

À mon père, Gilles et à ma mère, Henriette,

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier**

**EXPRESSION DE GÈNES DE *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS***

**Par
VALÉRIE OUELLET**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences en microbiologie appliquée**

Jury d'évaluation

**Président du jury
et examinateur interne : Darakhshan Ahmad**

Examineur externe : Marc Sirois

Directeur de recherche : Claude Dupont

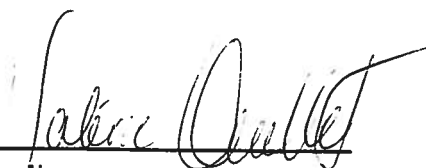
Co-directeur de recherche : François Shareck

novembre 2002

RÉSUMÉ

L'utilisation de *Streptomyces lividans*, pour l'expression de gènes hétérologues, est de plus en plus fréquente. Il représente un excellent hôte, puisqu'il s'agit d'un microorganisme bien connu, non pathogène pour l'homme et avec une capacité limitée à dégrader l'ADN hétérologue. Il est un candidat de choix pour la production de protéines fonctionnelles de *Mycobacterium tuberculosis*, en raison que le contenu génomique en guanine et en cytosine (G+C) des mycobactéries (~ 65 %) est similaire à celui de *S. lividans* (~ 74%). Cette étude a pour but de valider cette hypothèse, en plus de permettre la purification et la caractérisation des protéines sélectionnées et de fonction inconnue.

Les travaux portent, plus précisément, sur les gènes de la famille PE-PGRS (PE pour les motifs proline-acide glutamique trouvés près de l'extrémité N-terminale des protéines, PGRS pour "*Polymorphic Guanine cytosine Repetitive Sequences*"). Cette famille, unique à quelques mycobactéries pathogènes, comporte 61 gènes dispersés sur le chromosome codant pour des protéines de fonction inconnue. Plusieurs spéculations existent quant aux rôles de ces protéines; entre autres, elles auraient une implication dans la capacité de *M. tuberculosis* à se répliquer dans un macrophage et à y persister. Les facteurs de persistance sont de bonnes cibles thérapeutiques visant la mort de la bactérie, ce qui est de plus en plus difficile présentement, malgré les assauts du système immunitaire de l'hôte et les antibiotiques disponibles. Ainsi, l'étude des protéines encodées par les gènes de la famille PE-PGRS est une avenue intéressante et ce, non seulement pour le développement de nouvelles drogues, mais aussi pour l'amélioration des outils diagnostiques.


Étudiant


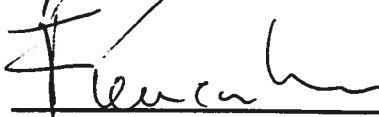

Directeur de recherche

Co-directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ	ii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
INTRODUCTION	1
I. REVUE DE LITTÉRATURE	4
1. Les Mycobactéries	5
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
3. Systèmes d'expression	8
4. Streptomycètes.....	9
4.1 <i>Streptomyces lividans</i>	10
4.1.1 Vecteurs utilisés.....	11
4.1.2 Promoteurs	11
5. Protéines d'intérêt	12
5.1 La famille PE	12
5.1.1 La sous-famille PGRS	14
6. Objectifs de travail.....	16
II. APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	17
1. Souches bactériennes	18
2. Vecteurs	19
3. Milieux de culture	31
4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	33
4.1 La source d'ADN.....	33
4.2 Les amorces nucléotidiques	36
4.3 Amplification	38
5. Analyse et manipulation de l'ADN.....	38
5.1 Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose	38
5.2 Extraction et purification d'ADN du gel d'agarose.....	39
5.3 Ligation.....	39
6. Transformation bactérienne	39
6.1 Transformation de protoplastes de la souche <i>S. lividans</i> 10-164.....	39

6.2	Transformation de la souche <i>E. coli</i> DH11S	40
6.2.1	Transformation avec de l'ADN plasmidique.....	40
6.2.2	Transformation avec de l'ADN phagique.....	41
7.	Extraction d'ADN	41
7.1	Extraction de plasmides de la souche <i>S. lividans</i> 10-164	41
7.2	Extraction de plasmides de la souche <i>E. coli</i> DH11S.....	42
7.3	Extraction d'ADN simple brin de phage M13 de la souche <i>E. coli</i> DH11S	43
8.	Analyse du niveau de transcription.....	44
8.1	Isolement d'ARN total.....	44
8.2	Buvarpage de l'ARN	45
8.3	Préparation de la sonde (Nick translation).....	45
8.4	Préparation de la colonne de Sephadex G-50	46
8.5	Préhybridation et hybridation	46
9.	Analyse des protéines	46
9.1	Dosage des protéines	46
9.2	Préparation des échantillons protéiques.....	47
9.3	Culture en fermenteur de 14 L.....	47
9.4	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	48
10.	Purification des protéines PE-PGRS par chromatographie d'affinité.....	50
11.	Identification de l'extrémité N-terminale des protéines d'intérêt.....	51
III.	RÉSULTATS.....	53
1.	Gènes d'intérêt auxquels sont ajoutés six codons histidine.....	54
1.1	Amplification des gènes d'intérêt à partir de l'ADN génomique de la souche BCG.....	54
1.2	Transformation de la souche <i>S. lividans</i> 10-164.....	59
1.3	Extraction de plasmides de la souche <i>S. lividans</i> 10-164	60
1.4	Transformation de la souche <i>E. coli</i> DH11S	65
1.5	Extraction de plasmides ou de phages de la souche <i>E. coli</i> DH11S ..	66
1.6	Analyse du niveau de transcription.....	72
2.	Analyse des protéines auxquelles sont ajoutés six résidus histidine	74
2.1	Immunobuvarpage de type Western.....	74
2.2	Purification des PE-PGRS par chromatographie d'affinité	78
2.3	Identification de l'extrémité N-terminale de la protéine	81
3.	Gènes de fusion.....	82
3.1	Amplification des gènes d'intérêt sous forme de fusion	82
3.2	Transformation de la souche <i>S. lividans</i> 10-164.....	85
3.3	Extraction de plasmides de la souche <i>S. lividans</i> 10-164	86
3.4	Analyse du niveau de transcription.....	92

4. Analyse des protéines de fusion.....	93
4.1 Immunobuvardage de type Western	93
IV. DISCUSSION.....	95
1. Réaction de polymérisation en chaîne	96
1.1 Amplification des gènes d'intérêt à partir de l'ADN génomique.....	96
1.2 Amplification des gènes d'intérêt à partir de l'ADN cosmique	98
1.3 Amplification des gènes de fusion.....	99
2. Transformation bactérienne.....	100
2.1 Transformation de la souche <i>S. lividans</i> 10-164 avec de l'ADN plasmidique recombinant.....	100
2.2 Transformation de la souche <i>E. coli</i> DH11S avec de l'ADN plasmidique ou phagique recombinant	101
3. Extraction d'ADN recombinant à partir des transformants	102
3.1 Extraction de plasmides recombinants de la souche <i>S. lividans</i> 10-164	102
3.2 Extraction de plasmides ou de phages recombinants de la souche <i>E. coli</i> DH11S	103
4. Analyse du niveau de transcription.....	104
5. Analyse des protéines	104
5.1 Immunobuvardage de type Western	104
5.2 Purification des PE-PGRS par chromatographie d'affinité.....	105
V. CONCLUSION.....	107
REMERCIEMENTS.....	111
BIBLIOGRAPHIE.....	113
ANNEXES.....	118

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I : Description des souches bactériennes utilisées	18
Tableau II : Description des vecteurs utilisés et construits.....	19
Tableau III : Séquences des amorces nucléotidiques	36
Tableau IV : Particularités des contrôles	40
Tableau V : Programme d'élution	51
Tableau VI : Résultats de la transformation de protoplastes de <i>S. lividans</i> 10-164	59
Tableau VII : Résultats de la transformation de protoplastes de <i>S. lividans</i> 10-164 avec les produits de fusion	85

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Homologie de séquence entre les 61 protéines PE-PGRS	13
Figure 2 : Homologie de séquence entre le gène <i>Rv0746</i> de la souche H37Rv et celui de la souche <i>BCG</i>	15
Figure 3 : Carte physique du plasmide C209 utilisé pour le clonage de gènes chez <i>S. lividans</i>	22
Figure 4 : Carte physique du plasmide pIAF550MCSL utilisé pour le clonage de gènes chez <i>S. lividans</i>	23
Figure 5 : Carte physique du plasmide pIAFC109MCS utilisé pour le clonage de gènes chez <i>S. lividans</i>	24
Figure 6 : Carte physique de la forme répliquative du phage M13mp18 utilisé pour le clonage de gènes chez <i>E. coli</i>	25
Figure 7 : Carte physique de la forme répliquative du phage M13mp19 utilisé pour le clonage de gènes chez <i>E. coli</i>	26
Figure 8 : Carte physique du plasmide pTZ19R utilisé pour le clonage de gènes chez <i>E. coli</i>	27
Figure 9 : Carte physique du cosmide MTCY06H11 utilisé pour l'amplification du gène <i>Rv1651c</i> (PE-PGRS)	28
Figure 10 : Carte physique du cosmide MTCY409 utilisé pour l'amplification du gène <i>Rv3812</i> (PE-PGRS)	29
Figure 11 : Carte physique du cosmide MTCY28 utilisé pour l'amplification du gène <i>Rv1759c</i> (PE-PGRS, wag22)	30
Figure 12 : a) Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des gènes <i>Rv1651c-5'His</i> et <i>Rv3812-5'His</i> amplifiés; b) Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des fragments d'ADN purifiés	56
Figure 13 : a) Schéma d'amplification des gènes <i>Rv1759c-5'His</i> et 3'His en deux fragments ; b) Schéma d'amplification du gène <i>Rv1651c-3'His</i> en deux fragments	57
Figure 14 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des portions 5' et 3' du gène <i>Rv1759c-5'His</i> amplifiées	57

Figure 15 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des portions 3' et 5' du gène <i>Rv1651c-3'His</i> amplifiées.....	58
Figure 16 : Carte physique du plasmide pIAF3812-5His.....	61
Figure 17 : Carte physique du plasmide pIAF1651c-5His.....	62
Figure 18 : Carte physique du plasmide pIAF1759c-5His.....	63
Figure 19 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF3812-5His.....	64
Figure 20 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF1759c-3His.....	64
Figure 21 : Carte physique du vecteur mp183812-5His.....	67
Figure 22 : Carte physique du vecteur mp193812-5His.....	68
Figure 23 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors du S1 mapping pour le gène <i>Rv3812-5'His</i>	69
Figure 24 : Carte physique du plasmide pTZ1759-3His.....	70
Figure 25 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide recombinant pTZ1759c-3His.....	71
Figure 26 : Détection des transcrits des gènes <i>Rv3812-5'His</i> et <i>3'His</i> à l'aide de la sonde <i>Rv3812</i> marquée au ³² P.....	72
Figure 27 : a) Détection des transcrits du gène <i>Rv1759c-3'His</i> à l'aide de la sonde <i>Rv1759c</i> marquée au ³² P ; b) Détection des transcrits du gène codant pour la résistance au thiostrepton à l'aide de la sonde <i>tsr'</i> marquée au ³² P.....	73
Figure 28 : Détection de la protéine <i>Rv3812-5'His</i> à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine.....	75
Figure 29 : Détection de la protéine <i>Rv3812-3'His</i> à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine.....	76
Figure 30 : Détection de la protéine <i>Rv1759c-3'His</i> à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine.....	77
Figure 31 : Chromatogramme représentant la purification à partir du surnageant de la culture obtenu après 48 heures de croissance de la souche <i>S. lividans</i> 10-164/pIAF3812-3His, en M14-glucose 1 %.....	79

Figure 32 : Photo d'un gel SDS-PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie des fractions récoltées lors de la purification de la protéine Rv3812-3'His.....	80
Figure 33 : a) Photo d'un gel d'agarose 0,7 % pour les gènes <i>Rv3812-5'CelA</i> et <i>AbfB</i> amplifiés; b) Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des portions 5' et 3' du gène <i>Rv1759c</i> amplifiées.....	84
Figure 34 : Carte physique du plasmide pIAF3812-CelA	87
Figure 35 : Carte physique du plasmide pIAF3812-AbfB.....	88
Figure 36 : Carte physique du plasmide pIAF1759c	89
Figure 37 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF3812-CelA.....	90
Figure 38 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF3812-AbfB	91
Figure 39 : Détection des transcrits des gènes <i>Rv3812-5'CelA</i> et <i>AbfB</i> à l'aide de la sonde <i>Rv3812</i> marquée au ³² P.....	92
Figure 40 : Détection de la protéine <i>Rv3812-5'CelA</i> à l'aide des anticorps dirigés contre la cellulase A.....	93
Figure 41 : Détection de la protéine <i>Rv3812-5'AbfB</i> à l'aide des anticorps dirigés contre l'arabinofuranosidase B	94
Figure 42 : Homologie de séquences pour les 98 premiers acides aminés des PE-PGRS <i>Rv1759c</i> , <i>Rv1651c</i> et <i>Rv3812</i>	99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AbfB	α -L-arabinofuranosidase B de <i>Streptomyces lividans</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
amp	ampicilline
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BCIP	phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl
BSA	albumine de sérum bovin
°C	degré Celsius
C	cytosine
CBD	domaine de fixation à la cellulose
CelA	cellulase A de <i>Streptomyces lividans</i>
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
Da	Dalton
DMSO	diméthyle sulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
FPLC	chromatographie liquide à performance rapide
G	guanine
g	unité gravitationnelle
h	heure
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IgG	immunoglobuline de type G
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside
kDa	kiloDalton
kpb	kilo paire de bases
kV	kilovolt

Mes	acide 4-morpholinoéthanesulfonique
min	minute
N	normale
NBT	nitro bleu tétrazolium
nm	nanomètre
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
pb	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
p/p	poids/poids
PS	peptide signal
p/v	poids/volume
PVDF	difluorure de polyvinylidène
rpm	révolution par minute
s	seconde
SDS	sodium dodécyle sulfate
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS	Tris-Saline
TE	Tris-EDTA
Tris	tris(hydroxyméthyle)aminométhane
TSB	bouillon de tryptone de soya
<i>tsr</i>	gène de résistance au thiostrepton
μF	microfaraday
v/v	volume/volume
XBD	domaine de fixation au xylane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
Ω	ohm

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis est un important pathogène humain. Des évidences d'infection par ce microorganisme sont retrouvées aussi loin que 4000 ans avant Jésus-Christ dans les tombes des momies égyptiennes. Aujourd'hui encore, des millions de vie à travers le monde sont menacés par *M. tuberculosis* (Michele et al, 1999). Cette bactérie, un bacille Gram positif, infecte près du tiers de la population mondiale. L'infection initiale à *M. tuberculosis* passe généralement inaperçue, car la plupart des bacilles viables se retrouvent sous le contrôle du système immunitaire de l'hôte et sont éliminés. D'un autre côté, les bacilles qui restent peuvent devenir inactifs pour quelques années, voire des décennies (Yuan et al, 1996). Lorsque réactivé, *M. tuberculosis* est responsable de la tuberculose, une maladie infectieuse pouvant causer des dommages irréversibles. La tuberculose peut toucher différents endroits du corps, tels les reins, la rate, les os, le cerveau, mais les poumons sont les organes de prédilection. En fait, c'est à leur niveau que se déroulent les premières étapes de l'infection.

