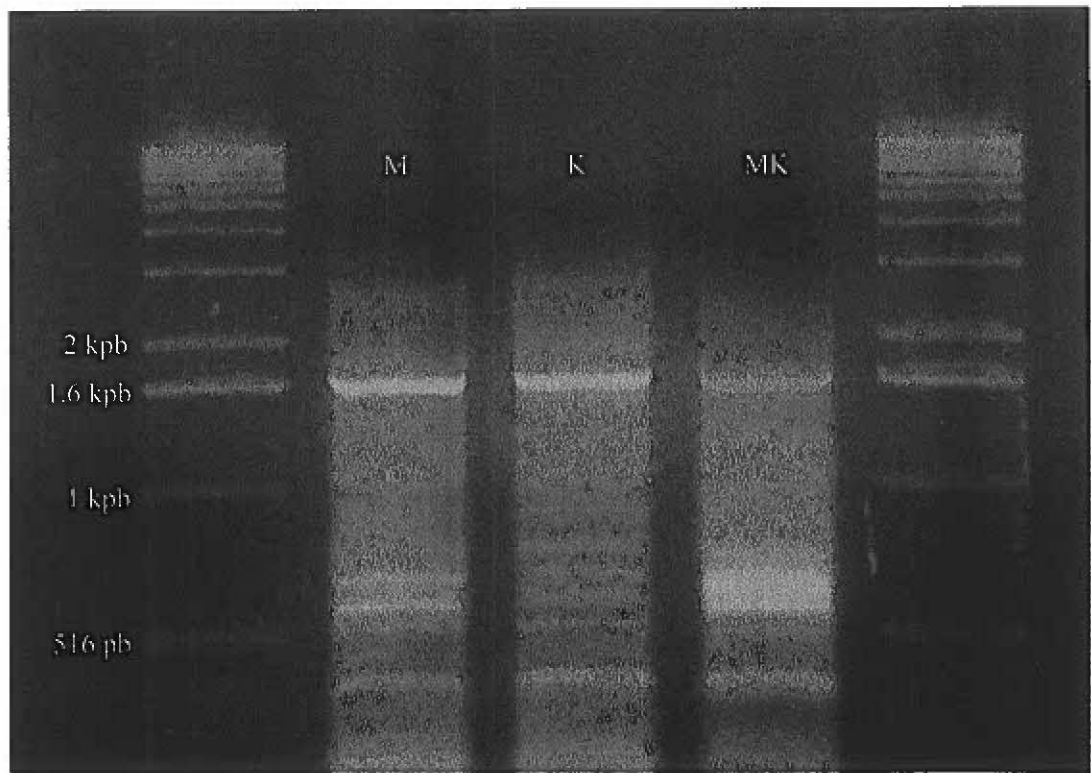
**b**

Figure 16: Profil électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification complets pour les mutations M, K et MK de *celA*.

M; mutant pour la méthionine,

K; mutant pour la lysine, et

MK; double mutant méthionine-lysine.



purifiés et digérés avec l'enzyme *Pst*I. Le vecteur pTZ19U/*celA* a aussi été digéré avec l'enzyme de restriction *Pst*I et migré sur gel d'agarose. Le fragment de 4473 pb a été découpé et extrait du gel par électroélution. Le fragment du vecteur a été déphosphorylé avant l'étape de ligation avec les produits des amplifications. Suite aux essais de clonage, 4 transformants ont été obtenus suite à l'essai de mutagenèse de la méthionine, 2 pour la lysine, 4 pour le double mutant et 2 pour le contrôle. Comme les inserts pouvaient avoir été clones dans les deux orientations, les plasmides obtenus ont été digérés avec l'enzyme de restriction *Sph*I et le criblage des clones s'est fait pour la présence de trois fragments de restriction de 3066 , 2817 et 291 pb (Figure 17).

Pour chacun des mutants, un clone présentant le motif de digestion escompté a été choisi pour produire une maxipréparation d'ADN plasmidique. Les produits des maxipréparations ont été séquencés avec une amorce près du lieu de la mutagenèse. Les trois mutants et le contrôle non muté avaient les séquences désirées.

### 1.3 Clonage avec le fragment de 3.7 kb de pSUR

Afin de vérifier les effets de la mutagenèse des gènes *celA* et *celB*, un fragment d'ADN conférant la résistance à la thiostreptone et une origine de répllication des streptomycètes a été cloné aux vecteurs pTZ19U/*celA* et pTZ19U/*celB* (mutants et contrôles des produits de la mutagenèse de *celA* et *celB*) pour en permettre la répllication dans *S. lividans*. Le clonage a été fait tel que décrit aux Figures 18 et 19. La transformation a été faite dans la souche *E. coli* DH11S et les transformants analysés et criblés selon le profil de restriction de leur plasmide. L'insertion s'est fait au niveau d'un seul site de restriction, d'où la possibilité de deux constructions comportant les deux éléments clonés.

Figure 17: Profil électrophorétique en gel d'agarose des fragments obtenus suite à la digestion avec l'enzyme *SphI* des plasmides vecteurs des gènes *celA* mutés en M, K, MK et non muté. Les clones identifiés avec des étoiles sont ceux ayant été sélectionnés.

M; mutant pour la méthionine,

K; mutant pour la lysine,

MK; double mutant méthionine-lysine et

C; contrôle non muté

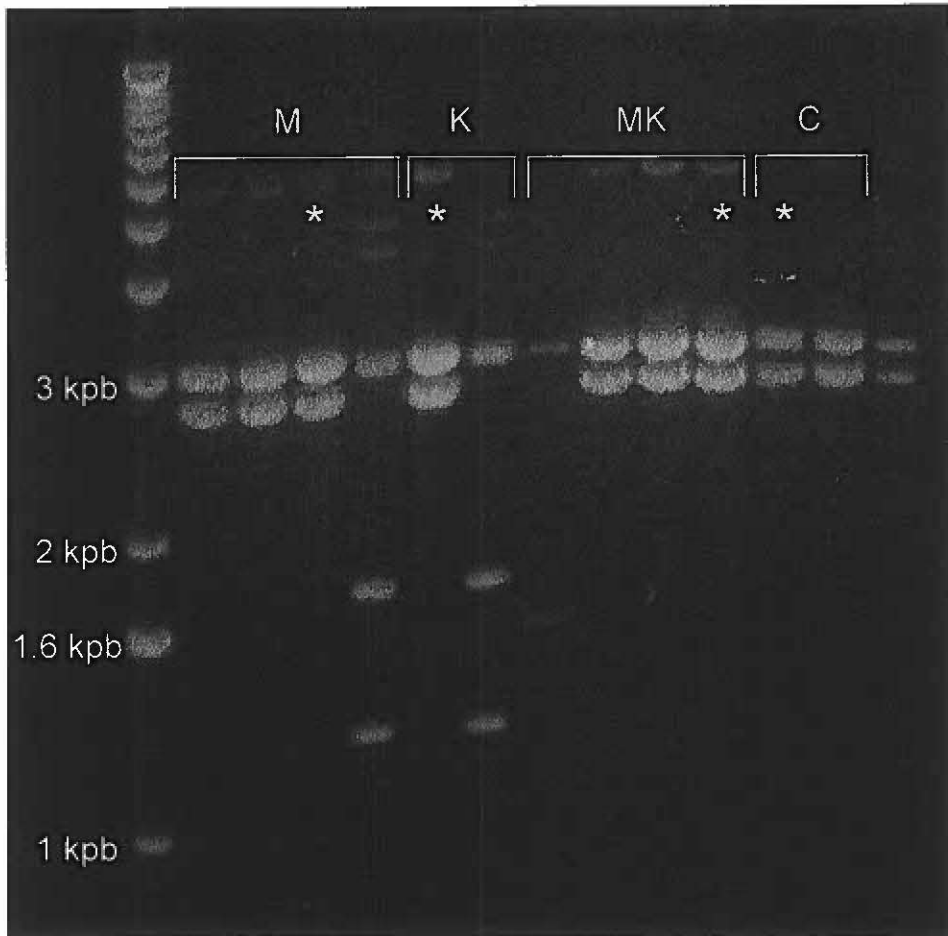
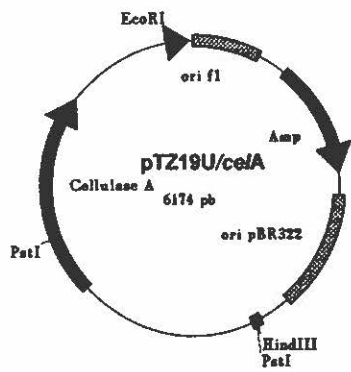
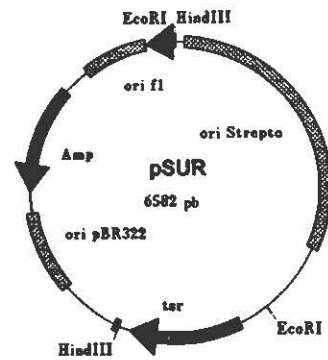
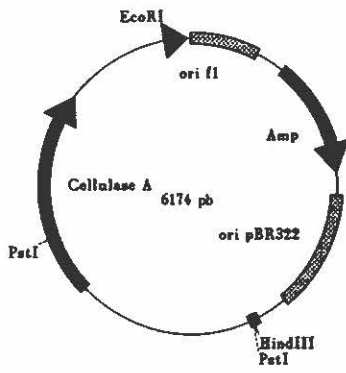


Figure 18: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de réplication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/*celA*.

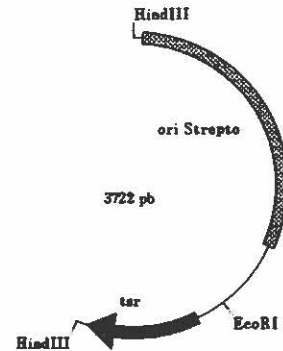




-Mutagenèse dirigée



-Digestion *HindIII*  
-Purification du fragment *HindIII* de 3.7 kpb



-Digestion *HindIII*

-Ligation

-Transformation dans *E. coli* DH11S

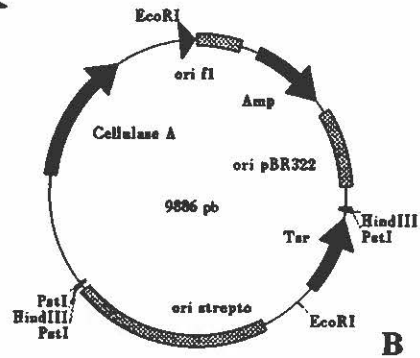
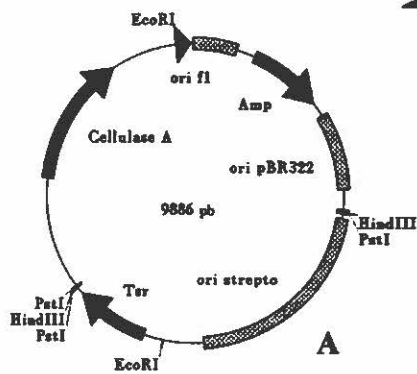
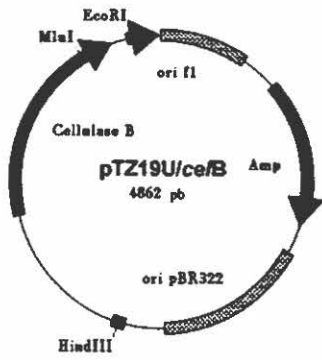
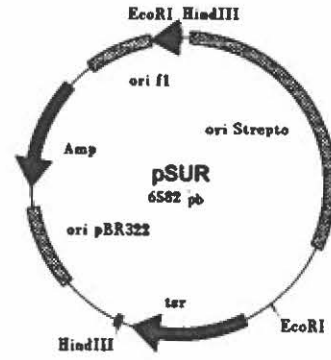
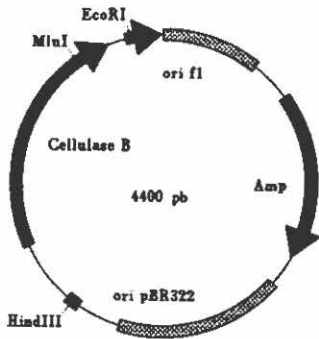


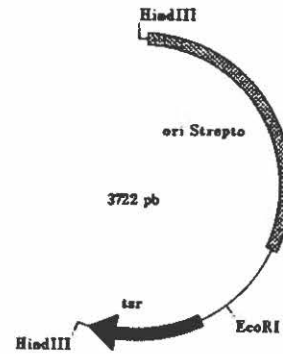
Figure 19: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de répllication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/*ceIB*.



-Mutagenèse dirigée



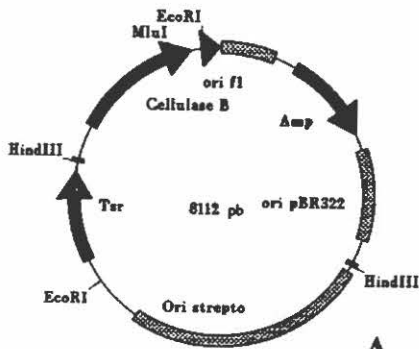
-Digestion  
*HindIII*  
-Purification du fragment  
*HindIII* de 3.7 kpb



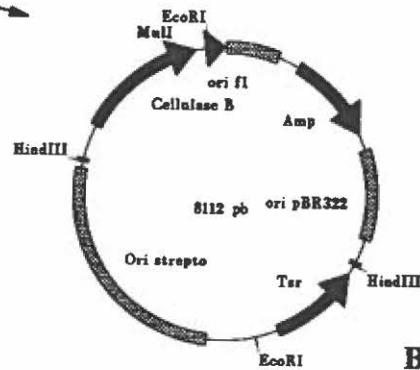
-Digestion *HindIII*

-Ligation

-Transformation dans  
*E. coli* DH11S



**A**



**B**

Les constructions variaient selon l'orientation de l'insert et ont été discriminé par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI*.

Les clones de pSUR/*celA* possédant la résistance à la thiostreptone et le gène *celA* dans le même sens (orientation A) donnaient des fragments de 5428 et 4458 pb quand digérés avec l'enzyme *EcoRI* et migrés en gel d'agarose. Les transformants possédant le gène de la résistance à la thiostreptone et le gène *celA* en sens contraire (orientation B) donnaient des fragments de 5964 et 3922 pb.

Les clones pSUR/*ceIB* donnaient des fragments de 4458 et 5428 pb lorsque digérés avec l'enzyme *EcoRI* suite à l'incorporation du gène de la résistance à la thiostreptone et le gène *ceIB* dans le même sens (orientation A). Si la résistance à la thiostreptone et le gène *ceIB* avaient été insérés en sens contraire (orientation B), les fragments étaient de 5964 et 3922 bps.

#### 1.4 Transformation dans *S. lividans*

L'orientation B a été choisie pour standardiser les diverses constructions, car le vecteur pSUR, qui allait servir comme contrôle sans gène *cel* lors des cultures, était composé de cette façon (Figure 18): soit les gènes *tsr'* et *amp'* sont en sens contraire. Tous les vecteurs ont une structure similaire mise à part les inserts contenant les divers gènes mutés et les contrôles sauvages et négatifs.

Les clones T1, T2, T3, TB (gène sauvage de *ceIB*) et pSUR (vecteur sans gène de cellulase) ont été transformés dans les souches de *S. lividans* 1326 et J1725. Les clones M, K, MK, et CA (gène sauvage de *celA*) ont été transformés dans *S. lividans* 1326.

## 1.5 Sécrétion de cellulases et de xylanases

Plusieurs des mutants avaient de la difficulté à sporuler en milieu solide ce qui a empêché l'utilisation de suspension de spores pour ensemercer les cultures liquides. Afin de déterminer la sécrétion de cellulases et de xylanases dans de différents milieux, les cultures ont donc été ensemençées avec des précultures de 25 ml de TSB et en utilisant un volume comprimé de mycélium identique. Les milieux liquides M14 contenant 1% CMC, 1% xylane, 1% xylane + CMC ou 1% xylane et cellobiose ( $G_2$ ) ont été utilisés. Les divers mutants *celA* et *celB* ainsi que les contrôles furent cultivés pendant 24 heures en milieu nutritif TSB. Le mycélium des précultures a été lavé deux fois avec du milieu M14 avant d'être utilisé pour l'ensemencement des quatre milieux mentionnés. Des échantillons ont été recueillis stérilement à des intervalles de 24 heures. Des immunobuvardages de 200 $\mu$ l de surnageants de cultures ont été faits pour les divers mutants en fonction des milieux de cultures et du temps d'incubation avec des anticorps anti-cellulase A, anti-cellulase B, anti-xylanase A et anti-xylanase B. Ces immunobuvardages ne donnent pas de valeurs quantitatives quant à la concentration de cellulases ou de xylanases présentes dans chacun des puits, mais permettent la comparaison entre les divers mutants et contrôles pour la production de ces enzymes.

### 1.5.1 Mutants du gène *celA*

Les résultats des immunobuvardages obtenus suite aux analyses des mutants du gène *celA* (M, K et MK) ainsi que le gène *celA* sauvage et le vecteur à copies multiples pSUR sont présentés aux Figures 20 à 23. Le mutant M (mutant pour la méthionine de départ) présentait la plus forte production de cellulase A (Figure 20) dans les quatre milieux et dépassait la production obtenue dans le cas du gène sauvage. Le mutant K (mutant pour la lysine adjacente à la méthionine de départ) par contre produisait considérablement moins de

Figure 20: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase A.

(M) mutant pour la méthionine de départ,

(K) mutant pour la lysine,

(MK) double mutant,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.

