INRS-Institut Armand-Frappier

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION DE PROTÉINES D'INTÉRÊT CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS* DANS UNE SOLUTION RÉSIDUELLE DE LACTOSÉRUM

Par

Marie-Hélène Mondou

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Charles Dozois, INRS-IAF
Examinateur externe	France Daigle Université de Montréal
Directeur de recherche	François Shareck, INRS-IAF
Codirecteur de recherche	Pierre Lemieux Technologie Biolactis Inc.

Droits réservés de Marie-Hélène Mondou, 2006

Résumé

La plupart des systèmes d'expression étant dispendieux et limités, la demande pour des systèmes souples, peu onéreux et utilisant des résidus provenant d'une autre industrie est grandissante. Technologie Biolactis Inc. a été créée dans le but de récupérer et de valoriser le lactosérum obtenu lors de la production fromagère. En utilisant cette solution pour produire une matrice protéique malléable, une solution résiduelle (SR) possédant des qualités en tant que milieu de culture pour les streptomycètes est générée. Étant donné la capacité des streptomycètes à produire de façon efficace des protéines autant homologues qu'hétérologues, le développement d'un système d'expression chez *Streptomyces lividans* dans la SR a été entamé. Une protéine d'intérêt thérapeutique d'origine humaine, la lactoferrine (Lf), a été sélectionnée afin d'être produite.

Dans le cadre de la production de Lf, une fois son effet antibactérien sur l'hôte évalué et considéré non-limitant, le gène recombinant a été synthétisé et cloné dans *S. lividans* 10-164. La présence d'ARNm de Lf a été confirmée dans plusieurs constructions, mais la protéine n'a jamais été détectée. Pour ce qui est du développement du système d'expression, une courbe de croissance de *S. coelicolor* M145, proche parente de *S. lividans*, a été réalisée en SR. Par la suite, des expériences de biopuces ont été effectuées afin d'identifier des promoteurs spécifiques aux différentes phases de croissance. Les données recueillies ont été traitées par ANOVA à une valeur $p<0.0005$. Suite à l'analyse statistique, quelques promoteurs ont été identifiés dont ceux d'un gène constitutif, de gènes induits durant la croissance active et de gènes induits tardivement.

Marie-Hélène Mondou
Étudiante

François Shareck
Directeur de recherche

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier François Shareck de l'INRS-Institut Armand-Frappier et Pierre Lemieux de Technologie Biolactis Inc. pour m'avoir permis de faire ma maîtrise sous leur direction. Je voudrais aussi remercier Philippe Goyette pour sa supervision et ses précieux conseils en début de projet.

Pour leur soutien et pour avoir écouté mes tranches de vie durant ces deux années, je voudrais remercier Louis-Philippe Précourt et Josée Beaulieu. Pour leurs idées et solutions aux nombreux problèmes survenus durant mon projet, je voudrais remercier les équipes de recherche de François Shareck, Technologie Biolactis Inc. et Claude Dupont. Je voudrais également remercier les stagiaires Marie-Ève Brault pour les recherches préliminaires effectuées avant mon arrivée et Richard Trachy pour son aide dans la réalisation de mon projet. Enfin, pour leur aide précieuse dans la compréhension de mes résultats de biopuces, Barbara Augustin du laboratoire de Charles Dozois, INRS-IAF, et Sébastien Faucher du laboratoire de France Daigle, Université de Montréal.

Pour terminer, je voudrais remercier ma famille et en particulier ma sœur, pour son aide en fin de rédaction et les nombreux appels téléphoniques, ainsi que mon mari pour son soutien incroyable.

Merci à tous!

Liste des figures

		Page
Figure 1:	Schéma du système sans cellule à échange continu (CECF) de Roche.	16
Figure 2:	Histogramme de la biomasse de *Streptomyces lividans* 10-164 dans différents milieux après plusieurs temps de culture.	21
Figure 3:	Cycle de vie de *Streptomyces*.	23
Figure 4:	Carte génétique et physique du chromosome de *Streptomyces coelicolor* M145.	25
Figure 5:	Différentes conformations de la lactoferrine.	28
Figure 6:	Produits commercialisés, ou en voie de l'être, contenant de la lactoferrine.	35
Figure 7:	Exemple de résultat d'une analyse de biopuce.	39
Figure 8:	Graphique représentant les résultats obtenus d'une analyse de biopuce.	39
Figure 9 :	Vecteurs initiaux utilisés pour le clonage du gène de la lactoferrine recombinante humaine tronquée.	46
Figure 10 :	Vecteurs contenant le gène de la lactoferrine recombinante humaine tronquée.	49
Figure 11 :	Autres vecteurs.	50
Figure 12 :	Courbe de tendance représentant le nombre de protoplastes de *S. lividans* 10-164 en fonction de la densité optique.	68
Figure 13 :	Disposition des spots sur les biopuces de *S. coelicolor* M145.	81
Figure 14 :	Test d'inhibition de croissance de *Streptomyces lividans* 10-164/C109 par la lactoferrine bovine.	89
Figure 15:	Utilisation des codons dans le gène de la lactoferrine recombinante humaine tronquée en comparaison à ceux présents dans la lactoferrine humaine native.	89

Figure 16:	Séquence du gène recombinant de la lactoferrine humaine tronquée.	91
Figure 17 :	Détection du gène de la lactoferrine chez les transformants de *S. lividans* 10-164 par amplification PCR.	92
Figure 18 :	Évaluation de l'activité xylanolytique des souches de *S. lividans* 10-164 contenant différentes formes du gène de la $Lf_{hr}tr$ à l'intérieur de l'opéron *XlnB*.	96
Figure 19 :	Détection d'ARNm provenant du gène de la lactoferrine dans les différentes souches produites.	97
Figure 20 :	Profil protéique du surnageant de culture de la souche *Streptomyces lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf.	99
Figure 21 :	Profil protéique des surnageants de culture concentrés de différentes souches contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$.	101
Figure 22 :	Immunodétection ECL anti-étiquette histidine présente sur la lactoferrine recombinante produite par certaines souches de *Streptomyces lividans* 10-164.	103
Figure 23 :	Immunodétection ECL anti-lactoferrine humaine des surnageants de culture concentrés de différentes souches contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$.	105
Figure 24 :	Évaluation de la quantité de $Lf_{hr}tr$ par ELISA dans les surnageants de culture des différentes souches sécrétrices produites.	106
Figure 25 :	Évolution d'une culture de *Streptomyces coelicolor* M145 en solution résiduelle.	109
Figure 26 :	Évolution d'une culture de *Streptomyces coelicolor* M145 en M14 xylose.	110
Figure 27 :	Diagramme de Venne représentant la répartition des gènes réprimés chez *S. coelicolor* M145 en SRD.	112
Figure 28 :	Région promotrice du gène de la β-galactosidase de *S. coelicolor* M145.	117
Figure 29 :	Évaluation de la production de XlnC avec le promoteur standard pC109 et le promoteur pβ-Gal.	119

Figure 30 : Région promotrice du gène constitutif SCO3783 de *S. coelicolor* M145. 132

Figure 31 : Région promotrice des gènes SCO5655 et SCO5656 de *S. coelicolor* M145. 132

Figure 32 : Séquences de la lactoferrine humaine complète. 148

Liste des tableaux

		Page
Tableau 1:	Composition chimique et minérale de la solution résiduelle (SR).	20
Tableau 2:	Liste des enzymes de restrictions utilisées et de leurs caractéristiques.	43
Tableau 3:	Liste des amorces de PCR, leur séquence et température d'hybridation à laquelle elles ont été utilisées.	44
Tableau 4 :	Gène induit constitutivement chez *S. coelicolor* M145 en SR.	114
Tableau 5 :	Gènes induits en début de croissance (t5 et t6.5) chez *S. coelicolor* M145 en SR.	114
Tableau 6 :	Gènes induits durant la croissance (t5, t6.5 et t10) chez *S. coelicolor* M145 en SR.	114
Tableau 7 :	Gènes induits en fin de croissance (t10 et t15) chez *S. coelicolor* M145 en SR.	114
Tableau 8 :	Gènes induits durant la phase stationnaire chez *S. coelicolor* M145 en SR.	115
Tableau 9 :	Gènes induits durant les deux phases exponentielles de croissance (t5 et t10) chez *S. coelicolor* M145 en SR.	116
Tableau 10 :	Gène induit durant la phase de transition chez *S. coelicolor* M145 en SR.	116
Tableau 11 :	Liste des gènes significatifs (valeur $p<0.0005$) lors de l'analyse statistique des biopuces de *S. coelicolor* M145.	150

Abréviations

A	adénosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Axe	acétylxylane estérase
CMI	concentration minimale inhibitrice
C	cytosine
Cy3	cyanine 3
Cy5	cyanine 5
^{0}C	degré celsius
DNase	désoxyribonucléase
G	guanosine
g	gramme
His	histidine
kDa	kilodaltons
Kb	kilobases
Lf	lactoferrine
$Lf_{hr}tr$	lactoferrine humaine recombinante tronquée
$Lf_{h}tr$	lactoferrine humaine tronquée
LPS	lipopolysaccharides
L	litre
LS	lactosérum
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
nm	nanomètre
pb	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PS	peptide signal
RNase	ribonucléase
RPM	révolutions par minute
RT-PCR	PCR en transcription inverse
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
SR	solution résiduelle
SRD	solution résiduelle digérée à la pronase
T	thymine

Tr	tronqué
V	volts
Xln	xylanase

Table des matières

RÉSUMÉ ..... **I**

REMERCIEMENTS ..... **II**

LISTE DES FIGURES ..... **III**

LISTE DES TABLEAUX ..... **VI**

ABRÉVIATIONS ..... **VII**

TABLE DES MATIÈRES ..... **VII**

INTRODUCTION **1**

1. REVUE DE LITTÉRATURE **4**

1.1. Systèmes d'expression de protéines d'intérêt actuels **5**
1.1.1. Mise en contexte 5
1.1.2. Systèmes d'expression procaryotes 5
1.1.2.1. *Escherichia coli* 5
1.1.2.2. Les streptomycètes 7
1.1.3. Systèmes d'expression eucaryotes 9
1.1.3.1. Les levures 9
1.1.3.2. Les moisissures 11
1.1.3.3. Les cellules eucaryotes 13
1.1.4. Systèmes d'expression d'organismes transgéniques 14
1.1.5. Système d'expression *in vitro* 15
1.1.6. Conclusion 18

1.2. La solution résiduelle **18**
1.2.1. L'industrie fromagère et le LS 18
1.2.2. Technologie Biolactis Inc. 19
1.2.3. Propriétés de la solution résiduelle (SR) 20

1.3. Les streptomycètes **21**
1.3.1. Généralités 21
1.3.2. Cycle de vie 22
1.3.3. Génétique 24
1.3.4. *Streptomyces lividans* 10-164 24

1.4. La lactoferrine (Lf) 26
1.4.1. Généralités 26
1.4.2. Structure 27
1.4.3. Fonctions 30
1.4.3.1. Influence sur la santé du nouveau-né 30
1.4.3.2. Activité antibactérienne 30
1.4.3.3. Activité antivirale 31
1.4.3.4. Activité anti-fongique 32
1.4.3.5. Activité anti-oxydante 32
1.4.3.6. Activité anti-cancéreuse 32
1.4.3.7. Modulation du système immunitaire 33
1.4.3.8. Régulation de la transcription 34
1.4.4. Production et utilisation actuelle 34

1.5. La transcriptomique 36
1.5.1. Mise en contexte 36
1.5.2. Les biopuces 36
1.5.3. Analyse des résultats obtenus avec les biopuces 37

2. MÉTHODOLOGIE 40

2.1. Matériel 41
2.1.1. Liste des produits utilisés 41
2.1.2. Liste des enzymes de restriction utilisées 43
2.1.3. Liste des amorces utilisées lors des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) 44
2.1.4. Description des vecteurs utilisés 44

2.2. Milieux de culture 51
2.2.1. *Escherichia coli* 51
2.2.1.1. Milieu 2xTY 51
2.2.1.2. Milieu Simmons citrate 51
2.2.2. Streptomycètes 51
2.2.2.1. Milieu R5 51
2.2.2.2. Milieu Bennett 52
2.2.2.3. Milieu riche TSB 52
2.2.2.4. Milieu minimal M14 53
2.2.2.5. Solution résiduelle digérée à la pronase (SRD) 53
2.2.2.6. Milieu Stewart RBB-xylane 54
2.2.3. Résistance aux antibiotiques 54

2.3. Manipulations des acides nucléiques 55
2.3.1. Protocoles concernant l'ARN 55
2.3.1.1. Extraction d'ARN du mycélium de streptomycètes 55
2.3.1.2. Analyse de l'ARN sur le BioAnalyzer de Agilent Technologies 57
2.3.1.3. Synthèse d'ADNc par transcriptase inverse 58

2.3.2. Protocoles concernant l'ADN 60
2.3.2.1. Évaluation de la concentration d'acide nucléique au spectrophotomètre 60
2.3.2.2. Amplification d'ADN par PCR 60
2.3.2.3. Synthèse du gène de la Lf_htr 61
2.3.2.4. Isolement de plasmides de streptomycètes 62
2.3.2.5. Électrophorèse sur gel d'agarose 63
2.3.2.6. Purification de fragments d'ADN d'un gel d'agarose 64
2.3.2.7. Digestion d'ADN par des endonucléases de restriction 65
2.3.2.8. Ligation d'ADN à un vecteur 66

2.4. Manipulations des streptomycètes 66
2.4.1. Préparation de protoplastes de *S. lividans* 10-164 66
2.4.2. Transformation de *Streptomyces lividans* 10-164 68
2.4.3. Culture de streptomycètes 69
2.4.4. Courbe de croissance de *Streptomyces coelicolor* M145 69
2.4.5. Lyse du mycélium de streptomycètes aux ultrasons 70
2.4.6. Précipitation des protéines du surnageant à l'acétone 71
2.4.7. Concentration du surnageant de culture de streptomycètes 71
2.4.8. Évaluation de l'effet antibactérien de la Lf sur les streptomycètes 72

2.5. Manipulations de *Escherichia coli* 73
2.5.1. Préparation de cellules compétentes *E. coli* DH11S 73
2.5.2. Transformation de *E. coli* 74
2.5.3. Isolement de plasmides 74

2.6. Manipulations des protéines 75
2.6.1. Analyse de la concentration protéique par la technique de Bradford 75
2.6.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant de type SDS-PAGE 76
2.6.3. Coloration d'un gel de polyacrylamide au Bleu de Coomassie 77
2.6.4. Transfert de protéines sur une membrane de type « Western Blot » 77
2.6.5. Immunodétection ECL 78
2.6.6. ELISA 79

2.7. Manipulations des biopuces 80
2.7.1. Biopuces de *S. coelicolor* M145 80
2.7.2. Coloration des biopuces au SYBR Green 82
2.7.3. Préparation de l'ADNc marqué au Cy3 et au Cy5 82
2.7.4. Pré-hybridation des biopuces 84
2.7.5. Hybridation des biopuces 84
2.7.6. Lecture de la biopuce 85
2.7.7. Analyse des résultats 85

3. RÉSULTATS 87

3.1. Production de lactoferrine humaine recombinante tronquée 88
3.1.1. Évaluation du pouvoir antibactérien de la Lf sur les streptomycètes 88
3.1.2. Construction du gène de la Lf humaine recombinante tronquée (Lf_{hr}tr) 88

3.1.3. Élaboration de différentes constructions contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$ 93
3.1.3.1. Constructions contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$ sécrétée 93
3.1.3.2. Constructions contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$ dans l'opéron *XlnB* 94
3.1.4. Évaluation de la présence d'ARNm de Lf dans les différentes souches 95
3.1.5. Évaluation de la présence de $Lf_{hr}tr$ dans le surnageant de culture des différentes souches produites 98
3.1.5.1. Visualisation de la $Lf_{hr}tr$ 98
3.1.5.2. Immunodétection 102
3.1.5.2.1. Immunodétection anti-étiquette His 102
3.1.5.2.2. Immunodétection anti-Lf 102
3.1.5.3. ELISA 104

3.2. Recherche de promoteurs spécifiques à la solution résiduelle 108
3.2.1. Courbe de croissance de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 Xylose 108
3.2.2. Évaluation du transcriptome de *S. coelicolor* M145 en SRD 111
3.2.2.1. Résultats de l'analyse statistique des biopuces 111
3.2.2.2. Identification de promoteurs intéressants dans le cadre du développement d'un système d'expression en SRD 113
3.2.2.3. Autres gènes intéressants induits en SRD 116

3.3. Évaluation du promoteur de la β-galactosidase 116
3.3.1. Construction du vecteur contenant le promoteur de la β-galactosidase 117
3.3.2. Évaluation de l'efficacité de la production protéique par le promoteur 118

4. DISCUSSION 121

4.1. Production de lactoferrine humaine recombinante tronquée 122
4.1.1. Évaluation du pouvoir antibactérien de la Lf sur les streptomycètes 122
4.1.2. Rendement des transformations chez *S. lividans* 10-164 122
4.1.3. Évaluation de la présence de $Lf_{hr}tr$ dans le surnageant de culture 123
4.1.3.1. Concentration des surnageants de culture 123
4.1.3.2. Détection de l'étiquette His présente sur certaines constructions de $Lf_{hr}tr$ 124
4.1.3.3. Détection de la Lf 125
4.1.3.3.1. Immunodétection anti-Lf 125
4.1.3.3.2. ELISA anti-Lf 126
4.1.3.4. Vérification de la séquence du gène recombinant de la $Lf_{h}tr$ 126
4.1.3.5. Problèmes liés à la production de protéines hétérologues 128

4.2. Recherche de promoteurs spécifiques à la solution résiduelle 128
4.2.1. Courbe de croissance de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 Xylose 128
4.2.2. Évaluation du transcriptome de *S. coelicolor* en SRD 129
4.2.2.1. Résultats de l'analyse statistique des biopuces 129
4.2.2.2. Identification de promoteurs intéressants dans le cadre du développement d'un système d'expression en SRD 130
4.2.2.3. Autres gènes intéressants exprimés en SRD 134
4.2.2.4. Design de l'expérience 136

4.3. Évaluation du promoteur de la β-galactosidase 137

4.4. Hypothèse : utilisation de l'acide lactique comme source de carbone 139

4.5. Stabilisation du pH de la culture de *S. coelicolor* M145 en SRD 141

CONCLUSION 142

APPENDICE A 145

APPENDICE B 149

RÉFÉRENCES 162

Introduction

Il existe une grande variété de systèmes d'expression sur le marché, autant eucaryotes que procaryotes. Chacun possède ses avantages et désavantages cependant, la plupart sont dispendieux et limités. Ce phénomène est dû entre autres aux limitations des organismes hôtes et aux protéines d'intérêt produites. Souvent, ces protéines ont un intérêt thérapeutique et sont d'origine humaine. Les procaryotes par exemple ne peuvent parfois pas effectuer les modifications post-traductionnelles nécessaires aux propriétés de ces protéines. Dans le cas des cellules eucaryotes, quant à elles, demandent des substrats dispendieux comme le sérum bovin fœtal. Elles sont de plus très sensibles aux contaminations. Pour ce qui est des systèmes d'expression avec les organismes transgéniques, ils sont extrêmement dispendieux, longs et ardus à réaliser. La demande pour des systèmes souples et peu onéreux est donc grandissante et l'utilisation de résidus provenant d'une autre industrie est de plus en plus courante.

Comme plusieurs compagnies à travers le monde, Technologie Biolactis Inc. a été créée dans le but de récupérer et valoriser une solution produite en quantité phénoménale lors de la production fromagère, le lactosérum (LS). Cette solution possède une composition riche en nutriments et en vitamines. La compagnie a développé un procédé original de fermentation du LS à l'aide de bactéries lactiques menant à la production d'une matrice protéique malléable nommée Nutractis. Cette matrice consiste en un concentré de protéines, peptides, vitamines, bactéries et produits de fermentation. Lors de cette production, une solution résiduelle (SR) possédant des qualités en tant que milieu de culture pour les streptomycètes est générée. En effet, ce microorganisme croît beaucoup plus rapidement et produit de 2 à 6 fois plus de biomasse en SR que dans un milieu de culture standard utilisé pour la production protéique.

Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses Gram positives provenant du sol qui sont reconnues pour être d'excellents producteurs de protéines. En effet, *Streptomyces lividans*, proche parente de *S. coelicolor* dont le génome a été entièrement séquencé, est capable de sécréter dans le milieu extracellulaire de façon efficace de

grandes quantités de protéines de haut poids moléculaire autant homologues qu'hétérologues.

Une protéine hétérologue d'intérêt thérapeutique qui serait intéressante à produire et qui est naturellement retrouvée dans le lait, et en faible quantité dans la SR, se nomme la lactoferrine (Lf). C'est une glycoprotéine d'environ 80 kilodaltons (kDa) de la famille des transferrines qui possède plusieurs propriétés dont un effet antimicrobien, anticancéreux, antioxydant et stimulant du système immunitaire. Étant donné que la protéine est composée de deux domaines homologues à 40% et que ses propriétés sont attribuées autant à la portion N-terminale qu'à la protéine entière, seule cette portion sera produite. Cette protéine est habituellement récupérée par purification à partir du lait humain ou bovin. Dû aux petites quantités récupérées, la Lf est une protéine très dispendieuse.

La biomasse plus élevée et la croissance plus rapide des streptomycètes dans la SR, en plus de leurs caractéristiques de producteurs de protéines, en font un hôte de choix pour le développement d'un système d'expression. De plus, l'amélioration de la croissance bactérienne insinue également qu'il y a présence de promoteurs spécifiquement activés par la SR, ce qui peut mener au développement d'un système d'expression spécialisé à haut rendement. La production de Lf tronquée, protéine multifonctionnelle qui sera produite dans le système d'expression, dans un résidu de la transformation du LS répondra également à une demande pour de la Lf abordable.

Dans le but de produire la Lf humaine tronquée (Lf_htr), l'effet antibactérien de la protéine sur l'hôte sera d'abord évalué. Le gène recombinant de la Lf_htr adapté au génome de l'hôte sera conçu pour ensuite réaliser différentes constructions du gène et les cloner chez *S. lividans* 10-164. Enfin, des transformants exprimant et produisant la Lf seront sélectionnés. Pour le développement du système d'expression en SR, une courbe de croissance de *S. coelicolor* M145 en SR sera effectuée pour ensuite isoler l'acide ribonucléique (ARN) total, le marquer à l'aide de fluorophores et réaliser des

hybridations sur des biopuces contenant 7339 de ses gènes afin d'identifier des promoteurs intéressants.

Ce mémoire présente tout d'abord une revue de littérature où il sera question de différents systèmes d'expression présents sur le marché, des caractéristiques intéressantes de la SR, des streptomycètes et de la Lf. La théorie afin de comprendre la technologie des biopuces sera décrite par la suite. Une section portant sur le matériel et les méthodes utilisées afin de remplir les différents objectifs exposés précédemment sera suivie des résultats obtenus. Pour terminer, il y aura une discussion des résultats et une conclusion.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. Systèmes d'expression de protéines d'intérêt actuels

1.1.1. Mise en contexte

Depuis quelques années, la production de protéines d'intérêt recombinantes bat son plein. Ces protéines sont utilisées autant dans les domaines de l'alimentaire que dans le pharmaceutique. Plusieurs compagnies se spécialisent dans l'un ou l'autre des systèmes d'expression connus, selon la nature des protéines à produire. Quelques uns offrent de nombreux avantages quant à la facilité d'effectuer des modifications génétiques ou au rendement, mais chacun a son point faible. Aucun système d'expression n'est parfait et la plupart sont très dispendieux. Il y a une véritable demande pour de nouveaux systèmes d'expression alliant de bons rendements à un faible coût dû au manque de capacité de production présente sur le marché. Il est certain que la production industrielle de protéines thérapeutiques de grande valeur ne nécessite pas un système d'expression à haut rendement autant que la production d'enzymes commerciales. Le tout est de cibler les besoins des entreprises et des laboratoires académiques, et de pouvoir y répondre grâce aux différents systèmes présents sur le marché selon leurs caractéristiques propres.

1.1.2. Systèmes d'expression procaryotes

1.1.2.1. *Escherichia coli*

Les systèmes d'expression utilisant *E. coli* sont très répandus étant donné l'excellente connaissance de leur génétique et du nombre impressionnant de vecteurs d'expression et de promoteurs inductibles disponibles (Baneyx, 1999). La rapidité de leur croissance et le fait que la bactérie peut croître sur des substrats peu coûteux jusqu'à une haute densité ont aussi mené à sa grande popularité. Il existe également des systèmes avec une pression sélective pour des gènes essentiels en plus de ceux utilisant les antibiotiques, étant donné que ces derniers causent parfois des inquiétudes au niveau de la résistance bactérienne. Il est à noter que *E. coli* a été le premier hôte utilisé dans la production de protéines

d'intérêt. L'insuline et l'hormone de croissance bovine (bGH) en sont des exemples (Swartz, 2001).

Ce système présente de grands avantages, mais étant donné la direction que prend l'industrie de la production de protéines d'intérêt, qui est de plus en plus axée vers des protéines complexes à usage thérapeutique, il nécessite de nouvelles améliorations pour égaler les systèmes utilisant les cellules eucaryotes. En effet, *E. coli* possède des inconvénients majeurs en ce sens. Tout d'abord, il ne peut pas glycosyler les protéines, ce qui est un problème avec les protéines humaines. Comme tous les procaryotes, l'usage des codons est différent de celui des eucaryotes et des humains. Ceci peut avoir un impact important sur le rendement de production protéique, la stabilité du plasmide et des ARN messagers (ARNm), et peut même inhiber la synthèse protéique ou la croissance de la bactérie (Zahn, 1996). L'utilisation de techniques de génie génétique comme la mutagenèse dirigée est nécessaire afin d'éviter ces désagréments. D'ailleurs, par cette technique, des problèmes naturels de stabilité d'ARNm peuvent être atténués avec l'ajout d'une queue polyadénylée (poly(A)) (Cao *et al.*, 1996) ou d'une structure secondaire en épingle à cheveux (Hansen *et al.*, 1994).

Le désavantage principal chez *E. coli* est dû à la surproduction protéique induisant la formation de corps d'inclusion. L'agrégation peut aussi être due au manque de chaperonnes spécifiques qui ne permettent pas le repliement adéquat des protéines humaines complexes ou à l'environnement réducteur du cytoplasme de la bactérie inhibant la formation des ponts disulfures (Baneyx, 1999). Ces corps d'inclusion facilitent la purification de la protéine produite et la protègent de la dégradation par les protéases cytoplasmiques, périplasmiques et membranaires (LaVallie et McRoy, 1995), mais les techniques de renaturation *in vitro* sont très coûteuses et très difficiles à réussir. Pour améliorer le repliement des protéines dans le cytoplasme, ce qui est moins coûteux que les méthodes *in vitro* suite à la purification, il y a la co-expression de chaperonnes ou le développement expérimental favorisant l'activité des chaperonnes présentes (De Bernardez *et al.*,

1999), la mutation d'enzymes responsables de l'environnement réducteur (Schneider *et al.*, 1997) ou les protéines de fusion (Forrer et Jaussi, 1998), qui aident par le fait même à la purification. Cependant, ces méthodes n'ont pas un taux d'efficacité de 100% et amènent de nouveaux problèmes au niveau du rendement ou de la purification du produit protéique final (Baneyx, 1999).

Pour ce qui est de la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire, plusieurs recherches ont été effectuées en ce sens mais aucune n'a démontré un véritable avancement (Wan et Baneyx, 1998). Les protéines sont sécrétées dans le périplasme et lorsqu'elles induisent le passage dans le milieu extracellulaire, il y a une perte de viabilité importante. Par contre, la localisation des protéines dans le périplasme offre des avantages au niveau du repliement car c'est un environnement oxydant qui favorise la formation des ponts disulfures à l'inverse du cytoplasme (Aslund et Beckwith, 1999). La co-expression de chaperonnes augmente aussi considérablement le taux de formation des ponts disulfures (Qiu *et al.*, 1998).

1.1.2.2. Les streptomycètes

Les streptomycètes, quant à eux, sont très différents de *E. coli*. Ces microorganismes constituent un niveau intermédiaire entre les systèmes d'expression procaryotes et eucaryotes. Les manipulations génétiques sont maintenant simplifiées depuis le séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996). De plus, les promoteurs et vecteurs disponibles sont nombreux et permettent souvent une réplication dans *E. coli* afin d'amplifier le matériel génétique à cloner ou à séquencer (Gusek et Kinsella, 1992). Certains vecteurs à haut nombre de copies par cellule peuvent mener à des taux de production protéique de l'ordre de microgrammes par litre (μg/L) à gramme (g)/L (Engels et Koller, 1992). La production protéique chez les streptomycètes est également effectuée en fermenteur, où la biomasse peut atteindre une haute densité en un temps raisonnable (Fornwald *et al.*, 1993).

Cependant, la croissance sur milieu solide est plus lente et plus complexe que les autres procaryotes. L'entretien des souches ainsi que les lyses bactériennes sont plus difficiles étant donné la résistance de leur paroi cellulaire (Prescott *et al.*, 1995).

Une des grandes qualités des streptomycètes pour la production de protéines d'intérêt, autant homologues qu'hétérologues, est la capacité de sécréter efficacement d'importantes quantités de protéines de haut poids moléculaire. Les amylases et les protéases en sont de bons exemples (Binnie *et al.*, 1997). Le fait de sécréter les protéines directement dans le milieu extracellulaire facilite grandement les étapes de purification et diminue les risques de dégradation par les protéases de l'hôte, étant donné qu'elles se retrouvent en plus grande quantité dans le milieu intracellulaire (Binnie *et al.*, 1997). Un autre avantage des streptomycètes sur *E. coli* concerne aussi la sécrétion. Les protéines étant immédiatement sécrétées dans le milieu extracellulaire et ne s'accumulant pas dans le cytoplasme ou le périplasme, elles n'agrègent pas en corps d'inclusion. Elles adoptent directement leur structure tertiaire afin d'être actives biologiquement et solubles. Ceci élimine donc les étapes de renaturation *in vitro*, qui sont presque impossibles à réaliser lors d'une production à grande échelle (Anné et Van Mellaert, 1993).

Pour ce qui est des modifications post-traductionnelles, les streptomycètes se rapprochent un peu plus des eucaryotes en permettant une certaine glycosylation (Binnie *et al.*, 1997). Elle n'est pas identique à la glycosylation eucaryotique mais n'est pas aussi immunogénique que l'hyperglycosylation effectuée par certaines levures. Les protéines humaines ne nécessitant pas de glycosylation ou de modifications trop complexes peuvent donc être produites.

La production de protéines hétérologues étant plus complexe que pour les protéines homologues, certaines stratégies peuvent être adoptées afin de faciliter le processus. Par exemple, lorsque les codons d'origine du gène d'intérêt ne sont

pas ou peu utilisés par le microorganisme hôte, les ARNs de transfert (ARNt) correspondant sont moins disponibles et retardent la traduction de l'ARNm en protéine. Ainsi, la probabilité que possède l'ARNm d'être détruit par des endonucléases ou de former des structures secondaires empêchant la traduction est plus élevée. La modification de ces codons pour ceux étant plus utilisés par le microorganisme hôte est donc une stratégie de choix afin d'améliorer la production. Cependant, la modification des codons à l'extrémité 5' de l'ARNm peut entraîner la diminution ou l'absence de la production des protéines d'intérêt (Lammertyn *et al.*, 1996). C'est donc une stratégie à utiliser avec prudence. Il est également possible d'effectuer une fusion du gène d'intérêt avec un gène natif afin d'améliorer son expression et sa sécrétion. Naturellement, l'utilisation de mutants déficients dans la production de protéases extracellulaires peut améliorer énormément la qualité et la quantité de protéines récupérées (Binnie *et al.*, 1997).

Il est à noter que le rendement de production dépend de plusieurs facteurs dont l'efficacité de la transcription, la stabilité de l'ARNm, la traduction, la stabilité de la protéine d'intérêt ainsi que la spécificité des protéases de l'hôte pour celle-ci (Anné et Van Mellaert, 1993). Il y a donc plusieurs points à observer et plusieurs ajustements à faire avant d'obtenir les rendements attendus, et ce, pour chacune des protéines d'intérêt.

1.1.3. Systèmes d'expression eucaryotes

1.1.3.1. Les levures

Plusieurs espèces de levures sont utilisées dans les systèmes d'expression, dont *Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis* et *Pichia pastoris*. Elles possèdent les avantages des systèmes d'expression procaryotes comme la rapidité de culture, l'état unicellulaire et le coût moindre en plus des propriétés physiologiques des cellules eucaryotes permettant la plupart des modifications post-traductionnelles. Les systèmes d'expression utilisant *P. pastoris* sont de plus en plus populaires. Ils ont été utilisés pour synthétiser plus de 400 protéines dans le cadre de recherches scientifiques ou de production industrielle, comme

l'insuline humaine (Wang *et al.*, 2001), l'albumine sérique humaine (Sreekrishna *et al.*, 1998) ainsi que les antigènes entrant dans la composition d'un vaccin contre la malaria (Brady *et al.*, 2001). *P. pastoris* possède les avantages inhérents aux systèmes d'expression chez les levures. Elle est facile à modifier génétiquement, elle effectue des modifications post-traductionnelles et est capable de haut rendement en fait de production protéique. Cette levure est capable de produire des protéines dans l'espace intracellulaire mais aussi dans le milieu extracellulaire. Elle peut aussi effectuer des modifications post-traductionnelles d'eucaryotes supérieures comme la N- et la O-glycosylation, la formation de ponts disulfures ainsi que des clivages protéolytiques (Cregg *et al.*, 2000). Ces propriétés permettent de produire des protéines d'intérêt humaines que d'autres organismes, même d'autres levures comme *S. cerevisiae*, ne peuvent accomplir.

P. pastoris est une levure méthylotrophique, ce qui veut dire qu'elle croît en présence de méthanol, grâce au promoteur fort *AOX1* qui code pour l'enzyme clé de l'assimilation du méthanol et qui est réprimé en présence de sucres, mais très fortement induit en présence de méthanol comme seule source de carbone. Ceci permet de contrôler l'expression d'une protéine lorsqu'elle est toxique pour l'organisme hôte. Cette caractéristique est d'autant plus intéressante puisqu'elle permet une économie lorsque des déchets de méthanol sont utilisés et qu'elle utilise un polluant pour croître. Un autre avantage, est que cette levure préfère un mode de croissance respiratoire plutôt qu'en fermentation. La fermentation produisant de l'éthanol ainsi que de l'acide acétique augmente rapidement la toxicité du milieu pour l'organisme et rend les changements de milieux de culture plus fréquents, ce qui augmente le coût total de production (Cregg et Madden, 1988).

Le système d'expression utilisant *P. pastoris* ne possède pas que des avantages. L'utilisation de méthanol demande plusieurs installations coûteuses et nécessite des vérifications régulières. C'est pourquoi d'autres promoteurs sont à trouver ou ont été développés pour pallier à ces inconvénients. Lorsqu'il y a une

forte densité cellulaire, il y a toujours un risque de dégradation protéolytique, ce qui diminue les rendements de production (Murasugi *et al.*, 2001). Afin de sécréter les protéines dans le milieu extracellulaire, des signaux de sécrétion provenant de l'hôte sont nécessaires. L'appariement d'un signal avec un gène particulier n'est pas un gage de réussite. Il faut donc trouver celui qui est adéquat afin d'avoir une production optimale pour une protéine spécifique. Un problème majeur dans la production de produits thérapeutiques est que la glycosylation de *P. pastoris* diffère de celle des humains. En effet, elle ajoute plus de mannoses à la chaîne d'oligo-saccharide et les protéines deviennent donc très immunogéniques (Cereghino *et al.*, 2002). Il est cependant connu que ce phénomène d'hyperglycosylation est moins fréquent chez *P. pastoris* que chez *S. cerevisiae* (Schmidt et Hoffman, 2002).

1.1.3.2. Les moisissures

Les systèmes d'expression utilisant les moisissures possèdent certains avantages associés aux systèmes eucaryotes comme les levures, mais aussi plusieurs défauts. Certaines espèces produisent des mycotoxines (Moss, 1989), ce qui peut causer un problème dans la production de protéines thérapeutiques, et les autres sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Plusieurs de ces dernières peuvent être utilisées sans danger, entre autres dans la production de protéines hétérologues (Jeenes *et al.*, 1991), mais c'est le genre *Aspergillus* qui prédomine puisqu'elle possède un rendement supérieur aux autres utilisées et un spectre de protéines pouvant y être clonées plus large. La chymosine a d'ailleurs été produite par *Aspergillus awamori* (Berka *et al.*, 1990) ainsi que l'interleukine-6 et la phospholipase porcine A_2 par *Aspergillus niger* (van den Hondel *et al.*, 1992).

La plupart des systèmes d'expression utilise des vecteurs d'intégration dans le génome de la moisissure afin d'obtenir des transformants stables (Archer, 1994). Cependant, l'efficacité de transformation est beaucoup moins importante

que dans le cas de vecteurs à réplication autonome (Gems *et al.*, 1991). Le développement de ces systèmes d'expression est donc beaucoup plus long et plus dispendieux. L'intégration, qui est la plupart du temps au hasard, peut aussi interférer avec des gènes essentiels ou influencer l'expression de gènes voisins. Parfois, ce sont ces derniers qui influencent le niveau d'expression du gène de la protéine d'intérêt pouvant ainsi affecter le rendement final. L'expression du gène d'intérêt sera aussi beaucoup moins fréquente que sur un vecteur à haut nombre de copies, ce qui diminue également les rendements. L'avènement de la génomique aide à prévoir un locus précis et diminuer ces risques (Bos *et al.*, 1988), mais ce n'est pas une science exacte.

Un des avantages de ce système est qu'il est souple. Il y a plusieurs promoteurs disponibles ainsi que différentes options de sélection des transformants comme des marqueurs auxotrophes (Unkles *et al.*, 1989) ou une résistance aux antibiotiques (Punt *et al.*, 1987). Une grande variété de peptides signaux, séquences nécessaires à la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire, sont reconnus pour être fonctionnels chez les moisissures, même ceux provenant d'une autre espèce. Ceci est peut-être dû au fait que la séquence d'acides aminés présente à la jonction du peptide signal (PS) et de la protéine ne semble pas être aussi importante que la structure secondaire de celle-ci. Il est à noter que le choix de l'un ou l'autre des peptides signaux va tout de même affecter le rendement protéique (Jeenes *et al.*, 1991). De plus, la sécrétion ne peut être effectuée si la protéine n'a pas été repliée correctement (Archer, 1994), ce qui cause un problème pour les protéines hétérologues complexes.

Lors de leur sécrétion, les protéines parcourent le réticulum endoplasmique où s'effectue la plupart des modifications post-traductionnelles dont les clivages protéolytiques et la glycosylation (Archer, 1994). Les moisissures, comme les levures, sont capables d'effectuer les deux types de glycosylation (Jeenes *et al.*, 1991). Ils sont aussi responsables d'hyperglycosylation à l'occasion ou de ne pas glycosyler du tout. Cependant, il

semble que les chaînes d'oligo-saccharides ajoutés aux protéines contiennent moins d'unités de mannose, ce qui rend les protéines moins immunogéniques et beaucoup plus semblables à celles des eucaryotes supérieurs (Salovuori *et al.*, 1987). Les autres modifications sont possibles chez les moisissures mais elles ne sont pas nécessairement faites correctement. La dégradation protéolytique est une réalité importante chez les moisissures car celles-ci possèdent de nombreuses protéinases (Barrett et Rawlings, 1991). La création de mutants protéinases négatifs ont cependant amélioré les rendements protéiques obtenus avec *A. awamori* (Berka *et al.*, 1990). La production de protéines homologues est donc beaucoup plus réussie que celle de protéines hétérologues.

1.1.3.3. Les cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes utilisées pour les systèmes d'expression sont des cellules végétales, d'insectes ou de mammifères. Dans cette catégorie, les cellules animales, comme les cellules ovariennes de hamsters chinois (CHO) ou les cellules embryonnaires de reins humains (HEK 293), sont les meilleures au point de vue des modifications post-traductionnelles (Braun et LaBaer, 2003). Cependant, elles offrent plusieurs lacunes au niveau de leur fragilité, leur dépendance aux substrats dispendieux comme le sérum bovin fétal, en plus de leur faible rendement pour la transfection et la production (Schmidt et Hoffman, 2002). Les systèmes d'expression utilisant la combinaison baculovirus et cellules d'insectes sont beaucoup plus robustes et productifs. Ce système est plus simple à réaliser, moins capricieux et beaucoup de vecteurs sont disponibles ce qui le rend plus souple. Le système le plus répandu utilise les cellules ovariennes de *Spodoptera frugiperda* (Sf 9) et le baculovirus dérivé du nucléopolyhedrovirus à capside multiple d'*Autographa californica* (AcMNPV), où plusieurs protéines ont pu être produites avec succès dont de nombreux allergènes utilisés lors d'immunothérapies (Schmidt et Hoffman, 2002). Les cellules de plantes quant à elles présentent un bon rendement et des modifications post-traductionnelles satisfaisantes. Le système habituel comprend le virus de la mosaïque du tabac et

des cellules provenant de *Nicotiana benthamiana*. Même si les cellules seules sont utilisées, l'organisme complet est préféré (Schmidt et Hoffman, 2002).

1.1.4. Systèmes d'expression d'organismes transgéniques

Les plantes sont utilisées en tant qu'organismes transgéniques puisqu'elles repoussent les contaminations retrouvées lors de l'utilisation des cellules seules en utilisant ses propres systèmes de défense. Il n'est pas nécessaire d'en faire une culture stérile et les substrats sont de faibles coûts (eau, lumière, terre et minéraux). La perspective de retrouver d'énormes champs où poussent des organismes génétiquement modifiés (OGM) n'est cependant pas accueillie avec ferveur par la société. De plus, si la protéine recombinante produite n'est pas destinée à être consommée avec la plante, la purification de celle-ci à partir des tissus sera plus difficile (Walmsley et Arntzen, 2003). Plusieurs protéines d'intérêt thérapeutique ont été produites avec les plantes transgéniques, dont des anticoagulants et des inhibiteurs de thrombine (Cramer *et al.*, 1999).

Dans le cas des chèvres ou des vaches transgéniques, ce problème ne se pose pas. La plupart du temps, les protéines sont exprimées dans le lait à l'aide de promoteurs spécifiques aux glandes mammaires. Les protéines d'origine humaine ou animale y sont repliées et glycosylées de façon authentique. Par exemple, de la soie d'araignée qui serait utile pour les sutures dans le domaine médical a été produite dans une chèvre transgénique par la compagnie Nexia (www.nexiabiotech.com). Par contre, les risques de transmission de pathogènes à l'homme y est plus grande que dans une production chez la plante. De plus, obtenir un animal transgénique en bonne santé et produisant efficacement une protéine d'intérêt est extrêmement dispendieux et laborieux (Baldassarre *et al.*, 2004). C'est pourquoi ces techniques sont presque exclusivement réservées aux compagnies privées.

Il y a deux méthodes de choix utilisées dans l'obtention d'un organisme transgénique, la microinjection pronucléaire (Gordon *et al.*, 1980) et plus récemment,

le transfert du noyau d'une cellule somatique (SCNT) (Wilmut *et al.*, 1997). Par contre, chacune d'elles possède son lot de difficultés. La microinjection pronucléaire injecte un vecteur d'acide désoxyribonucléique (ADN) dans les embryons recueillis chez une femelle, puis ceux-ci sont réintroduits. L'incorporation du vecteur ainsi que la production de la protéine d'intérêt chez un organisme transgénique est plus ou moins efficace. En effet, l'intégration du vecteur étant aléatoire, il peut très bien s'implanter dans une région faiblement transcrite ou dans une région indispensable à la survie de l'animal (Baldassarre *et al.*, 2004). Tous ces problèmes font en sorte que peu d'animaux transgéniques sont obtenus avec cette méthode, soit environ 6% de la progéniture (Krimpenfort *et al.*, 1991).

La méthode de SCNT quant à elle, utilise des fibroblastes provenant de la peau d'un animal où est injecté le vecteur d'ADN contenant un marqueur de sélection. Ces cellules seront mises en cultures sous pression sélective où elles pourront être caractérisées (site d'intégration et intégrité de la cellule) avant le transfert du noyau. Celui-ci doit d'abord être déprogrammé avant d'être introduit dans un oocyte énucléé. Cette étape est souvent insuffisante et les embryons ne survivent pas une fois implantés. Par contre, la majorité de la progéniture menée à terme et en vie à la naissance sera transgénique. Cependant, plusieurs mourront en très jeune âge ou développeront de graves problèmes de santé allant des problèmes cardiaques à un comportement agressif anormal (Baldassarre *et al.*, 2003).

1.1.5. Système d'expression *in vitro*

Le système d'expression *in vitro*, mieux connu sous le sigle RTS pour « Rapid Translation System », est un système acellulaire qui couple les réactions de transcription et de traduction. Ce système a été développé sous une forme rudimentaire dans les années 60, mais a été commercialisé par Roche tout récemment (http://www.roche-applied-science.com/sis/proteinexpression/index.jsp). Il utilise la machinerie présente dans le lysat de *E. coli* pour effectuer la réaction de traduction et effectue un ajout d'ARN polymérase T7 dans le but d'accélérer la réaction de

transcription et d'en augmenter la robustesse (Studier *et al.*, 1990). Le système à échange continu permet le remplacement des substrats d'énergie, des nucléotides triphosphates et des acides aminés utilisés tout en éliminant les sous-produits provenant de l'hydrolyse des nucléotides (figure 1). Naturellement, tous les paramètres peuvent être contrôlés de manière précise et le rendement du système peut ainsi être amélioré rapidement (Betton, 2003).

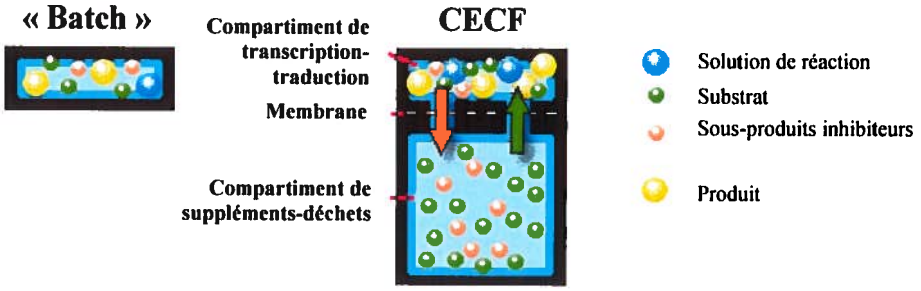


Figure 1. Schéma du système sans cellule à échange continu (CECF) de Roche. Le système CECF est composé de deux compartiments, le premier contenant la réaction de transcription et de traduction ainsi que le deuxième récupérant les déchets produits et fournissant les substrats. Grâce à la membrane, ce dernier compartiment permet un échange continu des sous-produits et des substrats permettant ainsi l'augmentation de la durée de la réaction de transcription, en comparaison avec le système en « batch » qui ne permet aucun échange (http://www.roche-applied-science.com/sis/proteinexpression/).

Ce système s'inscrit dans une vague de récentes technologies provenant de l'ère post-génomique, où le criblage et l'analyse structurale d'un grand nombre de protéines potentielles d'un génome ou de toute une famille de protéines doit être rapide et efficace. Des recherches ont entre autres été effectuées sur les protéines aux fonctions inconnues de *E. coli* (Monchois *et al.*, 2002) et sur les protéines de *M. tuberculosis* (Cho *et al.*, 2002). Cette technique peut être miniaturisée dans le cadre de criblages grâce à des chambres de réaction sur plaquette de plastique (Tabuchi *et al.*, 2002), mais aussi utilisée dans le cadre de production à grande échelle (Spirin *et al.*, 1988). C'est donc un système très versatile. Il est aussi utilisé dans la production de protéines toxiques qui affectent les fonctions cellulaires essentielles de

leur hôte, pour les protéines rapidement dégradées par la cellule hôte ainsi que pour l'incorporation d'acides aminés non-naturels ou marqués radioactivement (Betton, 2003). Il est également beaucoup plus facile de co-exprimer des protéines dans le système RTS. Ceci peut servir à co-exprimer une chaperonne ou étudier les interactions protéines-protéines de façon très rapide (Betton et Hofnung, 1994).

