

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

CATHERINE PENZES

PURIFICATION ET ÉTUDE DE LA PROTÉINE MsiK

DE *Streptomyces lividans*

SEPTEMBRE 1995

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
SOMMAIRE	xi
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	4
1. LES STREPTOMYCÈTES	5
1.1 Généralités	5
1.2 Importance industrielle des streptomycètes	5
1.3 <i>Streptomyces lividans</i>	8
1.4 <i>Streptomyces lividans</i> 10-164	10
2.0 L'HÉMICELLULOSE ET SA STRUCTURE	12
2.1 La cellulose	14
2.2 Les hémicelluloses	14
2.3 La lignine	17
3.0 HISTORIQUE DES ENZYMES HÉMICELLULOLYTIQUES DE <i>S. lividans</i>	17
3.1 Les xylanases	18
3.2 Les cellulases	22
3.3 La β -mannanase et les arabinofuranosidases	22
4.0 LE GÈNE <i>msiK</i> ET LA PROTÉINE MsiK	23
4.1 Caractéristiques des transporteurs ABC ("ATP-binding cassette")	25
4.2 Comparaison de la protéine MsiK avec d'autres transporteurs ABC	30
4.3 Description d'un système de transport énergie-dépendant	34
5.0 SYSTÈMES D'EXPRESSION HÉTÉROLOGUES CHEZ <i>Escherichia coli</i>	39
5.1 Expression chez <i>E. coli</i> utilisant le système promoteur/T7 ARN polymérase	39
5.2 Système de deux plasmides chez <i>E. coli</i> K38	40
5.3 Système d'expression chez <i>E. coli</i> BL21(DE3)	42

6.0 PURIFICATION PROTÉIQUE SUR COLONNE D'AFFINITÉ Ni-NTA	43
OBJECTIFS	46
MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
1. LISTE DES PRODUITS	48
2. SOUCHES BACTÉRIENNES ET VECTEURS	49
2.1 <i>Streptomyces lividans</i>	49
2.1.1 Les souches	49
2.1.2 Les plasmides	49
2.2 <i>Escherichia coli</i>	50
2.2.1 Les souches	50
2.2.2 Les plasmides	50
2.3 Les oligonucléotides	52
3. MILIEUX DE CULTURE	55
3.1 <i>Streptomyces lividans</i>	55
3.1.1 Pression sélective	55
3.1.2 Milieu pour la régénération des protoplastes	55
3.1.3 Milieu pour le dépistage	56
3.1.4 Milieu pour la conservation des clones et la lyophilisation	57
3.1.5 Milieu pour la production d'inoculum	57
3.1.6 Milieu pour la croissance	57
3.2 <i>Escherichia coli</i>	58
3.2.1 Pression sélective	58
3.2.2 Milieu pour la croissance et la sur-expression protéique	58
3.2.3 Milieu pour la détection des transformants	59
3.2.4 Milieu pour la conservation des clones	59
4. CONDITIONS DE CULTURE	59
4.1 <i>Streptomyces lividans</i>	59
4.1.1 Production d'inoculum	59
4.1.2 Préparation de l'extrait cellulaire	60
4.2 <i>Escherichia coli</i>	60
4.2.1 Production d'inoculum	60
5. ISOLEMENT D'ADN PLASMIDIQUE	61
5.1 Extraction d'ADN plasmidique de <i>S. lividans</i>	61
5.2 Micro-extraction d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	62
5.3 Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique	63
5.4 Analyse d'ADN plasmidique	63

5.5 Isolement d'ADN simple brin	64
6. SOUS-CLONAGE D'UN GÈNE CHEZ <i>E. coli</i>	65
6.1 Amplification élective <i>in vitro</i> (PCR)	65
6.2 Ligation	66
7. BACTÉRIES COMPÉTENTES	66
7.1 Protoplastes de <i>S. lividans</i>	66
7.2 <i>E. coli</i>	68
8. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE	69
8.1 <i>S. lividans</i>	69
8.2 <i>E. coli</i>	69
9. EXPRESSION D'UN GÈNE CLONÉ DANS <i>E. coli</i>	70
9.1 Micro-méthode	70
9.1.1 Dérivées d' <i>E. coli</i> K38	70
9.1.2 Dérivées d' <i>E. coli</i> BL21(DE3)	71
9.2 Macro-méthode	71
10. PURIFICATION DES PROTÉINES	72
10.1 Chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA	72
10.1.1 Micro-purification dénaturante des protéines	72
10.1.2 Macro-purification dénaturante des protéines	73
10.1.3 Purification native des protéines	73
10.1.4 Purification des corps d'inclusion	74
10.2 Dosage des protéines	75
10.3 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	75
10.3.1 Méthode automatisée (Phastsystem™)	75
10.3.2 Méthode conventionnelle	76
10.4 Extraction de protéine d'un gel SDS-PAGE	77
11. IMMUNO-DÉTECTION	78
11.1 Production d'anticorps	78
11.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	80
11.3 Transfert de protéines sur membrane de nylon	81
11.4 Immuno-détection des protéines	81
12. DÉTECTION DE LA LIAISON D'ATP	82
13. SÉQUENCAGE DE L'EXTRÉMITÉ N-TERMINALE	83
14. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE	84

14.1 Poids moléculaire	84
14.2 Point isoélectrique	85
RÉSULTATS	86
1. CONSTRUCTIONS GÉNÉTIQUES	87
1.1 Amplification du gène <i>msiK</i> par PCR	87
1.2 Obtention du gène <i>msiK</i> recombinant par clonage	91
2. CLONAGE DES AMPLICONS DANS LES VECTEURS D'EXPRESSION	93
2.1 Construction des plasmides pIAF249 et pIAF249m	93
2.1.1 Transformation d' <i>E. coli</i> K38	95
2.1.2 Transformation d' <i>E. coli</i> BL21(DE3)	95
2.2 Construction des plasmides pIAF49 et pIAF50 et transformation de 10-164 ..	96
3. MISE AU POINT D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION CHEZ <i>E. coli</i>	98
4. MISE AU POINT D'UN SYSTÈME DE PURIFICATION DE LA PROTÉINE MsiK	100
4.1 Mise au point du système de purification dénaturante à grande échelle	100
4.2 Mise au point du système de purification à partir des corps d'inclusion	102
4.3 Purification de la protéine par extraction d'un gel SDS-PAGE 9%	105
5. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTÉINE MsiK	105
6. PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-MsiK	107
7. IMMUNO-DÉTECTION DE LA PROTÉINE MsiK	108
7.1 Chez <i>E. coli</i>	108
7.2 Chez <i>S. lividans</i> 1326	108
8. DÉTECTION DE LA LIAISON D'ATP	111
DISCUSSION	115
CONCLUSIONS	127
REMERCIEMENTS	130
BIBLIOGRAPHIE	132

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a. a.	acide(s) aminé(s)
ABC	“ATP-binding cassette”
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMP	adénosine monophosphate
amp	ampicilline
am ^r	résistance à l'ampicilline
ARNase	ribonucléase
asn	asparagine
asp	acide aspartique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de sérum bovin
CAPS	acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique
cel ^r	n'exprimant pas d'activité cellulosique
CWS	“cell wall skeleton”
°C	degré Celsius
DMSO	diméthylsulfoxyde
D.O.	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent-assay”
FSBA	5'- <i>p</i> -fluorosulfonylbenzoyl adénosine
h	heure(s)
his	histidine
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kan	kanamycine
km ^r	résistance à la kanamycine
kb	kilobase(s)
kDa	kilodalton(s)
M	molarité
μg	microgramme(s)
μL	microlitre(s)
mg	milligramme(s)
min	minute(s)
mL	millilitre(s)
mM	millimolaire(s)
MPL	“monophosphoryl lipid A”
M ^r	masse moléculaire
Ni-NTA	résine de Ni-acide nitrilo-triacétique

nm	nanomètre(s)
NTG	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
PBS	saline tamponnée au phosphate (phosphate-buffered saline)
PCR	amplification élective <i>in vitro</i>
PEG	polyéthylène glycol
pI	point isoélectrique
pmol	picomole(s)
p/v	poids/volume
PVDF	polyvinylidène difluoride
rpm	révolutions par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde(s)
TBE	tampon Tris-borate EDTA
TDM	"trehalose dicorynomycolate"
TE	tampon Tris-EDTA
TES	acide (N-Tris[hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthane-sulfonique
TRIS	Tris(hydroxyméthyl) aminométhane
TSB	bouillon tryptone de soya
tsr ^r	résistance à la thiostreptone
Vh	volt heure
v/v	volume/volume
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
xln ^r	n'exprimant pas d'activité xylanasiq

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Comparaison des caractéristiques phénotypiques du mutant <i>S. lividans</i> 10-164 avec celles de la souche sauvage	13
Tableau 2 :	Groupement phylogénétique des protéines ABC de bactéries de la super-famille de transporteurs ABC selon les récepteurs solubles extra-cytoplasmiques	28
Tableau 3 :	Liste des transporteurs ABC caractérisés chez les procaryotes	31
Tableau 4 :	Les souches bactériennes et les plasmides	52
Tableau 5 :	Les séquences des amorces d'oligonucléotides utilisées pour amplifier le gène <i>msiK</i> par PCR	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Le cycle de vie des streptomycètes	6
Figure 2 :	La carte génétique du vecteur pIJ702	9
Figure 3 :	La structure de la cellulose	15
Figure 4 :	Représentation d'un hétéroxylane avec les sites d'attaque de différents enzymes xylanolytiques.	16
Figure 5 :	Emplacement des gènes <i>xln</i> , <i>cel</i> , <i>manA</i> et <i>abfB</i> sur le chromosome de <i>S. lividans</i> 1326	19
Figure 6 :	Représentation schématisée de l'induction des xylanases de <i>Streptomyces lividans</i>	20
Figure 7 :	La séquence du gène <i>msiK</i> de <i>S. lividans</i>	24
Figure 8 :	Alignement des deux régions hautement conservés chez les transporteurs ABC faisant partie du groupement 1	33
Figure 9 :	Schéma du transport des maltodextrines chez <i>E. coli</i>	35
Figure 10 :	Emplacement théorique de la protéine MsiK chez <i>Streptomyces lividans</i>	38
Figure 11 :	Les cartes génétiques des plasmides (A) pT7-5 et (B) pGP1-2	41
Figure 12 :	Schéma de l'interaction de la queue de polyhistidine et la résine Ni-NTA	44
Figure 13 :	Protocole d'immunisation des lapines pour la production d'anticorps	79
Figure 14 :	La séquence du gène <i>msiK</i>	88
Figure 15 :	Résultat de l'amplification élective <i>in vitro</i> de <i>msiK</i>	90
Figure 16 :	Construction du plasmide pIAF250	92
Figure 17 :	Construction du plasmide pIAF249	94

Figure 18 :	Construction des plasmides pIAF49 et pIAF50	97
Figure 19 :	Comparaison des systèmes d'expression d' <i>E. coli</i> K38 et d' <i>E. coli</i> BL21(DE3)	99
Figure 20 :	Mise au point du système d'expression chez <i>E. coli</i> BL21(DE3)	101
Figure 21 :	Mise au point du système de purification dénaturante	103
Figure 22 :	Mise au point du système de purification de la protéine MsiK à partir de corps d'inclusions produits chez <i>E. coli</i> BL21/pIAF250	104
Figure 23 :	Purification de la protéine MsiK par extraction de la bande d'un gel SDS-PAGE 9%	106
Figure 24 :	Immunodétection à l'aide d'anticorps anti-MsiK de la protéine MsiK purifiée à partir d' <i>E. coli</i> BL21(DE3)	109
Figure 25 :	Détection de la protéine MsiK à partir d'un extrait cellulaire de <i>S. lividans</i> 1326 en milieu M13-xylane	110
Figure 26 :	Détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK tronquée	113
Figure 27 :	Détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK produite chez <i>E. coli</i> BL21/pIAF250	114

SOMMAIRE

Le transport du xylobiose et du cellobiose chez le mutant pléiotropique, *S. lividans* 10-164 est défectueux. Ceci est la conséquence de la mutation au niveau du gène *msiK*. Afin de faciliter la caractérisation de la protéine MsiK, codée par ce gène *msiK*, un système d'expression et de purification a été mis au point chez *Escherichia coli*.

L'objet de cette étude est donc la protéine MsiK de *S. lividans*. La purification des protéines mutantes et fonctionnelles a été facilitée en amplifiant respectivement, le gène *msiK* de la souche 10-164 et du plasmide pIAF48, par amplification élective *in vitro* (PCR) dans le but d'insérer une queue de six résidus histidine à l'extrémité 5' des gènes. Les amplicons ont été clonés dans les vecteurs d'expression pT7-5 et pIJ702 afin de permettre une sur-expression des gènes codant les protéines chez les souches *E. coli* BL21(DE3) et *S. lividans* 10-164, respectivement. Les protéines exprimées chez *E. coli* ont ensuite été purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine Ni-NTA.

L'expression de la protéine recombinante chez *S. lividans* 10-164 nous a permis de vérifier sur milieu RBB-xylane, l'effet de la queue de polyhistidine sur la protéine recombinante MsiK quant à son activité. Des zones d'éclaircissements (hydrolyse du xylane par les xylanases sécrétées dans le milieu) semblables à celle produite par la souche sauvage sont présentes autour des clones positifs. Ceci démontre donc que la queue de polyhistidine n'affecte pas l'activité de

la protéine *in vivo*.

Par la suite, des anticorps polyclonaux anti-MsiK ont été produits et des expériences de liaison d'ATP ont été réalisées. Les résultats de l'immuno-détection et de liaison d'ATP faits sur des échantillons protéiques purifiés d'*E. coli* BL21/pIAF250 et sur des extraits cellulaires de *S. lividans* ont révélés une protéine de 41 kDa qui confirme la masse prédite par la séquence nucléotidique. Les expériences de liaison d'ATP sont en accord avec la théorie selon laquelle la protéine mutée ne lie pas l'ATP, contrairement à la protéine fonctionnelle. De plus, le fait que la protéine MsiK recombinante soit capable de lier l'ATP *in vitro* démontre également que la queue de polyhistidine n'interfère pas avec l'activité de la protéine. Par ailleurs, il a aussi été démontré que la protéine MsiK recombinante tronquée, produite chez *E. coli* BL21/pIAF249 est capable de lier l'ATP.

Finalement, une réaction croisée est obtenue avec les anticorps anti-MsiK et une protéine d'environ 30 kDa chez *S. lividans*. La capacité de liaison d'ATP par cette protéine inconnue a aussi été vérifiée et le résultat obtenu démontre que celle-ci est capable de lier l'ATP. Ceci suggère la présence d'un second système de transport énergie-dépendant chez *S. lividans*.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le groupe de recherche sur les streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier étudie la régulation, la sécrétion et la structure des enzymes hémicellulolytiques de *Streptomyces lividans*. Par mutagenèse au NTG, le mutant pléiotropique cellulase et xylanase négatif, *S. lividans* 10-164, a été obtenu dans les laboratoires des Dr D. Kluepfel, R. Morosoli et F. Shareck de l'Institut Armand-Frappier (Québec, Canada).

Tout récemment, Hurtubise *et al.* (1995) ont isolé le gène reconférant le phénotype sauvage au mutant 10-164. Ce gène, nommé *msiK* ("multiple sugar import") code pour une protéine qui lie l'ATP. Cette protéine a de fortes homologues avec les protéines MalK, UgpC, SfuC et MsmK, des protéines faisant partie de systèmes de transport énergie-dépendant (Ames, 1986; Kuan *et al.*, 1995). Plus précisément, la protéine MsiK fait partie de la classe I de la famille des transporteurs ABC. La protéine MsiK serait donc responsable de la liaison et l'hydrolyse d'ATP afin de fournir l'énergie requise à une perméase qui transporte les disaccharides inducteurs des gènes *cel* et *xln*.

La mutation au niveau du gène *msiK* de la souche *S. lividans* 10-164 se situe dans le motif Walker B, un des deux sites consensus de cette protéine. Ces motifs Walker (A et B) sont conservés chez les protéines qui lient l'ATP. Selon la littérature, une mutation dans un de ces deux sites rend la protéine inactive.

Afin de mieux comprendre le transport des sucres inducteurs des gènes *cel* et *xln*, il est nécessaire de connaître les caractéristiques des protéines impliquées dans celui-ci. Ce travail consiste donc à exprimer, purifier et caractériser la protéine MsiK de *S. lividans*, une protéine essentielle au transport du xylobiose et cellobiose chez cette souche.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LES STREPTOMYCÈTES

1.1 Généralités

Les streptomycètes sont des bactéries Gram positive de l'ordre des *Actinomycetales*. Ces bactéries filamenteuses sont non-pathogènes et retrouvées majoritairement dans le sol. Elles obtiennent leur source de carbone par la sécrétion de divers enzymes extra-cellulaires hydrolytiques telles que les hémicellulases qui dégradent l'hémicellulose. Ces bactéries ont un cycle de vie complexe; à partir d'une spore se développe un mycélium végétatif branché et non cloisonné qui se cannibalise pour former un mycélium aérien (figure 1). C'est à partir d'un fractionnement du mycélium aérien qu'on obtient à nouveau des spores (Chater, 1984). Les streptomycètes ont une autre caractéristique bien particulière, soit un contenu génétique riche en guanine (G) et cytosine (C) (70-73%). Cette particularité augmente leur résistance aux rayons ultra-violet et peut même être un facteur important permettant à la bactérie de transcrire une variété de gènes hétérologues (Hopwood, 1989).

1.2 Importance industrielle des streptomycètes

Du point de vue industriel, les streptomycètes sont bien connus pour leur capacité à produire une grande quantité de métabolites secondaires ainsi que divers antibiotiques d'importance médicale. Également, les streptomycètes possèdent tous les enzymes nécessaires à la dégradation de la biomasse lignocellulosique. Parmi ces enzymes, on retrouve les cellulases et les xylanases (Ishaque et Kluepfel, 1981; Kluepfel *et al.*, 1986). Ces enzymes ont gagné

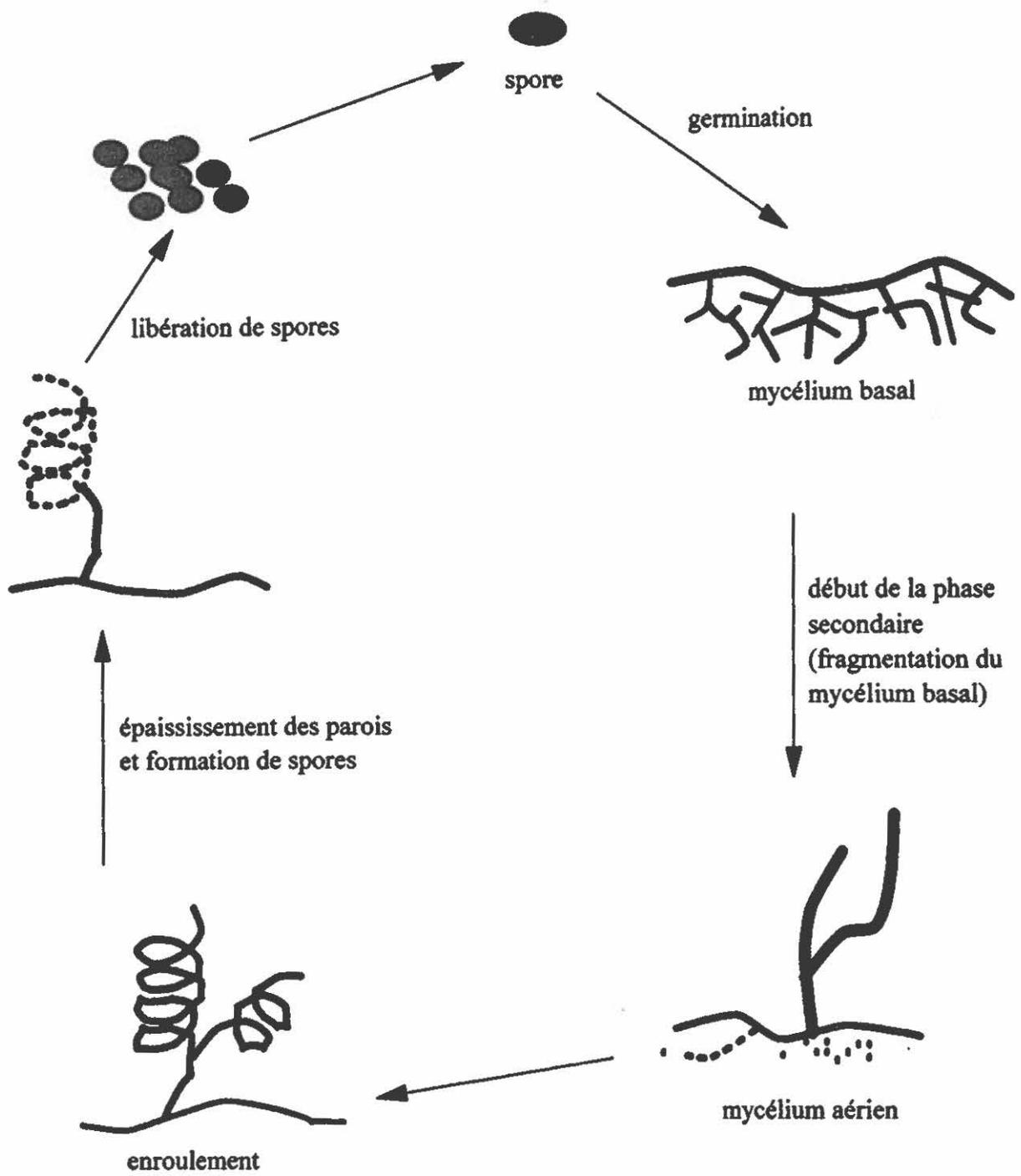


Figure 1 : Le cycle de vie des streptomycètes.

beaucoup d'intérêt depuis les dernières années à cause de leur potentiel industriel. Par exemple, un mélange de cellulases, de xylanases et de pectinases pourrait être utilisé dans la clarification des jus (Biely, 1985; Sreenath *et al.*, 1994). D'un autre côté, les cellulases seules pourraient servir dans la transformation des déchets agricoles en produits chimiques tels que l'éthanol ou en moulée pour les animaux d'élevage (Coughlan, 1985; Lynd *et al.*, 1991). Aussi, un mélange de cellulases et de xylanases, auraient une application dans la prédigestion de la moulée ce qui faciliterait la digestibilité de cette dernière par des animaux d'élevage (Seale, 1987). En outre, des études récentes ont démontré le potentiel d'utilisation des cellulases dans le désencrage des papiers recyclés (Flandroy, 1991; Woodward *et al.*, 1994). Par ailleurs, les xylanases ont un avenir important assuré dans le bioblanchiment des pâtes de papier réduisant ainsi la pollution créée par l'industrie papetière (Viikari *et al.*, 1986; Paice *et al.*, 1988; Paice *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1992; Gilbert et Hazlewood, 1993). Les avantages de l'utilisation de ces enzymes pour le bioblanchiment des pâtes de papiers sont: (1) la haute spécificité des réactions enzymatiques, (2) les conditions de réactions enzymatiques plus douces que celles chimiques et (3) l'absence de perte de modification chimique des substrats (Wong *et al.*, 1988).

Afin de réaliser ces diverses applications, les enzymes d'intérêt doivent être produites en grande quantité et de façon rentable. L'industrie détient déjà beaucoup d'expérience sur la fermentation à grande échelle des streptomycètes pour la production d'antibiotiques et de métabolites secondaires. Il est donc concevable de produire ces enzymes hémicellulolytiques de la même façon, étant donné que les conditions de fermentation pour la production d'enzymes sont les mêmes que celles pour la production d'antibiotiques déjà mise au point.

1.3 *Streptomyces lividans*

Il existe plusieurs microorganismes, procaryotes et eucaryotes, capables de sécréter des hémicellulases d'intérêt; par exemple, les genres *Bacillus* (Simonen et Palva, 1993), *Streptomyces* (Kluepfel *et al.*, 1986; Gilbert *et al.*, 1995) et le genre de champignon le plus étudié, *Trichoderma* (Buchert *et al.*, 1994).

L'avantage d'utiliser *S. lividans*, comparativement à d'autres microorganismes, est non seulement dû au fait que les techniques de fermentations sont au point, mais aussi parce que cette bactérie est bien connue génétiquement. Par ailleurs, *S. lividans* pousse relativement vite et produit une bonne quantité d'enzymes hémicellulolytiques. En plus de sécréter de grandes quantités d'hémicellulases, *S. lividans* est un microorganisme idéal en tant qu'hôte pour le clonage génétique grâce à sa capacité à reconnaître un grand nombre de promoteurs (Gusek et Kinsella, 1992).

Pour introduire un gène chez *S. lividans*, le vecteur pIJ702 peut être employé (figure 2). Ce vecteur à haut nombre de copie est fréquemment utilisé car il permet une sur-expression du gène cloné et maintient la stabilité du clone (Gusek et Kinsella, 1992). Ce vecteur peut être transmis dans plusieurs hôtes et facilite le clonage grâce à ses sites de restriction uniques. Il contient également un gène codant pour la résistance au thiostreptone ce qui permet la sélection des transformants. Ce marqueur est important car la plupart des streptomycètes sont sensibles au thiostreptone. Un autre marqueur retrouvé sur pIJ702 est le gène de la tyrosinase qui code

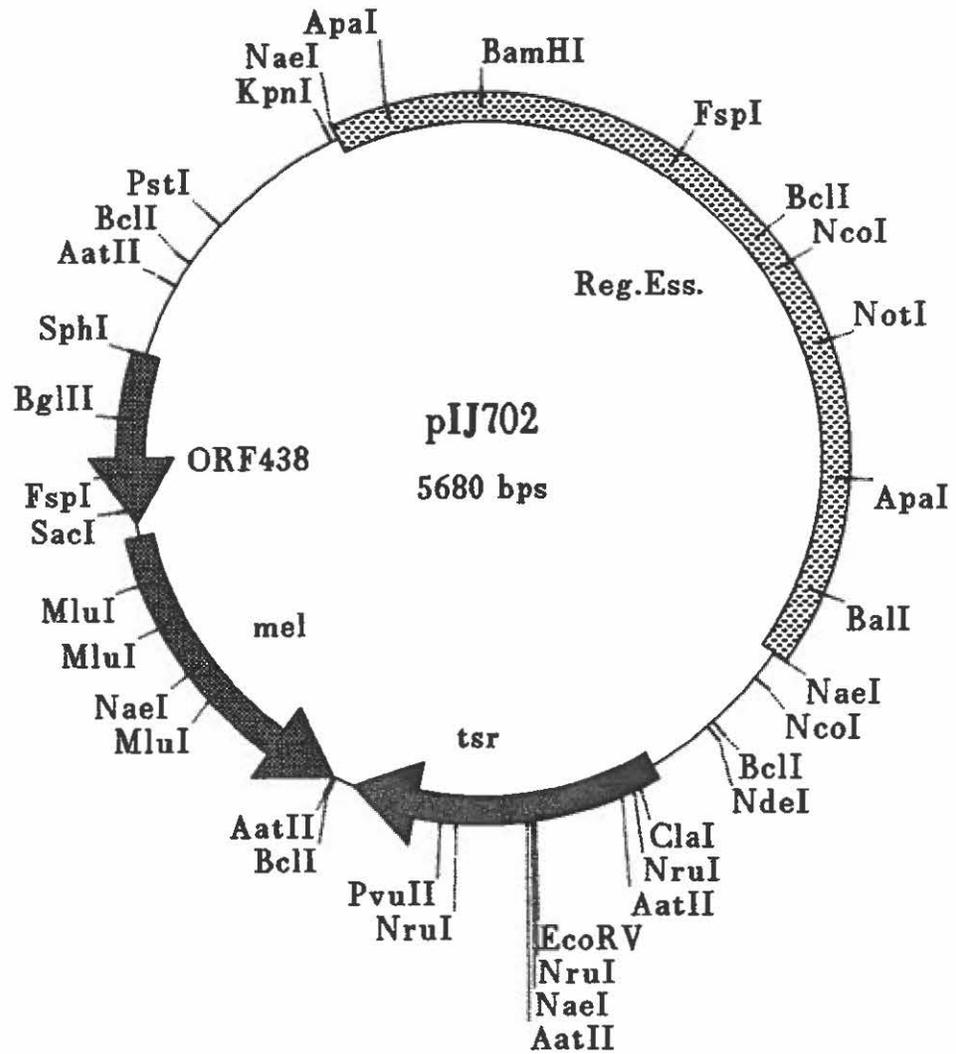


Figure 2 : La carte génétique du plasmide pIJ702

pour la biosynthèse de la mélanine. L'inactivation de la tyrosinase par insertion d'un gène permet de différencier les transformants contenant pIJ702 avec ou sans insert puisque ces premiers n'auront pas de pigmentation. De plus, les gènes clonés dans ce vecteur sont exprimés grâce au promoteur du gène *melC* qui code pour la tyrosinase.

1.4 *Streptomyces lividans* 10-164

S. lividans 10-164 est un mutant pléiotropique cellulase et xylanase négatif. Il a été obtenu par mutagenèse au N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) dans les laboratoires des Docteurs D. Kluepfel, R. Morosoli et F. Shareck de l'Institut Armand-Frappier (Mondou *et al.*, 1986). Ce mutant a permis la construction d'une banque génomique de *S. lividans* dans cette souche ce qui diminue les problèmes du clonage hétérologue. D'abord, les premières expériences de production d'une banque génomique de *S. lividans* chez *E. coli*, afin d'obtenir le gène de la xylanase A, furent décevantes car l'activité xylanasiq ue des transformants n'était pas visible (Mondou *et al.*, 1986). Ceci s'explique par le fait que lors du clonage hétérologue, les promoteurs des gènes clonés n'étaient pas reconnus par l'ARN polymérase de la cellule hôte. La création d'une banque génomique chez *S. lividans* fut donc la meilleure approche afin de minimiser ces problèmes. Ceci assurait la reconnaissance des promoteurs des gènes par l'hôte ainsi que la reconnaissance des peptides signaux nécessaires pour l'exportation des protéines extra-cellulaires. La mutagenèse au NTG pour l'obtention d'une souche de *S. lividans* ne sécrétant pas ou peu d'enzymes hémicellulolytiques fut donc entrepris. L'obtention de la souche *S. lividans* 10-164 était un résultat très prometteur car la détection des transformants était facile

et très visible, étant donné son phénotype cellulase et xylanase négatif (Mondou *et al.*, 1986). Ce mutant était également très stable et donc un bon outil de travail pour la construction de la banque génomique et le clonage homologue des gènes *xln* et *cel* de *S. lividans* ainsi que pour l'étude du contrôle de l'expression et de la régulation de ceux-ci.

Malgré la grande importance de la souche 10-164, la nature de la mutation a été inconnue pendant près de dix ans. En effet, ce n'est que tout récemment que ce mutant a été caractérisé par Hurtubise *et al.* (1995). Cette souche contient une mutation au niveau d'un gène codant pour une protéine qui lie l'ATP (section 4.0). Le transport des sucres (xylobiose, cellobiose, xylose et glucose) a été étudié et les résultats obtenus ont démontré que la mutation présente chez la souche 10-164 inhibe le transport du xylobiose et du cellobiose. Le transport du xylose est également affecté car il est dix fois moins efficace chez le mutant comparativement à la souche sauvage. Par contre, le transport de glucose n'est pas touché par la mutation. Par ailleurs, on observe une accumulation de xylose ou de glucose dans les milieux de culture ensemencé avec le mutant 10-164 comportant le xylobiose ou cellobiose comme source de carbone, respectivement. Cette accumulation est attribuable à l'activité de la β -xylosidase ou β -glucosidase qui est toujours présente chez le mutant.

Hurtubise *et al.* (1995) ont donc mis en évidence une deuxième voie d'utilisation du cellobiose via la β -glucosidase chez *S. lividans* qui explique sa croissance en présence de cellobiose. Cette croissance est par contre plus lente chez le mutant comparativement à celle de la souche sauvage (Shareck *et al.*, 1987). Il existe donc une voie majeure, via un système de

transport de cellobiose qui nécessite de l'énergie, et une voie mineure via la présence d'une β -glucosidase extra-cellulaire, induite en présence de cellobiose, qui hydrolyse ce dernier en deux molécules de glucose. Le glucose est ensuite transporté par cette voie mineure qui ne requiert pas d'énergie. Les mêmes observations ont été faites concernant le xylobiose. La souche 10-164 croît en présence de xylobiose même si cette molécule n'est pas transportée dans la cellule. Le xylobiose est hydrolysé en deux molécules de xylose par une β -xylosidase extra-cellulaire. Le xylose est ensuite métabolisé, mais de façon plus lente, afin d'assurer la croissance de la souche. Le xylose serait transporté via un système de transport autre que celui utilisé pour le transport du xylobiose et du cellobiose. Le phénotype du mutant 10-164 peut donc s'expliquer par le fait que le xylobiose et le cellobiose sont les inducteurs des xylanases et cellulases. Puisque ces molécules ne sont pas transportées dans la cellule, elles ne peuvent induire les gènes des xylanases et des cellulases (Hurtubise, 1994).

2.0 L'HÉMICELLULOSE ET SA STRUCTURE

La dégradation de la biomasse lignocellulosique par des enzymes lignocellulolytiques produits par des microorganismes tel que *S. lividans*, fait l'objet de plusieurs études. Cette matière est une ressource abondante et renouvelable qui est retrouvée dans les parois des cellules végétales. Le matériel lignocellulosique est principalement composé de trois constituants polymériques, soit la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Flandroy, 1991).

TABLEAU 1 : Comparaison des caractéristiques phénotypiques du mutant *S. lividans* 10-164 avec celles de la souche sauvage.

Caractéristiques phénotypiques	<i>S. lividans</i> 1326	<i>S. lividans</i> 10-164
Cellulases ¹	+	-
Xylanases ¹	+	-
β -mannanase ²	+	+
Arabinofuranosidases ³	+	-
β -glucosidase ⁴	+	+
β -xylosidase ⁴	+	+
Chitinase ⁵	+	-
Métalloprotéase(s) ⁶	+	++
Undecylprodigiosine ⁴	+	+
Actinorhodine ⁴	+	-
Sporulation ⁴	+	+/-

¹ Mondou *et al.*, 1986.

² Arcand *et al.*, 1993.

³ Manin *et al.*, 1994.

⁴ Hurtubise, 1994.

⁵ Brzezinski, communication personnelle.

⁶ Paradis, communication personnelle.

2.1 La cellulose

La cellulose est la matière organique la plus abondante de la biosphère, représentant de 30 à 40 % de la biomasse (Bisaria et Ghose, 1981). C'est un polymère linéaire de 100 à 10 000 unités de D-glucose reliées entre-elles par une liaison β -1,4 (figure 3). L'unité de base est le cellobiose qui est lui-même composé de deux unités de D-glucose. Les chaînes de cellulose s'associent parallèlement pour former des microfibrilles insolubles retrouvées dans les parois primaire et secondaire des cellules végétales. À l'intérieur de ces fibres, il y a des régions bien structurées et non-hydrolysables par des cellulases appelées cristalline et des régions hydrophiles plus relâchées dites amorphes (Bisaria et Ghose, 1981). La cellulose est toujours associée avec une variété d'hémicelluloses et de polysaccharides et forme l'armature du bois (Flandroy, 1991).