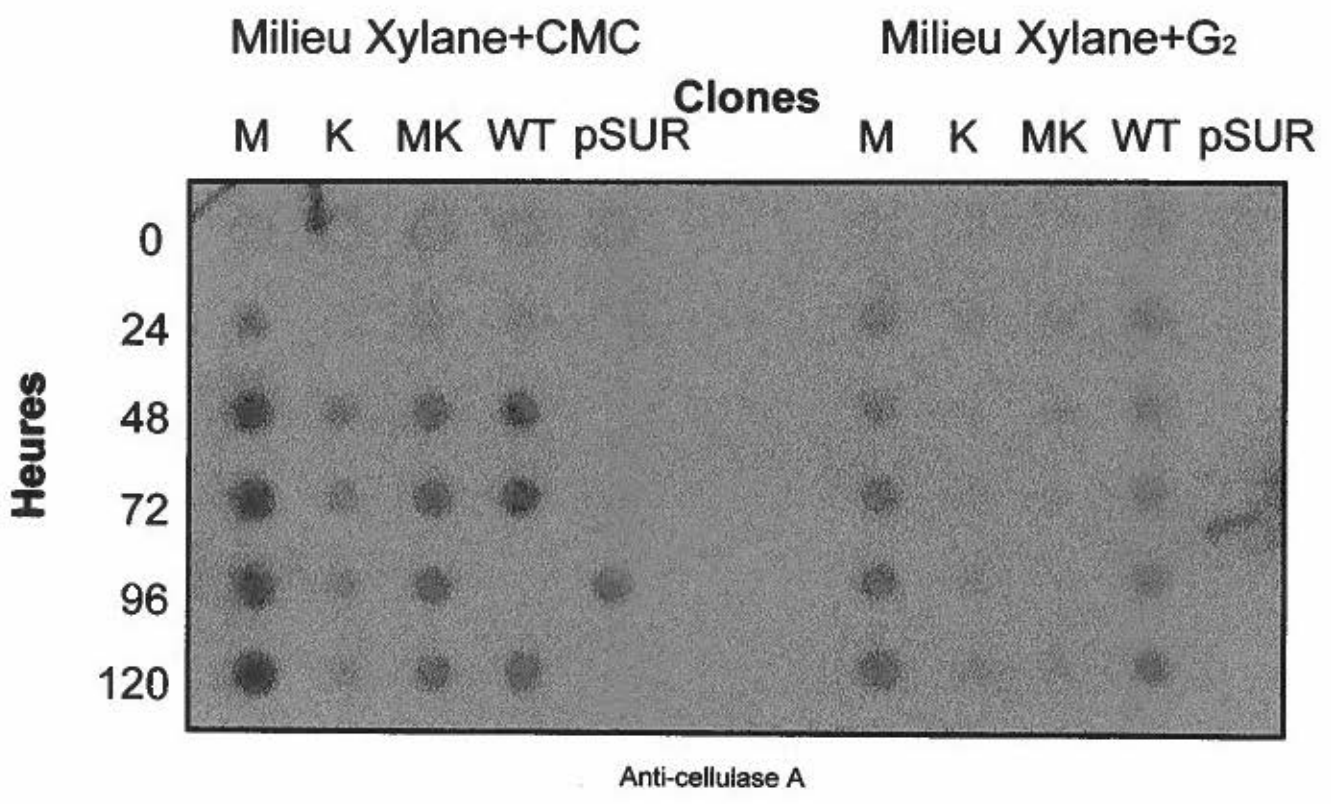
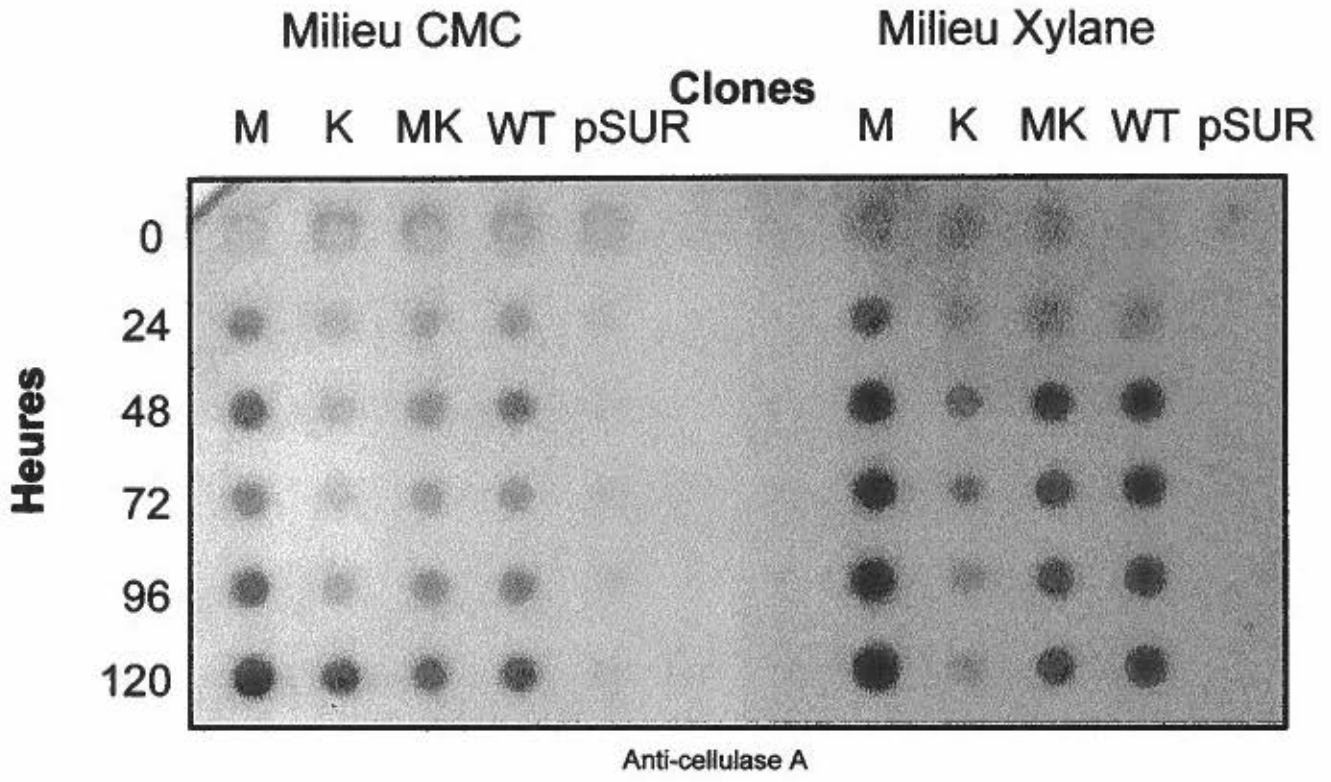


Figure 21: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase B.

(M) mutant pour la méthionine de départ,

(K) mutant pour la lysine,

(MK) double mutant,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.



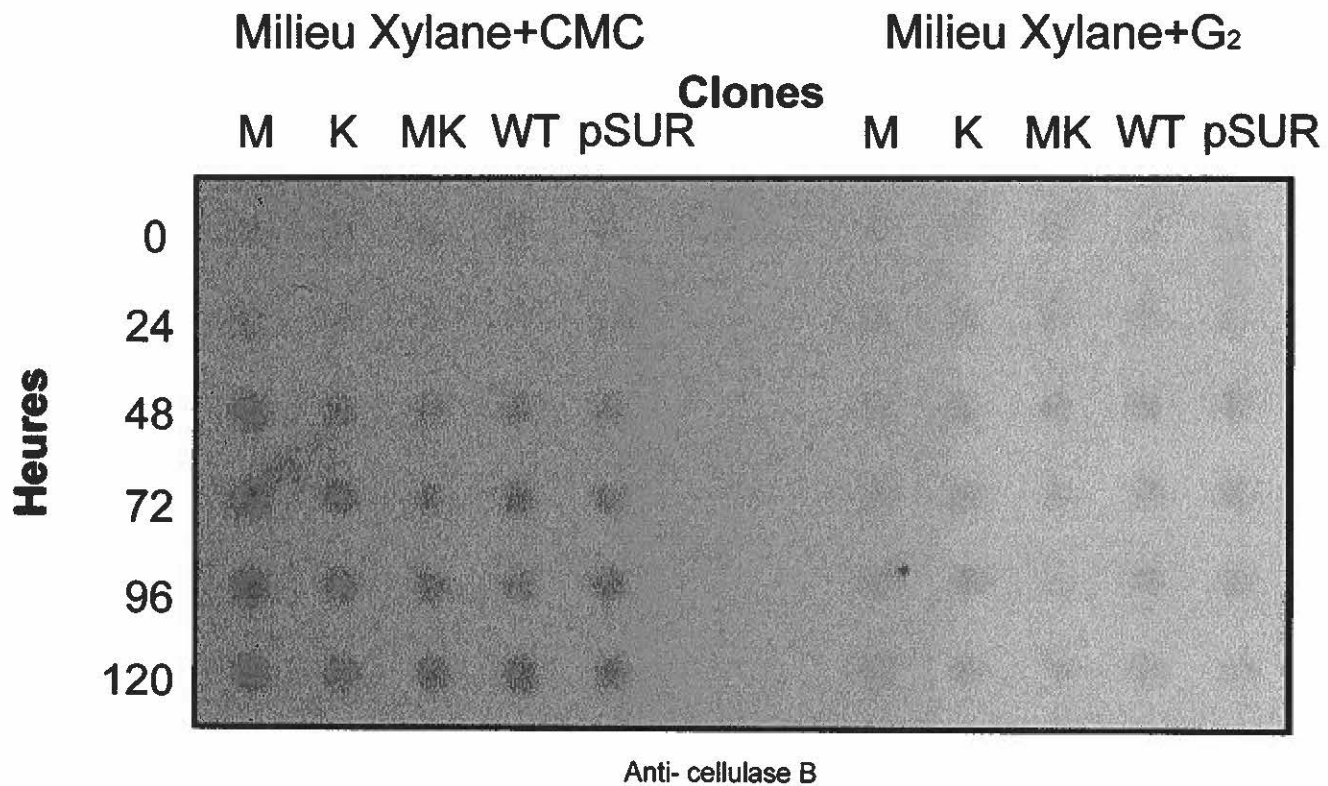
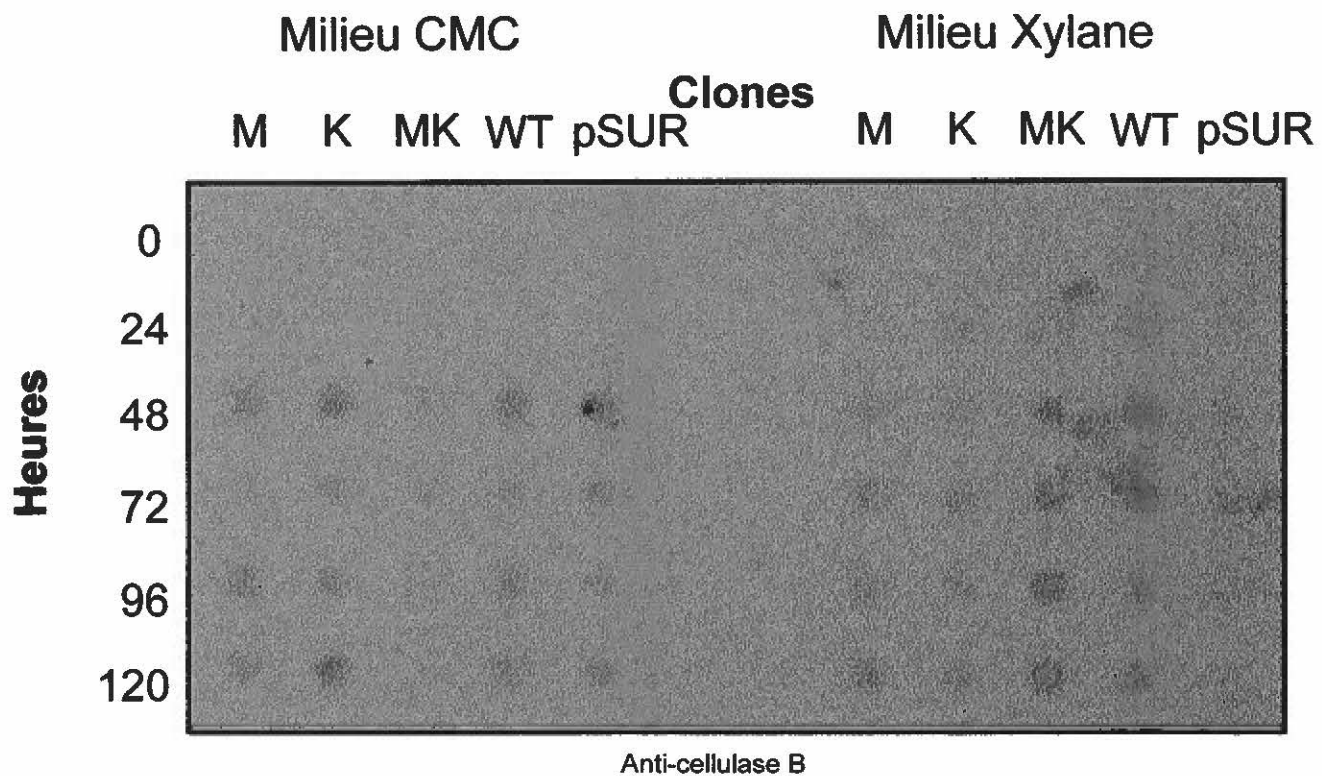


Figure 22: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase A.

(M) mutant pour la méthionine de départ,

(K) mutant pour la lysine,

(MK) double mutant,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.

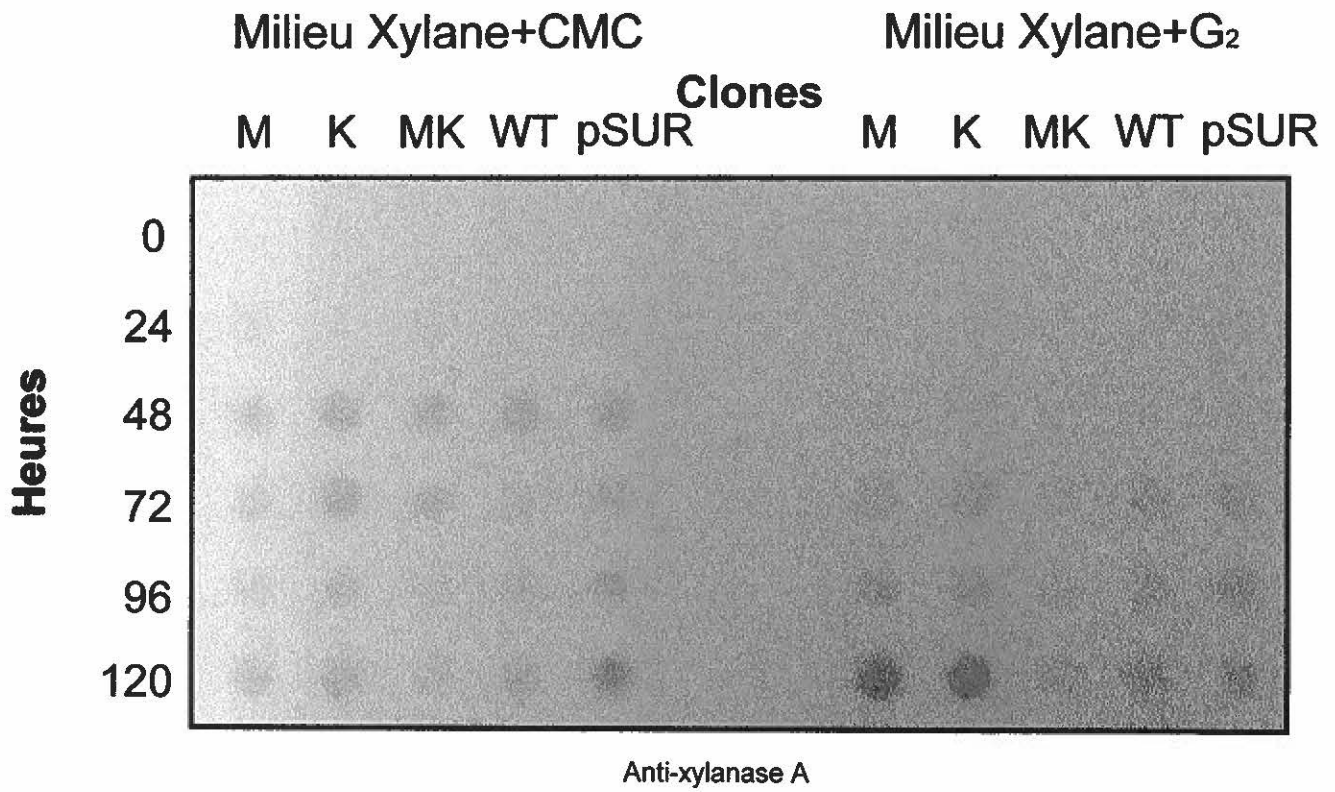
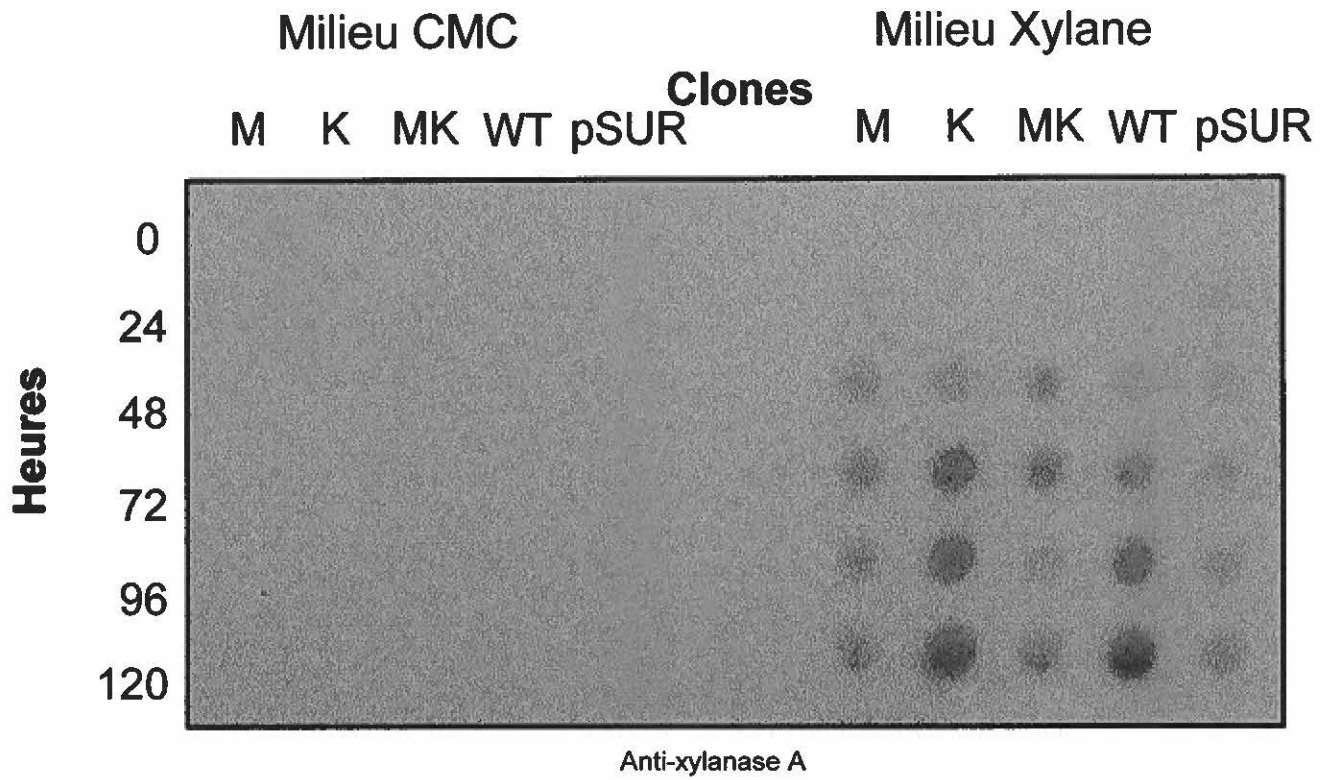


Figure 23: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase B.