Il est possible de déterminer si une personne a été exposée au bacille tuberculeux à l'aide d'un test cutané. Le problème est qu'il existe différentes conditions entraînant la possibilité de faux résultats. Des cas de sensibilité non-spécifique (non imputable à l'infection tuberculeuse) ont été observés, alors que des faux résultats négatifs peuvent être obtenus si les patients sont immunodéprimés ou ont été récemment infectés. Quant à la prévention, il existe présentement un moyen de prévenir la tuberculose : l'administration du vaccin BCG (Bacille Calmette-Guérin), obtenu par atténuation d'une souche de *Mycobacterium bovis*. Malheureusement, il s'agit d'un vaccin dont l'efficacité est imprévisible et variable (0 à 80 % d'efficacité, Sharma et al. 1999). De plus, il y a près de 50 ans, des antibiotiques efficaces contre *M. tuberculosis* ont été développés. Toutefois, plusieurs souches démontrent maintenant des résistances. Il est donc devenu important de mieux comprendre les facteurs de virulence, l'habileté d'adaptation, la capacité d'entrer dans un état de dormance et les moyens de résistance attribués à *M. tuberculosis*, des études qui sont facilitées depuis que la séquence complète du génome a été déterminée (Cole et al., 1998). Le but est maintenant d'améliorer les vaccins, les antibiotiques et les réactifs diagnostiques déjà disponibles.

Des contraintes existent toutefois, entre autres, la pathogénicité et la croissance lente du microorganisme. Ceci rend difficile, d'une part, les manipulations expérimentales, car il est possible que les personnes en contact avec le microorganisme soient infectées et qu'il y ait transmission rapide de la maladie aux collègues, à la familles, aux amies, ect.. D'autre part, le

métabolisme lent de *M. tuberculosis* est un autre point à considérer. Ce fait, à lui seul, peut retarder considérablement l'avancement des travaux. L'étude de gènes nécessite la production de protéines par culture de la bactérie. Une étape longue qui requiert non pas 24 à 48 heures, mais plutôt 3 à 4 semaines d'incubation (Hatfull, 1996).

Une solution est présentée ici, soit l'utilisation d'un système d'expression hétérologue. *S. lividans* 10-164 a déjà servi d'hôte pour la production de deux protéines de *M. tuberculosis*. D'abord, la protéine KasA (β -ketoacyl acyl carrier synthase) qui est la cible thérapeutique de l'isoniazide et ensuite, la protéine Hsp16.3 (heat shock protein de poids moléculaire de 16,3 kDa) qui est une protéine produite en réponse à un stress. Toutes deux ont été produites sous forme de protéine de fusion par l'ajout de six résidus histidine à leur extrémité N-terminale. Le protocole de purification a pu être mis au point, des rendements appréciables et des niveaux de pureté intéressants ont alors été obtenus. Maintenant, il s'agit d'appliquer le protocole développé à d'autres protéines de fonction inconnue pouvant avoir une importance dans la lutte contre la tuberculose.

I- REVUE DE LITTÉRATURE

1. Les Mycobactéries

Du point de vue taxonomique, les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, l'unique genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Ce sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, immobiles, non sporulés et aérobies facultatifs. Il s'agit de bactéries Gram positif pouvant également être qualifiées d'acido-alcool résistantes (Wayne et Kubica, 1984), une caractéristique mise à profit lors de la coloration de Ziehl-Neelsen. Le fait qu'elles retiennent les colorants, malgré l'action combinée d'acides dilués et d'alcool, est dû à la richesse de leur paroi en lipides. La membrane cellulaire mycobactérienne pourrait jouer un rôle décisif dans l'adaptation des Mycobactéries à la croissance et à la survie intracellulaires, ainsi que dans la modulation immunitaire et la résistance aux médicaments. Pour ce qui est du génome, à l'exception de *Mycobacterium leprae* (56 %), toutes les Mycobactéries ont un contenu génomique en guanine et en cytosine (G + C) variant de 61 à 71 % (www.pasteur.fr/externe).

2. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis, couramment appelé le bacille de Koch, est un pathogène intracellulaire obligatoire dont la cellule hôte est le macrophage. Il s'agit d'une bactérie dont la croissance est lente, alors les colonies apparaissent après 3 à 4 semaines d'incubation à 36°C en aérobiose (Hatfull, 1996).

La séquence complète du génome de la souche H37Rv a été déterminée en 1998 par des équipes française et britannique dirigées par le Dr Stewart Cole (Institut Pasteur à Paris) et le Dr Bart Barrell (Centre Sanger, Wellcome Trust au Royaume Uni) (Cole *et al.*, 1998). L'information génétique est contenue dans un ADN circulaire de 4 411 529 pb et 40 % des 3924 gènes codent pour des protéines encore de fonction inconnue. L'analyse de la séquence a mis en évidence certaines particularités, entre autres que le génome de *M. tuberculosis* est riche en guanine et en cytosine (65 %) et une importante partie de ses capacités codantes (~250 gènes) est destinée à la production d'enzymes nécessaires à la

synthèse, ainsi qu'à la dégradation de toutes sortes de lipides. De plus, on dénote un haut niveau de conservation des gènes entre *M. tuberculosis* et *M. bovis*. En fait, les mutations dans le génome sont presque toujours associées à la résistance aux drogues (Piatek *et al.*, 2000). Enfin, plusieurs gènes seraient impliqués dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*, mais peu d'informations sont disponibles présentement sur les bases moléculaires de la virulence mycobactérienne (Cole *et al.*, 1998).

M. tuberculosis est le principal agent de la tuberculose. Lorsque qu'une personne inhale des bacilles tuberculeux, ceux-ci vont se loger au niveau du poumon où ils sont phagocytés par les macrophages. Le système immunitaire réussit habituellement à contrôler l'infection et ce, en éliminant la plupart des bacilles de Koch. Toutefois, certains persistent et entrent dans un état de dormance jusqu'au moment où le système immunitaire se retrouve affaibli. Environ 10 % des personnes infectées développent la maladie à un moment de leur vie et ce risque est plus élevé pour les immunodéprimés. Bien que la majorité des cas de tuberculose touche les poumons, la maladie peut également s'attaquer à presque n'importe quelle partie du corps, comme les os, les reins, la rate et le cerveau (http://www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/corecurr/chapter_2.htm).

La tuberculose est une maladie infectieuse qui est encore aujourd'hui l'une des plus importantes dans le monde. Annuellement, 8 millions de nouveaux cas actifs de tuberculose et 2,9 millions de décès sont déclarés. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, www.who.int) estime que près d'un milliard de personnes seront infectés, 200 millions seront malades et 70 millions mourront de la tuberculose d'ici l'année 2020.

La vaccination par le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) a débuté il y a plus de 80 ans et est aujourd'hui utilisée dans presque tous les pays. Le BCG, qui est obtenu par atténuation d'une souche de *Mycobacterium bovis*, est considéré comme l'un des vaccins les plus sûrs, mais son efficacité est imprévisible et variable (0 à 80% d'efficacité) (Sharma *et al.*, 1999). C'est pourquoi la recherche de nouveaux vaccins contre la tuberculose est active. Signalons notamment la récente création d'un réseau de recherche,

coordonné par le Dr Brigitte Gicquel (Institut Pasteur, www.pasteur.fr), ayant pour but d'accélérer la mise au point de futurs vaccins anti-tuberculeux.

La mise en évidence d'une allergie tuberculique par un test cutané est connue et appliquée depuis longtemps. Ceci permet de détecter les sujets sensibilisés, malades ou non, lors de l'injection d'une petite quantité de réactif sous la surface de la peau de l'avant-bras. Trois jours plus tard, le professionnel de la santé vérifie si une rougeur entre 6-10 mm de diamètre est apparue. Si tel est le cas, la personne est présumée comme étant infectée ou ayant déjà été infectée. Le problème est l'existence de réactions allergiques non spécifiques et les faux résultats négatifs possibles chez les immunodéprimés et les personnes nouvellement infectées (Monaghan, 1994). Une analyse plus poussée des symptômes, ainsi que des examens en laboratoire sont indispensables pour compléter le diagnostique.

Il existe des antibiotiques permettant de prévenir la maladie et/ou de la traiter. Les principaux antituberculeux sont : l'isoniazide qui est aussi utilisé comme prophylaxie, la rifampicine, la streptomycine, l'éthambutol et la pyrazinamide (Heym, 1996). Le traitement est long, de 6 à 9 mois, car la bactérie meurt très lentement. De plus, pour éviter la sélection de mutants résistants, une association de 2 ou 3 antibiotiques s'impose. *M. tuberculosis* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques, en grande partie dû à son enveloppe cellulaire qui agit comme une barrière, mais aussi à la présence de nombreux gènes codant pour des déterminants potentiels de résistance (β -lactamases, acétyltransférases, pompes à efflux, etc.) (Cole *et al.*, 1998). La connaissance de ces déterminants devrait permettre d'améliorer l'utilisation des médicaments disponibles et de faciliter la conception de nouveaux traitements.

La tuberculose continue ses ravages, l'incidence de la maladie augmente non seulement dans les pays en voie de développement, mais aussi dans les pays industrialisés (OMS, www.who.int). Les études de *Mycobacterium tuberculosis* visent principalement l'amélioration du diagnostique clinique, l'élaboration d'un vaccin permettant une protection efficace et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreux

défis sont toutefois présents lors de ces études, entre autres la pathogénicité et la croissance lente du microorganisme. Une solution peut être envisagée, soit l'utilisation d'un système d'expression où l'hôte est non pathogène et peut produire rapidement, en quantité appréciable, des protéines de *M. tuberculosis*.

3. Systèmes d'expression

Un système d'expression est constitué d'une cellule hôte, ainsi que d'un vecteur. Ce dernier est une molécule d'ADN dans lequel on introduit un gène d'intérêt. L'ensemble, ADN vecteur et ADN d'intérêt, donne ce qu'on désigne de l'ADN recombinant qui sera éventuellement inséré et exprimé dans un hôte approprié (Campbell et Mathieu, 1995). Une vaste gamme de cellules hôte peut être utilisée, chacune d'elles présentant des avantages et des inconvénients. Les plus utilisées actuellement sont la bactérie *Escherichia coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que quelques espèces de *Bacillus*.

Les connaissances avancées concernant la physiologie et la génétique d'*E. coli* ont compté pour son utilisation comme hôte. En fait, c'est le système d'expression procaryote le plus fréquemment utilisé. C'est même une bactérie qui peut servir d'hôte pour la production de nombreuses protéines humaines (Shin *et al.*, 1998). Elle est facile à utiliser, se prête très bien à la culture en fermenteur et les taux d'expression obtenus sont élevés (jusqu'à plusieurs grammes de protéine par litre de culture).

Toutefois, l'utilisation d'*E. coli* a ses limites. En fait, comme c'est une bactérie qui sécrète très peu de protéines et qu'un haut niveau de production dans le cytoplasme a souvent pour conséquence la formation de corps d'inclusion, la protéine d'intérêt se retrouve souvent sous forme insoluble et inactive. La renaturation de celle-ci dans sa conformation active s'avère généralement difficile et impensable lors d'une production massive. De plus, sa purification s'avère souvent ardue, puisque la majeure partie des protéines de l'hôte se trouve dans le même compartiment cellulaire (Weicker *et al.*,

1996). Enfin, *E. coli* étant une entérobactérie, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'endotoxines dans les protéines purifiées.

Saccharomyces cerevisiae, plus communément appelée la levure de boulanger, se caractérise comme un eucaryote simple, à croissance rapide, qui requiert des milieux de culture peu coûteux. Il s'agit d'une levure pouvant être transformée facilement par une grande variété de plasmide et elle peut exécuter des modifications post-traductionnelles. De plus, étant donné que c'est un microorganisme unicellulaire, plusieurs techniques communément utilisées avec les bactéries peuvent être appliquées.

Malgré les avantages que comporte l'utilisation d'une levure comme système d'expression, des problèmes peuvent se présenter. Un de ceux-ci a été soulevé par Erm (1990) : la lyse de la cellule entraîne la libération des endo et des exoprotéinases présentes dans la vacuole de la levure, ce qui contribue à une possible dégradation. Il existe une solution à ce problème, soit de favoriser la sécrétion de la protéine d'intérêt dans le milieu de culture, n'obligeant plus ainsi la lyse. Toutefois, les mécanismes de sécrétion de la levure fonctionnent bien pour des petits polypeptides, mais beaucoup moins bien pour de grandes protéines.

4. Streptomycètes

Les streptomycètes sont aujourd'hui mieux connus et de plus en plus employés pour la production de protéines recombinantes. Leur habileté à sécréter des protéines et à reconnaître de nombreux promoteurs hétérologues font d'eux des excellents hôtes (Gusek et Kinsella, 1992). Les streptomycètes sont des bactéries Gram positif de l'ordre des *Actinomycetales*. Ils sont retrouvés dans la nature et ils ne sont pas pathogènes pour l'homme (GRAS : Generally Recognized As Safe, Claude Dupont PhD, communication personnelle). Commercialement importants au niveau de la production de différents métabolites, tels les antibiotiques, les streptomycètes synthétisent également de multiples enzymes essentielles à la dégradation de la biomasse (Gilbert *et al.*, 1995). Leur

information génétique est contenue dans un ADN linéaire d'environ 8 Mb (1,5 fois le génome d'*E. coli*) (Lin *et al.*, 1993). Comme leur génome est riche en guanine et en cytosine, les codons de ces bactéries montrent une forte tendance pour ces deux nucléotides en troisième position. De plus, cette tendance est reflétée au niveau des ARN de transfert. Il faut également savoir que certains codons, comme le codon TTA (Leucine), sont rarement retrouvés dans les gènes des streptomycètes (Kieser, 2000).

Streptomyces coelicolor A3 est de loin le microorganisme le plus étudié génétiquement chez les streptomycètes. Selon Kieser et Hopwood (1991), il représente un bon choix pour l'expression de gènes homologues. Cependant, cet organisme démontre une grande capacité à dégrader l'ADN hétérologue. En fait, de nombreuses souches de streptomycètes possèdent un système de restriction/modification très efficace contre l'ADN étranger. Ce qui ne semble pas le cas de *Streptomyces lividans* 66 qui est la souche la plus utilisée chez les streptomycètes pour l'introduction de gènes hétérologues.

4.1 *Streptomyces lividans*

Plusieurs protéines ont été produites avec succès chez *S. lividans*. Parmi celles-ci, on compte des protéines homologues (xylanase, mannanase et cellulase), mais aussi des protéines hétérologues provenant de bactéries Gram positif ou négatif, de même que des protéines d'origine eucaryote (Gilbert *et al.*, 1995). La production de protéines de mycobactéries est relatée dans la littérature. Entre autres, Tremblay *et al.* (2002) ont produit deux antigènes majeurs de *M. tuberculosis* chez *S. lividans* sous forme de protéines sécrétées. Les rendements après purification ont été appréciables, soient de 80 mg/L pour la protéine de 38 kDa (Rv0934) et de 200 mg/L pour la protéine de 19 kDa (Rv3763). Par contre, le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine de 38 kDa a montré la présence d'une délétion de 7 à 8 acides aminés, tandis que la protéine de 19 kDa a subi une délétion de 22 à 23 acides aminés comparativement à son entité naturelle. Ceci indique la présence de protéases extracellulaires pouvant s'attaquer aux protéines hétérologues. La protéine Kas A (β -ketoacyl acyl carrier synthase), la cible thérapeutique de l'isoniazide (Mdluli *et al.*, 1998), a également été produite chez *S. lividans* et 7,6 mg/g de protéine totale intracellulaire ont été obtenus (Dupont C. et Shareck F., non publié). Il

a aussi été possible d'obtenir 6,7 mg/g de la protéine Hsp16,3, une protéine qui est produite suite à un stress et qui empêche l'aggrégation des protéines (Chang *et al.*, 1996; Michele *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1996).