Ce système présente aussi certains désavantages dont le coût très élevé d'une telle technologie. Parfois, le faible taux de production incite l'ARNm à former des structures secondaires et empêche ainsi la traduction. Des recherches ont cependant démontré qu'avec l'ajout d'étiquettes ou la modification des séquences d'initiation de la traduction par génie génétique, la formation de ces structures est diminuée (Betton, 2003). Pour ce qui est de la conformation des protéines, parfois le fait de ne pas avoir une quantité aussi importante de macromolécules que dans le cytoplasme de la bactérie fait en sorte que les protéines se replient d'elles-mêmes (Ellis, 2001). La plupart du temps, il faut cependant co-exprimer des chaperonnes et des enzymes nécessaires à la formation de ponts disulfures ou les ajouter à la réaction, ce qui augmente considérablement le coût de production (Ferholz *et al.*, 2002). Étant donné que c'est le lysat d'une cellule procaryote, il n'y a pas la machinerie essentielle à la glycosylation ou à la phosphorylation des protéines. Étant un système récent sur le marché, plusieurs améliorations sont en cours comme l'ajout d'inhibiteur d'exonucléases limitant la dégradation de la matrice d'ADN, l'ajout de détergents à la réaction dans le but de produire des protéines membranaires en améliorant leur solubilité et leur purification (Nemetz *et al.*, 2002) ainsi que l'utilisation de lysats de cellules eucaryotes. En effet, l'utilisation d'un lysat de germe de blé éliminerait les problèmes reliés aux systèmes d'expression procaryotes et serait moins dispendieux car la productivité ainsi que la durée de vie de ce lysat est plus élevée. Il ne reste qu'à éliminer les problèmes reliés aux toxines présentes dans l'endosperme des germes de blé (Madin *et al.*, 2000). Ce système est donc très prometteur pour l'avenir de la production de protéines recombinantes.

1.1.6. Conclusion

La plupart des systèmes d'expression décrits ci-dessus présentent beaucoup d'avantages, mais ceux-ci sont souvent très onéreux, ardus à réaliser et limités. Il y a une demande grandissante pour une technologie souple et peu dispendieuse. De nouveaux systèmes d'expression propres s'inscrivant dans une politique de développement durable, soit qui utilisent un résidu d'une autre industrie comme matière première, commencent à faire leur apparition sur le marché.

1.2. La solution résiduelle

1.2.1. L'industrie fromagère et le LS

Lors de la production fromagère, où une partie de la caséine et des lipides du lait précipite dans le caillé, environ 90% du volume total de lait utilisé est transformé en LS. Ce produit dérivé ayant une forte charge organique, de l'ordre de 35 000 à 70 000 milligrammes (mg) de DBO_5/L (demande biologique en oxygène pour 5 jours par litre) (communication personnelle, W. Smoragiewicz, UQÀM), est considéré comme un polluant et ne peut être rejeté dans l'environnement. Il nécessite un processus réduisant sa charge organique avant de rejoindre les égouts. Depuis quelques années, d'importantes propriétés ont été associées au LS et ses composantes. Le rejet de celui-ci n'est donc plus à l'ordre du jour et sa valorisation prend de plus en plus d'importance.

Plusieurs compagnies oeuvrent dans le domaine de la valorisation du LS, dont Ingredia, une entreprise française. Le LS est séché et ajouté à des aliments pour en augmenter la valeur nutritive ou en faire des aliments fonctionnels. Plusieurs composantes peuvent aussi être isolées du LS, comme les protéines sériques, l'acide lactique, le lactose ainsi que les lipides afin d'entrer dans la composition de divers produits dans les domaines alimentaire, agroalimentaire, pharmaceutique, chimique et même pour faire des produits d'emballage (http://www.ensaia.u-nancy.fr/). Les techniques utilisées à cette fin comme l'ultrafiltration, le séchage par atomisation ou

la chromatographie d'affinité sont très coûteuses (communication personnelle, D. Jacques, CQVB). Les petites fromageries ne produisant que 7 millions de litres par année, ce qui équivaut à peine à 150 000 litres par jour, ne peuvent assurer la rentabilité de telles installations. Le LS produit est donc rejeté et génère l'équivalent de la pollution d'une ville de 13 000 habitants annuellement.

1.2.2. Technologie Biolactis Inc.

La nouvelle entreprise québécoise nommée Technologie Biolactis Inc., a pour mission de traiter et valoriser le LS des petites et moyennes fromageries dans le but de lui trouver des applications entre autres dans les domaines de la nutraceutique et de la pharmaceutique. Un procédé unique et peu coûteux a été développé par la compagnie. Il consiste en la fermentation du LS par des bactéries lactiques, puis à la précipitation des protéines et peptides présents pour obtenir une matrice de protéines malléables appelée Nutrilactis. Il contient plusieurs protéines, vitamines et molécules ayant des fonctions très intéressantes. Ce produit est présentement sous étude concernant ses propriétés potentielles, autant au niveau du système immunitaire, du contrôle lipidique, d'un effet antioxydant, anticancéreux, antibactérien, antiviral, que d'un effet prébiotique ou probiotique. Des aliments fonctionnels à valeur ajoutée ou nutraceutique pourront être développés si tel est le cas. Ayant une très faible teneur en gras, mais une texture onctueuse stable, ce produit peut être utilisé comme réducteur de gras dans la production d'un beurre ou d'une mayonnaise allégée. Il peut même être utilisé comme base pour crème cosmétique ou comme transporteur de médicaments dans le domaine pharmaceutique.

Au cours de la production de Nutractis, une SR est produite. Cette SR contient encore plusieurs nutriments intéressants (tableau 1). Elle possède une quantité de protéines et de sels assez importante, ce qui rend la recherche d'une valorisation de la SR aussi intéressante que celle du LS.

Tableau 1. Composition chimique et minérale de la solution résiduelle (SR).

Analyse chimique	Composition (g/Kg)
Solides	6,2
Gras	2,5
Protéines	4
Acidité totale	0,55
Acide lactique	9,1
Lactose	30
Bilan minéral	**Composition (mg/Kg)**
Calcium	2 700
Sodium	2 100
Potassium	1 400
Magnésium	70
Manganèse	traces
Phosphore	69
Fer	traces
Cuivre	traces
Sélénium	traces
Zinc	traces

1.2.3. Propriétés de la solution résiduelle (SR)

Suite à la caractérisation chimique de la SR, des recherches concernant ses propriétés et fonctions possibles ont été réalisées en parallèle avec le LS. Le LS ainsi que la SR semblent démontrer un fort potentiel de milieu de culture pour divers microorganismes, dont les streptomycètes. Les analyses de croissance bactérienne ont donc été réalisées avec cette espèce, dans différents milieux de cultures (figure 2). Un milieu de culture standard, le M14 xylose a été utilisé comme contrôle, le LS et la SR ont été utilisés tel quel et digérés à la pronase, ce qui permet leur autoclavage, sans que le contenu protéique de haut poids moléculaire précipite et devienne non-disponible aux microorganismes. La quantité de biomasse obtenue est beaucoup plus importante pour cette espèce dans la SR digérée à la pronase (SRD), que dans la SR, le LS, le LS digéré (LSD), ou que pour le M14 xylose. Il a été démontré plusieurs fois que le volume de mycélium compacté ou PMV (Packed Mycelium Volume) est environ de 2 fois plus élevé dans ce milieu.

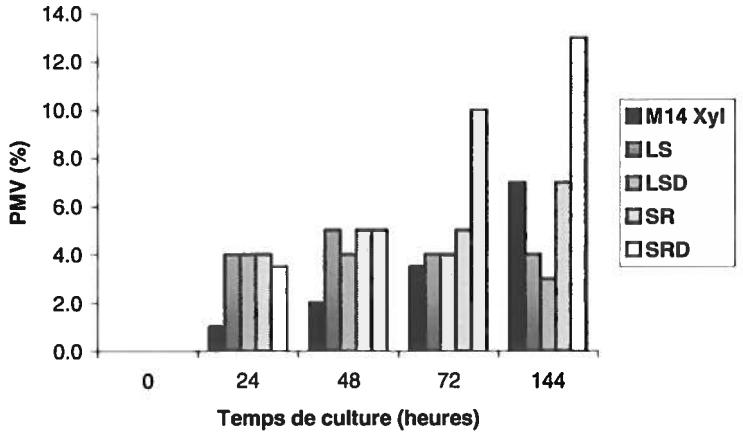


Figure 2. Histogramme de la biomasse de *Streptomyces lividans* 10-164 dans différents milieux après plusieurs temps de culture. La biomasse de *S. lividans* 10-164 obtenue dans différents milieux, soit le M14 xylose (M14 Xyl), le lactosérum (LS), le lactosérum digéré (LSD), la solution résiduelle (SR) et la solution résiduelle digérée (SRD), a été comparée selon le pourcentage de volume de mycélium compacté (PMV) récolté après différents temps de culture.

1.3. Les streptomycètes

1.3.1. Généralités

Le nom streptomycète provient du grec « streptos », qui signifie courbé et de « myces », qui signifie champignon. Il y a plus de 378 espèces qui appartiennent à ce genre de bactéries. Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses non fastidieuses, saprophytes, Gram positives et aérobies. Elles sont retrouvées dans le sol où elles dégradent et minéralisent la matière organique en décomposition. Ces bactéries sont considérées comme non-pathogènes pour l'homme à l'exception de *S. somaliensis* qui cause un actinomycétome. Cette infection des tissus sous-cutanés responsable de la formation de lésions engendre des gonflements, des abcès ainsi qu'une destruction osseuse si aucun traitement n'est administré. D'autres espèces ont été isolées sur des patients souffrant de maladies diverses mais aucune n'a été officiellement classée pathogène. Quelques autres streptomycètes sont considérés

comme pathogènes pour certains animaux et plantes, dont *S. scabies*, qui cause la maladie de la gale chez les pommes de terre et les betteraves. Les streptomycètes font partie de la grande famille des Actinomycètes (Prescott *et al.*, 1995). Ils sont chimio-organotrophes et n'ont besoin que d'une source de carbone organique, une source d'azote inorganique, de sels minimaux et un pH relativement neutre afin de croître convenablement (Gusek et Kinsella, 1992). Ces microorganismes produisent une grande quantité de métabolites secondaires lors de la formation des spores dont la géosmine (Prescott *et al.*, 1995), substance volatile responsable de l'odeur caractéristique de la terre, ainsi que 60% des 6 000 antibiotiques connus à ce jour (Volff et Altenbuchner, 1998).

1.3.2. Cycle de vie

Le cycle de vie des streptomycètes est plus complexe que la plupart des procaryotes (figure 3). En effet, suite à la germination d'une spore dans un environnement d'humidité et de température favorable, il y a apparition d'un mycélium végétatif. Celui-ci est constitué d'hyphes coenocytiques ramifiés contenant peu de septums, ce qui implique que chacun de ces compartiments contient plusieurs copies du génome. Le mycélium croît en pénétrant et solubilisant la matière organique ou le milieu de culture solide par la libération d'enzymes hydrolytiques. En milieu liquide, le mycélium croît sans contrainte. Du fait que le mycélium est immobile sur un milieu solide, l'eau et les nutriments disponibles diminuent pendant que les déchets cellulaires inhibant la croissance augmentent, il y a croissance d'un mycélium aérien. Ce dernier cannibalise le mycélium végétatif afin de croître. Il y a donc mort cellulaire du mycélium végétatif au fur et à mesure que le mycélium aérien se développe. Lorsque les ressources sont épuisées ou que les conditions ne sont plus favorables, la croissance arrête puis il y a séparation des hyphes en spores, petits compartiments contenant une copie du génome, grâce à la formation de parois transversales supplémentaires. Une fois la maturation des spores complétée, les spores sont relâchées et peuvent germer à nouveau (Gusek et Kinsella, 1992).

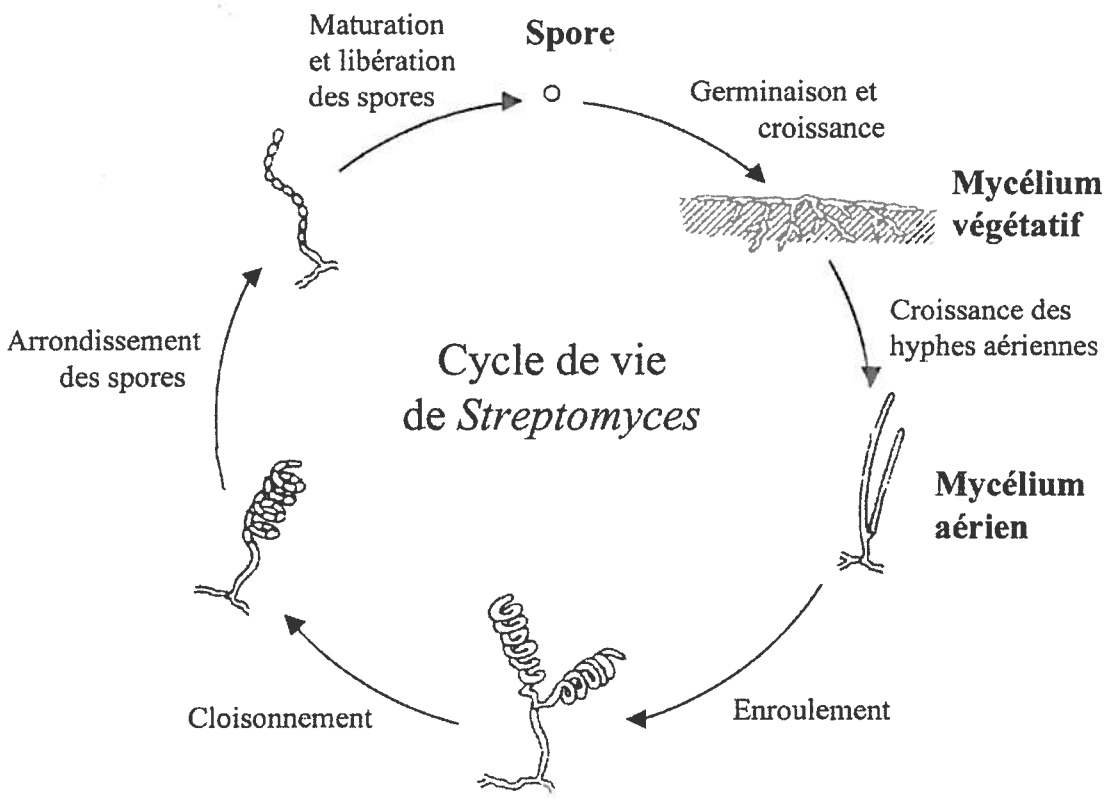


Figure 3. Cycle de vie de *Streptomyces*. Le mycélium végétatif qui croît suite à la germination d'une spore a une allure translucide et brillante. Le développement du mycélium aérien rend la culture blanche et d'aspect ouaté. Une fois la formation et la maturation des spores complétées, la culture prend une coloration grisâtre (tiré de Gusek et Kinsella, 1992, avec la permission de Martin Leduc).

1.3.3. Génétique

Les streptomycètes possèdent un génome linéaire de plus de 8 mégabases (Mb) ainsi qu'une variété d'éléments extrachromosomaux allant de 10 à 1 700 Kb (Hopwood *et al.*, 1993; Kinashi *et al.*, 1993). Le génome contenant plus de 7 800 cadres de lecture ouverts possibles est riche en guanosine et en cytosine (G + C) puisqu'il en est constitué à environ 74%. L'usage des codons est d'ailleurs extrêmement biaisé en faveur de ceux possédant un G ou un C en position 3 (Wright et Bibb, 1992; Anné et Van Mellaert, 1993). Les extrémités du génome étant instables, il n'est pas rare que d'importantes délétions surviennent ou qu'il y ait amplification de certaines portions du génome lors de la réplication cellulaire. Ces phénomènes sont observés dans plus de 0.1% des spores produites (Leblond et Decaris, 1994; Volff et Altenbuchner, 1998). Le génome de *S. coelicolor* A3(2) (figure 4), membre le plus étudié de la famille des streptomycètes, a été entièrement séquencé ce qui facilite de beaucoup les études de transcriptomique ou de protéomique sur cette espèce (Redenbach *et al.*, 1996).

1.3.4. *Streptomyces lividans* 10-164

Provenant de *S. lividans* 66, la souche 10-164 résulte d'une mutation ponctuelle dans le gène *msiK*, responsable de l'entrée de facteurs dans la bactérie nécessaires à la production des xylanases (Xln) et des cellulases (Hurtubise *et al.*, 1995). Ce mutant ne produit donc aucune xylanase et cellulase. L'absence de ces enzymes extracellulaires facilite la production de protéines par ce microorganisme en libérant les mécanismes de sécrétion ainsi qu'en facilitant la purification dans le milieu de culture. De plus, comme tous les streptomycètes, il est très facile de le modifier génétiquement par transformation des protoplastes (Gilbert *et al.*, 1995).

Du fait que *S. lividans* est un proche parent de *S. coelicolor*, qui a été entièrement séquencé, les manipulations génétiques ainsi que la synthèse d'amorces spécifiques sont davantage facilitées. Cette souche possède également un avantage sur

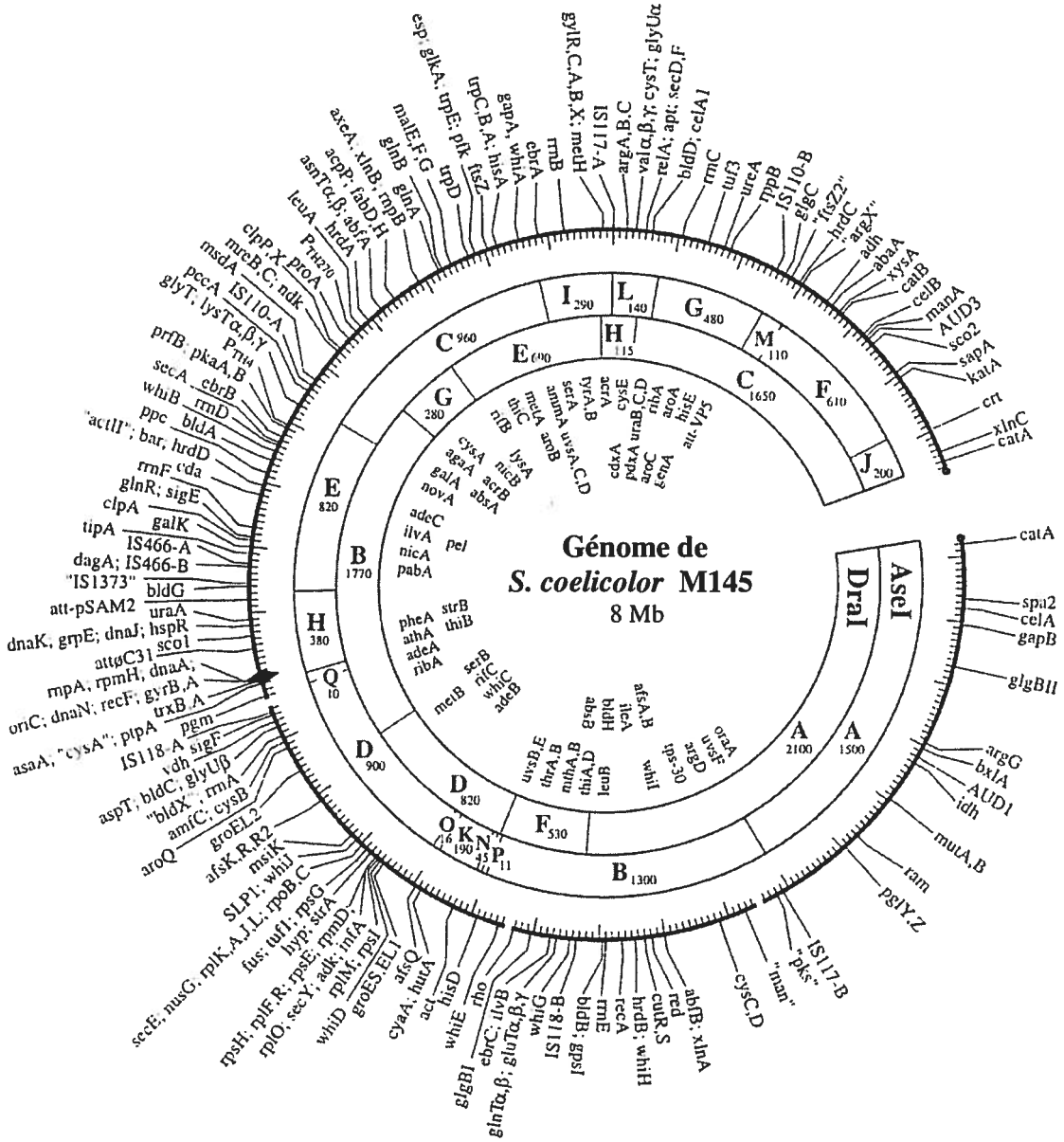


Figure 4. Carte génétique et physique du chromosome de *Streptomyces coelicolor* M145. La position des marqueurs du cercle extérieur provient d'une banque cosmidique ordonnée, dans laquelle chacun des fragments uniques ou qui se chevauchent ont une longueur équivalente. Les marqueurs du cercle intérieur ont été cartographiés seulement de manière génétique et leur position par rapport aux marqueurs physiques a été déterminée par interpolation. La grosseur des fragments provenant de la digestion *Ase*I et *Dra*I est exprimée en kilobases (Kb). ●, télomères du chromosome; ◆, origine de réplication du chromosome *oriC* (tiré de Redenbach *et al.*, 1996).

S. coelicolor. En effet, le système de restriction modification de *S. lividans* est plus faible que ce dernier. Il est donc plus facile de le transformer puisqu'il ne limite pas l'entrée ni la propagation du vecteur en dégradant l'ADN étranger lors de sa transformation (Kieser et Hopwood, 1991). De plus, *S. lividans* a peu d'activité protéolytique extracellulaire endogène dû à la présence d'un inhibiteur de protéases naturellement produit nommé STI 1 (Strickler *et al.*, 1992).

Malgré ces petites différences, cette souche peut toujours produire et sécréter de grandes quantités de protéines extracellulaires, homologues ainsi qu'hétérologues, ce qui lui procure de nets avantages dans la production de protéines d'intérêt (Gusek et Kinsella, 1992). Dans le cas des protéines homologues, comme les xylanases (Shareck *et al.*, 1991) et les cellulases (Théberge *et al.*, 1992), des rendements de 60 fois supérieurs à la production normale ont pu être obtenus grâce à l'utilisation de plasmides à haut nombre de copies. Pour ce qui est des protéines hétérologues, des niveaux de production plus bas mais très intéressants peuvent être atteints. La pro-insuline et l'interleukine 3 par exemple peuvent être produits jusqu'à des concentrations de 100 mg/L (Binnie *et al.*, 1997). Dans le cas du dérivé du récepteur soluble humain CD4 (Fornwald *et al.*, 1993), un taux de 300 mg/L a pu être obtenu. En plus d'une grande quantité de protéines récupérées, la qualité du produit est également supérieure à celle obtenue avec d'autres organismes. En effet, les caractéristiques de la protéine comme la solubilité, la formation des ponts disulfures ainsi que la réactivité avec des anticorps monoclonaux sont supérieurs comparé à sa production dans *E. coli* ou dans les cellules animales CHO (Binnie *et al.*, 1997). Toutes ces protéines possèdent une haute valeur commerciale dans les domaines des pâtes et papiers, de l'alimentaire ainsi que dans le domaine pharmaceutique.

1.4. La lactoferrine (Lf)

1.4.1. Généralités

La Lf est une protéine présente dans la plupart des sécrétions exocrines des mammifères. Elle se retrouve dans les larmes, la salive, les écoulements nasaux, le

mucus bronchial, le mucus cervico-vaginal, les fluides intestinaux et le liquide séminal. Elle est aussi le constituant majeur des granules secondaires des neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) circulants (Conneely, 2001). Elle entre également dans la composition du plasma, mais en faible quantité (Birgens, 1985). Cette protéine est aussi présente en très grande concentration dans le lait maternel, de 1 à 10 g/L dans le colostrum qui est le premier lait absorbé par le bébé suite à l'accouchement (Masson et Heremans, 1971). Elle se retrouve en moins grande importance dans le lait bovin et à une concentration de 100 mg/L dans le LS (Tomita *et al.*, 2002).

1.4.2. Structure

La Lf est une glycoprotéine d'attachement au fer de 80 kDa appartenant à la famille des transferrines. Ceci implique qu'elle a la capacité de transporter des ions Fe^{3+} dans les fluides. La simple chaîne polypeptidique de cette protéine est composée de 673 à 711 acides aminés repliés en deux domaines homologues, soit le domaine N-terminal et C-terminal. Ces domaines homologues à environ 40% sous-entendent qu'il y aurait eu une duplication des gènes il y a plus de 500 millions d'années (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Le gène de la protéine originale de 40 kDa se serait ainsi dupliquée pour former la protéine actuelle de 80 kDa. Elle possède un point isoélectrique (pI) de 8.4 à 8.9 (Anderson *et al.*, 1989).

Les deux domaines de la Lf possèdent chacun un centre de liaison au fer qui a la capacité de lier fermement, mais réversiblement un ion ferrique. Quatre acides aminés ont été identifiés comme étant impliqués dans l'attachement du fer pour chacun des domaines, soit His253, Tyr92, Tyr192 et Asp60 pour le domaine N-terminal et His253, Tyr435, Tyr528 et Asp395 pour le domaine C-terminal (Anderson *et al.*, 1989).

Dans l'organisation spatiale des domaines N-terminal et C-terminal, quatre sous-domaines peuvent être identifiés, soit N1, N2, C1 et C2. Une analyse structurale de la

protéine par rayons X a démontré une organisation différente de ces sous-domaines selon le degré de saturation en fer de celle-ci. Lorsque que la Lf est saturée en fer, l'hololactoferrine, les domaines exhibent une conformation dite fermée. Par contre, lorsque la protéine n'est pas saturée en fer, l'apolactoferrine, les deux sous-domaines N1 et N2 du domaine N-terminal sont dans une conformation dite ouverte, tandis que le domaine C-terminal reste fermé (figure 5). La liaison d'un ion ferrique est accompagnée de la fixation d'un ion bicarbonate afin de neutraliser les charges ajoutées (Anderson *et al.*, 1990; Jameson *et al.*, 1998).

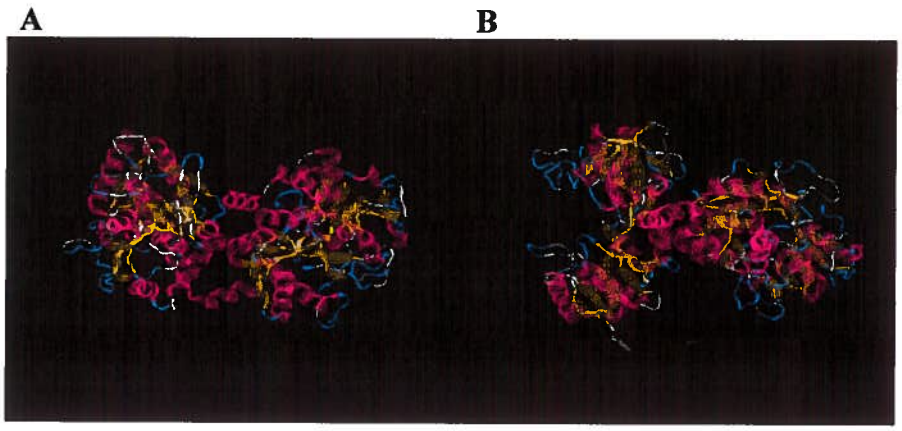


Figure 5. Différentes conformations de la lactoferrine. **A**, l'hololactoferrine, état de saturation en fer de la lactoferrine; **B**, l'apolactoferrine, état insaturé en fer de la lactoferrine. Domaine N-terminal à gauche, domaine C-terminal à droite (http://groningen.bio.ucalgary.ca/~hans/1lfg.gif).

Chaque domaine contient également un site potentiel de glycosylation auquel certains résidus glucidiques peuvent se fixer. De cette façon, le degré de glycosylation de la Lf peut varier, entraînant de ce fait une variation dans le poids de la protéine, allant de 76 à 80 kDa (van Berkel *et al.*, 1996). Une étude a démontré que la forte résistance de cette protéine à divers traitements, comme la digestion par certaines protéases ou la diminution du pH, pourrait être reliée à sa forte glycosylation. Par contre, elle indique que les différents degrés de glycosylation n'ont aucune influence sur la plupart des activités biologiques de la protéine étant donné que sa capacité à lier le fer ne varie pas lorsqu'elle n'est pas glycosylée (van

Berkel *et al.*, 1995). Ceci nous permet donc de croire qu'en produisant de la Lf chez les streptomycètes, la différence ou l'absence de glycosylation ne causera pas de baisse d'activités biologiques. Cependant, des études seront à effectuer quant à la nature immunogénique et toxicologique de ces glucides si elle est destinée à être consommée par les humains.

Bien que la Lf possède plusieurs similarités avec les autres transferrines, comme sa structure tridimensionnelle, sa fonction de transport du fer, son poids moléculaire ainsi que sa composition en acides aminés, de l'ordre de 59% et 49% d'homologie pour chaque domaine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984), ses propriétés physicochimiques diffèrent pour trois aspects principaux. Premièrement, sa glysosylation est différente. En effet, les transferrines possèdent deux sites de glycosylation situés tous deux sur le domaine C-terminal, tandis que la Lf possède un site sur chaque domaine (Spik *et al.*, 1982). Deuxièmement, une forte concentration de résidus arginines dans la portion N-terminal de la protéine lui confère un point isoélectrique (pI) plus élevé que celui des autres transferrines, qui varie habituellement entre 5.4 et 5.9 (Moguilevsky *et al.*, 1985). Cette propriété est sans doute à l'origine de sa capacité à se lier de manière non-covalente avec plusieurs molécules biologiques dont la ferritine (Pahud et Hilpert, 1976), l'ADN (Hutchens *et al.*, 1991), les lipopolysaccharides (LPS) (Miyazawa *et al.*, 1991) et l'héparine (Zou *et al.*, 1992). Troisièmement, la Lf a une affinité pour les ions ferriques environ deux fois plus élevé que pour la majorité des transferrines et possède la capacité unique de retenir ces ions jusqu'à un pH de 4.0 à 2.0 comparé à un pH de 6.0 à 4.0 (Mazurier et Spik, 1980). La plupart des activités biologiques de la Lf semblent directement reliées à sa capacité de lier le fer. C'est-à-dire que ses fonctions seraient Fe^{3+}-dépendantes. Certaines fonctions sont cependant Fe^{3+}-indépendantes, comme la liaison de la Lf avec certaines molécules et cellules. Ces différences, combinées à la localisation particulière de la Lf dans les tissus et fluides humains, lui confèrent ses propriétés fonctionnelles uniques.

Le domaine N-terminal de la Lf, en plus de posséder toutes les caractéristiques attribuées à la protéine entière, contient un court peptide bactéricide nommé

lactoferricine (Bellamy *et al.*, 1992). Son activité s'ajoute à l'activité totale de la protéine au niveau de son pouvoir antibactérien qui sera décrit plus loin. Étant donné que la protéine initiale était certainement constituée d'un seul domaine, que le domaine N-terminal contient tout ce qui est nécessaire aux fonctions de la Lf et qu'il est beaucoup plus court et ainsi, plus facile à cloner que la protéine entière, seulement le domaine N-terminal servira à cette étude. Cette stratégie a déjà été employée dans une étude afin d'étudier plus à fond les rôles associés à la protéine entière pouvant être dû au domaine N-terminal seul (Nakamura *et al.*, 2001). Ce système d'expression a été réalisé à l'aide de cellules d'insectes, mais jamais à l'aide de streptomycètes.

1.4.3. Fonctions

1.4.3.1. Influence sur la santé du nouveau-né

La Lf a une fonction très importante à jouer au niveau de la santé du nouveau-né. Elle lui est administrée par le biais du colostrum, et est ajoutée à la plupart des laits maternisés. Cette protéine aide à l'absorption ou à l'excrétion du fer par le nouveau-né. De plus, elle promeut la croissance d'une flore intestinale adéquate en favorisant la croissance des bonnes bactéries comme les bifidobactéries tout en empêchant la croissance des bactéries pathogènes de part son pouvoir antibactérien spécifique (Kawaguchi *et al.*, 1989; Nuijens *et al.*, 1996).

1.4.3.2. Activité antibactérienne

On peut distinguer trois mécanismes distincts qui contribuent aux fonctions antibactériennes de la Lf. Le premier mécanisme implique la capacité de l'apolactoferrine à séquestrer le fer présent dans l'environnement. Ainsi, le fer n'est plus disponible pour les bactéries et les prive d'un micro-élément essentiel à leur croissance (Arnold *et al.*, 1980). Par contre, ce mécanisme est souvent temporaire puisque certaines bactéries Gram négatives se sont adaptées en synthétisant des sidérophores, molécules ayant la capacité de lier le fer et même

de le retirer à la Lf (Conneely, 2001). L'efficacité de la protéine à accomplir sa fonction bactériostatique est dépendante de son degré de saturation en fer puisque si elle est saturée, elle ne peut le retirer aux bactéries. Il est à noter que la saturation en fer de la Lf présente dans le lait humain est seulement de 5 à 8%, ce qui implique que la protéine est dans cet environnement un excellent agent bactériostatique (Fransson et Lonnerdal, 1980).

Le second mécanisme est Fe^{3+}-indépendant. Il fait appel à la capacité de la protéine de se lier à certaines molécules biologiques comme les LPS et certaines endotoxines. La Lf endommage entre autres la membrane externe en retirant les LPS de celle-ci et cause la mort de la cellule par choc osmotique (Ellison et Giehl, 1991).

Troisièmement, un peptide de 25 acides aminés nommé lactoferricine qui est libéré du domaine N-terminal de la Lf par digestion à la pepsine possède une importante activité bactéricide (Bellamy *et al.*, 1992). Son mécanisme d'action serait apparenté à celui présenté ci-dessus. Il inhibe la croissance de plusieurs bactéries Gram négatives et positives comme *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, et même celles présentant une résistance à la Lf complète. Le peptide possède une activité antibactérienne de 2 à 12 fois supérieure à celle de la protéine. La lactoferricine est de plus insensible à la concentration de fer présent dans le milieu contrairement à la protéine totale (Tomita *et al.*, 1991).

1.4.3.3. Activité antivirale

La Lf est aussi capable d'inhiber la réplication de plusieurs virus, notamment celui de l'herpes simplex, du rotavirus, de l'hépatite C, du cytomegalovirus et de l'immunodéficience humaine (VIH) (Kanyshkova *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2000). Le mécanisme antiviral consiste en l'attachement de la Lf sur les glucosaminoglycanes de la membrane des cellules eucaryotes, empêchant ainsi la pénétration des particules virales à l'intérieur de celles-ci. La

Lf permet donc d'arrêter l'infection à son stade précoce. Il a aussi décrit que la Lf peut lier certains antigènes viraux (Yi *et al.*, 1997).

1.4.3.4. Activité anti-fongique

Le mécanisme par lequel la Lf opère en tant qu'anti-fongique n'est pas encore bien connu. Une étude a cependant démontré que la protéine ne peut pas contrôler ni inhiber la croissance des moisissures en l'absence des PMNs. D'autres études ont amené la possibilité que la Lf inhiberait leur croissance par séquestration du fer et que la lactoferricine aurait également un effet anti-fongique sur ces derniers (Levay *et al.*, 1995; Weinberg, 2003).

1.4.3.5. Activité anti-oxydante

Le fer libre présent dans les cellules ou les fluides peut s'avérer très nocif puisqu'il a la capacité de catalyser les réactions impliquant des radicaux libres. Puisque la Lf lie le fer qui se trouve en excès, elle agit en tant que puissant agent anti-oxydant. D'autres études ont démontré que la Lf pourrait stimuler la production d'hydroxyl par les leucocytes sans activer la production d'oxygène (O_2) ou de peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Comme cette protéine est résistante aux diminutions de pH et à la protéolyse, l'hololactoferrine est capable de résister à la dégradation et jouer son rôle dans des endroits très acides comme le petit intestin (Kanyshkova *et al.*, 2001).

1.4.3.6. Activité anti-cancéreuse

Il a aussi été rapporté que la Lf possède une activité anti-cancéreuse envers plusieurs types de tumeurs. La protéine a entre autres réduit de manière significative le nombre d'adénocarcinomes du côlon et provenant d'autres organes, ainsi que les métastases situées notamment au niveau des poumons. Ces expérimentations se sont déroulées autant chez les rats que chez les souris (Tsuda *et al.*, 2000 A et B). Cette activité anti-cancéreuse serait reliée au pouvoir que

possède la Lf à stimuler l'activité des cellules cytotoxiques « natural killer » (NK) et « lymphokine activated killer » (LAK) (Bezault *et al.*, 1994).

1.4.3.7. Modulation du système immunitaire

La Lf a plusieurs effets sur le système immunitaire. Sa localisation dans les fluides les plus susceptibles d'être en contact avec des microorganismes pathogènes ou la flore endogène lui permet de contrôler ces populations ou de les éliminer. Lors de son contact avec les bactéries non-désirables, les neutrophiles libèrent l'apolactoferrine de leurs granules secondaires afin de contribuer à leur pouvoir antimicrobien. Durant ce processus, le niveau de Lf augmente de façon importante dans tous les fluides biologiques, reflétant ainsi son apport au système de défense du corps (Kanyshkova *et al.*, 2001).

Cette protéine a la capacité de se lier à plusieurs types cellulaires du système immunitaire. Quelques uns de ces récepteurs de la Lf ont été identifiés à la surface des myéloblastes (Birgens *et al.*, 1984), des monocytes (Birgens *et al.*, 1983), des macrophages (van Snick et Masson, 1976), des lymphocytes (Mazurier *et al.*, 1989) ainsi qu'à la surface des cellules épithéliales impliquées dans la production de TNF-α (Iyer et Lonnerdal, 1993). Certaines études ont démontré que l'ADN présent à la surface des leucocytes sert également de récepteur à la Lf. En se liant à ces récepteurs, la Lf module le processus anti-inflammatoire ainsi que les réactions allergiques par la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules du système immunitaire en influençant la production de cytokines (Conneely, 2001; Kanyshkova *et al.*, 2001). Un autre mécanisme d'action impliqué dans les réactions anti-inflammatoires, qui est plus ou moins connu du monde scientifique, serait associé à la capacité que possède la Lf à se fixer aux LPS des bactéries, empêchant ainsi leur contact avec les récepteurs CD14 des macrophages et l'initiation la réponse immunitaire (Appelmelk *et al.*, 1994).

1.4.3.8. Régulation de la transcription

De récentes études suggèrent que la Lf pourrait aussi agir en tant que facteur de régulation de la transcription. Il a été démontré qu'elle peut pénétrer à l'intérieur du noyau et activer la transcription en se liant à des séquences d'ADN spécifiques. Les mécanismes contrôlant les effets de la Lf comme facteur de transcription, tout comme les gènes cibles, n'ont pas encore été identifiés. Les études se poursuivent afin d'approfondir la compréhension du rôle des interactions de la Lf avec les différents types cellulaires (Penco *et al.*, 1995; He et Furmanski, 1995).

1.4.4. Production et utilisation actuelle

La production de Lf à des fins commerciales et de recherches scientifiques est plutôt ardue. La méthode la plus utilisée est l'isolement et la purification de la protéine à partir du lait bovin et humain (Belizi et al., 1999). Les quantités récoltées sont très faibles comparativement au temps investi. Il y a aussi plusieurs systèmes d'expression qui ont été développés afin de produire de la Lf recombinante. Certains ont été développés chez la moisissure *A. awamori* (Ward *et al.*, 1997), chez des vaches et des souris transgéniques (van Berkel *et al.*, 2002; Nuijens *et al.*, 1997), ainsi que dans des cellules d'insectes par le biais de baculovirus (Salmon *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003). Tous ces systèmes d'expression obtiennent des quantités de Lf minimes, sont très dispendieux et demandent beaucoup de temps de préparation et de manipulation.

Plusieurs produits contenant de la Lf ont d'ailleurs été commercialisés dans quelques pays, notamment au Japon et aux États-Unis, en promouvant ses actions bénéfiques pour la santé humaine (figure 6). Ces produits sont présents sous forme de laits maternisés pour la nutrition du nouveau-né et de capsules ou de comprimés en tant que supplément alimentaire.

Figure 6. Produits commercialisés, ou en voie de l'être, contenant de la lactoferrine. **A**, capsules de lactoferrine du Japon (http://www.lactoferrin.jp/images/lactoferrin2.jpg); **B**, lactoferrine en poudre du Japon (http://www.dmc-lef.com/pic/lactoferrin.jpg); **C**, différents produits pouvant contenir de la lactoferrine de la compagnie DMV International (http://www.lfplus.com/s3/34.html), soit un yogourt, des comprimés, un lait maternisé, de la gomme à mâcher et une boisson sportive (de gauche à droite).

1.5. La transcriptomique

1.5.1. Mise en contexte

Il y a quelques années, l'émergence de la génomique a permis des avancées spectaculaires dans le domaine de la biologie. Le séquençage du génome d'organismes vivants, dont les humains et les animaux, a mené les scientifiques à s'interroger sur d'autres questions. La génomique en soit ne donne pas de réponse quant aux gènes utilisés par l'organisme, de façon constitutive ou inductible à certaines conditions, à l'importance de certains gènes par rapport aux autres, aux modifications post-transcriptionnelles des ARNm comme l'épissage alternatif ainsi qu'à la quantité de protéines produites dans l'organisme et les modifications post-traductionnelles qu'elles ont pu subir. La transcriptomique et la protéomique ont donc été développées afin de répondre à ces interrogations. La première étudiant tout ce qui touche à l'expression des gènes et la deuxième se concentrant sur les protéines réellement produites et les modifications subies entre la transcription du gène et la protéine mature (Hedge *et al.*, 2003).

1.5.2. Les biopuces

La transcriptomique est l'étude du transcriptome, qui se définit comme étant l'ARNm total, soit les transcrits, d'une cellule ou d'un tissu à un temps précis (Hedge *et al.*, 2003). Ceci implique qu'il existe plusieurs transcriptomes pour un seul génome. L'utilisation des biopuces permet l'analyse de ces différents transcriptomes en quantifiant les ARNm de milliers de gènes à la fois. Des études sur le profil d'expression de pathogènes sous différentes conditions, sur l'interaction hôte-pathogène, sur le polymorphisme génétique, sur le mécanisme d'action de nouveaux médicaments ainsi que sur de nouvelles cibles thérapeutiques ont été effectuées à l'aide de la technologie des biopuces (Kato-Maeda *et al.*, 2001).

Les biopuces consistent en des oligonucléotides synthétisés ou des ADN complémentaires (ADNc) à différents cadres de lecture ouverts amplifiés par PCR, représentant une portion ou la totalité des gènes exprimés par un organisme, déposés

in situ sur une lame de verre traitée chimiquement ou tout autre surface solide (DeRisi *et al.*, 1997). Dans le cadre de ce projet de recherche, des amplicons correspondant à 7339 gènes de *Streptomyces coelicolor* M145 déposés sur une lame de verre ont été utilisés. Ces amplicons servent à l'hybridation des ADNc produits lors d'une réaction de transcription inverse à partir des ARNm à analyser. Lors de cette réaction, des nucléotides associés à un fluorophore ou à un isotope radioactif sont incorporés à l'ADNc afin d'obtenir des sondes. Étant donné que les fluorophores cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5) seront utilisés, seulement cette technique sera expliquée. Suite à l'hybridation des ADNc marqués aux fragments d'ADN sur les biopuces, la fluorescence émanant de chacun de ces derniers permettra l'identification et la quantification de l'expression des gènes de l'organisme analysé (http://medicine.ucsd.edu/faculty/Wynshaw-Boris/Microarrays/microoverview.html).

1.5.3. Analyse des résultats obtenus avec les biopuces

Les analyses de biopuces étant différentielles, deux conditions peuvent être observées simultanément. Ces conditions peuvent être différents milieux ou différentes conditions de culture, différentes phases de croissance pour un seul organisme ou simplement deux organismes différents mais apparentés. Lorsque plusieurs conditions doivent être comparées les unes avec les autres, un même contrôle peut être utilisé pour chacune des conditions et ainsi, diminuer le nombre de biopuces à hybrider et faciliter l'analyse. Ce contrôle peut être une des conditions choisies ou de l'ADN génomique. Dans ce cas-ci, une condition a été choisie comme contrôle d'expression génique et a été identifiée par l'incorporation du fluorophore Cy3, tandis que la condition test où l'expression relative des gènes sera évaluée est identifiée par le Cy5. Étant donné que chacune des conditions peut contenir l'ARNm d'un même gène, et donc s'hybrider à un même point, c'est la résultante de la fluorescence émise en ce point qui sera analysée (figure 7).

En effet, le Cy3 émet une fluorescence représentée par la couleur verte et le Cy5 émet une fluorescence représentée par la couleur rouge. La résultante des deux est

représentée quant à elle par la couleur jaune. Lorsqu'un gène est représenté par un point rouge ou vert, cela signifie qu'il n'y a qu'une seule condition qui a permis l'expression de ce gène. Afin de faciliter la compréhension de cette analyse, la réorganisation des résultats sur un graphique est utilisée (figure 8). La médiane étant jaune, ce qui implique que les deux conditions possèdent le même transcrit en quantité équivalente, les points s'en éloignant de part et d'autre représentent les transcrits de plus en plus spécifiques à chacune des conditions. C'est de cette façon que l'identification de gènes uniquement induits dans une condition particulière est possible.

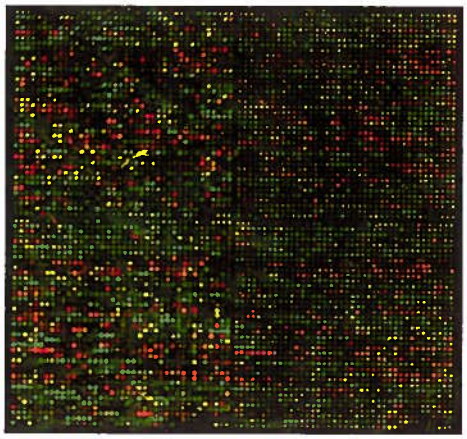


Figure 7. Exemple de résultat d'une analyse de biopuce. Chaque point représente un gène d'un organisme. ●, représente des gènes n'ayant aucune expression pour les deux conditions sous étude; ●, représente des gènes exprimés pour les deux conditions; ●, représente des gènes exprimés dans la condition où le Cy5 a été utilisé; ●, représente des gènes exprimés dans l'autre condition où le Cy3 a été utilisé (www.agilent.com).

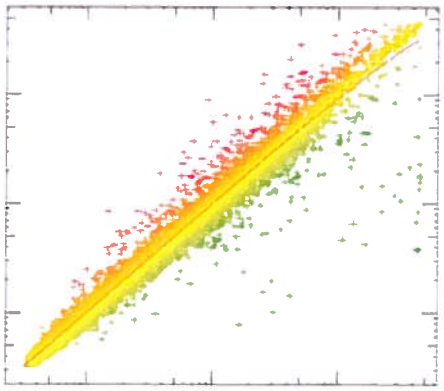


Figure 8: Graphique représentant les résultats obtenus d'une analyse de biopuce. Une médiane a été tracée avec les gènes présentant une quantité équivalente de transcrits pour chacune des conditions testées, ●. Les gènes plus ou moins exprimés pour une des deux conditions s'éloignent progressivement de la médiane selon les proportions de chacune (variation de couleur de jaune à rouge et de jaune à vert) jusqu'à ce que le point ne corresponde qu'à une seule des conditions, ● ou ● (www.agilent.com).