2.2 Les hémicelluloses

L'hémicellulose est le second composé le plus abondant dans la biosphère. Les hémicelluloses sont des hétéropolymères de D-galactose, de D-mannose, de D-xylose, de L-arabinose ou autres sucres simples. Ils sont très hydrophiles et relient la cellulose à la lignine pour former un réseau de liaisons souples (Flandroy, 1991). L'hémicellulose la plus répandue est le xylane qui comprend environ 200 unités de D-xylose reliées entre-elles par des liens β -1,4. Le xylane est principalement retrouvé dans le bois dur. Contrairement à la cellulose, la structure du xylane est plus complexe du fait qu'elle varie d'une plante à l'autre. Plusieurs substitués peuvent être retrouvés attachés à la structure de base du xylane (figure 4). Quelques substitués

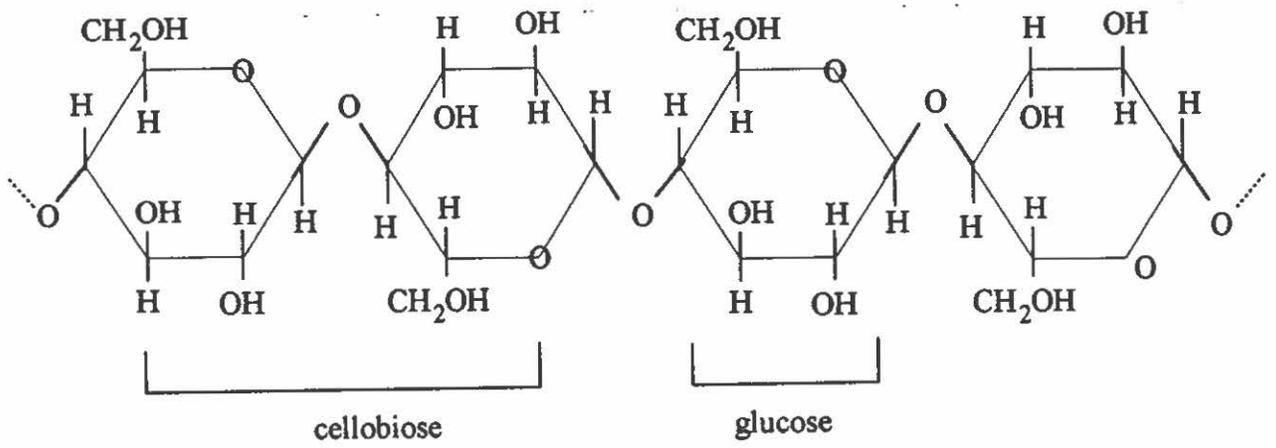


Figure 3 : La structure de la cellulose

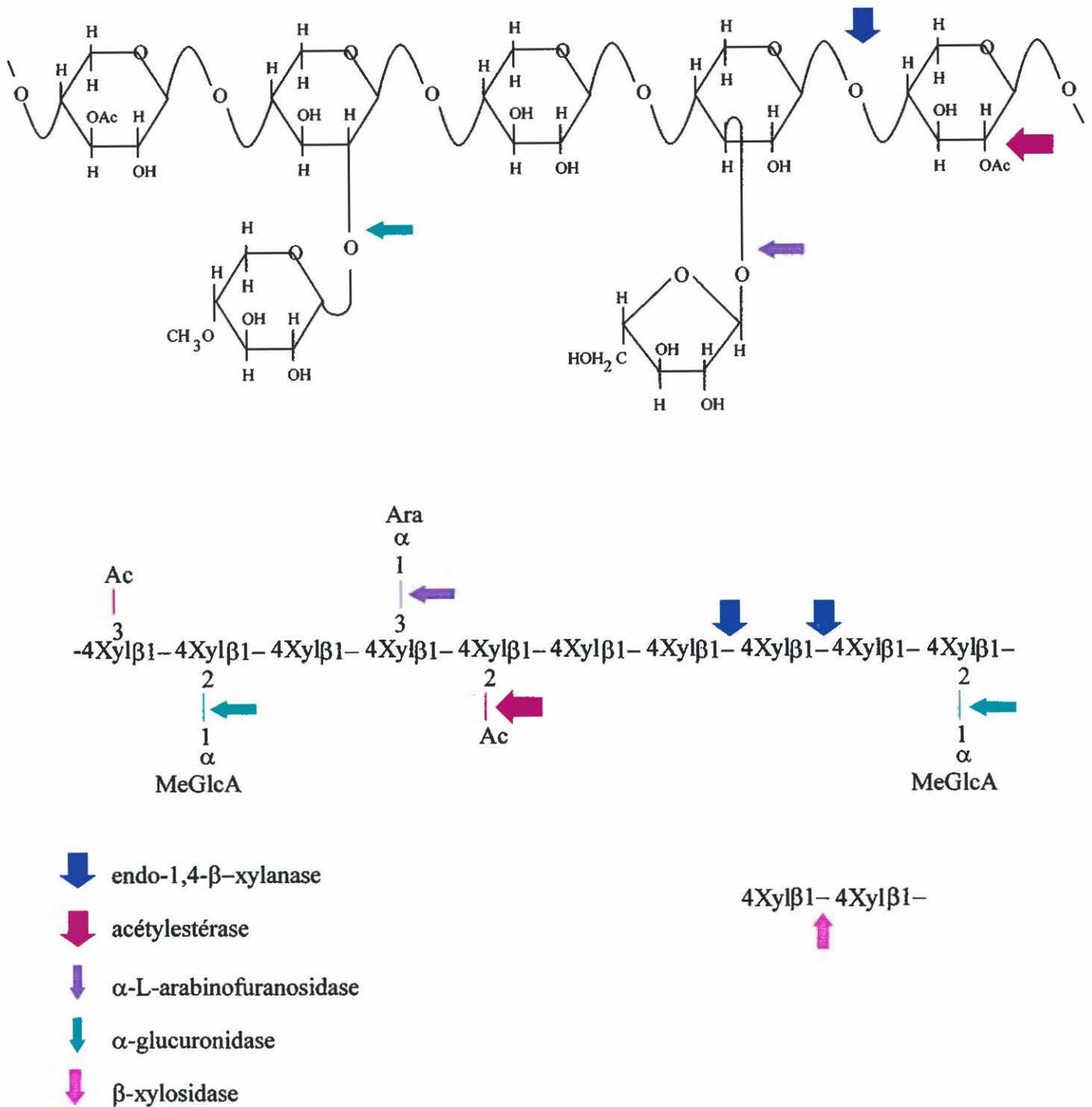


Figure 4: Représentation d'un hétéroxylane avec les sites d'attaque de différents enzymes xylanolytiques.

qui peuvent être présents sont des L-arabinofuranoses, des groupements acétylés et/ou des acides uroniques telle que l'acide D-glucuronique (Biely, 1985).

Un autre type d'hémicellulose retrouvé fréquemment dans la nature est le mannane. Ce polymère est retrouvé dans les bois mous et les graines des légumineuses. Il est composé d'unités de mannose reliées entre-elles par des liens β -1,4. Comme le xylane, le mannane peut avoir diverses chaînes latérales rattachées à son ossature, tout dépendant de l'origine végétale.

2.3 La lignine

Le troisième composé de la biomasse lignocellulosique est la lignine qui est étroitement liée avec la cellulose et les hémicelluloses au niveau des parois des végétaux. Ce polymère très complexe est constitué d'unités de phénylpropane liées par une grande variété de liaisons éther ou C-C (Flandroy, 1991). La lignine est très résistante aux produits chimiques et aux attaques de microorganismes.

3.0 HISTORIQUE DES ENZYMES HÉMICELLULOLYTIQUES DE *S. lividans*

Le groupe de recherche sur les streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier étudie la biodégradation de la lignocellulose depuis de nombreuses années. Plus précisément, ils étudient la régulation, la sécrétion et la structure des enzymes hémicellulolytiques de *S. lividans*. Jusqu'à présent, trois xylanases (Mondou *et al.*, 1986; Morosoli *et al.*, 1986; Kluepfel *et al.*, 1990;

Vats-Mehta *et al.*, 1990; Shareck *et al.*, 1991; Kluepfel *et al.*, 1992), deux cellulases (Théberge *et al.*, 1992; Wittmann *et al.*, 1994), une β -mannanase (Arcand *et al.*, 1993) et deux arabinofuranosidases (Manin *et al.*, 1994) ont été identifiées et caractérisées.

L'emplacement de la plupart de ces gènes sur le chromosome de *S. lividans* a ensuite été déterminé par Hopwood et Kieser (communication personnelle). À l'époque, la nature de la mutation de la souche *S. lividans* 10-164 n'était pas encore connue, mais on pensait que celle-ci affectait un polypeptide impliqué dans l'utilisation de cellulose et d'hémicellulose comme source de carbone puisque les gènes codant les hémicellulases ne sont pas retrouvés dans un opéron (figure 5). Hurtubise *et al.* (1995) ont par la suite démontré que le mutant 10-164 était incapable de transporter le cellobiose et le xylobiose à l'intérieur de la cellule. Le gène *msiK* reconférant le phénotype sauvage à la souche 10-164 a ensuite été isolé par Hurtubise *et al.* (1995), et récemment localisé sur le chromosome. Afin de connaître le rôle de cette protéine, il faut d'abord comprendre les mécanismes de régulation des enzymes hémicellulolytiques.

3.1 Les xylanases

Les xylanases sont des enzymes qui dégradent le xylane en coupant les liens β -1,4 pour former des xylooligosaccharides de plus petite taille (Biely *et al.*, 1993). Les trois xylanases identifiées chez *S. lividans* 1326 agissent en coopération pour éventuellement donner du xylobiose et du xylose (Kluepfel *et al.*, 1992). Les xylanases B et C attaquent le xylane et des xylooligosaccharides ayant un degré de polymérisation plus élevé que 5 (figure 6). Les

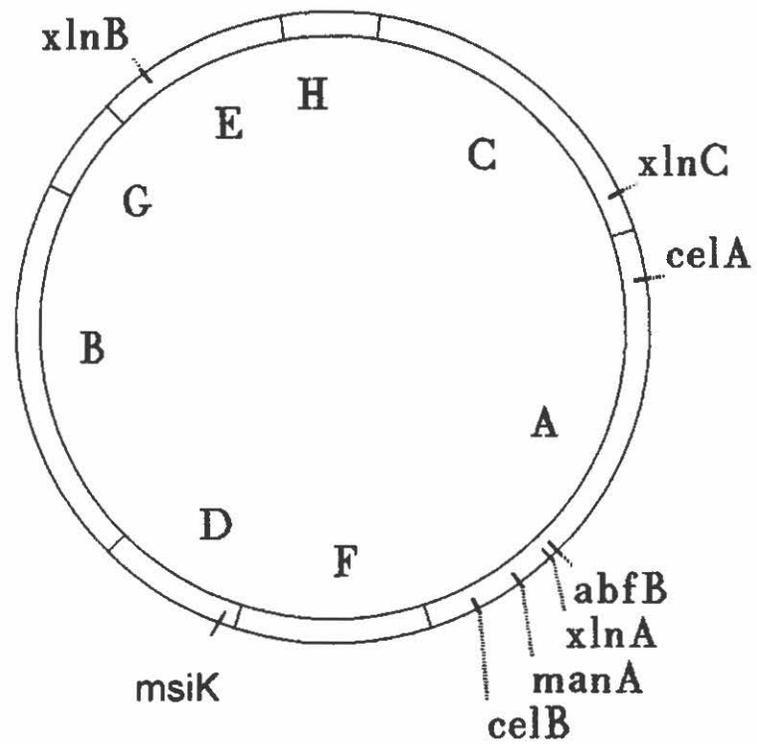


Figure 5 : Emplacement des gènes hémicellulolytiques et du gène *msiK* sur le chromosome de *S. lividans* 1326. Les fragments *Dra*I sont représentés de A à H.

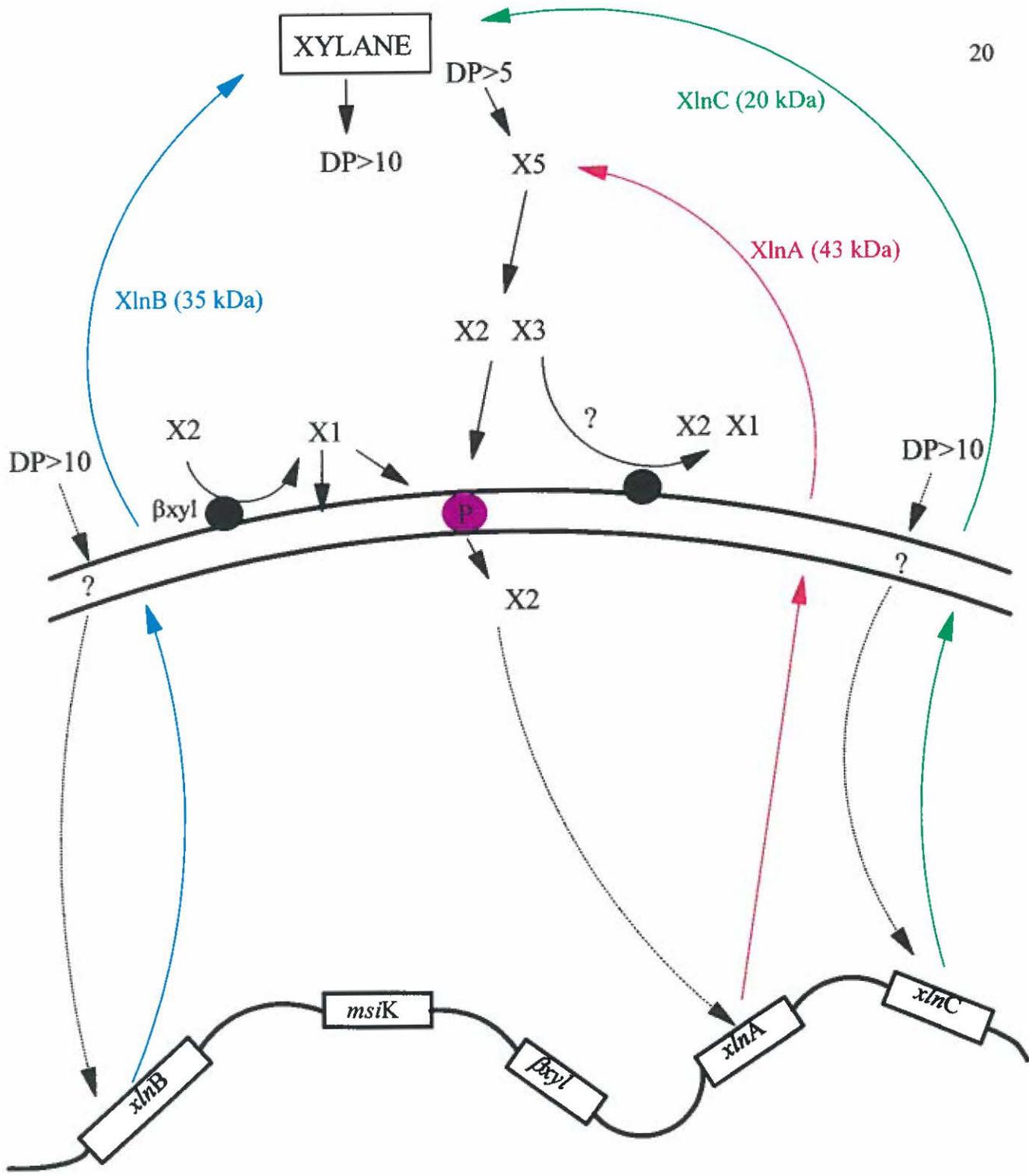


Figure 6 : Représentation schématisée de l'induction des xylanases de *Streptomyces lividans*.
 XlnA, XlnB, XlnC : xylanase A, xylanase B, et xylanase C
xlnA, *xlnB*, *xlnC*, *βxyl* : gènes des XlnA, XlnB, XlnC et β-xylosidase
 DP : degré de polymérisation, P : perméase
 ? : mécanisme inconnu

xylopentaoses (X5) libérés sont ensuite dégradés en xylobiose (X2) et xylotriose (X3) par la xylanase A. Le xylotriose semble être attaqué par une β -xylosidase extra-cellulaire pour former du xylobiose et du xylose (Hurtubise *et al.*, 1995).

Le xylobiose est transporté à l'intérieur de la cellule par transport actif via un système de perméase qui nécessite de l'énergie. Il est connu que le xylobiose induit l'expression des gènes des xylanases (Godden *et al.*, 1989; Hrmova *et al.*, 1991). Par contre, des études de dislocation génétique décrites par Arhin *et al.* (1994) semblent indiquer que le xylobiose induit la xylanase A, mais pas les xylanases B et C. Ces deux enzymes seraient induits par des xylooligosaccharides ayant un degré de polymérisation plus élevé que dix. Ces xylooligosaccharides se lieraient à la membrane externe (ne peuvent être transportés dans la cellule) et stimuleraient indirectement les gènes des xylanases B et C.

Les xylanases B et C sont exprimées à un niveau basal en absence de substrat et sécrétées dans le milieu en tant qu'éclaireurs. La dégradation du xylane par ces deux enzymes menant à la formation de xylooligosaccharides de degré de polymérisation élevé induirait ensuite l'expression des xylanases B et C. Les produits d'hydrolyse de ces enzymes induisent les gènes des xylanases B et C. Ces produits sont ensuite dégradés par la xylanase A en xylotriose et xylobiose. Ce dernier induit à son tour la production de la xylanase A. Cependant, le xylobiose et le xylotriose peuvent être attaqués par la β -xylosidase dont le produit, le xylose, réprimerait la production des xylanases. Les mécanismes de régulation à ce niveau sont encore mal connus.

3.2 Les cellulases

Les cellulases sont des enzymes qui dégradent la cellulose en hydrolysant les liens β -1,4 au niveau des régions amorphes de la fibre. Le système cellulolytique ressemble beaucoup au système xylanolytique. Les endoglucanases s'attaquent à la cellulose pour produire de plus petites molécules qui sont ensuite dégradées par des exocellulases pour donner du cellobiose. Le cellobiose, tout comme le xylobiose, est transporté à l'intérieur de la cellule par transport actif via une perméase (Jiresova, 1987). Le cellobiose induit ensuite la synthèse des cellulases ou, lorsque présent en grande quantité, est scindé par une β -glucosidase en deux molécules de glucose qui réprime l'expression des gènes. Les cellulases sont aussi produites de façon constitutive et par la suite induites en présence de cellulose par l'intermédiaire de dégradation, le cellobiose.

3.3 La β -mannanase et les arabinofuranosidases

Chez le mutant 10-164, contrairement aux xylanases et aux cellulases, la β -mannanase est toujours sécrétée et n'est donc pas affectée par la mutation au niveau du gène *msiK*. La β -mannanase hydrolyse les liens β -1,4 du mannane pour donner des oligomannosides de taille variée. Ceux-ci peuvent ensuite être scindés en mannose par l'intermédiaire d'une β -mannosidase (Arcand *et al.*, 1993). La β -mannanase cloné chez le mutant 10-164 hydrolyse le mannohexaose principalement en mannobiose et en petites quantités de mannotriose et de mannotétraose. Puisque cet enzyme est toujours produit chez le mutant 10-164, on peut penser que le

mannobiose pénètre la cellule via une perméase d'un autre système de transport actif pour induire la production de β -mannanases.

Les arabinofuranosidases, de leur côté, sont des enzymes qui jouent un rôle important dans la dégradation d'hémicellulose contenant des résidus arabinoses. C'est-à-dire que leur action est nécessaire pour hydrolyser les chaînes latérales comportant des arabinoses ce qui permet la dégradation complète de l'hétéropolymère (figure 4). L'arabinofuranosidase A, localisée dans le cytoplasme de la cellule, est induite par l'arabinose. Cette enzyme hydrolyse les arabino-oligoxylsides lorsqu'induite par l'arabinose (Manin *et al.*, 1994). Cette enzyme n'est pas détectée chez le mutant 10-164. Il semble que seul l'arabinoxylbiose peut être transporté à l'intérieur de la cellule possiblement par le même système de transport que le xylobiose et le cellobiose. Par conséquent, une défectuosité dans le transport de l'arabinoxylbiose empêcherait l'expression du gène *abfA*. L'arabinofuranosidase B à son tour a été clonée et est en voie de caractérisation.

4.0 LE GÈNE *msiK* ET LA PROTÉINE MsiK

Le gène reconférant le phénotype sauvage au mutant 10-164 a été isolé du plasmide pIAF48 par Hurtubise *et al.* (1995) et porte pour nom *msiK* (multiple sugar import). La séquence du gène *msiK* est retrouvée à la figure 7. Cette séquence a un cadre de lecture ouvert (ORF) de 942 paires de bases débutant par un codon ATG (nucléotide 406) et terminant avec un codon TGA (nucléotide 1540) codant pour une protéine de 378 acides aminés dont la masse

aa#		nt#
	CTCCCGAAGCCCGGCACGGTCTCGCAGGCCGAACCCCTGCCGGAGGGCAATAGCGCCCCGGCAACCCGAAGG	72
	GACCCCCCGATCCAGGATCGCGGGGGTCCGCTGGGCCGGCTGCGGAGCCCTGTCCGATTCCGAACCGACGAC	144
	CTTCGGTTTACAAGAGCGGCGCTCTGACCAGTGTAGCTAAGGAGGCACGGCTCGGGCGCGCCAGGCTGTCT	216
	CACGTACACAGACCGGTGAACGATGTGATGCGAAAATTTCGGCGGAATTACAGACTCCCAGCTACTGAC	288
	AGATCAGGTGAACGCCGGTACCCTCTGCTCAGCTTACCCTGTGGACTACACCACCACCTTCTCTACAAC	360
	GGATCGTCCGGCACGTTCTGCGGGTAGAAGGGGGCCCTTTCACCATGGCCACTGTTACGTTTCGACAAGGCG	432
9	M A T V T F D K A	
	ACCCGTGTGTACCCGGGTTCCACGAAGCCCGCGTGCACGGTCTCGACATCGACATCGCGGACGGCGAGTTC	504
33	T R V Y P G S T K P A V D G L D I D I A D G E F	
	CTCGTCTGGTCCGGCCGTCCGGTTGTGGCAAGTCCACCTCGCTCCGGATGCTCGCCGGGCTCGAGGACGTG	576
57	L V L V G P S G C G K S T S L R M L A G L E D V	
	AACGGCGGCCCATCCGCATCCGGTACCCGCGAGTGCACGCACCTGCCGCCGAAGGACCGGGACATCGCCATG	648
81	N G G A I R I G D R D V T H L P P K D R D I A M	
	GTGTTCCAGAACTACGCGCTGTACCCGCACATGTCGGTCCGCCGACAACATGGGCTTCGCCCTCAAGATCGCC	720
105	V F Q N Y A L Y P H M S V A D N M G F A L K I A	
	GGCGTCAACAAGGCGGAGATCCGGCAGAAGTTCGAGGAGGCCGGAAGATCCTCGACCTCACCGAGTACCTG	792
129	G V N K A E I R Q K V E E A A K I L D L T E Y L	
	GACCGCAAGCCGAAGGCGCTCTCCGGCGGTACGCGCCAGCGTGTGGCGATGGGCCGCGGATCGTGCCTGAG	864
153	D R K P K A L S G G Q R Q R V A M G R A I V R E	
	N	
	aAC	
	CCGCAGGTGTTCTCATGGACGAGCCGCTGTCCAACCTGGACGCCAAGCTCCGGTCTCCACGCCGTACGCAG	936
177	P Q V F I M D E E L S N L D A K L R S P R R T Q	
	ATCGCCTCGCTCCAGCGCCGCTGGGCATCACCACCGTCTACGTCACCCACGACCAGGTCGAGGCCATGACG	1008
201	I A S L Q R R L G I T T V Y V T H D Q V E A M T	
	ATGGGCGACCGCGTGGCGTCCCAAGGACGGTCTGCTCCAGGCAGGTCGACTCCCCGCGGAACATGTACGAC	1080
225	M G D R V A S S R T V C S R Q V D S P R N M Y D	
	AAGCCCGGAACCTTTCGTCGCGCGGCTTCATCGGCTCCCGGCCATGAACCTGGTCGAGGTCGCGATCACC	1152
249	K P A N L F V A G F I G S P A M N L V E V P I T	
	GACGGCGCGGTGAAGTTCGGCAACAGCGTCCGTCGCGGTCACCCGCGACGCCCTGAAGCGCGCCCTCCGACAAG	1224
273	D G G V K F G N S V V P V N R D A L K A A S D K	
	GGCGACCGCACGGTACCGTCCGGTGTCCGCCCGGAGCACTTCGACGTCGTGGAGCTGAACGGCGCGCGGCC	1296
297	G D R T V T V G V R P E H F D V V E L N G G A A	
	AAGACCCTGTGCAAGGACTCGGCGGACGCCCGCGCCCTCGCGGTCTCGGTGAACGTCGTCGGAGGAGAC	1368
321	K T L S K D S A D A P A G L A V S V N V E E T	
	GGCGCCGACGGCTACATCTACGGCACGGTTCGAGGTCGGCGCGGAGACGAAGGACCTCGTGGTCCCGCTCAGC	1440
345	G A D G Y I Y G T V E V G G E T K D L V V R V S	
	AGCCGCGCGGTGCCGGAGAAGGGCGCGACCTCCACGTCGTGCCGCGTCCGGGCGAGATCCACGTGTTCTCG	1512
369	S R A V P E R K A T V H V V P R P G E I H V F S	
	TCCTCCACGGGCGAGCGCTCACCGACTGAGAAACCACGCGACCGGGTGATTTACCCCCGCGTTGACGAAA	1584
378	S S T G E R L T D -	
	<u>GAGCCCCGGCCCTGCTGCGGGGCTCTTTTCGTTGTGCGACAAATACCCCGGCACAACGGACGTTTCGACCGA</u>	1656
	$\Delta G -38.5$	
	TGTTCTCAATCTCCTATCCCGTTCCTCGGCCGCTCTTCATCCCCGTTAGGGTGGACTAAATGTCCGCAAAT	1728
	CATTACCGGGCGCTACCCTCACTCGCGTGAAGCACTCCGTGAAGCCACTCCCACCACCCCGACAAGACGCG	1800
	ACGGCGCGGGCCCCCGCCCGCGGATCGGCCGCTCTCTCGCCTTCGTCCTGCCGTCGTCCTGGTGTCT	1872
	CCGGGACTTCCTCGGTACCCCGCTCAACTGGTCCGGGGATCCTCGGACTCGGTGCTCGCCGCGTCGGAGGC	1944
	CACCTCGCCCAAGGCCTCCTCCGCCCGCGCCCGCACGAGGTGCTGCGCGACCGGCTGCTGACCGAGTTGCA	2016
	GGAGGAGACCCGGCGCTCGCGTACCCACCTCCAGCAGGCGGTGAACGAGCGCCGTCGCTGGCCGACCA	2088
	CTGCGGACCATCGCCCGCGCCCTCGGCCGCGCGGTCGAGGTCACGGCCCGACGCGCGCCGATCGTA	2160
	CGCCCGTCCGTCGCGACACCGCTTCGCTCGGGCGTCTGGCCGCGCACGGCTAGGACCTCCGGAGGC	2232
	GGCTGGGGCGCGGTCACAGTTCGGGCATGACCGATCCGACCGCGCTCCGCGCCCGTTCAGCCGGTCTG	2304
	CCTGGCCGGCGGGCAGGTTCCCGCTGCGCCCCACACCGACGACCGGCCCAAGCCGATGGTCGAGATCCC	2376
	GGCCCGGACCCCGATCATCGGCATA	2403

Figure 7 : La séquence du gène *msiK* de *S. lividans*. Les régions ombragées sont les motifs Walker. La mutation, retrouvée dans le motif B au nucléotide 883, est indiquée par la lettre minuscule dans le nouveau codon au dessus de la séquence nucléotidique. La séquence palindromique est soulignée.

moléculaire prédite serait de 40 438 daltons. À l'extrémité 3' du gène *msiK*, on retrouve une séquence palindromique ($\Delta G = -38.5$ kcal) qui suggère un rôle dans la terminaison de la transcription (Hurtubise *et al.*, 1995). La comparaison de cette séquence avec d'autres séquences dans Genbank a révélé de fortes homologues avec une super-famille de protéines qui lient l'ATP (Higgins *et al.*, 1986). Par contre, le gène *msiK* n'est pas organisé en opéron comme la plupart des gènes avec lesquels l'homologie a été retrouvée.

4.1 Caractéristiques des transporteurs ABC ("ATP-binding cassette")

Il existe trois super-familles de protéines capables de lier l'ATP et d'utiliser l'énergie générée par l'hydrolyse de cette molécule pour activer divers processus biologiques (Higgins *et al.*, 1988; Bishop *et al.*, 1989; Dean *et al.*, 1989; Joshi *et al.*, 1989; Mimmack *et al.*, 1989). Ces trois familles sont les ATPases, les "trafic ATPases" et les transporteurs ABC (Palmen *et al.*, 1994). La protéine MsiK fait partie de la super-famille des transporteurs ABC. Ces trois familles ont en commun, deux sites hautement conservés appelés les motifs Walker A (G-x-x-G-x-G-K-T) et B (x-I-I-D-E-P) (Walker *et al.*, 1982; Pugsley, 1992; Higgins, 1992). Les motifs Walker forment le site de fixation impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Plus précisément, un résidu aspartique (D), conservé à 100% dans le site B, serait directement impliqué dans la liaison de MgATP (Karkaria, *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1993). Un troisième motif bien conservé est la séquence LSGGQRQRVA. Ce motif ressemble à un peptide de liaison qui lie deux domaines protéiques ensemble, le domaine hélicoïdal et le domaine qui forme le site de fixation impliquée dans la liaison et l'hydrolyse d'ATP (Shyamala *et al.*, 1991).

Les transporteurs ABC ("ATP-binding cassette") sont une super-famille de protéines qui lient l'ATP et sont impliqués dans les systèmes de transports actifs. Ces systèmes requièrent plusieurs composantes protéiques pour leur fonctionnement. Les transporteurs ABC sont retrouvés tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Basé sur leur origine et leur fonction générale, cette super-famille de protéines peut être sub-divisée en trois sous-classes : les transporteurs ABC eucaryotiques, les exporteurs ABC bactériens (exportation de polysaccharides ou de toxines) et les importeurs ABC bactériens (importation de nutriments) (Fath et Kolter, 1993; Saurin et Dassa, 1994; Kuan *et al.*, 1995). Ces systèmes de transport énergie-dépendant diffèrent d'autres systèmes de transports bactériens par le fait qu'ils sont sensibles aux chocs osmotiques et aux inhibiteurs métaboliques (Higgins *et al.*, 1986; Higgins *et al.*, 1988; Mimmack *et al.*, 1989; Higgins *et al.*, 1990b). Ce qui différencie également cette super-famille d'autres protéines liant l'ATP est un domaine d'environ 200 acides aminés hautement conservés appelé le complexe de liaison d'ATP ou "ATP-binding cassette" (Higgins, 1990b). Seule la sous-classe de transporteurs ABC impliqués dans l'importation de nutriments (importeurs bactériens) sera discutée plus en détails étant donné que la protéine MsiK fait partie de celle-ci.

Les transporteurs ABC bactériens jouent un rôle important dans les systèmes de transport énergie-dépendant en fournissant l'énergie à une perméase (Ames et Joshi, 1990). La plupart des transporteurs ABC connus jusqu'à présent ont été caractérisés chez des bactéries Gram négatif. Ces systèmes sont composés d'une protéine de liaison au substrat, d'une paire de protéines hydrophobes intégrées dans la membrane formant la perméase et d'une paire de

transporteurs ABC (Higgins, 1992; Saurin et Dassa, 1994; Kuan *et al.*, 1995).

La protéine de liaison au substrat est retrouvée dans l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif ou ancrée à la membrane cytoplasmique externe via une lipoprotéine chez les bactéries Gram positif (Higgins, 1992; Schneider *et al.*, 1994). Elles ont une très haute affinité envers leur substrat et leur présence est nécessaire au transport du celui-ci. La perméase est habituellement formée de deux polypeptides codés par un même gène ou par deux gènes distincts, retrouvés dans un même opéron (Higgins *et al.*, 1990b). Les transporteurs ABC, à leur tour, sont des protéines hydrophiles cytoplasmiques associées à la perméase via une boucle hydrophobe (Hyde *et al.*, 1990). Ils peuvent être retrouvés seuls ou en paire fonctionnant comme homodimère (Higgins, 1990; Higgins *et al.*, 1990a). Récemment, Schneider *et al.* (1994) ont démontré que la liaison et l'hydrolyse d'ATP par MalK de *S. typhimurium* accompagne un changement global dans la conformation de la protéine. C'est la boucle hydrophobe qui serait impliquée dans ce changement de conformation en présence d'ATP.

Peu importe le genre de substrat transporté (ie. sucres, acides aminés, vitamines, ions, etc.), ces systèmes se ressemblent énormément du point de vue fonction et structure. Par conséquent, ceci laisse croire que les composantes du système ont évolué en tant qu'ensemble (Saurin et Dassa, 1994; Kuan *et al.*, 1995). Les transporteurs ABC de bactéries jouent un rôle important dans le transport de nutriments nécessaire à la survie de la bactérie. Basé sur le type de nutriment transporté, Kuan *et al.* (1995) ont sub-divisé cette sous-famille de transporteurs ABC bactériens en huit groupes (tableau 2). De plus, l'analyse des masses moléculaires des

Tableau 2 : Groupement phylogénétique des protéines ABC de bactéries de la super-famille de transporteurs ABC selon les récepteurs solubles extra-cytoplasmiques

Groupement	spécificité des perméases énergisées	# de résidus
1	sucres, glycérol phosphate, fer	364 ± 13 résidus
2	2 ^e famille des sucres	504 ± 3 résidus
3	transport d'acides aminés polaires	250 ± 10 résidus
4	transport d'acides aminés hydrophobiques	245 ± 12 résidus
5* ¹	peptides nickel	329 ± 13 résidus 260 ± 8 résidus
6	sulfate et autres	variable (355 ± 48 résidus; 257 à 404 résidus)
7* ²	acides organiques	ND
8	complexes ferriques et vitamine B-12	260 ± 10 résidus

*¹ groupe ayant diverses fonctions

*² peu d'information publiée sur les transporteurs ABC faisant partie de ce groupe.

Cette classification tirée de Kuan *et al.* (1995) est définie selon la classification des récepteurs solubles extra-cytoplasmiques de Tam et Saier (1993).

protéines parmi chaque groupement démontre peu de variation malgré que cela varie énormément entre les groupements phylogénétiques.

Le premier groupe constitue les transporteurs ABC impliqués dans le transport de sucres spécifiques, de glycérol phosphate ou de fer. Le second groupe comprend les transporteurs qui font partie d'un système de perméase de divers sucres. La masse moléculaire des transporteurs ABC de cette classe est relativement plus élevée que celle du groupement 1. Les transporteurs ABC faisant partie du groupement 3 énergisent des perméases spécifiques envers des acides aminés polaires tandis que ceux du groupement 4 jouent un rôle dans le transport d'acides aminés hydrophobes. Les masses moléculaires des transporteurs ABC sont très semblable entre les membres de ces deux groupements. Le groupement 5 comprend les transporteurs ABC qui énergisent des perméases qui transportent soit des peptides ou du nickel. Les protéines du groupement 6, à leur tour, varient en fonction et en taille, car elles fournissent l'énergie à des perméases spécifiques envers des sulfates ou autres substrats. Le groupement 7 inclut les transporteurs impliqués dans les systèmes de transport d'acides organiques, cependant il y a peu d'information disponible dans la littérature. Finalement, le groupement phylogénétique 8 comprend les transporteurs ABC qui énergisent les perméases spécifiques envers des complexes ferriques ou la vitamine B₁₂.