4.1.1 Vecteurs utilisés

Quels que soient les vecteurs utilisés, tous dépendent des mécanismes moléculaires qui commandent la transcription et la traduction dans l'hôte. Plusieurs types de vecteurs peuvent être employés pour le clonage de gènes chez *S. lividans*, mais les plus régulièrement utilisés sont les plasmides sauvages. Comme Hopwood *et al* (1987) l'ont mentionné, l'ADN plasmidique est retrouvé naturellement dans environ 30% des souches. Il peut être très long (> 100 kb) comme SCP1 ou petit (< 10 kb) comme pIJ101. Les vecteurs construits à partir de ces plasmides contiennent presque tous le gène de résistance au thiostrepton de *Streptomyces azureus* (Thompson *et al*, 1980). Il est ainsi facile de sélectionner les transformants, car *S. lividans* est à l'origine sensible au thiostrepton. Il faut mentionner que ces vecteurs peuvent servir à l'expression tant de gènes eucaryotes que de gènes procaryotes. Par contre, peu de plasmides provenant de bactéries Gram négatif, ainsi que de bactéries Gram positif faibles en guanine et en cytosine se répliquent chez les *Streptomyces* (Kieser et Hopwood, 1991).

4.1.2 Promoteur

Le contrôle de la transcription de gènes d'actinomycète chez *S. lividans* peut se faire avec le promoteur d'origine. Par contre, s'il s'agit d'une protéine hétérologue, la fusion du gène d'intérêt à un promoteur de streptomycète peut améliorer le niveau d'expression. Malheureusement, malgré cette fusion, il est possible que la protéine voulue ne soit synthétisée qu'en petite quantité. Ceci peut s'expliquer par une faible stabilité de l'ARN_m ou par la possibilité que le promoteur soit sujet à la répression. Notons que les promoteurs chez les streptomycètes sont souvent induits par un substrat spécifique et fortement réprimés par le glucose (Gilbert *et al.*, 1995). Le promoteur C109 est communément utilisé pour contrôler la transcription de gènes d'intérêt chez *S. lividans*. Il s'agit d'un promoteur constitutif obtenu par mutation du promoteur de la

xylanase C (Xyl C) de *S. lividans*, mutation qui conduit à l'obtention d'un promoteur moins sensible à la répression catabolique exercée par le glucose.

5. Protéines d'intérêt

5.1 La famille PE

Un résultat du séquençage du génome de *M. tuberculosis* a été la découverte d'une nouvelle famille de protéines : la famille PE (PE pour les motifs proline et acide glutamique trouvés près de l'extrémité N-terminale). Celle-ci est composée de 99 membres, 38 PE et 61 PGRS (PGRS pour polymorphic guanine/cytosine repetitive sequences). Pour chacun d'eux, il y a une forte homologie pour les 98 premiers acides aminés (figure 1). Ensuite, dans le cas des PE, il peut y avoir une séquence unique de 0 à 500 a.a. Pour ce qui est des PGRS, on dénote une région C-terminale caractérisée par des répétitions GGAGGA contre laquelle des anticorps spécifiques peuvent être dirigés. Fait intéressant, la famille PE est unique à quelques mycobactéries pathogènes et représente plus de 5 % de l'ADN codant de *M. tuberculosis* (Ramakrishnan, 2000).

```

101                                     160
Rv0109  SLLITSPATVAAAATHLAGIGSALSTANAAAAAPTALSVAGADEVSVLIAALFEAYAQE
Rv0124  SFVSVAPEIVVAAATDLAGIGSAISAANAAAAAPTAVLAAGADEVSAIAALFSGHAQA
Rv0278c SFVIAAPEVIAAAATDLASLGSSISAANAAAAANTTALMAAGADEVSTAIALFGAHGQA
Rv0297  SFVIAQPEMIAAAAGELASIRSAINAANAAAAAQTTGVMSAAADEVSTAVAALFSSHAQA
Rv0578c SFVIATPEMLTTAATDLAKIGSTITAAAN-TAAAAVAKVLPASADEVSVVAALFGTHAQE
Rv0742  SFVIAAPEAIAAAATDLASIGSTIGAANAAAAANTTAVLAAGADQVSVIAIAAFGAHQQA
Rv0746  SFVFLAMPEVLGSAATDLAALGSLVGAADAAAAATTTGIVAAAQDEVSAIAALFSAHGRA
Rv0747  SWVMVSPELVVAAAADLAGIGSAISSANAAAAVNTTGLLTAGADEVSTAIALFGAQGQA
Rv0754  SFVIVARDALAAAAADLAQIGSAVNAGNLAANPTTAVAAAAADEVSAALAALFGAHARE
Rv0832  SYVSVLPATLATAATEVARIGSALSASAVAAAQTSAVQAAADEVSAIAALFSAHGRD
Rv0833  -----
Rv0834c SFVIAAPDLVAMATEDLAGIGASLTAANAAAAVPTSGLLAAAGDEVSAIAALFSSHGQQ
Rv0872c SYVLATPEMVAANNNLAQIGSTLSAANAAALAPTGGVLAAGADEVSAAVASLFGSHAQA
Rv0977  SFVVTAPPVLASAAADLGGIASMISEANAMAAVTTALAPAAADEVSAIAALFSSYARD
Rv0978c SFVNVAPQLVSTAAADAARIGSAINTAN-TAAAAATQVLAQAQDEVSTAIALFGSHGQH
Rv0980c SFVNVAPQLVSTAAADAARIGSAINTAN-TAAAAATQVLAQAQDEVSTAIALFGSHGQH
Rv1067c SFVLVSPQLMAAADVAGIGSAISAANAAALAPTSLVLAAGADEVSAVAALFSAHAGQ
Rv1068c SYMIAVPDMLSSAAGDLASIGSSINASTRAAAAAATTRLPAAADEVSAHIAALFSGHGEG
Rv1087  SFVVVVAPEVLAAAADLAGIGSTLAQANAAALAPTAVLAAGADEVSAIASLFGAHGQA
Rv1091  SFVIAAPEALVAVASDLAGIGSALAEANAAALAPTALLAAGADEVSAIAALFGAHGQA
Rv1243c EYLIAAQDVLVAAAADLEGIGSALAAANRAAEAPTGLLAAGADEVSAIASLFGSNAQA
Rv1325c SFVIAAPETLVRAASDLANIGSTLGAANAAALGPTTELLAAGADEVSAIASLFAAHGQA
Rv1396c SFLFAQPEMLGAAATDLASIGSAISTANAAAAAATTRVLAAGADEVSAVAALFSGHAQT
Rv1441c SNVMVVPGMLSAAAADVASIGAALSAANGAAAPTTAGVLAAGADEVSAIASLFGSYARD
Rv1450c SLVIVAPETVAAAALDVARIGSSIGAANAAAAGSTTSVLAAGADEVSAIATLFGSHARE
Rv1452c SLVIVTPEVAAAADVARIGSSIGVANSAAAAGSTTSVLAAGADEVSAIATLFGSHARE
Rv1468c SFVVANTEFVSGAAGNLARLGSMSAANAAAAAQTAVAAAAGADEVSAVAALFGAHGQT
*Rv1651c SFLLEPDLVTAAAANLAGIRLSALSEAAAAAATPTTALASAGADEVSAAVSRLFGAYGQQ
*Rv1759c SFVIAVPEITIAAAATDLADLGTIAGANAAAAANTTSLAAGADEISAIAALFGAHGRA
Rv1768  SYLVVPELVAAAATDLANIGSSISAANAAAAAPTALVAAGGDEVSAIAALFGAHARA
Rv1803c SQMIVAPAFVDAKDLATIGSAISRANAEALVPI TALLPAGADDVSAIAALFATHGQA
Rv1818c SFVVTIPEALAAVATDLAGIGSTIGTANAAAAVPTTVLAAAADDEVSAAMAALFSGHAQA
Rv1840c SFVVAPEVVVAAAADLAGIGSAIGAANAAAAVPTMGVLAAGADEVSAVAALFSGHAQA
Rv1983  SFLVVVPEFLTSAADVENIGSTLRAANAAAAASTTALAAGADEVSAVAALFARFGQE
Rv2098c -----GQS
Rv2099c SFVIASPEALLAAATDLAIRSTIRAANAAAAVPTTGALAPAADEVSAIAALFGAQ---
Rv2126c -----
Rv2162c SFVIAAPEVMAAAATDLANIGSSISAASAAAAGPTMGILAAAGADEVSVIASALFGSHAQ
Rv2396  SFLIASPEALAAATATYLTGIGSAISAANAVAAAPTTEILAAAGTDEVSTIASALFGAHAQA
Rv2487c SLVIATPQLLATAALDLASIGSQVSAANAAAAAMPTTEVVAAAADDEVSAIAGLFGAHARQ
Rv2490c SYVIATPEMMATAAFDLARIGSQVSAASAVAAMPTTEVVAAAGADEVSAIAALFSAHAQE
Rv2591  SFVTAAPEMLATAAQNVANIGSTLSAANATAAATTSVLAAGADEVSAIARLFSYATH
Rv2634c SFVIAVPEALTMASDLANIGSTINAANAAAAALPTTGVAAAADEVSAVAALFGSYAQ
Rv2741  SFVIAAPEFLTAAAMDLAGIGSTVSAASAAAAPTVAIILAAGADEVSAVAALFGMHGQA
Rv2853  LYVVASPDLMTAAATNLAEIGSAISTANGAAALPTVEVVAAAADDEVSTQIAALFGAHARS
Rv3344c -----
Rv3345c MSLMVAPELVAAAADLTGIGQAI SAANAAAAAGPTTQVLAAGADEVSAIAALFGTHAQE
Rv3367  SFVVAVPEALAAAADLVANIGSALSANAAAAAGTTGLLAAGADEVSAALASLFGSHAVS
Rv3388  SFVIANPEMLAAAATDLAGIRSAISAATAAAAAAPTQVAAAAGADEVSLAISALFGQHAQA
Rv3507  AMGAVSASAQTLRSRPLIGNGANATTPGGNGGDGGWLFSGGNGAPGAAGQSGGNGGSAG
Rv3508  SFVLIAPFVTAAGDLTNLGSSISAANASAAASATTQVLAAGADEVSAIAALFGGFLE
Rv3511  SFVLISPEVVSAAAGDLANVGSTISAANKAAAAATTQVLAAGADEVSAIAALFGMYGLE
Rv3512  -----PQGDGNAGNGGDGG
Rv3514  SFVLIAPFVTAAGDLTNLGSSISAANASAAASATTQVLAAGADEVSAIAALFGGFLE
Rv3590c SFVIVAPEALMSVASEVAGIGSALNAANAAAAAPTGGVLAAGADEVSAAMAALFGAHAQE
Rv3595c SFVIAVPEFLSAAATDLANLGTISAANAAASIPTTGVLAAGADDVSAIAALFGAHAQA
Rv3652  SYVIAAPEALVAAAATDLATLGTIGAANAAAAGSTTALLTAGADEVSAIAA-----
Rv3653  -----LFGMHGQT
*Rv3812 SFVVTVPEAVAAAADLAAIGSTLREATAAAAAGPTTGLAAAADDVSIIVSALFGRYGOE
Cons.:  SFV  PE  AAA  DLA  IGS  I  AANAAAA  TT  LAAGADEVSAIAALFG  H  Q

```

Figure 1 : Homologie de séquence à l'extrémité N-terminale entre les 61 protéines PE-PGRS. Les protéines d'intérêt sont identifiées par un astérisque.

5.1.1 La sous-famille PGRS

La sous-famille PGRS comporte 61 gènes dispersés sur le chromosome codant pour des protéines riches en glycine et en alanine (Cole *et al.*, 1998). Ces protéines sont de fonction inconnue, mais pourraient être des facteurs de persistance. En fait, d'après leur séquence, 13 d'entre elles pourraient être des phosphokinases, une pourrait se lier à la phosphopantéthéine (intermédiaire de la voie métabolique de la coenzyme A), 2 pourraient se lier à l'ATP et/ou au GTP et une pourrait être une protéase à acide aspartique. La protéine Rv1759c, qui appartient à la sous-famille PGRS, est une protéine dont l'extrémité C-terminale peut se lier à la fibronectine (Espitia *et al.*, 1999). Ceci peut être un élément important dans l'interaction hôte-bactérie. De plus, il s'agit d'un antigène dont les anticorps spécifiques sont retrouvés dans le sérum de patients infectés avec *M. tuberculosis*, suggérant qu'au moins ce membre des PGRS est exprimé au moment de l'infection (Espitia *et al.*, 1999). D'autres part, les séquences des PE-PGRS Rv3812 et Rv1651c sont homologues à celles de gènes de *M. marinum* préférentiellement exprimés dans le macrophage. Chez *M. marinum*, la mutation de ces gènes rend la souche incapable de se répliquer et une diminution de la capacité de persistance est remarquée (Ramakrishnan, 2000). Ces faits suggèrent un rôle des PGRS dans la virulence mycobactérienne. Autre point à noter est que les séquences des PGRS varient d'une souche à l'autre. Par exemple, le gène codant pour la protéine Rv0746 chez la souche BCG diffère de celui de la souche H37Rv par la délétion de 29 acides aminés et l'insertion de 46 acides aminés (figure 2 ; Cole *et al.*, 1998).

