

TRADUCTION DE LA XYLANASE A CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS* :
INFLUENCE DE SÉQUENCES COMPLÉMENTAIRES À L'ARNr 16S

Par

IBTISSEM HELAL

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Examinatrice interne : Maritza Jaramillo

INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Sélim Kermasha

Université McGill

Directrice de recherche : Monique Lacroix

Institut Armand Frappier

**«Et quand on ne peut revenir en arrière, on ne doit se préoccuper que de
la meilleure manière d'aller de l'avant.»**

Paulo Coelho, L'Alchimiste, 1988.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de recherche, Pr. Monique Lacroix Ph.D., de m'avoir soutenue, conseillée et motivée pour bien aboutir à la noble fin de mon objectif, obtenir mon diplôme de maîtrise tout en allant de l'avant.

Je remercie Pr. Maritza Jaramillo Ph.D., INRS-Institut Armand-Frappier qui m'honore en jugeant mon travail, en tant qu'examinatrice interne.

Je remercie Pr. Sélim Kermasha, Ph.D. de l'Université McGill, Faculté des Sciences de L'Agriculture et de L'Environnement qui me fait l'honneur de juger ce travail en tant qu'examineur externe.

Je tiens aussi à remercier vivement mes parents pour tout ce qu'ils m'ont donné.

Je remercie tous ceux et celles qui m'ont aidé à réaliser mon travail de Maîtrise.

RÉSUMÉ

Pour les applications étendues de *Streptomyces lividans* et la remarquable exigence du marché, trouver de nouvelles souches de *S. lividans* capables de produire de la xylanase avec de nouvelles propriétés est devenu un des sujets importants dans la recherche industrielle, bio-alimentaire et environnementale. En particulier, les xylanases revêtent une grande importance pour les industries de bio-blanchiment des pâtes de papier. Ainsi, il nous apparaissait intéressant d'élaborer une souche hyper-productrice de cette enzyme. Certaines études ont montré que la sécrétion de la xylanase A chez *S. lividans* est nettement améliorée avec le remplacement du peptide signal (ps) de la xln A par celui du long peptide signal de la cellulase A, et ce, grâce à la présence de séquences de 6,7 ou 8 nucléotides que ce ps contient et qui présentent une complémentarité à l'ARNr 16S.

Au cours de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que ces séquences d'intérêt de 6 à 8 nt, si elles se retrouvent dans le gène de structure de la xylanase A, elles pourraient influencer la traduction de cette enzyme. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recherché ces séquences d'intérêt dans le gène de structure de la XlnA chez *S. lividans* par alignement de la séquence du gène avec celle de l'ARNr 16S. Nous avons ainsi, localisé 4 séquences de 6 nt chacune, que nous avons appelé "boîtes". Celles-ci existent aux positions 181-186, 293-298, 427-432 et 735-740 dans le gène.

Afin d'étudier l'importance de chacune de ces boîtes dans la production de l'enzyme Xln A par *S. lividans*, nous avons mis au point une méthode de transformation génétique permettant d'optimiser la production de la xylanase A via la mutagenèse dirigée en changeant, une base nucléotidique, dans chacune de ces "boîtes", par une autre différente tout en conservant l'acide aminé produit. Nous avons ainsi essayé de créer 4 nouveaux mutants de XlnA chez *S. lividans* par mutagenèse dirigée par PCR en incorporant les boîtes mutées par effet cumulatif. Nous avons réussi à créer 3 nouveaux mutants seulement: pIAF_907.1 ayant la première boîte mutée, pIAF_907.2 ayant les deux premières boîtes mutées et pIAF_907.3 ayant les trois premières boîtes mutées. Le quatrième mutant pIAF_907.4 n'a pas vu le jour, pourtant la mutation de la quatrième boîte a été générée par PCR. Les essais étaient répétés 3 fois consécutives. Le mutant de *S. lividans*, pIAF_907.3 présente une performance élevée à la production de l'enzyme xylanase A (1150UI après

144h) en comparaison avec la structure native du clone pIAF_911.A9 (770UI) chez *S. lividans*.

En effet, grâce à notre étude, nous avons été en mesure de produire plus de 3g/l de xylanase obtenue avec la souche dépourvue des trois séquences de 6 nt complémentaires à l'ARNr 16S. Nous avons observé un effet inverse, alors qu'on s'attendait à une baisse remarquable de la production de la XlnA chez pIAF_907.3, après la destruction de 3 régions de complémentarité avec l'ARNr 16S. La construction du mutant pIAF_907.3 pourvue d'une complémentarité diminuée à l'ARNr 16S stimule, quand même, la production de la xylanase A.

Au cours de ce travail, nous avons montré que la mutation de la première boîte de complémentarité de 6nt à l'ARNr 16S, améliore la production de la xylanase A de 15,7% chez *S. lividans*. La mutation consécutive dans chacune des deux premières boîtes a entraîné une réduction de 40,26% de l'activité xylanolytique, ce qui montre l'importance de la séquence de la boîte 2 dans Le processus de traduction de Xylanase A dans *S. lividans*, lorsqu'il est associé à la boîte 3 intacte. D'autre part, la modification des trois premières boîtes a stimulé la production de xylanase de 48,4% en comparaison avec la construction native du gène de la XlnA.

ABSTRACT

For the extensive applications of *Streptomyces lividans* and the remarkable market demand, finding new strains of *S. lividans* capable of producing xylanase with new properties has become an important topic in industrial, bio-food and environmental research. In particular, xylanases are of high importance for the bio-bleaching industries of paper pulp. Thus, it appeared interesting to develop a hyper-producing strain of this enzyme. Some studies have shown that the secretion of xylanase A in *S. lividans* is markedly improved by replacing the Xln A signal peptide (ps) with that of the long ps of cellulase A by the presence of sequences of 6, 7 or 8 nucleotides which this ps contains and which exhibit complementarity to the 16S rRNA.

In this work, we hypothesized that these sequences of interest of 6 to 8 nt, if they occur in the xylanase A structural gene, could influence the translation of this enzyme. To verify this hypothesis, we searched these sequences of interest in the XlnA structural gene in *S. lividans* by aligning the gene sequence with that of 16S rRNA. We have thus located 4 sequences of 6 nt each, which we call "boxes" which exist at positions 181-186, 293-298, 427-432 and 735-740 in the gene.

In order to study the importance of each of these boxes in the production of the Xln A enzyme by *S. lividans*, we have developed a genetic transformation method to optimize the production of xylanase A via site-directed mutagenesis by changing, a nucleotide base, in each of these "boxes", to a different one while retaining the produced amino acid. We have thus tried to create 4 new XlnA mutants in *S. lividans* by PCR-site-directed mutagenesis by incorporating cumulatively mutated boxes. We managed to create 3 new mutants only: pIAF_907.1 having the first mutated box, pIAF_907.2 having the first two mutated boxes and pIAF_907.3 having the first three mutated boxes. Experiments were not successful obtaining the fourth mutant pIAF_907.4, yet the mutation of the fourth box was generated by PCR. The trials were repeated 3 times consecutively. pIAF_907.3 showed high production performance of the xylanase A enzyme (1150 IU after 144 h) in comparison with the native structure of the clone pIAF_911.A9 (770 IU) in *S. lividans*.

Indeed, thanks to our study, we were able to produce more than 3 g / l of xylanase obtained with pIAF_907.3, strain lacking the three sequences of 6 nt complementary to the 16S rRNA. We observed an inverse effect, whereas a remarkable decrease in the production of

XlnA was expected in pIAF_907.3 after the destruction of 3 16S rRNA complementarity sites. The construction of mutant pIAF_907.3 having reduced complementarity to 16S rRNA still stimulates the production of xylanase A.

In this work, we showed that the mutation of the first 6nt complementarity box to 16S rRNA improves the production of xylanase A by 15.7% in *S. lividans*. The subsequent mutation in each of the first two boxes resulted in a 40.26% reduction in xylanolytic activity, which demonstrates the importance of the box 2 sequence in the Xylanase A translation process in *S. lividans*. On the other hand, the modification of the first three boxes stimulated xylanase production by 48.4%.

Tables des matières

Chapitre I : REVUE DE LITTÉRATURE	12
1. <i>Streptomyces lividans</i>	13
1.1. Le cycle de vie des streptomycètes.....	13
1.2. Intérêts industriels des streptomycètes.....	14
2. La Xylanase	15
2.1. Les xylanases en Biotechnologie industrielle.....	15
3. La sécrétion chez les Streptomycètes	16
4. L'initiation de la traduction	18
4.1. L'ARNm.....	20
4.2. Le site de fixation des ribosomes (RBS)	21
4.3. Le peptide signal des streptomycètes	22
4.4. La machinerie impliquée dans l'enchaînement des acides aminés	24
4.4.1. Le ribosome des procaryotes	24
4.4.2. La grande sous-unité du ribosome.....	25
4.4.3. La petite sous-unité du ribosome.....	26
5. Travaux antérieurs pour l'amélioration de la traduction de la xylanase A chez <i>S. lividans</i>	30
5.1. Échange des différents peptides signaux des Streptomycètes	31
5.2. Alignement du peptide signal de la CelA avec l'ARNr 16S	32
5.3. Mutations au niveau du ps CelA en amont du gène XlnA	33
6. Hypothèse de travail et objectifs.....	34
6.1. Problématique.....	34
6.2. Hypothèse	35
6.3. Objectifs.....	35
6.3.1. Objectif 1: Identification des boîtes.....	35

6.3.2.	Objectif 2: Modification des boîtes	36
6.3.3.	Objectif 3: Étude des nouveaux mutants	36
Chapitre II: MATÉRIELS ET MÉTHODES		37
7.	Matériel, souches, vecteurs et conditions de culture	38
7.1.	<i>E. coli</i>	38
7.2.	<i>S. lividans</i>	39
7.3.	Les milieux de culture	40
7.3.1.	Les milieux liquides	40
7.3.1.1.	Milieu liquide pour la croissance <i>E. coli</i>	40
7.3.1.2.	Milieu liquide pour l'isolement d'ADN plasmidique	40
7.3.1.3.	Milieu liquide minimal pour la croissance de <i>S. lividans</i>	40
7.3.2.	Les milieux solides	41
7.3.2.1.	Milieu solide pour la croissance	41
7.3.2.2.	Milieu solide pour la régénération des protoplastes	41
7.3.2.3.	Milieu solide pour la détection de l'activité xylanolytique.....	41
8.	Méthodes.....	42
8.1.	Préparation des spores	42
8.2.	Manipulations de l'ADN	43
8.2.1.	Isolement de plasmides d' <i>E. coli</i>	43
8.2.2.	Purification d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium	43
8.2.3.	Isolement de plasmides de <i>S. lividans</i>	45
8.2.4.	Digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction.....	45
8.2.5.	Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose.....	45
8.2.6.	Extraction des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose.....	46
8.2.7.	Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur	46
8.3.	Mutagenèse dirigée.....	47

8.3.1.	Conception des oligonucléotides	47
8.3.2.	Les méthodes de mutagenèse testées	48
8.3.2.1.	Mutagenèse dirigée circulaire	49
8.3.2.2.	Mutagenèse dirigée par PCR recombinante ou “emboîtée”	50
8.3.3.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	51
8.3.4.	Étapes post-PCR	52
8.4.	Transformation des cellules	52
8.4.1.	Transformations chez <i>E. coli</i>	52
8.4.2.	Transformation chez <i>S. lividans</i>	53
8.5.	Méthodes de détection des mutants	53
8.5.1.	Hybridation de colonies par des sondes radioactives	54
8.5.2.	Séquençage de l'ADN	54
8.6.	Tests biologiques	55
8.6.1.	Mesure de l'activité enzymatique par la méthode des sucres réducteurs	55
8.6.2.	Mesure de la croissance du mycélium par dosage de l'ADN total	56
8.7.	Outils de bioinformatique utilisés	57
8.7.1.	Le logiciel Chromas	57
8.7.2.	Le logiciel BLAST	57
8.7.3.	Le logiciel DNAMAN	58
8.7.4.	Le logiciel Clone Manager 5	58
8.7.5.	Analyses Statistiques	58
Chapitre III: RÉSULTATS		59
9.	Alignement de la séquence de l'ARNm de la XlnA avec l'ARNr 16S de <i>S. lividans</i>	60
10.	Mutagenèse des boîtes contenues dans le gène de structure de la XlnA	61
11.	Optimisation des méthodes de mutagenèse dirigée par PCR	63
12.	Effet des mutations sur l'Activité xylanolytique et sur la croissance	

mycélienne.....	68
13. Rôle des “boîtes” du gène de la xylanase A	73
Chapitre IV : DISCUSSION & PERSPECTIVES	75
14. Influence des séquences de 6 nt complémentaires à l’ARNr 16S sur la production de la XlnA chez <i>S. lividans</i>	76
15. Influence des mutations sur la structure secondaire de l’ARNm	76
16. Refus de la fixation de la quatrième boîte de 6 nt chez <i>S. lividans</i>	78
17. Recherche d’autres séquences complémentaires à l’ARNr 16S dans le gène de la XlnA	79
CONCLUSION	82
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	84
ANNEXES.....	91

Listes des figures

Figure 1 : Actinomycètes filamenteuses.....	13
Figure 2 : Cycle de vie de <i>Streptomyces coelicolor</i>	14
Figure 3: Digestion du xylane par la xylanase au niveau de la liaison Beta-1,4-xylose.	15
Figure 4 : Système de sécrétion SEC et TAT chez les bactéries.....	17
Figure 5 : Structure tridimensionnelle du ribosome en cours d'initiation de la traduction.....	20
Figure 6 : Modèle, proposé par Sprengart et son équipe, de l'interaction entre la «Downstream Box» (DB) de l' ARNm et « l'Anti-Downstream Box» (ADB) de l' ARNr 16S durant le processus d'initiation de la traduction, en présence d'une séquence Shine-Dalgarno (SD).....	22
Figure 7 : Schématisation d'un ps de précurseur bactérien.....	23
Figure 8 : Schématisation d'un ribosome de bactérie.	25
Figure 9 : Structure secondaire de l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome des procaryotes.....	27
Figure 10 : Schématisation de la structure tertiaire de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité du ribosome d' <i>E.coli</i>	28
Figure 11 : Schématisation de la structure tertiaire de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité du ribosome des prokaryotes	29
Figure 12 : Un exemple de pseudonoed	30
Figure 13 : Echange du ps(XlnA) par le court ps(CelA), le court ps(ManA), le long ps(ManA) puis par le long ps (CelA) de <i>S.lividans</i>	32
Figure 14 : Alignement de l'ARNm du ps (CelA) avec l'ARNr 16S.	33
Figure 15 : Mutagenèse dirigée circulaire.	49
Figure 16 : Mutagenèse dirigée recombinante ou “emboîtée” par PCR,	51
Figure 17 :Mutagenese dirigee par extension de recouvrement partielle. Erreur ! Signet non défini.	
Figure 18 : Exemple de Chromatogramme pour l'analyse de séquences.	57
Figure 19: Exemple de de carte graphique et d'édition de séquences qu'on peut établir avec	

le logiciel Clone Manager.....	58
Figure 20 : Séquence du gène de structure de la XlnA.....	61
Figure 21 : Optimisation du nombre des cycles de la PCR donnant une meilleure amplification des fragments PCR pour les deux méthodes de mutagenèse dirigée par PCR utilisées: la circulaire et la recombinante.....	64
Figure 22 : Électrophorèse sur gel des fragments obtenus par PCR après mutagenèse dirigée recombinante du premier mutant du gène de structure de la XlnA au niveau de la position 181-186.....	65
Figure 23 : Électrophorèse sur gel des fragments obtenus par PCR après mutagenèse dirigée recombinante du second mutant du gène de structure de la XlnA au niveau de la position 293-298.....	66
Figure 24 : Électrophorèse sur gel des fragments obtenus par PCR après mutagenèse dirigée recombinante du troisième mutant du gène de structure de la XlnA au niveau de la position 427-432.....	66
Figure 25 : Recherche d'activité xylanasiq ue sur RBB-Xylane.	68
Figure 26 : Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones au cours du temps. pIAF907_1	70
Figure 27 : Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones au cours du temps. pIAF907_2	70
Figure 28 : Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones au cours du temps. pIAF907_3	71
Figure 29. Variation de l'activité de la xylanase pour les quatre souches étudiées.....	72
Figure 30. Structures secondaires des séquences d'ARNm avant et après mutations des boîtes de 6nt (1, 2 et 3) dans le gène XlnA.....	74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des ps des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des streptomycètes.	24
Tableau 2 : Mutations dans ps(CelA) en amont du gène XlnA.	34
Tableau3: Caractéristiques de la souche DH11S d' <i>E. coli</i> utilisée. Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 4: Liste des amerces pour les mutants du gène de la XlnA	48
Tableau 5 : Les boîtes de 6nt, dans le gène de la XlnA, complémentaires à l'ARNr 16S.	60
Tableau 6 : Liste des mutations ponctuelles dans le gène de structure de la XlnA.....	62
Tableau 7: Comparaison des deux méthodes de mutagenèse par PCR utilisées au cours de ce travail.....	64
Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés pour la création des nouveaux mutants de <i>S.lividans</i>	67

Liste des annexes

Annexe A : Séquence nucléotidique du gène de la XlnA.....	92
Annexe B : Symbole des acides aminés	93
Annexe C : Code génétique et fréquence de l'emploi des codons chez Streptomyces	94
Annexe D : Carte du phagemide pTZ19U	95
Annexe E : Caractéristiques des plasmides utilisés chez E.coli et construits à partir du pTZ19U.....	96
Annexe F : Carte du plasmide pIJ702.....	97
Annexe G : Caractéristiques des plasmides utilisés chez S. lividans et construits à partir du pIJ702	98
Annexe H :Compositions des milieux de culture solides et liquides utilisés	99
Annexe I: Compositions des tampons d'électrophorèse.....	102
Annexe J: Compositions des solutions d'hybridation	103
Annexe K: Programme PCR emboîté optimisé au cours de ce courant travail:.....	104
Annexe L: Liste des résultats de l'étude des structures secondaires probables avant et après mutagenèse des trois séquences de 6 nt mutées dans le gène de structure de la XlnA chez <i>S.lividans</i>	105

Liste des abréviations

Å	: Angström
a.a.	: Acide aminé
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADP	: Adénosine Di-Phosphate
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNt	: Acide ribonucléique de transfert
30S, 70S, 50S	: Vitesse de sédimentation des sous- unités ribosomiques
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>S. lividans</i>	: <i>Streptomyces lividans</i>
A, C, G, U	: Adénine, Cytosine, Guanine, Uracile
ATP	: Adénosine triphosphate
GTP	: Guanosine triphosphate
° C	: Degré Celsius
CCCP	: Carbonyl Cyanide <i>m</i> -ChloroPhenylhydrazone
Ci	: Curie
DB	: Downstream Box
DO	: Densité Optique
DNS	: Acide dinitrosalicylique
EDTA	: Acide (EthyleneDinitrilo)Tétraacétique
Gr	: gramme et ses subdivisions mg (milligramme), µg (microgramme)
GFOR	: Glucose-Fructose Oxydo-Réductase de <i>Zymomonas mobilis</i>
GFP	: Green Fluorescent Protein
GSP	: General Secretory Pathway
GTP	: Guanosine Tri-Phosphate

INTRODUCTION GENERALE

h	: Heure
kb	: kilobase
kcal	: kilocalorie
kDa	: kiloDalton
min	: Minute
ml	: Millilitre
mol	: Mole et ses subdivisions mmol (millimole), μ mol (micromole), nmol(nanomole), mol (Picomole).
nm	: Nanomètre
qsp	: Quantité suffisante pour
pb	: paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RBB	: Remazol Brilliant Blue
RBS	: Ribosome Binding Site
rpm	: Rotation par minute
SD	: Shine Dalgarno
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
sec	: Seconde
TCA	: Acide TriChloroacétique
Tm	: Température de fusion (Melting Temperature)
UI	: Unité enzymatique internationale

INTRODUCTION GENERALE

UTP	: Uracil Tri-Phosphate
XlnA	: Xylanase A
XlnB	: Xylanase B
XlnB2	: Xylanase B dépourvue de son domaine de liaison au xylane
XlnC	: Xylanase C
Site- A	: Site d' aminoacyl- ARNt
Site- P	: Site de peptidyl- ARNt
Site- E	: Site d' exit
H44	: Hélice 44 de la petite sous-unité du ribosome
H69	: Hélice 69 de la grande sous-unité du ribosome
Pont B2a	: Pont inter sous-unité du ribosome
Gln, Glu, Lys	: Glutamine, l'acide glutamique, lysine

CHAPITRE I :
REVUE DE LITTÉRATURE

1. *Streptomyces lividans*

S. lividans est une bactérie filamenteuse appartenant au genre *Streptomyces* et à la famille des Actinomycètes. Les Streptomycètes sont ubiquitaires dans la nature mais surtout saprophytes du sol (Bouizgarne et al. 2009, Trujillo-Cabrera et al. 2013). Leur croissance sous forme d'hyphe (**Figure 1**) leur confère un avantage pour la colonisation de cet habitat (Zucchi et al., 2012).

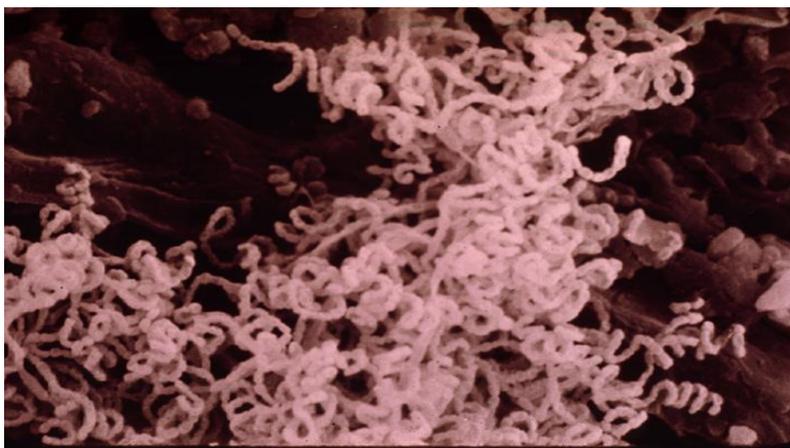


Figure 1: Actinomycètes filamenteuses

(https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_MEDIA/nrcs142p2_050427.jpg)

1.1. Le cycle de vie des streptomycètes

Le cycle de vie des *Streptomyces* est l'une des caractéristiques du genre (**Figure 2**). Il est très complexe alternant mycélium et spores, ainsi, en conditions favorables, un ou deux tubes germinaux émergent de la spore. La croissance apicale et axillaire de ces tubes permet la formation d'un mycélium qui, après, 2 à 3 jours donne un hyphe aérien. À la fin de cette phase de croissance aérienne, l'hyphe se divise en compartiments qui donnent à nouveau des spores. L'extrémité de chaque hyphe forme un syncytium en forme de spirale qui contient plusieurs dizaines de génomes. A différents stades du cycle, différents gènes accomplissent chacun une fonction différente (Kieser et al., 2000).

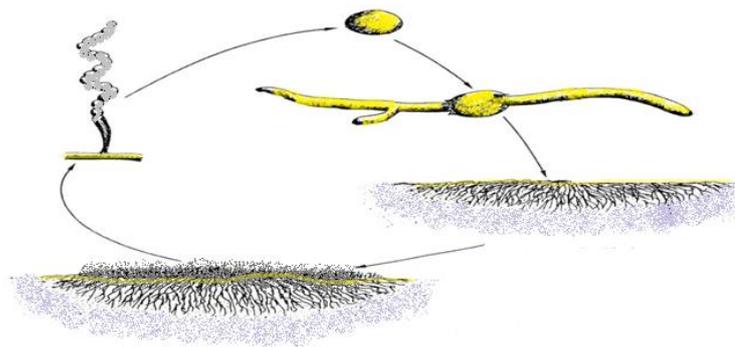


Figure 2: Cycle de vie de Streptomyces coelicolor (Adapté de Kieser et al., 2000)

1.2. Intérêts industriels des streptomycètes

Les Streptomycètes sont des bactéries non pathogènes et possèdent un important potentiel industriel grâce à la diversité des composés générés. Ils produisent plus de 50 % des antibiotiques de la pharmacopée disponible actuellement, parmi lesquels, on peut citer le Bialaphos (*S. hygroscopicus*), la Nystatine (*S. noursei*), la Bléomycine (*S. verticillus*), la Kanamycine (*S. kanamycetus*) et la Streptomycine (*S. griseus*) (Kieser et al., 2000). Les Streptomycètes sont également réputés pour un système de sécrétion des protéines très efficace. Elles produisent une grande variété de protéines d'importance industrielle en quantités non négligeables. Ces protéines sont souvent des enzymes extracellulaires comme les chitinases, les cellulases, les mannanases et les xylanases. Les cellulases sont impliquées dans la dégradation de nombreux biopolymères mais les hémicellulases ont la propriété de dégrader la lignocellulose. Les xylanases ont la capacité de dégrader l'hémicellulose du bois (Gusek et Kinsella, 1992).

Bien que certaines de ces enzymes puissent être produites en utilisant *Escherichiacoli* ou *Bacillus subtilis* comme hôtes spécifiques, *S.lividans* peut être l'hôte préférée pour une sécrétion efficace d'enzymes actives (Kim et al., 2011). Certaines enzymes comme les xylanases ont la capacité de dégrader spécifiquement l'hémicellulose du bois. Ces enzymes sont à la base d'un procédé biotechnologique mis au point pour le bio-blanchiment des pâtes à papier en remplacement de produits polluants à base de chlore (Viikari et al., 1991).

2. La Xylanase

Les xylanases sont des enzymes qui ont la propriété d'hydrolyser le xylane, une composante majeure de l'hémicellulose des bois durs, pour donner des chaînes courtes de xylo-oligosaccharides de longueur variable. Elles clivent les liaisons β -1,4 présentes dans le xylane conduisant à la formation des xylooligosaccharides de plus petites tailles (**Figure 3**) (Zhu, Y., et al., 2012). Sur la base d'homologie de la structure primaire, la plupart des xylanases ont été classées en familles d'hydrolases de glycoside 10 et 11 (GH10 et GH11 respectivement) (Henrissat et Bairoch, 1993). Les xylanases sont donc considérées comme étant des β -1,4, xylane xylano-hydrolases (E.C. 3.2.1.8).

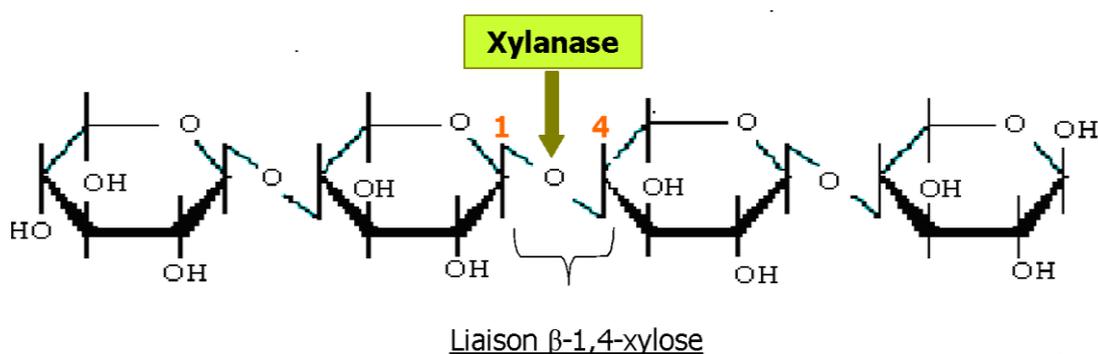


Figure 3: Digestion du xylane par la xylanase au niveau de la liaison Beta-1,4-xylose.

Les xylanases dérivées de champignons et de bactéries ont attiré beaucoup d'attention ces dernières années en raison de leur potentiel biotechnologique dans divers procédés industriels (Polizeli et al., 2005).

2.1. Les xylanases en Biotechnologie industrielle

L'étude des xylanases a connu, au cours des cinq dernières décennies, un essor considérable stimulé par les multiples possibilités d'applications industrielles:

- Au niveau agro-alimentaire: L'hydrolyse de certaines céréales riches en hémicelluloses facilite leur digestion par les animaux.
- En industrie alimentaire: Les xylanases sont utilisées comme additifs dans la farine de blé pour améliorer la manipulation de la pâte et la qualité des produits cuits au four (Jiang et al., 2008). Elles sont également largement utilisées dans la dégradation des arabinoxylanes dans les ingrédients de la nourriture, pour réduire la viscosité de la matière première et améliorer la nutrition (Silversides et al., 2006).
- Industrie du carburant: La fermentation de sucres issus de l'hydrolyse totale des

déchets hémicellulosiques par certains microorganismes peut servir à produire de l'éthanol, un carburant non polluant et renouvelable ainsi que divers produits chimiques.

- Industrie papetière: L'application industrielle qui retient davantage l'attention au cours des dernières années est l'utilisation des xylanases comme substances d'intérêt à la base de certains procédés biotechnologiques (biosynthèse microbienne) mis au point pour l'industrie du bio-blanchiment des pâtes à papier (Vicuna et al., 1995). La xylanase est ainsi utilisée à la place du chlore pour augmenter l'extractibilité de la lignine pour la fabrication de papier de haute qualité.

L'utilisation de xylanase pour remplacer ou réduire la quantité de chlore utilisé dans le blanchiment des pâtes aurait un effet positif sur l'impact environnemental du processus. La xylanase utilisée dans les applications de bio-blanchiment est généralement de la famille 11 des xylanases. En effet, une faible masse moléculaire de l'enzyme est souhaitable pour la pénétration dans la fibre et un manque d'activité de cellulase est nécessaire pour maintenir le rendement en pâte.

Étant donné l'importance de la xylanase A en industrie et la nécessité d'améliorer sa production chez les Streptomycètes, plusieurs équipes de recherche se sont mis à la compréhension et l'amélioration du système de sécrétion chez *S. lividans*.

3. La sécrétion chez les Streptomycètes

Les Streptomycètes bénéficient d'un système de sécrétion très efficace. Ayant pour la plupart un comportement de saprophytes non pathogènes et étant très souples au niveau nutritionnel, les Streptomycètes constituent d'excellents modèles pour l'expression de protéines homologues et hétérologues (Anné et Van Mellaert, 1993; Tomotsune et al., 2014). L'efficacité accrue de la machinerie de sécrétion des Streptomyces est due au fait que les protéines sont directement relâchées dans le milieu extérieur et non retenues au niveau du périplasme, réduit chez les bactéries à Gram positif (Gilbert et al., 1995). Chez les bactéries Gram négatives, les protéines produites doivent traverser la membrane interne, le périplasme puis la membrane externe avant de se retrouver dans le milieu extracellulaire (Gennity et al., 1990; Dolan and Oliver, 1991; Driessen et al., 1998; de Gier et al., 1996; Ayadi et al., 2007). L'efficacité de production est donc diminuée car les protéines peuvent rester prisonnières dans le périplasme ou dans le cytoplasme sous forme de corps d'inclusion dont la récupération n'est pas toujours facile (**Figure 4**).

La translocase Sec bactérienne est composée d'un canal conducteur formé de protéines intégrées dans la membrane (PCC). Ce canal est constitué de trois protéines membranaires

intégrées, SecY, SecE et SecG et d'une ATPase associée périphérique, SecA, qui fonctionne comme un moteur moléculaire pour conduire la translocation des protéines sécrétoires à travers la membrane (**Figure 4**). Les sous-unités SecY et SecE du canal, et la sous-unité motrice SecA sont des composants essentiels de la Sec-translocase et sont hautement conservées chez les bactéries. SecA s'associe de manière périphérique au PCC pour accepter les protéines sécrétoires à partir des chaperonnes SecB (**Figure 4(b)**) ou du ribosome (**Figure 4(a)**), pour enfiler les protéines dépliées à travers un canal transmembranaire étroit formé par le PCC. L'ATP et la force motrice du proton (PMF) fournissent l'énergie nécessaire à ce processus.