2. MÉTHODOLOGIE

2.1. Matériel

2.1.1. Liste des produits utilisés

Acétate de potassium (Sigma)
Acétone (Sigma)
Acide acétique glaciale (EMD)
Acide borique (Sigma)
Acide chlorhydrique (EM Science)
Acide citrique (J.T. Baker)
Acide maléique (Mallinckrodt)
Acrylamide (ICN)
Adénosine 5'-triphosphate (Pharmacia)
Agarose LE (Roche)
Agar Simmons citrate (Difco)
Amorces aléatoires (hexamères) (Invitrogen)
Ampicilline (Sigma)
Anticorps polyclonal anti-lactoferrine provenant de la chèvre (US Biological)
Anticorps polyclonal anti-lactoferrine provenant du lapin (Biodesign International)
Anticorps anti-IgG de lapin provenant de la chèvre (HRP) (Biodesign International)
Anti-mousse Blitz (Laboratoires Choisy)
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) en comprimé (Sigma)
β-mercaptoéthanol (Sigma)
Bacto Agar (USB)
Bacto Tryptone (Difco)
Bacto Yeast extract (Difco)
Bleu de bromophénol (ICN)
Bleu de Coomassie R-250 (BioRad)
Bromure d'éthidium 10 mg/ml (Plusone)
Casamino acids (Difco)
Chloroforme (EM Science)
Chlorure de calcium dihydrate (EM Science)
Chlorure de cobalt hexahydrate(BDH Chemicals)
Chlorure de cuivre dihydrate (Fischer)
Chlorure de fer hexahydrate (Fischer)
Chlorure de potassium (Sigma)
Chlorure de sodium (Fischer)
Citrate de sodium (Mallinckrodt)
Cy3-dCTP (Cy3-5-amino-propargyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate) (GE Healthcare)
Cy5-dCTP (Cy5-5-amino-propargyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate) (GE Healthcare)
DEPC (diethyl pyrocarbonate) (Sigma)
DMSO (diméthylsulfoxyde) (Laboratoire MAT)
DNase I certifié sans RNases (Qiagen)
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (J.T. Baker)
Extrait de bœuf (Difco)
Ficoll type 400 (Sigma)

Formamide (GE Healthcare)
γ-globuline bovine (Sigma)
Glucose (J.T. Baker)
Glycérol (Fischer)
Glycérol ultrapur (ICN Biomedicals)
Glycine (GE Healthcare)
Hydroxyde de sodium (J.T. Baker)
Hydroxyquinoline (Sigma)
Inhibiteur de ribonucléase RNase OUT (Invitrogen)
IPTG (Isopropylthio-β-D-galactosidase) (Gibco BRL)
Isopropanol (J.T. Baker)
K_2SO_4 (J.T. Baker)
Lactoferrine bovine (Sigma)
Lactoferrine humaine (Sigma)
L-proline (ICN Biomedicals)
Lysozyme (Sigma)
Maltose (Difco)
Mélange de dNTPs de grade PCR (Invitrogen)
Membrane de nitrocellulose (GE healthcare)
Méthanol (Laboratoire MAT)
Méthionine (Sigma)
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (J.T. Baker)
$MgSO_4 \cdot 7\ H_20$ (BDH Chemicals)
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (J.T. Baker)
$MnSO_4 \cdot 4\ H_20$ (J.T. Baker)
MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid) (Sigma)
$Na_2B_4O7 \cdot 10\ H_2O$ (J.T. Baker)
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$ (Fischer)
$(NH_4)_2SO_4$ (Fischer)
Nitrate d'argent (BDH)
N,N'-méthylène-bis-acrylamide (BioRad)
NZ-amine A (Sigma)
Papier pH Color pHast Indicator Strips pH 6.5-10.0 et 4.0-7.0 (VWR International)
Persulfate d'ammonium (BioRad)
Phénol (USB)
Phosphate de potassium dibasique (J.T. Baker)
Phosphate de potassium monobasique (J.T. Baker)
Phosphate de sodium monobasique (Laboratoire MAT)
Phosphate de sodium dibasique (Laboratoire MAT)
Plaque de 96 puits (Sarstedt)
PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) (Sigma)
Pronase (Sigma)
Polyéthylène glycol 1500 50% (Roche)
Polyéthylène glycol 8000 (Sigma)
Réactif bloqueur pour ELISA sans protéines laitières (Roche Diagnostics)
Saccharose (USB)

SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (Bio-Rad)
Solution résiduelle (Technologie Biolactis Inc.)
Sulfate de cuivre (J.T. Baker)
Sulfate de fer heptahydrate (J.T. Baker)
SYBR Green II 10 000X (Molecular Probes)
Tampon carbonate-bicarbonate en capsule (Sigma)
Tampon phosphate-citrate en capsule de perborate de sodium (Sigma)
Tampon TES (tris EDTA saccharose) (Sigma)
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine) (BioRad)
Thiamine (vitamine B1) (Sigma)
Thiostreptone (Sigma)
Trousse GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)
Trousse de PCR Titanium Taq (BD Biosciences)
Trousse Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen)
Trousse QIAprep Spin miniprep (Qiagen)
Transcriptase inverse SuperScript™ RNase H- (Invitrogen)
Tris (tris(hydroxyméthyl) aminométhane) (Roche)
Trizma Base (Sigma)
TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco)
Tween 20 (Sigma)
Tween 80 (Aldrich)
Tyrosine (Nutritional Biochemicals Corporation)
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (BioRad)
Xylane (Sigma)
Xylène cyanol (BDH Chemicals)
Xylose (Sigma)
$ZnCl_2$ (J.T.Baker)
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_20$ (J.T. Baker)

2.1.2. Liste des enzymes de restriction utilisées

Tableau 2. Liste des enzymes de restrictions utilisées et de leurs caractéristiques.

Enzyme	Site de restriction	Tampon	Tampon universel One-Phor-All	Température (^{0}C)	
				Optimale	Désactivation
*Bam*HI	G/GATCC	K	2X	30 *	85
*Eco*RI	G/AATTC	H	2X	37	65
*Hind*III	A/AGCTT	M	1X	37	85
*Pst*I	CTGCA/G	H	1X	37	85
*Sac*I	GAGCT/C	L	1X	37	65
*Sph*I	GCATG/C	H	2X	37	65

* Les manipulations ont été effectuées à 37 degré celsius (^{0}C).

2.1.3. Liste des amorces utilisées lors des réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Tableau 3. Liste des amorces de PCR, leur séquence et température d'hybridation à laquelle elles ont été utilisées.

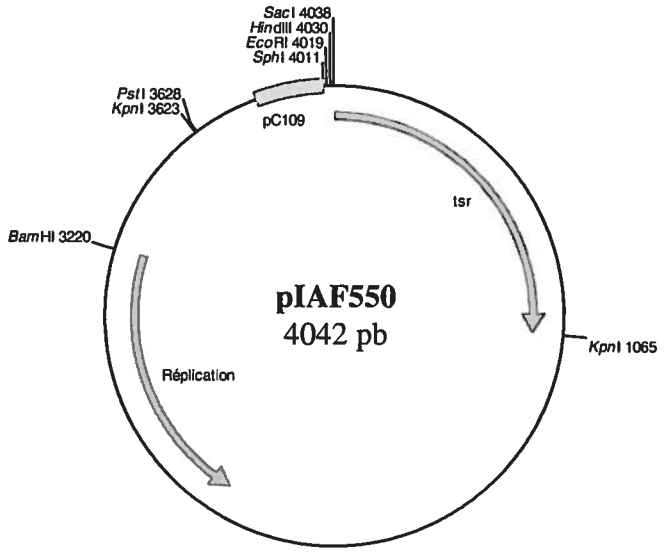
Amorces	Séquence (5' - 3')	Température d'hybridation (°C)
Lf-1	GGCCGCAGGAGAAGGAGCGTCCAGTGGTGCACCGTCTCCCA	50 et 55
Lac56H	AAAGCATGCACCATCACCATCACCATATCGAGGGGCGCGGCCGCAGGAGAAGGAGCGT	50
Lf-50	TCACCTCAGGTTCTGGATGGCGGTGAAGTAGCCGGAGCCCAGGTACA	50 et 55
Lac3Sac	AGTGGCGGTAGGTCTTGGACTCCACTCGAGAAA	50 et 70
ARNr 16S 5'	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	55
ARNr 16S 3'	TTACGGCGGC T/G GCTGGCAC	55
550 -40	CCCCGCCGTGGTTCGGGCAA	54
550 +40	CCGCTCTTCCCCGTCCGGGA	54, 56 et 60
ÉcoLacto	AAAGAATTCCACCATCACCATCACCATAT	56
Lacto5native	AAAGAATTCGGCCGCAGGAGAAGGAGCGT	60
XlnC 5'	GAACGCATGCAGCAGGACGGCACA	70
XlnC-Lacto F 5'	TGCCCGGCACAGCCCACGCCGGCCGCAGGAGAAGGAGCGTCCA	70
Lacto-XlnC R 3'	TGGACGCTCCTTCTCCTGCGGCCGGCGTGGGCTGTGCCGGGCA	70
PβGal Kpn 5'	GGGGGTACCGGGATGACGTTACGCGGTGT	68
PβGal Sph 3'	CCCGCATGCCCGTGGCCTTCCGTGGGCTTC	68
XlnB 5'	CGCATGCTGCTGCTCGTCCAGCCGAGGCG	68
XlnB 3'	CCCGAGCTCTCACCCGCCGACGTTGATGCT	68

* T/G correspond à une base dégénérée.

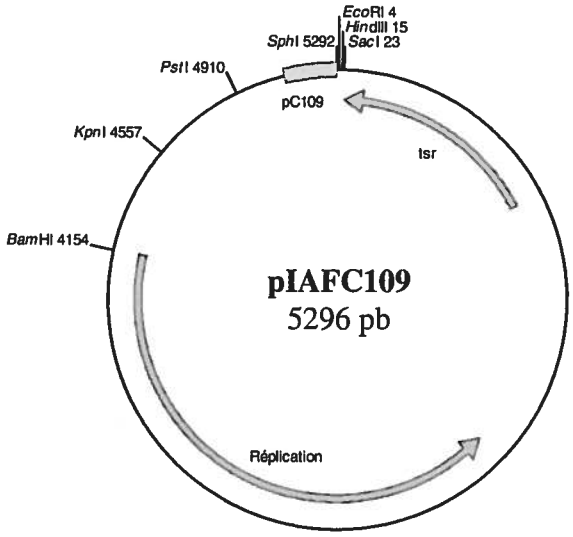
2.1.4. Description des vecteurs utilisés

Dans cette section, les vecteurs d'origine qui ont été utilisés lors de la construction des différentes souches contenant le gène recombinant de la Lf_htr ainsi que les constructions résultantes sont présentés (figure 9 et 10). De plus, d'autres vecteurs utilisés comme contrôles ou lors du séquençage de certains gènes y sont également présents (figure 11).

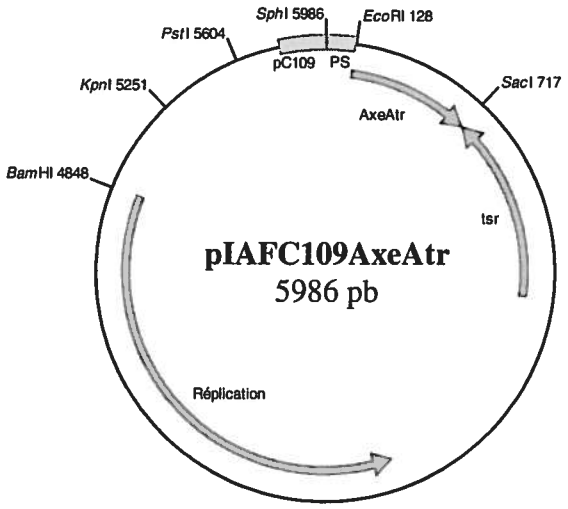
A


SacI 4038
HindIII 4030
EcoRI 4019
SphI 4011
PstI 3628
KpnI 3623
pC109
tsr
BamHI 3220
pIAF550
4042 pb
KpnI 1065
Réplication

B


EcoRI 4
HindIII 15
SphI 5292
SacI 23
PstI 4910
pC109
KpnI 4557
tsr
BamHI 4154
pIAFC109
5296 pb
Réplication

C


SphI 5986
EcoRI 128
PstI 5604
pC109
PS
KpnI 5251
SacI 717
AxeAtr
BamHI 4848
tsr
pIAFC109AxeAtr
5986 pb
Réplication

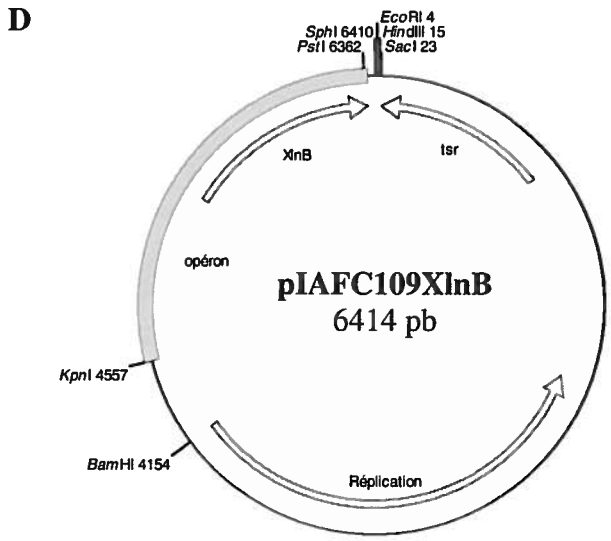
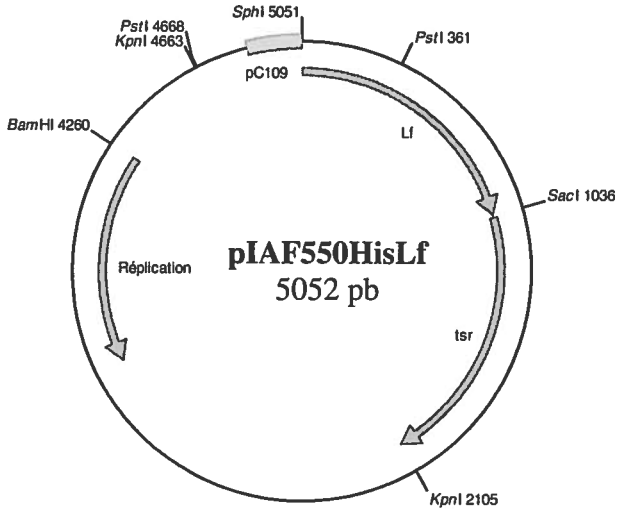
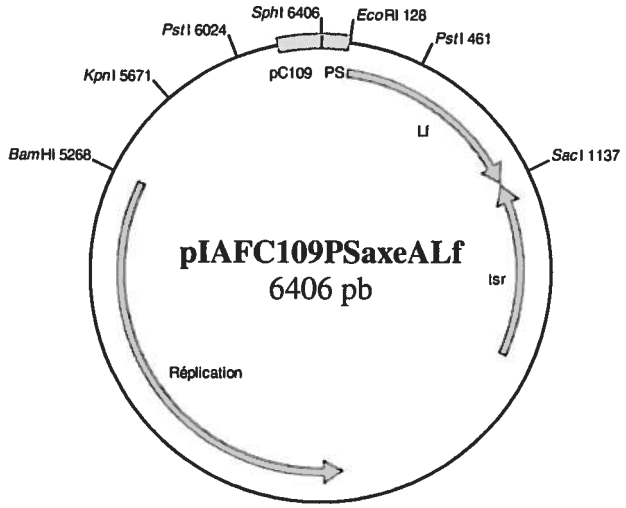


Figure 9. Vecteurs initiaux utilisés pour le clonage du gène de la lactoferrine recombinante humaine tronquée. A, vecteur pIAF550; **B**, vecteur pIAFC109; **C**, vecteur pIAFC109AxeAtr; vecteur pIAFC109XlnB. pC109, promoteur C109; tsr, gène de résistance à l'antibiotique thiostreptone; Réplication, région responsable de la réplication du vecteur; AxeAtr, gène de l'acétylxylane estérase A tronqué; Opéron, opéron de la xylanase B; XlnB, gène de la xylanase B.

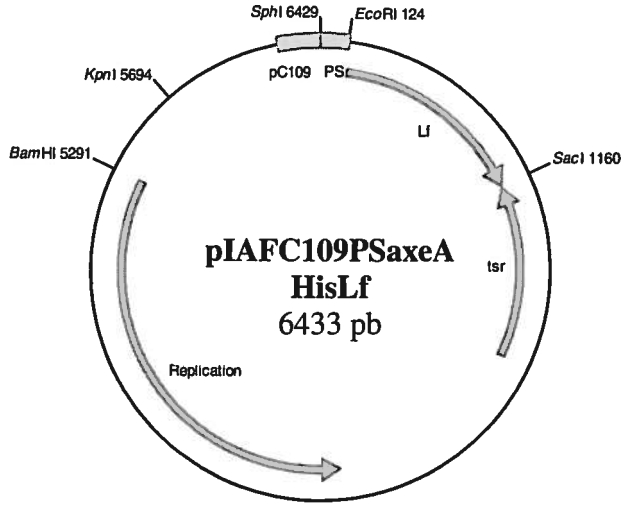
A


SphI 5051
PstI 4668
KpnI 4663
PstI 361
pC109
BamHI 4260
Lf
SacI 1036
Réplication
pIAF550HisLf
5052 pb
tsr
KpnI 2105

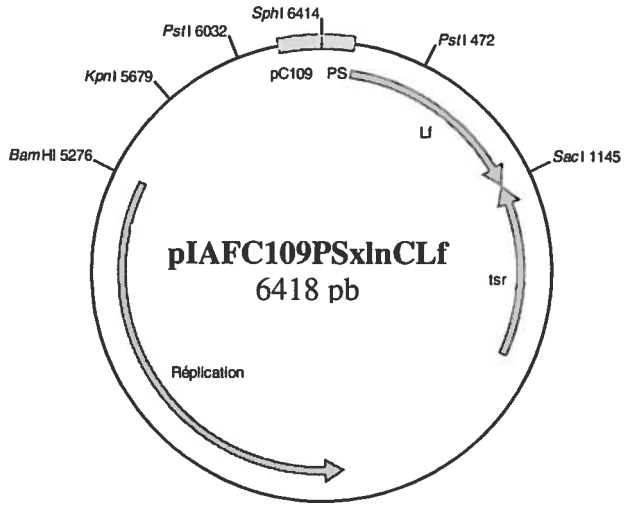
B


SphI 6406
EcoRI 128
PstI 6024
PstI 461
KpnI 5671
pC109
PS
Lf
BamHI 5268
SacI 1137
pIAFC109PSaxeALf
6406 pb
tsr
Réplication

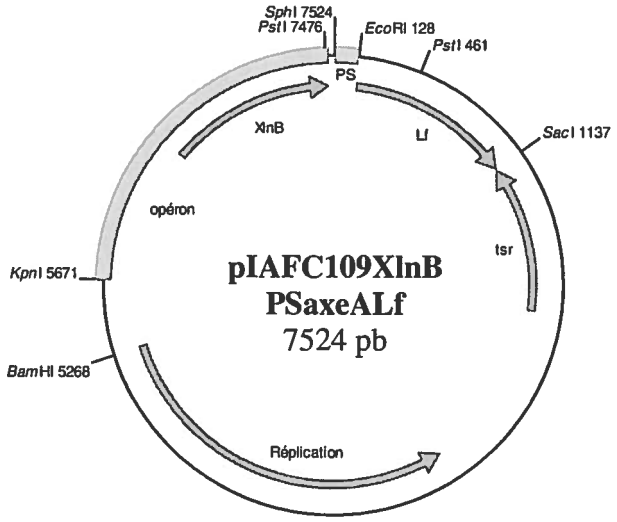
C


SphI 6429
EcoRI 124
KpnI 5694
pC109
PS
Lf
BamHI 5291
SacI 1160
pIAFC109PSaxeA
HisLf
6433 pb
tsr
Replication

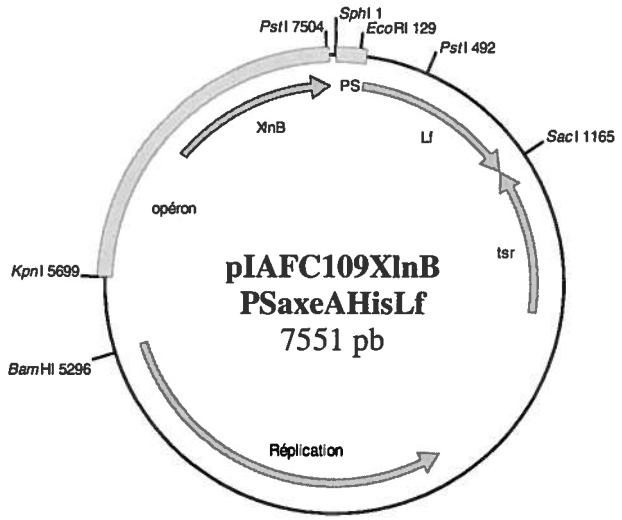
D


SphI 6414
PstI 6032
PstI 472
KpnI 5679
pC109
PS
Lf
BamHI 5276
SacI 1145
pIAFC109PSxlnCLf
6418 pb
tsr
Réplication

E


SphI 7524
PstI 7476
EcoRI 128
PstI 461
PS
XlnB
Lf
SacI 1137
opéron
tsr
KpnI 5671
pIAFC109XlnB
PSaxeALf
7524 pb
BamHI 5268
Réplication

F


PstI 7504
SphI 1
EcoRI 129
PstI 492
PS
XlnB
Lf
SacI 1165
opéron
tsr
KpnI 5699
pIAFC109XlnB
PSaxeAHisLf
7551 pb
BamHI 5296
Réplication

G

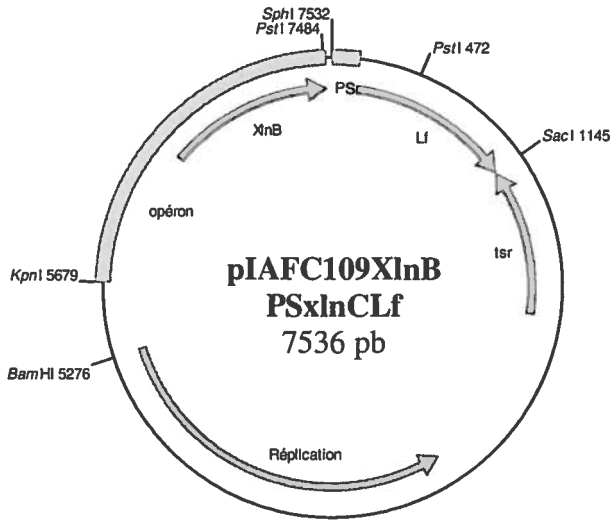


Figure 10. Vecteurs contenant le gène de la lactoferrine recombinante humaine tronquée. **A**, vecteur pIAF550HisLf; **B**, vecteur pIAFC109PSaxeALf; **C**, vecteur pIAFC109PSaxeAHisLf; **D**, vecteur pIAFC109PSxlnCLf; **E**, vecteur pIAFC109XlnBPSaxeALf; **F**, vecteur pIAFC109XlnBPSaxeAHisLf; **G**, vecteur pIAFC109XlnBPSxlnCLf. pC109, promoteur C109; PS, peptide signal; Opéron, opéron du gène de la xylanase B; XlnB, gène de la xylanase B; AxeA; gène de l'acétylxylane estérase A; XlnC, gène de la xylanase C; tsr, gène de résistance à l'antibiotique thiostreptone; Réplication, région responsable de la réplication du vecteur; His, étiquette de 6 histidines; Lf, gène de la lactoferrine humaine recombinante tronquée.

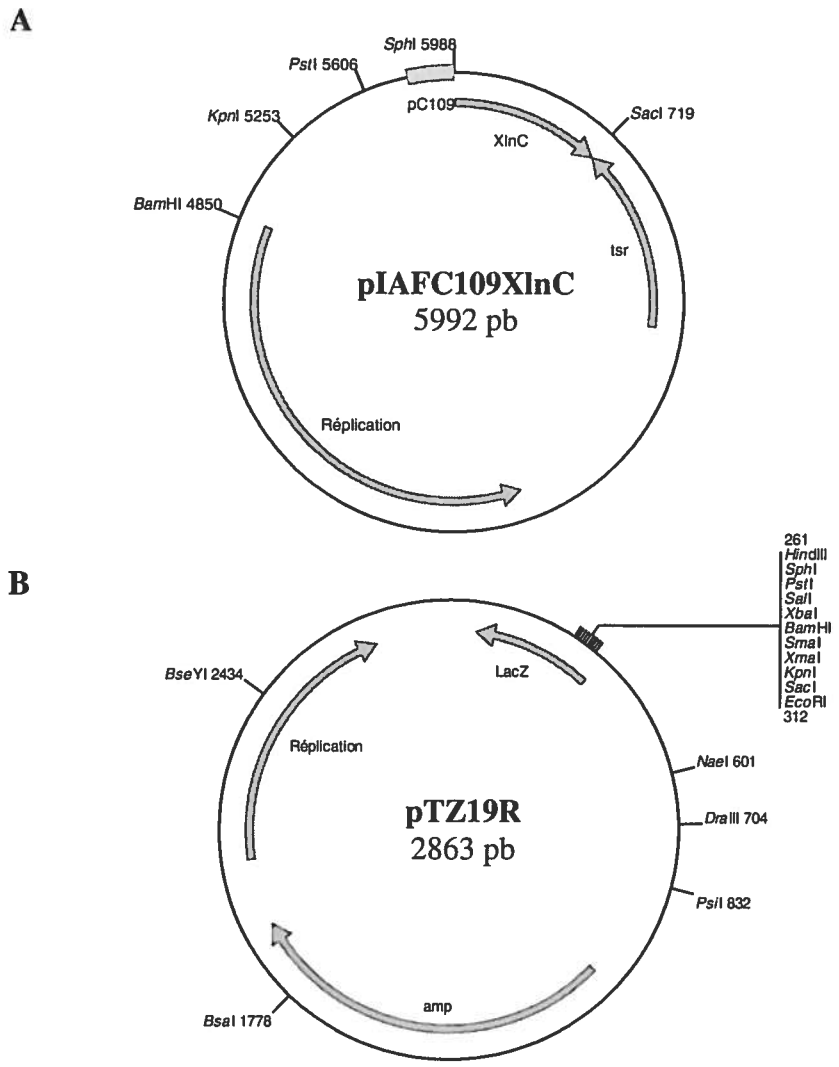


Figure 11. Autres vecteurs. A, Le vecteur pIAFC109XlnC est un vecteur de contrôle de production protéique pour les essais d'un promoteur spécifique à la solution résiduelle. pC109, promoteur C109; XlnC, gène de la xylanase C; tsr, gène de résistance à l'antibiotique thiostreptone; Réplication, région responsable de la réplication du vecteur. Le vecteur pIAFC109pβGalXlnC est identique à l'exception du fait que le segment *Kpn-Sph* a été remplacé par la région promotrice supposée de la β-galactosidase de *S. coelicolor* M145. **B**, Le vecteur pTZ19R de la compagnie Gibco BRL est un vecteur d'amplification d'inserts destinés à être séquencés dans le microorganisme *Escherichia coli*. LacZ, gène de la β-galactosidase contenant un site de clonage multiple; amp, gène de résistance à l'ampicilline; Réplication, région responsable de la réplication du vecteur.

2.2. Milieux de culture

2.2.1. *Escherichia coli*

2.2.1.1. Milieu 2xTY

Le milieu 2xTY utilisé pour la croissance de *E. coli* a été préparé en dissolvant 16 g de Bacto Tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl dans 1 L d'eau distillée puis en stérilisant le milieu à l'autoclave à 121^{0}C durant 20 minutes.

Dans le cas du milieu sous forme solide, 15 g/L de bacto agar ont été ajoutés à la préparation, puis le milieu a été réparti dans des bouteilles de verre avant d'être stérilisé à l'autoclave à 121^{0}C durant 20 minutes. Le milieu de culture a ensuite été refroidi en position inclinée puis conservé à 4^{0}C. Par la suite, le milieu a été liquéfié au micro-onde et une fois sa température stabilisée à 55^{0}C, il a été réparti à raison de 25 millilitres (ml) par pétri de plastique stérile. Les pétris contenant de l'ampicilline ont été conservés un maximum de 14 jours.

2.2.1.2. Milieu Simmons citrate

Le milieu Simmons Citrate utilisé pour la conservation de *E. coli* DH11S a été préparé en ajoutant à 1 L d'eau distillée 24.2 g d'agar Simmons Citrate. Le milieu a été stérilisé à 121^{0}C durant 15 minutes. Une fois refroidi à une température de 55^{0}C, une solution de glucose stérile y a été ajouté jusqu'à une concentration finale de 0.04% ainsi qu'une solution de thiamine également stérile jusqu'à une concentration de 0.01%. Le milieu a été réparti à raison de 25 ml par pétri.

2.2.2. Streptomycètes

2.2.2.1. Milieu R5

Le milieu R5 solide utilisé pour la régénération des protoplastes a été fait en dissolvant 103 g de saccharose, 0.25 g de K_2SO_4, 10.12 g de $MgCl_2$, 10 g de

glucose, 100 mg de Casamino Acids, 2 ml de la solution d'éléments traces, 5 g d'extrait de levure et 5.73 g de tampon TES dans 955 ml. Pour le milieu solide, 22 g d'agar ont été ajoutés. Après une stérilisation à 121^{0}C durant 20 minutes, les solutions stériles suivantes ont été ajoutées à raison de 10 ml de KH_2PO_4 0.5%, 4 ml de $CaCl_2$ 5M, 1 ml de $CuSO_4$ 5 mg/ml, 15 ml de L-proline 20%, 10 ml de méthionine 1% ainsi que 0.4 g de tyrosine dissout dans 5 ml de NaOH 1N stérilisé avec un filtre 0.2 µm. Le milieu a été agité et distribué à raison de 25 ml par pétri de plastique stérile. Par la suite, les pétris ont été séchés jusqu'à une perte de 15% de leur poids à la température de la pièce.

La solution d'éléments traces est composée de 40 mg de $ZnCl_2$, 200 mg de $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$, 10 mg de $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 10 mg de $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$, 10 mg de $Na_2B_4O7 \cdot 10\ H_2O$ et 10 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$ dissous dans 1 L d'eau distillée.

2.2.2.2. Milieu Bennett

Le milieu Bennett a été préparé en ajoutant à 1 L d'eau distillée 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de bœuf, 2 g de NZ-amine A, 10 g de maltose et 22 g d'agar. Le milieu a ensuite été ajusté à un pH de 7.3, puis stérilisé à l'autoclave à 121^{0}C durant 20 minutes. Lorsque la température du milieu s'est stabilisée à 55^{0}C, il a été réparti à raison de 25 ml par pétri.

2.2.2.3. Milieu riche TSB

Le milieu riche TSB liquide a été fait de 27.5 g de Tryptic Soy Broth sans glucose dilué dans 1 L d'eau distillée puis stérilisé à l'autoclave à 121^{0}C durant 20 minutes.

Dans le TSB-PEG-Blitz, du PEG 8000 à 50% à raison de 120 ml pour 1 L ainsi que de l'anti-mousse Blitz à raison de 0.5 ml pour 1 L ont été ajoutés au mélange avant la stérilisation.

2.2.2.4. Milieu minimal M14

Le milieu M14 a été préparé en dissolvant dans 1 L d'eau distillée 1.4 g de $(NH_4)_2SO_4$, 5 g de K_2HPO_4, 1 g de KH_2PO_4, 2 ml de Tween 80 et 1 ml de sels de Mandels, puis en ajustant le pH à 7.4. Le milieu a ensuite été autoclavé à 121^0C durant 20 minutes.

La solution de sels minéraux de Mandels a été préparée en dissolvant 140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7\ H_20$, 160 mg de $MnSO_4 \cdot 4\ H_20$, 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7\ H_20$ et 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6\ H_20$ dans 100 ml d'eau distillée.

Suite à la stérilisation, les solutions stériles suivantes ont été ajoutées à 100 ml de milieu de culture : 0.6 ml de $MgSO_4 \cdot 7\ H_20$ 5%, 1 ml de $CaCl_2 \cdot 2\ H_20$ et 4 ml de source de carbone à 25%. Ce milieu est utilisé pour faire croître les streptomycètes en présence de plusieurs sources de carbone, et dans le cadre de cette recherche, il a été utilisé comme milieu de culture traditionnel avec du xylose comme source de carbone.

Dans le M14 xylose-PEG-Blitz, le milieu a aussi été supplémenté avec du PEG 8000 à 50% pour une concentration finale de 6%, ainsi qu'avec de l'anti-mousse Blitz pour une concentration de 0.05%.

2.2.2.5. Solution résiduelle digérée à la pronase (SRD)

Afin d'être utilisée comme milieu de culture pour les streptomycètes ainsi que pour la production de protéines, la SR doit être digérée à la pronase (EC 3.4.24.31). Une solution stock de pronase à 20 mg/ml stérilisée sur un filtre

0.2 µm a été ajoutée à la SR stérile pour une concentration finale de 0.2 mg/ml. La SR a été digérée à 37^0C durant 24 heures sans agitation puis autoclavée à 121^0C durant 20 minutes.

Dans le cas de la SRD-PEG-Blitz, la SRD a été complémentée avant d'être ensemencée avec du PEG 8000 50% stérile pour une concentration finale de 6% ainsi qu'avec de l'anti-mousse Blitz stérile pour une concentration finale de 0.05%.

2.2.2.6. Milieu Stewart RBB-xylane

Le milieu RBB-xylane, xylane couplé au bleu brillant de Rémazol, servant à la détection de l'activité xylanolytique a été préparé en dissolvant 1.5 g de RBB-xylane dans 250 ml d'eau distillée bouillante puis en agitant et chauffant durant un minimum de 30 minutes. Cette solution a ensuite été autoclavée à 121^0C durant 20 minutes. Dans un autre Erlenmeyer, 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 g de KH_2PO_4, 5 g de K_2HPO_4, 0.5 g d'extrait de levure, 0.5 g de KCl et 1 ml de sels de Mandels (voir section 2.2.2.4.) ont été ajoutés à 750 ml d'eau distillée puis le pH a été ajusté à 7.2. Par la suite, 17 g d'agar ont été ajoutés puis le milieu a été autoclavé à 121^0C durant 20 minutes. Lorsque les deux solutions se sont stabilisées à une température d'environ 55^0C, elles ont été mélangées et agitées durant 5 minutes. Ensuite, 10 ml de $MgSO_4 \cdot 7\ H_20$ ont été ajoutés et le milieu a été réparti dans des pétris de plastique stériles à raison de 25 ml par pétri.

2.2.3. Résistance aux antibiotiques

Dans le cas où les souches de bactéries utilisées étaient résistantes aux antibiotiques, l'antibiotique en question a été ajouté aux milieux de culture utilisés. Pour les streptomycètes résistants à la thiostreptone, de l'antibiotique concentré à 5 mg/ml ou 50 mg/ml dans le DMSO a été ajouté aux milieux liquides à une

concentration finale de 5 µg/ml et aux milieux solides, lorsque la température du milieu n'excédait pas 55^{0}C, à 50 µg/ml.

Pour les souches de *E. coli* résistantes à l'ampicilline, l'antibiotique à 100 mg/ml dans l'eau distillée a été ajouté à une concentration finale de 100 µg/ml aux milieux liquides et solides.

2.3. Manipulations des acides nucléiques

2.3.1. Protocoles concernant l'ARN

2.3.1.1. Extraction d'ARN du mycélium de streptomycètes

Suite à une incubation d'environ 48 heures pour une extraction d'ARN standard, la culture de 100 ml de streptomycètes a été répartie dans deux tubes coniques en plastique stériles de 50 ml et centrifugées durant 10 minutes à une vitesse de 2 000 x g à la température de la pièce. Le surnageant a ensuite été jeté, puis le culot a été resuspendus dans deux volumes de « RNA Protect Bacteria Reagent » de Qiagen et transféré dans un tube conique en plastique stérile de 15 ml. Le mycélium a ensuite été vortexé durant 1 minute, incubé à la température de la pièce durant 5 minutes puis centrifugé durant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été retiré par décantation.

Afin d'extraire l'ARN total du mycélium, différentes étapes de lyse cellulaire et une extraction au phénol et au chloroforme ont été effectuées. Le culot a donc été resuspendu dans environ 1 ml de lysozyme à 15 mg/ml dissous dans du TE pH 8.0 en agitant mécaniquement avec la pipette. Le mycélium a ensuite été incubé avec le lysozyme durant 10 minutes en étant vortexé à toutes les 2 minutes. Par la suite, 4 ml de tampon RLT (trousse « RNeasy midi kit » de Qiagen) ont été ajoutés au mycélium avant d'être vortexé vigoureusement puis transféré dans des tubes en plastique stériles à bout arrondi de 12 ml. Les tubes ont été déposés sur glace et le mycélium a subi 6 cycles de 30 secondes aux ultrasons intercalés de 20 secondes d'arrêt afin d'être bien lysé. Le lysat a été

transféré dans un tube conique de 15 ml et 1 volume d'un mélange 50% phénol et 50% chloroforme a été ajouté. Le mélange a été vortexé pendant 30 secondes puis centrifugé durant 10 minutes à 3 000 x g à 4^0C. L'extraction a été répétée une deuxième fois. Une fois la phase aqueuse transférée, elle a été extraite avec 1 volume de chloroforme. La solution a ensuite été vortexée durant 30 secondes puis centrifugée pendant 5 minutes.

La trousse « RNeasy midi kit » de Qiagen a ensuite été utilisée pour purifier l'ARN. La phase aqueuse récupérée de l'extraction au phénol et au chloroforme a donc été transférée dans un nouveau tube et son volume a été ajusté à 5 ml avec du tampon RLT. Par la suite, 2.8 ml d'éthanol 95% ont été ajoutés au lysat cellulaire puis agités à la main. Quatre millilitres du lysat précipité ont été appliqués sur une colonne contenant une résine composée de billes de verre adsorbant les acides nucléiques. La colonne a ensuite été centrifugée durant 10 minutes à 3 000 x g à la température de la pièce. Le filtrat a été jeté puis le reste du lysat appliqué sur la colonne et centrifugé. Par la suite, la résine a été lavée à l'aide de 2 ml de tampon RW1. La colonne a été centrifugée durant 5 minutes. Afin de dégrader l'ADN, une solution de désoxyribonucléase (DNase) I (20 microlitres (µl) de DNase I concentrée dans 140 µl de tampon RDD) a été appliquée directement sur la résine puis incubée durant 15 minutes à la température de la pièce. Deux millilitres de tampon RW1 ont ensuite été ajoutés et incubés pour 5 minutes supplémentaires. La colonne a ensuite été centrifugée pendant 5 minutes. La résine a été lavée avec 2.5 ml de tampon RPE avant d'être centrifugée durant 2 minutes. Le lavage a été répété et la colonne centrifugée durant 5 minutes. Une fois sèche, la colonne a été transférée dans un nouveau tube conique de 15 ml certifié sans RNases.

Afin de récupéré l'ARN total, 250 µl d'eau certifiée sans RNases, ou moins selon la quantité de mycélium de départ, ont été appliqués directement sur la résine. La colonne a été incubée durant 1 minute à la température de la pièce puis centrifugée pendant 3 minutes. L'éluat a ensuite été récupéré et appliqué à

nouveau sur la colonne. Elle a été incubée à nouveau durant 1 minute avant d'être centrifugée. L'ARN récupéré a ensuite été déposé rapidement sur la glace et congelé rapidement à -80^{0}C.

2.3.1.2. Analyse de l'ARN sur le BioAnalyzer de Agilent Technologies

L'ARN a été analysé sur les plaquettes « RNA 6000 Nano » à l'aide du BioAnalyzer de Agilent Technologies. Les échantillons d'ARN et le standard de poids moléculaire « RNA 6000 » de Ambion ont été décongelés sur la glace et les solutions de la trousse « RNA 6000 Nano Reagents and Supplies » de Agilent Technologies ont été placées à la température de la pièce pendant 30 minutes avant le début des manipulations. Par la suite, 550 µl de gel ont été pipettés dans un microtube en plastique stérile de 1.5 ml contenant un filtre puis centrifugés à 1 500 x g durant 10 minutes. Le gel a ensuite été aliquoté à raison de 65 µl. Afin de préparer le gel servant à remplir les canaux de la plaquette, le microtube contenant le colorant a été vortexé durant 10 secondes puis centrifugé à 12 000 x g durant 10 secondes. Un microlitre de colorant a ensuite été ajouté à 65 µl de gel filtré. Le gel coloré a ensuite été vortexé afin de rendre la couleur homogène puis a été centrifugé durant 10 minutes. Le gel coloré a été conservé à l'obscurité.

Pendant la centrifugation, les échantillons d'ARN et le standard ont été aliquotés à raison de 2 µl par microtube puis ont été remis sur la glace. La plaquette a ensuite été placée dans le module de remplissage en position C et une seringue de 1 ml y a été insérée. Neuf microlitres du gel coloré ont été pipettés et déposés dans le puits identifié « G » noir. La plaquette a été incubée pendant 30 secondes à la température de la pièce puis le piston de la seringue a été placé à 1 ml, le module a été fermé et le piston pressé jusqu'à ce qu'il soit retenu par la pince grise. La plaquette a été incubée pendant 30 secondes. Le piston a été relâché en appuyant sur la pince grise et la plaquette incubée pour 5 secondes supplémentaires. Le piston a été remis à 1 ml et le module ouvert. Les aliquots

des échantillons et du standard ont été incubés dans un bain sec à 70^0C durant 2 minutes et pendant ce temps, 9 µl du gel coloré ont été ajoutés dans les deux autres puits identifiés « G ». Cinq microlitres du marqueur pour ARN ont été ajoutés dans le puits identifié « Ladder » et les douze puits d'échantillons. Une fois l'incubation des échantillons et du standard terminée, 1 µl de standard a été déposé dans le puits identifié « Ladder ». Par la suite, 1 µl de chacun des échantillons a été ajouté dans les puits d'échantillons. La plaquette a ensuite été vortexée durant 1 minute puis transférée dans le BioAnalyzer en position 1 et le programme « Électrophorèse / ARN / Total RNA procaryote » a été choisi et démarré.

2.3.1.3. Synthèse d'ADNc par transcriptase inverse

Afin de synthétiser de l'ADNc à partir d'ARN total, la transcriptase inverse SuperScript™ II de Invitrogen a été utilisée. Afin d'éviter les contaminations à l'ADN, l'ARN a été tout d'abord traité à la DNAse avant de subir le RT-PCR (PCR en transcription inverse). L'ARN a été décongelé sur la glace, incubé durant 5 minutes à 65^0C, puis a été remis sur la glace. Une digestion à la DNAse I a ensuite été effectuée en ajoutant à 61.1 µl d'eau DEPC, 8 µl d'ARN à 1 µg d'ARN/ µl, 8 µl de tampon de réaction 10X (200 millimolaire (mM) Tris-HCl pH 8.4, 20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl) ainsi que 2.9 µl de DNAse I à 2.73 U/ µl. La réaction a été incubée pour une durée de 15 minutes à la température de la pièce puis la DNAse I a été désactivée avec l'ajout de 400 µl d'eau DEPC et de 500 µl de phénol:chloroforme. Le mélange a été vortexé durant 30 secondes puis centrifugé à 12 000 x g durant 5 minutes à température de la pièce. Environ 300 µl de surnageant ont ensuite été transférés dans un microtube en plastique de 1.5 ml et 500 µl de chloroforme y ont été ajoutés avant d'être vortexés durant 30 secondes. Par la suite, le microtube a été centrifugé durant 2 minutes puis le surnageant a été transféré dans un autre microtube. Trente microlitres d'acétate de sodium 3 M pH 5.0 et 850 µl d'éthanol 95% ont été ajoutés à celui-ci avant d'être incubé à -20^0C durant 3 heures afin de précipiter l'ARN. Le microtube a ensuite

été centrifugé pendant 15 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot d'ARN lavé avec 500 µl d'éthanol 70% à 4^0C. L'ARN a été centrifugé durant 2 minutes, le surnageant a été retiré puis l'ARN a été centrifugé à nouveau. Une fois le liquide résiduel retiré, le culot a été asséché durant 2 minutes en laissant le microtube ouvert puis il a été dissout dans de l'eau DEPC à une concentration finale de 1 µg/µl. La solution d'ARN a ensuite été incubée durant 5 minutes à 65^0C afin d'être bien dissoute puis a été vortexée durant 5 secondes, centrifugée durant 10 secondes puis remise sur glace.

Le mélange réactionnel #1 a été préparé par la suite en mélangeant 4 µl de tampon de réaction 5X, 5.9 µl d'eau DEPC, 0.1 µl d'amorces aléatoires (hexamères) à 3 µg/µl, 1 µl de dNTPs à 10 mM et 0.5 µl d'inhibiteur de RNases "RNAseOUT" à 40 U/µl, pour un volume total de 11.5 µl par réaction. Le mélange réactionnel #1 a ensuite été transféré dans des microtubes en plastique stériles de 0.5 ml puis 5 µg d'ARN ont été ajoutés (5 µl) avant d'être vortexé, centrifugé et remis sur la glace. L'ARN a été incubé en présence du mélange réactionnel #1 durant 10 minutes à 65^0C puis durant 10 minutes sur la glace avant d'être à nouveau vortexé, centrifugé et remis sur la glace. Pendant ces incubations, le mélange réactionnel #2 a été préparé pour une réaction en mélangeant 2 µl de DTT à 0.1 M, 0.5 µl d'inhibiteur de RNases « RNAseOUT » à 40 U/µl et 1 µl de transcriptase inverse SuperScript II à 200 U/µl pour un total de 3.5 µl. Le mélange réactionnel #2 a été ajouté à la première préparation puis mélangé doucement avant d'être centrifugé durant 10 secondes. Une fois les microtubes placés dans l'appareil à PCR, la réaction de transcription inverse a subi le programme suivant : 15 minutes d'hybridation des amorces aléatoires à 25^0C suivies de 2 heures de synthèse des brins à 42^0C. L'appareil a conservé les échantillons à 4^0C aussitôt que le programme a été terminé, mais les réactions de RT ont été rapidement déposées sur la glace pour environ 5 minutes avant d'être diluées par 20 µl d'eau de grade PCR. Les réactions de RT, soit les préparations

d'ADNc, ont été vortexées et centrifugées durant 10 secondes avant d'être congelées à -20^{0}C ou analysées à l'aide d'une amplification d'ADN par PCR.

2.3.2. Protocoles concernant l'ADN

2.3.2.1. Évaluation de la concentration d'acide nucléique au spectrophotomètre

Lors d'une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nanomètre (nm), 1 ml d'eau distillée a été utilisé comme blanc dans une cuvette de quartz. Une fois le zéro d'absorbance fixé, 10 µl de la solution d'acide nucléique ont été ajoutés à l'eau et la lecture effectuée. Une valeur de densité optique (D.O.) de 1 équivalant à 50 nanogrammes (ng)/µl d'ADN, la concentration de la solution a pu être évaluée.

2.3.2.2. Amplification d'ADN par PCR

L'amplification d'ADN *in vitro* par PCR peut être utilisée pour différents besoins. Pour la vérification de la présence d'un insert dans différentes constructions, la trousse « Titanium Taq PCR Kit » de BD Biosciences Clontech a été utilisée. Un mélange réactionnel pour une réaction de 50 µl a été préparé dans un microtube en plastique stérile en mélangeant bien 5 µl de tampon de réaction PCR 10X (400 mM Tricine-KOH pH 8.0, 160 mM KCl, 35 mM $MgCl_2$, 37.5 µg/ml de BSA), 1 µl du mélange de dNTPs 50X, 5 µl de chacune des amorces à 10 pmol/µl, 1 µl de la polymérase Taq ainsi que la quantité d'eau de grade PCR nécessaire pour atteindre un total de 50 µl en soustrayant la quantité d'échantillon à ajouter. Le mélange a ensuite été réparti dans les microtubes en plastique stériles de 0.2 ml. Dans certains cas, l'échantillon a été ajouté sous forme solide donc 33 µl d'eau ont pu être ajoutés au mélange. C'est-à-dire que du mycélium provenant d'une colonie a été ajouté au mélange réactionnel à l'aide d'un embout stérile en remuant l'embout dans ce dernier et en l'incubant environ 1 minute à la température de la pièce. L'embout a ensuite été retiré et la réaction PCR a pu être initiée. Une fois les microtubes dans l'appareil à PCR, le mélange

réactionnel ainsi que l'ADN présent dans la préparation ont subi le programme suivant : 10 minutes de dénaturation à 94^0C, puis 35 cycles de 45 secondes de dénaturation à 94^0C, 45 secondes d'hybridation des amorces à leur température d'hybridation optimale, 1 minute d'élongation à 72^0C suivie de 10 minutes d'élongation supplémentaire à 72^0C. L'appareil a conservé les échantillons à 4^0C aussitôt que le programme a été terminé et les réactions PCR ont été rapidement congelées à -20^0C ou analysées par migration sur un gel d'agarose.

Pour l'amplification d'un gène à cloner dans *S. lividans*, la trousse « Platinum Pfx DNA Polymerase » de Invitrogen contenant une polymérase à haute fidélité a été utilisée. La méthode est identique à celle décrite ci-dessus à l'exception du tampon de réaction PCR qui est spécifique à la polymérase Pfx, une polymérase à haute fidelité, et que 1 µl de $MgSO_4$ 50X doit être ajouté au mélange réactionnel par réaction de 50 µl. Lorsque l'échantillon a été ajouté sous forme solide, la quantité d'eau de grade PCR ajoutée au mélange n'a été que 32 µl.

