

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

ALIOU BAH

ANALYSE DES RÉGIONS PROMOTRICES DES GÈNES *xlnA*, *xlnB* ET *xlnC*
DE *Streptomyces lividans*, EN UTILISANT LE GÈNE *xylE* DE *P. putida*
COMME GÈNE RAPPORTEUR.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii	
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x	
LISTE DES FIGURES	xi	
LISTE DES TABLEAUX	xiv	
SOMMAIRE	xv	
INTRODUCTION	1	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6	
1.0	APERÇU GÉNÉRAL SUR LES	
	STREPTOMYCÈTES	7
1.1	Cycle de vie primaire	7
1.2	Cycle de vie secondaire	10
2.0	LE CATABOLISME DU XYLANE	
	CHEZ LES STREPTOMYCÈTES	13
3.0	RÉGULATION DES PROMOTEURS DE	
	STREPTOMYCÈTES	15
3.1	Promoteurs	15
3.1.1	Définition	15
3.1.2	Hétérogénéité des promoteurs de streptomycètes	16
3.2	Hétérogénéité des ARN polymérases chez	
	les streptomycètes	17
3.2.1	L'holoenzyme de l'ARN polymérase et le	
	facteur sigma (σ)	17

3.2.2	Reconnaissance des séquences promotrices "SEP" d' <i>E. coli</i> par des ARN polymérases de streptomycètes	17
3.2.3	Rôle des différents facteurs sigma dans le contrôle de la différenciation de la transcription chez les streptomycètes	20
4.0	INDUCTION ET RÉPRESSION DES PROMOTEURS DE STREPTOMYCÈTES, PROMOTEURS CONSTITUTIFS	27
4.1	Protéines activatrices et contrôle positif	27
4.2	Promoteurs induits	28
4.3	Promoteurs réprimés	30
4.4	Promoteurs constitutifs	32
5.0	GÈNES RAPPORTEURS ET "SONDES À PROMOTEUR"	33
5.1	Les différents types de "sondes à promoteur"	33
5.1.1	Les différents types de gènes rapporteurs	34
5.1.1.1	Gènes rapporteurs de résistance aux antibiotiques	34
5.1.1.2	Gènes rapporteurs utilisés pour identification chromogénique	35
5.1.1.3	Gènes rapporteurs utilisés pour essais enzymatiques	36
5.1.1.4	Gènes rapporteurs utilisés pour détecter l'activité promotrice par émission de la lumière	37
5.1.2	Vecteurs de fusion et nombre de copie du plasmide	39

5.1.2.1	"Sondes à promoteur" à faible nombre de copie	39
5.1.2.2	"Sondes à promoteur" à nombre de copie multiple	42
OBJECTIFS DE LA RECHERCHE		46
MATÉRIEL ET MÉTHODES		47
LISTE DES PRODUITS		48
1.0	SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES UTILISÉS	50
2.0	MILIEUX DE CULTURE ET CONSERVATION DES SOUCHES	58
2.1	Milieux solides pour les streptomycètes	58
2.1.1	Milieu pour la régénération des protoplastes	58
2.1.1.1	Sélection des transformants pour la résistance au thiostrepton	59
2.1.2	Milieu de croissance	59
2.1.3	Milieu utilisé pour l'essai semi quantitatif de l'activité enzymatique de la C230	60
2.2	Milieux liquides pour les streptomycètes	61
2.2.1	Milieu de croissance	61
2.2.2	Milieu utilisé pour l'essai quantitatif de l'activité de la C230	61
2.3	Conservation des souches de streptomycètes	63
2.4	Milieu solide pour <i>E. coli</i>	63
2.4.1	Milieu de croissance	63

2.5	Milieu liquide pour <i>E. coli</i>	64
2.5.1	Milieu de croissance	64
2.6	Conservation des souches d' <i>E. coli</i>	64
3.0	EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE	64
3.1	Microextraction	64
3.1.1	Chez les streptomycètes	64
3.1.1.1	Solutions utilisées	65
3.1.1.2	Méthode	65
3.1.2	Chez <i>E. coli</i>	66
3.2	Extraction à grande échelle chez les streptomycètes	67
3.3	Purification de l'ADN plasmidique sur gradient isopycnique de chlorure de césium	67
4.0	ANALYSE DE L'ADN	67
4.1	Digestion enzymatique	67
4.2	Électrophorèse en gel d'agarose	68
4.2.1	Solutions utilisées	68
4.2.2	Méthode	68
4.3	Sous-clonage de l'ADN	69
4.3.1	Méthode	69
5.0	TRANSFORMATIONS	69
5.1	Transformation des protoplastes de <i>S. lividans</i> 10-164	69

5.1.2	Solutions utilisées	69
5.1.3	Méthode	70
5.2	Transformation des cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	70
5.2.1	Solutions utilisées	70
5.2.2	Méthode	71
6.0	DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA C230	72
6.1	Essai semi quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 en milieu solide	72
6.2	Essai quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 en milieu liquide "SLAB"	73
6.2.1	Solutions utilisées	73
6.2.2	Méthode	73
	RÉSULTATS	75
1.0	CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES DES PROMOTEURS DE <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> , <i>xlnC</i> , FUSIONNÉS AVEC LE GÈNE <i>xylE</i> DANS LES PLASMIDES pIJ4083 ET pXE4	76
1.1	Utilisation du "sonde à promoteur", pIJ4083 (copie multiple), pour la fusion des promoteurs de <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> , <i>xlnC</i> , avec le gène <i>xylE</i>	76
1.1.1	Promoteurs de <i>xlnA</i>	76

1.1.1.1	Construction de pIAF251	76
1.1.1.2	Construction de pIAF252	76
1.1.1.3	Construction de pIAF253	77
1.1.1.4	Construction de pIAF254	78
1.1.1.5	Construction de pIAF255	78
1.1.1.6	Construction de pIAF256	79
1.1.1.7	Construction de pIAF257	79
1.1.1.8	Construction de pIAF258	80
1.1.2	Promoteur de <i>xlnB</i>	80
1.1.2.1	Construction de pIAF259	80
1.1.3	Promoteur de <i>xlnC</i>	81
1.1.3.1	Construction de pIAF260	81
1.1.3.2	Construction de pIAF261	81
1.2	Construction plasmidique du promoteur de <i>xlnC</i> , fusionné avec le gène <i>xylE</i> dans le plasmide à copie unique, pXE4	82
1.2.1	Construction de pIAF262	82
2.0	ESSAI SEMI QUANTITATIF DE L'ACTIVITÉ DE LA C230 EN MILIEU MINIMAL SOLIDE "MBSM"	82
2.1	Activité des promoteurs de <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> et <i>xlnC</i> , dans pIJ4083	83
2.2	Activité du promoteur de <i>xlnC</i> , dans pXE4	84

3.0	ESSAI QUANTITATIF DE L'ACTIVITÉ DE LA C230 EN MILIEU LIQUIDE "SLAB"	84
3.1	Activité des promoteurs de <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> et <i>xlnC</i> , dans pIJ4083	84
3.2	Activité du promoteur de <i>xlnC</i> , dans pXE4	85
	DISCUSSION	116
1.0	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ PROMOTRICE DES GÈNES <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> et <i>xlnC</i> , DANS LE PLASMIDE À COPIE MULTIPLE, pIJ4083	117
1.1	En milieu contenant 1% de glucose	117
1.2	En milieu supplémenté avec 1% de xylane	120
1.3	En milieu contenant 1% de xylose	121
2.0	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ DES PROMOTEURS DES GÈNES DE <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> , <i>xlnC</i> DANS LE PLASMIDE pXE4	123
2.1	En milieu supplémenté avec 1% de glucose	123
2.2	En milieu contenant 1% de xylane	124
2.3	En milieu supplémenté avec 1% de xylose	124
3.0	ANALYSE DES RÉGIONS PROMOTRICES DE <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> et <i>xlnC</i> FUSIONNÉES AVEC LE GÈNE <i>xylE</i>	125

3.1	Fusions des promoteurs du gène <i>xlnA</i> avec le gène <i>xylE</i> , dans le plasmide pIAF252 et du gène <i>xlnC</i> avec le gène <i>xylE</i> , dans le plasmide pIAF261	125
3.2	Fusions des promoteurs du gène <i>xlnA</i> avec le gène <i>xylE</i> , dans les plasmides pIAF254, pIAF256, pIAF258 et du gène <i>xlnB</i> avec le gène <i>xylE</i> , dans le plasmide pIAF259	127
	CONCLUSION	138
	REMERCIEMENTS	142
	BIBLIOGRAPHIE	143

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide déoxy-ribonucléique
ARN	acide ribonucléique
C230	catéchol 2,3 dioxygénase
EDTA	acide [éthylène dinitrilo]-tétraacétique disodique
g	gramme(s)
kb	kilobase(s)
L	litre(s)
M	molaire
min.	minute(s)
mL	millilitre(s)
mUI	milliunité internationale
mg	milligramme(s)
µg	microgramme(s)
µL	microlitre(s)
nm	nanomètre(s)
PEG	polyéthylène glycol
p/v	poids par volume
rpm	rotations par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
TBE	tampon tris-borate-EDTA
TE	tampon Tris-EDTA
TRIS	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TSR	thiostrepton
v/v	volume par volume

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	Représentation schématique du cycle de vie primaire et secondaire de <i>S. coelicolor</i>	8
FIGURE 2:	Comparaison des séquences nucléotidiques des promoteurs typiques "SEP" de streptomycètes avec la séquence consensus d' <i>E. coli</i>	18
FIGURE 3:	Disposition des promoteurs P1 et P2 dans l'opéron galactose de <i>S. lividans</i>	22
FIGURE 4:	Représentation schématique du cycle de vie de <i>S. coelicolor</i> avec les gènes impliqués.....	24
FIGURE 5:	Carte de restriction du plasmide pXE4.....	40
FIGURE 6:	Carte de restriction du plasmide pIJ4083.....	43
FIGURE 7:	Carte de restriction du plasmide pXE3.....	54
FIGURE 8:	Carte de restriction des plasmides pSL1180 et pSL1190.....	56
FIGURE 9:	Carte de restriction des plasmides pIAF18, pIAF42 et pIAF20.....	86
FIGURE 10:	Carte de restriction du plasmide pIAF251.....	88

FIGURE 11:	Carte de restriction du plasmide pIAF252.....	90
FIGURE 12:	Carte de restriction du plasmide pIAF253.....	92
FIGURE 13:	Carte de restriction du plasmide pIAF254.....	94
FIGURE 14:	Carte de restriction du plasmide pIAF255.....	96
FIGURE 15:	Carte de restriction du plasmide pIAF256.....	98
FIGURE 16:	Carte de restriction du plasmide pIAF257.....	100
FIGURE 17:	Carte de restriction du plasmide pIAF258.....	102
FIGURE 18:	Carte de restriction du plasmide pIAF259.....	104
FIGURE 19:	Carte de restriction du plasmide pIAF260.....	106
FIGURE 20:	Carte de restriction du plasmide pIAF261.....	108
FIGURE 21:	Carte de restriction du plasmide pIAF262.....	110
FIGURE 22:	Représentation schématique des promoteurs des gènes <i>xlnA</i> , <i>xlnB</i> et <i>xlnC</i> , fusionnés avec <i>xylE</i> , ainsi que les sites de fixation de ribosome des différents gènes.....	130

- FIGURE 23: Séquence nucléotidique de la fusion du promoteur du gène *xlnA/SphI-BglII* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF252.....132
- FIGURE 24: Séquence nucléotidique de la fusion du promoteur du gène *xlnA/BglII-NotI* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF254.....134
- FIGURE 25: Séquence nucléotidique de la fusion du promoteur du gène *xlnC/PstI-SphI* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF261.....136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Souches bactériennes utilisées.....	50
Tableau 2	Plasmides utilisés.....	51
Tableau 3	Activité de la C230 des clones pIAF254, pIAF256, pIAF258, pIAF259 et pIAF261 en milieu minimal solide MBSM, supplémenté avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.....	112
Tableau 4	Activité de la C230 des clones pIAF254, pIAF256, pIAF258, pIAF259 et pIAF261 en milieu liquide "SLAB", supplémenté avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.....	113
Tableau 5	Activité de la C230 du clone pIAF262 en milieu minimal solide "MBSM", supplémenté avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.....	114
Tableau 6	Activité de la C230 du clone pIAF262 en milieu minimal liquide "SLAB", supplémenté avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.....	115

SOMMAIRE

S. lividans 1326 produit trois xylanases: A, B et C. L'activité promotrice des gènes *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, a été testée en fusionnant les fragments de ces gènes avec le gène *xylE* dans les vecteurs de fusion, pIJ4083, un plasmide à nombre de copie multiple et pXE4, un plasmide à nombre de copie unique. Le gène *xylE* de *Pseudomonas putida* est un gène rapporteur qui code pour une enzyme, la catéchol dioxygénase (C230), qui convertit le catéchol incolore en un composé, le 2-hydroxymuconique semialdéhyde, de couleur jaune intense. Les colonies qui contiennent les promoteurs localisés dans les constructions plasmidiques et pouvant faire exprimer le gène *xylE*, deviennent jaunes, lorsque vaporisées avec une solution aqueuse de catéchol. Celles, sans activité promotrice restent blanches. L'activité des promoteurs a été d'abord testée par visualisation sur Pétris, en milieu minimal supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose, puis en milieu liquide SLAB contenant 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose. Parmi les promoteurs des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* testés, certains avaient une activité en milieu contenant du xylane ou du xylose. En présence du glucose, seuls les promoteurs des fragments *xlnA/SphI-BglIII* et *xlnC/PstI-SphI* n'étaient pas réprimés. D'autre part, la distance entre les promoteurs testés et le gène *xylE* était inversement proportionnelle à la production de C230.

INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des bactéries gram-positives du sol qui forment des spores. Leur contenu génétique est riche en G+C, environ 73% (Benigni *et al.*, 1975; Enquist et Bradley, 1971). Ces bactéries possèdent un cycle complexe de différenciation morphologique, qui ressemble à celui des champignons filamenteux (Hopwood, 1967; Chater et Merrick, 1979). Le développement morphologique chez ces bactéries se fait par alternance entre le mycélium végétatif ou substrat et le mycélium aérien qui se transforme en spores. Les streptomycètes produisent la majorité des antibiotiques d'importance médicale et vétérinaire (Berdy, 1980) et la plupart des enzymes hydrolytiques extracellulaires (Williams *et al.*, 1983), dont les protéases, amylases, cellulases, xylanases, mannanases, chitinases, lipases et nucléases. La synthèse de plusieurs de ces produits semble être influencée de manière directe ou indirecte par la répression catabolique (Martin et Demain, 1980; Sanchez et Quinto, 1975). Le contrôle catabolique chez les bactéries gram-positives est encore moins compris et son étude représente un intérêt particulier chez les streptomycètes, à cause du cycle complexe de différenciation morphologique et de l'importance commerciale et industrielle de ces derniers (production d'antibiotiques, d'enzymes hydrolytiques extracellulaires et d'autres métabolites secondaires). Pour une meilleure compréhension des phénomènes liés à la répression catabolique et à la régulation de l'expression des gènes chez certaines bactéries, on a développé des systèmes de vecteurs de fusion, comprenant des gènes rapporteurs permettant de tester la force des promoteurs, d'identifier et de caractériser leurs séquences. L'utilisation de gènes rapporteurs tel que le gène *lacZ*

d' *E. coli*, qui code pour une protéine facile à doser, permettant d'effectuer un essai semi quantitatif de l'expression du gène dans les colonies en milieu solide sur Pétri, a révolutionné l'application des techniques génétiques, pour permettre une meilleure analyse de la régulation du gène aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Mais les multiples tentatives d'utiliser le gène *lacZ* comme gène rapporteur chez les streptomycètes ont été vaines, car toutes les colonies de streptomycètes examinées, ont une activité significative de β -galactosidase et les mutants sans activité, présentent des défauts pléiotropiques (Eckhardt et Smith, 1987). En plus, le gène *lacZ* de *E. coli* est faiblement exprimé chez les streptomycètes à cause de la différence dans l'usage des codons (King et Chater, 1986). Plusieurs autres systèmes de gènes rapporteurs ont été essayés, tels le gène *ampC* (β -lactamase) de *E. coli* (Forsman et Jaurin, 1987); le gène *tyr* (une tyrosinase) de *Streptomyces glaucescens* (Horinouchi et Beppu, 1985); les gènes *galK* (galactokinase) (Brawner *et al.*, 1985; Rosenberg *et al.*, 1986); *neo* (aminoglycoside-phosphotransférase de Tn5) (Bibb et Cohen, 1982; Ward *et al.*, 1986); *cat* (chloramphénicol acétyltransférase) (Bibb et Cohen, 1982) d' *E. coli* et le gène *vph* (phosphotransférase) de *Streptomyces vinaceus* (Rodicio *et al.*, 1985). Malgré l'utilité de ces gènes rapporteurs dans certaines applications, ils ont tous des désavantages. La plupart n'ont pas la même sensibilité que *lacZ* (chez *E. coli*) pour détecter l'activité du gène dans les colonies sur Pétri, en plus il n'y a aucune évidence qui permet de confirmer que ces gènes rapportent fidèlement le comportement du promoteur sous le contrôle transcriptionnel duquel ils se trouvent. Un autre

système de gène rapporteur, basé sur le fragment de l'opéron *luxAB* de *Vibrio harveyi* s'est avéré extrêmement sensible et utile pour les études sur la régulation spatiale et temporelle des gènes impliqués dans le développement chez *S. coelicolor*. Mais l'inconvénient de ce système, c'est de trier un grand nombre de colonies (Schauer *et al.*, 1988), en plus d'être coûteux. Cependant, il a été rapporté que le gène *xylE* de *Pseudomonas putida* est un gène rapporteur très efficace chez les streptomycètes (Ingram *et al.*, 1989). Le gène *xylE* code pour une enzyme, la catéchol 2,3-dioxygénase (C230), qui convertit le catéchol incolore en un produit d'oxydation, le 2-hydroxymuconique semialdéhyde, de couleur jaune intense. Le gène *xylE* a été utilisé comme gène rapporteur pour la première fois dans *Bacillus subtilis* (Zukowski *et al.*, 1983). Depuis, il a été utilisé avec succès dans d'autres fusions, *ctc-xylE*, chez *B. subtilis*, pour retrouver des mutations qui affectaient l'expression du promoteur *ctc* (Ray *et al.*, 1988); *galP1-xylE*, chez *S. lividans*, pour étudier la répression catabolique exercée par le glucose et l'induction par le galactose du promoteur *galP1* (Ingram *et al.*, 1989); *pcbC-xylE*, chez *Streptomyces clavuligerus*, pour localiser et identifier le promoteur *pcbC* (Astrid *et al.*, 1992). Le gène *xylE* possède plusieurs avantages par rapport aux autres gènes rapporteurs: dans la majorité des cas, il reproduit avec une excellente fidélité le comportement du promoteur sous le contrôle transcriptionnel duquel il se trouve. L'essai enzymatique de l'expression du gène *xylE* se fait par simple visualisation sur Pétris, ainsi que par colorimétrie. En plus, aucune condition spéciale de croissance n'est obligatoire, pas de souches spéciales requises comme hôtes,

à partir du moment où il n'y a pas d'activité (endogène) détectable de la C230. Le substrat, le catéchol, est moins coûteux, non toxique pour les bactéries utilisées et facile à manipuler.

La présente étude a pour objectifs, d'analyser les régions promotrices des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* de *S. lividans*. Pour cela, on a fusionné le gène rapporteur *xylE* de *Pseudomonas putida* aux fragments d'intérêt, dans des vecteurs de fusion pIJ4083 (Clayton et Bibb, 1990) et pXE4 (Ingram *et al.*, 1989). Ceci permettrait non seulement de localiser les différents promoteurs, d'évaluer leur force, mais aussi d'améliorer éventuellement leur efficacité. Enfin, cette étude nous permettra de savoir si les différents promoteurs testés sont inductibles par les sources de carbone comme le xylane et le xylose et s'ils sont susceptibles ou non à la répression catabolique exercée par le glucose. Une amélioration de la production enzymatique des xylanases à l'échelle industrielle serait envisageable, à partir de cette étude.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 Aperçu général sur les streptomycètes

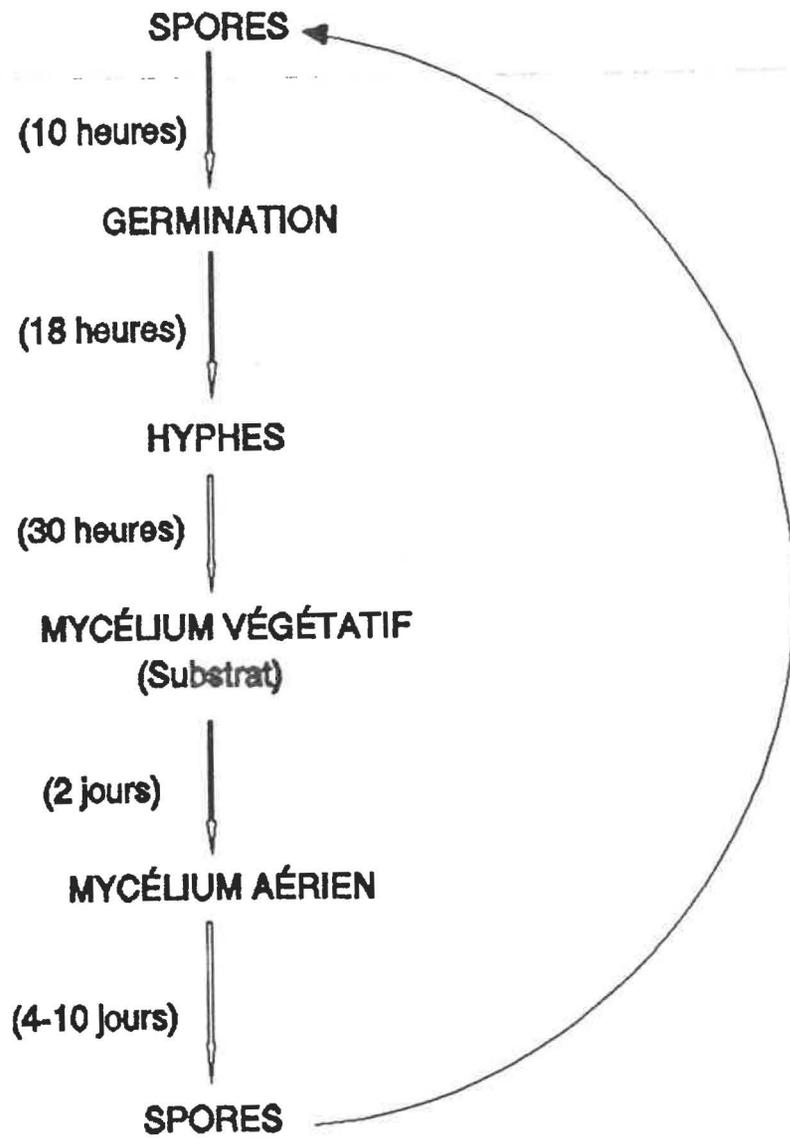
Les streptomycètes sont des bactéries gram-positives appartenant à la famille des actinomycètes. Ces microorganismes, ont longtemps été considérés comme étant phylogénétiquement des intermédiaires entre les bactéries et les champignons filamenteux. Leur particularité au sein des procaryotes est surtout due à leur contenu riche en G+C (environ 73%) comparativement à *E. coli* (environ 50%). Ceci pourrait être une des raisons permettant d'expliquer pourquoi les streptomycètes sont capables de transcrire les gènes en provenance d'autres bactéries (Kieser *et al.*, 1986); de résister contre les rayons UV lors de la production du mycélium aérien (Baltz, R.H. 1986).

Dans leur habitat naturel, le sol, les spores de streptomycètes se transforment en mycélium végétatif, qui envahit la surface des débris organiques qu'il hydrolyse grâce à la sécrétion d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Chater *et al.*, 1989). Les streptomycètes produisent aussi la majorité des antibiotiques d'importance médicale et vétérinaire, ainsi que d'autres agents chimiothérapeutiques, qui sont tous des métabolites secondaires (Williams *et al.*, 1983).

1.1 Cycle de vie primaire

L'un des aspects biologiques les plus intéressants de la biologie des streptomycètes constitue leur cycle de développement, incluant une différenciation complexe multicellulaire et morphologique (Fig. 1), avec alternance entre la phase nutritive (mycélium végétatif ou substrat), cycle

FIGURE 1 : Représentation schématique du cycle de vie primaire et secondaire de *Streptomyces coelicolor*.



primaire, et la phase reproductive dispersée (mycélium aérien), cycle secondaire, au cours duquel les hyphes végétatifs se transforment en spores. Les streptomycètes croissent comme un amas complexe de mycélium (mycélium végétatif) avec des hyphes branchés (enchevêtrés), qui pénètrent le sol pour solubiliser le matériel organique par la sécrétion d'enzymes extracellulaires. Dans les conditions de limitation de nutriments en milieu solide, ces bactéries se différencient par la formation d'hyphes aériens qui s'enroulent d'abord, subissent une septation, suivie par une formation de longues chaînes de cellules de spores pigmentées, chaque cellule contenant un seul génome. Les spores sont impliquées dans la coloration des colonies spécifique à l'espèce. La différenciation des colonies dure quelques jours, ensuite les deux types de mycélium réapparaissent, séparés dans le temps et dans l'espace, un autre cycle recommence et ainsi de suite (Schauer *et al.*, 1988).

1.2 Cycle de vie secondaire

La production d'antibiotiques, ainsi que d'autres métabolites secondaires se fait durant la période de transition du mycélium végétatif au mycélium aérien. Cependant, la production d'antibiotiques, synchronisée avec le cycle secondaire, tend à protéger les streptomycètes contre une éventuelle invasion de corps étrangers. Cette phase est suivie par une lyse partielle du substrat (mycélium végétatif) qui servira de nutriment au mycélium aérien. Le mycélium aérien se développe par la suite et se transforme en spore (Chater, 1984). Si la production d'enzymes extracel-

lulaires ainsi que d'autres métabolites secondaires semble coïncider avec le développement morphologique chez les streptomycètes, ceci n'est pas dû à un simple hasard, car les deux phénomènes pourraient être régulés par les mêmes mécanismes (Chater, 1984). La différenciation chez les streptomycètes comprend également la production du facteur A (2s-isocapryloyl-3s-hydroxyméthyl- τ -butyrolactone). Cette substance chimique extracellulaire, qui est une phéromone, est impliquée dans la production d'antibiotiques pigmentés, tels l'actinorhodine et l'undecylprodigiosine chez *S. coelicolor* 3A(2) et *S. lividans*, ainsi que dans la sporulation et la production de streptomycine chez *S. griseus* et *S. bikiniensis* (Hara et Beppu, 1982). Des observations faites sur le mutant D1 de *S. lividans* ont montré que cette souche croît sous forme de mycélium végétatif lisse qui initialement est sans pigment, mais plus tard devient jaunâtre. Cependant, des secteurs de colonies de ce mutant présentent souvent des colorations roses ou rouges (Stein et Cohen, 1989). Selon ces auteurs, ce mutant présente une sévère déficience dans la production du mycélium aérien. Toutefois, ce mutant est capable de produire des structures dans les alentours de son milieu de croissance. La capacité des colonies de mutants D1 à produire du mycélium aérien et un pigment, semble être accrue par la présence d'une colonie de type sauvage à proximité. Ce qui laisse à suggérer que le phénotype de ce mutant pourrait répondre à un agent diffusible comme le facteur A. En plus du facteur A, plusieurs autres gènes sont impliqués dans la sporulation chez les Streptomycètes. Par exemple, gène *bldA* (pour bald, chauve), qui code pour la tRNA_{LEU}, joue un rôle important

dans la sporulation chez les streptomycètes. D'autre part, il a été montré dans certaines études que le gène *whiG* (pour white: aspect blanchâtre du mycélium aérien incapable de sporuler) est aussi impliqué dans la sporulation des colonies chez *S. coelicolor*, car si les mutants de *whiG* sont capables de former du mycélium aérien, ils restent toujours blancs même après une incubation prolongée, temps normal requis pour l'acquisition de la couleur grise des spores (Hopwood *et al.*, 1970). Etant donné que *bldA* joue un rôle essentiel dans la différenciation autant chez *S. coelicolor* que chez plusieurs autres espèces, tel *S. lividans* (Chater *et al.*, 1988), et que plusieurs autres gènes sont impliqués dans le processus de développement et de différenciation morphologique chez les streptomycètes, il est donc possible d'envisager les multiples cascades régulatrices qui en résultent. Mais la régulation des promoteurs impliqués dans la transcription des différents gènes pour la synthèse d'enzymes extracellulaires, d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires chez les streptomycètes reste encore moins connue. Pour une meilleure compréhension de la régulation des promoteurs de streptomycètes, il serait bon de définir d'abord les promoteurs, leur polymorphisme. Nous parlerons ensuite de la régulation (induction et répression). Enfin, nous discuterons du système de gène de fusion (gènes rapporteurs), qui permet d'étudier la régulation des promoteurs chez les streptomycètes, d'identifier et de caractériser les différents signaux de régulation de la transcription.