(M) mutant pour la méthionine de départ,

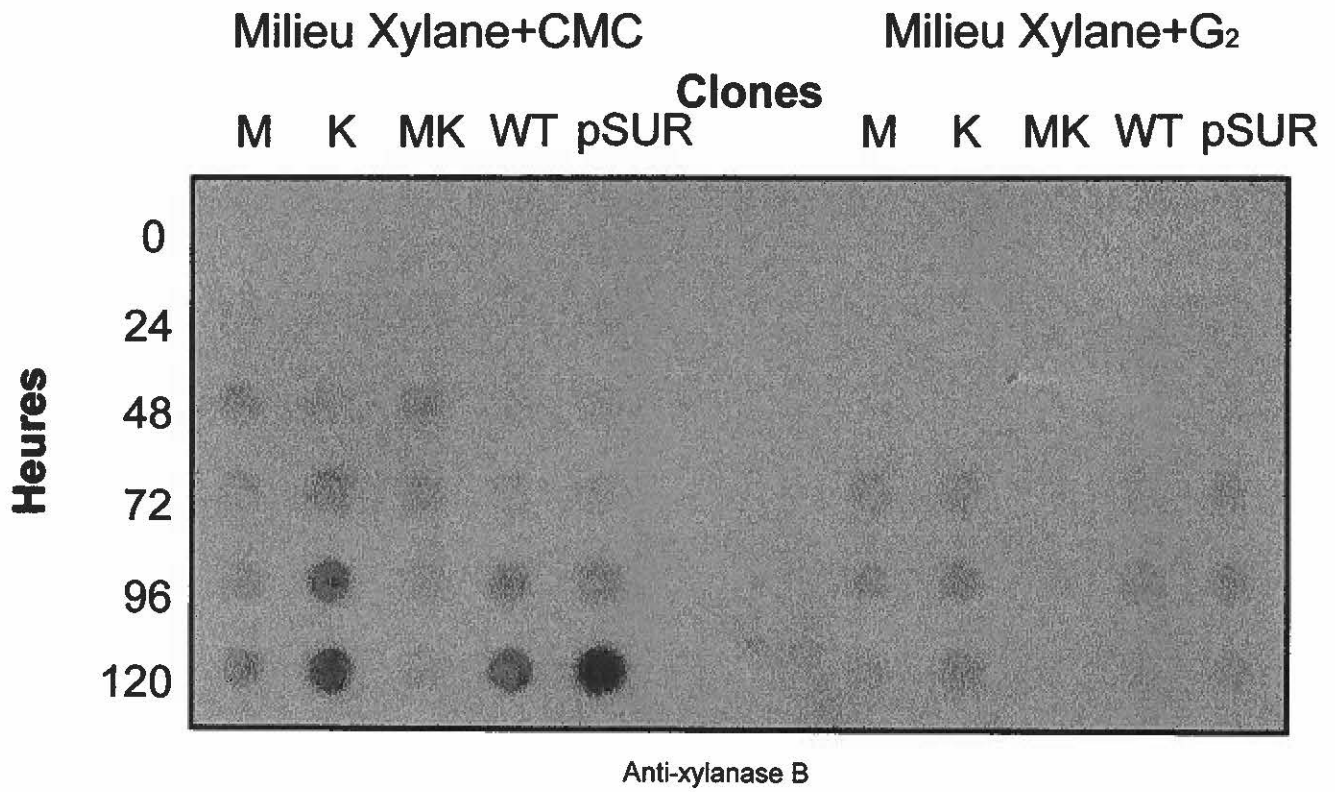
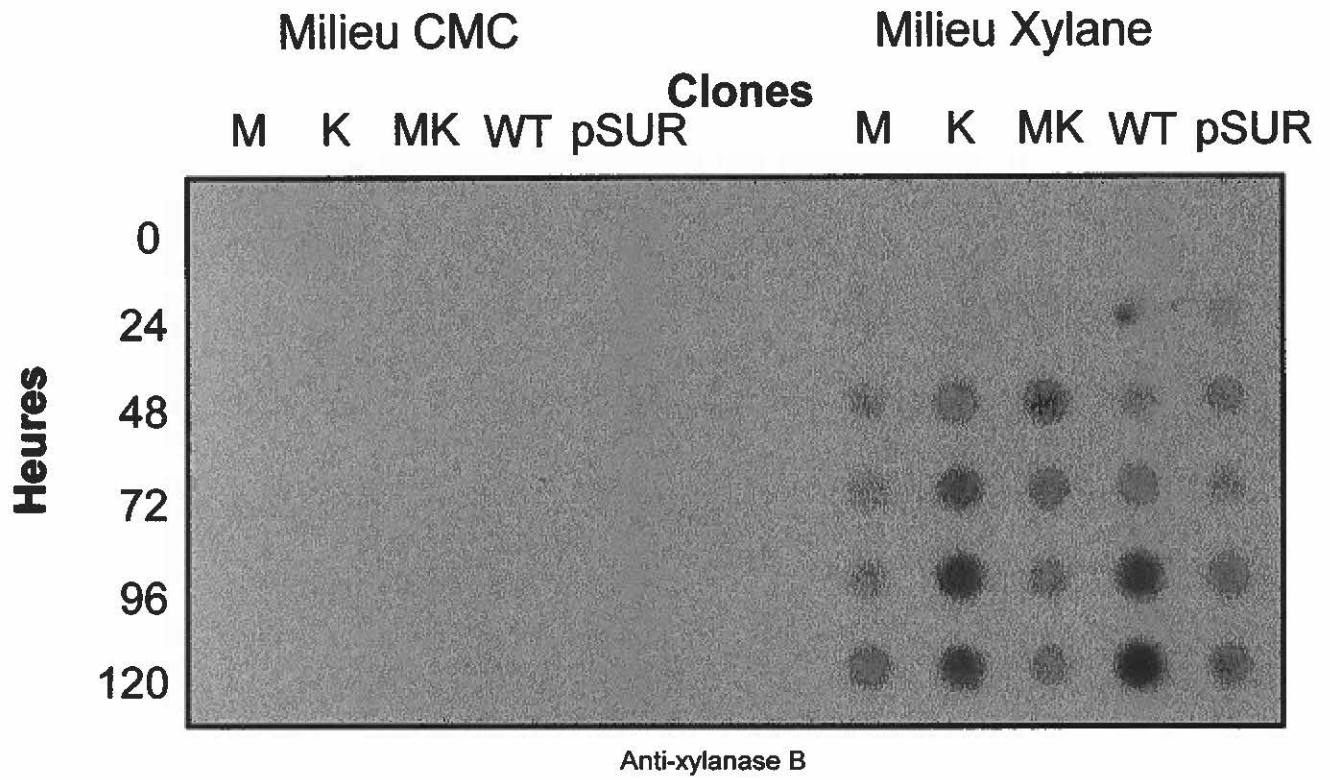
(K) mutant pour la lysine,

(MK) double mutant,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.



cellulase que dans le cas du gène sauvage. Le double mutant semblait produire une quantité équivalente à celle du contrôle sauvage. Le contrôle arborant seulement la copie génomique du gène *celA* ne produisait presque pas de cellulase A lorsque comparé aux autres. Des quatre milieux utilisés pour la production de cellulase A, le milieu M14 contenant 1% de xylane comme source de carbone semblait le meilleur (Figure 22), et le milieu avec 1% de xylane et de cellobiose le moins favorable pour la production de l'enzyme.

La production de cellulase B par ces clones était extrêmement faible quel que soit le milieu utilisé pour la croissance cellulaire (Figure 21). La surproduction de cellulase A ne semblait pas avoir d'effet sur l'apparition de cellulase B, qui est produite en quantités régulières quel que soit le mutant du gène *celA* présent.

Les productions de xylanases A et B étaient absentes dans les cultures en milieu CMC mais présentes dans les milieux contenant du xylane. La production de xylanases A et B semblaient être plus forte avec le mutant K (Figures 22 et 23) surtout en milieu xylane. Les plus faibles producteurs de xylanases étaient les clones M, MK et pSUR. Dans les milieux mixtes, les xylanases ont fait leur apparition après 48 heures de culture en xylane et xylane-CMC, et à 72 heures, mais en très faibles quantités, en milieu xylane-cellobiose.

### 1.5.2 Mutants du gène *celB*

Les résultats des immunobuvardages des protéines présentes dans les surnageants de culture obtenus dans le cas des mutants du gène *celB* (T1, T2 et T3), des souches contenant le gène *celB* sauvage et le vecteur pSUR sont présentés aux Figures 24 à 27. Le double mutant (T2) s'est avéré le plus fort producteur de cellulase B d'entre les cinq clones et ce dans tous les milieux (Figure 24). La production débutait très rapidement avec les clones T1, T2 et T3 dans les quatre milieux de cultures, et il y avait déjà accumulation de cellulase B

Figure 24: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase B.

(T1) mutant pour le premier codon TTA,

(T2) double mutant,

(T3) mutant pour le deuxième codon TTA,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.



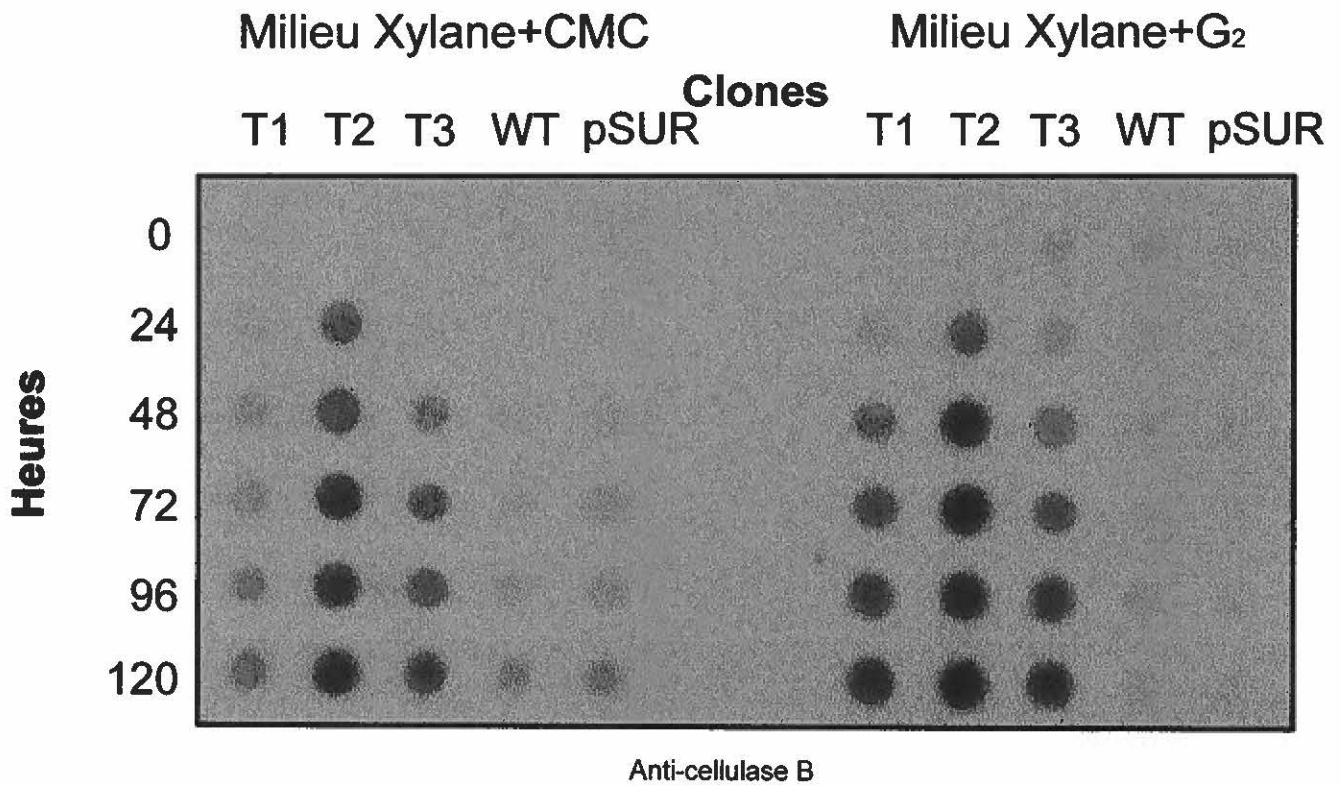
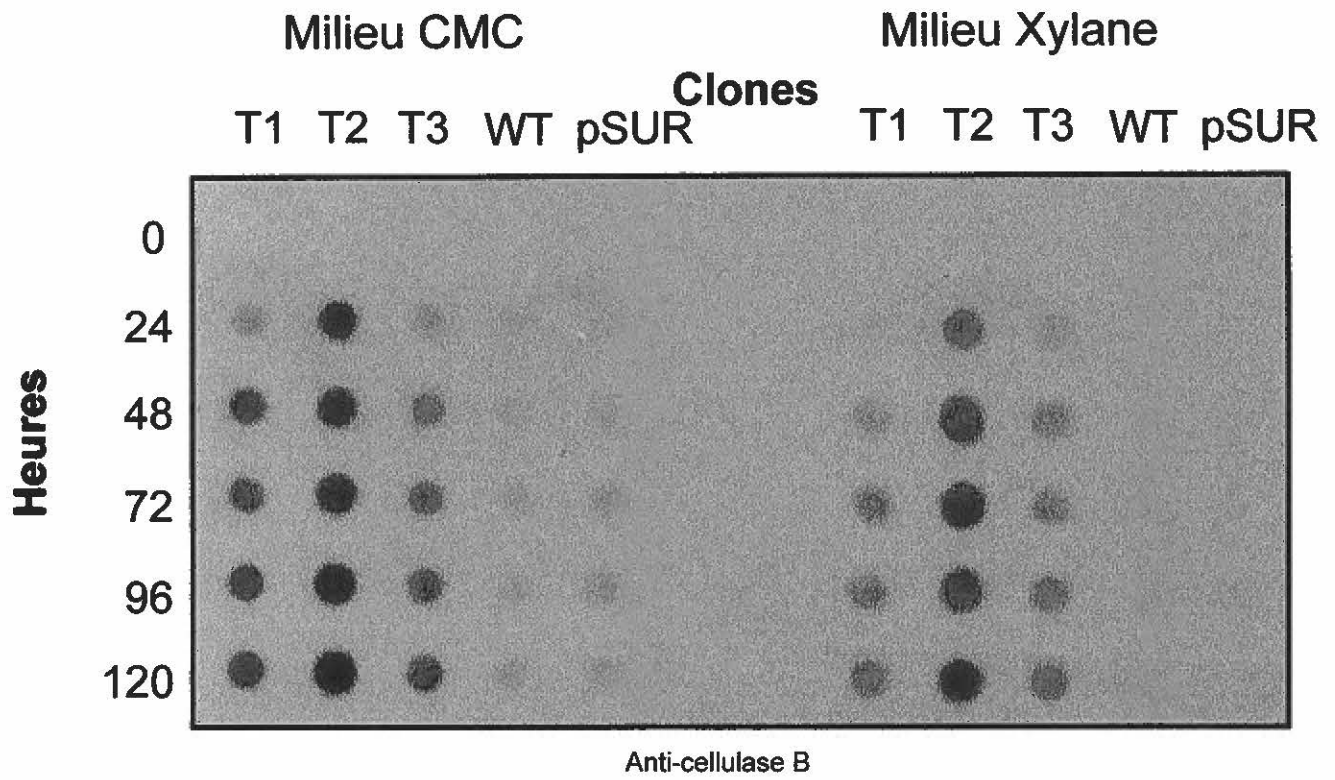




Figure 25: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-cellulase A.

(T1) mutant pour le premier codon TTA,

(T2) double mutant,

(T3) mutant pour le deuxième codon TTA,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.

