

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude protéomique du mutant Δ msiK1 de *Streptomyces coelicolor* M145

Par
Annie Chouinard

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

Jury d'évaluation

Examineur interne
Examineur externe
Directeur de recherche

François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier
Ryszard Brzezinski, Université de Sherbrooke
François Shareck, INRS-Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

Les streptomycètes sont des bactéries saprophytes du sol responsables de la biodégradation de plusieurs polymères comme le xylane et la cellulose. Les systèmes de dégradation de ces composés en sucres simples nécessitent l'entrée active des inducteurs grâce à un complexe de perméases membranaires dont l'énergie est fournie par la protéine MsiK. Afin de mieux comprendre la régulation de la dégradation du xylane, un mutant négatif du gène *msiK* de la souche *Streptomyces coelicolor* M145 a été obtenu par une nouvelle méthode de dislocation génétique. La souche mutante obtenue soit le mutant $\Delta ms i K 1$, présente un phénotype négatif pour la dégradation du xylane, de la cellulose et de l'agar. Par la suite, l'analyse protéomique du mutant en comparaison avec la souche sauvage a été réalisée. Les protéines différemment exprimées selon les conditions de croissance ont été séparées sur gels électrophorèse en deux dimensions et ont été analysées en spectrométrie de masse. Une protéine a été identifiée soit la xylose isomérase. Cette protéine n'est pas produite en présence de xylane par le mutant $\Delta ms i K 1$.



Étudiant



Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Mes deux années passées à l'Institut Armand-Frappier ont été très fructueuses tant au niveau professionnel que personnel. Je prends aujourd'hui le temps de remercier ceux et celles qui ont participé à ma réussite.

Je remercierai tout d'abord mon directeur de recherche, François Shareck, pour avoir accueilli une biologiste de Rimouski dans son laboratoire. Merci François pour ton soutien financier. Merci aussi pour m'avoir permis de réaliser mon rêve de visiter l'Écosse. Tes histoires et tes trucs culinaires sont des répits que j'ai grandement appréciés. Merci également à François Lépine pour son expertise en spectrométrie de masse. Je voudrais aussi remercier tous les collègues qui ont contribué à ma formation : Liette, une ressource inestimable; François-Xavier, mon complice; et tous ceux et celles qui ont, un jour ou l'autre, répondu à mes nombreuses interrogations.

Merci à l'association étudiante de 2002-2003 qui m'a permis de m'épanouir socialement. Merci particulièrement à Annie, Catherine et Judith pour être simplement mes amies.

Je ne peux omettre Stéphane, mon mari, qui a m'a toujours motivé et encouragé. La vie à tes côtés est merveilleuse, je veux que tu le saches. Merci à ma mère, Micheline, et à Ghislain pour avoir toujours cru en moi. Yvan et Eric, merci d'être mes frères et de m'avoir forgé le caractère. Merci papa de m'avoir transmis toute ta malice et ton espièglerie. J'aimerais aujourd'hui que tu sois là pour voir à quel point ta fille est accomplie. Tu vas toujours me manquer.

**On rencontre sa destinée
Souvent par des chemins qu'on prend pour l'éviter.**

Jean de La Fontaine, 1621-1695

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations	xi
Introduction.....	1
1. Revue bibliographique.....	3
1.1 Les streptomycètes.....	4
1.1.1 Propriétés générales	4
1.1.2 Importance industrielle.....	5
1.2. La dégradation de polysaccharides	6
1.2.1 Organisation des gènes de dégradation des polysaccharides.....	6
1.2.2 <i>Streptomyces lividans</i> 10-164.....	6
1.2.3 La protéine MsiK	7
1.2.4 Le système xylanolytique.....	10
1.3. Le génome de <i>S. coelicolor</i> M145	13
1.4. Génomique fonctionnelle	15
1.4.1 Principe de la dislocation génétique.....	15
1.4.2 La méthode REDIRECT	18
1.4.2.1 Description de la méthode.....	18
1.4.2.2 Description de la cassette de dislocation.....	18
1.4.2.3 Cassettes de dislocation génétique.....	20
1.4.4.4 Le plasmide pIJ790	21
1.4.2.5 Méthylation de l'ADN	21
1.4.3 Protéomique.....	23
1.4.3.1 Électrophorèse en deux dimensions.....	24
1.4.3.2 Analyse de l'image	25
1.4.3.3 Digestion <i>in situ</i>	25

1.4.3.4 Spectrométrie de masse et recherche dans les bases de données.....	26
1.4.4 Autres méthodes d'analyses protéomiques	27
1.4.4.1 Chromatographie en deux dimensions	27
1.4.4.2 Caractérisation de protéomes complexes	28
2. Approche expérimentale.....	30
2.1 Liste des produits chimiques utilisés.....	31
2.2 Souches, plasmides et amorces.....	34
2.2.1 Souches bactériennes utilisées.....	34
2.2.2 Le plasmide pIJ773	34
2.2.3 Amorces.....	36
2.3 Milieux de culture	36
2.3.1 Composition des milieux nutritifs pour la croissance d' <i>E. coli</i>	36
2.3.1.1 Milieu 2XTY	36
2.3.1.2 Milieu SOB.....	36
2.3.2 Composition des milieux nutritifs pour la croissance de <i>S. coelicolor</i>	37
2.3.2.1 Milieu R5 solide.....	37
2.3.2.2 Milieu Stewart-RBB xylane	37
2.3.2.3 Milieu CMC.....	38
2.3.2.4 Milieux riches (TSB et TSA).....	38
2.3.2.5 Milieu liquide minimal (M14).....	38
2.3.2.6 Milieu MS (farine de soya mannitol).....	39
2.3.2.7 Agar nutritif Difco (DNA)	39
2.4 Préparation de spores	39
2.5. Dislocation génétique.....	39
2.5.1 Purification de la cassette de résistance	39
2.5.2 Élaboration des amorces.....	40
2.5.3 Amplification de la cassette de résistance par PCR.....	41
2.5.4 Introduction de l'ADN cosmétique de <i>S. coelicolor</i> dans <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790.....	42
2.5.5 Introduction du produit de PCR dans le cosmide d'intérêt de <i>S. coelicolor</i>	43
2.5.6 Isolement de l'ADN cosmétique	43

2.5.7 Vérification du cosmide mutant.....	44
2.5.8 Conjugaison entre <i>E. coli</i> et <i>S. coelicolor</i>	45
2.6 Extraction ADN chromosomique	46
2.7 Protéomique	47
2.7.1 Préparation de la culture.....	47
2.7.2 Préparation des protéines cytoplasmiques.....	47
2.7.3 Dosage des protéines	47
2.7.4 Précipitation et incorporation des protéines	48
2.7.6 Focalisation isoélectrique	48
2.7.7 Équilibrage des languettes.....	49
2.7.8 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	49
2.7.9 Coloration au nitrate d'argent	49
2.7.10 Analyse de l'image.....	50
2.7.11 Digestion des protéines avec la trypsine	50
2.8 Analyse en spectrométrie de masse.....	51
2.8.1 Concentration et purification des peptides	51
2.8.2 Injection des peptides.....	52
2.8.3 Analyse bioinformatique	52
3. Résultats.....	54
3.1 Préparation de la cassette de dislocation génétique	55
3.1.1 Digestion du plasmide pIJ773	55
3.1.2 Amplification de la cassette de résistance à l'apramycine	56
3.2 Introduction de l'ADN cosmique de <i>S. coelicolor</i> dans <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790	57
3.3 Transformation avec la cassette de dislocation.....	57
3.3.1 Vérification du cosmide mutant.....	58
3.4 Conjugaison et analyse des exconjugants.....	63
3.4.1 Vérification par PCR de l'insertion de la cassette Apra ^R dans l'ADN chromosomique	63
3.4.2 Vérification par séquençage de l'insertion de la cassette Apra ^R dans l'ADN chromosomique	65

3.4.3 Analyse phénotypique du mutant $\Delta msiK1$	67
3.5 Analyse protéomique.....	68
3.5.1 Analyse du protéome en présence de xylose.	68
3.5.2 Analyse du protéome en présence de xylane.....	69
3.5.3 Analyse par spectrométrie de masse des protéines différemment exprimées ...	72
3.5.4 Analyse par spectrométrie de masse de la protéine SC3.....	72
4. Discussion.....	79
4.1 Dislocation génétique du gène <i>msiK</i> chez <i>S. coelicolor</i> M145	80
4.1.1 La méthode REDIRECT	80
4.1.2 Analyse phénotypique du mutant.....	81
4.2 Analyse du protéome du mutant $\Delta msiK1$ de <i>S. coelicolor</i> M145	82
4.2.1 Gels en deux dimensions et détection des protéines	82
4.2.2 Analyse du protéome en présence de xylose	83
4.2.3 Analyse du protéome en présence de xylane.....	83
4.2.3.1 Analyse en spectrométrie de masse des protéines différemment exprimées	83
4.2.3.2 Analyse du profil peptidique de la protéine SC3	84
4.2.3.3 Fragmentation du peptide 737,0 de valeur de m/z.....	85
4.2.3.4 La protéine SC3 : la xylose isomérase	86
5. Conclusion	89
Bibliographie	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distribution des gènes de dégradation de certains polysaccharides chez <i>S. coelicolor</i> M145	6
Figure 2. Séquence du gène <i>msiK</i> de <i>Streptomyces lividans</i>	9
Figure 3. Organisation des gènes du système xylanolytique.....	11
Figure 4. Système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	12
Figure 5. Carte physique du vecteur SuperCos 1.....	14
Figure 6. Dislocation génétique par intégration d'un vecteur par simple recombinaison homologue.....	16
Figure 7. Remplacement d'un gène par un marqueur par double recombinaison homologue.....	17
Figure 8. Organisation de la cassette de dislocation génétique.	19
Figure 9. Carte physique du plasmide pIJ790.	22
Figure 10. Carte physique du plasmide pIJ773.....	35
Figure 11. Élaboration des amorces pour l'amplification de la cassette de résistance.	40
Figure 12. Digestion du plasmide pIJ773 par <i>EcoRI</i> et <i>HindIII</i>	55
Figure 13. Amplification de la cassette de résistance à l'apramycine par PCR.	56
Figure 14. Carte physique du cosmide D49	59
Figure 15. Carte physique du cosmide D49 <i>msiK</i> : : <i>aac(3)IV</i>	60
Figure 16. Cosmide D49 <i>msiK</i> : : <i>aac(3)IV</i> digéré avec <i>SacI</i>	62
Figure 17. Vérification par PCR de l'ADN chromosomique du mutant Δ <i>msiK1</i>	64
Figure 18. Séquençage de l'amplicon de l'ADN de Δ <i>msiK1</i>	66
Figure 19. Croissance du mutant Δ <i>msiK</i> et de la souche sauvage M145 sur milieu solide	67
Figure 20. Gels en deux dimensions de pH 4-7 (18 cm) des protéines cytoplasmiques des souches cultivées en présence de xylose 1% pour la souche sauvage M145 et la souche mutante Δ <i>msiK1</i>	68
Figure 21. Gels en deux dimensions de pH 3-10 (18 cm) des protéines cytoplasmiques en présence de xylane soluble 1% pour la souche sauvage M145 et la souche mutante Δ <i>msiK</i>	70

Figure 22. Gels en deux dimensions de pH 4-7 (18 cm) des protéines sécrétées en présence de xylane soluble 1% pour la souche sauvage M145 et la souche mutante <i>ΔmsiK1</i>	71
Figure 23. Spectre de masse de la digestion à la trypsine de la protéine SC3.....	74
Figure 24. Spectre de masse de la fragmentation de l'ion 737,0.....	78
Figure 25. Nouveau modèle hypothétique de dégradation du xylane par les streptomycètes.....	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Cassettes de dislocation génétique.....	20
Tableau 2. Classement des protéines de <i>S. coelicolor</i> M145.	24
Tableau 3. Liste des souches	34
Tableau 4. Amorces nucléotidiques employées.....	36
Tableau 5. Conditions de température et de temps pour la réalisation de l'amplification de la cassette.....	41
Tableau 6. Conditions de température et de temps pour la réalisation de l'amplification de la cassette dans le cosmide mutant	44
Tableau 7. Paramètres de l'analyse par le logiciel PeptIdent.....	53
Tableau 8. Longueur des fragments de digestion attendus par la digestion avec <i>SacI</i>	61
Tableau 9. Points isoélectriques et masses moléculaires approximatifs des protéines différemment exprimées	69
Tableau 10. Masses des ions moléculaires	75
Tableau 11. Identification et séquence de la protéine SC3.....	75
Tableau 12. Masses peptidiques observées sur le spectre de masse en comparaison avec la digestion <i>in silico</i> de la protéine.....	76
Tableau 13. Masses des résidus en acide aminés observées sur le spectre de masse en comparaison avec la masse théorique.....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μA	microampère (s)
ADN	acide désoxyribonucléique
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthyl-ammonio]-1-propanesulfonate
$^{\circ}\text{C}$	degré Celcius
2-D	deux dimensions
DMSO	Sulfoxyde de diméthyl
DTT	dithiothréitol
EDTA	Éthylènediamine-tétraacétate de disodium
g	gramme (s)
μg	microgramme (s)
kb	kilopaire (s) de base (s)
kDa	kilodalton (s)
μl	microlitre (s)
μm	micromètre (s)
M	molaire
mA	milliampère (s)
min	minute (s)
m/z	masse/charge
mg	milligramme (s)
ml	millilitre (s)
mM	millimolaire (s)
NTG	N-méthyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine
pb	paire (s) de base (s)
PCR	réaction de polymérase en chaîne
pI	point isoélectrique
p/v	poids/volume
rpm	révolution (s) par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde (s)

TCA	acide trichloracétique
TES	acide N-tris(hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique
TFA	acide trifluoracétique
Tris	tris(hydroxyméthyl) aminométhane
U	unité
V	volt (s)
Vh	volt-heures
v/v	volume/volume

INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des bactéries saprophytes du sol. Elles sont abondamment employées dans l'industrie pour la production d'antibiotiques. Elles produisent également plusieurs autres métabolites secondaires comme des antifongiques, des herbicides, des enzymes hydrolytiques etc. En effet, puisqu'elles se retrouvent dans le sol, elles sont aptes à utiliser une grande variété de polymères comme source de carbone. Certaines de ces enzymes hydrolytiques dont les xylanases et les cellulases sont employées dans les procédés de bioblanchiment des pâtes et papiers. Une connaissance plus approfondie de la sécrétion et de la régulation de ces enzymes pourraient mener à leur meilleure utilisation dans l'industrie.

Plusieurs gènes du système xylanolytique ont déjà été caractérisés chez *Streptomyces lividans*. L'étude de cette voie catabolique chez ce microorganisme a été entreprise par le groupe de recherche sur les streptomycètes de l'INRS-Institut Armand-Frappier. L'approche préconisée dans le présent projet consiste à disloquer un gène du système xylanolytique pour ensuite identifier les protéines affectées par la mutation afin de leur assigner une fonction. La protéine du système xylanolytique sélectionnée pour cette étude est la protéine MsiK : un transporteur de type ABC.

Depuis peu, le génome de *Streptomyces coelicolor* M145 (un très proche parent de *S. lividans*) a été séquencé. La connaissance du génome est un outil incomparable pour les études en protéomique. En effet, il est impossible d'identifier une protéine avec certitude sans la connaissance du génome. La présente étude a donc été réalisée avec *Streptomyces coelicolor* M145.

L'objectif premier de ce projet est de réaliser la dislocation génétique du gène *msiK* chez *Streptomyces coelicolor* M145 par une nouvelle méthode de dislocation génétique. Cette méthode consiste à remplacer le gène d'intérêt sur un cosmide par une cassette qui contient un gène de résistance à un antibiotique. Par la suite, le cosmide modifié est transféré par conjugaison dans *Streptomyces coelicolor* M145 où il y aura

encore une fois double recombinaison au niveau des séquences homologues. Une fois le mutant obtenu, le phénotype de celui-ci sera comparé avec le phénotype de la souche sauvage.

Le second objectif de ce projet est d'effectuer l'étude protéomique du mutant en comparaison avec la souche sauvage en présence de xylose et de xylane. Les protéines différemment exprimées seront analysées en spectrométrie de masse pour être par la suite identifiées. L'identification de ces protéines confirmera et expliquera l'implication de la protéine MsiK dans le système xylanolytique.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les streptomycètes

1.1.1 Propriétés générales des streptomycètes

Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses Gram positif de l'ordre des *Actinomycetales*. Ce sont des saprophytes ubiquitaires du sol mais ils peuvent également se retrouver dans certains écosystèmes extrêmes comme les sources d'eau thermales (Xu *et al.*, 1998) ainsi que dans les sédiments marins de l'Antarctique (Ivanova *et al.*, 2001). Leur distribution géographique importante est liée au fait qu'ils sont aptes à sécréter une grande variété d'enzymes hydrolytiques afin de dégrader les polymères retrouvés dans la biomasse comme la cellulose, le xylane, la lignine, l'amidon, la chitine, les lipides, etc. et de s'en servir comme source de carbone et d'azote. Certaines espèces de streptomycètes dégradent également des composés organochlorés persistants dans l'environnement comme le 2,4-dichlorophénol (Yee et Wood, 1997) ainsi que le pentachlorophénol (Zaborina *et al.*, 1997). Elles compétitionnent aussi avec les microorganismes du milieu en sécrétant notamment des antibiotiques et des antifongiques.

Le cycle de vie complexe des streptomycètes est largement étudié puisque la production d'antibiotique est liée à la phase de croissance (Kieser *et al.*, 2000). En effet, malgré le fait que les streptomycètes soient des procaryotes, elles se développent en utilisant un cycle de différenciation complexe. Les spores sont la forme de résistance de la bactérie et permettent de subsister lorsque l'apport de nutriments et d'eau est faible (Kieser *et al.*, 2000). Lorsque les conditions redeviennent favorables, il y aura formation du mycélium. À ce moment, un ou deux tubes germinatifs émergeront de la spore et formeront le mycélium. Après développement du mycélium, il y a formation d'hyphes aériens et enfin, sporulation.

1.1.2 Importance industrielle des streptomycètes

Il est bien connu que les streptomycètes produisent une grande diversité d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires biologiquement actifs. Près des deux tiers des antibiotiques connus sont produits par des actinomycètes dont environ 80 % proviennent des streptomycètes. Les autres métabolites secondaires sont utilisés par exemple comme agents antifongique, herbicide, antitumoral, antiparasitaire, immunosuppresseur etc. (Kieser *et al.*, 2000).

En parallèle à l'étude des métabolites secondaires, l'étude des enzymes hydrolytiques tels que les cellulases et les xylanases produites par les streptomycètes est en expansion. Ces enzymes hydrolytiques sont responsables de la dégradation de la matière lignocellulosique dans la biomasse et sont employés dans divers procédés. Le pré-traitement des fibres de coton par des cellulases permet un meilleur blanchiment des fibres et une diminution du peroxyde d'hydrogène utilisé dans le procédé (Csiszàr *et al.*, 2001). Cette propriété d'agent blanchissant des cellulases est aussi partagée par les xylanases qui sont employées dans l'industrie des pâtes et papiers et permettent de réduire la quantité de chlore et autres décharges toxiques dans les eaux usées de ces usines (Prade, 1996). De plus, les xylanases et cellulases peuvent convertir la cellulose et l'hémicellulose en éthanol (Chandrakant et Bisaria, 1998). Les recherches sur les enzymes produites par les streptomycètes ont aussi permis d'élaborer un édulcorant à partir de l'amidon (Kaneko *et al.*, 2000).

Les recherches sur la production d'antibiotiques et d'enzymes ont mené à une connaissance approfondie de la génétique et de la physiologie des streptomycètes. Par exemple, il est bien connu que les streptomycètes sont capables de produire une grande quantité d'enzymes lignocellulolytiques et qu'ils possèdent un système de sécrétion de protéines efficace (Gilbert *et al.*, 1995). Cette habileté peut être exploitée pour la production de protéines recombinantes en clonant des gènes ou des groupes de gènes d'intérêt (Anné et Mellaert, 1993; Gilbert *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2000).

1.2. La dégradation de polysaccharides

1.2.1 Organisation des gènes de dégradation des polysaccharides

Les streptomycètes sont capables de dégrader une grande variété de polymères dont notamment plusieurs polysaccharides. Certains gènes de dégradation ont été identifiés et séquencés. La figure 1 présente l'organisation des gènes de dégradation de différents polymères sur le chromosome linéaire de *S. coelicolor* M145. Il est possible de constater que certains d'entre eux ne sont pas organisés en opéron même s'il s'agit de gènes impliqués dans la même voie catabolique. La régulation des différents systèmes de dégradation semble donc être régie par différents promoteurs.

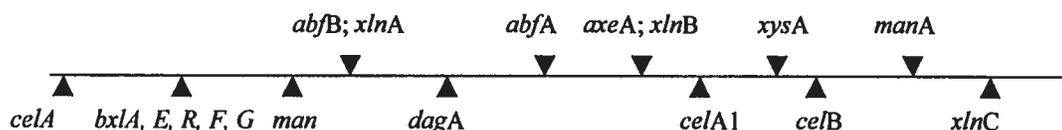


Figure 1. Distribution des gènes de dégradation de certains polysaccharides chez *S. coelicolor* M145 sur le chromosome (basé sur Hopwood, 1999).

Légende :

celA, *celA1*, *celB* : gènes impliqués dans la dégradation de la cellulose

bxlA, *R*, *E*, *F*, *G*, *abfA*, *abfB*, *axeA*, *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, *xysA*: gènes de dégradation du xylane

man, *manA* : gènes de dégradation du mannane

dagA : gène de dégradation de l'agar

1.2.2 *Streptomyces lividans* 10-164

En 1986, Mondou *et al.* du groupe de recherche sur les streptomycètes de l'INRS-Institut Armand-Frappier ont obtenu un mutant de *S. lividans* incapable de dégrader le xylane et la cellulose par mutagenèse au NTG (N-méthyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine). La mutation pourrait affecter l'expression de plusieurs gènes et créer un effet

d'interaction appelé effet pléiotropique. Le mutant 10-164 a permis de caractériser trois xylanases (Mondou *et al.*, 1986; Kluepfel *et al.*, 1990; Vats-Mehta *et al.*, 1990; Shareck *et al.*, 1991) une mannanase (Arcand *et al.*, 1993) et deux cellulases (Théberge *et al.*, 1992; Wittmann *et al.*, 1994) chez *S. lividans*.

1.2.3 La protéine MsiK

En 1995, Hurtubise *et al.* ont cloné chez le mutant 10-164 un gène à partir d'une banque de gènes rétablissant ainsi ses fonctions xylanolytique et cellulolytique. Le gène a été séquencé et il code pour une protéine de 40 kDa qui appartient à la superfamille des protéines ABC (ATP-Binding Cassette) qui constitue la plus grande famille de protéines connue jusqu'à présent. Les transporteurs de type ABC sont impliqués dans le transport d'une grande variété de substrats incluant les acides aminés, les peptides, les sucres, les toxines, les lipides, les drogues etc. et sont présents chez tous les organismes vivants (Chang et Roth, 2001). Les membres de cette superfamille possèdent des régions peptidiques hautement conservés comme les motifs Walker A (G-X-X-G-X-G-K-S/T) et B (D-E-A/P-T-S-A-L-D ou une séquence similaire) communs à toutes les protéines nécessitant de l'ATP ainsi qu'une autre séquence signature des transporteurs de type ABC (L-S-G-G-Q) (Holland et Blight, 1999). Les deux motifs Walker constituent les sites de fixation nucléotidique ou NBD (Nucleotide Binding Domain). Ils sont situés du côté cytoplasmique de la membrane et hydrolysent l'ATP (Higgins et Linton, 2001). Quant à la signature, il semblerait qu'elle soit impliquée dans la signalisation intramoléculaire et l'activité catalytique (Holland et Blight, 1999).