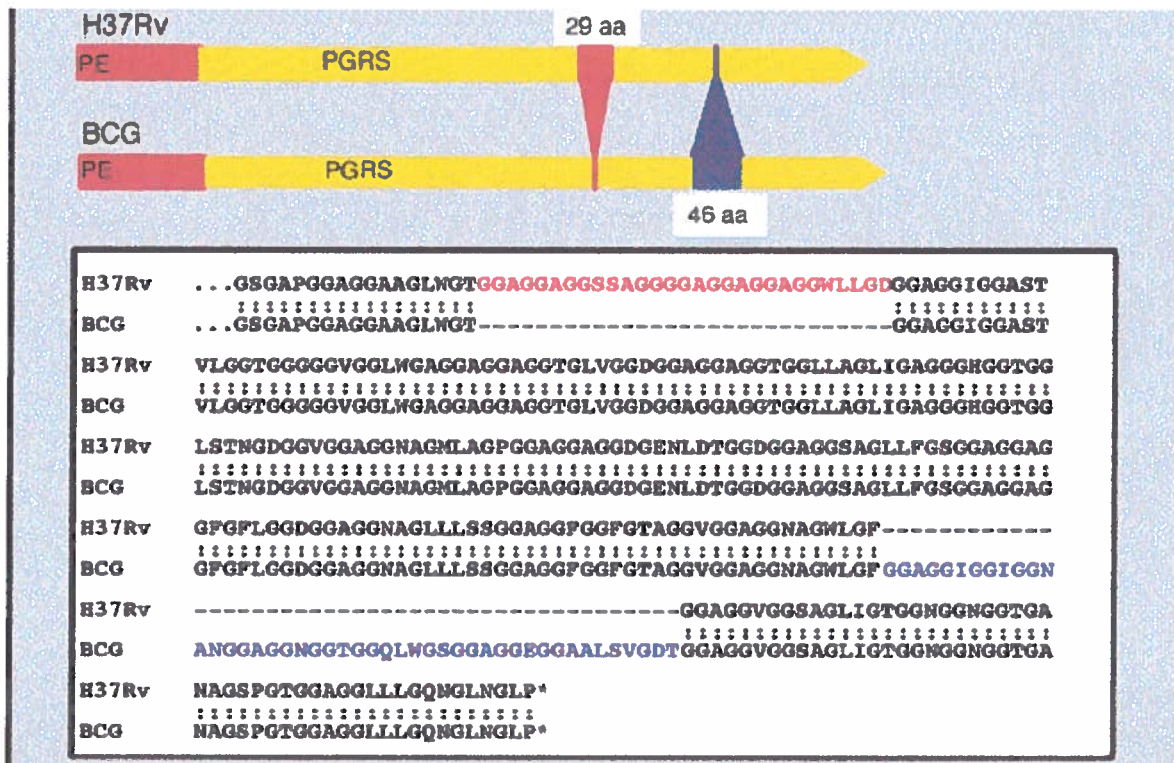


Figure 2 : Homologie de séquence entre la protéine de la souche H37Rv et celle de la souche BCG (tiré de l'article Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence (Cole *et al.*, 1998))

La localisation cellulaire des PGRS n'est pas connue (Cole *et al.*, 1998), mais d'après des études récentes (Brennan *et al.*, 2001), certaines d'entre elles seraient des protéines de surface ou sécrétées. Ceci signifie que nous pouvons les retrouver dans le surnageant obtenu après sonication du mycélium et centrifugation ou dans le surnageant de la culture. Il est toutefois possible de favoriser la sécrétion en fusionnant le gène d'intérêt à une séquence codant pour un peptide signal d'une protéine qui est normalement abondamment sécrétée chez *S. lividans*. Les peptides signaux chez les streptomycètes sont constitués en moyenne de 35 acides aminés, comparativement à ceux des bactéries Gram positif en général et des bactéries Gram négatif qui comportent de 29 à 31 acides aminés et de 24 à 25 acides aminés respectivement. Le peptide signal typique

est caractérisé par une extrémité N-terminale composée d'acides aminés hydrophiles, suivie d'une région hydrophobe. L'extrémité C-terminale se termine habituellement avec la séquence Ala-X-Ala et inclue fréquemment une proline qui permet l'exposition du site de clivage de la signal peptidase (Gilbert *et al.*, 1995). Le peptide signal de la xylanase A (Xyl A) est couramment employé pour la sécrétion de protéines hétérologues chez les streptomycètes. La fusion de la séquence du peptide signal à un gène d'intérêt, suivie du clonage dans un vecteur à multiples copies peut permettre la sécrétion de la protéine recherchée à un niveau représentant 80 % des protéines sécrétées chez *S. lividans*. Malgré un taux de sécrétion satisfaisant, l'utilisation d'autres peptides signaux, tels celui de la mannanase A (Man A) et de la cellulase A (Cel A), a été tentée et a permis l'obtention de taux de sécrétion supérieurs à celui obtenu avec le peptide signal de la xylanase (Pagé *et al.*, 1996).

6. OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'étude des protéines de *Mycobacterium tuberculosis* est très importante dans le but de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, de développer des outils diagnostiques plus efficaces, de même que des vaccins plus fiables. Les travaux sont facilités depuis que la séquence du génome de *M. tuberculosis* est disponible, mais il y a des contraintes : la pathogénicité du microorganisme et sa croissance lente. Pour contourner ces deux problèmes, une alternative possible est l'utilisation d'un système d'expression. *S. lividans* est un hôte de choix, car il s'agit d'une bactérie non-pathogène, bien connue et dont le contenu génomique en cytosine et en guanine (G+C) est très proche de celui des mycobactéries (62-70%).

L'objectif principal du projet est donc de valider l'utilisation de *S. lividans* comme organisme pouvant produire, en quantité appréciable, certaines protéines de *M. tuberculosis*. Les objectifs visés sont le clonage de trois gènes de *M. tuberculosis*, la purification et la caractérisation des protéines produites.

II- APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont décrites au tableau I.

Tableau I : Description des souches bactériennes utilisées

Souche	Génotype	Source/référence
<i>Streptomyces lividans</i> 66		
10-164	<i>msiK</i>	Hurtubise <i>et al.</i> , 1995
<i>Escherichia coli</i>		
DH11S	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>recA1398</i>) <i>deoR</i> <i>supE rpsL srl thi/F'</i> (<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15)	Gibco BRL

2. Vecteurs

Les vecteurs utilisés comme matrices pour des amplifications par PCR ou dans les clonages sont décrits au tableau II.

Tableau II : Description des vecteurs.

Vecteur	Description	Source
pIAFC209 (figure 3)	Vecteur multicopie se répliquant dans <i>Streptomyces</i> et <i>E. coli</i> et contenant les gènes de résistance au thiostrepton et à l'ampicilline	F. Shareck (INRS)
pIAF550MCSL (figure 4)	Dérivé de pIJ702 contenant une cassette de clonage	F. Shareck (INRS)
pIAFC109MCS (figure 5)	pIAFC109 contenant une cassette de clonage	F. Shareck (INRS)
M13mp18 (figure 6)	Forme répliquative du phage M13 avec une cassette de clonage multiple dans le gène <i>lacZ</i> (<i>EcoRI-HindIII</i>)	Bio-Rad
M13mp19 (figure 7)	Forme répliquative du phage M13 avec une cassette de clonage multiple dans le gène <i>lacZ</i> (<i>HindIII-EcoRI</i>)	Bio-Rad
pTZ19R (figure 8)	Vecteur multicopie, <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i> , ori <i>E. coli</i> , cassette de clonage	Amersham Pharmacia Biotech

pIAF3812-5His	pIAFC109 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1550 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 5'	Ce travail
pIAF3812-3His	pIAFC109 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1542 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 3'	Ce travail
pIAF3812-CelA	pIAF550MCSL avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1984 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés les séquences PS et CBD de la cellulase A à l'extrémité 5'	Ce travail
pIAF3812-AbfB	pIAF550MCSL avec un insert <i>EcoRI-SacI</i> de 2054 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés les séquences PS et XBD de l'arabinofuranosidase B à l'extrémité 5'	Ce travail
mp183812-5His	M13mp18 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1550 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 5'	Ce travail
mp193812-5His	M13mp19 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1550 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 5'	Ce travail
mp183812-3His	M13mp18 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1542 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 3'	Ce travail

mp193812-3His	M13mp19 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 1542 pb correspondant au gène <i>Rv3812</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 3'	Ce travail
pIAF1651-5His	pIAFC109 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 3071 pb correspondant au gène <i>Rv1651c</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 5'	Ce travail
pIAF1651-3His	pIAFC109 avec un insert <i>SphI-SacI</i> de 3063 pb correspondant au gène <i>Rv1651c</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 3'	Ce travail
pIAF1759c-5His	pIAFC109MCS avec un insert <i>EcoRI-SacI</i> de 2802 pb correspondant au gène <i>Rv1759c</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 5'	Ce travail
pIAF1759c-3His	pIAFC109MCS avec un insert <i>EcoRI-SacI</i> de 2781 pb correspondant au gène <i>Rv1759c</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 3'	Ce travail
pIAF1759c	pIAF550MCSL avec un insert <i>EcoRI-SacI</i> de 2770 pb correspondant au gène <i>Rv1759c</i>	Ce travail
pTZ1759-3His	pTZ19R avec un insert <i>EcoRI-SacI</i> de 2781 pb correspondant au gène <i>Rv1759c</i> auquel sont ajoutés six codons histidine à l'extrémité 3'	Ce travail
cosmide 2H2	cosmide contenant, entre autres, le gène de la cellulase A	John Innes Center

cosmide 06H11 (figure 9)	cosmide de 38 000 pb contenant, entre autres, le gène <i>Rv1651c</i>	S. Cole (Institut Pasteur)
cosmide 409 (figure 10)	cosmide de 30 352 pb contenant, entre autres, le gène <i>Rv3812</i>	S. Cole (Institut Pasteur)
cosmide 28 (figure 11)	cosmide de 40 163 pb contenant, entre autres, le gène <i>Rv1759c</i>	S. Cole (Institut Pasteur)

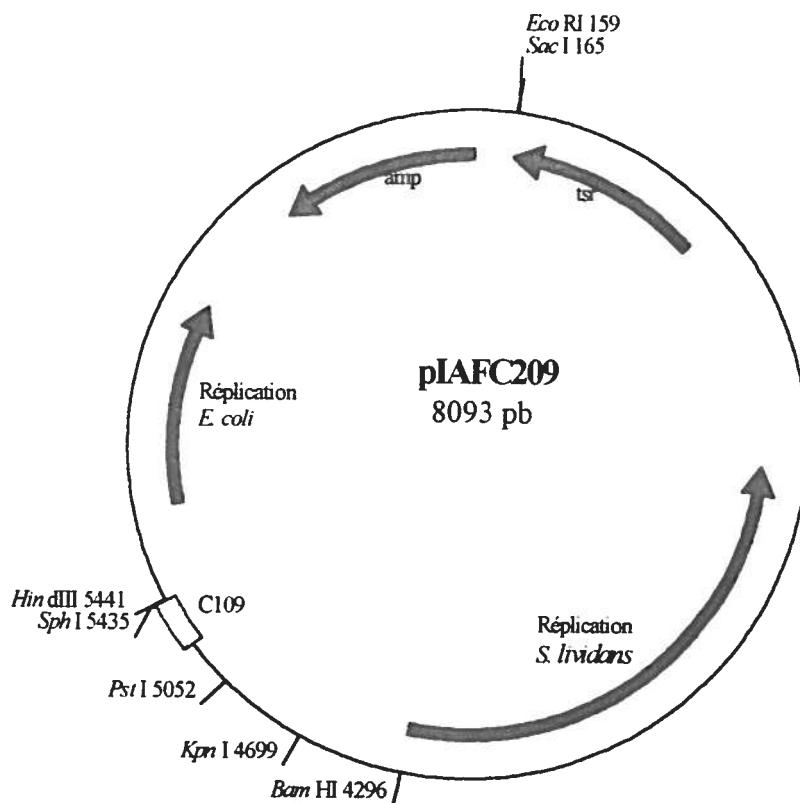


Figure 3 : Carte physique du plasmide pIAFC209 utilisé pour le clonage de gènes chez *S. lividans*. *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; Réplication *S. lividans*, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur; Réplication *E. coli*, origine de réplication chez *E. coli*; *amp*, gène de résistance à l'ampicilline. Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

cosmide 06H11 (figure 9)	cosmide de 38 000 pb contenant, entre autres, le gène <i>Rv1651c</i>	S. Cole (Institut Pasteur)
cosmide 409 (figure 10)	cosmide de 30 352 pb contenant, entre autres, le gène <i>Rv3812</i>	S. Cole (Institut Pasteur)
cosmide 28 (figure 11)	cosmide de 40 163 pb contenant, entre autres, le gène <i>Rv1759c</i>	S. Cole (Institut Pasteur)

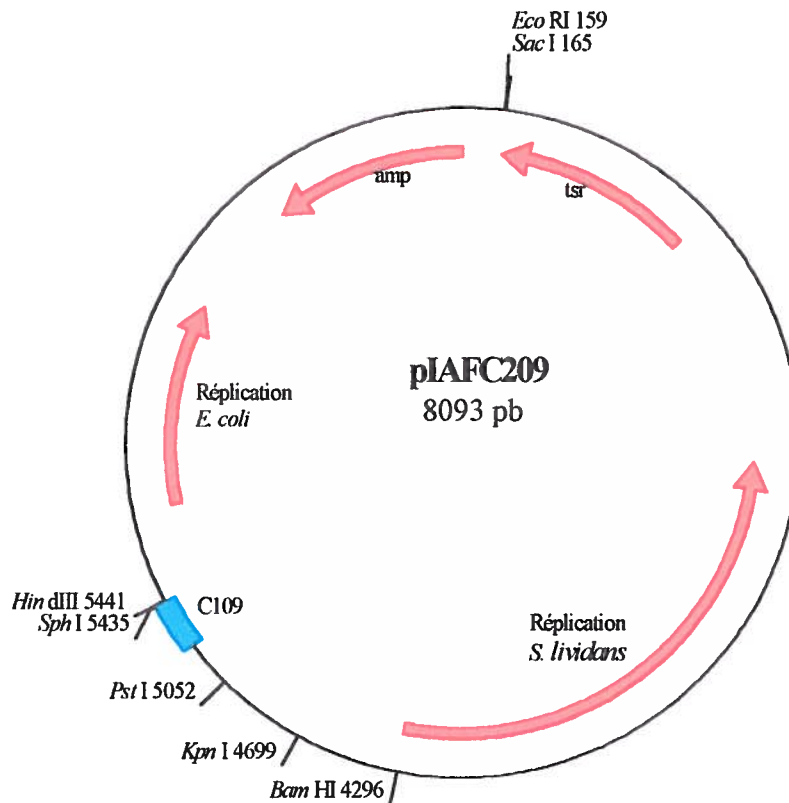


Figure 3 : Carte physique du plasmide pIAFC209 utilisé pour le clonage de gènes chez *S. lividans*. *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; Réplication *S. lividans*, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur; Réplication *E. coli*, origine de réplication chez *E. coli*; *amp*, gène de résistance à l'ampicilline. Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

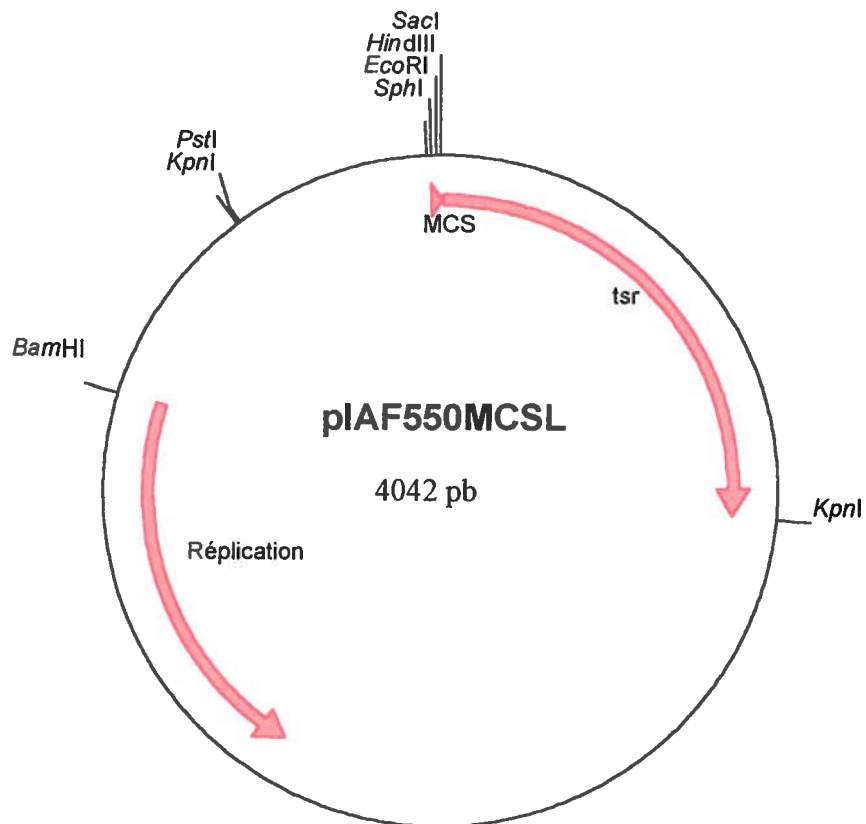


Figure 4 : Carte physique du plasmide pIAF550MCSL utilisé pour le clonage de gène chez *S. lividans*. *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; Réplication, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; MCS, site de clonage multiple. Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