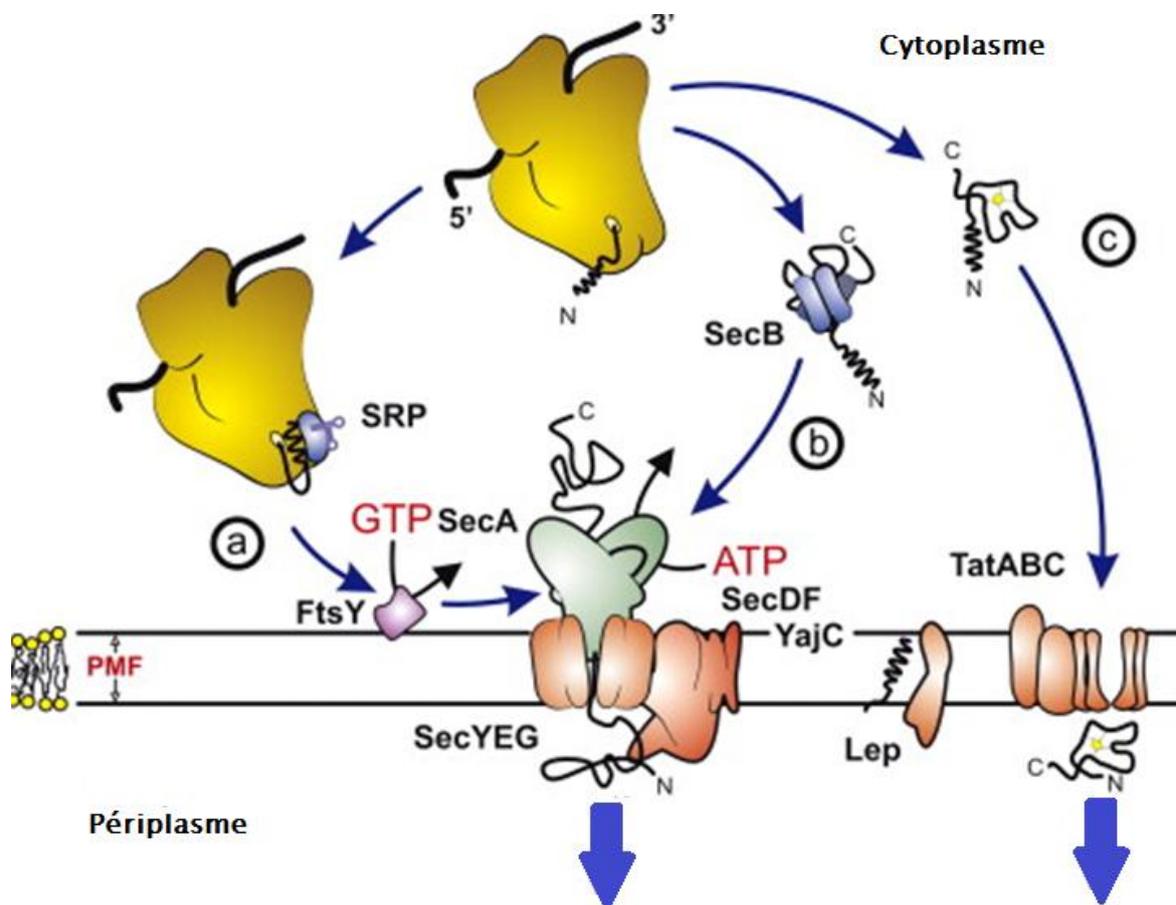


Figure 4 : Système de sécrétion SEC et TAT chez les bactéries (Extrait et adapté de Natale et al., 2008).

Les systèmes fonctionnels de translocation Tat (Twin-arginine-translocation) sont retrouvés dans les membranes cytoplasmiques de nombreuses bactéries et archées, ainsi que dans les membranes des thylakoïdes des plastides végétaux. Il existe également des preuves génomiques sur la présence des systèmes Tat dans les mitochondries végétales. Les translocases Tat sont constituées de deux ou trois sous-unités intégrées dans la membrane,

c'est-à-dire TatA et TatC ou TatA, TatB et TatC, qui forment ensemble un récepteur et un ensemble pour la conduction de protéines pour les substrats de Tat (**Figure 4(c)**). L'énergie pour la translocation est assurée par le PMF (force motrice du proton). Les systèmes Tat permettent de transloquer des protéines pliées à travers les membranes biologiques par opposition des systèmes système Sec, qui ne permettent de faire transloquer essentiellement que des protéines dépliées. Il a été aussi proposé que le système Tat ne soit utilisé que dans les cas où le pliage cytoplasmique exclut l'utilisation du système Sec (**Figure 4**) (Natale et al., 2008).

Les protéines sécrétées se retrouvent ainsi directement dans le milieu de culture, ce qui facilite leur récupération. Ces protéines sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui possède à l'extrémité N-terminale une séquence appelée peptide signal (ps) (Fass and Engels, 1996). Ce dernier est clivé au niveau de la membrane cellulaire libérant ainsi la protéine mature destinée à être sécrétée. Les ps des Streptomycètes ont la particularité d'être très longs. Certains d'entre eux, comme les gènes encodant la cellulase A (CelA) et la mannanase A (ManA), pourraient même posséder deux codons d'initiation de la traduction, situés dans le même cadre de lecture et précédés chacun d'un site d'attachement des ribosomes (ou RBS) plus ou moins défini. Selon le codon de départ sélectionné, un précurseur protéique long ou court sera synthétisé (Morosoli et al., 1997; Geukens et al., 2001).

Plusieurs études ont démontré l'importance de la phase de l'initiation de la traduction dans le processus de l'expression des enzymes. Pour répondre aux besoins des industries du papiers et l'industrie alimentaire, plusieurs équipes de recherche ont orienté le processus d'optimisation de la production de la xylanase A vers la compréhension et la modulation des paramètres qui régulent l'initiation de la traduction.

4. L'initiation de la traduction

Le processus d'initiation de la traduction se base sur trois grandes étapes principales. La première consiste à la reconnaissance du site d'initiation de la traduction par le ribosome. Cette étape principale est modulée par l'intervention de trois facteurs nommés les facteurs IF1, IF2 et IF3. Ce sont des protéines monomériques (Gualerzi et al., 1990) dont le fonctionnement commence avec la fixation des facteurs IF-1 et IF-3 à la petite sous-unité 30S du ribosome pour prévenir la formation prématurée du complexe 70S (Gualerzi et al., 2000). Ensuite, le facteur IF-2-GTP se fixe à la sous-unité 30S du ribosome afin de faciliter la fixation du fMet-ARNt méthylé. Le complexe 30S se fixe avec son interface

ribonucléique (ARNr 16S) sur l'ARNm au niveau du codon initiateur (5'AUG3') tout en se joignant à la grande sous-unité 50S du ribosome. Cette interaction est dirigée par l'appariement des bases complémentaires des séquences d'ARN, une **séquence consensus**, le motif **Shine-Dalgarno (SD)** riche en bases puriques sur l'ARNm et la séquence anti-Shine-Dalgarno (anti-SD) sur l'ARNr 16S (kozak 1983 et 1999).

Pour accéder au centre de décodage du ribosome, l'ARNm emprunte un tunnel et y rentre à travers un pore. Ce dernier comprend un loquet (zone encerclée en bleu) (**Figure 5**) (Schluenzen et al., 2000) comprenant des hélices H33/H34 et H16/H18 et créant des connections non covalentes entre la tête et le corps de la sous-unité 30S ce qui lui donne une conformation active. Ainsi, le loquet se referme donnant lieu à une géométrie spéciale au ribosome permettant une processivité et une fidélité correcte de l'ARNm. En cas d'un changement conformationnel au niveau de la tête et/ou de la plateforme causant une translocation du complexe ARNt-ARNm, le loquet indique la bonne direction à l'ARNm et empêche la dissociation du complexe 30S (Brian et al., 2000).

Le troisième stade de l'initiation de la traduction se fait sous l'intervention de la sous-unité 50S du ribosome qui joint le complexe d'initiation 30S. Les facteurs IF-1 et IF-3 sont ainsi détachés et la molécule GTP liée au facteur IF-2 est hydrolysée en GDP. Le complexe IF-2-GDP et le résidu phosphate sont dissociés.

Ainsi, au début de l'initiation de la traduction, les deux sous-unités 30S et 50S du ribosome sont dissociées. Puis, la petite sous-unité 30S forme un complexe avec l'ARNm au niveau du codon initiateur et l'ARNt portant la formyl-méthionine initiale (ARNt initiateur). La grande sous-unité 50S va alors s'ajouter à cet ensemble. Le ribosome 70S est alors complet. L'élongation et la terminaison continuent ensuite le processus de synthèse d'une chaîne polypeptidique complète par la traduction de la séquence d'ARNm.

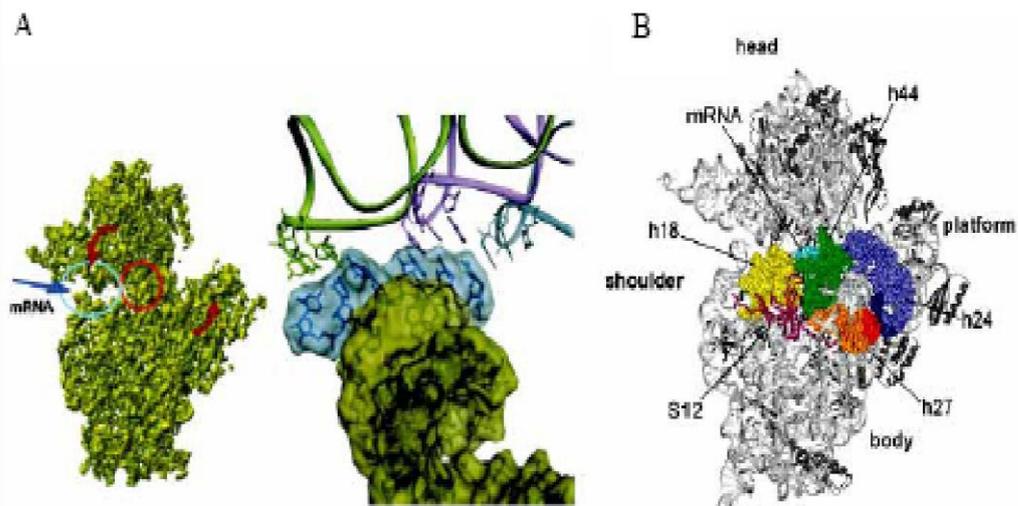


Figure 5 : Structure tridimensionnelle du ribosome en cours d'initiation de la traduction (Bélangier et al., 2004).

A : Le centre de décodage est entouré par un cercle rouge. La pénétration de l'ARNm au tunnel situé entre les deux sous unités est indiquée par une flèche bleue. Les mouvements relatifs de la tête et de la plateforme qui facilitent l'entrée de l'ARNm sont indiqués par des flèches rouges. A droite, une image de la région du centre de décodage montre les positions des boucles anticodons des ARNt et les codons de l'ARNm. D'après (Cate et al., 1999). La région haute de l'hélice 44 est visualisée en olive, les deux codons de l'ARNm en bleu et les bases de l'ARNt situées au site A en vert, au site P en violet et au site E en gris (Schluenzen et al., 2000). **B :** Structure cristallographique de la petite sous-unité de *T. thermophilus* a montré que l'ARNm au site A est entouré par les hélices de l'ARNr 16S. L'ARNr est représenté en gris clair, les protéines ribosomiques sont en gris foncé.

4.1. L'ARNm

De tous les éléments qui jouent un rôle dans l'initiation de la traduction, le plus variable est sans contredit l'ARNm. Sa composition et sa structure déterminent la force ainsi que la fréquence de l'interaction avec le reste de la mécanique de traduction (Farmer et Janssen, 1999). Le contact qui s'établit entre l'ARNm et la petite sous-unité ribosomale occupe une fonction particulièrement importante puisqu'il est grandement responsable de l'efficacité du processus de traduction, Ce contact s'effectue sur l'ARNm, au niveau du site d'attachement des ribosomes : le **RBS** (de l'anglais «**R**ibosome **B**inding **S**ite»).

4.2. Le site de fixation des ribosomes (RBS)

Le Site de fixation du ribosome (ou RBS) se définit comme étant la région de l'ARNm à laquelle se fixe le ribosome, au tout premier stade de l'initiation de la traduction. Selon Steitz et Jakes (1975), un RBS conventionnel s'étend approximativement de -15 à +15 nucléotides (nt) du codon de départ. La caractéristique principale d'un RBS « fort » ou efficace est de permettre son attachement fréquent aux ribosomes, ce qui a pour conséquences de protéger l'ARNm de la dégradation par des ribonucléases (Farmer et Janssen, 1999). Pour être efficace, le RBS doit donc comporter des séquences spécifiques facilitant sa reconnaissance par les ribosomes. Parmi celles-ci figure, bien entendu, le codon d'initiation de la traduction, un constituant essentiel du RBS. Presque invariablement, le RBS des ARNm d'*E. coli* contient également, en amont du codon d'initiation de la traduction, une séquence Shine-Dalgarno (SD) (AGGAGG) complémentaire à une courte région de l'ARNr 16S. La distance qui sépare la séquence SD du codon d'initiation de la traduction joue, elle aussi, un rôle crucial dans la fixation du ribosome à l'ARNm (Gold et al., 1981).

La figure 6 représente les liens entre les trois éléments responsables de l'initiation de la traduction. La DB (représentée par une boîte bleue), située sur l'ARNm en aval du codon d'initiation de la traduction, s'hybride à l'ADB (également en bleu), entre les nt 1469 et 1483 de l'ARNr 16S. Cette interaction engendre des changements de conformation au niveau de l'ARNr 16S qui rapprochent l'ASD (boîte jaune sur l'ARNr 16S) de la SD (boîte jaune sur l'ARNm). Les interactions DB-ADB et SD-ASD permettent de rapprocher la région décodante de l'ARNr 16S (en vert) tout près du codon d'initiation de la traduction (représenté en rouge, par un AUG) ce qui facilite le processus d'initiation de la synthèse protéique.

La machinerie permettant l'enchaînement des acides aminés est très complexe, elle se réalise au niveau du ribosome et fait intervenir de nombreux facteurs aussi bien protéiques que nucléiques (Farabaugh et al., 1993).

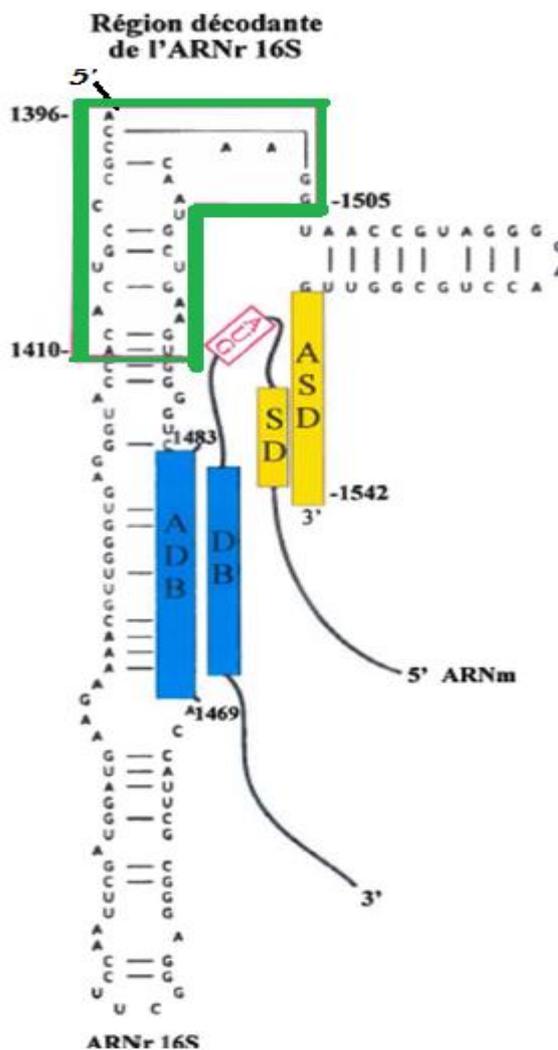


Figure 6 : Modèle, proposé par Sprengart et son équipe, de l'interaction entre la «Downstream Box» (DB) de l'ARNm et «l'Anti-Downstream Box» (ADB) de l'ARNr 16S durant le processus d'initiation de la traduction, en présence d'une séquence Shine-Dalgarno (SD) (Extrait et adapté de Sprengart et al., 1996)

4.3. Le peptide signal des streptomycètes

Chez les streptomycètes, bactéries Gram positives, les protéines sont sécrétées directement dans le milieu de culture tandis que la majorité des protéines libérées par les bactéries Gram négatif sont sécrétées dans le périplasma ou bien intégrées à la membrane externe (Morosoli et al., 1997). Les protéines à exporter d'abord sont synthétisées sous forme de précurseurs, comportant, à leur extrémité N-terminale, un peptide signal (ps). Cette séquence, longue d'environ 25 acides aminés (aa), joue un rôle important dans le processus de sécrétion (Von Heijne et Abrahmsén, 1989). N'étant pas replié, il constitue la séquence nécessaire à la translocation. Ce ps serait responsable de l'adressage de la pré-protéine vers la membrane cytoplasmique ainsi que de son insertion dans cette membrane (Pugsley, 1993 ; Jones et al.,

1990). Après la translocation, le ps est clivé par un signal peptidase livrant ainsi la protéine mature (Pugsley, 1993).

Malgré que les séquences de ces ps diffèrent entre les microorganismes, ils sont caractérisés par la similitude de leur structure subdivisée en domaines N, H et C (Von Heijne, 1985). La **figure 7** représente l'organisation de la structure des ps de précurseurs bactériens. La taille des ps des streptomycètes est particulièrement importante et peut atteindre jusqu'à 70 aa. Cela est dû principalement à l'étendue de leur domaine N. Le domaine N, constitué de 2 à 15 résidus, est polaire et affiche une charge nette positive, le surplus de résidus arginine dans le domaine N des ps des streptomycètes confère à celui-ci une charge nette positive de 3,5 (Pugsley, 1993). Ce domaine N ou cationique permet l'interaction électrostatique avec la membrane chargée négativement. De plus, le caractère basique de ce domaine renforce le contact avec la protéine SecA, un des constituants principaux du système de sécrétion (Lammertyn et Anné, 1998). Ainsi, l'élimination des aa chargés de l'extrémité N-terminale du ps aurait a pour conséquence de réduire l'efficacité de sécrétion des protéines (Pugsley, 1993).

Le domaine H (> 8 résidus) est composé en majeure partie de résidus hydrophobes. Son contenu élevé en alanine et en leucine lui confère la configuration d'une hélice α . Le domaine C est la petite région carboxy-terminale qui contient la séquence consensus reconnue par la « signal peptidase » LepB ou LspA. Ce domaine débute la plupart du temps par un aa comme la proline ou la glycine, capable de former une boucle J3 qui expose le site de clivage du ps afin de le rendre plus accessible à la « signal peptidase » (Pugsley, 1993).

Les cercles roses représentent les résidus chargés ou polaires. Les cercles bleus correspondent aux résidus hydrophobes ou apolaires. Les premiers aa de la protéine mature sont illustrés par des cercles gris. Les aa les plus souvent retrouvés dans chacun des domaines sont indiqués par leur lettre correspondante.

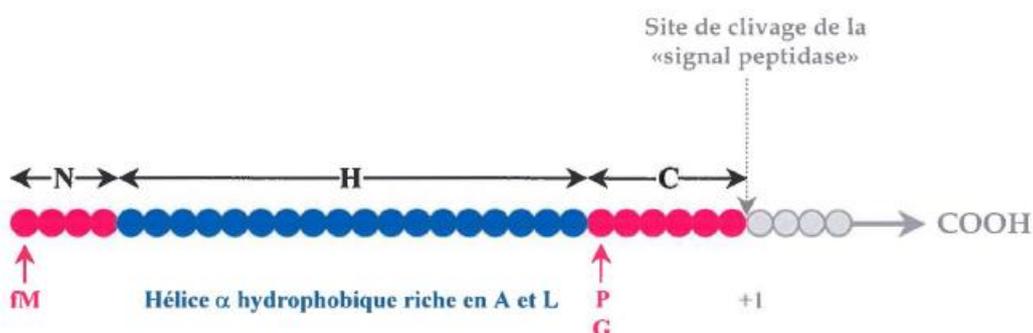


Figure 7 : Schématisation d'un ps de précurseur bactérien (Extrait et adapté de Pugsley, 1993).

Selon Izard et al. (1996) les domaines N et H agissent de concert, et non pas indépendamment l'un de l'autre, puisqu'une mutation dans l'une de ces deux régions peut être compensée par des changements dans l'autre domaine. En diminuant la taille du domaine H, qui dépasse normalement 8 résidus, ou en y introduisant des aa chargés ou fortement polaires, la sécrétion des protéines s'en trouve grandement affectée (Pugsley, 1993).

Outre les caractéristiques communes qui viennent d'être énumérées, la composition des ps connaît des différences notables. Celles-ci sont résumées à la figure 6. Par exemple, la taille des ps des streptomycètes atteint en moyenne 35 aa, et elle peut aller jusqu'à 70 aa de long, alors que les autres bactéries à Gram positif ont des ps moins longs de 29 à 31 aa (Von Heijne et Abrahamsén, 1989 ; Park et al., 1991). Quant aux ps d' *E. coli*, ils dépassent rarement les 25 résidus (Gilbert et al., 1995). Si les ps des streptomycètes sont nettement plus longs que ceux des autres bactéries, c'est principalement à cause de l'étendue de leur domaine N et, dans une moindre mesure, à la présence de résidus supplémentaires dans la région H.

Les aa additionnels localisés dans le domaine N des ps des streptomycètes sont plus souvent des résidus arginine (Lammertyn et Anné, 1998). La région amino-terminale du ps des streptomycètes est composée de 35% d'arginines et 3% de lysines contre 10% d'arginines et 35% de lysines pour les autres bactéries. La région cationique des ps des streptomycètes affiche donc une charge nette de + 3,5 comparativement à +2,9 pour les bactéries Gram positif et +2 pour *E. coli* (**Tableau 1**). Ce surplus de charges positives est attribuable à la présence des résidus arginine (Von Heijne et Abrahamsén, 1989).

Tableau 1 : Caractéristiques générales des ps des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des streptomycètes.

Bactéries	Streptomycètes	Gram positives	Gram Négatives
Longueur du ps	30 à 70 aa	29 à 31 aa	22 à 25 aa
Longueur du domaine N	3 à 30 aa	3 à 15 aa	3 à 8 aa
Charge du domaine N	+3,5	+3	+2,9

4.4. La machinerie impliquée dans l'enchaînement des acides aminés

4.4.1. Le ribosome des procaryotes

Le ribosome est une macromolécule ribonucléoprotéique (RNP) qui décrypte l'ARNm en une séquence polypeptidique. Il constitue une véritable usine à protéines. Chez les bactéries,

il dirige la synthèse protéique à la vitesse de 15 à 20 acides aminés par seconde. Sa masse moléculaire varie, de 25103 Da chez les procaryotes à 45103 Da chez les eucaryotes. Le ribosome des procaryotes est doté d'une structure très complexe composée dans un tiers en protéines, les deux autres tiers sont formés d'ARNr. Il comporte deux sous-unités inégales décrites par leurs coefficients de sédimentation. Chez les procaryotes, ce facteur est de 30S pour la petite sous-unité et 50S pour la grande sous-unité (**Figure 8**). Chaque unité est constituée d'ARN ribosomiques (ARNr) et de plusieurs protéines. Chez les procaryotes (exemple: *E. coli*), trois ARNr et 54 protéines sont impliqués dans la construction du ribosome fonctionnel. la grande sous-unité est formée des ARNr 23S (2900 bases) et 5S (120 bases) associés aux 33 protéines ribosomales alors que la petite sous-unité contient l'ARNr 16S (1540 bases) et 21 protéines.

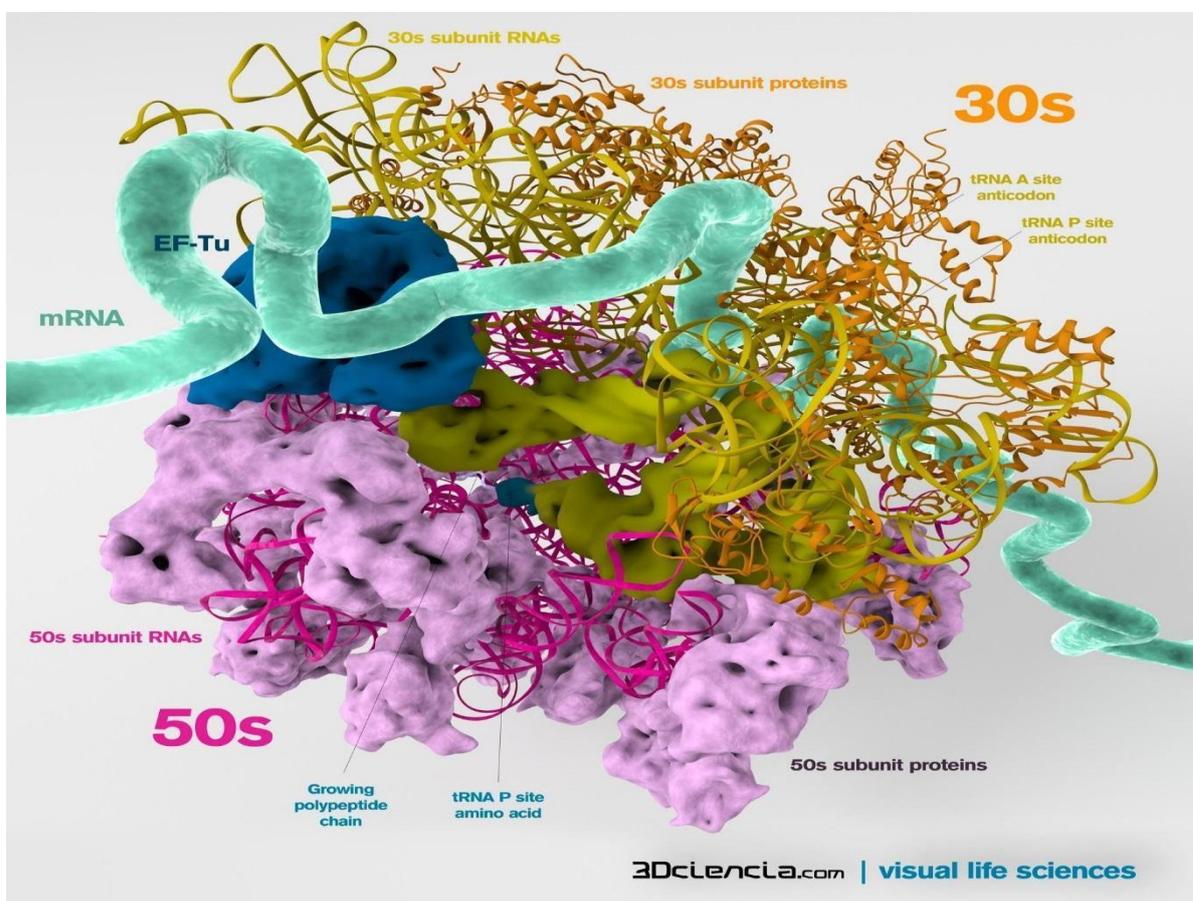


Figure 8 : Schématisation tridimensionnelle d'un ribosome de bactérie.

(<http://3dciencia.com/blog/2011/02/bacterial-ribosome-internal-structure/>).

4.4.2. La grande sous-unité du ribosome

La grande sous-unité dirige la formation de la liaison peptidique au cours de la traduction

(Lafontaine et Tollervey, 2001; Spahn et al., 2001; Yusupova et al., 2001). La structure tridimensionnelle de la sous-unité 50S (**Figure 8**) a permis de définir le ribosome en tant qu'un grand ribozyme dont l'activité catalytique est essentiellement dirigée par l'ARNr 23S et ses protéines sont surtout responsables de maintenir sa structure (Noller, 1991; Green et Noller, 1997; Yusupova et al., 2001; Nissen et al., 2001; Wilson et Nierhaus, 2003).

4.4.3. La petite sous-unité du ribosome

La petite sous-unité du ribosome, chez les procaryotes organise la translocation de l'ARNm et de l'ARNt et contrôle la fidélité de l'interaction codon-anticodon. L'observation de la structure en trois dimensions (3D) (**Figure 8**) de la petite sous unité du ribosome montre la présence d'un sillon conservé sur sa surface qui représente le tunnel d'entrée. Ce tunnel permet à l'ARNm de pénétrer facilement dans le ribosome. Trente nucléotides d'ARNm sont enfouis dans le ribosome. La structure tridimensionnelle de la sous-unité 30S, en processus de la traduction montre que l'ARNm interagit directement avec l'ARNr 16S (Wimberly et al., 2000; Ogle et al., 2005). Ce dernier, joue un rôle important dans le processus de la traduction. La structure secondaire de l'ARNm a un effet considérable l'efficacité de sa fonction. La structure secondaire de l'ARNm chez *S.lividans* est très riche en épingle à cheveux vu la richesse du génome de cette bactérie en bases G et l'épingle à cheveux n'est cependant pas le seul motif de structure secondaire chez les ARNm mais, bien d'autres structures existent comme par exemple la boucle interne ou le coude.

L'étude de la structure secondaire de l'ARNr 16S (**Figure 9**) peut nous aider à expliquer les causes de certains faits dans la traduction comme sa diminution voir même son arrêt. En effet, l'emprisonnement du site de fixation du ribosome dans une structure secondaire d'ARNm engendre une nette diminution, voire même l'arrêt, de la traduction (Ganoza et al., 1987; De Smit & Duin, 199; De Smit, 1998), notamment quand il s'agit d'un degré de repliement plus élevé de l'ARN.

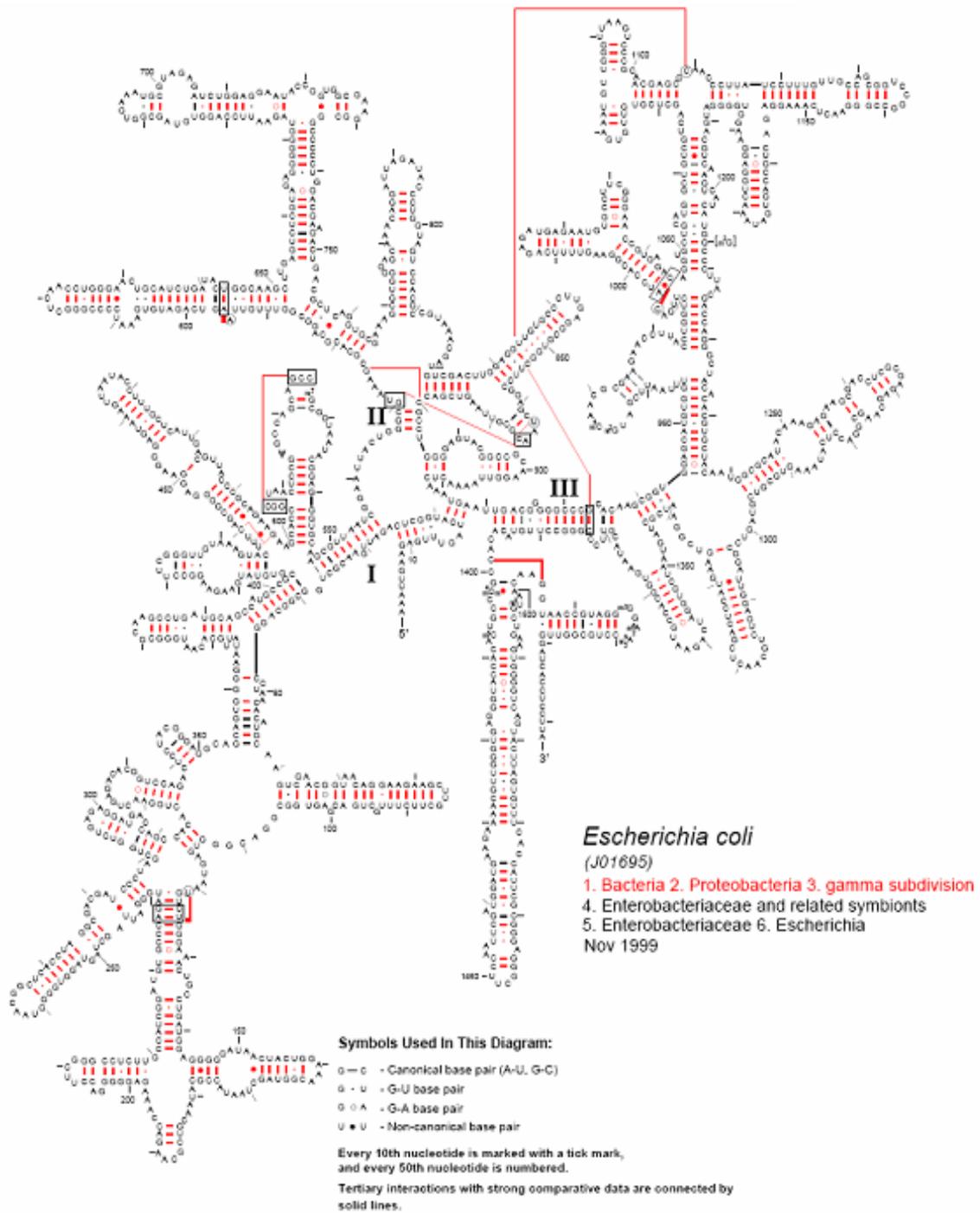


Figure 9 : Structure secondaire de l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome des procaryotes. (www.rna.icmb.utexas.edu)

Le rôle de ce dernier est en effet déterminant dans l'élaboration de la structure globale du ribosome ainsi que dans sa capacité à positionner les ARNt sur l'ARNm et la formation des liaisons peptidiques covalentes grâce à son activité catalytique. Ceci, par exemple, est élucidé dans le cas des structures parfaitement tridimensionnelles provenant du repliement des ARN ribosomaux de façon fortement compacte donnant lieu à un cœur au ribosome. Ce dernier confère au ribosome sa forme globale précise.