La figure 2 montre la séquence protéique de MsiK ainsi que la séquence nucléotidique correspondante. Les motifs relatifs aux transporteurs ABC sont également représentés. Pour ce qui est du mutant 10-164 de *S. lividans*, la mutation a eu lieu dans le motif Walker B. Le codon GAC a été modifiée pour le codon AAC changeant ainsi un acide aspartique pour l'asparagine. La protéine mutante ne pouvait donc plus fixer l'ATP et faire entrer les inducteurs du système xylanolytique et cellulolytique, ce qui pourrait expliquer l'effet pléiotropique observé.

13744@ atggccactg ttacgttcga caagcgacc cgtgtgtacc cgggttccac gaagccgcc gtcgacggtc tcgacatcga catcgccgac
m a t v t f d k a t r v y p g s t k p a v d g l d i d i a d

13654@ ggcgagttcc tcgtcctggt cggcccctcc gttgttgca agtccacctc gctcccggatg ctgcccggc tcgaggacgt gaacggcggc
g e f l v l v **h p s q c g k** t s l r m l a g l e d v n g g

13564@ gccatccgca tcggtgaccg cgagtgacg cacctgccc cgaagaccg ggcacatgcc atggtgttcc agaactacgc gctgtatccc
a i r i g d r d v t h l p p k d r d i a m v f q n y a l y p

13474@ cacatgtcgg tcgcccacaa catgggttc gccctcaaga tcgccgctg caacaagcg gagatccgc agaaggtcga ggagggcggc
h m s v a d n m g f a l k i a g v n k a e i r q k v e e a a

13384@ aagatcctcg acctcaccga gtacctggac cgcaagccga aggcctctc cggcggctcag cgcaagcgtg tggcgtatgg cgcgcgcat
k i l d l t e y l d r k p k a **l s g g q** q r v a m g r a i

13294@ gtgcgtgagc cgcaggtgt cctcatg **gac** gagccgtgt ccaacctgga cgccaagctc cgcgtctcca ccggtacgca gatcgcctcg
v r e p q v f l m d **e p l s n l d** a k l r v s t r t q l a s

13204@ ctccagccgc gcctgggcat caccacgctc tacgtcacc cagaccaggt cgaggccatg acgatgggcg accgcgtggc ggtcctcaag
l q r r l g i t t v y v t h d q v e a m t m g d r v a v l k

13114@ gacggtctgc tccagcaggt cgaactccc cggacaatgt acgacaagcc cgcgaacctc ttcgtccgcg gattcatcgg ctcccggcc
d g l l q q v d s p r n m y d k p a n l f v a g f i g s p a

13024@ atgaacctgg tcgaggtccc gatcaccgac ggcggcgtga agttcggcaa cagcgtgctc ccggtcaacc ggcacccct gaagggcggc
m n l v e v p i t d g g v k f g n s v v p v n r d a l k a a

12934@ tccgacaagg ggcaccgac ggtcaccgtc ggtgtcccgc cggagcactt cgacgtcgtg gagctgaacg gggcgccgc caagaccctg
s d k g d r t v t v g v r p e h f d v v e l n g g a a k t l

12844@ tcgaaggact cggcggacgc cccggccggc ctcgggtct cgggtgaact cgtggaggag accggcgcgc acggctacat ctacggcacc
s k d s a d a p a g l a v s v n v v e e t g a d g y i y g t

12754@ gtcgaggtcg gcggcgagac gaaggacctc gtgtcccgcg tcagcagccg cgcgggtccg gagaagggcg cgaccgtcca cgtcgtgccc
v e v g g e t k d l v v r v s s r a v p e k g a t v h v v p

12664@ cgtccggggc agatccact gttctcctcc tccacggggc agcgcctcac cgactga
r p g e i h v f s s s t g e r l t d -

Figure 2. Séquence du gène *msiK* de *Streptomyces lividans* et des motifs associés à un transporteur ABC (Hurtubise *et al.*, 1995)

Légende :

gpsgcgks : Walker A

lsggr : Séquence signature des transporteurs de type ABC

deplsnld : Walker B

gac : codon muté chez le mutant 10-164

1.2.4 Le système xylanolytique

Le xylane est l'un des polymères dégradés par les streptomycètes. Contrairement à la cellulose qui est un polymère linéaire de résidus D-glycosyl relié en β -(1 \rightarrow 4), le xylane est un polymère de D-xylose relié par des liens β -(1 \rightarrow 4) substitué avec plusieurs groupements tel que l'arabinose et l'acide glucuronique (Clark, 1997). Le xylane est le constituant principal de l'hémicellulose qui est le polysaccharide non-cellulosique principal de la membrane cellulosique des gymnospermes et de la paroi cellulosique des angiospermes. Une meilleure compréhension de la régulation du système de dégradation du xylane et des enzymes impliqués permettront la surproduction éventuelle des hémicellulases pour le bioblanchiment des pâtes et papiers.

Grâce au séquençage du gène *msiK* en 1995, le système xylanolytique *S. lividans* a pu être décrit en bonne partie. Le modèle hypothétique du système xylanolytique chez *S. lividans* est présenté à la figure 4. Puisque le xylane possède une structure complexe, il ne peut pénétrer tel quel à l'intérieur de la bactérie. Pour permettre sa dégradation, la bactérie sécrète plusieurs enzymes. D'abord, l'arabinofuranosidase B et l'acétyl xylane estérase A cliveront respectivement les substitutions arabinoses et acétyles. Par la suite, les xylanases pourront hydrolyser le xylane pour former des oligoxylosides soit le xylobiose (X2) et le xylotriose (X3). Ceux-ci seront transportés à l'intérieur de la bactérie par un système de perméase formé des protéines BxlE, BxlF et BxlG dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP en ADP par la protéine MsiK. Les oligosides possédant encore des groupements arabinoses à l'intérieur du cytoplasme sont hydrolysés par l'arabinofuranosidase A pour former du xylobiose et du xylotriose. Finalement, le xylobiose et le xylotriose seront hydrolysés en xylose par la β -xylosidase intracellulaire. Quant à la protéine BxlR, il s'agit d'une protéine de régulation se fixant à un palindrome à proximité des gènes du complexe (Larocque, 1998). La régulation du système xylanolytique n'est pas encore bien comprise. Ainsi, l'implication de la protéine BxlR ou de d'autres protéines de régulation reste à démontrer.

Pour ce qui est de l'organisation des gènes du système xylanolytique, elle est présentée à la figure 3. Les gènes *msiK*, *xlnC* et *bxlR* ne sont pas organisés en opéron contrairement aux gènes du système de perméase et aux gènes *xlnB* et *axeA*. Les autres gènes du système possèdent leur propre promoteur. Pour ces gènes, il est possible d'effectuer des dislocations génétiques sans effet polaire. Par contre, pour les gènes organisés en opéron, une dislocation du gène situé en amont pourrait entraîner un effet polaire à moins que la dislocation ne soit effectuée dans le cadre de lecture de la protéine.

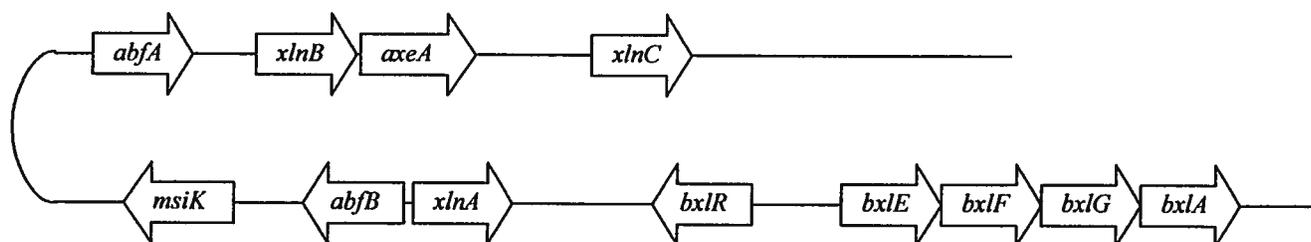


Figure 3. Organisation des gènes du système xylanolytique.

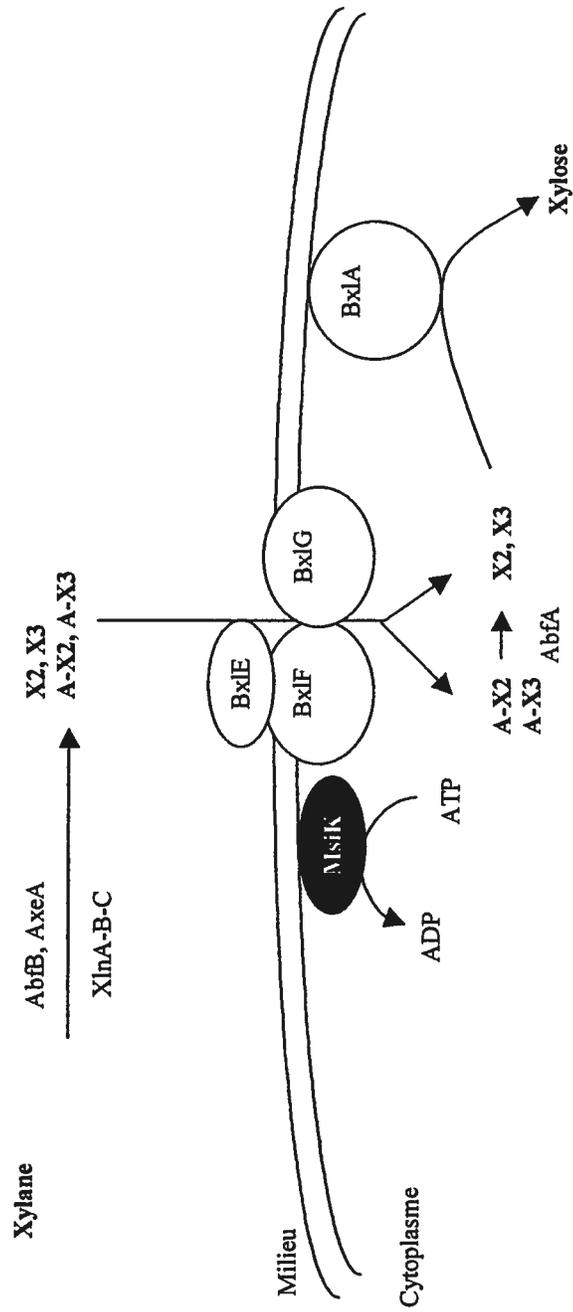


Figure 4. Modèle hypothétique du système de dégradation du xylane chez *S. lividans*

1.3. Le génome de *S. coelicolor* M145

Le 1^{er} août 1997, le Centre Sanger au Royaume-Uni a entrepris le séquençage du génome de *S. coelicolor* M145. La souche M145, dérivée de la souche A3(2), est prototrophe et ne possède aucun plasmide. Le séquençage a été réalisé par l'approche clone par clone en utilisant les cosmides générés et cartographiés par le groupe de David Hopwood au Centre John Innes. Tout d'abord, une banque de cosmides de l'ADN de *S. coelicolor* M145 a été construite et possède avec des insertions d'une taille moyenne de 37,5 kbs (Redenbach *et al.*, 1996). Le vecteur SuperCos qui a été employé est présenté à la figure 5 ainsi que le site de clonage *Bam*HI permettant le clonage de l'insertion. Finalement, 319 clones ont été sélectionnés et ordonnés afin de couvrir la totalité du chromosome.

Récemment, le génome de *S. coelicolor* M145 a été complètement séquencé (Bentley *et al.*, 2002). La séquence du génome révèle une multitude d'informations. Le chromosome linéaire compte 8 667 507 paires de base et 72,12% de résidus guanine et cytosine. Le contenu en G+C est élevé comparativement à d'autres genres bactériens comme par exemple *Escherichia coli* K12 qui possède 50,8 % de résidus G+C (Blattner *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il est possible de comparer le génome de *Streptomyces coelicolor* M145 avec le génome de d'autres organismes. Par exemple, les streptomycètes sont du même ordre bactérien (Actinomycètes) que les agents causants la tuberculose et la lèpre (*Mycobacterium tuberculosis* et *M. leprae*). Leur génome étant séquencé, il est possible d'apprendre sur ces pathogènes en effectuant des comparaisons génomiques avec les streptomycètes saprophytes ou en utilisant ces derniers comme système d'expression de protéines (Bentley *et al.*, 2002).

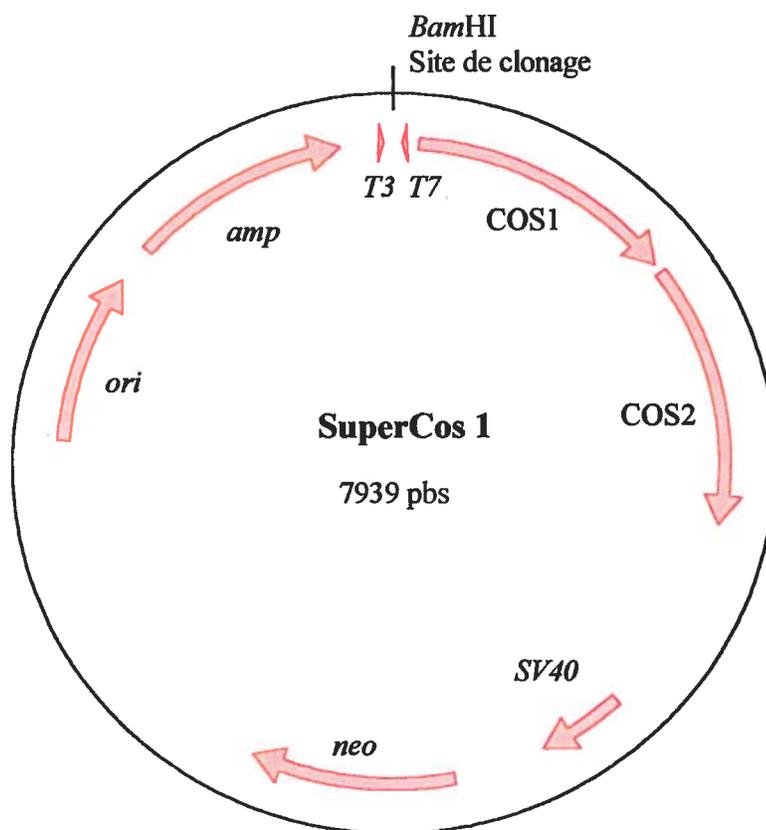


Figure 5. Carte physique du vecteur SuperCos 1 employé pour la construction de la banque cosmique *S. coelicolor* M145.

Légende :

T3 et *T7* : promoteurs de bactériophages

neo : gène de la résistance à la kanamycine

amp : gène de résistance à l'ampicilline

ori : origine de réplication du cosmide chez les procaryotes

SV40 : origine de réplication chez les eucaryotes

COS 1 et COS 2 : séquences nécessaires à l'encapsidation

1.4. Génomique fonctionnelle

La séquence génomique ne révèle que très peu d'informations quant aux fonctions des gènes. Par contre, une fois que la séquence est connue, il est possible de déterminer les cadres de lecture ouverts et de les traduire en protéines. Le chromosome de *S. coelicolor* a un énorme potentiel codant comparativement aux autres génomes séquencés jusqu'à maintenant. En effet, avec ses 7 816 protéines potentielles, *S. coelicolor* surpasse largement *E. coli* (4 289 protéines); *Bacillus subtilis* (4 099 protéines) et *Saccharomyces cerevisiae* (6 203 protéines) (Bentley *et al.*, 2002). L'étape suivante est d'assigner une fonction aux protéines potentielles. Pour ce faire, différentes approches peuvent être envisagées dont notamment la dislocation génétique et la protéomique.

1.4.1 Principe de la dislocation génétique

La dislocation génétique consiste d'interrompre ou remplacer la séquence d'un gène pour empêcher son expression. Par la suite, le phénotype du mutant pourra être comparé à celui de la souche sauvage. De cette façon, la fonction du gène d'intérêt pourra être identifiée. Cependant, lorsque la mutation a un effet pléiotropique ou lorsqu'aucun changement de phénotype n'est observé, l'assignation d'une fonction précise pour le gène peut s'avérer difficile.

Pour interrompre la séquence d'un gène, il s'agit d'intégrer un vecteur qui porte un marqueur de sélection dans la séquence du gène à disloquer. Le vecteur ne pouvant pas se répliquer dans la bactérie, il y aura donc obligatoirement intégration du vecteur pour que la bactérie acquière le marqueur de sélection. Pour ce faire, il y aura simple recombinaison entre les séquences homologues du vecteur et celles du chromosome comme le montre la figure 6. Le gène ainsi interrompu ne peut plus exercer sa fonction.

Pour remplacer un gène, il suffit d'introduire un vecteur qui contient deux marqueurs dont un est bordé de chaque côté par des séquences homologues au gène à

remplacer. La double recombinaison aura lieu entre les séquences homologues du vecteur et du chromosome comme le montre la figure 7. Les intégrants seront sélectionnés pour la résistance au premier antibiotique mais pour la sensibilité au second antibiotique afin d'éliminer les événements de simple recombinaison.

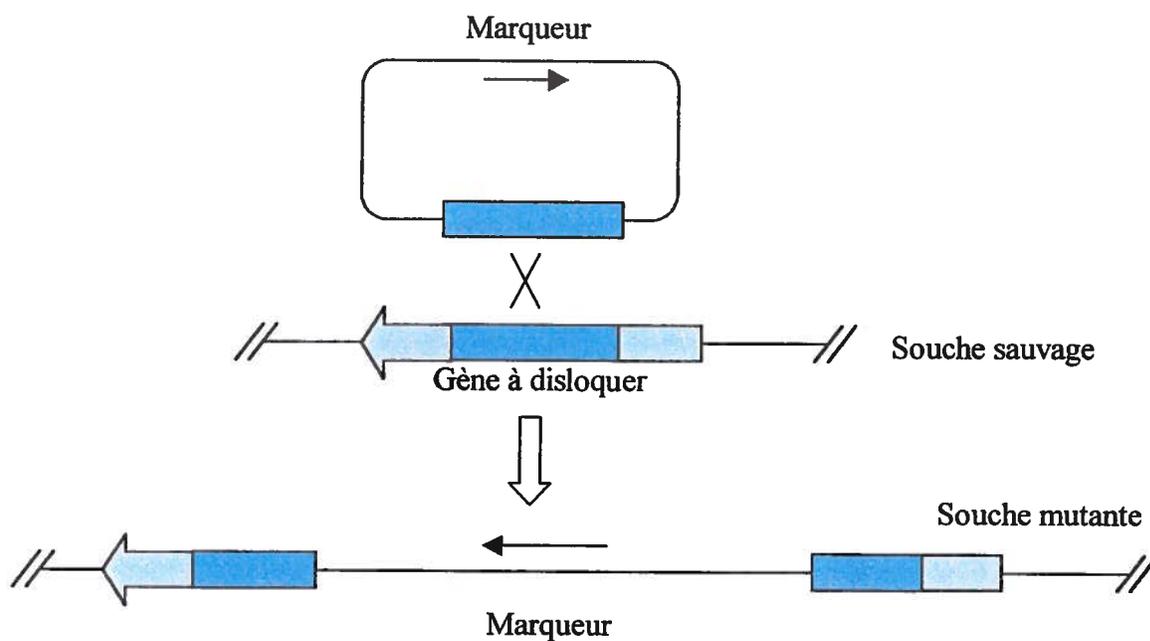


Figure 6. Dislocation génétique par intégration d'un vecteur par simple recombinaison homologue. La recombinaison aura lieu entre les séquences homologues en bleu.

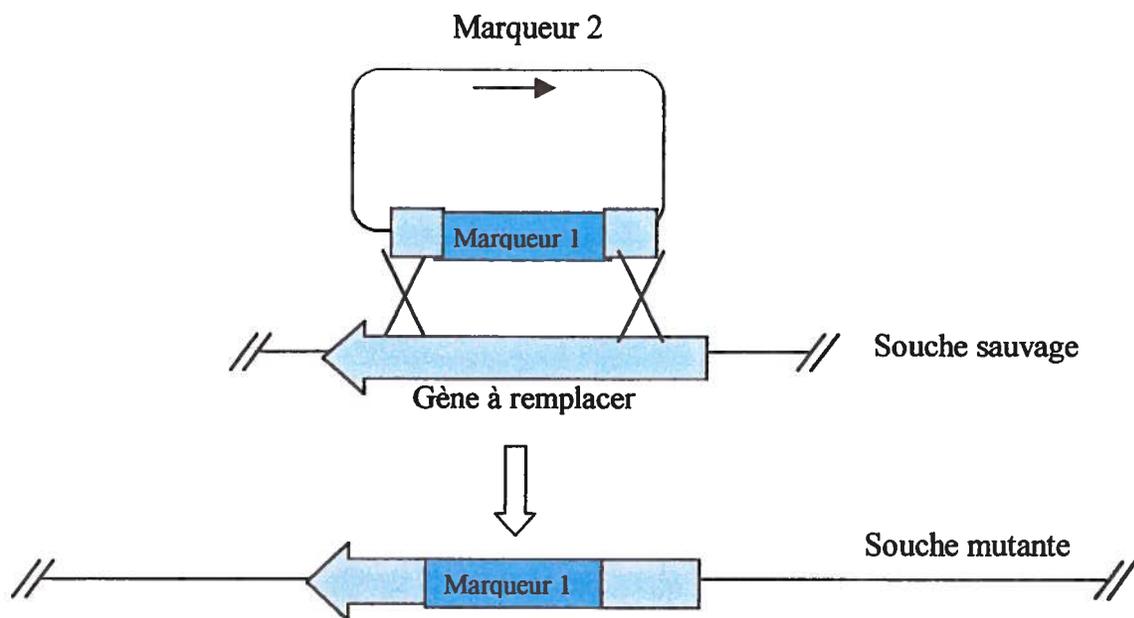


Figure 7. Remplacement d'un gène par un marqueur par double recombinaison homologue. La double recombinaison aura lieu entre les séquences homologues en mauve.

1.4.2 La méthode REDIRECT

1.4.2.1 Description de la méthode

La méthode REDIRECT consiste à remplacer la séquence du gène à disloquer sur un cosmide de *S. coelicolor* par une cassette qui contient un gène de résistance à un antibiotique. Pour ce faire, la cassette qui contient le gène de résistance à l'antibiotique est amplifiée avec des amorces qui contiennent des séquences homologues et spécifiques au gène à disloquer. La double recombinaison aura alors lieu entre les séquences homologues du produit de PCR et du cosmide. Par la suite, le cosmide modifié sera introduit dans *S. coelicolor* par conjugaison. Il y aura alors une double recombinaison homologue entre l'ADN cosmidique et l'ADN chromosomal interrompant ainsi la séquence du gène d'intérêt.

Tous les cosmides utilisés pour la construction de la carte physique et génétique du chromosome de *S. coelicolor* M145 ont été introduits dans la souche de *E. coli* BW25113. Il est donc possible de disloquer n'importe quel gène du génome par la méthode REDIRECT.

1.4.2.2 Description de la cassette de dislocation

La dislocation génétique s'effectue en remplaçant le gène d'intérêt par un gène de résistance à un antibiotique. Celui-ci est inclus dans une cassette dont l'organisation est présentée à la figure 8. Il est possible de constater que le marqueur possède son propre promoteur. De plus, l'inclusion de l'origine de transfert *oriT* dans la cassette permettra d'utiliser la conjugaison afin d'introduire le cosmide disloqué dans la souche de *S. coelicolor*. Enfin, l'inclusion de sites FRT dans la cassette permettra l'excision de la cassette par la recombinase « Flip » afin de produire, si nécessaire, des interruptions du cadre de lecture.

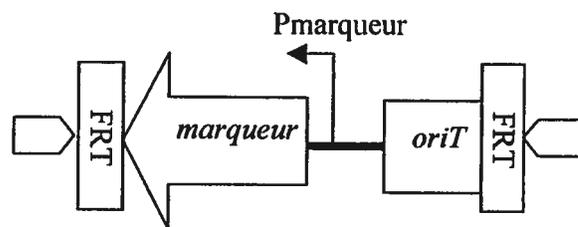


Figure 8. Organisation de la cassette de dislocation génétique contenant le gène de résistance à l'antibiotique.