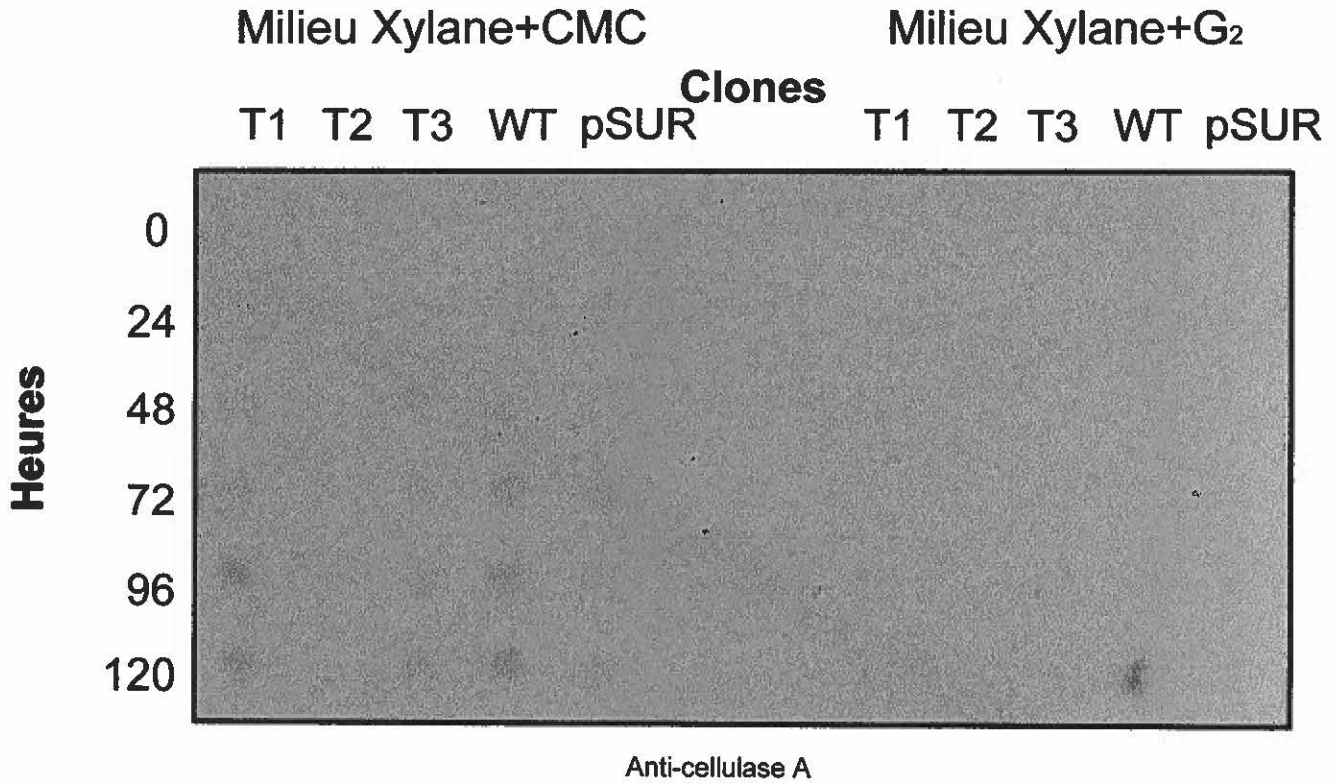
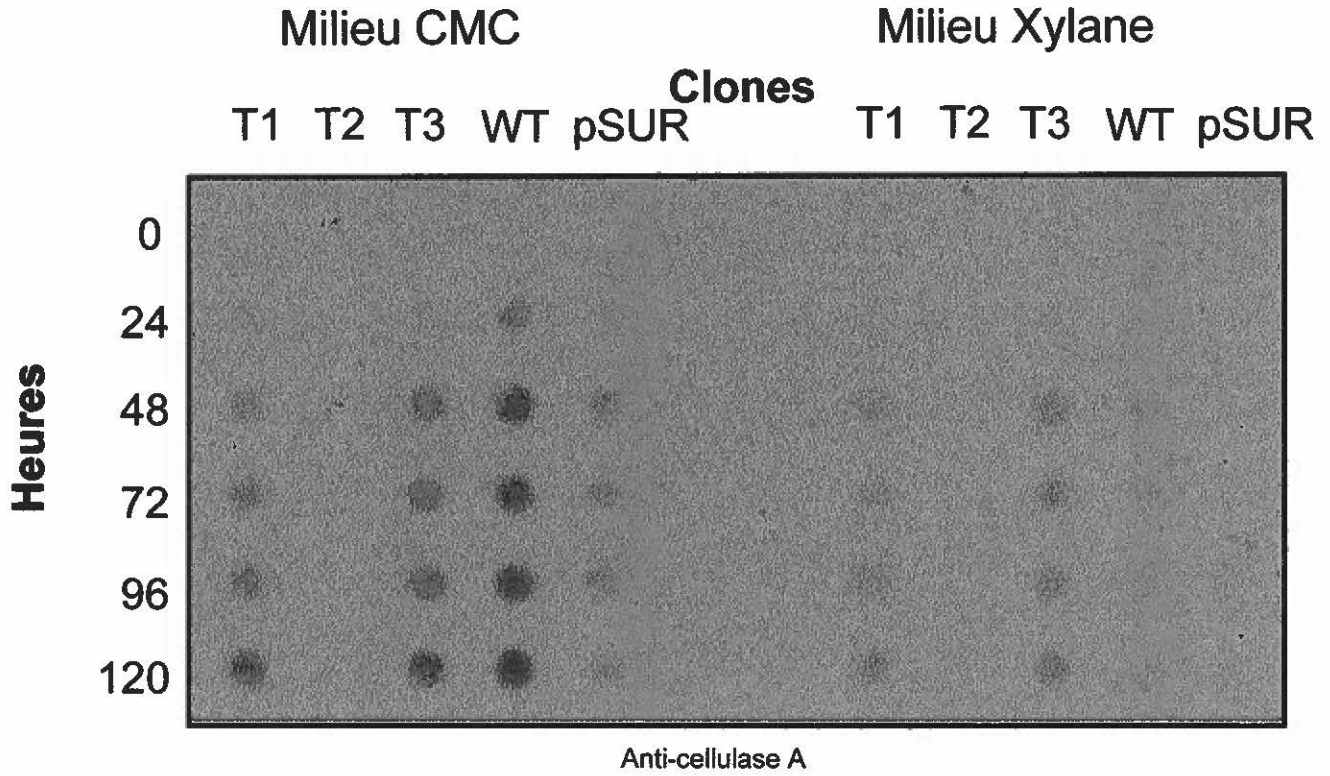


Figure 26: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase A.

(T1) mutant pour le premier codon TTA,

(T2) double mutant,

(T3) mutant pour le deuxième codon TTA,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.

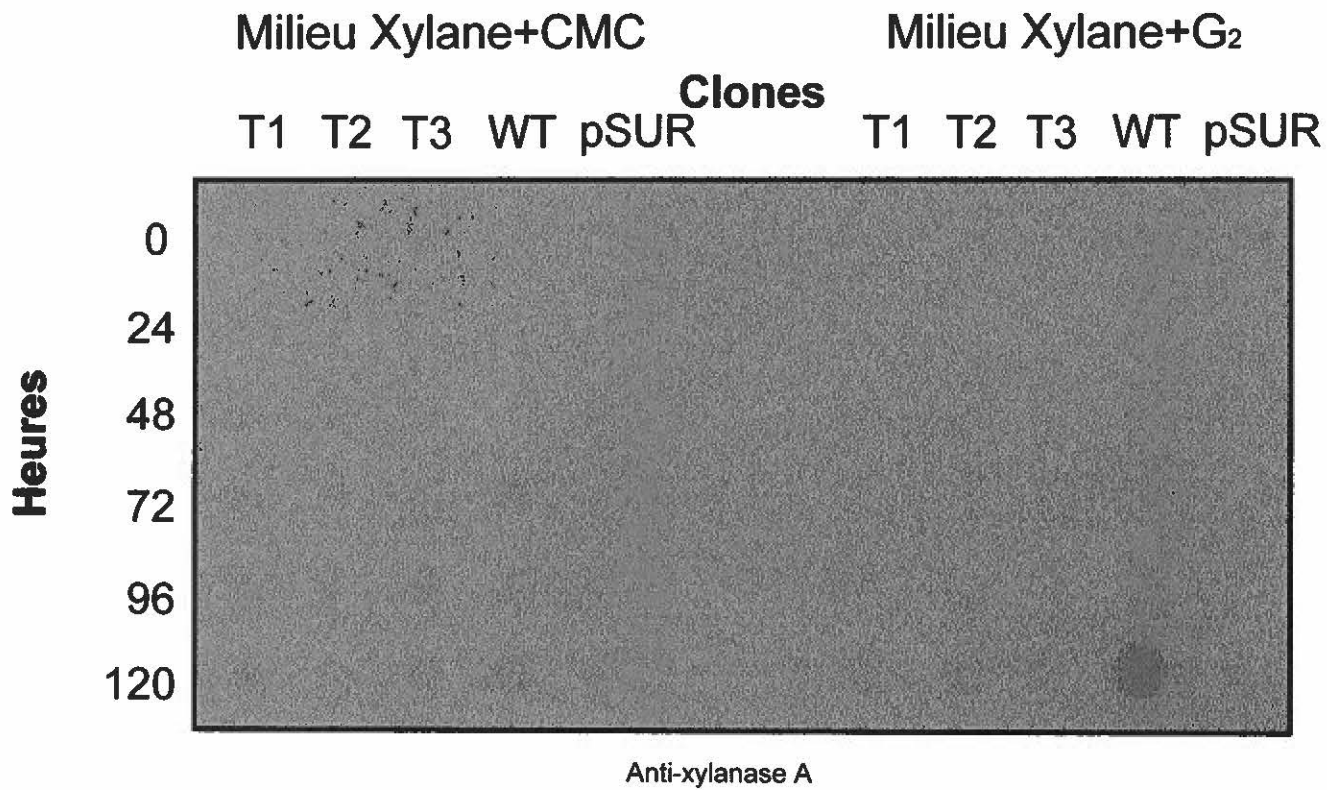
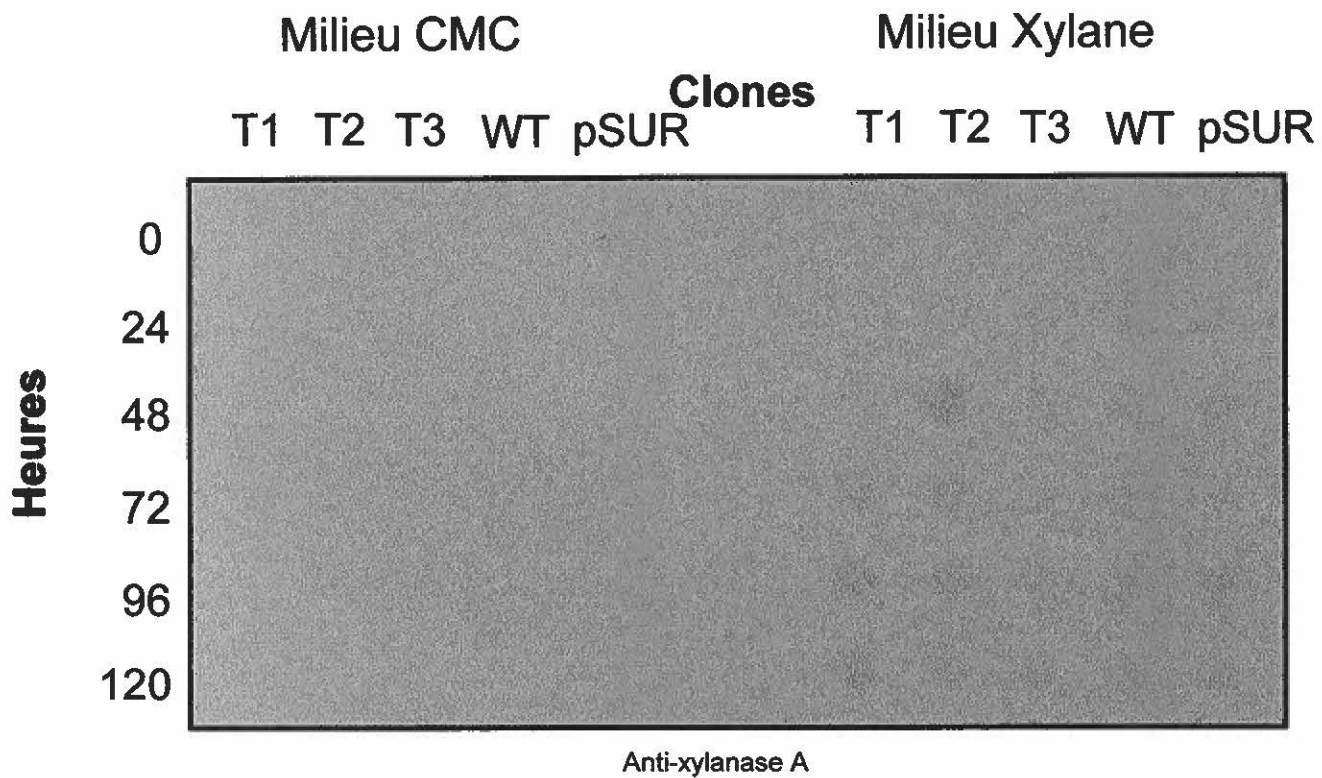


Figure 27: Révélation des immunoempreintes obtenues à partir des surnageants de culture des souches sauvages ou mutées après l'incubation en présence de l'antisérum anti-xylanase B.

(T1) mutant pour le premier codon TTA,

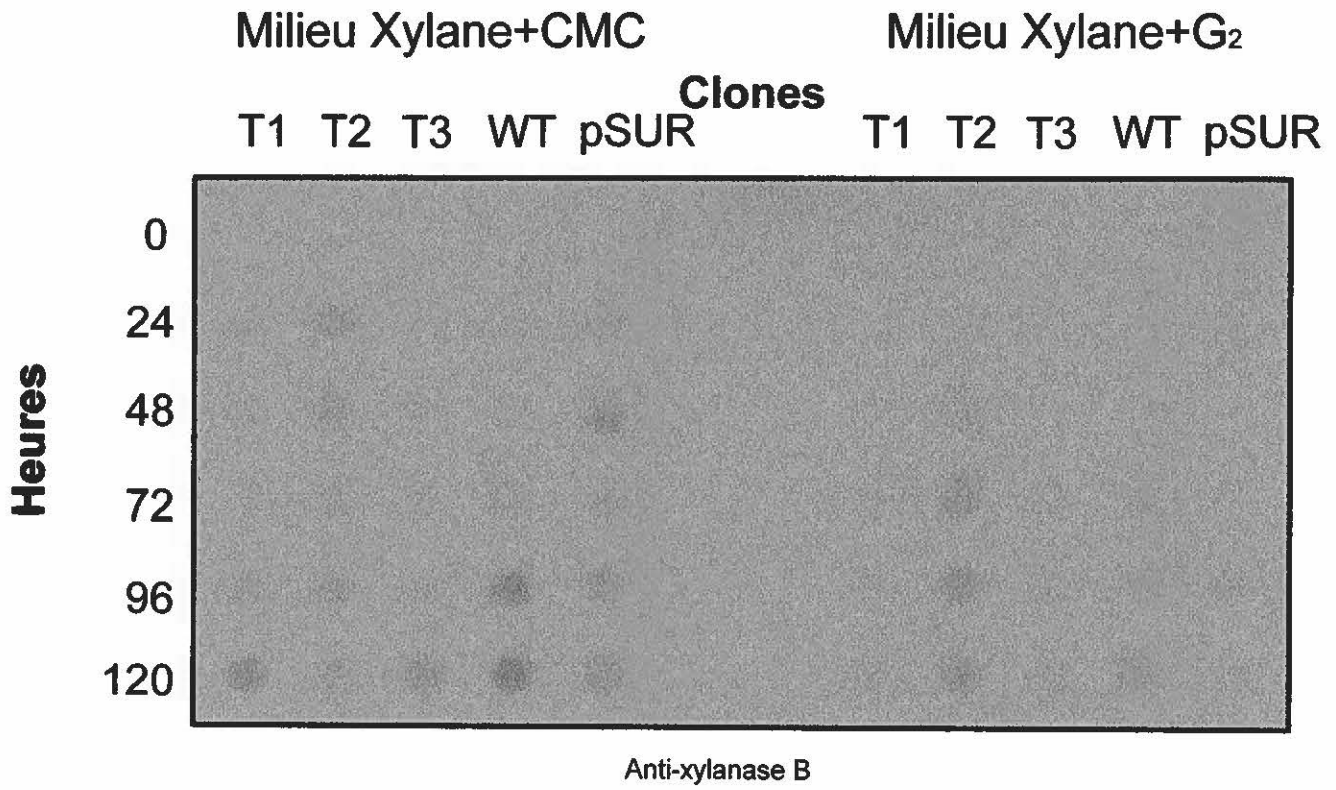
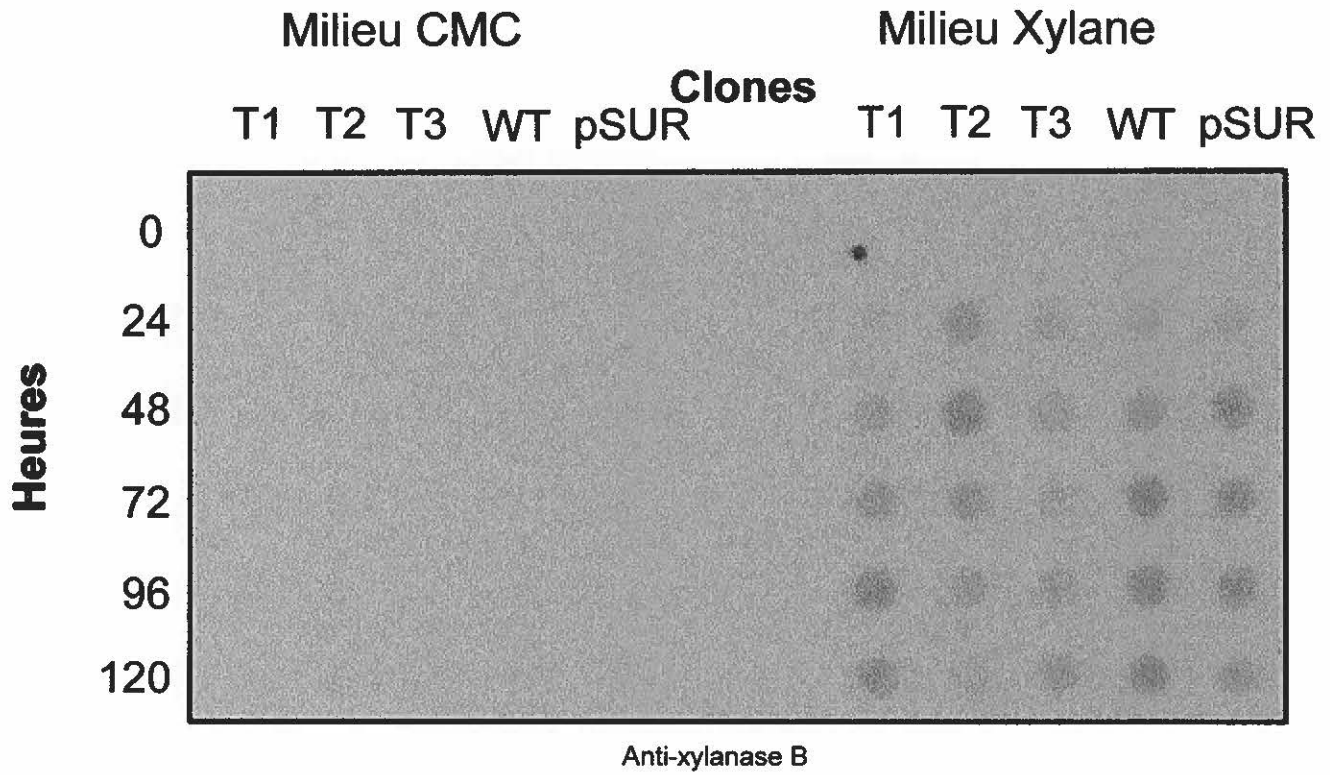
(T2) double mutant,

(T3) mutant pour le deuxième codon TTA,

(WT) gène de cellulase sauvage et

(pSUR) vecteur multicopie pSUR sans gène de cellulase.

Image par balayage.



après 24 heures de croissance. La plus forte expression fut notée en milieu xylane-cellobiose après 48 heures de culture. Par ailleurs, les clones T1 et T3 produisaient considérablement moins de cellulase B que le clone T2, mais beaucoup plus que la bactérie sauvage ou le contrôle possédant seulement la copie génomique. La production de cellulase B par les clones T1 et T3 a démarré dès 24 heures mais faiblement. Enfin le clone porteur du plasmide avec le gène sauvage (WT) et la souche 1326 arborant la copie du gène *celB* chromosomique ne produisaient que des traces d'enzyme dans tous les milieux de cultures utilisés.