4.2 Comparaison de la protéine MsiK avec d'autres transporteurs ABC

Près d'une quarantaine de transporteurs ABC ont été caractérisés chez les bactéries (tableau 3). La protéine MsiK ayant de fortes homologues avec les protéines MalK, MsmK, SfuC et UgpC, ferait donc partie du groupement 1 des transporteurs ABC bactériens. Les séquences des deux régions hautement conservées en acides aminés de ces protéines faisant partie de la classe I ont donc été alignées et comparées à la figure 8. Selon Kuan *et al.* (1995), ces deux régions ne sont qu'une approximation des motifs Walker dû à la variation retrouvée. Par exemple, la première région consensus est [LIVMF]₂GX[NST]G[ASC]GK[ST], où les résidus entre parenthèses représentent les possibilités à cette position et où X représente n'importe quel résidu. La deuxième région consensus est [LIVFMAC]₄D[ED][PA]X₃L. Cette région ressemble moins au motif Walker B, mais on note la conservation du résidu aspartate. Ces deux régions consensus chez les transporteurs ABC sont impliquées dans la liaison d'ATP.

La mutation au niveau du gène *msiK* est située dans le motif Walker B au nucléotide 883 où un résidu guanine a été remplacé par un résidu adénosine (figure 7). Le résultat de cette mutation est le remplacement de l'acide aspartique (D) invariable chez le gène sauvage par une asparagine (N) chez le mutant 10-164. Selon diverses études citées dans la littérature, une mutation dans l'un de ces deux sites consensus inhibe l'activité de la protéine (Higgins *et al.*, 1988; Karkaria *et al.*, 1990; Kashiwagi *et al.*, 1993; Covitz *et al.*, 1994; Singh et Maurizi, 1994; Koronakis *et al.*, 1995). Également, Shyamala *et al.* (1991) ont remplacé par mutagenèse dirigée, le résidu aspartate invariable dans le site B par une lysine ainsi qu'une arginine ce qui

Tableau 3 : Liste des transporteurs ABC caractérisés chez les procaryotes

Groupement	Transporteurs ABC	# de résidus	Spécificité	Microorganismes	Référence
1	SfuC	345	fer	<i>Serratia marcescens</i>	Angerer <i>et al.</i> (1990)
1	MbpX	370	inconnue	<i>Marchantia polymorpha</i>	Ohyama <i>et al.</i> (1986)
1	MalK	371	maltose	<i>Escherichia coli</i>	Dahl <i>et al.</i> (1989)
1	UgpC	356	β -glycérol phosphate	<i>E. coli</i>	Overduin <i>et al.</i> (1988)
1	MsmK	377	plusieurs sucres	<i>Streptococcus mutans</i>	Russell <i>et al.</i> (1992)
1	MsiK*	378	plusieurs sucres	<i>Streptomyces lividans</i>	Hurtubise <i>et al.</i> (1995)
2	MglA	506	galactose	<i>E. coli</i>	Hogg <i>et al.</i> (1991)
2	AraG	504	arabinose	<i>E. coli</i>	Scripture <i>et al.</i> (1987)
2	RbsA	501	ribose	<i>E. coli</i>	Burland <i>et al.</i> (1993)
3	HisP	258	histidine	<i>Salmonella typhimurium</i>	Higgins <i>et al.</i> (1982)
3	NocP	257	nopaline	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Zanker <i>et al.</i> (1992)
3	OccP	262	octopine	<i>A. tumefaciens</i>	Valdivia <i>et al.</i> (1991)
3	GlnQ	242	glutamine	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Wu <i>et al.</i> (1991)
3	GlnQ	240	glutamine	<i>E. coli</i>	Nohno <i>et al.</i> (1986)
3	ArtP	242	arginine	<i>E. coli</i>	Wissenbach et Uden (1992) EMBL/Genbank/DBDG
4	BraG	233	isoleucine, leucine, valine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hoshino <i>et al.</i> (1990)
4	BraF	255	isoleucine, leucine, valine	<i>P. aeruginosa</i>	Hoshino <i>et al.</i> (1990)
4	LivG	255	isoleucine, leucine, valine	<i>S. typhimurium</i>	Matsubara <i>et al.</i> (1992)
4	LivF	237	isoleucine, leucine, valine	<i>E. coli</i>	Adams <i>et al.</i> (1990)

Tableau 3 : (suite...)

Groupement	Transporteurs ABC	# de résidus	Spécificité	Microorganismes	Référence
5	NikE	268	nickel	<i>E. coli</i>	Navarro <i>et al.</i> (1993)
5	NikD	253	nickel	<i>E. coli</i>	Navarro <i>et al.</i> (1993)
5	OppF	334	oligopeptide	<i>S. typhimurium</i>	Hiles <i>et al.</i> (1987)
5	OppD	335	oligopeptide	<i>S. typhimurium</i>	Hiles <i>et al.</i> (1987)
5	OppF	307	oligopeptide	<i>Bacillus subtilis</i>	Perego <i>et al.</i> (1991)
5	OppD	336	oligopeptide	<i>B. subtilis</i>	Perego <i>et al.</i> (1991)
5	DciD	335	dipeptide	<i>B. subtilis</i>	Mathiopoulos <i>et al.</i> (1991)
6	CysA	344	sulfate	<i>Synechococcus</i> sp.	Green <i>et al.</i> (1989)
6	CysA	365	sulfate	<i>E. coli</i>	Sirko <i>et al.</i> (1990)
6	PotA	378	polyamines	<i>E. coli</i>	Furuchi <i>et al.</i> (1991)
6	PotG	404	polyamines	<i>E. coli</i>	Pistocchi <i>et al.</i> (1993)
6	ModC	300	molybdate	<i>E. coli</i>	Johann <i>et al.</i> (1987)
6	MolC	380	molybdate	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Luque <i>et al.</i> (1993)
6	ModC	363	molybdate	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Wang <i>et al.</i> (1993)
6	PstB	257	phosphate	<i>E. coli</i>	Burland <i>et al.</i> (1993)
6	ProV	400	proline, betaine	<i>E. coli</i>	Gowrishanker <i>et al.</i> (1989)
8	FecE	255	complexes ferriques	<i>E. coli</i>	Staudenmaier <i>et al.</i> (1989)
8	FepC	271	complexes ferriques	<i>E. coli</i>	Shea <i>et al.</i> (1991)
8	FhuC	265	complexes ferriques	<i>E. coli</i>	Coulton <i>et al.</i> (1987)
8	BtuD	249	vitamine B-12	<i>E. coli</i>	Friedrich <i>et al.</i> (1986)

Informations tirées de Kuan *et al.* (1995).

* : cette protéine a été insérée dans le tableau de Kuan *et al.* (1995) selon les caractéristiques des groupements phylogénétiques décrits.

Région 1

Motif Walker A

MalK (018)	VSKDINLDIHEGEFVVFV GPSGCGKSTLLRMI AGL	(052)
UgpC (019)	VIKPLTLDVADGEFIVMV GPSGCGKSTLLRM VAGL	(053)
MsmK (020)	SVEDFDLDIKNKEFIVFV GPSGCGKSTLLRM VAGL	(054)
MsiK (020)	AVDGLDIDIADGEFLVLV GPSGCGKSTSLRML AGL	(054)

consensus: -----LDI--GEF-V-V**GPSGCGKSTLLRM**-AGL
 * ** ***** **

Région 2

Motif Walker B

MalK (133)	ALSGGQRQRVAIGRTLVAEPS VFL DEPLSNLDAALRVQMRIE	(175)
UgpC (134)	ELSGGQRQRVAMGRAIVRDP VFL DEPLSNLDAKLRVSMRAE	(176)
MsmK (135)	DLSGGQRQRVAMGRAIVRDAK VFL MDEPLSNLDAKLRVSMRAE	(177)
MsiK (135)	ALSGGQRQRVAMGRAIVREPQ VFL MDEPLSNLDAKLRLSTRTQ	(177)

consensus: -LSGGQRQRVAMGRAIVR-P-V**FL**-DEPLSNLDAKLRVSMR-E
 ***** *** ** * * *** **

Figure 8 : Alignement des deux régions hautement conservées chez les transporteurs ABC faisant partie du groupement 1. Le numéro de résidu est donné entre parenthèses. Les acides aminés en gras font partie des motifs Walker. Les acides aminés dits consensus sont ceux conservés parmi toutes les séquences des transporteurs ABC du groupe 1 du tableau 3. Par ailleurs, les astérisques indiquent les acides aminés conservés parmi tous les transporteurs ABC du tableau 3.

a eu pour conséquence, la perte de liaison d'ATP par la protéine HisP (protéine de liaison à l'ATP impliquée dans le transport d'histidine chez *Salmonella typhimurium*). Donc, basée sur ces études, la mutation au niveau de la protéine MsiK empêcherait la liaison d'ATP qui est nécessaire au système de transport actif des disaccharides inducteurs des cellulases et des xylanases chez *S. lividans*.

4.3 Description d'un système de transport énergie-dépendant

Les systèmes de transport énergisés par des transporteurs ABC les plus étudiés jusqu'à présent sont ceux du maltose chez *Escherichia coli* (Schwartz, 1987; Joshi *et al.*, 1989; Dean *et al.*, 1989; Mimmack *et al.*, 1989; Dassa, 1990; Davidson et Nikaido, 1990; Davidson et Nikaido, 1991; Hor et Shuman, 1993; Covitz *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994), de l'histidine chez *Salmonella typhimurium* (Joshi *et al.*, 1989; Bishop *et al.*, 1989; Mimura *et al.*, 1990; Shyamala *et al.*, 1991; Petronilli et Ames, 1991; Kerppola *et al.*, 1991; Hobson *et al.*, 1994) et des oligopeptides chez *Salmonella typhimurium* (Higgins *et al.*, 1986; Gallagher *et al.*, 1989).

Le système de transport de maltose chez *E. coli* permet le transport uni-directionnel des maltodextrines linéaires via l'hydrolyse d'ATP (Covitz *et al.*, 1994). Ce système est composé de cinq polypeptides, LamB, MalE, MalF, MalG et MalK qui sont codés par les gènes *lamB*, *malE*, *malF*, *malG* et *malK*, respectivement (figure 9). Ces gènes sont retrouvés sur deux opérons séparés, soient *malEFG* et *malK-lamB-malM* (Dahl *et al.*, 1989). La protéine LamB permet la diffusion des maltodextrines à travers la membrane externe. Par la suite, la protéine

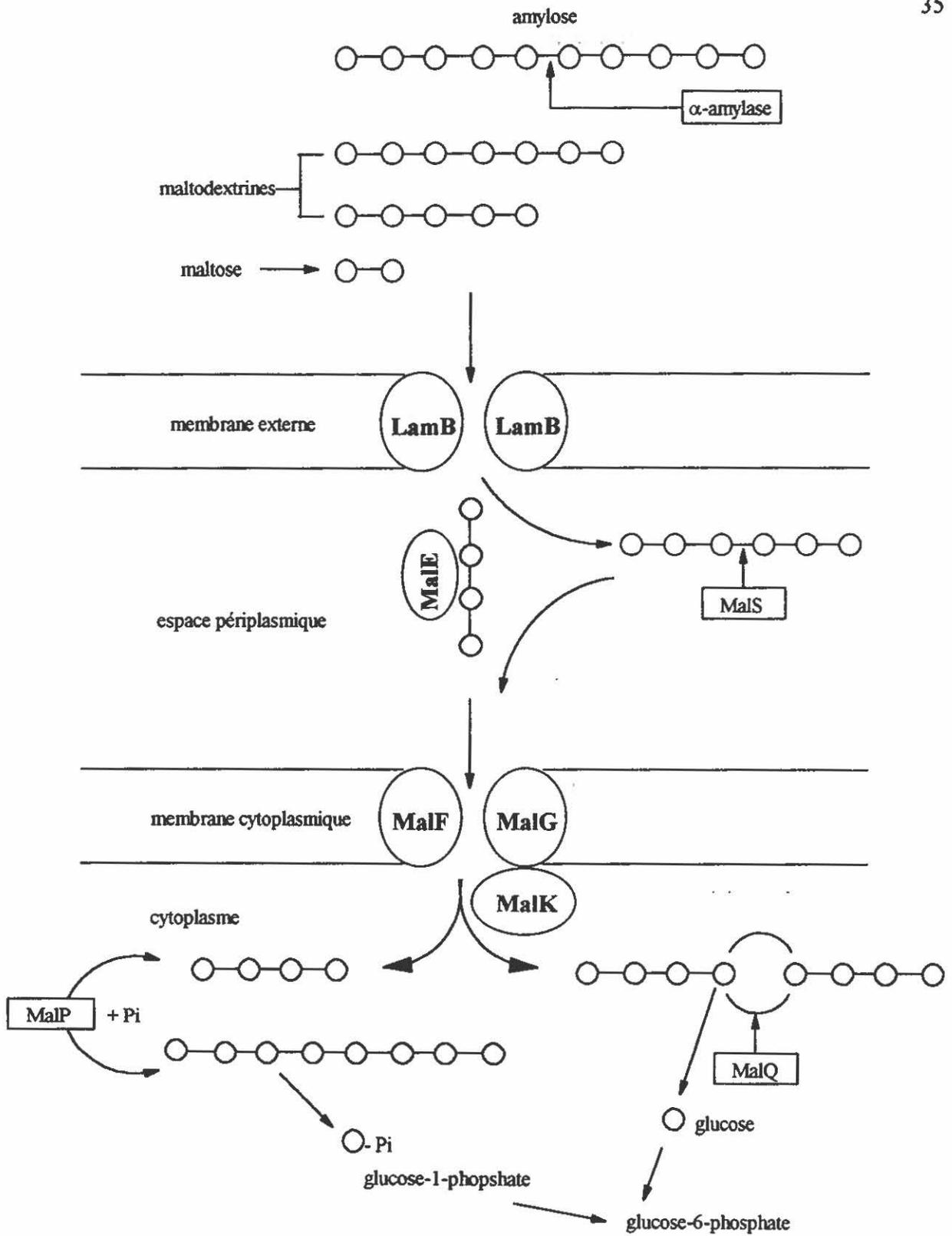


Figure 9 : Schéma du transport des maltodextrines chez *E. coli*

périplasmique, MalE, forme un complexe avec le substrat et présente celui-ci à la perméase formée des protéines hydrophobes MalF et MalG (Schwartz, 1987; Gilson *et al.*, 1988).

L'interaction entre le complexe MalE-substrat et MalF-MalG est rendu possible par la protéine MalK qui fournit l'énergie nécessaire à MalF et MalG (Dassa, 1990). L'hydrolyse de l'ATP par la protéine MalK permet un changement de conformation au niveau du complexe permettant ainsi la translocation du substrat (Schwartz, 1987; Dahl *et al.*, 1989; Davidson et Nikaido, 1990). Récemment, des études de modélisation ont été effectuées pour le système de transport du maltose afin de permettre l'évaluation des paramètres cinétiques et de mieux comprendre les interactions entre les composantes protéiques d'un tel système (Shilton et Mowbray, 1995). Selon un des modèles proposés, l'étape de l'hydrolyse de l'ATP serait l'étape limitante et irréversible. Selon un autre modèle, il semblerait que le substrat en état libre dans l'espace périplasmique pourrait interagir avec la perméase, autant que le substrat formant un complexe avec la protéine de liaison MalE (Shilton et Mowbray, 1995). Cette compétition est importante dans les systèmes où la protéine de liaison est induite car cela permet au système de réagir aux changements de la concentration du substrat. Les trois modèles proposés par Shilton et Mowbray (1995) mèneront à des études approfondies de modélisation afin de trouver le modèle propice au système de transport énergie-dépendant. Un tel modèle permettra de distinguer les paramètres utilisés dans un système ainsi que de suggérer les propriétés affectées par une mutation quelconque. Ce n'est que récemment qu'il a été démontré que l'hydrolyse de l'ATP est la source d'énergie qui permet le transport de nutriment dans ces systèmes (Dean *et al.*, 1989).

Malgré que la plupart des travaux effectués jusqu'à présent ont été réalisés chez les bactéries Gram négatif, ces systèmes de transport ont été mis en évidence chez les Gram positif (Gilson *et al.*, 1988). Par exemple des études de recyclage d'oligopeptides chez *Bacillus subtilis*, un Gram positif, ont mis en évidence la présence d'un système de transport similaire à celui retrouvé chez les bactéries Gram négatif (Perego *et al.*, 1991). Et plus récemment, des travaux effectués chez *Streptococcus mutans* par Russell *et al.* (1992) ont caractérisé un système de transport des sucres melibiose, raffinose et isomaltose, dont les gènes sont retrouvés dans un opéron et codent pour des protéines ayant de fortes homologues avec celles impliquées dans les systèmes de transport énergie-dépendant des bactéries Gram négatif. Curieusement, jusqu'à présent, les protéines impliquées dans un tel système sont codés par des gènes retrouvés dans un opéron (Schwartz, 1987; Hiles *et al.* 1987; Russell *et al.*, 1992; Liong et Ferenci, 1994).

Mise à part les études de Jiresova *et al.* (1987) sur la cinétique du transport de cellobiose chez *Streptomyces granaticolor*, aucun système de transport énergie-dépendant n'a été caractérisé chez *Streptomyces* jusqu'à présent. Hurtubise *et al.* (1995) sont les premiers à avoir caractérisé un tel système chez les streptomycètes. Basé sur l'homologie du gène *msiK* avec d'autres gènes codant des transporteurs ABC et sur les études citées sur ces systèmes dans lesquels le produit des gènes sont impliqués, l'emplacement théorique de la protéine MsiK, produit du gène *msiK*, est schématisé à la figure 10.

L'étude de la protéine MsiK permettra de mieux comprendre le système de transport

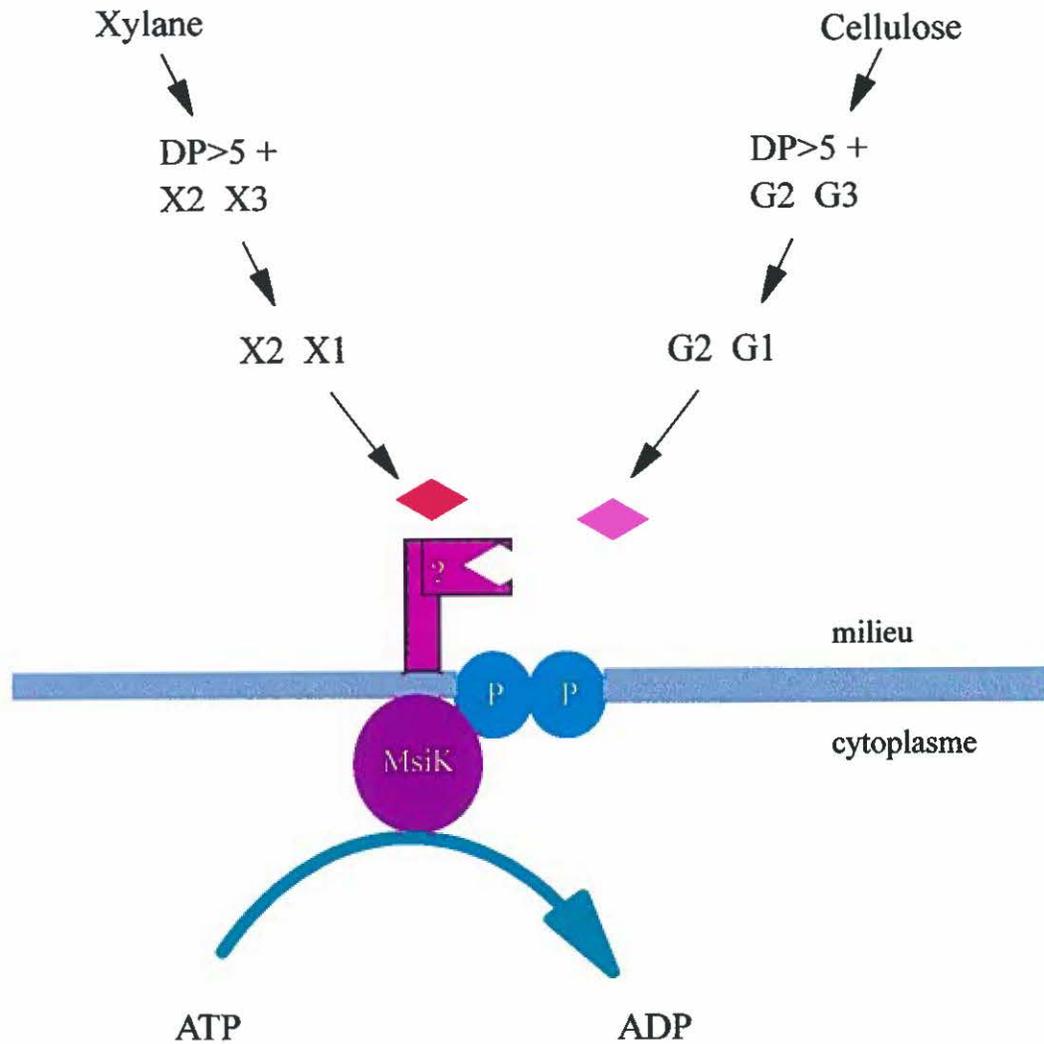


Figure 10: Emplacement théorique de la protéine MsiK chez *Streptomyces lividans*.

DP : degré de polymérisation

X1, X2 et X3 : xylose, xylobiose et xylotriose, respectivement

G1, G2 et G3 : glucose, cellobiose et cellotriose

P : perméase

? : protéine de liaison au substrat

des disaccharides chez *S. lividans* et mènera à une connaissance approfondie de la régulation des gènes.

5.0 SYSTÈMES D'EXPRESSION HÉTÉROLOGUES CHEZ *Escherichia coli*

De nombreux systèmes d'expression existent sur le marché pour sur-exprimer des protéines. La plupart ont été développés pour l'expression soit chez *E. coli*, chez des cellules d'insectes (utilisant les vecteurs de baculovirus) ou bien chez des cellules de mammifères. Chaque système a ses avantages et désavantages qui doivent être pris en considération lors du choix du système d'expression.

5.1 Expression chez *E. coli* utilisant le système promoteur/T7 ARN polymérase

Pour l'étude de la protéine MsiK, un système d'expression chez *E. coli* a été choisi pour la sur-expression et la purification de cette protéine. Ce système d'expression a été choisi car il est relativement simple, rapide et ne nécessite que des techniques de base de clonage d'ADN. La manipulation de cette souche est facilitée par le fait qu'elle est bien connue génétiquement. Un autre avantage est qu'*E. coli* croît rapidement dans un milieu peu coûteux. Par contre, l'expression protéique chez *E. coli* offre les désavantages de production d'agrégats insolubles nommés corps d'inclusions lorsque la protéine est sur-exprimée en grande quantité. Cependant, il est possible de récupérer les protéines des corps d'inclusions par des méthodes dénaturantes et de les renaturer par la suite.

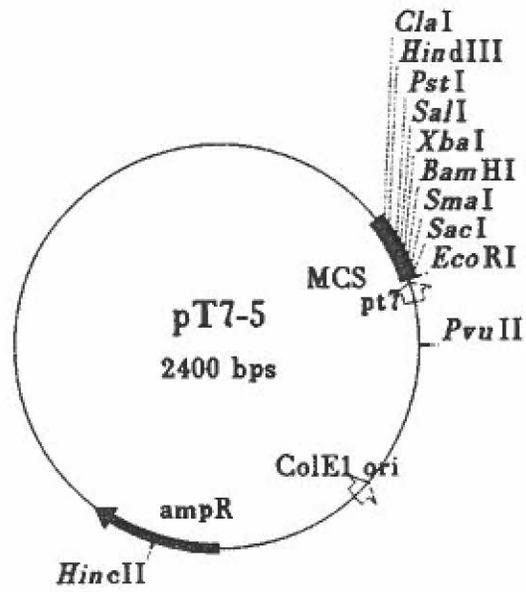
L'approche utilisée pour exprimer un gène hétérologue chez *E. coli* débute par l'insertion du gène dans un vecteur d'expression. Le vecteur choisi pour ce faire est le plasmide pT7-5 dérivé du vecteur à copie multiple, pBR322 (Tabor et Richardson, 1985; Studier et Moffatt, 1986). Comme tout vecteur d'expression, celui-ci contient un marqueur de sélection, un promoteur fort et spécifique et un site de clonage multiple (figure 11A). Ce vecteur contient comme marqueur de sélection, le gène de résistance envers l'ampicilline qui assure le maintien des plasmides dans les clones. Le promoteur est p_{T7} qui est très spécifique à la T7 ARN polymérase. Le gène cloné en aval de ce promoteur sera exprimé seulement lorsque cette enzyme sera présente dans la cellule. La beauté de l'utilisation de cette enzyme est qu'elle ne transcrit aucun gène retrouvé sur l'ADN chromosomique et synthétise l'ARNm à une vitesse supérieure à l'ARN polymérase d'*E. coli*.

Une fois la construction obtenue, le plasmide est introduit par transformation, dans une souche d'*E. coli* appropriée. Dans cette étude, deux souches d'*E. coli* ont été utilisées, soit K38/pGp1-2 (Tabor et Richardson, 1985) et BL21(DE3) (Studier et al., 1990).

5.2 Système de deux plasmides chez *E. coli* K38

La souche *E. coli* K38 contient le plasmide pGP1-2 nécessaire pour l'expression protéique puisque le gène de la T7 ARN polymérase est retrouvé sur ce plasmide (figure 11B). Ce gène est sous le contrôle du promoteur λp_L qui est réprimé par un répresseur thermo-sensible (cI857). Le gène de la T7 ARN polymérase est donc induit à 42 °C, suite à une

A



B

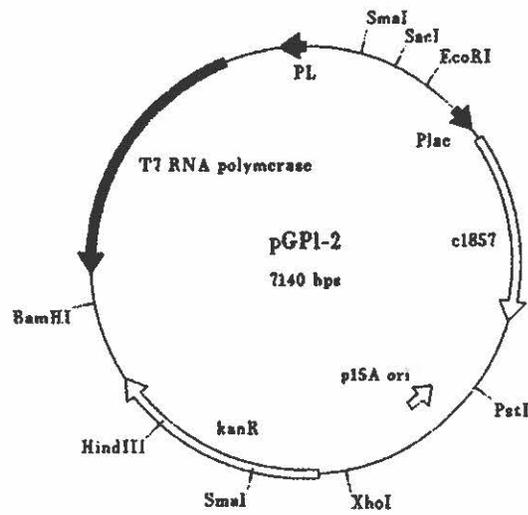


Figure 11 : Les cartes génétiques des plasmides (A) pT7-5 et (B) pGP1-2.

croissance cellulaire à 30 °C. La production de la T7 ARN polymérase induit, à son tour, l'expression du gène sous le contrôle du promoteur p_{T7} du vecteur d'expression, aussi transformé dans cette souche. Le plasmide pGP1-2 contient l'origine de réplication p15A qui est compatible avec celle de ColE1 de pT7-5 (vecteur d'expression). Les deux plasmides sont maintenus dans la cellule K38 avec l'ampicilline et la kanamycine.

5.3 Système d'expression chez *E. coli* BL21(DE3)

La souche *E. coli* BL21(DE3) est couramment utilisée comme hôte pour l'expression protéique. Les souches B, comparées aux souches K (tel qu'*E. coli* K38), ont un avantage du fait qu'elles ne possèdent pas la protéase Lon ni la protéase OmpT qui peuvent dégrader les protéines lors de la purification. Puisqu'il y a moins de protéases retrouvées chez les souches B, tel qu'*E. coli* BL21(DE3), on peut penser que les protéines exprimées seront plus stables. DE3 est un phage dérivé de λ portant sur son ADN le gène *lacI*, le promoteur *lacUV5*, le début du gène *lacZ* et le gène de la T7 ARN polymérase (Studier *et al.*, 1990). Ce fragment est inséré dans le gène *int* du chromosome de la souche. Par conséquent, le gène de la T7 ARN polymérase est sous le contrôle du promoteur *lacUV5* qui est induit à son tour par l'ajout d'IPTG. Ceci permet l'expression de protéines pouvant être toxiques pour la cellule.

6.0 PURIFICATION PROTÉIQUE SUR COLONNE D'AFFINITÉ Ni-NTA

Le système de purification utilisé pour purifier la protéine MsiK est QIAexpress de QIAGEN (manuel le QIAexpressionist). Ce système permet la purification rapide de protéines ayant une queue de six résidus histidine par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine Ni-NTA (acide nitrilo-triacétique). L'affinité de cette résine est très forte et spécifique pour la queue de polyhistidine ce qui permet des étapes de lavages assez stringents sans toutefois éluée la protéine recombinante portant la queue de polyhistidine, soit à l'extrémité N-terminale ou C-terminale (manuel le QIAexpressionist). De plus, la capacité de liaison de la résine NTA est de 5 à 10 mg de protéine recombinante par mL de résine.

Ce système de purification est utilisé pour purifier des protéines produites dans un système d'expression tel que celui décrit à la section 5. Il s'agit d'insérer une séquence nucléotidique codant une queue de polyhistidine à une des deux extrémités de la protéine à purifier et de cloner ce gène recombinant dans un vecteur d'expression de la série pT7. Une autre alternative couramment utilisée est l'insertion du gène à exprimer dans un vecteur d'expression qui contient déjà la séquence codant pour la queue d'histidine en amont ou en aval du site de clonage multiple du vecteur; par exemple, un vecteur de la série pEQ (QIAGEN).

La purification peut se faire soit en condition native ou dénaturante. Le système de purification de QIAexpress emploie la résine Ni-NTA, un chélateur de métal adsorbant (figure 12). Le ligand NTA contient quatre sites chélateurs pouvant interagir avec des ions métalliques.

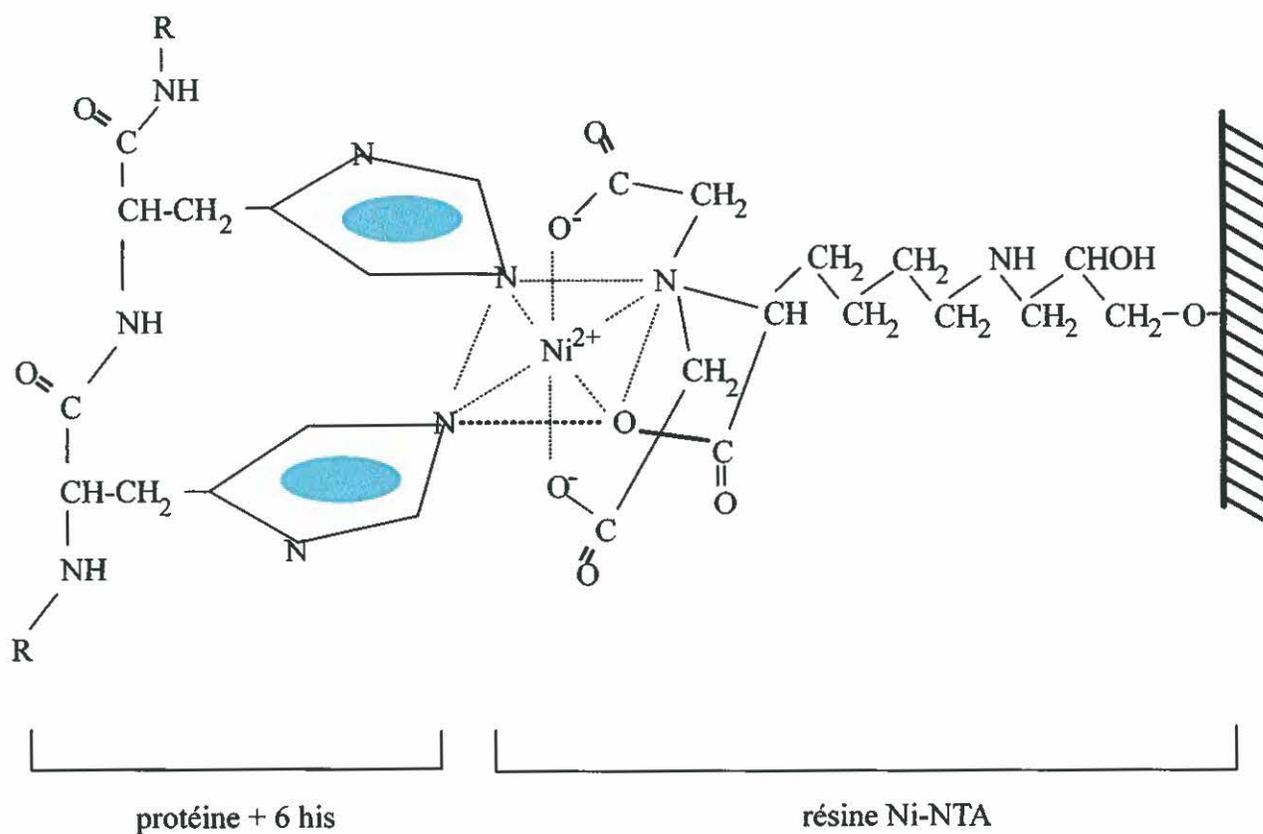


Figure 12 : Schéma de l'interaction entre la queue de polyhistidine et la résine Ni-NTA. Tiré du manuel d'instruction "The QIAexpressionist".

Puisque le NTA occupe quatre des six sites disponibles sur l'ions Ni^{2+} , les deux autres sites sont libres pour interagir avec la queue de polyhistidine (figure 12). Cette liaison permet une forte stabilité et donc une purification protéique efficace à plus de 95% de pureté. Il est possible que des protéines ayant un doigt de zinc puissent se lier a cette résine, cependant la liaison est beaucoup plus faible que celle de la queue de polyhistidine.

La protéine recombinante portant la queue de six résidus histidine est éluée de la résine par un abaissement de pH qui protone les résidus d'histidine ou bien par compétition avec l'imidazole qui se lie à la résine Ni-NTA pour déplacer la protéine recombinante. Par ailleurs, l'ajout d'EDTA chélate les ions Ni^{2+} pour libérer la protéine recombinante de la résine NTA.

OBJECTIFS

Le mutant pléiotropique *S. lividans* 10-164 est incapable de transporter le cellobiose et le xylobiose à l'intérieur de la cellule via le système de transport des dissaccharides dû à la mutation au niveau du gène *msiK*. La protéine MsiK est une des composantes de ce système de transport et interagirait avec d'autres composantes dont une perméase. Afin de mieux comprendre ce système de transport énergie-dépendant, l'étude de la protéine MsiK a été entreprise. La purification de la protéine MsiK constitue la première étape afin d'étudier son interaction avec les autres protéines. Les objectifs de ce projet de recherche étaient les suivants:

- (1) Mise au point d'un système d'expression et de purification à haut rendement chez *Escherichia coli* afin de produire une quantité suffisante de protéine MsiK portant une queue de six résidus histidine.
- (2) Production des anticorps anti-MsiK qui serviront à la détection par immuno-détection de la protéine MsiK dans des extraits cytoplasmiques de *Streptomyces lividans*. Les anticorps serviront aussi comme outils d'analyse futurs.
- (3) Séquençage des premiers acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale de la protéine afin de confirmer la séquence en acides aminés avec celle en acides nucléiques du gène.
- (4) Caractérisation de la protéine du point de vue biochimique (M^r, pI).
- (5) Détection de l'activité de la protéine MsiK versus la protéine mutante afin de vérifier si la première lie l'ATP.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. LISTE DES PRODUITS

Acétate de sodium (Sigma)	Chloroforme (J.T. Baker)
Acétate de potassium (Sigma)	Chlorure d'ammonium (J.T. Baker)
Acide acétique glacial (A & C)	Chlorure de calcium (Fisher)
Acide β -[cyclohexylamino] propane sulfonique (CAPS) (Sigma)	Chlorure de cuivre (J.T. Baker)
Acide citrique (Fisher)	Chlorure de fer (Fisher)
Acide éthylènediaminetétracétique (Fisher)	Chlorure de magnésium (J.T. Baker)
Acide hydrochlorique (J.T. Baker)	Chlorure de manganèse (J.T. Baker)
Acide Ni-nitrilo-triacétique (QIAGEN)	Chlorure de 4-nitrobleu tétrazolium (Boehringer Mannheim)
Acide phosphorique (J.T. Baker)	Chlorure de sodium (J.T. Baker)
Acide trichloroacétique (J.T. Baker)	Chlorure de zinc (J.T. Baker)
Acrylamide (Bio-Rad)	Dithiothréitol (Bio-Rad)
Adénosine triphosphate (Pharmacia LKB)	Diméthylsulfoxyde (J.T. Baker)
Adjuvant de RIBI (Cedar Lane)	Enzymes de restriction (Pharmacia LKB)
Agar (Difco)	Enzyme <i>pfu</i> (Stratagene)
Agarose (Bio-Rad)	Éthanol
Albumine de sérum bovin (Sigma)	Extrait de boeuf (Difco)
Ampicilline (Boehringer Mannheim)	Extrait de levure (Difco)
Anti-lapin d'âne conjugué à la peroxydase de raifort (Amersham)	Gélatine (Bio-Rad)
Anti-lapin de chèvre conjugué à l'alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim)	Glucose (Fisher)
Bacto casamino acid (Difco)	Glutaraldéhyde (BDH)
Bactotryptone (Difco)	Glycérol (Fisher)
β -mercaptoéthanol (BDH)	Glycine (ICN)
β -hydroxyquinoline (Sigma)	Hydrochlorure de guanidium (ICN)
Bleu Brillant de Rémozol (Sigma)	Hydroxyde de potassium (BDH)
Bleu de bromophénol (BDH)	Hydroxyde de sodium (BDH)
Bleu de Coomassie (Bio-Rad)	Imidazole (A & C)
Bouillon de tryptone de soya (Difco)	Isopropanol (BDH)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Boehringer Mannheim)	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Boehringer Mannheim)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Boehringer Mannheim)	Kanamycine (Boehringer Mannheim)
Bromure d'éthidium (Bio-Rad)	Ligase (Pharmacia LKB)
Butanol (BDH)	Maltose (Fisher)
Carbonate de sodium (Fisher)	Méthanol
	N,N'-méthylène bis-acrylamide (Bio-Rad)
	Nucléotides (Pharmacia LKB)
	NZ amine A (Sheffield Products)
	Peroxydase, solution B (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.)
	Peroxydase triméthylbenzidine (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.)