2.0 Le catabolisme du xylane chez les streptomycètes

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères. Elles contiennent principalement le xylane. La structure de la molécule de xylane est faite de résidus de D-xylose liés par des liaisons β -1,4 et quelques résidus branchés de L-arabinose et d'acide glucuronique (Biely, 1985). L'hydrolyse complète de la molécule de xylane en monosaccharides nécessite l'action combinée de différentes xylanases aussi bien que celle de la β -xylosidase (Reilly, 1981). Les xylanases sont produites par différents types de microorganismes, tels les bactéries, les champignons et les levures. Parmi les bactéries, les streptomycètes sont de bons producteurs de xylanases.

Selon des expériences menées par Keskar (1990), l'hydrolyse du xylane sur une courte période d'incubation avec la xylanase de *Streptomyces* T-7, donne du xylobiose, des xylo-oligosaccharides et des traces de résidus de xylose. Des xylanases de streptomycètes, semblables à la β -xylosidase de *A. niger*, hydrolysent le xylane (après 16 h. d'incubation) pour donner seulement du xylose. Trois autres types de xylanases retrouvés chez *Streptomyces* 3137, hydrolysent le xylane pour donner seulement du xylose et du xylobiose (Mariu *et al.*, 1985). Les xylanases de *S. exfoliatus* dégradent le xylane pour donner du xylose et du xylobiose (Sreenath et Joseph, 1982). Les souches de *Streptomyces* KT-23, synthétisent des xylanases qui hydrolysent le xylane pour donner initialement du xylobiose. Le xylobiose est ensuite clivé en xylose pendant une période d'incubation prolongée (Nakajima *et al.*, 1984). Kusakabe *et al.* (1977) ont aussi rapporté, que les produits d'hydrolyse du xylane par les xylanases d'autres

souches de *Streptomyces*, sont constitués principalement de xylobiose et de xylose. Cependant, l'hydrolyse du xylane par la xylanase de la souche *Chainia* (Bastawde, 1987), après quelques minutes d'incubation, donne majoritairement du xylohexaose et du xylotriase, tandis qu'une incubation prolongée, donne des résidus de xylobiose, xylopentaose, xyloheptaose et des traces d'autres oligosaccharides de haut degré de polymérisation. D'autres chercheurs (Shareck *et al.*, 1991), ont montré que la souche *S. lividans* 1326 produit trois xylanases: XlnA, XlnB et XlnC. D'après le patron d'hydrolyse du xylane par ces enzymes, les xylanases B et C hydrolysent le xylane pour donner des oligoxylosides de degré de polymérisation supérieur ou égal à trois. Ces deux enzymes possèdent une activité de type "endo" sur le xylane. La xylanase A attaque le xylane pour générer du xylobiose et du xylose comme sources de carbone; elle clive de façon préférentielle les produits d'hydrolyse des xylanases B et C (Kluepfel *et al.*, 1990). En général, les xylanases de streptomycètes attaquent le xylane pour produire principalement du xylotriase en début d'hydrolyse, avec quelques résidus de xylo tétraose et de xylobiose. Après une hydrolyse prolongée, les oligosaccharides de degré de polymérisation de 3 à 5, sont dégradés en xylobiose avec quelques résidus de xylose. Pour une hydrolyse de 120 h., les résidus de xylobiose sont dégradés en xylose, dernier métabolite de la dégradation du xylane. D'autre part, une hydrolyse d'oligosaccharides de degré de polymérisation allant de 3 à 6, donne d'abord du xylobiose, qui ensuite est dégradé en xylose. Le xylobiose est transporté activement dans la cellule pour être hydrolysé (Hurtubise *et al.*, transcrit soumis).

3.0 Régulation des promoteurs de streptomycètes

3.1 Promoteurs

3.1.1 Définition

Un promoteur, c'est la séquence d'ADN au niveau de laquelle l'ARN polymérase se fixe pour initier la transcription de l'ADN en ARN messenger. Cependant, tous les promoteurs n'ont pas la même efficacité. Il existe des promoteurs forts et des promoteurs faibles: les promoteurs forts permettent l'initiation de l'ARN à une haute fréquence, tandis que les promoteurs faibles contrôlent la synthèse de transcrits rares.

Des analyses détaillées de promoteurs reconnus par l'ARN polymérase d'*E. coli*, ont montré qu'il existe deux hexamères de nucléotides hautement conservés, l'un situé à 10 pb (région -10 ou boîte de Pribnow; Pribnow 1975) et l'autre à 35 pb (région -35) à partir du site d'initiation de la transcription (Rosenberg et Court, 1979). Ces signaux de transcription hautement conservés ont reçu le nom de séquences consensus. On pense que les deux régions, -10 et -35, des séquences consensus, jouent un rôle essentiel dans la détermination de la force du promoteur. Car, les mutations qui diminuent la fréquence de la transcription, réduisent aussi le degré d'homologie au niveau des régions conservées. Toutefois, d'autres régions moins conservées peuvent également avoir une influence sur la force du promoteur, tel le nombre de nucléotides qui sépare les deux hexamères. Par exemple des mutations portées sur l'ADN entre les deux régions conservées

(-10 et -35) dans le promoteur *lac* (de Crombrugghe *et al.*, 1971; Stephano et Gralla, 1982) ainsi que dans le promoteur de la β -lactamase (Jaurin *et al.*, 1981) changent la force du promoteur. Pour tester l'efficacité d'un promoteur, on mesure la fréquence avec laquelle la synthèse de l'ARN est initiée. Mais cette méthode est difficile à pratiquer en condition *in vivo*; c'est pourquoi, on évalue indirectement la force du promoteur à partir de la quantité de protéine exprimée par le gène se trouvant sous le contrôle du promoteur à tester.

3.1.2 Hétérogénéité des promoteurs de streptomycètes

Les promoteurs des gènes de streptomycètes ne sont pas tous de la même classe (Baylis et Bibb, 1988; Buttner *et al.*, 1988). À cause de cette hétérogénéité, les streptomycètes contiennent différentes formes d'holoenzymes d'ARN polymérase (Buttner *et al.*, 1988). Quelquefois, un gène donné ou un opéron peuvent être transcrits par au moins deux promoteurs de la même classe, alors que dans d'autres cas, la transcription se fait avec des promoteurs de classes différentes (Baylis et Bibb, 1988; Buttner *et al.*, 1988; Fornwald *et al.*, 1987). Le mécanisme de la différence de transcription de certains gènes spécifiques par différents types de promoteurs, a été démontré d'abord chez *Bacillus subtilis* et quelques uns de ses phages, ensuite chez d'autres bactéries, incluant les espèces d' *E. coli*, *Caulobacter* et *Pseudomonas*. Le même phénomène a été aussi observé chez les streptomycètes pour la première fois par Westpheling *et al.* (1985). Selon ces chercheurs, les promoteurs aussi bien que les ARN polymérases

chez les streptomycètes sont tous hétérogènes.

3.2 Hétérogénéité des ARN polymérases chez les streptomycètes

3.2.1 L'holoenzyme de l'ARN polymérase et le facteur sigma (σ)

L'holoenzyme de l'ARN polymérase des eubactéries est constitué de 5 sous unités ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). Le core de l'ARN polymérase ($\alpha_2\beta\beta' = E$) est capable de polymériser les ribonucléotides triphosphates en ARN. Mais la reconnaissance des séquences promotrices nécessite la présence de la sous unité σ . Ce polypeptide confère au core la capacité de se fixer de manière spécifique aux régions promotrices pour l'initiation de la transcription. Par conséquent, les bactéries pouvant synthétiser différents facteurs σ ont un potentiel plus élevé de contrôler l'expression des gènes spécifiques (Burgess *et al.*, 1969).

3.2.2 Reconnaissance des séquences promotrices "SEP" d' *E. coli* par des ARN polymérases de streptomycètes

Un groupe de signaux de transcription des promoteurs typiques d'*E. coli* ou "SEP", a été découvert chez les streptomycètes, comparable à la séquence consensus d' *E. coli* (Fig. 2) et capable de fonctionner chez les deux bactéries (Jaurin et Cohen, 1985). Les séquences consensus d' *E. coli* sont reconnues par une catégorie d'ARN polymérase de streptomycètes qui réagissent exactement de la même manière que l'ARN polymérase d' *E. coli* aux différentes mutations portées sur la région promotrice de la séquence

FIGURE 2 : Comparaison des séquences nucléotidiques des promoteurs typiques "SEP" de streptomycètes avec la séquence consensus de *E. coli*.

consensus "SEP" (Jaurin et Cohen, 1984). Ces ARN polymérase sont aussi capables de reconnaître des séquences promotrices en provenance d' *E. coli*, *Serratia marcescens* ou *Bacillus licheniformis* (Bibb et Cohen, 1982). Westpheling *et al.* (1985) ont découvert une holoenzyme d'ARN polymérase chez *S. coelicolor*, semblable à celle de *B. subtilis*, qui utilise aussi les séquences du promoteur typique, "SEP" d' *E. coli*.

3.2.3 Rôle des différents facteurs sigma dans le contrôle de la différenciation de la transcription chez les streptomycètes

De récentes études génétiques et biochimiques ont révélé l'existence d'au moins 7 différents facteurs σ chez *S. coelicolor*, jouant tous un rôle capital dans le contrôle de la différenciation et de la transcription des gènes de métabolites primaires. Au moins 3 différentes holoenzymes d'ARN polymérase contrôlent la transcription du gène de l'agarase (*dagA*) de *S. coelicolor* A3(2). *dagA* possède 4 promoteurs différents. La séquence d'un des promoteurs, *dagAp4*, situé en amont des 3 autres, ressemble énormément à la séquence consensus de la classe des promoteurs des eubactéries. Ce promoteur est transcrit à partir de l'holoenzyme $E\sigma^{35}$, responsable de la transcription du promoteur *veg* de *B. subtilis* (Westpheling *et al.*, 1985). Les trois autres promoteurs se distinguent non seulement du premier, mais aussi de façon remarquable entre eux. Ainsi, $E\sigma^{49}$ contrôle la transcription à partir du promoteur *dagAp3*, tandis que $E\sigma^{28}$ reconnaît *dagAp2*. Donc, le gène *dagA* est transcrit à partir de 4 différents promoteurs par au moins 3 différentes holoenzymes d'ARN polymérase: $E\sigma^{49}$, $E\sigma^{28}$,

$E\sigma^{35}$ (Buttner *et al.*, 1987; 1988).

D'autre part, l'opéron galactose (Fig. 3) de *S. coelicolor* A3(2) est transcrit par deux différentes holoenzymes d'ARN polymérase. L'opéron galactose comprend 3 gènes dont l'organisation est la suivante: *galT* (galactose-1-phosphate uridyl-transférase), *galE* (UDP-galactose épimérase) et *galK* (galactokinase). Cet opéron est transcrit à partir de deux promoteurs: *galp1* et *galp2* (Fornwald *et al.*, 1987). Westpheling et Brawner (1989), ont démontré également que deux holoenzymes avec différents facteurs σ sont impliqués dans l'expression de l'opéron galactose. D'après eux, le promoteur *galp2*, situé dans la région intercistronique de *galT/galE*, serait transcrit à partir d'une holoenzyme $E\sigma^{28}$, différente de celle qui contrôle la transcription à partir du promoteur *galp1*.

Comme il a déjà été souligné en section (1.1), l'un des aspects les plus intéressants de la biologie des streptomycètes constitue leur cycle de développement, incluant une différenciation complexe multicellulaire et morphologique. Des analyses génétiques ont révélé que 8 gènes (*whiA* à *whiI*) sont impliqués dans le processus de développement et de transition du mycélium aérien au spore (Fig. 4). Une mutation portée sur un seul de ces gènes, cause le blocage à un stade caractéristique entre la formation des hyphes aériens et le développement des spores. Ces mutations sont responsables de la couleur blanchâtre des colonies incapables de sporuler, même après une incubation prolongée. Parmi tous ces mutants, le mutant *whiG* semble être le gène clé dans le déclenchement du mécanisme de sporulation des hyphes aériens (Chater, 1972; McVittie, 1974). D'autre part,

FIGURE 3 : Disposition des promoteurs P1 et P2 dans l'opéron galactose de *S. lividans*.

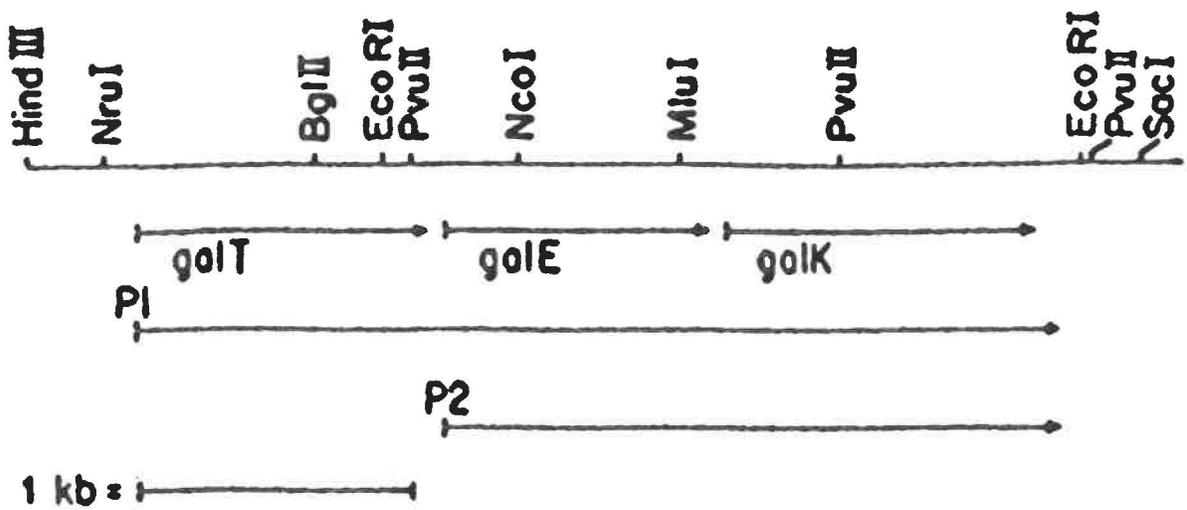
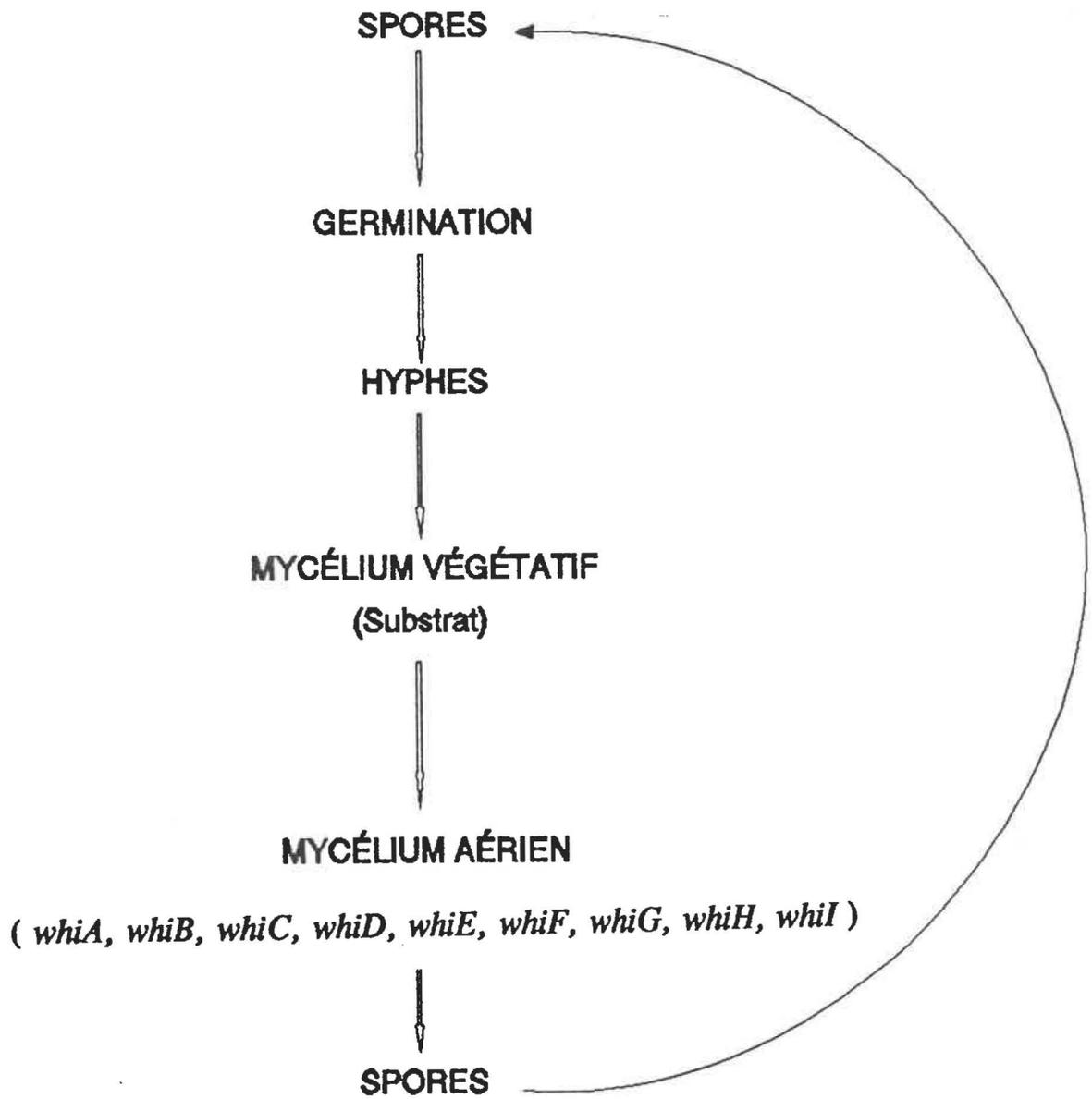


FIGURE 4 : Représentation schématique du cycle de vie de *Streptomyces coelicolor* avec les différents gènes impliqués.



Chater *et al.* (1989) ont montré que l'ARN polymérase isolée à partir des cultures du mutant *whiG* transcrit les gènes *dagA* de *S. coelicolor*, *veg* et *ctc* de *B. subtilis* de façon très identique à celle isolée à partir des cultures de la souche sauvage de *S. coelicolor*. Ce qui laisse à suggérer que le produit du gène *whiG* ne correspond pas aux différents facteurs sigma (σ^{28} , σ^{35} , σ^{49}). D'autres recherches ont montré que *S. coelicolor* possède 4 autres facteurs sigma codés à partir des gènes *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* et qui sont très homologues au facteur sigma σ^{70} d' *E. coli*, produit du gène *rpoD*. Cependant, il semble invraisemblable que l'implication de plusieurs formes d'holoenzymes dans l'expression des opérons, comme par exemple *gal* et *dagA*, soit un phénomène exceptionnel. La signification biologique de la complexité de l'hétérogénéité des promoteurs et des ARN polymérases chez les streptomycètes reste encore moins comprise. Par exemple, la reconnaissance de différents promoteurs contigus dans un opéron par différentes formes d'ARN polymérases, pourrait permettre l'expression de certains gènes particuliers durant différents stades de développement. Cette différence de reconnaissance pourrait être attribuable aussi à une réponse aux variations des conditions physiologiques, vu que le niveau relatif des formes alternatives d'ARN polymérase subit lui même un changement.

4.0 Induction et répression des promoteurs de streptomycètes, promoteurs constitutifs

4.1 Protéines activatrices et contrôle positif

L'initiation de la transcription à partir d'un promoteur est contrôlée positivement, lorsque cette initiation nécessite la participation d'un facteur protéique qui n'est pas toujours présent ou actif dans les cellules en croissance exponentielle. Ce facteur de protéine sera alors appelé un activateur (Englesberg et Wilcox, 1974). Dans les cellules en croissance exponentielle, l'initiation de la transcription à partir des promoteurs chez les bactéries, est accomplie par l'ARN polymérase. Un activateur peut être un facteur accessoire, permettant à l'ARN polymérase d'initier la transcription à partir de promoteurs spécifiques; un facteur qui remplace une des sous unités de l'ARN polymérase en modifiant la spécificité de reconnaissance du promoteur de cette dernière.

Un système contrôlé positivement implique un gène de régulation, qui code pour l'activateur et au moins un gène, le promoteur duquel est contrôlé par l'activateur. Par exemple, la protéine d'activation catabolique ou "CAP" est un produit du gène *crp*. Cette protéine en présence du 3'-5' adénosine monophosphate cyclique, se fixe à des sites spécifiques aux alentours de plusieurs promoteurs pour stimuler l'initiation de la transcription (de Crombrughe *et al.*, 1984; Englesberg et Wilcox, 1974; Ullmann et Danchin, 1983). Les gènes responsables de l'utilisation du galactose chez *E. coli* sont organisés en opéron polycistronique. Cet opéron

est transcrit à partir de deux promoteurs, P1 et P2 qui se chevauchent. Le promoteur P1, est activé positivement par la protéine réceptrice de l'AMPc.

Les gènes responsables de l'utilisation du galactose chez *Saccharomyces cerevisiae* sont regroupés ensemble et s'expriment de manière coordonnée. Cependant, chaque gène est transcrit à partir de son propre promoteur. Les promoteurs P1 et P2 sont contrôlés et activés positivement par le produit du gène *gal4* (Oshima, 1982).

Les promoteurs contrôlés positivement par définition ne sont pas tous fonctionnels ou ne fonctionnent pas du tout en présence d'une ARN polymérase seule. Ceci s'explique par le fait que:

- a) Les séquences nucléotidiques de ces promoteurs diffèrent beaucoup des séquences consensus (section 3.2.2), ce qui empêche l'ARN polymérase de les reconnaître.
- b) De tels promoteurs peuvent avoir des sites de fixation potentiels d'ARN polymérase, qui deviennent non fonctionnels à cause de la présence d'une séquence inhibitrice voisine capable de modifier la conformation de l'ADN. Dans ce cas précis, une activation permettrait de remédier à l'effet causé par la séquence inhibitrice.
- c) Enfin, le non fonctionnement d'un promoteur peut être causé par des répétitions d'initiations avortées (von Hippel *et al.*, 1984) ou bien par une terminaison précoce de la transcription.

4.2 Promoteurs induits

Les promoteurs de streptomycètes sont inductibles, dépendamment

de la source de carbone utilisée. L'activation coordonnée d'un ensemble de gènes fait intervenir des combinaisons complexes de signaux de régulation.

Fornwald *et al.* (1987), ont montré que l'utilisation du galactose chez *S. lividans* se fait à partir de l'induction d'un opéron polycistronique comprenant les gènes *galT*, *galE* et *galK* (Fig. 3). En plus, l'induction du galactose à partir de cet opéron est régulé en partie au niveau de la transcription de deux promoteurs totalement séparés et indépendamment régulés. Ingram *et al.* (1989) ont démontré que la galactokinase est requise pour l'induction par le galactose et la transcription de *galP1* chez *S. lividans*. L'explication la plus plausible de ce phénomène réside dans le fait que, le produit de la réaction de catalyse de la galactokinase, le galactose-1-phosphate, est l'inducteur de *galP1*. Ceci ressemble au même mécanisme d'induction des opérons lactose et glycérol chez *E. coli*. Dans le cas de l'opéron lactose, l'allolactose produit dans une réaction catalysée par la β -galactosidase est l'inducteur (Jobe et Bourgeois, 1972). Dans le cas de l'opéron du glycérol, l'inducteur est le glycérol-1-phosphate, produit dans une réaction catalysée par la glycérol kinase (Lin, 1976). L'avantage de tels arrangements, dans le cas de l'opéron *gal*, serait d'établir probablement une rétroaction positive qui augmenterait l'induction, ce qui faciliterait le transport du galactose dans la cellule. D'autre part, l'expression du gène *dagA* qui code pour l'agarase chez *S. coelicolor*, est induite par les produits de dégradation de l'agar et réprimée par le glucose et d'autres sucres. Tous ces mécanismes sont régis au niveau de l'initiation de la transcription. Pour ce qui concerne la régulation de la sécrétion des xylanases chez

lesprocaryotes, elle n'est pas encore totalement comprise (Nakanishi *et al.*, 1976a,b; Kluepfel et Ishaque, 1982; Woodward, 1984). Vu que le xylane est incapable de pénétrer dans la cellule microbienne, l'induction de la xylanase est stimulée par des fragments de xylane de faible poids moléculaire, qui sont produits dans le milieu par une petite quantité d'enzyme synthétisée de façon constitutive. L'induction des enzymes xylanolytiques dans les différentes cellules microbiennes est régulée par différents composés, tels que les alkyl- ou aryl- β -D-xylosides chez les streptomycètes (Nakanishi *et al.*, 1976a,b) et les méthyl- β -D-xylosides chez *Cryptococcus albidus* (Biely et Petráková 1984). Certains isomères peuvent aussi induire l'activité de la xylanase chez les levures (Hrmova *et al.*, 1984).

4.3 Promoteurs réprimés

Chez *E. coli* et d'autres bactéries gram-négatives, le glucose est la source de carbone préférée. En présence du glucose, l'utilisation d'autres substrats comme source de carbone est fortement inhibée. Plusieurs voies sont impliquées dans ce processus, incluant la répression catabolique. La protéine d'activation catabolique "CAP", une protéine régulatrice, intervient dans ce mécanisme comme activateur. Le mécanisme de cette activation peut se résumer comme suit: le glucose qui est transporté dans la cellule via le système de la phosphotransférase (Dills *et al.*, 1980; Ullmann et Danchin, 1983) bloque l'activité de l'adénylcyclase et diminue la concentration interne de l'AMPc. Ce qui empêche la protéine activatrice "CAP" de stimuler la transcription à partir des promoteurs des opérons impliqués dans le

catabolisme des substrats autres que le glucose. D'autre part, les deux promoteurs P1 et P2 de l'opéron *gal* chez *E. coli* sont négativement régulés par le répresseur *gal* (de Crombrughe et Pastan, 1980) et contrôlés négativement par le produit du gène *gal80*.

Comme chez *E. coli*, l'utilisation du galactose chez *S. cerevisiae* est sujette à la répression catabolique. Mais cette répression est contrôlée par l'isoenzyme hexokinase PII (Matsumoto *et al.*, 1983; Entian *et al.*, 1984) au lieu de l'AMPc. Ainsi, plusieurs organismes utilisent différents mécanismes de régulation pour accomplir le même travail métabolique. Le mécanisme par lequel le contrôle catabolique du glucose se fait chez les bactéries gram-positives reste complètement obscur. Ce mécanisme est totalement différent de l'activation positive modulée par l'AMPc, qui joue un rôle majeur chez les bactéries gram-négatives (Pastan et Adhya, 1976; Setlow, 1973), vu que le niveau de l'AMPc chez les streptomycètes est indépendant de la source de carbone utilisée (Hodgson, 1982). Les mutations chez *S. coelicolor* qui réduisent de façon considérable l'activité de la glucose kinase, diminuent la répression exercée par le glucose sur l'utilisation d'autres sources de carbone (Ikeda *et al.*, 1984). La répression catabolique du glucose joue un rôle considérable dans le contrôle de l'expression de certains gènes de biosynthèse d'antibiotiques. Étant donné que la biosynthèse des antibiotiques est elle même un mécanisme de développement régulé, il est fort possible, que la répression exercée par le glucose joue un rôle dans la régulation de l'expression d'autres gènes de croissance, tels ceux de la différenciation morphologique. Ingram *et al.* (1989), ont démontré aussi que

le promoteur *galP1* de *S. lividans* est susceptible à la répression catabolique exercée par le glucose.