La production de cellulase A par les cinq souches (T1, T2, T3, WT, et pSUR) était faible. Toutefois, celle-ci était plus forte en milieu CMC (induction) et presque absente en milieu xylane-cellobiose (suggérant un effet de répression catabolique provoqué par la présence de cellobiose). Contrairement à la production de cellulase B, le clone porteur du vecteur avec le gène sauvage (WT) produisait le plus de cellulase A et le clone T2 le moins et ceci dans tous les milieux. La synthèse de cellulase B par les clones T1 et T3 étaient encore entre les deux extrêmes (Figure 25), soit entre celles produites par T2 et WT.

La production de xylanase A fut faible dans les quatre milieux (Figure 26). Il n'y avait pas de xylanase A produite dans les cultures avec du CMC et presque pas avec le milieu xylane-cellobiose (pas d'induction). En milieu xylane ou xylane-CMC, il y avait production de xylanases dès 48 heures, mais en quantités trop faibles pour déterminer s'il y avait une variation entre ceux-ci. La production de xylanase B par contre était plus forte que celle de la xylanase A (Figure 27). Il y avait ici aussi absence d'expression de xylanase B en milieu CMC et une expression faible et tardive (72 heures) en milieu xylane-cellobiose. En milieu xylane et xylane-CMC, la production s'est faite dès le départ des cultures car il y a accumulation de xylanase B à 24 heures. La production de xylanase B par le clone T2 dans



les cultures en milieux xylane et xylane-CMC semblait plus importante au départ et diminuait par la suite. La meilleure expression de xylanase B à long terme (120 heures) fut produite par le clone WT.

### 1.5.3 *S. lividans* 1326 vs J1725

Des cultures des souches de *S. lividans* 1326 et *S. lividans* J1725 possédant des vecteurs avec les diverses mutations du gène *celB* ont été préparées dans le milieu M14 avec du xylane "oat spelt" comme source de carbone. Des échantillons de ces cultures ont été recueillis après 72 heures d'incubation et les surnageants analysés par électrophorèse sur gels de polyacrylamide-SDS. Un immunobuvardage de type Western a été réalisé à l'aide d'anticorps anti-cellulase B (Figure 28).

Les résultats obtenus ont démontré que les deux souches (*S. lividans* 1326 et J1725) transformées avec les vecteurs contenant les divers gènes mutants, le gène sauvage et le contrôle ont des taux de production similaire. Les souches porteuses du plasmide T2 contenant les deux mutations synthétisent davantage de cellulase B que les autres souches. Les deux simples mutants, T1 et T3 produisaient considérablement moins de cellulase B que les clones T2. Enfin, la synthèse par les souches portant les vecteurs avec le gène *celB* sauvage (WT) ou le vecteur pSUR était presque absente. Par ailleurs, la souche *S. lividans* 1326 transformée avec les vecteurs T1, T2 et T3 semblait produire plus de cellulase B que la souche J1725 porteuse du même plasmide. Dans le cas de la souche J1725, souche *bla* qui est déficiente pour l'ARN<sup>t</sup><sub>UUA</sub>, les deux simples mutants T1 et T3 ont généré de la cellulase B même si les quantités étaient relativement faibles. Dans les deux souches, *S. lividans* 1326 et J1725, il y avait aussi une dégradation importante, par des protéases du surnageant, de l'enzyme mature de 36kDa vers un fragment de 25kDa.



Figure 28: Détection par immunobuvardage de type Western de la production de cellulase B par les divers mutants dans les souches *S. lividans* J1725 (souche *bld*<sup>-</sup>) et 1326. Des aliquots de 10µl des surnageants de culture des souches de streptomycètes transformées avec des vecteurs portant des mutations au niveau des codons TTA du gène *ce/B* ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Les répliques des protéines transférées sur membrane de nylon ont été révélés suite à une incubation en présence d'antisérum anti-cellulase B.

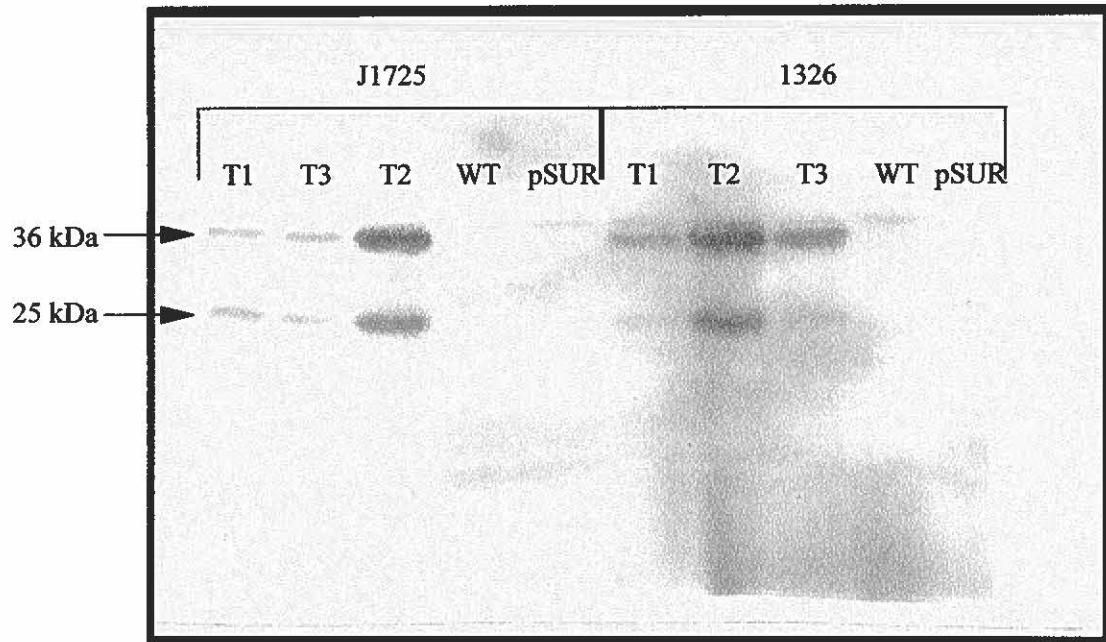
T1 - simple mutant TTA (premier codon TTA)

T2 - double mutant TTA

T3 - simple mutant TTA (deuxième codon TTA)

WT- gène de *ce/B* sur vecteur pSUR

pSUR - vecteur sans gène *ce/B*



## 2.0 Gènes hybrides

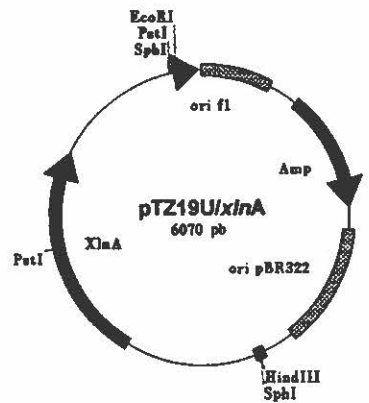
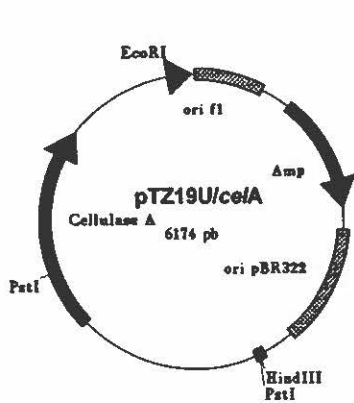
### 2.1 Construction des gènes hybrides

Vu la relative facilité de pouvoir assembler des morceaux de gènes par amplifications partielles et successives, des gènes hybrides *xlnA-celA* et *xlnA-celB* ont été construits afin de vérifier la capacité du promoteur et du peptide signal du gène de la xylanase A à induire la transcription et à la sécrétion d'autres protéines. Une souche normale de *S. lividans* transformée par le gène *xlnA* cloné dans un vecteur à copies multiples produit beaucoup de xylanases (Kluepfel *et al.*, 1986) et dispose donc d'un système de régulation permettant une sécrétion puissante. L'usage du promoteur, site de fixation des ribosomes et peptide signal de *xlnA* devrait permettre la production de beaucoup de protéines (cellulases dans ce cas). On peut aussi en même temps court-circuiter le promoteur et un fragment du gène responsable de la synthèse de cellulase et les restrictions imposés par les codons rares.

#### 2.1.1 Hybride xylanase A-cellulase A

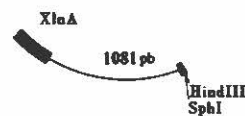
Le gène hybride *xlnA-celA* a été assemblé, tel que décrit à la Figure 29. Avec les amorces RP (sens) et CA-XC (anti-sens), la région promotrice, le site de fixation des ribosomes et la séquence qui code le peptide signal de la xylanase A (vecteur pTZ19U/*xlnA*) de *S. lividans* ont été amplifiés (1081 pb). Les amorces CA-PC (anti-sens) et CA-XN (sens) ont servi à amplifier un fragment du gène de la cellulase A (vecteur pTZ19U/*celA*) du peptide signal jusqu'à quelques nucléotides au delà du site de restriction *PstI* (428 bps). Les amorces CA-XC et CAXN sont complémentaires et comporte 16 nucléotides à leur extrémité 3' qui permettent l'hybridation à l'un ou l'autre des gènes matriciels. Une deuxième amplification a été faite avec les amorces RP et CA-PC pour produire un fragment de 1473

Figure 29: Stratégie utilisée pour la construction du gène hybride *xlnA-celA*. Ce gène comporte le promoteur, site de fixation des ribosomes, séquence codant le peptide signal du gène *xlnA* et la séquence codant la protéine mature de *celA*.



-Amplification avec amorces CA-PC et CA-XN

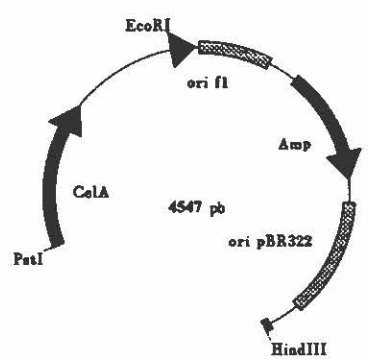
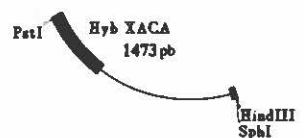
-Amplification avec amorces RP et CA-XC



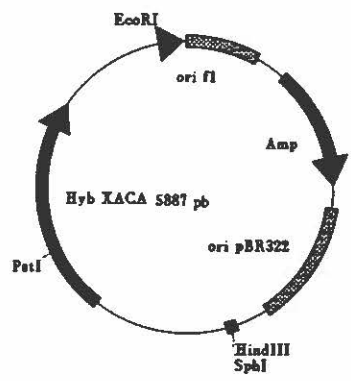
-Digestion HindIII et PstI

-Amplification avec amorces RP et CA-PC

-Purification du fragment HindIII et PstI de 4.5 kpb



-Clonage PstI et HindIII dans le vecteur pTZ19U/celA



pb. Ce fragment a été reclone au niveau de la région déterminée par les sites *HindIII-PstI* dans le vecteur pTZ19U/*celA* pour ainsi reconstruire le gène hybride.

### 2.1.2 Hybride xylanase A cellulase B

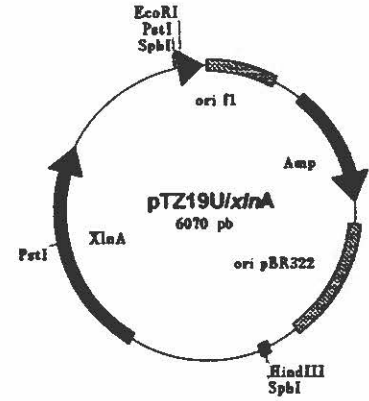
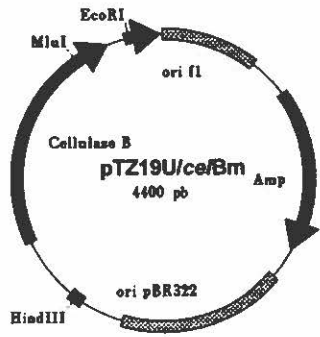
Le gène hybride *xlnA-celB* a été construit tel que décrit à la Figure 30. Les amorces RP (sens) et CB-XC (anti-sens) ont servi à amplifier, à partir du vecteur pTZ19U/*xlnA*, la région promotrice, le site de fixation des ribosomes et le peptide signal de la xylanase A (1081 pb). Les amorces CB-MC (anti-sens) et CB-XN (sens) ont servi à amplifier, à partir du vecteur pTZ19U/*celBm*, la région correspondant au gène de la cellulase B allant du peptide signal jusqu'à quelques nucléotides au delà du site *MluI* (885 pb). La deuxième amplification a été faite avec les amorces CB-MC et RP pour amplifier tout le fragment hybride (1930 pb). Celui-ci a été reclone au niveau des sites *HindIII-MluI* dans le vecteur pTZ19U/*celBm* complétant ainsi le gène hybride.

## 2.2. Clonage avec le fragment de 3.7kb de pSUR

Le fragment de 3.7kb comportant le gène de la résistance à la thiostreptone et une origine de répllication de streptomycètes a été introduit dans les deux vecteurs contenant les gènes hybrides pTZ19U/Hyb XACA (*xlnA-celA*) et pTZ19U/Hyb XACB (*xlnA-celB*) tel que décrit aux Figures 31 et 32. Les plasmides des transformants résistant à l'ampicilline ont été extraits et criblés pour déterminer l'orientation de l'insert par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* et migration sur gel d'agarose.

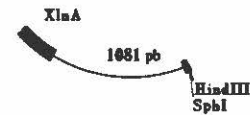
Pour l'hybride pSUR/XACA ayant le gène de la résistance à la thiostreptone et le gène hybride dans la même orientation, la digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI*

Figure 30: Stratégie utilisée pour la construction du gène hybride *xlnA-ceIB*. Ce gène comporte le promoteur, site de fixation des ribosomes, séquence codant le peptide signal du gène *xlnA* et la séquence codant la protéine mature de *ceIB*



-Amplification avec amorces  
CB-Mc et CB-XN

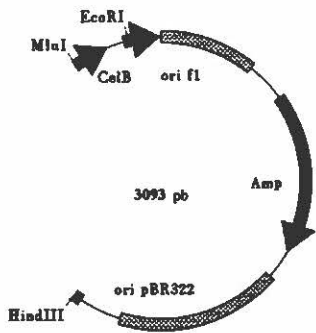
-Amplification avec amorces  
RP et CB-XC



-Digestion HindIII et MluI

-Purification du fragment  
HindIII et MluI de 3.1 kpb

-Amplification avec amorces  
RP et CB-MC



-Clonage MluI et HindIII dans  
le vecteur pTZ19U/celB

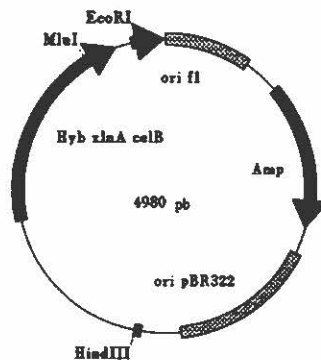
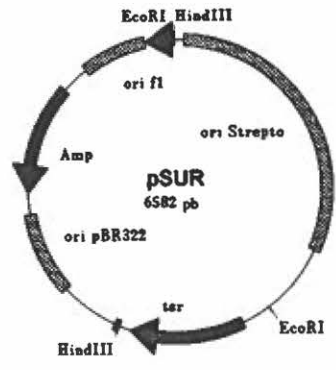
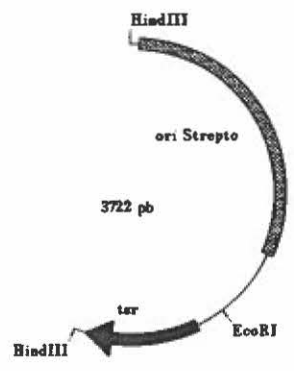
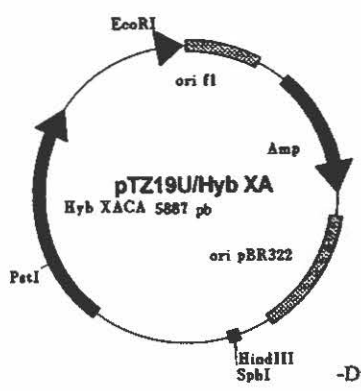




Figure 31: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de répllication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/Hyb XA.

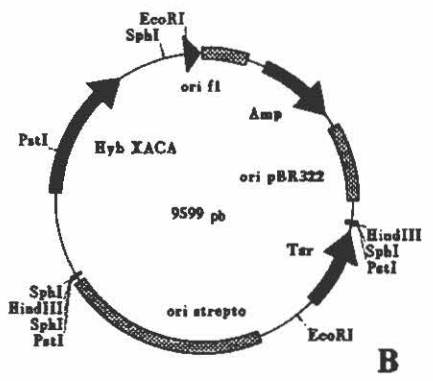
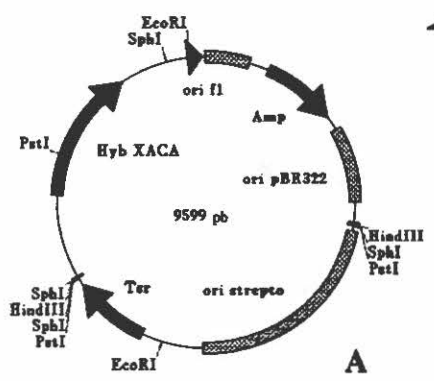


-Digestion  
*HindIII*  
-Purification du fragment  
*HindIII* de 3.7 kpb

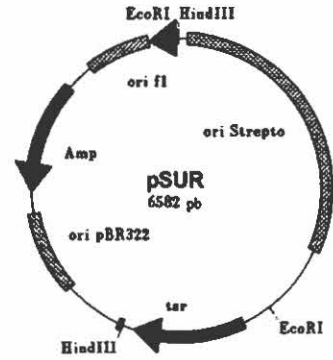


-Digestion *HindIII*

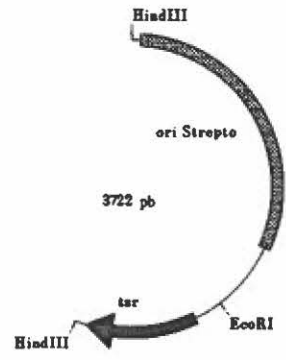
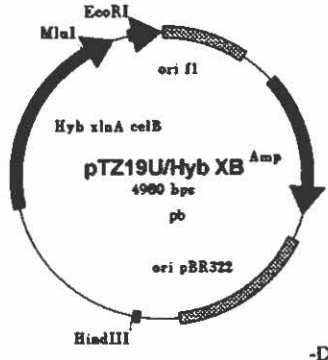
-Ligation  
-Transformation dans  
*E.coli* DH11S



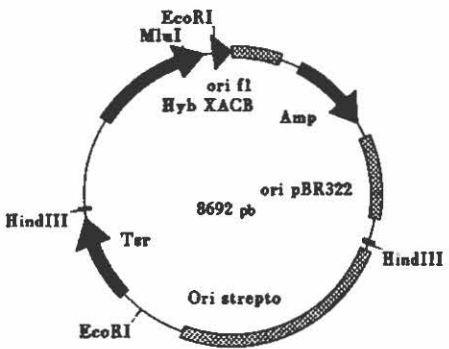
**Figure 32: Stratégie de clonage pour incorporer la résistance à la thiostreptone et l'origine de réplication de streptomycètes au vecteur pTZ19U/Hyb XB.**



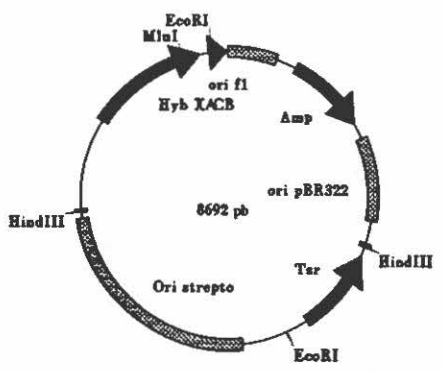
-Digestion  
*Hind*III  
-Purification du fragment  
*Hind*III de 3.7 kpb



-Digestion *Hind*III  
-Ligation  
-Transformation dans  
*E. coli* DH11S



A



B

donnait des fragments de 4171 et 5428 pb (orientation A). L'hybride pSUR/XACA avec les deux gènes en sens inverse (orientation B) donnait des fragments de 3922 et 5677 pb.