Légende :

FRT : site de reconnaissance de la recombinase

marqueur : gène de résistance à l'antibiotique

Pmarqueur : promoteur du gène de résistance à l'antibiotique

oriT : origine de transfert nécessaire à la conjugaison.

1.4.2.3 Cassettes de dislocation génétique avec différents marqueurs

La méthode REDIRECT prévoit la possibilité d'effectuer la dislocation de plusieurs gènes dans la même souche. Pour ce faire, il suffit d'utiliser un marqueur de résistance différent pour chacun des gènes à disloquer. Le tableau 1 présente les différents marqueurs qui peuvent être employés ainsi que la ou les résistances qui y sont associées. Ces marqueurs sont inclus dans une cassette de dislocation avec ou sans origine de transfert et la taille des cassettes varie de 1118 pbs à 1540 pbs. Après une dislocation avec une cassette contenant une origine de transfert, les dislocations subséquentes sur un cosmide peuvent être effectuées en utilisant des cassettes ne contenant pas d'origine de transfert puisqu'une seule origine de transfert est nécessaire à la conjugaison. Enfin, les cassettes de dislocation sont incluses dans différents vecteurs plasmidiques comme l'indique le tableau 1.

Tableau 1. Cassettes de dislocation génétique contenant différents marqueurs de résistance avec ou sans origine de transfert.

Marqueur de résistance	Résistance	Origine de transfert	Taille de la cassette	Nom du plasmide vecteur
<i>aac (3)IV</i>	Apramycine	+	1384 pbs	pIJ773
<i>aadA</i>	Spectinomycine et streptomycine	+	1424 pbs	pIJ778
<i>aadA</i>	Spectinomycine et streptomycine	-	1118 pbs	pIJ779
<i>vph</i>	Viomycine	+	1496 pbs	pIJ780
<i>vph</i>	Viomycine	-	1540 pbs	pIJ781

1.4.4.4 Le plasmide pIJ790

La méthode REDIRECT a d'abord été élaborée pour disloquer des gènes de *E. coli* par Datsenko et Wanner (2000). Ils ont effectué 40 dislocations génétiques différentes sans aucune erreur. L'efficacité de la méthode est directement reliée à la présence du plasmide pIJ790 (figure 9) dans la souche *E. coli* BW25113. Ce plasmide est dérivé du plasmide pKD20 employé par Datsenko et Wanner. Plusieurs bactéries ne peuvent être transformées avec de l'ADN linéaire puisque l'exonucléase *recBCD* dégrade cet ADN. Pour pallier ce phénomène, les gènes *gam*, *bet* et *exo* présents sur le plasmide pIJ790 inhibent l'action de l'exonucléase et augmentent ainsi le taux de recombinaison. Ces gènes sont sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose et le plasmide est facilement curable puisqu'il possède une origine de réplication thermosensible.

1.4.2.5 Méthylation de l'ADN

Certaines bactéries possèdent un système de restriction spécifique qui dégrade l'ADN méthylé. C'est le cas notamment pour *S. coelicolor* M145. Ce système de restriction peut être contourné en conjugant l'ADN cosmétique dans *S. coelicolor* à partir d'une souche qui n'effectue pas la méthylation de l'ADN comme la souche *E. coli* ET12567 (MacNeil *et al.*, 1992). La conjugaison se fera grâce au plasmide pUZ8002 présent dans la souche *E. coli* ET12567. Ce plasmide possède les gènes qui permettront le transfert de l'ADN cosmétique dont notamment les gènes qui codent pour le pilus sexuel. Par contre, il ne possède pas les gènes pour son propre transfert et est donc non transmissible (Kieser *et al.*, 2000).

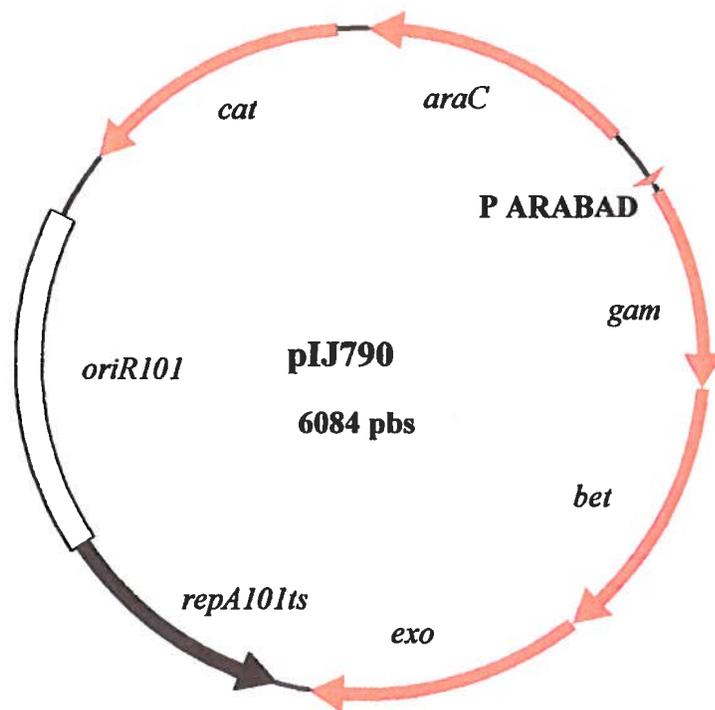


Figure 9. Carte physique du plasmide pIJ790.

Légende :

araC : activateur de l'arabinose

bet : code pour une protéine qui se fixe à l'ADN simple brin, favorise la recombinaison

cat : gène de résistance au chloramphénicol

exo : gène de l'exonucléase, favorise la recombinaison

gam : le produit de ce gène inhibe l'exonucléase V de l'hôte

oriR101 : origine de réplication thermosensible

P araBAD : promoteur inducible avec le L-arabinose

RepA101ts : site de réplication thermosensible

1.4.3 Protéomique

La protéomique consiste à comparer l'ensemble des protéines exprimées dans deux états physiologiques différents. Les protéines différemment exprimées sont par la suite excisées du gel, digérées à la trypsine et analysées en spectrométrie de masse. Les données obtenues en spectrométrie de masse sont par la suite comparées avec celles disponibles dans les bases de données afin d'identifier ces protéines inconnues.

La connaissance du génome d'un organisme est une information essentielle pour les études de protéomique. En effet, une fois que la séquence du génome est connue, celle-ci peut être traduite en cadres de lectures ouverts. Les protéines potentielles sont par la suite classées selon leur homologie de séquence avec des protéines déjà identifiées ou de protéines de d'autres organismes. Le génome de *S. coelicolor* M145 étant séquencé, ce microorganisme a donc été privilégié dans le cadre de cette étude. Sur les 7825 protéines possibles chez *S. coelicolor*, un faible nombre ont été identifiées soit environ 10% (tableau 2). Il est également possible de constater que la bactérie sécrète un grand nombre de protéines (530) afin de pouvoir dégrader les différents polymères présents dans la biomasse. Puisque la bactérie doit être en contact étroit avec son milieu, elle possède un grand nombre de transporteurs ABC (109) permettant de faire entrer les inducteurs comme le fait par exemple la protéine MsiK. De plus, une emphase importante est mise sur la régulation. En effet, 965 protéines ont un rôle de régulation potentiel ce qui correspond à plus de 12,3 % du génome (Bentley *et al.*, 2002). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la bactérie possède différentes phases de croissance liées au nombreux stress environnementaux.

Tableau 2. Classement des protéines de *S. coelicolor* M145 d'après Hesketh *et al.*(2002).

Classe de protéine	Nombre dans le génome	Nombre identifié
1. Fonctions non-démontrées	1049	68 (6 %)
2. Structurales	1322	114 (8 %)
3. Membranaires	836	4 (0,5 %)
4. Sécrétées	530	30 (5 %)
5. ABC transporteur, liaison ATP	109	16 (14 %)
6. Lipoprotéines	124	10 (8 %)
7. Facteurs Sigma	65	0 (0 %)
8. Facteurs Anti-Sigma	7	2 (28 %)
9. Antagonistes Anti-Sigma	15	1 (6 %)
10. Systèmes de régulation à deux composantes	80	11 (13 %)
11. Autres régulateurs	592	36 (6 %)
12. Systèmes kinases à deux composantes	85	0 (0 %)
13. Kinases Ser/Thr	37	1 (2 %)
14. Autres	2965	482 (16 %)
Total	7825	770 (10 %)

1.4.3.1 Électrophorèse en deux dimensions

La première étape de la protéomique consiste à séparer les protéines selon leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. Les protéines sont des molécules amphotères qui ont la propriété d'avoir une valeur de charge nette différente selon le pH du milieu environnant. Les protéines ont une valeur de charge nette égale à zéro à leur point isoélectrique. Le mélange de protéines est déposé sur une bande contenant un gel de pH croissant. Lorsque soumis à un courant électrique, les protéines vont se déplacer sur le gradient de pH pour s'immobiliser au pH correspondant à leur point isoélectrique.

Les protéines immobilisées sur la bande de gel sont par la suite séparées selon leur masse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le SDS conférera une valeur de charge nette négative aux protéines et celles-ci seront séparées en les soumettant de nouveau à un courant électrique. Finalement, les protéines sur le gel sont colorées à l'argent ou au bleu de Coomassie. Il est aussi possible de détecter les protéines par chimiluminescence et par fluorographie. Récemment, Lopez *et al.* (2000) ont développé une coloration fluorescente SYPRO-ruby. Cependant, la façon la plus efficace d'étudier

les protéines est de procéder par un marquage métabolique en présence d'acides aminés radioactif comme la méthionine-³⁵S et la leucine tritiée. La phosphorylation des protéines peut également être étudiée avec de l'ATP dont le phosphore est radioactif (Wilson et Walker, 1994). Le choix de la méthode de révélation dépend surtout du niveau de sensibilité désiré et les risques reliés à la radioactivité.

1.4.3.2 Analyse de l'image

Les méthodes de révélation peuvent atteindre un degré de sensibilité impressionnant surtout lorsqu'elles sont associées à des technologies de détection (impression de plaques photographiques) et de digitalisation (caméra haute définition et densitomètre laser) (Charlionet *et al.*, 1997). Le traitement des images obtenues est effectué par des logiciels de plus en plus performants et innovateurs. Des logiciels comme HermeS, Mélanie, Kepler, Quest et ImageMaster 2D permettent de détecter et de caractériser les spots, de préciser les coordonnées (masse moléculaire et pI), soustraire le bruit de fond, de créer des gels de référence, de comparer les cartes protéiques entre elles, en étudier les similitudes et les différences.

1.4.3.3 Digestion *in situ*

Pour obtenir des peptides à partir d'une protéine inconnue, l'approche conventionnelle consiste à digérer celle-ci avec une ou deux endoprotéases ou la cliver chimiquement. Plusieurs protéines sont résistantes aux protéases et requièrent la destruction des ponts disulfures par alkylation des cystéines avant de pouvoir être digérées. Par la suite, la protéine alkylée peut être digérée par plusieurs protéases dont notamment les endoprotéases (Lys-C, Asp-N, Glu-C, Arg-C), la trypsine, la chymotrypsine, la thermolysine et la pepsine (Lee et Shively, 1990). Le choix de l'enzyme dépend du type de clivage désiré. Cependant, pour les analyses protéomiques, la trypsine est l'endoprotéase privilégiée puisqu'elle génère des peptides de taille moyenne en clivant les protéines du côté C-terminal des résidus arginine et lysine. Pour ce qui est des méthodes chimiques de clivage d'une protéine, le bromure de cyanogène et

le N-chlorosuccinamide sont les deux produits les plus employés. Par contre, leur application est limitée puisqu'ils dégradent certains résidus sans compter que le bromure de cyanogène est hautement toxique (Lee et Shively, 1990).

1.4.3.4 Spectrométrie de masse et recherche dans les bases de données

Préalablement à l'analyse en spectrométrie de masse, les peptides doivent être purifiés de tout détergent comme le SDS qui pourrait nuire à l'ionisation des peptides. De plus, l'échantillon doit être concentré et dessalé antérieurement à l'analyse en spectrométrie de masse. Le type de colonne de purification employée dépend des caractéristiques des peptides recherchées (phosphorylation, hydrophobicité, taille etc.) et de l'éluant employé.

De façon générale, deux types d'analyses sont effectuées en protéomique soit l'analyse par empreinte protéique (peptide mass fingerprinting) ou le séquençage peptidique (peptide sequencing).

L'analyse par empreinte protéique s'effectue par une ionisation des peptides couplée à une analyse en spectrométrie de masse. L'ionisation de type MALDI « Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation » se produit lorsque les peptides fixés à une matrice sont excités par un laser et libérés sous forme d'ions gazeux. Pour ce qui est de l'ionisation par nébulisation ESI (Electrospray Ionisation), les peptides sont nébulisés par un grand champ électrostatique. Par la suite, les peptides ionisés seront séparés dans le spectromètre de masse. Les spectromètres de masse les plus couramment employés sont le quadropole et le « temps de vol » ou TOF (Time of Flight). Le quadropole déterminera un ratio de la valeur de masse sur la charge (m/z) pour chacun des peptides ionisés à partir des valeurs de voltage et de radiofréquence obtenues. Pour ce qui est du TOF, les valeurs de m/z seront déterminées à partir du temps de vol que prend l'ion pour atteindre le détecteur. Le spectromètre de masse de type quadropole possède une moins grande résolution mais est plus facilement compatible avec différents interfaces d'admission (American Society for Mass Spectrometry, 2001).

Les peptides ont une valeur de la masse sur la charge caractéristique de leur composition en acides aminés. Les différentes valeurs de masse déduites serviront pour l'analyse et l'identification de la protéine inconnue puisque chaque protéine a un profil peptidique qui lui est propre. En soumettant les différentes masses de peptides au logiciel PeptIdent (<http://ca.expasy.org/tools/peptident.html>), celui-ci trouvera un profil peptidique théorique ayant le plus d'homologie avec le profil obtenu en spectrométrie de masse permettant ainsi l'identification de la protéine inconnue.

Le séquençage des peptides s'effectue avec un spectromètre de masse en tandem (SM/SM). Dans ce type d'analyse, les peptides ionisés sont sélectionnés à partir d'un premier spectromètre de masse et isolés dans une cellule de collision où ils seront fragmentés un à la fois. Les fragments obtenus seront ensuite analysés dans un deuxième spectromètre de masse. La différence de masse entre les fragments peptidiques correspondra alors à la masse des différents résidus en acides aminés qui composent le peptide précurseur. La séquence du peptide ainsi déduite permettra, dans certains cas, d'identifier la protéine inconnue par des logiciels comme TagIdent (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>) ou bien de confirmer la protéine identifiée par l'analyse du profil peptidique.

1.4.4 Autres méthodes d'analyses protéomiques

1.4.4.1 Chromatographie en deux dimensions

L'électrophorèse en deux dimensions sur gel a plusieurs limites comme des temps de séparation très longs, un faible rendement avec des protéines très petites, très grosses ou hydrophobiques et une quantification difficile après coloration (Premstaller *et al.*, 2001). Des techniques chromatographiques ont été développées afin d'accélérer les analyses protéomiques, de les rendre plus quantitatives, plus faciles à automatiser et simples à coupler avec un spectromètre de masse. Puisque les protéines sont dans une phase liquide, différents types d'analyse peuvent être effectués. La chromatographie à une dimension est réalisée sur une colonne échangeuse d'ions ou une colonne d'exclusion, elle permet de séparer les protéines selon leur charge ou leur taille. La

première colonne peut être couplée à une seconde colonne de nature différente ce qui permet de séparer les protéines selon deux caractéristiques d'où le nom de chromatographie en deux dimensions. La ou les colonnes chromatographiques sont par la suite directement couplées au spectromètre de masse. D'autres approches chromatographiques permettent l'électrophorèse des protéines dans une phase liquide au lieu d'utiliser un milieu solide comme l'acrylamide. Ce type de séparation augmente le rendement et la sensibilité de l'électrophorèse en deux dimensions (Nilsson et Davidsson, 2000)

1.4.4.2 Caractérisation de protéomes complexes

La chromatographie en deux dimensions manque de résolution pour la détection de certaines classes de protéines, comme par exemple les protéines associées à la membrane et les protéines de faible abondance (Adam *et al.*, 2002). Pour pallier à cette lacune, des techniques faisant appel à des stratégies chimiques ont été développées.

La méthode ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) est une approche chimique qui permet de quantifier les protéines dans les protéomes complexes. Cette méthode consiste à marquer à l'aide d'une sonde chimique, les échantillons à tester. Cette sonde est composée d'un groupe réactif capable de se fixer à des acides aminés définis (ex. l'iodoacétamide se fixe sur les résidus cystéines), une région charnière de nature isotopique et une étiquette qui permettra l'isolement des protéines/peptides (ex. la biotine). Afin de permettre la quantification des protéines, un échantillon est marqué avec une sonde contenant un isotope léger et l'autre échantillon est étiqueté avec une sonde contenant un isotope lourd. Une protéase digère les protéines puis les peptides marqués sont séparés par chromatographie d'affinité. Les peptides sont analysés par chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse. Enfin, l'intensité des signaux des différentes paires de peptides permet de quantifier le niveau d'expression des protéines dans les deux échantillons (Adam *et al.*, 2002). À partir de la méthode ICAT, d'autres stratégies chimiques ont été introduites pour évaluer les modifications post-

traductionnelles comme par exemple le niveau de phosphorylation des protéines (Ahn et Resing, 2001).

La micro-puce à protéine est une autre stratégie d'analyse de protéomes complexes qui utilise le même principe que les puces à ADN de plus en plus employées en génomique fonctionnelle. Les protéines d'intérêt sont d'abord produites dans un vecteur puis couplées sur une plaque identique à celle utilisée pour les puces à ADN. Les protéines seront hybridées de façon covalente ou à l'aide d'une queue d'histidine et d'une plaque enduite de nickel (Zhu *et al.*, 2001). Par la suite, la puce à protéines servira à identifier les interactions protéines-protéines, identifier les substrats des protéines kinases et identifier les cibles protéiques de petites molécules (MacBeath et Schreiber, 2000).

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 Liste des produits chimiques utilisés

Acétate de sodium	Sigma
Acétone	Aldrich
Acétonitrile	EM Science (HPLC grade)
Acide acétique	EM Science
Acide chlorhydrique	EM Science
Acide nalidixique	Sigma
Ampholytes	Amersham Pharmacia Biotech
Ampicilline	Sigma
Apramycine	Sigma
Bacto agar	USB
Bacto casamino acid	Difco
Bicarbonate d'ammonium	VWR
Bleu de bromophénol	Biorad
Bouillon nutritif	Difco
Carbonate de sodium	EM Science
CHAPS	Amersham Pharmacia Biotech
Chloramphénicol	Sigma
Chloroforme	Fisher Scientific Company
Chlorure de calcium	Laboratoire MAT
Chlorure de cobalt	VWR
Chlorure de fer	VWR
Chlorure de magnésium	VWR
Chlorure de manganèse	VWR
Chlorure de potassium	Sigma
Chlorure de sodium	Fisher Scientific Company
Chlorure de zinc	Fisher Scientific Company
DMSO	Fisher Scientific Company
DTT	Amersham Pharmacia Biotech

EDTA	Fisher Scientific Company
Éthanol	Gouvernement du Québec
Extrait de levure	Difco
Farine de soya	Les aliments naturels TAU
Formaldéhyde	Fisher Scientific Company
Glucose	Sigma
Glycérol	Fisher Scientific Company
Glycine	Amersham Pharmacia Biotech
Hydroxyde de sodium	VWR
Iodoacétamide	Fisher Scientific Company
Isopropanol	Fisher Scientific Company
Kanamycine	Sigma
L-proline	ICN
Lysozyme	Roche
Mannitol	Sigma
Méthanol	Gouvernement du Québec
Méthionine	Sigma
Nitrate d'argent	Aldrich
Phénol	Roche
Phosphate de potassium dibasique	Fisher Scientific Company
Phosphate de potassium monobasique	Fisher Scientific Company
Phosphate de sodium	VWR
Potassium acétate	EM Science
RBB xylane	Biely , Mislovicova et Toman (1985)
Résine AG® 501-X8(D)	Biorad
RNase	Roche
Saccharose	Sigma
SDS	Biorad
Spermidine	Sigma
Sulfate d'ammonium	Fisher
Sulfate de cuivre	Sigma

Sulfate de fer	VWR
Sulfate de magnésium	VWR
Sulfate de manganèse	VWR
Sulfate de potassium	VWR
Sulfate de zinc	VWR
TCA	VWR
TES	Sigma
TFA	Fisher Scientific Company
Thiosulfate de sodium	VWR
Tris	USB
Tryptone de soya sans glucose	Difco
Tryptone	Difco
Tween 80	Sigma
Tyrosine	Gibco BRL
Urée	USB
Xylane	Sigma
Xylose	Sigma

2.2 Souches, plasmide et amorces

2.2.1 Souches bactériennes utilisées

Tableau 3. Liste des souches .

Souches	Génotype
<i>E. coli</i> BW25113/pIJ790	Plasmide: pIJ790 [<i>oriR101</i>], [<i>repA101(ts)</i>], <i>araC</i> , <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> Chromosome: (Δ (<i>araD- araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>::rrnB-4</i>), <i>lacI</i> p-4000(<i>lacI^Q</i>), λ^- , <i>rpoS</i> 369(Am), <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514
<i>E. coli</i> DH5 α /pIJ773	Plasmide: pBluescript KS (+), <i>aac (3)IV</i> , <i>oriT</i> (RK2), sites FRT Chromosome: F ⁻ , ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR</i> 17(<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE</i> 44, λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> 96, <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Plasmide: dérivé de RK2, non transmissible (Flett <i>et al.</i> , 1997) Chromosome: <i>dam-13::</i> Tn9, <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> (Flett <i>et al.</i> , 1997)
<i>S. coelicolor</i> M145	dérivée de la souche A3(2), prototrophe et ne possède aucun plasmide
<i>S. lividans</i> IAF10-164	<i>msiK⁻</i> (Hurtubise <i>et al.</i> , 1995)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>msiK1</i>	ce travail

2.2.2 Le plasmide pIJ773

Le plasmide pIJ773 qui contient la cassette de résistance à l'apramycine est présenté à la figure 10. Les sites de restriction *Hind*III et *Eco*RI sont utilisés pour isoler le fragment d'ADN contenant le gène de résistance à l'apramycine. Les sites *Sac*I sont employés pour vérifier la présence de l'apramycine chez les bactéries mutantes.

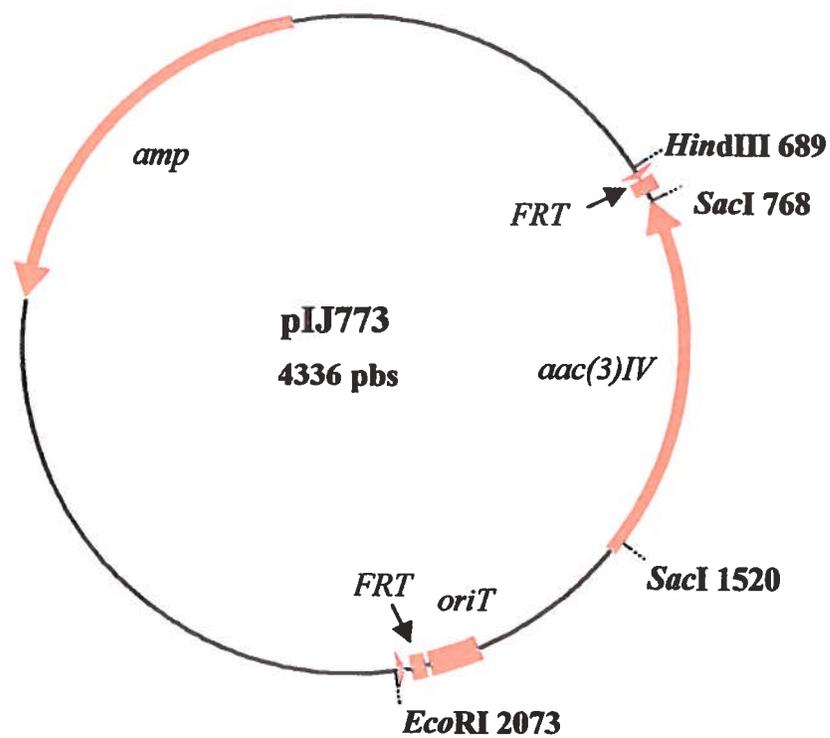


Figure 10. Carte physique du plasmide pIJ773.