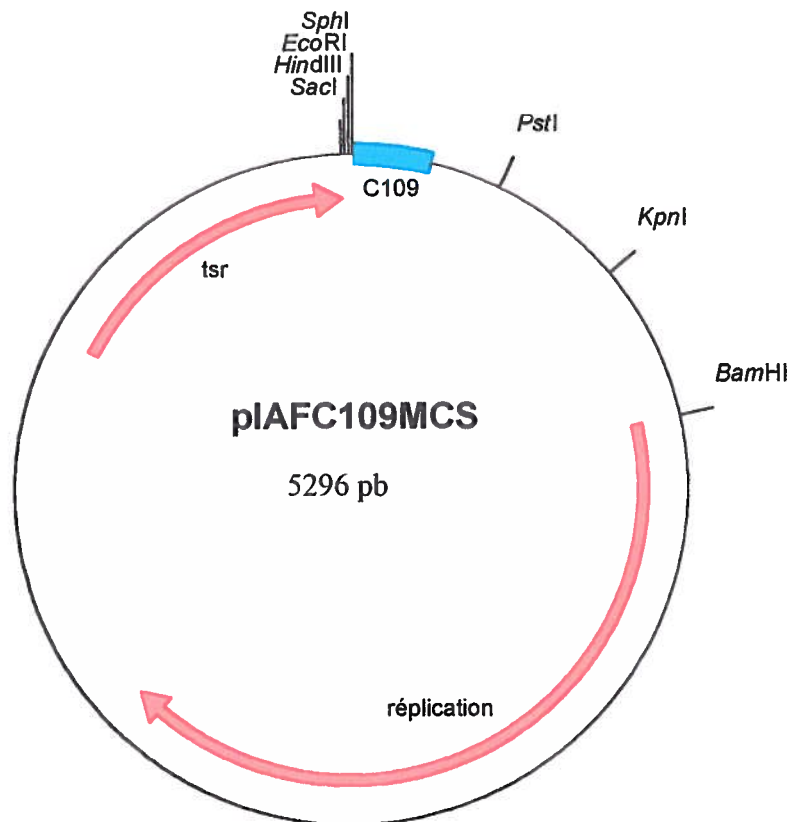
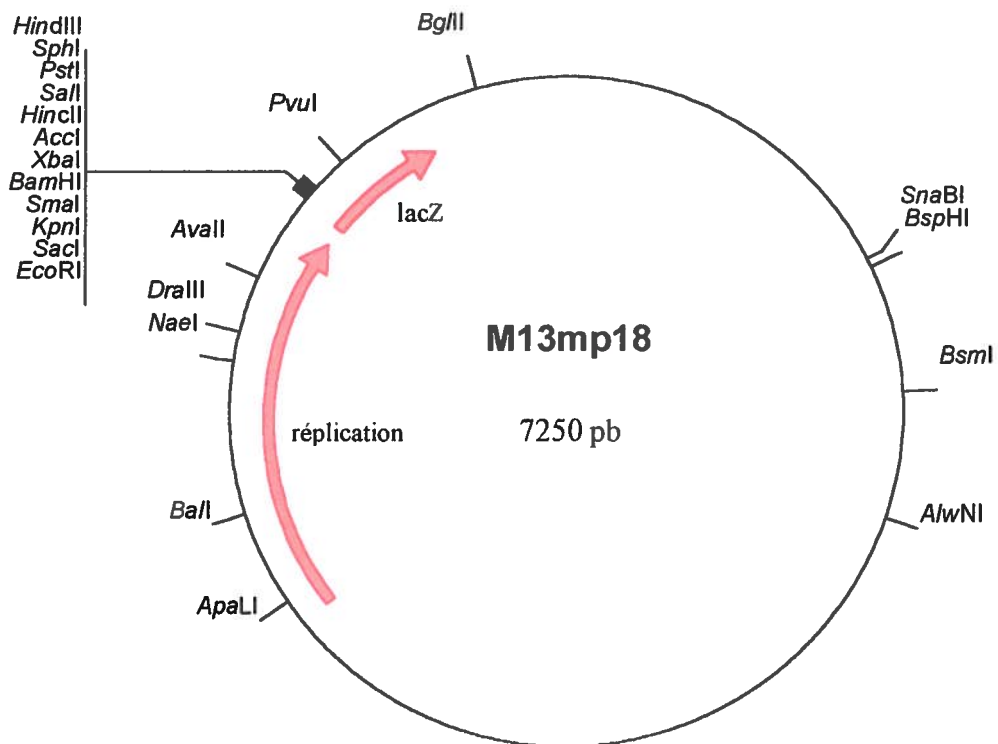


Figure 5 : Carte physique du plasmide pIAFC109MCS utilisé pour le clonage de gènes chez *S. lividans*. *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; réplication *S. lividans*, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.



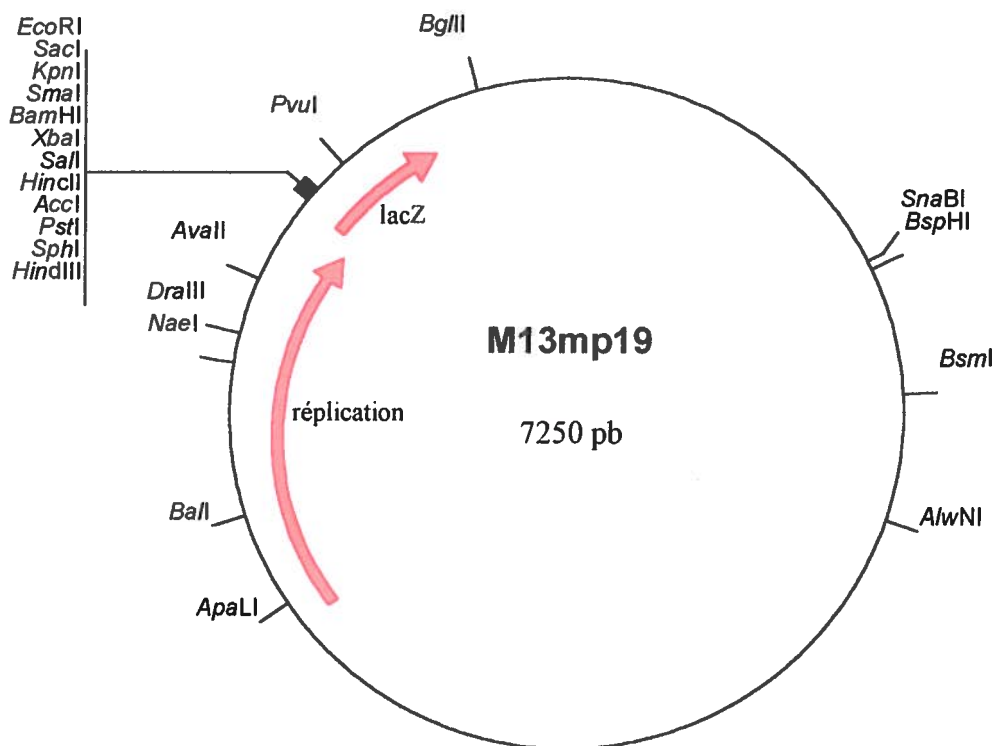


Figure 7 : Carte physique de la forme répliquative du phage M13mp19 utilisé pour le clonage de gènes chez *E. coli*. lac Z, opéron *lacZ*; réplication, origine de réplication. Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

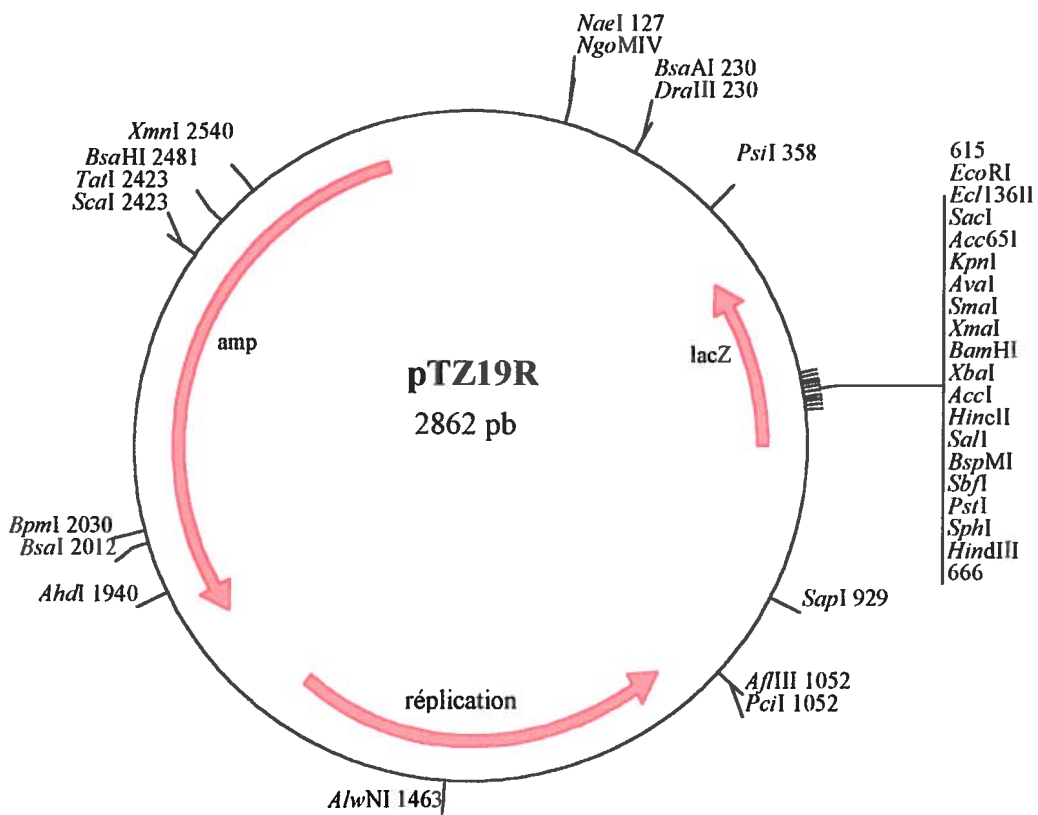


Figure 8 : Carte physique du plasmide pTZ19R utilisé pour le clonage de gène chez *E. coli*. *lacZ*, opéron *lacZ*; *amp*, gène de résistance à l'ampicilline; *réplication* : origine de *réplication*. Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

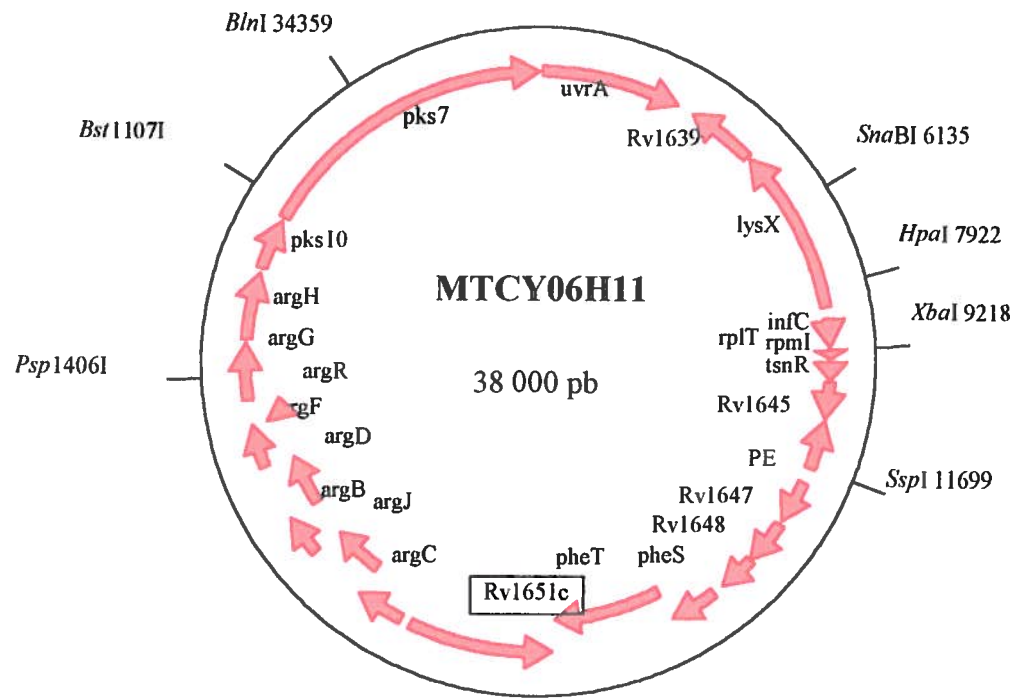


Figure 9 : Carte physique du cosmide MTCY06H11 utilisé pour l'amplification du gène *Rv1651c* (PE-PGRS). Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

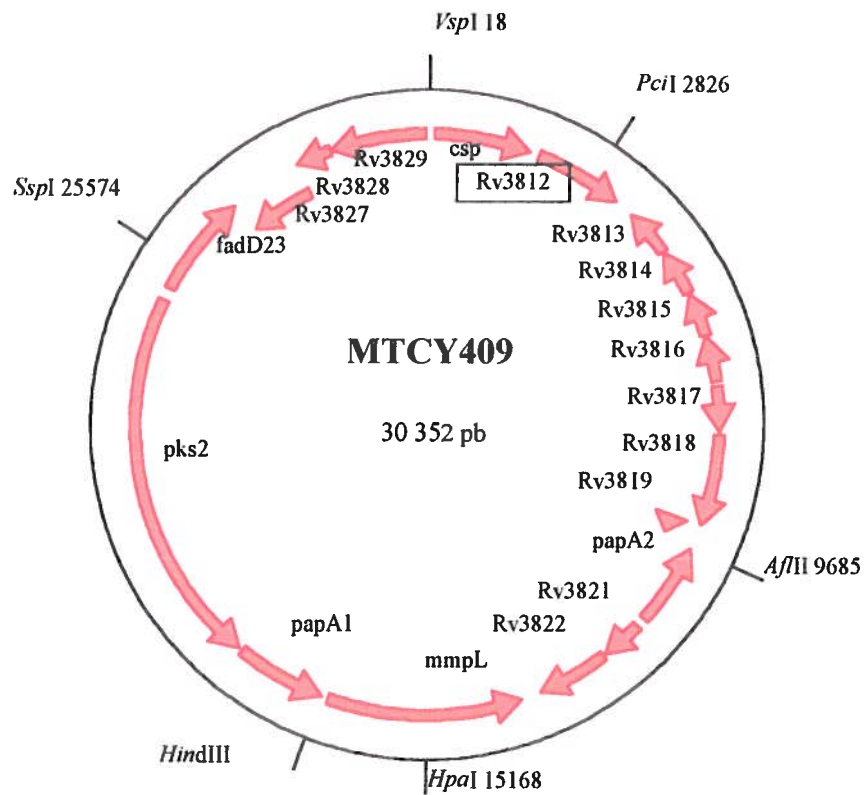


Figure 10: Carte physique du cosmide MTCY409 utilisé pour l'amplification du gène *Rv3812* (PE-PGRS). Les sites de reconnaissances uniques d'endonucléase de restriction du vecteur sont indiqués.