L'hybride pSUR/XACB ayant le gène de la résistance à la thiostreptone et le gène hybride dans la même orientation, donnait des fragments de 3264 et 5428 pb lorsque digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI*. La digestion du plasmide portant les deux gènes dans l'orientation inverse donnait des fragments de 4770 et 3922 pb.

Les vecteurs pSUR/Hyb XACA et pSUR/Hyb XACB avec les orientations B ont été clonés dans la souche *S. lividans* 1326.

### 2.3 Expression des cellulases

La production de cellulase par les souches transformées à l'aide des vecteurs porteurs des gènes hybrides a été dosée dans le milieu de culture (M14 contenant 1% de xylane "oat spelt" comme source de carbone). Des cultures des divers mutants du gène *celA* (M, K, MK et WT) et *celB* (T1, T2, T3 et WT) ont aussi été réalisées parallèlement et leur production de cellulase comparée à celle produite par les cellules transformées avec les gènes hybrides. La détection de l'enzyme a été faite par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps anti-cellulase A ou anti-cellulase B, et on a également procédé au dosage des protéines et de l'activité enzymatique (Figures 33 et 34).

Les cellules porteuses des mutants M, K et MK du gène *celA*, celles possédant le gène sauvage (WT) et celles transformées par le plasmide pSUR (Figure 33) produisaient des quantités de cellulase A similaires à celles obtenues lors des expériences précédentes décrites à la section 1.5.1. Par ailleurs le clone XA possédant le gène hybride *xlnA-celA* sécrétait approximativement 80% plus de cellulase que le clone possédant le gène sauvage, et 60% de

Figure 33: Détection par immunobuvardage de la cellulase A, et dosages protéiques et de l'activité enzymatique des surnageants de culture de *S. lividans* 1326 transformées avec les vecteurs contenant les gènes *celA* mutés et modifiés.

(a) immunobuvardage des protéines révélées par l'antisérum anti-cellulase A à partir des aliquots de 10 $\mu$ l de surnageants de culture prélevés après 72 hrs.

(b) histogramme représentant la quantité de protéines, ainsi que l'activité enzymatique de cellulase A révélée à partir des surnageants de culture.

Légende:

M; mutant pour la méthionine de départ,

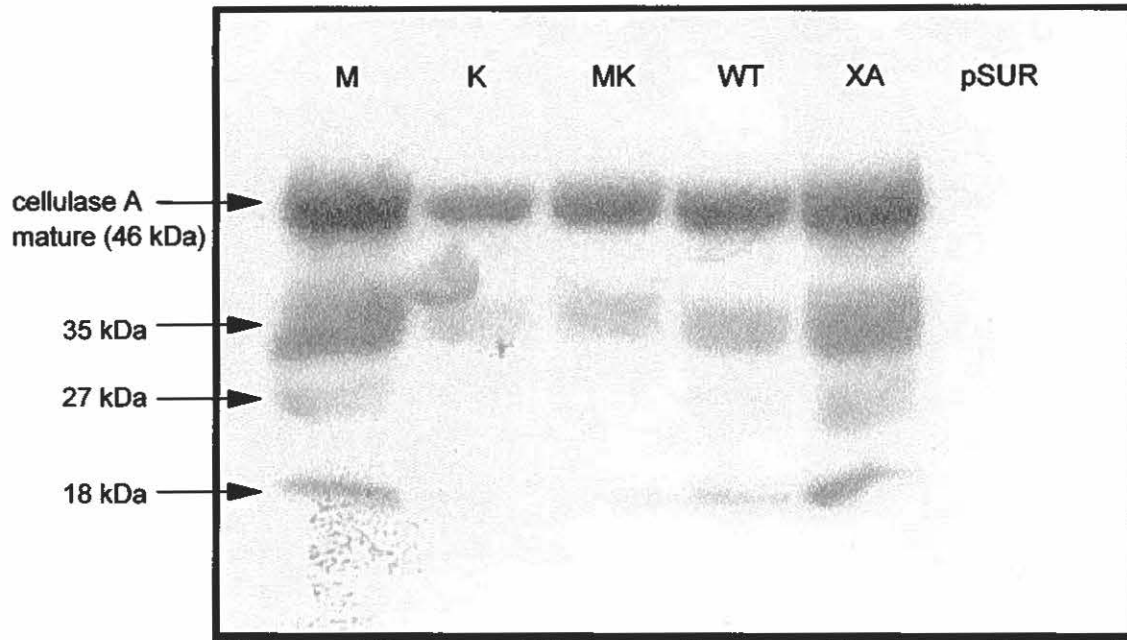
K; mutant lysine,

MK; double mutant ,

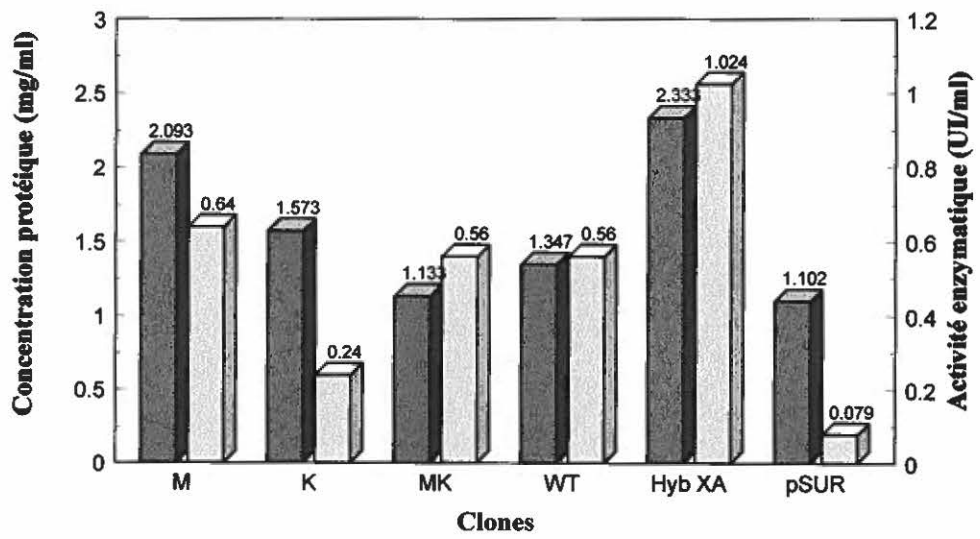
WT; gène sauvage,

Hyb XA; Hybride *xlnA-celA* et

pSUR; vecteur pSUR sans gène de cellulase



a



b

Figure 34: Détection par immunobuvardage de la cellulase B, et dosages protéiques et de l'activité enzymatique des surnageants de culture de *S. lividans* 1326 transformées avec les vecteurs contenant les gènes *celB* mutés et modifiés.

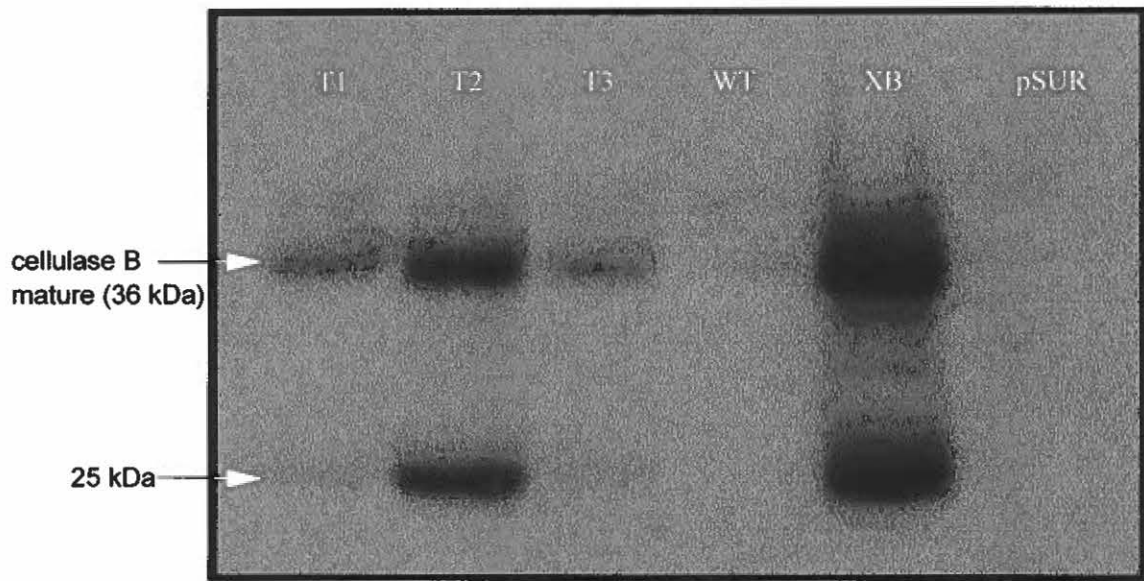
(a) immunobuvardage des protéines révélées par l'antisérum anti-cellulase B à partir des aliquots de 10 $\mu$ l de surnageants de culture prélevés après 72 hrs.

(b) histogramme représentant la quantité de protéines, ainsi que l'activité enzymatique de cellulase B révélée à partir des surnageants de culture.

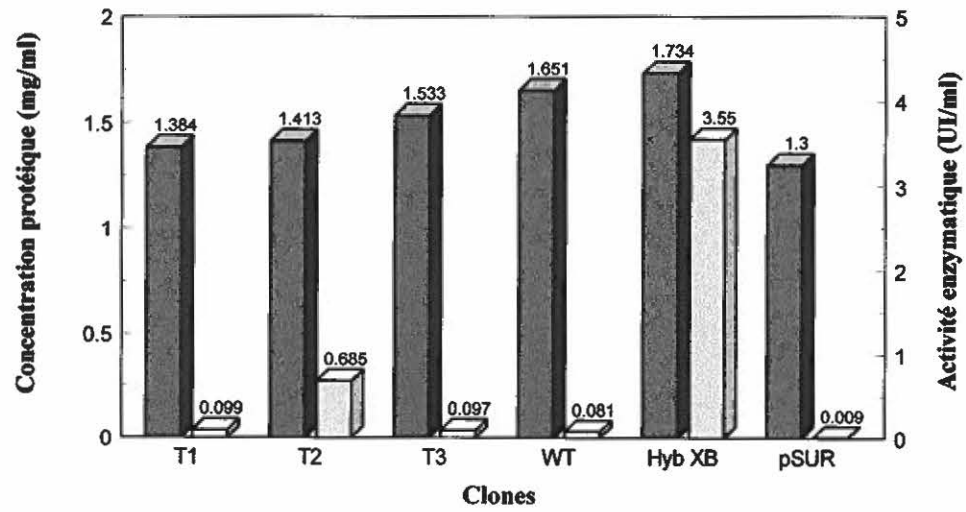
Légende:

T1; mutant pour le premier codon TTA,  
T2; double mutant,  
T3; mutant pour le deuxième codon TTA,  
WT; gène sauvage,  
Hyb XB; Hybride *xlnA-celB* et  
pSUR; vecteur pSUR sans gène de cellulase.





a



b

plus que le clone possédant la mutation pour la méthionine de départ (mutant M). Le dosage protéique des surnageants a révélé qu'il y avait aussi une augmentation de 75% de la sécrétion protéique par le clone contenant le gène hybride par rapport au clone possédant le gène sauvage.

La production de cellulase B par les mutants du gène *celB* ( T1, T2 et T3), par la souche sauvage (WT) et par le contrôle (pSUR) (Figure 34) était aussi similaire aux taux synthétisés lors des expériences précédentes décrites à la section 1.5.2. Par contre, la production de cellulase par le mutant T2 était 8.5 fois supérieure à celle de la souche sauvage (WT). Enfin le clone porteur du gène hybride XB en produisait beaucoup plus. D'après les dosages enzymatiques, cette quantité était approximativement 45 fois supérieure à celle produite par le clone porteur du le gène *celB* sauvage. De plus, la concentration protéique du surnageant n'avait augmenté que de 5%. Le rendement était donc nettement supérieur à celui des autres clones.

## **Discussion**

### Mutagenèse du gène *celB* par amplification élective à l'aide de la polymérase

Les essais pour muter le premier codon TTA du gène *celB* par amplification élective à la polymérase se sont déroulés sans problème majeur. Par contre, la mutagenèse du deuxième codon TTA ayant permis d'obtenir les mutants T2 et T3, n'a pas été sans difficulté (Figure 11b). Lors des essais d'amplification pour l'obtention des sous fragments des mutants T2 et T3, il y avait possiblement augmentation de la longueur d'une structure secondaire de l'ADN (Figures 35b et 35c). Initialement, cette structure comprenait un appariement de 14 nucléotides sur 17 qui passe à 19 sur 23 après la première étape d'amplification. L'emplacement de cette épingle se trouve à l'extrémité du sous fragment qui doit par la suite s'hybrider à l'autre sous fragment (Figures 9 et 35d). Il est possible que cette structure secondaire importante de l'ADN, ait inhibé l'hybridation des deux sous fragments ainsi que l'élongation de l'ADN par la polymérase, expliquant les difficultés rencontrées lors des expériences de la mutagenèse.

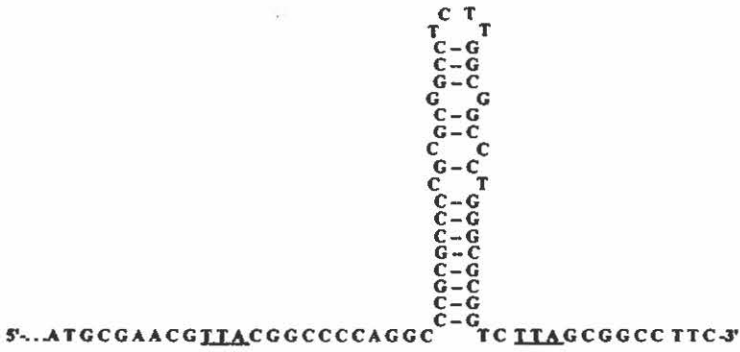
L'amplification a été réussie avec l'ajout de la protéine du gène 32 et l'utilisation du tampon "Taq Enhancer Solution" de la compagnie Stratagene. La protéine du gène 32 est normalement utilisée pour aider la T4 ou T7 ADN polymérase à traverser des structures secondaires importantes (Huberman *et al.*, 1971). La compagnie Stratagene qui distribue le tampon "Taq Enhancer Solution" décrit le produit comme une solution contenant une faible concentration de *Pfu* ADN polymérase comme ingrédient principal. La compagnie ne fait aucune mention de la composition de la solution dans laquelle l'enzyme est dissoute.

L'ajout de la protéine du gène 32 ou du tampon "Taq Enhancer Solution" individuellement a augmenté le rendement de la réaction d'amplification quelque peu, mais l'ajout simultanée des deux produits à la réaction donna un résultat similaire à la réaction de

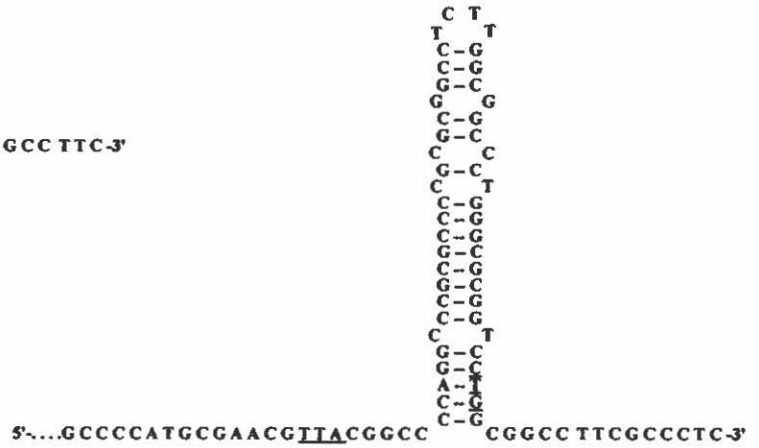
Figure 35: Structures secondaires possibles de l'ADN du gène *ceiB* lors des étapes de mutagenèse dirigée. (a) Séquence partielle du gène *ceiB* (b) Épingle à cheveu dans la région du deuxième codon TTA. (c) Épingle à cheveu produite suite à la première étape d'amplification pour changer ce codon. (d) hybridation entre les deux sous fragments pour permettre la deuxième étape d'amplification.