4.4 Promoteurs constitutifs

Il existe chez les streptomycètes des promoteurs constitutifs. Ces promoteurs sont capables de fonctionner même en absence d'inducteurs. Le fonctionnement de l'opéron galactose chez *E. coli* et *S. lividans* est un bon exemple pour illustrer ce phénomène. L'ordre des gènes dans l'opéron galactose chez *S. lividans* est *galT*, *galE*, *galK* (Fig. 3), alors que celui observé chez *E. coli*, est *galE*, *galT*, *galK*. Dans les deux cas, le promoteur constitutif est positionné en amont du gène *galE*. Cette organisation pourrait avoir un rapport physiologique important, quant à la capacité des deux microorganismes à utiliser le galactose. Chez *S. lividans* aussi bien que chez *E. coli*, l'UDP galactose 4- épimérase est exprimée constitutivement, parce que le promoteur constitutif est placé immédiatement en amont du gène *galE*. Chez *E. coli*, on sait que l'UDP galactose 4-épimérase est requise pour la synthèse de la paroi cellulaire en présence ou non de galactose (de Crombrughe et Pastan, 1980). Ce même phénomène pourrait être observé chez *S. lividans* (Fornwald *et al.*, 1989).

Comme déjà mentionné en section (4.2), l'induction de la xylanase est stimulée par des fragments de xylane de faible poids moléculaire, qui sont produits dans le milieu par une petite quantité d'enzyme synthétisée de façon constitutive. Ce qui laisse à penser qu'il pourrait exister chez des souches productrices de xylanase, un opéron du gène *xln*, transcrit à partir

de promoteurs, régulés de façon indépendante: certains inductibles, d'autres constitutifs.

La compréhension de la régulation des gènes chez les streptomycètes reste d'une grande importance, à cause de la multiplicité des gènes d'intérêt, incluant ceux responsables de la différenciation morphologique (Chater, 1984); ceux impliqués dans la biosynthèse des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (Malpartida et Hopwood, 1984; Chater et Bruton, 1985).

5.0 Gènes rapporteurs et "sondes à promoteur"

Dans les "sondes à promoteur", les fragments actifs de promoteurs peuvent être identifiés grâce à la capacité de ces derniers à activer la transcription d'un gène rapporteur sans promoteur, dont le produit est aisément détectable. L'analyse des signaux de régulation génétique est rendue possible, grâce à l'isolement et à la caractérisation des régions de l'ADN impliquées dans l'initiation de la transcription. Plusieurs "sondes à promoteur" ont déjà été construites, contenant des gènes rapporteurs chez les streptomycètes (Bibb et Cohen, 1982; Fornwald *et al.*, 1987; Forsman et Jaurin, 1987; Horinouchi et Beppu, 1985; Ingram *et al.*, 1989; Schauer *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1986; Zukowski *et al.*, 1983).

5.1 Les différents types de "sondes à promoteur"

Les constructions des vecteurs de fusion se différencient les unes des autres, selon le type de gène rapporteur utilisé ou le nombre de copie du

plasmide.

5.1.1 Les différents types de gènes rapporteurs

Dans les "sondes à promoteur", on utilise plusieurs types de gènes rapporteurs, incluant les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes dont le produit sert à effectuer une identification chromogénique, un essai enzymatique ou même un essai par émission de lumière.

5.1.1.1 Gènes rapporteurs de résistance aux antibiotiques

Certaines "sondes à promoteur" contiennent un gène de résistance à un antibiotique, dont l'activation est déclenchée grâce à la présence d'un promoteur localisé en amont de celui-ci. Ces constructions demandent une expression précoce et constitutive à partir du promoteur sous-cloné, afin d'obtenir un niveau significatif de résistance. Ceci pourrait probablement empêcher la détection des promoteurs, qui fonctionnent tardivement durant le cycle de vie de l'organisme. Un tel exemple peut être illustré par la construction plasmidique du vecteur de fusion pIJ486 (Ward *et al.*, 1986) dans lequel, le gène de l'aminoglycoside phosphotransférase (*néo*) du transposon Tn5 est utilisé comme système indicateur. Ce vecteur de fusion contient un terminateur de transcription du coliphage fd, pour empêcher une transcription à travers un terminateur de transcription, à partir des séquences promotrices pouvant se trouver sur le corps du vecteur. Le vecteur contient aussi un site de clonage multiple, permettant d'utiliser un plus grand nombre d'enzymes de restriction. On peut citer comme autres exemples de gènes

rapporteurs de résistance aux antibiotiques, les gènes *ampC* d'*E. coli* (Forsman et Jaurin., 1987), qui code pour la β -lactamase, conférant la résistance à l'ampicilline; *cat* d'*E. coli* (Bibb et Cohen, 1982), qui code pour la chloramphénicol acétyltransférase, conférant la résistance au chloramphénicol; *vph* de *Streptomyces vinaceus*, qui code pour une phosphotransphérase, conférant la résistance à la viomycine (Rodicio *et al.*, 1985).

5.1.1.2 Gènes rapporteurs utilisés pour identification chromogénique

Certaines "sondes à promoteur" contiennent un gène rapporteur, dont le produit sert à effectuer une identification chromogénique de fragments actifs de promoteurs. Ce deuxième procédé permet de compenser les désavantages du premier (section 5.1.1.1), qui est une méthode sélective, requise pour l'activation des gènes de résistance à un antibiotique. Horinouchi et Beppu (1985) ont utilisé cette méthode pour construire le plasmide pARC1. Un pigment brun est produit à la suite de la transcription à partir d'une séquence fonctionnelle de promoteur cloné dans le plasmide pARC1. Ce système permet de détecter des promoteurs tardifs durant le cycle de vie chez les streptomycètes (Feistelson *et al.*, 1986). Toutefois, des analyses subséquentes d'un fragment actif de promoteur dans le plasmide pARC1, sont rendues difficiles à cause du manque de sites de restrictions. Ce qui complique la réisolation de l'insert cloné. En plus, la présence d'un faible niveau résiduel de pigment brun peut donner des résultats erronés

dans l'évaluation de l'activité d'un promoteur faible. Comme autres exemples de gènes rapporteurs utilisés dans le système de détection chromogénique, on peut citer les gènes suivants:

- *lac Z* (King et Chater, 1986) d' *E. coli*. Le gène *lac Z* est un fragment de l'opéron *lac* d'*E. coli*, qui code pour une enzyme, la β -galactosidase. La portion aminoterminal de cette protéine, est capable de compléter avec une β -galactosidase déficiente, dont le gène est présent sur un épisome F dans la cellule hôte. Cette complémentation produit une β -galactosidase active, qui donne une coloration bleue, lorsque les cellules sont mises en croissance en présence d'un inducteur, l'isopropyl-thiogalactoside (IPTG) et du substrat chromogénique, X-gal (β -D-galactopyranoside).

- *tyr* de *Streptomyces glaucescens* (Horinouchi et Beppu, 1985). Ce gène, contrôle la synthèse d'un pigment brun. Grâce à la production du pigment brun, le gène *tyr* peut être utilisé comme gène rapporteur pour identification chromogénique.

- *xylE* de *P. putida* (Zukowski *et al.*, 1983). Le gène *xylE* code pour une enzyme, la catéchol 2,3 dioxygénase, qui convertit le catéchol incolore en un composé, le 2-hydroxymuconique semialdéhyde, de couleur jaune intense. Les colonies ayant une activité promotrice pouvant faire exprimer le gène *xylE*, deviennent jaunes, lorsque vaporisées avec une solution aqueuse de catéchol.

5.1.1.3 Gènes rapporteurs utilisés pour essais enzymatiques

Certains gènes rapporteurs sont utilisés pour tester l'activité du

promoteur, en procédant à un essai enzymatique. C'est le cas du gène *galK* (Brawner *et al.*, 1985; Rosenberg *et al.*, 1986) d' *E. coli*, qui code pour une enzyme, la galactokinase, dont la production peut être quantifiée par essai enzymatique ou bien détectée par "immunoblot".

Notons que l'activité de la C230, produit du gène *xylE*, peut être effectuée en milieu liquide par essai enzymatique (Ingram *et al.*, 1989).

5.1.1.4 Gènes rapporteurs utilisés pour détecter l'activité promotrice par émission de la lumière

L'opéron *luxAB* de *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* et d'autres bactéries marines est un autre exemple de gène rapporteur sensible, avec comme système de détection, l'émission de la lumière. L'opéron *luxAB* code pour une enzyme, la luciférase, qui est un hétérodimère constitué des sous unités α (produit du gène *luxA*) et β (produit du gène *luxB*). Cette enzyme catalyse l'oxydation des longues chaînes d'aldéhyde et réduit le mononucléotide flavine avec émission de la lumière:

$\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{LUMIÈRE}$ (Hastings et Gibson, 1963).

L'émission de la lumière permet de détecter les fragments de promoteurs actifs, placés en amont du gène de la luciférase.

Il faut cependant noter que parmi tous ces gènes rapporteurs utilisés chez les streptomycètes, le gène *xylE* de *P. putida*, semble être le plus prometteur. En plus des raisons déjà énumérées à la section (Introduction), l'utilisation de *xylE* est idéale pour l'analyse de la transcription des gènes

exprimés le long du cycle de vie (production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires) ou tardivement (production de métabolites secondaires, différenciation morphologique), lors du développement de la colonie. Les raisons qui motivent ce choix sont les suivantes:

1. L'utilisation des gènes rapporteurs de résistance aux antibiotiques est beaucoup plus indiquée dans l'étude des promoteurs exprimés dans les cultures jeunes.
2. Il est difficile de quantifier l'expression des gènes qui codent pour des enzymes sécrétées (Forsman et Jaurin, 1987), à cause d'une grande quantité de protéine synthétisée.
3. Les gènes rapporteurs *lacZ*, *luxAB*, *ampC*, *galK*, contiennent tous le codon TTA de la leucine. Hors, il est déjà connu que le produit du gène *bldA* influence directement l'expression des gènes contenant le codon TTA, qui semble être requis (au moins chez *S. coelicolor*) pour réguler la différenciation et la production d'antibiotiques (Lawlor *et al.*, 1987; Leskiw *et al.*, 1991).
4. L'ensemble de gènes qui codent pour le pigment brun chez *S. coelicolor* et qui sont aussi utilisés comme gènes rapporteurs dans certaines "sondes à promoteur", comme pARC1 (Horinouchi et Beppu, 1985) et pCLL1 (Feitelson, 1988), sont reconnus être une partie du groupe de gène *whiE*, responsable de la pigmentation des spores (Davis et Chater, 1990). Hors, l'expression phénotypique de cet ensemble de gène pour la production de pigment pourrait être limitée, en fournissant à la bactérie un supplément de précurseurs.

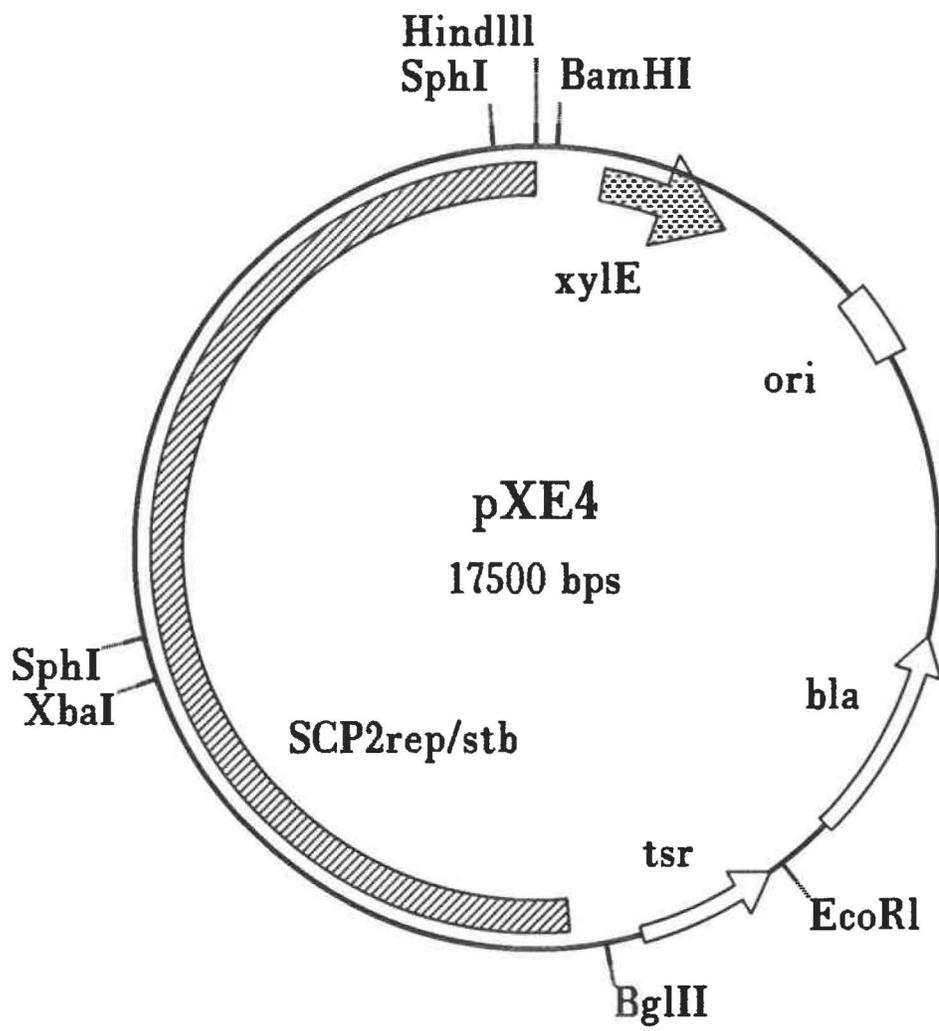
5.1.2 Vecteurs de fusion et nombre de copie du plasmide

En fonction du nombre de copies du plasmide, on peut distinguer les "sondes à promoteur" à faible nombre de copie et les "sondes à promoteur" à nombre de copie multiple.

5.1.2.1 "Sondes à promoteur" à faible nombre de copie

Certaines "sondes à promoteur" à faible nombre de copie par génome, sont souvent utilisées pour sélectionner des fragments de promoteurs actifs (Bibb et Cohen, 1982). Parmi elles, on peut citer les plasmides SLP1.2 (Bibb *et al.*, 1981). Les plasmides dérivés SLP114 et SLP124, possèdent un nombre de deux à cinq copies par chromosome. Le plasmide pXE4 (Fig. 5), qui porte le gène *xylE* de *P. putida*, est un dérivé du plasmide SCP2* et possède environ une copie par chromosome. pXE4 est un plasmide stable, qui ne se transfère pas. Dans pXE4, la cassette du gène *xylE* est située en amont du terminateur de transcription, λ_{10} et en aval des deux sites de clonage *BamHI* et *HindIII*. Un codon "arrêt" se trouve dans la région entre le site de clonage *BamHI* et le codon de départ de *xylE*. Ceci a pour effet d'empêcher la formation de protéine de fusion du gène *xylE*. pXE4 contient aussi les gènes *ori*, une origine de répllication *colE1*; *tsr* (une méthylase d'ARN ribosomal) de streptomycètes, pour la résistance au thio-strepton; *bla* (une β -lactamase) d'*E. coli*, pour la résistance à l'ampicilline; *SCP2 rep/stb*, qui confère au plasmide les fonctions de répllication et de stabilité.

FIGURE 5 : Carte de restriction du plasmide pXE4.

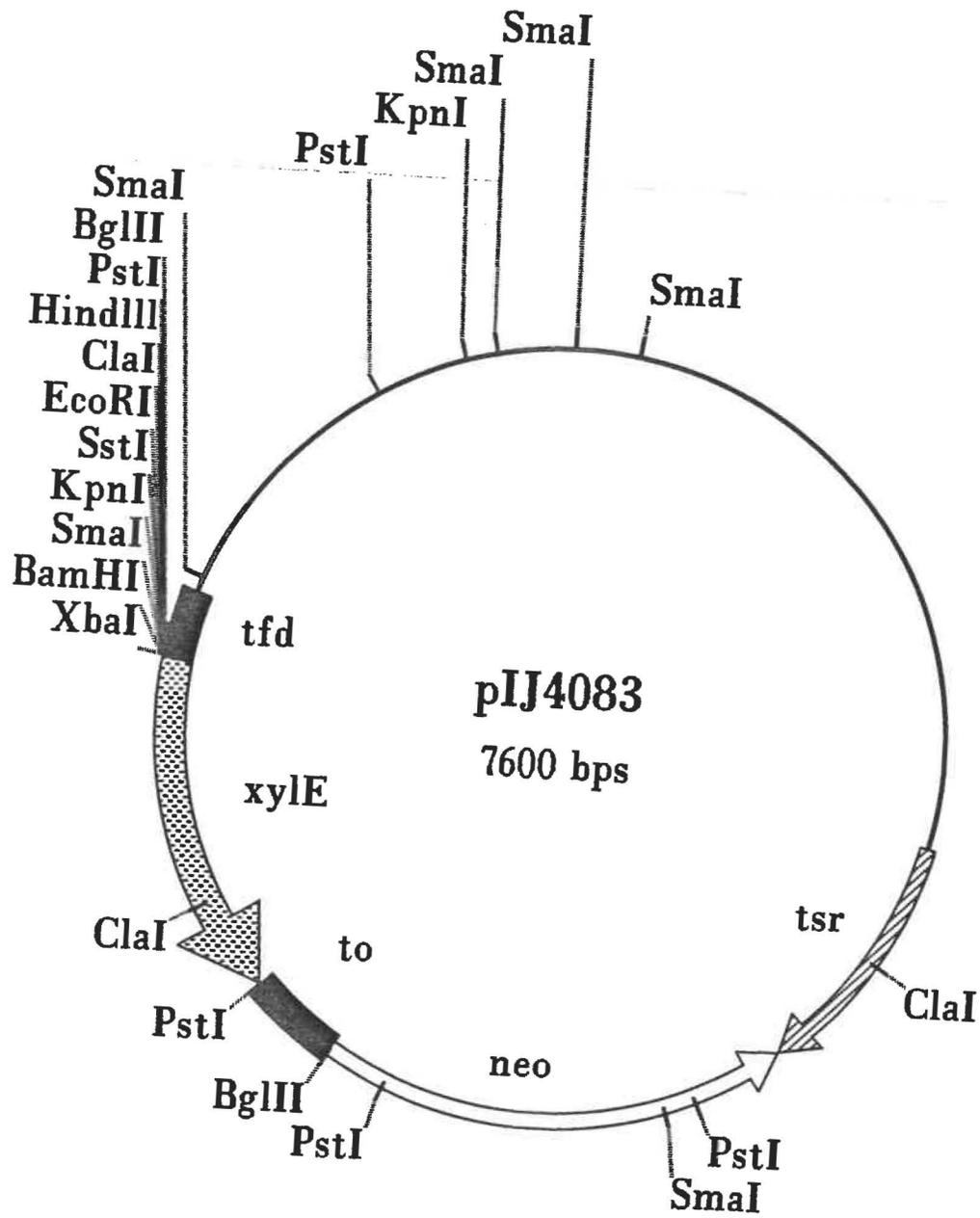


5.1.2.2 "Sondes à promoteur" à nombre de copie multiple

Les "sondes à promoteur" à nombre de copie multiple sont des vecteurs de fusion, qui génèrent plusieurs copies du plasmide par chromosome. Parmi elles, on peut citer les dérivés de pIJ101, tels les plasmides pIJ424 et pIJ425, avec environ 40 à 300 copies par chromosome (Kieser *et al.*, 1982). Ces plasmides dérivés, contiennent le gène aminoglycoside phosphotransférase du transposon Tn5. Ici, le fragment actif du promoteur est identifié grâce à la résistance à la kanamycine chez les transformants de *S. lividans*. Le plasmide pIJ4083 (Fig. 6), avec environ 100 à 200 copies par chromosome (Clayton et Bibb, 1990), est un plasmide dérivé de pIJ487 (Ward *et al.*, 1986), qui lui aussi provient de pIJ101. pIJ4083 comprend les gènes *tsr*, pour la résistance au thiostrepton; *néo*, pour la résistance à la néomycine et à la kanamycine; une cassette du gène *xylE*, située en amont du terminateur de transcription λ_{ω} et en aval d'un site de clonage multiple. Un codon "arrêt" se trouve dans la région entre le site de clonage *BamHI* et le codon de départ de *xylE*, pour empêcher la formation de protéines de fusion du gène *xylE*. Un terminateur de transcription du phage fd (*tfd*) est situé en amont du site de clonage multiple, pour prévenir une éventuelle transcription à travers le terminateur de transcription, à partir d'un promoteur quelconque situé sur le vecteur. Cependant, l'utilisation des "sondes à promoteur" à haut nombre de copie, pour tester l'activité des promoteurs, peut parfois conduire à des conclusions erronées. Ceci s'explique par diverses raisons:

1. Un gène peut être positivement contrôlé, à cause de son amplification par

FIGURE 6 : Carte de restriction du plasmide pIJ4083.



le plasmide à haut nombre de copie qui le porte.

2. La présence d'un faible niveau résiduel de l'expression du gène, pouvant être due à une transcription à travers un terminateur de transcription, à partir d'un promoteur situé sur le vecteur (Stragier *et al.*, 1983).

3. Dans les systèmes contrôlés positivement, une titration de l'activateur, lorsque le site de fixation de ce dernier est présent en nombre de copie multiple, peut conduire à une diminution de l'expression des gènes chromosomaux contrôlés par cet activateur (Banner *et al.*, 1983).

4. Dans les systèmes contrôlés négativement, la présence de l'opérateur en nombre de copie multiple, peut aussi conduire à une titration du répresseur, occasionnant une dérèpression des gènes chromosomaux contrôlés par ce répresseur (Sadler *et al.*, 1977).

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Les objectifs assignés à la réalisation de ce projet de maîtrise étaient:

. Étudier et analyser les régions promotrices des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* de *Streptomyces lividans* en utilisant le gène *xylE* de *P. putida* comme gène rapporteur.

. Après localisation et identification des différents promoteurs des gènes *xlnA*, *xlnB*, et *xlnC*, déterminer l'activité de la C230 du gène *xylE* en milieux minimaux (solide et liquide), supplémentés avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

LISTE DES PRODUITS

Acétate de sodium (Fisher)
Acide maléique (BDH)
Agar (Difco)
Agarose (BioRad)
Albumine sérique bovine (Sigma)
Ampicilline (Boehringer Mannheim)
Bleu de bromophénol (BDH)
Bromure d'éthidium (Boehringer Mannheim)
CaCl₂ anhydre (BDH)
Catéchol (USB)
Chloroforme (ACS)
CsCl (BRL)
CuSO₄ (J. T. Baker)
D-Glucose anhydre (ACS)
EDTA (Fisher)
Extrait de boeuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Extrait de malt (Difco)
FeCl₃.7H₂O (J. T. Baker)
Glycérol (BDH)
Hydroxyquinoline (ACS)
KH₂PO₄ (J. T. Baker)
K₂HPO₄ (J. T. Baker)

K₂SO₄ (J. T. Baker)
Lait écrémé (Difco)
Maltose (Difco)
MgCl₂.H₂O (J. T. Baker)
MgSO₄.7 H₂O (J. T. Baker)
MnCl₂ (J. T. Baker)
NaCl (BDH)
Na₂HPO₄.7H₂O (J. T. Baker)
NaH₂PO₄.H₂O (J. T. Baker)
NaOH (J. T. Baker)
(NH₄)₂SO₄ (J. T. Baker)
NZ Amine A (Sheffield Products)
PEG 1500 (Boehringer Mannheim)
PEG 8000 (BDH)
Peptone (Difco)
SDS (BioRad)
Simmons citrate (Difco)
Thiostrepton (Squibb Ltée)
Tryptone (Difco)
TRIS (Boehringer Mannheim)
Triton X-100 (BioRad)
Xylane de bouleau (Sigma)
ZnSO₄ (J. T. Baker)

1.0 Souches bactériennes et plasmides utilisés

Dans la présente étude, les souches bactériennes ainsi que les plasmides utilisés sont représentés respectivement dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1. Souches bactériennes utilisées

Souches	Génotype	Référence
<i>S. lividans</i> 66	souche sauvage	D.A. Hopwood
<i>S. lividans</i> 10-164	<i>xln⁻ cel</i>	Kluepfel et al. (1986)
<i>E. coli</i> DH1	F ⁻ <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44, relA1?</i>	BRL
<i>E. coli</i> NM522	<i>supE thi hsd^Δ5</i> <i>Δ(lac-proAB)</i> F' (<i>proAi3 lacI^F</i> <i>lacZ^ΔM15</i>)	Pharmacia

Tableau 2. Plasmides utilisés

Plasmides	Génotype	Référence
pIJ4083	<i>tsr^r néo^r t_o tfd xylE</i>	Clayton et Bibb (1990)
pXE4	<i>tsr^r bla t_o tfd</i> <i>xylE SCP2rep\st ori</i>	Ingram et al. (1989)
pXE3	<i>tsr^r bla t_o tfd</i> <i>xylE SCP2rep\st ori galP1</i>	Ingram et al. (1989)
pSL1180	<i>lacI ori Amp^r</i>	Pharmacia
pSL1190	M13 <i>ori lacZ MCS</i>	
pIAF251	<i>xlnA\SphI-BglII</i> dans pSL1180	ce travail
pIAF252	<i>xlnA\SphI-BglII</i> de pIAF251 mis dans pIJ4083	
pIAF253	<i>xlnA\BglII-NotI</i> dans pSL1190	ce travail
pIAF254	<i>xlnA\BglII-NotI</i> de pIAF253 mis dans pIJ4083	ce travail
pIAF255	<i>xlnA\SphI-NotI</i> dans pSL1190	ce travail
pIAF256	<i>xlnA\SphI-NotI</i> de pIAF255 mis dans pIJ4083	ce travail
pIAF257	<i>xlnA\SphI-PstI</i> dans pSL1190	ce travail
pIAF258	<i>xlnA\SphI-PstI</i> de pIAF257 mis dans pIJ4083	ce travail

Tableau 2 (suite)

Plasmides	Génotype	Référence
pIAF259	<i>xlnB</i> \BclI dans pIJ4083	ce travail
pIAF260	<i>xlnC</i> \PstI-SphI dans pSL1180	ce travail
pIAF261	<i>xlnC</i> \PstI-SphI de pIAF260 mis dans pIJ4083	ce travail
pIAF262	<i>xlnC</i> \PstI-SphI de pIAF261 mis dans pXE4	ce travail

pIJ4083 (Fig. 6) (Clayton et Bibb, 1990), est une "sonde à promoteur", à nombre de copie multiple (100-200 copies par chromosome). Il porte le gène *xylE* de *P. putida* comme gène rapporteur, ce qui permet de tester l'activité des différents promoteurs placés en amont de celui-ci. pXE4 (Fig. 5) et pXE3 (Fig. 7) (Ingram *et al.*, 1989) sont des plasmides à nombre de copie unique. Le plasmide pXE4 comme pIJ4083, permet de tester l'activité des promoteurs grâce au gène *xylE*, tandis que pXE3 constitue un contrôle où *xylE* est transcrit par le promoteur *galP1*. Les plasmides pSL1180/1190 (Fig. 8) (Brosius, 1989) ont un nombre de copies multiples. Ces deux vecteurs possèdent un site de clonage multiple permettant d'ajouter de nouveaux sites de restriction aux extrémités du fragment d'ADN à cloner.

FIGURE 7 : Carte de restriction du plasmide pXE3.