Persulfate d'ammonium (Bio-Rad)
Phosphate de potassium monobasique (Sigma)
Phénol (BDH)
Polyéthylène glycol 1500 et 6000 (Sigma)
Propionamide (Aldrich Chemical Co.)
Protéine A marquée à ^{125}I (ICN)
Réactif de Folin (BDH)
Sodium de borate (Sigma)
Sodium de phosphate dibasique (J.T. Baker)
Sodium de phosphate monobasique (J.T. Baker)
Standard de masse moléculaire "1 KB ladder" (GIBCO BRL)
Standard de poids moléculaire connu (Bio-Rad)
Standard de poids moléculaire connu "pre-stained" (Bio-Rad)
Sucrose (BDH)
Sulfate d'ammonium (J.T. Baker)
Sulfate de cuivre (J.T. Baker)
Sulfate de magnésium (J.T. Baker)
Sulfate de potassium (Anachemia)
Sulfate de sodium dodécyl (Bio-Rad)
Tampon "One-Phor-All" 10x (Pharmacia LKB)
Tampon *pfu* (Stratagene)
Tampon TES (Bio-Rad)
Tartrate de potassium monosodique (BDH)
Temed (Bio-Rad)
Thiostreptone (Squibb Canada ltée)
Tris (Boehringer Mannheim)
Triton X-100 (Bio-Rad)
Trousse "ATP-binding protein detection" (Boehringer Mannheim)
Trousse de coloration à l'argent (Pharmacia LKB)
Tween 20 et 80 (Bio-Rad)
Urée (Bio-Rad)

2. SOUCHES BACTÉRIENNES ET VECTEURS

2.1 *Streptomyces lividans*

2.1.1 Les souches

Les souches de *Streptomyces lividans* utilisées lors de cette étude sont décrites dans le tableau 4. La souche sauvage, *S. lividans* 1326, a été obtenue du Dr D.A. Hopwood du John Innes Institute (Norwich, Grande Bretagne). Par mutagénèse au NTG, la souche *S. lividans* 10-164 (xln⁻, cel⁻), ayant une mutation pléiotropique, a été obtenue dans les laboratoires des Dr D. Kluepfel, R. Morosoli et F. Shareck de l'Institut Armand-Frappier. Les souches IAF49 et IAF50 proviennent de la souche 10-164 qui possède les plasmides pIAF49 et pIAF50, respectivement, construits lors de ce travail.

2.1.2 Les plasmides

Les plasmides utilisés sont décrits dans le tableau 4. Le vecteur à copie multiple, pIJ702 (Katz *et al.* 1983), porte le gène de la résistance au thiostreptone et le gène de synthèse de la mélanine, soit la tyrosinase. Ce vecteur est utilisé pour exprimer le gène *msiK* chez le mutant 10-164. Le plasmide pIAF48, obtenu par criblage d'une banque génomique de *S. lividans* 1326 dans 10-164, contient un fragment *Sau3A1* de 5.9 Kb dans lequel le gène *msiK* est situé. Les plasmides pIAF49 et pIAF50, contiennent le gène *msiK* tronqué et le gène complet, respectivement, associé à une queue de six résidus histidine cloné dans pIJ702.

2.2 *Escherichia coli*

2.2.1 Les souches

Deux souches d'*E. coli*, soit *E. coli* K38 (Tabor et Richardson, 1985) et *E. coli* BL21(DE3) (Studier et Moffatt, 1986), ont été utilisées pour l'expression du gène codant pour la protéine MsiK. Ces souches sont présentées au tableau 4. Les souches *E. coli* BL21/pIAF249, BL21/pIAF249m et BL21/pIAF250 sont dérivées d'*E. coli* BL21(DE3) qui a été transformée avec les plasmides pIAF249, pIAF249m et pIAF250, respectivement. Les souches *E. coli* IAFK39, IAFK248, IAFK249 et IAFK249m sont dérivées d'*E. coli* K38 qui a été transformée avec les plasmides pT7-5, pIAF248, pIAF249 et pIAF249m, respectivement. Les constructions sont décrites à la section 2 des résultats. La souche *E. coli* DH11S (GIBCO BRL) a été utilisée pour la production d'ADN simple brin servant au séquençage des gènes *msiK*, *msiK/6his* tronqué et *msiK* tronqué muté.

2.2.2 Les plasmides

Le principal vecteur utilisé pour une production efficace de protéine recombinante est pT7-5 (Tabor et Richardson, 1985). Les plasmides pIAF248, pIAF249, pIAF249m et pIAF250 sont dérivés du vecteur pT7-5 et permettent la production de la protéine MsiK, des protéines de fusion MsiK/6his tronquée, MsiK/6his mutée tronquée et MsiK/6his, respectivement. Les vecteurs M13mp18 et M13mp19 sont des phages utilisés pour cloner des fragments d'ADN afin de produire de l'ADN simple brin.

Tableau 4 : Les souches bactériennes et les vecteurs plasmidiques

Souches ou plasmides	génotypes/phénotypes	origine
Souches		
<i>S. lividans</i> 10-164	<i>msiK</i> ⁻	Mondou <i>et al.</i>
<i>S. lividans</i> IAF48	pIAF48	Hurtubise <i>et al.</i>
<i>S. lividans</i> IAF49	pIAF49	ce travail
<i>S. lividans</i> IAF50	pIAF50	ce travail
<i>E. coli</i> DH11S	<i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) Δ(<i>lac proAB</i>) Δ(<i>recA1398</i>) <i>deoR rpsL srl thi</i> /F' <i>proAB</i> + <i>lacI</i> ^q ZΔM15	GIBCO BRL
<i>E. coli</i> K38/pGP1-2	pGP1-2	Tabor et Richardson
<i>E. coli</i> IAFK39	pGP1-2, pT7-5	ce travail
<i>E. coli</i> IAFK248	pIAF248	ce travail
<i>E. coli</i> IAFK249	pIAF249	ce travail
<i>E. coli</i> IAFK249m	pIAF249m	ce travail
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F', <i>ompT</i> ⁻ , <i>lon</i> ⁻ , <i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻ T7 ARN polymérase	Studier et Moffatt
<i>E. coli</i> BL21/pIAF249	pIAF249	ce travail
<i>E. coli</i> BL21/pIAF249m	pIAF249m	ce travail
<i>E. coli</i> BL21/pIAF250	pIAF250	ce travail
Plasmides		
pIJ702	<i>tsr</i> ^r , <i>mel</i> ^r	Dr E. Katz
pIAF48	fragment <i>Sau3A1</i> (5.9 Kb) (<i>msiK</i>)	Hurtubise <i>et al.</i>
pIAF49	pIJ702 + <i>msiK</i> /6his tronquée	ce travail
pIAF50	pIJ702 + <i>msiK</i> /6his	ce travail
M13mp18	<i>lacZ'</i> , cassette de clonage	Pharmacia LKB
M13mp19	<i>lacZ'</i> , cassette de clonage	Pharmacia LKB
pGP1-2	<i>km</i> ^r , T7 ARN polymérase	Tabor et Richardson
pT7-5	ori ColE1, <i>am</i> ^r , pT7, MCS	Tabor et Richardson
pIAF248	<i>msiK</i> inséré dans <i>EcoRI-BamHI</i> de pT7-5	ce travail
pIAF249	<i>msiK</i> /6his tronqué inséré dans <i>EcoRI-BamHI</i> de pT7-5	ce travail
pIAF249m	<i>msiK</i> /6his tronqué muté inséré dans <i>EcoRI-BamHI</i> de pT7-5	ce travail
pIAF250	<i>msiK</i> /6his inséré dans <i>EcoRI-</i> <i>BamHI</i> de pT7-5	ce travail

2.3 Les oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés lors de ce travail ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (Gene Assembler, Pharmacia LKB) par le service de synthèse d'ADN du laboratoire du Dr F. Shareck. Les séquences de ces oligonucléotides sont retrouvées au tableau 5. Ces amorces d'ADN permettent d'amplifier, par amplification élective *in vitro* (PCR), le gène *msiK*.

L'amorce MsiK5 a été élaborée de façon à intégrer un site *EcoRI* (GAATTC) suivi d'un site de liaison aux ribosomes (rbs) (TCAGGAGAACGC), d'un site *SphI* (GCATGC) et d'une queue de six résidus histidine (CAT CAC CAT CAC CAT CAC) en amont des premières bases nucléotidiques (ATG GCC ACT GTT ACG) codant pour les premiers acides aminés (M, A, T, V, T) de la protéine MsiK.

L'amorce MsiK3 contient, à partir de son extrémité, un site de restriction *BamHI* (GGATCC) suivi d'un site *SacI* (GAGCTC). Ces deux oligonucléotides permettent d'obtenir un amplicon de 1.1 kb (*msiK*-6his tronqué). Celui-ci peut ensuite être digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI/BamHI* permettant un sous-clonage dans le vecteur pT7-5. Également, une digestion *SphI/SacI* permet de sous-cloner le gène dans le plasmide pIJ702. Le site d'attachement aux ribosomes assure la traduction de l'ARNm en protéine de fusion MsiK/6his tronquée. Afin d'amplifier le gène en entier, les oligonucléotides MsiKFL, MsiK3-1, MsiK3-2, MsiK3-3, MsiK3-4 et MsiK3-5 ont été synthétisés.

3. MILIEUX DE CULTURE

3.1 *Streptomyces lividans*

3.1.1 Pression sélective

Les clones de *S. lividans* portant le plasmide pIJ702 et ses dérivés sont conservés en présence de l'antibiotique thiostreptone. Cet antibiotique, dilué dans du DMSO, est utilisé à une concentration finale de 5 µg/mL en milieu liquide et de 50 µg/mL en milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

3.1.2 Milieu pour la régénération des protoplastes

La régénération des protoplastes de *S. lividans* se fait sur milieu R5 (Hopwood *et al.*, 1985). Ce milieu est constitué de 103 g de sucrose, 250 mg de K₂SO₄, 10.12 g de MgCl₂·6H₂O, 10 g de glucose, 0.1 g de Bacto Casamino Acid, 5 g d'extrait de levure, 5.73 g de tampon TES, 22 g de Bacto agar et 2 mL d'une solution d'éléments traces par litre d'eau déionisée. La solution d'éléments traces contient 40 mg de ZnCl₂, 200 mg de FeCl₃, 10 mg de CuCl₂, 10 mg de MnCl₂, 10 mg de Na₂B₄O₇ et 10 mg de (NH₄)₆(Mo₇)₂₄ par litre d'eau déionisée.

Suite à la stérilisation, le milieu est refroidi et les solutions suivantes sont ajoutées stérilement : 10 mL de KH₂PO₄ 0.5% (p/v), 4 mL de CaCl₂ 5M (p/v), 1 mL de CuSO₄ (5mg/mL), 15 mL de L-proline 20% (p/v), 10 mL de méthionine 1% (p/v) et 0.4 g/L de tyrosine. Cette dernière solution est d'abord diluée dans 5 mL de NaOH 1 N. Le milieu est

réparti dans des boîtes de Petri (20 mL/Petri) qui sont ensuite séchées pendant cinq jours à la température de la pièce permettant une perte de 15% de leur poids. Elles sont ensuite entreposées à 4°C.

3.1.3 Milieu pour le dépistage

La détection des clones positifs se fait sur milieu minimal solide contenant du xylane couplé au colorant Bleu Brillant de Rémozol (milieu RBB-xylane, 0.2%, (p/v)). Ce milieu est composé de 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 minéraux de Mandels par 750 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7.2 et 17 g d'agar sont ajoutés. La solution de sels de Mandels comprend 140 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 160 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 200 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ par 100 mL d'eau déionisée (Mandels et Reese, 1957).

Dans un autre Erlenmeyer, 2 g de RBB-xylane sont dissouts dans 250 mL d'eau déionisée chaude et la solution est mélangée 30 min pour bien dissoudre le RBB-xylane. Les deux solutions sont stérilisées et refroidies à 55°C. Elles sont mélangées ensemble et les solutions suivantes y sont ajoutées stérilement: 10 mL de MgSO_4 5% (v/v) et 1 mL de thiostreptone (50 mg/mL). Le tout est bien mélangé et 20 mL sont versés par boîte de Petri.

3.1.4 Milieu pour la conservation des clones et la lyophilisation

Les souches de *S. lividans* sont conservées à 4°C sur un milieu Bennett en boîte de Petri (Jones, 1949). Ce milieu est composé de 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de boeuf, 2 g de NZ amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre d'eau distillée. Suite à la stérilisation, 1 mL d'une solution de 50 mg/mL de thiostreptone est ajouté lorsqu'une pression sélective est nécessaire.

Afin de conserver les clones à long terme, ils sont lyophilisés. Pour ce faire, des spores préparées sur milieu Bennett/thio sont resuspendues dans du lait écrémé 10% (p/v) stérile. Les spores sont lyophilisées dans des ampoules de verre qui sont ensuite scellées à la flamme sous vide.

3.1.5 Milieu pour la production d'inoculum

Le milieu TSB est utilisé pour la production d'inoculum (pré-culture). Ce milieu riche est composé de 30 g de tryptone de soya par litre d'eau distillée (Hopwood *et al.*, 1985).

3.1.6 Milieu pour la croissance

Le milieu M14 contenant 1% de xylose ou 1% de xylane comme source de carbone est employé pour la croissance cellulaire. Le milieu M14 est composé de 1.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

5.5 g de K_2HPO_4 , 1.0 g de KH_2PO_4 , 2 mL de Tween 80 et 1 mL d'une solution de sels minéraux (ingrédients à la section 3.1.3) par litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7.4 et 100 mL de milieu sont répartis par Erlenmeyer de 500 mL avant la stérilisation. Un gramme de xylane doit être ajouté par Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu avant stérilisation lorsque désiré comme source de carbone. Avant son utilisation, le milieu est refroidi et les solutions suivantes sont ajoutées stérilement: 1 mL de $CaCl_2$ 3% (p/v), 600 μ L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5% (p/v), et 10 μ L de thioestrepton (50mg/mL). Lorsque le xylose est désiré comme source de carbone, 4 mL de xylose 25% (p/v) sont ajoutés après stérilisation.

3.2 *Escherichia coli*

3.2.1 Pression sélective

Afin de maintenir les clones d'*E. coli* portant le plasmide pT7-5 ou un dérivé de celui-ci, l'ampicilline est utilisée à une concentration finale de 60 μ g/mL. Les clones portant le vecteur pGP1-2 sont maintenus avec l'utilisation de kanamycine à une concentration finale de 60 μ g/mL (Tabor et Richardson, 1985).

3.2.2 Milieu pour la croissance et la sur-expression protéique

Le milieu 2xTY est employé pour la croissance de cellules d'*E. coli*. Ce milieu nutritif est constitué de 16 g de bactotryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée.

3.2.3 Milieu pour la détection des transformants

Afin de détecter les transformants, le milieu 2xTY contenant 15 g/L de Bacto agar est employé. Suite à une stérilisation de 20 minutes à 121°C, le milieu est refroidi et les antibiotiques appropriés y sont ajoutés. Le milieu est ensuite réparti dans des boîtes de Petri.

3.2.4 Milieu pour la conservation des clones

La conservation des clones d'*E. coli* se fait en repiquant une colonie dans 5 mL de milieu 2xTY contenant les antibiotiques nécessaires et incubée pendant la nuit à la température optimale de croissance. Un volume de 1.5 mL de glycérol stérile 50% (v/v) est ensuite ajouté. Ceci permet de préserver les cellules à -80°C.

4. CONDITIONS DE CULTURE

4.1 *Streptomyces lividans*

4.1.1 Production d'inoculum

Afin de préparer une pré-culture d'une souche de *S. lividans*, un volume de 25 mL de milieu TSB dans un Erlenmeyer de 125 mL est inoculé avec du mycélium provenant d'un Petri de milieu Bennett-thio. La croissance se fait à 34°C avec agitation à 240 rpm pendant 24 à 36 heures. Lorsque nécessaire, la culture est passée au broyeur de Potter après 24 heures afin de fragmenter le mycélium. Ceci permet une croissance plus rapide. Par la suite, 5% (v/v) de cette

préculture sont utilisés pour ensemer le milieu de croissance.

4.1.2 Préparation de l'extrait cellulaire

Un volume de 100 mL de milieu de croissance est ensemercé avec 5 mL de pré-culture et le tout est incubé à 34°C avec agitation à 240 rpm pendant 48 heures. Lorsqu'une bonne croissance est obtenue, le mycélium est récupéré par centrifugation à 9000x g pendant 15 min (Centrifugeuse Beckman, modèle J2-21, rotor JA10). Le mycélium est lysé par passage à la presse de French et le lysat est centrifugé à nouveau. Le surnageant est récupéré auquel est ajouté un volume d'acétone. Le tout est incubé pendant une heure sur glace avec agitation. Les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation pendant 15 min et le culot est resuspendu dans 100 µL de tampon d'échantillon (section 9.3).

4.2 *Escherichia coli*

4.2.1 Production d'inoculum

Une colonie sur milieu solide est inoculée dans 5 mL de milieu 2xTY contenant les antibiotiques appropriés. Les souches d'*E. coli* sont incubées à 37°C pendant 16 heures avec une agitation de 240 rpm. Par exception, uniquement les souches comportant le vecteur pGP1-2 sont incubées à 30°C.

À partir de cette pré-culture, 1:50 de la suspension cellulaire est ajouté à du milieu 2xTY

frais contenant les antibiotiques nécessaires. Les cultures sont incubées jusqu'à une D.O.₆₀₀ de 0.7 à 0.9.

5. ISOLEMENT D'ADN PLASMIDIQUE

5.1 Extraction d'ADN plasmidique de *S. lividans*

L'extraction d'ADN plasmidique à petite échelle est effectuée selon la méthode de Keiser *et al.* (1984). Un culot de mycélium provenant d'une suspension cellulaire de 500 µL en milieu TSB est obtenu par centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 secondes (Biofuge 13, Baxter Canlab) et lavé avec 500 µL de tampon I sans lysozyme (10.3 % (p/v) sucrose, 25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0). Le culot est ensuite resuspendu dans un volume final de 500 µL de tampon I contenant 2 mg/mL de lysozyme (Pharmacia LKB). Le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, 250 µL de tampon II (0.3 M NaOH et 2 % (p/v) SDS) sont ajoutés au mélange qui est immédiatement agité durant 10 s. Le tout est incubé à 70°C pendant 15 minutes. L'échantillon est refroidi lentement à la température de la pièce (environ 30 minutes) et 80 µL de tampon III sont ajoutés (5 g de phénol, 5 mL de chloroforme, 5 mg d'hydroxyquinoline, 1 mL d'eau déionisée). L'échantillon est agité à nouveau et centrifugé 3 min à 13 000 rpm. Environ 700 µL du surnageant contenant l'ADN plasmidique sont récupérés dans un nouveau tube Eppendorf auquel sont ajoutés 70 µL d'acétate de sodium 3 M et 700 µL d'isopropanol. Le mélange est incubé 5 min à la température de la pièce afin de précipiter l'ADN. Celui-ci est récupéré par centrifugation pendant 2 min et resuspendu dans 50 µL de tampon TE et 5 µL d'acétate de sodium 3 M. Ensuite, 25 µL de phénol neutre (Sambrook *et al.*, 1989) sont ajoutés

et le mélange agité 5 secondes avant d'être centrifugé pendant 2 min. La phase aqueuse est récupérée et 50 μ L (1 vol) d'isopropanol sont ajoutés. Suite à une incubation de 5 min à la température de la pièce et d'une centrifugation d'une durée de 5 min, le culot est récupéré et dissout dans 50 μ L d'eau déionisée stérile.

5.2 Micro-extraction d'ADN plasmidique d'*E. coli*

L'isolement de l'ADN plasmidique d'*E. coli* se fait à l'aide d'une trousse commerciale "Miniprep Kit Plus" de Pharmacia LKB. Le principe de cette technique est basé sur la lyse alcaline selon Birnboim et Doly (1979). Un culot cellulaire provenant d'une culture est récupéré dans un tube Eppendorf par micro-centrifugation (Biofuge 13, Baxter Canlab) à 13 000 rpm pendant 30 secondes et resuspendu dans 100 μ L d'une solution isotonique froide (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glucose, 10 mM EDTA, et 0.15% Kathon^R CG/ICP). Les cellules sont ensuite lysées par l'ajout de 200 μ L d'une solution alcaline composée de 0.2 M NaOH et de Triton X-100 1% (v/v). Le tout est mélangé doucement par inversion, afin d'éviter la fragmentation excessive de l'ADN chromosomique. On y ajoute ensuite 150 μ L d'une solution neutralisante (3 M acétate de sodium, pH 4.8) qui permet la précipitation de l'ADN chromosomique. Le tout est agité délicatement et incubé 5 minutes sur glace. Une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes suit afin de récupérer le surnageant. À celui-ci est ajouté 400 μ L d'isopropanol (1 vol) et le mélange est incubé à 4°C pendant 10 minutes. L'ADN plasmidique est récupéré par centrifugation et le culot est dissout dans 50 μ L de tampon TE.

5.3 Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique isolé est analysé par digestion simple et/ou double avec des endonucléases de restriction (Pharmacia LKB). Une unité d'enzyme est utilisée par microgramme d'ADN dans un tampon "One-Phor-All" 10x (Pharmacia LKB) dilué à 1x ou 2x, selon la concentration spécifiée par le fabricant. Le volume final est de 20 μ L. Le mélange est incubé pendant une à deux heures à 37°C.

5.4 Analyse d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est analysé par électrophorèse en gel d'agarose 0.7% (p/v) dissout dans un tampon TBE 1x (89 mM Tris-HCl, 89 mM acide borique et 20 mM EDTA, pH 8.0). Une concentration de 0.5 μ g/mL de bromure d'éthidium est ajoutée au gel afin de visualiser les fragments par lumière ultra-violette. Le tampon d'échantillon (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol FF et 30% glycérol) est ajouté dans un rapport 1:5 à l'ADN digéré avant d'être déposé dans le puits. La migration se fait dans un appareil à électrophorèse "DNA sub-cell" de Bio-Rad à une différence de potentiel de 5 Volts/cm pendant 16 heures (Sambrook *et al.*, 1989).

Le standard de masse moléculaire utilisé est le "1 Kb Ladder" (GIBCO BRL Life Technologies, Inc.). Ce standard d'ADN de taille connue entre 400 et 12 000 paires de bases permet d'estimer la taille des fragments séparés.

5.5 Isolement d'ADN simple brin

L'isolement d'ADN simple brin servant au séquençage se fait selon la méthode décrite dans le manuel d'instruction de Bio-Rad "M13 Cloning/Sequencing Kits". Le gène provenant d'un clone positif ou d'un produit de PCR est cloné dans les formes répliquatives M13mp18 et M13mp19. Ceux-ci diffèrent entre eux par l'orientation de la cassette de clonage. Ces formes répliquatives sont ensuite transformées dans *E. coli* DH11S et étalées sur milieu 2xTY en présence d'IPTG (inducteur de l'opéron lactose) et de X-gal (substrat de la β -galactosidase qui donne une coloration bleue lorsqu'hydrolysé par l'enzyme).

Suite à une incubation pendant la nuit à 37°C, les plages blanches sont repiquées à l'aide de cure-dents stériles dans 1.5 mL de milieu 2xTY contenant une culture log de DH11S. Le tout est incubé pendant 6 heures à 37°C suivi d'une centrifugation pendant 10 min à 13 000 rpm (Biofuge 13, Baxter Canlab). À cette étape, la grosseur des fragments peut être analysée par électrophorèse en gel d'agarose 0.7 % (voir section 5.4). Par la suite, 1 mL de surnageant est transvidé dans un tube Eppendorf propre contenant 250 μ L d'une solution de PEG₆₀₀₀ 20% (p/v) et 2.5 M NaCl. Le tout est mélangé par inversion et incubé à 4°C pour la nuit. Une centrifugation de 10 min est effectuée afin de récupérer les phages. Le culot est ensuite suspendu dans 100 μ L de tampon TE et 50 μ L de phénol saturé sont ajoutés dans le but de purifier l'ADN simple brin. Le tout est agité et incubé pendant 15 min à la température de la pièce. A ce mélange sont ajoutés 50 μ L de chloroforme suivi d'une deuxième incubation. Le mélange est ensuite centrifugé 5 min et la phase aqueuse est récupérée. L'ADN simple brin est

précipité par l'ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol froid. Le mélange est incubé à -20°C pendant 30 min. Un culot est récupéré par centrifugation pendant 10 min et lavé une fois à l'éthanol 75 % (v/v). Le culot est bien séché et dissout dans 30 µL d'eau stérile.

6. SOUS-CLONAGE D'UN GÈNE CHEZ *E. coli*

6.1 Amplification élective *in vitro* (PCR)

L'amplification élective *in vitro* permet d'amplifier une région spécifique entre deux amorces. Ces amorces s'hybrident aux chaînes complémentaires de la séquence d'ADN à être amplifiée. Un cycle de PCR comprend une dénaturation des brins complémentaires suivi de l'hybridation des amorces et d'une synthèse d'ADN à l'aide de la polymérase *Pfu*. Ce cycle est répété 30 fois.

Dans un tube Eppendorf stérile sont ajoutés en ordre: 59 µL d'eau distillée stérile, 10 µL de tampon *Pfu* 10x, 2 µL de 10 mM de chacun des nucléotides (A,C,G,T), 1 µL de Tween 20 5% (v/v), 8 µL de propionamide 50% (v/v), 10 µL de matrice linéarisée (environ 1 ng d'ADN), 0.5 µL de chaque amorce (environ 50 pmol) et 1 µL d'enzyme *Pfu*. Le tout est bien mélangé et 50 µL de ce mélange sont aliquotés dans deux tubes à PCR stériles. Afin d'éviter l'évaporation lors de la réaction, 100 µL d'huile minérale sont déposés en surface du mélange.

Le programme utilisé est le suivant: 5 min à 95°C, 5 min à 55°C, 3 min à 72°C, suivi de 30 cycles comprenant 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 3 min à 72°C. Le PCR termine avec une

incubation à 72°C pendant 7 min.

6.2 Ligation

Un gène ou un produit de PCR obtenu par la méthode précédente est sous-cloné dans divers vecteurs d'expression selon la méthode de ligation décrite par Sambrook *et al.* (1989). Pour ce faire, 5 µL de vecteur ainsi que 5 µL de produit de PCR sont d'abord digérés selon la méthode décrite à la section 5.3. Les enzymes de restriction sont ensuite désactivés à 85°C pendant 10 minutes et 2 µL d'ATP 10 mM et 1 µL de T4 ADN ligase sont ajoutés au tube. Le mélange est incubé pendant 16 heures à la température de la pièce.

7. BACTÉRIES COMPÉTENTES

7.1 Protoplastes de *S. lividans*

La préparation de protoplastes de *S. lividans* se fait selon la méthode de Hopwood *et al.*, 1985 modifiée par Kluepfel *et al.* (communication personnelle). Afin de préparer des protoplastes, 3 mL d'une culture en milieu TSB sont utilisés pour ensemercer un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu R5 liquide et 0.5% (v/v) glycine. Le tout est incubé à 34°C pendant 24 hr avec une agitation à 240 rpm. Le mycélium est homogénéisé au Potter et centrifugé dans des bouteilles stériles de 500 mL à 9000x g pendant 15 minutes (Centrifugeuse Beckman, modèle J2-21, rotor JA10). Le culot de mycélium est lavé deux fois avec une solution de sucrose 10.3% (p/v). Suivant le deuxième lavage, le culot est resuspendu dans 50 mL de

tampon P contenant 1 mg/mL de lysozyme. Le mycélium est mélangé doucement trois fois à l'aide d'une pipette et est incubé à 34°C pendant 30 min afin de digérer la paroi cellulaire. Le mycélium est mélangé doucement à quinze minutes d'intervalle lors de cette incubation.

Le tampon P est composé de 103 g de sucrose, 0.25 g de K_2SO_4 , 2.02 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mL d'une solution d'éléments traces (voir section 3.1.3) et 800 mL d'eau distillée. Cette solution est autoclavée en aliquots de 80 mL auxquels sont ajoutés les solutions stériles suivantes : 1 mL de KH_2PO_4 0.5 % (p/v), 10 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.68 % (p/v) et 10 mL de tampon TES 5.73% (p/v) ajusté à pH 7.2.

Afin de vérifier que le mycélium soit transformé en protoplastes, un examen microscopique est effectué. Lorsqu'environ 100% de protoplastes sont obtenus, 15 mL de tampon P sont ajoutés et le tout est incubé 15 minutes de plus à 34°C. Par la suite, les protoplastes sont filtrés sur laine de verre dans des bouteilles de centrifugation de 50 mL. Suite à une centrifugation de 7 min à 5000 rpm, le surnageant est décanté et le culot de protoplastes est resuspendu dans le volume résiduel. Les protoplastes sont lavés deux fois dans le tampon P et resuspendus dans un volume qui donne 10^{10} protoplastes par mL. La quantité de protoplastes est estimée par spectrophotométrie à une densité optique (D.O.) de 600 nm et comparé à une courbe de la D.O. en fonction du nombre de protoplastes par mL. Les protoplastes peuvent être aliquotés puis congelés dans un bécher contenant de la glace mis à -70°C.

7.2 *E. coli*

La préparation de bactéries compétentes d'*E. coli* se fait selon la méthode usuelle décrite par Sambrook *et al.* (1989). Une colonie de la souche à transformer est ensemencée dans 5 mL de milieu 2xTY (incluant les antibiotiques selon le cas) et est incubée à 30°C ou 37°C (selon la souche) pendant la nuit avec une agitation de 240 rpm. Par la suite, 500 µL de cette culture sont ajoutés à 50 mL de milieu 2xTY frais et le tout est incubé jusqu'à l'obtention d'une D.O.₆₆₀ de 0.5. Un culot est récupéré par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse Sorvall RC-5B, DuPont Instruments, rotor SA600) et est resuspendu dans 10 mL de tampon CM1 froid (164 mg de CH₃COONa, 1.98 g MnCl₂·4H₂O, 58 mg de NaCl, 200 mL d'eau distillée, pH 5.6)

Le tout est incubé sur glace pendant 20 minutes suivi d'une centrifugation d'une durée de 10 minutes à 5000 rpm. Le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon CM2 froid (41 mg de CH₃COONa, 515 mg de CaCl₂·2H₂O et 495 mg de MnCl₂·4H₂O, 50 mL d'eau distillée, pH 5.6). Les cellules sont ensuite incubées sur glace pendant 20 minutes avant d'être mises en présence avec l'ADN.

8. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

8.1 *S. lividans*

Les protoplastes préparés selon la section 7.1 sont transformés par la méthode décrite par Hopwood *et al.* (1985), modifié par Kluepfel *et al.* (communication personnelle). Dans un tube Eppendorf stérile sont ajoutés 50 μL de protoplastes de *Streptomyces lividans*, 5 μL d'ADN (produit de ligation) et 200 μL de PEG₁₅₀₀ 25% (v/v). Le PEG₁₅₀₀ est dilué dans le tampon T de transformation qui est composé de 25 mL de sucrose 10.3% (p/v) stérile, 75 mL d'eau distillée stérile, 0.2 mL d'une solution d'éléments traces (composition décrite à la section 3.1.3), 1 mL de K₂SO₄ 2.5% (v/v), 0.2 mL de CaCl₂ 5 M et 0.5 mL de tampon d'acide Tris-maléique (tampon Tris, pH 8.0 ajusté avec l'acide maléique).

Le mélange est incubé 2 minutes à la température de la pièce et 50 μL du mélange sont étalés sur milieu R5. Les boîtes de Petri sont incubées à 34°C pendant 16 heures suivi d'un recouvrement de 1 mL d'une solution de thiostreptone (10 μL d'un stock de 50 mg/mL dans 1 mL d'eau distillée stérile). Les boîtes de Petri sont placées de nouveau à 34°C pendant 24 à 48 heures.

8.2 *E. coli*

Les cellules compétentes d'*E. coli*, préparées par la méthode décrite à la section 7.2 sont transformées par la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Dans un tube Falcon de 10 mL

(sur glace) sont placés 300 μ L de cellules compétentes et 5 μ L d'ADN (2 à 200 ng). Le mélange est incubé sur glace pendant 40 minutes suivi d'un choc thermique à 42°C pendant deux minutes sans agitation. Ceci permet à l'ADN de pénétrer les cellules. Le mélange est placé de nouveau sur la glace et 1 mL de milieu 2xTY est ajouté dans le tube. Le tout est incubé à 30°C ou 37°C (selon la souche) pendant 45 minutes permettant l'expression phénotypique. La culture est étalée sur un milieu solide contenant le marqueur de sélection et les boîtes de Petri sont incubées pendant la nuit à la température optimale de la souche.

9. EXPRESSION D'UN GÈNE CLONÉ DANS *E. coli*

9.1 Micro-méthode

La micro-méthode (adaptée selon la souche utilisée) permet de vérifier d'abord l'expression du gène cloné dans le vecteur d'expression avant d'entreprendre l'expression à grande échelle avec le meilleur système d'expression.

9.1.1 Dérivées d'*E. coli* K38

Afin d'exprimer une protéine fusionnée à une queue de six résidus d'histidine, une colonie d'un clone positif estensemencée dans 5 mL de milieu 2xTY contenant 60 μ g/mL d'ampicilline et de kanamycine. La souche est incubée à 30°C pendant la nuit et 1.25 mL de cette culture sont transférés dans 8.25 mL de milieu 2xTY/kan amp frais. Le tout est incubé à 30°C jusqu'à l'obtention d'une D.O.₆₀₀ entre 0.7 à 0.9. Les cellules sont ensuite placées à 42°C

durant 30 min suivi d'une incubation à 37°C pendant 3 heures. La culture est répartie en tubes Eppendorf en raison de 2 mL et centrifugée à 13 000 rpm pendant 10 min (Biofuge 13, Baxter Canlab, Heraeus Instruments). Le culot cellulaire est préservé à -80°C jusqu'à l'étape de la micro-purification.