La structure tertiaire de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité du ribosome (**Figures 10 et Figure 11**) représente un niveau de repliement supérieur de l'ARN, vis à vis la structure secondaire. Elle est constituée essentiellement de l'interaction de motifs secondaires (Figure 12) sur courtes ou longues distances. L'ensemble forme une structure en 3 dimensions plus complexe que celle amorcée par la structure secondaire.

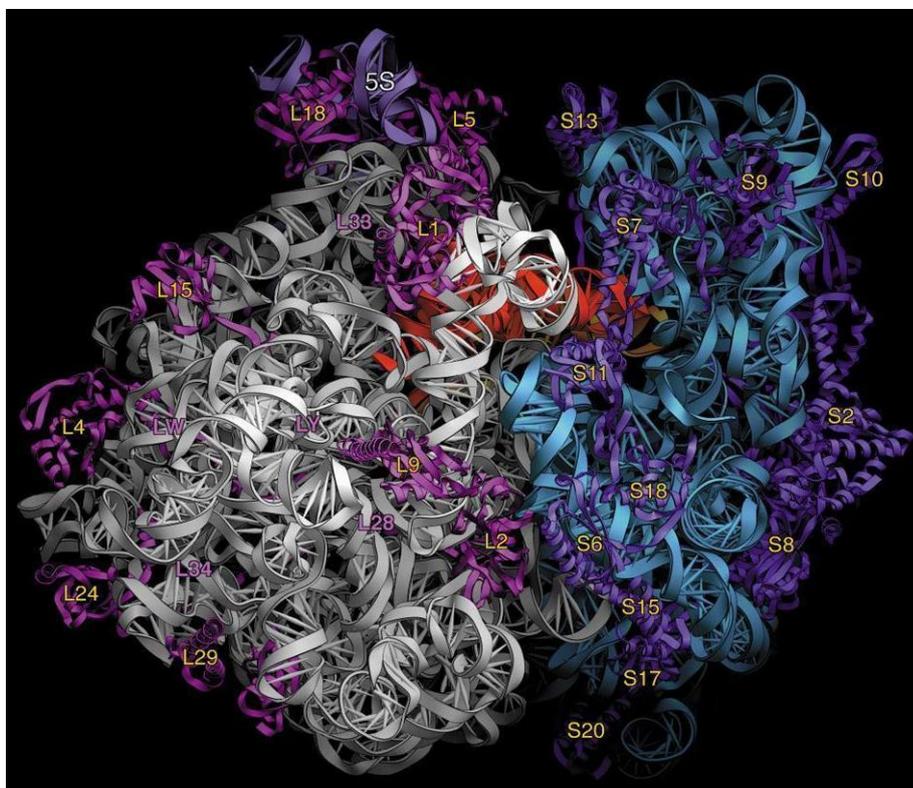


Figure 10 : Schématisation de la structure tertiaire de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité du ribosome d'E.coli (configuration en bleu à droite).(http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html)

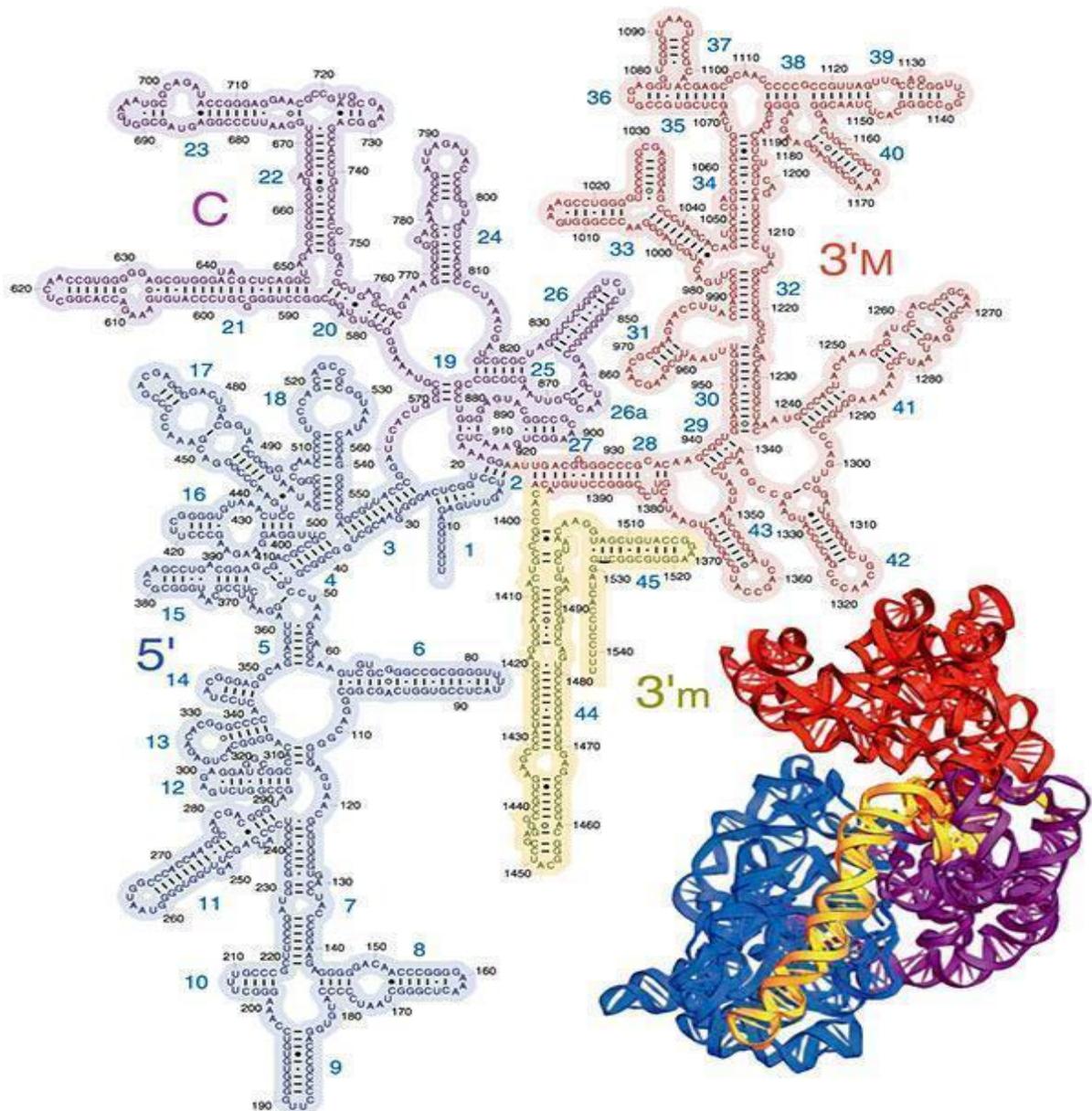


Figure 11 : Schématisation de la structure tertiaire de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité du ribosome des prokaryotes (configuration en bas au coin droit). (http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html).

Un exemple de motif tertiaire est le pseudonœud (**Figure 12**). Un pseudonœud isole une boucle (comme un nœud) sans qu'un brin traverse une boucle comme dans un vrai nœud. Il est constitué de l'interaction d'une boucle d'une structure secondaire avec une séquence complémentaire située en dehors de la boucle. Cette séquence ne traversant pas la boucle, la structure est dénommée pseudonœud. Les pseudonœuds sont très souvent présents dans les ARN. Ils fournissent souvent un point d'ancrage aux protéines, notamment dans l'ARNm et l'ARNr 16S. Un exemple intéressant d'un de leur rôle est le changement de cadre de lecture traductionnelle des messagers vers la gauche qu'ils peuvent induire. Un tel changement de cadre se produit lorsque le ribosome "dérape" d'un nucléotide vers la gauche (changement de

cadre -1), changeant ainsi le cadre de lecture et donc induisant une protéine complètement différente. Ce changement peut être "programmé" dans la structure de l'ARNm en cours de traduction. Il suffit qu'un pseudonoeud soit présent en amont d'une séquence hexanucléotidique composée d'une série de 4 à 6 nt identiques dite de "glissement". Le pseudonoeud va, par sa structure tertiaire, induire une pause du ribosome. Cette pause permet le dérapage d'un nucléotide vers la gauche avant la poursuite de la traduction de l'ARNm (Plant et al., 2003).

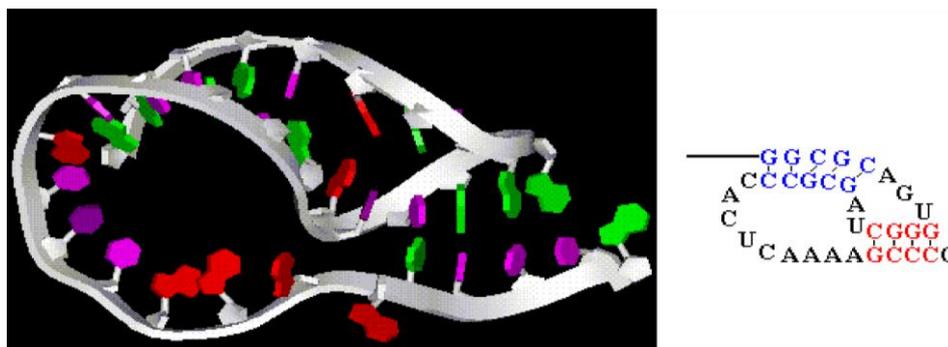


Figure 12 : Un exemple de pseudonoeud (extrait et modifié de Plant et al., 2003).

5. Travaux antérieurs pour l'amélioration de la traduction de la xylanase A chez *S. lividans*

Les streptomycètes sont connus pour la production d'enzymes extracellulaires telles que des protéases, des agarases, des xylanases, des chitinases, etc. (Gusek et Kinsella, 1992). Le système de sécrétion des Streptomycètes se distingue également par l'importance du taux d'expression de certaines protéines homologues comme la TNF à 20 mg/l (Bender et al., 1998) et l'Hirudine à 250-500 ng/ml (Chang et Chang, 1988). Les Streptomycètes constituent un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de sécrétion (Gilbert et al., 1996) et de les exploiter donc pour l'élaboration d'une souche bactérienne hyperproductrice. En effet, depuis quelques années, de nombreuses expériences de mutagenèse dirigée ont été menées à bien sur les ps des Streptomycètes pour faire de celles-ci des compétiteurs pour la production de protéines homologues ou hétérologues (Kutzner et al., 1981; Gilbert et al., 1995; Giannotta et al., 2003; Tomotsune et al., 2014).

5.1. Échange des différents peptides signaux des Streptomycètes

L'équipe de Pagé, (1996) s'est interrogée si la substitution d'un ps par celui d'une autre enzyme peut optimiser les taux de sécrétion d'une protéine particulière. Pour tester leur hypothèse, le groupe de chercheurs s'est servi du gène de la xylanase A de *S. lividans* comme modèle. Le ps de cette enzyme fut remplacé successivement par six ps homologues provenant de *S. lividans* soient les ps de la xylanase B, la xylanase C, la mannanase A, la cellulase A, la cellulase B et l'acétyl-xylane estérase.

L'approche de Pagé et ses collaborateurs se révèle un succès en ce qui concerne les précurseurs de l'**acétyl-xylane estérase**, la **xylanase B**, la **mannanase A** et la **cellulase A** pour lesquels les taux de xylanase A produite atteignent respectivement **120%**, **90%**, **87.5%** et **75%** de ceux du ps sauvage (Pagé et al., 1996). Mais bien qu'en interchangeant les ps, les chercheurs parviennent à frôler les niveaux des protéines obtenus grâce au ps sauvage et aucun des remplacements opérés n'augmente de façon significative la production de xylanase A (Morosoli et Dupont, 1999).

Une attention un peu plus soutenue aux séquences des ps des Streptomycètes a permis de constater qu'en amont du ps de plusieurs gènes, il est possible de trouver un autre codon d'initiation de la traduction, en phase avec le premier, et précédé d'une séquence Shine-Dalgarno plus ou moins bien conservée. Une telle organisation est notamment retrouvée dans les ps des gènes encodant la mannanase A (ManA), la cellulase A (CelA), la chitosanase, l'inhibiteur de subtilisine et l'estérase (Pagé et al., 1996). La présence de deux codons d'initiation de la traduction, situés dans le même cadre de lecture, pourrait supposer une forte augmentation des taux de production d'enzyme si ces codons sont utilisés simultanément lors de la traduction. Afin de vérifier cette hypothèse, les séquences codant les ps de la Man A et celui de la CelA ont été fusionnées avec le gène de la xylanase A de *S. lividans* (**Figure 13**).

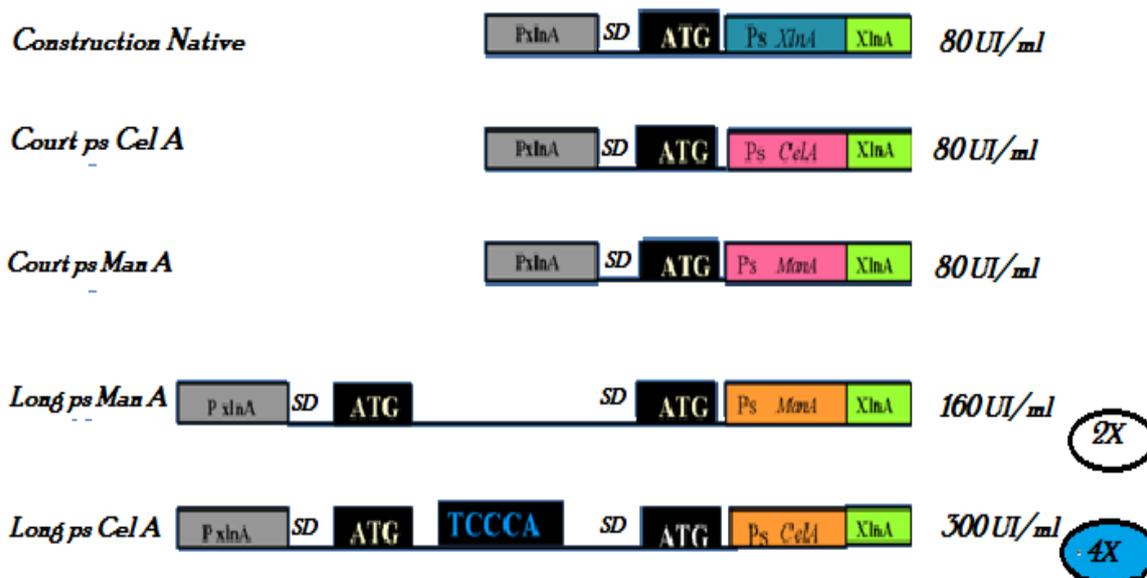


Figure 13 : Echange du ps(XlnA) par le court ps(CelA), le court ps(ManA), le long ps(ManA) puis par le long ps (CelA) de *S.lividans*.

Dans la construction native du gène de la XlnA, la boîte bleue représente le ps sauvage de la XlnA. La boîte verte représente le gène de la XlnA dans toutes les constructions. Le gène de la XlnA est précédé du ps de la XlnA et du codon d'initiation de la traduction, ATG. En amont de ce dernier, on retrouve la séquence Shine-Dalgarno (SD) et le promoteur de la XlnA (PxlnA, représenté par la boîte grise). Les boîtes roses représentent les courts ps de la CelA et de la ManA. Les boîtes de couleur orange représentent la partie courte du long ps de la ManA et de la CelA, ces deux dernières précédées par deux codons d'initiation de la traduction (ATG) en phase. En amont de chacun de ces codons, il existe une séquence SD.

5.2. Alignement du peptide signal de la CelA avec l'ARNr 16S

Un alignement du long peptide signal de la *celA* avec l'ARNr 16S de *S. lividans* montre la présence d'une séquence de 5 nucléotides (TCCCA) complémentaire à une séquence d'ARNr 16S (AGGGU à la position 1461-1465) (**Figure 14**). Cette boîte de 5 nucléotides s'est avérée, selon l'équipe de Pagé (1996), être responsable de quadrupler le taux de production de l'enzyme par rapport à la construction native de *la xlnA*, mais également par rapport au long ps de la Mannanase A. Comme l'illustre la figure 14, cet alignement de séquences a permis d'identifier une complémentarité de séquence de 5 nt (TCCCA) entre l'ARNr 16S (entre les nt 1461 et 1465) et l'ARNm.

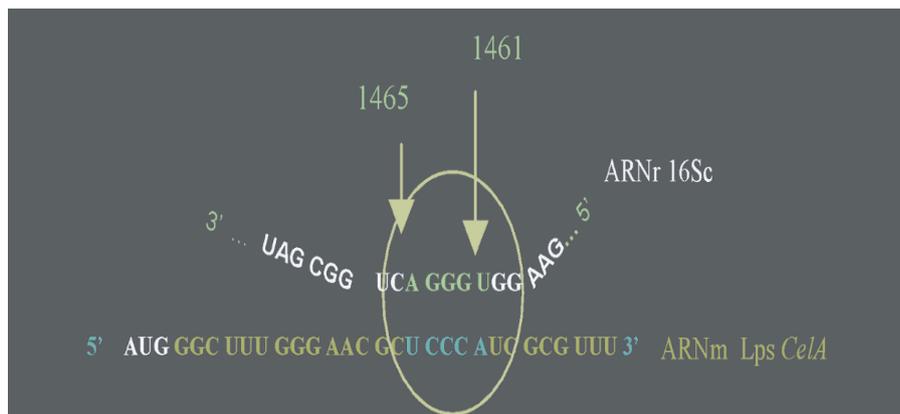


Figure 14 : Alignement de l'ARNm du ps (*CelA*) avec l'ARNr 16S.

Une complémentarité de séquences de 5 nt améliore la production de la xylanase d'un facteur 4, qu'advient-il alors si le nombre de nucléotides complémentaires par mutations est augmenté ou diminué.

5.3. Mutations au niveau du ps *CelA* en amont du gène *XlnA*

Kébir et ses collaborateurs (2000) ont procédé à des mutations au niveau du long peptide signal de la *CelA* en amont du gène de la xylanase A en changeant, par mutagenèse dirigée, le nombre de nucléotides complémentaires à l'ARNr 16S. Une séquence de 17 nucléotides complémentaires à l'ARNr 16S entre les positions 1454 et 1470 diminue fortement la production de xylanase A. Les résultats suggèrent que l'appariement de ces séquences complémentaires est trop important pour permettre au ribosome d'effectuer normalement la traduction de cet ARN messenger.

L'étude de cette longue séquence par étapes (**Tableau 2**) montre que les meilleures productions sont obtenues avec des séquences complémentaires de 6 à 8 nucléotides comprises à l'intérieur de la séquence de 17 nt décrite précédemment (Kébir et al., 2000). L'optimisation de la séquence de complémentarité entre l'ARNr 16S et l'ARNm du ps de la *CelA* en amont du gène de la xylanase A est une étape fondamentale pour améliorer la production de la xylanase A chez *S. lividans*. L'élaboration d'une souche bactérienne hyper-productrice d'enzymes et pouvant servir d'hôte de choix pour la production de protéines homologues et hétérologues passe par une bonne compréhension des processus qui modulent l'expression des gènes codant pour ces protéines (Tomotsune et al., 2014).

Tableau 2 : Mutations dans *ps(CelA)* en amont du gène *XlnA* (Kebir et al., 2000).

Nom	Séquence	UI/ml	L
ARNr 16S	TTC GTC CCA ATC GCC AGT CCC ACC TTC GAC TCC		
911-A.2	ATC GGC TTT <u>ATC GCC AGT CCC ACC TTC</u> TTG TGT CCG CTT	43	17
911-A.8	ATC GGC TTT GGA AAC <u>AGT CCC</u> ATC GCG TTG TGT CCG CTT	928	8
911-A.7	ATC GGC TTT GGG AAC <u>AGT CCC</u> ATC GCG TTG TGT CCG CTT	886	7
911-A.9	ATC GGC TTT GGG AAC GCG <u>CCC ACC</u> GCG TTG TGT CCG CTT	758	6
911-A	ATC GGC TTT GGG AAC GCT <u>CCC</u> ATC GCG TTG TGT CCG CTT	300	5
911-A.3	ATC GGC TTT GGG AAC GCT <u>CCC</u> GTC GCG TTG TGT CCG CTT	96	4

L'évolution a justement mis en place toute une série de mécanismes subtils qui permettent aux bactéries d'ajuster la production de certaines de leurs protéines. Cet ajustement peut être fait à n'importe quelle étape du trajet suivi par l'acheminement de l'information biologique, mais il a été mis surtout au niveau de l'étape de la transcription. Par contre, même si le contrôle transcriptionnel est prééminent, la régulation des gènes s'effectue aussi fréquemment au niveau de la traduction (Horton et al., 1994). Toutes les étapes menant à la synthèse protéique représentent des lieux où l'activité traductionnelle peut être régulée. Ainsi, la traduction d'un ARNm peut être contrôlée aussi bien à la phase d'initiation que pendant l'allongement de la chaîne ou au moment de sa terminaison. Toutefois, comme la phase d'initiation est limitante, la régulation a lieu le plus souvent durant cette première étape.

6. Hypothèse de travail et objectifs

6.1. Problématique

Pour répondre aux exigences de l'industrie des pâtes et papiers, beaucoup de travaux ont été consacrés à l'identification de nouvelles xylanases et afin d'améliorer les propriétés des xylanases de type sauvage. De nombreux gènes de xylanase ont été clonés et exprimés dans *E. coli*. Certaines xylanases recombinantes ont été caractérisées et largement utilisées. Pour ses applications étendues et sa remarquable exigence de marché, trouver de nouvelles souches capables de produire de la xylanase ou de cloner et d'exprimer les gènes de xylanase avec de nouvelles propriétés est devenu un des sujets importants dans la recherche bio-alimentaire et environnementale (Polizeli et al., 2005).

Afin d'optimiser la production de la xylanase, Arhin et son équipe en 1994, ont étudié l'effet de la suppression d'un ou de plusieurs gènes de xylanase et ont observé la réduction des taux de croissance et des activités de xylanases totales lorsque la souche a été cultivée en présence de xylane. L'optimisation de la sécrétion de la xylanase A par *S. lividans* a été étudiée par Pagé et son équipe (1996) qui ont étudié l'effet de la délétion du peptide signal (ps) de la xylanase puis son remplacement par d'autres peptides signaux. Il a été démontré que le taux de synthèse de cette enzyme dépendait directement du type de peptide signal ajouté. En 1995, Pagé et son équipe avaient trouvé que le précurseur long de la Cellulase A fait plus que tripler la production de xylanase, celle-ci passant de 80 à 300 UI/ml.

En 2000, Kébir et son équipe, après avoir aligné ce long peptide signal de la CelA et le long ps de la ManA avec l'ARNr 16S de *S. lividans*, ils ont montré la présence d'une séquence, uniquement dans le ps de la CelA, de 5 nucléotides (TCCCA), complémentaire à une séquence d'ARNr 16S (AGGGU) à la position 1461-1465. Ils ont montré que cette complémentarité de séquences de 5 nt augmenterait la traduction de la xylanase A de quatre fois. Ils ont aussi trouvé que les mutants contenant uniquement des séquences de 6, 7 et 8 nt ont favorisé la production de xylanase, celle-ci atteignant un niveau optimal de plus de 3g/l.

6.2. Hypothèse

Dans ce travail, et suite à la démonstration par Kébir et ses collaborateurs, en 2000, que les boîtes de 6 à 8 nt, de l'ARNm du peptide signal de la cellulase A, complémentaires à l'ARNr 16S, augmentent la production de la XlnA, nous avons émis l'hypothèse que ces séquences pourraient se retrouver dans le gène de structure de la xylanase A et serviraient alors à augmenter ou à fidéliser la traduction de l'ARN de la Xylanase A. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fixé trois objectifs.

6.3. Objectifs

6.3.1. Objectif 1: Identification des boîtes

Localiser les boîtes de 6 à 8 nt complémentaires à l'ARNr 16S par alignement de la séquence du gène de structure de la XlnA avec celle de l'ARNr 16S. Nous avons utilisé le logiciel BLASTN 2.2.6. (Altschul et al., 1997) pour mettre en évidence ces boîtes dans le gène.

6.3.2. Objectif 2: Modification des boîtes

Étudier l'importance de chacune de ces "boîtes" dans la production de l'enzyme Xln A par *S.lividans* en :

- changeant une base nucléotidique par une autre différente dans chacune de ces "boîtes" tout en conservant l'acide aminé produit.

Plusieurs mutants de XlnA seraient créés par mutagenèse dirigée par PCR en :

- incorporant les boîtes mutées par effet cumulatif.

6.3.3. Objectif 3: Etude des nouveaux mutants

Analyser l'influence de chacune des mutations sur l'effet éventuel de la rupture de complémentarité de séquences avec l'ARNr 16S sur la production de la XlnA chez *S.lividans*.

- Les nouvelles souches de *S. lividans* incorporant les mutants de Xln A sont vérifiées en testant la capacité d'hydrolyse enzymatique du xylane après culture sur milieu de RBB-Xylane (Arhin et al., 1994).
- L'activité xylanasique sera testée par la méthode des sucres réducteurs (Miller et al., 1959).

Des Outils de bioinformatique seront utilisés pour l'analyse des données :

- Chromas (Klatte, 1996)(version 1.45) pour la lecture des séquences d'ADN.
- Clone Manager 5 (www.scied.com) pour établir des simulations de clonage et explorer les séquences
- DNAMAN (Lynnon Corp., Quebec, Canada), (Feng et Doolittle, 1987; Thompson et al., 1994) pour l'alignement de plusieurs séquences en parallèle, la conception des amorces PCR ainsi que l'analyse de séquences de gènes obtenus après la création des mutations.

CHAPITRE II:
MATÉRIELS ET MÉTHODES

7. Matériel, souches, vecteurs et conditions de culture

Les premières expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées directement dans des plasmides et des protoplastes de *Streptomyces*, sauf que transformer directement chez *S. lividans* s'est avéré une opération assez longue pour aboutir à un nouveau mutant. Ceci est incriminé d'une part, à la longueur de la période d'incubation de *Streptomyces* de 7 jours aux moins, et d'autre part, à la richesse du génome de *Streptomyces* en bases puriques G et C (plus que 75%) ce qui génère souvent des modifications de la structure secondaire de l'ARNm lors de l'induction des mutations par mutagenèse dirigée (Pagé et al., 1995- 1996; Chen et Westpheling., 1998).

Les différentes mises au point des expériences nous ont permis de générer les mutations d'abord chez *E.coli*, en raison de la simplicité de ce modèle bactérien puis transférer les cassettes de clonage chez *S. lividans* (Sprengart et al., 1996).

7.1. *E. coli*

Les sous-clonages du gène *xlnA* et de ses versions modifiées que nous avons effectués, ont été réalisés dans la souche DH11S d'*E.coli* (**Tableau 3**). Les opérations de mutagenèse dirigée selon les différentes méthodes, adoptées par Pagé et son équipe (1996), nécessitent l'utilisation des souches IAF 806 et IAF 811-A ainsi que des dérivés de cette dernière (Kébir et al., 2000).

Tableau 3 : Caractéristiques de la souche DH11S d'*E. coli* utilisée.

Souche	Description et/ou Génotype	Fournisseur	Souche
DH11S	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrrhsdRMS mrcBC</i>) Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>recA1398</i>) <i>deoR supE rpsL srI thi</i> /F' <i>proAB⁺lacI^qZΔM15</i>	GIBCO BRL® (18307-017)	DH11S

Tous les plasmides utilisés pour transformer *E. coli* lors de cette étude dérivent du phagemide pTZ19U (Bio-Rad) (2862 pb) par l'insertion d'un fragment HindIII-SacI de 1.2 Kb. Ce dernier doit contenir entre autres, le gène muté de la xylanase A codant pour le domaine catalytique de l'enzyme. En effet, même si elle est dépourvue de son site de fixation au substrat, la forme tronquée de la xylanase A est bien active. En plus du gène de structure de la xylanase A, le fragment de 1.2 Kb comprend le peptide signal de la cellulase A cloné également entre les sites HindIII et SacI. Ce dernier est un long peptide signal

contenant le peptide signal de la cellulase A ainsi qu'une séquence de 57 nt, en amont du codon d'initiation du peptide signal court de la celA (Kébir et al., 2000).

De plus, le pTZ19U contient l'origine de répllication double brin d'origine bactérienne colE1 ainsi que l'origine de répllication simple brin du phage f1, activable après une co-infection par un phage auxiliaire M13K07. Il contient également le gène de résistance à l'ampicilline, l'opérateur et le promoteur du gène lac, le promoteur de l'ARN polymérase T7 et le fragment lacZ' (codant pour les 145 premiers a.a. de la β -galactosidase) au sein duquel on retrouve un site multiple de clonage (**Annexe D**).

7.2. *S. lividans*

Le gène de la xylanase A a été isolé à partir d'une banque génomique de *S. lividans* 1326. Le gène sauvage complet de la XlnA se trouve dans le plasmide pIAF906 (Pagé et al., 1996). La souche que nous avons utilisée pour les transformations chez *S. lividans* est la souche 10-164. C'est un mutant de la souche sauvage 1326 dans laquelle le système de transport du cellobiose et du xylobiose est inhibé. Le cellobiose et le xylobiose sont connus pour être des effecteurs positifs de l'expression des gènes codant respectivement pour les cellulases et les xylanases de *S. lividans*. Ainsi, la souche 10-164 est un mutant pléiotropique cellulase/xylanase négatif (Hurtubise et al., 1995; Mondou et al., 1986). Elle porte une mutation affectant la protéine msiK, responsable de la liaison à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire au transport des xylo-oligosaccharides tels le cellobiose et le xylobiose, à l'intérieur des cellules. Notons que ces premiers sont les inducteurs respectifs de la cellulase et de la xylanase (Hertubise et al., 1995).

Ainsi la souche *S. lividans* 10-164 est dépourvue de ces deux activités enzymatiques et de toute activité xylanolytique. Ces critères nous ont amené à utiliser cette souche pour la transformation des plasmides portant les mutations dans le peptide signal et le gène de la xylanase A. De plus, le défaut de l'expression de ces deux enzymes se présente comme un critère supplémentaire pour l'analyse de l'activité xylanolytique des nouveaux clones obtenus par les différentes mutations dirigées, sachant que les gènes de xylanase d'origine chromosomique ne sont pas exprimés.

Les plasmides utilisés pour transformer *S. lividans* 10-164 sont tous dérivés du plasmide multicopies pIJ702 (40 à 300 copies par cellule). Ce plasmide de 5.8 kb (voir Annexe F) contient plusieurs sites uniques de restriction ainsi que le gène de résistance au thiostrepton, un antibiotique utilisé comme crible de sélection.

7.3. Les milieux de culture

Les compositions des milieux de culture utilisés lors de nos travaux sont identifiées en **Annexe H**.

7.3.1. Les milieux liquides

7.3.1.1. Milieu liquide pour la croissance *E. coli*

Les milieux de culture utilisés pour les travaux effectués avec *E. coli* sont le LB ou le 2XTY (Sambrook et al., 1989). Pour les expérimentations préliminaires, on utilise préférentiellement le 2XTY. Pour obtenir des milieux solides, 15 g d'Agar par litre de milieu sont ajoutés. Après autoclavage, ces milieux sont additionnés de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ampicilline afin de permettre la sélection des clones bactériens transformés par pTZ19U.

7.3.1.2. Milieu liquide pour l'isolement d'ADN plasmidique

Le milieu riche TB (Terrific Broth) sert à stimuler la croissance des clones d'*E. coli* pour l'isolement de leur ADN plasmidique. L'antibiotique ampicilline y est ajoutée, en concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Par ailleurs, les cultures d'*E. coli* sont toujours incubées à 37°C et sous agitation de 240 rpm.