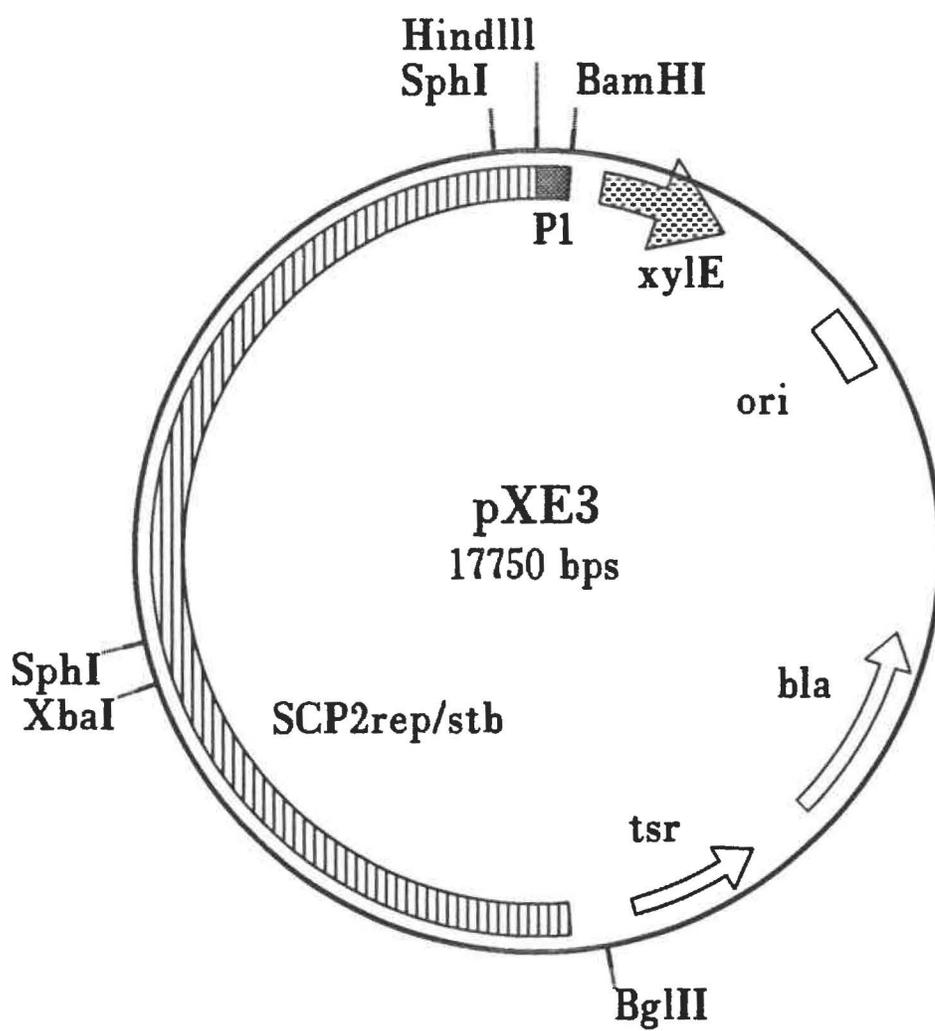


FIGURE 8 : Cartes de restriction des plasmides pSL1180 et pSL1190.

2.0 Milieux de culture et conservation des souches

2.1 Milieux solides pour les streptomycètes

2.1.1 Milieu pour la régénération des protoplastes

Les protoplastes sont régénérés en milieu R₃ (Hopwood *et al.*, 1985). Ce milieu comprend:

Sucrose	515 g
K ₂ S ₀ ₄	1,25 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	50,6 g
Glucose	50 g
Difco Casaminoacide	0,5 g
Solution d'éléments traces	10 mL (Hopwood <i>et al.</i> , 1985)
Extrait de levure	25 g
Tampon TES	28,65 g
Agar	110 g

Le mélange est complété avec de l'eau distillée pour un volume total de 4700 mL. Après stérilisation, on ajoute 250 mL des solutions stériles suivantes:

KH ₂ PO ₄ (0,5%)	50 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (5M)	20 mL
CuSO ₄ (5mg/mL)	5 mL
L-proline (20%)	75 mL
Méthionine (1%)	50 mL

Tyrosine (2 g dissout
dans 25 mL de NaOH 1N) 25 mL

On répartit ensuite les 5 litres du volume final du milieu à raison de 20 mL par Pétri. Les Pétris sont séchés à la température de la pièce pendant 5 jours, jusqu'à une perte de 15% de leur poids initial.

2.1.1.1 Sélection des transformants pour la résistance au thiostrepton

Après régénération des protoplastes sur milieu R₅ (section 2.1.1), les transformants sont sélectionnés pour la résistance au thiostrepton après étalement sur chaque Pétri de 1 mL d'eau distillée stérile contenant 10 µl de thiostrepton (50 mg/mL) afin d'obtenir une concentration finale de 500 µg/mL.

2.1.2 Milieu de croissance

La croissance des souches de streptomycètes se fait sur Pétri en milieu solide Bennett (Jones, 1949). La composition de ce milieu est la suivante:

Extrait de levure	1 g
Extrait de boeuf	1 g
N.Z. amine A	2 g
Maltose.	10 g

Le pH est ajusté à 7,2 puis 22 g d'agar sont ajoutés au mélange. Le volume final est complété à 1 litre. Après stérilisation pendant 20 min.

à 121°C du thiostrepton (50 mg/mL, dissout dans du DMSO) est ajouté au milieu à une concentration finale de 50 µg/mL.

2.1.3 Milieu utilisé pour l'essai semi quantitatif de l'activité enzymatique de la C230

Pour l'essai semi quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 sur Pétri, les transformants de streptomycètes sélectionnés en milieu solide Bennett + tsr sont repiqués sur milieu minimum modifié " MBSM " (Brawner *et al.* , 1985), supplémenté avec 1% de glucose (p/v), 1% de xylane (p/v) ou 1% de xylose (p/v). Un litre du milieu contient:

(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g
K ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaCl	2 g
Agar	20 g

Dans le but de prévenir la formation de précipité, les composés suivants sont ajoutés stérilement après autoclavage:

CaCl ₂ (0,02%)	400 µl de 50%
MgCl ₂ (0,05%)	1 mL de 50%
FeCl ₃ .7H ₂ O (0,0002%)	4 µl de 50%

Du thiostrepton (50 mg/mL) est ajouté à une concentration finale de 10 µg/mL.

2.2 Milieux liquides pour les streptomycètes

2.2.1 Milieu de croissance

La croissance des souches de streptomycètes se fait en milieu liquide YEME (Hopwood *et al.*, 1985). Un litre du milieu YEME comprend:

Extrait de levure	3 g
Bacto-peptone	5 g
Extrait de malt	3 g
Glucose	10 g
Sucrose	340 g

Avant de stériliser, on répartit 25 mL du milieu dans des Erlenmeyers de 125 mL. Après stérilisation, on ajoute 50 μ l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2,5 M) plus 2,5 μ l de thioestrepton (50 mg/mL). Le mycélium obtenu peut servir d'inoculum pour faire pousser d'autres cultures ou être utilisé pour isoler de l'ADN plasmidique. Le mycélium peut se conserver à $-20^\circ C$ pour une période prolongée, après suspension dans une solution de 10% de glycérol (v/v) (Hopwood *et al.*, 1985).

2.2.2 Milieu utilisé pour l'essai quantitatif de l'activité de la C230

L'essai quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 se fait en milieu liquide avec des cultures de streptomycètes ayant poussé dans un milieu SLAB (Fornwald *et al.*, 1987), supplémenté avec 1% (p/v) de la

source de carbone utilisée, 10% de polyéthylène glycol 8000 (p/v), du thiostrepton (10 µg/mL). Un litre de milieu SLAB contient:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g	
L-asparagine	2 g	
K ₂ HPO ₄	9 g	
NaH ₂ PO ₄	1 g	
Extrait de levure	2 g	
Solution d'éléments traces	2 mL	(Hopwood <i>et al.</i> , 1978)
Polyéthylène glycol 8000	10 g	

Avant d'autoclaver, on répartit 50 mL du milieu dans des Erlenmeyers de 250 mL. Après stérilisation, au moment d'utiliser, chaque 50 mL du milieu est supplémenté avec les éléments suivants:

MgCl ₂ (0,05%)	50 µl de 50%
CaCl ₂ (0,001%)	10 µl de 5%
Source de carbone	500 µl de 50%
thiostrepton (10 µg/mL)	10 µl de la concentration (50 mg/mL)

L'activité de la C230 a été dosée selon la méthode de Ingram *et al.* (1989). Une milliunité correspond à la formation d'une nanomole de la semialdéhyde de l'acide 2-hydroxymuconique, par minute, à 30°C (Zukowski *et al.*, 1983). Le coefficient d'extinction molaire à 375 nm de la semialdéhyde de l'acide 2-hydroxymuconique est $3,3 \times 10^4$ moles/litre (Sala-Trepat et Evans, 1971).

La formule utilisée pour calculer l'activité de la C230 est:

$$\text{Activité (mU/mg)} = \frac{(\Delta D.O^{375}/\text{min.}) \times (10^9 \text{ nM/M})}{(3,3 \times 10^4 \text{ M}) \times (\text{mg protéines})}$$

2.3 Conservation des souches de streptomycètes

Les souches de streptomycètes sont conservées sous forme de spores à 4°C sur milieu solide Bennett + tsr, pendant une courte période.

Pour une période de conservation prolongée, les spores sont maintenues à -20°C, après suspension dans une solution de 20% de glycérol (v/v) (Hopwood et al., 1985) ou lyophilisées dans un appareil «Virtis Quick Seal» (Virtis, Gardiner, N.Y.), après suspension dans une solution de lait écrémé à 10 % (p/v).

2.4 Milieu solide pour *E. coli*

2.4.1 Milieu de croissance

La croissance des souches d' *E. coli* se fait en milieu solide "2xYT" + ampicilline. Ce milieu comprend:

Extrait de levure	10 g
Tryptone	16 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

Après autoclavage, de l'ampicilline est ajouté à une concentration finale de 50 $\mu\text{g/mL}$, de manière stérile.

2.5 Milieu liquide pour *E. coli*

2.5.1 Milieu de croissance

La croissance des souches d' *E. coli* se fait en milieu liquide "2xYT", de même composition que celui utilisé en milieu solide (section 2.4.1), mais sans agar.

2.6 Conservation des souches d'*E. coli*

Les souches DH1 et NM522 d' *E. coli* sont conservées pendant une courte période à 4°C sur milieu solide Simmons Citrate (Difco) supplémenté avec 0,4% (p/v) de glucose et 0,01% (p/v) de thiamine. Pour une période de conservation prolongée, les souches sont maintenues à -70°C, après suspension dans 1 mL de glycérol 15% (v/v) (Maniatis et al., 1982).

3.0 Extraction de l'ADN plasmidique

3.1 Microextraction

3.1.1. Chez les streptomycètes

3.1.1.1 Solutions utilisées

Tampon I:	sucrose	10,3%	Solution II:	NaOH	0,3 M
	Tris	25 mM		SDS	2%
	EDTA	25 mM			
	pH	8,0			

Solution III:	Phénol Analar	5 g
	Chloroforme	5 mL
	Eau distillée	1 mL
	Hydroxyquinoline	5 mg

3.1.1.2 Méthode

C'est l'extraction en petite quantité de l'ADN plasmidique par la méthode de la lyse alcaline (Hopwood *et al.*, 1985). La méthode est facile et rapide. Chez les streptomycètes, la microextraction se fait dans un microtube contenant 500 μ l de culture de mycélium obtenue après croissance en milieu liquide YEME+tsr (section 2.2.1). Après homogénéisation, les cellules sont centrifugées environ 10 sec., puis lavées avec 500 μ l de tampon I sans lysozyme. Pour lyser la paroi cellulaire, les cellules sont incubées pendant 30 min. à 37°C dans un volume de 400 μ l de tampon I contenant 2 mg/mL de lysozyme. On ajoute ensuite par échantillon 250 μ l de la solution II en mélangeant immédiatement environ 10 sec., le tout est incubé pendant 15 min. à 55°C (pour les plasmides de taille supérieure à 20 kb) ou à 70°C (pour les plasmides de taille inférieure à 20 kb) et refroidi lentement (environ 30 min.) à la température de la pièce. A ce stade, l'ADN chromosomique se dénature, tandis que l'ADN plasmidique, plus petit, se

renature plus facilement avec le refroidissement. On ajoute 80 μ l de la solution III en vortexant environ 10 sec., ce qui provoque une baisse du pH dans le milieu et facilite la renaturation de l'ADN plasmidique, en même temps, l'ADN chromosomique simple brin ainsi que les protéines sont précipités. Après centrifugation, l'ADN plasmidique est précipité en transférant 700 μ l du surnageant dans un tube propre où on ajoute 70 μ l de NaAc 3M plus 700 μ l d'isopropanol. Le tout est incubé pendant 5 min. à la température de la pièce. Le culot est repris dans 50 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0), en utilisant 5 μ l de NaAc 3M et 25 μ l de phénol neutre (phénol équilibré d'abord avec 0,5 vol. de Tris 1 M (pH 8,8), ensuite avec 0,5 vol. de Tris 0,1 M (pH 8)). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité avec 50 μ l d'isopropanol à la température de la pièce pendant 10 min.. Après centrifugation, le culot est dissout dans 50 μ l de tampon TE.

3.1.2 Chez *E. coli*

Une portion de cellules ayant poussé sur Pétri en milieu solide "2xYT"+ ampicilline (section 2.4.1) est ramenée dans un microtube contenant 500 μ l d'eau distillée, à l'aide d'un cure dent. La culture est alors homogénéisée, ensuite centrifugée. Après centrifugation, le plasmide est isolé du culot par microextraction, selon la méthode de la lyse alcaline (Pharmacia).

3.2 Extraction à grande échelle chez les streptomycètes

C'est l'extraction à grande échelle de l'ADN plasmidique selon la méthode de la lyse alcaline (Hopwood et al., 1985). Elle se fait avec 500 mL de culture de mycélium, après croissance en milieu liquide YEME+tsr (section 2.2.1). Grâce à cette méthode, on peut isoler de l'ADN plasmidique en quantité suffisante, permettant ainsi de procéder aux différentes manipulations (digestions enzymatiques, sous-clonages etc.)

3.3 Purification de l'ADN plasmidique sur gradient isopycnique de chlorure de césium

L'ADN plasmidique obtenu à partir de l'extraction à grande échelle par la méthode de la lyse alcaline est purifié sur gradient isopycnique de chlorure de césium (Maniatis et al., 1982). Grâce à cette méthode, on obtient de l'ADN plasmidique pur débarrassé de l'ADN chromosomique et de l'ARN.

4.0 Analyse de l'ADN

4.1 Digestion enzymatique

Pour effectuer la digestion enzymatique de l'ADN plasmidique, on ajoute dans un microtube les éléments suivants:

ADN	1 μ g dans x μ l de TE
One Phor All Buffer	x μ l (selon le type d'enzyme)
10 X (Pharmacia)	

4.3 Sous-clonage de l'ADN

4.3.1 Méthode

Après digestion enzymatique de l'ADN plasmidique, on le fait migrer sur gel d'agarose (0,7%) dans un tampon TAE. Les fragments à cloner sont ensuite récupérés du gel d'agrose par élution (Pharmacia). La ligation se fait en mélangeant dans un tube Eppendorf les éléments suivants:

Vecteur:	1 μ g dans x μ l de TE
Insert	environ 1 μ g dans x μ l de TE
One Phor All Buffer	2 μ l
10X Pharmacia	
ATP (10 mM)	2 μ l
T ₄ ligase	0,05 à 0,1 unités
Eau distillée	x μ l qui complète le volume final de la solution de ligation à 20 μ l

L'ensemble est incubé à 12°C pour une durée allant de 3 à 16 h.

5.0 Transformations

5.1 Transformation des protoplastes de *S. lividans* 10-164

5.1.2 Solutions utilisées

PEG 1500 (25%):	PEG 1500 (50%)	4 mL
	Tampon de transformation	4 mL

Tampon de transformation:	Tris Maleic 1M	0,25 mL
	CaCl ₂ 0,5M	0,1 mL
	Tampon T	4,6 mL

Tampon T:	Sucrose (10,3%)	25 mL
	Eau distillée	75 mL
	Solution d'éléments traces	0,2 mL
	K ₂ SO ₄ (2,5%)	1 mL

5.1.3 Méthode

Des protoplastes de *S. lividans* 10-164 préparés au préalable et conservés en aliquots (Hopwood *et al.*, 1985), sont décongelés à la température de la pièce. La transformation des protoplastes est effectuée en additionnant dans un microtube les éléments suivants:

Protoplastes	50 µl
ADN	environ 40 ng dans x µl de TE
PEG 1500 (25%)	200 µl

On étale séparément sur Pétris en milieu R₅ (section 2.1.1) 100 µl et 150 µl de la préparation de transformation. Après 16 heures d'incubation, les protoplastes sont régénérés et les transformants sont sélectionnés pour la résistance au thiostrepton (section 2.1.1.1).

5.2 Transformation des cellules compétentes d' *E. coli*

5.2.1 Solutions utilisées

Tampons:	CM1:	NaOAc	10 mM
		MnCl ₂	50 mM
		NaCl	5 mM
		pH	5,6
	CM2:	NaOAc	10 mM
		CaCl ₂	70 mM
		MnCl ₂	5 mM
		Glycérol	5 %
		pH	5,6

Les solutions utilisées ont été d'abord stérilisées par filtration.

5.2.2 Méthode

Pour la préparation des cellules compétentes de *E. coli*, on ensemence d'abord 5 mL du milieu liquide "2xYT" (section 2.5.1) avec la souche à transformer (DH1 ou NM522). Le tout est incubé à 37°C pendant 18 heures avec agitation. Une portion de cette culture (0,5 mL), est utilisée pour ensemencer 50 mL du milieu "2xYT". Ensuite, on incube cette deuxième culture à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité de 0,5 à 660 nm. La culture est centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min. et le culot est ensuite suspendu dans 10 mL de tampon CM1 (maintenu au froid) et incubé sur glace pendant 20 min. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon CM2 (maintenu au froid) et incubé sur glace pendant 20 min. Une fois les cellules compétentes prêtes, elles sont transformées sur glace, en additionnant dans un tube Falcon les éléments suivants:

Cellules compétentes	300 µl
ADN	environ 2 à 200 ng dans x µl de TE

La préparation de transformation est incubée pendant 40 min. sur glace, ensuite, on fait subir aux cellules un choc thermique en les incubant à 42°C pendant 2 min. Cette étape permet de mieux faire pénétrer l'ADN dans la cellule. Après avoir remis les cellules sur glace, on ajoute 1 mL de milieu "2xYT". Le tout est incubé pendant 30 min. à 37°C pour l'expression phénotypique. Ensuite, on étale sur Pétris en milieu solide "2xYT" + ampicilline (section 2.5.1) environ 100 à 200 µl de la culture de transformation. Les Pétris sont alors mis en incubation à 37°C pendant 16 heures.

6.0 Détection de l'activité enzymatique de la C230

6.1 Essai semi quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 en milieu solide

L'essai semi quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 se fait par simple visualisation sur Pétris. Les "sondes à promoteur", pIJ4083 (Fig. 5) et pXE4 (Fig. 7), portent le gène *xylE* de *P. putida* sans promoteur. Le gène *xylE* code pour une enzyme, la catéchol dioxygénase, qui convertit le catéchol incolore en un composé jaune intense 2-hydroxy muconique semialdéhyde (Zukowski *et al.*, 1983). Les transformants sont sélectionnés sur milieu minimum Bennett + tsr après incubation de deux jours à 34°C. Pour détecter l'activité enzymatique de la C230, les Pétris sont vaporisés avec une solution aqueuse de 0.5 M de catéchol.

6.2 Essai quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 en milieu liquide "SLAB"

6.2.1 Solutions utilisées

Tampon d'échantillon:	Phosphate de potassium (pH 7,5)	100 mM
	EDTA	20 mM
	Acétone	10%

Tampon d'essai:	Phosphate de potassium (pH 7,5)	100 mM
	Catéchol	0,2 mM

6.2.2 Méthode

L'activité enzymatique de la C230 des colonies jaunes de streptomycètes (clones positifs), testée par simple visualisation sur Pétri (section 6.1) en milieu solide Bennett + tsr, est ensuite quantifiée en milieu liquide "SLAB" + tsr (section 2.2.2). Le dosage quantitatif de l'activité enzymatique de la C230 en milieu liquide "SLAB" procède comme suit: après répartition de 50 mL de milieu "SLAB" + tsr dans des Erlenmeyers de 250 mL, le milieu est inoculé avec des colonies jaunes (clones positifs). L'activité enzymatique des colonies jaunes est d'abord testée sur milieu minimum Bennett + tsr et sur milieu minimum modifié "MBSM" + tsr (section 6.1), supplémenté avec la source de carbone à utiliser. On fait pousser les cultures à 34°C pour une période de 28 heures avec agitation à 200 rpm. Les cultures sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 5 mL de milieu "SLAB". On ajoute une portion de cette suspension cellulaire (environ 2 mL) au milieu "SLAB" supplémenté avec la source de carbone

à utiliser et on incube pendant 2 heures à 34°C. Le culot de culture obtenu après centrifugation est d'abord lavé dans un tampon de phosphate de potassium 20 mM (pH 7,2), ensuite resuspendu dans un volume final de 3 mL de tampon d'échantillon. Les cellules sont lysées par sonification pendant une min. avec ajout de 10 µl de 10% (v/v) de Triton X-100/mL. L'extrait cellulaire est incubé sur glace pour une durée de 15 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 5 min. dans un microcentrifuge (model Brinkmann 5415) à 4°C. L'activité enzymatique de la C230 est déterminée par spectrophotométrie (Zukowski *et al.*, 1983). La solution de réaction est composée du tampon d'essai plus une portion de l'extrait cellulaire. Les deux sont ajustés de manière à obtenir une courbe linéaire. Le tampon d'essai est incubé pendant une min. à 37°C et la réaction est initiée par addition de l'extrait cellulaire. La lecture de la densité optique est effectuée par intervalles de temps réguliers (2, 4, 6, 8, 10 min.). L'activité enzymatique de la C230 est mesurée à une DO = 375 nm et convertie en µ/mg de protéine. Les concentrations de protéines sont déterminées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) avec l'albumine bovine sérique comme protéine standard.

RÉSULTATS

1.0 Constructions plasmidiques des promoteurs de *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, fusionnés avec le gène *xylE* dans les plasmides pIJ4083 et pXE4

1.1 Utilisation du "sonde à promoteur", pIJ4083 (copie multiple), pour la fusion des promoteurs de *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, avec le gène *xylE*

1.1.1 Promoteurs de *xlnA*

1.1.1.1 Construction de pIAF251

Le plasmide pIAF18 (Fig. 9) a été utilisé pour la construction du plasmide pIAF251 (Fig. 10). Pour cela, le fragment *SphI-BglIII* (700 pb) a été récupéré du plasmide pIAF18 par digestion avec les enzymes de restriction *SphI* et *BglIII*. On a ligué ce fragment avec les extrémités compatibles du fragment pSL1180/*SphI-BglIII* (3422 pb). Le fragment pSL1180/*SphI-BglIII* contient le gène *lacI*, l'origine de réplication colE1 d' *E. coli*, le gène de résistance à l'ampicilline *Amp^r*, l'origine de réplication du phage M13, une partie du gène de la β -galactosidase *lacZ'* d' *E. coli*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF251 (4100 pb), a été utilisée pour transformer la souche *E. coli* NM522.

1.1.1.2 Construction de pIAF252

La construction du plasmide pIAF251 (section 1.1.1.1) nous a permis d'ajouter de nouveaux sites de restriction, *HindIII* et *BamHI*, aux

extrémités du fragment *SphI-BglIII*, en vue de le sous-cloner dans pIJ4083. Après digestion enzymatique de pIAF251 avec les enzymes de restriction *HindIII* et *BamHI*, on a récupéré le fragment, augmenté des deux bouts avec les sites de restriction *HindIII* et *BamHI*. Ce fragment a été ligué avec les extrémités compatibles de pIJ4083/*HindIII-BamHI* (7600 pb), obtenu par digestion du plasmide pIJ4083 (Fig. 6) au niveau des sites uniques de restriction *HindIII* et *BamHI* (situés dans le SCM) avec les enzymes correspondantes. Le fragment pIJ4083/*HindIII-BamHI* contient les gènes *tsr*, pour la résistance au thiostrepton, *neo* (sans promoteur), pour la résistance à la néomycine et à la kanamycine, *xylE*, λt_0 et *tfd*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF252 (8514 pb) (Fig. 11), dans lequel l'insert possède la même orientation que le gène *xylE*, a été utilisée pour transformer la souche *S. lividans* 10-164.

1.1.1.3 Construction de pIAF253

Le plasmide pIAF253 (Fig. 12) a été construit à partir du fragment *BglIII-NotI* (400 pb), récupéré du plasmide pIAF18, par digestion avec les enzymes de restriction *BglIII* et *NotI*. Ce fragment a été ligué avec les extrémités compatibles du fragment pSL1190/*BglIII-NotI* (3422 pb). Ce dernier provient du phagemide pSL1190 (3442 pb) (Fig. 8), digéré au niveau des sites uniques de restriction *BglIII* et *NotI* (situés dans le SCM) avec les enzymes de restriction *BglIII* et *NotI*. Le fragment pSL1190/*BglIII-NotI* contient les gènes *lacI*, *Amp^r ori*, *M13ori*, *lacZ*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF253 (3800 pb), a été utilisée pour

transformer la souche *E. coli* NM522.

1.1.1.4 Construction de pIAF254

Le plasmide pIAF254 (Fig. 13) a été construit à partir de pIAF253 (section 1.1.1.3). Après digestion enzymatique du plasmide pIAF253 avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *SacI*, le fragment *BglII-NotI* a été augmenté des deux côtés avec les sites *EcoRI* et *SacI*. Ce fragment été ensuite ligué avec les extrémités compatibles du fragment pIJ4083/*EcoRI-SacI* (7600 pb), en provenance du plasmide pIJ4083. Le fragment pIJ4083/*EcoRI-SacI* contient les gènes *tsr*, *néo*, *λt_o*, *xylE*, *tfd*. Après ligation, la nouvelle construction plasmidique, pIAF254 (8000 pb), dans laquelle l'insert *BglII-NotI* possède la même orientation que le gène *xylE*, a été utilisée pour transformer la souche *S. lividans* 10-164.

1.1.1.5 Construction de pIAF255

Pour construire le plasmide pIAF255 (Fig. 14), le fragment *SphI-NotI* (1100 pb), en provenance de pIAF18, a été ligué avec les extrémités compatibles du fragment pSL1190/*SphI-NotI* (3422 pb). Ce dernier a été obtenu à partir de la digestion du phagemide pSL1190 (3422 pb) au niveau des sites uniques de restriction (situés dans le SCM) avec les enzymes *SphI* et *NotI*. Le fragment pSL1190/*SphI-NotI* contient les gènes *lacI*, *Amp^r*, *ori*, *M13ori*, *lacZ*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF255 (4500 pb), a été utilisée pour transformer la souche *E. coli* NM522.

1.1.1.6 Construction de pIAF256

Le plasmide pIAF255 (section 1.1.1.5) a servi à la construction de pIAF256 (Fig. 15). Après digestion enzymatique de pIAF255 avec les enzymes *EcoRI* et *SacI*, on a récupéré le fragment *SphI-NotI* (1100 pb), augmenté des deux côtés avec les sites *EcoRI* et *SacI*. Ensuite, ce fragment a été ligué avec les extrémités compatibles du fragment pIJ4083/*EcoRI-SacI*, obtenu à partir du plasmide pIJ4083, digéré au niveau des sites uniques de restriction *EcoRI* et *SacI* (situés dans le SCM) avec les enzymes correspondantes. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF256 (8700 pb), dans laquelle l'insert possède la même orientation que *xylE*, a été utilisée pour transformer la souche d' *E. coli* NM522.

1.1.1.7 Construction de pIAF257

Pour construire le plasmide pIAF257 (Fig. 16), le fragment *SphI-PstI* (1700 pb), récupéré de pIAF18 (Fig. 9) par digestion enzymatique au niveau des sites de restriction *SphI* et *PstI*, a été d'abord ligué avec les extrémités compatibles du fragment pSL1190/*SphI-PstI* (3422 pb). Ce dernier a été obtenu à partir de la digestion du phagemide pSL1190, au niveau des sites uniques de restriction (situés dans le SCM) avec les enzymes *SphI* et *PstI*. Le fragment pSL1190/*SphI-PstI* contient les gènes *lacI*, *Amp^r*, *ori*, *M13ori*, *lacZ'*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF257 (5100 pb), a été utilisée pour transformer la souche *E. coli* NM522.