3. Milieux de culture

Tous les milieux de culture ont été autoclavés à 121°C pendant 20 minutes. Les quantités indiquées sont utilisées pour préparer 1 L de milieu.

Milieu liquide riche (TSB, Kieser et *al*, 2000)

Le milieu TSB (Tryptic Soy Broth) est composé de 30 grammes de tryptone de soya par litre d'eau distillée.

Milieu liquide minimal (M14, Kieser et *al*, 2000)

Le milieu M14 est constitué de 1,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , sels de Mandels 0,1 % (v/v) (140 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 160 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ par 100 mL d'eau distillée) et Tween 80 0,2 % (v/v). Le pH doit être de 7,4. Suite à un autoclavage, 6 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 % (p/v), ainsi que 10 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 % (p/v) sont ajoutés de façon aseptique.

Milieu Bennett solide (Kieser et *al*, 2000)

Un gramme d'extrait de levure et un gramme d'extrait de bœuf sont dissous dans un litre d'eau distillée. Par la suite, 2 g de NZ amine, 10 g de maltose et 20 g d'agar sont ajoutés. Le pH est ajusté à 7,2 avec du NaOH, puis le tout est autoclavé. Si nécessaire, 1 mL de thiostrepton (50 mg par mL de DMSO) est ajouté.

Milieu R5 solide (Kieser et *al*, 2000)

Le milieu R5 solide comprend 103 g de sucrose, 0,25 g de K_2SO_4 , 10,12 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g de glucose, 0,1 g d'acide casamino, solution d'éléments en trace 0,2 % (v/v) (ZnCl_2 40 mg/L, FeCl_3 200 mg/L, MnCl_2 10 mg/L, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10 mg/L et $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ 10 mg/L), 5 g d'extrait de levure, 22 g d'agar et 5,73 g de TES (acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique). Après stérilisation du milieu, les solutions stériles suivantes sont ajoutées : 10 mL de KH_2PO_4 0,5 % (p/v), 4 mL de CaCl_2 5 M, 15 mL de L-proline 20 % (p/v), 1 mL de CuSO_4 0,5 % (p/v), 10 mL de méthionine 1% (p/v) et 5 mL de tyrosine 8 % de NaOH 1N.

Milieu SOB et SOC (Maniatis et *al*, 1982)

Le milieu SOB est composé de 20 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 0,5 g de NaCl et 10 mL de KCl 250 mM. Le pH doit être de 7,0. Pour 10 mL de SOB, 100 µL de MgCl₂ 1M stérile, ainsi que 100 µL de glucose 2 M stérile peuvent être ajoutés pour donner le milieu SOC.

Milieu LB (Luria Bertani Broth, Maniatis et *al*, 1982)

Pour chaque litre de milieu, 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl sont ajoutés. Le pH est ajusté à 7,0. Un ajout de 15 g d'agar permet de solidifier le milieu au besoin.

Milieu 2xTY (Maniatis et *al*, 1982)

Milieu qui requiert 16 g de bactotryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl. Si désiré, un ajout d'agar 15 g/L permet de solidifier le milieu.

Milieu H (Maniatis et *al*, 1982)

Milieu comportant 10 g de bactotryptone et 8 g de NaCl. Un ajout de 12 g d'agar permet de solidifier le milieu.

Géloses molles

Elles sont constituées des ingrédients du milieu H, excepté que l'agar est ajouté à une concentration de 8 g/L. Avant la stérilisation, le mélange est chauffé pour dissoudre l'agar et est réparti dans des éprouvettes contenant chacune 3 mL de milieu.

4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

4.1 La source d'ADN

La source d'ADN est l'ADN génomique de la souche BCG fourni par le Dr Ishaque (Institut Armand-Frappier). Un volume de 350 μ L était à notre disposition (35 ng/ μ L). Des cosmides (tableau 2) ont aussi été utilisés comme source d'ADN. Mentionnons que 400 ng des cosmides 06H11, 409 et 28 ont été fournis par le Dr Stewart Cole de l'Institut Pasteur et qu'au besoin, ils peuvent être produits en plus grande quantité. La technique utilisée à cette fin est la transformation d'*E. coli* DH11S par électroporation, suivie d'une extraction d'ADN selon la méthode de la trousse Flexiprep (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal).

Préparation des cellules électrocompétentes

Une pré-culture de la souche bactérienne *E. coli* DH11S est préparée dans 20 mL de milieu Luria Broth (LB) et est incubée pour la nuit à 37°C sous agitation (220 rpm). Le lendemain, 5 mL de la pré-culture servent d'inoculum à 500 mL de milieu LB. Une incubation dans les mêmes conditions que précédemment est poursuivie jusqu'à l'obtention d'une densité optique d'environ 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm. Après avoir refroidit le milieu sur la glace pendant quinze minutes, une centrifugation de 25 minutes est effectuée à 4°C à une vitesse de 3000 x g. Le surnageant est alors éliminé et le culot est resuspendu dans 25 mL d'eau déionisée stérile conservée à 4°C. On ajoute 100 mL d'eau, puis le procédé est recommencé : centrifugation, élimination du surnageant, resuspension du culot. La troisième fois, le culot est resuspendu dans 5 mL de glycérol 10 % (v/v); la quatrième fois, le volume de glycérol est diminué à 0,5 mL. Finalement, les cellules ont été aliquotées en 50 μ L par microtube stérile pour être ensuite congelées à -80°C.

Transformation par électroporation

Les cellules électrocompétentes, l'ADN, de même que la cuvette à électroporation sont mis sur la glace. On mélange 5 μL d'ADN cosmétique (4 $\text{ng}/\mu\text{L}$) avec 50 μL de cellules électrocompétentes (*E. coli* DH11S). Du mélange, 46 μL sont prélevés et déposés dans une cuvette pour l'électroporation avec l'appareil Gene Pulser (Bio-Rad) réglé à 25 μF , 1,6 kV et 400 Ω . Une fois terminé, 1 mL de milieu SOC est ajouté et le tout est transféré dans un tube stérile pour une incubation d'une heure à 37°C et sous agitation (220 rpm). On étale 100 μL de la culture obtenue sur un milieu LB-agar avec ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lequel est incubé pour la nuit à 37°C.

Extraction des cosmides chez *E. coli* (méthode Flexiprep, Amersham Pharmacia Biotech)

Une colonie d'*E. coli* DH11S est repiquée dans 10 mL de milieu LB et le tout est incubé pendant 16 heures à 37°C sous agitation (220 rpm). Une centrifugation de 10 minutes à la température de la pièce et à la vitesse maximale (16 000 x g) précède la resuspension du culot dans 200 μL de la solution I (glucose 50 mM, Tris pH 8,0 25 mM, EDTA 10 mM). On ajoute 400 μL de la solution II (SDS 1 % (p/v), NaOH 0,2 N) et, après avoir mélangé, il est nécessaire d'incuber 5 minutes à la température de la pièce. La solution III est additionnée (acétate de potassium 3 M, acide acétique 10 % (v/v)) en suivant le même procédé que pour la solution II, excepté que l'incubation se déroule sur la glace. Une centrifugation de 10 minutes à 16 000 x g et à la température de la pièce est suivie du transfert du surnageant dans un second microtube à lequel sont ajoutés 700 μL d'isopropanol. Après avoir incubé 10 minutes à la température de la pièce, une centrifugation de 20 minutes est effectuée à 16 000 x g. Le surnageant est alors éliminé, le culot est séché et resuspendu dans 50 μL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0).

Pour s'assurer de la pureté de l'ADN (ADN génomique ou cosmique), une extraction au phénol-chloroforme a été effectuée. La première étape consiste à ajouter un volume de phénol à un volume d'échantillon. La seconde vise à mélanger le tout doucement par inversion, ainsi qu'à centrifuger pendant 5 minutes à la température de la pièce et à la vitesse maximale (16 000 x g). Par la suite, la phase aqueuse, est recueillie dans un second microtube. Les 3 étapes précédentes sont répétées tant et aussi longtemps que l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique n'est pas claire. Le même procédé est effectué, mais cette fois, le phénol est remplacé par le chloroforme 24:1. Ensuite, 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol 95 % (v/v) sont ajoutés à la phase aqueuse pour faire précipiter l'ADN. Une incubation à la température de la pièce pendant 2 heures est nécessaire, avant de centrifuger pour 30 minutes à 16 000 x g (température de la pièce) et d'éliminer le surnageant. Le culot est séché à la température de la pièce, resuspendu dans 50 µL d'eau stérilisée, puis la densité optique (DO) de l'échantillon obtenu est mesurée à une longueur d'onde de 260 nm. La quantité d'ADN peut être calculée selon la formule suivante : $1 \text{ DO}_{260} = 50 \text{ µg/mL}$.

Digestion

L'ADN est digéré à l'aide des enzymes de restriction *EcoRI* (5'-GAATTC-3') et *SacI* (5'-GAGCTC-3') ou *SphI* (5'-GCATGC-3') et *SacI* dans un volume total de 20 µL. Il est recommandé d'utiliser 1 µg d'ADN pour une unité d'enzyme, ceci dans le tampon «One-Phor-All» 2X (Tris-acétate 20 mM, pH 7,5, acétate de magnésium 20 mM et acétate de potassium 100 mM). Une incubation pendant 2 heures à 37°C est nécessaire, puis la réaction enzymatique est inactivée lors d'une incubation à une température de 72°C pendant 15 minutes.

4.2 Les amorces nucléotidiques

Les amorces nucléotidiques ont été synthétisées avec l'appareil Gene Assembler Plus de Pharmacia LKB à l'INRS-IAF. Le tableau III dresse une liste des amorces utilisées avec leurs séquences respectives.

Tableau III : Séquences des amorces nucléotidiques. Les codons d'initiation, lorsque présents, sont en gras; les nucléotides s'appariant au gène d'intérêt sont soulignés et les sites de restriction sont en italique.

Nom	SÉQUENCE (5'-3')
<i>Rv1759c-5'</i>	CCGAATTCAGGAGAACTCCTAGATGCACCATCACCATCAC CATATCGAGGGCCGGATGTCGTTTGTGATCGCGGT-3'
<i>Rv1759c-3'</i>	CCCGAGCTCCTACGTCAAGCCGTGCTGCT
<i>Rv1651c-5'</i>	CCCGCATGCACCATCACCATCACCATATCGAGGGCCGGA TGTCGTTCTTACTCGT
<i>Rv1651c-3'</i>	CCCGAGCTCCTAAGGGGCAATTGCCTGCGCTA
<i>Rv3812-5'</i>	CCCGCATGCACCATCACCATCACCATATCGAGGGCCGGA TGTCGTTTCGTGTCACA
<i>Rv3812-3'</i>	CCCGAGCTCCTAAGCCGCCGGTTTGAT
<i>Rv1759c3- 1545 nt</i>	TGGCACAACCTGCAGCAGGACATT
<i>Rv1759c5- 1522 nt</i>	AATGTCCTGCTGCAGGTTGTGCCA
<i>Rv1651c3- 1426 nt</i>	CCGGTGGTGCCGCGGGCAGTAGCT
<i>Rv1651c5- 1407 nt</i>	AGCTACTGCCCGCGGCACCA
<i>Rv38123- 893 nt</i>	CCCGCTGGGAGATCTGTTCACCAT
<i>Rv38125 -866 nt</i>	ATGGTGAACAGATCTCCCAGCGGGCCCA
<i>1759c-5'</i>	AAAGAATTCAGGAGAACTCCTAGATGTCGTTTGTGATCGC GGT
<i>1759c-3'His</i>	TTTGAGCTCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCGTCAAGCCG TGCTGCCCAT

<i>1651c-5'</i>	<u>AAAGCATGC</u> GCTTCTTGCTCGTGGAGCCGGA
<i>1651c-3'His</i>	TTTGAGCTCTCAATGGTGATGGTGATGGTGAGGGGCAATT <u>GCCTGCGCTA</u>
<i>3812-5'</i>	<u>AAAGCATGC</u> GGTTCGTGGTACAGTGCCGGA
<i>3812-3'His</i>	5'TTTGAGCTCTCAATGGTGATGGTGATGGTGAGCCGCCGG <u>TTTGATTGCCA-3'</u>
<i>CelA-5</i>	<u>AAAGCATGC</u> AACGCCTTTTGGCCCTGCT
<i>Rv3812-CelA</i>	<u>TCCGGCACTGTGACCACGAACGACAT</u> CCCGGCCCTCGATC GGTGTCCCGGTCGCGGG
<i>CelA-Rv3812</i>	CCCGCACC GGGACACCGATCGAGGGCCGGATGTCGTT <u>GTGGTCACAGTGCCGGA</u>
<i>AbfB-5</i>	<u>AAAGAATTCAGTCGAGGGAGT</u> TCCCATGCACAGAGGAA
<i>Rv3812-AbfB</i>	<u>ACTGTGACCACGAACGACAT</u> CPCGGCCCTCGATCGTCGGC GGCGTACCGGT
<i>AbfB-Rv3812</i>	ACCGGTACGCCGCCGACGATCGAGGGCCGGATGTCGTT <u>GTGGTCACAGT</u>
<i>CelA-52</i>	<u>AAAGAATTCAGTCGAGGGAGT</u> TCCCATGAAACGCCTTTTG GCCCTGCT
<i>Rv1759c-CelA</i>	<u>ACCGCGATCACAAACGACAT</u> CPCGGCCCTCGATCGGTGTC CCGGTCGCGGG
<i>CelA-Rv1759c</i>	CCCGCACC GGGACACCGATCGAGGGCCGGATGTCGTT <u>GTGATCGCGGT</u>
<i>NcoI-1759c</i>	<u>TTGTGCCATGGCGAGGT</u>
<i>Rv1759c-AbfB</i>	<u>ACCGCGATCACAAACGACAT</u> CPCGGCCCTCGATCGTCGGC GGCGTACCGGT
<i>AbfB-Rv1759c</i>	ACCGGTACGCCGCCGACGATCGAGGGCCGGATGTCGTT <u>GTGATCGCGGT</u>
<i>1759c-NcoI</i>	<u>ACCTCGCCATGGCACAA</u>

4.3 Amplification

L'amplification des gènes choisis a été effectuée par PCR. Dans un microtube sont ajoutés dans l'ordre : 63 μL d'eau stérile, 10 μL de tampon à PCR 10 X (Tris-HCl 100 mM pH 8,85, KCl 250 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 mM, MgSO_4 20 mM), 2 μL de chacun des quatre nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10 mM), 8 μL de propionamide 50 % (v/v), 2 μL de MgSO_4 25 mM, 3 μL de chacune des deux amorces diluées à 10 pmol/ μL , 2 μL d'ADN (0,1 μg) et 0,5 μL *Pwo* ADN polymérase 5 U/ μL .

L'appareil de la compagnie Techne, modèle Genius, a été utilisé pour l'amplification. Le programme utilisé est le suivant : un temps de dénaturation de 3 minutes à 95°C, suivi de 30 cycles comme suit : 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C. Le programme se termine par un temps d'élongation supplémentaire de 7 minutes à 72°C.