9.1.2 Dérivées d'*E. coli* BL21(DE3)

La production de protéine recombinante à petite échelle dans les clones d'*E. coli* BL21(DE3) se fait de la même façon que celle décrite en 9.1.1. Cependant, il y a quelques modifications. Seul l'antibiotique ampicilline est ajouté au milieu 2xTY et la souche croît à 37°C. De plus, l'induction se fait par l'intermédiaire de 3 mM d'IPTG et les cellules sont incubées pendant 3 à 4 heures additionnelles.

9.2 Macro-méthode

La méthode à grande échelle consiste àensemencer un litre ou plus de culture d'*E. coli*. Pour ce faire, 20 mL d'une pré-culture sont inoculés dans chaque Erlenmeyer de 2 L contenant 1 L de milieu 2xTY frais contenant 60 µg/mL d'ampicilline. Les milieuxensemencés sont incubés à 37°C jusqu'à une D.O.₆₀₀ de 0.7 à 0.9. Une fois atteinte, 1.4 mL d'une solution stock d'IPTG 1M sont ajoutés par litre de culture. Le tout est incubé pendant 3 à 4 heures à 37°C pour induire la production de protéine qui sera accumulée dans des corps d'inclusion. Les cellules sont récupérées par centrifugation durant 10 minutes à 5000 rpm (centrifugeuse Sorvall

RC-5B, rotor GS-3) et lavées avec 20 mL de tampon A (500 mM NaCl et 160 mM Tris-HCl pH 8.0). Les cellules sont conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

10. PURIFICATION DES PROTÉINES

10.1 Chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA

10.1.1 Micro-purification dénaturante des protéines

La micro-méthode de purification dénaturante des protéines se fait selon le manuel d'instruction de QIAGEN (QIAexpressionist). Cette méthode permet de purifier rapidement les protéines produites aux sections 9.1.1 et 9.1.2. Les cellules obtenues aux sections 9.1.1 et 9.1.2 sont resuspendues dans 400 μ L de tampon B (8 M urée, 0.1 M phosphate de sodium et 0.01M Tris-HCl, pH 8.0) et mélangées doucement afin d'être lysées. Le lysat est centrifugé 10 min à 13 000 rpm dans une micro-centrifugeuse et le surnageant est récupéré. Un volume de 100 μ L de résine Ni-NTA 50% (p/v), équilibré dans le tampon B, est ajouté. La mixture est incubée à la température de la pièce pendant 30 min avec faible agitation et la résine est récupérée par centrifugation pendant 10 s. La résine est lavée trois fois avec 1 mL de tampon C (8 M urée, 0.1 M phosphate de sodium et 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3). Les protéines sont éluées par l'ajout de 30 μ L de tampon C contenant 100 mM d'EDTA. Ce dernier chélate les ions de nickel de la résine ce qui permet l'éluion de la protéine et donc la récupération de la protéine dans le surnageant suite à une centrifugation de 30 s.

10.1.2 Macro-purification dénaturante des protéines

La macro-méthode de purification des protéines est une modification de la micro-méthode de QIAGEN. Les cellules récupérées par centrifugation à 4000x g pendant 20 min sont resuspendues dans 20 mL de tampon B auquel 32 μ L de β -mercaptoéthanol sont ajoutés pour donner une concentration finale de 10 mM. Le tout est incubé à la température ambiante pendant une heure avec agitation afin de lyser les cellules. Suite à une centrifugation de 45 min à 18 000x g (Beckman J2-21, rotor JA-20), le surnageant est récupéré. À celui-ci sont ajoutés 3 mL de résine Ni-NTA 50 % (p/v) préalablement équilibrée et le tout est mélangé pendant une heure à la température ambiante.

Le mélange est ensuite chargé dans une colonne d'un cm de diamètre. Lorsque le volume exclu est passé, la résine est lavée avec 40 mL de tampon B suivi de 40 mL de tampon C (contenant 10 mM de β -mercaptoéthanol). La protéine est éluée de la colonne par l'ajout de 5 mL de tampon C contenant 100 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoéthanol et 10 % (v/v) glycérol. L'échantillon protéique pur est conservé à -80°C.

10.1.3 Purification native des protéines

La purification native se fait selon le protocole 5 du manuel d'instruction de QIAGEN. Quelques modifications ont été apportées au protocole. Le surnageant, suite à la lyse cellulaire, est récupéré par centrifugation à 18 000 rpm pendant 40 min et incubé en présence d'un mL de

résine Ni-NTA (au lieu de 8 mL) pendant une heure à 4°C. Le mélange est ensuite chargé dans une colonne d'un cm de diamètre. La résine est d'abord lavée avec 40 mL de tampon de lavage contenant 20 mM d'imidazole suivi de 40 mL de tampon de lavage contenant 40 mM d'imidazole. L'élution de la protéine est réalisée avec 3 mL de tampon de lavage contenant 200 mM imidazole et 10% (v/v) glycérol.

10.1.4 Purification des corps d'inclusion

Les protéines sont récupérées à partir des corps d'inclusions selon la méthode décrite par Soumounou et Laliberté (1994). Le culot cellulaire congelé à -80°C (obtenu par la méthode décrite à la section 9.2) est dégelé et resuspendu dans 8 mL de tampon A (500 mM NaCl et 160 mM Tris-HCl, pH 8.0). De plus, 2 mL de tampon A contenant 5 mg/mL de lysozyme sont ajoutés. Le tout est incubé 20 min à la température de la pièce afin de digérer la paroi cellulaire. Ensuite, trois cycles de congélation dans un bain de glace sèche/éthanol suivi de décongélation à la température de la pièce sont effectués. La lyse cellulaire est assurée par six cycles de sonication de 30 secondes. La lyse est vérifiée par examen au microscope et lorsqu'accomplie, la préparation est centrifugée à 10 000 rpm pendant 30 minutes (centrifugeuse Sorvall RC-5B, DuPont Instruments, rotor SA600). Le surnageant est décanté et les corps d'inclusions retrouvés dans le culot sont lavés deux fois avec un mélange de 4 mL de tampon A et 4 mL d'urée 4 M (2.4 g dissouts dans 10 mL de tampon A). Une centrifugation de 20 minutes à 8000 rpm permet de récupérer les corps d'inclusions dépourvus de protéines solubles. La protéine insoluble dans les corps d'inclusions est ensuite resuspendue dans 20 mL de tampon A contenant

6 M GuHCl, 5 mM β -mercaptoéthanol et 0.1% Tween 20. Les corps d'inclusions sont solubilisés pendant 30 minutes à la température de la pièce avec agitation occasionnelle. Les protéines solubilisées par le GuHCl sont récupérées par centrifugation à 15 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. La protéine retrouvée dans le surnageant est mise en présence de 1 mL de résine Ni-NTA 50% (v/v) équilibrée dans le tampon A (sans GuHCl). Le tout est incubé une heure à la température de la pièce avec agitation douce. Le mélange est ensuite chargé dans une colonne d'un cm de diamètre. Des lavages avec le tampon A contenant du GuHCl sont effectués jusqu'à ce que la D.O.₂₈₀ soit inférieure à 0.01. La résine est ensuite lavée avec 40 mL de tampon A sans GuHCl ce qui permet la renaturation de la protéine sur la colonne. La protéine est éluée par l'ajout de 3 mL d'imidazole 250 mM en tampon A.

10.2 Dosage des protéines

La méthode de Lowry *et al.* (1951) est utilisée pour doser les protéines en utilisant la fraction V de l'albumine sérique de bovin (BSA) comme standard.

10.3 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

10.3.1 Méthode automatisée (Phastsystem™)

La pureté des échantillons protéiques est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant de 12.5% (Phastgel™) par la méthode semi-automatisée, Phastsystem™ (Pharmacia LKB). Un volume de 5 μ L de tampon d'échantillon 3x (voir section

9.3) est mélangé à 10 μ L d'échantillon. Le tout est bouilli 10 min et 4 μ L est déposé sur un puits du peigne applicateur 6/4 de Pharmacia LKB.

Un standard de protéines de poids moléculaire connus (Bio-Rad) est aussi disposé sur un puits du peigne. Ce standard (LMW) comprend les protéines suivantes: le lysozyme (14.4 kDa), l'inhibiteur de trypsine de soya (21.5 kDa), l'anhydrase carbonique (31 kDa), l'ovalbumine (42,7 kDa), l'albumine de sérum bovin (66.2 kDa) et la phosphorylase b (97.4 kDa).

La migration se fait jusqu'à un temps de séparation de 70 Volts-heures (Vh). Les gels sont colorés au nitrate d'argent avec le kit commercial "Phastgel silver kit" selon le manuel d'instruction Phastsystem™ (Pharmacia LKB).

10.3.2 Méthode conventionnelle

L'électrophorèse en présence de SDS est effectuée selon la méthode conventionnelle établie par Laemmli (1970) afin de séparer une plus grande quantité de protéines. Une quantité connue d'échantillon est mélangée dans un rapport 4:1 avec du tampon d'échantillon 5x. Le mélange est bouilli pendant 10 min et est déposé dans un puits du gel de polyacrylamide dénaturant 9 %. La migration se fait à 50 v pendant 16 heures dans un tampon d'électrophorèse (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.00375% SDS, pH 8.3).

Le gel peut être coloré pendant une heure avec une solution de bleu de Coomassie (0.75 g bleu de Coomassie R-250, 250 mL de méthanol, 50 mL d'acide acétique et 200 mL d'eau

distillée). La décoloration se fait pendant une à trois heures dans une solution contenant du méthanol 30%, (v/v) et de l'acide acétique 7%, (v/v). En d'autres cas, le gel peut être coloré au nitrate d'argent avec la trousse commerciale "Silver Stain Plus" de Bio-Rad. Le gel est ensuite conservé dans une solution de glycérol 10%, (v/v) et peut être séché entre deux membranes de cellulose du kit "gel drying" de Promega selon les instructions du bulletin technique (fiche no. 91).

10.4 Extraction de protéine d'un gel SDS-PAGE

La bande protéique d'intérêt est excisée du gel à l'aide d'un scalpel stérile. Cette technique simple permet de purifier davantage l'échantillon obtenu à l'étape 10.1.2. L'échantillon est migré sur gel SDS-PAGE 9% et deux languettes de chaque côté du gel sont colorées au bleu de Coomassie afin de situer la protéine. La bande protéique est ensuite excisée et déposée dans un tube en plastique de 10 mL contenant 4 mL de PBS (0.45 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g de NaCl et 50 mg d'EDTA par litre d'eau distillée).

Le tout est incubé à la température de la pièce pendant deux heures avec agitation occasionnelle et, le tout est versé dans une seringue stérile de 10 mL. Le gel est morcelé par plusieurs passages d'une seringue à une autre en utilisant des aiguilles de plus petit diamètre à chaque fois. La préparation est ensuite transférée dans un nouveau tube de 10 mL et centrifugée 10 min à 3000 rpm. Le surnageant de protéine est récupéré et filtré sur membrane de 0.22 μm avant d'être congelé à -80°C .

11. IMMUNO-DÉTECTION

11.1 Production d'anticorps

Des anticorps polyclonaux ont été préparés en immunisant des lapines de race Nouvelle-Zélande âgées de quatre mois. Une prise de sang pré-immun a été effectuée sur chaque lapine, avant l'immunisation.

Une première injection d'environ 200 µg est réalisée de façon intramusculaire, suivie de deux injections additionnelles de 300 µg à des intervalles d'une semaine et de quatre semaines (voir figure 13). Lorsqu'un bon titre d'anticorps est obtenu, les lapines sont sacrifiées par ponction cardiaque.

L'adjuvant utilisé est l'émulsion MPL^R+TDM+CWS (RIBI Immunochem Research Inc., Cedar Lane, Ont.). L'adjuvant est chauffé 15 min à 45°C et est reconstitué avec 2 mL de PBS contenant une quantité connue de la protéine pure. Le tout est bien mélangé au vortex pendant quelques minutes avant injection.

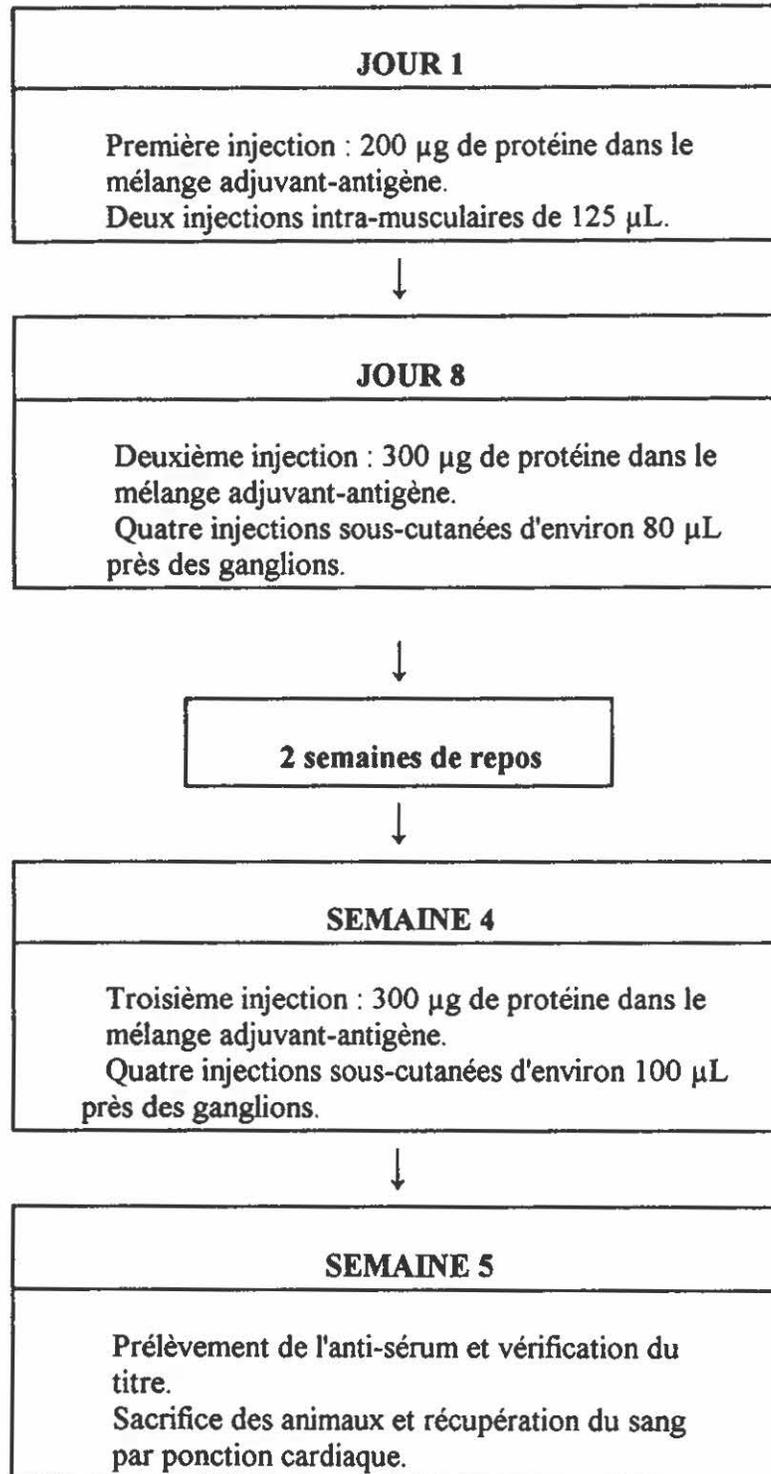


Figure 13 : Protocole d'immunisation des lapines pour la production d'anticorps

11.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

La méthode ELISA directe est employée pour déterminer la concentration d'anticorps obtenus par la méthode décrite à la section 11.1. Dans un plateau Linbro de 96 puits, 50 μL d'antigène dilué à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un tampon carbonate/bicarbonate 0.1 M, pH 9.5 sont déposés dans le fond des puits. La plaque est incubée pendant la nuit à 4°C. Après trois rinçages avec un tampon de lavage (solution de PBS contenant 0.1% (v/v) de Tween20), les sites libres sont bloqués avec 200 μL de tampon PBS contenant 2% (p/v) de lait écrémé. Le tampon PBS est composé de 520 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.35 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g de NaCl et 50 mg d'EDTA par litre d'eau distillée, pH à 7.2.

La plaque est incubée une heure à la température ambiante, suivi d'une deuxième série de trois lavages. Des dilutions par deux des anti-sérums à tester sont déposées à raison de 50 μL par puits. La plaque est incubée à 37°C pendant deux heures. Les puits sont ensuite rincés trois fois avec le tampon de lavage et 50 μL de conjugué HRP (horse radish peroxidase) anti-IgG de lapin produit chez l'âne sont ajoutés. Cet anticorps est d'abord dilué 1:1000 dans du PBS contenant 2% (p/v) de lait écrémé. La plaque est incubée de nouveau pendant 90 min à 37°C. Les puits sont lavés cinq fois et 50 μL d'un mélange (1:1) de peroxidase triméthyl benzidine (TMB) et peroxidase, solution B sont ajoutés. La plaque est agitée délicatement et incubée à la température ambiante pendant 15 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 μL d'acide phosphorique 1M et les lectures de densité optique se font à 450 nm à l'aide de l'appareil Multiscan (Titertek Multiskan, Flow laboratories, Inc., McLean, Va.).

11.3 Transfert de protéines sur membrane de nylon

Le transfert des protéines sur membrane de nylon est réalisé selon Towbin *et al.* (1979). Les protéines séparées en SDS-PAGE (section 10.3.2) sont transférées sur la membrane avec l'appareil Trans-blot SD (semi-dry transfer cell) de Bio-Rad. Le gel préalablement équilibré pendant 30 min dans le tampon de transfert est placé sur la membrane de nylon (Boehringer Mannheim) et le tout se retrouve entre deux feuilles de papier buvard trempées dans le tampon de transfert (2.93 g de glycine, 5.81 g de Tris et 3.75 mL de SDS 10%, (p/v) par litre d'eau distillée). Ce montage est assemblé entre les deux électrodes de l'appareil. Le transfert est effectué à 25 V pendant une heure pour un gros gel (16 x 16 x 0.15 cm) ou à 15 V pendant 20 min pour un petit gel (8 x 10 x 0.05 cm). La membrane est ensuite séchée pendant une heure à la température ambiante.

11.4 Immuno-détection des protéines

Les protéines transférées sur une membrane de nylon (section 11.3) sont détectées à l'aide d'anticorps spécifiques. La membrane est trempée pendant une heure dans 10 mL de PBS contenant 3 % (p/v) de lait écrémé. Après incubation, le tampon est décanté et la membrane est incubée de nouveau dans 20 mL de tampon frais contenant de 50 à 150 μ L d'anticorps, tout dépendant du titre de l'anticorps. L'incubation se fait pendant deux heures à la température ambiante. Après, trois lavages de 10 min sont effectués avec du tampon PBS contenant 0.5% (v/v) de Triton X-100 suivi d'un lavage de 15 min avec le tampon PBS. Par la suite, la

membrane est incubée une heure dans 10 mL de tampon PBS contenant 3 % (p/v) de lait écrémé et 2 μ L de la protéine A marquée à l'iode radioactif (125 I, ICN). La membrane est lavée de nouveau, trois fois 10 min avec le tampon PBS contenant 0.5% (v/v) de Triton X-100.

La membrane est séchée et l'autoradiographie entre deux écrans d'intensification Hi-Plus (DuPont) sur film Kodak BIOMAX MR à -80°C est effectuée. La durée de l'exposition varie selon l'intensité du signal.

12. DÉTECTION DE LA LIAISON D'ATP

La détermination de la liaison de l'ATP à une protéine est effectuée avec le kit commercial "ATP-binding protein detection kit" de Boehringer Mannheim. L'échantillon protéique purifié par la méthode décrite à la section 10.1.2 est d'abord dialysé contre du tampon PBS pH 7.0 pendant 24 heures à 4°C. Une quantité de 0.5 μ g de protéine est ensuite incubée avec 1.0 mM FSBA (dilué dans du DMSO) pendant 20 min à 30°C. Le FSBA est un analogue à l'ATP qui reconnaît et modifie les sites de liaison des nucléotides. La mixture est ensuite bouillie dans le tampon SDS-PAGE et migrée sur un gel de polyacrylamide dénaturant selon la méthode décrite à la section 10.3.2.

La protéine modifiée-FSBA est transférée sur une membrane de nitrocellulose selon la technique décrite à la section 11.3. La membrane est ensuite incubée 30 minutes à la température de la pièce avec 10 mL de tampon Tris-NaCl (TBS), pH 7.4 contenant 2 % (p/v) de gélatine. Le TBS est constitué de 8.8 g de NaCl et 6 g de Tris par litre d'eau déionisée.

L'incubation se fait dans un tube à hybridation. La membrane est ensuite lavée trois fois, cinq min chaque fois avec le TBS contenant 0.1% Tween20 (TBS-Tween). Ceci permet d'enlever la gélatine en excès. Par la suite, la membrane est incubée dans 5 mL de TBS-Tween contenant 10 μ L d'anticorps anti-FSBA reconstitués (dilution finale de 1 μ g/ μ L). L'incubation se fait pendant 2 heures à la température de la pièce dans le four à hybridation. Trois lavages au TBS-Tween de cinq minutes sont ensuite effectués à la température de la pièce.

La membrane de nylon est ensuite incubée dans 12 mL tampon TBS-Tween contenant 3 μ L d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline. L'incubation se fait pendant 30 min avec une agitation douce. Quatre lavages de cinq min sont effectués avec le TBS. Les complexes anticorps/antigènes sont détectés par la réaction colorimétrique avec les substrats de la phosphatase alcaline, soit le chlorure de 4-nitrobleu tétrazolium (NBT) et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP). Un tampon de Tris-HCl 0.1M, pH 9.5 comprenant les ingrédients suivants est d'abord préparé : 6.06 g de Tris, 5.08 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ et 2.92 g de NaCl dissouts dans un volume final de 500 mL d'eau distillée. À 20 mL de ce tampon sont ajoutés 100 μ L de NBT et 75 μ L de (BCIP). La membrane est placée dans ce mélange sans agitation et ce jusqu'à l'apparition de bandes. La membrane est rincée à l'eau afin d'arrêter la réaction.

13. SÉQUENCAGE DE L'EXTRÉMITÉ N-TERMINALE

Un échantillon de protéines partiellement purifiées est chargé sur un gel SDS-PAGE

12.5% d'une épaisseur de 0.75 mm, préparé selon le protocole de Laemmli (1970) décrit à la section 10.3.2.

Le transfert des protéines sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) est réalisé selon le protocole de Matsudaira (1987). Le transfert se fait à 250 mA pendant 15 min dans le tampon de transfert (10 mM CAPS, 10% méthanol, pH 11.0 ajusté avec du NaOH) à l'aide de l'appareil Multiphor II Nova Blot de Pharmacia LKB.

La membrane est ensuite lavée pendant 20 minutes à l'eau déionisée et colorée au bleu de Coomassie R-250 0.1%, (p/v) contenant 50% de méthanol. La décoloration se fait pendant cinq min maximum avec une solution de décoloration (50% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial). La membrane est séchée et préservée à -20°C à l'obscurité. Le service de séquençage de l'Institut de Recherche en Biotechnologie a réalisé la séquence de l'extrémité N-terminale de la protéine par dégradation d'Edman.

14. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE

14.1 Poids moléculaire

Le poids moléculaire de la protéine a été évalué par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant selon la méthode décrite à la section 10.3.1. Une régression linéaire du poids moléculaire de la protéine en fonction de la distance de migration du standard protéique permet de déterminer le poids moléculaire de la protéine.

14.2 Point isoélectrique

Le point isoélectrique (pI) d'une protéine est déterminé par focalisation isoélectrique (IEF) sur un gel de polyacrylamide contenant des ampholytes. La migration se fait dans l'appareil Phastsystem™. Les ampholines forment un gradient de pH 3 à pH 9 (Phastgel™ 3-9) suite à une pré-électrophorèse jusqu'à 75 Vh. Un échantillon protéique de 4 µL est ensuite appliqué et migre pendant 410 Vh. Un standard de protéines de pI connu migre en parallèle. Ce standard (IEF calibration kit, pH 3-10, Pharmacia, LKB) comprend les protéines suivantes: amyloglucosidase (pI-3.5), inhibiteur de trypsine de soya (pI-4.55), β-lactoglobuline A (pI-5.2), anhydrase B carbonique de bovin (pI-5.85), anhydrase B carbonique humain (pI-6.55), bande acide de myoglobine (pI-6.85), bande basique de myoglobine (pI-7.35), bande acide de lectine de lentille (pI-8.15), bande moyenne de lectine de lentille (pI-8.45), bande basique de lectine de lentille (pI-8.65) et trypsinogène (pI-9.3). Suivant la migration, les protéines sont révélées en colorant le gel au nitrate d'argent avec le kit commercial "Phastgel silver kit" selon le manuel d'instruction Phastsystem™ (Pharmacia LKB).

RÉSULTATS

1. CONSTRUCTIONS GÉNÉTIQUES

1.1 Amplification du gène *msiK* par PCR

La figure 14 représente la séquence corrigée du gène *msiK*. La séquence originale du gène isolé et séquencé par Hurtubise (1994) avait un cadre de lecture ouvert (ORF) de 942 nucléotides débutant par un codon ATG (nucléotide 406) et se terminant par un codon TGA (nucléotide 1348) codant pour une protéine de 314 acides aminés dont le poids moléculaire calculé serait de 33 878 daltons.

Une erreur de séquençage a été retrouvée dans la région indiquée par quatre flèches consécutives (nucléotides 1325 à 1328). Cette séquence révisée contient quatre bases de cytosine consécutives au lieu de trois. La séquence corrigée du gène *msiK* a donc un cadre de lecture ouvert de 1136 nucléotides débutant par un codon ATG (nucléotide 406) et se terminant par un codon TGA (nucléotide 1540) codant pour une protéine de 378 acides aminés dont le poids moléculaire calculé serait de 40 483 daltons (Hurtubise *et al.*, 1995). Le contenu en G + C est de 68.7% et la troisième base de chaque codon est essentiellement une guanine ou une cytosine (plus de 90%) ce qui correspond au contenu habituel de l'ADN de *Streptomyces* (Bibb *et al.*, 1984).

Le fragment *KpnI/BamHI* du plasmide pIAF48 a été utilisé comme matrice pour l'amplification élective *in vitro* (PCR) du gène *msiK*. La méthode de PCR est décrite à la section 6.1 des matériels et méthodes. L'oligonucléotide MsiK5 (nucléotides 406-420) a permis

aa#		nt#
	CTCCCGAAGCCCGGCACGGTCTCGCAGGCCGAACCCCTGCCGGAGGGCAATAGCGCCCCGGCAACCCGAAGG	72
	GACCCCCGATCCAGGATCGCGGGGGTCTGGCCGGCTGCGGAGCCCCTGTCGGATTCTGAACCGACGAC	144
	CTTCGCTTACAAGAGCGGCGCTCTGACCAGCTGAGCTAAGGAGGCACGCGTCGGGGCGCGCAGGCTGCTC	216
	CACTGTACACAGAGCCGGTGAACGATGTGATCGGAAAATTCGGCGGAATTCACAGACTCCAGCTACTGAC	288
	AGATCAGGTGAACGCCGGTACCGTCTGCTCAGCTTACCCTGTGGACTACACCACCACCTTCTTACAAC	360
	GGATCGTCCGGCACGTTCTGCCGGTAGAAGGGGGCCCTTTCACCATGGCCACTGTTACGTTTCGACAAGGCG	432
9	ACCCGTGTGTACCCGGGTTCCACGAAGCCCGCGTGCAGCGTCTCGACATCGACATCGCGGACGGCGAGTTC	504
33	T R V Y P G S T K P A V D G L D I D I A D G E F	
	CTCGTCTGGTCCGGCCGTCGGTGTGGCAAGTCCACCTCGCTCCGGATGCTCGCCGGGCTCGAGGACGTG	576
57	L V L V G P S G C G K S T S L R M L A G L E D V	
	AACGGGGCGCCATCCGCATCGGTGACCGGACGTGACGCACCTGCCGCCGAAGGACCGGGGACATCGCCATG	648
81	N G A I R I R Q K V E E A A K I L D L T E Y L	
	GTGTTCCAGAACTACGCGCTGTACCCGCACATGTGGTCCGCCGACAACATGGGCTTCGCCCTCAAGATCGCC	720
105	V F Q N Y A L Y P H M S V A D N M G F A L K I A	
	GGCGTCAACAAGGCGGAGATCCGGCAGAAGGTGAGGAGGCGCGAAGATCCTCGACCTCACCGAGTACCTG	792
129	G V N K A E I R Q K V E E A A K I L D L T E Y L	
	GACCGCAAGCCGAAGCGCTCTCCGGCGGTACGCGCCAGCGTGTGGCGATGGGCCGCGGATCGTCCGTGAG	864
153	D R K P K A L S G G Q R Q R V A M G R A I V R E	
	N	
	aAC	
	CCGCAGGTGTTCTCATGGACGAGCCGCTGTCCAACCTGGACGCCAAGCTCCGGTCTCCACGCCGTACGCAG	936
177	P Q V F L M D E E L S N L D A K L R S P R R T Q	
	ATCGCCTCGCTCCAGCGCCGCTGGGCATCACCACCGTCTACGTCACCCACGACCAGGTCGAGGCCATGACG	1008
201	I A S L Q R R L G I T T V Y V T H D Q V E A M T	
	ATGGGCGACCGCGTGGCGTCTCAAGGACGGTCTGCTCCAGGCAGGTCGACTCCCGCGGAACATGTACGAC	1080
225	M G D R V A S S R T V C S R Q V D S P R N M Y D	
	AAGCCCGCAACCTCTTCGTCGCGCGCTTTCATCGGCTCCCGCGCCATGAACCTGGTCGAGGTCCCGATCACC	1152
249	K P A N L F V A G F I G S P A M N L V E V P I T	
	GACGGCGCGTGAAGTTCGGCAACAGCGTCCCGGTCACCCGCGACGCCCTGAAGCGCCGCTCCGACAAG	1224
273	D G G V K F G N S V V P V N R D A L K A A S D K	
	GGCGACCGCACGGTCCCGTCCGGTCCCGCCGGAGCACTTCGACGTCGTGGAGCTGAACGGCGCGCGGCC	1296
297	G D R T V T V G V R P E H F D V V E L N G G A A	
	AAGACCCTGTCGAAGGACTCGGGCGGACGCCCGCGGCTCGCGGTCTCGGTGAACGTCGTGGAGGAGACC	1368
321	K T L S K D S A D A P A G L A V S V N V V E E T	
	GGCGCCGACGGCTACATCTACGGCACGGTTCGAGTTCGGCGGAGACGAAGGACCTCGTGGTCCCGCTCAGC	1440
345	G A D G Y I Y G T V E V G G E T K D L V V R V S	
	AGCCCGCGGTCGCGGAGAAGGGCGGACCGTCCACGTCGTGCCGCTCCGGGCGAGATCCACGTGTTCTCG	1512
369	S R A V P E K G A T V H V V P R P G E I H V F S	
	TCCTCCACGGGCGAGCGCCTCACCGACTGAGAAACCACGCGACCGGGTGATTTACCCCCGCGTTGACGAAAA	1584
378	S S T G E R L T D -	
	GAGCCCCGGGCTGCTGCGGGGCTCTTTTCGTTGTGACAAAATACCCCGGCACAACGGACGTTTCGACCGA	1656
	TGTTTCGTCGAATCTCTATCCCGTTCGCGCGCTCTTCTACCCCGTTCAGGTTGGACTAAATGTCGCAAAT	1728
	CATTACCGGGCGTACCCTCACTCGCGTGAAGCACTCCGTGAAGCCACTCCACCCACCCCGACAGACGCG	1800
	ACGCGGCGGGGCCCCGCGCGGATCGGCGGCTCTCTCGCCTTCGTCCTGCCGTCGTCCTGGTGTCT	1872
	CCGGGACTTCTCGGTCAACCGCGTCAACTGGTCCGGGGATCCTCGGACTCGGTGCTCGCCGCGTCGGAGGC	1944
	CACCTCGCCAAAGGCTCCTCCGCCCGGCCCCGACAGGTTGCTGCGCGACCGGCTGCTGACCGAGTTGCA	2016
	GGAGGAGACCCCGGCGTCCGCGTACCCACCTCCAGCAGGCGGTGAACGAGCGCCCGTCCGTCGGCCGACCA	2088
	CTGCGGACCATCGCCCGGCGCTCGGCGCGCGCGGTGAAGGTCTACGGCCGACGCGCGCCAGTCGA	2160
	CGCCCGTCCCGTCTGCGACACCGCCTTCGCTCGGGGCTCCTGGCCGCGCACGGCTAGGACCTCCGGAGGC	2232
	GGCTGGGGCGCGGCTACAGTTCGGGCATGACCGATCCGACGCGCGTCCCGCCCCGTTCAAGCCGGTCT	2304
	CCTGGCCGGCGGGCAGGTTCCCGCTGCGCCCCACACCGACGACCGGCCAAGCCGATGGTCGAGATCCC	2376
	GGGCCGGACCCCGATCATCGGCATA	2403

Figure 14 : La séquence du gène *msiK*. Les quatre flèches consécutives (nucléotides 1325-1328) indiquent la région de l'erreur du séquençage. Le site de restriction reconnu par l'enzyme *BalI* est en gras. La flèche désigne le site de coupure par l'enzyme.

d'insérer un site d'attachement aux ribosomes (RBS), suivi des sites de restriction *EcoRI* et *SacI*, ainsi qu'une queue de six résidus histidine du côté N-terminal. Cette queue de polyhistidine facilitera la purification du produit de ce gène recombinant. L'amorce MsiK3, basée sur la séquence non-correctée, a permis l'insertion des sites de restriction *BamHI* et *SacI* à l'extrémité C-terminale (nucléotides 1334-1351).

Le résultat de ce PCR est présenté à la figure 15. Un amplicon (*msiK*-6his TR) de 1,0 kb a été obtenu tel que prévu. Celui-ci a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI* et inséré dans M13mp18 et M13mp19. Ceci a permis de séquencer le gène recombinant afin d'assurer la présence de la queue de polyhistidine. L'ADN simple brin est utilisé comme matrice. Le séquençage a été fait selon la méthode de Sanger *et al.* (1977). Les données obtenues par le séquenceur ALF ont été ensuite analysées par le programme ALF Manager (IBM).