Légende :

amp : gène de résistance à l'ampicilline

FRT : site de reconnaissance par la « Flip recombinase »

aac (3)IV : gène de résistance à l'apramycine

oriT : origine de transfert.

2.2.3 Amorces

Tableau 4. Amorces nucléotidiques employées.

Oligonucléotides	Séquence (5'→3')
RD <i>msiK5</i>	ggc acg ttc ctg ccg gta gaa ggg ggc cct ttc acc atg att ccg ggg atc cgt cga cc
RD <i>msiK3</i>	gtc aac gcg ggt gaa atc acc cgg tcg cgt ggt ttc tca tgt agg ctg gag ctg ctt c
2D49 <i>msiK5</i>	ccg gtg aac gat gtg att cga
2D49 <i>msiK3</i>	cat tta gtc acc cta acg gg

2.3 Milieux de culture

2.3.1 Composition des milieux nutritifs pour la croissance d'*E. coli*

2.3.1.1 Milieu 2XTY

Ce milieu est composé de 16 g de tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée. Le milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

2.3.1.2 Milieu SOB (Hanahan, 1983)

Le milieu SOB a été préparé en additionnant 20 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 0,58 g de NaCl et 0,19 g de KCl à un litre d'eau distillée et le pH ajusté à 7,0 au besoin avec du HCl concentré. Ce milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes.

2.3.2 Composition des milieux nutritifs pour la croissance de *S. coelicolor*

2.3.2.1 Milieu R5 solide pour la conservation des souches

Les souches ont été conservées sur le milieu solide R5. Ce milieu se compose de 103 g de saccharose, 10 g de glucose, 250 mg de K_2SO_4 , 10,12 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 100 mg de Bacto Casamino Acid, 5 g d'extrait de levure, 5 g de TES, 22 g de Bacto agar et 2 ml d'une solution d'éléments traces par litre d'eau distillée. Cette solution est constituée de 40 mg de $ZnCl_2$, 200 mg de $FeCl_3$, 10 mg de $CuCl_2$, 10 mg de $MnCl_2$, 10 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ et 10 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ dans un litre d'eau distillée. Par la suite, le milieu R5 a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Lorsque le milieu est refroidi, les solutions suivantes ont été ajoutées stérilement soit 10 ml de KH_2PO_4 0,5% (p/v), 4 ml de $CaCl_2$ 5M, 1 ml de $CuSO_4$ 0,5% (p/v), 15 ml de L-proline 20% (p/v), 10 ml de méthionine 1% (p/v) et 400 mg de tyrosine préalablement diluée dans 5 ml de NaOH 1N. Le milieu a été réparti dans des boîtes de Pétri puis laissé à température de la pièce pendant 5 jours afin d'obtenir une perte de poids d'environ 15%. L'entreposage a été effectué à 4°C.

2.3.2.2 Milieu Stewart-RBB xylane

Dans un premier temps, 1,5 g de RBB-xylane a été dissout dans 250 ml d'eau distillée en agitant sur une plaque chauffante pendant au moins 30 minutes. Parallèlement, 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 g de KH_2PO_4 , 5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de KCl et 1 ml de sels de Mandels ont été ajoutés à 750 ml d'eau distillée et le pH ajusté à 7,2. La solution minérale de Mandels (Mandels et Reese, 1957) renferme 140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 160 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ par 100 ml d'eau distillée. Les deux solutions ont été autoclavées pendant 20 minutes à 121°C. Après stérilisation, elles ont été refroidies à 55°C et mélangées avant d'être agitées pendant 5 minutes. Finalement, 10 ml de $MgSO_4$ 5% ont été additionnés et le milieu a été réparti dans des boîtes de Pétri.

2.3.2.3 Milieu CMC

Le milieu Stewart-CMC a été préparé en ajoutant 10 g de CMC (de faible viscosité) à 1 L de milieu Stewart avant la stérilisation.

2.3.2.4 Milieux riches (TSB et TSA)

Pour la croissance en milieu liquide riche, le bouillon de tryptone de soya sans glucose (TSB) a été utilisé. Il a été obtenu en dissolvant 27,5 g de TSB dans un litre d'eau distillée. Le milieu a été stérilisé pendant 20 minutes à 121°C. Afin d'obtenir un milieu solide, 20 g d'agar ont été ajoutés dans 1 litre de milieu liquide TSB. Le milieu a été stérilisé comme précédemment.

2.3.2.5 Milieu liquide minimal (M14)

Le milieu minimal utilisé est le milieu M14 qui se compose de 1,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , 2 ml de Tween 80 et 1 ml de la solution de Mandels par litre d'eau distillée. Après dissolution, le pH a été ajusté à 7,4. La stérilisation a été effectuée à 121°C pendant 20 minutes. Il est important de noter que les sources de carbone ont été additionnées au milieu avant la stérilisation pour ce qui est du xylane et après pour le xylose à une concentration finale de 1%. Juste avant l'utilisation, 0,6 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5% p/v) et 1 ml de CaCl_2 (3% p/v) ont été ajoutés stérilement par 100 ml de milieu M14.

2.3.2.6 Milieu MS (farine de soya mannitol) (Hobbs *et al.*, 1989)

Le milieu MS se compose de 20 g d'agar, 20 g de mannitol et 20 g de farine de soya par litre d'eau du robinet. Ce milieu a été autoclavé deux fois à 115°C pendant 15 minutes.

2.3.2.7 Agar nutritif Difco (DNA)

Le milieu DNA se compose de 20 g d'agar et de 23 g de bouillon nutritif Difco par litre d'eau distillée. Ce milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes.

2.4 Préparation de spores

Les spores de *S. coelicolor* M145 ont été obtenus à partir de 15 cultures sur plats de Pétri de 7 à 10 jours sur milieu solide MS. Les spores ont été resuspendues dans du glycérol 20% stérile à l'aide d'un fil de platine bouclé. Le volume final de 10 ml a été filtré sur laine de verre et le filtrat a été centrifugé pendant 20 minutes à 4°C. Les spores ont été resuspendues dans le volume résiduel et dilué à nouveau dans du glycérol 20% afin d'obtenir une concentration de spores d'environ 1×10^8 à une densité optique de 660 nm. Les spores ont été aliquotées et conservées à -80°C.

2.5. Dislocation génétique (Gust *et al.*, 2003)

2.5.1 Purification de la cassette de résistance

Environ un microgramme d'ADN plasmidique de pIJ773 ont été digérés avec 50 U d'enzyme de restriction *EcoRI* et 50 U de *HindIII*. Le produit de digestion a été séparé sur gel d'agarose à 5V/cm pour deux à trois heures. La digestion a généré le vecteur de 2938 pb et un fragment de 1398 pb qui correspond à la cassette de résistance à

l'apramycine. Le fragment de 1398 pb a été découpé du gel et purifié à l'aide de la trousse de purification QIAGEN. Le fragment purifié a été conservé -20°C dans du Tris-HCl 10 mM pH 8 à une concentration de 100 ng/μl.

2.5.2 Élaboration des amorces

Pour chaque gène à disloquer, deux amorces ont été nécessaires. Chaque amorce possède une extrémité 5' de 39 nucléotides correspondant à la séquence adjacente du gène de *S. coelicolor* qui doit être inactivé et une extrémité 3' correspondant aux 19 ou 20 nucléotides spécifiques à la cassette comme le montre la figure 11.

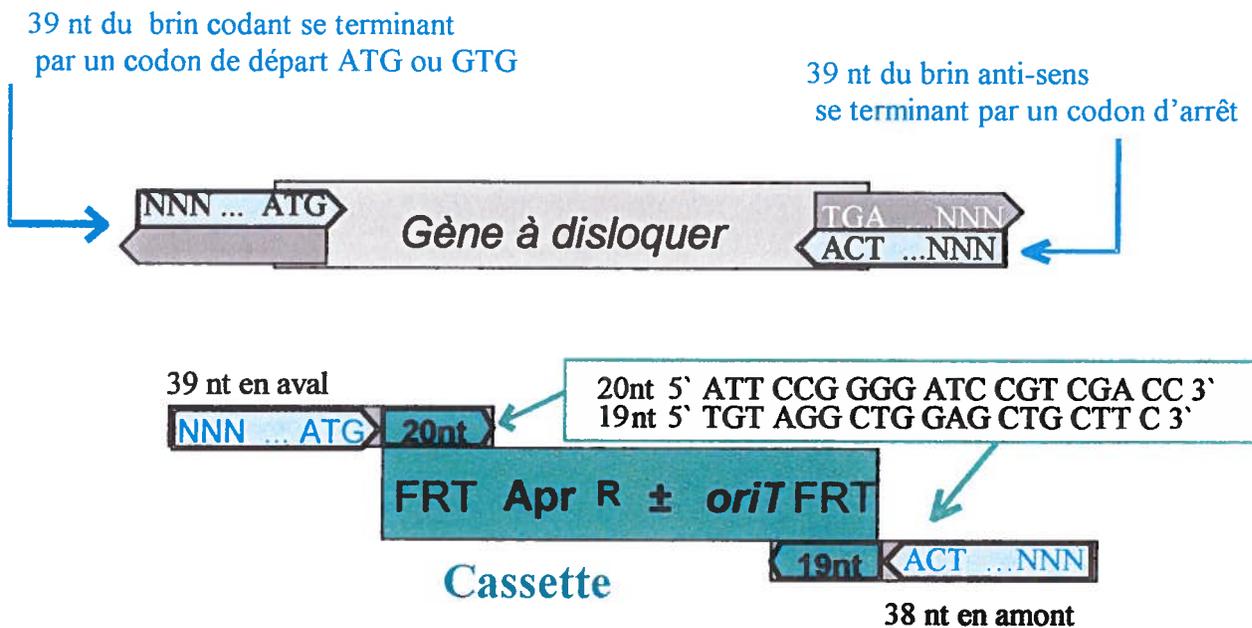


Figure 11. Élaboration des amorces pour l'amplification de la cassette de résistance.

2.5.3 Amplification de la cassette de résistance par PCR

Pour l'amplification de la cassette, la réaction a été effectuée avec 0,5 µl de la matrice d'ADN (100 ng/µl) et 5 µl de chacune des amorces (10 pmol/µl). La réaction a été réalisée dans une solution contenant 5 µl de tampon 10X, 2,5 µl de DMSO (100%) , 4 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de polymérase (2,5 U/µl) et 26 µl d'eau. L'amplification a été réalisée selon les conditions de température et de temps décrites dans le tableau 5.

Tableau 5. Conditions de température et de temps pour la réalisation de l'amplification de la cassette.

Phase	Température et temps	Répétition
1. Dénaturation	94°C, 2min	
2. Dénaturation	94°C, 45 sec	10 cycles
3. Hybridation	50°C, 45 sec	
4. Élongation	72°C, 90 sec	
5. Dénaturation	94°C, 45 sec	15 cycles
6. Hybridation	55°C, 45 sec	
7. Élongation	72°C, 90 sec	
8. Élongation finale	72°C, 5 min	
9. Maintien	4°C	

De la réaction de PCR, 5 µl ont été employés pour une analyse sur gel d'agarose. Le reste a été purifié avec une trousse de purification QIAgen et le produit final a été élué avec 12 µl de tampon EB afin d'obtenir le produit de PCR le plus concentré possible.

2.5.4 Introduction de l'ADN cosmique de *S. coelicolor* dans *E. coli* BW25113/pIJ790 par électroporation

Le souche *E. coli* BW25113/pIJ790 a été incubée pendant la nuit à 30°C dans 10 ml de milieu 2XTY contenant 25 µg/ml de chloramphénicol. Par la suite, 10 ml de milieu SOB contenant 20 mM de MgSO₄ et 25 µg/ml de chloramphénicol ont été inoculés avec 100 µl de la culture précédente. La culture a été incubée à 30°C avec agitation à 200 rpm de 3 à 4 heures jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,6. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4000 rpm (Centrifugeuse Beckman, rotor JA-20) pendant 5 min à 4°C. Le milieu a été décanté et le culot resuspendu dans 50 ml de glycérol 10% stérile froid. Un second lavage a été effectué avec un volume identique de glycérol. Enfin, le culot a été resuspendu dans le volume résiduel. Cinquante microlitres de cellules compétentes ont été mélangées avec 2 µl de l'ADN du cosmide. L'électroporation a été réalisée dans une cuvette de 0,1 cm refroidie sur la glace en utilisant l'appareil GenePulser II de Biorad dans les conditions suivantes : 400Ω, 25µF et 1,6 V. Par la suite, 1 ml de 2XTY froid a été ajouté aux cellules. Après une incubation d'une heure avec agitation à 30°C, 100 µl et mélange a été étalé sur un milieu 2XTY contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), de la kanamycine (50 µg/ml) et du chloramphénicol (25 µg/ml). Le reste du mélange électroporé a été centrifugé brièvement puis le culot étalé sur le même milieu. L'incubation à 30°C s'est poursuivie de 12 à 16 heures. Une colonie isolée a été transférée dans 5 ml de 2XTY contenant les mêmes antibiotiques que précédemment. Après une seconde incubation de 12 à 16 heures à 30°C, la culture a été employée comme pré-culture pour produire des cellules compétentes pour être transformées avec la cassette de résistance modifiée par PCR. Tous les 319 cosmides de *S. coelicolor* ont été introduits par électroporation dans la souche *E. coli* BW25113/pIJ790. Pour chaque gène à disloquer, il s'agit de choisir le cosmide qui contient la séquence du gène en question.

2.5.5 Introduction du produit de PCR dans le cosmide d'intérêt de *S. coelicolor*

Un prélèvement de 100 µl de la culture de 12 à 16 heures de la souche *E.coli* BW25113/pIJ790/cosmide a servi pour inoculer 10 ml de milieu SOB contenant 20 mM de MgSO₄, 25 µg/ml de chloramphénicol et 50µg/ml de kanamycine. Les gènes *red* ont été induits en ajoutant 100 µl de L-arabinose 1 M stérilisé par filtration sur 0,2 µm pour obtenir une concentration finale de 10 mM. La culture a été incubée de 3 à 4 heures à 30°C avec agitation à 200 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,6. Les cellules compétentes ont été obtenus de la même façon que dans la section 2.5.4. La culture de cellules électroporées a été incubée à 37°C puis étalée comme précédemment sur un milieu 2XTY contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), de la kanamycine (50 µg/ml) et de l'apramycine (50 µg/ml). Le milieu a été incubé de 12 à 16 heures à 37°C pour permettre la perte de pIJ790. Si d'autres dislocations avaient été prévues l'incubation aurait été accomplie à 30°C et en présence de chloramphénicol (25 µg/ml) pour conserver le plasmide pIJ790).

2.5.6 Isolement de l'ADN cosmifique

La dislocation du gène a été vérifiée par analyse de restriction et par PCR. Une lyse alcaline suivie d'une extraction phénol/chloroforme ont produit de l'ADN cosmifique approprié pour l'analyse de restriction. L'ADN cosmifique des transformants a été isolé d'une culture de 6 h à 37°C dans 5 ml de 2XTY contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), de la kanamycine (50 µg/ml) et de l'apramycine (50 µg/ml). De cette culture, 1 ml a été prélevé et centrifugé 30 secondes. Le culot a été resuspendu dans 200 µl de solution 1 (EDTA 10 mM, glucose 50mM et Tris 25 mM, pH 8). Ensuite, 200 µl de la solution 2 (NaOH 200mM, SDS 1%) ont été ajoutés immédiatement et mélangés par inversion des tubes avant d'ajouter de la même façon 200 µl de la solution 3 (acétate de potassium 3 M, pH 5,5). Par la suite, le mélange a été centrifugé pendant 5 minutes à la température de la pièce. 400 µl de phénol/chloroforme ont été ajoutés au surnageant avant

d'être agités et centrifugés pendant 5 minutes. La phase aqueuse a été mélangée à 600 μ l d'isopropanol puis les tubes ont été incubés sur la glace pendant 10 minutes. Après une autre centrifugation de 5 minutes, le culot a été resuspendu dans 200 μ l d'éthanol 70% puis le mélange a été centrifugé pendant 5 minutes. Le culot a enfin été séché 5 minutes à la température de la pièce et resuspendu dans 50 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8.

2.5.7 Vérification du cosmide mutant

Il est possible de vérifier le cosmide mutant avec des enzymes de restriction ou par PCR en utilisant des amorces de 18-20 nucléotides qui s'hybrident de 100 à 200 en amont et en aval de la région recombinante de 39 pb. Les conditions de thermocyclage sont décrites dans le tableau 6.

Tableau 6. Conditions de température et de temps pour l'amplification de la cassette du cosmide mutant

Phase	Température et temps	Répétition
1. Dénaturation	94°C, 2min	
2. Dénaturation	94°C, 45 sec	} 30 cycles
3. Hybridation	55°C, 45 sec	
4. Élongation	72°C, 90 sec	
5. Élongation finale	72°C, 5 min	
6. Maintient	4°C	

2.5.8 Conjugaison entre *E. coli* et *S. coelicolor*

Puisque la souche cible *S. coelicolor* possède un système de restriction qui dégrade l'ADN méthylé, il a été nécessaire de transférer le cosmide dans une souche de *E. coli* n'effectuant pas la méthylation de l'ADN tel que la souche ET12567. Le cosmide a ensuite été transféré dans *S. coelicolor* par conjugaison intergénique. Pour ce faire, une culture de 10 ml de 2XTY contenant de la kanamycine (25 µg/ml) et du chloramphénicol (25 µg/ml) a servi pour générer des cellules compétentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002 en utilisant la méthode décrite à la section 2.5.4. Les cellules compétentes ont été transformées par électroporation avec le cosmide mutant et placées dans un milieu 2XTY ne contenant que de l'apramycine (50 µg/ml) et de l'ampicilline (50 µg/ml) puisque la souche ET12567 a de la difficulté à croître si trop d'antibiotiques sont présents dans le milieu. Après une incubation de 12 à 16 heures à 37°C, 10 ml de 2XTY avec apramycine (50 µg/ml), chloramphénicol (25 µg/ml) et kanamycine (50 µg/ml), ont été inoculés avec un transformant et incubés de nouveau à 37°C pour 4 heures. Les cellules ont été lavées deux fois avec 10 ml de 2XTY pour enlever les antibiotiques qui pourraient empêcher *Streptomyces coelicolor* de croître. Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de 2XTY. Durant ce temps, 10 µl (10^8) spores de *Streptomyces coelicolor* M145 ont été ajoutés dans 500 µl de 2XTY. Ils ont été activés par la chaleur à 50°C pour 10 minutes puis refroidis. 500 µl de cellules de *E. coli* ont été mélangées avec 500 µl de spores et centrifugés brièvement. Le culot a été resuspendu dans 50 µl de volume résiduel. Des dilutions de 10^0 à 10^{-4} de 100 µl dans de l'eau stérile ont été réalisées et étalées sur milieu MS sans antibiotique contenant 10 mM $MgCl_2$. Après une incubation de 16 à 20 heures à 30°C, les Pétris ont été recouverts avec 1 ml d'eau contenant 0,5 mg d'acide nalidixique et 1,25 mg d'apramycine. L'incubation à 30°C s'est poursuivie jusqu'à la croissance des exconjugants. Ceux-ci ont été repiqués sur milieu DNA contenant de l'acide nalidixique (25 µg/ml), de l'apramycine (50 µg/ml) avec et sans kanamycine (50 µg/ml). Les exconjugants qui ont intégré le gène de résistance à l'apramycine par double recombinaison sont sensibles à la kanamycine et résistants à l'apramycine. Les colonies sensibles à la kanamycine ont été repiquées sur milieu MS contenant de l'acide

nalidixique (25 µg/ml) de l'apramycine (50 µg/ml) et incubées à 34°C pendant 5 jours et conservées à 4 °C.

2.6 Extraction ADN chromosomique

L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir d'une culture de 48 heures dans le milieu TSB. Une centrifugation a permis de récupérer environ 50 mg de mycélium et celui-ci a été resuspendu dans 500 µl d'une solution composée de 0,3 M de saccharose, de 25 mM de Tris pH 8, de 25 mM de EDTA, de 2 mg/ml de lysozyme et de 50 µg/ml de RNase. Le mélange a été incubé à 37°C durant 30 minutes. Par la suite, 250 µl de SDS 2% ont été additionnés et mélangés. Enfin, 500 µl de phénol/chloroforme (1 :1) ont été ajoutés avant que le mélange soit de nouveau agité. La phase aqueuse a été récupérée après une centrifugation à 13 000 rpm. Trois autres extractions phénol/chloroforme ont été effectuées sur la phase aqueuse. Lors de la dernière extraction, 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M a été ajouté à la phase aqueuse. Le tout a été agité puis un volume d'isopropanol a été additionné au mélange. Après une incubation de 5 minutes, le tout a été centrifugé et le surnageant retiré. Après une deuxième centrifugation, le culot obtenu a été resuspendu dans 25 µl tampon TE contenant 100 mM de spermidine et incubé pendant 5 minutes. Deux autres centrifugations successives ont été effectuées et 300 µl d'acétate de sodium 0,3 M contenant 10 mM de MgCl₂ et 700 µl d'éthanol 95% ont été ajoutés au culot. Le mélange a été incubé pendant une heure avant d'être de nouveau centrifugé pendant 2 minutes. Le culot a été resuspendu dans 75 µl de tampon TE et agité 30 minutes avec un Mixer 5432 Eppendorf. Par la suite, l'ADN a été conservé à -20°C.

2.7 Protéomique

2.7.1 Préparation de la culture

La production d'inoculum a été réalisée en récoltant le mycélium ainsi que les spores d'un quart de Pétri à l'aide d'un fil de platine bouclé et en déposant le tout dans un Erlenmeyer de 25 ml contenant 12 ml de milieu TSB et trois billes de verre stériles. La culture a été incubée à 34°C avec agitation à 240 rpm pendant 24 heures. Le mycélium a été transféré dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 25 ml de milieu M14 avec 1% de la source de carbone. Celui-ci a été placé à 34°C avec agitation à 240 rpm pendant 24 heures. Le mycélium a de nouveau été recueilli et placé dans un Erlenmeyer de 2 L contenant 500 ml de milieu M14 avec 1% de la source de carbone. La culture a été incubée pendant 72 heures dans les mêmes conditions que précédemment.

2.7.2 Préparation des protéines cytoplasmiques

Après la période de croissance requise, la culture a été filtrée sous vide sur un papier filtre Whatman #1 déposé sur un filtre Büchner. Le mycélium a été récupéré à la surface du filtre à l'aide d'une spatule. Le mycélium a été resuspendu dans un volume minimal de tampon phosphate de sodium 20 mM à pH 7,4. Le mélange a été maintenu sur glace et les cellules lysées aux ultrasons à 10 reprises pendant 30 secondes avec un sonicateur XL de Heat Systems. L'efficacité de la lyse a été vérifiée à l'aide d'un examen microscopique. Le mélange a été centrifugé à 13 000 rpm (Centrifugeuse Beckman, rotor JA-20) pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant récupéré a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.7.3 Dosage des protéines (Lowry, 1951)

Le dosage des protéines cytoplasmiques a été effectué à l'aide de la méthode de Lowry (1951). Pour ce faire, une courbe standard de la concentration d'albumine de

sérum bovin en fonction de la densité optique à 700 nm a été réalisée. La densité optique des échantillons a été également prise à 700 nm.