2.3.2.3. Synthèse du gène de la Lf_htr

La synthèse du gène de la Lf_htr recombinante a été effectuée en assemblant 50 oligonucléotides se chevauchant par amplification PCR (Stemmer *et al.*, 1995). La trousse « Platinum Pfx DNA Polymerase » de Invitrogen a été utilisée pour la réaction PCR d'un volume final de 25 µl. Dix microlitres de chacun des 50 oligonucléotides à 100 µM ont été déposés dans un microtube de plastique stérile de 1.5 ml afin d'obtenir un mélange d'amorces équimolaires à 2 µM. Un microlitre de ce mélange a été utilisé pour la réaction PCR et 19.7 µl d'eau de grade PCR ont été ajoutés en plus de 2.5 µl du tampon d'amplification Pfx 10X, 0.8 µl du mélange de dNTPs à 10 mM, 0.5 µl de $MgSO_4$ à 50 mM et 0.5 µl de la polymérase à ADN Platinum Pfx. Ce mélange a été soumis au programme suivant: 2 minutes de dénaturation à 94^0C, puis 55 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94^0C, 30 secondes d'hybridation à 52^0C, 1 minute

d'élongation à 72^{0}C suivie de 5 minutes d'élongation supplémentaire à 72^{0}C. L'appareil a conservé les échantillons à 4^{0}C aussitôt que le programme a été terminé et les réactions PCR ont été rapidement congelées à -20^{0}C.

Ensuite, 5 µl de cette réaction ont été utilisés afin d'amplifier le gène en entier avec les amorces externes Lac56H et Lac3Sac, qui ont introduit les sites de restriction *Sph*I et *Sac*I aux extrémités 5' et 3' respectivement. À ce 5 µl, se sont ajoutés 14.7 µl d'eau de grade PCR, 2.5 µl de tampon d'amplification Pfx 10 X, 0.8 µl du mélange de dNTPs à 10 mM, 0.5 µl de $MgSO_4$ à 50 mM, 0.5 µl de l'amorce Lac56H à 133 mM, 0.5 µl de l'amorce Lac3Sac à 158 mM et 0.5 µl de la polymérase à ADN Platinum Pfx. La réaction a ensuite été soumise au programme d'amplification PCR standard décrit dans la section 2.3.2.2.

2.3.2.4. Isolement de plasmides de streptomycètes (Hopwood *et al.*, 1985)

Suite à une incubation de 48 heures à 34^{0}C avec une agitation de 240 révolutions par minute (RPM) d'une culture de streptomycètes dans le TSB-thiostreptone (TSB-TS), le mycélium a été décanté durant quelques minutes. Des prélèvements de 500 µl de mycélium ont été effectués puis déposés dans des microtubes en plastique stériles de 1.5 ml. Les microtubes ont été centrifugés à 12 000 x g durant 30 secondes à la température de la pièce afin d'obtenir environ 100 µl de mycélium compacté. Le surnageant a été jeté puis le culot a été lavé avec 500 µl de solution #1 stérile (10.3 % saccharose, 25 mM Tris et 25 mM EDTA pH 8.0). Le mycélium a été vortexé durant 10 secondes puis centrifugé à nouveau.

Afin de lyser le mycélium, le surnageant a été aspiré doucement et 400 µl d'une solution de lysozyme à 2 mg/ml dans la solution #1 ont été ajoutés au culot. Les microtubes ont été vortexés durant 10 secondes puis incubés durant 1 heure à 37^{0}C. Une fois l'incubation terminée, 250 µl de solution #2 fraîche (0.3 N NaOH et 2% SDS) ont été ajoutés et les microtubes ont été vortexés immédiatement

durant 10 secondes. Ceux-ci ont ensuite été déposés dans un bain-marie où la température de l'eau se situait entre 70^0C et 74^0C et qui a ensuite été éteint. Une fois la température descendue à 30^0C, soit environ une heure et demi, les microtubes ont été retirés et 100 µl de solution #3 (10 g de phénol, 10 mg d'hydroxyquinoline, 10 ml de chloroforme et 2 ml d'eau distillée) y ont été ajoutés. Les microtubes ont été vortexés immédiatement durant 10 secondes puis centrifugés durant 3 minutes. Les surnageants ont été retirés par aspiration puis les microtubes ont été centrifugés à nouveau durant 10 secondes. Le reste du surnageant a été retiré par aspiration et le culot a été asséché durant 5 minutes à l'air ambiant. Cinquante microlitres de TE pH 8.0 (1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris) et 5 µl d'acétate de sodium 3 M ont été ajoutés au culot, puis les microtubes ont été agités à l'agitateur mécanique durant 1 minute. Vingt-cinq microlitres de phénol neutre ont été ajoutés à un tube à la fois et les microtubes ont été vortexés immédiatement durant 5 secondes. Ils ont ensuite été centrifugés durant 3 minutes. Cinquante microlitres de la phase aqueuse ont été transférés dans un microtube et 50 µl d'isopropanol y ont été ajoutés. Les microtubes ont été mélangés par inversion puis incubés durant 5 minutes à la température de la pièce afin de précipiter l'ADN. Suite à une centrifugation de 10 minutes, le surnageant a été aspiré et les microtubes centrifugés à nouveau durant 10 secondes. Le reste du surnageant a été aspiré et le culot asséché à l'évaporateur rotatif durant 3 minutes. Cinquante microlitres d'eau distillée autoclavée ont été ajoutés au culot puis les microtubes ont été agités à l'agitateur mécanique durant 1 minute afin que l'ADN se solubilise. La préparation d'ADN plasmidique a ensuite été congelée et conservée à -20^0C.

2.3.2.5. Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour visualiser des fragments d'ADN d'environ 12 000 paires de bases (pb) à 1 000 pb, un gel de 0.7% poids/volume (p/v) d'agarose a été utilisé tandis que pour des fragments de 1 000 pb à 200 pb, un gel d'agarose de 2% p/v a été utilisé. L'agarose a été dissous par chauffage dans du TBE 1X (89 mM Tris-HCl,

20 mM EDTA pH 8.0, 89 mM acide borique). Lorsque la solution a été refroidie à environ 50^0C, du bromure d'éthidium concentré a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 0.5 µg/ml afin de permettre la visualisation des bandes d'ADN sous illumination aux ultraviolets. Après avoir solidifié durant environ 1 heure, le gel a été déposé dans une cuve « DNA Sub Cell » de BioRad et recouvert de tampon TBE 1X.

Les échantillons à analyser ont été mélangés à du tampon d'échantillon 6X (0.25% de bleu de bromophénol, 0.25% de xylène cyanol et 15% de Ficoll de type 400) dans une proportion de 5 :1 avant d'être déposés dans les puits du gel. Le marqueur de poids moléculaire utilisé a été le « 1 Kb PLUS DNA Ladder » de Gibco BRL ou le « Low DNA Mass Ladder 2 » de Invitrogen. La migration s'est effectuée sous une tension de 30 volts (V) durant 16 heures ou de 100 V pour une durée de 3 heures émise par le « PowerPAC Basic » de BioRad. La visualisation des bandes aux ultraviolets a été réalisée à l'aide du « AlphaImager™ 3400 » de AlphaInnotech à 302 nm.

2.3.2.6. Purification de fragments d'ADN d'un gel d'agarose

Afin de purifier un fragment d'ADN, la trousse « GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit » de GE Healthcare a été utilisée. Après la migration d'une préparation d'ADN sur un gel d'agarose, la bande à purifier a été identifiée à l'aide des ultraviolets. La bande a ensuite été découpée et transférée dans un microtube de plastique de 1.5 ml préalablement pesé (à 0.1 mg près). Le microtube a ensuite été pesé avec la bande et le poids de celle-ci en milligramme a été calculé. Dix microlitres de tampon de capture ont alors été ajoutés pour chaque 10 mg de bande pour un maximum de 300 µl de tampon de capture (3 M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl pH 6.6, 5% éthanol) et 300 mg de bande. Le microtube a été vortexé puis incubé à 60^0C durant environ 10 minutes jusqu'à ce que l'agarose se soit dissoute. Le microtube a ensuite été centrifugé à 12 000 x g à la température de la pièce environ 10 secondes et le liquide a été

transféré sur la colonne GFX. La colonne a été incubée 1 minute à la température de la pièce avant d'être centrifugée durant 30 secondes. Le filtrat a ensuite été jeté et la colonne lavée avec 500 µl de tampon de lavage (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% éthanol) pour ensuite être centrifugée à nouveau. Le filtrat a été jeté puis la colonne a été transférée dans un microtube. Entre 10 et 50 µl de TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ont été déposés au milieu de la colonne et celle-ci a été incubée durant 1 minute avant d'être centrifugée pendant 1 minute. La solution filtrée contenant le fragment d'ADN purifié a ensuite été analysée sur gel d'agarose afin d'évaluer sa concentration ou conservée à -20^0C.

2.3.2.7. Digestion d'ADN par des endonucléases de restriction

Pour digérer de l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction, une réaction de 20 µl a été préparée. Pour des digestions simples, le tampon spécifique à l'enzyme a été utilisé soit les tampons 10X **L** (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol), **M** (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 500 mM NaCl), **H** (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 1000 mM NaCl) et **K** (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 1000 mM KCl) à une concentration de 1X soit 2 µl. Par la suite, de 0.2 à 1 µg d'ADN ont été ajoutés au tampon optimal de l'enzyme, à 1 µl de l'enzyme utilisée et à l'eau distillée autoclavée afin de compléter le volume à 20 µl. Dans le cas d'une digestion double, le tampon « One-Phor-All *PLUS* 10X » de Pharmacia (100 mM Tris-acétate pH 7.5, 100 mM acétate de magnésium et 500 mM acétate de potassium) a été utilisé à des concentrations de 0.5X, 1X ou 2X selon les enzymes utilisées. La préparation a ensuite été incubée à la température optimale de l'enzyme, qui est habituellement 37^0C, durant une heure et demie. Lorsque la digestion double comprenait des enzymes non-compatibles au niveau de la concentration du tampon, l'ajout de 2 µl de tampon supplémentaire a été nécessaire et la digestion a été poursuivie pour une heure et demie (la réaction était alors de 22 µl au total).

Quinze minutes avant la fin de l'incubation, 1 µl de RNase à 1 µg/µl a été ajouté à la réaction afin d'éliminer l'ARN qui aurait pu s'y trouver. Les enzymes ont ensuite été désactivées à 65^{0}C ou 85^{0}C durant 20 minutes selon leur spécification. La digestion a ensuite été analysée sur un gel d'agarose ou congelée à -20^{0}C.

2.3.2.8. Ligation d'ADN à un vecteur

Afin de liguer un fragment d'ADN avec un vecteur ayant tous deux été digérés par les mêmes enzymes de restriction ou par des enzymes qui ont laissé des extrémités compatibles, une réaction de ligation a été effectuée. Entre 400 et 600 ng d'un vecteur ont été mélangés à 600 ng d'insert puis ajoutés à 2 µl d'ATP à 10 mM, 2 µl de tampon «One-Phor-All 10X» de USB et 1 µl d'ADN ligase T4 de USB également, le tout dans un volume d'eau distillée autoclavée permettant de compléter à 20 µl. La ligation a été effectuée à la température de la pièce pour une durée d'environ 7 heures.

2.4. Manipulations des streptomycètes

2.4.1. Préparation de protoplastes de *S. lividans* 10-164

À partir d'une ampoule de *S. lividans* 10-164 lyophilisé, 15 ml de milieu riche TSB ont été ensemencés dans un Erlenmeyer contenant 5 billes de verre et incubés à 34^{0}C avec agitation pour 24 heures. La culture a ensuite été homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur manuel puis le mycélium de 5 ml de culture a été récupéré à l'aide d'une centrifugation de 10 minutes à 2 000 x g à la température de la pièce. Cent millilitres de milieu R5 ont été ensemencés avec le mycélium puis incubés pendant 24 heures à 34^{0}C avec agitation. La culture a été homogénéisée à nouveau puis centrifugée dans une bouteille à centrifugation en plastique stérile de 500 ml durant 10 minutes à 14 300 x g. Le culot a été lavé avec 30 à 40 ml d'une solution de sucrose 10.3%. Le mycélium a ensuite été transféré dans une bouteille à centrifugation de plastique stérile de 50 ml puis centrifugé durant 10 minutes à

12 000 x g. Les étapes de lavage et de centrifugation ont été répétées pour ensuite resuspendre le culot dans 30 ml d'une solution de lysozyme (1 mg de lysozyme pour 1 ml de tampon P filtré sur un filtre de 0.2 µm) et l'incuber à 34^{0}C dans un bain-marie. Après 15 minutes, la solution a doucement été mélangée, puis remise au bain-marie. Quinze microlitres de la préparation ont été déposés sur une lame de verre afin d'évaluer le pourcentage du mycélium converti en protoplastes au microscope à contraste de phase. La préparation étant composée de plus de 95% de protoplastes, 15 ml de tampon P (voir paragraphe ci-dessous) ont été ajoutés et l'incubation poursuivie jusqu'à 45 minutes. La suspension de protoplastes a ensuite été filtrée sur de la laine de verre préalablement imbibée de la solution de sucrose 10.3%. Les protoplastes ont été recueillis dans une bouteille à centrifugation de 50 ml puis centrifugés durant 10 minutes à 3 000 x g. Le culot de protoplastes a été délicatement resuspendu dans le volume résiduel de décantation puis 30 à 40 ml de tampon P ont été ajoutés. Les protoplastes ont été centrifugés à nouveau et le lavage répété. Dix millilitres de tampon P ont été ajoutés aux protoplastes resuspendus. La concentration de protoplastes a été vérifiée en déterminant la densité optique à 600 nm de la solution diluée 1/100 et 1/1000 dans du tampon P contre un blanc de tampon P (figure 12) et leur intégrité a été vérifiée en les observant au microscope à contraste de phase. Les protoplastes ont été dilués avec du tampon P à une concentration de 1 à 2.5 x 10^{10} cellules par millilitre puis répartis dans des microtubes en plastique stériles de 1.5 ml en aliquots de 120 µl et congelés à -80^{0}C.

Le tampon P a été préparé en dissolvant à 800 ml d'eau distillée 103 g de sucrose, 0.25 g de K_2SO_4, 2 ml de solution d'éléments traces (voir section 2.2.2.1.) et 2.02 g de $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$. Le tampon a ensuite été réparti dans 5 bouteilles de verre à raison de 160 ml par bouteille puis stérilisé à l'autoclave à 121^{0}C durant 20 minutes. Chaque bouteille a ensuite été supplémentée avec 2 ml de KH_2PO_4 0.5%, 20 ml de $CaCl_2$ 3.68% et 20 ml de tampon TES pH 7.2 5.73% avant d'être utilisée.

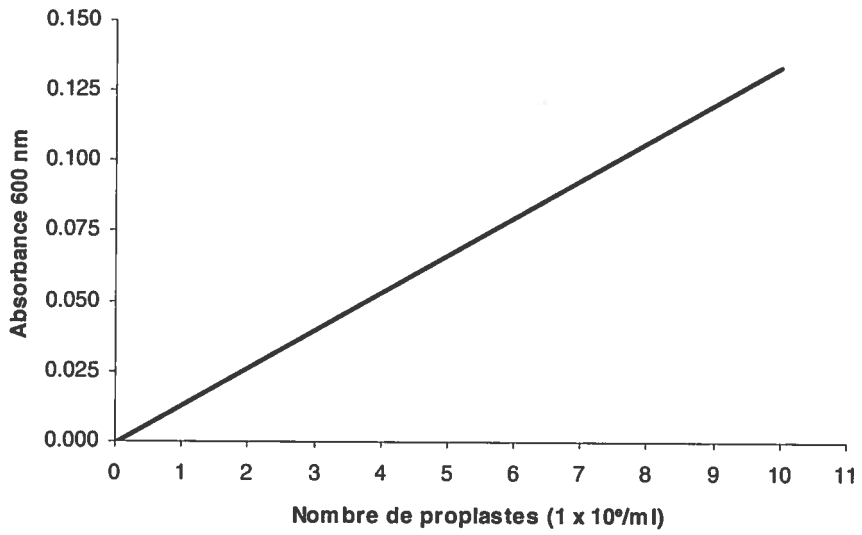


Figure 12. Courbe de tendance représentant le nombre de protoplastes de *S. lividans* 10-164 en fonction de la densité optique. Absorbance à 600 nm de différentes suspensions de protoplastes de *S. lividans* 10-164 de concentration connue (L. Biron, laboratoire de F. Shareck, INRS-IAF).

2.4.2. Transformation de *Streptomyces lividans* 10-164

Tout d'abord, les pétris R5 nécessaires à la transformation de *S. lividans* 10-164 ont été ouverts et asséchés durant 20 minutes sous la hotte à flux laminaire. Par la suite, 50 µl de protoplastes de *S. lividans* 10-164 et 200 µl de PEG 25% ont été ajoutés à la ligation du plasmide et de l'insert (20 µl). Ces solutions ont ensuite été mélangées doucement en aspirant et rejetant trois fois à l'aide d'une pipette P1000. Après 1 minute et demie d'attente, 10 µl, 25 µl, 50 µl ou 100 µl selon la transformation ont été déposés sur une gélose R5 puis étalés à l'aide de billes de verre stériles. Après 16 heures d'incubation à 34^{0}C, chaque gélose a été recouverte d'une solution contenant 500 µg de thiostreptone (10 µl de thiostreptone 50 µg/µl dilués dans le DMSO dans 1.5 ml d'eau distillée stérile) afin de sélectionner les protoplastes ayant été transformés par le plasmide qui contient le gène de résistance à cet

antibiotique. Par la suite, les géloses ont été incubées de 2 à 5 jours à 34^0C jusqu'à l'apparition de colonies résistantes.

Le PEG 25% a été préparé en mélangeant 4 ml de PEG 50% avec 4 ml de tampon T supplémenté stérile. Le tampon T est composé de 25 ml de saccharose 10.3%, 75 ml d'eau distillée, 0.2 ml d'une solution d'éléments traces et de 1 ml de K_2SO_4 2.5%. À 9.3 ml de tampon T a été ajouté 0.2 ml de $CaCl_2$ 5 M et 0.5 ml de tampon Tris-acide maléique 1 M pH 8.0 pour obtenir du tampon T supplémenté.

2.4.3. Culture de streptomycètes

Après une croissance du mycélium sur le milieu Bennett ou Bennett-thiostreptone de 5 à 7 jours à 34^0C, du mycélium et des spores ont été récoltés à l'aide d'une bouclée de platine. Douze millilitres de TSB ou de TSB-PEG-Blitz avec ou sans thiostreptone contenus dans un Erlenmeyer de 50 ml contenant 5 billes de verre (3 à 5 mm de diamètre) ont été inoculés par ce mycélium ou par un dixième du volume provenant d'une autre culture, soit environ 1 ml. Suite à une incubation de 24 heures à 34^0C avec une agitation de 240 RPM, la pré-culture a été récupérée et homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur manuel puis 10 ml ont été transférés dans un tube en plastique stérile à bout arrondi de 12 ml. Le tube a été centrifugé durant 10 minutes dans une centrifugeuse de table clinique (IEC Clinical Centrifuge) à 2 000 x g. Le mycélium récupéré a été resuspendu dans le milieu de culture voulu pour la croissance des streptomycètes pour ensemencer par la suite 100 ml de ce milieu contenu dans un Erlenmeyer de 500 ml. La croissance a été effectuée à 34^0C avec une agitation de 240 RPM pour une durée voulue.

2.4.4. Courbe de croissance de *Streptomyces coelicolor* M145

Afin de réaliser des expériences de biopuces avec l'ARN de *S. coelicolor* M145 en SRD, il a été important de déterminer les phases de croissance de la bactérie au cours du temps (Huang *et al.*, 2001). Pour ce faire, deux pré-cultures de 12 ml en TSB-PEG-Blitz ont été ensemencées avec le mycélium de 1 ml d'une pré-culture de

12 ml de *S. coelicolor* M145 cultivée en TSB congelé à -20^{0}C dans le glycérol 50% stérile. Par la suite, deux cultures en SRD-PEG-Blitz ou en M14 xylose-PEG-Blitz standard ont été préparées. Des prélèvements de 0.5 à 1 ml ont été effectués à toutes les heures de 0 à 12 heures puis à 24, 25, 28, 32 et 48 heures et le pH a été évalué à l'aide de papier pH « Color pHast Indicator Strips pH 6.5-10.0 et 4.0-7.0 » de VWR International. Ces prélèvements ont ensuite été homogénéisés pendant environ 1 minute, ou dilués de 1/1 à 1/10 avec de l'eau distillée et ensuite homogénéisés. Par la suite, 1 ml de l'échantillon a été transféré dans des cuvettes de 1 ml en plastique puis lu au spectrophotomètre à 450 nm contre un blanc de milieu de culture dilué comme l'échantillon. Les valeurs d'absorbance ont toujours été prises entre 0.200 et 0.900.

Afin d'éviter une prise trop importante de mycélium lors des prélèvements et ainsi, affecter la croissance de *S. coelicolor*, deux cultures ont été étudiées simultanément. Les trois premiers prélèvements ont été effectués dans les deux cultures et un facteur de conversion a été trouvé pour corréler l'absorbance. Par la suite, cinq prélèvements ont été effectués dans une culture puis les deux prélèvements subséquents ont été effectués avec les deux cultures. Le reste de l'expérimentation a été effectué dans l'autre culture.

2.4.5. Lyse du mycélium de streptomycètes aux ultrasons

Suite à l'incubation d'une culture de 48 heures, le mycélium a été récupéré à l'aide d'une centrifugation de 10 minutes à 2 000 x g à la température de la pièce. Le culot a ensuite été resuspendu dans deux volumes de tampon sodium phosphate 20 mM à pH 7.0 contenant 0.1 mM de PMSF et transféré dans un tube en plastique stérile de 12 ml à bout arrondi. Le mycélium a été vortexé durant 1 minute puis centrifugé à nouveau. Le surnageant a été jeté et le mycélium a été resuspendu dans deux volumes de tampon. Une fois l'appareil à ultrasons calibré, le tube a été déposé sur glace et la sonde de l'appareil a ensuite été enfoncée jusqu'à une profondeur d'au moins 1 cm dans la suspension de mycélium en s'assurant que celle-ci ne touchait pas

aux parois du tube. L'appareil à ultrasons a ensuite été mis en marche et l'intensité a été augmentée jusqu'à 3. Des cycles de 1 minute avec ultrasons intercalés de 45 secondes d'arrêt ont été effectués jusqu'à ce que le mycélium soit lysé et qu'il n'y ait plus de présence d'amas. La séparation du mycélium a été vérifiée à l'aide du microscope à contraste de phase à l'immersion (1 000 X) en utilisant 15 à 20 µl de la suspension. La suspension de mycélium a été divisée en plusieurs microtubes de plastique de 1.5 ml puis centrifugée à 12 000 x g durant 10 minutes à 4^0C. Le lysat intracellulaire a ensuite été transféré dans des microtubes propres et congelé à -20^0C.

2.4.6. Précipitation des protéines du surnageant à l'acétone

Afin de concentrer les protéines du surnageant d'une culture de streptomycètes, 500 µl de surnageant ont été précipités dans un microtube en plastique de 1.5 ml en y ajoutant 1 ml d'acétone. La solution a ensuite été vortexée durant 10 secondes puis déposée durant 1 heure sur la glace. La solution a ensuite été centrifugée à 12 000 x g durant 5 minutes puis le surnageant a été jeté. Le culot contenant les protéines a été asséché à l'aide de l'évaporateur rotatif durant environ 5 minutes. Les protéines ont été resuspendues dans 16 µl d'eau distillée pour ensuite être utilisées comme échantillon dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) (voir la section 3.6.2. pour la préparation de l'échantillon).

2.4.7. Concentration du surnageant de culture de streptomycètes

Afin de concentrer les protéines du surnageant de culture de streptomycètes, des unités de concentration « Macrosep Centrifugal Devices 3K Omega » de Pall Filtron et de « NanoSpin Plus 4K » de Gelman Sciences ont été utilisés. Pour ce faire, 15 ml de surnageant supplémenté avec l'inhibiteur de protéases PMSF à une concentration de 0.1 mM ont été déposés dans un tube de concentration de Pall Filtron de 50 ml. Les tubes ont été centrifugés à 4 500 x g à 4^0C durant environ 8 heures. Le filtrat a ensuite été jeté et le surnageant concentré a été récupéré en fixant le module de récolte sous la membrane et en centrifugeant le tube durant 3 minutes. La

concentration protéique du surnageant concentré a été évaluée par la méthode de Bradford.

Par la suite, 500 µl de ce surnageant ont été concentrés à nouveau en étant transférés dans un microtube de concentration de Gelman Sciences de 1.5 ml pour être centrifugés à 12 000 x g durant environ une heure et demi. Une fois la centrifugation terminée, le filtrat a été récupéré à l'aide d'une micropipette puis transféré dans un microtube en plastique de 1.5 ml. Par la suite, le reste du surnageant à concentrer a été transféré dans le microtube de concentration en ayant pris soin de noter son volume exact. Une fois les manipulations répétées pour le reste de l'échantillon, le volume de surnageant concentré récolté a été mesuré et le facteur de concentration a été évalué avec l'aide du volume de départ. La concentration du surnageant concentré a ainsi pu être évaluée en la comparant avec la valeur obtenue lors du test de Bradford après la première étape de concentration.

2.4.8. Évaluation de l'effet antibactérien de la Lf sur les streptomycètes

La souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109 a été utilisée afin d'évaluer le pouvoir antibactérien de la Lf sur les streptomycètes. Pour ce faire, des dilutions de Lf bovine à des concentrations de 1 mM, 750 micromolaires (µM), 500 µM, 250 µM et 100 µM ont été effectuées dans de l'eau distillée stérile à partir d'une solution stock à 1 mM stérilisée par filtration sur un filtre 0.2 µm. Un contrôle négatif constitué d'eau distillée stérile a été utilisé. Par la suite, du mycélium de *S. lividans* 10-164/pIAFC109 a été récolté à partir d'une culture de 5 jours à 34^{0}C sur une gélose Bennett-thiostreptone (BT). Ce mycélium a été ajouté à 150 µl d'eau distillée stérile dans un microtube en plastique stérile de 1.5 ml puis vortexé afin d'obtenir une suspension homogène et turbide. À l'aide d'un écouvillon stérile, la suspension a été étalée sur une gélose BT et laissée à sécher durant 45 minutes. Une fois la gélose sèche, 6 µl de chaque dilution de Lf et du contrôle négatif ont été déposés à une certaine distance l'une de l'autre sur la gélose. La gélose a ensuite été laissée à sécher durant 45 minutes. Une fois la gélose sèche, la gélose a été incubée à 34^{0}C durant 2 à

3 jours ou jusqu'à ce qu'il y ait croissance d'un tapis bactérien. Les zones d'inhibitions créées par les dépôts de Lf ont ensuite pu être observées.

2.5. Manipulations de *Escherichia coli*

2.5.1. Préparation de cellules compétentes *E. coli* DH11S

Pour préparer des cellules compétentes de *E. coli* DH11S, un milieu Simmons citrate a tout d'abord été inoculé par cette souche. Par la suite, une colonie isolée a été utilisée pour ensemencer 5 ml de milieu de culture 2xTY contenus dans un Erlenmeyer de 25 ml et a été incubée à 37^{0}C avec agitation à 240 RPM durant 24 heures. Ensuite, 2.5 ml de cette pré-culture ont été transférés dans 250 ml de 2xTY contenus dans un Erlenmeyer de 1000 ml. Cette culture a été incubée à 37^{0}C avec une agitation de 240 RPM jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0.4. Une fois la densité optique atteinte, la culture a été transférée dans des bouteilles à centrifugation en plastique stériles de 500 ml préalablement déposées sur la glace. La culture a été incubée durant 15 minutes sur la glace avant d'être centrifugée à 1 100 x g pendant 15 minutes à 4^{0}C. Le surnageant a ensuite été jeté et le culot resuspendu dans 83 ml de tampon CBI (voir paragraphe ci-dessous) en aspirant et rejetant à l'aide de la pipette jusqu'à homogénéité. La suspension a ensuite été incubée 1 heure sur la glace avant d'être centrifugée à 1 500 x g durant 15 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot resuspendu cette fois dans 10 ml de tampon CBII (voir paragraphe ci-dessous) en aspirant et rejetant à l'aide de la pipette. Par la suite, la suspension a été incubée durant 15 minutes sur la glace puis aliquotée à raison de 220 µl par microtube en plastique de 1.5 ml stérile qui ont été préalablement disposés dans un support contenant de la glace sèche et du méthanol afin de permettre une congélation rapide des cellules compétentes. Les microtubes ont été transférés le plus rapidement possible dans un congélateur à -80^{0}C.

Le tampon CBI a été préparé en ajoutant à 200 ml d'eau distillée 40 ml de KCl 1 molaire (M), 24 ml de $CaCl_2$ 1 M, 2.4 ml d'acétate de potassium 5 M et 60 ml de glycérol ultra pur. Le pH a été ajusté à 5.8 avec une solution d'acide acétique 0.2 M

avant que le volume soit complété à 400 ml avec de l'eau distillée. Le tampon a ensuite été filtré sous vide sur un filtre 0.2 µm.

Le tampon CBII quant à lui a été préparé en ajoutant à 100 ml d'eau distillée 2 ml de KCl 1 M, 15 ml de $CaCl_2$ 1 M, 4 ml de MOPS 0.5 M et 30 ml de glycérol ultrapure. Le pH a été ajusté à 6.8 avec du NaOH 0.5 M puis le volume a été ajusté à 200 ml avec de l'eau distillée. Le tampon a ensuite été stérilisé sur un filtre 0.2 µm.

2.5.2. Transformation de *E. coli*

Suite à la ligation d'un insert dans le vecteur pTZ19R, la réaction de ligation a été utilisée afin de transformer des cellules compétentes de *E. coli* DH11S. Tout d'abord, 100 µl de cellules compétentes ont été ajoutés aux 20 µl de réaction de ligation. Ces cellules ont été incubées durant 30 minutes sur la glace. Celles-ci ont ensuite été soumises à un choc thermique à 42^0C durant 2 minutes avant d'être déposées sur la glace et incubées durant 2 minutes. Les cellules transformées ont été incubées à 37^0C avec une agitation de 240 RPM pour une durée de 45 minutes avec 400 µl du milieu 2xTY liquide. Suite à l'incubation, 100 µl et 200 µl de la culture ont été déposés sur une gélose 2xTY-ampicilline qui a préalablement été imbibée de 50 µl de X-Gal à 2% et de 10 µl d'IPTG à 100 µM dilués dans 100 µl d'eau distillée stérile. Les géloses ont été incubées à 37^0C durant 16 heures puis les colonies blanches ont été sélectionnées afin de récupérer les bactéries contenant l'insert dans le vecteur.

2.5.3. Isolement de plasmides

L'isolement de plasmides de *E. coli* a été réalisé à l'aide de la trousse « QIAprep Spin miniprep » de Qiagen. Suite à la culture d'une colonie de *E. coli* en 2 ml de 2xTY-ampicilline pendant 16 heures à 37^0C avec agitation à 240 RPM, le culot a été récupéré à l'aide d'une centrifugation à 12 000 x g durant 10 minutes. Ce dernier a été resuspendu dans 250 µl de tampon P1 à 4^0C puis transféré dans un microtube en plastique de 1.5 ml. Par la suite, 250 µl de tampon P2 ont été ajoutés et la suspension

bactérienne a été mélangée par inversion de 4 à 6 fois. Une fois les bactéries lysées, la solution étant devenue visqueuse et claire, 350 µl de tampon P3 ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN génomique. Le microtube a été centrifugé durant 10 minutes puis le surnageant a été déposé sur une colonne QIAprep. La colonne a été centrifugée environ 1 minute puis l'éluat a été jeté. La colonne a été lavée avec 500 µl de tampon PB puis centrifugée à nouveau. L'éluat a été jeté et la colonne a été lavée avec 750 µl de tampon PE. La colonne a été centrifugée à nouveau et l'éluat jeté. La colonne a été centrifugée durant 1 minute afin d'être asséchée complètement. La colonne a ensuite été transférée dans un autre microtube et l'ADN plasmidique a été récupéré en déposant 50 µl de tampon EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) sur la colonne. La colonne a été incubée durant 1 minute puis centrifugée pendant 1 minute afin de récupérer l'éluat.

2.6. Manipulations des protéines

2.6.1. Analyse de la concentration protéique par la technique de Bradford

La technique de Bradford a été utilisée afin de mesurer la concentration protéique des surnageants de culture ou des lysats intracellulaires des bactéries. Tout d'abord, un standard protéique, la γ-globuline, a été dilué dans un volume final de 1 ml à des concentrations de 50.4 µg/ml, 43.2 µg/ml, 36.0 µg/ml, 28.8 µg/ml, 21.6 µg/ml, 14.4 µg/ml, 7.2 µg/ml, 3.6 µg/ml et de 1.8 µg/ml à partir d'une solution stock de 1.44 mg/ml et d'une solution-mère de 57.6 µg/ml. Les échantillons, ainsi que le milieu de culture ou le tampon dans lequel les échantillons se trouvent, ont été préparés à l'aide de dilutions successives dans un volume final de 1 ml dans l'eau distillée autoclavée. Des dilutions de 1/5, 1/20, 1/100, 1/500, 1/2 500 et 1/12 500 ont été utilisées selon le cas. Deux cents microlitres de « Protein Assay Reagent » concentré de BioRad ont été ajoutés et mélangés à 800 µl de ces dilutions à intervalles réguliers. Ils ont ensuite été lus au spectrophotomètre à 595 nm entre 5 et 15 minutes après l'addition du colorant contre un blanc d'eau traité comme les échantillons. Une courbe standard a ensuite été faite avec les résultats obtenus pour

la γ-globuline et la concentration protéique des échantillons a été évaluée à l'aide de l'équation. La valeur des tampons et des milieux de culture utilisés a été soustraite aux valeurs obtenues pour les échantillons lorsque celle-ci était importante.

2.6.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant de type SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE a été utilisé pour visualiser et séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Le gel de résolution de polyacrylamide 12% a été préparé en premier en mélangeant à 1.6 ml d'eau distillée autoclavée, 1.3 ml de Tris-HCl pH 8.8 1.5 M, 2 ml d'un mélange d'acrylamide 30% (29.2 g d'acrylamide et 0.8 g de N'N'-méthylène-bis-acrylamide dans 100 ml d'eau distillée), 50 µl de SDS 10%, 50 µl d'ammonium persulfate 10% ainsi que 2 µl de TEMED. La préparation a ensuite été coulée entre les deux vitres espacées de 0.75 mm et de l'eau distillée a été délicatement coulée par-dessus. Après environ 30 minutes de polymérisation, l'eau a été retirée des plaques par inversion et les vitres asséchées à l'aide d'un papier KimWipes. Le gel de concentration composé de 2.1 ml d'eau distillée autoclavée, 380 µl de Tris-HCl pH 6.8 1 M, 0.5 ml d'un mélange d'acrylamide 30%, 30 µl de SDS 10%, 30 µl d'ammonium persulfate 10% ainsi que de 3 µl de TEMED a été coulé à la surface du gel de résolution puis le peigne a été placé immédiatement. Après environ 40 minutes de polymérisation, le gel a été transféré dans la chambre d'électrophorèse « Mini-PROTEAN™ 3 » de BioRad et ensuite, recouvert de tampon de migration 1X (192 mM glycine, 25 mM Tris Base, 3.5 mM SDS). Les échantillons ont été préparés en ajoutant 4 µl de tampon d'échantillon 5X à 16 µl d'échantillon comprenant habituellement 25 µg de protéines. Le tampon d'échantillon 5X a été préparé en mélangeant à 1.5 ml d'eau distillée, 0.5 ml de Tris-HCl pH 6.8 1 M, 3.2 ml de glycérol 50%, 1.6 ml de SDS 10%, 0.8 ml de bleu de bromophénol 0.5% et 0.4 ml de β-mercaptoéthanol. Les échantillons et le marqueur ont ensuite été bouillis durant 10 minutes avant d'être déposés dans les puits à l'aide d'embouts à longue pointe. Dépendamment de l'expérience, 10 µl du marqueur de poids moléculaire « Full Range Rainbow Molecular Weight Markers » de GE Healthcare, du marqueur « SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range » de

BioRad ou du marqueur « 6x His Protein Ladder » de Qiagen ont été utilisés. Le gel a ensuite été soumis à une tension de 200 V par le « PowerPAC Basic » de BioRad durant 30 à 60 minutes selon l'analyse à effectuer.

2.6.3. Coloration d'un gel de polyacrylamide au Bleu de Coomassie

Une fois la migration du gel terminée, le gel de résolution a été séparé du gel de concentration puis submergé dans le colorant bleu de Coomassie R-250 0.1% (méthanol 40%, acide acétique 10%). Après 20 minutes d'incubation à la température de la pièce avec agitation douce, le gel a été rincé à l'eau distillée de 2 à 3 fois puis transféré dans environ 50 ml d'une solution de décoloration (méthanol 40%, acide acétique 10%). Le gel a été décoloré toute la nuit sans agitation puis transféré dans la solution de réhydratation (glycérol 1%, azoture de sodium 1 mM). Après environ 1 heure, le gel a été numérisé puis conservé dans la solution de réhydratation à 4^0C.

2.6.4. Transfert de protéines sur une membrane de type « Western Blot »

Suite à la migration du gel SDS-PAGE, le gel de concentration a été découpé. Le gel de résolution a ensuite été déposé dans le tampon de transfert (39 mM de glycine, 48 mM de Trizma Base, 0.037% de SDS et 20% de méthanol) pour 15 minutes. Une membrane « Hybond ECL Nitrocellulose » de GE Healthcare a été découpée de la même taille que le gel avant d'être humidifiée par capillarité avec de l'eau distillée, puis déposée dans le tampon de transfert pour 10 minutes. Durant ce temps, quatre papiers absorbants Whatman ont été humidifiés dans le tampon de transfert. Une fois le gel et la membrane équilibrés, le montage de la cassette de transfert a été effectué en déposant dans l'ordre un coussinet, deux papiers absorbants, le gel, la membrane, deux papiers absorbants puis un autre coussinet. Une fois les bulles d'air entre la membrane et le gel déplacées en roulant une pipette par-dessus le montage, la cassette a été refermée puis insérée dans la chambre d'électrophorèse qui a été remplie de tampon de transfert. Le contenant interne a ensuite été rempli de glace et le couvercle refermé. Le transfert a été effectué entre 80 et 100 V durant 2 à 3 heures. La glace a

été renouvelée régulièrement durant le transfert. Une fois le transfert terminé, le montage a été défait et la membrane séchée à l'air ambiant durant 1 heure. La membrane a été conservée à 4^0C entre deux papiers absorbants, le tout enroulé dans une pellicule de plastique.

2.6.5. Immunodétection ECL

La membrane sur laquelle a été transféré des protéines a été réhydratée dans du PBS 1X (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 4.3 mM de Na_2PO_4 et 1.5 mM de KH_2PO_4), puis recouverte d'une solution de blocage 1X dans un contenant de plastique environ de la taille de la membrane. Ensuite, elle a été incubée durant 1 heure à la température de la pièce sur une plate-forme agitatrice. La membrane a été lavée sommairement deux fois dans environ 100 ml de PBS 1X supplémenté de 0.1% de Tween-20 (solution de lavage). Une incubation de 15 minutes dans la solution de lavage a été effectuée sur la plate-forme agitatrice, suivie de deux autres incubations de 5 minutes. La solution de lavage a été changée entre chacun des lavages. Par la suite, la membrane a été recouverte de l'anticorps primaire préparé dans la solution de blocage 0.5X diluée dans le tampon de lavage. Elle a été incubée avec agitation pour un minimum d'une heure. La membrane a ensuite été lavée comme décrit ci-dessus. La membrane a été recouverte de l'anticorps secondaire préparé comme l'anticorps primaire. La membrane a été incubée avec agitation durant un certain temps selon l'expérience (voir paragraphes ci-dessous). Le lavage de la membrane a été répété et un lavage supplémentaire d'environ 10 minutes a été effectué. La membrane a ensuite été égouttée sur un papier absorbant, déposée dans un contenant de plastique propre et recouverte de 3 ml de la solution de détection #2 de la trousse « ECL Western blotting analysis system » de GE Healthcare. Dans la chambre noire, 3 ml de la solution de détection #1 ont été ajoutés et mélangés avec la solution de détection #2. Suite à une incubation de 1 minute, la membrane a été égouttée et déposée entre deux acétates. Les bulles d'air ont été retirées en roulant une pipette sur le montage, puis celui-ci a été déposé dans une cassette. Un film d'autoradiographie « Kodak BioMax » de GE Healthcare a été déposé par-dessus et

la cassette a été fermée. Des expositions de 1 à 60 minutes ont été effectuées afin de visualiser les bandes réagissant positivement aux anticorps.

L'immunodétection anti-étiquette de six histidines (His) a été réalisée en utilisant du lait écrémé à 3% comme solution de blocage 1X. L'anticorps primaire anti-étiquette His de souris (GE Healthcare) a été utilisé à une dilution de 1/3 000 et incubé durant 2 heures. L'anticorps secondaire anti-immunoglobuline (Ig) G de souris couplé à l'enzyme HRP, pour « Horse Radish Peroxidase », provenant du mouton (GE Healthcare) a été utilisé à une dilution de 1/5 000 et incubé durant 1 heure.

L'immunodétection anti-Lf a été effectuée en utilisant la solution de blocage 1X (Réactif bloqueur pour ELISA sans protéines laitières) de Roche Diagnostics. L'anticorps primaire polyclonal anti-Lf provenant du lapin (Biodesign International) a été utilisé à une dilution de 1/1 000 et incubé durant 1 heure et demi. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin provenant de la chèvre (Biodesign International) a été utilisé à une dilution de 1/5 000 et incubé durant 30 minutes.

2.6.6. ELISA

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été effectué avec des anticorps polyclonaux spécifiques à la Lf. L'anticorps anti-Lf provenant de la chèvre (US Biological) sélectionné pour le fond de la plaque à 96 puits a été dilué à une concentration de 1/1 000 dans un tampon carbonate-bicarbonate. Cent microlitres de cette dilution ont été déposés dans les puits et incubés durant 1 heure à 37^{0}C. La plaque a ensuite été transférée à 4^{0}C pour 16 heures. La plaque a été vidée par inversion puis lavée 2 fois à l'aide de 200 µl du tampon de lavage TBS 1X-Tween 20 0.1%. Une fois la plaque vide et sèche, 200 µl de solution de blocage 1X ont été ajoutés dans les puits. La plaque a été incubée pendant 1 heure à la température de la pièce puis lavée 4 fois à l'aide du tampon de lavage. Les échantillons ont ensuite été dilués 1/1, 1/2 et 1/5 dans la solution de blocage 0.5X-PBS 1X comme les contrôles

positifs de Lf humaine à 1 ng (0.01 ng/µl) et à 10 ng (0.1 ng/µl). Cent microlitres de ces dilutions ont été déposés dans les puits et incubés pour une durée de 2 heures à 37^{0}C. Par la suite, la plaque a été vidée et lavée 6 fois. Cent microlitres d'une dilution 1/10 000 de l'anticorps polyclonal primaire anti-Lf provenant du lapin (Biodesign International) dans la solution de blocage 0.5X-PBS 1X ont ensuite été déposés dans les puits. La plaque a été incubée pendant 1 heure et demi à 37^{0}C puis vidée et lavée 6 fois. Cent microlitres d'une dilution 1/10 000 de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin provenant de la chèvre (Biodesign International) dans la solution de blocage 0.5X-PBS 1X ont ensuite été déposés dans les puits. La plaque a été incubée durant 1 heure et demi à 37^{0}C puis vidée et lavée 6 fois. Une fois la plaque asséchée, un comprimé d'ABTS a été dissous dans le tampon phosphate-citrate. Cent microlitres de cette solution ont ensuite été déposés dans les puits et la plaque a été incubée dans le noir à 37^{0}C. La plaque a été lue au spectrophotomètre « Microplate autoreader EL-309 » de Mandel Scientific à 405 nm après 15, 30 et 45 minutes d'incubation.

2.7. Manipulations des biopuces

2.7.1. Biopuces de *S. coelicolor* M145

Les biopuces ont été achetées de l'Université de Surrey en Angleterre. Ces biopuces contiennent les amplicons de 7339 gènes de *S. coelicolor* M145, imprimés en duplicata. Ces amplicons espacés de 230 µm sont disposés sur la lame de verre en carré de 19 spots de largeur par 18 de longueur. Quatre carrés de spots sont disposés en largeur par 12 en longueur. Des contrôles positifs d'hybridation d'ARN ribosomal (ARNr) 16S et des contrôles négatifs correspondant à des gènes de *Pseudomonas aeruginosa* sont aussi présents. Il y a également des contrôles positifs chimiques pour les fluorophores Cy3 et Cy5 (figure 13).

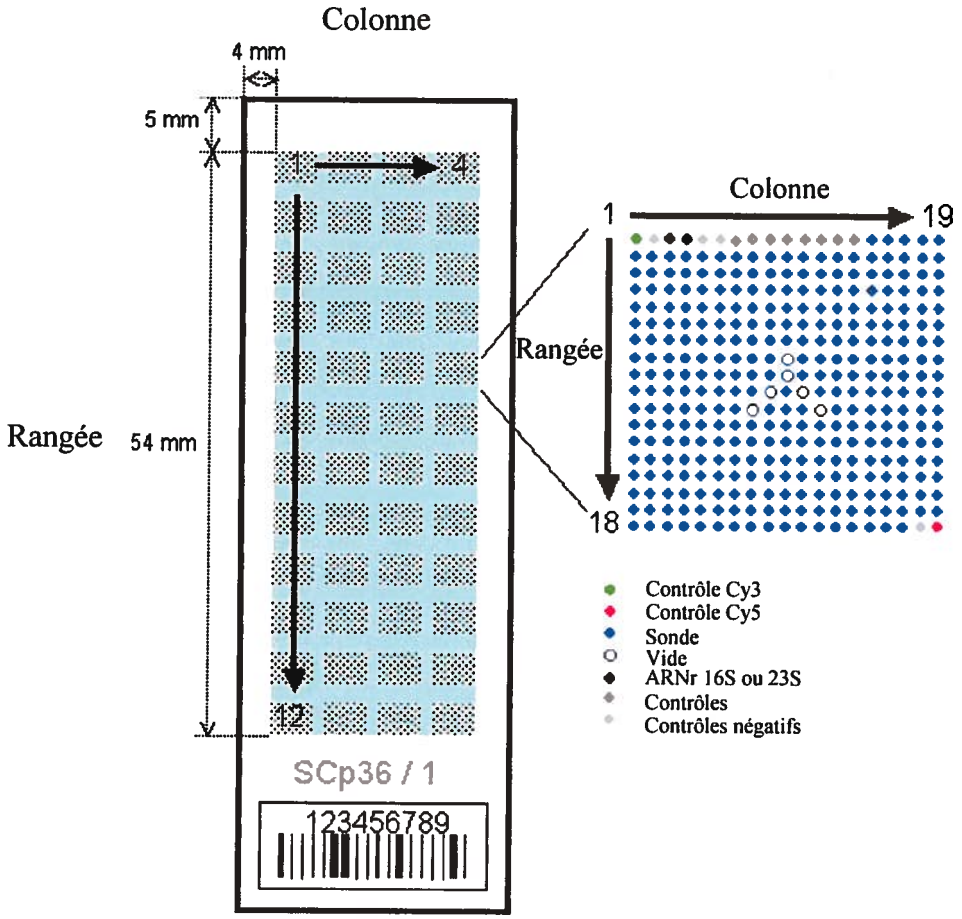


Figure 13. Disposition des spots sur les biopuces de *S. coelicolor* M145. Les sondes correspondant à des amplicons spécifiques à chacun des gènes représentés sur la biopuce ont été déposés avec le tampon SSC 3X. Cy, cyanine; ARNr, ARN ribosomal (http://www.surrey.ac.uk/SBMS/Fgenomics/Microarrays/html/Downloads.html).

Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata, soit trois biopuces par condition. Par la suite, un triplicata inverse a été réalisé. Le triplicata inverse, aussi appelé « Flip dye », correspond à l'inversement des colorants de la condition au contrôle. Le contrôle devient marqué au Cy5 tandis que la condition devient marquée au Cy3.

2.7.2. Coloration des biopuces au SYBR Green

Afin de vérifier si les biopuces ont été bien imprimées, une coloration de l'ADN au SYBR Green a été effectuée sur une lame de chaque lot utilisé. La lame a tout d'abord été déposée dans une solution de SYBR Green 1/10 000 dans du TBE 1X (10.8 g de Tris Base, 5.5 g d'acide borique, 4 ml de EDTA 0.5 M) durant 2 minutes. La lame a ensuite été lavée durant 2 minutes dans du TBE 1X puis 3 fois durant 2 minutes dans de l'eau distillée fraîche à chaque fois. Suite au séchage de la lame à l'aide d'air comprimé, l'ADN présent sur celle-ci a été visualisé à l'aide du lecteur de puce « ProScan Array HT » de PerkinElmer à une longueur d'onde de 488 nm. La grosseur et l'uniformité des dépôts d'ADN ont pu être confirmées puis le SYBR Green a été éliminé en incubant la lame durant 2 heures dans du SDS 1% préparé dans du tampon TE pH 7.5 (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). La lame a ensuite été asséchée à l'air.