L'amplicon ayant les bases codant pour une queue de polyhistidine en amont des premiers acides aminés du produit du gène, est ensuite digéré avec les enzymes de restriction pertinents pour l'insertion du gène *msiK* recombinant dans les vecteurs d'expression appropriés (section 2.0 des résultats). Puisqu'il a été démontré par les anticorps anti-MsiK que le produit de ce gène recombinant donne lieu à une protéine tronquée (section 7.2 des résultats), les oligonucléotides MsiK-FL (nucléotides 1893-1907), MsiK3-1 (nucléotides 1893-1916), MsiK3-2 (nucléotides 1642-1656), MsiK3-3 (nucléotides 1528-1542), MsiK3-4 (nucléotides 1517-1542) et MsiK3-5 (nucléotides 1630-1656) ont ensuite été synthétisés afin d'amplifier le gène

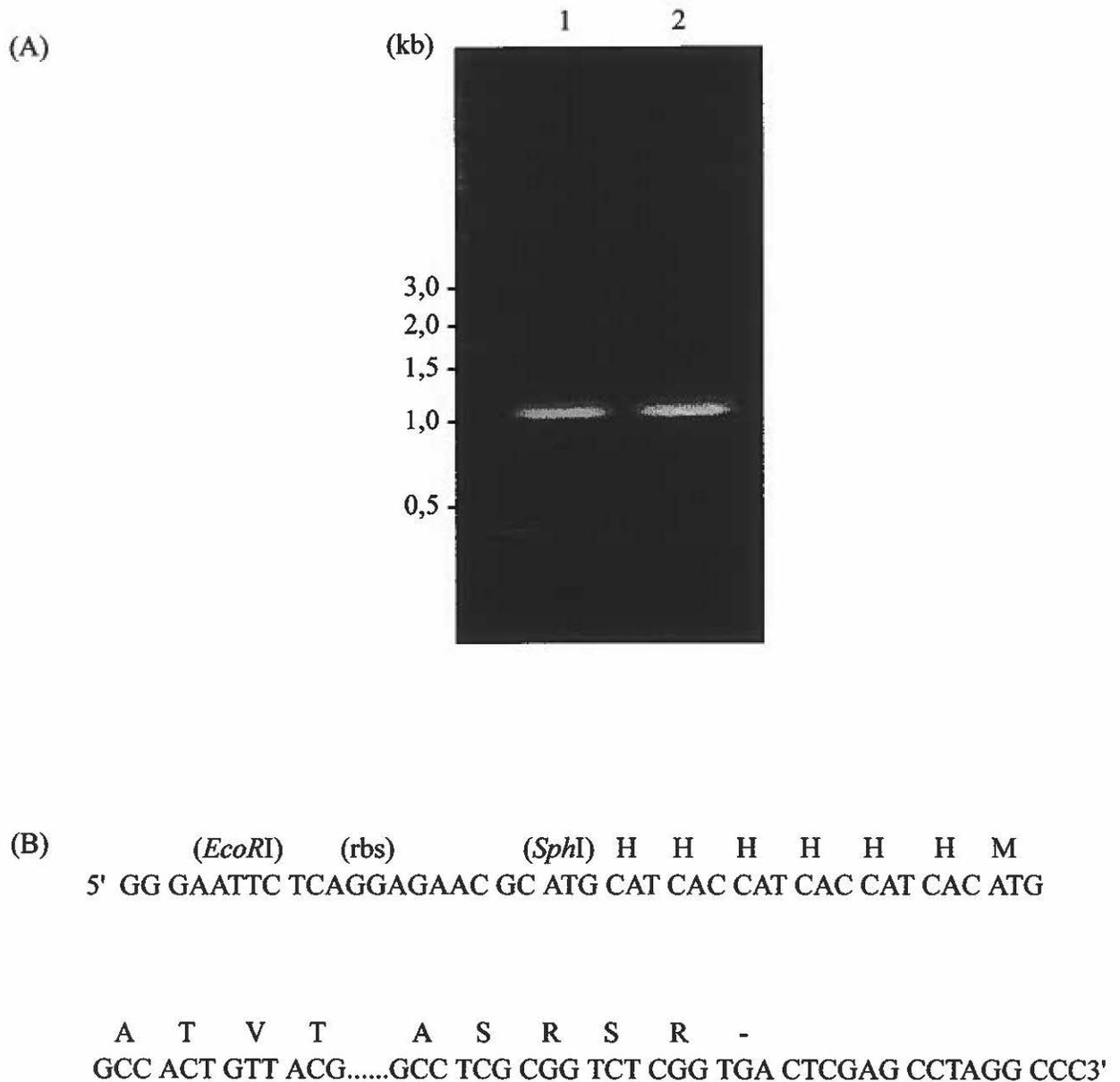


Figure 15 : Résultat de l'amplification élective *in vitro* du gène *msiK*.

(A) Migration des amplicons MsiK-TR en gel d'agarose 0.7% .

Puits 1 et 2 : l'amplicon msiK-6his TR

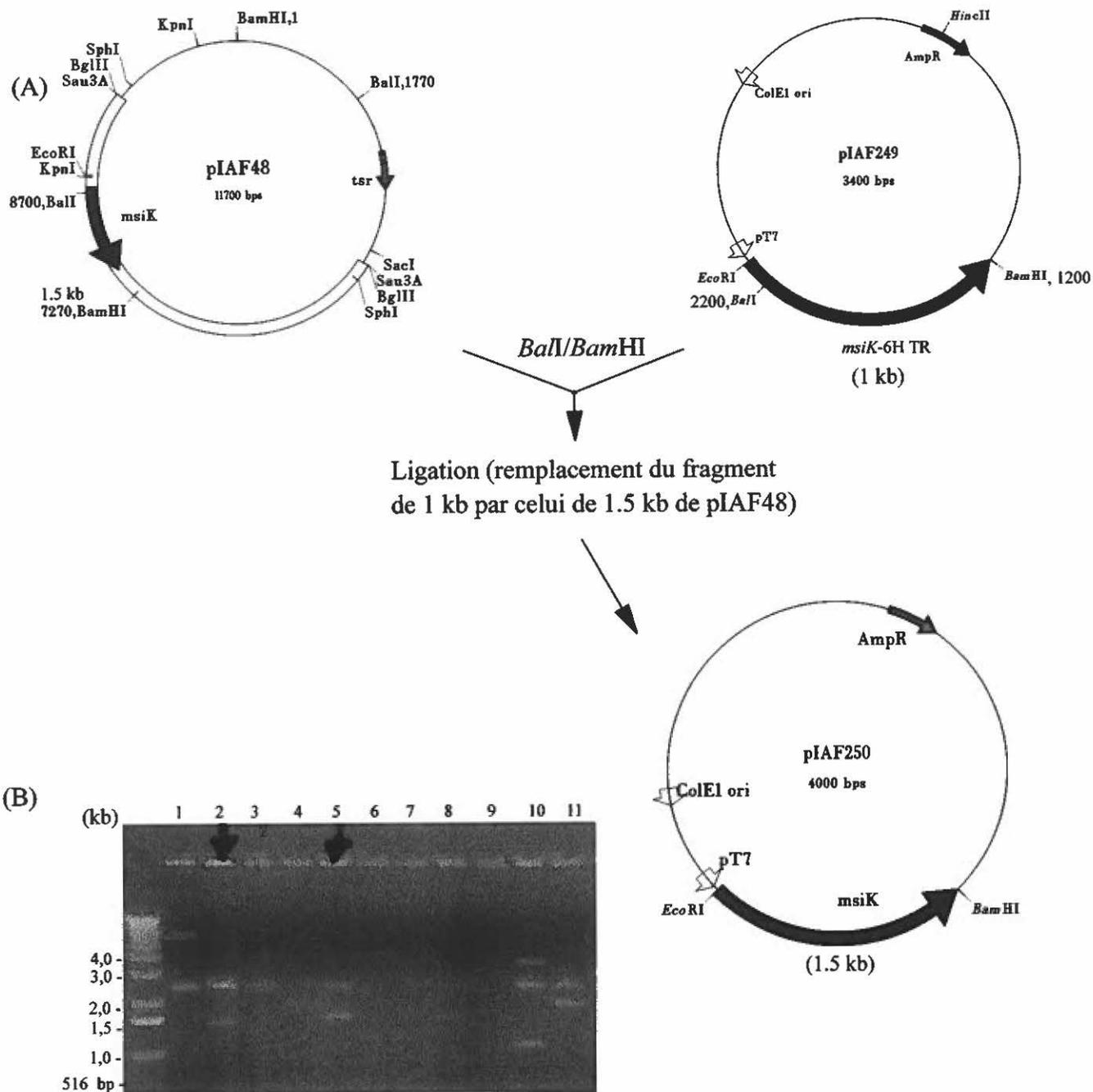
(B) La séquence des extrémités 5' et 3' de l'amplicon MsiK-TR

recombinant entier (tableau 5 des matériels et méthodes). Cependant, après de nombreux essais de PCR, l'amplification de *msiK* recombinant pleine longueur fut négative. Une seconde approche a donc été entreprise afin d'obtenir le gène *msiK* recombinant.

Il est important de noter que le gène muté provenant de la souche *S. lividans* 10-164 a aussi été amplifié de la même façon que le gène *msiK* de *S. lividans* 1326. Le résultat a aussi donné lieu à un amplicon (*msiK*-6his TR muté) d'environ 1000 paires de bases. Celui-ci a aussi été séquencé et digéré avec les enzymes pertinents pour l'insertion dans les vecteurs d'expression.

1.2 Obtention du gène *msiK* recombinant par clonage

La méthode alternative pour l'obtention du gène *msiK* recombinant est celle du sous-clonage. Le but de cette expérience était d'obtenir l'extrémité C-terminale manquante du gène *msiK* tronqué. Ainsi pour ce faire, les plasmides pIAF48 et pIAF249 ont été digérés avec *BalI* et *BamHI* (figure 16 A). L'enzyme *BalI* a été choisie car il reconnaît le site de restriction unique (nucléotides 407-412) situé près de l'extrémité N-terminale du gène. Puisque une digestion *BalI* donne une extrémité franche (5'TGG↓CCA3'), des quantités équimolaires de chaque digestion plasmidique ont été utilisées pour faire cette ligation. Cette dernière consistait donc à remplacer le fragment de 1,0 kb (gène *msiK* tronquée) de pIAF249 par celui de 1,5 kb (gène *msiK* entier) provenant de pIAF48. Des cellules compétentes d'*E. coli* BL21(DE3) et de DH11S ont été transformées avec le produit de ligation et étalées sur milieu solide 2xTY contenant de



l'ampicilline.

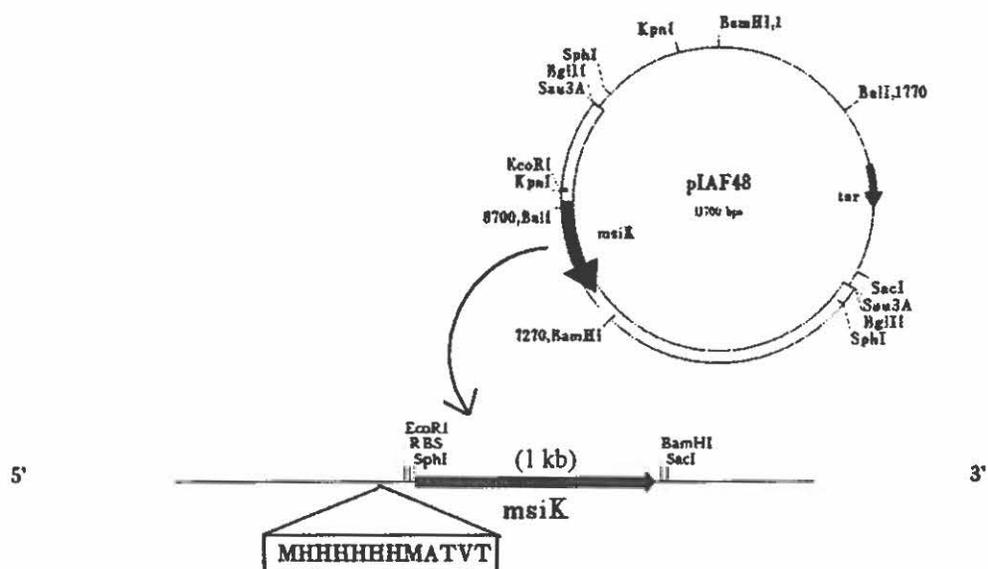
Les transformants ont été repiqués dans du milieu 2xTY + ampicilline afin de faire les mini-préparations plasmidiques. Les plasmides isolés ont ensuite été digérés avec *EcoRI* et *BamHI* et les bandes séparées sur gel d'agarose 0.7%. Le résultat de ces analyses plasmidiques est retrouvé à la figure 16 B. Le gène *msiK* recombinant pleine longueur (fragment de 1500 pb) a été isolée des clones #2 et #5 de DH11S. Cependant, aucun clone positif chez BL21(DE3) n'a été obtenu . Le plasmide portant l'insert de 1,5 kb isolé d'*E. coli* DH11S a été nommé pIAF250.

2. CLONAGE DES AMPLICONS DANS LES VECTEURS D'EXPRESSION

2.1 Construction des plasmides pIAF249 et pIAF249m

La construction du plasmide pIAF249 qui permet la sur-expression du gène *msiK* recombinant tronqué chez *E. coli*, est schématisée à la figure 17. Ce plasmide a été obtenu en digérant l'amplicon *msiK*-6his TR et le vecteur d'expression, pT7-5, avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI* afin de cloner ce fragment *EcoRI/BamHI* (1.0 kb) de l'amplicon dans le vecteur pT7-5.

Par ailleurs, l'amplicon *msiK*-6his TR muté a aussi été cloné dans ce vecteur d'expression de la même façon afin de construire le plasmide pIAF249m. Ce plasmide permet l'expression de la protéine recombinante tronquée mutée chez *E. coli*.



Amplification par PCR du fragment *KpnI/BamHI* avec les amorces MsiK5 et MsiK3

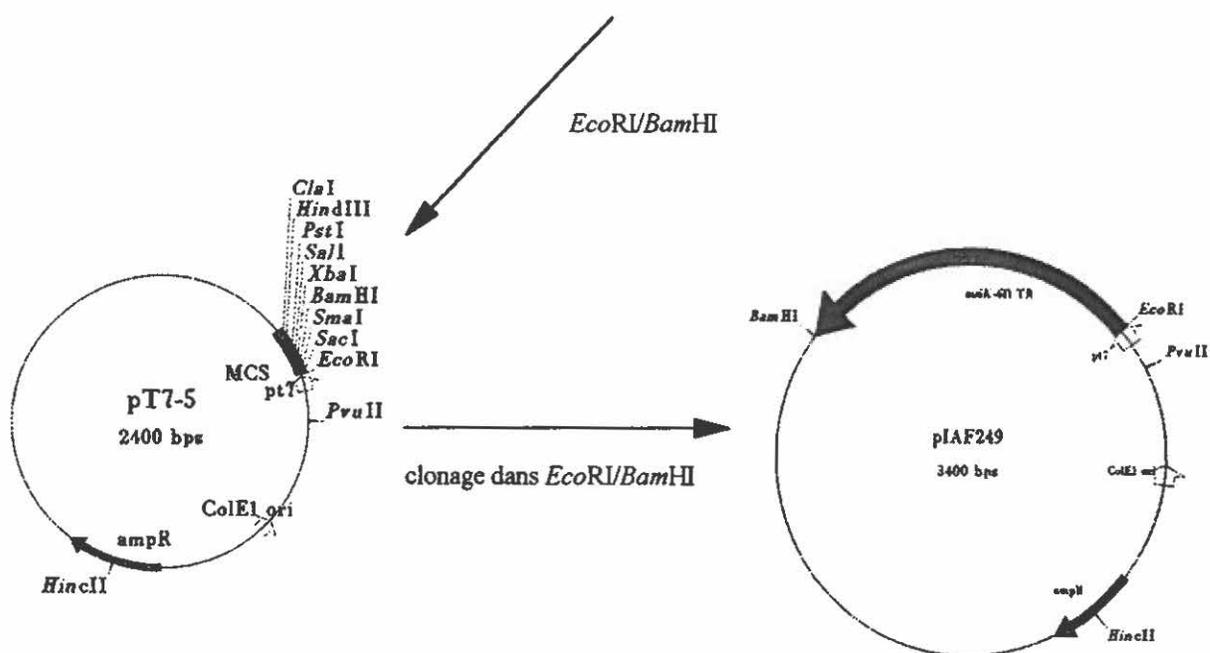


Figure 17 : Construction du plasmide pIAF249.

2.1.1 Transformation d'*E. coli* K38

La souche *E. coli* K38/pGP1-2 a d'abord été utilisée afin de sur-exprimer la protéine recombinante MsiK. Pour ce faire, des cellules compétentes de cette souche ont été transformées avec pIAF249 et étalées sur milieu solide 2xTY + ampicilline + kanamycine. Les transformants résistants à l'ampicilline et à la kanamycine ont ensuite été repiqués et les plasmides analysés. Un clone positif a été obtenu et celui-ci a été nommé *E. coli* K249.

La souche *E. coli* K38/pGP1-2 a aussi été transformée avec pIAF249m pour donner le clone *E. coli* K249m. Ce clone permet la sur-expression du gène *msiK* tronqué muté.

2.1.2 Transformation d'*E. coli* BL21(DE3)

La souche *E. coli* BL21(DE3) a également été utilisée comme alternative à la souche *E. coli* K38/pGP1-2 pour la production de MsiK recombinant. Des cellules compétentes de BL21(DE3) ont été transformées avec les plasmides pIAF249 et pIAF249m et étalées sur milieu 2xTY solide contenant l'ampicilline. Les clones positifs obtenus ont été nommés *E. coli* BL21/pIAF249 et BL21/pIAF249m, respectivement

Les plasmides #2 et #5 isolés de la souche DH11S (section 1.2 des résultats) ont aussi été transférés par transformation dans des cellules compétentes de BL21(DE3). Ce clone portant pIAF250 a été désigné *E. coli* BL21/pIAF250.

2.2 Construction des plasmides pIAF49 et pIAF50 et transformation de 10-164

Le plasmide pIAF49 a été construit en digérant l'amplicon *msiK*-6his TR et le vecteur pIJ702 avec les enzymes de restrictions *SphI* et *SacI* (figure 18A). Le fragment *SphI/SacI* provenant de l'amplicon a ensuite été cloné dans pIJ702 en aval du promoteur du gène *melC*. Des protoplastes de *S. lividans* 10-164 ont ensuite été transformés avec le produit de la ligation et étalés sur milieu R5. Les colonies blanches ont été repiquées sur milieu RBB-xylane afin d'observer la présence d'une zone d'hydrolyse autour de la colonie. Les clones positifs, donnant des zones d'éclaircissement semblables à celle de la souche sauvage, ont été analysés et le clone portant le plasmide pIAF49 a été nommé *S. lividans* IAF49.

D'autre part, le plasmide pIAF50 a été construit en digérant le plasmide pIAF250 avec les enzymes *SphI* et *BamHI* (figure 18B). En parallèle, le plasmide pIJ702 a été digéré avec les enzymes *SphI* et *BglII*. Le fragment *SphI/BamHI* de pIAF250 a ensuite été cloné dans les sites *SphI/BglII* de pIJ702. Des protoplastes de *S. lividans* 10-164 ont été transformés avec le produit de ligation et étalés sur milieu R5. Les colonies blanches ont été analysées sur milieu solide RBB-xylane. Des zones d'éclaircissement semblables aux zones produites par la souche sauvage ont été obtenues autour de plusieurs clones. Ceux-ci ont été analysés et porte pour nom *S. lividans* IAF50.

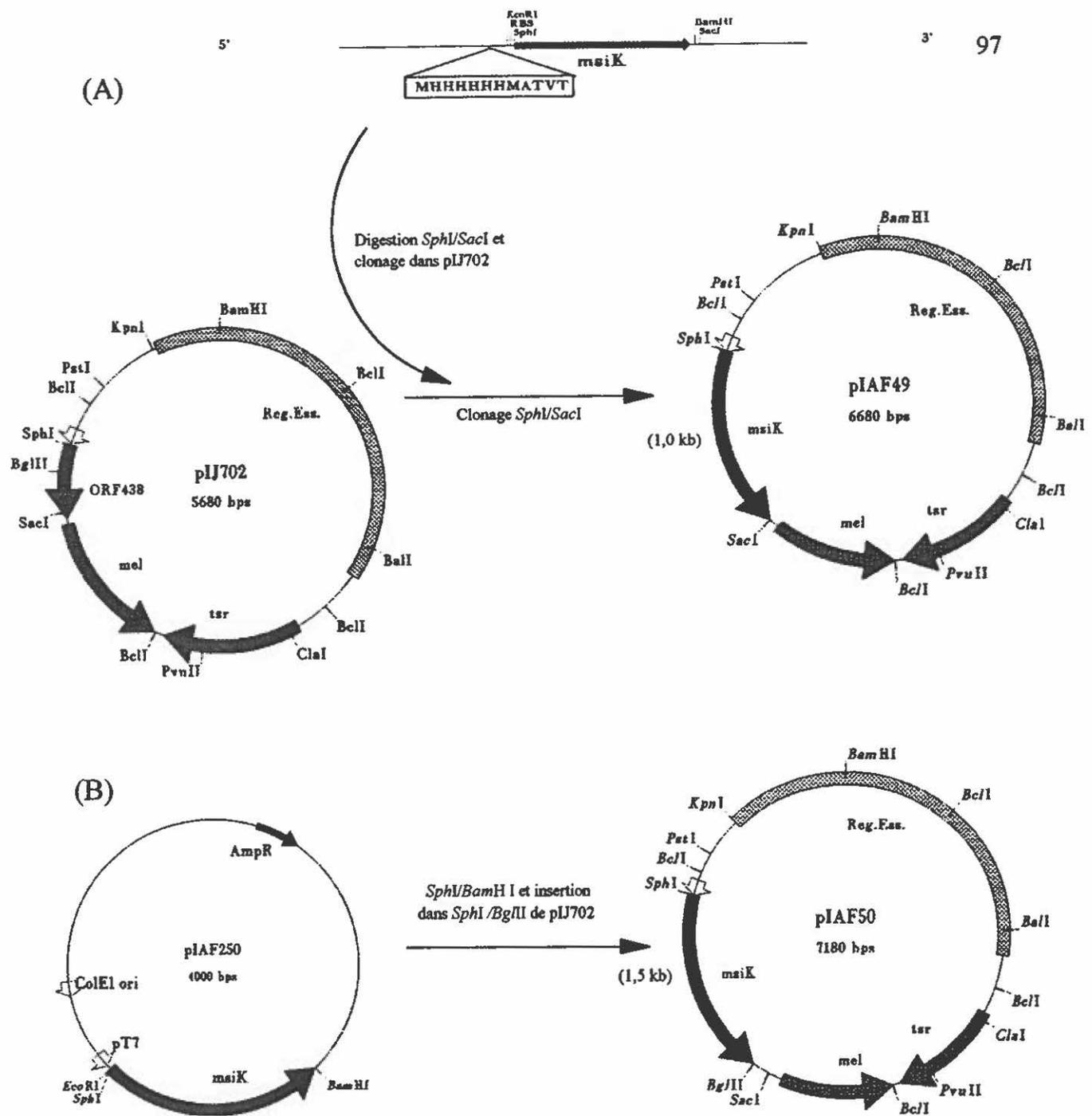


Figure 18 : Constructions des plasmides pIAF49 et pIAF50.

- (A) Amplification du gène *msiK* par PCR suivi d'une digestion de l'amplicon de 1,0 kb avec *SphI/SacI* pour l'insertion dans le plasmide pIJ702. Ce plasmide sert à l'expression du gène de la protéine MsiK tronquée chez *S. lividans*.
- (B) Le plasmide pIAF50 a été construit en digérant pIAF250 avec *SphI/BamHI* et le fragment de 1.5 kb a été cloné dans *SphI/BglII* de pIJ702. Ce plasmide sert à l'expression du gène de la protéine pleine longueur chez *S. lividans*.

3. MISE AU POINT D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION CHEZ *E. coli*

Les premiers essais d'expression ont été faits avec les constructions chez *E. coli* K38/pGP1-2 puisque c'était la souche disponible à l'époque. Les conditions de culture du protocole d'expression protéique de QIAexpressionist de QIAGEN ont été légèrement modifiées afin de les adapter à la souche K38/pGP1-2 (section 4.2.1). La mise au point de ce système d'expression a été réalisée avec la micro-méthode. Des prélèvements selon le temps ont été effectués afin d'optimiser l'expression. Suite à l'expression (section 9.1.1), la protéine a été purifiée selon la micro-méthode de QIAexpressionist de QIAGEN (section 10.1.1). La meilleure expression obtenue était à 37°C pendant 2 heures. Une incubation plus longue ne permettait pas d'obtenir une plus grande quantité de protéines. Par contre, la quantité de protéines obtenue par ce système d'expression n'était pas suffisante.

Une deuxième approche pour sur-exprimer la protéine MsiK a été réalisée avec les clones obtenus chez la souche *E. coli* BL21(DE3) (section 2.1.2) selon le protocole QIAexpressionist de QIAGEN (section 9.1.2). Au départ, des échantillons ont été prélevés selon le temps afin d'optimiser l'expression chez cette souche. Cette fois-ci, la meilleure expression a été obtenue suite à une incubation de 4 heures à 37°C après l'ajout de 3 mM d'IPTG. Des prélèvements ont été effectués jusqu'à 6 heures d'incubation, cependant la différence au niveau de la quantité de protéines obtenue entre 4 h et 6 h d'expression n'était pas significative. Ces deux systèmes de micro-expression sont comparés à la figure 19.

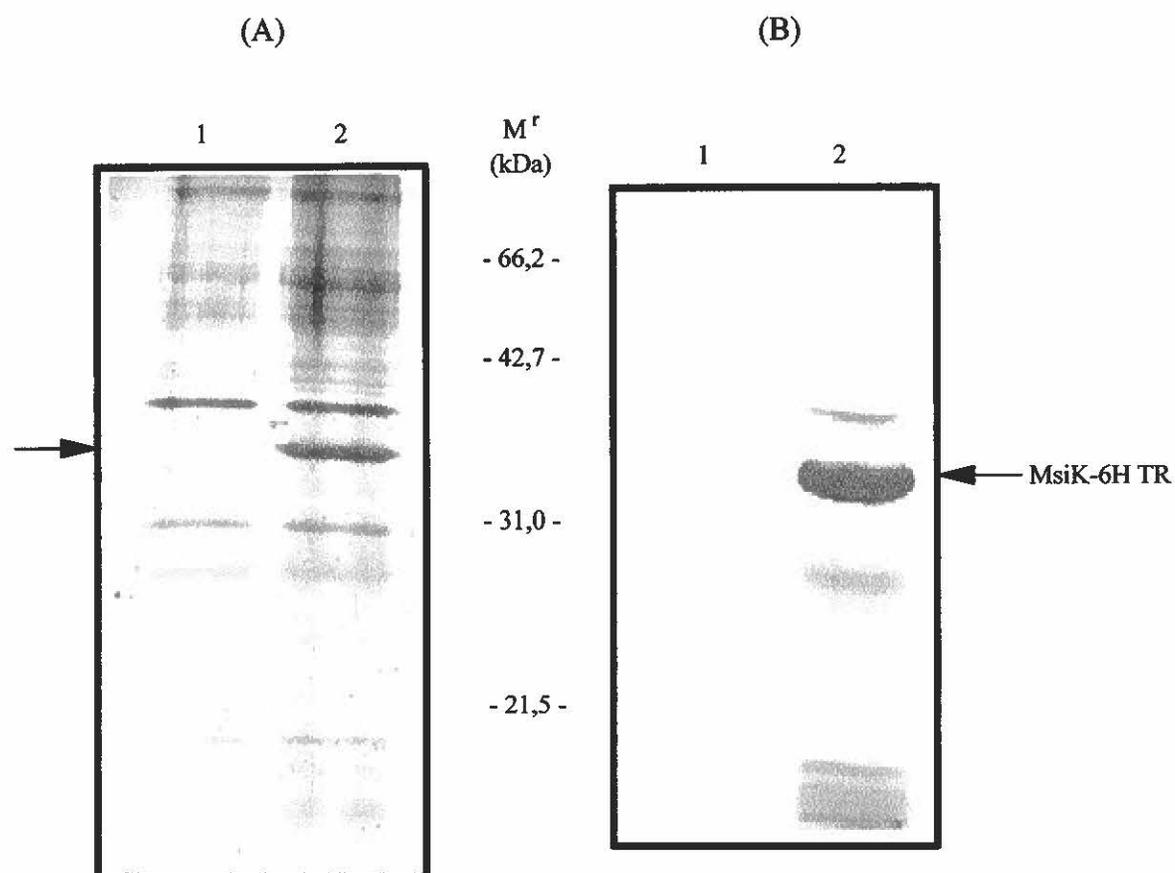


Figure 19 : Comparaison des systèmes d'expression d'*E. coli* K38 et d'*E. coli* BL21(DE3).

Image par balayage des gels.

(A) Production de la protéine MsiK recombinante tronquée (MsiK-6H TR)

chez *E. coli* K38. SDS-PAGE 12.5% coloré au nitrate d'argent.

(1) *E. coli* K38 (contrôle négatif)

(2) *E. coli* IAF249

(B) Expression de la protéine MsiK-6H TR chez *E. coli* BL21(DE3).

Phastgel 12.5% coloré au nitrate d'argent.

(1) *E. coli* BL21(DE3) + pT7-5 (contrôle négatif)

(2) *E. coli* BL21/pIAF249

Les gels représentés dans cette figure sont des images obtenues par densitométrie avec l'appareil Imaging Densitometer, modèle GS-670 de Bio-Rad. Ces images sont analysées par le programme Molecular Analyst. En (A), 16 μ L d'échantillons protéiques mélangés à 4 μ L de tampon d'échantillon 5x ont été déposés dans chacun des puits. La migration a été faite sur SDS-PAGE 12.5% dans l'appareil Miniprotean II de Bio-Rad. Le gel en (B) représente un phastgel™ de 12% dont 4 μ L d'échantillon ont été déposés sur le peigne applicateur. Les deux gels ont été colorés au nitrate d'argent. Il est nettement évident qu'une meilleure expression de la protéine MsiK (bande à 41 kDa) est obtenue chez la souche *E. coli* BL21(DE3).

L'expression à grande échelle a ensuite été mise au point avec les clones de la souche d'*E. coli* BL21(DE3). À la figure 20, on retrouve l'expression réalisée chez BL21/pIAF249. La protéine a été purifiée par la méthode dénaturante (à grande échelle) de QIAexpressionist de QIAGEN. Chaque puits contient 16 μ L d'échantillon protéique. Les échantillons ont migrés sur un SDS-PAGE 12.5 % et le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Une fois l'expression protéique optimisée, la mise au point de l'étape de purification a été possible.

4. MISE AU POINT D'UN SYSTÈME DE PURIFICATION DE LA PROTÉINE MsiK

4.1 Mise au point du système de purification dénaturante à grande échelle

L'objectif visant à optimiser le système d'expression étant atteint, la prochaine étape était de développer un système de purification. Plusieurs modifications ont été effectuées au

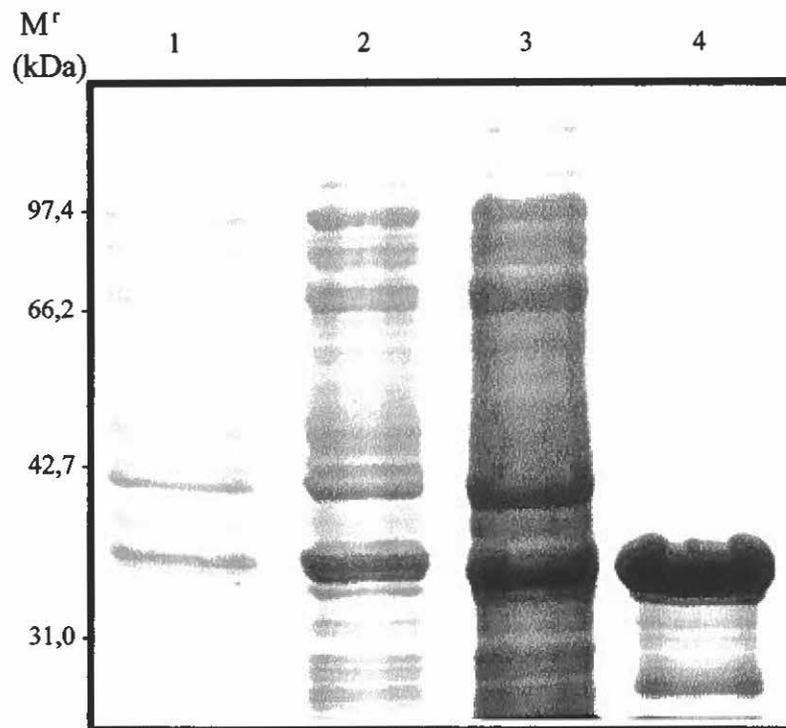


Figure 20 : Mise au point du système d'expression chez *E. coli* BL21(DE3).
SDS-PAGE 12.5% coloré au bleu de Coomassie. Image de balayage du gel.
(1) Surnageant de culture
(2) Culot cellulaire dissout dans le tampon B
(3) Volume exclu
(4) Élution avec 100 mM EDTA

protocole de base de la micro-purification de QIAexpressionist. Suite aux nombreux essais, la méthode qui s'est avérée la plus efficace est décrite à la section 10.1.2 des matériels et méthodes. La figure 21 représente le résultat d'une purification selon cette méthode. On remarque dans la colonne 3 que plusieurs protéines n'adhèrent pas à la résine Ni-NTA. Par contre, la protéine éluée n'est pas pure à 100%. On remarque aussi sur cette figure que l'ajout de β -mercaptoéthanol dans les solutions permet une meilleure stabilité des protéines lorsqu'on compare la protéine majeure éluée (MsiK) dans les colonnes 4 et 5. Un dosage de protéine par la méthode de Lowry indique la récupération de 1.5 mg de la protéine MsiK, en moyenne, par litre de culture induit.

4.2 Mise au point du système de purification à partir des corps d'inclusion

Plusieurs essais pour purifier la protéine MsiK sous sa forme native ont aussi été effectués, mais aucun résultats significatifs n'a été obtenu. Ceci laisse à croire qu'il y a formation de corps d'inclusions suite à l'expression protéique à 37°C. Ainsi, un protocole de purification de corps d'inclusions de Soumounou et Laliberté (1994) a été légèrement modifié pour la purification de la protéine MsiK. Le résultat de cette purification est démontré à la figure 22. L'étape de lavage des corps d'inclusions avec 4M urée (colonne 2) permet de dissocier des protéines contaminantes des corps d'inclusions sans solubiliser les corps d'inclusions eux-mêmes. Suivant les étapes de lavage, la protéine éluée par l'ajout de 250 mM imidazole est pure à plus de 95%. Le bruit de fond observé aux alentours de 60 kDa est causé par la présence de β -mercaptoéthanol lors d'une coloration au nitrate d'argent. Les protéines sont dosées par la

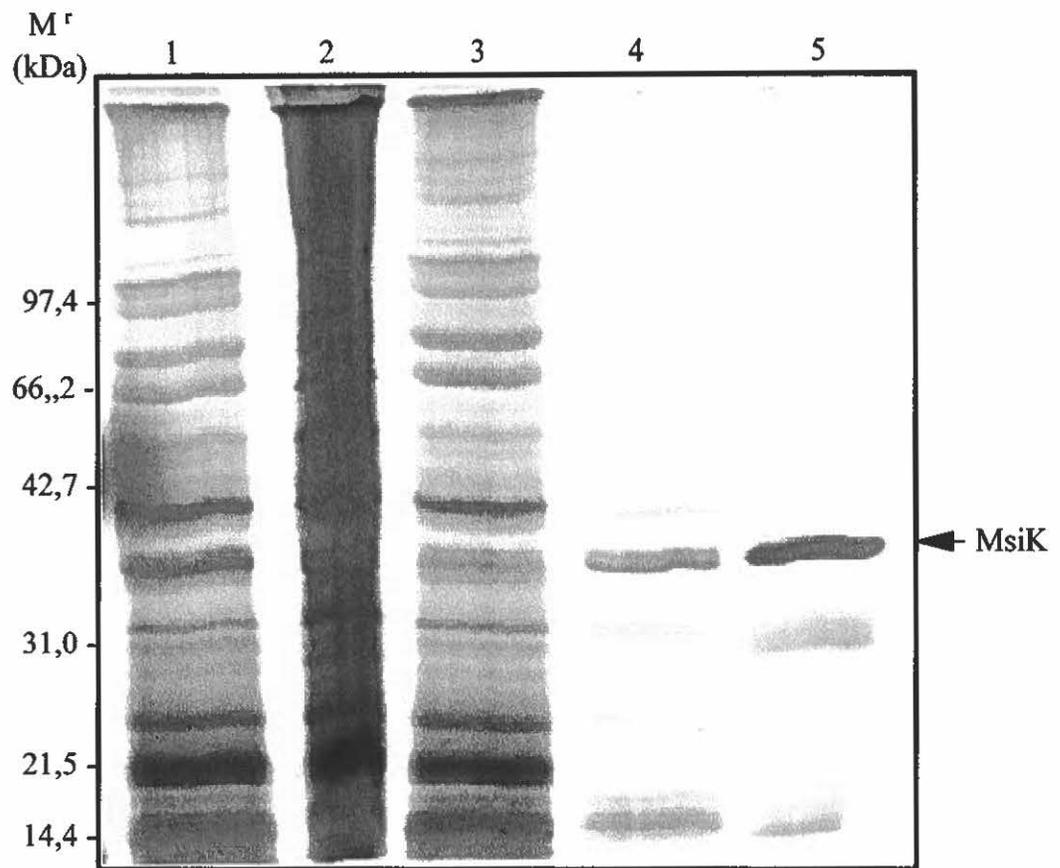


Figure 21 : Mise au point du système de purification dénaturante. Phastgel™ 12% coloré au nitrate d'argent. Image par balayage.