5'-...ATG CGA ACG IIA CGG CCC CAG GCC CGC GCC CCG CGC GGC CTC  
M R T L R P Q A R A P R G L  
TTG GCG GCC CTG GGC GCG GTC IIA GCG GCC TTC GCC CTC GTC.....3'  
L A A L G A V L A A F A L V

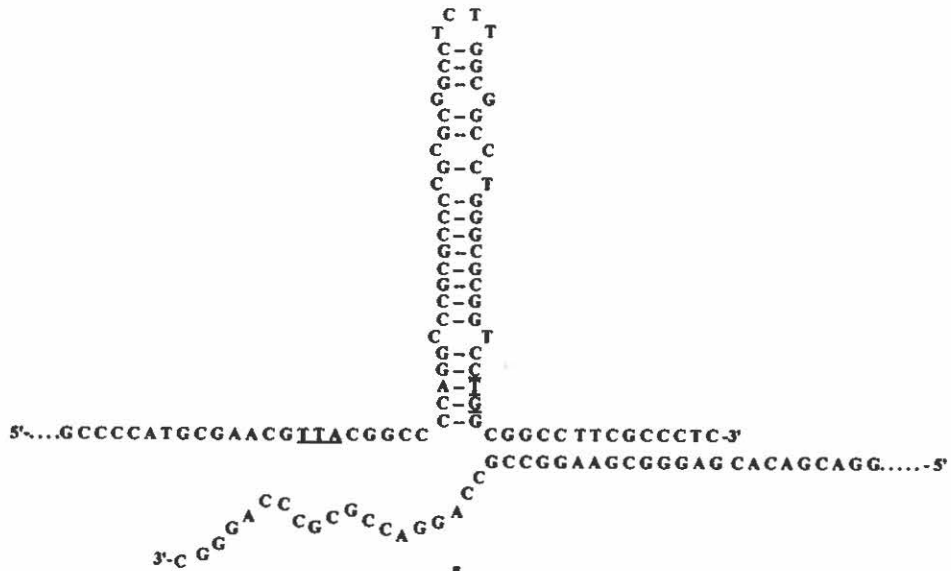
a



b



c



d

contrôle (Figure 12). Dans le cas de la réaction d'amplification devant permettre la mutation du deuxième codon TTA (mutants T2 et T3), l'étape déterminante était probablement la dénaturation de l'énorme structure secondaire (Figure 35c), au moins au départ de la réaction pour permettre l'hybridation des deux fragments et générer quelques fragments complets. Une fois cette étape franchie, l'amplification pouvait probablement se poursuivre de façon normale.

### **Mutagenèse du gène *celA* par amplification élective à l'aide de la polymérase**

Les difficultés encourues lors des essais d'amplification avec les amorces CA-HN et CA-MC de la région en amont de la mutation sont intéressantes. Les fragments amplifiés par les amorces CA-MC, CA-KC ou CA-MKC et CA-HN (région en amont du gène *celA*) avait une dimension de 650 pb au lieu des 390 pb tel qu'attendu. Comme les essais de PCR entre CA-HN et CA-PC n'ont pas permis d'amplification du gène *celA*, et sachant que l'amorce CA-PC hybride bien dans les produits obtenus des autres amplifications, il semblerait que l'amorce CA-HN n'ait pas hybridé. Les produits d'amplification obtenus avec les amorces RP et CA-MC, CA-KC ou CA-MKC étaient nets, donc les amorces hybridaient au site de mutation voulue. Si l'amplification du sous fragment en amont du gène débute au site que l'on veut muter, la deuxième amorce devait s'hybrider dans la région non séquencée. Il est donc probable que la production d'un fragment de 650 pb soit le produit d'une amplification non sélective amorcée aux deux extrémités par l'amorce CA-MC (ou CA-KC, CAMKC). Il y aurait donc un site propice à l'hybridation des amorces CA-M, CA-K et CA-MK dans cette région non séquencée. Ceci pourrait expliquer la difficulté lors de la mutagenèse par la méthode de simple brin polyuracile et la présence de faux positifs. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait séquencer la région inconnue en amont du gène *celA*.

## Méthodes de mutagenèse

Des trois méthodes de mutagenèse utilisées lors de ces travaux, la méthode la plus efficace fut celle par amplification élective à l'aide de la polymérase (PCR). La plupart des protocoles de mutagenèse fonctionnent quelque fois de façon aléatoire et on ne peut, préalablement déterminer le taux de succès. Les problèmes encourus en cours d'expérimentation avec la méthode de Kunkel (1987) et par celle de Deng et Nickoloff (1992) sont souvent inconnus et difficilement corrigibles. La solution est souvent la répétition de toute l'expérience de mutagenèse en modifiant quelques paramètres chaque fois, ce qui peut prendre un temps considérable.

La mutagenèse par PCR permet de suivre l'efficacité des réactions à chaque étape et de modifier si nécessaire le protocole. La méthode est versatile et peut être utilisée pour produire toute sorte de constructions, tel que des gènes hybrides (Horton *et al.* 1989), des délétions dans les gènes, l'ajout de séquences de terminaison ou de sites de restriction. Par contre, cette méthode nécessite beaucoup plus de matériel et d'équipement que les autres méthodes et peut par conséquent être plus dispendieuse.

### Triplet d'initiation TTG du gène *celA*

Le remplacement du codon TTG, qui code pour la méthionine de départ dans le gène *celA*, par un ATG (codon typique pour le départ de la traduction) a permis une augmentation nettement supérieure de la production de cellulase A comparativement à celle produite par le gène sauvage (Figure 20 et 33). Le dosage de l'activité enzymatique des surnageants de culture (Figure 33) n'a montré toutefois qu'une augmentation d'environ 15% par rapport à la souche sauvage. Cette variation est probablement due à la dégradation de



l'enzyme dans le surnageant par des protéases car il y a une augmentation de 55% de la synthèse protéique entre les clones M et WT (Figure 33). Dans la même figure, la dégradation marquée de la cellulase A est nettement visible étant donné la présence de plusieurs bandes de masse inférieure à celle de la protéine native de 46 kDa.

Considérant la rareté de l'usage du codon TTG pour l'initiation de la traduction (1.3%), on s'attendrait à ce qu'il y ait une faible production de l'enzyme ou que son usage soit impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes. L'échange du codon TTG par le codon ATG, utilisé à 68% pour l'initiation de la traduction, n'a pas donné d'augmentation considérable qu'espérée et il semblerait que l'initiation de la traduction se fasse relativement bien par le codon TTG en dépit du problème de positionnement de l'ARN<sub>t</sub>, proposé par Kuchino *et al.* (1982). Étant donné la faible augmentation de synthèse de cellulase A observée suite à la mutagenèse de ce codon rare, et vu la diversité des protéines ayant un triplet TTG comme premier codon (Figure 3), il est peu probable que l'usage du TTG comme codon de départ de la traduction soit un système de régulation spécifique.

#### **Modification du codon AAA du gène *celA***

La mutation du codon AAA du gène *celA* en un codon AAG a eu pour effet de diminuer la production de cellulase A d'approximativement 50% (Figures 20 et 33). Chez les streptomycètes, la lysine est codée par un codon AAG dans 95% des cas et par un codon AAA dans seulement 5% des cas. Vu l'énorme écart entre ces deux pourcentages, on s'attendrait à ce que le haut taux d'usage du codon AAG soit le reflet d'une condition ou d'un mode de régulation quelconque dans la cellule. D'après les résultats, l'usage du triplet AAA serait légèrement plus favorable que l'usage du triplet AAG, possiblement dû à une

abondance d'ARN<sub>t</sub><sub>AAA</sub> et une plus faible compétition par les ARN<sub>i</sub> des gènes pour ceux-ci. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ueda *et al.* (1993) qui ont rapporté une diminution de la production de la protéine *ssi* (inhibiteur subtilisin dans les streptomycètes) comme résultat d'une expérience similaire. Ils en ont conclu que le codon AAA n'était pas impliqué dans la régulation génétique chez les streptomycètes.

### **Modification des codons TTG-AAA en ATG-AAG du gène *celA***

Le changement de deux codons rares du gène *celA* a résulté en un taux de production de cellulase A à un niveau presque identique à celui du gène sauvage (Figures 20 et 33). Curieusement, le changement du codon TTG a résulté en une augmentation de la synthèse de cellulase A, l'échange du deuxième codon a causé une diminution, et les deux modifications simultanées ont conduit à la synthèse d'une quantité approximativement équivalente à celle du gène sauvage. Normalement, on s'attendrait à un rendement, de la part du double mutant, inférieur ou équivalent à celui produit par le simple mutant le moins performant, car une production linéaire est aussi rapide que son élément le plus faible.

Une explication possible du taux de production inattendue par le double mutant serait qu'en conditions normales, la production de cellulase A à partir du gène sauvage est ralentie au niveau de l'initiation de la traduction de l'ARN<sub>m</sub> comportant le codon TTG. Suite à la mutagenèse du codon AAA en AAG, la traduction du gène *celA* subirait un deuxième ralentissement causé par la présence relativement faible d'ARN<sub>t</sub><sub>AAG</sub> car les deux codons rares sont adjacents l'un à l'autre. L'élimination du premier facteur ralentisseur (départ de la traduction) est produit dans le double mutant et le facteur limitant devient maintenant la traduction du codon AAG. Il y aurait donc un élément causant le ralentissement de la

traduction dans le double mutant et dans le gène sauvage, deux de ces éléments dans le mutant K et aucun dans le mutant M.

### **Effet du changement des codons TTA du gène *celB***

Une augmentation importante de la production de cellulase B a été observée suite à la mutagenèse dirigée des codons TTA du gène *celB* (Figure 25). Le remplacement d'un des deux codons TTA (mutants T1 et T3) a résulté en une augmentation appréciable de la synthèse de cellulase B. Le remplacement des deux codons rares (mutant T2) du gène *celB* conduit à une très forte production de cellulase B. L'initiation de la production de l'enzyme par les trois mutants était très précoce car l'enzyme était détectée dès 24 heures après le début de cultures. Telle que décrit auparavant, la production de cellulase B par le gène sauvage (WT) porté sur un plasmide à copies multiples (Wittmann *et al.*, 1994) et par la souche possédant l'unique copie chromosomique (pSUR) est extrêmement faible.

La faible production de cellulase par le gène sauvage confirme l'hypothèse de régulation stricte imposé par *bldA* tel que décrit par Leskiw *et al.* (1993). Les deux simples mutants T1 et T3, malgré la présence d'un codon UUA ont produit quand même une bonne quantité de cellulase B tout en étant partiellement dépendant de *bldA*. Il y a probablement un appariement imparfait avec un autre ARN<sub>t</sub><sub>LEU</sub> qui influence la production de cet enzyme (Leskiw *et al.*, 1991a).

La surproduction de cellulase B par les trois mutants semble affecter la production de cellulase A car plus il y a de cellulase B, moins il y a de cellulase A (Figures 24 et 25). La souche portant le gène sauvage (WT) produisant très peu de cellulase B, synthétise le plus de cellulase A. Les deux simples mutants T1 et T3 qui ont produit un peu plus de cellulase B, synthétisaient un peu moins de cellulase A que dans le cas de la souche porteuse du gène

sauvage. Finalement, le double mutant a produit beaucoup de cellulase B et peu (ou presque pas) de cellulase A. Cette diminution n'a pas semblé affecter la synthèse des xylanases, car il n'y avait pas d'énormes fluctuations dans la production de xylanase A ou de xylanase B entre les divers clones (Figures 26 et 27). Ces résultats suggèrent que les systèmes de régulation et de sécrétion des deux cellulases sont reliés et qu'il y a un niveau de saturation du système. L'analyse du mutant T2 quant à la production de cellulase A et xylanase A et B suggère que la biosynthèse de cellulase B monopolise tout le système de sécrétion.

### **L'effet de la source de carbone sur la production de xylanases et de cellulases**

Comme l'habitat naturel des streptomycètes est un milieu riche en matériel lignocellulosique, il est normal que les enzymes nécessaires à la dégradation de ce substrat soient bien régulées. La source de carbone joue donc un rôle crucial dans la production de xylanases et cellulases.

Les résultats obtenus ont démontré que la biosynthèse des xylanases est absente en milieu CMC (Figures 22, 23, 26 et 27), ceci serait due à la dégradation du carboxyméthylcellulose par les cellulases en cellobiose et au fait que le cellobiose n'induit pas la biosynthèse de xylanases (Kluepfel *et al.*, 1987). Dans les trois milieux contenant du xylane, les xylanases étaient sécrétées, mais pas en quantités équivalentes. En milieu xylane, les xylanases apparaissaient après 24 hrs de culture et en quantités relativement abondantes (Figures 22 et 23). Cette synthèse est normale car les oligoxylosides, produits de la dégradation du xylane, induisent la production de xylanases (Arhin *et al.*, 1994).

En milieu xylane-cellobiose, la synthèse de xylanases était faible et ne débutait qu'après 48 hrs de culture. Le cellobiose qui est plus facilement assimilable par la cellule serait absorbé en premier lors de la croissance rapide en début de culture, et le xylane ne

serait utilisé que lors de l'épuisement du cellobiose (répression des xylanases par le cellobiose Khanna et Guari, 1993). La production de xylanases était très faible et n'augmentait pas avec le temps (Figures 22 et 23). Ceci est attribuable au fait que quand les cultures vieillissent, il y a épuisement de sels minéraux et début de lyse du mycélium avec comme résultat le changement des conditions du milieu (baisse de pH ) et en conséquence arrêt de la croissance.

En milieu xylane-CMC, il y avait apparition de xylanases à 48 hrs et en quantités intermédiaires entre celles obtenues en milieu xylane et en milieu xylane-cellobiose (Figures 22 et 23). Dans ce milieu, le xylane et le CMC doivent être dégradés par des xylanases et des cellulases afin de permettre aux glucides de pénétrer dans la cellule. Comme le CMC n'est pas immédiatement assimilable, la cellule produit des xylanases (en faible quantité) qui dégradent le xylane en oligoxylosides qui par la suite induisent les xylanases.

Les cellulases, quant à elles, étaient induites par la présence de xylane, de CMC ou de cellobiose et étaient produites dans les quatre milieux (Figures 21 et 24). Dans ces essais, la production de cellulases A ou B est issue et régulée par la copie chromosomique unique de la souche *S. lividans* 1326. La synthèse de cellulase A fluctuait selon la surproduction de cellulase B alors que celle de la cellulase B était relativement constante même dans la souche surproductrice de cellulase A. Dans les deux cas, la production de cellulases à partir de la copie chromosomique unique semblait être plus faible en milieu cellobiose.

Il y a normalement une régulation très finement ajustée pour contrôler la production d'enzymes lignocellulolytiques par le micro-organisme afin de minimiser ses dépenses énergétiques. Dans ces essais, cette régulation était court-circuitée par la présence de plusieurs copies du même gène (*celA* ou *celB*) clonés sur le vecteur multicopies pSUR. Ce

vecteur contient un fragment du vecteur pIJ702 qui est présent en nombres variant entre 40 et 300 copies par cellule (Katz *et al.*, 1983, Gusek et Kinsella, 1992).

### **Production de cellulase B par les simples mutants T1 et T3 dans la souche *S. lividans* J1725**

La production de cellulases par la souche *S. lividans* J1725 porteuse des deux simples mutations, T1 et T3, nous permet d'émettre l'hypothèse que l'ARN<sub>t</sub><sup>UUA</sup> n'est pas le seul ARN<sub>t</sub> pouvant s'hybrider au codon UUA de l'ARN<sub>m</sub>. Comme la souche J1725 est incapable de produire l'ARN<sub>t</sub><sup>UUA</sup> et qu'il y a définitivement production de cellulases (Figure 28) il doit y avoir une possibilité d'appariement non spécifique à un autre ARN<sub>t</sub> qui permet l'élongation de la protéine (Fernandez-Moreno *et al.*, 1991). Le taux d'appariement non spécifique serait probablement faible, mais permettrait néanmoins un certain taux d'élongation si un seul codon UUA est présent. L'appariement de deux ARN<sub>t</sub> non spécifiques serait donc peu probable et limiterait dramatiquement la production de la protéine. Cette condition est reflétée au niveau de la production de cellulase B dans la souche *bldA*<sup>-</sup> (*S. lividans* J1725). La souche porteuse du gène sauvage ne produit presque pas de cellulases, les deux simples mutants en produisent un peu et le double mutant, sans codon UUA, en produit beaucoup (Figure 28).

### **Gènes Hybrides**

Comme les gènes *celA* et *celB* présentent des éléments potentiellement limitants dans leur peptide signal et que dans tout système, la vitesse maximale est déterminée par son élément le plus lent, nous avons tenté d'outrepasser ces obstructions en modifiant ces gènes. Des études antérieures par Kluepfel *et al.* (1986) ont démontré que la xylanase A est

produite en très forte quantité et que le gène possède donc un promoteur puissant. Au cours de ce travail, des essais visant à interchanger le début des gènes *celA* et *celB* avec celui de *xlnA*, ont été réalisés, de même que des tentatives de construction de gènes hybrides.

Lors de la construction de ces gènes, la difficulté la plus importante était de ne pas modifier l'état des protéines matures afin de ne pas interférer avec les caractéristiques physico-chimiques des cellulases. Les protéines précurseurs des cellulases A et B et de la xylanase A sont clivées après les acides aminés A-X-A pour produire les protéines matures quand la protéine traverse la paroi cellulaire. Cette caractéristique commune a grandement facilité la sélection de la jonction des fragments de gène, et la fusion des gènes a été réalisée à ce point de clivage (Figure 29 et 30). Le xylane fut la source de carbone utilisée lors des essais de l'expression des gènes hybrides car le xylane est un inducteur de xylanases et les deux gènes sont soumis à la même régulation que la xylanase A. Les produits des gènes *xlnA-celA* et *xlnA-celB* obtenus lors de ces études semblent avoir la même taille que les cellulases produites par les gènes sauvages (Figures 33 et 34). De plus, les produits de dégradation par les protéases étaient similaires à ceux des protéines normales.

Selon les dosages des activités enzymatiques des diverses cultures, l'hybride *xlnA-celA* produisait presque deux fois plus de cellulases que le gène sauvage (1.02 IU/ml de surnageant). Cette valeur n'est pas énorme, mais il faut tenir compte du fait que la cellulase A est déjà produite en grandes quantités par le gène sauvage (Figure 33). La production de cellulases par l'hybride était légèrement supérieure (environ 60%) à celle du mutant M dont le codon TTG a été remplacé par un ATG.

Par ailleurs, la production de cellulase B par l'hybride *xlnA-celB* était plus de 40 fois supérieure à celle produite par le gène sauvage *celB*, et 5 fois supérieure à la production du mutant T2. La différence dans les niveaux de synthèse est probablement encore plus

grande, mais la précision du dosage enzymatique est affectée par la présence de cellulase A qui possède une activité spécifique cinq fois supérieure à celle de la cellulase B (Théberge *et al.*, 1991; Wittmann *et al.*, 1993). Il n'a pas été possible par immunobuvardage de détecter la présence de bande à 36 kDa pour le gène *celB* sauvage (Figure 34) du à sa faible production et au petit volume de surnageant utilisé lors des essais (le volume utilisé était faible due aux grandes quantités de protéines produites par l'hybride).