7.3.1.3. Milieu liquide minimal pour la croissance de *S. lividans*

La croissance des transformants de *S. lividans* 10-164 se fait dans un flacon erlenmeyer de 125 ml contenant 20 ml de milieu minimal et 4 petites billes de verre, d'un diamètre d'environ 3 mm, limitant l'agrégation potentielle de mycélium.

Comme le vecteur d'expression de *S. lividans* contient le gène de résistance au thiostrepton, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cet antibiotique sont ajoutés automatiquement à toutes les cultures liquides (Hopwood et al., 1985). Le milieu est alors prêt à l'inoculation avec 2 x 10⁶ spores/ml. Cependant avant d'être introduites dans l'erlenmeyer, les spores doivent être soigneusement lavées à deux reprises avec du milieu M14 stérile pour éliminer toute trace de glycérol (section 3). Les cultures sont incubées à 34°C dans un agitateur rotatif à 240 rpm. La croissance optimale de croissance des Streptomycètes est de 30°C, mais la production de xylanase est favorisée par des températures d'environ de 40°C. La température 34°C représente, un optimum entre une croissance convenable et une bonne production

d'enzymes. À des intervalles réguliers de 24h, des échantillons de 1 ml sont prélevés à partir de chaque culture pour l'analyse subséquente de l'activité xylanolytique (Hopwood et al., 1985).

7.3.2. Les milieux solides

7.3.2.1. Milieu solide pour la croissance

Le milieu SFM (Soya Flour Mannitol) a servi comme support solide pour la croissance, la sporulation et l'entreposage des transformants de *S. lividans*. Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 mn à 121°C. Après stérilisation, du thiostrepton est ajouté au milieu à une concentration finale de 50µg/ml. Il est important de souligner que la concentration de thiostrepton requise pour les milieux solides est 10 fois plus importante que celle des milieux liquides. L'incubation des géloses SFM+Thiostrepton se fait à 30°C.

7.3.2.2. Milieu solide pour la régénération des protoplastes

La paroi des bactéries à Gram positif, notamment celle des streptomycètes, est assez épaisse et rend la transformation de ces cellules difficiles. Pour pallier à ce problème, il est donc nécessaire de recourir à l'utilisation de protoplastes, c'est à dire des bactéries dépourvues de paroi, de formes sphériques et osmotiquement sensibles.

Les protoplastes de *S. lividans* sont préparés selon la méthode de Hopwood et son équipe (1985) basée sur le traitement des cellules avec une solution contenant des lysozymes, ces derniers hydrolysent les peptidoglycanes de la paroi cellulaire et libèrent ainsi les protoplastes. Même complètement dépourvus de leur paroi, les protoplastes sont capables de continuer à se développer normalement tant que l'isotonie du milieu est maintenue. A cet effet, on étale les transformants de *S. lividans* sur les boîtes de gélose R5. Ce milieu est de nature très riche en sucres et en minéraux, permettant la régénération des protoplastes suite à une transformation. Il contient tous les éléments qui permettent à *S. lividans* de reconstituer une paroi membranaire.

7.3.2.3. Milieu solide pour la détection de l'activité xylanolytique

Le RBB-Xylane est un milieu minimal solide qui permet de visualiser de manière rapide l'activité xylanasiq ue éventuelle des transformants de *S. lividans*. Le substrat, du xylane de

l'épeautre d'avoine, est lié de manière covalente au colorant Remazol Brilliant Blue formant ainsi le complexe RBB-Xylane. Comme les xylanases sont des enzymes extracellulaires, elles sont sécrétées et diffusent dans le milieu. La présence d'activité xylanasiq ue se traduit par l'apparition d'une zone d'éclaircissement autour des colonies productrices de xylanase suite à l'hydrolyse enzymatique du xylane alors que le reste de la boîte demeure bleu (Biely et al., 1988).

8. Méthodes

8.1. Préparation des spores

Une fois la sélection des bons transformants est faite, les clones jugés les plus intéressants de *S. lividans* sont inoculés séparément à l'aide d'une once de platine sur le milieu solide SFM+Thio. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées dans une étuve à 30°C pendant 7 jours (le temps minimum requis pour la formation des spores à la surface des colonies). À l'aide de l'once de platine, on gratte délicatement les spores à la surface de chaque boîte et on les étale de la même façon sur quatre autres boîtes de SFM+Thio. Une incubation minimale de 7 jours dans les mêmes conditions que précédemment est également requise, jusqu'à l'obtention d'une couche de couleur grisâtre à la surface des colonies, propre à la sporulation. C'est à partir de ce moment qu'on peut effectuer la récolte des spores. 10 ml d'une solution stérile de glycér ol 20% sont versés délicatement (sous hotte laminaire) dans un premier plat de pétri. Avec l'extrémité d'une pipette 10 ml à bout rond, on gratte délicatement la surface de la gélose afin de détacher les spores. La suspension de spores résultante de la première boîte de pétri est aspirée puis transférée dans une seconde boîte de pétri qui sera grattée à son tour dans les mêmes conditions et de la même façon. Les 10 ml de glycér ol peuvent servir pour la récolte de trois boîtes de pétri. La suspension de spores est ensuite introduite dans un tube stérile de 35 ml muni d'un bouchon et contenant des billes de verre d'environ s 3 mm de diamètre. On agite vigoureusement le tube afin de disperser les amas de mycélium. La suspension de spores est par la suite filtrée sur laine de verre stérile. Cette dernière agit comme une barrière pour retenir les débris cellulaires et les fragments d'hyphes. La concentration des spores est estimée par mesure de la densité à 660nm. La conservation des spores pourrait se faire pour une très longue période au congélateur à -20°C grâce au glycér ol.

8.2. Manipulations de l'ADN

Les techniques de manipulation de l'ADN utilisées au cours de ce travail sont décrites au cours des prochains paragraphes.

8.2.1. Isolement de plasmides d'*E. coli*

L'ADN plasmidique d'*E. coli* est extrait selon la technique de lyse par ébullition (*Holmes et Quigley, 1981 ; Liu et Mishra, 1995*). Elle consiste à lyser la paroi des cellules par l'emploi de Triton X-100 et de lysozymes puis à dénaturer les protéines et l'ADN chromosomique par ébullition. L'ADN plasmidique, de par sa conformation super-enroulée, est résistant à ce traitement.

En effet, les clones obtenus par mutagenèse dirigée sont repiqués successivement sur un milieu solide 2xTY-ampicilline et dans un microtube contenant 200µl du milieu liquide riche en TB-ampicilline. Après une incubation de 16 heures, à 37°C avec agitation de 225-250 RPM, ces derniers sont centrifugés pendant un maximum de 15 secondes à 13 000 rpm afin de casser les peptidoglycanes de la paroi cellulaire des cellules en suspension et libérer les plasmides. Ainsi, le surnageant est retiré délicatement par aspiration puis le culot est resuspendu dans 40 µl de solution lysozyme-STT (2 mg de lysozyme dissous dans 1 ml de tampon STT : sucrose 8%, Tris-HCl 50 mM de pH ajusté à 8, Triton 100X 5%). Les tubes Eppendorf sont vigoureusement vortexés, par la suite, les échantillons sont bouillis pendant 60 secondes. Finalement, une centrifugation des tubes pendant 5 min à 13 000 rpm permet la récupération de l'ADN plasmidique dans le surnageant. La concentration de l'ADN dans le surnageant doit être aux environs de 150 µg/ml pour les vecteurs Puc: 2 µl sont digérés selon les conditions normales pour la vérification d'insert et 1 µl est déposé sur plaque de nitrocellulose afin de vérifier la mutagenèse par hybridation au ³²P. Cette méthode rapide est utilisée lorsqu'on souhaite tester rapidement l'ADN de plusieurs dizaines de clones simultanément (300 clones par jour).

8.2.2. Purification d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium

La purification d'ADN d'*E. coli* est rendue possible grâce à la technique du gradient de chlorure de césium (*Sambrook et al., 1989*). Cette méthode est initiée avec la mise en culture d'un clone d'*E. coli* sélectionné dans un flacon contenant 100 ml de milieu 2xTY-ampicilline. Après une incubation à 37°C durant au moins 16 heures, la suspension cellulaire

est centrifugée pendant 5 minutes à 5000 rpm (centrifugeuse Sorvall RC-5B, rotor GSA). Le culot de cellules obtenu est resuspendu dans 2.5 ml de tampon glucose (glucose 50 mM ajusté à pH 8, EDTA 10 mM). 5.5 ml d'une solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) 1% et NaOH 0.2 N est ajoutée. Le mélange est mis en agitation doucement puis incubé dans la glace pendant 5 minutes. À froid, on ajoute 2.5 ml de tampon d'acétate de potassium (60 ml d'acétate de potassium 5 M, 11.5 ml d'acide acétique et 28.5 ml d'eau) et on laisse incuber encore 5 minutes sur la glace (4°C). L'échantillon est centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant récolté dans un tube de 50ml subit successivement une extraction au phénol: chloroforme: alcool isoamylique et une centrifugation de 5 minutes à 6000 rpm (centrifugeuse Sorvall RC-B5, rotor SA6000) afin d'éliminer les protéines emprisonnées dans la phase phénolique et conserver uniquement la phase aqueuse. Au volume de cette dernière, 0.6 volume d'isopropanol est additionné puis, le mélange est mis au repos pendant 30 minutes à la température de la pièce. On centrifuge, par la suite pendant 15 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant est par ailleurs décanté minutieusement et le précipité est resuspendu dans 1 ml de tampon TE (Tris 10mM, EDTA 1mM à pH 8) et transféré dans un tube contenant 0.5 ml d'eau et 2.625 g de chlorure de césium, donnant un volume final de 2 ml à une densité de 1.84. Finalement, 7.5 µl de bromure d'éthidium, à une concentration de 0.5 µg/ml, sont ajoutés.

Parallèlement, le gradient de chlorure de césium est préparé dans un tube spécial, compatible avec l'ultra-centrifugeuse. Dans le fond de ce tube, on dépose 1.8 ml de chlorure de césium 65%. Puis l'échantillon d'ADN préparé précédemment est chargé avec précaution au-dessus. Le tube est centrifugé dans une centrifugeuse *Beckman TL-100 (rotor TLN-100)* à 100 000 rpm pendant 3 heures. Au cours de l'ultracentrifugation, un gradient de chlorure de césium se forme et les différents composants du mélange se répartissent selon leur densité. Le bromure d'éthidium se lie à l'ADN et il se forme des bandes distinctes dans le tube qui fluorescent sous un faisceau de lumière ultraviolette. La bande correspondant à l'ADN plasmidique est récupérée au moyen d'une seringue et le bromure d'éthidium qu'elle contient est retiré à l'aide de butanol saturé d'eau. Cette étape d'extraction est répétée tant que l'échantillon n'est pas complètement débarrassé du bromure d'éthidium. Finalement, l'ADN plasmidique pur est précipité toute une nuit à -20°C avec 2 volumes d'éthanol 70%. Le lendemain, le mélange est centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 400 µl de tampon TE. Puis l'ADN est précipité par ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium à 13 000 rpm. Le culot d'ADN est séché à l'air libre et resuspendu dans un volume final de 50 µl d'eau. La concentration d'ADN est déterminée par l'absorbance à 260 µm.

Une unité de DO est équivalente à 50 µg/ml d'ADN.

8.2.3. Isolement de plasmides de *S. lividans*

La purification de l'ADN plasmidique de *S. lividans* est effectuée selon une variante de la méthode de lyse alcaline en présence de SDS (Birnboim et Doly, 1979). Elle a été modifiée dans le but de l'appliquer aux *Streptomyces* (Kieser et al., 2000). La principale différence avec le kit est que la purification de l'ADN se fait par une extraction phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol.

8.2.4. Digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction

On admet qu'une unité d'enzyme de restriction est suffisante pour digérer 1 µg d'ADN. La digestion s'effectue à une température de 37°C pendant une à deux heures selon l'enzyme de restriction utilisée et ce dans un volume final de 20µl en présence d'un tampon "One Phor all Plus 10X" (Pharmacia) (Tris-acétate 100 mM à pH 7.5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM) utilisé à une concentration optimale (1X, 2X ou 3X) définie spécifiquement pour chaque enzyme. L'inactivation de l'enzyme est une opération jugée nécessaire afin d'être certains que cette enzyme ne continue pas à agir plus tard. L'inactivation se fait sous l'effet d'une exposition thermique ainsi, on expose le produit de digestion de 5 à 30 minutes à une température variant également de 50 à 85°C, selon l'enzyme en question. Lors de digestion par plus d'une enzyme, on fait une digestion séquentielle entrecoupée et suivie chaque fois d'une séparation des fragments sur gel d'agarose afin de vérifier l'opération du clonage.

8.2.5. Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose

À la fin de la digestion, on ajoute 4µl de tampon de charge 4X (Annexe I) puis on dépose les échantillons sur un gel d'agarose de 0.7% à 1.5% (p/v) selon la taille du fragment à séparer, le tampon TAE 1X (Annexe I) constitue le tampon d'électrophorèse. Dans l'un des puits, on dépose un standard d'ADN (1kb ou 1Kb PLUS, selon la taille du fragment à visualiser). Le gel d'agarose contient en plus 0.5 µg.ml⁻¹ de bromure d'éthidium additionné à la solution du gel d'agarose juste avant l'écoulement du gel. Cet agent s'intercale entre les bases complémentaires de l'ADN qui, lorsqu'il est excité par les ultraviolets (U.V.), émet de la fluorescence. Les gels sont illuminés par les UV afin de visualiser les bandes d'ADN. Une

photographie est prise avec un Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

8.2.6. Extraction des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose

Après digestion enzymatique et migration sur gel, il est possible de découper le gel d'agarose afin de récupérer un fragment d'intérêt. Ce dernier peut être ensuite extrait de l'agarose à l'aide du kit QIAEX®II de Qiagen. Après solubilisation de l'agarose et en présence de fortes concentrations de sels, le fragment d'ADN est adsorbé de manière sélective sur des billes de silica-gel. L'éluion de l'ADN est réalisée en employant une solution faiblement concentrée en sels.

Un tampon de chargement est ajouté, dans un rapport de 1:5, à tous les échantillons d'ADN doivent être analysés. Ce tampon 6X comprend 0.25% de bleu de bromophénol, 0.25% de xylène cyanol et 30% de glycérol. Les échantillons sont alors déposés dans les puits du gel d'agarose. Le premier puits est exclusivement réservé au marqueur de poids moléculaire 1 Kb ladder qui permettra d'évaluer la longueur des fragments d'ADN ayant migré dans le gel, le second puits est réservé à un petit échantillon de la solution d'ADN à purifier. Le gel est ensuite soumis à une tension constante d'environ 100 V pendant 3 à 4 heures. Après migration, les gels sont coupés au niveau de la bande d'intérêt. Une vérification de la séparation de la bande cible est effectuée par incubation du gel d'agarose restant dans un bain de bromure d'éthidium pendant 30 minutes afin de l'exposer par la suite aux rayons UV.

8.2.7. Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur

La réaction de ligation demande la présence de quantité équimolaire du fragment inséré et du plasmide (environ 25 à 200 ng d'ADN plasmidique). On procède à une quantification de l'ADN sur gel d'agarose à l'aide des marqueurs de poids moléculaire en respectant le ratio vecteur/insert. Cependant, on digère deux fois plus d'insert que de vecteur. La quantité de vecteur utilisée est de 25-30 ng dans le cas d'une transformation dans *E. coli* et de 100-200 ng dans le cas d'une transformation dans *S. lividans*. Le vecteur et l'insert d'intérêt sont digérés par les mêmes endonucléases afin de générer des extrémités cohésives identiques. Les fragments d'ADN générés sont alors récupérés par séparation et extraction sur gel d'agarose. L'ADN du vecteur ainsi que celui de l'insert sont précipités à l'éthanol en ajoutant 0.1 volume d'acétate de sodium 3M et deux volumes d'éthanol 95%. Les deux échantillons sont incubés pendant 10 minutes dans un congélateur à -80°C puis ensuite

centrifugés à 13 000 tpm pendant 30 minutes. On récupère ainsi les culots à sec puis, on resuspend le vecteur dans 7 µl d'eau et on mélange les deux échantillons ensemble délicatement. Enfin, la réaction de ligation se fait dans un volume final de 10 µl, après addition de 1 µl de tampon One Phor All 10X, 1 µl d'ATP 10 mM et 1 µl d'ADN Ligase du phage T4 (l'équivalent de 2.5 unités d'enzyme). Le mélange de ligation est incubé pendant 16 heures dans un bain-marie à 14°C sous agitation modérée.

8.3. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une technique indispensable en génie génétique et en biologie moléculaire. Elle est souvent utilisée pour l'étude des relations structuro-fonctionnelles de certaines protéines ainsi qu'elle permet de créer des mutations volontaires au sein de certaines séquences d'ADN. Depuis la découverte de son principe de base en 1978, différentes méthodes de mutagenèse dirigée ont été développées moyennant la méthode PCR. Un oligonucléotide préalablement synthétisé et portant la mutation désirée, va s'hybrider spécifiquement avec une région de l'ADN matrice. Il sert comme amorce pour l'initiation de la synthèse d'ADN in vitro. L'extension de l'amorce avec une ADN polymérase génère de l'ADN double brin qui porte, la mutation désirée. L'efficacité de la réaction de mutagenèse par PCR est optimisée avec la mise au point de plusieurs paramètres dont l'optimisation de la réaction PCR et la conception des oligonucléotides mutagéniques.

8.3.1. Conception des oligonucléotides

La conception des oligos est une étape cruciale et son optimisation est primordiale pour la réussite de la mutagenèse par PCR. Elle dépend de trois paramètres qui doivent être absolument optimisés pour chaque nouvelle amorce:

Par définition, la séquence d'un oligo doit porter au minimum une base changée.

La longueur de l'oligo est par ailleurs déterminée par la complexité de la mutation. Une séquence dont le premier nucléotide est un G ou un C risquerait de rendre l'amplification plus difficile, d'autant plus que le génome des Streptomyces est très riche en séquences puriques.

Un autre paramètre qu'il faut surveiller est le choix des codons les plus fréquents et si possible ceux qui contiennent le moins de bases G et C.

L'optimisation de tous ces paramètres permettrait de contrôler la formation des structures secondaires, la température et le temps d'hybridation et d'élongation de l'amorce. Après

études des maintes possibilités, les oligonucléotides optimisés et utilisés pour créer les différentes mutations au sein de ce travail ont été tous synthétisés par Biopharma. Le **tableau 4** représente les séquences complètes de ces différents oligonucléotides respectivement au niveau du gène de structure de la xylanase A et du peptide signal de la cellulase A.

Tableau 4 : Liste des amorces pour les mutants du gène de la XlnA

Matrice	Amorce	Séquences	Mutant
911_A9	ACCGCCAT <u>T</u> GCCTCGGGCA	XlnA 183	907.1
	TGCCCGAGGCAATGGCGGT	XlnA 183c	
907.1	GAACCGCAGCGGGG <u>A</u> CAGTTCAACTTCAGC	XlnA 279	907.2
	GCTGAAGTTGAACTGTCCCCGCTGCGGTTC	XlnA 279c	
907.2	GGCAGCGCGCTGCGG <u>G</u> CAGGCGATGATCGAC	XlnA 414	907.3
	GTCGATCATCGCCTGCCGCAGCGCGCTGCC	XlnA 414c	
907.3	TGCGTCGGCTTCCA <u>A</u> TCGCACTTCAACAGC	XlnA 724	907.4
	GCTGTTGAAGTGCATTGGAAGCCGACGCA	XlnA 724c	

Une fois que les oligos sont synthétisés, l'optimisation de la mutagenèse dirigée est complétée par le choix de la méthode la plus convenable, un facteur ayant autant de poids que la conception des oligos.

8.3.2. Les méthodes de mutagenèse testées

Il existe plusieurs méthodes, à concept de base unique, de mutagenèse dirigée par PCR. Certaines ont été testées pour leur facilité de manipulation ainsi que pour leur efficacité à produire les mutations au sein du plasmide de *S. lividans* et/ou *E.coli*.

Les méthodes de mutagenèse dirigée les plus utilisées sont: la mutagenèse recombinante (dite aussi "emboîtée"), la mutagenèse dirigée circulaire à une seule étape de Zheng et ses collaborateurs (2004), la mutagenèse dirigée QuickChange™ de Stratagene®, la mutagenèse dirigée par extension de recouvrement et également la méthode du "Mégaprimer".

Au cours de ce travail, seulement deux méthodes seront optimisées : **la mutagenèse recombinante et la mutagenèse dirigée circulaire**. La meilleure est utilisée pour la création des nouveaux mutants.

8.3.2.1. Mutagenèse dirigée circulaire

Cette méthode développée par Zheng et son équipe (2004), est inspirée de la méthode de mutagenèse dirigée QuickChange™ de Stratagene® tout en assurant une très bonne efficacité d'amplification. La conception de cette méthode minimise la dimérisation des amorces et favorise la formation d'hybrides amorce-matrice pendant la réaction PCR. Elle est également applicable même pour de très petites amorces (7 bases et plus) et pour des vecteurs de grande taille (4 à 12 Kb). La restriction se présente au niveau de la conception des amorces, qui doivent être partiellement complémentaires et non complètement. La réaction d'amplification par PCR (**Figure 15**) est effectuée dans un volume final de 100 μ l en additionnant à 70 μ l de H₂O, 10 μ l de tampon (PFU), 8 μ l de dNTP (200 μ M), 4 μ l de MgSO₄, 1 μ l de matrice (50 η g/ μ l de *E. coli*), 3 μ l de chacune des amorces (25 pmol/ μ l) et 1 μ l de PFU (1.25U). La réaction est initiée par une étape de pré-chauffage du mélange de la réaction à 94°C pendant 3 minutes, suivie de 16 cycles à 94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min et 68°C pendant 8, 12, 16 ou 24 min selon la longueur de la matrice (matrice de 2.8Kb, 8 min) poursuivi par une incubation à 68°C pendant 1 h. Cette dernière étape donne le temps pour une élongation douce. Les produits d'amplification par PCR sont évalués par électrophorèse sur gel d'agarose et sont ensuite purifiés avec le kit QIAquick™ de purification des produits PCR (Qiagen). Un aliquot de 5 μ l de produit final de PCR traité à la DpnI est transformé dans 50 μ l de cellules compétentes d'*E. coli* (DH5-11S), le mélange est inoculé sur milieu 2xTY solide enrichi d'ampicilline. 4 colonies sont ensuite sélectionnées et leurs plasmides sont isolés par miniprep. Les mutants positifs sont sélectionnés par digestion avec les enzymes correspondantes et les séquences sont vérifiées par séquençage.

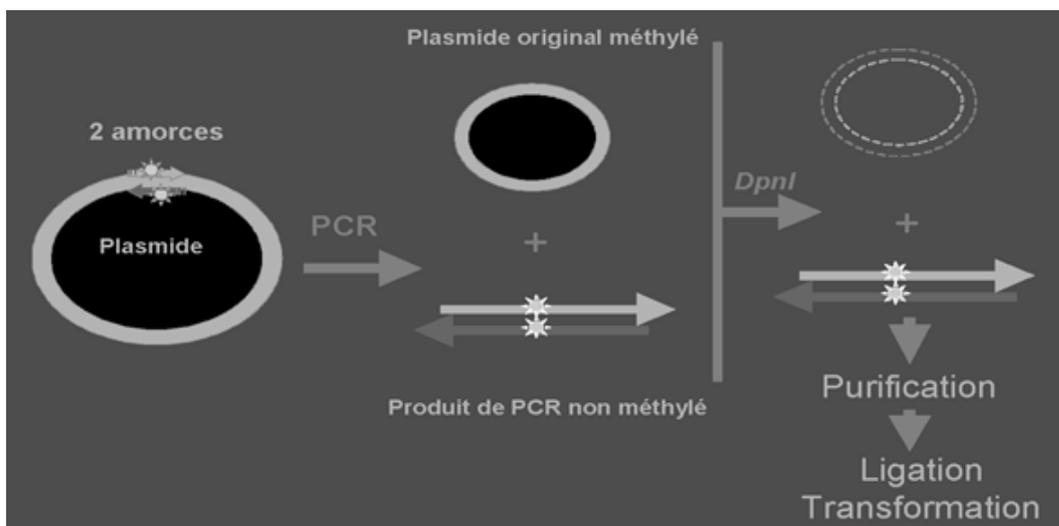


Figure 15 : Mutagenèse dirigée circulaire.

8.3.2.2. Mutagenèse dirigée par PCR recombinante ou “emboîtée”

Cette méthode a été utilisée pour la création de mutants dans le peptide signal de la xylanase A en moyennant deux réactions PCR (**Figure 16**). Dans un tube eppendorf de 200 μ l, on met 64 μ l d'eau mQ stérilisée, 10 μ l de tampon Pfu 10X, 8 μ l d'un mélange contenant 2.5mM de chaque dNTP, 8 μ l de propionamide 50%, 4 μ l de MgSO₄ 25 mM, 1 μ l de Tween 20 5%, 3 μ l de l'amorce interne à 25 pmol. μ l⁻¹, 1 μ l de matrice de concentration 100 ng. μ l⁻¹, 1 μ l d'enzyme polymérase Pfu Turbo® à 2.5 U. μ l⁻¹. Le thermocycleur utilisé est le Techne Genius. Le programme utilisé pour réaliser les PCR simples est le suivant : 3 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 52°C, 3 min à 68°C, et une incubation de 10 min à 68 °C. Un programme portant des paramètres différents a été optimisé pour effectuer les PCR emboîtées. Des étapes de traitement de l'ADN résultant des PCR simples sont nécessaires afin de préparer la matrice pour la PCR emboîtée : les produits des deux PCR simples du même mutant sont mélangés dans un tube eppendorf de 1.5ml, le mélange est chauffé à 98°C pendant 10 min. 10 μ l du tampon Pfu 10X est ajouté à chaud, le pool est ainsi laissé refroidir à la température de la pièce. Les mêmes proportions de dNTP, propionamide, MgSO₄, Tween 20 et Pfu sont utilisées avec les 40 μ l de préparation d'ADN et 32 μ l d'eau mQ stérilisée. On met 3 μ l de chacune des deux amorces externes CD101 et AfIII de concentration 25 pmol. μ l⁻¹ pour emboîter les deux petits fragments simples et amplifier le résultat étant un fragment de 1400 pb. La réaction est alors réalisée selon le programme suivant : 8 min à 68°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 52°C, 3 min à 68°C, et une incubation de 10 min à 68 °C.

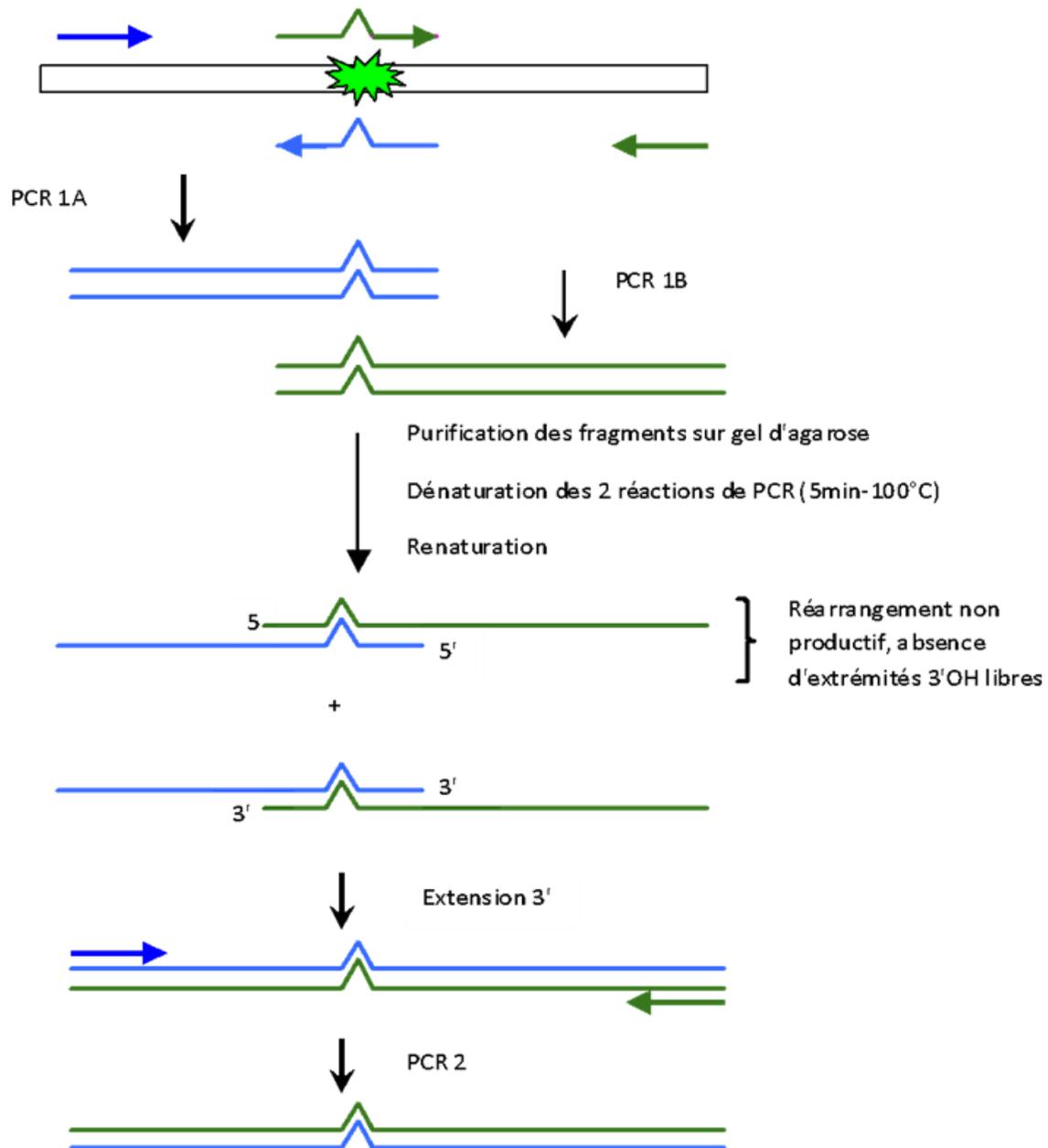


Figure 16 : Mutagenèse dirigée recombinante ou "emboîtée" par PCR, (Higuchi, 1990).

8.3.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Dans un tube Eppendorf de 0.2 ml, on place 32.5 µl d'eau stérile, 4 µl d'un mélange contenant 2.5 mM de chaque dNTP, 5 µl de tampon Pfu 10X, 4 µl de propionamide 50 %, 0.5 µl de Tween 20 5%, 1.5 µl de chacune des deux amorces à une concentration de 25 pmol.µl⁻¹ (soit 37.5 pmol au total), 0.5 µl d'ADN matrice à une concentration de 0.1 µg.µl⁻¹ (soit 50 ng), 0.5 µl de Pfu Turbo ® à 2.5 U.µl⁻¹ (soit 1.25 U). Le thermocycleur employé est le Techne Genius. Le programme utilisé pour amplifier le gène de la xInC se déroule dans

les conditions suivantes : 5 min à 95°C, 5 min à 55°C, 3 min à 72°C puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 3 min à 72°C. Une variante de ce programme, comportant moins de cycles, a été utilisée pour les opérations de PCR recombinantes ou PCR emboîtées (Higuchi, 1990). Le principe de cette méthode est expliqué à la figure 7. Dans certains cas, avant de procéder aux cycles d'amplification, la matrice est chauffée pendant 5 min à 100°C. L'amplification est ensuite réalisée dans les conditions suivantes : 5 min à 95°C, 5 min à 55°C, 3 min à 72°C avant d'enchaîner par 15 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 3 min à 72°C. Une fois que la réaction de mutagenèse par PCR est réalisée, des étapes post PCR sont indispensables afin d'affiner les produits PCR.