1.1.1.8 Construction de pIAF258

Le plasmide pIAF257 (section 1.1.1.7) a servi à la construction de pIAF258 (Fig. 17). Après digestion enzymatique de pIAF257 avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *SacI*, on a récupéré le fragment *SphI-PstI*, augmenté des deux côtés avec les sites de restriction *EcoRI* et *SacI*. Ce fragment a été ligué avec les extrémités compatibles du fragment pIJ4083/*EcoRI-SacI* (7600 pb), lui-même digéré au niveau des sites uniques de restriction *EcoRI* et *SacI* (situés dans le SCM). Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF258 (9200 pb), dans laquelle l'insert *SphI-PstI* possède la même orientation que *xylE*, a été utilisée pour transformer la souche *S. lividans* 10-164.

1.1.2 Promoteur de *xlnB*

1.1.2.1 Construction de pIAF259

Pour construire le plasmide pIAF259 (Fig. 18), le fragment *BclI* (1000 pb), a été d'abord récupéré de pIAF42 (Fig. 9) par digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction *BclI*. Après linéarisation du plasmide pIJ4083, digéré avec l'enzyme *BamHI* au niveau du site de restriction unique *BamHI* (situé dans le SCM), les deux fragments aux extrémités compatibles ont été ligués ensemble. Le fragment pIJ4083/*BclI* (7600 pb), contient les gènes *tsr*, *néo*, λt_0 , *xylE*, *tfd*. La construction plasmidique obtenue, pIAF259 (8600 pb), dans laquelle l'insert possède la même orientation que *xylE*, a été utilisée pour transformer la souche *S.*

lividans 10-164.

1.1.3 Promoteur de *xlnC*

1.1.3.1 Construction de pIAF260

Pour la construction du clone pIAF260 (Fig. 19), le fragment *PstI-SphI* (350 pb), a été d'abord récupéré du plasmide pIAF20 (Fig. 9) par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction *PstI* et *SphI*. Ensuite, ce fragment a été ligué avec les extrémités compatibles de pSL1180/*PstI-SphI*, généré à partir de la digestion du phagemide pSL1180 (Fig. 8) au niveau des sites uniques de restriction (situés dans le SCM) avec les enzymes *PstI* et *SphI*. Le fragment pSL1180/*PstI-SphI* contient les gènes *lacI*, *Amp^r*, *ori*, *M13ori*, *lacZ'*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF260 (3750 pb), a été utilisée pour transformer la souche *E. coli* NM522.

1.1.3.2 Construction de pIAF261

Le plasmide pIAF260 (section 1.1.3.1) a été utilisé pour construire pIAF261 (Fig. 20). Après digestion enzymatique de pIAF260 avec les enzymes de restriction *HindIII* et *BamHI*, on a récupéré le fragment *PstI-SphI*, augmenté des deux bouts avec les sites *HindIII* et *BamHI*. Ce fragment a été ligué avec les extrémités compatibles de pIJ4083/*HindIII-BamHI*. Après ligation, la nouvelle construction, pIAF261 (8170 pb), dans laquelle l'insert possède la même orientation que *xylE*, a été utilisée pour

transformer la souche *S. lividans* 10-164.

1.2 Construction plasmidique du promoteur de *xlnC*, fusionné avec le gène *xylE* dans le plasmide à copie unique, pXE4

1.2.1 Construction de pIAF262

On a construit le plasmide pIAF262 (Fig. 21), en récupérant d'abord le fragment *PstI-SphI* du plasmide pIAF261 (section 1.1.3.2), augmenté des deux extrémités avec les sites de restriction *HindIII* et *BamHI*. Après linéarisation du plasmide pXE4 (Fig. 5) par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction *HindIII* et *BamHI*, on a obtenu le fragment pXE4/*HindIII-BamHI* (17500 pb). Ensuite, les deux fragments ont été ligués par leurs extrémités compatibles. Le fragment pXE4/*HindIII-BamHI* contient les gènes *xylE*, *bla*, *tsr*, *SCP2rep/stb*, et l'origine de réplication *colE1* d' *E. coli*. Après ligation, la construction plasmidique obtenue, pIAF262 (18000 pb), dans laquelle l'insert possède la même orientation que *xylE*, a été utilisée pour transformer d'abord la souche *E. coli* DH1. Le plasmide pIAF262 extrait à partir de cette souche a été ensuite utilisé, pour transformer *S. lividans* 10-164.

2.0 Essai semi quantitatif de l'activité de la C230 en milieu minimal solide "MBSM"

2.1 Activité des promoteurs de *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, dans pIJ4083

Tel que mentionné en section (Introduction), le gène *xylE* de *P. putida* code pour une enzyme, la catéchol 2,3 dioxygénase (C230), qui convertit le catéchol incolore en un composé, le 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde, de coloration jaune intense. Dans le but de vérifier, si cette réaction chromogénique pouvait être utilisée pour déterminer l'expression du gène *xylE* se trouvant sous le contrôle transcriptionnel des promoteurs de *xlnA*, *xlnB*, et *xlnC*, les transformants de *Streptomyces lividans* contenant les différentes constructions plasmidiques, pIAF252, pIAF254, pIAF256, pIAF258, pIAF259, pIAF261, pIAF262, pIJ4083, pXE3 et pXE4, ont été repiqués en milieu minimal solide "MBSM" supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose comme sources de carbone. Les plasmides pXE3, pXE4 et pIJ4083 ont été utilisés comme contrôles. Après deux jours d'incubation à 34°C, les Pétris ont été vaporisés avec une solution aqueuse de 0,5 M de catéchol.

Les colonies contenant le plasmide pIJ4083, sans promoteur, ayant poussé sur milieux contenant les différentes sources de carbone, sont restées blanches après vaporisation (tableau 3).

Les colonies contenant le plasmide pXE3, ayant poussé en milieu contenant 1% de glucose sont restées blanches, tandis que celles ayant poussé en milieu Bennett + thiostrepton sont devenues jaunes intenses, après vaporisation avec une solution aqueuse de 0,5 M de catéchol (résultats non mentionnés dans le tableau 3). pXE3 contient la construction plasmidique du promoteur *galPI* de *S. lividans*, fusionné avec le gène *xylE*

(Ingram *et al.*, 1989).

L'essai semi quantitatif de l'activité de la C230, des promoteurs de *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* dans pIJ04083, en présence des différentes sources de carbone utilisées, a donné les résultats mentionnés au tableau 3. Le degré de coloration est dépendant de l'activité promotrice des clones.

2.2 Activité du promoteur de *xlnC*, dans pXE4

L'essai semi-quantitatif du dosage de l'activité enzymatique de la C230 en milieu minimal solide "MBSM", supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose, des colonies contenant les constructions plasmidiques du promoteur du gène *xlnC* (*xlnC/PstI-SphI/350* pb), fusionné avec *xylE* dans le plasmide à copie unique, pXE4, nous a montré une coloration, jaune pâle sur toutes les sources de carbones, lorsque les colonies ont été vaporisées avec une solution aqueuse de 0,5 M de catéchol (tableau 5).

Les colonies portant le plasmide pXE4, sans promoteur sont restées blanches, lorsque vaporisées au catéchol (tableau 5).

3.0 Essai quantitatif de l'activité de la C230 en milieu liquide "SLAB"

3.1 Activité des promoteurs de *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, dans pIJ4083

Pour vérifier si la réaction de coloration (jaune) observée sur Pétris (section 2.0), était en corrélation avec l'essai quantitatif du dosage de la

C230 en culture liquide, les souches portant les constructions plasmidiques des promoteurs des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, fusionnés avec *xylE* dans le plasmide à copie multiple, pIJ4083, ont été mises en croissance pendant 2h. en milieu liquide "SLAB", supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose. Les résultats obtenus à partir du dosage quantitatif de l'activité enzymatique de la C230, exprimée en milliunités par milligrammes (mU/mg) de protéine, sont représentés dans le tableau 4.

3.2 Activité du promoteur de *xlnC*, dans pXE4

L'essai quantitatif du dosage de l'activité enzymatique de la C230 en milieu minimal liquide "SLAB", supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose, des souches contenant la construction plasmidique du promoteur du gène de *xlnC* (*xlnC/PstI-SphI/350 pb*), fusionné avec *xylE* dans le plasmide à nombre de copie unique, pXE4, est représenté dans le tableau 6.

FIGURE 9 : Cartes de restriction des plasmides pIAF18, pIAF42 et pIAF20.

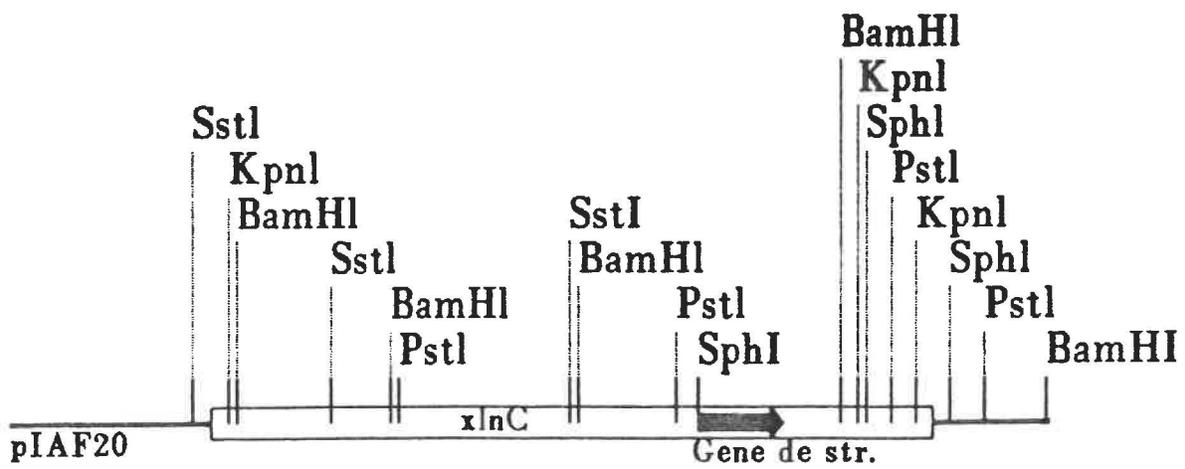
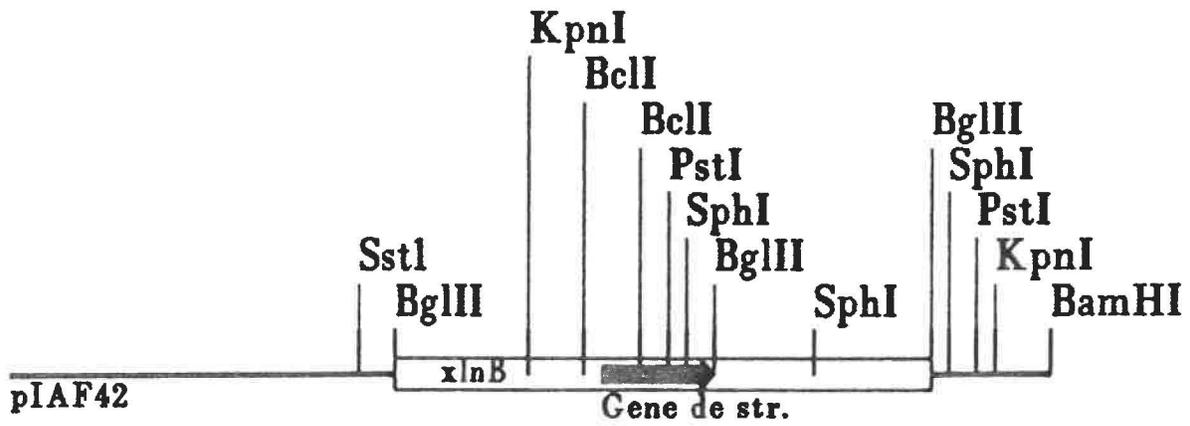
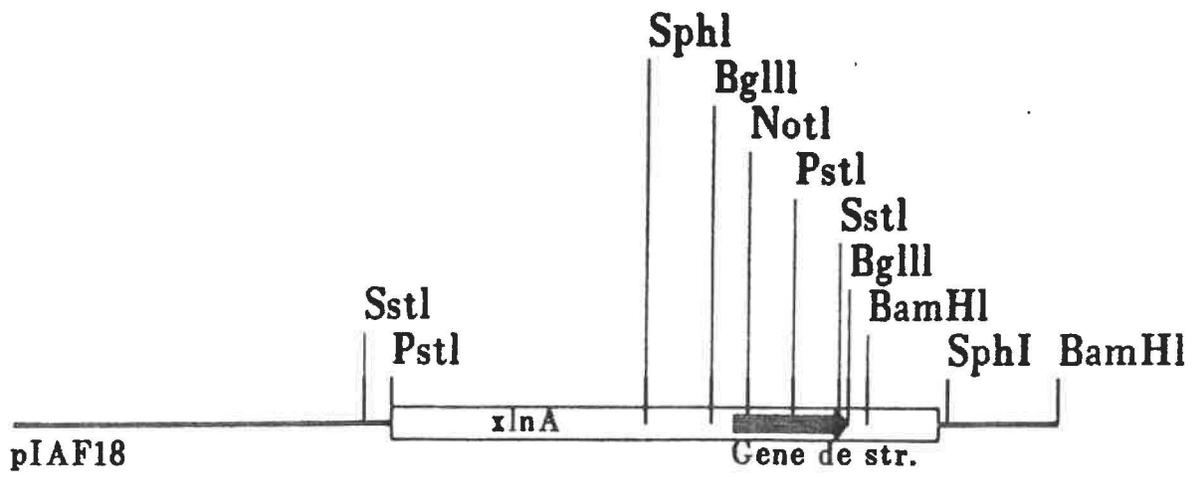
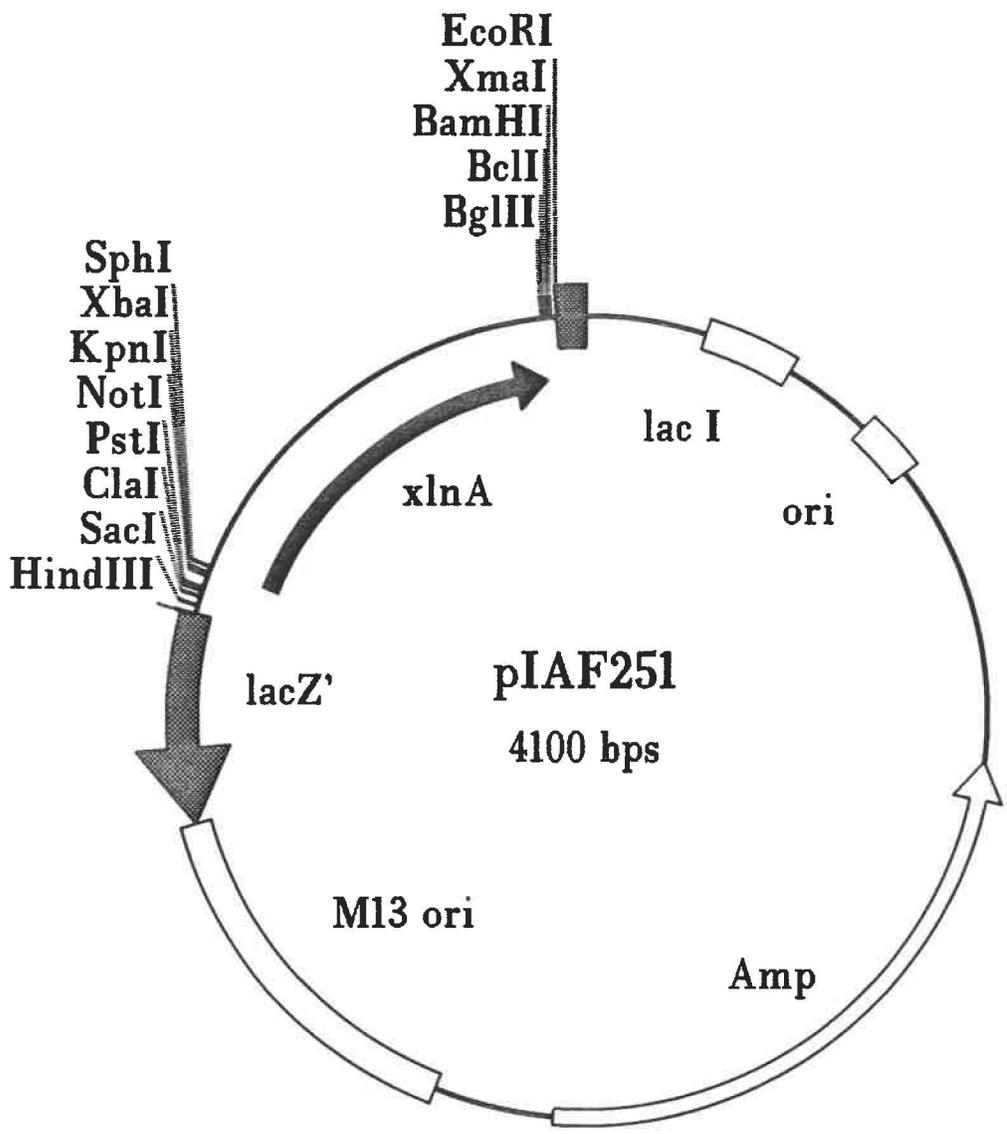


FIGURE 10 : Carte de restriction du plasmide pIAF251. Fragment *SphI*-*BglII* du gène de *xlnA* mis dans pSL1180.



5

FIGURE 11 : Carte de restriction du plasmide pIAF252. Fragment du gène *xlnA/SphI-BglII* du plasmide pIAF251 mis dans pIJ4083.

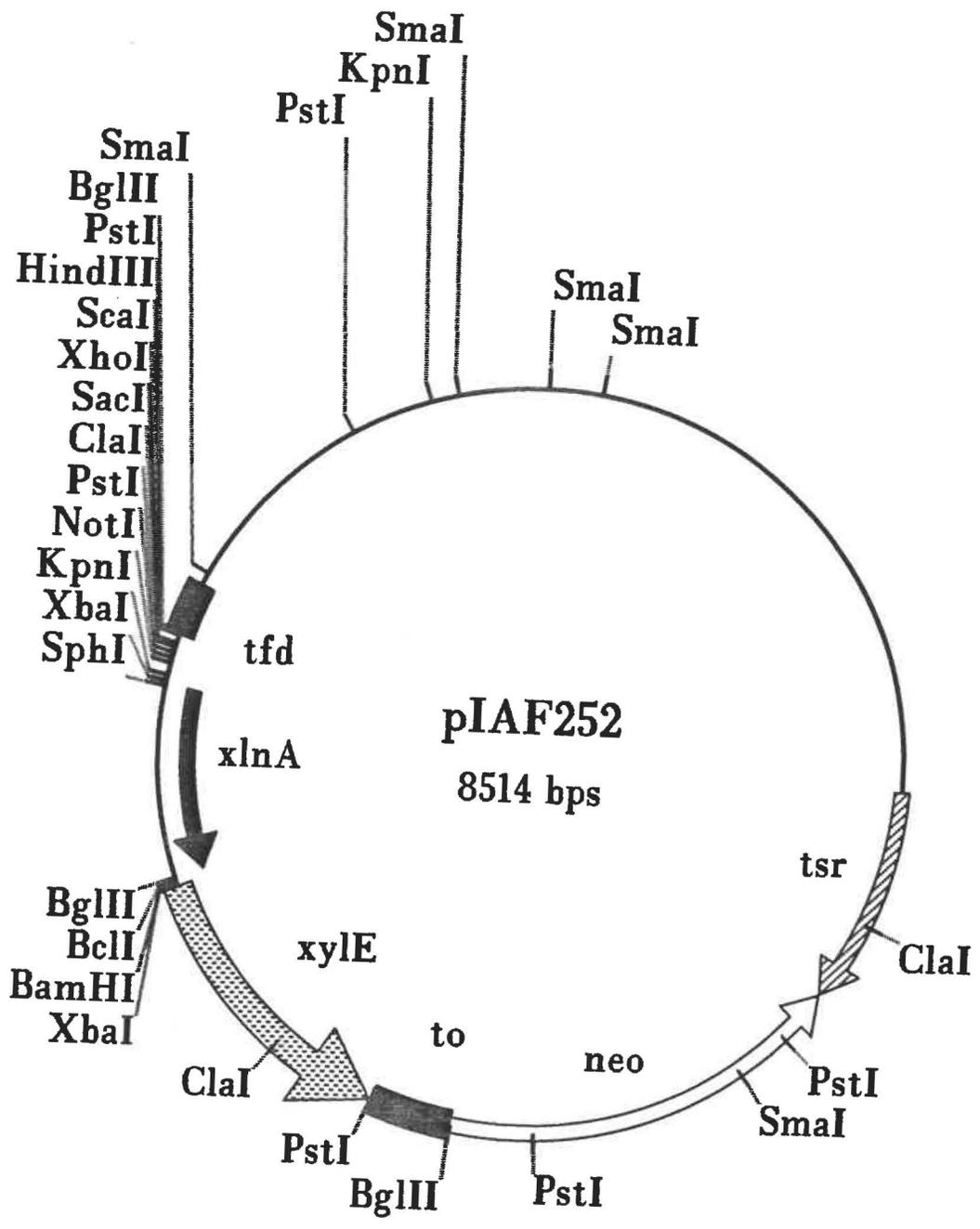


FIGURE 12 : Carte de restriction du plasmide pIAF253. Fragment du gène de *xlnA/BglII-NotI* mis dans pSL1190.

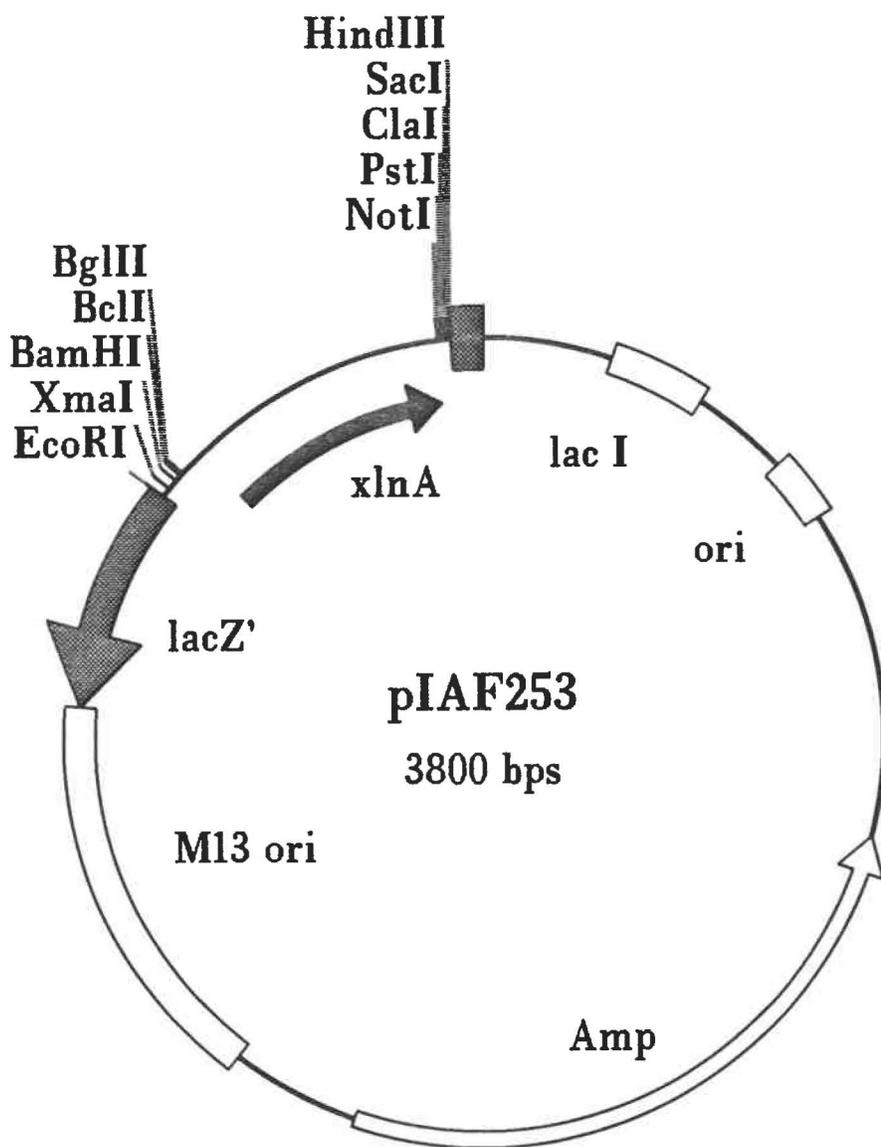


FIGURE 13 : Carte de restriction du plasmide pIAF254. Fragment du gène *xlnA/BglII-NotI* du plasmide pIAF253 mis dans pIJ4083.

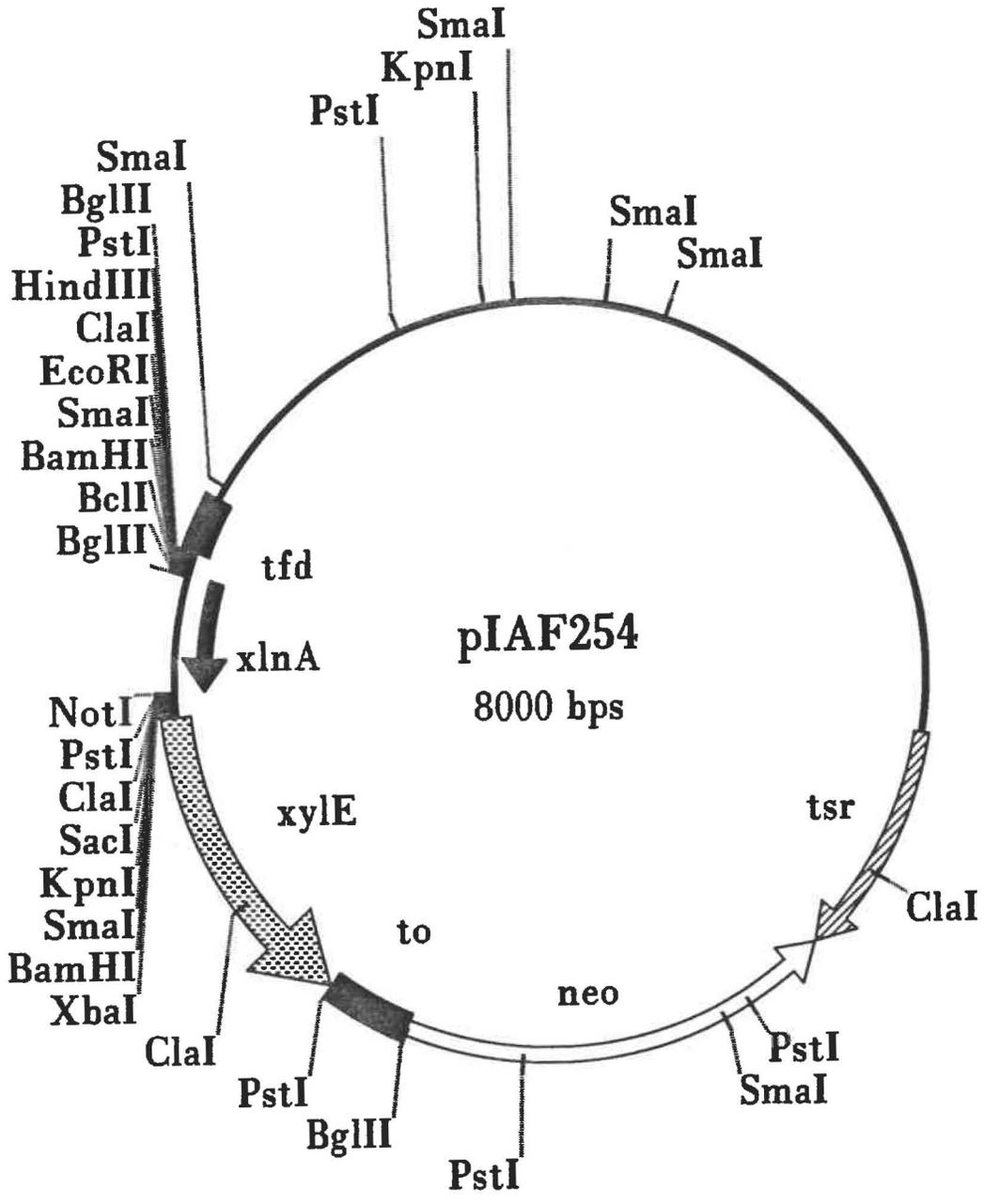


FIGURE 14 : Carte de restriction du plasmide pIAF255. Fragment du gène *xlnA/SphI-NotI* mis dans pSL1190.