- (1) Extrait cellulaire
- (2) Culot de débris cellulaire
- (3) Volume exclu
- (4) Élution avec 100 mM EDTA
- (5) Résultat de l'élution avec 100mM EDTA suite à l'ajout de 10 mM β -ME dans tous les tampons.

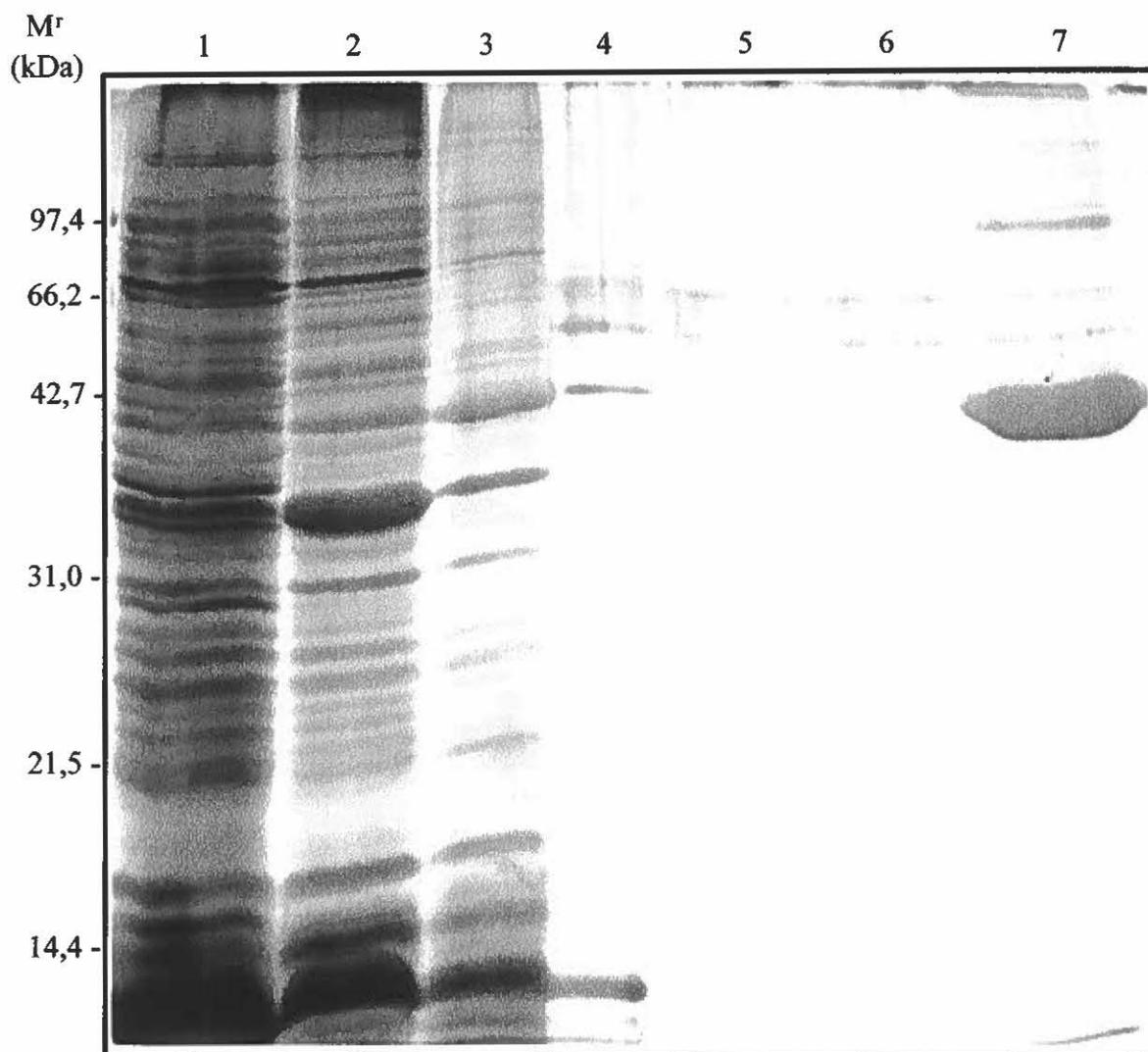


Figure 22 : Mise au point du système de purification de la protéine MsiK à partir de corps d'inclusions produits chez *E. coli* BL21/pIAF250. SDS-PAGE 12.5% coloré au nitrate d'argent. Image par balayage du gel par densitométrie.

- 1) Extrait cellulaire
- 2) Lavage des corps d'inclusions
- 3) Volume exclu
- 4-6) Étapes de lavage de la colonne de résine Ni-NTA
- 7) Éluion de la protéine avec 250 mM imidazole

méthode de Lowry et en moyenne, 1 mg de protéines est récupéré par litre de culture.

4.3 Purification de la protéine par extraction d'un gel SDS-PAGE 9%

L'échantillon protéique de MsiK tronquée, suite à la purification par affinité sur résine Ni-NTA, est pur à plus de 95%. Cependant, cet échantillon n'est pas suffisamment pur pour la production d'anticorps anti-MsiK. La protéine MsiK tronquée pure a donc été obtenue suivant une séparation en SDS-PAGE 9% (figure 23). Les protéines sont quantifiées par la méthode de Lowry avant et après extraction et les pertes de protéines par cette méthode ne sont pas significatives.

5. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTÉINE MsiK

Les caractéristiques biochimiques de la protéine MsiK sont déterminées à partir de l'échantillon pur à 95% suivant la purification de MsiK à partir des corps d'inclusions. La masse moléculaire (M^r) de la protéine MsiK est déterminée par migration sur SDS-PAGE 12.5% (figure 22). MsiK est estimée à 41 kDa par référence à des standards de poids moléculaire connu (Bio-Rad).

Le point isoélectrique (pI) de la protéine MsiK est estimé par focalisation isoélectrique (IEF) avec l'appareil Phastsystem. Une échelle de pH constituée de protéines de pI connu a permis de déterminer un pI de 5.8 pour la protéine MsiK.

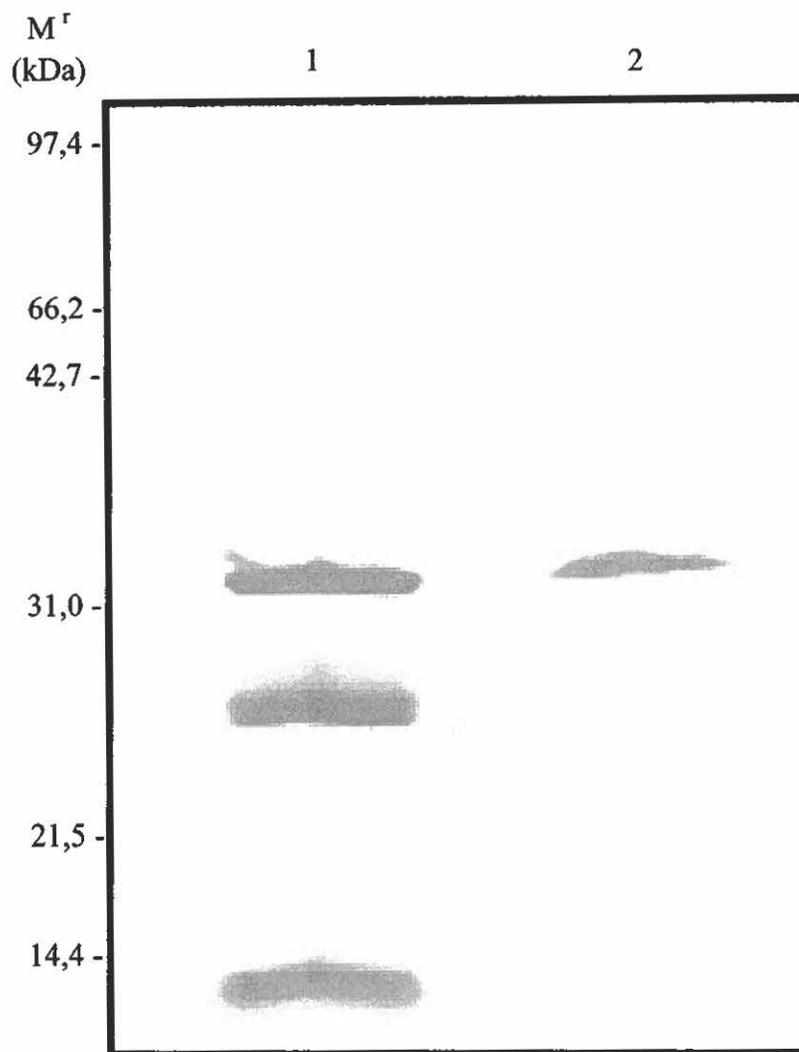


Figure 23 : Purification de la protéine MsiK par extraction de la bande d'un gel SDS-PAGE 9%. Phastgel 12 % coloré au nitrate d'argent. Image par balayage.
(1) Échantillon protéique avant purification par extraction de la bande.
(2) La protéine MsiK dans le tampon PBS suite à l'extraction de la bande.

L'extrémité N-terminale de la protéine MsiK recombinante est déterminée afin d'assurer que la protéine détectée sur gel soit belle et bien MsiK. Le résultat du séquençage des premières acides aminés de la protéine extrait de la membrane PVDF (M_{xxx}H_{xxx}HMATVTFDKA) concordait avec les premiers acides aminés codés par la séquence du gène recombinant en acides nucléiques (MH_{HHHH}HMATVTFDKA).

6. PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-MsiK

Les premiers anticorps polyclonaux anti-MsiK ont été produits chez deux lapines selon le protocole décrit à la figure 13. Ces anticorps ont été obtenus en utilisant un échantillon protéique pur de la protéine MsiK tronquée. Une lapine sur deux a réagit à l'antigène. Par contre le titre obtenu par ELISA était très faible (1/2560). L'obtention d'un échantillon pur de la protéine MsiK pleine longueur, a permis de mettre en cours une deuxième production d'anticorps anti-MsiK afin d'obtenir un meilleur titre. Le protocole d'immunisation détaillé à la figure 13 a cependant été modifié. Tout d'abord, une bouteille d'adjuvant RIBI, reconstituée avec 2 mL d'antigène, a été utilisée par lapine. De plus, une première injection d'un mL a été réalisée de façon intramusculaire, suivi d'une deuxième injection (booster) d'un mL trois semaines plus tard. Un échantillon sanguin a été prélevé de l'oreille de chaque lapine dix jours suivant le booster. Le sérum a été récupéré afin de déterminer le titre. Un titre plus élevé que 1/12 500 a été atteint.

7. IMMUNO-DÉTECTION DE LA PROTÉINE MsiK

7.1 Chez *E. coli*

Les protéines MsiK tronquée et pleine longueur exprimées chez *E. coli* BL21(DE3) et purifiées à partir des corps d'inclusions ont été détectées par les anticorps polyclonaux anti-MsiK (figure 24). Les protéines ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 12.5% et transférées sur membrane de nylon. Il n'y a pas de réactions croisées apparentes. Les anticorps anti-MsiK ont aussi détectés la protéine MsiK mutée produite chez *E. coli*.

7.2 Chez *S. lividans* 1326

La protéine MsiK est détectée dans des extraits cellulaires de *S. lividans* 1326 en milieu M14-xylane (figure 25). L'extrait cellulaire préparée à la section 4.1.2 (matériels et méthodes) est ensuite chargé sur un SDS-PAGE 12.5% et les protéines transférées sur membrane de nylon. La détection avec les anticorps anti-MsiK a révélée la présence d'une protéine de 41 kDa correspondant à la protéine MsiK (figure 25A). Cependant une réaction croisée avec une protéine d'environ 31 kDa est présente.

D'autre part, l'activité de liaison d'ATP a été vérifiée pour ce même échantillon (figure 25B). Le résultat démontre d'abord que la protéine MsiK, détectée par les anticorps anti-MsiK lie l'ATP. Ensuite, cette figure démontre que la protéine inconnue ayant une réaction croisée avec les anticorps anti-MsiK lie aussi l'ATP. La technique de détection de la liaison d'ATP est

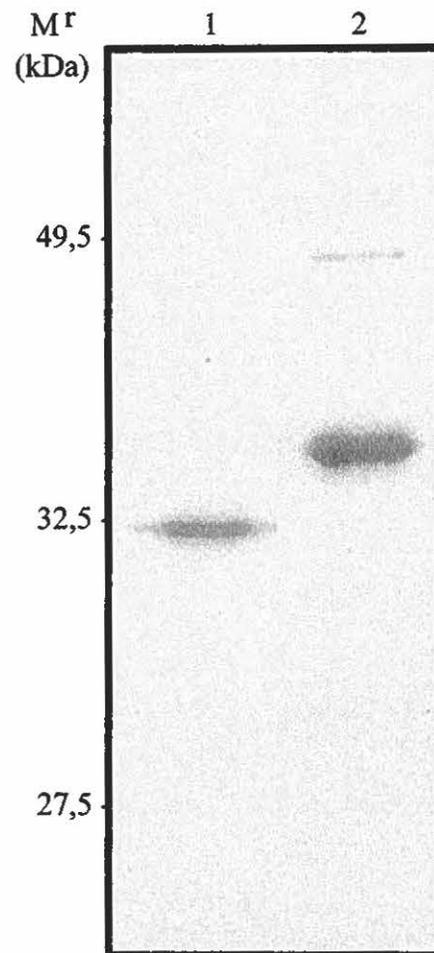


Figure 24: Immuno-détection à l'aide d'anticorps anti-MsiK de la protéine MsiK purifiée à partir d'E. coli BL21(DE3). Image de balayage de l'autoradiogramme.

(1) La protéine MsiK recombinante tronquée

(2) La protéine MsiK recombinante pleine longueur

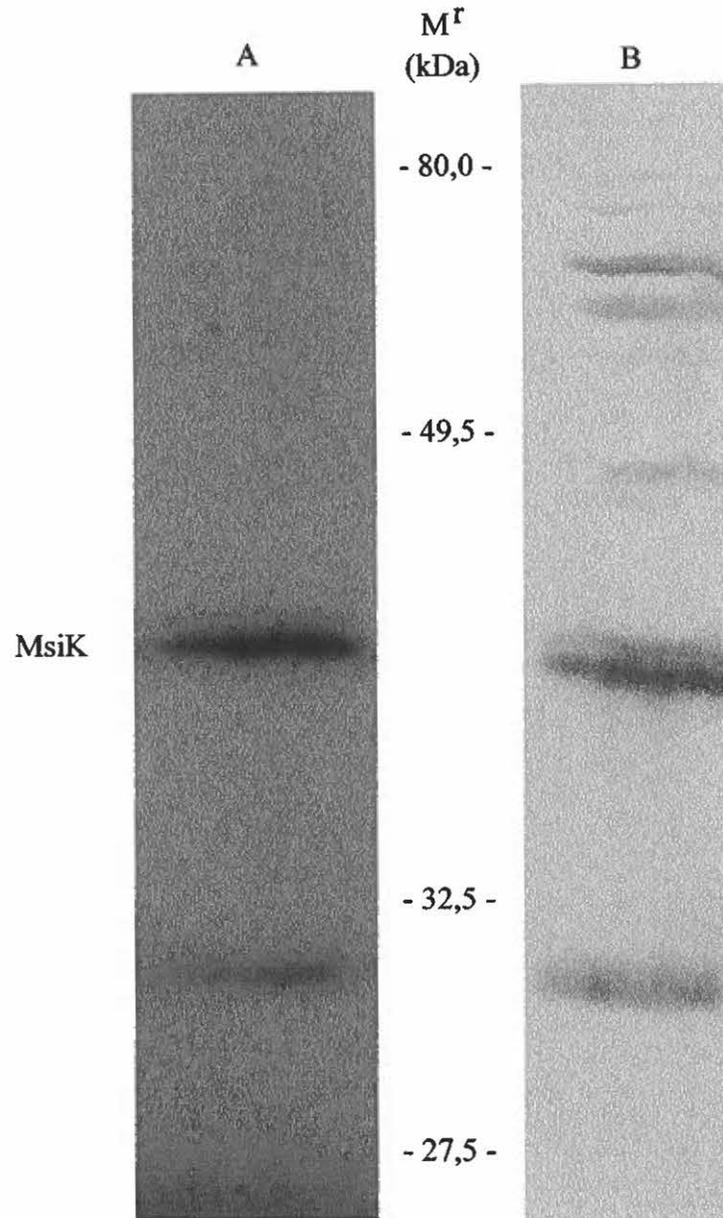


Figure 25 : Détection de la protéine MsiK à partir d'extrait cellulaire de *S. lividans* 1326 en milieu M14-xylane. Image de balayage par densitométrie.
(A) Immuno-détection avec les anticorps anti-MsiK
(B) Détection de la liaison d'ATP

une méthode très sensible donc il peut y avoir présence de bruit de fond après une détection prolongée.

Cet expérience a été fait en parallèle avec des extraits cellulaires de *S. lividans* 1326 en milieu M14-xylose. Les résultats préliminaires ont démontré qu'il semble y avoir une plus faible production de la protéine MsiK en milieu xylose.

8. DÉTECTION DE LA LIAISON D'ATP

Les expériences de détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK recombinante produite chez *E. coli* ont aussi été faites. Les échantillons protéiques ont été purifié à partir d'*E. coli* selon la méthode décrite à la section 10.1.4 des matériels et méthodes. La protéine MsiK est renaturée sur la colonne suite aux étapes de lavage avec le tampon A qui ne contient pas de GuHCl.

Les premiers essais ont été effectués en utilisant la protéine tronquée (figure 26). Dans cette expérience, diverses concentrations de FSBA ont été essayées pour trouver les conditions propices à la liaison spécifique du FSBA aux protéines liant l'ATP. On remarque une plus faible intensité des bandes dans les puits 3 et 4. Dans la colonne 6, aucune bande protéique est présente ce qui veut dire que la protéine mutée ne lie pas le FSBA, l'analogue de l'ATP.

Suite aux essais de détection de la liaison d'ATP sur des extraits cellulaires de *S. lividans*

1326 en milieu M14-xylane (figure 25), et les résultats obtenus de l'immunodétection démontrant que la protéine MsiK était en réalité une protéine d'environ 41 kDa, les essais de liaison d'ATP ont été refaits sur la protéine MsiK recombinante pleine longueur produite chez *E. coli* (figure 27). Les résultats obtenus supportent les premiers résultats obtenus avec la protéine tronquée. C'est-à-dire, la protéine MsiK lie l'ATP contrairement à la forme mutée.

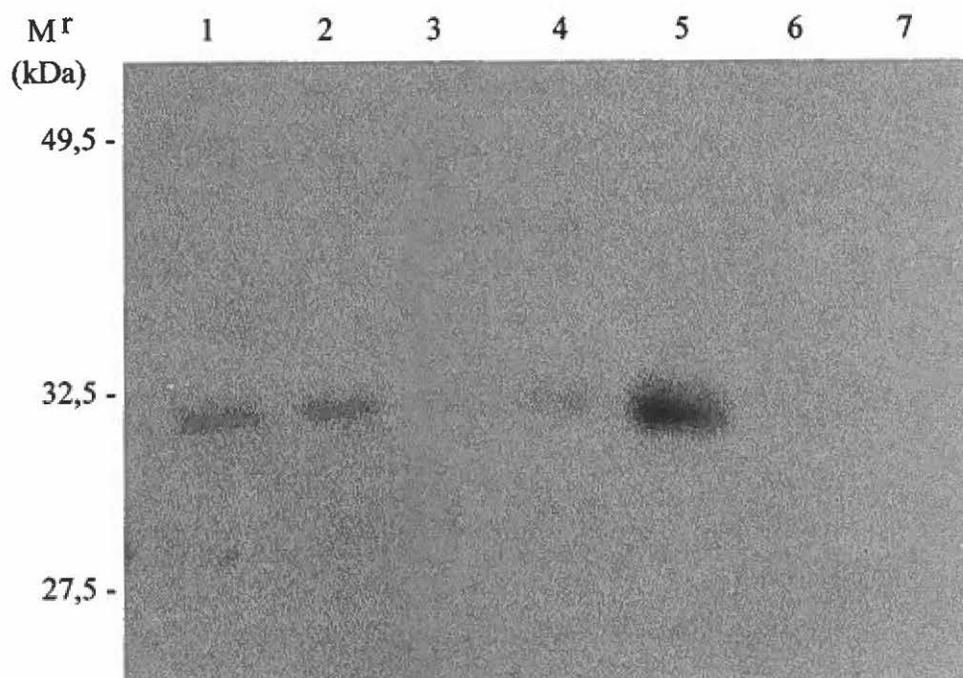


Figure 26 : Détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK recombinante tronquée.

- (1) Contrôle positif (40 ug de protéine MsiK + 1,0 mM FSBA + 2 mM ATP + 2 mM MgCl₂)
- (2) MsiK (40 ug) + 0,25 mM FSBA
- (3) MsiK (40 ug) + 0,5 mM FSBA
- (4) MsiK (40 ug) + 1,0 mM FSBA
- (5) MsiK (40 ug) + 1,5 mM FSBA
- (6) MsiK mutée (40 ug) + 1,5 mM FSBA
- (7) Contrôle négatif (40 ug de la protéine MsiK)

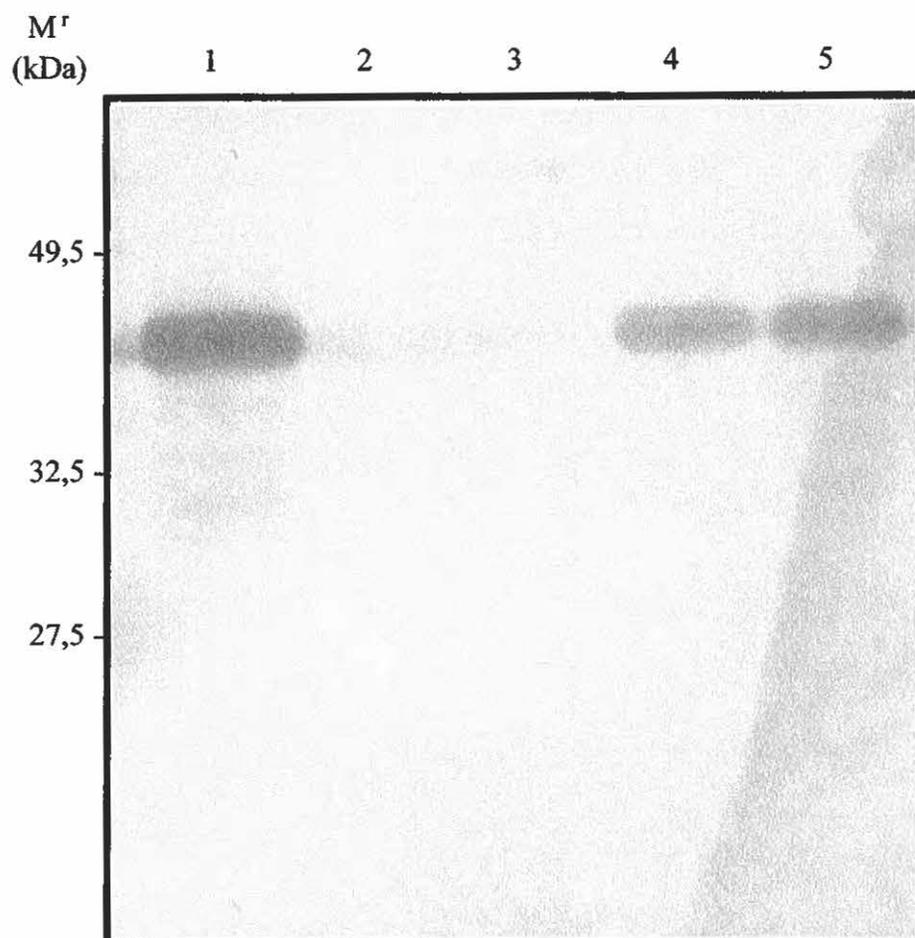


Figure 27 : Détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK produite chez *E. coli* BL21/pIAF250. Image par balayage.

- (1) Contrôle positif (15 ug de protéine MsiK + 0.5 mM FSBA)
- (2) Contrôle négatif (30 ug de protéine MsiK)
- (3) MsiK mutée (30 ug + 0.5 mM FSBA)
- (4) MsiK (9 ug + 0.25 mM FSBA)
- (5) MsiK (9 ug + 0.5 mM FSBA)

DISCUSSION

Construction des vecteurs d'expression et correction de la séquence du gène *msiK*

Jusqu'à présent, les enzymes impliquées dans la biodégradation du xylane et de la cellulose de *S. lividans* caractérisés par le groupe de recherche, ont été clonées de façon homologue dans le vecteur d'expression à copie multiple, pIJ702, afin de sur-exprimer le gène et de faciliter la purification de l'enzyme. La plupart de ces enzymes était extra-cellulaires, elles possèdent donc un peptide signal. Par conséquent, la sécrétion abondante d'un enzyme dans le milieu facilite habituellement sa récupération. Par contre, le produit du gène *msiK* n'est pas sécrété à l'extérieur de la cellule. De plus, les conditions pour l'induction de la transcription du gène *msiK*, s'il y a lieu, ne sont pas encore connues. Donc, afin d'éviter des difficultés de sur-expression de *msiK* chez *S. lividans*, la protéine MsiK de *Streptomyces lividans* a été caractérisée en mettant au point un système d'expression et de purification chez *Escherichia coli*. Le système promoteur/T7 ARN polymérase chez *E. coli* a été choisi pour purifier la protéine recombinante ayant une queue de polyhistidine. Cette stratégie est de plus en plus utilisée avec succès pour la purification d'un grand nombre de protéines recombinantes solubles. Récemment, plusieurs protéines membranaires insolubles impliquées dans des systèmes de transport autres qu'énergie-dépendant ont été purifiées en insérant une queue de polyhistidine du côté N-terminal ou C-terminal de la protéine. Par exemple, la perméase impliquée dans le transport du melobiose chez *E. coli* a été purifiée en utilisant cette stratégie (Pourcher *et al.*, 1995). Ils ont inséré la queue de polyhistidine par mutagenèse dirigée et cloné le gène recombinant dans le vecteur d'expression pT7-6. D'autres stratégies consistent à cloner le gène dans des vecteurs d'expression comprenant une séquence qui code pour les six résidus

d'histidine. Cette séquence peut être retrouvée en aval ou en amont du gène cloné. Quelques exemples de tels vecteurs d'expression sont ceux de la série pQE (QIAGEN, manuel d'instruction "The QIAexpressionist") ou ceux de la série pET (Soumounou et Laliberté, 1994).

Pour l'étude de la protéine MsiK, nous avons inséré la queue de polyhistidine par PCR et cloné le gène recombinant dans le vecteur d'expression pT7-5. Basé sur la séquence originale de *msiK* isolé par Hurtubise (1994), deux oligonucléotides, MsiK5 et MsiK3 ont été synthétisés pour l'amplification du gène (nucléotides 406 à 1348). En plus de la queue de polyhistidine, un site d'attachement aux ribosomes a été inséré à l'extrémité 5' du gène puisque celui-ci, nécessaire à l'expression du gène recombinant, n'est pas présent dans le vecteur pT7-5. Les amplicons ont été clonés dans le vecteur pT7-5 en aval du promoteur p_{T7} . Les premières constructions furent les plasmides pIAF249 et pIAF249m. À l'époque, il n'était pas connu que ces gènes recombinants codaient pour des protéines tronquées. Ce n'est qu'avec l'obtention d'anticorps anti-MsiK que ceci a été découvert. Une protéine ayant une masse moléculaire d'environ 34 kDa, prédite par la séquence originale du gène de *msiK* était recherchée. Par contre, les anticorps anti-MsiK ont détecté dans les extraits cellulaires de *S. lividans* 1326 une protéine de 41 kDa (figure 25).

Suite à cette observation, la séquence du gène a été revérifiée et l'erreur de lecture a été localisée dans la région indiquée par quatre flèches consécutives indiquant les nucléotides aux positions 1325 à 1328 (figure 14). De telles erreurs de lecture sont fréquentes lorsqu'on séquence un gène de streptomycètes car le contenu élevé en G + C peut causer des

compressions de séquence ce qui rend difficile la lecture de celle-ci (F. Shareck, communication personnelle).

Des nouveaux oligonucléotides ont été synthétisés afin d'amplifier le gène en entier et de purifier la protéine MsiK pleine longueur. Malheureusement, pour des raisons inconnues, les essais de PCR n'ont pas fonctionné cette fois-ci. Une seconde approche, soit le sous-clonage a donc été réalisée avec succès.

Vérification de l'activité de la protéine MsiK recombinante *in vivo*

L'activité des protéines MsiK recombinantes tronquées et pleine longueur a été vérifiée *in vivo*. Les clones positifs *S. lividans* IAF49 et IAF50 ont été analysés sur RBB-xylane. Une zone d'éclaircissement autour des colonies des clones positifs indiquait l'hydrolyse du xylane présent dans le milieu. Cette expérience a démontrée premièrement que la queue de polyhistidine présente à l'extrémité N-terminale des protéines n'interférait pas avec l'activité de celles-ci. Une autre conclusion peut être tirée de cette expérience dû au fait que le gène *msiK* recombinant tronqué reconferme le phénotype sauvage à la souche 10-164. On peut conclure que la partie manquante de l'extrémité C-terminale de la protéine MsiK n'est pas nécessaire au bon fonctionnement de la protéine. D'ailleurs, Schneider *et al.* (1994) ont démontré que l'extrémité C-terminale de la protéine MalK de *E. coli* joue un rôle dans la stabilité de la protéine contre les protéases et, en plus de lier et d'hydrolyser l'ATP comme les transporteurs ABC, elle jouerait un rôle dans la régulation d'autres gènes induit par le maltose. Nous savons que se sont

les sites Walker qui sont impliqués dans la liaison d'ATP et que l'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie requise au transport, tel que le transport des disaccharides chez *S. lividans*. Ces deux motifs sont présents dans les gènes tronqué et mature. Par conséquent, les produits de ces gènes sont toujours fonctionnels.

Comparaison des systèmes d'expression chez *E. coli* K38 et BL21(DE3) et purification de la protéine

Les premiers essais d'expression ont été faits avec les constructions chez *E. coli* K38/pGP1-2 car c'était la souche disponible au départ. Cependant, les premiers essais d'expression et de purification de la protéine MsiK chez cette souche ne semblaient pas donner des résultats satisfaisants. Une seconde stratégie, soit l'utilisation de la souche *E. coli* BL21(DE3) a donc été choisie. Cette souche a été transformée avec les plasmides pIAF249 et pIAF249m et les conditions d'expression ont été mises au point. Ensuite, la comparaison de ces deux systèmes de micro-expression a été faite afin de choisir le meilleur système d'expression (figure 19). La comparaison a révélé une production protéique plus élevée chez BL21(DE3). Cette différence peut être attribuable à l'origine de la souche. C'est-à-dire que la souche K38 fait partie de la famille *E. coli* K12 tandis que BL21 fait partie de la famille *E. coli* B. Studier *et al.* (1990) mentionne que les souches de la famille B ont un avantage en tant qu'hôte pour l'expression protéique par rapport aux souches K car ces premières sont déficientes au niveau des gènes *lon* et *ompT*, ceux-ci codant pour des protéases. Par ce fait, on peut penser que l'absence de ces protéases permettrait une meilleure stabilité de la protéine MsiK lors de la purification. En outre, la souche K38 est incubée à 42°C pour permettre l'expression de la T7

ARN polymérase. À cette température, il se peut que des protéines de réponse aux stress soient produites, contribuant ainsi à la dégradation de la protéine MsiK. Le système d'expression utilisant la souche *E. coli* BL21(DE3) fut donc choisi pour la production de protéine MsiK (figure 20).

La purification de la protéine a ensuite été mise au point. Les essais de purification en condition native furent décevants. Ceci s'expliquait par la formation d'agrégats insolubles nommés les corps d'inclusions. Ils sont formés lorsqu'il y a une sur-production relativement rapide de protéines. Les protéines s'associent ensemble et par conséquent, les corps d'inclusions contiennent la protéine sur-exprimée à plus de 90%. Afin d'obtenir la protéine insoluble, des méthodes de purification dénaturantes ont été effectuées. Les premiers essais ont été effectués par purification dénaturante de QIAexpressionist de QIAGEN en modifiant quelque peu les tampons de lavage pour stabiliser la protéine MsiK purifiée (figure 21). Par exemple, l'ajout de 10 mM de β -mercaptoéthanol dans les tampons de sonication et de lavages a accompli l'objectif de stabiliser les protéines en les gardant dans un milieu réducteur. Par ailleurs, l'ajout de glycérol à la concentration finale de 10% (v/v) aux tampons de lavage et d'élution ajoute à la stabilisation de la protéine lors de la conservation à -80°C .

Le résultat de cette purification dénaturante confirme la haute spécificité de la résine envers des protéines portant six résidus histidine consécutifs car le volume exclu contient une grande quantité de protéines n'adhérant pas à la résine (figure 21). On remarque aussi sur cette figure que l'ajout de β -mercaptoéthanol dans les solutions permet une meilleure récupération

de protéine lorsqu'on compare la protéine majeure éluée dans les colonnes 4 et 5. Ceci suggère que le β -mercaptoéthanol stabilisait la protéine. Par contre, l'échantillon protéique purifiée contient des protéines contaminantes en plus de la protéine MsiK. Une seconde approche pour améliorer la purification fut donc entreprise, soit celle de la purification à partir des corps d'inclusions (figure 22). Cette méthode implique plus d'étapes contrairement à la purification dénaturante, mais l'échantillon protéique récupéré à la fin est pur à plus de 95%. Cependant, la quantité de protéine récupérée (1 mg/mL) est légèrement plus basse que celle obtenue par purification dénaturante (1.5 mg/mL).

Un des objectifs de la purification de la protéine MsiK étant la production d'anticorps spécifiques, une étape additionnelle a dû être réalisée pour l'obtention d'un échantillon protéique pur. Cette étape consistait donc à faire migrer l'échantillon protéique dans un unique puits ayant la largeur du gel. Un gel SDS-PAGE de 9% permettait une bonne séparation de la protéine MsiK des protéines contaminantes et une extraction facilitée car le pourcentage d'acrylamide n'était pas trop élevé. En effet, une migration dans un gel de 7% n'a pas permis une bonne séparation et un gel de 12% a empêché une bonne élution de la protéine en tampon PBS. La bande protéique de MsiK a été extraite du gel et les protéines récupérées ont été quantifiées par la méthode de Lowry. Les pertes de protéines par cette méthode d'extraction n'étaient pas significatives.

Caractérisation biochimique de la protéine MsiK

Par la suite, la caractérisation biochimique de la protéine a été faite. Le poids moléculaire des protéines MsiK tronquée et pleine longueur a été déterminé par SDS-PAGE 12%. La protéine tronquée a été estimée à 32 kDa, tandis que la protéine MsiK pleine longueur a un poids moléculaire d'environ 41 kDa par référence à des standards de poids moléculaire. Le point isoélectrique de la protéine MsiK a aussi été estimé à 5.8 ce qui correspond au pI théorique de cette protéine prédit par logiciel informatique.