2.7.4 Précipitation et incorporation des protéines

Les protéines ont été précipitées en ajoutant deux volumes de TCA 10%/acétone pendant au moins une heure à -20°C. Le mélange a été centrifugé pendant 5 min à 4°C et le culot récupéré. Par la suite, celui-ci a été lavé à deux reprises avec un volume d'acétone froid contenant 20 mM de DTT. Les protéines du culot ont été solubilisées pendant 1 heure avec agitation dans 370 µl de tampon de solubilisation (urée 9M déionisée avec la résine AG501-X8 (D), CHAPS 4% (p/v), ampholytes 0,5% (v/v) au pH approprié, DTT 15 mM et quelques grains de bleu de bromophénol). Après solubilisation du culot, la solution est centrifugée 5 minutes à 13 000 rpm pour précipiter les débris non-solubles. 350 µl du surnageant ont été déposés dans un portoir de 18 cm avant d'y placer la languette supportant le gel. La languette a ensuite été recouverte d'huile minérale afin d'empêcher la cristallisation de l'urée. Le gel a été réhydraté pendant 12 heures à 20°C.

2.7.6 Focalisation isoélectrique

À la suite de la période de réhydratation, la température a été réglée à 20°C et le courant à 50 µA par languette. La focalisation isoélectrique a été effectuée en trois étapes soient 500 V pour obtenir 500 Vh, 1000 V pour obtenir 1000 Vh et finalement 8000V pour un minimum de 60 000 Vh. Les languettes ont été par la suite immédiatement équilibrées ou placées à -20°C.

2.7.7 Équilibration des languettes

Avant de séparer les protéines dans la deuxième dimension, les languettes ont été équilibrées pendant 15 minutes dans deux solutions différentes. La première solution était composée de 15 ml de tampon d'équilibration (urée 6 M, glycérol 30% (p/v), 50 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 2% et quelques grains de bleu de bromophénol) et 150 mg de DTT. La seconde solution contenait, quant à elle, 15 ml de tampon d'équilibration et 375 mg d'iodoacétamide.

2.7.8 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les languettes équilibrées ont été trempées dans un tampon de migration 1X à pH 8,3 composé de 25 mM Tris-HCl, de glycine 1,4% (p/v) et de SDS 0,1% (p/v). Par la suite, chaque languette a été déposée à la surface d'un gel de polyacrylamide 9%. Pour la deuxième dimension, la séparation des protéines a été réalisée en soumettant le gel à un courant de 15 mA/gel jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel.

2.7.9 Coloration au nitrate d'argent

Après l'électrophorèse, les protéines ont été fixées avec une solution de 400 ml de méthanol 50% (v/v) et d'acide acétique 5% (v/v) pendant une heure puis par 400 ml de méthanol 50% (v/v) pendant 10 minutes. Le gel a été rincé 2 fois avec 400 ml d'eau déionisée pendant 10 minutes et laissé 1 minute dans 500 ml d'une solution fraîche de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,02% (p/v) avant d'être de nouveau lavé deux fois pendant une minute dans 400 ml d'eau déionisée. Le gel a été coloré pendant 20 minutes avec 500 ml d'une solution fraîche d' AgNO_3 0,2% (p/v) et rincé de nouveau deux fois avec 400 ml d'eau déionisée. Enfin, le gel a été développé 500 ml d'une solution de Na_2CO_3 2% (p/v) avec 500 μl de formaldéhyde 37%. Après un développement significatif la réaction a été arrêtée en incubant le gel dans une solution d'acide acétique 5% (v/v).

2.7.10 Analyse de l'image

Les gels 2-D ont été photographiés à l'aide d'une caméra CCD (Kodak Image Station IS440CF) et l'acquisition de l'image a été réalisée en format TIFF 16 bits. Par la suite, les images ont été analysées par le logiciel ImageMaster™ 2-D Elite version 3.10 (Amersham Pharmacia Biotech). Les gels ont d'abord été superposés et la correspondance entre les protéines a été faite. La variation du niveau d'expression de certaines protéines entre les gels a été déterminée.

2.7.11 Digestion des protéines avec la trypsine

Les protéines ont été excisées du gel à l'aide d'un emporte pièce et conservées à -20°C jusqu'au moment de la digestion. Le nombre de spots recueillis pour chacune des protéines à identifier allait de 1 à 6 selon la concentration approximative des protéines. Les spots correspondant à une même protéine sur le gel ont été regroupés dans un microtube et recouvert avec $500\ \mu\text{l}$ de NH_4HCO_3 100 mM pendant au moins une heure. Le surnageant a été retiré à l'aide d'une pipette de transfert et $150\ \mu\text{l}$ de NH_4HCO_3 100 mM et $10\ \mu\text{l}$ de DTT 45 mM ont été ajoutés. Les microtubes ont été centrifugés pendant 30 secondes et incubés pendant 30 minutes à 60°C . Ils ont été refroidis à la température de la pièce et $10\ \mu\text{l}$ d'iodoacétamide 100 mM ont été ajoutés. Le tout a été agité à la main, centrifugé 30 secondes et incubé 30 minutes à la température de la pièce à l'abri de la lumière. Par la suite, le liquide a été retiré à l'aide d'une pipette de transfert et $500\ \mu\text{l}$ d'une solution d'acétonitrile 50%/ NH_4HCO_3 100 mM ont été ajoutés. Les microtubes ont été incubés avec agitation pendant une heure et le surnageant enlevé. Les spots ont été coupés dans un plat de Pétri avec un bistouri pour avoir des morceaux d'environ $1\ \text{mm}^3$ et transférés dans un microtube de $200\ \mu\text{l}$. Après avoir ajouté $50\ \mu\text{l}$ d'acétonitrile, les tubes ont été laissés au repos de 10 à 15 minutes afin de permettre la réduction du gel. Le solvant a été enlevé et le gel asséché à l'évaporateur rotatif (SpeedVac, Savant). Par la suite, les morceaux de gel ont été réhydratés en deux étapes. Tout d'abord, $20\ \mu\text{l}$ de tampon NH_4CO_3 25 mM auquel ont été ajoutés $0,2\ \mu\text{g}$ de trypsine (modifiée de qualité de

séquençage, Proméga) ont été déposés sur les morceaux de gel. Après 15 minutes, 20 μ l de tampon supplémentaire ont été additionnés afin de couvrir les morceaux de gels. La digestion a été effectuée pendant 16 heures à 37°C. Les microtubes ont été centrifugés pendant 30 secondes et le surnageant contenant les peptides récupéré. À deux reprises, les morceaux de gel ont été rincés avec 50 μ l de 60 % ACN/0,1 % TFA et centrifugés durant 30 secondes avant d'être incubés à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation, les microtubes ont été placés sous agitation 5 minutes et au bain à ultrasons (Bransonic) pendant 5 minutes. Le liquide a été récupéré et cumulé avec celui prélevé auparavant. Le mélange contenant les peptides a été asséché complètement à l'évaporateur rotatif et redissout dans 20 μ l de TFA 1%. L'échantillon a été concentré et purifié immédiatement ou conservé à -20°C.

2.8 Analyse en spectrométrie de masse

2.8.1 Concentration et purification des peptides

La concentration et la purification des peptides ont été effectuées grâce à un embout ZipTip™ contenant une résine hydrophobe C₁₈. Toutes les solutions nécessaires à cette étape ont été filtrées avec un filtre de nylon de 0,2 μ m résistant aux solvants et tout le matériel a préalablement été siliconisé. La résine a été humectée en aspirant et en rejetant trois fois une solution d'acétonitrile 50%. La colonne a été par la suite équilibrée en aspirant/éliminant cinq fois une solution de TFA 0,1%. L'échantillon a été déposé à l'intérieur de l'embout ZipTip™ à l'aide d'un embout de chargement à pointe fine et 10 cycles d'aspiration/élimination ont été effectués dans un microtube vide afin de fixer les protéines sur la colonne. La colonne a été ensuite lavée en effectuant 10 cycles dans une solution fraîche de TFA 0,1 %. Enfin, les peptides ont été élués en réalisant cinq cycles d'aspiration/élimination dans un microtube propre contenant 6 μ l de méthanol 50 % /0,1 % acide acétique. L'échantillon obtenu a été placé dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes et centrifugé 30 secondes avant d'être analysé en spectrométrie de masse ou conservé à -20°C.

2.8.2 Injection des peptides

Le mélange peptidique a été injecté dans le spectromètre de masse de type triple quadrupole (Quattro II, Micromass) en utilisant une source nanoflow (Z SPRAY™). Le logiciel employé pour la manipulation du spectromètre, l'acquisition des données et l'analyse des spectres a été Masslynx/Biolynx v3.3 (Micromass).

2.8.3 Analyse bioinformatique

La recherche du profil peptidique de chaque protéine inconnue à l'aide du logiciel PeptIdent sur le site Expasy (www.expasy.ch) a permis d'identifier la protéine inconnue. Le tableau 7 montre les paramètres employés pour la recherche avec ce logiciel. Le point isoélectrique ainsi que la masse de la protéine inconnue ont été déterminés à partir du gel 2D. Par ailleurs, l'obtention d'une séquence en acide aminés à partir de la fragmentation d'un peptide a permis de confirmer l'identification faite au préalable.

Tableau 7. Paramètres de l'analyse par le logiciel PeptIdent

Peptide Mass Fingerprinting

Name of the unknown protein: <input type="text" value="inconnu X"/> Database: <input type="text" value="SWISS-PROT and TrEMBL"/> Note: Peptides with masses >6000 Da have not been indexed.	pI: <input type="text" value="X"/> within pI range: <input type="text" value="0.50"/> Mw: <input type="text" value="X"/> (in Dalton, not kDa!) within Mw range (in percent): <input type="text" value="20"/>
Species to be searched: <input type="text" value="BACTERIA"/>	
Enter a list of <u>peptide masses</u> (separated by spaces or newlines) that correspond to the unknown protein: Or upload a file in one of the <u>supported formats</u> from your computer. The peptide masses will be extracted automatically from this file: <input type="text"/>	
Masses des peptides obtenues par spectrométrie de masse <input type="text"/>	
All peptide masses are <input type="radio"/> $[M+H]^+$ or <input type="radio"/> $[M]$ or <input type="radio"/> $[M-H]^-$, and <input checked="" type="radio"/> <u>monoisotopic</u> or <input type="radio"/> <u>average</u> . The peptide masses are with <u>cysteines treated with</u> : <input type="text" value="iodoacetamide"/> <input checked="" type="checkbox"/> with <u>acrylamide adducts</u> on cysteines <input checked="" type="checkbox"/> with <u>methionines oxidized</u> . Mass tolerance: \pm <input type="text" value="0.5"/> <input type="text" value="Dalton"/>	Enzyme: <input type="text" value="Trypsin"/> Allow for <input type="text" value="1"/> <u>missed cleavage sites</u> (MC). Report only proteins with at least <input type="text" value="X"/> peptide hits. Display a maximum of <input type="text" value="20"/> <u>matching proteins</u> . <input checked="" type="checkbox"/> <u>Print information about sequence portion covered</u> by the matching peptides.

3. RÉSULTATS

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

3.1 Préparation de la cassette de dislocation génétique

3.1.1 Digestion du plasmide pIJ773 contenant la cassette de résistance

La cassette qui contient le gène de résistance à l'apramycine est comprise dans le plasmide pIJ773. Pour isoler la cassette, une digestion avec deux enzymes de restriction a été nécessaire. En effet, la digestion par *EcoRI* et *HindIII* a généré deux fragments comme le montre la figure 12. Les fragments de 2938 pbs et de 1398 pbs correspondent respectivement au vecteur et à la cassette qui contient le gène de résistance à l'apramycine.

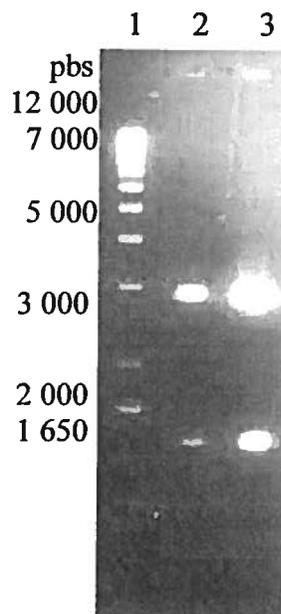


Figure 12. Digestion du plasmide pIJ773 par *EcoRI* et *HindIII*.

Légende :

1 : marqueur de poids moléculaire

2 : 3 μ l de la digestion

3 : 5 μ l de la digestion

3.1.2 Amplification de la cassette de résistance à l'apramycine

Après la purification de la cassette sur colonne QIAgen, celle-ci a été amplifiée à l'aide des amorces RD*msiK3* et RD*msiK5* (tableau 4). Un fragment de 1476 pbs a été obtenu comme le montre la figure 13. Cette amplification a permis d'ajouter de chaque côté de la cassette de résistance des séquences homologues au gène *msiK* nécessaires à la double recombinaison sur le cosmide. L'amplicon Apra^R: *msiK* a ainsi été obtenu.

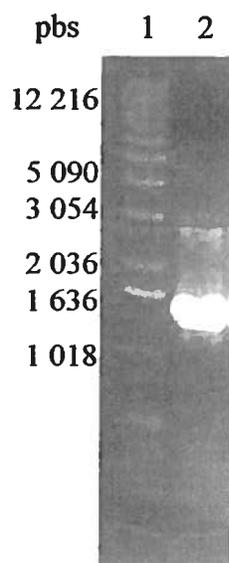


Figure 13. Amplification de la cassette de résistance à l'apramycine par PCR avec des amorces spécifiques (RD*msiK3* et RD*msiK5*).

Légende :

1: marqueur de poids moléculaire

2: 5 µl de l'amplification du fragment de 1398 pbs

3.2 Introduction de l'ADN cosmique de *S. coelicolor* dans *E. coli* BW25113/pIJ790 par électroporation

Tout le génome de *S. coelicolor* a été cloné dans 319 cosmides pour le séquençage et la construction de la carte génétique et physique du chromosome. Ainsi, il a été possible de localiser le cosmide qui contient la séquence du gène à disloquer parmi les 319 disponibles. En effet, le gène *msiK* se retrouve sur le cosmide D49. Une fois que le cosmide D49 a été choisi celui-ci a été transformé par électroporation dans la souche de *E. coli* BW25113 qui contient le plasmide pIJ790. Les transformants ont été sélectionnés pour l'acquisition de la résistance à l'ampicilline et à la kanamycine; ces résistances étant conférées par l'incorporation du cosmide.

3.3 Transformation avec la cassette de dislocation

À la suite d'une purification sur colonne, l'amplicon Apra^R *msiK* obtenu par PCR de la cassette de résistance à l'apramycine a été utilisé pour transformer la souche de *E. coli* BW25113/pIJ790/D49. Le produit de PCR ne pouvant pas se répliquer, il y a eu obligatoirement double recombinaison entre les séquences homologues du produit de PCR et celles du cosmide pour que la souche devienne résistante à l'apramycine. De plus, la double recombinaison homologue a été promue par les gènes *gam*, *bet* et *exo* situés sur le plasmide pIJ790. Ces gènes ont été induits par l'ajout d'arabinose dans le milieu de culture. Enfin, en incubant les transformants à 37°C pendant 16 heures, il y a eu perte du plasmide pIJ790 dont la répllication est thermosensible. Les transformants obtenus (environ 100) étaient donc également sensibles au chloramphénicol compte-tenu de l'absence du plasmide pIJ790.

3.3.1 Vérification du cosmide mutant

Le cosmide D49 ayant intégré la cassette de résistance à l'apramycine dans le gène *msiK* est représenté à la figure 15 en comparaison avec celui contenant le gène *msiK* (figure 14). Le cosmide D49 *msiK::aac (3)IV* a été extrait des transformants résistants à l'apramycine obtenus par la transformation avec le produit de PCR. Afin de s'assurer que la recombinaison a eu lieu au bon endroit, une vérification par enzyme de restriction a été réalisée (figure 16).

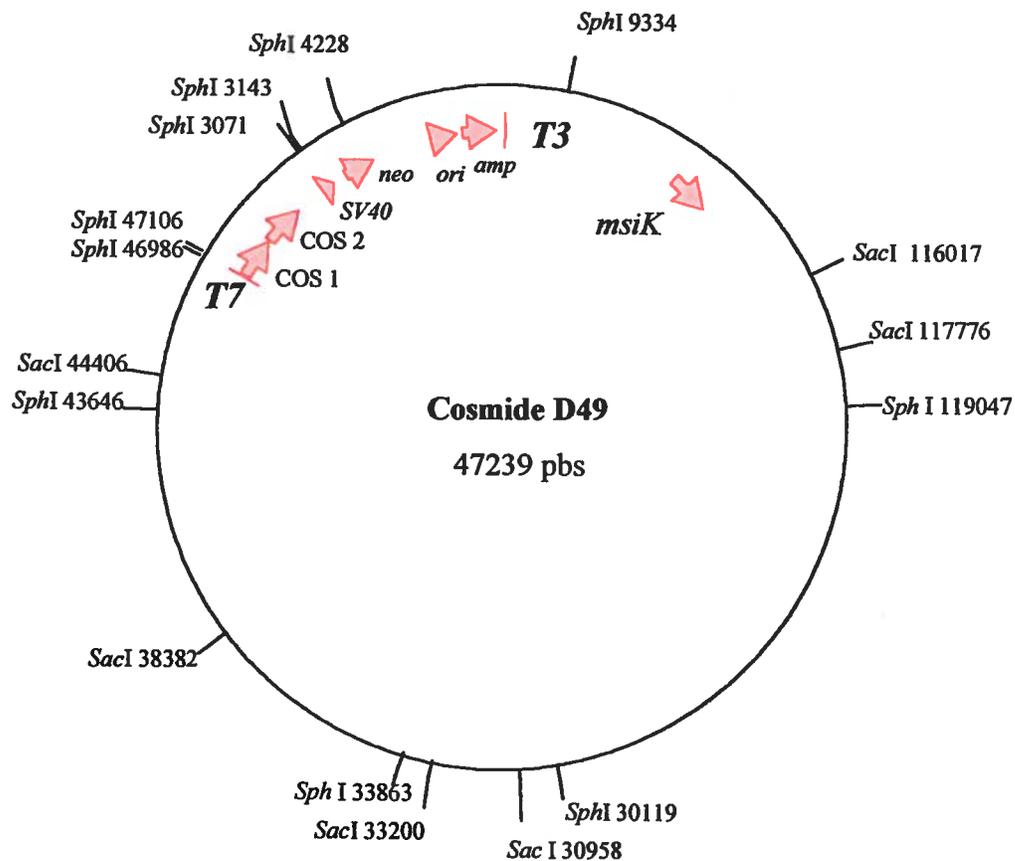


Figure 14. Carte physique du cosmide D49.

Légende :

ori : origine de réplication du cosmide

amp : gène de résistance à l'ampicilline

neo : gène de résistance à la kanamycine

SV40 : origine de réplication de cellules eucaryotes

COS 1 et COS 2 : séquences nécessaires à l'encapsidation

T3 et T7 : promoteurs d'ARN polymérase de phages

msiK : gène *msiK*

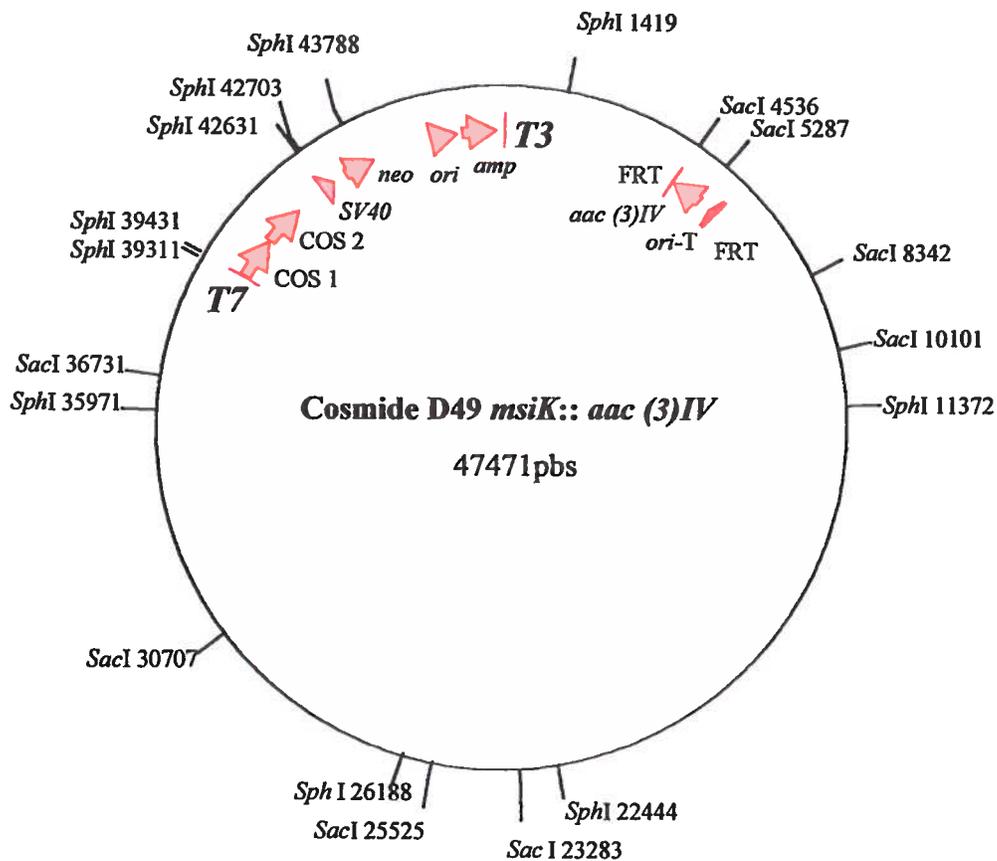


Figure 15. Carte physique du cosmide D49*msiK::aac(3)IV*.

Légende :

ori : origine de réplication du cosmide

amp : gène de résistance à l'ampicilline

neo : gène de résistance à la kanamycine

SV40 : origine de réplication de cellules eucaryotes

COS 1 et COS 2 : séquences nécessaires à l'encapsidation

T3 et T7 : promoteurs d'ARN polymérase de phages

FRT : sites de reconnaissance de la FLP (Flip recombinase)

aac(3)IV : gène de résistance à l'apramycine

ori-T : origine de transfert

L'ADN cosmétique de D49 *msiK:: aac (3)IV* a été digéré avec *SacI* et le produit digéré a migré sur gel agarose 0,7% pendant 12 à 16 heures à 30 V. Les longueurs de fragments attendus pour les deux cosmides sont représentées au tableau 8. Les fragments de 15 726 pbs, de 3 055 pbs et de 751 pbs ne sont présents que chez le cosmide contenant la cassette de résistance à l'apramycine. Les cosmides de huit transformants résistants à l'apramycine ont été extraits et analysés comme le montre la figure 16. Le fragment de 3055 pbs confirme la présence de la cassette de résistance au bon endroit sur le cosmide chez sept des huit transformants analysés. Pour ce qui est des fragments de 15 726 pbs et de 751 pbs, ils n'ont pu être visualisés sur ce gel d'agarose.