8.3.4. Étapes post-PCR

La réaction de mutagenèse dirigée par PCR peut être réussie comme elle peut ne pas l'être et ce, en fonction de l'acheminement du produit final de la PCR. Les étapes suivantes sont simples mais primordiales pour l'augmentation des chances de réussite de la mutagenèse et doivent être incluses dans tous les cas des mutations de *S. lividans*, selon nos optimisations. Les étapes sont ainsi décrites dans l'ordre, on commence par nettoyer l'ADN, le purifier avec le kit de Qiagène et le concentrer par une précipitation à l'éthanol ensuite, les amorces de PCR sont éliminées par filtration sur colonnes de Qiagen. L'ADN est alors séparé sur gel d'agarose et les bandes sélectionnées selon leur taille sont extraites en utilisant le kit QIAEX®II de Qiagen. Une extraction Phénol/Chloroforme et une nouvelle précipitation à l'éthanol sont ensuite essentielles pour le nettoyage et la concentration de l'ADN, respectivement. C'est ainsi que l'ADN pourrait être considéré de bonne qualité et prêt à être digéré et inséré au vecteur.

8.4. Transformation des cellules

Après mutagenèse, la nouvelle séquence mutée du gène est introduite dans une cellule hôte en moyennant un vecteur pour que la recombinaison homologue puisse remplacer la copie existante dans le gène par la version modifiée. La transformation est réalisée à deux niveaux, premièrement chez *E.coli* pour vérifier la séquence au niveau moléculaire par le séquençage

8.4.1. Transformations chez *E. coli*

La transformation d'*E.coli* nécessite ainsi la préparation de cellules compétentes. La préparation des cellules et leur transformation sont deux étapes réalisées d'après la méthode

de Hanahan (1983). Les cellules sont, tout d'abord rendues compétentes par un traitement au CaCl_2 , ce qui rend perméable la membrane des bactéries. Par la suite, ces bactéries peuvent être conservées à -80°C dans une solution de glycérol 15 %. En règle générale, 10 μl de mélange de ligation servent à transformer 100 μl de bactéries compétentes. L'insertion de l'ADN exogène est déclenchée par un choc thermique de 2 min à 42°C . Les bactéries sont ensuite incubées pendant 1h à 37°C sous une agitation de 250 rpm afin de permettre l'expression phénotypique de la résistance à l'ampicilline. La sélection des bactéries recombinantes se fait sur un milieu contenant de l'ampicilline comme le 2xTY ou LB. Les bactéries transformées apparaissent après environ 16h à 37°C (Wei et al., 2010).

8.4.2. Transformation chez *S. lividans*

La transformation de *S. lividans* se fait au moyen de protoplastes de la souche 10-164, préparés d'après la technique de Kieser et al. (2000). 10 μl de mélange de ligation servent à transformer 50 μl de protoplastes (10^8 à 10^9 protoplastes. ml^{-1}). Les protoplastes sont étalés sur un milieu R5. Après 16h de régénération à 30°C , la sélection des transformants est effectuée en recouvrant le milieu R5 par 1.5 ml d'une solution de thiostrepton à 0.33 mg/ml. Incubés à 30°C , les transformants apparaissent 2-3 jours après l'addition de l'antibiotique.

8.5. Méthodes de détection des mutants

Le phagemide utilisé pour l'étude de ces boîtes du gène de structure de la XlnA était le pTZ19U dans lequel fut inséré un fragment HindIII-SacI de 1.2 Kb comprenant le ps long de la CelA et le gène de structure de la XlnA tronqué, qui ne code que pour le domaine catalytique de l'enzyme. Après mutagenèse, les clones furent sélectionnés par hybridation avec l'oligonucléotide contenant la mutation. Les clones furent ensuite séquencés afin de s'assurer de la présence effective de la mutation et de vérifier si d'autres mutations indésirables n'auraient pas été introduites dans la construction. Le fragment HindIII-SacI contenant la mutation a ensuite été cloné dans le plasmide pIAF 911_A.9 et ses versions modifiées, se répliquant chez *S. lividans*. Ce vecteur est dérivé du plasmide à copies multiples pIJ702, dans lequel le gène de la xylanase A a été introduit. Les plasmides résultants ont alors servi à transformer les protoplastes de la souche hôte 10-164 de *S. lividans*, qui est xylanase et cellulase négative. Cette transformation est ainsi réalisée sur milieu solide R5 en présence de l'antibiotique Thiostrepton (50mg/ml).

8.5.1. Hybridation de colonies par des sondes radioactives

La vérification des mutations est effectuée par hybridation à l'aide de sondes marquées au ^{32}P . Cette méthode rapide est utilisée lorsqu'on souhaite tester rapidement l'ADN de plusieurs clones simultanément. Ainsi, comme sondes, on utilise l'amorce ayant servi à la réaction de mutagenèse qu'on marque préalablement au ^{32}P . La réaction de marquage est réalisée en présence de 1 μl d'amorce à une concentration de 100-200 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 10 μl de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP à 4500 $\text{Ci}\cdot\text{mmole}^{-1}$, 5 unités de polynucléotide kinase et 5 μl de tampon kinase 10X (Tris-HCl 0.5M pH 7.6, MgCl_2 0.1M, DTT 50 mM, spermidine HCl 1mM, EDTA 1mM pH 8.0) pour un volume final de 50 μl . Le marquage se déroule pendant 1h à 37°C. La sonde est conservée à -20°C jusqu'à utilisation. Dans un tube Eppendorf, on place 2 μl de miniprep plasmidique avec 2 μl de solution dénaturante (EDTA 20 mM, NaOH 0.8 M). On incube 10 min à température ambiante puis on dépose 2 μl sur une membrane de Nylon. L'ADN est ensuite fixé sur la membrane par un traitement aux U.V. à l'aide du GS Gene Linker UV Chamber de Bio-Rad (programme C-L, 125 mJ). La membrane est pré-hybridée pendant 1h à 42°C dans le tampon d'hybridation contenant du SSC 6X, du Na_2HPO_4 50 mM pH 7.0, SDS 0.1 %, Denhardt 5X et 0.1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ADN de sperme de saumon. La membrane est ensuite hybridée avec 10 pmol de sonde radioactive en présence de tampon d'hybridation et pendant 16h à 42°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois 20 min à température ambiante dans une solution de SSC6X (0.9 M NaCl; 0.09 M citrate de sodium, SDS 0.1 %). Elle est ensuite rincée par une solution de chlorure de tétraméthylammonium (Me_4NCl 3M, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, SDS 0.1 %) puis lavée une dernière fois dans du Me_4NCl 3M seul à une température inférieure de 2 à 4 degrés à la température de dénaturation de la sonde. Cette technique d'hybridation repose sur les propriétés du Me_4NCl qui permet une hybridation indépendante de la composition en bases de l'amorce, cela signifie que la température de lavage dépend exclusivement de la longueur de l'amorce et non pas de sa composition en G+C (Wood *et al.*, 1985). La membrane est séchée puis placée dans une cassette sensible à la radioactivité (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Après 24h d'exposition à température ambiante, l'écran est scanné (Phospho ImagerTM SI, Molecular Dynamics) et analysé par le logiciel ImageQuant[®]5.0 (Molecular Dynamics).

8.5.2. Séquençage de l'ADN

Les séquences des différentes constructions ont été vérifiées par la méthode de terminaison de chaînes aux didésoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977) en présence de 4% de

propionamide pour éviter les compressions dues à la forte proportion de GC du génome de *S. lividans*. Chaque didésoxynucléotide est couplé à un fluorochrome différent. Les réactions sont réalisées par le service de séquençage offert par les laboratoires Génome de l'université McGill à l'aide du séquenceur automatique *ABI PRISM 3700 DNA Analyser*.

8.6. Tests biologiques

8.6.1. Mesure de l'activité enzymatique par la méthode des sucres réducteurs

Les clones de *S. lividans* 10-164 obtenus par mutagenèse dirigée sont analysés en milieu liquide in vivo pour la production de xylanase. 2×10^6 spores/ml sont inoculés dans un milieu minimal M14. Des échantillons de 1 ml de culture sont prélevés à intervalles de temps réguliers afin d'évaluer l'activité enzymatique et la courbe de croissance des souches mutantes. Comme la xylanase est une enzyme extracellulaire, c'est à partir du surnageant de culture qu'est déterminée la quantité d'enzyme produite par chaque clone. Le surnageant de culture est incubé en présence de xylane de bouleau. L'hydrolyse de ce substrat libère des sucres réducteurs qui sont ensuite dosés, au moyen de l'acide dinitrosalicylique (DNS), selon la méthode de Miller (1959). Les xylanases de *S. lividans* hydrolysent le xylane de bouleau en oligo-xylosides de tailles variables dont les extrémités réductrices réagissent avec l'acide dinitrosalicylique (acide hydroxy-2-dinitro 3,5-benzoïque ou DNS) pour donner un composé de couleur jaune orangée. Le phénol contenu dans la solution de DNS accentue le niveau de coloration de la réaction tandis que le bisulfite de sodium stabilise la couleur obtenue. L'intensité de la coloration est un indicateur direct de la quantité de sucres réducteurs présents et donc de la quantité de xylanase produite dans le milieu. La mesure est donc effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (*Microplate autoreader EL 309, BIO TEK Instruments*) à une absorbance de 540 nm.

La procédure à suivre pour le test des sucres réducteurs est la suivante : l'échantillon de 1 ml de culture est d'abord centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est recueilli dans un tube eppendorf et le culot contenant le mycélium est conservé pour le test de dosage de l'ADN. Par ailleurs, un tube contenant 300 µl d'eau, 100 µl de tampon citrate-phosphate et 500 µl de xylane de bouleau 1% est pré-incubé dans un bain marie à 60°C pendant 3 minutes. Le tampon citrate-phosphate se compose de 17.22 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 3.43 g d'acide citrique dissous dans 100ml d'eau. Le pH est ajusté à 6.0 en ajoutant de l'un ou

l'autre des composés solides. La réaction enzymatique est déclenchée par addition de 0.1 ml d'une dilution appropriée du surnageant de culture, la solution est incubée à 60°C pendant 10 min. 60°C représente la température optimale de la xylanase A de *S. lividans*. Pour arrêter la réaction d'hydrolyse, 1 ml de solution de DNS est introduit dans tous les tubes refroidis immédiatement sur glace. La solution de DNS contient 10 g d'acide dinitrosalicylique, 10 g de NaOH, 2 g de phénol et 200 g de tartrate de sodium et potassium à laquelle on rajoute au dernier moment 0.5 ml de méta-bisulfite de sodium 10 % pour un volume final de 1 litre. Tous les tubes sont ensuite chauffés au bain Marie bouillant (100°C) pendant 15 min afin d'induire la réaction de coloration expliquée ci-dessus, puis refroidis sur glace. 300 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits d'une plaque Elisa de 96 puits, dont l'absorbance est lue à 540 nm. Pour chaque échantillon testé, un témoin correspondant est établi. Ce témoin mesure la quantité de sucres réducteurs présents dans le surnageant, avant l'incubation de 10 minutes à 60°C. Cette seconde valeur est soustraite de la quantité de sucres réducteurs de l'échantillon. Le témoin est préparé et analysé exactement de la même façon que l'échantillon sauf que les 100 µl de dilution d'enzyme ne lui sont ajoutés qu'une fois que le DNS a été introduit dans le tube. Pour convertir la DO à 540 nm de l'échantillon et du témoin en unité internationale (UI) de xylanase produite, une courbe standard est effectuée à l'aide de concentrations connues de xylose. Une unité enzymatique internationale (UI) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une µmole de substrat (en l'occurrence des oligo-xylosides ou sucres réducteurs) par minute à 60°C.

8.6.2. Mesure de la croissance du mycélium par dosage de l'ADN total

Le dosage de l'ADN est effectué pour chaque échantillon afin d'estimer la croissance bactérienne selon la méthode décrite par Burton (1956). Après avoir prélevé et centrifugé 1 ml de culture, le surnageant est décanté puis le culot est repris par 500 µl de SSC 1X froid (préparé à partir d'une solution mère de SSC 20X composée de 175.3 g de NaCl et 88.2 g de citrate de sodium par litre d'eau et ajustée à pH 7), puis dispersé avec un potter avant de rajouter 500 µl supplémentaires de SSC 1X. À chaque tube, on ajoute successivement 1.0 ml d'acide perchlorique, 2.0 ml de diphénylamine à 4% dissous dans de l'acide acétique glacial et 0.2 ml d'acétaldéhyde à 0.16 %, puis on mélange à l'aide du vortex. Un témoin est également préparé en additionnant les mêmes solutions, mais exempt d'ADN. Recouverts de parafilm, les tubes échantillon et contrôle sont incubés à 30°C pendant 16h sans agitation. 1

ml de suspension est centrifugé pendant 2 min à 14 000 rpm puis l'absorbance du surnageant est lue au spectrophotomètre à 595 nm et à 700 nm. La différence $DO_{595nm} - DO_{700nm}$ permet de projeter la croissance des souches bactériennes en mesurant le contenu en ADN.

8.7. Outils de bioinformatique utilisés

8.7.1. Le logiciel Chromas

La version 1.45 du logiciel Chromas (Klatte, 1996), permet d'extraire du chromatogramme, résultant du séquençage, la séquence d'ADN sous forme de lettres ATCG et de sélectionner la partie fiable de la séquence, celle où le chromatogramme présente des pics de couleur bien marqués sans signal parasite (www.technelysium.com) (**Figure 17**).

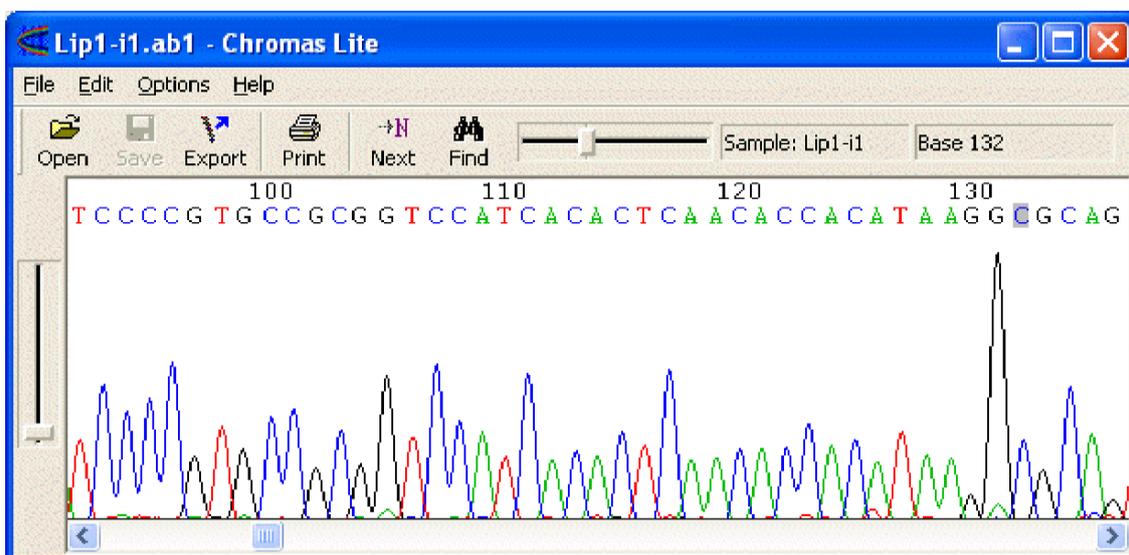


Figure 17 : Exemple de Chromatogramme pour l'analyse de séquences.

8.7.2. Le logiciel BLAST

Le logiciel BLASTN version 2.2.6. (Altschul et al., 1997) est utilisé pour aligner deux séquences d'ADN afin de trouver des régions de séquences similaires ce qui permettrait d'analyser la complémentarité entre l'ARNr 16 dans la petite sous unité du ribosome et les séquences responsables de l'augmentation de la traduction sur le gène de la xylanase A chez *S. lividans*.

**CHAPITRE III:
RÉSULTATS**

9. Alignement de la séquence de l'ARNm de la XlnA avec l'ARNr 16S de *S. lividans*

Des séquences de 6 à 8 nt, que nous avons appelé “boîtes d'activation”, complémentaires à l'ARNr 16S et qui stimulent le processus d'initiation de la traduction ont été mises en évidence dans l'ARNm du long ps. de la *CelA* en amont du gène de structure de la XlnA chez *S. lividans* (Kébir et al., 2000; Barendt, et al., 2012).

Pour satisfaire les objectifs de la présente étude, quant à savoir si des séquences de complémentarité entre l'ARNr 16S et l'ARNm du gène de la XlnA pourraient exister, un alignement de séquence de ce gène avec l'ARNr 16S de *S. lividans* a été effectué. Le Tableau 5 représente les boîtes de 6 nt qui existent dans le gène de structure de la Xln A et qui sont complémentaires à l'ARNr 16S.

Tableau 5 : Les boîtes de 6nt, dans le gène de la XlnA, complémentaires à l'ARNr 16S.

Nom	Position sur le gène	Séquence
Boîte 1	181-186	ATCGCC
Boîte 2	293-298	GCCCAG
Boîte 3	427-432	CGCCAG
Boîte 4	735-740	CCAGTC

Une investigation de la séquence du gène de structure de la *xlnA* a permis de localiser 4 “boîtes” de 6 nucléotides chacune qui sont complémentaires à l'ARNr 16S et que nous pensons qu'elles pourraient avoir un effet sur le taux de traduction de l'ARN de la XlnA. Ces boîtes sont situées aux positions 181-186, 293-298, 427-432 et 735-740 respectivement. Les trois premières boîtes sont réparties régulièrement sur le gène puisqu'elles sont espacées de plus ou moins 100 à 200 nt. La quatrième boîte désobéit à cette régularité et se trouve à environ 300 nt plus loin que la troisième boîte (**Figure 19**).

La **Figure 19** représente la séquence du gène de structure de la xylanase A chez *S. lividans* avec en couleurs les séquences qui représentent une complémentarité à l'ARNr 16S. Les 4 boîtes de 6nt sont représentées en bleu. Le même alignement a été fait pour une détection de séquences de 5 nucléotides, 11 séquences de 5 nt qui sont complémentaires à l'ARNr 16S ont été découvertes et sont représentées en vert sur la **figure 19**. Les

soulignements en vert font allusion à la présence de deux séquences de 5 nt qui se partagent une ou deux bases.



Figure 19 : Séquence du gène de structure de la XlnA.

Afin de vérifier si la complémentarité de séquence ARNm-ARNr 16S est un phénomène commun aux gènes de la bactérie, les gènes de la xylanase B (Xln B) et de la xylanase C (Xln C) ont été soumis au même examen de séquences. Une complémentarité a effectivement été trouvée dans chacun de ces cas. L'analyse des séquences des gènes de la XlnA, de la XlnB et de la XlnC révèle toutefois un profil commun malgré qu'elle n'implique pas nécessairement les mêmes nt, la complémentarité entre l'ARNr 16S et les différents gènes se trouve toujours dans la région de l'ARNr comprise entre les nt 1456 et 1473.

10. Mutagenèse des boîtes contenues dans le gène de structure de la XlnA

Le rôle des séquences, «boîtes», contenues dans le gène de structure de la XlnA et qui sont complémentaires à l'ARNr 16S a été analysé après mutation d'une seule base nucléotidique au centre de chacune des quatre boîtes tout en conservant les acides aminés afin de ne pas toucher la structure de la protéine (**Tableau 6**). Un phagemide, le pTZ19U, est utilisé et dans lequel fut inséré un fragment HindIII-SacI de 1.2 Kb comprenant le long ps. de la Cel A avec le gène de structure la Xln A tronqué, qui ne code que pour le domaine catalytique de l'enzyme.

Tableau 6 : Liste des mutations ponctuelles dans le gène de structure de la XlnA

Nom	Position	Séquence originale	Séquence mutée
911_A8	-	-	-
907.1	181-186	ATC GCC I A	ATT GCC I A
907.2	293-298	GCC CAG G Q	GCA CAG G Q
907.3	427-432	CGC CAG R Q	CGG CAG R Q
907.4	735-740	TTC CAG TC F Q	TTC CAA TC F Q

Les bases originales sont représentées par la couleur orange et les mutations en rouge. Les acides aminés sont ainsi conservés et représentés en bleu et vert.

Deux méthodes de mutagenèse dirigée ont été utilisées pour générer les nouveaux mutants, la mutagenèse dirigée recombinante et la circulaire. Afin de les adapter à la souche de *S. lividans*, une série d'expériences d'optimisation des paramètres temps et températures a été réalisée.

11. Optimisation des méthodes de mutagenèse dirigée par PCR

La méthode de mutagenèse a été fixée en se basant sur les critères suivants: la longueur et le degré de complexité, le nombre et la longueur des amorces et le pourcentage des mutants réussis. Les résultats obtenus sont représentés au **Tableau 7** montrant que la méthode circulaire est efficace quantitativement pour l'obtention de nouveaux mutants, essentiellement la mutation de la quatrième boîte. Cependant, afin d'avoir des traces, nous avons choisi la méthode de mutagenèse recombinante.

Une optimisation des programmes d'amplification par PCR s'est avérée une étape primordiale afin de maximiser la quantité de produit PCR. Afin d'améliorer la qualité et la quantité du produit PCR, nous avons optimisé les températures d'hybridation ainsi que le nombre de cycles utilisés. Ce dernier paramètre s'est avéré le plus influent dans notre expérimentation.

Tableau 7: Comparaison des deux méthodes de mutagenèse par PCR utilisées au cours de ces travaux

Méthode	Efficacité	Complémentarité des oligos internes	Caractéristiques	Description
Circulaire	Très efficace (80%)	Partielle, min 7 bases	2 amorces 1 réaction PCR	Très facile Très rapide
Recombinante	Efficace (40%)	Totale, min 7 bases	4 amorces 2 réactions PCR	Complicquée Longue

Des PCR avec 18, 23, 38 et 33 cycles ont été testées selon le programme PCR cité dans l'annexe K puis comparées entre la mutagenèse recombinante et la mutagenèse circulaire par la détermination des concentrations des produits amplifiés par PCR. Les produits PCR de chacune de ces expériences ont été soumis à une électrophorèse (**Figure 20**).

Les résultats obtenus nous amènent à utiliser un organigramme PCR de 33 cycles pour les deux méthodes de mutagenèse employées. L'amplification n'est obtenue qu'avec le programme PCR ayant effectué 33 cycles. La température d'hybridation et la température d'élongation étant fixées à 52°C et 68°C respectivement pour les deux méthodes.

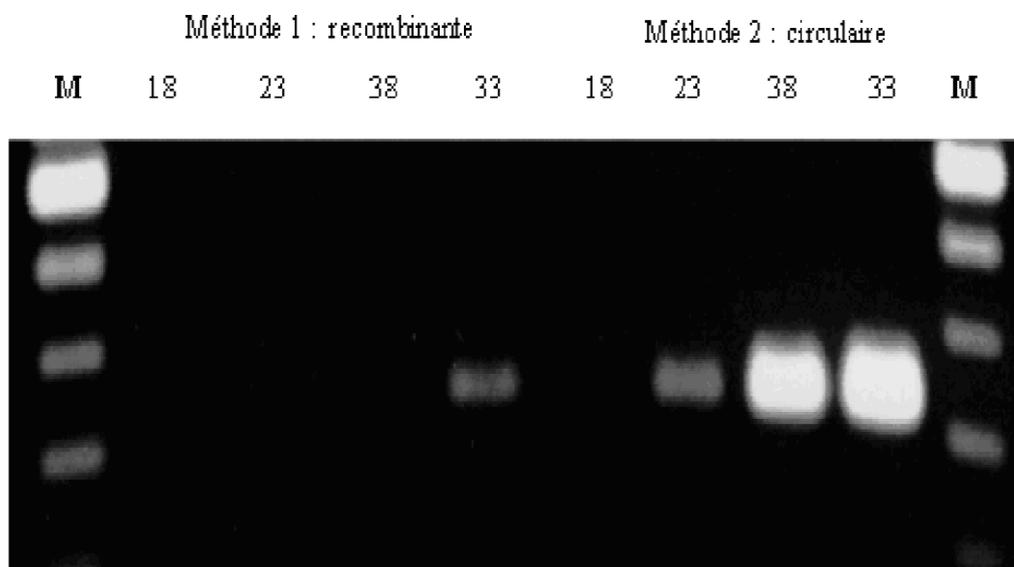


Figure 20 : Optimisation du nombre des cycles de la PCR donnant une meilleure amplification des fragments PCR pour les deux méthodes de mutagenèse dirigée par PCR utilisées: la circulaire et la recombinante. Les deux réactions ont été réalisées dans les mêmes conditions. Le nombre de cycles PCR est varié : 18, 23, 28 et 33 cycles. M : marqueur moléculaire. 5 ul de produit d'amplification par PCR du fragment digéré HindIII-SacI.

La mutagenèse recombinante passe par 3 étapes d'amplification par PCR :

- L'amplification du brin 5'-3' avec une amorce externe et une amorce interne portant la mutation,
- L'amplification du brin complémentaire par une amorce externe et une amorce interne complémentaire portant la mutation et enfin,
- L'amplification par PCR pour la recombinaison des deux premiers brins.

La taille des fragments obtenus par les deux premières PCR varie selon la position de la mutation.

Pour le premier mutant, la taille du fragment obtenu par PCR, utilisant l'amorce interne portant la mutation, est de 838 pb. La taille du fragment obtenu par PCR en utilisant l'amorce interne complémentaire portant la mutation est de 569 pb. La taille du fragment produit par recombinaison est d'environ 1000 pb après digestion HindIII-SacI (**Figure 21**).

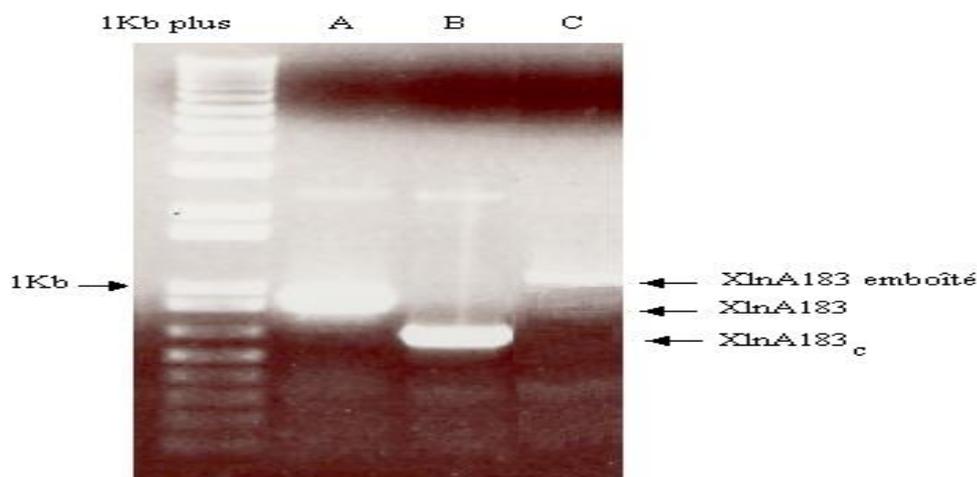


Figure 21 : *Électrophorèse sur gel des fragments obtenus par PCR après mutagenèse dirigée recombinante du premier mutant du gène de structure de la XlnA au niveau de la position 181-186. A : amplification du brin 5'-3' avec les amorces NP20bis- XlnA183 (838 pb). ; B : amplification du brin complémentaire avec les amorces 183c-CD101 (569pb). ; C : Amplification du produit de recombinaison HindIII-SacI (1.2Kb).*

Pour le deuxième mutant, le fragment obtenu par l'amorce interne portant la mutation est de 729 pb et de 300 pb par l'amorce interne complémentaire portant la mutation (**Figure 22**). La taille du fragment produit par recombinaison est également de 1000 pb après digestion HindIII-SacI.

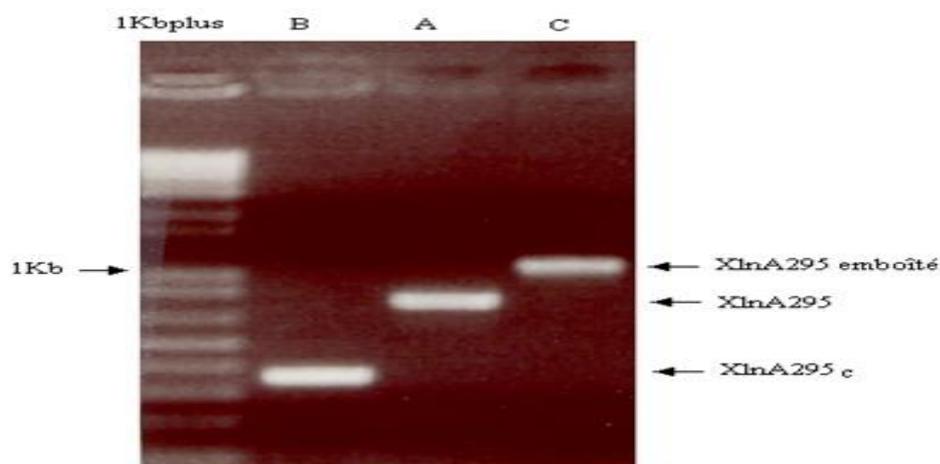


Figure 22 : Électrophorèse sur gel des fragments obtenus par PCR après mutagenèse dirigée recombinante du second mutant du gène de structure de la XlnA au niveau de la position 293-298. A : amplification du brin 5'-3' avec les amorces NP20bis- XlnA 295 (729 pb). ; B : amplification du brin complémentaire avec les amorces 295c- CD101- (300 pb). ; C : Amplification du produit de recombinaison HindIII-SacI (1.2Kb)

Pour le troisième mutant les fragments obtenus sont de tailles respectives 606 pb et 457pb. La taille du fragment produit par recombinaison est également de 1000 pb après digestion HindIII-Sac (Figure 23).

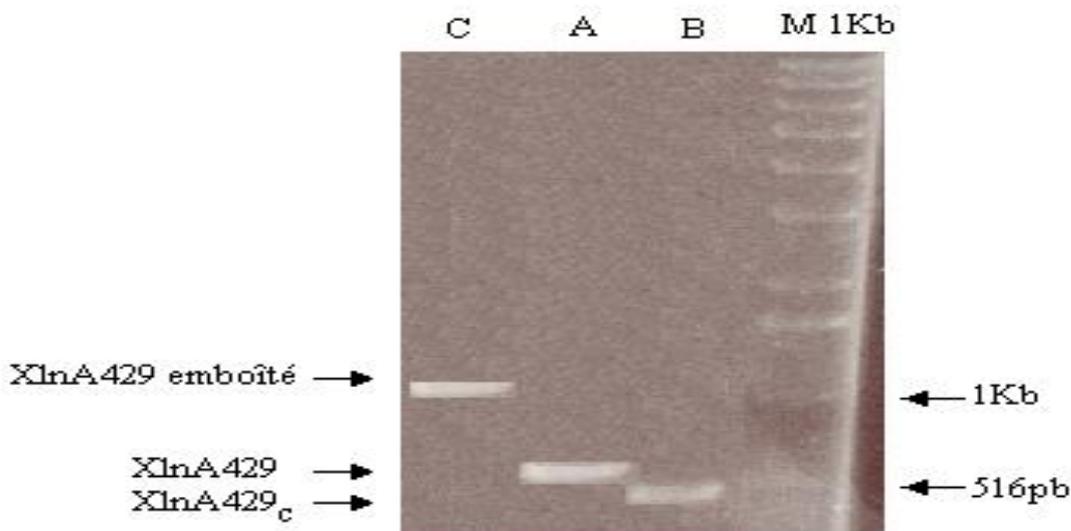


Figure 23 : Électrophorèse sur gel des fragments obtenus par PCR après mutagenèse dirigée recombinante du troisième mutant du gène de structure de la XlnA au niveau de la position 427-432. A : amplification du brin 5'-3' avec les amorces NP20bis- XlnA429 (606pb); B : amplification du brin complémentaire avec les amorces 429c-CD101 (457pb); C : Amplification du produit de recombinaison HindIII-SacI (1.2Kb).

Chapitre III : RÉSULTATS

Après mutagenèse, les clones sont sélectionnés par hybridation avec l'oligonucléotide contenant la mutation puis séquencés afin de s'assurer de la présence effective de la mutation et de vérifier si d'autres mutations indésirables n'auraient pas été introduites dans la construction. Le fragment *HindIII-SacI* contenant la mutation a été cloné dans le plasmide pIAF 906 et ses versions modifiées (**Tableau 8**) pouvant se répliquer chez *S. lividans*. Ce vecteur est dérivé du plasmide à copies multiples pIJ 702, dans lequel le gène de la XlnA a été introduit. Les plasmides résultants ont alors servi à transformer les protoplastes de la souche hôte 10-164 de *S. lividans*, qui est "xylanase et cellulase négative". Les transformants de *S. lividans* sont étalés sur milieu riche R5 en présence de thiostrepton pour la régénération des protoplastes. Afin de distinguer les clones producteurs, une première ronde de sélection a été effectuée sur le milieu solide RBB-xylane.