2.7.3. Préparation de l'ADNc marqué au Cy3 et au Cy5

L'ARN total de bactéries provenant de deux conditions différentes a été utilisé comme matrice à la production d'ADNc par la méthode du RT-PCR. Les préparations d'ARN total ont été utilisées afin de produire des sondes d'ADNc ayant incorporées un ou l'autre des fluorophores, soit le Cy3 et le Cy5, durant la transcription inverse de l'ARNm en ADNc. Pour ce faire, 15 µg d'ARN total bactérien ont été mélangés à 1.7 µl d'amorces aléatoires dans un microtube en plastique de 0.5 ml sur la glace. Les réactions ont été complétées avec de l'eau DEPC à 16.9 µl pour les réactions au Cy3 et à 15.9 µl pour les réactions au Cy5. Les

préparations d'ARN ont été vortexées durant 5 secondes puis centrifugées à 12 000 x g pendant 10 secondes. Les préparations ont été incubées à 70^0C durant 10 minutes puis les microtubes ont été remis sur glace. Le mélange réactionnel composé de 6 µl de tampon de réaction 5X, 3 µl de DTT 0.1 M, 0.6 µl de dNTPs (25 mM dATP, 25 mM dTTP, 25 mM dGTP, 10 mM dCTP), 1.5 µl de Cy3-dCTP ou 2.5 µl de Cy5-dCTP et 2 µl de la transcriptase inverse SuperScript™ II a été ajouté à la préparation suite à l'incubation à raison de 13.1 µl pour les réactions avec le Cy3 et 14.1 µl pour celles avec le Cy5. Le mélange a été vortexé, centrifugé puis incubé à la température de la pièce pour une durée de 10 minutes dans le noir. Les microtubes ont ensuite été transférés dans une étuve à 42^0C durant 1 heure et 50 minutes dans le noir.

Une fois la réaction de RT terminée, les microtubes ont été centrifugés et 5 µl d'EDTA 0.5 M pH 8.0 y ont été ajoutés. Les ADNc ont ensuite été purifiés à l'aide de la trousse « MinElute PCR Purification » de Qiagen. Pour ce faire, 175 µl de tampon PB ont été ajoutés aux réactions puis les microtubes ont été vortexés et centrifugés. Les réactions ont été déposées sur les colonnes « MinElute » puis centrifugées durant 1 minute. Les filtrats ont été jetés et les colonnes lavées avec 750 µl de tampon PE. Les colonnes ont été centrifugées durant 1 minute et leur filtrat a été jeté. Les colonnes ont ensuite été centrifugées durant 1 minute supplémentaire. Les colonnes ont ensuite été transférées dans des microtubes de plastique de 1.5 ml propres et 20 µl de tampon EB ont été déposés sur les colonnes. Les colonnes ont été incubées durant 1 minute à la température de la pièce avant d'être centrifugées durant 1 minute. Les éluats contenant les ADNc marqués, soit les sondes, ont ensuite été combinés selon l'expérience pour obtenir une condition marquée au Cy3 et une autre condition marquée au Cy5. Les sondes combinées, ayant donc un volume de 40 µl, ont été mélangés à 40 µl de tampon d'hybridation 2X (500 µl de SSC 20X, 500 µl de formamide, 20 µl de SDS 10%) avant d'être bouillis durant 5 minutes dans le noir. Le SSC 20X est constitué de citrate de sodium 0.3 M ajusté à un pH de 7.0 avec de l'acide citrique 0.3 M contenant du chlorure de sodium 3 M.

2.7.4. Pré-hybridation des biopuces

Afin de préparer les biopuces à l'hybridation des mélanges d'ADNc marqué, celles-ci ont été soumises à une pré-hybridation. Les biopuces ont été immergées chacune dans 50 ml de tampon de pré-hybridation (125 ml de formamide, 250 mg de BSA, 5 ml de SDS 10% et 125 ml de SSC 20X dans 245 ml d'eau milliQ) contenu dans un tube conique en plastique de 50 ml puis ont été incubées durant 45 minutes à 42^0C. Les biopuces ont ensuite été transférées dans un support à lame de verre et ont été lavées en étant agitées dans un contenant de verre rempli d'eau milliQ durant 2 minutes à la température de la pièce. Le lavage a été répété dans un autre contenant. Les biopuces ont été asséchées à l'air puis déposées chacune dans une chambre d'hybridation de Corning.

Deux lamelles de verre 25 x 60 millimètres (mm) avec des bandes de téflon de 0.75 mm d'épaisseur « LifterSlip » de Erie Scientific Company ont été nettoyées à l'air puis déposées sur les biopuces. Quinze microlitres d'eau milliQ ont été déposés dans les deux puits aux extrémités de la chambre d'hybridation puis celle-ci a été refermée et déposée à 42^0C avant d'être utilisée.

2.7.5. Hybridation des biopuces

Une fois le mélange d'ADNc marqué bouilli, les microtubes ont été centrifugés. Le mélange a ensuite été déposé délicatement à la limite de la lamelle de verre. Une fois la sonde totalement aspirée par capillarité entre la biopuce et la lamelle, la chambre d'hybridation a été refermée et retournée dans l'étuve à 42^0C pour une incubation d'environ 16 heures.

Suite à l'hybridation de l'ADNc marqué sur les biopuces, celles-ci ont été libérées des chambres d'hybridation pour être agitées dans du tampon de lavage SSC 2X SDS 0.1% pré-chauffé à 42^0C afin de retirer la lamelle. Une fois la lamelle décollée, la biopuce a été déposée dans un support à lame et a été agitée durant 5 minutes dans le tampon. Par la suite, la biopuce a été transférée dans un contenant remplie de tampon

SSC 0.1X SDS 0.1% et agitée durant 10 minutes. La biopuce a été agitée successivement dans quatre contenants de SSC 0.1X avant d'être immergée dans un tube conique en plastique de 50 ml rempli d'eau milliQ durant environ 3 secondes. La biopuce a ensuite été asséchée à l'air comprimé et lue au lecteur de biopuce ou conservée dans un dessiccateur à l'obscurité.

2.7.6. Lecture de la biopuce

Les biopuces ont été lues sur le lecteur de biopuces « ProScan Array HT » de PerkinElmer, à l'aide du logiciel « ScanArray Express ». Lors de la lecture, l'intensité des lasers (PMT) a été ajustée afin d'obtenir une intensité de signal optimale (35 000-45 000 dans une échelle allant de 0 à 65 000) pour la majorité des spots sans retrouver de saturation. Une fois les images de lecture du fluorophore Cy3 et Cy5 satisfaisantes, celles-ci ont été enregistrées en format Tiff pour une quantification ultérieure.

2.7.7. Analyse des résultats

Pour débuter, la quantification des spots a été effectuée avec le logiciel « ScanArray Express ». La méthode « Adaptive circle » a été utilisée, ce qui implique que le logiciel a cherché le centre du spot et s'est adapté à son diamètre. Les critères de sélection ont été fixés à un maximum de 140% et un minimum de 50% du diamètre nominal. Les données ont été normalisées à l'aide de la méthode de Lowess.

Une fois les données quantifiées et normalisées, les intensités normalisées du signal de lecture du Cy3 et du Cy5, pour lesquelles le bruit de fond a été soustrait, ont été sélectionnées pour l'analyse statistique. Les gènes présentant un ratio de l'intensité sur le bruit de fond inférieur à 3 ont tout d'abord été éliminés. Par la suite, un ratio de l'intensité d'une condition en Cy5 sur l'intensité du contrôle en Cy3 pour chacun des gènes a été calculé. De cette façon, les gènes de la condition testée ont été identifiés comme plus ou moins exprimés que dans le contrôle. Par la suite, un $\log_2$

des ratios (Log ratio) a été réalisé afin de normaliser l'amplitude, ce qui implique qu'un gène deux fois plus exprimé dans la condition que dans le contrôle correspond à la même amplitude qu'un gène deux fois moins exprimé. Ces Log ratio ont ensuite été traités par une analyse de variance, un ANOVA. Les gènes présentant une valeur $p<0.0005$ ont été sélectionnées. Ces gènes ont ensuite été confirmés avec les gènes significatifs de l'analyse statistique effectuée pour le triplicata inverse.

À l'intérieur des gènes significatifs restant, les gènes significativement exprimés présentant un Log ratio supérieur à 1 et les gènes significativement réprimés présentant un Log ratio inférieur à -1 ont été identifiés. Ceux-ci ont ensuite été confirmés avec le triplicata inverse, en comparant l'amplitude des Log ratio. Un gène exprimé avec un Log ratio de 2 a du présenté un Log ratio d'environ -2 dans le triplicata inverse.

3. RÉSULTATS

3.1. Production de lactoferrine humaine recombinante tronquée

3.1.1. Évaluation du pouvoir antibactérien de la Lf sur les streptomycètes

Avant de débuter la construction du gène recombinant de la Lf_htr et les clonages dans les streptomycètes, il était important de s'assurer que le pouvoir antibactérien de la protéine n'affecterait pas l'hôte. C'est pourquoi un test d'inhibition de croissance a été effectué avec différentes concentrations de Lf sur la souche *S. lividans* 10-164/C109.

L'évaluation du pouvoir antibactérien de la Lf sur les streptomycètes a été effectuée en se basant sur l'article de Bellamy *et al.* (1992). *E. coli* 0111, microorganisme Gram négatif contrôle ainsi que *S. aureus*, microorganisme Gram positif contrôle, y ont présenté tous deux une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 25 µM contre la Lf bovine. La différence entre la Lf bovine et humaine étant minime, soit 25 µM et 37 µM de CMI pour *E. coli* respectivement, la Lf bovine a été choisie afin d'effectuer le test.

Suite à une incubation d'environ 3 jours, les zones d'inhibition de croissance de *S. lividans* causées par l'addition de lactoferrine bovine ont démontré que des concentrations de 500 µM à 1 mM inhibent complètement la croissance de la bactérie (figure 14). Cependant, la croissance commence à être affectée à une concentration de 250 µM de Lf. La CMI est donc de 250 µM, ce qui implique que les streptomycètes sont 10 fois moins sensibles à la Lf bovine que les deux souches contrôles utilisées dans l'article de Bellamy *et al.* (1992).

3.1.2. Construction du gène de la Lf humaine recombinante tronquée (Lf_{hr}tr)

Afin de produire le gène de la Lf_{hr}tr, une série de 50 oligonucléotides se chevauchant a été utilisée. Ces oligonucléotides ont été basés sur la séquence de la protéine humaine (appendice A) et couvraient le domaine N-terminal en entier.

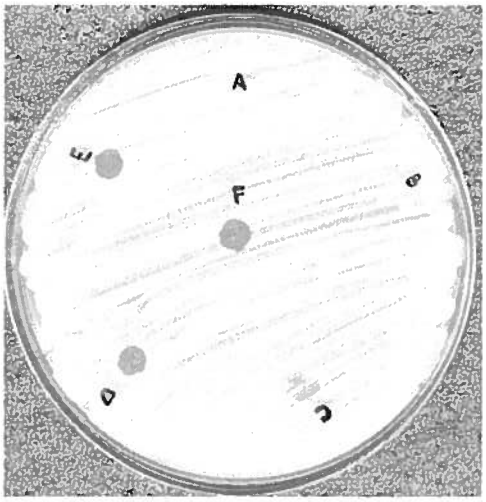


Figure 14. Test d'inhibition de croissance de *Streptomyces lividans* 10-164/C109 par la lactoferrine bovine. Culture de 3 jours à 34^{0}C d'un tapis bactérien et zones d'inhibitions de croissance de *S. lividans* 10-164/C109 sur une gélose Bennett-thiostreptone, où 6 µl de différentes concentrations de lactoferrine bovine ont été déposés. **A**, 0 µM; **B**, 100 µM; **C**, 250 µM; **D**, 500 µM; **E**, 750 µM; **F**, 1 mM.

```
Lf humaine          ggccgtagga gaaggagtgt tcagtggtgc accgtatccc a

Lf recombinante     ggccgcagga gaaggagcgt ccagtggtgc accgtctccc a
```

Figure 15. Utilisation des codons dans le gène de la lactoferrine humaine recombinante tronquée en comparaison à ceux présents dans la lactoferrine humaine native. Les codons modifiés dans le gène de la lactoferrine recombinante et ceux correspondant dans le gène de la lactoferrine humaine native ont été soulignés afin de les mettre en évidence. La séquence utilisée comme exemple correspond à l'amorce située en 5' de l'ARNm du gène de la lactoferrine. Les codons, bien que différents, codent pour le même acide aminé. Les mutations créées sont donc silencieuses et n'occasionnent aucune modification de la protéine finale.

Les codons riches en adénosine et en thymine (A + T) ont été modifiés afin de mieux correspondre au génome riche en G + C des streptomycètes, microorganisme dans lequel la protéine devait être produite (figure 15). Étant donné leur utilisation limitée par le microorganisme, la disponibilité des ARN de transfert (ARNt) est faible et peut retarder la traduction des ARNm de la protéine d'intérêt.

Suite à son assemblage par PCR (figure 16), le gène de la $Lf_{hr}tr$ a été amplifié par PCR à l'aide des amorces externes Lf56H, contenant le site de restriction *Sph*I et une étiquette His facilitant la détection de la protéine, et Lacto3Sac contenant le site *Sac*I.

Le gène amplifié a été déposé sur un gel d'agarose puis la bande correspondant au gène de la $Lf_{hr}tr$ d'environ 1 000 pb a été découpé et le fragment purifié. Ce fragment a par la suite été ligué au vecteur pIAF550 puis les protoplastes de la souche *S. lividans* 10-164 ont été transformés avec ce produit de ligation pour former la souche *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf (voir section 3.1.4. de la méthodologie). Suite à une sélection des transformants contenant le vecteur par pression sélective à l'antibiotique thiostreptone, des colonies ayant résisté ont été testées directement par PCR afin de déterminer si elles contenaient le gène de la $Lf_{hr}tr$ à l'aide des amorces Lf-1 et Lf-50 à une température de 50^0C (figure 17). Deux des clones positifs ayant une croissance rapide et une amplification suffisante ont été sélectionnés puis leurs plasmides ont été isolés. L'insert de ces plasmides a été digéré puis ligué dans le vecteur pTZ19R. Des cellules compétentes de *E. coli* DH11S ont ensuite été transformées avec ce vecteur et le vecteur ainsi que l'insert ont ainsi pu être amplifiés. Suite à une culture de 16 heures en 2xTY ampicilline et une fois que les plasmides ont été isolés, l'insert a été séquencé afin de confirmer l'intégrité du gène (Génome Québec, Université McGill). Les deux clones ont présenté une séquence conforme à celle établie puis une des deux souches a été choisie pour continuer les expérimentations. Le mycélium de cette même souche a par la suite été utilisé comme contrôle positif lors des amplifications PCR du gène de la lactoferrine.

```
1    ggccgcagga gaaggagcgt ccagtggtgc accgtctccc agcccgaggc caccaagtgc
     ccggcgtcct cttcctcgca ggtcaccacg tggcagaggg tcgggctccg gtggttcacg

61   ttccagtggc agaggaacat gaggagagtg cgcggccccc cggtcagctg catcaagaga
     aaggtcaccg tctccttgta ctcctctcac gcgccggggg gccagtcgac gtagttctct

121  gactccccca tccagtgcat ccaggccatc gcggagaaca gggccgacgc cgtgacctg
     ctgagggggt aggtcacgt  ggtccggtag cgcctcttgt cccggctgcg gcactgggac

181  gacggcgggt tcatctacga ggcgggcctg gccccctaca agctgcgccc ggtcgcggcg
     ctgccgccca agtagatgct ccgcccggac cgggggatgt tcgacgcggg ccagcgccgc

241  gaggtctacg ggaccgagag acagccccgc acccactact acgccgtggc cgtggtgaag
     Ctccagatgc cctggctctc tgtcggggcg tgggtgatga tgcggcaccg gcaccacttc

301  aagggcggca gcttccagct gaacgagctg cagggcctga agtcctgcca caccggcctg
     ttcccgccgt cgaaggtcga cttgctcgac gtcccggact tcaggacggt gtggccggac

361  cgcaggaccg ccggctggaa cgtcccgatc gggaccctgc gccccttcct gaactggacg
     gcgtcctggc ggccgacctt gcagggctag ccctgggacg cggggaagga cttgacctgc

421  ggcccgcccg agcccatcga ggcggccgtg gccaggttct tctccgccag ctgcgtcccc
     ccgggcgggc tcgggtagct ccgccggcac cggtccaaga agaggcggtc gacgcagggg

481  ggcgcggaca agggccagtt ccccaacctg tgccgcctgt gcgcggggac cggggagaac
     ccgcgcctgt tcccggtcaa ggggttggac acggcggaca cgcgcccctg gcccctcttg

541  aagtgcgcct tctcctccca ggagccgtac ttcagctact ccggcgcctt caagtgcctg
     ttcacgcgga agaggagggt cctcggcatg aagtcgatga ggccgcggaa gttcacggac

601  agagacgggg ccggggacgt ggccttcatc agggagagca ccgtgttcga ggacctgtcc
     tctctgcccc ggcccctgca ccggaagtag tccctctcgt ggcacaagct cctggacagg

661  gacgaggccg agagggacga gtacgagctg ctctgcccgg acaacacccg gaagcccgtg
     ctgctccggc tctccctgct catgctcgac gagacgggcc tgttgtgggc cttcgggcac

721  gacaagttca aggactgcca cctggcccgg gtcccctcgc acgccgtcgt ggcccgcagc
     ctgttcaagt tcctgacggt ggaccgggcc caggggagcg tgcggcagca ccgggcgtcg

781  gtgaacggca aggaggacgc catctggaac ctgctccgcc aggcgcagga gaagttcggc
     cacttgccgt tcctcctgcg gtagaccttg gacgaggcgg tccgcgtcct cttcaagccg

841  aaggacaagt cgccgaagtt ccagctcttc ggctccccga gcgggcagaa ggacctgctg
     ttcctgttca gcggcttcaa ggtcgagaag ccgaggggct cgcccgtctt cctggacgac

901  ttcaaggact cggccatcgg gttctcgagg gtgcccccga ggatcgactc cgggctgtac
     aagttcctga gccggtagcc caagagctcc cacgggggct cctagctgag gcccgacatg

961  ctgggctccg gctacttcac cgccatccag aacctgaggt ga
     gacccgaggc cgatgaagtg gcggtaggtc ttggactcca ct
```

Figure 16. Séquence du gène recombinant de la lactoferrine humaine tronquée. Le gène de la lactoferrine recombinante tronquée a été assemblé par hybridation d'amorces lors d'une amplification par PCR. Les amorces utilisées ont été surlignées afin de mettre en évidence les chevauchements entre celles du brin codant et du brin complémentaire.

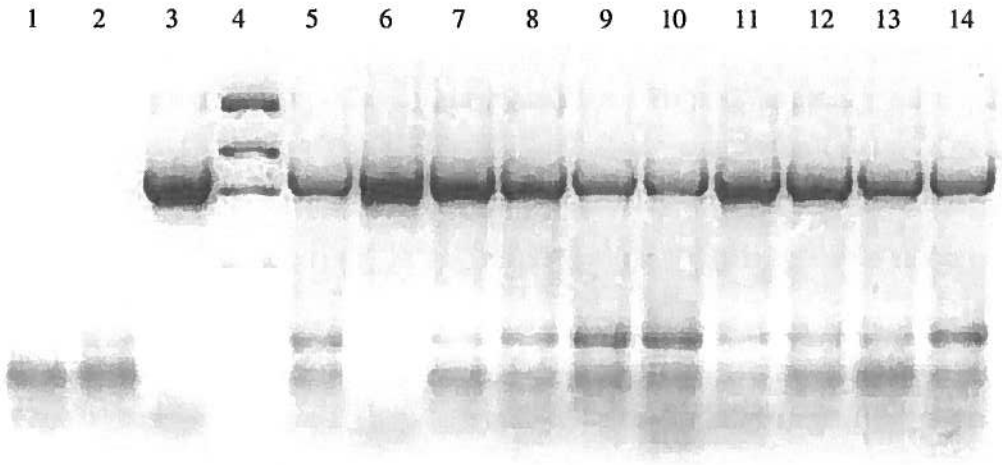


Figure 17. Détection du gène de la lactoferrine chez les transformants de *S. lividans* 10-164 par amplification PCR. Suite à la transformation des protoplastes de *S. lividans* 10-164 avec le vecteur pIAF550HisLf et de la sélection des transformants positifs à l'aide de la thiostreptone, la présence du gène de la lactoferrine dans les colonies résistantes a été confirmée à l'aide d'une amplification PCR avec les amorces Lf-1 et Lf-50 à une température d'hybridation de 50^0C. Dix microlitres de chaque réaction PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 2% dans le TBE 1X en présence de 2 µl de tampon d'échantillon 6X. Les échantillons ont migré sous une tension de 100 V durant environ 1 heure. **1**, mélange réactionnel (contrôle négatif); **2**, mycélium de *S. lividans* 10-164/550 (contrôle négatif); **3**, gène purifié de la Lf_{hr}tr *Sph*I *Sac*I (contrôle positif); **4**, marqueur de poids moléculaire «Low DNA Mass Ladder 2» de Invitrogen; **5-14**, transformants sélectionnés #1 à #10.

3.1.3. Élaboration de différentes constructions contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$

La séquence du gène de la $Lf_{hr}tr$ étant complète et juste, la souche *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf a été utilisée pour faire les constructions suivantes (voir section 3.1.4. de la méthodologie).

3.1.3.1. Constructions contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$ sécrétée

Tout d'abord, le site de restriction *Eco*RI a été inséré au début du gène de la $Lf_{hr}tr$ par amplification PCR directement sur le mycélium à l'aide des amorces ÉcoLacto et 550 + 40 à une température d'hybridation de 56^0C. Le produit PCR d'environ 1 000 pb a été découpé du gel d'agarose et purifié avec la trousse GFX. L'insert HisLf et le vecteur pIAFC109AxeAtr ont ensuite été digérés par les enzymes de restrictions *Eco*RI et *Sac*I puis ligués ensemble. Des protoplastes de *S. lividans* 10-164 ont été transformés avec le produit de ligation afin de produire la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf. Les transformants ont été sélectionnés par pression sélective à la thiostreptone et confirmés par amplification PCR directement sur le mycélium à l'aide des amorces Lf-1 et Lf-50 à une température de 50^0C. Un transformant a été choisi pour la suite des expérimentations.

Afin de créer la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeALf, le site *Eco*RI a été inséré au début du gène de la $Lf_{hr}tr$, mais cette fois-ci, avec une amorce ne possédant pas l'étiquette His afin de produire la Lf sous une forme native. Le gène a donc été amplifié par PCR directement sur le mycélium à l'aide des amorces Lacto5Native et 550 + 40 à une température d'hybridation de 60^0C. Le produit PCR a ensuite été traité comme celui de la souche précédente jusqu'à obtention d'un transformant confirmé.

Par la suite, afin d'obtenir une souche possédant le gène de la $Lf_{hr}tr$ avec un peptide signal (PS) différent de celui de l'acétylxylane estérase A (AxeA), et ainsi comparer leur efficacité au niveau de la sécrétion de $Lf_{hr}tr$, une

amplification PCR directement sur le mycélium de la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnC a été effectuée avec les amorces XlnC 5' et Lf-XlnC R à une température de 70^0C. Ainsi, le PS de la XlnC a été amplifié et une portion du gène de la Lf_{hr}tr sans l'étiquette His y a été intégrée. Le produit PCR d'environ 200 pb a donc été découpé du gel d'agarose et purifié avec la trousse GFX. Ensuite, le gène de la Lf_{hr}tr a été amplifié par PCR directement sur le mycélium de la souche *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf à l'aide des amorces XlnC-Lacto F et Lacto3Sac à une température de 70^0C. Ainsi, le gène de la Lf_{hr}tr a été amplifié avec une portion du PS de la XlnC. Le produit PCR d'environ 1 000 pb a été découpé du gel d'agarose et purifié avec la trousse GFX. Les deux produits PCR purifiés ont ensuite été ligués par PCR à l'aide des amorces XlnC 5' et Lacto3Sac à une température de 70^0C. Un dixième de la quantité d'amorces habituelle a été utilisé pour l'amplification. Le produit PCR d'environ 1 200 pb a ensuite été découpé du gel d'agarose et purifié avec la trousse GFX. L'insert PSxlnCLf et le vecteur pIAFC109 ont ensuite été digérés par les enzymes de restrictions *Sph*I et *Sac*I puis ligués ensemble. Ce produit de ligation a ensuite été transformé dans des protoplastes de *S. lividans* 10-164 afin de produire la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSxlnCLf. Les transformants ont été sélectionnés et confirmés comme décrit précédemment et un parmi eux a été choisi pour la suite des expérimentations.

3.1.3.2. Constructions contenant le gène de la Lf_{hr}tr dans l'opéron *XlnB*

Afin d'insérer le gène de la Lf_{hr}tr dans l'opéron de la XlnB, et peut-être ainsi protéger de la dégradation l'ARNm de notre protéine d'intérêt en l'intégrant dans cet ARNm polycistronique, le vecteur pIAFC109XlnB a été utilisé. Comme les plasmides purifiés pIAFC109PSaxeALf, pIAFC109PSaxeAHisLf et pIAFC109PSxlnCLf, le vecteur pIAFC109XlnB a été digéré avec les enzymes de restrictions *Sph*I et *Sac*I. Le vecteur a ensuite été ligué avec chacun des inserts et ces produits de ligation ont été insérés dans des protoplastes de *S. lividans* 10-164 afin d'obtenir les souches *S. lividans* 10-

164/pIAFC109XlnBPSaxeALf, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeA HisLf et *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnB PSxlnCLf. Chacune des souches a été sélectionnée par pression sélective avec la thiostreptone puis confirmée à l'aide de deux méthodes. Tout d'abord, quelques colonies résistantes ont été piquées sur une gélose RBB-xylane. Ainsi, les colonies formant des zones de lyse transparentes ont été sélectionnées puisqu'elles produisaient de la XlnB (figure 18). Par la suite, les colonies positives ont été confirmées par amplification PCR du gène de la $Lf_{hr}tr$ comme décrit précédemment. Un transformant par souche a été choisi pour la suite des expérimentations.

3.1.4. Évaluation de la présence d'ARNm de Lf dans les différentes souches

Toutes les souches produites contenaient le gène de la $Lf_{hr}tr$, par contre, leur habileté à exprimer le gène et à produire la protéine restait inconnue. Pour s'en assurer, la présence d'ARNm de Lf a été vérifiée par la méthode du RT-PCR.

Dix microgrammes de l'ARN total des souches produites, extrait d'une culture de 48 heures en M14 xylose, ont été traités avec la transcriptase inverse afin de produire de l'ADNc aux ARNm présents. Suite à ce traitement, les ADNc ont été soumis à un PCR afin de déterminer si parmi ceux-ci se trouvait des ADNc de Lf. En tant que contrôles d'intégrité et d'expression des ARNm présents dans l'ARN total, les ADNc au gène de l'ARNr 16S ainsi que ceux du gène de la XlnB, dans le cas des clones où la Lf a été incluse dans l'opéron de la XlnB, ont été vérifiés. De plus, en tant que contrôles négatifs, un PCR sur l'ARN total a été effectué afin de s'assurer de l'absence d'ADN contaminant dans la préparation qui pourrait mener à des faux positifs. Le PCR pour l'ARNr 16S a été effectué à 55^0C avec les amorces ARNr 16S 5' et ARNr 16S 3', le PCR pour la XlnB a été effectué à 68^0C avec les amorces XlnB 5' et XlnB 3' et le PCR pour la Lf a été effectué à 55^0C avec les amorces Lf-1 et Lf-50.

Les réactions PCR ont été déposées sur un gel d'agarose afin de visualiser les résultats (figure 19). Le gel a révélé la présence d'ADNc, donc d'ARNm, d'ARNr

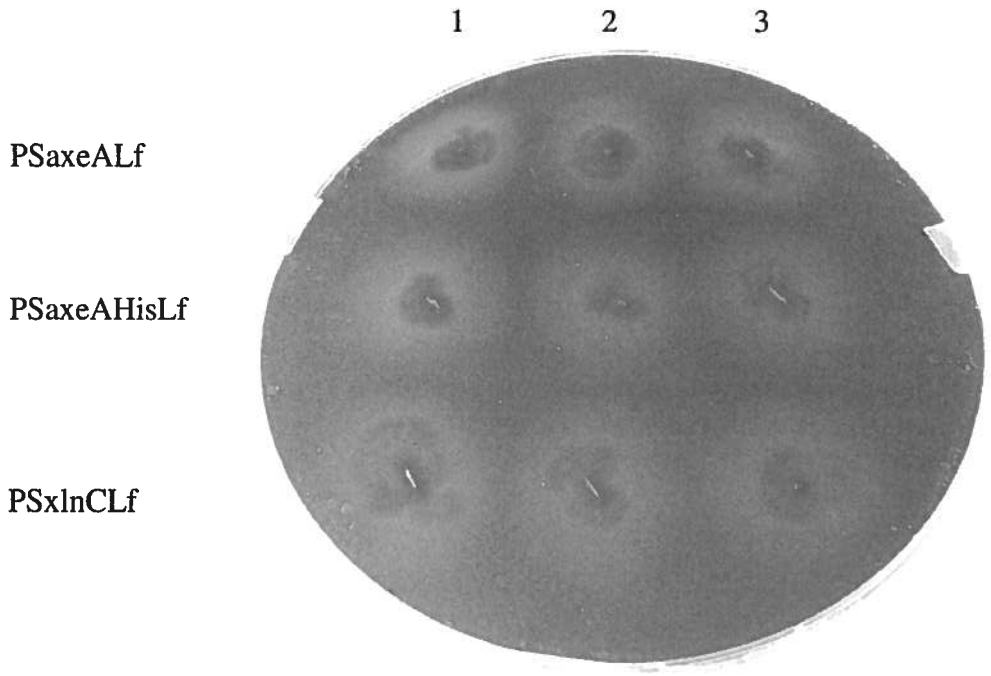


Figure 18. Évaluation de l'activité xylanolytique des souches de *S. lividans* 10-164 contenant différentes formes du gène de la $Lf_{hr}tr$ à l'intérieur de l'opéron *XlnB*. Visualisation des zones de lyse où le xylane de la gélose RBB-xylane a été dégradé après une incubation de 8 heures à 34^0C par quelques colonies des souches *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeALf, pIAFC109XlnBPSaxeAHisLf ou pIAFC109XlnB PSxlnCLf qui ont été sélectionnées à la thiostreptone. $Lf_{hr}tr$, lactoferrine humaine recombinante tronquée; XlnB, xylanase B; PS, peptide signal; axeA, acétyl xylane estérase; xlnC, xylanase C.

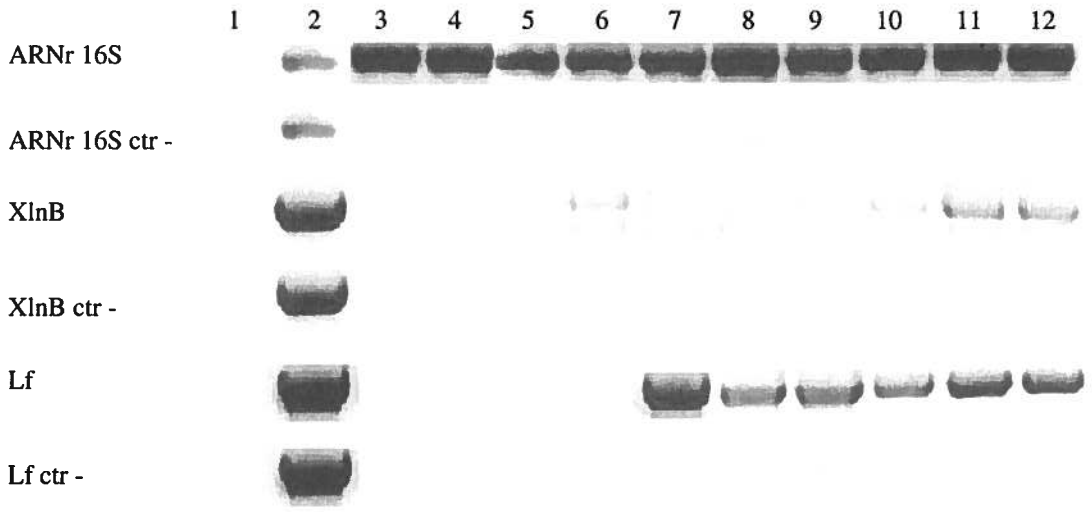


Figure 19. Détection d'ARNm de lactoferrine dans les différentes souches produites. Gel d'agarose 2% présentant les réactions PCR effectuées à partir des RT-PCR et les contrôles négatifs (ctr -) effectués avec les préparations d'ARN total des différentes souches produites. **1**, mélange réactionnel du PCR (contrôle négatif de la réaction); **2**, contrôle positif de la réaction PCR avec l'ADN présent dans le mycélium des souches *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf pour la détection d'ARNm de l'ARNr 16S et de la lactoferrine (Lf) ainsi que la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnB pour la détection d'ARNm de xylanase B (XlnB); **3**, *S. lividans* 10-164/pIAF550; **4**, *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf; **5**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109; **6**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnB; **7**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeALf; **8**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf; **9**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSxlnCLf; **10**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeALf; **11**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeAHisLf; **12**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSxlnCLf.

16S dans toutes les souches et de XlnB dans les souches contenant ce gène. L'ARNm contenu dans la préparation d'ARN total n'était donc pas dégradé et les souches produites exprimaient bien les gènes présents dans les vecteurs. La présence d'ADNc de Lf a aussi été révélée dans toutes les souches produites, sauf dans *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf. L'absence de bandes dans les contrôles négatifs ne contenant que la préparation d'ARN total signifie qu'il n'y avait aucune contamination à l'ADN et que tous les résultats obtenus sont de vrais positifs. Suite à ces résultats, le fait que les souches produites avec le vecteur pIAFC109 contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$ expriment bien le gène a pu être confirmé.

3.1.5. Évaluation de la présence de $Lf_{hr}tr$ dans le surnageant de culture des différentes souches produites

3.1.5.1. Visualisation de la $Lf_{hr}tr$

Suite à ces résultats, les surnageants d'une culture de 24 et 48 heures à 34^0C avec une agitation de 240 RPM de la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf ont été observés sur un gel SDS-PAGE avec le surnageant de la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109 comme contrôle négatif. Les protéines du surnageant de culture ont tout d'abord été précipitées à l'acétone, étant donné qu'il était impossible d'atteindre 25 µg de protéines dans un volume convenable lors du dépôt des échantillons sur le gel. Suite à la précipitation, les protéines ont donc été dissoutes dans de l'eau distillée et du tampon d'échantillon puis ont été déposées sur le gel. Les protéines ont ensuite été révélées à l'aide d'une coloration au bleu de Coomassie et seulement une à deux bandes faibles dans les surnageants de culture de 48 heures étaient visibles. Une coloration au nitrate d'argent a donc été effectuée sur un gel ne contenant que le surnageant des cultures de 48 heures. Cette fois, les protéines étaient visibles, mais elles ne présentaient pas une bonne résolution (figure 20). Les traînées présentent dans les lignes de migration étaient certainement dues aux sels qui ont été concentrés lors de la précipitation à l'acétone. Ceux-ci ont probablement affectés la migration des échantillons. De plus, la dissolution

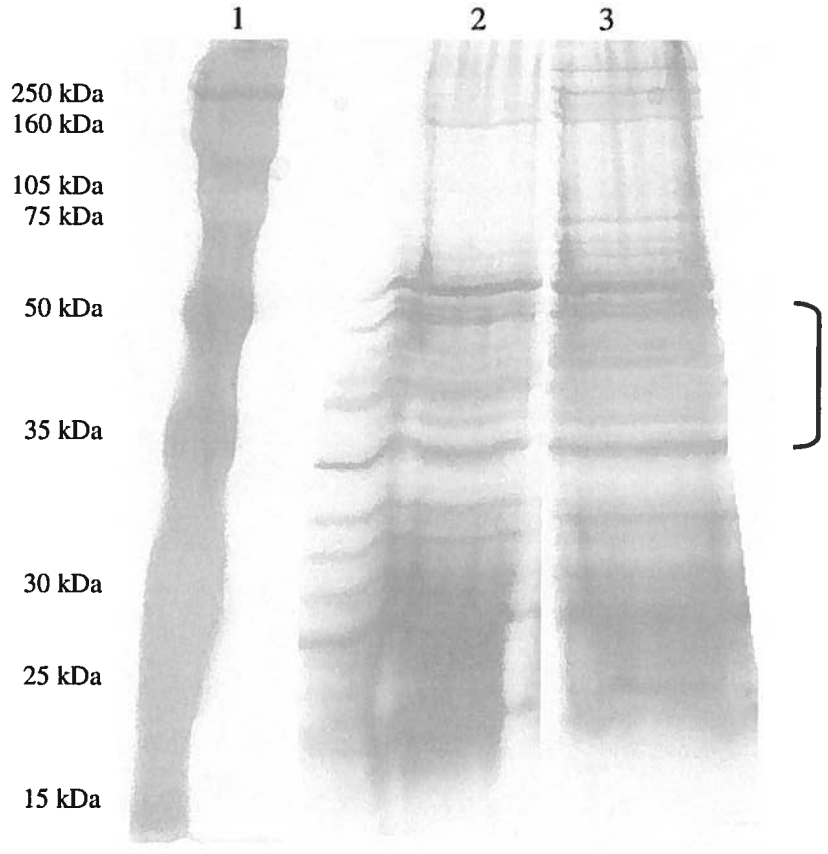


Figure 20. Profil protéique du surnageant de culture de la souche *Streptomyces lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf. Gel SDS-PAGE 12% coloré au nitrate d'argent représentant 500 µl de surnageant d'une culture de 48 heures à 34^{0}C sous une agitation de 240 RPM précipités à l'acétone. **1**, marqueur de poids moléculaire «Full Range Rainbow» de GE Healthcare; **2**, surnageant précipité de *S. lividans* 10-164/pIAFC109; **3**, surnageant précipité de *S. lividans* 10-164/pIAFC109PsaxeA HisLf.] , zone du gel où devrait se situer la Lf. PS, peptide signal; axeA, acétylxylane estérase; His, étiquette de six histidines; Lf, gène de la lactoferrine humaine recombinante tronquée.

dans l'eau suite à la précipitation ne semble pas avoir permis à toutes les protéines de se renaturer puisque aucune différence marquante dans le profil protéique n'était visible.

Pour contrer ce phénomène, les surnageants de culture ont été concentrés entre 50 et 100 fois à l'aide d'appareils de concentration par filtration sur membrane lors de centrifugations, soit « Macrosep Centrifugal Devices 3K » et « NanoSpin Plus 4K » de la compagnie Pall Filtron et Gelman Sciences respectivement. C'est donc 25 µg de protéines provenant du surnageant concentré d'une culture de 48 heures à 34^0C avec une agitation de 240 RPM des souches *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeALf, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSxlnCLf, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeALf, *S. lividans* 10-164/pIAFC109 XlnBPSaxeAHisLf et *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSxlnCLf qui ont été déposés sur un gel SDS-PAGE en plus des souches contrôles *S. lividans* 10-164/pIAFC109 et *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnB.

Suite à la coloration du gel au bleu de Coomassie, le profil protéique des différentes souches a été révélé (figure 21). La XlnB, au poids moléculaire d'environ 30 kDa, se retrouve en grande quantité. Le poids moléculaire attendu de la Lf_{hr}tr est d'environ 40 kDa, la moitié du poids de la protéine native complète, soit 80 kDa. Étant donné la précision relative de séparation des gels SDS-PAGE, la protéine recombinante devait se retrouver entre les bandes de 50 et 35 kDa du marqueur de poids moléculaire. Quelques faibles bandes ne se retrouvant pas dans le surnageant des souches contrôles ont été observées dans la plupart des surnageants de culture appartenant aux différentes souches produites.

Afin de déterminer si une de ces bandes correspondait bien à la Lf_{hr}tr, des analyses plus spécifiques ont été effectuées sur ces surnageants de culture concentrés.

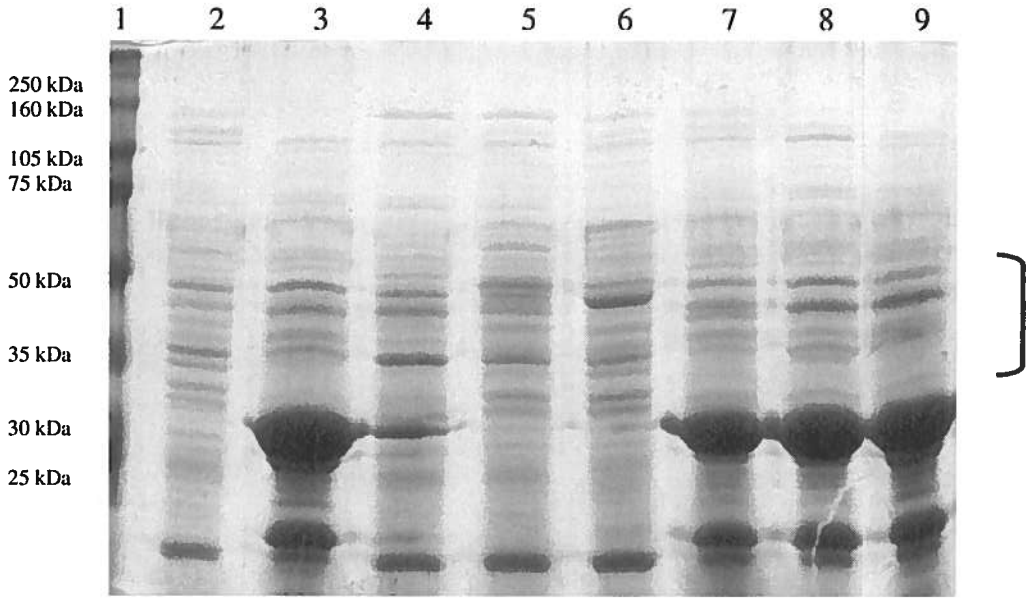


Figure 21. Profil protéique des surnageants de culture concentrés de différentes souches contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$. Gel SDS-PAGE de 12% coloré au bleu de Coomassie présentant le profil protéique des surnageants de culture concentrés (25 µg) des souches suivantes. La zone soulignée représente l'intervalle de poids moléculaire où devrait se retrouver la lactoferrine humaine recombinante tronquée ($Lf_{hr}tr$), soit autour de 40 kDa. **1**, marqueur de poids moléculaire «Full range Rainbow» de GE Healthcare; **2**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109; **3**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnB; **4**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeALf; **5**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf; **6**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSxlnCLf; **7**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeALf; **8**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeAHisLf; **9**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109 XlnBPSxlnCLf. Xln, xylanase; PS, peptide signal; axeA, acétylxylane estérase A; His, étiquette de six histidines.

3.1.5.2. Immunodétection

3.1.5.2.1. Immunodétection anti-étiquette His

Afin de détecter les protéines contenant une étiquette His, une immunodétection anti-étiquette His a été effectuée sur les surnageants des différentes souches produites. Vingt-cinq microgrammes de protéines provenant du surnageant concentré d'une culture de 48 heures à 34^0C avec 240 RPM d'agitation en M14 xylose des différentes souches produites ont ensuite été déposés sur deux gels SDS-PAGE. Un gel a été coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines et les protéines de l'autre gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de GE Healthcare par la méthode du « Western blot ». Par la suite, la membrane a subi une immunodétection anti-étiquette His à l'aide de la trousse « ECL™ Western Blotting Analysis System » de GE Healthcare. Suite à une autoradiographie de la membrane, les résultats suivant ont été obtenus.

Le marqueur de poids moléculaire « 6xHis Protein Ladder » de Qiagen constitué de protéines contenant une étiquette His a bien été révélé par l'immunodétection (figure 22). Malheureusement, aucune bande ciblée sur le gel SDS-PAGE comme étant potentiellement la $Lf_{hr}tr$ n'a été révélée. Le contrôle positif ainsi que les contrôles négatifs, soit le surnageant concentré des souches ne contenant pas le gène de la Lf, ayant présentés les résultats attendus, la présence de la protéine n'a pu être confirmée.

3.1.5.2.2. Immunodétection anti-Lf

L'étiquette His pouvant ne pas être disponible aux anticorps ou encore pouvant être détruite par des protéases de l'hôte, une immunodétection anti-Lf a été effectuée de façon identique à l'immunodétection anti-étiquette His.

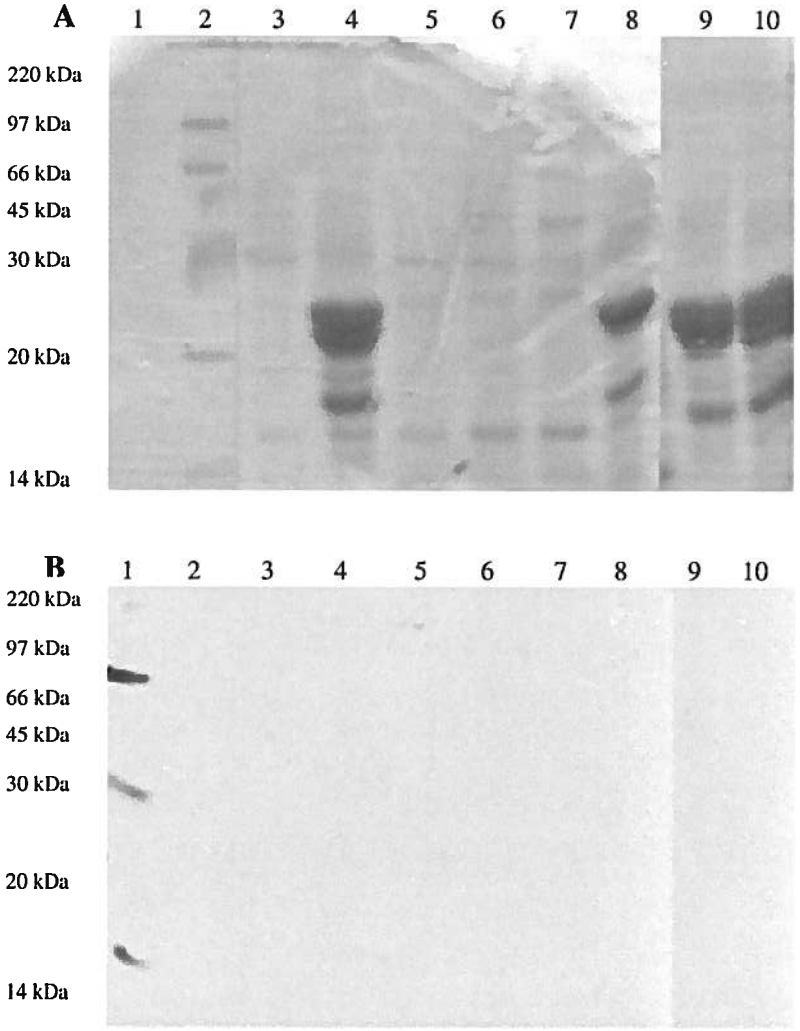


Figure 22. Immunodétection ECL anti-étiquette histidine présente sur la lactoferrine recombinante produite par certaines souches de *Streptomyces lividans* 10-164. **A**, gel de polyacrylamide dénaturant de type SDS-PAGE; **B**, autoradiographie de la membrane de nitrocellulose ayant été incubée avec des anticorps anti-étiquette histidine. Les puits contiennent: **1**, marqueur de poids moléculaire avec étiquettes histidine «6xHis Protein Ladder» de Qiagen (contrôle positif), **2**, marqueur de poids moléculaire «High Range Rainbow» de GE Healthcare, **3**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109, **4**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109XlnB, **5**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109PSaxeALf, **6**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109PSaxeAHisLf, **7**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109PSxlnCLf, **8**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109XlnBPSaxeALf, **9**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109XlnBPSaxeAHisLf et **10**, surnageant de *S. lividans* 10-164/C109XlnBPSxlnCLf. Xln, xylanase; PS, peptide signal; axeA, acétylxylane estérase A; Lf, lactoferrine; His, étiquette de six histidines.

Le contrôle positif de 5 µg de Lf bovine a bien répondu à l'immunodétection (figure 23). Les surnageants de culture concentrés provenant des souches contenant le gène de la Lf n'ont présenté aucune bande positive suite à l'immunodétection. Le fait qu'aucune bande n'a été révélée autour de 40 kDa, poids moléculaire auquel était attendu la $Lf_{hr}tr$, indique qu'il n'y a pas de production de $Lf_{hr}tr$ ou bien que la quantité produite est sous la limite de détection du test. Il est également possible que la protéine ne présentait pas les épitopes reconnus par l'anticorps anti-Lf puisqu'elle était dénaturée.