La variation de l'activité enzymatique rapportée entre les deux témoins pSUR pour les deux hybrides (Figures 33 et 34) vient du fait que le dosage a été réalisé dans des conditions différentes. En effet, le dosage de la cellulase A a été fait à 50°C à pH 5.5 et le dosage de la cellulase B a été fait à 60°C à pH 6.5. La cellulase A perd environ 10% de son activité si dosée à pH 6.5 et 70% si dosée à 60°C (Théberge *et al.*, 1991). De façon similaire, la cellulase B perd 60% de son activité quand elle est dosée à pH 5.5 et 50% quand elle est dosée à 50°C (Wittmann *et al.*, 1993). La production de cellulase B à partir de sa copie chromosomique était très faible due à sa régulation par les deux codons TTA. Par contre, la cellulase A ne semble pas être régulée par son codon d'initiation TTG et serait produite à partir de la copie chromosomique en quantité plus importante.



## **Conclusion**

Des diverses méthodes de mutagenèse utilisées dans cette étude, la plus efficace est de loin la méthode de mutagenèse par PCR. Cette méthode permet non seulement de muter les gènes, mais aussi d'effectuer différents changements au niveau de l'ADN tout en permettant l'examen détaillé de la progression à chacune des étapes de l'expérience. Les deux autres méthodes n'ont pas donné le rendement espéré.

La mutagenèse du triplet d'initiation TTG du gène *celA* en faveur de l'ATG typique a résulté en une augmentation de la sécrétion de cellulase A de deux fois supérieure à celle obtenue avec la souche porteuse du gène sauvage. Même si le codon TTG n'est utilisé qu'à 1.3% pour l'initiation de la traduction, la production de l'enzyme ne semble pas être fortement régulée par ce codon. Le remplacement du codon AAA par un codon AAG dans le gène *celA* a résulté en une diminution de 50% de la production de la cellulase A. Cette diminution serait due à une plus forte compétition pour l'ARN<sub>t</sub><sub>AAG</sub> que pour l'ARN<sub>t</sub><sub>AAA</sub>, car dans le cas des ARNm, la lysine est codée à 95% par le codon AAG. L'échange des deux codons rares par les plus communs (TTG-AAA en ATG-AAG) n'a pas entraîné de changement significatif au niveau de la production de cellulase A. Il semblerait que la progression de la traduction serait ralentie par un des deux éléments, soit le codon TTG ou AAG.

La mutagenèse des codons TTA du gène *celB* par des codons CTG a entraîné une augmentation importante dans la production de cellulase B. L'échange individuel des codons TTA a résulté en une augmentation marquée ( 5 à 10 fois plus que le sauvage), tandis que le double mutant en produisait encore plus (7.5 fois plus que les simples mutants). Le clonage dans la souche *S. lividans* J1725 (mutant *bld'*) résulta en une production similaire à celle de la souche *S. lividans* 1326. Il est probable qu'il existe un ARN<sub>t</sub> autre que l'ARN<sub>t</sub><sub>UUA</sub> (absent dans la souche *S. lividans* J1725) pouvant se fixer au codon UUA, ce qui permet la

traduction de l'ARNm en protéine. Cette hypothèse a déjà été proposée par Leskiw *et al.* (1991b) suite aux résultats de tests sur l'expression des gènes *hyg* et *aad* (résistance à l'hygromycine et à la spectinomycine). Les chances d'appariement avec un autre ARN<sub>t</sub> sont probablement faibles, causant un ralentissement important de la synthèse protéique en présence d'un codon UUA. La présence de deux de ces codons aurait donc pour effet de limiter de façon significative la synthèse de la protéine. Ceci explique la très faible production de la cellulase B par le clone contenant le gène sauvage.

La surproduction de cellulase B à l'aide d'un vecteur multicopies a eu pour effet de diminuer la production de cellulase A à partir du gène chromosomique. Plus la sécrétion de cellulase B était importante, plus la sécrétion de cellulase A diminuait. Il est possible qu'il y ait un lien entre la sécrétion des deux cellulases. La surproduction de l'une pourrait monopoliser les systèmes de sécrétion et ralentir la sécrétion de l'autre. La synthèse de xylanase A et B ne semble pas avoir été affectée de façon significative par des variations dans la production de cellulases, mais a semblé être dépendante de la source de carbone contenue dans le milieu de culture.

Enfin, les deux gènes hybrides (homologues) construits à partir de la séquence promotrice, du site de fixation des ribosomes et du peptide signal de *xlnA* jumelés à la séquence codant pour la protéine mature de la cellulase A ou cellulase B ont donné de très bons rendements. Le clone contenant le gène hybride *xlnA-celA* a produit deux fois (1.24 UI/ml) plus de cellulase A que le clone porteur du gène sauvage. De plus, le clone porteur du gène hybride *xlnA-celB* a produit au delà de 40 fois (3.55 UI/ml) plus de cellulase B que le clone sauvage. La production de cellulase A et cellulase B semble donc limitée par les séquences promotrices, de fixation aux ribosomes et du peptide signal de leurs gènes. Le promoteur de *xlnA* est très puissant et la séquence du peptide signal permet le transport de

la protéine à l'extérieur de la cellule. Ce système pourrait permettre la production de grandes quantités de protéines hétérologues sécrétées, mais il reste encore à solutionner le problème des protéases qui dégradent les enzymes dans le surnageant.

## Remerciements

J'aimerais remercier François Shareck, mon directeur de recherche, pour son aide incalculable, sa patience, son aide financière, ses bons conseils et sa bonne humeur.

Un grand merci à Lise Trempe, Yvon Lamontagne et François Paradis (Dr. W) pour leur aide et leur conseils techniques.

Merci à tous les membres du groupe de recherche sur les streptomycètes; Dieter Kluepfel, Rolf Morosoli, Claude Dupont, Serge, Liette, Lisette, Nicole, Catherine, Stéphane, Martin, Patrick, Daniel, Françoise et Mona.

Un autre grand merci à Joanne et Lise du service de séquençage pour leur aide et pour leur bonne humeur même très tôt le matin.

Je tiens à remercier la Fondation Armand-Frappier pour son support financier.

J'aimerais remercier mes camarades du 555; Ivan (l'hydro), John (tasse-toi), Juan (la bière) , Horacio (le révérend), Frank (la signature), Dale (la paperasse) et Jean-Pierre (la puce) pour leur support moral et en bière.

Merci à Anastasia, Dana, Fred, Gaétan, Khristina, René et Ye-Phing pour les discussions mouvementées à l'heure du lunch.

## **Bibliographie**

- 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. *Biochem. J.* 290: 857-863.
- ARHIN F. F., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1994. Effects of disruption of xylanase-encoding genes on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*. *J of Bacteriol.* 176: 4924-30
- BABCOCK M.J. et K.E. KENDRICK. 1990. Transcriptional and translational features of a sporulation gene of *Streptomyces griseus*. *Gene* 95: 57-63.
- BIRNBOIM H.C. et J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- BRADFORD M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRAIL L., E. FAN, D. B. LEVIN et D. M. LOGAN. 1993. Improved polymerase fidelity in PCR-SSCPA. *Mutat. Res.* 303: 171-175
- BRANA, A.F., C. MENDEZ, L.A. DIAZ, M.B. MANZANAL et C. HARDISSON. 1986. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1319-1326.
- BRUCCOLERI R.E. et G. HEINRICH. 1988. An improved algorithm for nucleic acid secondary structure display. *Computer Applications in the Biosciences* 4: 167-73.
- BRUCCOLERI R.E. et M. KARPLUS. 1990. Conformational sampling using high-temperature molecular dynamics. *Biopolymers* 29: 1847-1862
- BUTLER M.J., C.C. DAVEY, P. KRYGSMAN, E. WALCZYK et L.T. MALEK. 1992. Cloning of genetic loci involved in endoprotease activity in *Streptomyces lividans* 66: a novel neutral protease gene with an adjacent divergent putative regulatory gene. *Can. J. Microbiol.* 38: 912-920.
- BUTLER M.J., A. BERGERON, G. SOOSTMEYER, T. ZIMNY et L.T. MALEK. 1993. Cloning and characterisation of an aminopeptidase P-encoding gene from *Streptomyces lividans*. *Gene* 123: 115-119.
- BUTLER M.J., J.S. APHALE, C.BINNIE, M.A. DIZONNO, P. KRYGSMAN, G.A. SOLTES E. WALCZYK et L.T. MALEK. 1994. The aminopeptidase N-encoding *pepN* gene of *Streptomyces lividans* 66. *Gene* 141: 115-119.

- BUTLER M.J., C. BINNIE, M.A. DIZONNO, P. KRYGSMAN, G.A. SOLTES, G. SOOSTMEYER, G. WALCZYK et L.T. MALEK. 1994. Cloning and characterisation of a gene encoding a secreted tripeptidyl aminopeptidase from *Streptomyces lividans* 66. Non publié, déposé dans GenBank, code d'accès L27466.
- CARBON J., T.E. SHENK et P. BERG. 1975. Biochemical procedure for production of small deletions in simian virus 40 DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1392-1396.
- CHATER, K.F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. Ann. Rev. Microbiol, 47: 685-713.
- CONLEY E.C. et J.R. SAUNDERS. 1984, Recombination-dependent recircularization of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 194: 211-218.
- DARNELL, J., H. LODISH et D. BALTIMORE. 1990. Molecular Cell Biology. Second Edition, Scientific American Books, Distributed by W.H. Freeman and Company, New York, 941-942.
- DENG W.P. et J.A. NICKOLOFF. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. Anal. Biochem. 200: 81-88.
- FERNANDEZ-ABALOS, J.M., P. SANCHEZ, P.M. COLL, J.R. VILLANUEVA, P. PEREZ et R.I. SANTAMARIA. 1991. Cloning and nucleotide sequence of *celA*<sub>1</sub>, an endo- $\beta$ -1,4-glucanase-encoding gene from *Streptomyces halstedii* JM8. J. Bacteriol. 174: 6368-6376.
- FERNANDEZ-MORENO, M.A., J.L. CABALLERO, D.A. HOPWOOD, et F. MALPARTIDA. 1991. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. Cell 66: 769-780.
- FERNANDEZ-MORENO M.A., E. MARTINEZ, L. BOTO, D.A. HOPWOOD, et F. MALPARTIDA. 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. J. Biol. Chem. 267: 19278-19290.
- FLAVELL R.A., D.L. SABO, E.F. BANDLE et C. WEISSMANN. 1974. Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Q $\beta$  RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 367-371.
- FREIER S.M., R. KIERZEK, J.A. JAEGER, N. SUGIMOTO, M.H. CARUTHERS, T. NEILSON, et D.H. TURNER. 1986. Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377.



- GANOZA M., C., P. MARLIERE, E.C. KOFOID et B.G. LOUIS. 1985. Initiator tRNA may recognize more than the initiation codon in mRNA: a model for translational initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4587-4591.
- GUSEK T.W. et J.E. KINSELLA. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Critical Reviews in Microbiology* 18: 247-60.
- GRAMAJO, H.C., E. TAKANO et M.J. BIBB. 1993. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) is transcriptionally regulated. *Mol. Microbiol.* 7: 837-845.
- HENSEL M., H. LILL, R. SCHMID, G. DECKERS-HEBESTREIT et K. ALTENDORF. 1993. The *atp* operon of *Streptomyces lividans*: cloning and complete nucleotide sequence of the genes of the ATP synthase (F1Fo). Non publié, déposé dans GenBank, code d'accès Z22606
- HINTERMANN G. 1994. Cloning, partial characterization and nucleotide sequence of a trypsin-like protease gene from *Streptomyces glaucescens*. Non publié, déposé dans GenBank, code d'accès U13770
- HOBBS THOMAS. (1651) *Leviathan*, pt. 1, chapitre 5.
- HO, S.N., H.D. HUNT, R.M. HORTON, J.K. PULLEN et L.R. PEASE. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 77: 51-59.
- HOFACKER I. L., P. SCHUSTER, W. FONTANA et P.F. STADLER. 1994. From sequences to shapes and back: a case study in RNA secondary structures. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 255: 279-84.
- HOPWOOD D. A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.S. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of streptomyces, A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- HOPWOOD D. A. 1967. Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 81: 887-898.
- HORTON, R.M., H.D. HUNT, S.N. HO, J.K. PULLEN, et L.R. PEASE. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 77: 61-68.
- HUBERMAN J.A., A. KORNBERG et B. M. ALBERTS. 1971. Stimulation of T4 bacteriophage DNA polymerase by the protein product of T4 gene 32. *J. Mol. Biol.* 62: 39-52.

- HUTCHISON C.A. 3D., S. PHILLIPS, M.H. EDGELL, S.GILLAM, P. JAHNKE et M. SMITH. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* 253: 6551-6560.
- JAEGER J.A., D.H. TURNER et M. ZUKER. 1989. Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7706-7710.
- KATZ, E., C.J. THOMPSON et D.A. HOPWOOD. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2703-2714.
- KEOHAVONG P. et W. G. THILLY. 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9253-9257.
- KHANNA S. et GAURI. 1993. Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 990-995
- KLUEPFEL D., F. SHARECK, F. MONDOU, et R. MOROSOLI. 1986. Characterisation of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 230-234.
- KUCHINO, Y., I. YAMAMOTO et S. NISHIMURA. 1982. Nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* initiator tRNA. *Nucleic Acids Res.* 10: 6671-6674.
- KUNKEL T.A., J.D. ROBERTS et R.A. ZAKOUR. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymol.* 154: 367-382.
- KUTZNER H. J. 1981. The family streptomycetaceae. Starr, Stolp, Truper, Balows and Schlegel (editors), *The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification bacteria*. Vol II Springer-Verlag, Berlin, 2028-2090.
- LAEMMLI U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- LEVER M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* 47: 273-9.
- LAI C.J. et D. NATHANS. 1974. Deletion mutants of simian virus 40 generated by enzymatic excision of DNA segments from the viral genome. *J. Mol. Biol.* 89: 179-193.
- LAWLOR, E.J., H.A. BAYLIS et K.F. CHATER. 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev* 1: 1305-1310.

- LESKIW, B. K., M. MEVARECH, L.S. BARRITT, S.E. JENSEN, D.J. HENDERSON, D.A. HOPWOOD, C.J. BRUTON et K.F. CHATER. 1990. Discovery of an insertion sequence, IS116, from *Streptomyces clavuligerus* and its relatedness to other transposable elements from actinomyces. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 1251-1258.
- LESKIW, B.K., E.J. LAWLOR, J.M. FERNANDEZ-ABALOS et K.F. CHATER. 1991(a). TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2461-2465
- LESKIW, B.K., M.J. BIBB et K.F. CHATER. 1991(b). The use of a rare codon specifically during development?. *Mol. Microbiol.* 5: 2861-2867.
- LESKIW, B.K., R. MAH, E.J. LAWLOR et K.F. CHATER. 1993. Accumulation of *bldA*-specific tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bact.* 175: 1995-2005.
- LIMAURO D., A. AVITABILE, M. CAPPELLANO, A.M. PUGLIA, et C.B. BRUNI. 1990. Cloning and characterization of the histidine biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 90: 31-41.
- MANIN C., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1994. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). *Biochem. J.* 302: 443-449
- MAYFIELD D.C et A.S. KESTER. 1972. Physiological studies on *Vitreoscilla stercoraria*. *J. Bacteriol.* 112: 1052-1056.
- McCASKILL J.S. 1990. The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers.* 29: 1105-1119.
- MONDOU F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene* 49: 323-329.
- PARADKAR A. S., A. K. PETRICH, B. K. LESKIW, K. A. AIDOO et S. E. JENSEN. 1994. Transcriptional analysis and heterologous expression of the gene encoding beta-lactamase inhibitor protein (BLIP) from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene* 144: 31-36
- PESCHKE V., H. SCHMIDT, H.Z. ZHANG, et W. PIEPERSBERG. 1994. Organization of the complete gene cluster for lincomycin production in an overproducing strain of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Non publié, déposé dans GenBank, code d'accès X79146

- PIRET, J.M. et K.F. CHATER. 1985. Phage-mediated cloning of *bldA*, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development, and its analysis by genetic complementation. *J. Bacteriol.* 163: 965-972.
- PISSOWOTZKI K., K. MANSOURI et W. PIEPERSBERG. 1991. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. *Mol. Gen. Genet.* 231: 113-123.
- RAZIN A., T. HIROSE, K. ITAKURA et A.D. RIGGS. 1978. Efficient correction of a mutation by use of chemically synthesized DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4268-4270.
- SANGER F., S. NICKLEN et A.R.COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- SHARECK F., F. MONDOU, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1987. Cloning of DNA sequences involved in overproduction of endoglucanase activity in *Streptomyces lividans* 66. *Biotech. Letters* 9: 169-174.
- SHARECK F., P. BIELY, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1995. Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene* 153: 105-109
- SUEOKA NOBORU. 1992. Directional mutation pressure, selective constraints, and genetic equilibria. *J. Mol. Evol.* 34: 95-114.
- THÉBERGE M., P. LACAZE, F. SHARECK, R. MOROSOLI, et D. KLUEPFEL. 1992. Purification and characterisation of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 815-820.
- THÉBERGE M. 1991. Purification et caractérisation d'une endoglucanase de *Streptomyces lividans* 66. Mémoire de maîtrise, IAF, Université du Québec
- UEDA, Y., S. TAGUCHI, K. NISHIYAMA, I. KUMAGAI et K. MIURA. 1993. Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1172: 262-266.
- UEDA, Y., I. KUMAGAI et K. MIURA. 1992. The effects of a unique D-loop structure of a minor tRNA Leu(UUA) from *Streptomyces* on its structural stability and amino acid accepting activity. *Nucleic Acids Res.* 20: 3911-3917.
- VATS-MEHTA S., P. BOUVRETTE, F.SHARECK, R. MOROSOLI et D.KLUEPFEL. 1990. Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans* 66. *Gene* 86: 119-22.

- WEBER W., H. ZAHNER, J. SIEBERS, K. SCHRODER et A. ZEECK. 1979. Metabolic products of microorganisms. 175. Tetracenomycin C. Arch. Microbiol. 121: 111-116
- WHITE A., P. HANDLER et E.L. SMITH. 1973. Principles of biochemistry, 5eme édition, McGraw Hill Book Company 1973.
- WITTMANN S., F. SHARECK, D. KLUEPFEL, et R. MOROSOLI. 1994. Purification and characterisation of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1701-1703.
- WITTMANN S. 1993. Clonage et séquençage de gène de la cellulase B de *Streptomyces lividans* 66 et caractérisation de l'enzyme. Mémoire de maîtrise, IAF, Université du Québec
- WILKIE K.C.B. 1979. The hemicelluloses of grasses and cereals. Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 36: 215-264.
- WOOD W.I., J. GITSCHIER, L.A. LASKY et R.M. LAWN. 1985. Base composition independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1585-8.
- WRIGHT, F. et M.J. BIBB. 1992. Codon usage in the G+C rich Streptomyces genome. Gene 113: 55-65.
- ZUKER M. et P. STIEGLER, 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucleic Acids Res. 9: 133-148.