Tableau 8. Longueur des fragments de digestion attendus par la digestion avec *SacI* (longueur en paire de base)

| Cosmide D49 | CosmideD49 <i>msiK:: aac (3)IV</i> |
|-------------|------------------------------------|
| 18 850 | 15 726 |
| 13 182 | 13 182 |
| 6 024 | 6 024 |
| 5 182 | 5 182 |
| | 3 055 |
| 2 242 | 2 242 |
| 1 759 | 1 759 |
| | 751 |

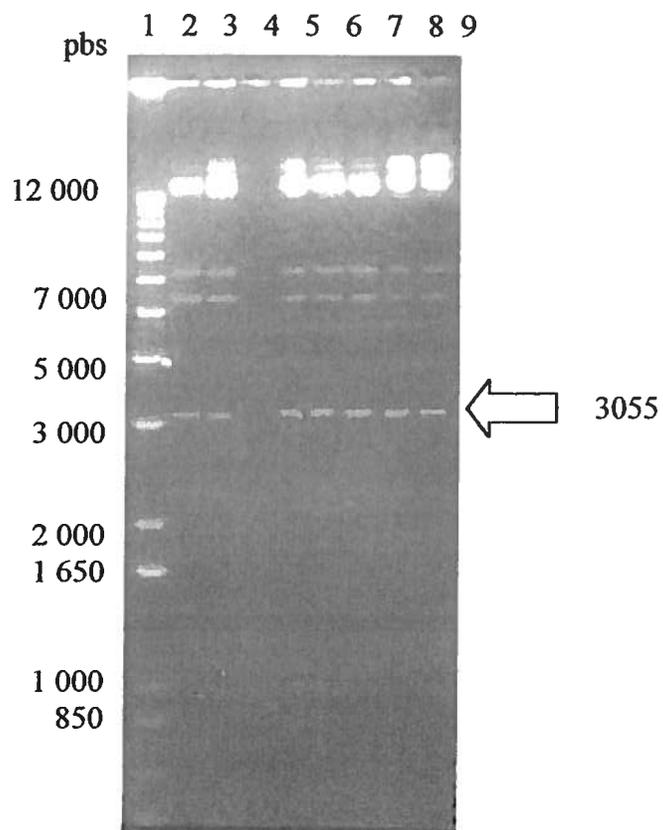


Figure 16. Cosmide D49 *msiK* :: *aac(3)IV* digéré avec *SacI*.

Légende :

1: Marqueur de poids moléculaire

2-9: Cosmides D49 *msiK* :: *aac(3)IV* après digestion avec *SacI* isolés de 8 colonies d'*E. coli* BW25113

3.4 Conjugaison et analyse des exconjugants

Suite à l'analyse précédente, deux microlitres de la préparation d'ADN cosmique ont été utilisés pour transformer la souche *E. coli* ET12567 contenant le plasmide pUZ8002 nécessaire à la conjugaison avec les spores de *S. coelicolor* M145 tel que décrit à la section 2.4.8. Plus de 10^5 exconjugants ont été obtenus. Les exconjugants ont été repiqués sur milieu DNA avec kanamycine ou apramycine. Les colonies sensibles à la kanamycine et résistantes à l'apramycine ont été sélectionnées. La sensibilité à la kanamycine permet d'exclure tous les événements de simple recombinaison. Sur 25 exconjugants résistant à l'apramycine analysés, seulement 2 présentaient une sensibilité à la kanamycine. L'événement de double recombinaison s'est donc produit au taux de 8%.

3.4.1 Vérification par PCR de l'insertion de la cassette Apra^R dans l'ADN chromosomique

La vérification par PCR des exconjugants a nécessité une paire additionnelle d'amorces de 18-20 nucléotides qui s'hybrident de 100 à 200 paires de bases en amont et en aval de la région recombinante de 39 pbs soient les amorces 2D49*msiK3* et 2D49*msiK5* (tableau 4). La réaction de polymérase en chaîne a été réalisée dans les mêmes conditions que lors de l'amplification de la cassette (section 2.5.3) en utilisant 1 µl de la matrice d'ADN au lieu de 0,5 µl. Les longueurs de fragments attendus sont donc de 1 726 pbs pour la souche ayant intégré la cassette qui contient le gène de résistance à l'apramycine et de 1447 pbs pour l'amplification du gène *msiK*. Le PCR a également été effectué avec l'ADN chromosomique de *S. lividans* 10-164 comme témoin négatif et le cosmide D49*msiK* : : *aac(3)IV* comme témoin positif. La digestion préalable de l'ADN chromosomique avec l'enzyme de restriction *SphI* a facilité la réaction de PCR. Un seul exconjugant Apra^R et Kan^S a été analysé dans le cadre de ce projet soit le mutant Δ*msiK1*. Le résultat de l'amplification est présentée à la figure 17.

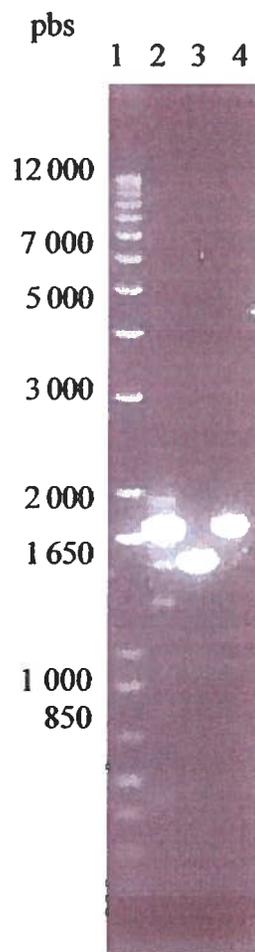


Figure 17. Vérification par PCR de l'ADN chromosomique du mutant $\Delta ms i K 1$.

Légende :

1: Marqueur de poids moléculaire

2 :Cosmide D49 mutant digéré par *SphI* et amplifié par PCR avec les amorces 2D49*msiK5* et 2D49*msiK3*.

3 : ADN chromosomique de *S. lividans* 10-164 digéré par *SphI* et amplifié par PCR avec les amorces 2D49*msiK5* et 2D49*msiK3*.

4 : ADN chromosomique du mutant présumé $\Delta ms i K 1$ digéré par *SphI* et amplifié par PCR avec les amorces 2D49*msiK5* et 2D49*msiK3*.

3.4.2 Vérification par séquençage de l'insertion de la cassette Apra^R dans l'ADN chromosomique

L'amplicon obtenu par PCR a la section précédente a été séquençé. La séquence obtenue est présentée à la figure 18. La dislocation s'est produite au nucléotide près puisque l'ATG du début du gène *msiK* et le TGA de la fin du gène se retrouvent dans les séquences en vert exactement à l'endroit prévu lors de la conception des amorces. Les séquences du gène d'apramycine (en bleu) et des FRT (en mauve) ont également été retrouvées.

1 ggccaggttcc tgcggtaga agggggccct ttcacatga ttcgggggat ccgtcgacct gcagttcgaa gttcctattc tctagaaaagt
91 ataggaactt cgaagtccc gccagctcgc cagagcagga ttcccgttga gcaccgccag gtgcgaataa gggacagtga agaaggaaca
181 ccgctcgcg ggtgggcta cttcacctat cctgcccgc tgacgccgtt ggatacacca agaaaagtct acacgaaccc ttggcaaaa
271 tcctgtatat cgtgcgaaa aggatggata taccgaaaa atcgctataa tgaccccga gacgggttat gcagcggaaa atgcagctca
361 cgtaactga tgccgtatt gcagtaccag cgtacggccc acagaatgat gtcacgctga aaatgccggc ctttgaatgg gttcatgtgc
451 agtcccatca gcaaaagggg atgataagtt taccaccacc gactatttgc aacagtgccg ttgatcgtgc tatgatcgcac tgatgtcatc
541 agcgtggag tgcaatgtc¹ tgcaatcga atggcgaaa gccgagctca td

1231 agatcccttg atcttctcgc atccgcaga ggcgggatgc gaagaatgcg atgccgctcg tgtggaca gccctgggtc aactgggccc
1261 tattccgaag ttcctattct ctagaaagta taggaacttc gaagcagctc cagcctacac ccagtcgatt ggctgagctc atgagttcc
1351 cgcgttgacc

Figure 18. Séquençage de l'amplicon de l'ADN de $\Delta msiK1$ obtenu avec les amorces 2D49 $msiK5$ et 2D49 $msiK3$

Légende :

Gene de résistance à l'apramycine

FRT

Région en amont et en aval du gène *msiK*

3.4.3 Analyse phénotypique du mutant $\Delta ms i K 1$

Le phénotype du mutant $\Delta ms i K 1$ a été vérifié sur deux milieux de culture différents soient les milieux CMC (figure 19A) et RBB xylane (figure 19B). Après une croissance en présence de cellulose et de xylane, des zones de dégradation de 20 mm et de 18 mm ont respectivement été observées pour la souche sauvage M145. Pour ce qui est du mutant $\Delta ms i K 1$, aucune zone de dégradation de la cellulose ou du xylane n'a été constatée. De plus, le mutant ne produit pas d'agarase contrairement à la souche sauvage. La production d'agarase est visible à la figure 19C et se traduit par une altération du milieu solide.

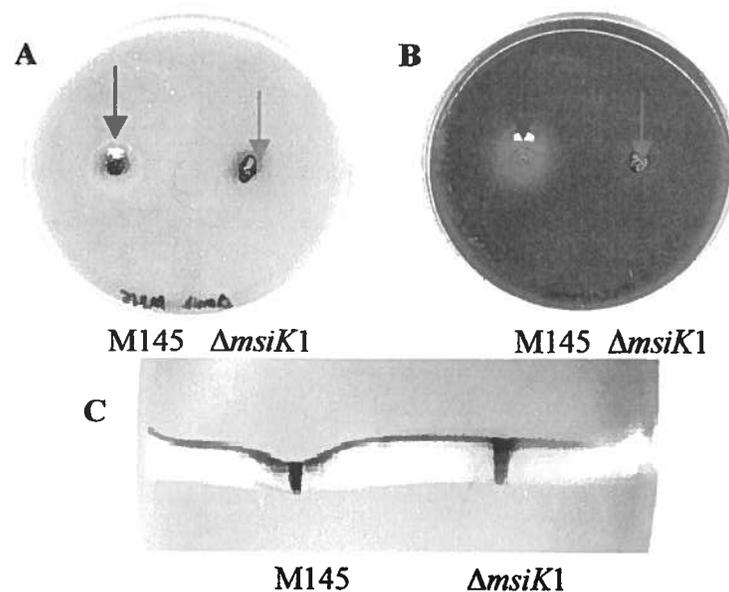


Figure 19. Croissance du mutant $\Delta ms i K$ et de la souche sauvage M145 sur milieu solide A) avec de la cellulose (CMC) B) avec du xylane (RBB-xylane) C) coupe transversale du milieu de culture solide

3.5 Analyse protéomique

3.5.1 Analyse du protéome en présence de xylose.

L'analyse protéomique du mutant $\Delta msiK1$ a d'abord été réalisée suite à une croissance dans un milieu minimal contenant du xylose. Les protéines cytoplasmiques du mutant ont été séparées selon leur masse et leur point isoélectrique en comparaison à celles de la souche sauvage M145 (figure 20). L'expression des protéines est semblable pour les deux souches et les patrons protéiques les plus intenses sont représentés par les cercles rouges. Il a également été possible de constater que la plupart des protéines se situent à des valeurs de pH de 4,5 à 6 et que très peu de protéines se situent aux pH basiques. Par contre, une mauvaise focalisation des protéines du côté acide s'est traduit par des stries et un faible nombre de protéines résolues.

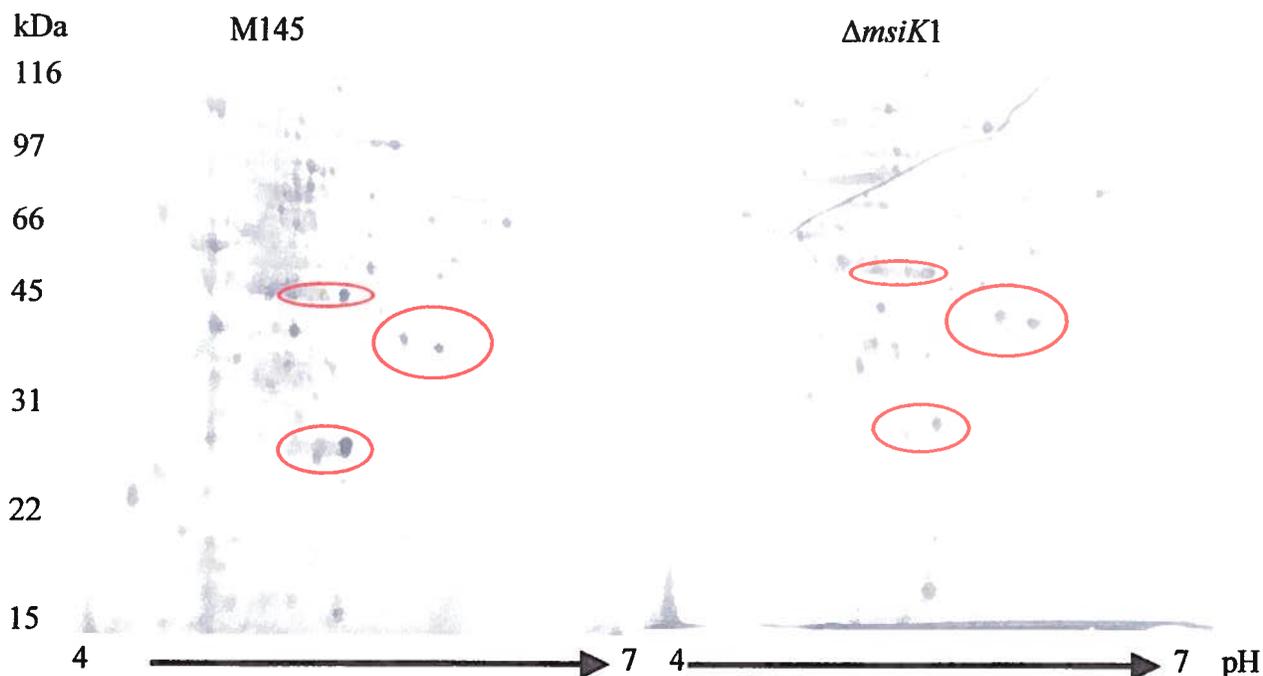


Figure 20. Gels en deux dimensions de pH 4-7 (18 cm) des protéines cytoplasmiques des souches cultivées en présence de xylose 1% pour la souche sauvage M145 et la souche mutante $\Delta msiK1$. Cent microgrammes de protéines ont été séparées selon leur pI et leur poids moléculaire.

3.5.2 Analyse du protéome en présence de xylane

L'analyse protéomique du mutant a également été effectuée après sa croissance en milieu minimal contenant du xylane soluble à une concentration de 1%. Ainsi, l'analyse protéomique a été réalisée pour les protéines cytoplasmiques et les protéines sécrétées. La focalisation isoélectrique des protéines cytoplasmiques a été obtenue pour des valeurs de pH de 3 à 10 (figure 21). Quant aux protéines sécrétées, des gels de pH 4 à 7 sont présentés à la figure 22. De façon générale, les patrons protéiques sont sensiblement les mêmes (cercles rouges). Cependant, quelques protéines différemment exprimées ont été observées. Les protéines sélectionnées sont les plus représentatives de l'ensemble des gels qui ont été effectués pour les mêmes gammes de pH; elles se retrouvent systématiquement dans tous les gels. D'autres protéines s'exprimaient différemment mais elles n'ont pas été sélectionnées puisqu'elles étaient peu abondantes et présentes uniquement dans certains gels. Les protéines ne s'exprimant que chez la souche sauvage M145 sont encerclées en bleu. Pour ce qui est des protéines encerclées en noir, elles ne s'expriment que chez le mutant Δ *msiK1*. Les protéines SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SCA1 et SCA2 ont été extraites des gels, digérées à la trypsine et les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse afin de les identifier. Le tableau suivant montre les points isoélectriques et les masses moléculaires approximatives des protéines différemment exprimées.

Tableau 9. Points isoélectriques et masses moléculaires approximatifs des protéines différemment exprimées en présence de xylane.

| Protéines | pI | Masses moléculaires (Da) |
|-----------|-----|--------------------------|
| SC1 | 5 | 25 000 |
| SC2 | 6 | 44 000 |
| SC3 | 5,5 | 42 000 |
| SC4 | 6 | 45 000 |
| SC5 | 6,2 | 46 000 |
| SCA1 | 4 | 23 000 |
| SCA2 | 8 | 31 000 |

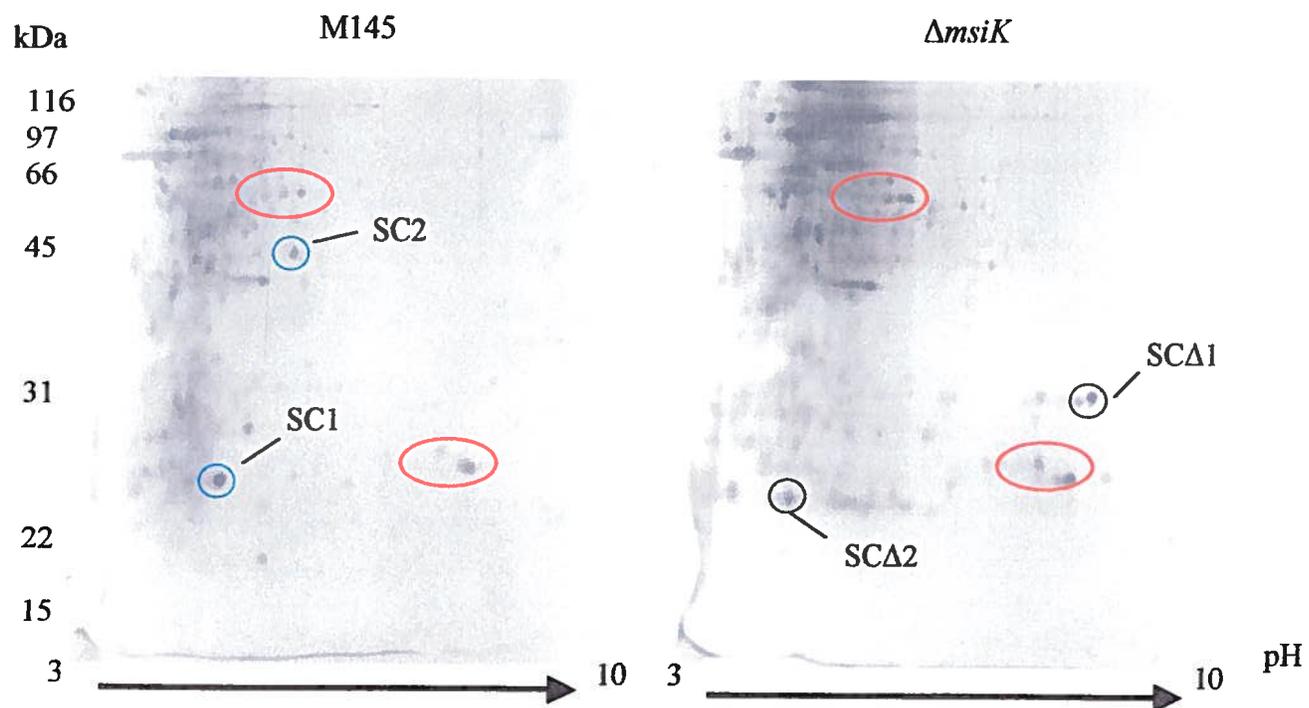


Figure 21. Gels en deux dimensions de pH 3-10 (18 cm) des protéines cytoplasmiques en présence de xylane soluble 1% pour la souche sauvage M145 et la souche mutante $\Delta ms i K$. Cent microgrammes de protéines ont été séparées selon leur pI et leur masse.

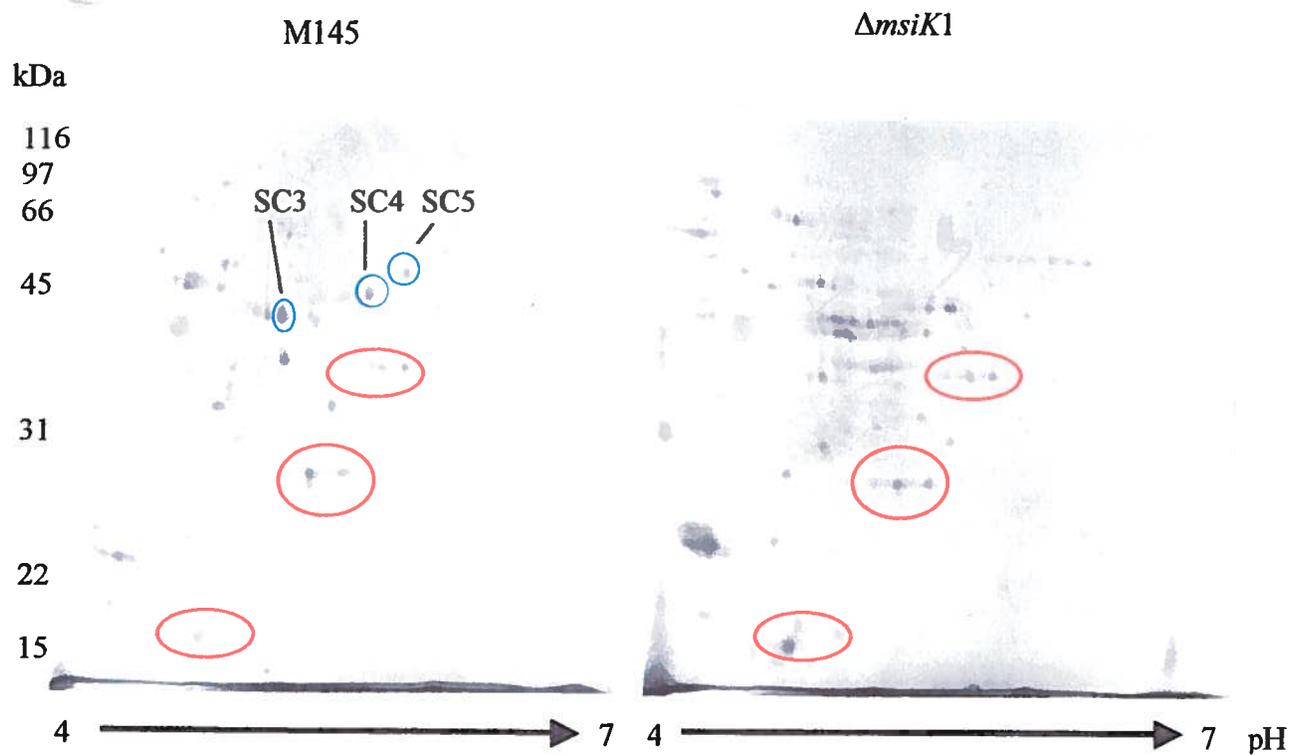


Figure 22. Gels en deux dimensions de pH 4-7 (18 cm) des protéines sécrétées en présence de xylane soluble 1% pour la souche sauvage M145 et la souche mutante $\Delta ms i K 1$. Cent microgrammes de protéines ont été séparées selon leur pI et leur masse.

3.5.3 Analyse par spectrométrie de masse des protéines différemment exprimées

Pour chacune des protéines sélectionnées, les peptides provenant de la digestion de dix morceaux de gels ont été combinés et injectés dans le spectromètre de masse. De plus, la réalisation d'un blanc a permis d'ignorer certains pics du spectre de masse pour l'analyse peptidique. En effet, les pics présents dans le spectre de masse du blanc ont tout simplement été omis de l'analyse et de la fragmentation. Pour les protéines SC1, SC2, SC4, SCA1 et SCA2, aucun peptide n'a été identifié par spectrométrie de masse puisque les spectres de masse présentaient un bruit de fond très intense. Ces protéines n'ont donc pas pu être identifiées dans le cadre de ce projet.

3.5.4 Analyse par spectrométrie de masse de la protéine SC3

L'analyse en spectrométrie de masse n'a donné de résultats significatifs que pour la protéine SC3 et le spectre de masse obtenu pour cette protéine est présenté à la figure 23. En tout, 12 ions ont été employés pour l'analyse peptidique de la protéine inconnue et la recherche dans les bases de données. L'état de charge des ions pseudo-moléculaires a permis de déduire la masse moléculaire de l'ion correspondant nécessaire à la recherche. L'état de charge a été déterminé sur le spectre de masse à partir de la distance entre les différents pics isotopiques du peptide. Le tableau 10 présente les différentes valeurs de charges associées à chaque ion ainsi que la masse de l'ion pseudo-moléculaire correspondant. Certains pics étaient présents dans le blanc comme par exemple les pics 503,2 ; 547,3 et 635,3 de valeur de m/z et n'ont donc pas été employés pour l'analyse et l'identification.