L'immunodétection a également révélé positivement la XlnB et un produit de dégradation de celle-ci. Le signal étant fort et apparaissant rapidement lors de l'exposition, soit après seulement 60 secondes, il n'est pas considéré comme non-spécifique. Il est possible que ce signal soit causé par une réaction croisée de l'anticorps anti-Lf.

3.1.5.3. ELISA

Afin de confirmer la présence ou non de $Lf_{hr}tr$ dans les surnageants des différentes souches de *S. lividans* produites, un test ELISA de type « sandwich » a été effectué. Ainsi, si la protéine devait être dans sa forme biologique pour être détectée par les anticorps ou si la quantité produite était sous la limite de détection de l'immunodétection, elle allait être détectée par cette méthode. La limite de détection de l'ELISA étant de 1 à 10 ng comparé à 500 ng pour l'immunodétection (résultats non-présentés), le test permettait une spécificité beaucoup plus grande.

Ce sont donc 100 µl de surnageant concentré provenant d'une culture de 48 heures à 34^0C avec agitation dans le milieu M14 xylose des différentes souches produites qui ont été analysés à l'aide d'un ELISA anti-Lf contre un standard de Lf humaine. Les résultats obtenus ont été négatifs pour chacun des échantillons et le contrôle négatif (figure 24). La limite de détection étant de 1 ng

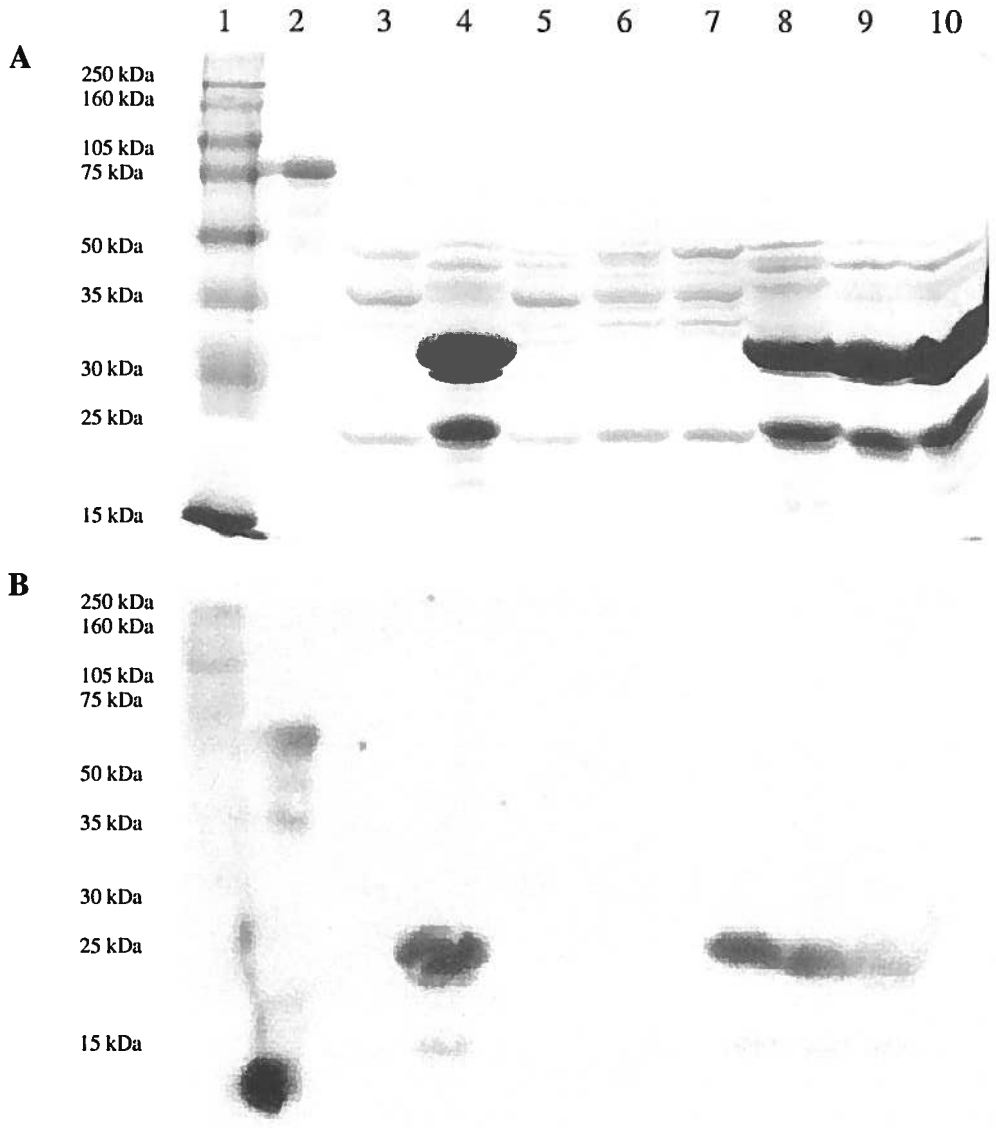


Figure 23. Immunodétection ECL anti-lactoferrine humaine des surnageants de culture concentrés de différentes souches contenant le gène de la $Lf_{hr}tr$. A, Protéines du surnageant concentré (25 µg) des différentes souches produites sur un gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie; **B**, autoradiographie après une exposition de 1 minute d'une membrane de nitrocellulose, où les protéines du gel ont été transférées, soumise à une immunodétection ECL anti-lactoferrine. **1**, marqueur de poids moléculaire «Full Range Rainbow» de GE Healthcare; **2**, 5 µg de lactoferrine bovine; **3**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109; **4**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnB; **5**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeALf; **6**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf; **7**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSxlnCLf; **8**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSaxeALf; **9**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109 XlnBPSaxeAHisLf; **10**, *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnBPSxlnCLf.

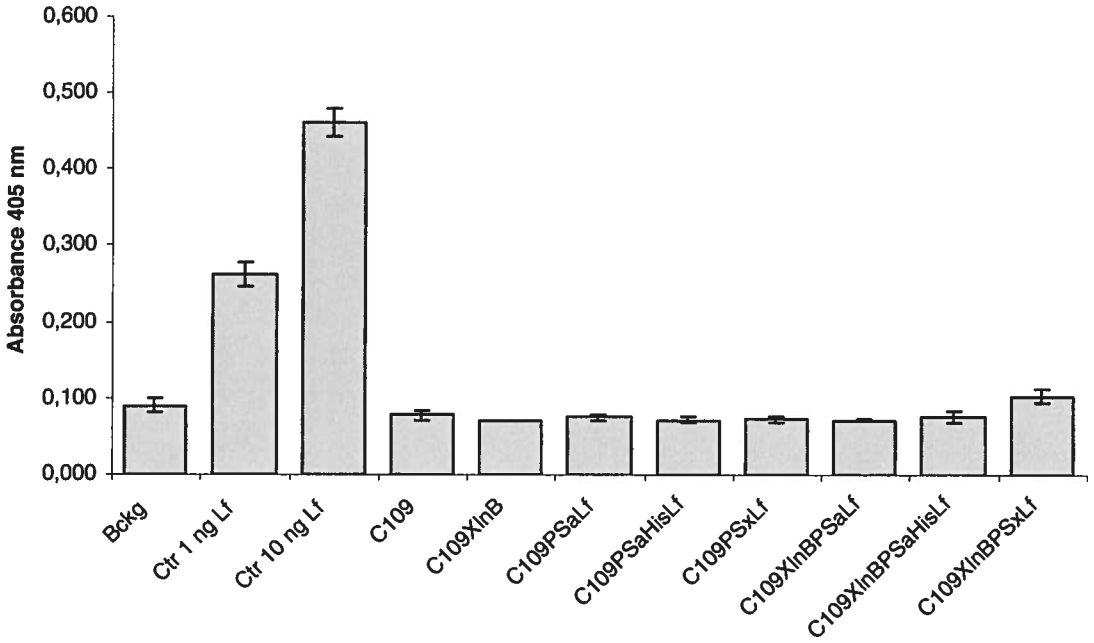


Figure 24. Évaluation de la quantité de $Lf_{hr}tr$ dans les surnageants de culture des différentes souches produites par ELISA. Histogramme représentant les résultats d'un test ELISA anti-lactoferrine humaine. Cent microlitres d'échantillon, soit le surnageant de culture concentré des différentes souches, et de contrôles ont été soumis à un test colorimétrique puis détectés par un spectrophotomètre pour les plaques à 96 puits après 45 minutes à une absorbance de 405 nm. **Bckg**, «background» ou bruit de fond (solution de blocage 0.5X-PBS 1X servant de contrôle négatif); **Ctr 1 ng Lf**, 1 ng de lactoferrine humaine (contrôle positif); **Ctr 10 ng Lf**, 10 ng de lactoferrine humaine (contrôle positif); **C109-C109XlnBPSxLf**, surnageants concentrés des souches de *S. lividans* 10-164/pIAFC109 à pIAFC109XlnBPSxLf. PSa, peptide signal de l'acétylxylane estérase A (AxeA); PSx, peptide signal de la xylanase C (XlnC); XlnB, xylanase B; Lf, lactoferrine humaine recombinante tronquée ($Lf_{hr}tr$).

dans 100 µl, soit d'une concentration de Lf de 0.01 ng/µl, la possibilité de retrouver de la $Lf_{hr}tr$ dans le surnageant concentré des souches produites est faible.

Suite à ces résultats, la production de $Lf_{hr}tr$ par les souches produites semblait négative ou inférieure à 1 ng, soit à une concentration de 0.01 ng/µl pour un surnageant concentré entre 50 et 100 fois. Ces valeurs impliquent que la production serait inférieure à 1×10^{-4} mg/L. Il est très raisonnable de penser obtenir une production supérieure à cette valeur, même pour une protéine hétérologue. Une vérification de la séquence du gène de la Lf dans les différentes constructions a donc été entreprise.

3.1.6. Vérification de la séquence du gène recombinant de la $Lf_h tr$

Le gène des trois constructions *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeALf, *S. lividans* 10-164/pIAFC109PSaxeAHisLf et *S. lividans* 10-164/pIAFC109 PSxlnCLf a été séquencé. Les trois constructions ont présentés les mêmes mutations exactement aux mêmes endroits. Trois de ces mutations sont ponctuelles et changent l'acide aminé impliqué, soit les mutations C467T, qui change une alanine pour une valine, G583T, qui change une glycine pour une cystéine et C798A, qui change un acide aspartique pour un acide glutamique. La quatrième mutation est une délétion de 4 bases ($\Delta_{598\text{-}601}$), CTGA, qui modifie le cadre de lecture de l'ARNm pour le dernier tiers de la protéine. Ces mutations expliquent peut-être pourquoi le gène de la Lf est bel et bien exprimé, mais que la protéine n'est pas retrouvée.

Chacun d'eux ayant été conçu séparément, soit par des amplifications PCR distinctes, le fait de contenir 4 mutations identiques était totalement improbable. Le seul élément commun à ces trois constructions était le gène d'origine de la souche *S. lividans* 10-164/pIAF550HisLf. Ce gène avait été séquencé au début des

expérimentations et avait présenté une séquence conforme. Il a donc été séquencé de nouveau et sa séquence s'est avérée erronée elle aussi. Le gène d'origine contenait en effet les quatre mutations retrouvées dans le gène des différentes constructions réalisées.

3.2. Recherche de promoteurs spécifiques à la solution résiduelle

3.2.1. Courbe de croissance de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 Xylose

Afin d'identifier des promoteurs de streptomycètes spécifiques à la SR, il était impératif de déterminer les phases de croissance du microorganisme dans ce milieu de culture. La découverte de promoteurs constitutifs, précoces ou tardifs pourrait mener à différentes utilités, entre autres pour la production de protéines d'intérêt toxiques pour la bactérie hôte.

Une courbe de croissance de *Streptomyces coelicolor* M145 a donc été effectuée dans la SRD (figure 25) ainsi que dans le milieu de culture standard pour la production de protéines M14 xylose (figure 26). Les courbes de croissance obtenues étaient très différentes l'une de l'autre. La courbe de croissance en SRD permettait de distinguer les différentes étapes, soit une courte phase de latence entre 0 et 3 heures de culture, une première phase exponentielle de croissance entre 3 heures et 6 heures de culture, une phase de transition entre 6 et 7 heures de culture, une deuxième phase exponentielle de croissance entre 7 et 12 heures de culture ainsi qu'une phase stationnaire à partir de 12 heures de culture. La courbe de croissance en M14 xylose ne permettait pas distinguer ces phases de croissance. Seule une longue phase de latence entre 0 et 24 heure de culture, une phase de croissance entre 24 et 32 heures de culture ainsi qu'une phase stationnaire à partir de 32 heures de culture ont pu être observées.

Le fait que la SRD est un milieu de culture considéré comme riche tandis que le M14 xylose est considéré comme un milieu minimal confirme le résultat obtenu. En prenant compte de ces différences, la comparaison des gènes activés dans les

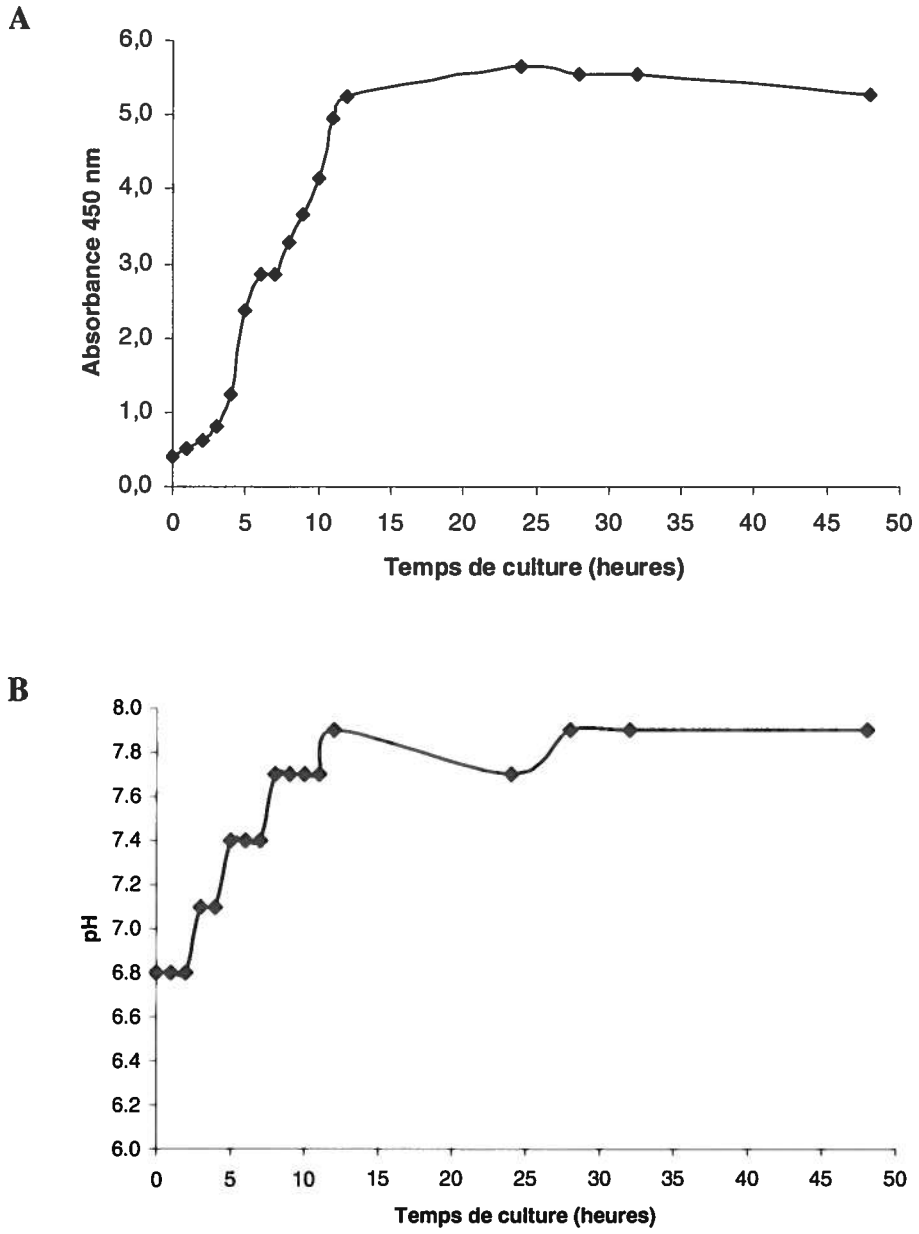


Figure 25. Évolution d'une culture de *Streptomyces coelicolor* M145 en solution résiduelle. A, L'évolution de la biomasse d'une culture de *S. coelicolor* M145 en SRD-PEG-Blitz à 34^{0}C sous agitation de 240 RPM en fonction du temps a été détectée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Les lectures ont été effectuées avec 1 ml de culture contre un blanc de SRD-PEG-Blitz, tous deux dilués dans de l'eau distillée. **B**, L'évolution du pH du milieu de culture en fonction du temps a été évaluée simultanément à l'aide de papiers pH «Color pHast Indicator Strips» pH 6.5-10.0 et 4.0-7.0 de VWR International. SRD, solution résiduelle digérée à la pronase.

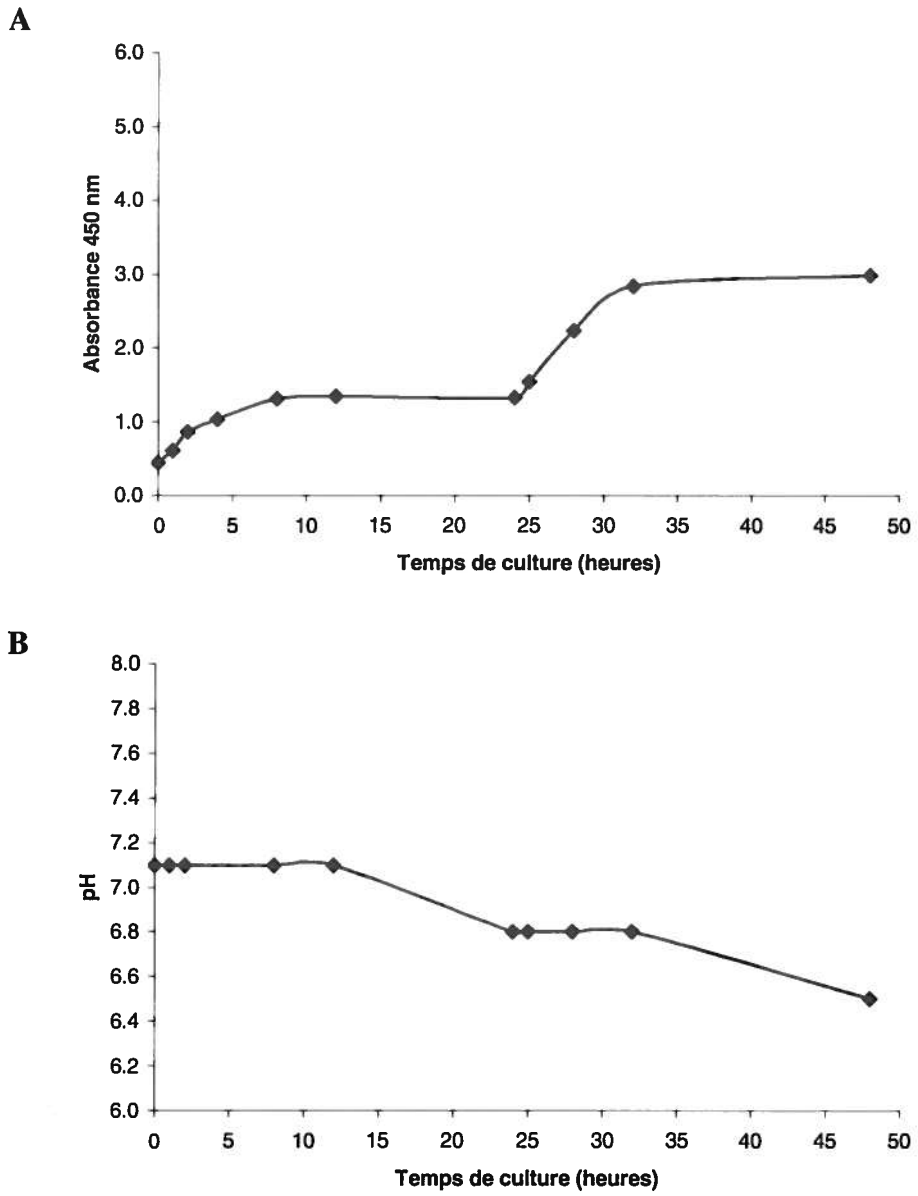


Figure 26. Évolution d'une culture de *Streptomyces coelicolor* M145 en M14 xylose. **A**, L'évolution de la biomasse d'une culture de *S. coelicolor* M145 en M14 xylose-PEG-Blitz à 34^{0}C sous agitation de 240 RPM en fonction du temps a été détectée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Les lectures ont été effectuées avec 1 ml de culture contre un blanc de M14 xylose-PEG-Blitz, tous deux dilués dans de l'eau distillée. **B**, L'évolution du pH du milieu de culture en fonction du temps a été évaluée simultanément à l'aide de papiers pH «Color pHast Indicator Strips» pH 6.5-10.0 et 4.0-7.0 de VWR International.

différents milieux à chaque phase de croissance à des fins d'identification de promoteurs spécifiques à la SR était impossible. La comparaison a donc été basée sur les gènes actifs chez *S. coelicolor* M145 durant la fin de la phase de latence (t3) de la culture en SRD (Huang *et al.*, 2001). Les conditions testées ont été la première phase exponentielle de croissance (t5), la phase de transition (t6.5), la deuxième phase exponentielle de croissance (t10) et la phase stationnaire (t15).

3.2.2. Évaluation du transcriptome de *S. coelicolor* M145 en SRD

3.2.2.1. Résultats de l'analyse statistique des biopuces

Suite à l'isolement de l'ARN total de cultures de 3, 5, 6.5, 10 et 15 heures de *S. coelicolor* M145 en SRD et l'évaluation de l'intégrité et de la concentration effectués, des expériences de biopuces ont été réalisées. Chacune des conditions a été comparée au contrôle (t3) en triplicata. De plus, un triplicata inverse a été réalisé pour un total de 6 biopuces par condition. Les résultats obtenus lors de l'analyse statistique sont résumé ci-dessous.

Après avoir effectué un ANOVA sur les données provenant des conditions t5, t6.5, t10 et t15 ayant comme critère de sélection une valeur $p<0.0005$, 464 gènes ont été considérés comme significatifs (appendice B). De ces 464 gènes, 104 ont été identifiés comme significativement induits (Log ratio > 1) et 92 ont été identifiés comme significativement réprimés (Log ratio < -1) par rapport à la condition contrôle. Dans le cadre du projet de recherche, soit d'utiliser des promoteurs induits en SRD pour un système d'expression, il est certain que les gènes réprimés n'ont pas d'importance. Leur répartition a tout de même été présentée dans un diagramme de Venne (figure 27).

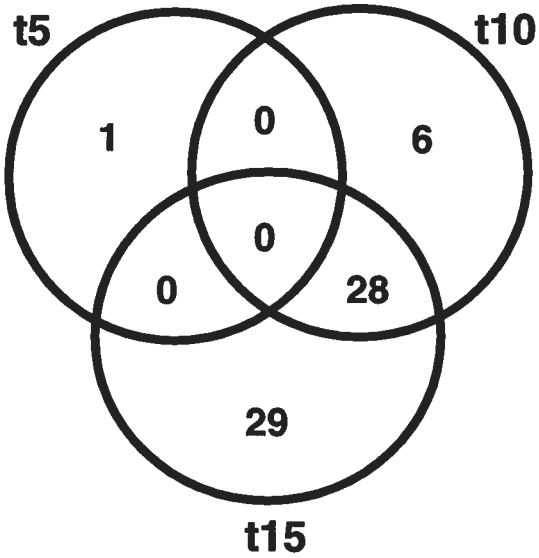


Figure 27. Diagramme de Venne représentant la répartition des gènes réprimés chez *S. coelicolor* M145 en SRD. Un seul gène a été identifié comme significativement réprimé au temps t5, première phase exponentielle de croissance. Pour la deuxième phase exponentielle de croissance, le temps t10, 34 gènes ont été identifiés comme étant réprimés dont 6 qui l'étaient exclusivement à cette phase de croissance. Durant la phase stationnaire, le temps t15, 57 gènes ont été identifiés comme étant réprimés, dont 29 qui étaient exclusifs à cette condition. Il y a 28 gènes qui étaient réprimés conjointement aux temps t10 et t15. Aucun gène n'a été identifié comme étant réprimé significativement au temps t6.5, la phase de transition.

3.2.2.2. Identification de promoteurs intéressants dans le cadre du développement d'un système d'expression en SRD

Pour ce qui est des gènes induits, 16 ont été identifiés au temps t5 dont 2 qui étaient exclusivement induits dans cette phase de croissance, 10 ont été identifiés au temps t6.5 dont 1 qui était exclusif, 33 ont été identifiés au temps t10 dont 18 qui étaient exclusifs et 45 au temps t15 dont 35 qui étaient exclusifs. Parmi ces gènes, certains sont induits à des phases de croissance intéressantes pour un système d'expression. Ces gènes sont sur-exprimés puisque leur promoteur est induit dans ces conditions. L'identification des gènes est donc en fait l'identification des promoteurs intéressants.

Tout d'abord, un gène induit constitutivement à tous les temps étudiés a été identifié (tableau 4). Le promoteur de ce gène pourrait être utilisé dans la production de protéines n'affectant pas la croissance de l'hôte, comme des protéines homologues standards.

Par la suite, des gènes induits durant le début de la croissance de *S. coelicolor* M145 (tableau 5), ainsi que durant toute la durée de la croissance, mais non durant la phase stationnaire (tableau 6) ont été identifiés. Ces promoteurs pourraient être utiles lors de la production de protéines standards où la culture serait maintenue en croissance constante.

Afin de produire des protéines toxiques à l'hôte qui pourraient affecter sa croissance, des promoteurs plus tardifs ont été identifiés. Des gènes induits lors de la fin de la croissance de *S. coelicolor* M145, soit dans la deuxième phase de croissance et dans la phase stationnaire (tableau 7), ainsi que des gènes induits exclusivement durant la phase stationnaire (tableau 8) ont été identifiés.

Tableau 4. Gène induit constitutivement chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO2783	SCC105.14	Monooxygénase probable	4.46E-06	3.449

Tableau 5. Gènes induits en début de croissance (t5 et t6.5) chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO5655	SC6A9.12	Aminotransférase probable	2.62E-10	2.128
SCO4050	2SCD60.16	Acétyltransférase probable	9.37E-07	1.887
SCO5656	SC6A9.11	Protéine de régulation de la transcription	9.29E-07	1.545
SCO0513	SCF6.09	Protéine membranaire intégrale	8.82E-05	1.448
SCO5657	SC6A9.10c	Aldéhyde déshydrogénase	2.49E-08	1.245
SCO4049	2SCD60.15	Protéine de liaison aux antibiotiques probable	8.32E-05	1.194

Tableau 6. Gènes induits durant la croissance (t5, t6.5 et t10) chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO2782	SCC105.13	Décarboxylase pyridoxal-dépendente probable	1.22E-05	3.096
SCO7407	SC6D11.03c	β-galactosidase probable	4.30E-04	1.493

Tableau 7. Gènes induits en fin de croissance (t10 et t15) chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO1646	SCI41.29c	Protéine hypothétique	1.35E-14	2.950
SCO6712	SCH35.12c	Hydrolase probable	3.37E-11	2.186
SCO1660	SCI52.02	Glycérol kinase probable (glpK)	1.64E-07	2.075
SCO3579	SCH17.13c	Protéine de régulation probable	1.40E-08	2.018
SCO4295	SCD95A.28	Protéine de choc au froid (scoF4)	3.77E-07	2.008
SCO2097	SC4A10.30c	Protéine membranaire probable	2.03E-09	1.373
SCO1907	SCI7.25c	Protéine conservée hypothétique	9.75E-07	1.299

Tableau 8. Gènes induits durant la phase stationnaire chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO3428	SCE9.35c	Protéine ribosomale 50S L33 probable (rpmG)	2.49E-09	5.753
SCO0166	SCJ1.15	Régulateur probable	8.43E-15	5.374
SCO6762	SC6A5.11	Phytoène déshydrogénase probable	1.34E-14	4.218
SCO5810	SC4H2.31c	Protéine transmembranaire à efflux probable	2.80E-12	3.305
SCO2505	SCC121.08	Lipoprotéine transporteur de métaux (type ABC) probable	1.16E-12	3.069
SCO0379	SCF62.05	Catalase EC 1.11.1.6 (katA)	5.55E-16	2.989
SCO0174	SCJ1.23c	Protéine de liaison à ADN probable	6.29E-08	2.374
SCO0478	SCF76.18c	Protéine membranaire probable	5.21E-12	2.318
SCO3252	SCE39.02c	Protéine initiatrice de la réplication (repSA)	3.36E-11	2.202
SCO3323	SCE68.21	Facteur sigma de l'ARN polymérase probable	3.88E-08	2.190
SCO6682	SC5A7.32	Protéine hypothétique	1.63E-05	2.183
SCO5895	SC3F7.15	Méthyltransférase probable (redI)	3.09E-07	1.984
SCO0199	SCJ12.11c	Alcool déshydrogénase probable	4.96E-09	1.971
SCO5881	SC2E9.22c	Régulateur de réponse (redZ)	1.15E-06	1.965
SCO3427	SCE9.34c	Protéine ribosomale 50S L31 probable (rpmE)	7.55E-05	1.873
SCO5861	SC2E9.02	Protéine hypothétique	4.43E-08	1.873
SCO5982	StBAC16H6.17c	Régulateur probable	2.22E-16	1.838
SCO0170	SCJ1.19c	Protéine hypothétique conservée	1.24E-04	1.706
SCO5147	SCP8.10	Facteur sigma de la sous-famille ECF probable	7.84E-07	1.648
SCO5590	SC2E1.07	Protéine hypothétique	1.30E-11	1.598
SCO5453	SC3D11.10	Protéine membranaire intégrale probable	1.94E-08	1.563
SCO2519	SCC121.22c	Protéine membranaire intégrale probable	6.58E-12	1.529
SCO5733	SC3C3.19c	Protéine hypothétique	1.57E-10	1.469
SCO1121	2SCG38.14	Protéine sécrétée probable	1.55E-7	1.461
SCO0437	SCF51A.15c	Protéine conservée probable	6.88E-11	1.435
SCO5633	SC6A9.34	Protéine intégrase de fusion (traSA)	2.27E-10	1.433
SCO1695	SCI30A.16	Protéine hypothétique	7.45E-6	1.340
SCO6761	SC6A5.10	Petite protéine hypothétique	2.62E-8	1.281
SCO1554	SCL11.10c	Nicotinate-nucléotide-dimethylbenzimidazole-phosphoribosyltransferase probable	1.13E-8	1.224
SCO6624	SC1F2.21c	Protéine hypothétique	1.90E-5	1.206
SCO5383	2SCG6G5.27c	Sous-unité de liaison à l'ATP d'un transporteur (type ABC) probable	1.29E-5	1.197
SCO4287	SCD95A.20	Protéine hypothétique	7.18E-8	1.155
SCO4340	SCD12A.23	Intégrase probable	6.21E-9	1.135
SCO3426	SCE9.33c	Protéine hypothétique	1.91E-9	1.042
SCO0837	SCF43A.27c	Protéine hypothétique	4.47E-8	1.021

Tableau 9. Gènes induits durant les deux phases exponentielles de croissance (t5 et t10) chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO4262	SCD49.03	Protéine hypothétique	2.30E-05	3.286
SCO4142	SCD84.09c	Précurseur d'une protéine de liaison au phosphate (pstS)	6.86E-11	2.339
SCO4252	SCD8A.25c	Protéine hypothétique	1.54E-11	1.875

Tableau 10. Gène induit durant la phase de transition chez *S. coelicolor* M145 en SRD.

Gène	Cosmide	Fonction	Valeur p	Log ratio
SCO2780	SCC105.11	Protéine sécrétée probable	8.07E-09	1.100

3.2.2.3. Autres gènes intéressants induits en SRD

D'autres gènes intéressants ont aussi été identifiés lors de l'analyse des résultats de biopuces. Leur promoteur ne présente aucun intérêt au niveau d'un système d'expression, mais ce sont des gènes qui apportent des informations sur le métabolisme de *S. coelicolor* M145 en SRD. Parmi ceux-ci, des gènes induits seulement durant les deux phases exponentielles de croissance ont été identifiés (tableau 9). De plus, un gène induit exclusivement durant la phase de transition, phase de croissance très peu connue chez les streptomycètes, a été identifié (tableau 10).

3.3. Évaluation du promoteur de la β-galactosidase

Lors d'études antérieures, il a été découvert que les streptomycètes utilisent le lactose présent à 30 g/L dans la SRD comme source de carbone (résultats non-présentés). La β-galactosidase de *S. coelicolor* M145, enzyme responsable du clivage du lactose en glucose et en galactose, devrait être impliquée dans l'utilisation de cette molécule par le microorganisme. Par le fait même, le promoteur du gène de cet enzyme devrait être plus actif en SRD que dans un milieu de culture standard. Le

potentiel du promoteur de la β-galactosidase a donc été déterminé dans le but de découvrir un promoteur fort spécifique à la SRD pour développer un système d'expression. Ces expérimentations ont été faites avant d'obtenir le matériel et les appareils nécessaires à la réalisation des expériences de biopuces (voir tableau 6 pour le niveau d'expression de la β-galactosidase).

3.3.1. Construction du vecteur contenant le promoteur de la β-galactosidase

Afin de déterminer le potentiel du promoteur, la protéine rapporteuse XlnC a été utilisée. Tout d'abord, la région promotrice de 283 pb de la β-galactosidase a été amplifiée par PCR directement avec une colonie de *E. coli* 9B5. Le cosmide SC9B5 présent dans la bactérie a été utilisé comme matrice pour les amorces pβGalKpn5' et pβGalSph3' à une température d'hybridation de 68^{0}C (figure 28).

A

B

```
  1  gggatgacgt tacgcggtgt tccggtcacc gtcaggagcc ccgggggcag
 51  acctgggtgc cccaacggcc cggaccatgt gaccgatcgt cccgaaggcc
101  cccgtgttca ccaggaacaa acaaactccg acggggtaat tgattcggtt
151  gtgttcgggt tctagggtga cccgtgactc agtagtcgcc gcgtcaccgg
201  cagttgcgtt ccacccctac ggcaactgct ctcacagcac cgtgcgttga
251  gccgcccccg aagcccacgg aaggccacgg tca
                           r b s
```

Figure 28. Région promotrice du gène de la β-galactosidase de *S. coelicolor* M145. A, Région promotrice du gène de la β-galactosidase (SC9B5.24). ⊢⊣ , région intergénique correspondant au promoteur de SC9B5.24 (John Innes Institute). **B,** séquence du promoteur. Les séquences soulignées et en gras représentent les régions -35 et -10 du promoteur. La région soulignée et identifiée « rbs » représente la région d'attachement au ribosome (Eckhardt *et al.*, 1987).

Le produit PCR a ensuite été ligué dans le vecteur pIAFC109XlnC digéré préalablement avec les enzymes de restrictions *Kpn*I et *Sph*I. Le promoteur pC109 a ainsi été remplacé par le promoteur pβGal (voir section 3.1.4. de la méthodologie). Une fois les protoplastes de *S. lividans* 10-164 transformés avec le vecteur et certaines colonies sélectionnées grâce à leur résistance à la thiostreptone, la production de XlnC par celles-ci a été vérifiée avec les géloses RBB-xylane afin de s'assurer de l'intégrité du promoteur. Une dernière vérification de la présence du promoteur chez les souches sélectionnées a été effectuée à l'aide d'une amplification par PCR identique à la précédente directement sur le mycélium. Une souche de *S. lividans* 10-164/pIAFC109pβGalXlnC a donc été sélectionnée pour l'évaluation du promoteur de la β-galactosidase.

3.3.2. Évaluation de l'efficacité de la production protéique par le promoteur

La production protéique de XlnC des souches contenant les vecteurs avec le promoteur de la β-galactosidase et le promoteur standard pC109 a été vérifiée dans différents milieux de culture. Tout d'abord, la production de la protéine a été évaluée dans le milieu de culture standard M14 xylose, dans la SRD ainsi que dans le M14 lactose contenant la même concentration de lactose que la SRD, soit 30 g/L. Les cultures ont été effectuées à 34^{0}C sous agitation à 240 RPM et du surnageant de culture a été prélevé après 0, 6, 12, 24, 48, 72 et 144 heures. Dix microlitres de chacun des échantillons de surnageant ont été déposés sur un gel SDS-PAGE de 12 % de polyacrylamide. La XlnC a ensuite été révélée à un poids moléculaire d'environ 25 kDa par une coloration au bleu de Coomassie.

Entre 12 et 24 heures de culture, la XlnC a été aperçue pour la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnC dans le surnageant de culture en M14 lactose et M14 xylose (figure 29). Ce n'est qu'après 48 heures de culture qu'une faible bande a été aperçue dans le surnageant de culture en SRD. Le milieu de culture standard M14 xylose a été celui où la protéine a été retrouvée en plus grande quantité, suivi du M14 lactose pour terminer avec la SRD où une très faible quantité de XlnC a été observée. Pour

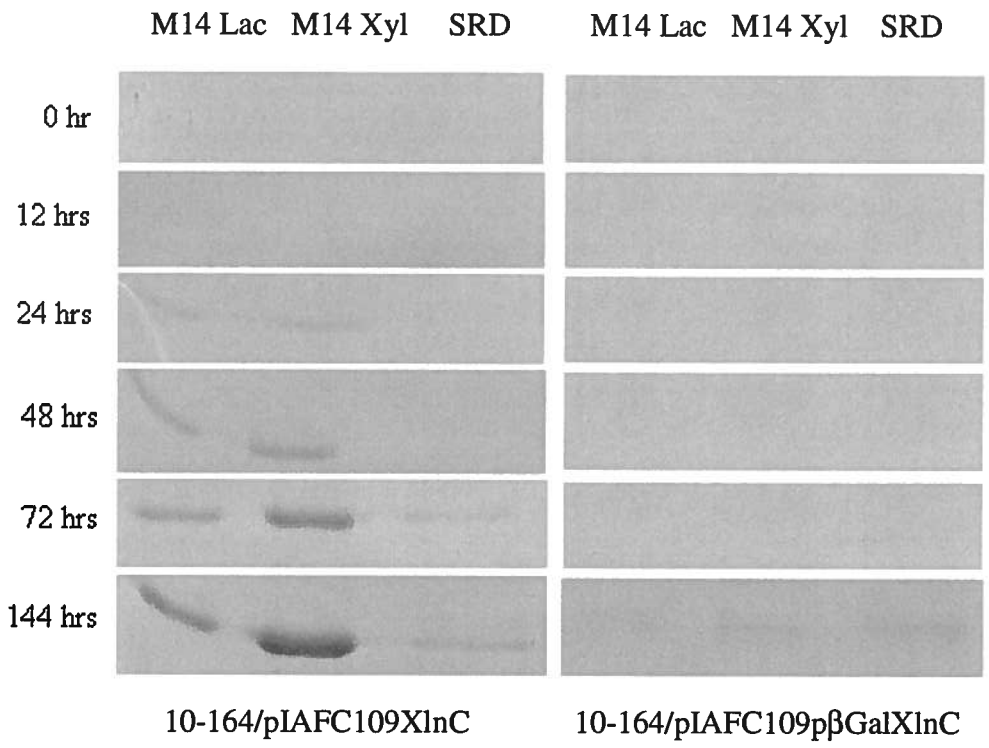


Figure 29. Évaluation de la production de XlnC avec le promoteur standard pC109 et le promoteur pβ-Gal. Gel SDS-PAGE 12% résumant l'apparition de la protéine xylanase C (XlnC) à différents temps d'une culture à 34^{0}C sous agitation de 240 RPM. La production de la protéine par le promoteur pC109 de la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109XlnC a été comparée avec le promoteur de la β-galactosidase pβ-Gal de *S. coelicolor* M145 de la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109pβGalXlnC. La production de protéine a aussi été comparé selon le milieu de culture, soit le M14 lactose (Lac), le M14 xylose (Xyl) et la solution résiduelle digérée à la pronase (SRD).

ce qui est de la souche *S. lividans* 10-164/pIAFC109pβGalXlnC, la protéine n'a été visible qu'à partir de 144 heures de culture dans les différents milieux et avec une intensité très faible.

4. DISCUSSION

4.1. Production de lactoferrine humaine recombinante tronquée

4.1.1. Évaluation du pouvoir antibactérien de la Lf sur les streptomycètes

La CMI de la Lf sur la souche hôte *S. lividans* 10-164 a été évaluée à 250 µM (voir section 4.1.1. des résultats). Cependant, les résultats cités dans l'article de Bellamy *et al.*, obtenus en 1992 avec les souches contrôles *E. coli* 0111 et *S. aureus* n'ont jamais pu être répétés. Plusieurs souches, milieux de culture ou conditions ont été testés en milieu solide et liquide, mais aucune inhibition n'a été observée. Les souches utilisées ne présentaient pas de sensibilité face à la protéine, contrairement aux souches utilisées par l'équipe de Bellamy. Après quelques semaines de travail, les essais pour répéter les contrôles ont été abandonnés étant donné que les résultats obtenus pour l'hôte étaient suffisants pour la poursuite du projet. En effet, une CMI de 250 µM correspondrait à une production de 20 g/L de Lf par l'hôte. La production de protéines hétérologues étant plus difficile pour l'hôte que la production de protéines homologues, il est rare d'obtenir une production importante. Dans le cas des streptomycètes, une production record d'une protéine hétérologue, soit le récepteur soluble CD4 de l'équipe de Fornwald (Fornwald *et al.*, 1993), a été publiée à 300 mg/L. Donc, la production de 20 g/L d'une protéine recombinante est peu probable.

Du fait que seule la portion N-terminale de la Lf sera produite par l'hôte, il est impossible d'affirmer hors de tout doute qu'elle ne présentera pas un effet antibactérien puisque ce n'est pas exactement la même protéine qui a été testée. Étant donné que la propriété antibactérienne de la protéine est due à la protéine totale, ainsi qu'au peptide présent seulement dans la portion N-terminale, la lactoferricine, elle sera peut-être affectée à la baisse.

4.1.2. Rendement des transformations chez *S. lividans* 10-164

Le nombre de transformants obtenu lors des transformations de protoplastes de *S. lividans* 10-164 avec les différentes constructions contenant le gène de la Lf a

toujours été plus faible que la normale. En effet, le contrôle positif utilisant le vecteur complet et intègre lors de la transformation a permis à plus de 400 colonies de croître lorsque la totalité de la transformation, soit 270 µl, a été déposée sur la gélose R5. Cependant, le nombre de transformants obtenus était suffisant pour que la transformation soit considérée réussie, soit entre 100 et 200 colonies par transformation. Cependant, certaines questions sont maintenant à considérer étant donné qu'aucun transformant n'a présenté une séquence conforme du gène de la Lf. Il est possible que lorsque les protoplastes ont commencé à se regénérer sur le milieu R5, et qu'ils ont débuté la production de $Lf_{hr}tr$, qu'ils soient morts à cause de toxicité de la protéine. Afin de survivre, les polymérases de l'hôte ont peut-être effectué plusieurs erreurs lors de la réplication du génome. Certaines ont sûrement été fatales, mais d'autres ont pu affecter des gènes qui n'affectent pas la viabilité cellulaire. Dans ce cas ci, les quelques transformants restants pourraient alors contenir une version du gène muté et/ou délété en présentant tout de même une résistance à la thiostreptone. Si c'est le cas, il serait très peu probable de récupérer un transformant contenant le gène intact de la Lf.

4.1.3. Évaluation de la présence de $Lf_{hr}tr$ dans le surnageant de culture

4.1.3.1. Concentration des surnageants de culture

Au départ, le profil protéique des surnageants de culture a été visualisé tel quel par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Malheureusement, les protéines n'étaient pas en assez grande quantité pour que des bandes soient perçues, autant avec une coloration au bleu de Coomassie qu'au nitrate d'argent. Afin de concentrer le surnageant, plusieurs précipitations des protéines à l'acétone ont été effectuées, mais cette technique ne semblait pas efficace (figure 20). En effet, le culot résultant de cette précipitation n'était pas facilement resuspendable. Parfois, des amas persistaient ce qui indique peut-être que certaines protéines dénaturées restaient non-solubles et ne pouvaient donc pas être visibles lors de la coloration du gel. La migration sur gel était également affectée par la grande quantité de sels qui était concentrée par le fait même.

La concentration des protéines a donc été effectuée par des appareils de concentration par filtration sur membrane et différents profils protéiques ont été observés grâce à une coloration au bleu de Coomassie d'un gel SDS-PAGE (figure 21). D'ailleurs, quelques bandes entre 50 et 30 kDa, poids moléculaire où la $Lf_{hr}tr$ devait se retrouver, semblaient présentes ou non dans le surnageant des souches contrôles et les différentes constructions. Par contre, aucune n'était surexprimée par rapport aux autres. La présence de la protéine n'était donc pas claire et l'utilisation de différentes techniques plus spécifiques était requise.

4.1.3.2. Détection de l'étiquette His présente sur certaines constructions de $Lf_{hr}tr$

Afin de facilité la tâche d'identifier la bande contenant de la $Lf_{hr}tr$, différentes techniques servant à repérer une étiquette His ont été utilisées.

Tout d'abord, un colorant devant colorer les bandes de protéines contenant une étiquette His directement sur le gel SDS-PAGE a été utilisé, soit le « Pro-Q Sapphire 365 oligohistidine gel stain » de la compagnie Molecular Probes. Cette technique n'a pas fonctionné. Elle a été répétée plusieurs fois sans aucun résultat et même les contrôles positifs n'ont jamais réagi positivement. C'est pourquoi une immunodétection classique avec un anticorps anti-étiquette His a été utilisée.

L'immunodétection a quant à elle été réussie. Par contre, aucune bande provenant du surnageant de culture des différentes constructions réalisées n'a été révélée à l'autoradiographie (figure 22). Des colonnes de purification d'affinité au nickel ont été utilisées afin de concentrer les protéines contenant une étiquette His, dans le cas où elles seraient en trop faible quantité pour être visualisée. Malheureusement, aucune bande n'a été détectée. Étant donné qu'il est possible que l'étiquette soit internalisée lors du repliement de la protéine, ou qu'elle soit tout simplement détruite par les différentes protéases de *S. lividans*, les expérimentations afin de visualiser la protéine ont été poursuivies avec des techniques visant directement la Lf.

4.1.3.3. Détection de la Lf

4.1.3.3.1. Immunodétection anti-Lf

L'immunodétection anti-Lf a été ardue à mettre au point. Tout d'abord, le bloqueur classique utilisé dans le laboratoire lors d'une immunodétection est le lait écrémé. La Lf étant présente naturellement dans le lait, il ne pouvait être utilisé. Le bloqueur choisi a donc été un bloqueur pour ELISA ne contenant pas de protéines laitières. Il est en fait composé d'un mélange de protéines obtenu suite à la dégradation protéolytique de la gélatine purifiée et de chlorure de sodium dans un tampon Tris. De plus, la Lf produite n'étant pas complète, l'utilisation d'un anticorps monoclonal était à éviter. L'immunodétection a donc été mise au point avec un anticorps polyclonal. Beaucoup de signaux non-spécifiques ont été observés avant que la concentration et la durée d'incubation des anticorps aient été ajustées correctement. Une fois les conditions fixées, une réaction croisée avec la XlnB est demeurée présente (figure 23). Des efforts considérables ont été mis en œuvre pour l'éliminer, mais il n'en fut rien. Étant donné que le poids moléculaire de celle-ci n'interférait pas dans la fenêtre de poids moléculaire où était recherchée la $Lf_{hr}tr$, les tentatives pour faire disparaître cette réaction croisée n'ont pas été poursuivies.

Aucun signal provenant de la Lf n'a cependant été observé (figure 23). Plusieurs explications sont possibles. Il se peut que la protéine n'était pas en assez grande quantité ou que la sensibilité de l'immunodétection n'était pas assez élevée pour qu'elle soit détectée. Il est aussi possible que l'anticorps reconnaisse un épitope qui ne soit disponible que sous la forme native et non dénaturée de la protéine. Dans tous les cas, il était nécessaire de développer une autre méthode de détection pour la Lf.