Tableau 7 : Liste des plasmides utilisés pour la création des nouveaux mutants de *S.lividans*.

Mutant	Caractéristiques du plasmide mutant	Matrice
pIAF911_A.9	Long ps. de la CelA + Gène de structure sauvage XlnA.	
pIAF907.1	Long ps. de la CelA + Gène XlnA (mutation boîte 1 de 6nt : position 183).	pIAF911_A.9
pIAF907.2	Long ps. de la CelA + Gène XlnA (mutation boîte 1 de 6nt : position 295).	pIAF907.1
pIAF907.3	Long ps. de la CelA +Gène XlnA (mutation boîte 1 de 6nt : position 429).	pIAF907.2
pIAF907.4	Long ps. de la CelA + Gène XlnA (mutation boîte 1 de 6nt : position 738).	pIAF907.3

Certaines colonies qui ont poussé sur milieu R5 ont été repiquées sur milieu de RBB-xylane pour voir si elles ont acquis le gène de la xylanase. Au bout de 24 h d'incubation à 30°C, au moins 40% des clones positifs devraient montrer une zone d'éclaircissement, révélatrice de la présence d'activité xylanasiq ue sur cette gélose de coloration bleue. Selon notre expérience, dans la majorité des cas, un pourtour clair de la zone d'éclaircissement révèle la présence du gène complet. Si la zone de lyse est floue, c'est que le gène de la xylanase est tronqué (**Figure 24**).

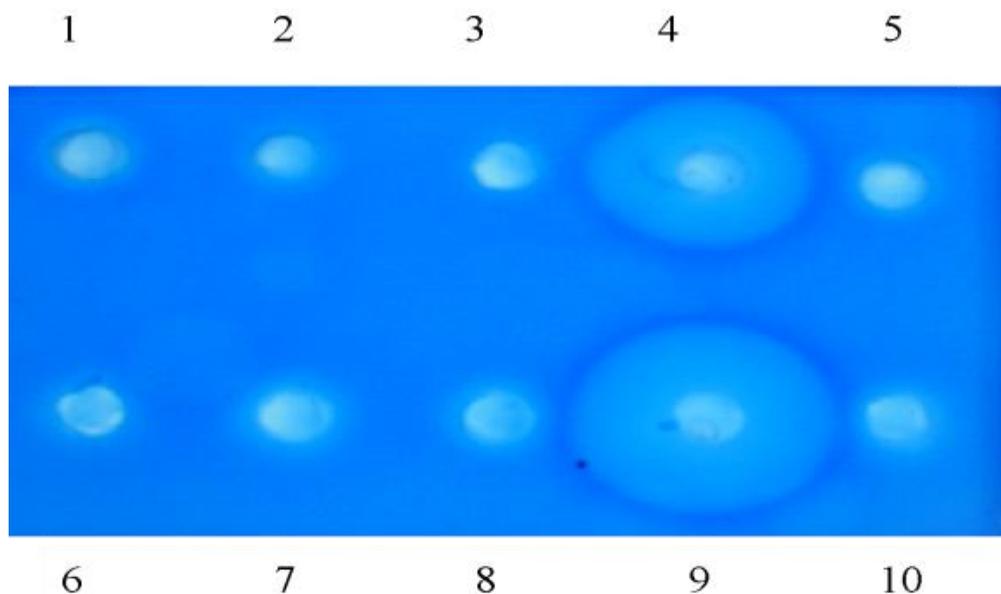


Figure 24 : Recherche d'activité xylanolytique sur RBB-Xylane.

La photo est prise après 24h d'incubation du gel à 30°C pour 8 colonies du mutant **pIAF907_1**. **1** : contrôle vide; **2**: repiquât de protoplastes de la souche 10-164 non transformée; **3 jusqu'à 10**: repiquât de 8 colonies testées de **pIAF907_1**. Dans ce cas, seules les colonies **pIAF907_1 col. 4** et **pIAF907_1 col. 9** sont positives.

Pour permettre les études en milieu liquide, des cultures de spores des cinq meilleurs mutants choisis sur RBB-xylane ont été préparées sur milieu SFM.

12. Effet des mutations sur l'Activité xylanolytique et sur la croissance mycélienne

L'activité xylanolytique et la croissance mycélienne des différents mutants générés au cours de cette étude ont été mesurées à partir des surnageants de culture en milieu minimal M14. Ce milieu a été choisi parce qu'il ne contient aucun élément qui pourrait éventuellement affecter la production de xylanase. Pour pouvoir comparer la production de xylanase de chacun des clones, les milieux de culture ont tous été inoculés avec la même quantité de spores, soit 2×10^6 spores/ml. De plus, avant d'être introduites dans le milieu, les spores ont été soigneusement lavées afin de les débarrasser du glycérol qui a servi à leur conservation. Ce substrat pourrait agir en tant que source de carbone additionnelle et par le fait même, influencer la production de xylanase. Les cultures ont été incubées durant 144 heures à 34°C et des échantillons de 1 ml en ont été prélevés à intervalles de temps réguliers pour permettre

d'effectuer les tests d'activité enzymatique et de mesurer la croissance des clones.

Comme le développement des streptomycètes passe par la formation de mycélium, il était absolument inconcevable de mesurer la croissance des souches en prenant la densité optique des cultures. La croissance du mycélium aurait pu être évaluée par le dosage des protéines totales mais cette méthode requiert une étape embarrassante de cassage des cellules aux ultrasons. Nous avons opté pour le dosage de l'ADN total à la diphénylamine. Le test de dosage de l'ADN permet de s'assurer que les différences observées au niveau de la production de xylanase des souches ne sont pas dues à des variations de la croissance des clones mais bien à l'effet des mutations qui ont été introduites. Le contenu en ADN de chaque clone fût évalué à 24 h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. La production de xylanase de chaque clone a été évaluée grâce à la méthode des sucres réducteurs. Les courbes bleues représentées sur les **figures 25, 26 et 27** illustrent les quantités de xylanases sécrétées dans les surnageant de cultures par chacun des clones **pIAF907_1**, **pIAF907_2** et **pIAF907_3** respectivement, en fonction du temps. Les essais de création du mutant **pIAF907_4** ont tous échoué, nous n'avons donc pas obtenu des résultats pour ce mutant.

L'allure générale des différentes courbes d'activité pour les 3 mutants obtenues se ressemble mais avec des profils propres à chaque clone. Tous les mutants du gène de structure de la XlnA sont comparés à la souche contrôle IAF 911 _A.9. Ce clone de référence possède le long ps de la CelA contenant une séquence de complémentarité de 6nt. avec l'ARNr 16S. Cette souche possède une activité xylanolytique de 770 UI/ml à 144h, soit environ 10 fois plus importante que celle d'IAF_906, qui contient le ps sauvage de la XlnA.

La production de xylanase des différents clones continue à augmenter jusqu'au temps 144h sans atteindre une phase stationnaire (**figures 25, 26 et 27**). Le nouveau mutant pIAF 907_1 et pIAF 907_3, contrairement au pIAF 907 _2, ont une production xylanolytique qui dépasse celle de la souche contrôle IAF 911 _A.9.

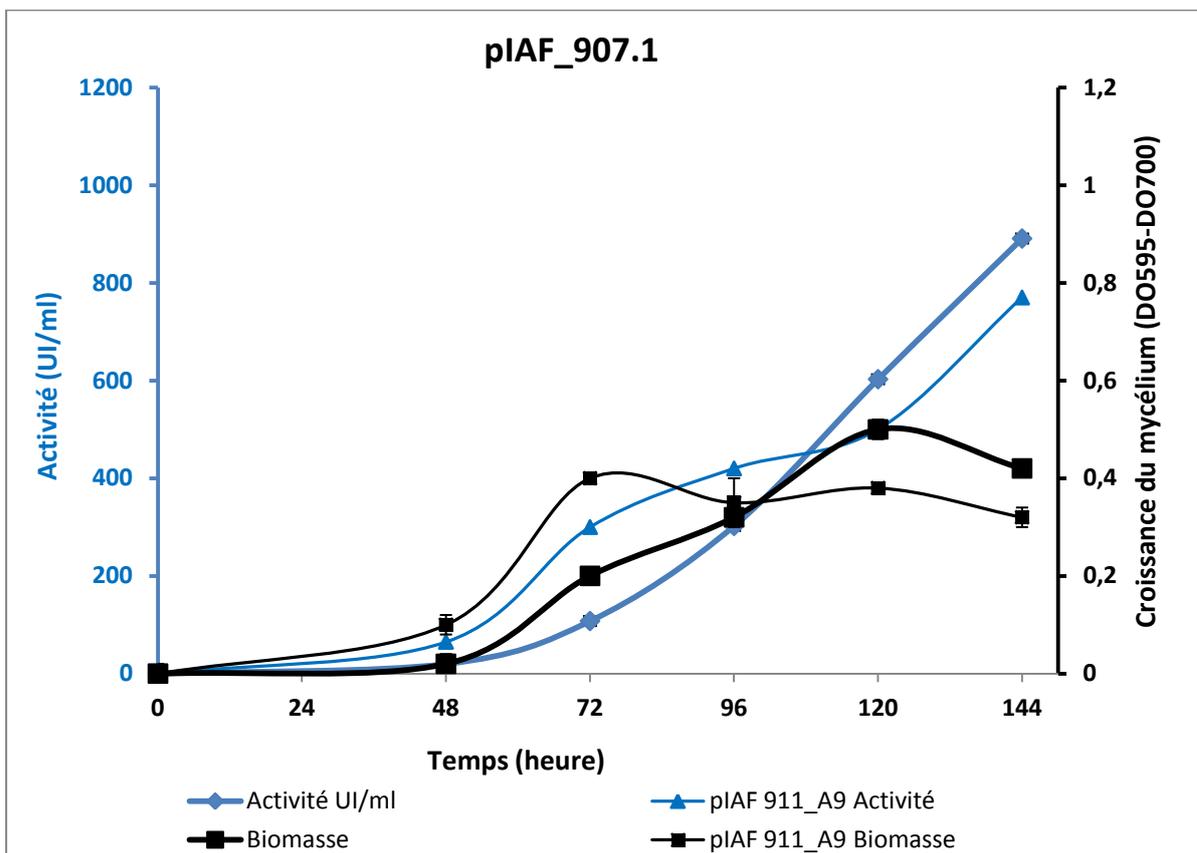


Figure 25: Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones du mutant pIAF_907.1 au cours du temps.

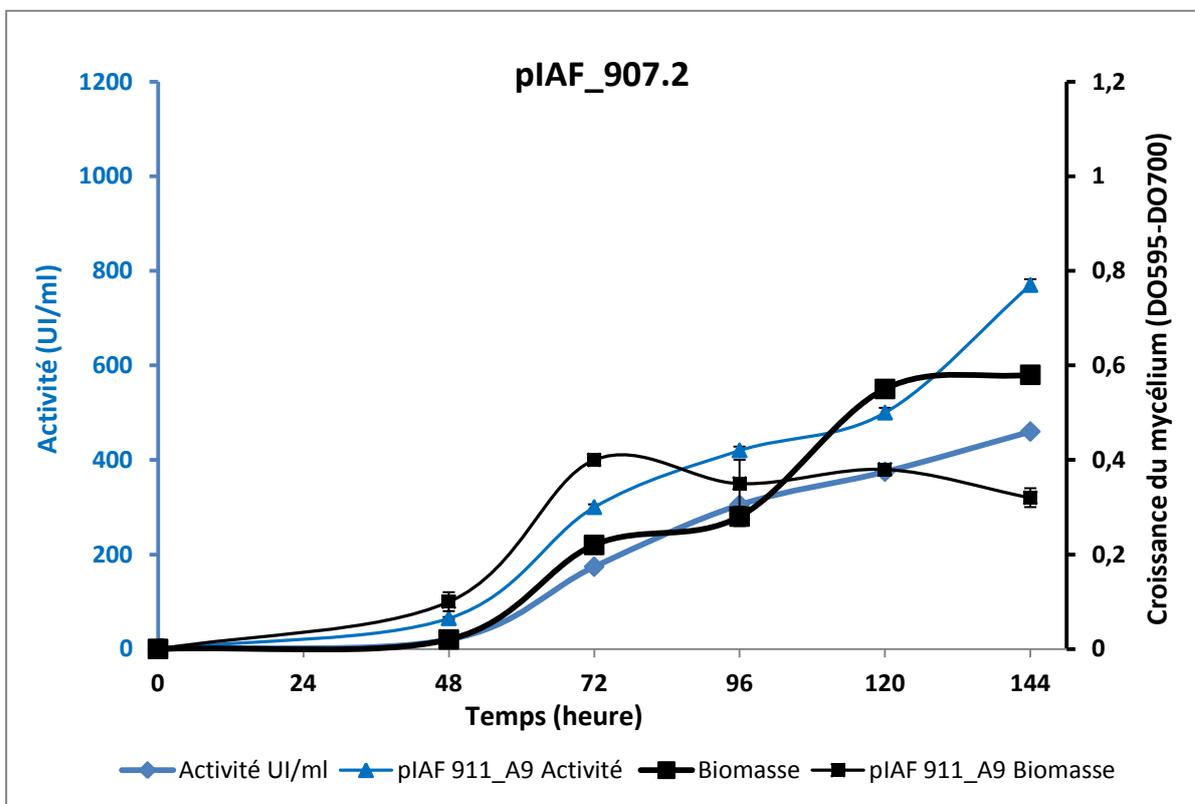


Figure 26 : Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones du mutant pIAF_907.2 au cours du temps.

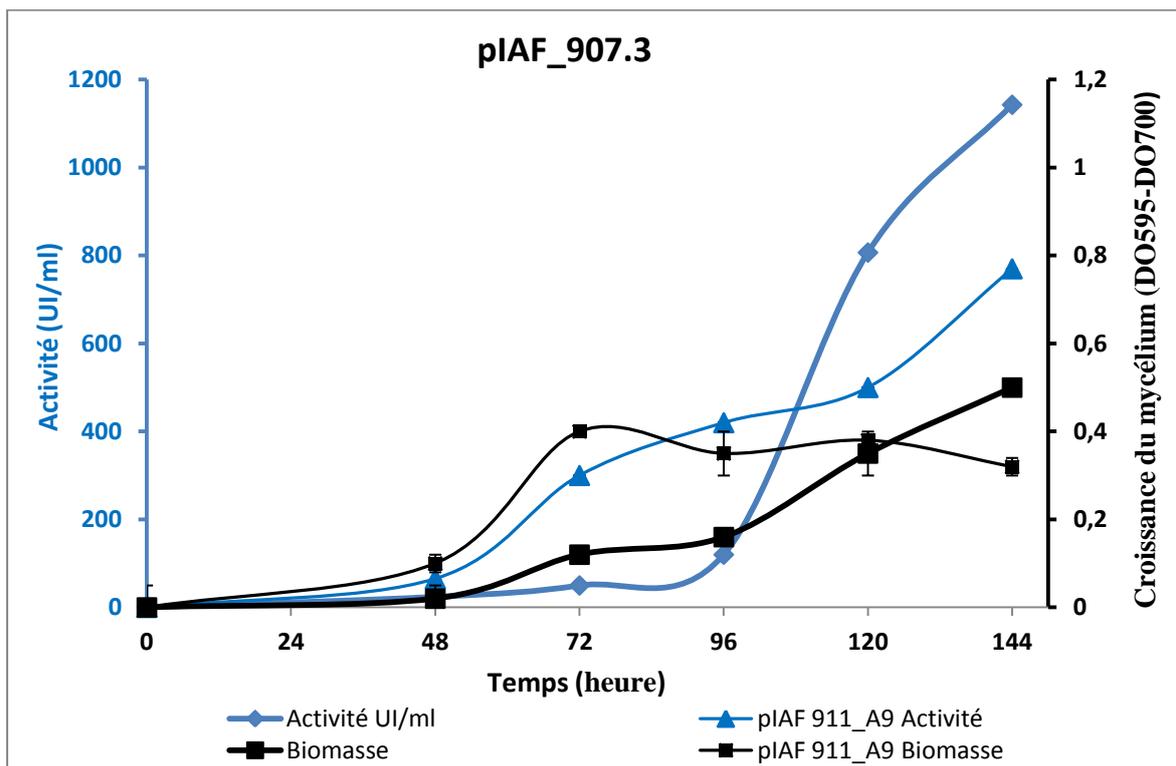


Figure 27: Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones du mutant pIAF_907.3 au cours du temps.

D'après l'activité spécifique de la xylanase, qui est de 400 UI/mg, 100 UI/ml correspondent à 250 mg de xylanase par litre, ce qui donne une idée de la production obtenue par chaque clone, en termes de quantité de protéine.

Le changement de séquence 6 nt contenues dans le gène de structure de la Xln A, et qui complémentaires à l'ARNr 16S, par introduction de mutations ponctuelles à l'intérieur de ces séquences résultant des mutants pIAF_907.1, pIAF_907.3 et pIAF_907.2, a permis d'obtenir une activité enzymatique de 15.7% et de 48.44 % ($P \leq 0.05$) pour les deux premiers mutants respectivement, et ce par rapport à l'activité de la xylanase A produite par la souche contrôle IAF911_A.9. Pour le mutant pIAF_907.2, l'activité a baissé de 40.26% ($P \leq 0.05$) (Figure 28).

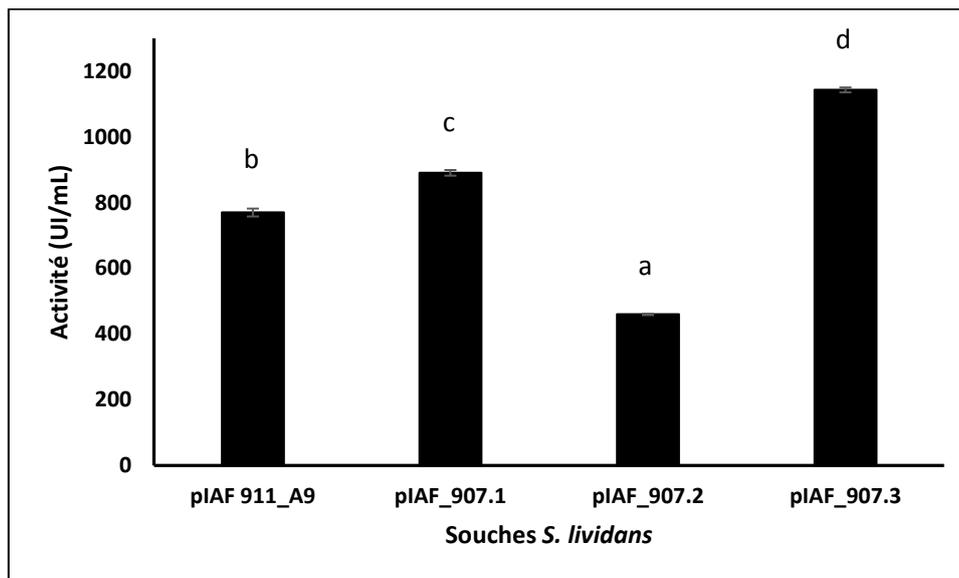


Figure 28. Variation de l'activité de la xylanase pour les quatre souches étudiées.

L'expérience a été répétée trois fois de manière indépendante ($n=3$) avec chaque condition en triplicata pour chaque expérience. Les barres d'erreur représentent les erreurs types des moyennes. Les lettres a, b, c et d représentent les résultats d'analyse de variance (ANOVA), Duncan. Les différences entre les moyennes ont été considérées significatives ($P \leq 0,05$).

La croissance bactérienne est représentée par la croissance du mycélium récupéré dans le culot du surnageant de culture. La croissance bactérienne est latente et très faible pendant les 48h premières heures pour les trois mutants, puis la biomasse évolue remarquablement pendant les 96 heures qui suivent. La phase de latence peut être expliquée par une phase d'adaptation des bactéries à leur nouveau milieu de culture. En comparaison avec l'allure de la courbe de croissance de la souche contrôle, le même profil est observé pour les trois souches bactériennes là où la croissance des mutants commence à se stabiliser, voir même décliner à partir de 124h jusqu'à la fin de la période de culture, en parallèle avec le contrôle, sauf pour le mutant pIAF_907.3 où la croissance continue à augmenter jusqu'à 144h. Pour le mutant pIAF_907.3, l'évolution de la courbe de croissance microbienne semble suivre la même allure que celle de l'activité xylanolytique.

Une autre observation découle de l'analyse des courbes de croissance (**Figures 25, 26 et 27**) montrant que les clones qui produisent le plus de xylanase semblent aussi être ceux dont la croissance est la plus faible. Cela pourrait être attribué au fait que le métabolisme de ces clones est davantage orienté vers la production de xylanase et que les cellules disposent alors de moins d'énergie pour leur croissance en milieu minimal (Krishnan et al., 2010).

13. Rôle des “boîtes” du gène de la xylanase A

Pour comprendre le rôle des « boîtes » de 6nt existant dans le gène de structure de la XlnA et qui sont complémentaires à l'ARNr 16S dans l'amélioration de l'expression du gène de la xylanase A, nous avons analysé les résultats émanant des trois nouveaux mutants chez *S. lividans* obtenus pIAF_907.1, pIAF_907.2 et pIAF_907.3 après interruption de cette complémentarité à l'ARNr 16S aux positions 183, 295 et 429, et pouvant influencer la production de la XlnA. Nous avons ainsi créé un mutant de *S. lividans*, pIAF_907.3 acquérant une complémentarité accrue à l'ARNr 16S, et ce au niveau de 3 séquences spécifiques du gène XlnA. Ce nouveau mutant acquiert une performance élevée à la production de l'enzyme xylanase A.

Nous avons également montré que la modification de la première séquence (ATC GCC par ATT GCC) induit une augmentation de 30% de la production de la xylanase. Il semble que cette augmentation de production est due à la variation de structure secondaire de l'ARNm par le changement de la base purique (C) par une base pyrimidique (T) ce qui pourrait favoriser le processus de la traduction (**Figure29**).

De même, la mutagenèse de la troisième séquence (CGC CAG par CGG CAG), nous a permis d'augmenter le taux de production de xylanase de 50%. Il s'avère que ces deux mutations consécutives favorisent le déplacement du ribosome sur l'ARNm.

Le changement de la seconde séquence (GCC AGT par GCA AGT) dans le mutant de la première séquence nous a permis d'obtenir une baisse importante du niveau de la xylanase, démontrant ainsi le rôle évident qu'elle jouerait dans la stimulation des taux de production de l'enzyme. Ainsi, nous avons démontré que la DB joue un rôle important dans la stimulation du taux de production de xylanase. Cela nous aide à mieux comprendre comment certains ARNm dépourvus de séquence de tête (ou « leader ») sont tout de même traduits de façon très efficace.

En outre, nous avons été en mesure de produire plus de 3g/l de xylanase obtenue avec la souche dépourvue des trois séquences de 6 nt complémentaires à l'ARNr 16S. **Un effet inverse a été obtenu alors qu'on s'attendait à une baisse remarquable de la production par la destruction des régions de complémentarité avec l'ARNr 16S.**

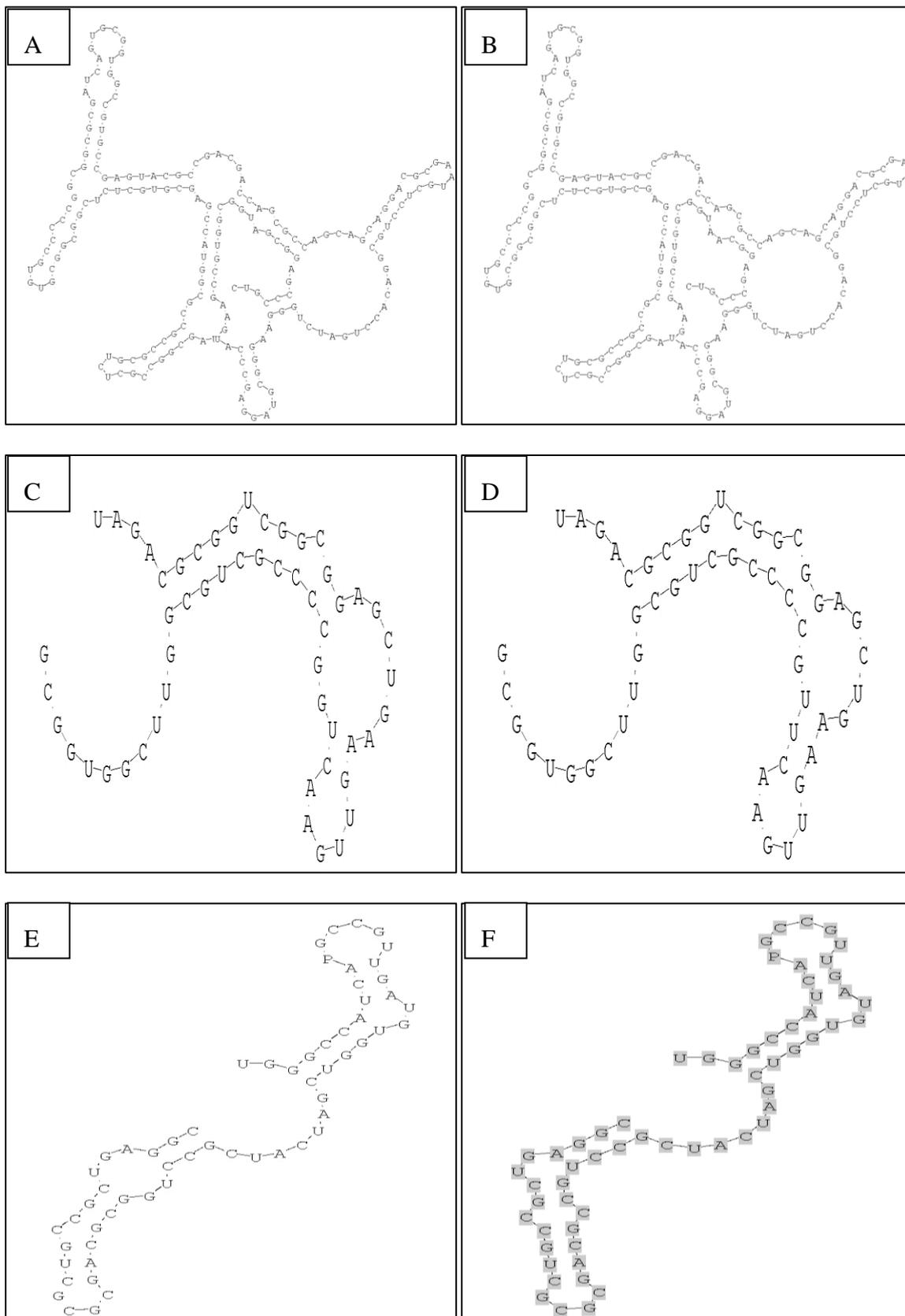


Figure 29. Structures secondaires des séquences d'ARNm avant et après mutations des boîtes de 6nt (1, 2 et 3) dans le gène *XlnA* ; A, C et E: Structures natives des clones IAF911_A9, pIAF_907.1 et pIAF_907.2 incorporant les séquences des boîtes 1, 2 et 3 respectivement; B, D et F : Structures des nouveaux mutants pIAF_907.1, pIAF_907.2 et pIAF_907.3 des boîtes 1, 2 et 3 respectivement.

**CHAPITRE IV : DISCUSSION &
PERSPECTIVES**

L'étude des séquences de 6nt par mutations ponctuelles montre que celles-ci influencent la production de la xylanase. Cependant, certains points concernant le rôle que joue chacune de ces séquences dans la stimulation ou la réduction des taux de production d'enzyme, demeurent inexpliqués. En ce qui suit, nous proposons trois analyses hypothétiques.

14. Influence des séquences de 6 nt complémentaires à l'ARNr 16S sur la production de la XlnA chez *S. lividans*

Le changement de séquence complémentaires à l'ARNr 16S qui sont contenues dans le gène de structure de l'ARNr 16S par introduction de mutations ponctuelles à l'intérieur de ces quatre séquences de 6 nt (mutants pIAF_907.1, pIAF_907.2 et pIAF_907.3), a augmenté de 15% l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture pour le premier mutant et de 50% pour le mutant portant les trois séquences modifiées, et ce par rapport à la souche contrôle IAF911_A.9. Pour le mutant pIAF_907.2, l'activité a baissé de 40%.

Si pour les mutants pIAF_907.1 et pIAF_907.3, la production de la xylanase a augmenté par rapport à celle du contrôle, pour le mutant pIAF_907.2, cette production a diminué. Ces résultats prouvent que les hauts niveaux de production de xylanase obtenus avec le gène de structure natif, contenant les quatre séquences de 6nt complémentaires à l'ARNr 16S, est attribuable à la DB (TCCCA). Ces résultats corroborent ceux de l'équipe de Sprengart, qui rapporte que l'élimination de la DB du gène 0,3 du bactériophage T7 abolit presque entièrement l'activité traductionnelle de l'ARNm (Sprengart et al., 1990 et 1996). Il a été démontré que la présence de la DB est également requise pour l'induction des hauts niveaux de traduction du gène rpoH d'*E. coli* (Nagai et al., 1991). De la même façon, il a été proposé qu'une DB stimule l'expression des gènes glnS et lysU d'*E. coli* (Faxén et al., 1991).

15. Influence des mutations sur la structure secondaire de l'ARNm

La structure secondaire de l'ARNm chez *S. lividans* est très riche en épingles à cheveux vue la richesse du génome de cette bactérie en bases G et C. Des nouvelles souches portant des mutations ponctuelles (par l'insertion ou l'élimination d'une base purique) pIAF_907.1, pIAF_907.2 et pIAF_907.3 montrent une interaction entre l'ARNm et l'ARNr 16S au sein de la petite sous-unité du ribosome.

D'après Yoshizawa et son équipe (1999), les positions N-terminales (position 1492-1493) de l'ARNr 16S qui sont associées avec les 2'OH du codon de l'ARNm et ayant une liaison

correcte codon – anticodon entre l'ARNm et l'ARNt cognate déplace le codon dans une bonne orientation ce qui favorise sa liaison avec l'ARNr. Une interaction incorrecte entre l'ARNm et l'ARNt proche cognat entraîne une paire de bases non appariée dans les deux premières positions de l'hélice codon-anticodon, ce qui modifie ces structures, altère le contact N1 et diminue le signal de conformation correcte.

Dresios et son équipe (2006) ont étudié le mécanisme de complémentarité des bases appariées ARNm-ARNr intervenant dans l'initiation de la traduction chez les eucaryotes en comparaison avec l'appariement de bases entre l'ARNm et l'ARNr. Bien que l'appariement de bases analogues ait été suggéré pour affecter la traduction de divers ARNm eucaryotes, des preuves directes ont manqué. Pour tester cet appariement de bases, ils ont développé un système de levure qui utilise des ribosomes contenant un ARNr 18S hybride de levure et de souris. En utilisant ce système, ils ont démontré qu'un élément de 9 nucléotides trouvé dans l'ARNm de l'homéodomaine de Gtx de souris facilite l'initiation de la traduction par appariement de bases à l'ARNr de 18S. Diverses mutations ponctuelles dans l'élément Gtx et dans l'ARNr de 18S de levure hybride ou de type sauvage ont confirmé l'exigence d'une correspondance complémentaire intacte. La présence de l'élément Gtx dans divers ARNm suggère que cet élément affecte la traduction de groupes d'ARNm.

Le rôle de la complémentarité du contexte des sites de liaison du ribosome non-Shine-Dalgarno à l'ARNr d'*E. coli* (RBS) a été étudié par Barendt et son équipe en 2012. Quarante-deux bases ont été supprimées de l'UTR 5' constant pour créer une construction avec une longueur de leader plus représentative des longueurs de leader trouvées naturellement dans *E. coli*, typiquement de 20-40 bases. La molécule d'ARNm utilisée avait seulement 21 bases en amont du RBS randomisé à 18 bases pour permettre la récupération par RT-PCR. La plupart des motifs non-SD ont été révélés par le séquençage à haut débit après trois cycles de sélection de plus en plus stricte pour assurer une traduction très efficace. Cependant, la nature de ces motifs non-SD diffère beaucoup des motifs non SD observés. Le leader plus court a permis la sélection de motifs riches en G et en U, dont beaucoup présentait une complémentarité parfaite avec des motifs riches en C et en A de l'ARNr 16S de *E. coli*. De plus, le leader le plus court a permis la sélection des RBS ayant une similitude frappante avec les RBS naturels d'*E. coli* et certains d'entre eux se sont très bien comportés *in vivo*.