5. Analyse et manipulation de l'ADN

5.1 Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose

Les différents fragments d'ADN obtenus par PCR sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose 0,7 % (p/v). L'agarose est préparée dans le tampon TBE 1X (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM) et pour une solubilisation complète, il est nécessaire de chauffer le mélange. Après avoir laissé refroidir à la température de la pièce, le bromure d'éthidium est ajouté à une concentration finale de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Quant aux échantillons, ils sont mélangés dans un rapport 5:1 avec un tampon constitué de bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v) et Ficoll de type 400 15 % (p/v). Pour estimer la longueur des fragments d'ADN obtenus, 2,5 μL du marqueur «1 kb DNA ladder» (Gibco BRL) sont déposés dans un puits du gel. La migration est effectuée à 120 volts pendant approximativement 2 heures à l'aide de l'appareil "Power Supply" modèle 200/2.0 (Bio-Rad). En dernier lieu, le gel est exposé aux rayons ultraviolets (UV), grâce à l'appareil Gel Doc 1000 de la compagnie Bio-Rad. Ceci permet de visualiser les bandes d'ADN.

5.2 Extraction et purification d'ADN du gel d'agarose

Les amplicons sont extraits du gel d'agarose et purifiés à l'aide de la trousse GFX (Amersham Pharmacia Biotech). Pour ce faire, les bandes d'ADN d'intérêt sont découpées et chacune d'elles est transférée dans un microtube. Un volume de tampon de capture (solution tamponnée contenant de l'acétate et un chaotrope) est alors ajouté à un volume de gel (100 mg ~ 100 µL), puis le mélange qui en résulte est agité au vortex, avant d'être incubé à 60°C pour une période variant de 5 à 15 minutes. Une fois l'agarose solubilisée, l'échantillon est centrifugé quelques secondes à 16 000 x g (température de la pièce) et déposé sur une colonne contenant une matrice en fibre de verre fournie par le fabricant. Une incubation d'une minute à la température de la pièce est suivie d'une centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le filtrat obtenu est éliminé, 500 µL du tampon de lavage (TE additionné d'éthanol 80 % (v/v)) sont ajoutés et le tout est centrifugé à nouveau. La colonne est, par la suite, placée dans un microtube et l'ADN est élué avec 50 µL d'eau stérile.

5.3 Ligation

La ligation entre le gène d'intérêt et le vecteur s'effectue à l'aide de la T₄ ADN ligase. Pour ce faire, un mélange de 20 µL contenant l'insert et le vecteur dans un rapport 1:1, 2 µL d'ATP 10 mM, 2 µL de tampon <<One-Phor-All>> 10X (Tris-acétate 100 mM, acétate de magnésium 100 mM, acétate de potassium 500 mM), ainsi qu'une unité de la ligase est préparé. Le tout est incubé pendant 16 heures à la température de la pièce.

6. Transformation bactérienne

6.1 Transformation de protoplastes de la souche *S. lividans* 10-164

Un mélange comportant 50 µL de protoplastes de *Streptomyces lividans* 10-164, 5 µL du produit de ligation et 200 µL d'une solution de polyéthylène glycol 25 % (v/v) est préparé, puis incubé à la température de la pièce pour 1 minute 30 secondes. Le tout est ensuite étalé sur des milieux R5 solides, puis une incubation à 34°C pendant 16 heures est nécessaire, avant d'étaler 1 mL de thiostrepton 0,5 mg/mL. Une ré-incubation est

requis jusqu'à croissance de colonies (environ 72 heures). Un contrôle négatif et un contrôle positif sont également préparés en parallèle, leurs particularités sont résumées au tableau IV.

Tableau IV: Particularités des contrôles

Contrôle	Produit de ligation remplacé par :
-	pIAFC109 digéré avec les enzymes <i>SphI</i> et <i>SacI</i> (sans insert)
+	plasmide pIAFC109 non digéré (sans insert)

Les colonies résistantes à l'antibiotique sont repiquées sur un milieu Bennett contenant du thiostrepton (Bennett-thio) à une concentration de 50 µg/mL.

6.2 Transformation de la souche *E. coli* DH11S

6.2.1 Transformation avec de l'ADN plasmidique

Dans un tube préalablement refroidi sur la glace, 300 µL de cellules compétentes sont ajoutés à 5 µL de produit de ligation. Le tout est mélangé et incubé sur la glace pendant 40 minutes, avant d'être incubé à 42°C pour 2 minutes. Dans le cas d'une expression phénotypique, 1 mL de milieu 2xTY est ajouté au mélange et une incubation de 40 minutes à 37°C sous agitation (240 rpm) est requise. Ensuite, 100 µL de la culture obtenue sont étalés sur un milieu 2xTY avec ampicilline 100 µg/mL. Afin d'effectuer une sélection des transformants portant un plasmide recombinant, 10 µL d'isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) 100 mM et 50 µL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) 2 % (p/v) en diméthyl formamide ont été préalablement étalés sur les milieux. Les géloses sont incubées à 37°C pour la nuit. Le lendemain, les colonies blanches sont repiquées sur le même type de milieu et incubées dans les mêmes conditions pour au moins 16 heures. Il faut noter que des contrôles ont également été préparés. D'abord, un contrôle positif où le produit de ligation est remplacé par 1 µL du plasmide pTZ19R non

digéré. Ensuite, un contrôle négatif où le produit de ligation est remplacé par 5 μ L de plasmide pTZ19R digéré avec les enzymes *SphI* et *SacI*.

6.2.2 Transformation avec de l'ADN phagique

Des cellules de fond d'*E. coli* DH11S sont préparées dans 5 mL de 2xTY lors d'une incubation de 16 heures à 37°C et sous agitation (240 rpm). La culture obtenue est diluée 1/10, puis incubée pendant 3 heures dans les mêmes conditions que précédemment. Pendant ce temps, 300 μ L de cellules compétentes DH11S sont mélangés avec 5 μ L du produit de ligation. Une incubation de 40 minutes sur la glace est suivie d'un traitement à la chaleur (2 minutes à 42°C), puis le mélange est remis sur la glace. Un mélange de 300 μ L de cellules de fond, 10 μ L d'IPTG 100 mM et 50 μ L d'X-Gal 2 % (p/v) en diméthyl formamide est préparé dans un tube contenant 3 mL de gélose molle refroidie à 55°C. Par la suite, 150, 100 ou 50 μ L du mélange comportant des cellules compétentes transformées sont ajoutés. Le tout est étalé sur un milieu H, avant d'être incubé à 37°C pour la nuit.

7. Extraction d'ADN

7.1 Extraction de plasmides de la souche *S. lividans* 10-164

Des cultures sont préparées à partir de mycélium de *S. lividans* provenant de milieux solides Bennett-thio ensemencés précédemment (section 6.1). Le repiquage est effectué dans 5 mL de TSB auxquels sont ajoutés 5 μ L de thiostrepton 5 mg/mL et 400 μ L de glucose 25 % (p/v). Les cultures liquides sont incubées à 34°C pendant 48 heures avec agitation (240 rpm). Par la suite, pour chaque culture, 500 μ L sont centrifugés à la température de la pièce pendant quelques secondes à 16 000 x g et le culot obtenu est lavé avec 500 μ L de solution I (sucrose 10,3 % (p/v), Tris 25 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0). Le mélange est centrifugé pendant 1 minute à 16 000 x g et à la température de la pièce, puis le surnageant est éliminé. Le mycélium est resuspendu dans 400 μ L de solution de lysozyme (2 mg par mL de solution I). Après une incubation de 30 minutes à

37°C, 250 µL de solution II (NaOH 0,3 N, SDS 2 % (p/v)) sont ajoutés. Le mélange est alors agité au vortex pendant 10 secondes et incubé à 70°C, en laissant refroidir jusqu'à la température de la pièce. Par la suite, l'addition de 100 µL de solution III (5 g de phénol, 5 mL de chloroforme, 1 mL d'eau, 5 mg d'hydroxyquinoline) et une seconde étape d'agitation au vortex sont effectuées. Une centrifugation à la température de la pièce pendant 3 minutes à la vitesse maximale (16 000 x g) précède l'ajout de 70 µL d'acétate de sodium 3M, ainsi que 700 µL d'isopropanol à la phase aqueuse. Après avoir mélangé, incubé 5 minutes à la température de la pièce et centrifugé pour 2 minutes (16 000 x g), le surnageant est éliminé, alors que le culot est resuspendu dans 50 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), 5 µL d'acétate de sodium 3 M et 25 µL de phénol neutre. Une agitation au vortex pendant quelques secondes et une centrifugation pour 2 minutes à la température de la pièce et à 16 000 x g sont suivis de la précipitation de l'ADN avec 50 µL d'isopropanol. Une incubation à la température de la pièce pendant 5 minutes et une centrifugation pour un même laps de temps, à une vitesse de 16 000 x g (température de la pièce) précèdent l'enlèvement de la phase aqueuse et le séchage du culot. Celui-ci est finalement dissout dans 50 µL d'eau stérile.

7.2 Extraction de plasmides de la souche *E. coli* DH11S

Une culture d'*E. coli* DH11S est préparée dans 5 mL de 2xTY contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) à partir d'une colonie blanche obtenue suite à la transformation de la souche avec le plasmide pTZ19R recombinant (section 6.2). Après une incubation pendant la nuit à 37°C sous agitation (240 rpm), un prélèvement de 1,5 mL de la culture est centrifugé une trentaine de secondes à la vitesse maximale (16 000 x g) et à la température de la pièce. Le surnageant est alors éliminé et le culot est resuspendu dans 200 µL de la solution I (glucose 50 mM, Tris pH 8,0 25 mM, EDTA 10 mM). Ensuite, 200 µL de la solution II (SDS 1 % (p/v), NaOH 0,2 N) sont ajoutés et le tout est mélangé par inversion. La solution III (60 mL d'acétate de potassium 5M, 11,5 mL d'acide acétique et 28,5 mL d'eau) est additionnée en suivant le même procédé que pour la solution II. Une centrifugation de 5 minutes à la température de la pièce et à 16 000 x g est suivie du transfert du surnageant dans un second microtube à lequel sont ajoutés 420 µL d'isopropanol. Après une incubation de 10 minutes à la température de la pièce, une

dernière centrifugation de 10 minutes est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est éliminé, le culot est séché et resuspendu dans 50 μ L de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0).

7.3 Extraction d'ADN simple brin de phage M13 de la souche *E. coli* DH11S

Une culture d'*E. coli* DH11S est préparée dans un milieu 2xTY. Suite à une incubation de 16 heures à 37°C et sous agitation (240 rpm), une dilution 1/100 de la culture est incubée pendant 1 heure dans les mêmes conditions. À l'aide d'un cure-dent stérile, une plage trouble, obtenue sur un milieu H lors de la transformation d'*E. coli* avec le phage M13mp18 ou M13mp19 recombinant (section 6.2), est repiquée dans 1,5 mL de la culture préparée précédemment. Après avoir incubé pendant 6 heures à 37°C et sous agitation (240 rpm), la culture est transférée dans un microtube et centrifugée pendant 10 minutes à la température de la pièce (16 000 x g). On mélange un mL du surnageant avec 0,25 mL de polyéthylène glycol 20 % (v/v) + NaCl 2,5 M et le tout est gardé à 4°C pour la nuit. Le lendemain, une centrifugation de 10 minutes à 16 000 x g (température de la pièce) est suivie de l'élimination du surnageant et la resuspension du culot dans 100 μ L de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Suite à l'ajout de 50 μ L de phénol saturé, l'échantillon est agité au vortex pendant 10 secondes et incubé pour 15 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 50 μ L de chloroforme sont ajoutés, une agitation au vortex, une incubation de 5 minutes à la température de la pièce et une centrifugation de 5 minutes à 16 000 x g sont alors effectuées. La phase aqueuse est récupérée dans un microtube contenant 0,1 volume de sodium acétate (NaAc) 3 M pH 5,2. Après avoir ajouté 2 volumes d'EtOH 95 % (v/v), la précipitation de l'ADN est effectuée à -20°C et requiert au moins 1 heure. Une centrifugation de 10 minutes est effectuée à la température de la pièce à 16 000 x g, le surnageant est éliminé, le culot est séché et resuspendu dans 30 μ L d'eau distillée stérile. Par la suite, un mélange composé de 1 μ L de M13mp18 recombinant, 1 μ L de M13mp19 recombinant, 1 μ L de NaCl 2 M et 5 μ L d'eau distillée stérilisée est préparé. Une incubation à 90°C est requise, puis on laisse refroidir jusqu'à la température de la pièce. Une centrifugation de 5 secondes à la température de la pièce et à 16 000 x g précède l'ajout de 2 μ L de nucléase S1 diluée à 1

U/ μ L dans le tampon S1 5X. Il est nécessaire de centrifuger à nouveau pour 5 secondes, avant d'incuber à 37°C pour 30 minutes. Le tout est analysé à l'aide d'un gel d'agarose 0,7 % (p/v).

8. Analyse du niveau de transcription

8.1 Isolement d'ARN total (Maniatis *et al*, 1982)

Cette étape requiert la préparation d'une culture dans 20 mL de TSB contenant 20 μ L de thioestrepton 5 mg/mL et du glucose à une concentration finale de 1 % (p/v). Le tout doit être incubé à 34°C, sous agitation (240 rpm) jusqu'au moment où la croissance se retrouve en phase exponentielle (24 à 36 heures). Par la suite, une centrifugation à la température de la pièce pendant 10 minutes à 4000 x g permet la récupération du mycélium lequel est resuspendu dans 5 mL de la solution D (isothiocyanate de guanidium 4 M ; citrate de sodium 25 mM, pH 7 ; sarkosyl 0,5 % (p/v) ; 2-mercaptoéthanol 0,72 % (v/v)). Les cellules sont alors brisées à la presse de French (American Instrument Co.) avec une pression de 10 000 psi. Une centrifugation à 4°C pendant 20 minutes, à 27 000 x g est effectuée, puis un prélèvement de 5 mL de l'extrait cellulaire est transféré dans un tube stérile. À ceci sont ajoutés 2 g de chlorure de césium (CsCl) et, suite à une agitation au vortex, le mélange obtenu est déposé sur un coussin de 1,2 mL de CsCl 5,7 M dans EDTA 0,1 M (pH 7,5). La préparation est ultracentrifugée à 20°C pendant 16 heures à 100 000 x g. Le culot ainsi obtenu est récupéré dans 100 μ L d'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate). Pour s'assurer de la pureté de l'ARN, deux extractions avec du chloroforme-alcool isoamylique sont effectuées dans un volume 1:1. Finalement, une précipitation de l'ARN est réalisée à -20°C pour la nuit et ce, à l'aide de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2,2 volumes d'éthanol 95 % (v/v). L'ARN est récupéré lors d'une centrifugation de 30 minutes à 16 000 x g (température de la pièce) et est resuspendu dans 300 μ L d'eau traitée au DEPC. Le dosage de l'ARN est effectué à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Pharmacia LKB (modèle Ultrospec III).

8.2 Buvardage de l'ARN (Maniatis et *al*, 1982)

Les échantillons comportent tous 5 µg d'ARN dissout dans 10 µL d'eau traitée au DEPC. À ceci sont ajoutés 20 µL de formamide 100 % (v/v), 7 µL de formaldéhyde 37 % (v/v) et 2 µL de SSC 20 X (NaCl 3 M ; citrate trisodique 0,3 M). Après une incubation de 15 minutes à 68°C pour dénaturer l'ARN, les échantillons sont refroidis sur la glace et 2 volumes de SSC 20 X sont ajoutés. Une membrane de nitrocellulose (8 cm x 10 cm) imbibée d'eau est incubée pendant une heure dans la solution SSC 20 X. Pendant ce temps, l'appareil à buvardage (Bio-Rad, BIO-DOT SF) est nettoyé avec du NaOH 0,1 N et rincé avec de l'eau stérile. Deux papiers absorbants imbibés de la solution SSC 20 X et la membrane de nitrocellulose sont placés dans l'appareil, selon les instructions du fournisseur. Tous les puits sont remplis de SSC 10 X et une légère succion est appliquée. Une fois que tout le liquide est passé, le procédé est recommencé pour une deuxième fois. Les échantillons sont alors buvardés sous vide et les puits sont rincés deux fois avec un mL de SSC 10 X. La membrane est bien séchée et cuite au four à vide à 80°C pendant 2 heures.