4.1.3.3.2. ELISA anti-Lf

En développant le protocole d'ELISA sandwich, les interrogations soulevées lors de l'immunodétection trouvaient une réponse. Tout d'abord, la limite de détection de 1 ng de Lf dans 100 µl, qui équivaut à une production minimale de 250 ng/L de Lf dans le surnageant d'origine (non-concentré), était très faible. Il est raisonnable de penser atteindre une production de cet ordre étant donné que la majorité des protéines hétérologues d'origine humaine produites chez les streptomycètes ont un taux de production variant de 20 mg/L jusqu'à plus de 300 mg/L (Binnie *et al.*, 1997). De plus, en utilisant 100 µl de surnageant concentré comme échantillon au lieu d'environ 10 µl dans le cas de l'immunodétection, qui correspond à environ 25 µg de protéines, 10 fois plus de protéines sont utilisées pour la détection. Les chances de repérer la protéine est donc augmentée. Aussi, les protéines ne se retrouvent pas dans un environnement dénaturant.

Malheureusement, aucune détection de Lf n'a été observée dans le surnageant concentré des souches contenant les différentes constructions (figure 24). La vérification de la séquence du gène de la Lf pour chacune des constructions était donc nécessaire.

4.1.3.4. Vérification de la séquence du gène recombinant de la Lf_htr

Étant donné que le gène recombinant de la Lf_htr a été exprimé dans la majorité des souches produites (voir section 3.1.4. des résultats), mais que la protéine n'a jamais pu être détectée (voir section 3.1.5. des résultats), un problème au niveau de la séquence du gène a été soupçonné. Le fragment amplifié par PCR à partir de l'ADNc étant du bon poids moléculaire, soit entre 1000 et 1200 pb selon la matrice, il était certain qu'il n'y avait pas eu création d'un codon stop. Dans le cas où un codon stop aurait été généré, la transcription du gène se serait arrêtée et

l'ARNm aurait été plus court. La réaction de RT-PCR nous l'aurait donc indiquée. Par contre, rien n'indiquait que le reste de la séquence était conforme.

Comme il était soupçonné, la séquence du gène recombinant de la Lf_htr était incorrecte (voir section 4.1.6. des résultats). Cependant, chacune des constructions qui ont été réalisées par des amplifications PCR distinctes possédait des mutations identiques. Le gène d'origine utilisé comme matrice lors de ces amplifications ayant été séquencé (voir section 4.1.2. des résultats), il a d'abord été question d'une erreur lors des manipulations. Après avoir répété le séquençage, le résultat était toujours le même et le seul élément commun à toutes ces constructions était le gène d'origine. Il a donc été séquencé de nouveau et naturellement, il contenait les 4 mutations. Ces mutations ont très bien pu être la cause d'un mauvais repliement de la protéine. En effet, trois d'entre-elles impliquaient un changement de l'acide aminé en question et la délétion de 4 bases changeait le cadre de lecture pour le dernier tiers de la protéine. Ainsi, les acides aminés en aval de cette dernière étaient tous incorrects.

La cause ainsi que l'origine de ces mutations sont inconnues. La séquence ayant été vérifiée par plusieurs personnes au début du projet sous-entend que les mutations sont survenues après le séquençage, mais il est aussi possible qu'il y ait eu un mélange de souches et que celle utilisée comme matrice pour les différentes constructions ne soit pas la souche dont le gène a été séquencé. Quoi qu'il en soit, plusieurs méthodes de détection de la Lf ayant été développées, il ne reste qu'à corriger et séquencer le gène recombinant de la Lf_htr, puis reprendre les constructions pour sélectionner un transformant producteur de Lf_{hr}tr. Il est certain que si le problème se situe au niveau de la toxicité trop importante de la Lf pour l'hôte et que les transformants ne peuvent se regénérer totalement avant de mourir, aucun transformant ne pourra être obtenu et la production de cette protéine d'intérêt devra être abandonnée. Par contre, s'il est possible de retarder la production de Lf, comme par exemple en utilisant un promoteur tardif à la croissance, les recherches pourront être poursuivies.

4.1.3.5. Problèmes liés à la production de protéines hétérologues

Outre le fait que les bactéries hôtes n'ont souvent pas un génome adapté à celui de l'organisme d'origine de la protéine d'intérêt à produire, ce qui entraîne un problème de disponibilité des différents ARNt, il y a le stress. En effet, la production d'une protéine hétérologue peut induire un stress chez l'organisme hôte. Ce phénomène induit chez l'hôte l'expression de différents gènes, pouvant nuire à la production de la protéine d'intérêt ou même mener à sa dégradation. Ce phénomène a d'ailleurs été observé dans le cas de la production d'une protéine hétérologue chez le genre *Aspergillus* (communication personnelle, Adrian Tsang, Concordia). Dans le cas des streptomycètes, les nombreuses protéases produites pourraient être impliquées.

Une analyse de comparaison du transcriptome d'une souche de streptomycètes produisant une protéine homologue, par exemple la XlnC, avec celui d'une souche contenant le gène recombinant de la Lf_htr corrigé pourrait être effectuée. Si c'est le cas, les protéases ou autres protéines de stress induites par la production d'une protéine hétérologue pourront être identifiées. La production d'une souche hôte «knock out» pour les gènes induits et identifiés comme possiblement négatifs à la production de protéines d'intérêt pourrait être envisagée.

4.2. Recherche de promoteurs spécifiques à la solution résiduelle

4.2.1. Courbe de croissance de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 Xylose

Il existe plusieurs différences marquées entre la culture de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 xylose. Dans cette section, il sera question du profil des deux courbes de croissance (figures 25 et 26 A). Tout d'abord, la croissance est beaucoup plus rapide en SRD qu'en M14 xylose. La phase de latence est presque inexistante dans la SRD tandis qu'elle a une durée d'environ 24 heures en M14 xylose. Tout ceci s'explique par le fait que les pré-cultures sont effectuées dans un milieu riche, le TSB.

La biomasse présente dans ces pré-cultures, soit l'inoculum, est ensuite transférée dans la SRD et dans le M14 xylose. La SRD est un autre milieu de culture riche en nutriments, il n'y a donc pas d'adaptation nécessaire par le microorganisme tandis que pour le milieu M14 xylose, qui est un milieu minimal, cette adaptation est primordiale. Celui-ci doit maintenant synthétiser lui-même la majorité des acides aminés essentiels à sa croissance qui sont absents dans le nouveau milieu. La bactérie devant dépenser beaucoup d'énergie à produire des acides aminés, des enzymes et d'autres protéines, comme une protéine d'intérêt, elle croît moins rapidement et la biomasse reste plutôt faible.

Étant donné la différence marquée entre le profil de la courbe de croissance de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 xylose, il était impossible de trouver des promoteurs spécifiques à la SRD et ainsi, trouver un promoteur exclusif. Par contre, la recherche de promoteurs spécifiques aux différentes phases de croissance de *S. coelicolor* M145 dans la SRD pouvait mener à l'optimisation et la spécialisation du système d'expression. De ce fait, le système trouvait tout de même des caractéristiques intéressantes le rendant commercialisable

4.2.2. Évaluation du transcriptome de *S. coelicolor* en SRD

4.2.2.1. Résultats de l'analyse statistique des biopuces

L'analyse statistique finalement choisie a été un ANOVA. La valeur $p<0.0005$ a été sélectionnée puisqu'elle fournissait un nombre suffisant de gènes significatifs pour l'expérience ainsi que pour le triplicata inverse, soit 6.3% des gènes présents sur la biopuce. De cette façon, après la confirmation des gènes avec le triplicata inverse, il en restait suffisamment pour analyser correctement les gènes exprimés et réprimés dans chacune des conditions. Une valeur p plus permissive augmentait trop le nombre de gènes significatifs tandis qu'une correction, comme la correction de Bonferroni qui doit augmenter la stringence de l'ANOVA, le réduisait trop. En comparant avec d'autres études effectuées chez *Streptomyces*, comme celle de Huang et al. en 2001 où 4.0% des gènes présents

sur la biopuce ont été significatifs, le pourcentage obtenu se trouve dans la moyenne.

4.2.2.2. Identification de promoteurs intéressants dans le cadre du développement d'un système d'expression en SRD

Les promoteurs des différents gènes identifiés, une fois confirmés, pourront servir au développement d'un système d'expression spécialisé. Le promoteur constitutif pourra servir de promoteur standard pour le système d'expression chez *S. lividans* en SRD. Les promoteurs actifs durant les premières phases de croissance pourront être utiles lors de la production de protéines n'affectant pas la croissance ni l'intégrité de l'hôte. Ceux-ci pourront même être utiles lors d'une production durant laquelle la culture serait maintenue en croissance constante, où elle n'atteindrait pas la phase stationnaire. Ces protéines d'intérêt peuvent être des protéines homologues ayant un intérêt commercial comme la Xln (Kansoh et Nagieb, 2004) utilisées lors du blanchiment de la pulpe dans la fabrication du papier. Elles pourraient aussi être des protéines hétérologues d'intérêt thérapeutique facilement produites par les streptomycètes comme dans le cas des récepteurs solubles CD4 (Fornwald *et al.*, 1993) utilisés dans la recherche de nouvelles thérapies contre le VIH.

Dans le cas des promoteurs plus tardifs, induits vers la fin de la croissance ou seulement lors de la phase stationnaire, des protéines toxiques à l'hôte pouvant affecter sa croissance pourraient être produites. Par exemple, des protéines ayant un effet antibactérien comme la Lf, des protéases ou différentes protéines difficiles à produire par la bactérie hôte.

Il est important par contre que l'expression de ces gènes soit confirmée à l'aide de différentes techniques avant que les promoteurs respectifs soient utilisés. En effet, l'analyse des résultats des biopuces est arbitraire. Beaucoup de manipulations statistiques sont effectuées et les conclusions peuvent varier d'une analyse à l'autre, d'où l'importance de choisir une analyse adaptée aux besoins.

Ces résultats doivent donc être confirmés à l'aide d'un PCR quantitatif ou d'un « Northern blot ». Ces techniques permettent la quantification du niveau d'expression des gènes identifiés et confirment s'ils sont réellement plus ou moins exprimés que dans la condition contrôle choisie. Ensuite, les promoteurs des gènes identifiés pourront être localisés dans les cosmides contenant le génome de *S. coelicolor* M145 et être clonés dans un vecteur contrôle. Ce vecteur contiendra le gène d'une protéine homologue facile à produire par *S. lividans* telle que la XlnC. Ensuite, la production de la protéine contrôle pourra être observée et l'efficacité réelle du promoteur pourra être évaluée avant qu'il soit offert comme option dans le cadre du système d'expression en SRD.

En regardant de plus près les résultats, certains peuvent sembler incongrus. Le cas du promoteur constitutif du gène SCO2783, correspondant au gène SCC105.14 codant pour une monooxygénase probable dans le cosmide SCC105, en est un exemple. En effet, ce gène est considéré comme constitutif d'après l'analyse statistique des biopuces puisqu'il est exprimé dans toutes les phases de croissance de *S. coelicolor* M145 dans la SRD (tableau 4). Cependant, ce gène fait partie d'un opéron comprenant également les gènes SCC105.13 codant pour une décarboxylase probable (SCO2782), SCC105.15 codant pour une acétyltransférase probable et SCC105.16 codant pour une protéine hypothétique conservée (figure 30). SCC105.13, qui précède directement SCC105.14, a été identifié comme étant exprimé seulement durant la croissance de la bactérie, soit durant les temps t5, t6.5 et t10 (tableau 6). Ce gène étant sous le contrôle du même promoteur et faisant partie du même ARNm polycistronique devrait en théorie être identifié par l'analyse comme étant exprimé également. Ceci s'explique du fait que les résultats de biopuces sont encore à confirmer. Il se peut qu'après un PCR quantitatif, la quantité de transcrits du gène SCC105.13 soit plus importante que pour la condition contrôle également dans la phase stationnaire et devienne un gène constitutif comme le gène SCC105.14. Il est également possible que ce dernier ne soit pas plus exprimé que dans la condition contrôle durant la phase stationnaire et que c'est lui qui devra être transféré dans la classe

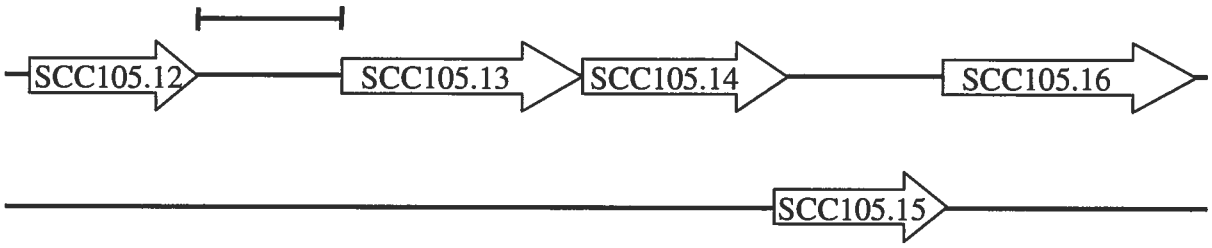


Figure 30. Région promotrice du gène constitutif SCO2783 de *S. coelicolor* M145. ⊢⊣ , région promotrice de l'opéron duquel fait partie le gène SCO2783 (SCC105.14) du cosmide SCC105. Les deux lignes représentent deux cadres de lecture différents (Jonh Innes Institute).

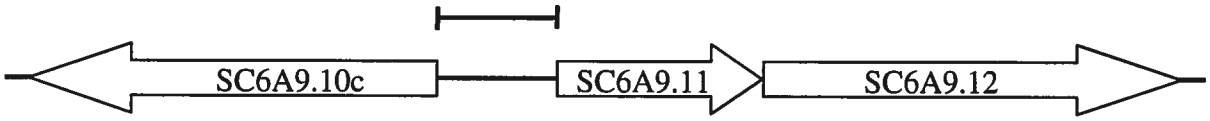


Figure 31. Région promotrice des gènes SCO5655 et SCO5656 de *S. coelicolor* M145. ⊢⊣ , région promotrice de l'opéron duquel fait partie les gènes SCO5656 (SC6A9.11) et SCO5655 (SC6A9.12) du cosmide SC6A9. Région qui semble commune au gène SCO5657 (SC6A9.10c) présent en sens inverse sur le même cadre de lecture (John Innes Institute).

des gènes exprimés durant la croissance seulement. Le fait qu'ils possèdent une expression équivalente par rapport au contrôle, soit environ 3.2 fois plus, le lien qui unit ces deux gènes est tout même présent dans les résultats. Pour ce qui est des gènes SCC105.15 et SCC105.16 présents dans cet opéron, étant donné qu'ils n'ont pas ressortis significatifs du test ANOVA, ils n'ont pu être analysés. L'observation de leur niveau d'expression, soit 2.2 fois plus élevé par rapport au contrôle, offre toutefois une indication quant au fait qu'ils sont unis aux gènes SCC105.13 et SCC105.14. Il est intéressant de mentionner que ces quatre gènes sont homologues aux gènes *RhbB* (SCC105.13), *RhbE* (SCC105.14), *RhbD* (SCC105.15) et *RhbF* (SCC105.16) faisant partie de l'opéron *RhbABCDEF* impliqué dans la biosynthèse de la rhizobactine, sidérophore associé à la membrane de *Rhizobium meliloti* (Lynch *et al.*, 2001).

Dans le cas des gènes SC6A9.11 (SCO5656) et SC6A9.12 (SCO5655), les résultats de biopuces sont quant à eux logiques (tableau 5). En effet, les deux gènes sont exprimés durant le début de la croissance, soit durant les temps t5 et t6.5. Ces deux gènes font partie du même opéron (figure 31) et sont tous deux exprimés environ 1.8 fois plus que dans la condition contrôle. De plus, le gène SC6A9.10c (SCO5657) présent en sens inverse à la gauche de l'opéron est aussi exprimé en début de croissance (Log ratio de 1.245). Selon l'organisation génique de la région, la région promotrice de l'opéron semble commune à celle du gène SC6A9.10c. En observant la nature de ces gènes, le lien qui les unit semble d'autant plus logique. En effet, l'opéron comprend les gènes d'une protéine de régulation de la transcription probable (SC6A9.11) et d'une aminotransférase probable (SC6A9.12). En sens inverse, il y a le gène d'une aldéhyde déshydrogénase probable (SC6A9.10c). Tout d'abord, il faut savoir que le gène de la protéine de régulation identifiée semble faire partie de la famille de régulation AsnC. Cette famille est homologue à la protéine de régulation Lrp chez *E. coli* (Willins *et al.*, 1991). Cette protéine est responsable de la régulation de plusieurs opérons. Parmi ceux-ci, l'opéron *ilvIH* code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de quelques acides aminés dont la leucine.

Lorsque l'acide aminé n'est pas présent dans l'environnement de la bactérie, la protéine se lie au promoteur et augmente l'expression de l'opéron. Par contre, si la leucine est présente, cette dernière empêche la liaison de Lrp avec l'ADN. Elle diminue ainsi l'expression de l'opéron et par le fait même, la production d'une enzyme nécessaire à sa synthèse. Une protéine de régulation impliquée dans la biosynthèse d'acides aminés a donc un lien certain avec une protéine comme l'aminotransférase, qui transfère la fonction amine d'un acide aminé sur une autre molécule, formant par le fait même un autre acide aminé. Il se pourrait même que la Lrp régule son expression en même temps que la sienne. Le transfert d'une fonction amine mène à la formation d'un autre acide aminé et d'un composé acide (Thierry et Maillard, 2002). Ce composé peut ensuite subir des transformations effectuées par d'autres enzymes. Il est possible qu'il soit alors utilisé dans une réaction médiée par une aldéhyde déshydrogénase, comme le gène SC6A9.10c classifié dans l'adaptation osmotique de *S. coelicolor* M145 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/classwise.html), qui converti réversiblement une fonction acide (COOH) en fonction aldéhyde (CHO) (http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim227f.htm). Étant donné le lien qui unit ces gènes, et le fait que cette région promotrice semble très active au niveau de leur expression en début de croissance de l'hôte, celle-ci pourrait être utilisée comme promoteur dans le cadre d'un système d'expression en SRD.

4.2.2.3. Autres gènes intéressants exprimés en SRD

D'autres gènes ont aussi été identifiés par les biopuces. Ces gènes sont intéressants dans une optique d'étude du métabolisme de *S. coelicolor* M145 en SRD. Étant donné qu'il s'agit des premières cultures analysées sous cet angle des streptomycètes dans ce milieu de culture, ces résultats apportent des informations intéressantes pouvant mener à certaines découvertes. Entre autres, à quoi sont dues cette croissance plus rapide et cette biomasse plus importante que dans un milieu standard.

Un gène exprimé seulement lors de la phase de transition (tableau 10), entre les deux phases exponentielles de croissance, qui est peu caractérisée a été identifié. Ce gène ayant une fonction inconnue, des recherches incluant la création d'une souche mutante pourraient être effectuées et sa fonction pourrait sans doute être identifiée. Pour ce faire, il serait nécessaire de produire une souche mutante pour le gène et une souche mutante complémentée avec le gène sur un vecteur d'expression pour les comparer avec la souche d'origine, soit *S. coelicolor* M145. En effet, en effectuant des cultures dans différentes conditions ou en présence de différents substrats tout en vérifiant plusieurs paramètres comme la courbe de croissance, le pH de la culture, les protéines extracellulaires et intracellulaires produites, le phénotype de la culture, etc., une différence quelconque entre les souches testées pourrait mener à l'identification de la fonction du gène. Ce type de recherche a déjà été effectué afin de trouver la fonction de gènes pour plusieurs microorganismes. L'équipe de Cho *et al.* a d'ailleurs utilisée cette technique en 2003 pour confirmer la fonction de deux gènes présents dans l'opéron *pqrAB*, qu'elle soupçonnait d'être impliqués dans la résistance de trois mutants de *S. coelicolor* A3(2) au dichlorure de paraquat, ou « methyl viologen », qui est présent dans quelques herbicides et pesticides (http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=4663&nom=METHYL+VIOLOGEN). L'équipe a été en mesure de confirmer la fonction de régulateur négatif de son propre opéron pour la protéine codée par le gène *pqrA*, ainsi que la fonction de pompe à efflux du dichlorure de paraquat pour la protéine codée par le gène *pqrB*.

De plus quelques gènes ont été associés aux deux phases de croissance exponentielles (tableau 9). Parmi ceux-ci se trouve le gène d'un précurseur d'une protéine de liaison au phosphate. Cette information pourrait également être utilisée dans le cadre d'une étude sur le métabolisme de croissance de *S. coelicolor* M145 en SRD. En effet, ce gène est homologue au gène *pstS* de *E. coli* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/classwise.html). Le gène *pstS* fait partie de l'opéron *pst* comprenant également les gènes *pstA*, *pstB* et *pstC*.

Les protéines codées par cet opéron font partie d'un système de transport du phosphate. La protéine PstS est quant à elle un transporteur de phosphate inorganique (Pi) périplasmique. Elle est aussi impliquée dans la régulation du régulon *pho*, qui comprend le gène d'une phosphatase alcaline et de l'opéron *pst* dont elle fait partie. Le régulon *pho* est exprimé lorsque la bactérie croît sous limitation de phosphate (Hoffer et Tommassen, 2001). Le phosphate est un élément essentiel à la survie et à la réplication des bactéries, en tant que constituant des acides nucléiques et des systèmes de distribution d'énergie (ATP). Il est donc possible que *S. coelicolor* M145 soit limitée au niveau du taux de phosphate libre disponible en SRD (69 mg/Kg) ou bien qu'elle utilise cette protéine pour augmenter la quantité ou la rapidité de l'absorption du phosphate spécifiquement durant ses deux phases exponentielles de croissance. Des études plus approfondies sur la fonction de cette protéine chez *S. coelicolor* M145 pourraient répondre à cette interrogation et mener à une meilleure connaissance de son métabolisme en SRD. L'observation du niveau d'expression du gène par PCR quantitatif lors d'une culture en SRD supplémenté en phosphate comparé à la SRD standard pourrait entre autres être envisagée.

4.2.2.4. Design de l'expérience

Cette expérience de biopuces a été basée sur l'étude réalisée par l'équipe de Huang (Huang *et al.*, 2001). Il est certain qu'après avoir développé les manipulations et l'analyse statistique, plusieurs connaissances ont été acquises. Le design d'expérience choisi a donc été remis en question.

Choisir une condition d'ARN total comme contrôle n'est pas la meilleure option. Aucun standard n'est parfait et c'est d'ailleurs un problème pour l'analyse et la comparaison des données dans le domaine des biopuces. Cependant, certains présentent plus d'avantages que d'autres. Dans ce cas-ci, l'utilisation d'ADN génomique de *S. coelicolor* M145 aurait été préférée.

Tout d'abord, l'utilisation d'ARN total provenant d'une seule phase de croissance a été une erreur. À chaque phase de croissance, certains gènes sont exprimés et d'autres non. Pour que l'expression relative d'un gène soit évaluée, un spot doit présenter un signal d'hybridation pour chacune des conditions (Tallat *et al.*, 2002). À tout le moins, un mélange d'ARN total de différentes phases de croissance aurait pu être utilisé pour uniformiser l'intensité du contrôle pour la majorité des spots. Le fait qu'environ la moitié des spots n'ait pu être analysée pour cause d'intensité trop faible ou inexistante dans une des deux conditions a limité le nombre de gènes identifiés ainsi que leur fiabilité. En utilisant de l'ADN génomique, où chacun des gènes est représenté de façon équitable, normalise les résultats avec une reproductibilité supérieure et rend la comparaison d'une expérience à l'autre ou d'un laboratoire à l'autre plus facile.

Si les résultats de l'équipe de Talaat sont exacts, une fois confirmés à l'aide du PCR quantitatif, seulement 45 à 70% des gènes identifiés par l'expérience de biopuces réalisées dans cette étude seront réellement considérés plus ou moins exprimés par rapport au contrôle. La méthode utilisant l'ADN génomique quant à elle obtiendrait un taux de véracité allant de 85 à 99%.

4.3. Évaluation du promoteur de la β-galactosidase

Le promoteur de la β-galactosidase de *S. coelicolor* M145 n'a pas présenté les résultats escomptés pour la production de XlnC lors d'une culture en SRD. En effet, une production plus importante de XlnC était attendue en SRD, et en M14 lactose, comparé à une culture en M14 xylose puisque ce promoteur est induit par le lactose. Cependant, une très faible production a été observée uniformément dans les différents milieux après 144 heures de culture (figure 29). De plus, le gène de la β-galactosidase SCO7407 a été identifié lors de l'étude du transcriptome effectuée ultérieurement comme étant exprimé durant la croissance active de la bactérie, soit entre 5 et 10 heures de culture (tableau 6). La protéine aurait donc due être visible rapidement dans le surnageant de culture. Dans

le cas du promoteur pC109, une production plus importante en M14 xylose était attendue étant donné que le promoteur est induit par le xylose et c'est ce qui été obtenu.

Ces résultats présentent bien l'importance de confirmer les résultats obtenus par l'analyse statistique des biopuces et ce, autant par la méthode du RT-PCR qu'avec un vecteur contrôle contenant le gène d'une protéine rapporteuse comme dans ce cas-ci. En effet, même si un promoteur est induit lors de la croissance de la bactérie, il n'est pas certain qu'il en résultera une grande production protéique. Il existe d'autres systèmes qui peuvent limiter la production protéique. Les ARNm peuvent être dégradés au fur et à mesure qu'ils sont produits, sans avoir le temps d'être traduits en protéines. Plusieurs mécanismes sont responsables de cette dégradation. Il y a le repliement de l'ARNm qui peut influencer la dégradation en découvrant une extrémité ou en formant des portions d'ARNm double-brin, en forme d'« épingle à cheveux » par exemple. Chez les bactéries Gram positives comme les streptomycètes, ces mécanismes sont peu connus. Un homologue à la ribonucléase (RNase) E de *E. coli* a été identifié chez *S. coelicolor*. Cette enzyme serait responsable du clivage de l'ARNm simple-brin. Un homologue à la RNase III clivant l'ARNm double-brin a aussi été identifié. Les extrémités générées par ces deux endoribonucléases permettraient à l'enzyme polynucléotide phosphorylase (PNPase) d'ajouter en 3' une queue polyadénylée (poly(A)) hétéropolymérique qui faciliterait ensuite la dégradation de l'ARNm (Bralley et Jones, 2003). Il est d'ailleurs intéressant de mentionner que la PNPase serait la seule enzyme chez *S. coelicolor* à polyadényler et qu'elle incorpore d'autres nucléotides à la queue de poly(A), d'où le terme hétéropolymérique. Cette enzyme catalyserait également d'autres réactions nécessaires à la synthèse d'antibiotiques chez certains streptomycètes. En plus du contrôle des ARNm, de nombreuses protéases peuvent dégrader les protéines une fois produites dans le milieu intracellulaire ou une fois sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ce sont donc plusieurs facteurs qui peuvent influencer la production d'une protéine par un organisme hôte.

Le promoteur de la β-galactosidase ayant été caractérisé par l'équipe de Eckhardt *et al.* en 1987, il est peu probable que le problème se situe au niveau de l'intégrité du

promoteur puisque la région clonée contenait toute la séquence nécessaire à l'expression du gène. Par contre, lorsque d'autres promoteurs provenant de *S. coelicolor* M145 seront testés, il sera important de faire attention à la région clonée. En effet, les streptomycètes possèdent différents types de promoteurs, qui ne sont pas nécessairement similaires à ceux utilisés par *E. coli*, comme c'était le cas ici. Certains gènes semblent être régulés par de multiples promoteurs, qui peuvent être superposés et se situés en partie ou totalement à l'intérieur de cadres de lecture ouverts (ORFs) (Strohl, 1992). Ces caractéristiques rendent le clonage de promoteurs présumés plus difficile puisqu'ils peuvent ne pas être confinés à l'espace intergénique adjacent au gène identifié.

4.4. Hypothèse : utilisation de l'acide lactique comme source de carbone

Comme mentionné précédemment, il existe plusieurs différences entre la culture de *S. coelicolor* M145 en SRD et en M14 xylose. Outre le profil des courbes de croissance, il y a l'évolution du pH de la culture. En effet, comme dans une culture bactérienne standard, la culture de *S. coelicolor* M145 en M14 xylose s'acidifie au cours du temps avec l'accumulation de déchets métaboliques acides, dont entre autres des acides organiques produits lors de réactions de fermentation (figure 26 B). Cependant, ce n'est pas le cas dans la culture en SRD où le milieu s'alcalinise jusqu'à atteindre un plateau à un pH de 7.9 (figure 25 B).

Suite à cette observation, une hypothèse a été émise. Il a été démontré dans le passé que les streptomycètes utilisent le lactose présent dans la SRD à une concentration de 30 g/L comme source de carbone. Il est cependant possible qu'ils utilisent une autre source de carbone. La SRD possède une concentration d'acide lactique de 9.1 g/L, qui pourrait également en être une source importante. Au fur et à mesure que l'acide lactique serait dégradée, le pH augmenterait. Étant donné que l'augmentation du pH a été observée, l'hypothèse que *S. coelicolor* M145 utiliserait l'acide lactique a donc été émise.

L'enzyme utilisée pour former et dégrader l'acide lactique est la lactate déshydrogénase (LDH). Le génome de *S. coelicolor* M145 contiendrait deux gènes codant pour une LDH, soit le gène SCO2118 et SCO3594. Malheureusement, aucun de ces deux gènes n'a été identifié comme étant significatif par l'analyse statistique des biopuces. La surexpression de ces gènes en SRD n'a donc pas été établie avec cette technique. Cependant, le fait qu'ils n'ont pas été significatifs dans cette expérience n'a rien à voir avec le fait qu'ils sont ou non surexprimés en SRD, les résultats obtenus n'étaient seulement pas constants à travers les différentes biopuces hybridées. La non-significativité d'un gène peut être causé par de nombreux phénomènes. Il est possible que la cause soit une irrégularité du dépôt des amplicons sur la lame, ce qui a d'ailleurs été observé dans ce cas-ci. En effet, dû probablement à problème de régulation de l'humidité dans la chambre de dépôt, les spots ont séchés plus ou moins rapidement ce qui a mené à des spots en forme de beignes. Ainsi, l'hybridation s'est effectuée en périphérie du spot et non au centre. Cependant, le centre est tout de même considéré comme de l'hybridation lors de la quantification et entre dans le calcul de la médiane d'intensité du spot. Ceci ajoute une grande variabilité entre les biopuces. Il est aussi possible qu'il y ait eu des saletés ou un dépôt de tampon à ces endroits, ce qui a pu augmenter le bruit de fond et camoufler l'intensité du spot. Il se peut également, entre autres possibilités, que ces gènes n'étaient pas du tout exprimés dans la condition contrôle et par le fait même, n'ont pas permis l'évaluation d'une expression relative.

Afin de confirmer ou non l'hypothèse émise, il est possible comme avec le gène de la β-galactosidase, de récupérer à l'aide d'amorces et d'une amplification PCR le promoteur des gènes SCO2118 et SCO3594, puis de tester leur efficacité dans un vecteur contrôle. Ainsi, nous pourrions déterminer si ces promoteurs pourraient entrer dans l'élaboration du système d'expression en SRD.

4.5. Stabilisation du pH de la culture de *S. coelicolor* M145 en SRD

La culture de *S. coelicolor* M145 en SRD s'alcalinise jusqu'à un plateau à un pH de 7.9. Ce plateau survient après 12 heures de culture, exactement au même moment que le plateau de la phase stationnaire (figure 25). Étant donné la richesse de la SRD en tant que milieu de culture, il est peu probable que l'apparition de la phase stationnaire soit due à un manque de nutriments. Par contre, il serait logique de penser que l'atteinte du pH de 7.9 affecte la croissance du microorganisme dans ce milieu de culture.

Si cette hypothèse s'avère vraie, il serait possible d'ajuster le pH tout au long de la culture et d'empêcher l'atteinte d'un pH de 7.9. De cette façon, la bactérie continuerait de croître et les promoteurs identifiés comme étant induits durant la croissance seraient utiles pour le système d'expression.

Conclusion

L'intérêt pour de nouveaux systèmes d'expression utilisant les résidus d'une autre industrie comme matière première étant grandissant, le développement d'un système d'expression propre de protéines d'intérêt a été entrepris. Les objectifs principaux du projet de recherche présenté étaient de développer un système d'expression chez *S. lividans* dans une SR à la production fromagère et de produire la $Lf_{hr}tr$.

Dans le but de produire de la $Lf_{hr}tr$ chez *S. lividans* 10-164, le potentiel antibactérien de la Lf bovine a été déterminé sur l'hôte. La CMI a été évaluée à 250 µM, ce qui équivaut à une production de 20 g/L de Lf par l'hôte. Ce taux de production étant peu probable, le gène recombinant a été conçu par assemblage d'oligonucléotides. Différentes constructions ont ensuites été élaborées et clonées chez l'hôte. Durant ces transformations, un faible nombre de transformants a été obtenu. Ce phénomène indique peut-être que la $Lf_{hr}tr$ est produite très tôt lors de la regénération des protoplastes et qu'ils sont trop fragiles pour la supporter. Cependant, le nombre de transformant était suffisant et des analyses afin de trouver un producteur de $Lf_{hr}tr$ ont été entreprises.

L'expression du gène de la $Lf_{hr}tr$ a été identifiée chez la plupart des souches produites grâce à l'évaluation de la présence d'ARNm de Lf, soit celles possédant les constructions avec le vecteur pIAFC109. Par contre, la présence de la protéine n'a jamais été observée, autant avec une immunodétection qu'avec un ELISA anti-Lf. La présence d'ARNm sans protéine a semé un doute quant à l'intégrité du gène. La séquence du gène a donc été vérifiée pour les différentes constructions et le gène recombinant d'origine. Quatre mutations ont ainsi été repérées. Trois d'entre-elles sont des mutations ponctuelles qui changent l'acide aminé impliqué. L'autre mutation est une délétion de 4 bases qui change le cadre de lecture pour le dernier tiers de la protéine. Ces mutations semblent indiquer que la protéine n'est pas en mesure de se replier correctement, ce qui permet aux protéases de la dégrader rapidement. Le fait de ne pas retrouver de $Lf_{hr}tr$ lorsqu'il y a présence d'ARNm est donc plausible.

Outre la séquence erronée, plusieurs problèmes sont associés à la production de protéines hétérologues, dont l'induction d'un stress chez l'hôte. Ce stress peut induire l'expression de différents gènes pouvant nuire à la production de la protéine d'intérêt. Les streptomycètes ayant une grande quantité de protéases, il est possible qu'un ou plusieurs gènes d'entre-elles soient surexprimés. Il serait donc intéressant, après avoir corrigé le gène de la $Lf_{hr}tr$ et répété les différentes constructions, de faire une expérience de biopuces comparant les gènes exprimés dans une souche de *S. coelicolor* M145 produisant une protéine homologue avec ceux d'une souche produisant une protéine hétérologue comme la Lf.

Dans le cas du développement du système d'expression en SRD, des promoteurs spécifiques à différentes phases de croissance ont été identifiés. Au total, 464 gènes significatifs ont été identifiés suite à une analyse ANOVA à l'aide d'une valeur $p<0.0005$. Parmis ceux-ci, 104 ont été identifiés comme significativement induits et 92 ont été identifiés comme significativement réprimés. Les promoteurs de certains gènes induits peuvent être intéressants dans le cadre d'un système d'expression. Un promoteur constitutif, des promoteurs induits durant la croissance et des promoteurs tardifs ont entre autres été identifiés. Les premiers promoteurs pourront être utilisés lors de la production de protéines d'intérêt homologues ou n'affectant pas la croissance de l'hôte tandis que les promoteurs tardifs pourront être utiles lors de la production de protéines toxiques. Ces gènes devront éventuellement être confirmés à l'aide d'un PCR quantitatif et d'une protéine rapporteuse dans un vecteur contrôle de production protéique. Dans le cas du promoteur de la β-galactosidase, qui devait être induit en début de croissance, ce dernier contrôle n'a pas révélé les résultats escomptés. En effet, l'utilisation de ce promoteur n'a pas augmenté la production de la protéine rapporteuse XlnC.

Pour terminer, une alcalinisation de la culture de *S. coelicolor* M145 en SRD lors de la courbe de croissance a été observée. L'hypothèse que cette alcalinisation serait due à l'utilisation de l'acide lactique présent en SRD comme source de carbone a été émise. Il serait donc intéressant que les promoteurs des deux gènes codant pour des LDH probables chez *S. coelicolor* soient testés dans un vecteur contrôle de production

protéique, étant donné que ces gènes n'ont pas ressortis significatifs lors de l'analyse des résultats de biopuces.

Appendice A

Séquences de la lactoferrine humaine

```
  1  ggccgtagga gaaggagtgt tcagtggtgc accgtatccc aacccgaggc
      G  R  R   R  R  S   V  Q  W  C   T  V  S   Q  P  E

 51  cacaaaatgc ttccaatggc aaaggaatat gagaagagtg cgtggccctc
     A  T  K  C   F  Q  W   Q  R  N   M  R  R  V   R  G  P

101  ctgtcagctg cataaagaga gactccccca tccagtgtat ccaggccatt
      P  V  S   C  I  K  R   D  S  P   I  Q  C   I  Q  A  I

151  gcggaaaaca gggccgatgc tgtgaccctt gatggtggtt tcatatacga
      A  E  N   R  A  D   A  V  T  L   D  G  G   F  I  Y

201  ggcaggcctg gccccctaca aactgcgacc tgtagcggcg gaagtctacg
     E  A  G  L   A  P  Y   K  L  R   P  V  A  A   E  V  Y

251  ggaccgaaag acagccacga actcactatt atgccgtggc tgtggtgaag
      G  T  E   R  Q  P  R   T  H  Y   Y  A  V   A  V  V  K

301  aagggcggca gctttcagct gaacgaactg caaggtctga agtcctgcca
      K  G  G   S  F  Q   L  N  E  L   Q  G  L   K  S  C

351  cacaggcctt cgcaggaccg ctggatggaa tgtgcctata gggacacttc
     H  T  G  L   R  R  T   A  G  W   N  V  P  I   G  T  L

401  gtccattctt gaattggacg ggtccacctg agcccattga ggcagctgtg
      R  P  F   L  N  W  T   G  P  P   E  P  I   E  A  A  V

451  gccaggttct tctcagccag ctgtgttccc ggtgcagata aaggacagtt
      A  R  F   F  S  A   S  C  V  P   G  A  D   K  G  Q

501  ccccaacctg tgtcgcctgt gtgcggggac aggggaaaac aaatgtgcct
     F  P  N  L   C  R  L   C  A  G   T  G  E  N   K  C  A

551  tctcctccca ggaaccgtac ttcagctact ctggtgcctt caagtgtctg
      F  S  S   Q  E  P  Y   F  S  Y   S  G  A   F  K  C  L

601  agagacgggg ctggagacgt ggcttttatc agagagagca cagtgtttga
      R  D  G   A  G  D   V  A  F  I   R  E  S   T  V  F

651  ggacctgtca gacgaggctg aaagggacga gtatgagtta ctctgcccag
     E  D  L  S   D  E  A   E  R  D   E  Y  E  L   L  C  P

701  acaacactcg gaagccagtg gacaagttca aagactgcca tctggcccgg
      D  N  T   R  K  P  V   D  K  F   K  D  C   H  L  A  R

751  gtcccttctc atgccgttgt ggcacgaagt gtgaatggca aggaggatgc
      V  P  S   H  A  V   V  A  R  S   V  N  G   K  E  D

801  catctggaat cttctccgcc aggcacagga aaagtttgga aaggacaagt
     A  I  W  N   L  L  R   Q  A  Q   E  K  F  G   K  D  K

851  caccgaaatt ccagctcttt ggctccccta gtgggcagaa agatctgctg
      S  P  K   F  Q  L  F   G  S  P   S  G  Q   K  D  L  L

901  ttcaaggact ctgccattgg gttttcgagg gtgcccccga ggatagattc
      F  K  D   S  A  I   G  F  S  R   V  P  P   R  I  D
```

```
951   tgggctgtac cttggctccg gctacttcac tgccatccag aacttgagga
      S  G  L  Y   L  G  S   G  Y  F   T  A  I  Q   N  L  R

1001  aaagtgagga ggaagtggct gcccggcgtg cgcgggtcgt gtggtgtgcg
       K  S  E   E  E  V  A   A  R  R   A  R  V   V  W  C  A

1051  gtgggcgagc aggagctgcg caagtgtaac cagtggagtg gcttgagcga
        V  G  E   Q  E  L   R  K  C  N   Q  W  S   G  L  S

1101  aggcagcgtg acctgctcct cggcctccac cacagaggac tgcatcgccc
      E  G  S  V   T  C  S   S  A  S   T  T  E  D   C  I  A

1151  tggtgctgaa aggagaagct gatgccatga gtttggatgg aggatatgtg
       L  V  L   K  G  E  A   D  A  M   S  L  D   G  G  Y  V

1201  tacactgcag gcaaatgtgg tttggtgcct gtcctggcag agaactacaa
        Y  T  A   G  K  C   G  L  V  P   V  L  A   E  N  Y

1251  atcccaacaa agcagtgacc ctgatcctaa ctgtgtggat agacctgtgg
      K  S  Q  Q   S  S  D   P  D  P   N  C  V  D   R  P  V

1301  aaggatatct tgctgtggcg gtggttagga gatcagacac tagccttacc
       E  G  Y   L  A  V  A   V  V  R   R  S  D   T  S  L  T

1351  tggaactctg tgaaaggcaa gaagtcctgc cacaccgccg tggacaggac
        W  N  S   V  K  G   K  K  S  C   H  T  A   V  D  R

1401  tgcaggctgg aatatcccca tgggcctgct cttcaaccag acgggctcct
      T  A  G  W   N  I  P   M  G  L   L  F  N  Q   T  G  S

1451  gcaaatttga tgaatatttc agtcaaagct gtgcccctgg gtctgacccg
       C  K  F   D  E  Y  F   S  Q  S   C  A  P   G  S  D  P

1501  agatctaatc tctgtgctct gtgtattggc gacgagcagg gtgagaataa
        R  S  N   L  C  A   L  C  I  G   D  E  Q   G  E  N

1551  gtgcgtgccc aacagcaatg agagatacta cggctacact ggggctttcc
      K  C  V  P   N  S  N   E  R  Y   Y  G  Y  T   G  A  F

1601  ggtgcctggc tgagaatgct ggagacgttg catttgtgaa agatgtcact
       R  C  L   A  E  N  A   G  D  V   A  F  V   K  D  V  T

1651  gtcttgcaga acactgatgg aaataacaat gaggcatggg ctaaggattt
        V  L  Q   N  T  D   G  N  N  N   E  A  W   A  K  D

1701  gaagctggca gactttgcgc tgctgtgcct cgatggcaaa cggaagcctg
      L  K  L  A   D  F  A   L  L  C   L  D  G  K   R  K  P

1751  tgactgaggc tagaagctgc catcttgcca tggccccgaa tcatgccgtg
       V  T  E   A  R  S  C   H  L  A   M  A  P   N  H  A  V

1801  gtgtctcgga tggataaggt ggaacgcctg aaacaggtgc tgctccacca
        V  S  R   M  D  K   V  E  R  L   K  Q  V   L  L  H

1851  acaggctaaa tttgggagaa atggatctga ctgcccggac aagttttgct
      Q  Q  A  K   F  G  R   N  G  S   D  C  P  D   K  F  C
```

```
1901  tattccagtc tgaaaccaaa aaccttctgt tcaatgacaa cactgagtgt
       L  F  Q   S  E  T  K   N  L  L   F  N  D   N  T  E  C

1951  ctggccagac tccatggcaa aacaacatat gaaaaatatt tgggaccaca
        L  A  R   L  H  G   K  T  T  Y   E  K  Y   L  G  P

2001  gtatgtcgca ggcattacta atctgaaaaa gtgctcaacc tccccccctcc
      Q  Y  V  A   G  I  T   N  L  K   K  C  S  T   S  P  L

2051  tggaagcctg tgaattcctc aggaagtaa
       L  E  A   C  E  F  L   R  K  -
```

Figure 32. Séquences de la lactoferrine humaine complète. Comprend la séquence ADN du gène, ainsi que la séquence en acides aminés de la protéine. Les acides aminés écrit en gras représentent la séquence de la protéine tronquée, soit la portion N-terminale de la protéine.

Appendice B

Liste des gènes significatifs de l'analyse statistique des biopuces

Tableau 11. Liste des gènes significatifs (valeur p<0.0005) lors de l'analyse statistique des biopuces de *S. coelicolor* M145.