La recherche de la protéine SC3 a été réalisée à l'aide du logiciel PeptIdent. Le tableau 11 présente le résultat de la recherche obtenu avec les 12 masses peptidiques retrouvées sur le spectre de masse. La protéine inconnue est la xylose isomérase de *Streptomyces coelicolor*. La séquence de la protéine est également présentée dans ce tableau ainsi que les acides aminés qui composent les peptides retrouvés sur le spectre de masse (en rouge). Ces acides aminés, au nombre de 128, couvrent 33,1% de la séquence

totale en acides aminés de la protéine. Il est finalement possible de constater que les peptides observés sont distribués sur toute la protéine.

Enfin, le tableau 12, présente les masses des peptides observées en comparaison avec les peptides obtenus par la digestion tryptique *in silico* de la xylose isomérase. Les différences entre les masses observées et théoriques varient entre 0,1 et 0,6 Da. La plus grande différence est observée pour le plus gros peptide soit celui de 1821,3 Da. Les peptides de 1524,8 Da, 1240,6 Da et 1033,0 Da possèdent un site de clivage de la trypsine manqué (#MC). Quant aux autres peptides, aucun site de clivage n'a été omis par la trypsine.

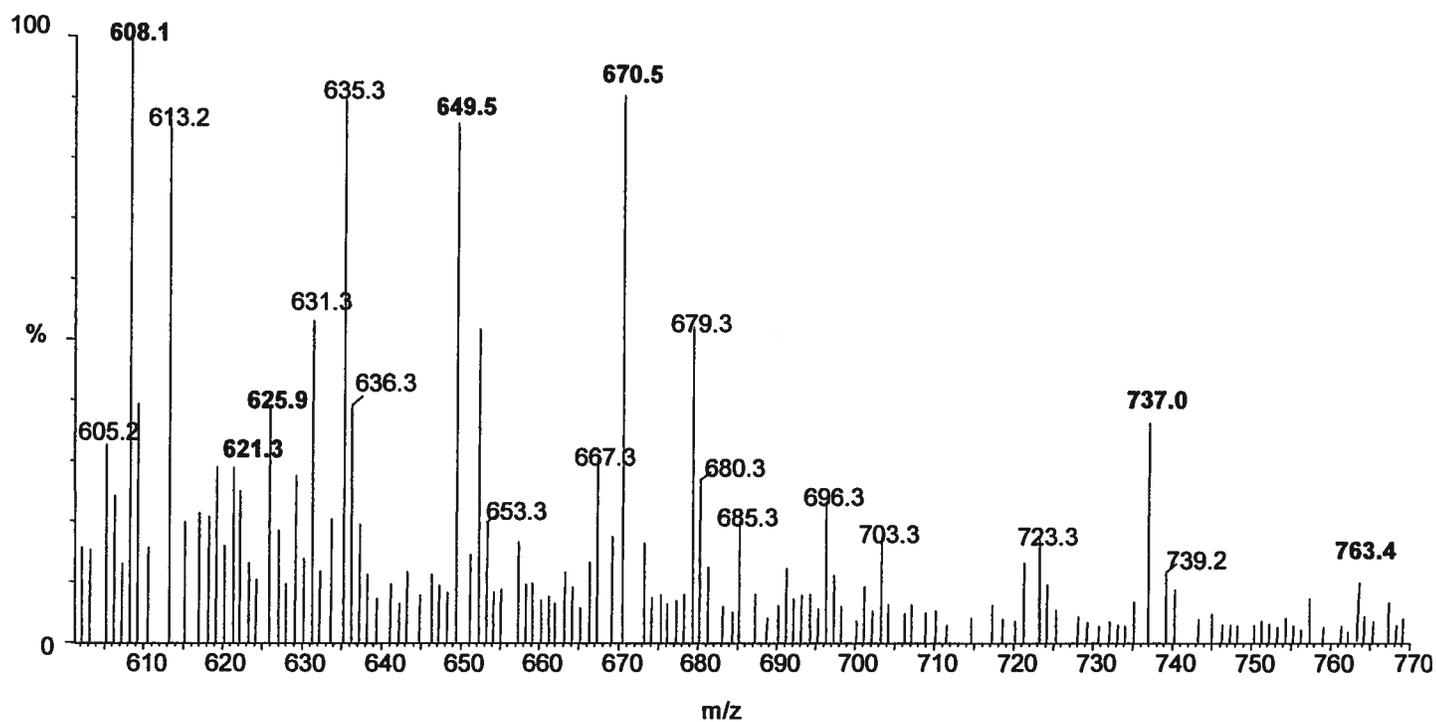
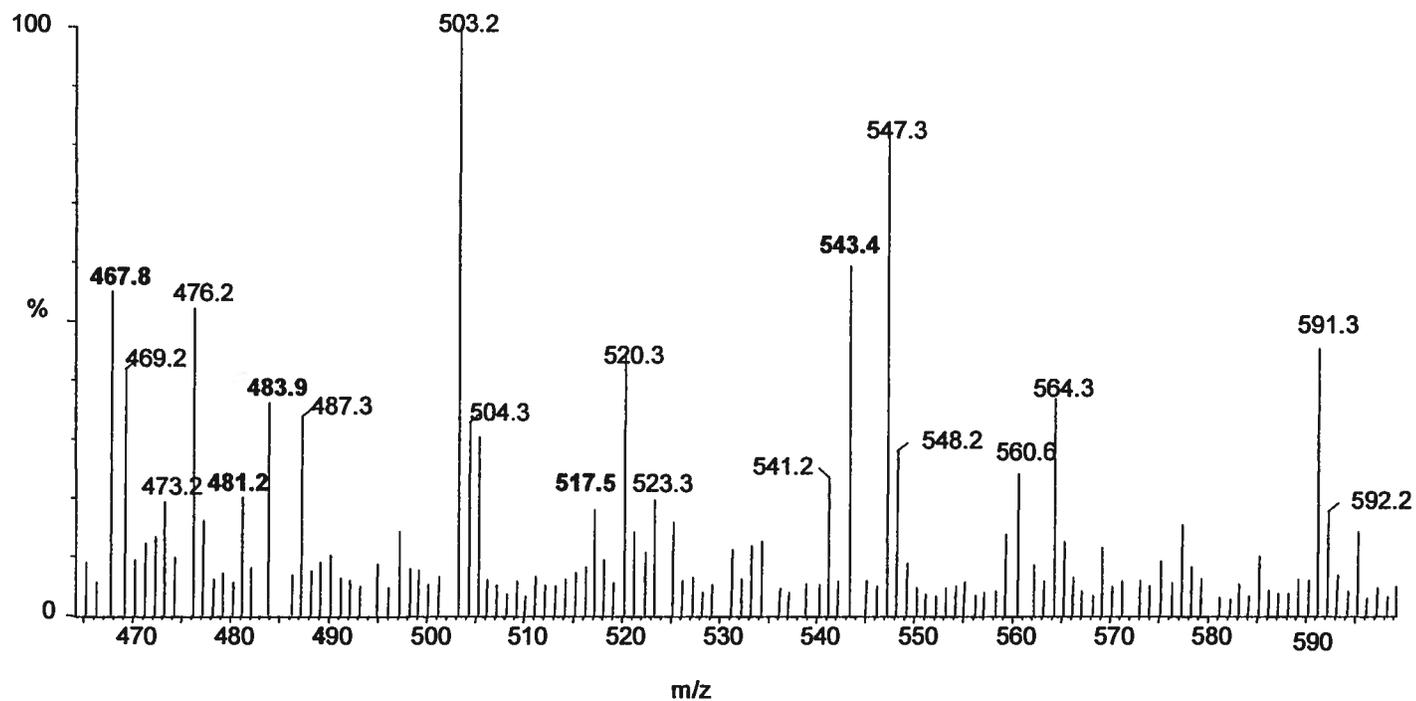


Figure 23. Spectre de masse de la digestion à la trypsine de la protéine SC3 pour les valeurs de m/z de 460 à 600 et de 600 à 770 .

Tableau 10. Masses d'ions moléculaires déduites à partir de la masse de l'ion pseudo-moléculaire et de l'état de charge selon la formule $[M] = (M+z)/z$

| Ion pseudo-moléculaire (M) | État de charge (z) | Ion moléculaire [M] |
|----------------------------|--------------------|---------------------|
| 608,1 | +3 | 1821,3 |
| 763,4 | +2 | 1524,8 |
| 737,0 | +2 | 1472,0 |
| 481,2 | +3 | 1440,6 |
| 670,5 | +2 | 1339,0 |
| 649,5 | +2 | 1297,0 |
| 625,9 | +2 | 1249,8 |
| 621,3 | +2 | 1240,6 |
| 543,4 | +2 | 1084,8 |
| 517,5 | +2 | 1033,0 |
| 483,9 | +2 | 965,8 |
| 467,8 | +2 | 933,6 |

Tableau 11. Identification et séquence de la protéine SC3. Les séquences retrouvées sur les peptides identifiés par spectrométrie de masse sont représentées en rouge.

Q9LOB8 (XYLA_STRCO) pI: 5.06, Mw: 42918.17
 Xylose isomerase (EC 5.3.1.5). - *Streptomyces coelicolor*.

1 **MNYQTPEDR** ftfglwtvgw qgrdpfgdat **rQALDPAESV** **RR**lselgayg
 vtfhdddliip fgssdteres hikrfr**QALD** **ATGMK**vpmat tnlfthpvfk
DGAFTANDRd vrryalrkti rnidlavelg asvyvawggr egaesgaakd
 vrdaldrmke afdllgeyvt eqgydlkfai epkpnepr**GD** **ILLPTVGHAL**
AFIERlerpe lygvnpevgh eqmaglnfph giaqalwagk **LFHIDLNGQS**
GIKYDQDLRF **GAGDLR**aafw lvdllleragy agprhfdfkp prtedefdgvw
 asaagcmr**NY** **LILKDR**aaaf **rADPQVQEAL** **AAAR**ldelar ptaedglaal
 ladr**SAYDTF** **DVDA**AAARgm afehdqlam dhllgar 387

Tableau 12. Masses peptidiques observées sur le spectre de masse en comparaison avec la digestion *in silico* de la protéine. La séquence d'acides aminés obtenue par la fragmentation peptidique est représentée en rouge.

| Masse Observée (Da) | Masse Théorique (Da) | Δ Masse (Da) | #MC | Position | Peptide |
|---------------------|----------------------|---------------------|-----|----------|------------------------------|
| 1821,3 | 1821,0 | 0,6 | 0 | 189-205 | GDILLPTVGHALAFIER |
| 1524,8 | 1524,7 | 0,1 | 1 | 254-266 | YDQDLRFGAGDLR |
| 1472,0 | 1471,7 | 0,3 | 0 | 355-368 | SAYDTFDVDA AAA AR |
| 1440,6 | 1440,8 | 0,2 | 0 | 241-253 | LFHIDLNGQSGIK |
| 1339,0 | 1338,7 | 0,3 | 0 | 322-334 | ADPQVQEALAAAR |
| 1297,0 | 1296,7 | 0,3 | 0 | 178-188 | FAIEPKPNEPR |
| 1249,8 | 1249,5 | 0,3 | 0 | 1-10 | MNYQTPEDR |
| 1240,6 | 1240,7 | 0,1 | 1 | 32-42 | QALDPAESVRR |
| 1084,8 | 1084,6 | 0,2 | 0 | 32-41 | QALDPAESVR |
| 1033,0 | 1033,6 | 0,6 | 1 | 309-316 | NQLLKDR |
| 965,8 | 965,4 | 0,4 | 0 | 101-109 | DGAFTANDR |
| 933,6 | 933,5 | 0,1 | 0 | 77-85 | QALDATGMK |

À la suite de l'analyse du profil peptidique, l'ion pseudo-moléculaire de valeur de m/z de 737,0 a été fragmenté dans la cellule de collision avec une énergie de 33 eV. Le spectre de fragmentation obtenu (figure 24) a permis de déduire la séquence en acide aminé YDTFDV en effectuant la lecture sur le spectre de droite vers la gauche. La différence de masse entre chaque pic intense correspond à la masse d'un résidu en acide aminé. Cette séquence se retrouve sur la séquence du peptide 1472,0 Da obtenu par la digestion *in silico* (tableau 12). Il est également possible de constater que l'ion pseudo-moléculaire précurseur a été retrouvé sur le spectre de fragmentation.

Pour ce qui est du tableau 13, il fait état de la différence de masse des résidus en acides aminés observée sur le spectre de fragmentation et la masse théorique de ces mêmes résidus. La différence de masse est faible et varie de 0 à 0,3 Da. En ce qui concerne les autres peptides de la protéine présents sur le spectre de masse (figure 23), la fragmentation de ces derniers n'a pas généré de spectre de fragmentation permettant de déduire une séquence en acides aminés.

Tableau 13. Masses des résidus en acide aminés observées sur le spectre de masse en comparaison avec la masse théorique.

| Masse observée (Da) | Masse théorique (Da) | Δ Masse (Da) | Résidu d'acide aminé correspondant |
|---------------------|----------------------|---------------------|------------------------------------|
| 162,7 | 163,0 | 0,3 | Y (tyrosine) |
| 115,0 | 115,0 | 0 | D (acide aspartique) |
| 100,8 | 101,0 | 0,2 | T (thréonine) |
| 147,0 | 147,1 | 0,1 | F (phénylalanine) |
| 115,3 | 115,0 | 0,3 | D (acide aspartique) |
| 99,4 | 99,1 | 0,3 | V (valine) |

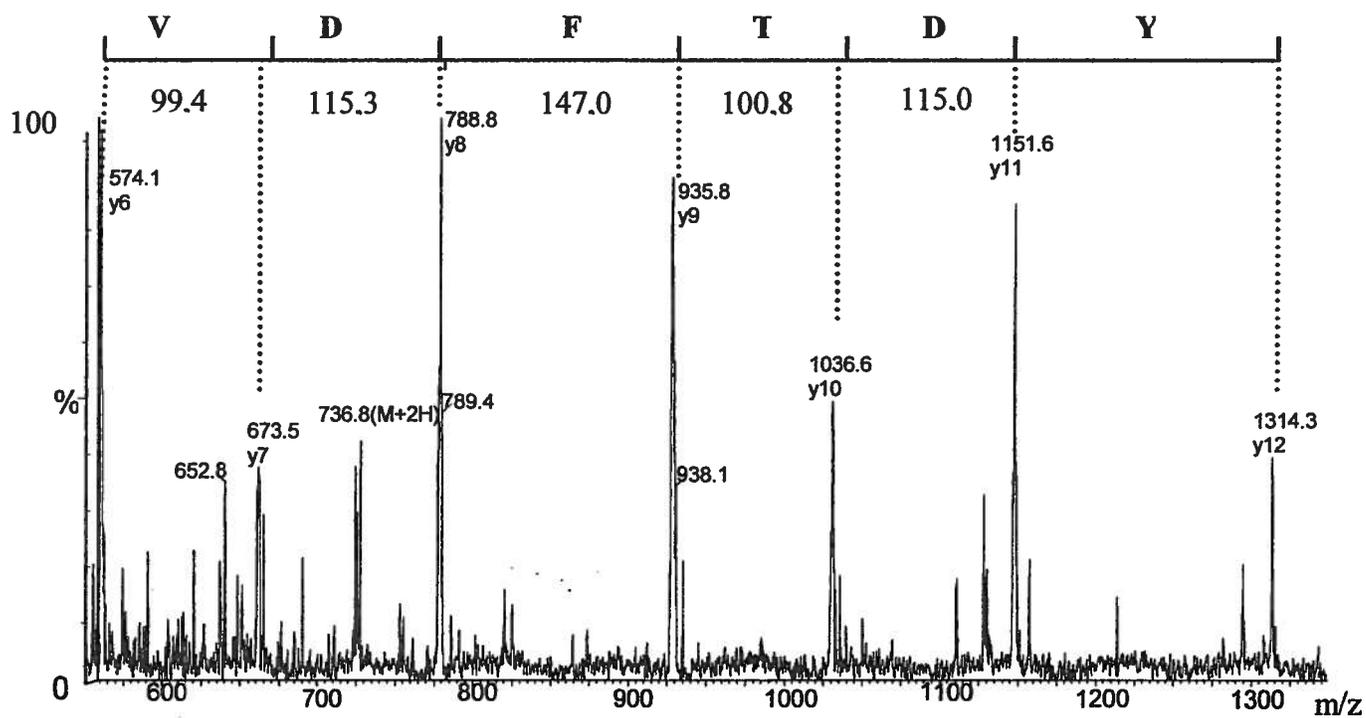


Figure 24. Spectre de masse de la fragmentation de l'ion 737,0 avec une énergie de collision de 33 eV.

4. DISCUSSION

4.1 Dislocation génétique du gène *msiK* chez *S. coelicolor* M145

4.1.1 La méthode REDIRECT

La méthode REDIRECT a été plus efficace que les autres méthodes utilisées auparavant pour les Streptomycètes (Kieser *et al.*, 2000). Par exemple, Leduc en 1999 a tenté de disloquer les gènes du locus *bxl* et le gène *msiK* chez *S. lividans* en utilisant des plasmides d'une longueur moyenne inférieure à 1000 paires de bases. Par cette méthode, aucun mutant ayant subi la double recombinaison homologue n'a été obtenu.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'efficacité de la méthode REDIRECT. Tout d'abord, les gènes *gam*, *bet* et *exo* situés sur le plasmide pIJ790 augmentent le taux de recombinaison homologue comme démontré par Datsenko et Wanner (2000). Plus d'une centaine de transformants ont été obtenus par la transformation avec le produit de PCR (section 3.3) ce qui est comparable aux résultats obtenus par Gust *et al.* (2003). D'autre part, l'inclusion d'une origine de transfert dans la cassette de résistance permet l'utilisation de la conjugaison pour le transfert intergénique de l'ADN cosmétique. Le nombre d'exconjugants obtenus est donc élevé (plus de 10^5 , section 3.4) puisque la conjugaison est plus efficace que la transformation des protoplastes (Matsushima *et al.*, 1994).

Une autre différence entre la méthode REDIRECT et les méthodes employées auparavant est que la double recombinaison sur le chromosome s'effectue entre des séquences homologues de très grande taille. En effet, en utilisant un cosmide d'une taille moyenne de 37,5 kbs, les régions de chaque côté du marqueur seront plus grandes que sur un plasmide dont la taille moyenne est nettement inférieure. Pour ce qui est de la dislocation du gène *msiK*, le taux de double recombinaison homologue a été de 8% (section 3.4) ce qui est légèrement inférieur aux résultats obtenus par Gust *et al.* (2003). En effet, sur plus de 100 segments de *S. coelicolor* remplacés par la méthode REDIRECT, une moyenne de 10 à 30% des exconjugants présentaient la double recombinaison homologue.

Par ailleurs, la rapidité de la méthode est augmentée en utilisant des souches de *E. coli* pour effectuer la dislocation génétique sur l'ADN cosmétique. En effet, les souches de *E. coli* ont une croissance beaucoup plus rapide que les souches de streptomycètes. Ainsi, l'obtention de mutants stables s'est effectué rapidement (quelques jours) comparativement aux autres méthodes qui pouvaient prendre plusieurs semaines (Leduc, 1999). Cependant, le criblage des exconjugants demeure assez long.

Enfin, la stabilité de la dislocation génétique comparativement à une mutation ponctuelle est sans aucun doute un grand avantage notamment pour les études enzymatiques. En effet, il existe une possibilité que la mutation ponctuelle chez *S. lividans* 10-164 réverte après plusieurs repiquages rétablissant ainsi le phénotype sauvage. Le mutant 10-164 de *S. lividans* étant la seule souche employée pour cloner des xylanases et cellulases mutantes par le groupe des streptomycètes de l'INRS-Institut Armand-Frappier, la préservation du phénotype *cel*⁻ et *xln*⁻ est donc très importante.

4.1.2 Analyse phénotypique du mutant

Une mutation du gène *msiK* chez la souche *S. lividans* 1326 affecte la dégradation du xylane et de la cellulose (Mondou *et al.*, 1986). Ce phénotype a également été observé dans le cadre de ce projet avec le mutant Δ *msiK1* de la souche *S. coelicolor* M145 (section 3.4.3.). De plus, le mutant Δ *msiK1* présente un phénotype négatif pour la dégradation de l'agar. Ce phénotype n'a pu être observé auparavant avec le mutant 10-164 puisque la souche sauvage *S. lividans* ne produit pas d'agarase (Servin-Gonzalez, Jensen et White, 1994). La mutation du gène *msiK* chez *S. lividans* 10-164 n'affecte pas la sécrétion des xylanases et cellulases mais bien la régulation de ces systèmes de dégradation. En effet, en inactivant le gène *msiK* les inducteurs des gènes ne peuvent plus entrer dans la bactérie et activer la transcription des gènes. Par conséquent, il est possible de supposer que la mutation du gène *msiK* chez *S. coelicolor* a un effet sur la régulation de la production de l'agarase plutôt que sur la sécrétion de l'agarase. De plus,

certains complexes de dégradation sont souvent sous le contrôle d'inducteurs sans aucun lien structural avec le substrat ou le produit de dégradation d'une enzyme (Hodgson, 2000). Ainsi, un produit de dégradation intermédiaire du xylane et/ou de la cellulose pourrait induire la production de l'agarase, ce qui pourrait expliquer l'effet pléiotropique observé. À ce stade-ci, il est impossible d'affirmer que la dislocation complète du gène *msiK* chez *S. coelicolor* M145 n'a pas les mêmes conséquences que la mutation ponctuelle chez 10-164 de *S. lividans*.

4.2 Analyse du protéome du mutant Δ *msiK1* de *S. coelicolor* M145

4.2.1 Gels en deux dimensions et détection des protéines

L'objectif de ce projet d'étude était d'identifier des protéines affectées par la dislocation du gène *msiK* et idéalement des protéines de régulation du système xylanolytique. Pour ce faire, des gels en deux dimensions ont été effectués pour des valeurs de pH de 4 à 7 et de 3 à 10. Cependant, la résolution de ces gels est beaucoup plus faible que celle des gels de pH étroit ce qui rend la détection des protéines exprimées en faible quantité plus difficile (Hoving *et al.*, 2002). Il est donc possible que d'autres protéines, en plus de celles identifiées, soient affectées par la dislocation du gène *msiK* et qu'elles n'aient pas été résolues. La réalisation de gels de pH étroits permettrait d'augmenter la profondeur de l'analyse. Par ailleurs, les protéines les plus représentatives ont été sélectionnées pour la présente étude. Plusieurs variations d'expression entre les différents gels ont été observées mais ces variations n'étaient pas présentes systématiquement dans tous les gels. En effet, une petite variation des conditions de culture peut faire varier le protéome de la bactérie.

Pour ce qui est de la détection des protéines, le logiciel Image Master Elite a eu une utilité assez limitée. En effet, pour l'analyse et la superposition des gels, un travail manuel ardu était nécessaire à chaque analyse afin d'enlever les artéfacts détectés par le logiciel. La manque de résolution de la caméra CCD (Kodak Image Station IS440CF) et la qualité de l'image non optimisée pour ce genre d'analyse est en grande partie

responsable de la capacité d'analyse limitée du logiciel. L'acquisition des images à l'aide d'un densitomètre laser pourrait augmenter la capacité d'analyse du logiciel.

4.2.2 Analyse du protéome en présence de xylose

Pour l'analyse du protéome du mutant *S.c.ΔmsiK1* en présence de xylose, l'expression des protéines est comparable comparativement à la souche sauvage M145. Cela peut s'expliquer par le fait que le xylose est un sucre simple dont l'entrée dans la bactérie se produit de façon passive. Par conséquent, le rôle de la protéine MsiK en présence de xylose n'a pu être approfondi dans le cadre de ce projet.