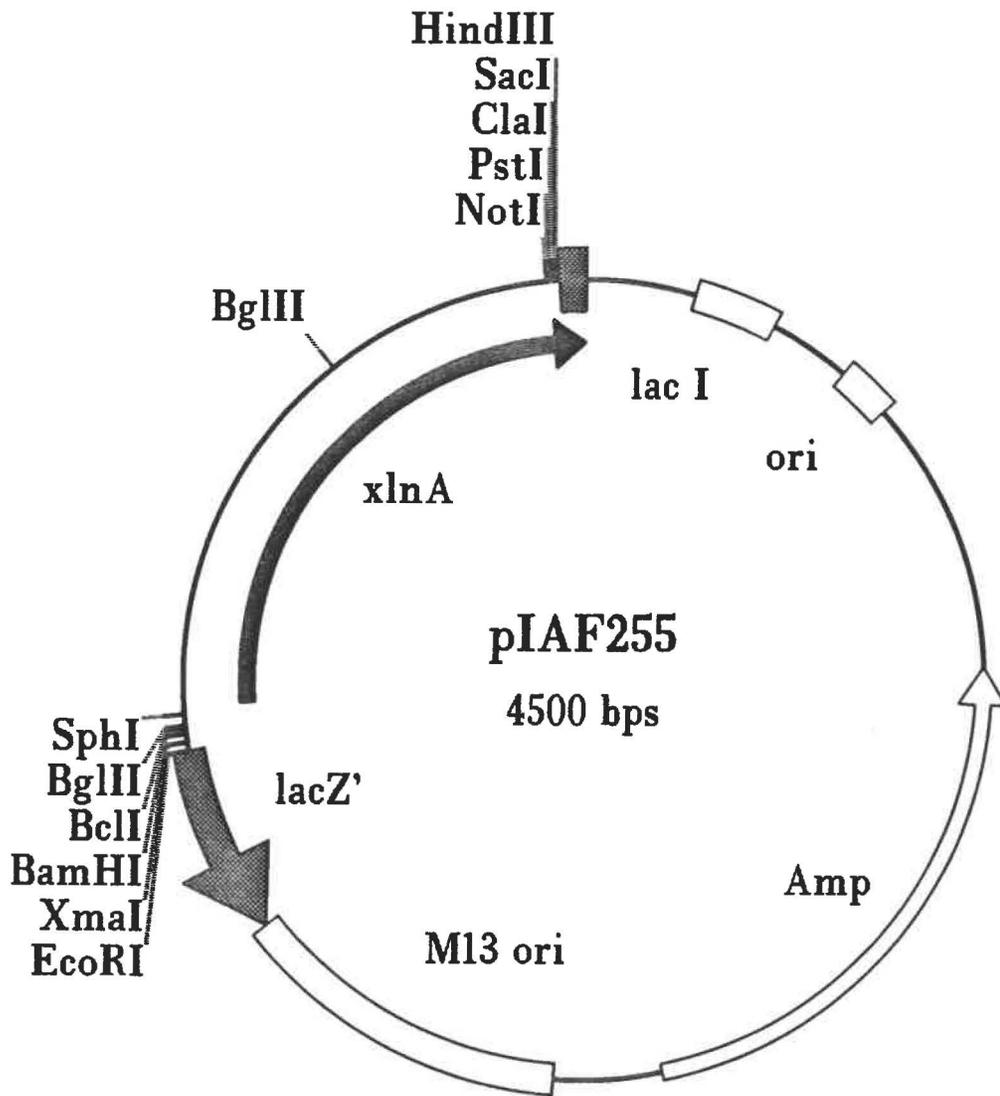


FIGURE 15 : Carte de restriction du plasmide pIAF256. Fragment du gène de *xlnA/SphI-NotI* du plasmide pIAF255 mis dans pIJ4083.

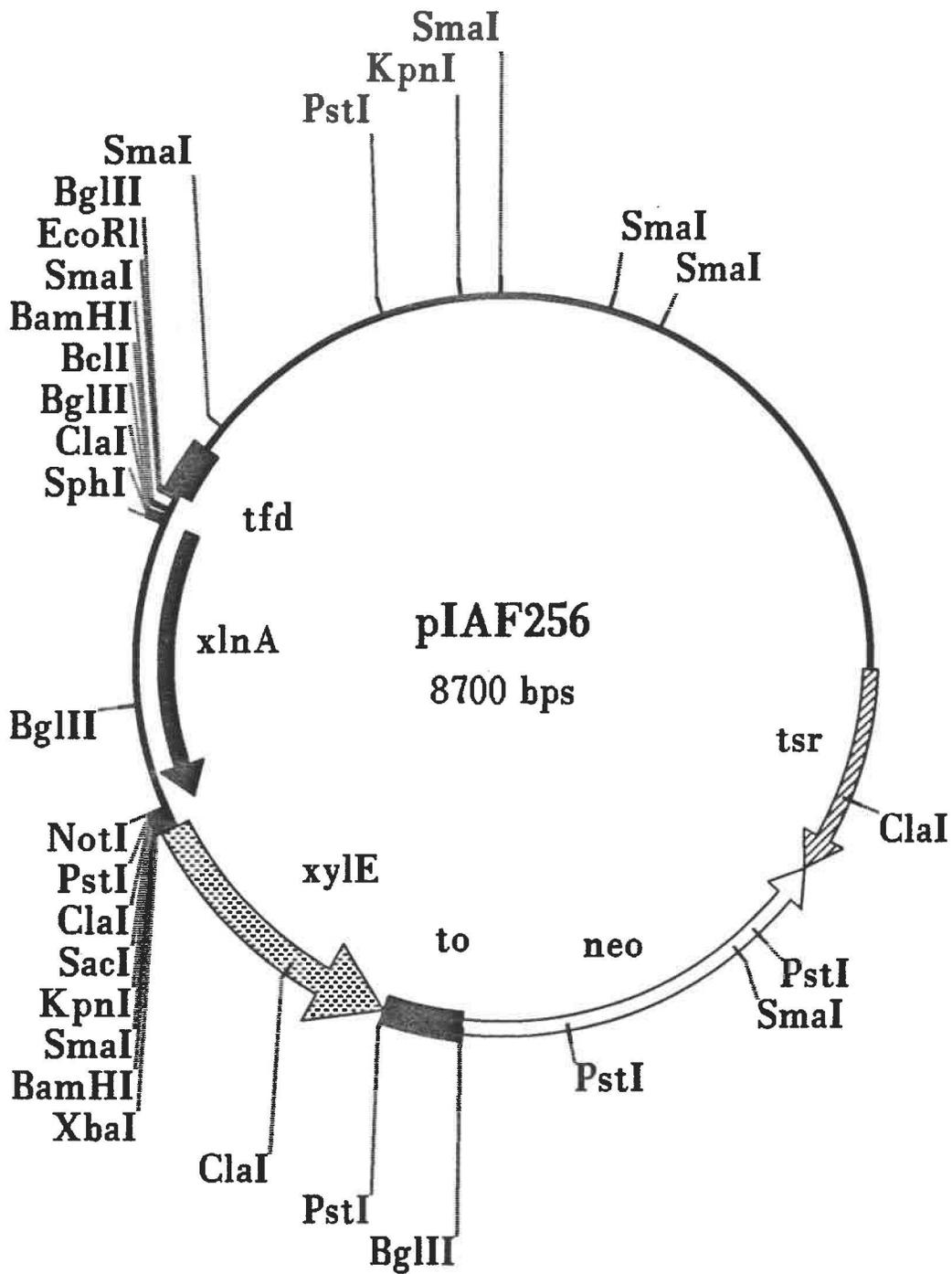


FIGURE 16 : Carte de restriction du plasmide pIAF257. Fragment du gène de *xlnA/SphI-PstI* mis dans pSL1190.

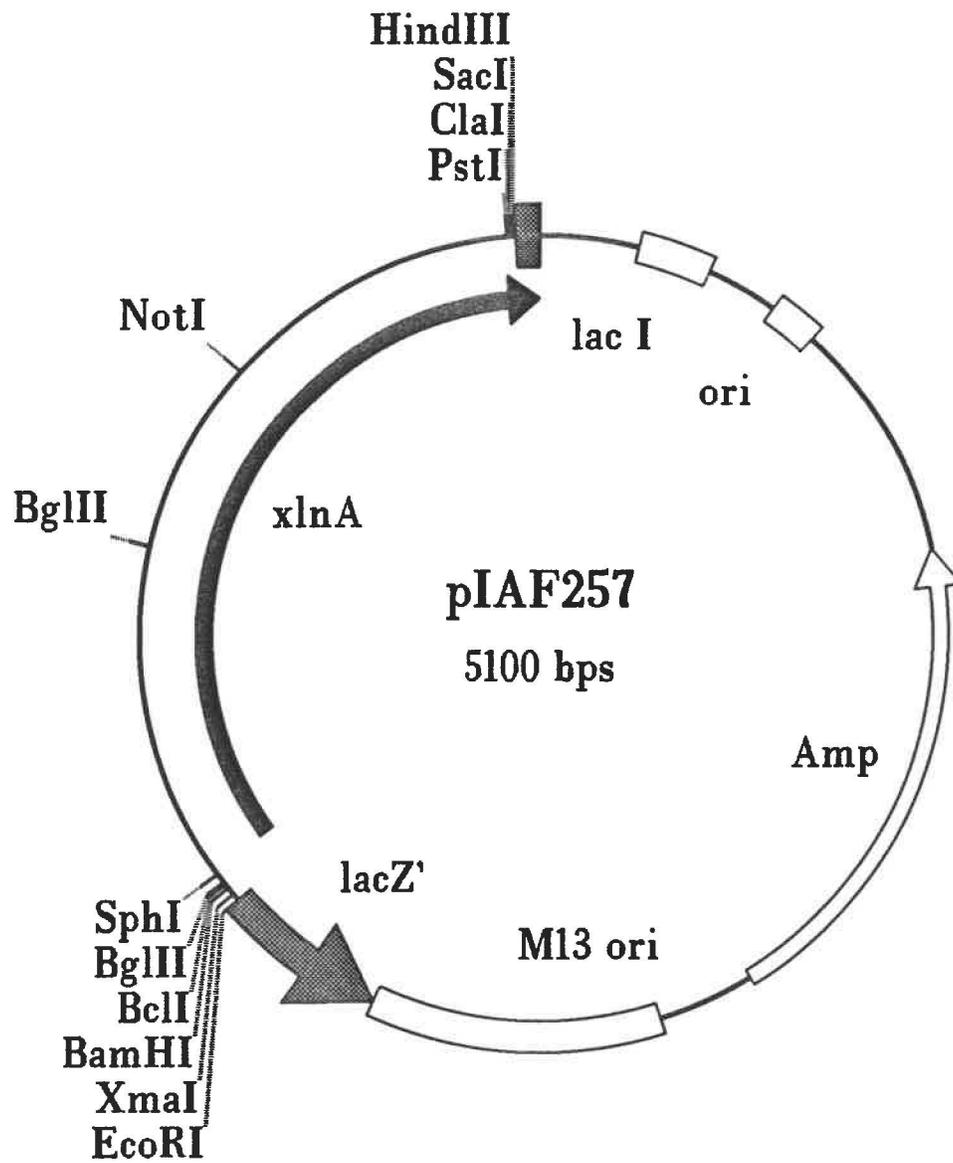


FIGURE 17 : Carte de restriction du plasmide pIAF258. Fragment du gène *xlnA/SphI-PstI* du plasmide pIAF257 mis dans pIJ4083.

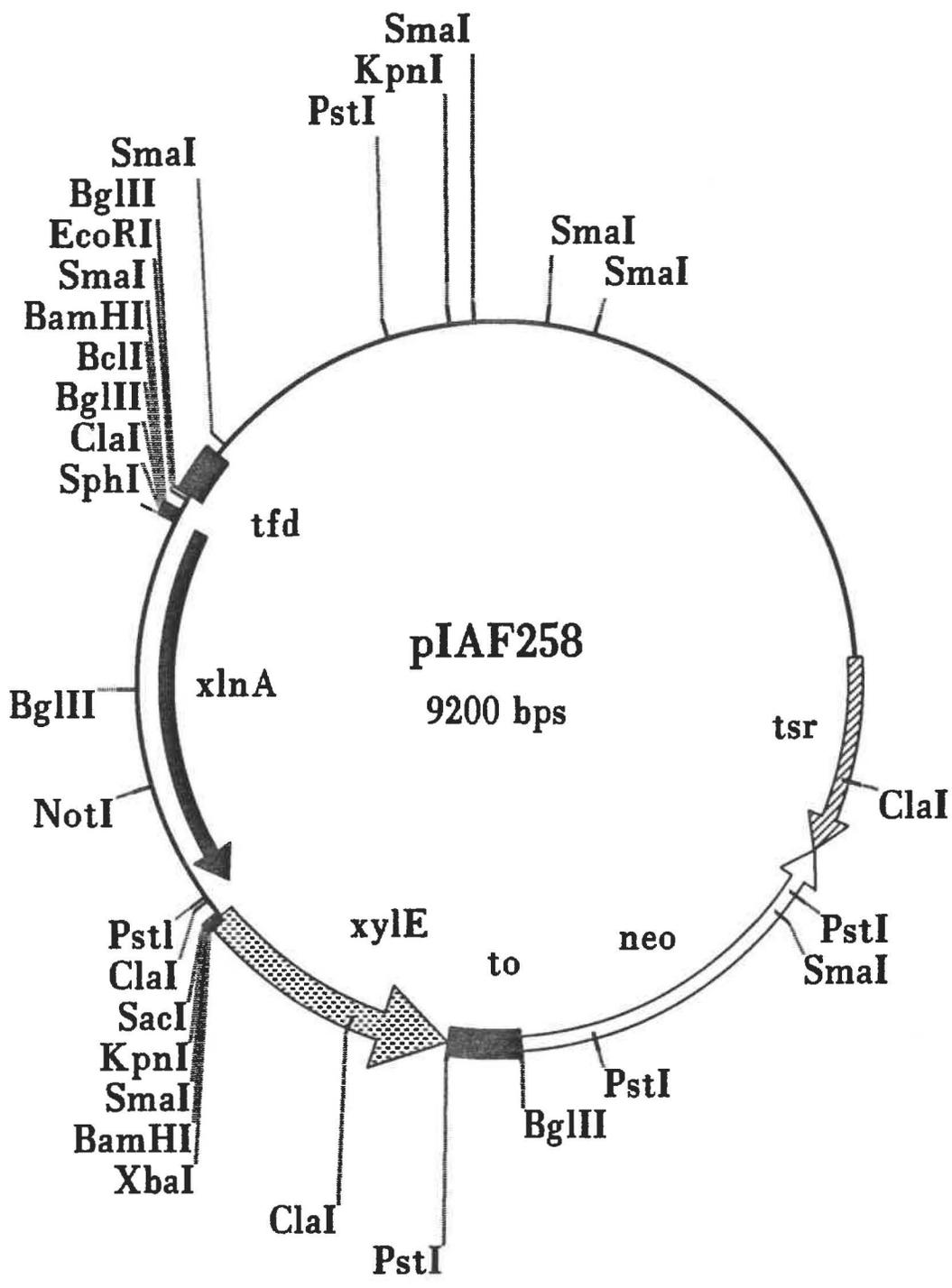


FIGURE 18 : Carte de restriction du plasmide pIAF259. Fragment du gène de *xlnB/BclI* mis dans pIJ4083.

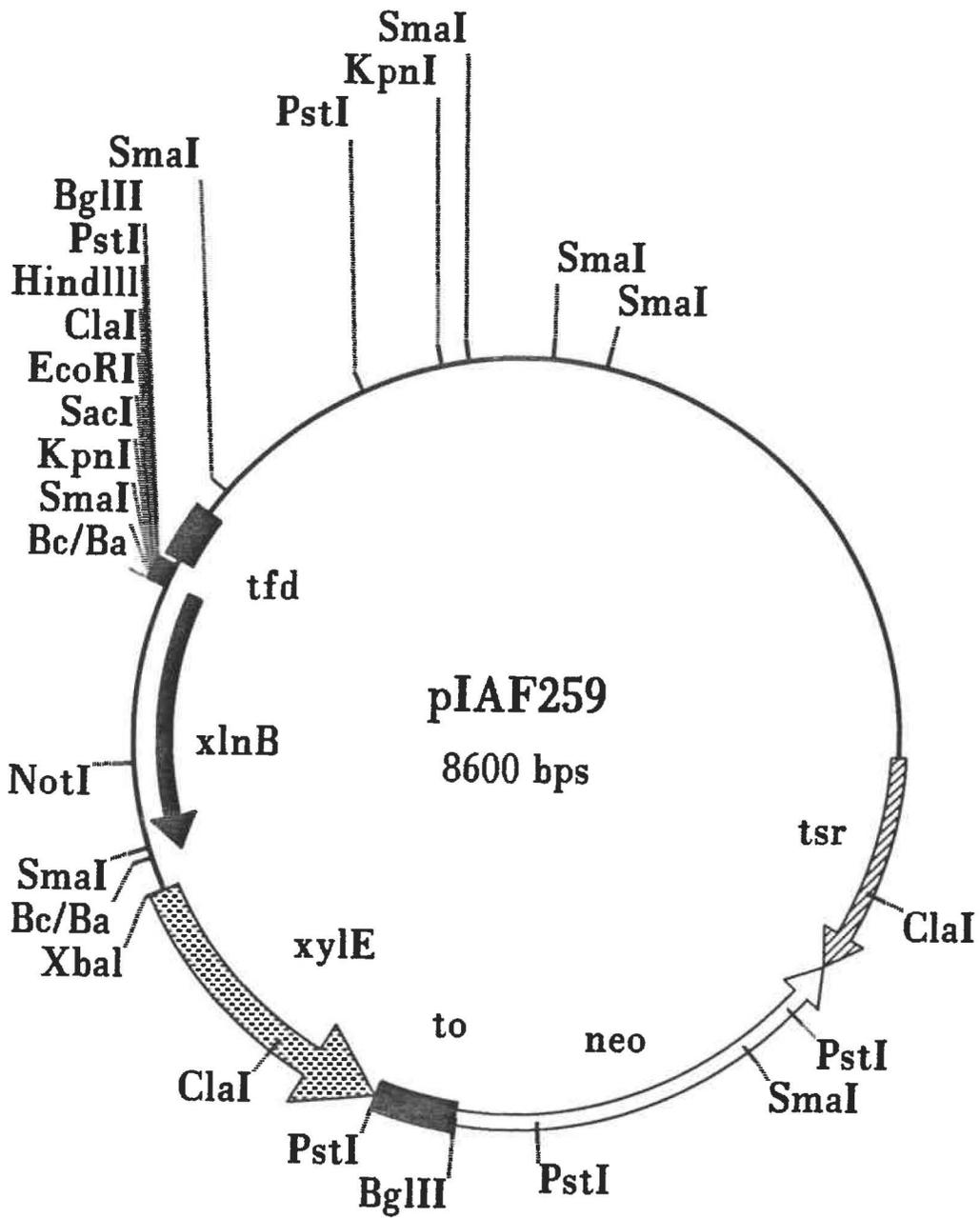


FIGURE 19 : Carte de restriction du plasmide pIAF260. Fragment du gène de *xlnC/PstI-SphI* mis dans pSL1180.

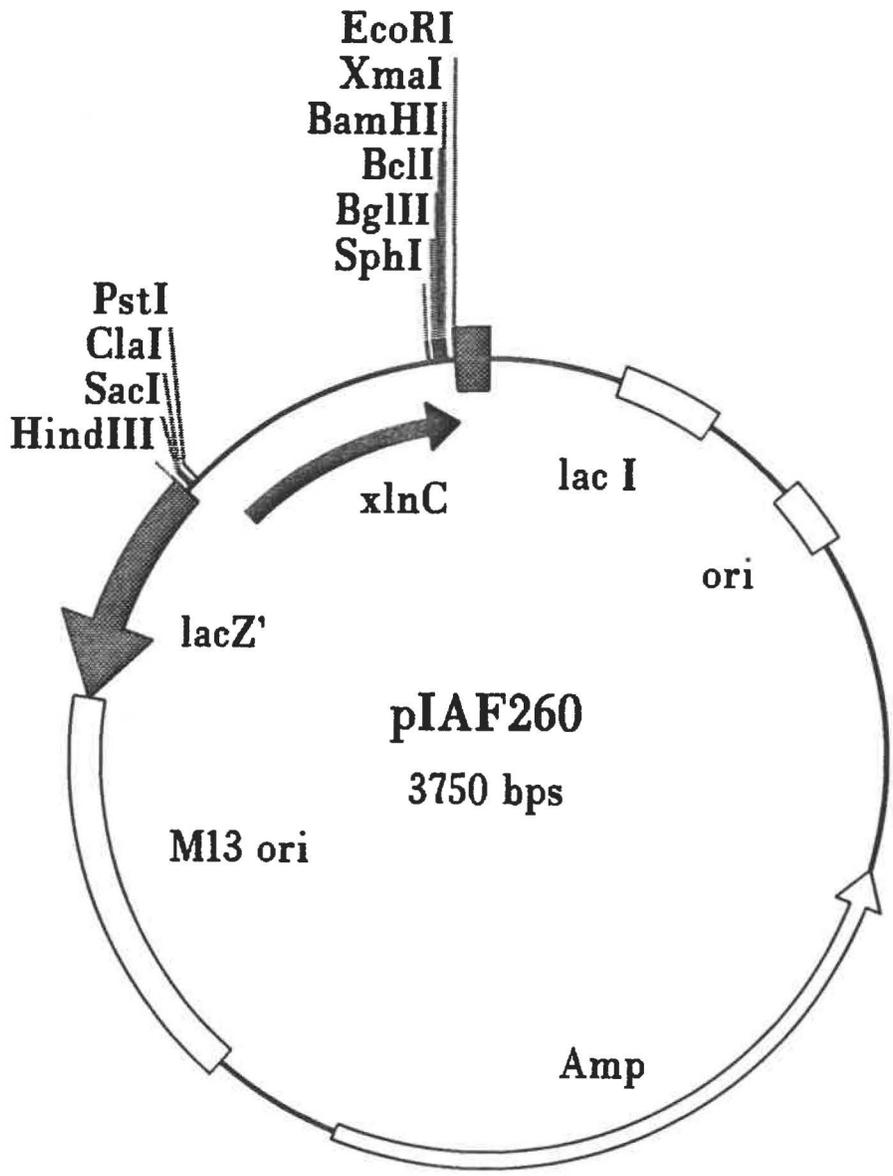


FIGURE 20 : Carte de restriction du plasmide pIAF261. Fragment du gène *xlnC/PstI-SphI* du plasmide pIAF260 mis dans pIJ4083.

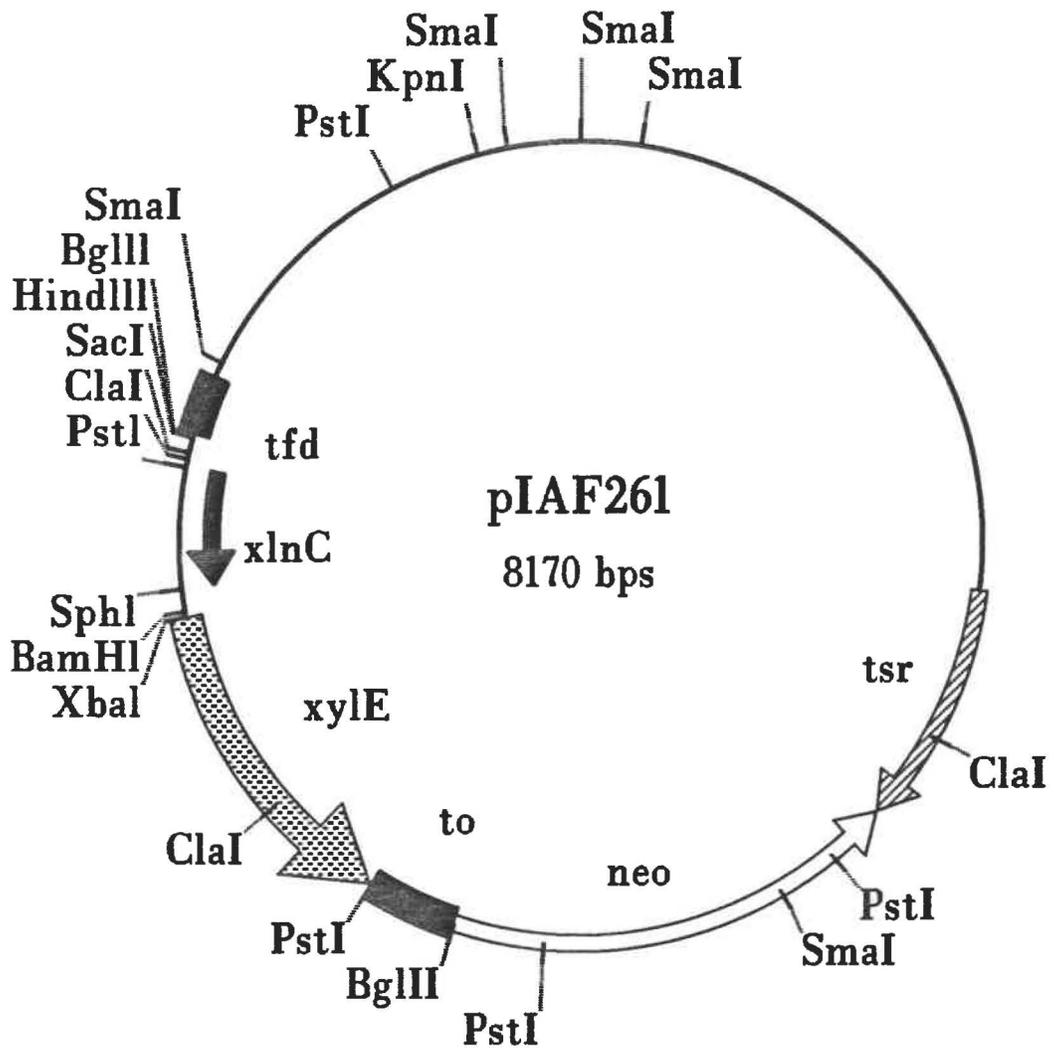


FIGURE 21 : Carte de restriction du plasmide pIAF262. Fragment du gène *xlnC/PstI-SphI* mis dans pXE4.