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO0004	2.81E-05	0.352	0.359	0.615	0.180
SCO0033	2.58E-08	0.337	0.120	0.612	1.042
SCO0111	1.42E-06	-0.025	-0.046	-0.072	0.829
SCO0119	3.05E-04	0.270	-0.115	0.144	0.753
SCO0131	8.11E-05	0.137	-0.077	1.349	0.025
SCO0132	2.59E-06	-0.095	-0.069	-0.122	0.832
SCO0166	8.43E-15	0.594	0.410	0.598	5.374
SCO0168	9.48E-10	1.021	0.577	1.087	3.538
SCO0170	1.24E-04	0.015	-0.007	0.424	1.706
SCO0172	3.55E-07	0.225	0.103	0.224	0.929
SCO0174	6.29E-08	0.114	0.030	0.499	2.374
SCO0196	2.50E-04	0.124	-0.121	0.608	0.912
SCO0199	4.96E-09	0.551	0.200	0.363	1.971
SCO0248	1.17E-05	0.201	-0.117	-0.090	-0.831
SCO0259	1.73E-05	0.398	0.075	0.776	1.057
SCO0277	2.25E-08	0.469	0.293	0.131	-0.915
SCO0278	1.51E-09	0.054	-0.034	-0.091	0.874
SCO0288	2.63E-05	0.077	0.174	-0.016	-0.460
SCO0302	3.53E-04	0.140	-0.010	0.032	-0.262
SCO0318	2.08E-07	0.257	-0.016	0.210	0.691
SCO0323	1.99E-04	0.125	0.022	0.516	0.070
SCO0332	3.08E-06	-0.121	-0.228	-0.374	-0.706
SCO0359	2.74E-07	-0.098	0.081	-0.045	1.193
SCO0379	5.55E-16	-0.220	-0.106	-0.130	2.989
SCO0418	3.00E-04	-0.116	0.013	-0.277	-0.462
SCO0429	9.51E-07	-0.411	-0.311	-0.817	-0.866
SCO0437	6.88E-11	-0.506	-0.434	-0.584	1.435
SCO0438	1.22E-04	0.202	0.036	-0.035	0.560
SCO0452	1.64E-04	0.351	0.301	0.701	0.101
SCO0463	1.76E-07	-0.054	0.022	-0.068	0.991
SCO0466	2.39E-07	-0.411	-0.254	-0.653	-0.894
SCO0478	5.21E-12	-0.119	0.046	-0.030	2.318
SCO0513	8.82E-05	1.499	1.397	0.709	1.117
SCO0546	2.07E-04	-0.684	-0.719	-0.374	-0.931
SCO0565	2.06E-07	0.145	0.177	-0.132	-0.689
SCO0602	2.48E-05	0.572	0.494	0.436	0.094
SCO0693	1.74E-08	-0.205	0.010	-0.502	-0.687
SCO0720	5.92E-07	0.046	0.022	-0.307	-0.450
SCO0731	4.47E-04	-0.099	-0.033	0.096	-0.425
SCO0732	6.97E-07	0.286	0.192	0.854	1.301

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO0742	3.37E-04	0.219	0.278	0.334	-0.146
SCO0749	1.77E-05	-0.303	-0.004	-0.560	-1.023
SCO0760	1.11E-04	0.135	0.078	0.736	0.835
SCO0770	2.22E-05	0.156	0.109	0.361	0.648
SCO0810	4.25E-09	0.058	0.012	-0.299	-1.248
SCO0837	4.47E-08	0.000	-0.092	0.064	1.021
SCO0851	1.04E-06	0.130	0.006	-0.100	0.862
SCO0858	8.27E-08	-0.102	0.216	0.336	0.707
SCO0880	1.92E-04	0.024	-0.013	0.238	0.510
SCO0887	4.12E-06	-0.558	-0.432	0.253	-1.183
SCO0897	1.27E-08	0.044	0.035	-0.110	1.005
SCO0923	7.62E-10	0.102	-0.238	0.021	1.116
SCO0924	5.90E-08	0.265	0.112	0.756	1.243
SCO0957	5.52E-07	-0.754	-0.691	-0.560	-1.433
SCO0993	6.80E-07	0.562	0.051	0.450	0.210
SCO0994	3.54E-04	0.022	-0.089	0.613	0.007
SCO1062	1.17E-04	-0.135	-0.187	-0.502	-0.152
SCO1065	3.94E-11	-0.310	-0.181	-0.519	-1.172
SCO1081	3.33E-04	-0.231	-0.185	-0.239	-0.566
SCO1086	1.79E-04	-0.221	-0.160	-0.177	0.306
SCO1121	1.55E-07	-0.013	-0.013	-0.031	1.461
SCO1197	3.08E-06	0.130	0.270	0.069	0.854
SCO1205	6.27E-05	0.398	0.350	0.535	-0.037
SCO1222	8.81E-09	0.406	0.136	0.207	1.240
SCO1234	3.39E-09	0.182	0.232	-0.063	-0.752
SCO1279	3.48E-04	-0.524	-0.398	-0.581	-0.811
SCO1289	1.09E-08	-0.207	0.007	0.858	-0.362
SCO1290	6.95E-07	0.176	-0.097	1.781	-0.590
SCO1326	1.18E-07	0.391	0.410	0.118	-0.554
SCO1334	6.72E-09	0.203	0.526	0.168	-1.238
SCO1346	2.59E-06	-0.474	-0.274	-0.419	-1.382
SCO1361	1.61E-04	0.228	0.234	0.349	0.827
SCO1418	4.69E-07	0.196	0.187	0.138	1.927
SCO1421	2.57E-07	0.249	0.325	0.126	1.460
SCO1428	1.97E-05	-0.120	-0.021	0.332	-0.336
SCO1450	1.74E-05	0.086	0.094	-0.093	-0.217
SCO1468	9.34E-07	0.135	0.031	0.374	0.822
SCO1472	6.94E-09	0.171	-0.246	0.196	0.868
SCO1517	7.87E-09	-0.092	0.021	-0.582	-0.561
SCO1521	4.84E-11	0.794	0.326	-0.053	-0.667
SCO1523	1.16E-09	1.926	0.688	0.353	0.256
SCO1554	1.13E-08	-0.413	0.023	-0.305	1.224

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO1565	3.40E-07	-0.026	-0.086	2.425	0.304
SCO1598	4.88E-09	-0.129	0.058	-0.854	-0.937
SCO1599	3.33E-16	-0.501	0.073	-1.300	-2.244
SCO1615	5.02E-07	0.213	0.157	0.008	0.926
SCO1640	1.81E-04	0.402	0.083	0.482	1.576
SCO1646	1.35E-14	0.962	0.710	2.235	3.665
SCO1648	2.47E-07	1.159	0.607	2.101	1.964
SCO1651	3.00E-04	-0.159	-0.088	-0.559	-0.411
SCO1652	1.34E-06	-0.275	-0.139	-0.420	-0.626
SCO1660	1.64E-07	1.066	0.687	2.335	1.815
SCO1687	8.92E-07	0.342	0.157	0.206	0.763
SCO1695	7.45E-06	0.431	-0.012	0.258	1.340
SCO1724	5.73E-08	0.072	0.061	0.459	0.289
SCO1728	1.27E-05	0.057	0.077	0.018	-0.306
SCO1791	3.63E-12	-0.102	-0.054	0.223	1.394
SCO1800	3.42E-05	0.057	0.120	-0.082	0.917
SCO1829	7.23E-07	-0.012	0.150	-0.229	-0.330
SCO1836	1.92E-09	0.185	-0.140	0.260	0.788
SCO1856	2.21E-04	0.312	0.331	0.844	0.385
SCO1866	2.13E-08	0.926	0.697	1.070	-0.282
SCO1893	4.57E-07	0.422	0.099	0.021	0.631
SCO1906	8.35E-05	-0.095	-0.020	1.372	0.333
SCO1907	9.75E-07	0.352	0.229	1.130	1.469
SCO1942	1.81E-05	0.453	0.285	-0.248	-0.384
SCO1945	1.14E-08	0.174	0.253	-0.035	-0.584
SCO1947	1.25E-14	0.540	0.509	-0.340	-1.262
SCO1958	1.19E-07	0.207	0.461	0.528	-0.913
SCO1968	2.34E-07	0.071	-0.087	1.956	0.610
SCO1970	3.62E-04	-0.043	0.033	0.773	0.346
SCO1993	1.13E-05	0.559	0.047	0.392	0.136
SCO2067	5.30E-06	0.266	0.987	-0.007	0.273
SCO2086	9.91E-05	-0.254	-0.106	-0.471	-0.798
SCO2097	2.03E-09	0.430	0.082	1.276	1.470
SCO2109	1.05E-06	0.269	0.320	0.476	0.046
SCO2115	3.25E-05	0.341	-0.154	-0.355	-0.371
SCO2126	6.03E-05	0.251	0.030	-0.499	0.057
SCO2127	6.52E-06	0.043	0.121	-0.254	-0.368
SCO2148	2.77E-10	-0.583	-0.352	-1.016	-1.555
SCO2149	1.45E-04	-0.062	-0.107	-0.576	-0.954
SCO2150	1.66E-15	-0.340	-0.079	-1.236	-2.101
SCO2151	2.35E-08	-0.497	-0.192	-0.828	-1.244
SCO2155	2.05E-10	-0.318	-0.107	-0.878	-0.940

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO2156	1.46E-07	-0.056	-0.076	-0.669	-1.035
SCO2176	5.16E-08	0.008	0.206	-0.272	-0.338
SCO2180	2.69E-14	0.647	0.203	-0.142	-0.822
SCO2183	9.14E-06	0.805	0.410	0.056	-0.269
SCO2194	8.25E-08	0.862	0.249	0.226	0.239
SCO2196	4.47E-05	-0.065	0.049	-0.415	-0.585
SCO2250	8.13E-07	0.389	0.096	0.426	0.863
SCO2255	2.80E-04	0.309	0.261	0.047	-0.168
SCO2273	3.84E-04	-0.003	-0.048	-0.324	-0.512
SCO2285	5.21E-06	0.005	-0.023	0.626	-0.421
SCO2286	1.26E-04	-0.091	-0.066	2.601	-0.428
SCO2296	9.20E-06	0.122	0.076	0.644	0.341
SCO2306	2.39E-07	-0.399	-0.144	-0.711	-0.961
SCO2326	1.08E-07	-0.045	-0.086	-0.151	-0.882
SCO2334	2.55E-04	0.004	0.018	0.032	-0.319
SCO2336	3.15E-05	-0.169	-0.001	-0.240	-0.438
SCO2347	2.26E-04	0.371	0.173	0.587	0.888
SCO2350	3.84E-04	-0.240	-0.188	-0.490	-0.524
SCO2358	1.32E-12	1.617	1.569	1.240	0.421
SCO2383	7.45E-06	0.145	0.021	0.519	-0.495
SCO2404	1.43E-10	1.107	0.558	2.419	1.745
SCO2434	1.80E-08	-0.320	-0.208	-0.222	-0.877
SCO2435	4.11E-04	0.371	0.248	0.610	0.557
SCO2505	1.16E-12	-0.180	0.014	-0.247	3.069
SCO2519	6.58E-12	-0.010	0.001	-0.063	1.529
SCO2532	4.33E-05	0.127	0.051	0.234	0.759
SCO2563	3.03E-07	-0.515	0.154	-0.857	-1.285
SCO2591	3.62E-07	0.380	0.140	0.230	-0.323
SCO2593	9.42E-05	0.147	0.033	-0.753	-0.226
SCO2595	7.67E-07	-0.149	-0.096	-0.435	-1.037
SCO2597	3.59E-10	-0.542	0.130	-1.066	-1.155
SCO2618	1.87E-07	-0.630	-0.536	-0.864	-1.545
SCO2619	7.40E-09	0.932	0.638	0.452	-0.215
SCO2620	2.86E-10	-0.829	-0.455	-0.924	-1.837
SCO2621	1.76E-04	-0.097	0.094	-0.236	-0.543
SCO2646	3.29E-04	-0.218	-0.230	-0.426	-0.467
SCO2650	3.41E-09	-0.146	-0.062	0.029	0.721
SCO2661	9.44E-07	0.013	-0.046	0.168	-0.338
SCO2687	5.80E-06	-0.216	0.076	-1.000	-2.082
SCO2716	1.52E-07	-0.528	-0.369	-0.469	-1.124
SCO2736	8.48E-05	0.491	0.214	-0.603	-0.528
SCO2780	8.07E-09	0.850	1.100	0.394	-0.069

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO2782	1.22E-05	3.452	3.096	2.223	0.940
SCO2783	4.45E-06	4.341	3.650	3.248	2.113
SCO2787	1.23E-06	0.255	0.149	0.392	0.036
SCO2837	4.12E-06	0.298	0.040	-0.078	-0.383
SCO2851	7.35E-06	0.327	0.212	0.139	-0.601
SCO2852	1.02E-08	-0.100	-0.109	-0.301	0.727
SCO2873	2.78E-04	0.189	-0.098	0.157	0.926
SCO2879	1.35E-04	0.009	-0.017	0.051	0.434
SCO2888	4.81E-10	0.083	0.114	-0.332	-0.320
SCO2898	6.38E-12	0.512	0.290	0.407	-0.384
SCO2899	2.87E-07	0.228	-0.101	0.177	0.472
SCO2911	6.59E-05	0.744	-0.696	0.496	-0.278
SCO2913	4.00E-06	0.361	-0.242	0.017	-0.043
SCO2916	6.86E-09	-0.215	-0.110	-0.531	-1.673
SCO2920	2.65E-06	0.537	0.017	1.678	1.328
SCO2923	3.88E-05	0.038	0.092	1.208	0.029
SCO2931	1.79E-06	0.091	0.132	0.186	-0.223
SCO2958	4.84E-10	0.277	0.163	0.642	0.821
SCO2990	1.47E-11	0.145	0.096	0.340	0.804
SCO3024	8.48E-05	-0.282	-0.155	-0.298	-0.504
SCO3029	1.14E-04	-0.469	-0.321	-0.603	-0.615
SCO3032	2.84E-05	0.506	0.305	1.035	1.096
SCO3048	7.54E-07	0.169	0.117	-0.145	-0.398
SCO3049	1.59E-05	-0.154	-0.037	-0.188	-0.626
SCO3069	3.15E-05	0.650	0.152	0.794	-0.113
SCO3092	3.55E-10	0.340	-0.037	-0.958	-0.211
SCO3098	5.10E-05	0.047	-0.042	0.188	0.829
SCO3124	1.03E-05	-0.283	0.053	-0.925	-1.409
SCO3144	2.38E-12	-0.043	0.085	-0.133	-0.940
SCO3187	8.94E-10	-0.424	-0.232	-0.743	-1.447
SCO3209	3.10E-05	-0.184	0.013	-0.301	-0.718
SCO3217	3.20E-04	0.003	0.026	0.690	0.540
SCO3252	3.36E-11	0.845	0.400	0.705	2.202
SCO3262	7.32E-13	0.112	0.440	-0.419	-2.701
SCO3293	9.83E-05	0.083	0.070	0.349	0.101
SCO3310	4.38E-07	0.945	0.401	0.015	-0.026
SCO3317	3.93E-05	0.154	0.149	-0.522	0.120
SCO3323	3.88E-08	0.095	0.000	-0.009	2.190
SCO3338	6.50E-07	-0.656	-0.514	-1.055	-1.151
SCO3345	2.94E-05	0.078	-0.049	-0.364	-0.313
SCO3369	9.72E-05	0.187	0.218	-0.082	0.424
SCO3391	8.82E-06	0.584	0.380	0.507	0.168

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO3426	1.91E-09	-0.033	-0.252	-0.167	1.042
SCO3427	7.55E-05	-0.079	0.075	0.129	1.873
SCO3428	2.49E-09	0.782	-0.212	0.636	5.753
SCO3463	2.11E-04	-0.188	-0.255	-0.094	-0.380
SCO3464	6.18E-06	-0.037	-0.179	0.078	0.466
SCO3534	2.42E-04	0.064	0.103	-0.077	-0.001
SCO3553	3.40E-06	0.364	-0.113	0.381	-0.064
SCO3557	3.14E-06	0.221	0.296	0.086	-0.108
SCO3570	7.77E-11	-0.311	-0.085	-0.819	-0.902
SCO3579	1.40E-08	0.481	0.328	1.059	2.977
SCO3583	2.48E-04	-0.348	-0.168	-0.523	-0.548
SCO3594	5.32E-05	0.629	0.140	0.793	0.726
SCO3602	2.57E-08	-0.791	-0.081	-0.473	-0.036
SCO3608	1.98E-04	0.327	0.149	0.526	-0.058
SCO3615	6.03E-09	0.458	0.296	0.030	-0.791
SCO3622	4.21E-04	0.285	0.414	0.169	-0.155
SCO3629	3.80E-10	0.231	-0.040	-1.116	-1.740
SCO3637	2.32E-05	-0.102	-0.005	0.295	-0.394
SCO3651	6.06E-05	-0.120	-0.004	-0.308	-0.381
SCO3663	6.49E-05	0.602	0.198	0.732	1.222
SCO3671	1.13E-09	-0.450	0.446	-0.118	-0.319
SCO3717	1.99E-06	-0.108	0.065	-0.442	-0.420
SCO3724	6.02E-06	-0.269	-0.247	-0.461	-0.789
SCO3731	2.47E-07	-0.436	0.065	-0.589	-0.228
SCO3763	1.01E-04	0.287	0.120	0.077	-0.184
SCO3765	1.60E-05	-0.065	-0.095	-0.107	1.005
SCO3800	3.39E-10	0.150	0.207	-1.396	-0.379
SCO3811	7.08E-10	1.169	0.675	0.000	-1.426
SCO3822	8.93E-06	0.413	0.019	-0.171	0.521
SCO3858	4.18E-08	-0.392	-0.370	-0.598	-1.143
SCO3899	2.62E-04	-0.094	0.048	-0.528	-0.565
SCO3902	1.23E-04	-0.708	-0.550	-0.675	-1.047
SCO3906	4.81E-06	-0.201	-0.199	-1.238	-0.876
SCO3930	4.34E-05	0.276	0.085	0.713	0.662
SCO3946	4.90E-06	0.577	0.418	-0.408	0.892
SCO3970	3.23E-10	-0.302	-0.221	-0.600	-0.593
SCO4015	1.42E-07	0.283	0.128	0.434	0.509
SCO4024	7.91E-06	0.081	0.266	0.620	0.282
SCO4049	8.32E-05	1.099	1.288	0.492	0.473
SCO4050	9.37E-07	1.909	1.865	0.527	0.329
SCO4067	8.87E-05	1.255	0.904	0.731	0.874
SCO4094	7.72E-05	-0.100	-0.177	0.192	0.398

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO4096	3.10E-04	0.063	-0.079	0.102	0.307
SCO4104	1.26E-10	0.303	0.199	0.131	-0.584
SCO4139	2.76E-05	0.467	-0.153	2.694	0.804
SCO4141	8.03E-05	0.180	-0.088	1.186	-0.120
SCO4142	6.86E-11	1.007	0.176	3.671	-0.003
SCO4152	4.41E-06	0.463	0.040	1.820	0.415
SCO4207	8.17E-07	0.199	0.092	0.187	1.057
SCO4229	4.53E-04	0.316	-0.214	2.068	0.478
SCO4232	6.24E-09	0.559	0.348	0.399	1.325
SCO4242	5.98E-05	0.232	0.012	0.824	-0.627
SCO4252	1.54E-11	1.505	-0.900	2.245	-1.046
SCO4253	2.76E-05	0.266	-0.092	0.718	0.022
SCO4262	2.30E-05	2.748	1.607	3.824	1.066
SCO4287	7.18E-08	-0.094	-0.033	0.086	1.155
SCO4295	3.77E-07	0.902	0.516	1.889	2.128
SCO4337	1.18E-07	-0.315	-0.278	-0.828	-0.972
SCO4340	6.21E-09	0.159	-0.146	0.202	1.135
SCO4374	4.12E-06	-0.720	-0.550	-0.911	-1.675
SCO4378	1.11E-04	-0.826	-0.691	-0.771	-1.501
SCO4393	3.33E-16	0.539	0.451	0.345	-1.638
SCO4396	1.59E-05	0.132	-0.202	0.318	0.011
SCO4437	1.95E-04	0.134	-0.046	-0.478	0.280
SCO4443	3.00E-06	0.147	-0.009	0.061	1.112
SCO4474	3.31E-04	0.235	0.127	-0.779	-0.044
SCO4498	1.55E-04	0.160	-0.207	0.071	-0.269
SCO4509	9.28E-06	0.850	0.510	0.617	0.151
SCO4516	7.55E-06	0.505	0.208	0.993	1.619
SCO4561	5.99E-05	-0.165	-0.234	-0.238	0.335
SCO4613	4.21E-09	-0.700	-0.117	-0.452	-1.299
SCO4614	5.24E-10	-0.233	0.141	-0.510	-1.002
SCO4646	1.34E-04	-1.171	-0.075	-0.610	-0.763
SCO4647	4.20E-04	-0.701	-0.014	-0.289	-0.026
SCO4648	1.33E-11	-0.215	0.202	-1.165	-1.163
SCO4653	8.25E-08	-0.496	-0.117	-0.768	-1.379
SCO4655	1.16E-08	-0.383	-0.179	-1.015	-1.270
SCO4659	4.16E-04	-0.434	-0.120	-1.003	-0.961
SCO4661	4.23E-04	-0.229	-0.153	-0.592	-0.364
SCO4662	4.09E-06	0.108	-0.140	-0.726	-0.725
SCO4701	3.00E-08	-0.339	-0.155	-1.051	-1.257
SCO4702	8.88E-16	-0.281	0.051	-1.426	-2.133
SCO4703	2.97E-04	-0.073	-0.036	-0.456	-0.954
SCO4704	1.17E-05	-0.302	-0.174	-0.945	-1.537

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO4705	1.71E-07	-0.532	-0.326	-1.062	-1.200
SCO4706	2.05E-04	-0.517	-0.126	-1.507	-2.562
SCO4707	1.18E-12	-0.239	0.105	-1.364	-1.966
SCO4709	9.20E-10	-0.190	-0.013	-1.306	-1.293
SCO4710	6.98E-10	-0.175	0.064	-1.220	-2.053
SCO4711	5.44E-15	-0.442	-0.058	-1.530	-1.800
SCO4712	1.25E-10	-0.419	-0.079	-1.383	-1.915
SCO4713	7.65E-08	-0.380	-0.134	-1.469	-1.969
SCO4714	7.55E-06	-0.248	-0.141	-0.905	-1.470
SCO4715	7.08E-06	-0.605	-0.285	-0.975	-1.131
SCO4716	1.62E-06	-0.457	-0.207	-1.056	-1.478
SCO4717	7.41E-05	-0.509	-0.249	-1.093	-1.288
SCO4718	1.20E-04	-0.133	-0.112	-0.648	-0.530
SCO4719	1.09E-07	-0.494	-0.168	-1.102	-1.255
SCO4720	2.85E-04	-0.474	-0.332	-1.080	-1.206
SCO4722	4.03E-04	-0.691	-0.226	-0.867	-1.156
SCO4725	6.25E-10	-0.587	-0.156	-1.249	-2.348
SCO4726	1.17E-14	-0.439	0.038	-1.304	-2.503
SCO4727	1.63E-10	-0.118	0.182	-1.329	-1.661
SCO4728	6.50E-13	-0.295	-0.078	-1.212	-1.524
SCO4730	4.30E-05	-0.068	-0.022	-0.802	-0.915
SCO4735	1.21E-07	-0.520	-0.055	-1.159	-1.189
SCO4770	1.91E-09	-0.135	0.023	-0.567	-0.837
SCO4783	2.63E-09	0.917	0.736	0.532	-0.358
SCO4788	1.34E-04	0.518	0.343	0.562	0.060
SCO4806	5.24E-06	0.581	-0.007	0.898	0.472
SCO4808	1.58E-06	0.213	-0.246	-0.335	-0.487
SCO4827	8.55E-10	0.936	0.802	0.067	0.450
SCO4838	4.54E-11	0.308	0.011	0.263	0.914
SCO4857	1.97E-06	-0.701	-0.302	-0.875	-1.658
SCO4875	3.04E-05	-0.401	-0.231	1.128	1.227
SCO4878	3.25E-04	-0.043	0.020	0.792	0.144
SCO4879	5.76E-05	0.118	0.142	1.053	0.374
SCO4881	1.35E-04	0.011	0.098	0.960	-0.312
SCO4888	2.85E-06	-0.161	-0.124	-0.452	-0.604
SCO4905	2.02E-04	0.284	0.298	0.296	0.042
SCO4915	1.92E-04	0.319	0.219	0.617	0.468
SCO4934	8.31E-06	0.206	-0.030	-0.668	0.422
SCO4944	3.36E-04	-0.188	0.015	-0.220	-0.393
SCO5010	3.93E-05	-0.048	-0.117	0.502	0.560
SCO5014	6.85E-09	-0.105	0.050	0.900	0.229
SCO5016	1.33E-04	0.359	0.249	0.411	0.101

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO5029	1.43E-13	-0.532	-0.063	-0.441	0.748
SCO5049	1.34E-05	-0.803	-0.680	-1.275	-1.363
SCO5103	1.80E-07	0.055	0.183	0.676	1.204
SCO5112	4.46E-06	-0.129	0.213	-0.303	-0.519
SCO5113	1.55E-09	0.106	0.273	-0.421	-0.557
SCO5122	2.15E-07	0.280	0.159	0.819	1.251
SCO5124	9.31E-08	0.346	-0.021	0.745	0.618
SCO5125	4.52E-04	0.395	0.278	0.731	0.402
SCO5140	1.22E-05	0.004	0.072	-0.175	-0.723
SCO5141	6.45E-08	0.232	-0.080	0.333	0.911
SCO5147	7.85E-07	0.784	0.560	0.099	1.648
SCO5165	1.53E-08	0.063	-0.085	-0.057	-0.442
SCO5178	7.71E-06	0.437	-0.289	0.001	-0.857
SCO5196	6.48E-08	0.134	0.091	0.013	0.874
SCO5205	4.86E-05	-0.363	-0.357	-0.590	-1.060
SCO5225	3.60E-04	0.424	0.560	0.482	-0.395
SCO5231	1.45E-04	-0.002	-0.025	0.045	0.377
SCO5237	4.81E-11	0.443	0.200	0.218	0.633
SCO5262	1.55E-04	0.123	-0.174	0.387	0.669
SCO5281	2.66E-15	0.453	0.009	-0.427	-0.961
SCO5301	4.66E-05	-0.231	-0.069	-0.572	-0.827
SCO5355	2.63E-09	0.206	-0.134	-0.758	-0.852
SCO5359	1.03E-13	-0.055	0.282	-0.986	-1.086
SCO5373	1.50E-05	-0.223	-0.072	-0.699	-0.267
SCO5382	3.59E-04	-0.288	-0.161	-0.411	-0.432
SCO5383	1.30E-05	0.102	0.117	0.185	1.197
SCO5436	1.11E-07	0.390	0.376	0.325	-0.349
SCO5453	1.94E-08	-0.004	-0.017	-0.316	1.563
SCO5467	3.11E-12	0.091	-0.034	0.112	-1.182
SCO5472	2.39E-06	0.143	0.111	0.790	0.196
SCO5520	1.01E-04	0.795	0.599	0.095	-0.406
SCO5545	1.21E-04	-0.586	0.606	-0.172	0.046
SCO5546	6.59E-05	-0.240	0.092	-0.489	-0.700
SCO5547	2.06E-05	0.090	-0.037	-0.458	-0.471
SCO5551	4.80E-11	-0.440	-0.256	-0.704	-1.827
SCO5556	9.03E-07	-0.288	0.153	-1.161	-0.632
SCO5578	2.47E-07	0.619	0.381	-1.129	-1.888
SCO5590	1.30E-11	0.577	0.432	-0.077	1.598
SCO5591	1.22E-15	-0.882	-0.122	-1.589	-1.879
SCO5592	1.12E-07	-0.761	-0.005	-0.892	-1.116
SCO5595	1.03E-05	-0.189	0.257	-0.772	-0.689
SCO5597	2.72E-04	-0.399	-0.153	-0.164	0.482

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO5624	2.96E-08	-0.217	0.032	-1.046	-0.705
SCO5633	2.28E-10	0.192	0.227	0.263	1.433
SCO5655	2.63E-10	2.278	1.977	0.037	1.095
SCO5656	9.30E-07	1.471	1.620	0.050	0.747
SCO5657	2.50E-08	1.242	1.248	0.131	0.647
SCO5670	2.73E-08	0.629	0.371	0.302	-0.607
SCO5698	7.57E-05	-0.304	-0.319	0.088	-0.115
SCO5724	1.18E-10	-0.063	-0.017	0.706	0.854
SCO5725	7.77E-10	0.221	-0.007	0.770	1.001
SCO5729	2.49E-04	-0.097	-0.123	0.172	0.474
SCO5733	1.58E-10	0.317	-0.024	0.759	1.469
SCO5736	4.44E-16	-0.695	0.276	-1.108	-2.131
SCO5749	5.71E-07	-0.036	-0.078	0.465	0.738
SCO5776	4.43E-07	0.286	-0.051	1.343	-0.902
SCO5810	2.81E-12	-0.465	-0.196	-0.131	3.305
SCO5851	6.31E-05	0.072	0.171	-0.173	-0.937
SCO5861	4.43E-08	-0.033	-0.012	-0.046	1.873
SCO5864	4.46E-05	0.063	0.620	-0.243	0.080
SCO5881	1.16E-06	-0.081	0.068	0.112	1.965
SCO5895	3.10E-07	-0.163	0.181	0.154	1.984
SCO5914	2.00E-06	-0.008	0.015	-0.282	-0.439
SCO5982	2.22E-16	-0.057	0.084	0.399	1.838
SCO6131	1.88E-04	-0.626	-0.351	-0.767	-1.072
SCO6132	8.28E-05	0.451	0.697	0.870	0.442
SCO6134	1.94E-05	-0.473	-0.272	-0.540	-0.969
SCO6145	6.80E-05	-0.156	0.001	0.905	-0.229
SCO6224	4.41E-06	-0.307	-0.095	-0.205	0.587
SCO6245	1.44E-07	0.055	-0.017	0.144	0.591
SCO6278	2.69E-05	0.689	0.517	0.490	0.152
SCO6281	4.13E-04	-0.365	-0.378	-0.359	-0.842
SCO6390	2.84E-05	0.007	0.025	-0.183	0.546
SCO6440	2.27E-05	0.176	0.088	0.685	0.445
SCO6451	5.38E-06	0.734	0.502	0.914	-0.021
SCO6463	9.48E-06	-0.710	-0.605	-0.531	-1.144
SCO6469	1.45E-08	0.178	-0.109	0.109	0.857
SCO6510	1.43E-05	0.158	-0.123	0.214	0.901
SCO6557	2.86E-04	0.155	0.056	0.618	0.270
SCO6616	6.14E-05	-0.721	-0.643	-0.620	-1.311
SCO6624	1.90E-05	0.822	0.278	0.419	1.206
SCO6632	2.27E-07	0.513	0.462	0.898	1.350
SCO6633	6.44E-05	1.048	0.920	1.294	0.362
SCO6652	3.47E-05	0.072	0.170	0.288	-0.468

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO6663	4.34E-10	1.102	1.049	-0.481	-1.212
SCO6682	1.64E-05	-0.281	0.184	0.128	2.183
SCO6693	2.23E-05	-0.697	-0.530	-0.617	-1.230
SCO6712	3.38E-11	0.663	0.549	1.145	3.227
SCO6721	2.06E-04	-0.180	-0.194	-0.173	0.187
SCO6761	2.63E-08	0.149	0.215	0.071	1.281
SCO6762	1.34E-14	0.787	0.637	0.855	4.218
SCO6810	8.98E-05	0.074	-0.204	0.092	0.660
SCO6839	1.26E-04	-0.060	-0.031	-0.093	-0.579
SCO6854	6.30E-05	-0.054	0.036	0.062	0.570
SCO6855	1.18E-08	-0.287	-0.096	-0.414	-0.852
SCO6905	3.83E-07	0.121	-0.056	0.100	0.604
SCO6960	1.06E-05	-0.476	-0.260	-0.567	-0.869
SCO6969	5.62E-07	0.131	-0.022	0.354	1.316
SCO7087	5.13E-09	0.239	-0.125	0.347	0.751
SCO7124	2.07E-05	0.652	0.255	0.277	-0.333
SCO7142	2.31E-07	0.404	0.507	-0.547	-0.916
SCO7149	1.16E-10	0.333	0.457	0.093	-1.557
SCO7177	1.06E-06	-0.347	-0.310	-0.292	-0.974
SCO7211	1.60E-07	0.105	-0.051	0.508	0.451
SCO7276	3.87E-04	0.342	0.277	0.683	0.187
SCO7285	8.21E-05	-0.520	-0.423	-0.579	-0.900
SCO7375	7.36E-06	-0.229	0.078	0.205	0.826
SCO7407	4.30E-04	2.583	1.001	1.493	0.019
SCO7425	1.66E-09	-0.330	-0.271	-0.764	-0.842
SCO7464	1.68E-08	0.250	0.016	-0.165	-0.589
SCO7516	4.98E-04	0.648	0.299	0.527	0.163
SCO7517	4.89E-04	-0.152	-0.070	-0.350	-0.248
SCO7526	9.03E-06	-0.077	-0.116	-0.218	-0.477
SCO7537	6.74E-05	-0.079	-0.001	0.172	-0.066
SCO7538	2.49E-06	-0.163	-0.066	-0.168	0.514
SCO7548	1.30E-04	-0.244	-0.408	0.105	0.099
SCO7557	1.91E-06	-0.274	0.005	-0.525	-0.959
SCO7575	2.04E-09	-0.512	-0.430	-0.837	-1.630
SCO7630	3.57E-05	0.179	0.230	0.936	0.106
SCO7657	7.33E-06	0.548	-0.080	-0.104	0.733
SCO7672	4.78E-05	-0.007	0.019	0.341	0.375
SCO7677	1.58E-06	0.132	0.008	0.006	1.037
SCO7691	5.40E-06	-0.115	-0.145	-0.344	0.550
SCO7748	2.35E-06	-0.340	-0.467	0.024	0.600
SCO7750	4.02E-08	-0.292	-0.124	-0.562	-0.885

Gène	Valeur p	Log ratio t5	Log ratio t6.5	Log ratio t10	Log ratio t15
SCO7785	8.15E-05	0.209	0.072	0.159	0.718
SCO7839	1.05E-05	0.351	0.153	0.798	0.397
SCO7840	8.49E-06	0.288	0.126	0.670	0.097
SCP1.258c	1.00E-04	-0.658	-0.513	-0.913	-1.187
SCP1.77c	3.78E-05	0.107	-0.053	0.312	0.525

Références

Anné, J., Van Mellaert, L. 1993. Minireview, *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol. Letters* 114: 121-128

Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W., Baker, E.N. 1989. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 A resolution. *J. Mol. Biol.* 209(4):711-734

Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rumball, S.V., Baker, E.N. 1990. Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. *Nature* 344(6268):784-787

Appelmelk, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., de Boer, H.A., MacLaren, D.M., de Graaff, J., Nuijens, J.H. 1994. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* 62(6):2628-2632

Archer, D.B. 1994. Enzyme production by recombinant *Aspergillus*. *Bioprocess Technol.* 19:373-93.

Arnold, R.R., Brewer, M., Gauthier, J.J. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28(3):893-898

Aslund, F., Beckwith, J. 1999. The thioredoxin superfamily: Redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181:1375-1379

Baldassarre, H., Keefer, C.L., Wang, B., Lazaris, A., Karatzas, C.N. 2003. Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum-pick-up. *Cloning Stem Cells* 5:279-285

Baldassarre, H., Wang, B., Keefer, C.L., Lazaris, A., Karatzas, C.N. 2004. State of the art in the production of transgenic goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16(4):465-470

Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin. Biotech.* 10:411-421

Barrett, A.J., Rawlings, N.D. 1991. Types families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.* 19:707-715

Belizi, S., Shepelev, A.P., Klimova, I.A., Nazarova, I.N., Pushkina, N.V. 1999. Modified method of isolation of lactoferrin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 35(4):426-430

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121:130-136

Berka, R.M., Ward, M., Wilson, L.J., Hayenga, K.J., Kodama, K.H., Carlomagno, L.P., Thompson, S.A. 1990. Molecular cloning and deletion of the aspergillopepsine A gene from *Aspergillus awamori*. *Gene* 86(2):153-162

Betton, J.-M. 2003. Rapid translation system (RTS): A promising alternative for recombinant protein production. *Curr. Protein and Peptide Sci.* 4:73-80

Betton, J.-M., Hofnung, M. 1994. In vivo assembly of active maltose binding protein from independently exported protein fragments. *EMBO J.* 13(5):1226-1234

Bezault, J., Bhimani, J., Wiprovnick, P., Furmanski, P. 1994. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* 54:2310-2312

Binnie, C., Cossar, J.D., Stewart, I.H. 1997. Review, Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol.* 15(8):315-20.

Birgens, H. 1985. Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia. *Scand. J. Haematol.* 34(4):326-331

Birgens, H.S., Hansen, N.E., Karle, H., Kristensen, L.O. 1983. Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br. J. Haematol.* 54(3):383-391

Birgens, H.S., Karle, H., Hansen, N.E., Kristensen, L.O. 1984. Lactoferrin receptors in normal and leukemic human blood cells. *Scand. J. Haematol.* 33(3):275-280

Bos, C.J., Debets, A.J.M., Swart, K., Huybers, A., Kobus, G., Slakhorst, S.M. 1988. Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*14(5):437-443

Brady, C.P., Shimp, R.L., Miles, A.P., Whitmore, M., Stowers, A.W. 2001. High-level production and purification of P30P2MSP1$_{19}$, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 23:468-475

Bralley, P., Jones, G.H. 2003. Overexpression of the polynucleotide phosphorylase gene (pnp) of *Streptomyces antibioticus* affects mRNA stability and poly(A) tail length but not ppGpp levels. *Microbiol.* 149:2173-2182

Braun, P., LaBaer, J. 2003. High throughput protein production for functional proteomics. *TRENDS Biotechnol.* 21(9):383-388

Cao, G.J., Pogliano, J., Sarkar, N. 1996. Identification of the coding region for a second poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11580-11585

Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., Cregg, J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotech.* 13:329-332

Cho, H.S., Pelton, J.G., Wang, W., Yokota, H., Wemmer, D.E. 2002. Cell-Free translation systems. Spirin, A.S., Ed., Springer, Berlin, pp.227-233

Cho, Y.H., Kim, E.J., Chung, H.J., Choi, J.H., Chater, K.F., Ahn, B.E., Shin, J.H., Roe, J.H. 2003. The *pqrAB* operon is responsible for paraquat resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185(23):6756-6763

Conneely, O.M. 2001. Review, Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J. Am. Coll. Nutr.* 20(5): 389S-395S

Cramer, C.L., Boothe, J.G., Oishi, K.K. 1999. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118

Cregg, J.M., Cereghino, L., Shi, J., Higgins, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotech.* 16:23-52

Cregg, J.M., Madden, K.R. 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* 29:33-41

De Bernardez, E.C., Schwarz, E., Rudolph, R. 1999. Inhibition of aggrapation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* 309:217-236

DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680-686

Eckhardt, T., Strickler, J., Gorniak, L., Burnett, W.V., Fare, L.R. 1987. Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted β-galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 169(9):4249-4256

Ellis, R.J. 2001. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* 26(10):597-604

Ellison, R.T., Giehl, T.J. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88:1080-1091

Engels, J.W., Koller, K.-P. 1992. Transgenesis; Gene expression and secretion of eukaryotic proteins in *Streptomyces*. (Murray, J.A.H.) *John Wiley and Sons*, New York, pp.32-53

Fernholz, E., Zaiss, K., Besir, H., Mutter, W. 2002. Cell-Free translation systems. Spirin, A.S., Ed., Springer, Berlin, pp.175-179

Fornwald, J.A., Donovan, M.J., Gerber, R., Keller, J., Taylor, D.P., Arcuri, E.J., Brawner, M.E. 1993. Soluble forms of the human T cell receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans*. *Biotech.* 11(9):1031-1036

Forrer, P., Jaussi, R. 1998. High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* by fusion to the bacteriophage lambda head protein D. *Gene* 224:45-52

Fransson, G.B., Lonnerdal, B. 1980. Iron in human milk. *J. Pediatr.* 96:380-384

Gems, D., Johnstone, I.L., Clutterbuck, A.J. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98(1):61-67

Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:13-19

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:7380-7384

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

Hansen, M., Chen, L., Fejzo, M., Belasco, J. 1994. The *ompA* 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 12:707-716

He, J., Furmanski, P. 1995. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373:721-724

Hedge, P.S., White, I.R., Debouck, C. 2003. Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:647-651

Hoffer, S.M., Tommassen, J. 2001. The phosphate-binding protein of *Escherichia coli* is not essential for P(i)-regulated expression of the *pho* regulon. *J. Bacteriol.* 183(19):5768-5771

Hopwood, D.A., Kieser, H.M., Kieser, T. 1993. *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Physiology, biochemistry and molecular genetics; The chromosome map of *Streptomyces coelicolor* A3(2). (Sonenshein, A.L., Hoch, Hond, J.A., Eds, R.) *Am. Soc. Microbiol.* Washington, pp.497-504

Hopwood, J., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, J., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. *The John Innes Foundation*

Huang, J., Lih, C.-J., Pan, K.-H., Cohen, S.N. 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* unsing DNA microarrays. *Genes Dev.* 15:3183-3192

Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D., Morosoli, R. 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 17(2):367-377

Hutchens, T.W., Henry, J.F., Yip, T.T., Hachey, D.L., Schanler, R.J., Motil, K.J., Garza, C. 1991. Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants: evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr. Res.* 29:243-250

Ishii, K., Takamura, N., Ikehara, T., Nishio, Y., Nagai, H., Hara, S., Kawafune, T., Sumino, Y., Yamamuro, W. 2000. Effect of short-term lactoferrin for patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 32:444A

Iyer, S., Lonnerdal, B. 1993. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47(4):232-241

Jameson, G.B., Anderson, B.F., Norris, G.E., Thomas, D.H., Baker, E.N. 1998. Structure of human apolactoferrin at 2.0 A resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54:1319-1335

Jeenes, D.J., MacKenzie, D.A., Roberts, I.N., Archer, D.B. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9:327-367

Kansoh, A.L., Nagieb, Z.A. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85(2):103-114

Kato-Maeda, M., Gao, Q., Small, P.M. 2001. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol.* 3(11):713-719

Kawaguchi, S., Hayashi, T., Masano, H., Okuyama, K., Suzuki, T., Kawase, K. 1989. Effect of lactoferrin-enriched infant formula on low birth weight infants. *Shuusankiigaku* 19:125-130

Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. 2001. Lactoferrin and its biological functions. *Biochem. (Moscow)* 66(1):5-13

Kieser, T., Hopwood, D.A. 1991. Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement.. *Methods Enzymol.* 204:430-458

Kinashi, H., Murayama, M., Matsushita, H., Nimi, D. 1993. Structural analysis of the giant linear plasmid SCP1 in various *Streptomyces coelicolor* strains. *J. Gen. Microbiol.* 139:1261-1269

Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van der Broek, S. Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., *et al.* 1991. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biotechnol.* 9(9):844-847

Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Bijnens, A.P., Joris, B., Anné, J. 1996. Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *Streptomyces lividans* can lead to decreased mRNA stability and protein yield. *Mol. Gen. Genet.* 250:223-229

LaVallie. E.R., McRoy, J.M. 1995. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli. Curr. Opin. Biotechnol.* 6:501-506

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

Levay, P.F., Viljoen, M. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80:252-267

Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., O Cuiv, P., Crosa, J.H., O'Connell, M. 2001. Genetic organization of the region enoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti. J. Bacteriol.* 183(8):2576-2585

Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., Endo, Y. 2000. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(2):559-564

Masson, P.L., Heremans, J.F. 1971. Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol. B.*39(1):119-129

Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W.L., Montreuil, J., Spik, G. 1989. Expression of human lactotransferrin receptors in phyto-hemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by anti-ligand affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 179:481-487

Mazurier, J., Spik, G. 1980. Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 629(2):399-408

Metz-Boutigue, M.H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., Jolles, P. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145(3):659-676

Miyazawa, K., Mantel, C. Lu, L., Morrison, D.C., Broxmeyer, H.E. 1991. Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions: effect on lactoferrin binding to monocyte/ macrophage-differentiated HL-60 cells. *J. Immunol.* 146:723-729

Moguilevsky, N., Retegui, L.A., Masson, P.L. 1985. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.* 229(2):353-359

Monchois, V., Vincentelli, R., Deregnaucourt, C., Abergel, C., Claverie, J.-M. 2002. Cell-Free translation systems. Spirin, A.S., Ed., Springer, Berlin, pp.197-202

Moss, M.O. 1989. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 69S-81S

Murasugi, A., Asami, Y., Mera-Kikuchi, Y. 2001. Production of recombinant human bile salt-stimulated lipase in *Pichia pastoris. Protein Expr. Purif.* 23:282-288

Nakamura, I., Watanabe, A., Tsunemitsu, H., Lee, N-Y., Kumura, H., Shimazaki, K-I., Yagi, Y. 2001. Production of recombinant bovine lactoferrin N-Lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Expr. Purif.* 21: 424-431

Nemetz, C., Wessner, S., Krupka, S., Watzele, M., Mutter, W. 2002. Cell-Free translation systems. Spirin, A.S., Ed., Springer, Berlin, pp.157-163

Nuijens, J.H., van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E.J., Hartevelt, P.P., de Boer, H.A., van Veen, H.A., Pieper, F.R. 1997. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 272(13): 8802-8807

Nuijens, J.H., van Berkel, P.H.C., Schanbacher, F.L. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1:285-295

Pahud, J., Hilpert, H. 1976. Affinity chromatography of lactoferrin on immobilized ferritin. *Protides Biol. Fluids.: Proc. Colloquium* 23:571-574

Penco, S., Pastorino, S., Bianchi, S.G., Garre, C. 1995. Lactoferrin down-modulates the activity of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor promoter in interleukin-1 beta-stimulated cells. *J. Biol. Chem.* 270-12263-12668

Prescott, Harley, Klein. 1995. Microbiologie. *DeBoeck Université*, Bruxelles, pp.506-517

Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemanse, M.A., Pouwels, P.H., van den Hondel, C.A.M.J.J. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56(1):117-124

Qiu, J., Swartz, J.R., Goergiou, G. 1998. Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4891-4896

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

Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, MC, Coddeville, B., Spik, G. 1997. Characterization of human lactoferrine produced in the baculovirus expression system. *Protein Expr. Purif.* 9, 203-210

Salovuori, I., Mararow, M., Rauvala, H., Knowles, J., Kaariainen, L. 1987. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotech.* 5:152-156

Schmidt, M., Hoffman, D.R. 2002. Expression systems for production recombinant allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128:264-270

Schneider, E.L., Thomas, J.G., Bassuk, J.A., Sage, E.H., Baneyx, F. 1997. Manipulating the aggregation and oxydation of human SPARC in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 15:581-585

Shareck, F., Roy, C., Yaguchi, M., Morosoli, R., Kluepfel, D. 1991. Nucleotide sequence of the xylanase A, B and C genes of *Streptomyces lividans*. *Gene* 107:75-84

Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegenhart, J.F.G. 1982. Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 121(2):413-419

Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., Alakhov, Y.B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242:1162-1164

Sreekrishna, K., Tschopp, J.F., Thill, G.P., Brierly, R.A., Barr, K.A. 1998. Expression of a human serum albumin in *Pichia pastoris*. US Patent, 5707828

Stemmer, W.P., Crameri, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., Heyneker, H.L. 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligonucleotides. *Gene* 164(1): 49-53

Strickler, J.E., Berka, T.R., Gorniak, J., Fornwald, J., Keys, R., Rowland, J.J., Rosenberg, M., Taylor, D.P. 1992. Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 267(5):3236-3241

Strohl, W.R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20(5):961-974

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185:60-89

Swartz, J.R. 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotech.* 12:195-201

Tabuchi, M., Hino, M., Shinohara, Y., Baba, Y. 2002. Cell-free protein synthesis on a microchip. *Proteomics* 2:430-435

Tallat, A.M., Howard, S.T., Hale IV, W., Lyons, R., Garner, H., Johnston, S.A. 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 30(20):155-160

Tanaka, T., Nakamura, I., Lee, N.-Y., Kumura, H., Shimazaki, K.I. 2003. Expression of bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe by recombinant baculovirus and its antimicrobial activity against *Prototheca zopfii*. *Biochem. Cell Biol.* 81:349-354

Théberge, M., Lacaze, P., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase form *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:815-820

Thierry, A., Maillard, M.-B. 2002. Production of cheese flavour compounds derived form amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait* 82:17-32

Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74:4137-4142

Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H. 2002. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 80:109-112

Tsuda, H., Sekine, K., Takasuka, N., Toriyama-Baba, H., Iigo, M. 2000. **A**. Mini-review, Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administrated bovine lactoferrin in animals. *BioFactors* 12: 83-88

Tsuda, H., Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Han, B.S., Moore, M.A. 2000. **B**. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. *Mutat. Res.* 462:227-233

Unkles, S.E., Campbell, E.I., Carrez, D., Grieve, C., Contreras, R., Fiers, W., van den Hondel, C.A.M.J.J., Kinghorn, J.R. 1989. Transformation of *Aspergillus niger* with homologous nitrate reductase gene. *Gene* 78(1):157-166

van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E.J., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F.R., de Boer, H.A., Nuijens, J.H. 1995. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysosyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem. J.* 312: 107-114

van Berkel, P.H., van Veen, H.A., Geerts, M.E., de Boer, H.A., Nuijens, J.H. 1996. Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin: a study with glycosylation-site mutants. *Biochem. J.* 319:117-122

van Berkel, P.H.C., Welling, M.M., Geerts, M., van Veen, H.A., Ravensgergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E.K.J., Pieper, F., Nuijens, J.H., Nibbering, P.H. 2002. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotech.* 20: 484-487

van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J., van Gorcom, R.F.M. 1992. Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus. Antonie van Leeuwenhoek* 61(2):153-160

van Snick, J.L., Masson, P.L. 1976. The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.* 144(6):1568-1580

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

Walmsley, A.M., Arntzen, C.J. 2003. Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(2):145-150

Wan, E.W., Baneyx, F. 1998. TolAIII co-overexpression facilitates the recovery of periplasmic recombinant proteins into the growth medium of *Escherichia coli. Protein Express. Purif.* 14:13-22

Wang, Y., Liang, Z.-H., Zhang, Y.-S., Yao, S.-Y., Xu, Y.-T., Tang, Y.-H., Zhu, S.-Q., Cui, D.-F., Feng, Y.-M. 2001. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol. Bioeng.* 73:74-79

Ward, P.P., Chu, H., Zhou, X., Conneely, O.M. 1997. Expression and characterization of recombinant murine lactoferrin. *Gene* 204: 171-176

Weinberg, E.D. 2003. Review, The therapeutic potential of lactoferrin. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12(5): 841-851

Willins, D.A., Ryan, C.W., Platko, J.V., Calvo, J.M. 1991. Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.* 266(17):10768-10774

Wilmut, I., Schuleke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813

Wright, F., Bibb, M.J. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113:55-65

Yi, M., Kaneko, S., Yu, D.Y., Murakami, S. 1997. Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *J. Virol.* 71(8):5997-6002

Zahn, K. 1996. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol.* 178:2926-2933

Zou, S., Magura, C.E., Hurley, W.L. 1992. Heparin-binding properties of lactoferrin and lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 103:889-895

Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail, Service du répertoire toxicologique
http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=4663&nom=METHYL+VIOLOGEN

Compagnie Agilent Technologies
www.agilent.com

Compagnie DMV International
http://www.lfplus.com/s3/34.html

Compagnies Japonaises
http://www.lactoferrin.jp/images/lactoferrin2.jpg
http://www.dmc-lef.com/pic/lactoferrin.jpg

Compagnie Nexia
www.nexiabiotech.com

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
http://www.ensaia.u-nancy.fr/

Photos des différentes conformations de la Lf
http://groningen.bio.ucalgary.ca/~hans/1lfg.gif

Projet Sanger, Université de Surrey, Angleterre
http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/classwise.html

Site de la compagnie Roche
http://www.roche-applied-science.com/sis/proteinexpression/index.jsp

Site de l'Université de Surrey, SBMS
http://www.surrey.ac.uk/SBMS/Fgenomics/Microarrays/html/Downloads.html

Site d'information sur la chimie, organisation intergouvernementale américaine
http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim227f.htm

Université de Californie, San Diego
http://medicine.ucsd.edu/faculty/Wynshaw-Boris/Microarrays/microoverview.html