4.2.3 Analyse du protéome en présence de xylane

L'analyse du protéome du mutant *S.c.ΔmsiK1* a été réalisée dans un milieu de culture contenant du xylane. Quelques différences ont été observées dans l'expression des protéines. Il est possible que la protéine MsiK soit une de ces protéines. Cependant, les protéines cytoplasmiques SC1 et SC2 ne possèdent pas les mêmes points isoélectriques et les mêmes masses moléculaires (tableau 9) que la protéine MsiK (pI de 5,79 et masse moléculaire de 40 396 Da). D'autre part, il est possible de s'attendre à ce que l'apramycine soit une nouvelle protéine exprimée par le mutant *ΔmsiK1*. À cet effet, les protéines SCA1 et SCA2 possèdent des masses et des pI différents de l'apramycine (un pI de 5,66 et une masse de 27 873 Da). Pour ce qui est des protéines sécrétées SC3, SC4 et SC5, aucune d'entre elles n'ont les mêmes coordonnées sur le gel en deux dimensions que l'agarase (pI de 6,84 et masse de 35 164Da). L'effet de la mutation sur l'agarase ayant déjà été observé sur milieu de culture solide (figure 19).

4.2.3.1 Analyse en spectrométrie de masse des protéines différemment exprimées

Pour les protéines SC1, SC2, SC4, SC5, SCA1 et SCA2, aucun profil peptidique n'a été obtenu en spectrométrie de masse. Malgré le fait que dix morceaux de gels ont été cumulés pour chacune des protéines, la quantité de protéine injectée dans le spectromètre de masse n'était pas suffisante pour que les peptides se discriminent du bruit de fond. L'injection d'une plus grande quantité de peptides au spectromètre de masse aurait permis d'augmenter la possibilité d'obtenir un profil peptidique pour les protéines inconnues. Pour ce faire, il aurait fallu avoir plus de protéines dans les gels. Le chargement d'une plus grande quantité de protéines dans les gels n'aurait pas résolu nécessairement le problème puisque la résolution diminue en fonction de la quantité de protéines incorporée dans les gels (Resing, 2002). Il aurait cependant été possible d'utiliser des gels de pH étroit (gel couvrant 1 à 2 unités de pH) puisqu'une plus grande quantité de protéines peut être incorporée dans ces gels comparativement aux gels de pH large (pH 3-10, 4-7) (Hoving *et al.*, 2002). D'autres techniques d'analyses, comme la dégradation d'Edman, aurait permis l'identification des protéines inconnues.

De plus, lors de la coloration, l'argent se fixe sur les chaînes latérales des acides aminés et empêche l'ionisation des peptides. Les peptides non-ionisés ne peuvent pas être détectés en spectrométrie de masse. Pour augmenter la sensibilité, une décoloration avec une réduction de type Farmer aurait pu être effectuée comme démontrée par Gharahdaghi *et al.* (1999). À ce moment, les molécules d'argent sont lavées du gel avant que la digestion de la protéine ne soit effectuée. De plus, l'utilisation de d'autres méthodes de coloration compatibles avec la spectrométrie de masse aurait également augmenté le nombre de peptides ionisés comme par exemple la coloration au bleu de Coomassie. Le nombre de peptides récupérés avec un gel coloré au bleu de Coomassie est équivalent à une digestion en solution de la protéine. Cependant, la coloration à l'argent demeure la coloration la plus sensible (Resing, 2002).

4.2.3.2 Analyse du profil peptidique de la protéine SC3

Pour la protéine SC3, il a été possible d'obtenir un spectre de masse correspondant à un profil peptidique (figure 23). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la protéine SC3 était une protéine très abondante dans les gels comparativement aux autres protéines analysées dans le cadre de ce projet. Le profil peptidique obtenu en spectrométrie de masse présente de nombreux pics intenses pour des valeurs de m/z inférieur à 800. Dans cette analyse, la comparaison avec le blanc a été d'une très grande utilité puisque plusieurs pics ont été omis de l'analyse facilitant ainsi l'identification de la protéine. Pour ce qui est du spectre de masse pour les valeurs de m/z supérieur à 800, aucun pic n'est apparu plus intense que le bruit de fond et le spectre de masse n'a donc pas pu servir pour l'identification de la protéine.

Tous les peptides identifiés par le spectromètre de masse se retrouvent dans la digestion *in silico* de la xylose isomérase et les différences de masse n'excèdent pas 0,6 Da (tableau 12). Plus les différences entre les masses théoriques et observées sont faibles, plus l'identification de la protéine sera sans ambiguïté (Jensen, Larsen et Roepstorff, 1998). De plus, le point isoélectrique et la masse moléculaire de la xylose isomérase correspondent bien à ce qui a été observé sur les gels en deux dimensions pour la protéine SC3 (tableaux 9 et 11) ce qui sert également à confirmer l'identification. Enfin, les peptides identifiés en spectrométrie de masse couvrent 33,1% de la séquence et sont distribués sur toute la protéine ce qui indique que la protéine n'a pas été hydrolysée dans le milieu de culture.

4.2.3.3 Fragmentation du peptide 737,0 de valeur de m/z

Le peptide de valeur de m/z de 737,0 est le seul peptide qui a été fragmenté avec succès lors de l'analyse en spectrométrie de masse. Les autres peptides ont tout de même été fragmentés dans la cellule de collision mais aucun spectre de masse permettant de déduire une séquence en acides aminés n'a été obtenu. En effet, les autres peptides

n'étaient probablement pas en quantité suffisante pour générer des spectres de fragmentation clairs et par conséquent, aucune séquence peptidique n'a été obtenue.

Les résidus d'acides aminés déduits du spectre de fragmentation du peptide 737,0 ont une différence de masse n'excédant pas 0,3 Da comparativement à leur masse théorique (tableau 13). Ainsi, aucune masse ne correspond à deux résidus possibles dans un intervalle de confiance de 0,5 Da. La séquence YDTFDV est donc probablement exacte. Enfin, la séquence obtenue par fragmentation se retrouve dans la séquence du peptide précurseur 1472 de valeur de m/z (tableau 12) ce qui valide l'identification de la xylose isomérase.

4.2.3.4 La protéine SC3 : la xylose isomérase

La protéine SC3 a été identifiée comme étant la xylose isomérase. Cette enzyme porte aussi le nom de glucose isomérase et catalyse la conversion du D-xylose et du D-glucose en D-xylulose et D-fructose respectivement (Bhosale, Rao et Deshpande, 1996). La xylose isomérase est une protéine cytoplasmique mais a été retrouvée dans le surnageant de culture dans le cadre de ce projet. Les gels effectués sur la fraction cytosolique n'ont pas permis de localiser la xylose isomérase. Malgré son abondance, il est possible que celle-ci ne soit pas résolue aux gammes de pH utilisées lors de cette étude. Il serait intéressant d'effectuer des gels de pH étroits afin de localiser cette protéine.

La xylose isomérase ne possède pas de peptide signal comme le montre le tableau 11 et a besoin de cofacteurs métalliques comme le Mg^{2+} , le Co^{2+} et le Mn^{2+} pour exercer sa fonction catalytique (Bhosale, Rao et Deshpande, 1996). Par conséquent, il est peu probable que la xylose isomérase soit sécrétée dans le milieu de culture. La xylose isomérase a également été observée dans le milieu de culture par Nguyen (2003) et par Simard (résultats non publiés) chez *S. coelicolor* M145 et *S. lividans* 1326 respectivement. Pour le moment, l'hypothèse veut que la xylose isomérase se retrouve

dans le surnageant lors du bris du mycélium au cours de la culture en milieu liquide. Il aurait cependant été intéressant de vérifier son activité dans le surnageant de culture en effectuant une mesure de l'activité enzymatique de la conversion du xylose en xylulose.

Du point de vue biologique, tout semble indiquer que la production de la xylose isomérase ne soit pas induite chez le mutant du gène *msiK*. En effet, chez le mutant $\Delta ms i K 1$, le xylobiose et le xylotriose ne peuvent plus entrer dans la bactérie et, par conséquent, la concentration de xylose intracellulaire est beaucoup plus faible que chez la souche sauvage M145. Il reste cependant à déterminer si la xylose isomérase est régie par le même système de régulation que les autres protéines du système xylanolytique

Finalement, la figure suivante montre le nouveau modèle hypothétique de la dégradation du xylane avec l'implication de la xylose isomérase. Une fois que la xylose isomérase aura converti le xylose en xylulose, celui-ci sera alors phosphorylé par la xylulokinase afin de former le xylulose-5-phosphate. Ce dernier sera par la suite, utilisé comme source d'énergie par la voie du pentose phosphate (Bhosale, Rao et Deshpande, 1996).

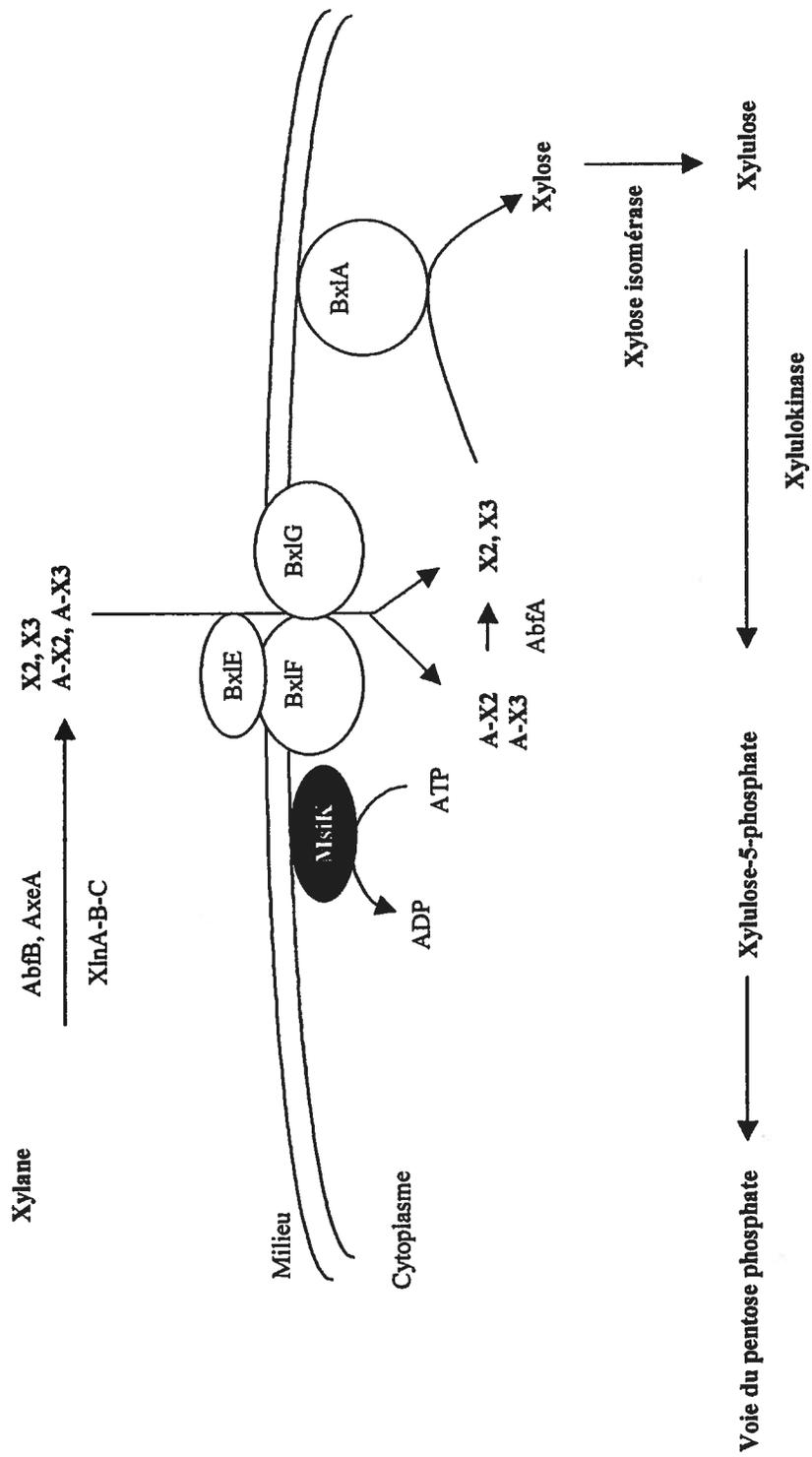


Figure 25. Nouveau modèle hypothétique de dégradation du xylane par les streptomycètes.

5. CONCLUSION

Le premier objectif de ce projet était de réaliser la dislocation génétique du gène *msiK* chez *S. coelicolor* M145 par une nouvelle méthode de dislocation génétique permettant ainsi l'obtention d'un mutant stable dont le phénotype est xylanase et cellulase négatif. L'efficacité de la méthode REDIRECT élaborée par Gust *et al.* (2003) a été démontrée et il est maintenant possible d'obtenir des mutants stables pour tous les gènes de *S. coelicolor*. À cet effet, deux autres mutants stables (*bxlR* (1H10) et *bxlR* (F85)) ont été obtenus jusqu'à présent dans le laboratoire à partir de la méthode décrite dans ce projet. D'ailleurs, l'étude du protéome du mutant *bxlR* est présentement en cours dans le laboratoire afin d'identifier le rôle de cette protéine et son implication dans le système xylanolytique. Il est possible de s'attendre à ce que la méthode REDIRECT soit employée non seulement pour les études protéomiques mais aussi pour toutes les autres études de génomique fonctionnelle.

Le phénotype du mutant *S.c.ΔmsiK1* a été analysé dans le cadre de ce projet. La souche ne dégrade par le xylane et la cellulose tel que prévu. De plus, la production d'agarase semble avoir été affectée par la mutation du gène *msiK*. Des études complémentaires pourraient sans doute identifier d'autres effets pléiotropiques de la mutation notamment l'étude de la croissance dans différents milieux de cultures solides ou liquides.

L'analyse protéomique du mutant *S.c.ΔmsiK1* s'est avérée très laborieuse. Sur huit protéines différemment exprimées une seule a pu être identifiée en spectrométrie de masse. La quantité de matériel nécessaire pour l'obtention d'un spectre de masse permettant l'identification de la protéine était considérable. Cette étape aurait pu être facilitée en utilisant des gels avec une échelle de pH plus étroite tout en espérant que les mêmes protéines se retrouvent dans ces gels. D'autre part, l'utilisation d'un appareil plus sensible permettrait également d'augmenter le nombre de protéines identifiées avec succès. Ainsi, au lieu de cumuler dix gels pour chacune des protéines, dix protéines différentes pourraient être identifiées avec un appareil plus sensible. De plus, l'utilisation de techniques automatisées à toutes les étapes de la protéomique est un autre exemple qui augmenterait le nombre de protéines identifiées.

L'analyse protéomique a néanmoins permis d'identifier la xylose isomérase comme étant une protéine affectée par la mutation du gène *msiK*. Cette protéine semble être réprimée chez le mutant du gène *msiK*. Cependant, sa présence dans le surnageant de culture reste encore à éclaircir.

L'analyse du protéome de *S. coelicolor* M145 ne fait que commencer. La connaissance de la totalité du génome facilite grandement l'identification des protéines mais il reste beaucoup de travail à effectuer. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet, faciliteront sans aucun doute les études subséquentes de protéomiques.

Bibliographie

Adam, G. C., E. J. Sorensen et B. F. Cravatt. 2002. «Chemical strategies for functional proteomics». Mol Cell Proteomics, vol. 1, no. 10, p. 781-790.

Ahn, N. G., et K. A. Resing. 2001. «Toward the phosphoproteome». Nat Biotechnol, vol. 19, no. 4, p. 317-318.

Anné, J., et L. Van Mellaert. 1993. «*Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production». FEMS Microbiol Lett, vol. 114, no. 2, p. 121-128.

Arcand, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli et F. Shareck. 1993. «Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme». Biochem J, vol. 290 (Pt 3), p. 857-863.

Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream *et al.* 2002. «Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)». Nature, vol. 417, no. 6885, p. 141-147.

Bhosale, S. H., M. B. Rao et V. V. Deshpande. 1996. «Molecular and industrial aspects of glucose isomerase». Microbiol Rev, vol. 60, no. 2, p. 280-300.

Biely, P., D. Mislovicova et R. Toman. 1985. «Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-beta-xylanases and endo-1,4-beta-glucanases». Anal Biochem, vol. 144, no. 1, p. 142-146.

Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau et Y. Shao. 1997. «The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12». Science, vol. 277, no. 5331, p. 1453-1474.

Chandrakant, P., et V. S. Bisaria. 1998. «Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol». Crit Rev Biotechnol, vol. 18, no. 4, p. 295-331.

Chang, G., et C. B. Roth. 2001. «Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters». Science, vol. 293, no. 5536, p. 1793-1800.

Charlionet, R., N. Machour-Merlet et A. Vanderplaëtsen. 1997. «Le point sur l'analyse protéomique», Société Française d'Électrophorèse et d'Analyse Protéomique (site internet).

Clarke, A. J. 1997. Biodegradation of Cellulose: Enzymology and Biotechnology. Technomic, Lancaster, États-Unis, p. 1 à 53.

Csiszar, E., A. Losonczy, G. Szakacs, I. Rusznak, L. Bezur et J. Reicher. 2001. «Enzymes and chelating agent in cotton pretreatment». J Biotechnol, vol. 89, no. 2-3, p. 271-279.

Datsenko, K. A., et B. L. Wanner. 2000. «One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 12, p. 6640-6645.

Flett, F., V. Mersinias et C. P. Smith. 1997. «High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes». FEMS Microbiol Lett, vol. 155, no. 2, p. 223-229.

Gharahdaghi, F., C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai et S. M. Mische. 1999. «Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a

method for the removal of silver ions to enhance sensitivity». Electrophoresis, vol. 20, no. 3, p. 601-605.

Gilbert, M., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel. 1995. «Production and secretion of proteins by streptomycetes». Crit Rev Biotechnol, vol. 15, no. 1, p. 13-39.

Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser et K. F. Chater. 2003. «PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100, no. 4, p. 1541-1546.

Hanahan, D. 1983. «Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids». J Mol Biol, vol. 166, no. 4, p. 557-580.

Hesketh, A. R., G. Chandra, A. D. Shaw, J. J. Rowland, D. B. Kell, M. J. Bibb et K. F. Chater. 2002. «Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*». Mol Microbiol, vol. 46, no. 4, p. 917-932.

Higgins, C. F., et K. J. Linton. 2001. «Structural biology. The xyz of ABC transporters». Science, vol. 293, no. 5536, p. 1782-1784.

Hobbs, G., Frazer, CM, Gardner, DCJ, Cullum, JA, Oliver, SG. 1989. «Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture.». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 31, no., p. 272-277.

Hodgson, D. A. 2000. «Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria». Adv Microb Physiol, vol. 42, no., p. 47-238.

Holland, I. B., et M. A. Blight. 1999. «ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans». J Mol Biol, vol. 293, no. 2, p. 381-399.

Hopwood, D. A. 1999. «Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico». Microbiology, vol. 145 (Pt 9), p. 2183-2202.

Hoving, S., B. Gerrits, H. Voshol, D. Muller, R. C. Roberts et J. van Oostrum. 2002. «Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients». Proteomics, vol. 2, no. 2, p. 127-134.

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 Microbiol, vol. 17, no. 2, p. 367-377.

Ivanova, V., M. Oriol, M. J. Montes, A. Garcia et J. Guinea. 2001. «Secondary metabolites from a *Streptomyces* strain isolated from Livingston Island, Antarctica». Z Naturforsch [C], vol. 56, no. 1-2, p. 1-5.

Jeffries, T. 1996. «Enzyme technology for pulp bleaching and deinking». USDA Forest Products Laboratory (http://calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/enztech/enztech_toc.html).

Jensen, O. N., M. R. Larsen et P. Roepstorff. 1998. «Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: strategies and applications». Proteins, vol. Suppl 2, no., p. 74-89.

Kaneko, T., S. Takahashi et K. Saito. 2000. «Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener (HFCS) production». Biosci Biotechnol Biochem, vol. 64, no. 5, p. 940-947.

Kieser, T., M. J. Bibb, M. Buttner, K. F. Chater et D. A. Hopwood. 2000. Practical Streptomyces Genetics. The John Innes Center, Norwich, England, 613 p.

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, vol. 267, no. 1, p. 45-50.

Larocque, D. 1998. «Analyse moléculaire du locus *bxl* de *Streptomyces lividans*.», INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 184 p.

Leduc, M. 1999. «Analyse moléculaire du complexe xylanolytique de *S. lividans* par dislocation génétique», Laval, INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 142 p.

Lee, T. D., et J. E. Shively. 1990. «Enzymatic and chemical digestion of proteins for mass spectrometry». Methods Enzymol, vol. 193, no., p. 361-374.

Lopez, M. F., K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson et W. F. Patton. 2000. «A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling». Electrophoresis, vol. 21, no. 17, p. 3673-3683.

Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, et R.J. Randall. 1951. «Protein measurement with the Folin phenol reagent». J. Biol. Chem., vol. 193, no., p. 265-275.

MacBeath, G., et S. L. Schreiber. 2000. «Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination». Science, vol. 289, no. 5485, p. 1760-1763.

MacNeil, D. J., K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons et T. MacNeil. 1992. «Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector». Gene, vol. 111, no. 1, p. 61-68.

Mandels, M., et E. T. Reese. 1957. «Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals.». J. Bacteriol., vol. 73, no., p. 269-278.

Matsushima, P., M. C. Broughton, J. R. Turner et R. H. Baltz. 1994. «Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production». Gene, vol. 146, no. 1, p. 39-45.

Mondou, F., F. Shareck, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1986. «Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*». Gene, vol. 49, no. 3, p. 323-329.

Nilsson, C. L., et P. Davidsson. 2000. «New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry». Mass Spectrom Rev, vol. 19, no. 6, p. 390-397.

Prade, R. A. 1996. «Xylanases: from biology to biotechnology». Biotechnol Genet Eng Rev, vol. 13, p. 101-131.

Premstaller, A., H. Oberacher, W. Walcher, A. M. Timperio, L. Zolla, J. P. Chervet, N. Cavusoglu, A. van Dorsselaer et C. G. Huber. 2001. «High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using monolithic capillary columns for proteomic studies». Anal Chem, vol. 73, no. 11, p. 2390-2396.

Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi et D. A. Hopwood. 1996. «A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome». Mol Microbiol, vol. 21, no. 1, p. 77-96.

Resing, K. A. 2002. «Analysis of signaling pathways using functional proteomics». Ann N Y Acad Sci, vol. 971, p. 608-614.

Servin-Gonzalez, L., M. R. Jensen, J. White et M. Bibb. 1994. «Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2)». Microbiology, vol. 140 (Pt 10), p. 2555-2565.

Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli et D. Kluepfel. 1991. «Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*». Gene, vol. 107, no. 1, p. 75-82.

A. S. F. M. 2001. «What is Mass Spectrometry». American Society for Mass Spectrometry (www.asms.org).

Tang, L., S. Shah, L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla et B. Julien. 2000. «Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster». Science, vol. 287, no. 5453, p. 640-642.

Theberge, 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, vol. 58, no. 3, p. 815-820.

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, vol. 86, no. 1, p. 119-122.

Wilson, K., et J. Walker. 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. 4 édition. New York: Cambridge University Press, 586 p.

Wittmann, S., F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli. 1994. «Purification and characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene». Appl Environ Microbiol, vol. 60, no. 5, p. 1701-1703.

Xu, L. H., Y. Q. Tiang, Y. F. Zhang, L. X. Zhao et C. L. Jiang. 1998. «*Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring». Int J Syst Bacteriol, vol. 48 Pt 4, p. 1089-1093.

Yee, D. C., et T. K. Wood. 1997. «2,4-Dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase». Biotechnol Prog, vol. 13, no. 1, p. 53-59.

Zaborina, O., B. Baskunov, L. Baryshnikova et L. Golovleva. 1997. «Degradation of pentachlorophenol in soil by *Streptomyces rochei* 303». J Environ Sci Health B, vol. 32, no. 1, p. 55-70.

Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein et M. Snyder. 2001. «Global analysis of protein activities using proteome chips». Science, vol. 293, no. 5537, p. 2101-2105.