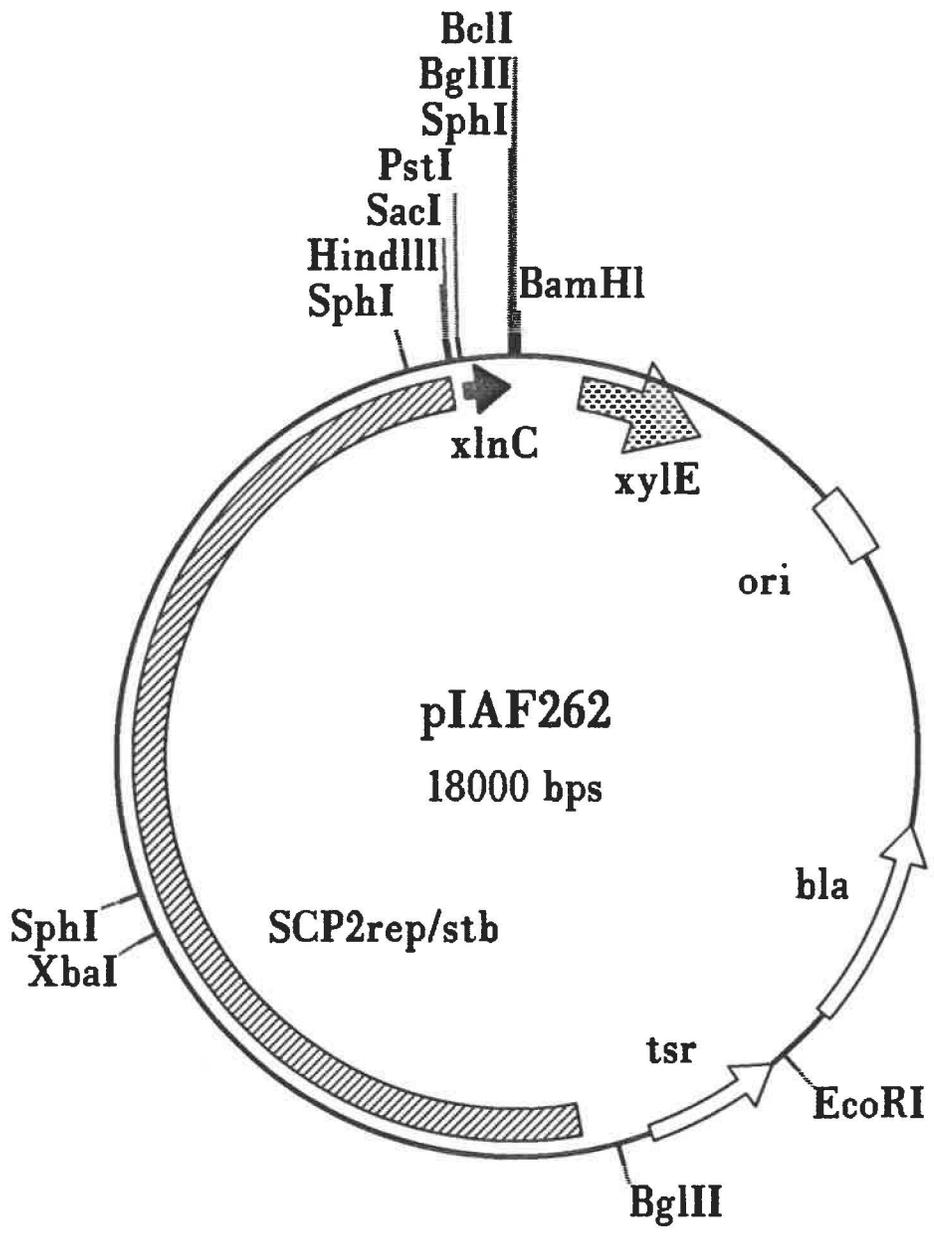


Tableau 3. Activité de la C230 des clones pIAF252, pIAF254, pIAF256, pIAF258, pIAF259 et pIAF261 en milieu minimal solide "MBSM", supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose.

Plasmides

Hôte: *S. lividans* 10-164

Activité de la C230 (réaction de coloration)

1% glucose 1% xylane 1% xylose

pIAF252 (<i>xlnA/SphI-BglII</i>)	+++	++	++
pIAF254 (<i>xlnA/BglII-NotI</i>)	+	+	+
pIAF256 (<i>xlnA/SphI-NotI</i>)	++	++	+
pIAF258 (<i>xlnA/SphI-PstI</i>)	-	-	-
pIAF259 (<i>xlnB/BclI</i>)	+	+	+
pIAF261 (<i>xlnC/PstI-SphI</i>)	++	+++	++
pIJ4083	-	-	-

Légende: +++ Jaune intense; ++ Jaune; + Jaune pâle; - Blanc

Tableau 4. Activité de la C230, des clones pIAF252, pIAF254, pIAF256, pIAF258, pIAF259 et pIAF261, en milieu liquide "SLAB", supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose.

Plasmides

Hôte: *S. lividans* 10-164

Activité spécifique de la C230 (mU/mg de protéine)

1 % glucose

1 % xylane

1 % xylose

pIAF252 (<i>xlnA/SphI-BglII</i>)	118	43	61
pIAF254 (<i>xlnA/BglII-NotI</i>)	12	13	9
pIAF256 (<i>xlnA/SphI-NotI</i>)	42	27	11
pIAF258 (<i>xlnA/SphI-PstI</i>)	3	4	2
pIAF259 (<i>xlnB/BclI</i>)	21	11	16
pIAF261 (<i>xlnC/PstI-SphI</i>)	90	185	114
pIJ4083	ND	ND	ND

Tableau 5. Activité de la C230 du clone pIAF262 en milieu minimal solide "MBSB", supplémenté avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.

Plasmide

Hôte: *S. lividans* 10-164

Activité de la C230 (réaction de coloration)

	1 % glucose	1 % xylane	1 % xylose
pIAF262 (<i>xlnC/PstI-SphI</i>)	+	+	+
pXE4	-	-	-

Légende: + Jaune pâle; - blanche

Tableau 6. Activité de la C230 du clone pIAF262, en milieu liquide "SLAB", supplémenté avec 1 % de glucose, 1 % de xylane ou 1 % de xylose.

Plasmide	<u>Hôte: <i>S. lividans</i> 10-164</u>		
	<u>Activité spécifique de la C230 (mU/mg de protéine)</u>		
	1 % glucose	1 % xylane	1 % xylose
pIAF262 (<i>xlnC/PstI-SphI</i>)	11	14	9
pXE4	ND	ND	ND

DISCUSSION

1.0 Analyse de l'activité promotrice des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, dans le plasmide à copie multiple, pIJ4083

L'étude de l'activité promotrice des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, a pu être effectuée, en utilisant le gène *xylE* de *P. putida*, comme gène rapporteur chez *S. lividans*. D'après les résultats obtenus à la suite des essais semi quantitatifs et quantitatifs du dosage de l'activité de la C230, on remarque que l'activité des différents promoteurs testés des gènes de *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, portés sur un plasmide à copie multiple, pIJ4083, n'est pas la même, dépendant de la source de carbone utilisée.

1.1 En milieu contenant 1% de glucose

En milieu minimal contenant 1% de glucose, le promoteur du plasmide pIAF252 possède une grande activité (Tableau 4). Des études précédentes menées par Morosoli *et al.* (1990), avaient montré la présence d'un promoteur dans le fragment *BglIII-NotI* du gène *xlnA* (Fig. 9). Ce promoteur est situé immédiatement en amont du gène *xlnA* et serait le vrai promoteur de ce gène. Ces mêmes études avaient permis de démontrer que cette région promotrice était réprimée par le glucose. Car, en délétant les régions -55 à -75 (région de la séquence consensus), du fragment *xlnA/BglIII-NotI*, ces chercheurs sont parvenus à obtenir une augmentation de l'activité xylanasique en présence du glucose, comme seule source de carbone. Ce qui laissait supposer, que la région délétée était soit impliquée dans la répression catabolique du glucose ou qu'il y avait un second promoteur en amont de *BglIII-NotI*, qui lui, ne serait pas réprimé par le glucose. En effet, la présente

étude nous a permis de démontrer cette hypothèse. En se référant à la construction du plasmide pIAF252 (Fig. 11), ce nouveau promoteur se situe dans le fragment *xlnA/SphI-BglIII*. Dans le plasmide pIAF256 (Fig. 15), construit lors de cette étude, on remarque, que le promoteur *xlnA/SphI-BglIII*, est contigu au promoteur *xlnA/BglIII-NotI* et situé immédiatement en amont de ce dernier (Fig. 15; Fig. 22). D'après les constatations de Rolf Morosoli (communications personnelles), le promoteur localisé dans le fragment *xlnA/SphI-BglIII*, ne serait pas celui du gène *xlnA*. Toutefois, ce promoteur, possède une forte homologie avec les séquences consensus de *E. coli* (Introduction, section 3.2.2) et n'est pas susceptible à la répression catabolique du glucose (Tableau 4).

Le clone pIAF254, qui contient uniquement le promoteur de *xlnA/BglIII-NotI*, ne possède presque pas d'activité en présence du glucose (Tableau 4). Ce qui est en parfaite corrélation avec les résultats obtenus par Morosoli *et al.* (1990). Le promoteur de *xlnA/BglIII-NotI* est donc susceptible à la répression catabolique du glucose.

Les plasmides pIAF256 et pIAF258 possèdent deux promoteurs, l'un est localisé dans le fragment *xlnA/SphI-BglIII* et l'autre dans le fragment *xlnA/BglIII-NotI* (Fig. 22). Dans ces deux constructions plasmidiques, le fragment *BglIII-NotI* se trouve être celui, qui est situé immédiatement en amont du gène *xyle*. Dans le cas du plasmide pIAF258, le promoteur *BglIII-NotI* est augmenté de la portion de gène *xlnA/NotI-PstI* (Fig. 22), ce qui rend ce promoteur encore plus distant de *xyle*. Les résultats obtenus à partir de cette étude nous montrent qu'en milieu minimal supplémenté avec 1% de

glucose, le plasmide pIAF256 possède une faible activité et pIAF258, n'en possède presque pas (Tableau 4).

Ainsi, le gène *xlnA* dans le plasmide pIAF18 (Fig. 9) possède deux promoteurs. Le promoteur qui est localisé dans le fragment *xlnA/BglII-NotI*, est répressible par le glucose. Le second, localisé dans le fragment *xlnA/SphI-BglII* n'est pas susceptible à la répression exercée par le glucose.

Le plasmide pIAF259 (Fig. 18), contient le promoteur de *xlnB*, qu'on a localisé dans le fragment de *xlnB/BclI* en provenance du plasmide pIAF42 (Fig. 9). Ce promoteur en fusion avec le gène *xylE* (Fig. 22), ne présente pas d'activité remarquable en présence du glucose (Tableau 4). Ainsi, le promoteur localisé dans le fragment de *xlnB/BclI* serait aussi réprimé par le glucose (Tableau 4).

Cette étude nous a aussi permis de localiser une activité promotrice dans le fragment de *xlnC/PstI-SphI*. D'après les résultats du tableau 4, le plasmide pIAF261 (Fig. 20), qui contient le promoteur du gène *xlnC* en provenance du plasmide pIAF20 (Fig. 22), présente une forte activité en milieu minimal supplémenté avec 1% de glucose.

Comme il a été déjà souligné en introduction (section 4.3), chez les bactéries gram-négatives, le glucose est la source de carbone préférée. En présence du glucose, l'utilisation d'autres substrats est fortement inhibée. Le mécanisme par lequel le contrôle catabolique du glucose se fait chez les bactéries gram-positives reste complètement obscur. Ce mécanisme est totalement différent de l'activation positive modulée par l'AMPc, qui joue un rôle majeur chez les bactéries gram-négatives (Pastan et Adhya, 1976;

Setlow, 1973), vu que le niveau de l'AMPc chez les streptomycètes est indépendant de la source de carbone utilisée (Hodgson, 1982). Cependant, en excisant un fragment de promoteur à partir du chromosome (son emplacement normal), on modifie la conformation de l'ADN. Certaines régions du chromosome, qui agiraient en trans avec des protéines régulatrices, seraient probablement altérées. À titre d'exemple, Zuber *et al.* (1987), ont démontré, qu'en plaçant le promoteur du gène *spoVG*, impliqué dans la sporulation chez *Bacillus subtilis*, sur un plasmide à copie multiple, on modifiait la conformation de ce dernier et par conséquent, l'expression du gène se trouvant sous son contrôle. Ces hypothèses pourraient probablement être une des raisons permettant d'expliquer, pourquoi les promoteurs des plasmides pIAF252 et pIAF261 ne sont pas réprimés par le glucose.

La répression des promoteurs des gènes *xlnA*, *xlnB* des plasmides pIAF254, pIAF258 et pIAF259 par le glucose, concorde bien avec les résultats déjà obtenus dans la littérature. Kluepfel *et al.* (1991), ont rapporté que la production de xylanase est fortement inhibée par le glucose non seulement chez la souche sauvage de *S. lividans* 3131, mais aussi chez les clones IAF18 et IAF42.

1.2 En milieu supplémenté avec 1% de xylane

Par ailleurs, les expériences menées en milieu supplémenté avec 1% de xylane ont montré, que seul le promoteur du plasmide pIAF261 avait une grande activité (Tableau 4). Dans ces conditions, l'activité du promoteur de

xlnC dans le plasmide pIAF261, serait due à l'absence de la répression catabolique exercée par le glucose. En plus, une transcription maximale de ce promoteur en raison de sa petite taille, pourrait augmenter la production de C230.

1.3 En milieu contenant 1% de xylose

Les résultats obtenus en milieu supplémenté avec 1% de xylose, nous montrent, que le promoteur du plasmide pIAF252 possède une activité (Tableau 4). L'induction du promoteur de *xlnA/SphI-BglII* du plasmide pIAF252 (Fig. 11), serait attribuable à l'effet de dosage du gène. Les promoteurs de ces plasmides seraient amplifiés en plusieurs copies, vu qu'ils sont portés sur un plasmide à haut nombre de copie. Des études menées par Kluepfel *et al.* (1991), permettent de confirmer cette hypothèse. D'après ces chercheurs, le xylose n'induit pas le système xylanolytique chez la souche sauvage de *S. lividans* 3131. Par contre, les clones IAF18, IAF42 et IAF20 (Fig. 9) sont inductibles par le même substrat.

Le promoteur du plasmide pIAF254 (Fig. 13), n'a presque pas d'activité en milieu supplémenté avec 1% de xylose (tableau 4). Apparemment, le promoteur de *xlnA/BglII-NotI* du plasmide pIAF254 serait un promoteur faible. Son activité est très petite, même porté sur un plasmide à copie multiple.

L'activité promotrice de *xlnA/SphI-NotI* du plasmide pIAF256 (Fig. 15) reste faible en milieu contenant 1% de xylose (Tableau 4). Le plasmide pIAF256 porte deux promoteurs, celui de *xlnA/BglII-NotI*, situé en

aval du second, *xlnA/SphI-BglIII* (Fig. 22). La faible activité du plasmide pIAF256, serait probablement due à un effet atténuateur qu'exerce le premier promoteur localisé dans le fragment de *xlnA/BglIII-NotI* (Fig. 22) sur le second, localisé dans le fragment *xlnA/SphI-BglIII* (Fig. 22).

Le plasmide pIAF258 est resté presque sans activité sur tous les milieux de culture testés (tableau 4). Le plasmide pIAF258 (Fig. 17), porte aussi les deux promoteurs, l'un est localisé dans le fragment *xlnA/SphI-BglIII* et l'autre dans le fragment *xlnA/BglIII-NotI* (Fig. 22). À la différence du plasmide pIAF256, où les deux promoteurs du gène de *xlnA* sont localisés dans le fragment de *xlnA/SphI-NotI* (Fig. 22), dans le plasmide pIAF258, le fragment de *xlnA/SphI-NotI* est augmenté de la portion de gène *xlnA/NotI-PstI* (Fig. 22). L'absence d'activité dans le cas du plasmide pIAF258, serait attribuable à la formation de structures secondaires "hairpin", en amont du site *PstI*, dans le gène de structure de *xlnA*. Ces structures secondaires peuvent constituer un obstacle et provoquer un arrêt de la traduction de l'ARNm.

Le promoteur localisé dans le fragment du gène de *xlnB/BclI* (Fig. 22) du plasmide pIAF259 (Fig. 19), présente une faible activité en présence du xylose, utilisé comme seule source de carbone (tableau 4). Le promoteur de *xlnB* dans le plasmide pIAF259, est beaucoup plus distant du gène *xylE*, comparativement au promoteur de *xlnA/SphI-BglIII*, qui lui est plus proche du gène *xylE* dans le plasmide pIAF252. La faiblesse du promoteur de *xlnB* dans le plasmide pIAF259, pourrait être aussi attribuée à la formation de structures secondaires dans le gène de structure de *xlnB*.

Le promoteur du gène de *xlnC/PstI-SphI* (Fig. 9) dans le plasmide pIAF261 (Fig. 20), montre une haute activité en milieu minimal contenant 1% de xylose (Tableau 4). Comme déjà mentionné plus haut dans cette section, la grande activité de ce promoteur comme celui du gène *xlnA/SphI-BglII* du plasmide pIAF252, serait due à l'effet de dosage du gène. Donc, le promoteur de *xlnC*, porté sur un plasmide à copie multiple, pIJ4083, dans le plasmide pIAF261, n'est pas réprimé par le glucose.

2.0 Analyse de l'activité des promoteurs des gènes de *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, dans le plasmide pXE4

2.1 En milieu supplémenté avec 1% de glucose

Les essais de sous-clonage des gènes *xlnA* et *xlnB*, dans le plasmide pXE4, ont été infructueuses, dû à la recombinaison des plasmides et à la grosseur du plasmide pXE4 (17,50 kb). Toutefois, le sous-clonage du promoteur du gène *xlnC/PstI-SphI* dans le plasmide pXE4 (Fig. 5) a pu être effectué (pIAF262) (Fig. 21).

Dans cette étude, les analyses faites avec le plasmide pIAF262, reflètent à notre vue, la vraie activité du promoteur de *xlnC* dans les conditions physiologiques normales chez *S. lividans*. En effet, le plasmide pIAF262, lorsque mis en croissance en milieu minimal supplémenté avec 1% de glucose, 1% de xylane ou 1% de xylose, montre une activité de la C230 environ 10 fois inférieure à celle observée chez le clone IAF261 (Tableau 6), qui porte le même promoteur dans le plasmide à copie multiple, pIJ4083

(Fig. 6). Le promoteur du gène *xlnC* est réprimé par le glucose. Ce qui est en parfaite corrélation avec les résultats déjà rapportés dans la littérature. Kluepfel *et al.* (1991) ont démontré que la souche sauvage de *S. lividans* 3131 ainsi que les clones IAF18, IAF42 et IAF20 étaient fortement réprimés par le glucose.

2.2 En milieu contenant 1% de xylane

La croissance du clone IAF262 en milieu contenant 1% de xylane, montre une très faible activité promotrice. En effet, le xylane est une grosse molécule incapable de pénétrer dans la cellule. Comme l'induction de la xylanase est stimulée par des fragments de xylane de faible poids moléculaire, le promoteur du plasmide pIAF262 ne sera donc pas induit. Car, le plasmide pIAF262 a été introduit dans la souche 10-164, qui est incapable de transporter l'inducteur de façon active. Ce qui fait qu'il y a très peu d'activité de la C230.

2.3 En milieu supplémenté avec 1% de xylose

La croissance sur milieu supplémenté avec 1% de xylose, montre que le promoteur de *xlnC* du clone IAF262 (Fig. 21) est réprimé par le xylose (Tableau 6). Les données de la littérature obtenues à partir de Vats-Metha *et al.* (1990); Kluepfel *et al.* (1991), indiquent que le xylose réprime l'activité xylanase de la souche sauvage 3131, où le promoteur se trouvant en conditions physiologiques normales est généré en une seule copie. Notre expérience permet de confirmer ces résultats, car dans cette

étude, le promoteur de *xlnC* est porté sur un plasmide à nombre de copie unique, ce qui répond aux conditions physiologiques normales. Pour illustrer ces résultats, on pourrait citer comme autre exemple, les études menées par Bruton *et al.* (1988). Ces chercheurs ont incorporé le gène *xylE* "in situ", devant l'opéron *actI* (pour actinorhodine) dans le phage ϕ C31 de *Streptomyces*. Les expériences menées avec cette fusion ont pu révéler, que le gène *bldA* (qui code pour la tRNA_{Leu}), était indispensable à la transcription du gène *actI*.

3.0 Analyse des régions promotrices de *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* fusionnées avec le gène *xylE*

3.1 Fusions des promoteurs du gène *xlnA* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF252 et du gène *xlnC* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF261

L'observation des régions promotrices des gènes *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, fusionnés avec le gène *xylE* (Fig. 22), nous indique, que les promoteurs qui ont la plus grande activité, ceux des plasmides pIAF252 (Fig. 11) et pIAF261 (Fig. 20), sont moins distants du gène *xylE*. La région promotrice de pIAF252 ne possède aucun site de fixation du ribosome "RBS" (Fig. 22; Fig. 23).

D'autre part, l'analyse de la séquence nucléotidique du promoteur présumé de *xlnA/SphI-BglII*, fusionné avec le gène *xylE* dans pIAF252 (Fig. 23), nous indique, que la distance séparant la région promotrice du

"RBS" du gène *xylE*, est de 140 nucléotides (Fig. 23). Dans ces conditions, on peut supposer, que l'ARN polymérase se fixe d'abord aux alentours du promoteur pour l'initiation de la transcription de l'ARNm avec une haute fréquence. Comme la séquence "leader", située entre le début de l'initiation de la transcription à partir du promoteur et le codon ATG de départ du gène *xylE* est plus courte, les ribosomes se fixeront très étroitement au "RBS" du gène *xylE* pour initier la traduction de l'ARNm à partir de l' ATG de *xylE*.

Une autre analyse, portée sur les séquences nucléotidiques du promoteur présumé de *xlnC/PstI-SphI*, fusionné avec le gène *xylE* dans le plasmide pIAF261 (Fig. 25), montre, que le "RBS" du gène *xylE* est distant de la région promotrice de 270 nucléotides. Mais le fragment de *xlnC/PstI-SphI* à la différence de *xlnA/SphI-BglII*, possède un "RBS". Ce "RBS" est très proche du gène *xylE* dans la construction de pIAF261 (Fig. 22). À partir de l'analyse détaillée de la séquence nucléotidique de la région de fusion (*xlnC/PstI-SphI*)-*xylE* (Fig. 25), dans la construction de pIAF261 (Fig. 20), on peut penser, que l'ARN polymérase, qui se fixe d'abord aux alentours du promoteur présumé de *xlnC/PstI-SphI*, initie la transcription de façon efficace. Ici aussi, la séquence "leader" est très courte et la fixation des ribosomes peut commencer soit à partir du premier "RBS" (celui du gène *xlnC/PstI-SphI*) ou au niveau du second (celui du gène *xylE*). Car, le second "RBS" est contigu au premier (Fig. 25). Dans les deux cas, la traduction de l'ARNm commencera à partir de l'ATG de départ du gène *xylE*.

3.2 Fusions des promoteurs du gène *xlnA* avec le gène *xyle* dans les plasmides pIAF254, pIAF256, pIAF258 et du gène *xlnB* avec le gène *xyle* dans le plasmide pIAF259

Dans la présente étude, les résultats obtenus à partir du dosage quantitatif de l'activité de la C230, nous montrent que les promoteurs (portés sur plasmide à copie multiple, pIJ4083) des plasmides pIAF254 (Fig. 13), pIAF256 (Fig. 15), pIAF259 (Fig. 18), sont faibles. Le promoteur de pIAF258 (Fig. 17) reste presque sans activité (Tableau 4) .

Lorsqu'on observe la fusion des gènes *xlnA/BglIII-NotI* (pIAF254), *xlnA/SphI-NotI* (pIAF256), *xlnA/SphI-PstI* (pIAF258) et *xlnB/BclI* (pIAF259) avec le gène *xyle* (Fig. 22), toutes ces fusions possèdent deux "RBS", comme chez pIAF261 (section 3.1). Mais cependant, à la différence de pIAF252 et pIAF261, les promoteurs des plasmides pIAF254, pIAF256, pIAF258 et pIAF259 sont beaucoup plus distants du "RBS" de *xyle* (Fig. 22). Il en va de soi que le "RBS" de ces derniers soit aussi éloigné de celui de *xyle*.

Une analyse plus précise de la séquence nucléotidique du promoteur présumé de *xlnA/BglIII-NotI*, fusionné avec le gène *xyle* (Fig. 24) dans le plasmide pIAF254 (Fig. 13) nous montre, que la distance entre la région promotrice et le "RBS" du gène *xyle* est de 351 nucléotides. Cet écart devient plus élevé dans les fusions de *xyle* avec les gènes *xlnA/SphI-NotI*, *xlnA/SphI-PstI*, *xlnB/BclI* (Fig. 22). À partir de ces observations, on peut supposer, que la distance remarquable entre les promoteurs présumés des plasmides pIAF254, pIAF256, pIAF258, pIAF259 et le "RBS" de *xyle*,

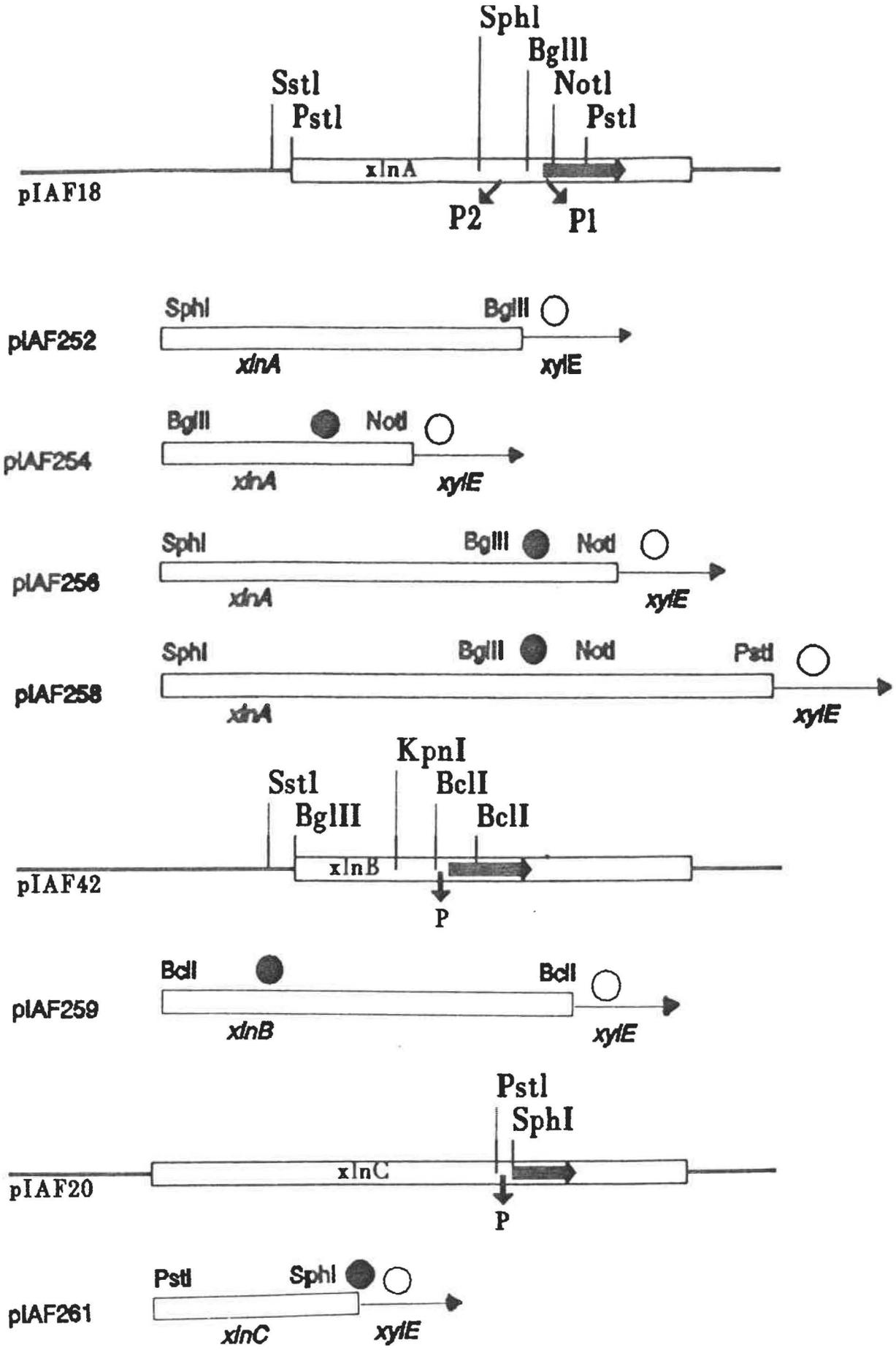
nuirait à la continuation de la traduction de l'ARNm par les ribosomes, initiée à partir du premier "RBS" (celui des gènes *xlnA* et *xlnB*). Cette interruption pourrait être due à la formation de structures secondaires "hairpin" de l'ARNm, au niveau de la séquence "leader", située entre le début de l'initiation de la transcription à partir du promoteur et le codon de départ ATG de *xylE*. Devant un "hairpin" ou des codons "arrêt" répétés, les ribosomes peuvent s'immobiliser lorsqu'ils entrent en contact avec les "release factors". Ce qui provoquerait le détachement des ribosomes de l'ARNm. Ce genre d'interruption occasionne donc des avortements de la traduction. On peut alors penser, que le promoteur testé est inefficace (Roberts *et al.*, 1979a, b). Ces différentes hypothèses nous aident mieux à comprendre pourquoi les promoteurs des plasmides pIAF254, pIAF256 et pIAF259 sont faibles.