Par ailleurs, l'extrémité N-terminale de la protéine MsiK a été séquencée. Le résultat (section 5 des résultats) concorde avec les premiers acides aminés codés par la séquence nucléotidique du gène. Ce séquençage a permis, dans un premiers temps, de s'assurer que la protéine exprimée et purifiée était véritablement la protéine MsiK et que dans un deuxième temps, cette protéine contenait belle et bien la queue de polyhistidine à l'extrémité N-terminale.

Immunodétection et détection de la liaison d'ATP

Les anticorps anti-MsiK ont été produits chez des lapins en utilisant l'adjuvant de RIBI pour augmenter la réponse immunitaire. Contrairement à l'adjuvant de Freund, autrefois utilisé pour la production d'anticorps, l'adjuvant de RIBI est beaucoup moins nocif pour le lapin. Le titre a été déterminé pour les anticorps produits chez chaque lapin. Seulement un lapin a réagit relativement bien comparé à l'autre, donnant un titre de 1/2560. Ce titre étant faible, une autre

immunisation a été réalisée afin d'obtenir un titre plus élevé. Les premiers anticorps ont été produits contre la protéine MsiK tronquée, tandis que la deuxième immunisation a été réalisée avec la protéine MsiK pleine longueur. Cette protéine, ayant une plus grande taille que la protéine tronquée, est probablement plus immunogène. En effet, un titre plus élevé que 1/12 500 a été obtenu comparativement au titre de 1/2560 obtenu auparavant. Toutefois, cette différence remarquable entre les titres obtenus peut être attribuable au fait que les injections administrées aux lapines contenaient une proportion plus élevée d'adjuvant étant donné que deux bouteilles d'adjuvant RIBI ont été utilisées au lieu d'une seule pour les deux lapines.

Les anticorps ont détecté la protéine MsiK tronquée et pleine longueur produites chez la souche *E. coli* BL21(DE3) (figure 24). Aucune réaction croisée n'est apparente dans la colonne 1, cependant une très faible bande apparaît à environ 50 kDa dans la colonne 2 de cette figure. Cette faible bande est probablement attribuable à une réaction non-spécifique car la quantité d'échantillon protéique chargé était trop élevée. D'autres expériences d'immuno-détection n'ont pas révélé cette bande. Les anticorps anti-MsiK ont aussi détecté la protéine MsiK dans des extraits cellulaires de *S. lividans* 1326 en milieu M14-xylane (figure 25A). Ce milieu a été utilisé car il est connu que le xylane induit la production des xylanases et des cellulases. On peut donc supposer que le xylane aurait un effet positif sur l'expression de la protéine MsiK. L'immuno-détection a aussi été effectuée sur des extraits cellulaires de *S. lividans* 1326 en milieu M14-xylose puisqu'il semble que le xylose réprime les xylanases. Le résultat était identique à celui démontré à la figure 25A, avec l'exception de l'intensité des bandes pour une même quantité de surnageant. Cette réponse plus faible indique la possibilité

que l'expression de la protéine MsiK est influencée par la source de carbone disponible tout comme pour l'expression des enzymes hémicellulolytiques. Ce résultat est préliminaire et il sera donc intéressant d'étudier plus en profondeur la régulation de l'expression de cette protéine. D'ailleurs, les mécanismes par lesquels les transporteurs ABC en général fonctionnent, sont très peu connus au niveau moléculaire (Schneider *et al.*, 1994).

Un autre résultat très captivant, révélé par l'immuno-détection, a été une réaction croisée évidente avec une protéine d'environ 31 kDa. Cette dernière est également capable de lier l'ATP (figure 25B). Malgré le fait qu'il est possible que cette protéine de 31 kDa soit un produit de dégradation de la protéine MsiK, on peut toutefois supposer qu'il existe un deuxième transporteur ABC chez *S. lividans*. Ceci est très probable car nous avons vu dans la revue de littérature que ces protéines se ressemblent énormément du point de vue structure et fonction (Saurin et Dassa, 1994; Kuan *et al.*, 1995). Par ce fait, on peut supposer qu'il existe un second système de transport énergie-dépendant qui n'a pas encore été identifié chez *S. lividans*. En effet, l'identification d'un autre système de ce genre ajoutera au peu d'information disponible sur les systèmes de transport énergie-dépendant des microorganismes Gram positif.

Les autres bandes révélées par cette détection représentent probablement des protéines liant l'ATP, mais n'étant pas des transporteurs ABC (figure 25B). Il existe plusieurs protéines liant l'ATP telles que les kinases, et qui peuvent être détectées par l'intermédiaire de la trousse utilisée dans ce travail. Une probabilité expliquant les diverses bandes retrouvées est basée sur le fait que cette détection est très sensible et donc, les bandes peuvent être simplement du bruit

de fond obtenu après une coloration trop longue de la membrane.

Tout récemment, des résultats préliminaires d'hybridation d'une sonde d'ADN de *msiK* avec des cosmides d'une banque génomique de *S. coelicolor* ont localisé le gène *msiK* en plus d'un second gène inconnu (Dr. Hopwood, communication personnelle). Ce deuxième gène pourrait coder pour la protéine de 31 kDa dont la fonction est inconnue.

Détection de la liaison d'ATP chez *E. coli*

Les expériences de détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK recombinante produite chez *E. coli* ont aussi été réalisées. Les premiers essais ont été effectués en utilisant la protéine tronquée (figure 26). Cette expérience a permis de confirmer la capacité de liaison d'ATP par la protéine MsiK tronquée, de vérifier si la queue de polyhistidine avait un effet sur l'activité de la protéine *in vitro* et de constater si la protéine mutée était incapable de lier l'ATP. En effet, la protéine MsiK tronquée lie l'ATP. La présence des deux motifs Walker intacts dans la protéine tronquée explique pourquoi elle est encore fonctionnelle. De plus, cette expérience de détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK *in vitro* appuie les résultats obtenus chez *S. lividans* concernant l'activité de la protéine *in vivo*, c'est-à-dire que la queue de polyhistidine n'interfère pas avec l'activité *in vitro* de la protéine recombinante. Par ailleurs, une bonne détection a été obtenue avec des concentrations de 0.5 mM FSBA. Malheureusement, il semble y avoir une réponse faible dans les puits 3 et 4, mais cela est dû au fait que ces échantillons protéiques, lors du chargement dans les puits, ont été perdus.

Ce qui est aussi important de remarquer dans cette expérience est le fait que la protéine MsiK mutée (puits 6) ne lie pas le FSBA. Ce résultat concorde avec les expériences de mutagenèse dirigée effectuées sur la protéine HisP de *S. typhimurium*, où l'aspartate invariable dans le motif Walker B a été remplacé par une lysine et une arginine ayant pour effet la perte de la liaison d'ATP par cette protéine (Shyamala *et al.*, 1991). D'autres travaux de mutagenèse dirigée ont mis en évidence l'importance de ces sites Walker dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP en ADP (Karkaria *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1993).

Avec l'obtention de la protéine recombinante pleine longueur, les expériences de détection de la liaison d'ATP ont été reproduites (figure 27). Ces nouveaux résultats supportent les résultats obtenus auparavant par le fait que la protéine MsiK recombinante pleine longueur lie l'ATP, tout comme la protéine tronquée.

Quelques expériences peuvent être proposées pour faire suite aux travaux réalisés. La prochaine étape serait d'obtenir la protéine inconnue de 31 kDa qui interagit avec les anticorps anti-MsiK. Ceci pourrait être accompli par immuno-précipitation avec les anticorps anti-MsiK d'un échantillon protéique provenant de la souche *S. lividans* 1326. Suite à l'obtention de cette protéine, la séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale de celle-ci peut être déterminée et comparée avec d'autres séquences. Par ailleurs, un oligonucléotide pourrait être synthétisé afin de permettre l'isolement et le clonage du gène codant cette protéine ou possiblement le gène qui code pour la perméase qui interagit avec la protéine MsiK.

CONCLUSIONS

Les objectifs de cette étude de la protéine MsiK ont été atteints. Tout d'abord, les résultats obtenus ont permis de constater que la protéine a une masse moléculaire de 40.8 kDa ce qui correspond à la masse prédite par la séquence corrigée du gène *msiK*. La purification des protéines MsiK fonctionnelle et mutante de *Streptomyces lividans* a été facilitée par la mise au point d'un système d'expression et de purification chez *Escherichia coli* BL21(DE3). Par PCR, une séquence de nucléotides codant pour une queue de polyhistidine a été insérée à l'extrémité N-terminale. Les amplicons ont été clonés dans le vecteur d'expression pT7-5 pour la production de protéines recombinantes chez *E. coli* BL21(DE3). Ce système d'expression s'est avéré très efficace. La protéine a été récupérée à partir des corps d'inclusion et purifiée par chromatographie d'affinité sur la résine Ni-NTA. Il a été démontré *in vivo* ainsi qu'*in vitro* que la queue de polyhistidine n'interfère pas avec l'activité de la protéine. Les protocoles décrits dans ce travail peuvent ainsi être appliqués pour la purification d'autres protéines de *S. lividans*, notamment celles étant intra-cellulaires.

Les expériences de détection de la liaison d'ATP par la protéine MsiK ont démontré que la protéine joue un rôle crucial dans le transport des disaccharides chez *S. lividans*. C'est d'ailleurs grâce aux résultats obtenus avec la protéine mutée, n'étant pas capable de lier l'ATP, que nous pouvons venir à cette conclusion car le transport des disaccharides nécessite l'ATP. En effet, la mutation au niveau de la protéine MsiK explique le phénotype pléiotropique de la souche *S. lividans* 10-164. Cette mutation rend la protéine non-fonctionnelle dû au fait qu'elle

ne peut plus lier l'ATP. L'ATP est nécessaire au transport. En absence d'énergie la perméase du cellobiose et du xylobiose est incapable de transférer ces disaccharides à l'intérieur de la cellule du mutant 10-164.

L'étude de la protéine MsiK, la première composante isolée jusqu'à présent d'un système de transport énergie-dépendant pour le transport des disaccharides chez *S. lividans*, supporte les évidences rapportées dans la littérature que ces systèmes sont présents chez les bactéries Gram positif. Aucun système de ce genre n'a encore été caractérisé chez les streptomycètes. Cette étude est donc une étape préliminaire à la caractérisation d'un système de transport énergie-dépendant en plus d'approfondir notre compréhension du transport du xylobiose et du cellobiose chez *S. lividans*.

Par ailleurs, le séquençage récent d'un cadre de lecture ouvert ayant de l'homologie avec des perméases ou des protéines membranaires est très prometteur car cela pourra mener à une meilleure compréhension du transport des disaccharides ou même à la découverte d'un deuxième système de transport énergie-dépendant chez *S. lividans*. Également, la détection d'une seconde protéine ayant une masse moléculaire d'environ 31 kDa, qui lie l'ATP et qui est reconnue par les anticorps anti-MsiK semble indiquer la présence d'un second transporteur ABC. Des résultats préliminaires d'hybridation d'une sonde d'ADN de *msiK* sur le chromosome de *S. coelicolor* semble également localiser un second gène (Dr. Hopwood, communication personnelle). Celui-ci code possiblement pour la protéine de 31 kDa révélée par les anticorps anti-MsiK et qui lie l'ATP. Les prochains objectifs sont donc le séquençage de ce deuxième

gène et la purification du produit de ce gène en utilisant le système d'expression et de purification mis au point lors de cette étude de la protéine MsiK. Ceci permettra de confirmer ou non la présence d'un deuxième système de transport énergie-dépendant ou bien de caractériser une seconde composante du système de transport des disaccharides chez *S. lividans*.

Il reste une somme importante de travail à effectuer afin de bien caractériser le système de transport du xylobiose et du cellobiose chez *S. lividans*. Il faudra éventuellement isoler et séquencer les autres composantes de ce système et caractériser les protéines codées par ces gènes. Ceci permettrait de reconstituer des vésicules membranaires pour diverses études, dont l'interaction de la protéine MsiK avec la perméase, l'analyse de l'hydrolyse de l'ATP, et l'effet d'une sur-expression du système sur le transport du xylobiose et cellobiose. L'isolement et le séquençage des gènes codant les autres composantes du système de transport risque d'être plus complexes par rapport à celles effectuées chez *E. coli*, *Bacillus* ou *Salmonella typhimurium* puisque les gènes chez *Streptomyces* ne sont pas retrouvés dans un opéron comme ils le sont chez d'autres bactéries. Cependant, ce sont ces études d'interaction et de modélisation qui ont approfondi nos connaissances sur les systèmes de transport énergie-dépendant.

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. François Shareck, pour son support financier et moral ainsi que pour sa confiance en moi et ses nombreux conseils très pertinents pendant mes études de deuxième cycle. La motivation qu'il m'a donnée pour la science, pour mener ma recherche et d'y mettre mon maximum est fortement appréciée. Je suis aussi très reconnaissante envers sa famille pour avoir adopté mon petit chien Carbone. Je sais qu'il sera heureux.

Tous mes remerciements vont également aux Docteurs Kluepfel, Morosoli, Dupont, Hurtubise et Paradis pour leur conseils techniques et leurs intérêts manifestés envers mon projet. Je remercie aussi toute l'équipe des streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier (IAF), notamment Lise Trempe, Yvon Lamontagne, Serge Durand, Lisette Duval, Liette Biron, et Nicole Daigneault pour leur assistance technique et l'atmosphère de travail agréable et inoubliable au cours de mes deux années de maîtrise. Un merci spécial à Claire Beauchemin pour sa grande générosité à mon égard.

Je tiens aussi à remercier tous les étudiants de l'IAF impliqués dans les activités sportives et para-scolaires avec qui j'ai partagé des souvenirs inoubliables. Je nomme parmi eux, Catherine, Martin "caniche", Alain "full-suspension", Stéphane, Patricia, Nicolas, Sylvie, Bertrand, W, Françoise et Mona. Je remercie également Francisco pour son amitié et surtout pour son aide et ses conseils en informatique qui m'ont permis de réaliser des belles diapositives

et figures.

En dehors de la communauté scientifique, je suis très reconnaissante envers mes parents et mon frère pour leur support et encouragements à poursuivre mes études. Mom and dad, you are the best! Je tiens aussi à remercier ma famille à Montréal, surtout Christine, Annick, Sylvie et Ian pour leur présence et support moral.

And last but not least, I want to thank you, Chris, for your support, encouragement, confidence and love. You have brought me so much joy and made my life very complete. Our future looks very bright!

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, M.D., L.M. WAGNER, T.J. GRADDIS, R. LANDICK, T.K. ANTONUCCI, A.L. GIBSON et D.L. OXENDER. 1990. Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-1 and LS transport systems of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**:11436-11443.
- AMES, G.F.-L. 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 397-425.
- AMES, G.F.-L et A.K. JOSHI. 1990. Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. *J. Bacteriol.* **172**: 4133-4137.
- ANGERER, A., S. GAISSER et V. BRAUN. 1990. Nucleotide sequences of the *sfuA*, *sfuB*, and *sfuC* genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic-binding-protein-dependent iron transport mechanism. *J. Bacteriol.* **172**: 572-578.
- ARCAND, N., D. KLUEPFEL, F.W. PARADIS, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1993. β -mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem J.* **290**: 857-863.
- ARHIN, F.F., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1994. Effects of disruption of xylanase-encoding genes on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **176**:4924-4930.
- BERTRAND, J.L., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1989. Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 791-794.
- BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnol.* **3**: 286-290.
- BIELY, P., D. KLUEPFEL, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1993. Mode of action of three endo- β -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. *Biochimica Biophysica Acta* **1162**, pp. 246-254.
- BIRNBOIM, H.C. et J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* **7**: 1513.
- BISARIA, V.S. et T.K. GHOSE. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 90-104.
- BISHOP, L., R. AGBAYANI Jr., S.V. AMBUDKAR, P.C. MALONEY et G. F-L AMES. 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration

of ATP hydrolysis concomitant with transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 6953-6957.

BOEHRINGER MANNHEIM. 1994. ATP-binding protein detection kit. User's guide. Boehringer Mannheim, Canada.

BUCHERT, J., RANUA, M., SIIKAAHO, M., PERE, J. et VIKARI, L. 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in the bleaching of Kraft pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**: 941-945.

BURLAND, V., G. PLUNKET III., D.L. DANIELS et F.R. BLATTNER. 1993. DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. Genomics **16**:551-561.

CHATER, K.F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. Dans : Microbial Development. eds. R. Losick et L. Shapiro, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp.89-115.

COUGHLAN, M.P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnol. Gen. Rev. **3**: 39-109. (Ed) G.E. Russell, Angleterre.

COULTON, J.W., P. MASON et D.D. ALLATT. 1987. *fhuC* and *fhuD* genes for iron(III)-ferrichrome transport into *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **169**:3844-3849.

COVITZ, K.M.Y., C.H. PANAGIOTIDIS, L.I. HOR, M. REYES, N.A. TREPTOW et H.A. SHUMAN. 1994. Mutations that alter the transmembrane signalling pathway in an ATP-binding cassette (ABC) transporter. EMBO J. **13**: 1752-1759.

DAHL, M.K., E. FRANCOZ, W. SAURIN, W. BOOS, M.D. MANSON et M. HOFNUNG. 1989. Comparison of sequences from the *malB* regions of *Salmonella typhimurium* and *Enterobacter aerogenes* with *Escherichia coli* K12: A potential new regulatory site in the interoperonic region. Mol. Gen. Genet. **218**:199-207.

DAIGNEAULT-SYLVESTRE, N. et D. KLUEPFEL. 1979. Method for the rapid screening of cellulolytic streptomycetes and their mutants. Can. J. Microbiol. **25**: 858-860.

DASSA, E. 1990. Cellular localization of the MalG protein from the maltose transport system in *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. **222**: 33-36.

DAVIDSON, A.L. et H. NIKAIDO. 1990. Overproduction, solubilization, and reconstitution of the maltose transport system for *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **265**: 4254-4260.

DAVIDSON, A.L. et H. NIKAIDO. 1991. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem.

266: 8946-8951.

DEAN, D., A.L. DAVIDSON et H. NIKAIDO. 1989. Maltose transport in membrane vesicles of *Escherichia coli* is linked to ATP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 9134-9138.

FATH, M.J. et R. KOLTER. 1993. ABC transporters: Bacterial exporters. Microbiol. Rev. **57**: 995-1017.

FLANDROY, L. 1991. Industrie papetière: une page à tourner. Biofutur. **102**: 21-35.

FRIEDRICH, M.J., L.C. DEVEAUX et R.J. KADNER. 1986. Nucleotide sequence of the *btuCED* genes involved in vitamin B₁₂ transport in *Escherichia coli* and homology with components of periplasmic-binding-protein-dependent transport systems. J. Bacteriol. **167**:928-934.

FURUCHI, T., K. KASHIWAGI, H. KOBAYASHI et K. IGARASHI. 1991. Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the *Escherichia coli* chromosome. J. Biol. Chem. **266**:20928-20933.

GALLAGHER, M.P., S.R. PEARCE, et C.F. HIGGINS. 1989. Identification and localization of the membrane-associated, ATP-binding subunit of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. Biochem. J. **180**: 133-141.

GILBERT, H. et G. HAZLEWOOD. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. **139**: 187-194.

GILBERT, M., R. MOROSOLI, F. SHARECK, et D. KLUEPFEL. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. Crit. Rev. in Biotechnol. **15**:13-39.

GILSON, E., G. ALLOING, T. SCHMIDT, J.P. CLAVERYS, R. DUDLER et M. HOFNUNG. 1988. Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in Gram-positive bacteria and mycoplasma. EMBO J. **7**: 3971-3974.

GODDEN, B., LEGON, T., HELVENSTEIN, P. et PENNINCKX, M. 1989. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. **135**:285-292.

GOWRISHANKAR, J. 1989. Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171**:1923-1931.

GREEN, L.S., D.E. LAUDENBACK et A.R. GROSSMAN. 1989. A region of cyanobacterial genome required for sulfate transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**:1949-1953.

- GU, J., C.G. STEPHENSON, et M.J. IADOROLA. 1994. Recombinant proteins attached to a nickel-NTA column: Use in affinity purification of antibodies. *Biotechniques* **17**: 257-262.
- GUSEK, T.W. et J.E. KINSELLA. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**: 247-260.
- HIGGINS, C.F., P.D. HAAG, K. NIKAIDO, F. ARDESHIR, G. GARCIA et G. F-L. AMES. 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* **298**:723-727.
- HIGGINS, C.F., I.D. HILES, G.P.C. SALMOND, D.R. GILL, J.A. DOWNIE, I.J. EVANS, I.B. HOLLAND, L. GRAY, S.D. BUCKEL, A.W. BELLS et M.A. HERMODSON. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.
- HIGGINS, C.F., M.P. GALLAGHER, M.L. MIMMACK et S.R. PEARCE. 1988. A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays* **8**: 111-116.
- HIGGINS, C.F. 1990. The role of ATP in binding-protein-dependent transport systems. *Res. Microbiol.* **141**: 353-360.
- HIGGINS, C.F., M.P. GALLAGHER, S.C. HYDE, M.L. MIMMACK et S.R. PEARCE. 1990a. Periplasmic binding-protein dependent transport systems: the membrane associated components. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **326**: 353-365.
- HIGGINS, C.F., S.C. HYDE, M.M. MIMMACK, U. GILEADI, D.R. GILL et M.P. GALLAGHER. 1990b. Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenergetics and Biomembranes* **22**: 571-592.
- HIGGINS, C.F. 1992. ABC-transporters: From microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**: 67-113.
- HILES, I.D., M.P. GALLAGHER, D.J. JAMIESON et C.F. HIGGINS. 1987. Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **195**: 125-142.
- HOBSON, A.C., R. WEATHERWAX et G. F-L. AMES. 1984. ATP-binding sites in the membrane components of histidine permease, a periplasmic transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7333-7337.
- HOGG, R.W., C. VOELKER et I. VON CARLOWITZ. 1991. Nucleotide sequence and analysis of the *mgI* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **229**:453-459.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* : A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich.

HOPWOOD, D.A. 1989. "Streptomyces genetics in pure and applied research" dans Genetic and molecular biology of industrial microorganisms. Hershberger, Queener, Hegeman (Eds), ASM, Washington, pp: 12-19.

HOR, L-I. et H.A. SHUMAN. 1995. Genetic analysis of periplasmic binding protein-dependent transport in *Escherichia coli*. Each lobe of maltose-binding protein interacts with a different subunit of the MalFGK₂ membrane transport complex. J. Mol. Biol. **233**:659-670.

HOSHINO, T. et K. KOSE. 1990. Cloning, nucleotide sequences, and identification of products of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO *bra* genes, which encode the high-affinity branched-chain amino acid transport system. J. Bacteriol. **172**:5531-5539.

HRMOVA, M., E. PETRAKOVA et P. BIELY. 1991. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. J. Gen. Microbiol. **137**:541-547.

HURTUBISE, Y. 1994. Caractérisation de la mutation présente dans la souche cellulase et xylanase négative *Streptomyces lividans* 10-164. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke et Institut Armand-Frappier.

HURTUBISE, Y., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1995. A cellulase/xylanase negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol. Microbio. **17**:367-377.

HYDE, S.C., P. EMSLEY, M.J. HATSHORN, M.M. MIMMACK, U. GILEADI, S.R. PEARCE, M.P. GALLAGHER, D.R. GILL, R.E. HUBBARD et C.F. HIGGINS. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature **346**:362-365.

ISHAQUE, M. et D. KLUEPFEL. 1981. Production of xylanolytic enzymes by *Streptomyces flavogriseus*. Biotechnol. Lett. **3**: 481-486.

JIRESOVA, M., Z. DOBROVA, J. NAPRSTEK, P. RYSAVY et J. JANECEK. 1987. The cellobiose uptake system in *Streptomyces granaticolor*. FEMS Microbiol. Lett. **41**:279-282.

JOHANN, S et S.M. HINTON. 1987. Cloning and nucleotide sequence of the *chID* locus. J. Bacteriol. **169**:1911-1916.

- JONES, K.L. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* **57**: 141-145.
- JOSHI, A., S. AHMED et G. FERRO-LUZZI AMES. 1989. Energy coupling in bacterial periplasmic transport systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 2126-2133.
- KARKARIA, C.E., C.M. CHEN et B.P. ROSEN. 1990. Mutagenesis of a nucleotide-binding site of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**:7832-7836.
- KASHIWAGI, K., S. MIYAMOTO, E. NUKUI, H. KOBAYASHI et K. IGARASHI. 1993. Functions of PotA and PotD proteins in spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**:19358-19363.
- KATZ, E., C.J. THOMPSON et D.A. HOPWOOD. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2703-2714.
- KERPPOLA, R.E., V.K. SHYAMALA, P. KLEBBA et G. FERRO-LUZZI AMES. 1991. The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex. *J. Biol. Chem.* **266**: 9857-9865.
- KIESER, T. 1984. Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**: 19-36.
- KLUEPFEL, D., N. DAIGNEAULT, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1992. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 626-631.
- KLUEPFEL, D., F. SHARECK, F. MONDOU et R. MOROSOLI. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 230-234.
- KLUEPFEL, D., S. VATS-MEHTA, F. AUMONT, F. SHARECK et R. MOROSOLI. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J.* **267**: 45-50.
- KORONAKIS, E., C. HUGHES, I. MILISAV, et V. KORONAKIS. 1995. Protein exporter function and *in vitro* ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol. Microbiol.* **1**:87-96.
- KUAN, G., E. DASSA, W. SAURIN, M. HOFNUNG et M.H. SAIER, Jr. 1995. Phylogenetic analyses of the ATP-binding constituents of bacterial extracytoplasmic receptor-dependent ABC-type nutrient uptake permeases. *Res. Microbiol.* **146**:271-278.

- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LEBLOND, D., M. REDENBACH et J. CULLUM. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **175**: 3422-3429.
- LIONG, E.C. et T. FERENCI. 1994. Molecular cloning of a maltose transport gene from *Bacillus stearothermophilus* and its expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **243**:343-352.
- LYND, L.R., J.H. CUSHMAN, R.J. NICHOLS, et C.E. WYMAN. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* **251**:1318.
- LOWRY, O.H., N.H. ROSENBROUGH, A.L. FAN et R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- LUQUE, F., L.A. MITCHENALL, M. CHAPMAN, R. CHRISTINE et R.N. PAU. 1993. Characterization of genes involved in molybdenum transport in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbio.* **7**:447-459.
- MANDELS, M. et E.T. REESE. 1957. Production of cellulase in *Trichoderma viride* is influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriol.* **73**: 269-278.
- MANIN, C., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1994. Purification and characterization of an α -arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). *Biochem J.* **302**: 443-449.
- MATHIOPOULOS, C., J.P. MUELLER, F.J. SLACK, C.G. MURPHY, S. PATANKAR, G. BUKUSOGLU et A.L. SONENSHEIN. 1991. A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**:1903-1913.
- MATSUBARA, K., K. OHNISHI et K. KIRITANI. 1992. Nucleotide sequences and characterization of *liv* genes encoding components of the high-affinity branched-chain amino acid transport system in *Salmonella typhimurium*. *Biochem. J.* **112**:93-101.
- MATSUDAIRA, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
- MIMMACK, M.L., M.P. GALLAGHER, S.R. PEARCE, S.C. HYDE, I.R. BOOTH et C. F. HIGGINS. 1989. Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: Stoichiometry of ATP hydrolysis during transport *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8257-8261.

- MIMURA, C.S., A. ADMON, K.A. HURT et G. FERRO-LUZZI AMES. 1990. The nucleotide-binding site of HisP, a membrane protein of the histidine permease. *J. Biol. Chem.* **265**: 19535-19542.
- MONDOU, F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene* **49**: 323-329.
- MOROSOLI, R., J.L. BERTRAND, F. MONDOU, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* **239**: 587-592.
- NAVARRO, C., L.F. WU et M.A. MANDRAND-BERTHELOT. 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol. Microbiol.* **9**:1181-1191.
- NOHNO, T., T. SAITO et J. HONG. 1986. Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine permease operon (*glnHPQ*). *Mol. Gen. Genet.* **205**:260-269.
- OHYAMA, K., H. FUKUZAWA, T. KOHCHI, H. SHIRAI, T. SANO, S. SANO, K. UMESONO, Y. SHIKI, M. TAKEUCHI, Z. CHANG, S. AOTA, H. INOKUCHI et H. OZEKI. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**:572-574.
- OVERDUIN, P., W. BOOS et J. TOMMASSEN. 1988. Nucleotide sequence of the *ugp* genes of *Escherichia coli* K-12: homology to the maltose system. *Mol. Microbiol.* **2**:767-775.
- PAICE, M.G., R. BERNIER Jr. et L. JURASEK. 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 235-239.
- PAICE, M.G., N. GURNAGUL, D.H. PAGE et L. JURASEK. 1992. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of Kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 272-276.
- PALMEN, R., A.J.M. DREISSEN et K.J. HELLINGWERF. 1994. Bioenergetic aspects of the translocation of macromolecules across the bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* pp. 417-451.
- PEREGO, M., C.F. HIGGINS, S.R. PEARCE, M.P. GALLAGHER et J.A. HOCH. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**:173-185.
- PETRONILLI, V. et G. FERRO-LUZZI AMES. 1991. Binding protein-dependent histidine permease mutants. Uncoupling of ATP hydrolysis from transmembrane signalling. *J. Biol. Chem.* **266**: 16 293-16 296.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY. 1989. Miniprep Kit Plus™. Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY. 1989. Phastsystem™: Owner's manual. Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden.

PISTOCCHI, R., K. KASHIWAGI, S. MIYAMOTO, E. NUKUI, Y. SADAKATA, H. KOBAYASHI et K. IGARASHI. 1993. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **268**:146-152.

POURCHER, T., S. LECLERCQ, G. BRANDOLIN et G. LEBLANC. 1995. Melibiose permease of *Escherichia coli*: Large scale purification and evidence that H⁺, Na⁺, and Li⁺ sugar symport is catalyzed by a single polypeptide. *Biochem.* **34**:4412-4420.

PROMEGA. 1991. Gel drying kit: technical bulletin #91. Promega, Promega corporation, Madison, Wisconsin.

PUGSLEY, A.P. 1992. "Superfamilies of bacterial transport systems with nucleotide binding components." dans *Prokaryotic structure and function: A new perspective*. Dow, C. et Cole, J.A. (Eds), Soc. for Gen. Microbiol. Sym., Cambridge University Press, Cambridge. **47**: 223-248.

RUSSELL, R.R.B., J.A. OPOKU, I.C. SUTECLIFFE, L. TAO, et J.J. FERRETTI. 1992. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J. Biol. Chem.* **267**: 4631-4637.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning - A laboratory Manual*, (deuxième édition), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

SAURIN, W. et E. DASSA. 1994. Sequence relationships between integral inner membrane proteins of binding protein-dependent transport systems: Evolution by recurrent gene duplications. *Prot. Sci.* **3**: 325-344.

SCHNEIDER, E., S. WILKEN et R. SCHMID. 1994. Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP-binding cassette transporter protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 20 456- 20 461.

SCHWARTZ, M. 1987. The maltose regulon. Dans : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Éds. F.C.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low,

B. Magasanik, M. Schaechter et H.E. Umbarger. American Society for Microbiology, Washington, pp. 1482-1502.

SCRIPTURE, B.J., C. VOELKER, S. MILLER, R.T. O'DONNELL, L. POLGAR, J. RADE, B.F. HORAZDOVSKY et R.W. HOGG. 1987. High-affinity L-arabinose transport operon. *J. Mol. Biol.* **197**:37-46.

SEALE, D.R. 1987. Bacteria and enzymes as products to improve silage preservation. Dans: *Developments in Silage*. eds. Wilkinson et Stark, Chalcombe Publ., G.B., pp.47-61.

SHEA, C.M. et M.A. MCINTOSH. 1991. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:1415-1428.

SHILTON, B.H. et S.L. MOWBRAY. 1995. Simple models for the analysis of binding protein-dependent transport systems. *Prot. Sci.* **4**:1346-1355.

SHARECK, F., F. MONDOU, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1987. Cloning of DNA sequences involved in overproduction of endoglucanase activity in *Streptomyces lividans* 66. *Biotechnol. Lett.* **9**: 169-174.

SHARECK, F., C. ROY, M. YAGUCHI, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene* **107**: 75-82.

SHYAMALA, V., V. BAICHWAL, E. BEALL et G.F.-L. AMES. 1991. Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J. Biol. Chem.* **266**:18714-18719.

SIMONEN, M. et I. PALVA. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* **57**: 109-137.

SINGH, S.K. et M.R. MAURIZI. 1994. Mutational analysis demonstrates different functional roles for the two ATP-binding sites in ClpAP protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 29537-29545.

SIRKO, A., M. HRYNIEWICZ, D. HULANICKA et A. BOCK. 1990. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *J. Bacteriol.* **172**:3351-3357.

SOUMOUNOU, Y. et J.F. LALIBERTÉ 1994. Nucleic acid-binding properties of the p1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **75**: 1-7.

SREENATH, H.K., K.R. SUDARSHANAKRISHNA et K. SANTHARIAM. 1994.

Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases. *J. Ferment. and Bioeng.* **78**:486-488.

STAUDENMAIER, H., B. VAN HOVE, Z. YARAGHI et V. BRAUN. 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:2626-2633.

STUDIER, F.W. et B. A. MOFFATT. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

STUDIER, F.W., A.H. ROSENBERG, J.J. DUNN et J.W. DUBENDORFF. 1990. "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes" dans *Methods in Enzymology*. D.V. Goeddel, ed. Academic Press Inc. San Diego, California. **185**: 60-89.

TABOR, S. et C.C. RICHARDSON. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **82**: 1074-1078.

TAM, R. et M.H. SAIER, Jr. 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:320-346.

THÉBERGE, M., P. LACAZE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 815-820.

TODD, W. et J.E. KINSELLA. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/ vector pIJ702 for gene cloning. *Crit. Rev. in Microbiol.* **18**: 247-260.

TOWBIN, H., T. STAEBELIN et J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

TURNER, L.R., J.C. LARA, D.N. NUNN, et S. LORY. 1993. Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**: 4962-4969.

VALDIVIA, R.H., L. WANG et S.C. WINANS. 1991. Characterization of a putative periplasmic transport system for octopine accumulation encoded by *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6. *J. Bacteriol.* **173**:6398-6405.

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

122.

VIIKARI, L., M. RANUA, A. KANTELINEN, J. SUNDQUIST et M. LINKO. 1986. Bleaching with enzymes. Proc. Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm. pp. 67-69.

WALKER, J.E., M. SARASTE, M.J. RUNSWICK et N.J. GAY. 1982. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. 1:945-951.

WITTMANN, S., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1994. Purification and characterization of a second endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. Biochem. J. 60: 1701-1703.

WONG, K.K.Y., L.U.L. TAN et J.N. SADDLER. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. 52: 305-317.

WOODWARD, J., L.M. STEPHAN, L.J. KORAN, K.K.Y. WONG et J.N. SADDLER. 1994. Enzymatic separation of high-quality uninked pulp fibers from recycled newspapers. Bio/Technology 12:905-908.

WU, L. et N.E. WELKER. 1991. Cloning and characterization of a glutamine transport operon of *Bacillus stearothermophilus* NUB36: Effect of temperature on regulation of transcription. J. Bacteriol. 173:4877-4888.

YANG, J.L., G. LOU et K.E.L. ERIKSSON. 1992. The impact of xylanase on bleaching of kraft pulps. TAPPI 75: 95-101.

ZANKER, H., J. VON LINTIG et J. SCHRÖDER. 1992. Opine transport genes in the octopine (*occ*) and nopaline (*noc*) catabolic regions in Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 174:841-849.