L'équipe de Barendt (2012) a conclu que la complémentarité de motifs courts dans l'UTR 5' à des motifs courts dans l'ARNr 16S facilite probablement l'efficacité traductionnelle et ont démontré que des contacts transitoires entre l'ARNm et l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale permettraient à l'ARNm d'augmenter la concentration locale de ribosomes dans

son voisinage et de se re-positionner pour former un complexe de préinitiation productif capable de rejoindre la grande sous-unité ribosomale et de commencer l'élongation. Ils ont ainsi conclu que l'association de bases entre les motifs courts et riches en C des RBS non SD et l'ARNr riche en G de la sous-unité ribosomale petite permet une traduction rapide, très probablement grâce au repositionnement rapide de L'ARNm sur la petite sous-unité ribosomale pour former un complexe de préinitiation productif qui peut ensuite rejoindre la grande sous-unité ribosomale et procéder rapidement à l'allongement.

16. Refus de la fixation de la quatrième boîte de 6 nt chez *S. lividans*

Au cours de ce travail, il était prévu de quantifier l'effet de la mutagenèse de la quatrième séquence de 6nt en utilisant comme matrice le mutant pIAF_907.3. L'obtention de ce mutant n'était cependant pas possible. Le séquençage des fragments obtenus par PCR de l'insert avant clonage montre la présence de la mutation, sauf que le produit de séquençage du plasmide extrait après clonage et transformation dans les protoplastes 10-46 de *S.lividans* est négatif. Les essais également réalisés dans le but de fixer la mutation chez *E. coli* en premier ont été vains. C'est pourquoi on pense que la bactérie refuse plus de mutations dans la séquence du gène de structure de la XlnA.

Chez certaines bactéries, la traduction de certains gènes peut être instable à cause de la présence d'une mutation. La **Figure 30** ci-dessous (Chatterjee et al., 2011; Mehra et al., 2008) représente un exemple d'une expression instable du gène de biosynthèse des antibiotiques chez *S. coelicolor*.

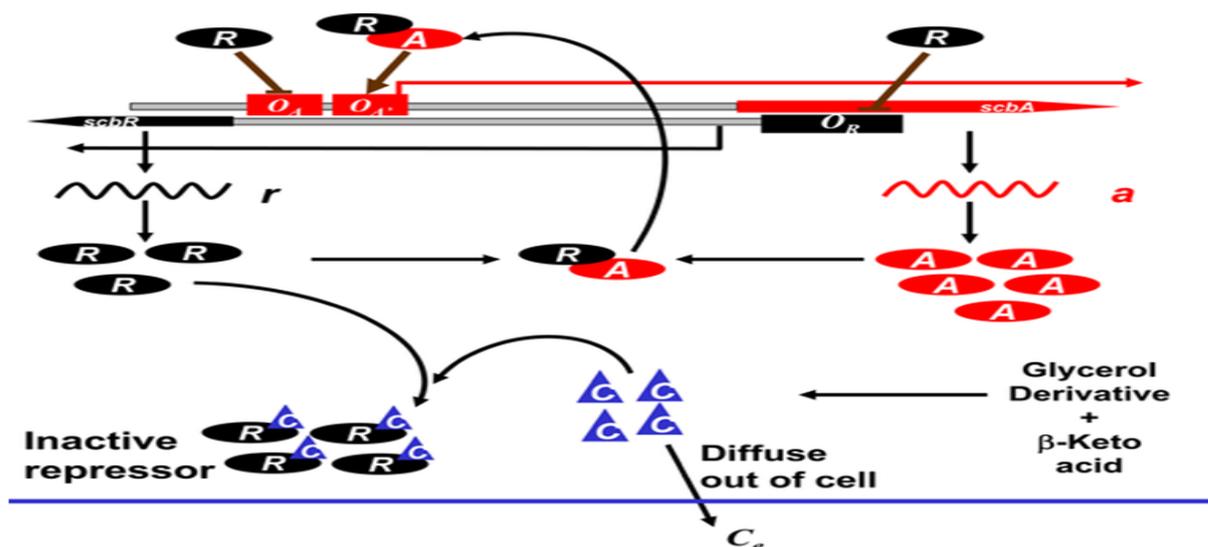


Figure 30: Diagramme schématisé du système ScbA/ScbR du Butyrolactone Regulon chez *S. coelicolor* responsable d'une expression instable du gène de biosynthèse des antibiotiques (Extrait et adapté de Mehra et al., 2008).

Dans la figure 30, les deux brins d'ADN sont représentés en noir. Le gène *scbA* est présent sur le brin positif (montré en rouge) tandis que le *scbR* est présent sur le brin opposé (représenté en noir). La protéine ScbR (**R**) peut se lier au site opérateur OU réprimer la transcription à partir du gène *scbR*. ScbR lié à l'OA réprime la transcription à partir du gène *scbA*, tandis qu'un complexe protéine-protéine ScbA-ScbR (**AR**) active la transcription à partir du gène *scbA*. La flèche émoussée indique la répression et la flèche pointue désigne l'activation. Les deux ARNm, **scbR** et **scbA** sont représentés par **r** et **a**, respectivement. Le **SCB1** intracellulaire (représenté par **C**) est formé à partir de dérivés de glycérol et de β -cétoacide par action enzymatique de **ScbA** (**A**). SCB1 peut former un complexe avec la protéine **ScbR** (**CR**), et aussi diffuse hors de la cellule (**Ce**).

17. Recherche d'autres séquences complémentaires à l'ARNr 16S dans le gène de la XlnA

L'équipe de Kébir (2000) a démontré que la présence, dans ce même ps long du gène de la Cellulase, d'une courte séquence de 5 nt complémentaire aux nt 1461 à 1465 de l'ARNr 16S de *S. lividans*, contribue, elle aussi, à stimuler la production de la xylanase. Le retrait de cette séquence du ps long de la *celA* a conduit en une baisse importante du niveau de xylanase. De même, une complémentarité très forte (17 nt) entre cette séquence et l'ARNr 16S empêcherait le ribosome de se détacher de l'ARNm pour poursuivre le processus de traduction. D'après Kébir et al. (2000), il semble que la longueur optimale de la séquence du ps long de la *CelA* soit de 6, 7 ou 8 nt. Une telle longueur de séquence de complémentarité avec l'ARNr 16S permet d'obtenir une production 10 fois plus que celle obtenue avec le ps sauvage de la XlnA (kébir et al., 2000).

Une investigation de la séquence du gène de structure de la XlnA montre la présence de 11 séquences de 5 nt qui sont complémentaires à l'ARNr 16S et qui pourraient justement avoir un effet sur la traduction. Justement, des mutations ponctuelles au niveau des nt 183, 295 et 429 dans le gène a laissé penser qu'il serait probable que l'augmentation du taux de la traduction de la XlnA de 48.44% dans le troisième mutant, obtenue après une élimination des trois premières séquences de 6nt, soit le résultat de l'intervention des séquences de 5 nt dans XlnA, complémentaires à l'ARNr16S, afin de couvrir ce changement.

Ce résultat affirme celui obtenu avec l'équipe de Kébir (2000) qui ont prouvé que même des complémentarités de séquences de 5nt stimuleraient la traduction de la XlnA et une

production de l'ordre de 1.6g/l est quand même obtenue avec le mutant 911A (Kébir et al., 2000).

D'un autre côté, la DB a été décrite comme un élément stimulateur de la traduction qui agirait en s'appariant avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (Sprengart et al., 1990). Les résultats obtenus dans notre étude suite à l'interruption de la complémentarité à l'ARNr 16S, semblent apporter des probabilités additionnelles de l'existence et du rôle de la DB dans le processus d'initiation de la traduction. Les bases moléculaires et biochimiques de l'interaction DB-ADB restent cependant à élucider. Les expériences de protection d'ARN tentant de prouver directement la présence de l'interaction DB-ADB se sont toutes soldées par des échecs (Etchegary et Inouye, 1999).

La seconde séquence présente des caractéristiques analogues à celles de la «downstream box» ou (DB) découverte un peu plus tôt par l'équipe de Sprengart, dans certains ARNm de la bactérie *E. coli* (Sprengart et al., 1996).

Il est également probable que la DB ne soit pas le seul élément qui stimule la production de la xylanase dans ce cas. Le changement de la base C par A dans ce cas crée une interaction non correcte entre l'ARNm et l'ARNr proche, ce qui entraîne une paire de base non appariée dans leur position de l'hélice codon-anticodon et modifie ainsi la structure. Ce phénomène pourrait altérer le contact entre l'ARNm et l'ARNr 16S et diminuer le signal de conformation correcte (Barendt, et al., 2012).

D'autre part, Barendt et al.(2012) ont étudié la spécificité de la complémentarité de certaines séquences de l'ARNm avec des séquences de l'ARNr dans la traduction des protéines. Ils ont utilisé un système de traduction minimal, reconstitué à partir d'*E. coli* pour identifier des sites de liaison efficaces aux ribosomes (RBS) sans biais et à haut débit. Ils ont appliqué une puissante méthode de sélection in vitro de ribosomes et permettant d'enrichir seulement les séquences d'ARNm qui pourraient diriger la traduction rapide des protéines. En plus des motifs canoniques Shine-Dalgarno (SD), ils ont récupéré des séquences riches en cytosine hautement efficaces (riches en C) qui présentent une complémentarité sans équivoque à l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome, ce qui indique que l'appariement de bases de spécificité large peut être un mécanisme général inhérent à une traduction efficace. En outre, compte tenu de la conservation de la structure et de la fonction ribosomiques entre les espèces, la plus grande pertinence des séquences RBS riches en C identifiées par cette approche d'évolution in vitro est appuyée par de multiples exemples variés dans la nature, y compris les RBS riches en C chez plusieurs bactériophages et plantes, un consensus de poly-C avant le codon d'initiation chez les eucaryotes inférieurs et des séquences de type Kozak

chez des vertébrés.

Basé sur des analyses statistiques rigoureuses, Barendt et al. ont conclu que la complémentarité de motifs courts dans l'UTR 5' à des motifs courts dans l'ARNr 16S facilite probablement la traduction la plus efficace. Les contacts transitoires entre l'ARNm et l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale peuvent permettre à l'ARNm d'augmenter la concentration locale de ribosomes dans son voisinage et de se repositionner comme nécessaire pour former un complexe de préinitiation productif capable de rejoindre la grande sous-unité ribosomale et de commencer l'élongation.

En comparant cette étude avec le présent travail, il est évident que la longueur et / ou la composition en séquences de l'UTR 5' affecte les identités spécifiques des séquences complémentaires qui sont les plus efficaces pour traduire un transcrite particulier. Cependant, les résultats expérimentaux et computationnels soutiennent la complémentarité ARNm-ARNr en tant que mécanisme général, de large spécificité pour une traduction efficace, influencé aussi bien par la nature que par la longueur du peptide signal.

En perspectives, il serait également intéressant d'étudier de plus près la modification des structures secondaires engendrée par les mutations ponctuelles créées.

L'optimisation des caractéristiques de la séquence de l'ARNr 16S exposée à l'ARNm afin de mieux déchiffrer les complémentarités de séquence avec l'ARNm, ainsi, il serait convenable de mieux définir en premier les limites 5' et 3' de la séquence de l'ARNr 16S exposée à l'ARNm et qui stimulerait la production de la XlnA, mais aussi de définir la position par rapport au premier codon d'initiation de la traduction des séquences dans l'ARNm qui sont complémentaires à l'ARNr 16S.

Notons que onze séquences de 5 nucléotides également complémentaires à l'ARNr 16S ont été localisées dans le gène de structure et réparties entre les boîtes de 6nt. Ces séquences jouent un rôle important dans la production de l'enzyme, ceci suggère que la présence de ces boîtes de 5nt pourrait compenser les effets de la modification des boîtes de 6nt. En perspective, nous envisageons également de modifier ces boîtes de 5 nt afin de vérifier cette hypothèse de compensation des boîtes de 6 nt.

CONCLUSION

Les protéines sécrétées par des bactéries Gram-positives sont libérées dans le milieu de culture tout en conservent habituellement leur conformation native. Cette propriété rend ces cellules hôtes potentiellement intéressantes pour la production de protéines recombinantes, car on peut tirer pleinement profit des protocoles établis pour la purification des protéines actives. Étant donné l'importance des xylanases pour les industries de bio-blanchiment des pâtes de papier, il apparaissait intéressant d'élaborer une souche hyper-productrice de cette enzyme. Cette présente étude a permis de mettre au point une méthode de transformation génétique pour améliorer la production de la xylanase A chez *S. lividans* via la mutagenèse dirigée au niveau du gène de structure de la XlnA.

Nous avons ainsi créé un mutant de *S. lividans*, pIAF_907.3 ayant une complémentarité réduite à l'ARNr 16S, et ce au niveau de 3 séquences spécifiques du gène XlnA. Ce nouveau mutant possède une performance élevée à la production de l'enzyme xylanase A.

Notre présente étude a montré également que cette surproduction d'enzyme était due également en partie à la présence de séquence codant pour le ps long de la CelA renfermant deux codons d'initiation de la traduction dans le gène de structure de la XlnA et qui sont complémentaires à l'ARNr 16S. Nous avons mis en évidence quatre séquences de 6 nt dans le gène de la XlnA, aux positions 181-186, 293-298, 427-432 et 735-740, influençant ainsi la production de la XlnA.

La rupture de cette complémentarité de séquences avec l'ARNr 16S par mutagenèse dirigée à l'intérieur de ces séquences par effet cumulatif influence la production de la XlnA. Nous avons également montré que la modification de la première séquence (ATC GCC par ATT GCC) induit une augmentation assez importante de la production de la xylanase. Il semble que cette augmentation de production est due à la variation de structure secondaire de l'ARNm par le changement de la base purique (C) par une base pyrimidique (T) ce qui pourrait favoriser le processus de la traduction.

De même, la mutagenèse de la troisième séquence (CGC CAG par CGG CAG) a permis d'augmenter remarquablement la production de la xylanase A. Pour expliquer cela, nous mettons ainsi l'hypothèse que ces deux mutations consécutives favorisent le déplacement du ribosome sur l'ARNm.

Le changement de la seconde séquence (GCC AGT par GCA AGT) dans le mutant de la première séquence nous a conduits à l'obtention d'une baisse importante du niveau de la xylanase, démontrant ainsi le rôle évident qu'elle jouerait dans la stimulation des taux de

production de l'enzyme. Nous mettons ainsi l'hypothèse que le changement de la base C par la base A pourrait avoir créé une structure secondaire engendrant ainsi un ralentissement du déplacement du ribosome sur l'ARNm.

En somme, nos travaux nous ont permis de prouver que la DB occupe une fonction prépondérante dans la stimulation du taux de production de xylanase. Cela nous aide à mieux comprendre comment certains ARNm dépourvus de séquence de tête (ou « leader ») sont tout de même traduits de façon très efficace.

En effet, grâce à notre étude, nous avons été en mesure de produire plus de 3g/l de xylanase obtenue avec la souche dépourvue des trois séquences de 6 nt complémentaires à l'ARNr 16S. Un effet inverse a été obtenu alors qu'on s'attendait à une baisse remarquable de la production par la destruction des régions de complémentarité avec l'ARNr 16S.

En perspectives, plusieurs stratégies de pointe pourraient être explorées pour déterminer les meilleures conditions à même d'augmenter le rendement des protéines sécrétées par *Streptomyces lividans*. Différentes approches pourraient être utilisées pour augmenter les niveaux d'expression et de traduction de la xylanase, et ce particulièrement :

- En approfondissant l'étude du rôle de la région de l'ARNr 16S exposée à l'ARNm et particulièrement sa capacité de stimuler ou inhiber la traduction,
- En jouant sur le choix de la voie de sécrétion et la modulation des protéines
- En explorant par des approches multi-omiques le fond génétique des voies de synthèse et de sécrétion de la xylanase,
- En utilisant les méthodes permettant de modéliser le système de sécrétion et son rendement chez *S. lividans* afin de faire le scaling-up nécessaire à une production de protéines recombinantes de manière économiquement viable.

Une étude de l'effet des mutations des boîtes 2, 3 et 4 chacune à part, pourrait être réalisée pour une comparaison judicieuse de l'importance de chaque boîte dans la traduction de la xylanase. Une comparaison avec les résultats obtenus dans ce travail considérant les constructions avec des mutations successives des boîtes donnerait des résultats d'intérêt.

La thermostabilité pourrait être déterminée pour les enzymes mutantes exprimées en mesurant l'activité résiduelle après le choc thermique à des températures variables.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et Lipman, D. J. (1997). «Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.», Nucleic Acids Res, 25(17), 3389–3402.
- Anné, J., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Van Impe, J., Bernaerts, K. (2014). «Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*.», Biochem. Biophys. Acta. 1843:1750–1761
- Anné, J. & van Mellaert, L. (1993). «*Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production.», FEMS Microbiol. Lett., 114 : 121-128.
- Arhin, F.F., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. (1994). «Effects of disruption of xylanase-encoding gene on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*.», J. Bacteriol., 176: 4924-4930.
- Ayadi, DZ., Chouayekh, H., Mhiri, S., Zerria K., Fathallah, DM. et Bejar S. (2007). «Expression by *Streptomyces lividans* of the rat alpha integrin CD11b A-domain as a secreted and soluble recombinant protein.», J. Biomed. Biotechnol. 2007:54327.
- Barendt, P. A., Shah, N. A., Barendt, G. A. et Sarkar; C. A. (2012). «Broad-Specificity mRNA–rRNA Complementarity in Efficient Protein Translation.», PLoS Genetics, 8(3)
- Belanger; F., Gagnon; M.G., Steinberg, S.V., Cunningham, P.R. et Brakier-Gingras, L. (2004). «Study of the functional interaction of the 900 Tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome.», J. Mol Biol., 338: 683-693.
- Bender, K., Gottlicher M., Whiteside S., Rahmsdorf H.J. et Herrlich P. (1998). «Sequential DNA damage-independent and –dependent activation of NF-kappaB by UV.» EMBO J., 17: 5170–5181.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. et Hopwood, D.A. (2002). «Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).», Nature, 417: 141-147.
- Berks, B.C. (1996). «A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?», Mol. Microbiol., 22: 393-404.
- Biely, P., Mislovicova D. et Toman, R. (1988). «Remazol brilliant blue xylan—a soluble chromogenic substrate for xylanases.», Method. Enzymol., 160:536–541
- Berks, B.C., Sargent, F. et Palmer T. (2000). «The TAT protein export pathway.», Mol.Microbiol., 35: 260-274.
- Birnboim, H.C. et Doly, J. (1979). «A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA ». Nucleic Acids Res., 7: 1513-1523.
- Brian, T. W., Ditlev, E. B., William, M. C., Robert, J. M-W, Andrew, P. C., Clemens,

- Vonrhein, Thomas H. Et Ramakrishnan V. (2000). «Structure of the 30S ribosomal subunit.», Nature, 407: 327-339.
- Bouizgarne, B., Lanoot, B., Loqman, S., Spro, C., Klenk, H.-P., Swings, J. et Ouhdouch Y. (2009). «*Streptomyces marokkonensis* sp nov., isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa*L.» Int. J. Syst. Evol. Micr. 59: 2857-2863.
- Burton, K. (1956). «A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.», Biochem. J., 62: 315-323.
- Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N. et Noller H.F. (1999). «X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes.», Science 285: 2095–2104.
- Carter, Jr. C.W., Kraut, J., Freer, S.T., Xuong, N.-H., Alden, R.A. et Bartsch, R.G. (1974). «Two-angstrom crystal structure of oxidized Chromatium high potential iron protein.», J. Biol. Chem., 35: 4214.
- Chang, S. et Chang, S. Y. (1988). In Abst. Sev. Int. Symp. Biol. Actinomyc., S 1 b-6 Tokyo
- Chatterjee, A., Drews, S. M., Eriko, T., Yiannis, N. K. et Wei-Shou, H. (2011). «Convergent transcription in the butyrolactone regulon in streptomyces coelicolor confers a bistable genetic switch for antibiotic biosynthesis.», PLoS One 6.
- Chen, C. C. et J. Westpheling (1998). «Partial characterization of the *Streptomyces lividans* xlnB promoter and its use for expression of a thermostable xylanase from *Thermotoga maritima*.», Appl. Envir. Microbiol. 64(11): 4217-4225.
- Chung, CT, Niemela, SL et Miller, RH (1989). «One-step preparation of competent *Escherichiacoli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.» Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 2172-2175.
- Dalbey, R. et von Heijne, G. (1992). «Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes : a new protease family.», Trends Biochem. Sci., 17: 474-478.
- Danese, P.N., et Silhavy, T.J. (1998). «Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli* », Annu. Rev. Genet., 32: 59-64.
- Dolan, K.M. et Oliver, D.B. (1991). «Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation.», J. Biol. Chem., 266: 23329-23333.
- Dresios, J., Chappell, S. A., Zhou, W. et Mauro, V. P. (2006). «An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes.» Nature Struct. Molec. Biol., 13(1), 30-34.
- Driessen, A. J. M., Fekkes, P. et Van Der Wolk, J. P. W. (1998). « The Sec system.», Curr. Opin. Microbiol., 1: 216–222.
- Farabaugh, P.J. (1993) «Alternative readings of the genetic code.», Cell., 74 : 591-596
- Farmer, M. et Janssen, G. R. 1999. «A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and un-leadered mRNA in *Escherichia coli*.», Mol. Microbiol. 31:1025-1038
- Fass, S.H. et Engels, J.W. (1996). « Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the α -amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. », J. Biol. Chem., 271: 15244-15252.
- Faxén, M. et Plumbridge, J. (1991). «Codon choice and potential complementarity between mRNA downstream of the initiation codon and bases 1471–1480 in 16S ribosomal RNA

affects expression of *glnS*.» Nucleic acids res, 19(19), 5247-5251.

Fekkes, P. et Driessen, A.J.M. (1999). «Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane.» Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63: 161-173.

Feng, D. F. et Doolittle, R. F. (1987). «Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees.» J. Mol. Evol., 25(4), 351-360.

Ganoza, M. C., Kofoed, E. C., Marliere, P. et Louis, B. G. (1987). «Potential secondary structure at translation-initiation sites.» Nucleic acids res., 15(1), 345-360.

Gennity, J., Goldstein, J. et Inouye, M. (1990). «Signal peptide mutants of *Escherichia coli*», J. Bioenerg. Biomembr., 22:233–269.

Geukens, N., Parro, V., Rivas, L.A., Mellado, R.P., Anné J. (2001). «Functional analysis of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases.» Arch. Microbiol., 176: 377-380.

Giannotta, F., Georis, J., Rigali, S., Virolle, M. J. et Dusart, J. (2003). «Site-directed mutagenesis of conserved inverted repeat sequences in the xylanase C promoter region from *Streptomyces* sp. EC3.» Mol. Genetic. Genomic., 270(4), 337-346.

Gier, de J.W.L., Mansournia, P., Valent, Q.A., Phillips, G.J., Luirink, J. et von Heijne, G. (1996). «Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle.» FEBS Lett., 399: 307-309.

Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. (1995) «Production and secretion of proteins by *Streptomyces*.» Crit. Rev. Biotech., 15: 13-39.

Gilbert, D. (1996) «SeqPup», Version 0.6, Biological Sequence Editor and Analysis Program.

Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling S., Singer, BS., Stormo, G. (1981) «Translational initiation in prokaryotes.» Annu. Rev. Microbiol.;35:365–403.

Green, R., and Noller, H.F. (1997). «Ribosomes and translation.» Annu. Rev. Biochem. 66, 679–716.

Gualerzi, C.O. and Pon, C.L. (1990) «Initiation of mRNA translation in prokaryotes.» Biochemistry29: 5881-5889.

Gualerzi, C.O., Brandi, L., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomsic, J. and Pn, C. (2000), «Translation initiation in bacteria.» The ribosome: Struct., Funct. Antibiot. Cell. Interact.,477-494.

Gusek, T. W. et Kinsella, JE., (1992) «Review of the *Streptomyces lividans* vector PIJ702 system for gene cloning.» Crit. Rev. Microbiol., 18: 247-260.

Hanahan, D. (1983). « Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.» J. Mol. Biol., 166: 557-580.

Harwood, AJ (ed) (1993), «Protocols for gene analysis» Methods Mol. Biol., 31.p. 113-116.

Von Heijne, G. (1990). «The signal peptide », J. Membr. Biol., 115:195–201.

Higuchi, R. (1990). «Recombinant PCR.» PCR Protocol : Guide Meth App., 31: 177-183.

Holmes, D.S. et Quigley, M. (1981). « A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.» Anal. Biochem., 114: 193-197.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrepf, H. (1985). Genet. Manip. Strepto.: Lab. Manual, 2ème Eds, 345-346.

- Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D., Morosoli, R. (1995) «A cellulase/xylanase negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins.», Mol. Microbiol., 17: 367-377.
- Izard, J.W., and Kendall, D.A. (1994) «Signal peptides: exquisitely designed transport promoters ». Mol. Microbiol. 13: 765-773.
- Jiang L., Xun M., Wang J., Wan J. (2008). «QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines.», J. Cereal Sci. 48: 1: 173–179.
- Kébir, H., Dupont, C., Morosoli, R. (2000). «Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide: dependence on box and inverted repeat sequence.», Biochem. Biophys. Act., 1491: 177-184.
- Kendall, K.J. and Cohen, S.N. (1988) «Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties.», J. Bacteriol., 170: 4634-51.
- Kim, M.R., Choeng Y.H., Chi W.J., Kang D.K., Hong S.K. (2010). «Heterologous production of streptokinase as a secretory form in *Streptomyces lividans* and non secretory form in *Escherichia coli*.», J. Microbiol Biotechnol. 20:132–137.
- King, R.D., Saqi, M., Sayle, R, Sternberg., M.J. (1997) «DSC: public domain protein secondary structure predication.», Comput Appl Biosci. 13(4):473-4.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000). Practical Strepto. Genet., 3ème Eds., 165-167.
- Kiyoshi, N. (1996). «RNA-protein complexes». Curr. Opin. Struct. Biol., 6:53-61
- Kluepfel, D., Daigneault, N., Morosoli, R., Shareck, F. (1992). «Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66.», Appl. Microbiol. Biotechnol., 36: 626-631.
- Kluepfel, D., Vats-Mehta, S., Aumont, F., Shareck, F. and Morosoli, R. (1990). «Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66.», Biochem. J., 267: 45-50.
- Kosack, M. (1983) «Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles.», Microbiol Rev. 47:1-45.
- Kozak, M. (1999) «Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes.», Gene, 234: 187-208.
- Krichnan, K. M., Van Etten, W. J. et Janssen, G. R. (2010) «Proximity of the Start Codon to a Leaderless mRNA's 5 Terminus Is a Strong Positive Determinant of Ribosome Binding and Expression in *Escherichia coli*», J. Bacteriol., 6482–6485.
- Kumamoto, C.A. and Beckwitt, J. (1983). « Mutation in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. », J. Bacteriol., 154: 253-260.
- Kutzner, H. J. (1981). «The family *Streptomycetaceae*. In The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria.», Prem. Eds., 2028–2090
- Lafontaine, D. L., & Tollervey, D. (2001). «The function and synthesis of ribosomes.». Nat. Rev. Molec. Cell Biol., 2(7), 514-520.
- Lammertyn, E., Desmyter, S., Schacht, S., Van Mellaert, L., Anné, J. (1998). «Influence of charge variation in *Streptomyces venezuelae*-amylase on heterologous protein production

by *Streptomyces lividans*.», Appl. Microbiol. Biotechnol., 46: 424-430.

Matsuyama, S.I., Kimura, E. and Mitzushima, S. (1990). «Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of *Escherichia coli*, allows ATP binding to its amino-terminal region.», J. Biol. Chem., 265: 8760-8765.

Mehra, S., Charaniya, S., Takano, E., Hu, W.S. (2008) «A Bistable Gene Switch for Antibiotic Biosynthesis: The Butyrolactone Regulon in *Streptomyces coelicolor*.» PLOS ONE 3-7.

Miller, G.L. (1959). «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar», Anal. Chem., 31: 426-428.

Miller, JH,(1992) «A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria.», 55-72.

Miller, V.L., Kaper, J.B., et Portnoy, D.A. (1994) «Molecular genetics of bacterial pathogenesis.» Americ. Soc. Microbiol., 57: 238-242.

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

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

Morosoli, R. et Dupont C. (1999).«Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans*: dependence on signal peptides length, number and composition.», FEMS Microbiol. Lett., 179: 437-445.

Nagai, H., Yuzawa, H., & Yura, T. (1991). «Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of sigma 32 synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. » Proceed. Nation. Acad. Sci., 88(23), 10515-10519.

Noller, H. F. (1991). «Ribosomal RNA and translation.» Annu. Rev. Biochem., 60(1), 191-227.

Ogle, J. M., & Ramakrishnan, V. (2005). «Structural insights into translational fidelity». Annu. Rev. Biochem., 74, 129-177.

Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F., Morosoli, R. (1995). «Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*.», Appl. Environn. Microbiol., 62: 109-114.

Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F., Morosoli, R. (1996).«Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans* : dependence on number of ribosome-binding sites.», Nat. Biotechnol., 14: 756-759.

Plant, E. P., Jacobs, K. L. M., Harger, J. W., Meskauskas, A., Jacobs, J. L., Baxter, J. L., Petrov A.N. et Dinman, J. D. (2003). «The 9-Å solution: How mRNA pseudoknots promote efficient programmed-1 ribosomal frameshifting». Rna, 9(2), 168-174.).

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F. , Jorge, J.A. , Amorim, D.S. (2005).«Xylanases from fungi: properties and industrial applications». Appl. Microbiol.Biotechnol., 67 (2005), pp. 577–591.

Sambrook, J. , Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). « Molecular cloning, a laboratory manual», NY : Cold Spring Harbor Lab. Press, (2) :163-172.

Sambrook, J. et Russell, D.W. (2001). « Molecular cloning, a laboratory manual », 3^{ème} édition, NY : Cold Spring Harbor Lab. Press.

- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A. R. (1977). « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. », Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi F., Yonath Ad. (2000). «Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution», Cell, 102 : 615-623
- Sevillano, L, Vijgenboom, E, van Wezel, GP, Diaz, M, Santamaria, RI (2016).«New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*»,Microb CellFact. 15-28
- de Smit, M. H., & van Duin, J. (1994). «Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*: a quantitative analysis of literature data. », J. Mol. Biol., 244(2), 144-150.
- De Smit, M. H. (1998). «Translational control by mRNA structure in eubacteria: molecular biology and physical chemistry. », Cold Spring Harbor Monog. Arch., 35, 495-540.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., & Frank, J. (2001). «Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. », Cell, 107(3), 373-386.
- Sprengart, M. L., Fatscher, H. P., & Fuchs, E. (1990). «The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16S rRNA and downstream sequences of the mRNA.», Nucleic Acids Res., 18(7), 1719-1723.
- Sprengart, M. L., Fuchs, E., & Porter, A. G. (1996). «The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*.»The EMBO Journal, 15(3), 665–674.
- Steitz, J. A., & Jakes, K. (1975). «How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. », Proceed. Nat. Acad. Sci., 72(12), 4734-4738.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). «CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.»Nucleic Acids Res., 22(22), 4673-4680.
- Tomotsune, K., Kasuga, K., Tsuchida, M., Shimura, Y., Kobayashi, M., Agematsu, H., et al. (2014). «Cloning and sequence analysis of the cellulase genes isolated from two cellulolytic *Streptomyces* and their heterologous expression in *Streptomyces lividans*. » Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour. 20, 213–218.
- Trujillo-Cabrera, Y., et al. (2013). «Diverse cellulolytic bacteria isolated from the high humus, alkaline-saline chinampa soils.» Annals of microbiology 63(2): 779-792.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Rättö, M. et Sundquist. J. (1991). «Enzymes in pulp and paper processing.» ACS Symp. Ser., 460:12.
- Wei, W., et al. (2010). «The effective expression of xylanase gene in *Candida utilis* by 18S rDNA targeted homologous recombination in pGLR9K.» Mol. Biol. Report. 37(6): 2615-2620.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C, Hartsch, T & Ramakrishnan, V. (2000). «Structure of the 30S ribosomal subunit.» Nature, 407(6802), 327-339.
- Wilson, D. N., & Nierhaus, K. H. (2003). «The ribosome through the looking glass.»

Angew. Chemie Int. Ed., 42(30), 3464-3486.

Wood, W.L., Gitschier, J., Lasky, L.A. and Lawn R.M. (1985). «Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries.», Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1585-1588.

Yoshizawa, S., Fourmy, D., & Puglisi, J. D. (1999). «Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA». Sci., 285(5434), 1722-1725.

Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). «The path of messenger RNA through the ribosome. » Cell, 106(2), 233-241.

Zheng, L., Baumann, U. and Reymond, J.-L., (2004). «An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol.», Nucl Acids Res 32 (14): e115.

Zhu, Y., et al. (2012). «Properties of an Alkaline-Tolerant, Thermostable Xylanase from *Streptomyces chartreusis* L1105, Suitable for Xylooligosaccharide Production.», J. Food Sci. 77(5): C506-C511.

Zucchi, T. D., et al. (2012). «*Streptomyces brevispora* sp. nov. and *streptomyces laculatispora* sp. nov., actinomycetes isolated from soil.», Int. J. Syst. Evol. Microbiol.» 62(PART 3): 478-48

ANNEXES

Annexe A :
Séquence nucléotidique du gène de la XlnA

5'ATGGGCTCCTACGCCCTTCCCAGATCAGGTGTCCGCAGGAGCATTTCGCGTCCT
GCTGCTGGCGCTGGTTCGTCGGCGTACTCGGCACGGCCACCGCACTGATCGCGCC
GCCGGGGGCACACGCCGCCGAGAGCACGCTCGGTACCGCGGCGGGCGCAGAGCG
GCCGCTACTTCGGCACCGCCATCGCCTCGGGCAGGCTGAGCGACTCGACGTACA
CGTCGATCGCGGGCCGTGAGTTCAACATGGTGACGGCCGAGAACGAGATGAAG
ATCGACGCCACCGAACCGCAGCGGGGCCAGTTCAACTTCAGCTCCGCCGACCGC
GTCTACAACCTGGGCGGTGCAGAACGGCAAGCAGGTGCGCGGCCACACCCTGGC
CTGGCACTCCCAGCAGCCCGGCTGGATGCAGAGCCTCAGCGGCAGCGCGCTGCG
CCAGGCGATGATCGACCACATCAACGGCGTGATGGCCCACTACAAGGGCAAGA
TCGTCCAGTGGGACGTCGTGAACGAGGCCTTCGCCGACGGCAGTTCGGGAGCGC
GGCGGGACTCCAACCTGCAACGCAGCGGCAACGACTGGATCGAGGTTCGCCTTCC
GCACCGCGCGCGCCGCCGACCCGTCCGCCAAGCTCTGCTACACGACTACAACGT
CGAGAACTGGACCTGGGCCAAGACCCAGGCCATGTACAACATGGTGCGGGACT
TCAAGCAGCGCGGCGTGCCGATCGACTGCGTTCGGCTTCCAGTCGCACTTCAACG
CGGCAGCCCCTACAACAGCAACTTCCGCACCACACTGCAGAACTTCGCCGCCCT
CGGCGTCGACGTGGCCATCACCGAGCTGGACATCCAGGGCGCCCCGGCCTCGAC
CTACGCCAACGTGACCAACGACTGCCTGGCCGTCTCGCGCTGCCTCGGCATCAC
CGTCTGGGGTGTGCGCGACAGCGACTCCTGGCGGTTCGGAGCAGACGCCGTTGCT
GTTCAACAACGACGGCAGCAAGAAGGCCGCGTACACCGCCGTCTCGACGCACT
CAACGGCGGGCGACTCCTCGGAGCCCCCGCGGACGGGGGACAGATCAAGGGCG
TCGGTTCGGGCCGCTGCCTCGACGTGCCCGACGCCAGCACCTCCGACGGCACCC
AGCTCCAGCTGTGGGACTGCCACAGCGGCACCAACCAGCAGTGGGCGGCCACTG
A 3'

Annexe B :

Symboles des acides aminés

- Acides aminés hydrophobes

Symbole	Nom
A - Ala	Alanine
F - Phe	Phénylalanine
I - Ile	Isoleucine
L - Leu	Leucine
P - Pro	Proline
M - Met	Méthionine
V - Val	Valine
W - Trp	Tryptophane

- Acides aminés polaires mais non chargés

Symbole	Nom
C - Cys	Cystéine
G - Gly	Glycine
N - Asn	Asparagine
Q - Gln	Glutamine
S - Ser	Serine
T - Thr	Thréonine
Y - Tyr	Tyrosine

- Acides aminés chargés négativement

Symbole	Nom
D - Asp	Acide aspartique
E - Glu	Acide glutamique

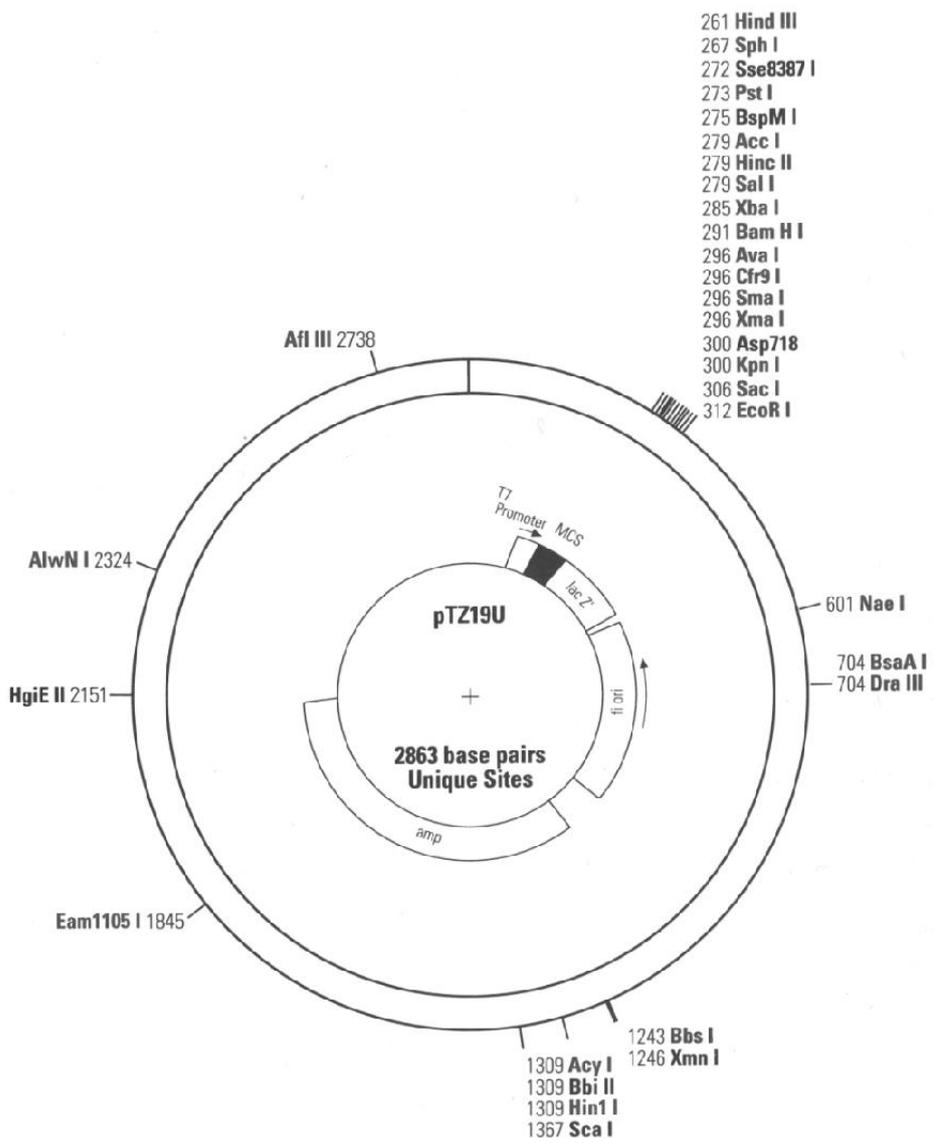
- Acides aminés chargés positivement

Symbole	Nom
H - His	Histidine
K - Lys	Lysine
R - Arg	Arginine

Annexe C :
Code génétique et fréquence de l'emploi des codons chez Streptomyces

%	codon	A.a.	%	codon	A.a.	%	codon	A.a.	%	codon	A.a.
12.0	TGT	C	5.0	TAT	Y	1.1	TCT	S	1.6	TTT	F
88.0	TGC	C	95.0	TAC	Y	39.1	TCC	S	98.4	TTC	F
81.0	TGA	Stop	4.0	TAA	Stop	2.4	TCA	S	0.4	TTA	L
100.0	TGG	W	15.0	TAG	Stop	27.4	TCG	S	2.6	TTG	L
7.3	CGT	R	6.5	CAT	H	2.7	CCT	P	2.0	CTT	L
45.0	CGC	R	93.5	CAC	H	42.4	CCC	P	38.5	CTC	L
3.7	CGA	R	6.1	CAA	Q	1.6	CCA	P	0.3	CTA	L
37.7	CGG	R	93.9	CAG	Q	53.3	CCG	P	56.1	CTG	L
2.9	AGT	S	4.6	AAT	N	2.2	ACT	T	4.4	ATT	I
27.1	AGC	S	95.4	AAC	N	65.2	ACC	T	92.0	ATC	I
1.1	AGA	R	5.8	AAA	K	2.4	ACA	T	3.6	ATA	I
5.2	AGG	R	94.2	AAG	K	30.2	ACG	T	100	ATG	M
8.7	GGT	G	4.7	GAT	D	2.3	GCT	A	2.8	GTT	V
64.2	GGC	G	95.3	GAC	D	58.7	GCC	A	56.0	GTC	V
8.9	GGA	G	17.7	GAA	E	4.3	GCA	A	2.5	GTA	V
18.2	GGG	G	82.3	GAG	E	34.7	GCC	A	38.8	GTG	V

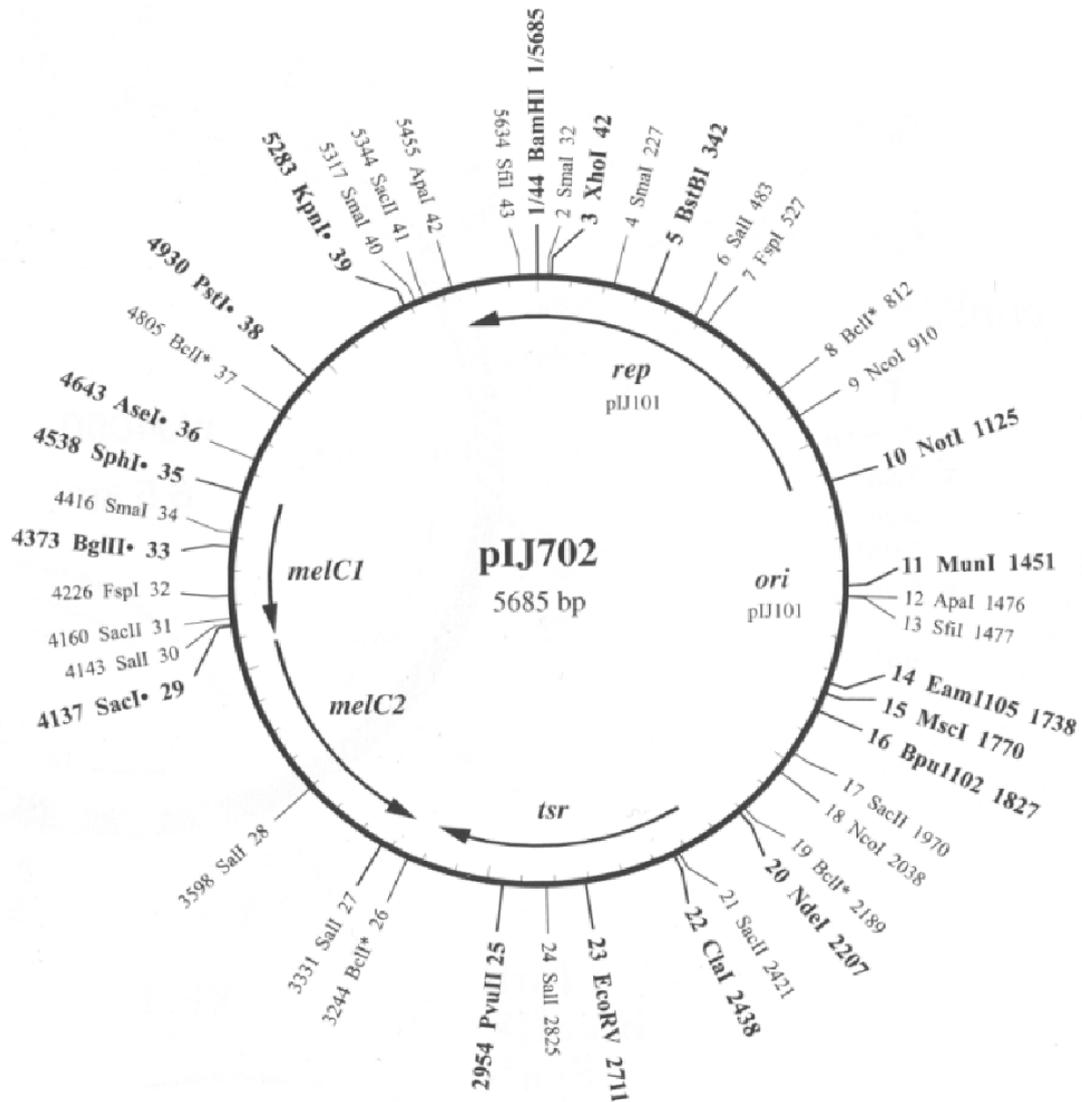
Annexe D :
Carte du phagemide pTZ19U



Annexe E :
Caractéristiques des plasmides utilisés chez *E.coli* et construits à partir du pTZ19U

Référence	Caractéristiques essentielles	Plasmide
Pagé et al.,1995	Vecteur dérivé du pTZ19U contenant le gène de structure de la XlnA dépourvu de son promoteur et dans lequel la séquence du peptide signal de la XlnA est entourée des sites de restriction <i>HindIII</i> et <i>KpnI</i>	pIAF806

Annexe F :
Carte du plasmide pIJ702



Annexe G :
Caractéristiques des plasmides utilisés chez *S. lividans* et construits à partir du pIJ702

Référence	Caractéristiques essentielles	Plasmide
Kendall et Cohen, 1988	Vecteur contenant les marqueurs mel et tsr	pIJ702
Pagé et al., 1995	Vecteur dérivé du pIJ702 contenant le gène complet xlnA et son promoteur	pIAF20
Pagé et al., 1996	Vecteur dérivé du pIAF20 contenant entre ses sites SphI et SacI, la séquence codante de 2 kb correspondant à xlnA. Des sites de restriction HinDIII et SacI ont également été introduit de chaque côté de la séquence du peptide signal.	pIAF906
Pagé al., 1996	Vecteur dérivé du pIAF906 contenant le gène de la XlnA, ainsi que la séquence du long peptide signal de la CelA (court ps. CelA + 57nt en amont du second ATG), contenant une séquence de 5 nt complémentaire à l'ARNr 16S	pIAF911_A
Kébir et al., 2000	Vecteur dérivé du pIAF911_A contenant la séquence du peptide signal de la CelA modifiée au niveau de la position 19 à partir du premier ATG, et portant une séquence de complémentarité de 6 nt avec l'ARNr 16S.	pIAF911_A.9
Ce travail	Vecteur dérivé du pIAF911_A.9 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été muté au niveau de la base 183.	pIAF 907.1
Ce travail	Vecteur dérivé du pIAF907.1 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été muté au niveau de la base 295.	pIAF 907.2
Ce travail	Vecteur dérivé du pIAF907.2 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été muté au niveau de la base 429.	pIAF 907.3
Ce travail	Vecteur dérivé du pIAF907.3 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été muté au niveau de la base 738.	pIAF 907.4

Annexe H :

Compositions des milieux de culture solides et liquides utilisés

Milieu 2xTY	
Produit	Mesure
Bactotryptone	16 g
Extrait de levure	10 g
NaCl	5 g
Eau qsp	1 L
Agar	15 g
Ampicilline (solution stock 25 mg/ml)	4 ml
Milieu LB (sambrook et al., 1989)	
Produit	Mesure
NaCl	10 g
Bactotryptone	10g
Extrait de levure	5 g
Eau qsp	1 L
Agar	15 g
Ampicilline (solution stock 25 mg/ml)	4 ml
TB (Terrific Broth)	
Produit	Mesure
Bactotryptone	12 g
Extrait de levure	24 g
Glycérol	4 ml
Eau qsp	1 L
Ampicilline (solution stock 25 mg/ml)	4 ml
TSB	
Produit	Mesure
Tryptic Soy Broth w/o dextrose	27.5 g
Eau qsp	1 L
Milieu M14 (Pagé et al., 1996 adapté)	
Produit	Mesure
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Sels de Mandel	1 ml
Tween 80	2 ml

Ajuster le pH à 7		
Produit	Mesure	
Eau qsp	1 L	
CaCl ₂ (solution stock 3 %)	200 µl	
MgSO ₄ (solution stock 5%)	120 µl	
Thiostrepton (solution stock 5 mg.ml ⁻¹)	20 µl	
Sels de Mandel (pour 100 ml)		
Produit	Mesure	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.14 g	
MnSO ₄ .H ₂ O	0.16 g	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.2 g	
Ces minéraux sont dissous progressivement dans 100ml d'eau distillée. Le pH est ajusté		
Milieu RBB Xylan et RBB Xylan contenant 15 % de glucose		
<u>Solution 1</u>	Produit	Mesure
	RBB xylane	1.0 g
	Eau	125 ml
	<i>Brasser et bouillir 30 minutes</i>	
<u>Solution 2</u>	Produit	Mesure
	Sels Mandel	0.5 ml
	(NH ₄) ₂ SO ₄ g	1.0 g
	KH ₂ PO ₄	0.75 g
	K ₂ HPO ₄	2.5 g
	Extrait de levure	0.25 g
	KCl	0.25 g
	Eau	375 ml
	<i>Ajuster le pH à 7.2</i>	
	Agar	8.5 g
<i>Stériliser 20 minutes et refroidir à 55°C</i>		
<i>Mélanger les solutions 1 et 2 (pour éviter la précipitation du colorant)</i>		
<i>Rajouter stérilement</i>		
<u>Solution 3</u>	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 ml
	Thiostrepton (50 mg.ml ⁻¹)	0.5 ml
Milieu SFM		
Farine de soja	20 g	
Mannitol	20 g	

Agar	20 g	
Eau qsp	1 L	
Milieu R5 (recette pour 2 L)		
<u>Préparer séparément</u>		
KH ₂ PO ₄ 0.5 % (autoclaver)	10 ml	
CaCl ₂ 5M (autoclaver)	4 ml	
CuSO ₄ 5 mg.ml ⁻¹ (autoclaver)	1 ml	
L-proline 20 % (filtrer)	15 ml	
L-méthionine (filtrer)	10 ml	
L-tyrosine 0.4 g repris dans 5 ml NaOH 1N (filtrer)		
Et la solution (<i>Autoclaver</i>)	Sucrose	103 g
	K ₂ HPO ₄	0.25 g
	MgCl ₂	10.12 g
	Glucose	10 g
	Casamino acides	0.1 g
	<u>Eléments traces*</u>	2 ml
	Extrait de levure	5 g
	Tampon TES	5.73 g
	Ajouter d'eau	955 ml
	Agar	11 g

Laisser refroidir puis ajouter les 6 solutions préparées individuellement.

Faire sécher les boîtes pendant 5 jours (perte de 15 % de leur poids)

*Les éléments traces (Hopwood et al., 1985) :

ZnCl ₂	0.04 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.20 g
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,01 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.01 g
Na ₂ B ₄ O ₇ . 10H ₂ O	0.01 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0.01 g

Annexe I:
Compositions des tampons d'électrophorèse

Tampon de charge 4X pour "échantillon ADN"

Bleu de bromophénol	25 mg
Xylène cyanol	25 mg
Glycérol	3 ml
Eau	3 ml

Tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 50 X pour électrophorèse en gel d'agarose

Tris base	242 g
Acide acétique glacial	57.1 ml
EDTA 0.5M (pH 8.0)	100 ml
Eau qsp	1 L

Diluer 1/50 avant utilisation

Annexe J:
Compositions des solutions d'hybridation

Tampon Kinase (10X) sans ATP :

Pour préparer un stock de 50ml

Tris-HCl pH7.6	0.7M	35ml	du stock	1M
MgCl ₂	0.1M	5ml	du stock	1M
Dithiothréitol	50mM	2.5ml	du stock	1M

Solution de Me₄NCI

Me ₄ NCI	3M	1ml	du stock	5M
---------------------	----	-----	----------	----

Préparation de solution stock de MgCl₂ 1M

PM du MgCl₂ =203.30

Peser 20.33g de MgCl₂ pour 100 ml de solution

Préparation de solution stock de Dithiothréitol 1M

PM du Dithiothréitol =154.3 g

Peser 0.7715g pour 5 ml de solution

Annexe K:
Programme PCR emboîté optimisé au cours de ce courant travail

- | | | | |
|----|-------|------|--|
| 1. | 8min | 68°C | |
| 2. | 1 min | 94°C | |
| 3. | 1 min | 52°C | |
| 4. | 3 min | 68°C | Refaire les étapes 2 à 4 pendant 29 fois |
| 5. | 10min | 68°C | |
| 6. | Pause | 4°C | |

Annexe L:
Liste des résultats de l'étude des structures secondaires probables avant et après mutagenèse des trois séquences de 6 nt mutées dans le gène de structure de la XlnA chez *S.lividans*
(Résultats du travail courant)

1) Boîte 1 : Séquence originale

a) Séquence directe d'ADN (brin transcrit)

194 bp;

Composition 25 A; 75 C; 66 G; 28 T; 0 OTHER

Percentage: 12.9% A; 38.7% C; 34.0% G; 14.4% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 59.73 dsDNA: 119.65

ORIGIN

```
1      ATGGGCTCCT ACGCCCTTCC CAGATCAGGT GTCCGCAGGA GCATTGCGGT CCTGCTGCTG
61     GCGCTGGTGC TCGGCGTACT CGGCACGGCC ACCGCACTGA TCGCGCCGCC GGGGGCACAC
121    GCCGCCGAGA GCACGCTCGG TACCGCGGCG GCGCAGAGCG GCCGCTACTT CGGCACCGCC
181    ATCGCCTCGG GCAG
```

b) Séquence complémentaire et antiparallèle d'ADN (brin non transcrit ou codant)

194 bp;

Composition 28 A; 66 C; 75 G; 25 T; 0 OTHER

Percentage: 14.4% A; 34.0% C; 38.7% G; 12.9% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 60.11 dsDNA: 119.65

ORIGIN

```
1      CTGCCCAGAG CGATGGCGGT GCCGAAGTAG CGGCCGCTCT GCGCCGCCGC GGTACCGAGC
61     GTGCTCTCGG CGGCGTGTGC CCCC GGCGGC GCGATCAGTG CGGTGGCCGTGCCGAGTACG
121    CCGACGACCA GCGCCAGCAG CAGGACGCGA ATGCTCCTGC GGACACCTGA TCTGGGAAGG
181    GCGTAGGAGC CCAT
```

c) Brin d'ARN

2) Boîte 1 L : Séquence mutée (ATCGCC----ATTGCC)

a) Séquence directe d'ADN (brin transcrit)

194 bp;

Composition 25 A; 74 C; 66 G; 29 T; 0 OTHER

Percentage: 12.9% A; 38.1% C; 34.0% G; 14.9% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 59.74 dsDNA: 119.64

ORIGIN

```
1      ATGGGCTCCT ACGCCCTTCC CAGATCAGGT GTCCGCAGGA GCATTCGCGT CCTGCTGCTG
61     GCGCTGGTTCG TCGGCGTACT CGGCACGGCC ACCGCACTGA TCGCGCCGCC GGGGGCACAC
121    GCCGCCGAGA GCACGCTCGG TACCGCGGCG GCGCAGAGCG GCCGCTACTT CGGCACCGCC
181    ATTGCCTCCG  GCAG
```

b) Séquence complémentaire et antiparallèle d'ADN (brin non transcrit ou codant)

194 bp;

Composition 29 A; 66 C; 74 G; 25 T; 0 OTHER

Percentage: 14.9% A; 34.0% C; 38.1% G; 12.9% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 60.10 dsDNA: 119.64

ORIGIN

```
1      CTGCCCCGAGG CAATGGCGGT GCCGAAGTAG CGGCCGCTCT GCGCCGCCGC GGTACCGAGC
61     GTGCTCTCGG CGGCGTGTGC CCCC GGCGGC GCGATCAGTG CCGTGGCCGT GCCGAGTACG
121    CCGACGACCA GCGCCAGCAG CAGGACGCGA ATGCTCCTGC GGACACCTGA TCTGGGAAGG
181    GCGTAGGAGC CCAT
```

c) Brin d'ARN

194 bases;

Composition 29 A; 66 C; 74 G; 25 U; 0 OTHER

Percentage: 14.9% A; 34.0% C; 38.1% G; 12.9% U; 0.0% OTHER

Molecular Weight: 62.85 kDa

ORIGIN

```
1      CUGCCCCGAGGCAAUGGCGGU GCCGAAGUAG CGGCCGCUCU GCGCCGCCGC GGUACCGAGC
61     GUGCUCUCGG CGGCGUGUGC CCCC GGCGGC GCGAUCAGUG CGGUGGCCGUGCCGAGUACG
121    CCGACGACCA GCGCCAGCAG CAGGACGCGA AUGCUCCUGC GGACACCUGA UCUGGGAAGG
181    GCGUAGGAGC CCAU
```


3) Boîte 2 :Séquence originale

a) Séquence directe d'ADN (brin transcrit)

54 bp;

Composition 10 A; 23 C; 14 G; 7 T; 0 OTHER

Percentage: 18.5% A; 42.6% C; 25.9% G; 13.0% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 16.51 dsDNA: 33.30

ORIGIN

1 CGCCACCGAA CCGCAGCGGG **GCCAGT**TCAA CTTCAGCTCC GCCGACCGCG TCTA

b) Séquence complémentaire et antiparallèle d'ADN (brin non transcrit ou codant)

54 bp;

Composition 7 A; 14 C; 23 G; 10 T; 0 OTHER

Percentage: 13.0% A; 25.9% C; 42.6% G; 18.5% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 16.84 dsDNA: 33.30

ORIGIN

1 TAGACGCGGT CGGCGGAGCT GAAGTTGA**AC TGG**CCCCGCT GCGGTTCGGT GGCG

c) Brin d'ARN

54 bases;

Composition 7 A; 14 C; 23 G; 10 U; 0 OTHER

Percentage: 13.0% A; 25.9% C; 42.6% G; 18.5% U; 0.0%OTHER

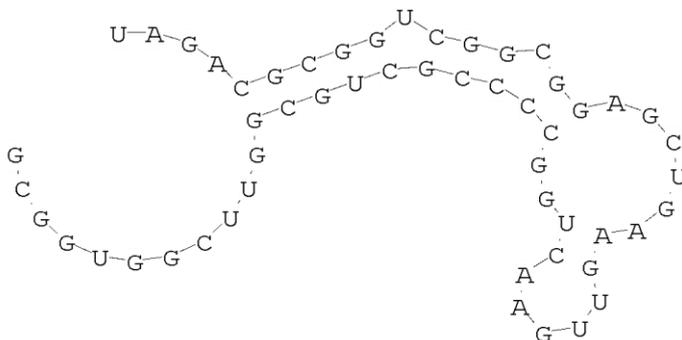
Molecular Weight: 17.57 kDa

ORIGIN

1 UAGACGCGGU CGGCGGAGCU GAAGUUGA**AC UGG**CCCCGCU GCGGUUCGGUGGCG

d) Structure secondaire de l'ARN

Minimum free energy of the structure= -14.80 kcal/mol



4) Séquence boîte 2 mutée (GCCAGT----GCAAGT)

a) Séquence directe d'ADN (brin transcrit)

54 bp;

Composition 11 A; 22 C; 14 G; 7 T; 0 OTHER

Percentage: 20.4% A; 40.7% C; 25.9% G; 13.0% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 16.54 dsDNA: 33.30

ORIGIN

1 CGCCACCGAA CCGCAGCGGG GCAAGTTCAA CTCAGCTCC GCCGACCGCG TCTA

b) Séquence complémentaire et antiparallèle d'ADN (brin non transcrit ou codant)

54 bp;

Composition 7 A; 14 C; 22 G; 11 T; 0 OTHER

Percentage: 13.0% A; 25.9% C; 40.7% G; 20.4% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 16.82 dsDNA: 33.30

ORIGIN

1 TAGACGCGGT CGGCGGAGCT GAAGTTGAAC TTGCCCCGCT GCGGTTCGGT GGCG

c) Brin d'ARN

54 bases;

Composition 7 A; 14 C; 22 G; 11 U; 0 OTHER

Percentage: 13.0% A; 25.9% C; 40.7% G; 20.4% U; 0.0%OTHER

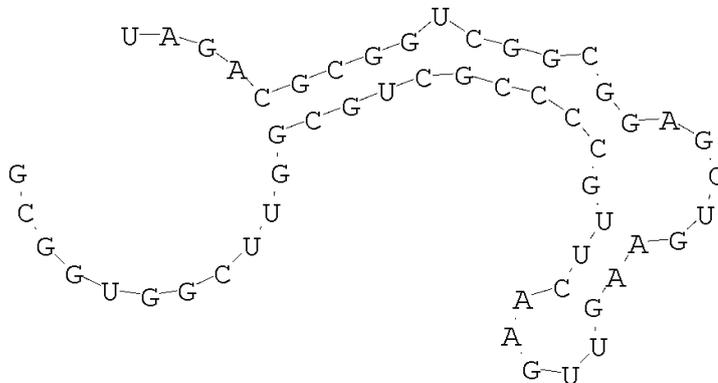
Molecular Weight: 17.53 kDa

ORIGIN

1 UAGACGCGGU CGGCGGAGCU GAAGUUGAAC UUGCCCCGCU GCGGUUCGGU GGCG

d) Structure secondaire de l'ARN

Minimum free energy of the structure= -14.90 kcal/mol
 UAGACGCGGUCGGCGGAGCUGAAGUUGAACUUGCCCCGUCGCGGUUCGGUGGCG
(((((((.....((((.....))))))))).....



5) Boîte 3 : Séquence originale

a) Séquence directe d'ADN (brin transcrit)

61 bp;

Composition 12 A; 22 C; 19 G; 7 T; 1 OTHER

Percentage: 19.7% A; 36.1% C; 31.1% G; 11.5% T; 1.6%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 18.80 dsDNA: 37.62

ORIGIN

```
1      GCCTCAGCGG CAGCGCGCTG CGCCAGGCGA TGATCGACCA CATCAACGGC PTGATGGCCC
61     A
```

b) Séquence complémentaire et antiparallèle d'ADN (brin non transcrit ou codant)

61 bp;

Composition 7 A; 19 C; 22 G; 12 T; 1 OTHER

Percentage: 11.5% A; 31.1% C; 36.1% G; 19.7% T; 1.6%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 18.88 dsDNA: 37.62

ORIGIN

```
1      TGGGCCATCA PGCCGTTGAT GTGGTCGATC ATCGCCTGGC GCAGCGCGCT GCCGCTGAGG
61     C
```

c) Brin d'ARN

61 bp;

Composition 12 A; 21 C; 20 G; 7 T; 1 OTHER

Percentage: 19.7% A; 34.4% C; 32.8% G; 11.5% T; 1.6% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 18.84 dsDNA: 37.62

ORIGIN

1 GCCTCAGCGG CAGCGCGCTG **CGGCAG**GCGA TGATCGACCA CATCAACGGC PTGATGGCCC

61 A

b) Séquence complémentaire et antiparallèle d'ADN (brin non transcrit ou codant)

61 bp;

Composition 7 A; 20 C; 21 G; 12 T; 1 OTHER

Percentage: 11.5% A; 32.8% C; 34.4% G; 19.7% T; 1.6% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 18.84 dsDNA: 37.62

ORIGIN

1 TGGGCCATCA PGCCGTTGAT GTGGTCGATC ATCGC**CTGCC** GCAGCGCGCT GCCGCTGAGG

61 C

c) Brin d'ARN

61 bases;

Composition 7 A; 20 C; 21 G; 12 U; 1 OTHER

Percentage: 11.5% A; 32.8% C; 34.4% G; 19.7% U; 1.6% OTHER

Molecular Weight: 19.65 kDa

ORIGIN

1 UGGGCCAUCA PGCCGUUGAU GUGGUCGAUC AUCGCC**UGCC** GCAGCGCGCU
GCCGCUGAGG

61 C

d) Structure secondaire de l'ARN