Dans le but d'avoir un haut niveau de l'expression du gène, l'emploi d'un promoteur fort n'est pas le seul critère, l'utilisation d'un "RBS" efficace ou séquence de Shine-Dalgarno (SD) (Shine et Dalgarno, 1975), en est un autre. Une fixation plus solide du ribosome sur l'ARNm, provoquerait une liaison forte entre la séquence SD de l'ARNm et la séquence 3' de l'ARNr (Steitz, 1979), ce qui permettrait d'augmenter le niveau de traduction. Des études menées par Wagner *et al.* (1994), ont montré qu'une liaison plus étroite des ribosomes avec leur site de fixation, provoquerait une protection du transcrite de l'ARNm contre l'attaque des endoribonucléases. Dans ces conditions, l'ARNm se dégradera moins vite et sera par conséquent plus stable. C'est peut être une des raisons, pouvant

expliquer la production en grande quantité de la C230 chez les plasmides pIAF252 (Fig. 11) et pIAF261 (Fig. 20) (Tableau 4), vu qu'en plus, les promoteurs présumés de ces derniers sont plus proches du "RBS" du gène *xylE*. Comme le gène *xylE* a un site "RBS" très efficace, les promoteurs des plasmides pIAF254 (Fig. 13), pIAF256 (Fig. 15), pIAF258 (Fig. 17) et pIAF259 (Fig. 19), pourraient être rendus plus forts, en les rapprochant du gène *xylE*, par délétion à l'exonucléase III de la région de fusion en amont du gène *xylE* jusqu'à proximité du promoteur.

D'autre part, pour diminuer, voire supprimer, la répression catabolique que le glucose exerce sur les promoteurs des gènes *xlnA/BglII-NotI* du plasmide pIAF254 (Fig. 13) et *xlnB/BclI* du plasmide pIAF259 (Fig. 18), on pourra muter les régions promotrices impliquées dans cette répression, par la méthode de la mutagenèse dirigée.

FIGURE 22 : Représentation schématique des promoteurs des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*, fusionnés avec le gène *xylE*, ainsi que les sites de fixation de ribosome des différents gènes.



Légende: ○ Site de fixation du ribosome du gène *xyIE*
 ● Site de fixation du ribosome des gènes *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*

FIGURE 23 : Séquence nucléotidique de la fusion du promoteur de *xlnA/SphI-BglIII* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF252.

GCATGCNNNCCTGGCCGGCAAGTCACACCTCCGCAGATCAGAGCTTGCGGCAGCACGCTGATGCC
SphI
 TCATGAGTACGTAAGCCGTGGGCCTGCGAGATCGCGTCCCGGGCAAGGCGATGCACGCAGCCGTG
 TTTCTCGGAACCAGCGCAGCACCAGACCGCCTGGCGAACGGGCCAGGTCTGGGAGAGCCCTTCGG
 CGTGCCGATCCTGCGCCGGTGGGCGGCCAGCAGCCGGGCGAGGGAACTTGACGATGTGGCGTGGG
 -35
 ACGTCGAGCGTGGCAGCATAAGTGACCAACGTGAAGCCTCTGTTCGAGCGGACATGATCCCGGCA
 -10
 GAGCAGTCCTACCAGGGCTACGCCTGCTGCCCGCGGCGTCACCCGAAGATCTGTCATGATGATCA
BglII pSL1180

TTGCAATTGGATCC
BamHI

TCTAGAGTCACTTTCGCCACGTTGGCGGAAACAAACCT
XbaI pIJ4083

GACAACATG
xyle

AACTATGAAGAGGTGACGTCATG
 RBS M

FIGURE 24 : Séquence nucléotidique de la fusion du promoteur de *xlnA/BglIII-NotI* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF254.

GATCTACCCGATGCCGCACGTACACGGCAGGCCGCCCGTGACGGCTCACGACCTCGCAGATCA
BglIII

GGCCCGACTCACTCGATTT**CGAAACTTTTCGCACAATAACTGAAACTTTTCCGGCGCCAAGTATTG**
-75 -55

ACCGAGCATCGTCAACACCTCAATCATTCTGTCTGACTTCCCTGCGCTCCAGTCCTTCCGTGAC
-35 -10

CACTACTTT**GGAGGCACAGTCATGGGCTCCTACGCCCTTCCCAGATCAGGTGTCCGCAGGAGCAT**
RBS M

TCGCGTCTGTGCTTGCGGCGCTGGTCGTTCGGCGTACTCGGCACGGCCACCGCACTGATCGCGCCGC

CGGGGGCACACGCCGCCGAGAGCACGCTCGGCGCCGCGGCGGCGCAGAGCGGGCCGCTG**CGAGCTG**
NotI

ECGCCATCGATACGGGTACGTCCGGACCGCGGACATGTACA
pSL1190

GAGCTCGGTACCCGGGGATCCT
SacI *BamHI*

CTAGAGTCACTTTCGCCACGTTGGCGGAAACAAACCT
XbaI pIJ4083

GACAACATGAACTATGAAGAGGTG
xylE RBS

ACGTCATG
M

FIGURE 25 : Séquence nucléotidique de la fusion du promoteur de *xlnC/PstI-SphI* avec le gène *xylE*, dans le plasmide pIAF261.

CTGCAGACTCGACTCCTAAGGTCGTCGAATGTTTCGAAGAATGTGCGTGTGATTGCGTATTTCTT
PstI
 TCCTGTTCCCTCTTCTCGTTGCTCAGATGCTTCGGGCGCGAGGTGCTGTGACATGTAGTTCGTCTT
 AGCCAAGGCCTCCGCCC CGAACGGAAGGTTTCCGAAAGTCTGTGAAACTGTTGACAGGGTCTA
 TGGCGTCCTACGAAAACTGTGGCCACCGAACGACAGGAAGGCCGTCCGTTCCGCTCGCGACATGT
 -35
 GACCGTTCGCGGCGTGACGGACCGGGGGCGGCCCCCGTGGTTCGGGCAAGGCCGCGGGCCGGAGA
 -10
 GACCGTTCGCGGCGTGACGGACCGGGGGCGGCCCCCGTGGTTCGGGCAAGGCCGCGGGCCGGAGA
 AGCCGCCCCACCAGCCTTCATCAGGAGAACGCATGCGCAAATTTAAAGCGCTGATATCGATCGCG

RBS *SphI*

CGCAGATCTGTGATGATGATCATTTGCAATTTGGATCC
 pSL1180 *BamHI*

TCTAGAGTCACTTTCGCCACGTTGGCG
XbaI pIJ4083

GAAACAAACCT

GACAACATGAACTATGAAGAGGTGACGTCATG
xyle RBS M

CONCLUSION

Dans la présente étude, l'utilisation du gène *xylE* de *P. putida*, comme gène rapporteur dans les plasmides pIJ4083 et pXE4, nous a permis de localiser les fragments de promoteurs des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*. Ainsi, l'activité promotrice du gène de *xlnA* a été localisée dans les fragments *SphI-BglIII*/700 pb, *BglIII-NotI*/400 pb et *SphI-NotI*/1100 pb. Celle du gène *xlnB*, a été localisée dans le fragment *BclI*/1000 pb. L'activité promotrice dans le gène *xlnC*, a été localisée dans le fragment *PstI-SphI*/350 pb.

Cette étude nous a aussi permis d'évaluer l'activité promotrice des différentes constructions plasmidiques:

- . Le plasmide pIAF252 (Fig. 11) possède une activité promotrice moins élevée en milieu contenant du xylane. Par contre, cette activité est plus élevée en présence du xylose. Le promoteur du plasmide pIAF261 n'est pas réprimé par le glucose (Tableau 4).

- . Le promoteur du plasmide pIAF254 (Fig. 13) possède une activité négligeable en présence du xylane ou du xylose, utilisés comme seules sources de carbone. Le promoteur du plasmide pIAF254 est susceptible à la répression catabolique exercée par le glucose (Tableau 4).

- . Le plasmide pIAF256 (Fig. 15) possède une activité promotrice négligeable en milieu contenant 1% de xylane ou 1% de xylose. L'activité promotrice du plasmide pIAF256 est moins forte en présence du glucose. Le plasmide pIAF258 (Fig. 17) n'a aucune activité en milieu contenant du glucose, du xylane ou du xylose (Tableau 4).

- . Le plasmide pIAF259 possède une très faible activité promotrice sur les

milieux contenant du xylane et du xylose. Le promoteur du plasmide pIAF259 est réprimé par le glucose (Tableau 4).

. Le plasmide pIAF261 (Fig. 20) possède une forte activité en milieu contenant du xylane et du xylose. Le promoteur du plasmide pIAF261 n'est pas réprimé par le glucose (Tableau 4).

. Le promoteur du plasmide pIAF262 est réprimé par le glucose et le xylose (Tableau 6). Cette dernière observation est d'une grande portée, car le promoteur du gène *xlnC*, est généré en copie unique, comme en conditions physiologiques normales. La régulation avec le clone pIAF262 nous a montré, à quel point un gène peut être dosé, lorsque porté sur un plasmide à copie multiple.

À partir de cette étude, on a pu démontrer, que la régulation des promoteurs portés sur un plasmide à copie multiple, peut se révéler trompeuse, due au nombre de copie du plasmide.

Toutefois, en se servant des clones à copie multiple et unique des promoteurs des différents gènes *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, obtenus dans cette étude, on pourra:

. Étudier et comprendre d'avantage les mécanismes de régulation des gènes impliqués dans la répression catabolique et dans la production des enzymes xylanolytiques.

. Envisager une augmentation de la production des xylanases ou d'autres enzymes hydrolytiques extracellulaires au niveau industrielle, en améliorant la force des promoteurs testés.

D'autre part, la souche *S. lividans* 10-164 est un mutant pléiotropique, elle

possède une perméase défectueuse, empêchant le transport du xylobiose. Comme il a déjà été mentionné en section introduction (2.0), le xylobiose est transporté activement à l'intérieur de la cellule pour être hydrolysé. Le xylobiose étant le principal inducteur du système xylanolytique, des expériences similaires pourront être menées avec d'autres souches, tels le mutant 8-83 (Cel⁻) ou *S. lividans* 1326, afin de comprendre d'avantage, les résultats obtenus dans cette étude.

REMERCIEMENTS

Je remercie très particulièrement mon directeur de recherche, François Shareck, pour son apport financier et moral, son encadrement tout au long de ce projet de maîtrise.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le groupe des streptomycètes, particulièrement à Dieter Kluepfel, sans oublier Rolf Morosoli et la technicienne Lise Trempe.

Merci à l'I.A.F et à tous ceux qui de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser ce travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

ASTRID K. P., X. WU., K. L. ROY et S. E. JENSEN. 1992. Transcriptional analysis of the isopenicillin N synthase-encoding gene of *Streptomyces clavuligerus*. *Gene* 111:77-84.

BALTZ, R. H. 1986. Mutation in *Streptomyces*. In S.W. Queener and L. E. Day (ed), *The Bacteria. Antibiotic-Producing Streptomyces*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla. 9:61-94.

BANNER, C. D. B., C. P. Jr. MORAN, R. LOSICK. 1983. Deletion analysis of a complex promoter for a developmentally regulated gene from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 168:351-365.

BASTAWDE, K. B. 1987. Studies on xylanase by *Chainia* sp. Ph.D. Thesis, Pune University, Pune, India.

BAYLIS, H. A. et M. J. Bibb., 1988. Transcriptional analysis of the 16S rRNA gene of the *rrnD* gene set of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 2:569-579.

BENIGNI, R., R. P. ANTONOV ET L. A. CARERE. 1975. Estimate of the genome size by renaturation studies in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.* 30:324-326.

BERDY, J. 1980. Recent advances in and prospects of antibiotic research. *Process Biochem.* Oct.-Nov.:28-35.

BIBB, M. J., J. M. WARD, T. KIESER, S. N. COHEN et D. A. HOPWOOD. 1981. Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* 184:230-240.

BIBB, M. J. et S. N. COHEN. 1982. Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* 187:265-277.

BIELY, P. et E. PETRÁKOVA. 1984. Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*. *J. Bacteriol.* 160: 408-412.

BRAWNER, M. E., J. I. AUERBACH, J. A. FORNWALD, M. ROSENBERG et D. P. TAYLOR. 1985. Characterization of *Streptomyces* promoter sequences using the *Escherichia coli* galactokinase gene. *Gene* 40: 191-201.

BROSIUS, J. 1989. Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA* 8:759-777.

BRUTON, C., GUTHRIE, E. P. et CHATER, K. F. Phage vectors that allow monitoring of transcription of secondary metabolism genes in *Streptomyces*. Communication. John Innes Institute, John Innes Centre for Plant Science, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, U.K.

BURGESS, R. R. A. A. TRAVERS, J. J. DUNN et E. K. F. BAUTZ. Factor stimulating transcription by RNA Polymerase. 1969. *Nature* 221:43-46.

BUTTNER, M. J., I. M. FEARNLEY et M. J. BIBB. 1987. The agarase gene (dag A) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* 209:101-109.

BUTTNER, M. J., A. M. SMITH et M. J. BIBB. 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (dag A) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell* 52:599-607.

CHATER, K. F. 1972. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 72:9-28.

CHATER, K. F. et MERRICK M. J. 1979. In *Developmental Biology of Prokaryotes*, J. H. Parish, Ed. (Blackwell, Oxford), p. 93.

CHATER, K. F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In R. Losick and L. Shapiro (ed.), *Microbial development*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 89-115.

CHATER, K. F., E. J. LAWLOR, C. MENDEZ, C. J. BRUTON, N. K. DAVIS, K. PLASKITT, E. P. GUTHRIE, B. L. DALY, H. A. BAYLIS et K. VUTRONG. 1988. Gene expression during *Streptomyces* development. *Proc. of*

Int. Symp. of Actinomycete Biology. Tokyo.

CHATER, K. F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. Trends in Genetics 5:372-377.

CHATER, K. F. et C. J. BRUTON. 1985. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. EMBO J. 4:1893-1897.

CHATER, K. F., C. J. BRUTON, K. A. PLASKITT, M. J. BUTTNER, C. MENDEZ et J. D. HELMANN. 1989. The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility σ factor of *B.subtilis*. Cell 59:133-143.

CLAYTON, T. M. et BIBB, M. J. 1990. *Streptomyces* promoter-probe plasmids that utilise *xylE* gene of *Pseudomonas putida*. Nucleic Acids Res. 18:1077.

DAVIS, N. K. et K. F. CHATER. 1990. Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. Mol. Microbiol. 4:1679-1691.

de CROMBRUGGHE, B., et I. PASTAN. 1980. In: The Operon, eds. Miller, J. H. & Reznikoff, W. S. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), pp. 303-324.

de CROMBRUGGHE, B., B. CHEN, M. GOTTESMAN, I. PASTAN, H. E. VARMUS, M. EMMER et R. PERLMAN. 1971. Regulation of *lac* mRNA synthesis in a soluble cell-free system. Nat. New Biol. 230:37-40.

de CROMBRUGGHE, B., S. BUSBY, H., BUC. 1984. Activation of transcription by the cyclic AMP receptor protein. Science. 224:831-37.

DILLS, S. S., A. APPERSON, M. R. SCHMIDT, M. H. Jr. SAIER. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. Microbiol. Rev. 44:385-418.

ECKHARDT, T. et R. SMITH. 1987. M. Alacević, D. Hranueli, and Z. Toman (ed.), Proceedings of the International Symposium on the Genetics of Industrial

Microorganisms, Split, Yugoslavia.

ENGLESBERG, E. et G. WILCOX. 1974. Regulation: Positive control. *Ann. Rev. Genet.* 8:219-42

ENQUIST, L. W et S. G. BRADLEY. 1971. Characterization of deoxyribonucleic acid from *Streptomyces venezuelae* spores. *Develop. Ind. Microbiol.* 12:225-236.

ENTIAN, K. D., E. KOPETZKI, K. U. FROHLICH. et D. MECKE. 1984. Cloning of hexokinase isoenzyme PI from *Saccharomyces cerevisiae*: PI transformants confirm the unique role of hexokinase isoenzyme PII for glucose repression in yeasts. *Mol. Gen. Genet.* 198:50-54.

FEITELSON, J. S., A. M. SINHA et E. A. COCO. 1986. Molecular genetics of *red* biosynthesis in *Streptomyces*. *J. Natl. Prod.* 49:988-994.

FEITELSON, J. S. 1988. An improved plasmid for the isolation and analysis of *Streptomyces* promoters. *Gene* 66:159-162.

FORNWALD, J. A., F. J. SCHMIDT, C. W. ADAMS, M. ROSENBERG et M. E. BRAWNER. 1987. Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:2130-2134.

FORSMAN, M. et B. JAURIN. 1987. Chromogenic identification of promoters in *Streptomyces lividans* by using an *ampC* beta-lactamase promoter-probe vector. *Mol. Gen. Genet.* 210:23-32.

HARA, O., et T. BEPPU. 1982. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*. The role of A-factor. *J. Antib.* 35: 349-358.

HASTINGS, J. W. et Q. H. GIBSON. 1963. Intermediates in the Bioluminescent Oxidation of Reduced Flavin Mononucleotide. *J. Biol. Chem.* 238:2537.

HODGSON, D. A. et K. F. CHATER. 1981. A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3(2), and its

inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1. *J. Gen. Microbiol.* 124:339-348.

HODGSON, D. A. 1982. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128:2417-2430.

HOPWOOD, D. A et H. M. WRIGHT. 1978. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 162:307-317.

HOPWOOD, D. A., H. WILDERMUTH, et H. M. PALMER. 1970. Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. *J. Gen. Microbiol.* 61:397-408.

HOPWOOD, D. A., M. J. BIBB, K. F. CHATER, T. KIESER, C. J. BRUTON, H. M. KIESER, D. J. LYDIATE, C. P. SMITH, J. M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, A laboratory manual, The John Innes Foundation (Eds), Norwich, pp:213-243.

HORINOUCI, S et T. BEPPU. 1985. Construction and application of a promoter-probe plasmid that allows chromogenic identification in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 162:406-412.

HORINOUCI, S., H. SUZUKI et T. BEPPU. 1986. Nucleotide sequence of *asfB*, a pleiotropic gene involved in secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 168: 257-269.

HRMOVA, M., P. BIELY, M. VRSANSKA et E. PETRAKOVA. 1984. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*. *Archives of Microbiology.* 161:371-376.

IKEDA, H., E. T. SENO, C. J. BRUTON et K. F. CHATER. 1984. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196:501-507.

INGRAM, C., M. BRAWNER, P. YOUNGMAN, J. WESTPHELING. 1989. *xyIE*

functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces spp.*: Use for the study of galP1, a catabolite-controlled promoter. J. Bacteriol. 171: 6617-6624.

JAURIN, B., T. GRUNDSTRÖM, T. EDLUND et S. NORMARK. 1981. The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth-rate-dependent regulation. Nature 290:221.

JAURIN, B. et S. N. COHEN. 1984. *Streptomyces lividans* RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcriptional signals. Gene 28:83-91.

JAURIN, B. et S. N. COHEN. 1985. *Streptomyces* contain *Escherichia coli*-type A+T-rich promoters having novel structural features. Gene 39:191-201.

JOBE, A. et S. BOURGEOIS. 1972. *lac* repressor-operator interaction. VI. The natural inducer of the *lac* operon. J. Mol. Biol. 75:303.

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

KESKAR, S. S. 1990. Endoxylanases of *Streptomyces* T7. Ph.D. Thesis, Poona University, Pune, India.

KIESER, T., D. A. HOPWOOD, H. M. WRIGHT et C. J. THOMPSON. 1982. pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. Mol. Gen. Genet. 185:223-238.

KIESER, T., M. T. MOSS, J. W. DALE, et D.A. HOPWOOD. 1986. Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in "*Streptomyces lividans*". J. Bacteriol. 168:72-80.

KING, A. et K. F. CHATER. 1986. The expression of the *Escherichia coli lacZ* gene in *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol. 132:1739-1752.

KLUEPFEL, D. et M. ISHAQUE. 1982. Xylan induced cellulolytic enzymes in *Streptomyces flavogriseus*. Developments in Industrial Microbiology. 23:389-396.

KLUEPFEL, D., F. SHARECK, F. MONDOU et R. MOROSOLI. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:230-234.

KLUEPFEL, D., S. VATS-MEHTA, F. AUMONT, F. SHARECK et R. MOROSOLI. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans*. Biochem. J. 267:45-50.

KLUEPFEL, D., R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1991. "Homologous cloning of the xylanase genes and their expression in *Streptomyces ivedans* 66" dans Genetics and product formation in *Streptomyces*. Baumberg, Krügel et Noack (Eds), New-York, pp:207-214.

KUSAKABE, I., T. YASUI et T. KOBOYASHI. 1977. Purification and some properties of extracellular xylanase from *streptomyces* sp. E-18. Nippon Nagei Kaga Ku Kaishi 51:429-437.

LAWLOR, E. J., H.A. BAYLIS, et K. F. CHATER. 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene incoding a tRNA-like product in *Streptomyces ceolicolor* A3(2). Gene Dev. 1:1305-1310.

LESKIW, B. K., E. J. LAWLOR, J. M. FERNANDEZ-ABALOS et K. F. CHATER. 1991. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative *Streptomyces* mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:2461-2465.

LIN, E. C. C. 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 30:535-578.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

LYDIATE, D. J., F. MALPARTIDA et D. A. HOPWOOD. 1985. The *Streptomyces* plasmid SCP2*:its functional analysis and development into useful cloning vectors. 1985. Gene. 35:223-235.

MALPARTIDA, F. et D. A. HOPWOOD. Molecular Cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. 1984. *Nature*. London. 309: 462-464.

MANIATIS, T., E. F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (Eds), New-York, pp:187-210.

MARTIN, J. F. et A. L. DEMAINE. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44:230-251.

MARUI, M., K. NAKANISHI et T. YASUI. 1985. Immunological properties and constituent amino acids of three xylanases produced inductively from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* 49:3409-3413.

MATSUMOTO, K., I. UNO, T. ISHIKAWA et Y. OSHIMA. Cyclic AMP may not be Involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants unable to Synthesize it. 1983. *J. Bacteriol.* 156:898-900.

McVITTIE, A. 1974. Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 81:291-302.

NAKAJIMA, T., K. TSUKAMOTO, T. WATANABE, K. KAINUMA et K. MATSUDA. 1984. Purification and some properties of an endo-1, 4- β -D-xylanase from *Streptomyces* sp. *J. of Ferm. Techn.* 62:269-276.

NAKANISHI, K., T. YASUI et T. KOBAYASHI. 1976a. Inducer for the xylanase production by *Streptomyces* sp. *Journal of Fermentation Technology* 54:801-807.

NAKANISHI, K., T. YASUI et T. KOBAYASHI. 1976b. A preliminary experiment on xylanase production by *Streptomyces* sp. *Journal of Fermentation. Technology* 54:813-817.

OSHIMA, Y. 1982. In the *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, eds. Strathern, J. N., Jones, E. W. &

Broach, J. R. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), pp. 159-180.

PASTAN, I. et S. ADHYA. 1976. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Esherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40:527-551.

PETRICH, A. K., X. WU, K. L. ROY et S. E. JENSEN. 1992. Transcriptional analysis of the isopenicillin N synthase-encoding gene of *Streptomyces clavuligerus*. *Gene* 111:77-84.

PRIBNOW, D. 1975. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:784-788.

RATTO, M. et K. POUTANEN. 1988. Production of mannan-degrading enzymes. *Biotechnol. Lett.* 10:661-664.

RAY, C., M. IGO., W. SHAFER., R. LOSICK et C. P. MORAN. 1988. Suppression of *ctc* promoter mutations in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 900-907.

REILLY, P. J. 1981. Xylanase: structure and function. *Basic Life Sciences* 18:111-129.

ROBERTS, T. M., R. KACICH et M. PTASHNE. 1979a. A general method for maximizing the expression of a cloned gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5596.

ROBERTS, T. M., S. L. SWANBERG, A. POTEETE, G. RIEDEL et K. BACKMAN. 1979b. A plasmid cloning vehicle allowing a positive selection for inserted fragments. *Gene.* 12:123.

RODICIO, M. R., C. J. BRUTON et K. F. CHATER. 1985. New derivatives of the *Streptomyces* temperate phage ϕ C31 useful for cloning and functional analysis of *Streptomyces* DNA. *Gene* 34:283-292.

ROSENBERG, M., M. BRAWNER, J. GORMAN et M. REFF. 1986.

Galactokinase gene fusion in the study of gene regulation in *E. coli*, *Streptomyces*, *yeast*, and higher cell systems, p. 151-186. In J. K. Setlow and A. Hollaender (ed.), Genetic engineering, vol. 8. Plenum Publishing Corp., New York.

ROSENBERG, M et D. COURT. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13:319.

SADLER, J., M. TECKLENBURG, J. BETZ, D. GUEDEL, D. YANSURA et M. CARUTHERS. 1977. Cloning of chemically synthesized lactose operators. *Gene.* 1:21-305.

SALA-TREPAT, J. M et W. C. EVANS. 1971. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species. 4-oxalocrotonate pathway. *Eur. J. Biochem.* 20:400-413.

SANCHEZ, S., et C. M. QUINTO. 1975. D-Glucose isomerase: constitutive and catabolite repression-resistant mutants of *Streptomyces phaeochromogenes*. *Appl. Microbiol.* 30:750-754.

SCHAUER, A., M. RANES, R. SANTAMARIA, J. GUIJARRO, E. LAWLOR, C. MENDEZ, K. CHATER et R. LOSICK. 1988. Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Science* 240:768-772.

SETLOW, P. 1973. Inability to detect cyclic AMP in vegetative or sporulating cells or dominant spores of *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:365-372.

SHARECK, F., C. ROY, M. YAGUCHI, R. MOROSOLI, D. KLUEPFEL. 1991. Nucleotide sequence of the xylanase A, B and C genes of *Streptomyces lividans*. *Gene* 107:75-83.

SHINE, J. et L. DALGARNO. 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature.* 254:34.

STEIN, D et S. N. COHEN. 1989. A cloned regulatory gene of *Streptomyces lividans* can suppress the pigment deficiency phenotype of different developmental

mutants. *J. Bacteriol.* 171:2258-2261.

STEITZ, J. A. 1979. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In *Biological regulation and development* (ed. R. F. Goldberger). Plenum Press, New York. 1:349.

STEPHANO, J. E et J. D. GRALLA. 1982. Spacer mutations in the *lacP*^o promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:1069-1072.

STRAGIER, P., F. RICHAUD, F. BORNE et J. C. PATTE. 1983. Regulation of diamino-pimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. *J. Mol. Biol.* 168:307-20.

ULLMANN, A., et A. DANCHIN. 1983. Role of cyclic AMP in bacteria. In *advances in Cyclic Nucleotide Research*. ed P. Greengard, G. A. Robison. New York: Raven 15:1-53.

VATS-MEHTA, S., P. BOUVRETTE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1990. Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans* 66. *Gene* 86:119-122.

VON HIPPEL, P. H., D. G. BEAR, W. D. MORGAN, J. A. McSWIGGEN. 1984. Protein-nucleic acid interactions in transcription: A molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53:389-446.

WARD, J. M., G.R. JANSSEN, T. KIESER, M. J. BIBB, M. J. BUTTNER et M. J. BIBB. 1986. Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478.

WESTPHELING, J et M. BRAWNER. 1989. Two transcribing activities are involved in expression of the *Streptomyces* galactose operon. *J. Bacteriol.* 171:1355-1361.

WESTPHELING, J., M. RANES et R. LOSICK. 1985. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* 313:22-27.

WILLIAMS, S. T., M. GOODFELLOW, G. ALDERSON, E. M. H. WELLINGTON, P. H. A. SNEATH et M. J. SACKIN. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743-1813.

WOODWARD, J. 1984. Xylanases: functions, properties and applications: Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. 8:9-30.

ZUBER, P., J. M. HEALY et R. LOSICK. 1987. Effects of plasmid propagation of a sporulation promoter on promoter utilization and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169:461-464.

ZUKOWSKI, M. M., D. F. GAFFNEY, D. SPECK, M. KAUFFMANN, A. FINDELI, A. WISECUP et J. P. LECOCQ. 1983. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:1101-1105.

ZUKOWSKI, M. M et L. MILLER. 1986. Hyperproduction of an intracellular heterologous protein in a *sacU^h* mutant of *Bacillus subtilis*. *Gene* 46:247-255.