8.3 Préparation de la sonde ("Nick translation", Maniatis et *al*, 1982)

Dans un volume final de 20 µL, le mélange suivant est préparé : 0,1 µg d'ADN double brin à marquer, 3 µL de dNTP (1 µL de dATP 2 mM, 1 µL de dGTP 2 mM, 1 µL de dTTP 2 mM), 20 µCi de [α^{32} P] dCTP, 2 µL du tampon 10 X et 2 µL de la solution d'enzyme fournis dans la trousse de marquage par déplacement de l'encoche (Roche). Une incubation de 35 minutes à 15°C est suivie de l'arrêt de la réaction enzymatique lors de l'ajout de 2 µL EDTA 0,2 mol/L (pH 8.0) et lors d'une incubation de 10 minutes à 65°C. Il est maintenant nécessaire d'éliminer les désoxyribonucléotides radioactifs non incorporés par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-50 (voir la section suivante). À la sonde sont d'abord ajoutés 80 µL de TE et le tout est passé sur la colonne. Celle-ci est préalablement placée dans un tube de 10 mL au fond duquel un microtube est disposé de manière à recueillir la sonde. Suite à une centrifugation à la température de la pièce pendant 4 minutes à 1 500 x g, 100 µL de TE sont ajoutés sur la colonne et une seconde centrifugation est effectuée. La sonde (200 µL) est finalement bouillie pendant 10 minutes et conservée à 4°C.

8.4 Préparation de la colonne de Sephadex G-50

Une colonne est préparée à l'aide d'une seringue de 1 cc de laquelle le piston a été enlevé et l'extrémité inférieure a été bouchée avec de la laine siliconisée. La résine utilisée est du Sephadex G-50 dont 1 mL est contenu dans la colonne. Celle-ci est placée dans un tube de 10 mL et une centrifugation de quelques secondes à une vitesse de 1 500 x g est effectuée à la température de la pièce. Ensuite, le volume de résine est complété à 1 mL, puis le tout est centrifugé à nouveau. Le procédé est recommencé jusqu'à ce que le volume soit maintenu à 1 mL. Enfin, il est nécessaire de faire passer 100 µL de TE pour équilibrer la colonne et, suite à une centrifugation de 4 minutes à la température de la pièce (1 500 x g), cette dernière est prête pour la purification de la sonde (section 8.3).

8.5 Préhybridation et hybridation

La membrane de nitrocellulose, sur laquelle ont été déposés les échantillons d'ARN, est préhybridée pendant au moins 1 heure à 68°C. Le tampon de préhybridation est constitué de SSC 3X, Na₂HPO₄ 50 mM, SDS 0,1 % (p/v), Denhardt 5 X (Denhardt 5 X : 10 g/L de Ficoll de type 400, 10 g/L de polyvinylpyrrolidone, 10 g/L de BSA) et ADN de sperme de saumon 0,01 mg/mL. La sonde est ensuite ajoutée au tampon et une incubation pour la nuit à 68°C est nécessaire. Le lendemain, deux lavages de 30 minutes sont effectués à 68°C dans une solution composée de SSC 0,1 X et de SDS 0,1 % (p/v). La membrane est alors exposée sur un écran (Phosphor screen, Molecular Dynamics) et, après 24 heures, le résultat peut être visualisé à l'aide du PhosphorImager (Molecular Dynamics). Enfin, la résolution de l'image est ajustée à l'aide du logiciel Image Quant 5.0.

9. Analyse des protéines

9.1 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry et *al* (1951). La solution standard utilisée est l'albumine de sérum bovin (BSA).

9.2 Préparation des échantillons protéiques

La souche est ensemencée dans 6 mL de TSB-glucose 1 % (p/v) additionnés de thiostrepton 5 µg/mL. Le tout est incubé à 34°C pour 24 heures sous agitation (240 rpm). Chaque pré-culture obtenue est transvidée dans 100 mL de milieu M14 contenant 5 µg/mL de thiostrepton et du glucose à une concentration finale de 1 % (p/v). Une incubation pendant 48 heures sous agitation (240 rpm) et à une température de 34°C est requise, avant de prélever un premier échantillon de 1500 µL. Le reste est ré-incubé pour 24 heures supplémentaires, puis un second prélèvement est fait. Des pré-cultures et des cultures, pour lesquelles la source de carbone utilisée est le xylose à une concentration de 1 % (p/v), sont aussi préparées. Les prélèvements de 48 et 72 heures sont centrifugés pendant 5 minutes à 16 000 x g et à la température de la pièce pour séparer le surnageant de culture du mycélium. Chaque surnageant est transféré dans un second microtube, l'ajout de deux volumes d'acétone à un volume de surnageant précède une incubation du mélange à 4 °C pendant une heure. Le culot obtenu, suite à une centrifugation de 15 minutes à 16 000 x g (température de la pièce), est resuspendu dans 60 µL de tampon d'échantillon 5X (SDS 2 % (p/v), glycérol 20 % (v/v), β-mercaptoéthanol 5 % (v/v), bleu de bromophénol 0,05 % (v/v) et Tris-HCl 62.5 mM, pH 6,8). Quant au mycélium, les cellules sont resuspendues directement dans 150 µL du tampon décrit ci-dessus. Afin de dénaturer les protéines avant leur séparation dans un gel de polyacrylamide, les échantillons sont bouillis pendant 10 minutes.

9.3 Culture en fermenteur de 14 L

Des pré-cultures sont aussi préparées dans 25 mL de culture liquide. Le transfert se fait alors dans 400 mL du milieu M14-glucose (ou xylose) 1 % (p/v) ajoutés de 5 µg/mL de thiostrepton. Après une incubation de 48 heures, un transfert est effectué dans 7 L du même milieu minimal. Une croissance de 48 ou 72 heures précède une filtration de la culture sur un papier filtre Whatman no.1. D'une part, le surnageant est concentré selon la méthode d'ultrafiltration à débit tangentiel à l'aide du système Pellicon (Millipore). Les membranes utilisées avec cet appareil sont conservées à 4°C dans du formaldéhyde 4 % (v/v). Un rinçage doit donc d'abord être effectué, ceci avec 4 litres d'eau distillée et 4 litres de tampon phosphate 50 mM pH 6.0. Ensuite, l'entrée au

système est placée dans le surnageant à concentrer et la pompe est mise en fonction. Le rétentat est recueilli à un débit d'environ 500 mL/min, alors que le débit pour le filtrat est ajusté à un maximum de 100 mL/min. Une fois le surnageant concentré jusqu'au volume désiré (environ 200 mL), un rinçage des membranes avec 200 mL du tampon phosphate est nécessaire pour récupérer le volume du surnageant présent dans le système. D'autre part, le mycélium est brisé par sonication (Sonicateur modèle XL2020). Pour ce faire, les cellules sont d'abord resuspendues dans le tampon phosphate (phosphate de sodium 20 mM, chlorure de sodium 500 mM, dithiothreitol 2 mM, pH 7.4) et le tout est conservé sur la glace. Les ultrasons sont émis dans le mélange avec une intensité appropriée ($\approx 20\%$ du maximum) pendant une minute, suivi d'un repos d'une minute pour éviter la dénaturation par la chaleur. Le procédé est répété jusqu'à ce que la solution devienne homogène. Pour s'assurer que les cellules sont bien cassées, une observation au microscope doit être faite. Par la suite, une centrifugation d'une heure à 4°C, 27 000 x g permet l'élimination des débris cellulaires. Le surnageant résultant est concentré dans un appareil Amicon à l'aide d'une membrane de porosité de 3 kDa (Pall Filtron). Ceci se déroule à 4°C sous une pression de 45 psi jusqu'à l'obtention d'un volume final de 10 mL. Un prélèvement de 24 μ L d'un surnageant concentré est mélangé avec 6 μ L de tampon d'échantillon 5 X. Le tout est bouilli pendant 10 minutes, puis centrifugé à la température de la pièce pendant quelques secondes à 16 000 x g.

9.4 Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide, en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS), sont effectuées d'après le protocole de Laemmli et *al* (1970) à l'aide des appareils Mini Protean II (Bio-Rad). Chaque échantillon préparé précédemment est déposé dans un puits du gel, de même qu'un standard de masse moléculaire (Low Molecular Weight pour les gels à colorer; le marqueur Rainbow pour les gels à transférer). La migration s'effectue à 200 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel (environ 45 minutes). Le tampon d'électrophorèse utilisé est constitué de glycine 0,192 M, de SDS 0,1 % (p/v) et de Tris 0,025 M, pH 8,3. Suite à la migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie 0,1 % (p/v) R-250 (dans le méthanol 40 % (v/v))

et l'acide acétique glacial 10 % (v/v)) ou transférés sur une membrane de nylon chargée positivement.

Coloration au bleu de Coomassie des gels de polyacrylamide

Les gels sont incubés pendant 30 minutes dans la solution de bleu de Coomassie décrite précédemment, puis ils sont décolorés dans un mélange constitué de méthanol 40 % (v/v) et d'acide acétique glacial 10 % (v/v). Enfin, dans le but de conserver les gels, ceux-ci sont déposés dans du glycérol 10 % (p/v), avant d'être séchés entre 2 films de la trousse «Gel Drying Film» de la compagnie Promega.

Transfert de protéines et révélation de membranes

Les protéines du gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim), à l'aide de l'appareil Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad. Pour ce faire, le gel et la membrane sont placés entre deux papiers buvards et une tension de 20 volts est exercée pendant 15 minutes. Le tampon de transfert utilisé est constitué de Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8.3 (Towbin *et al.*, 1979). En ce qui concerne la révélation, la membrane est d'abord incubée pendant 1 heure dans 40 mL de la solution de blocage (lait écrémé 5 % (p/v) dans du TBS (Tris 65 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5)). Par la suite, la membrane est transférée dans la solution d'anticorps primaires diluée dans du lait écrémé 1 % (p/v)) et incubée pendant une heure. Quatre lavages de 5 minutes sont effectués dans du TBS, puis la membrane est incubée pendant 30 minutes en présence de l'anticorps secondaires (15 µL d'anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dans 15 mL de lait écrémé 1 % (p/v)). Une seconde étape de lavage, identique à celle précédemment effectuée, précède l'ajout du substrat (9,6 mL d'eau distillée, 100 µL KH₂PO₄ 1M, 100 µL (NH₄)₂SO₄ 1M, 50 µL de peroxyde d'hydrogène 3 % (v/v) et 200 µL d'*o*-dianisidine 0,5 % (p/v) dans le méthanol 100 % (v/v)). Finalement, la réaction est arrêtée par un rinçage à l'eau. L'antisérum de lapin spécifique à l'arabinofuranosidase B (AbfB) ou à la cellulase A (CelA) peut aussi être utilisé comme anticorps primaire. L'anticorps secondaire est constitué de 15 µL d'anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline dans 15 mL de lait écrémé 1 % (p/v) /TBS sont utilisés. La révélation est effectuée avec 15 µL de la

solution de chlorure de nitro bleu tétrazolium/phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (Boehringer) dans 10 mL de la solution de coloration constituée de Tris 100 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 % (p/v), NaCl 100 mM (pH 9,5).

10. Purification des protéines PE-PGRS par chromatographie d'affinité

Les protéines additionnées d'une queue d'histidine sont purifiées lors d'une chromatographie d'affinité. À cet effet, une colonne HiTrap Chelating de 5 mL (Pharmacia), l'appareil FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Waters 625 LC system, Millipore), un détecteur UV (Waters 484, Millipore), un collecteur de fraction (Pharmacia, Fine Chemicals Frac-300) et deux tampons ont été utilisés. Les tampons de départ (phosphate de sodium 20 mM, chlorure de sodium 500 mM, DTT 2 mM, pH 7.4) et d'élution (phosphate de sodium 20 mM, chlorure de sodium 500 mM, DTT 2 mM, imidazole 500 mM, pH 7.4) sont préalablement filtrés sur une membrane de 0,2 μm (Gelman Sciences). Il en est de même pour l'échantillon qui est filtré, toutefois, sur une membrane provenant de la compagnie Millipore. L'injection se fait sur une colonne qui a d'abord été conditionnée. Ceci se fait en trois étapes : la première consiste à faire un lavage avec 15 mL d'eau déionisée; la seconde est l'injection de 2,5 mL de NiSO_4 0,1 M; la troisième est un deuxième lavage, cette fois avec 10 mL d'eau déionisée. Ensuite, la colonne est équilibrée avec 10 mL du tampon de départ. Fait à noter, ces étapes se déroulent à un débit de 1 mL/minute, alors que l'injection de l'échantillon peut être faite à un débit de 2 mL/minute. La colonne est lavée avec le tampon de départ jusqu'à ce que les protéines ne s'accrochant pas à la colonne soient éliminées. Il est possible de déterminer ce moment, grâce à un détecteur UV et au chromatogramme. Par la suite, un programme d'élution est sélectionné, celui-ci est décrit au tableau V. L'élution des protéines fixées sur la colonne s'est faite par passage d'un gradient ascendant d'imidazole (0 à 0,5 M) et en récoltant des fractions de 2 mL.

Tableau V: Programme d'élution

Temps (min)	Débit (mL/min)	Tampon A (%)	Tampon B (%)
Initiale	2,0	100	0
20,00	2,0	92	8
30,00	2,0	92	8
35,00	2,0	70	30
45,00	2,0	70	30
50,00	2,0	0	100
60,00	2,0	0	100
61,00	2,0	100	0

Tampon A : tampon de départ; Tampon B : tampon d'élution

Le surnageant de départ (avant passage sur la colonne), la fraction contenant les protéines non retenues sur la colonne et les différentes fractions d'élution sont analysés par SDS-PAGE (12%) et sont transférés sur une membrane pour l'immunodétection.

11. Identification de l'extrémité N-terminale des protéines d'intérêt

Une migration dans un gel de polyacrylamide est effectuée dans des conditions dénaturantes à 150 volts pour 170 volt-heure (V-h). Le gel obtenu est rincé avec le tampon de transfert (CAPS 10 mM, méthanol 10 % (v/v), pH 11,0) pendant 5 minutes et une membrane PVDF (polyvinylidene difluoride) est rincée dans le méthanol 100 % (v/v) pendant une minute, avant de subir un rinçage identique à celui du gel. Un transfert est effectué à l'aide du système Mini-TransBlot (Bio-Rad) pendant 15 minutes, à 250 mA. La membrane est lavée avec de l'eau distillée pour 5 minutes, puis elle est incubée pendant une minute dans la solution de bleu de Coomassie 0,1 % (p/v) R-250 (dissout dans le méthanol 40 % (v/v) et l'acide acétique glacial 10 % (v/v)). La décoloration s'effectue par des lavages successifs dans la solution de méthanol 50 % (v/v) et d'acide

acétique glacial 10 % (v/v) durant un maximum de 5 à 7 minutes. La membrane est séchée à la température de la pièce, avant d'être entreposée à -20 °C dans l'obscurité. La méthode d'Edman est la réaction choisie pour la détermination rapide de la séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt. Ceci a été effectué au Centre de Biotechnologie Sheldon de l'Université McGill avec le séquenceur automatisé Applied Biosystems 492 gas-phase/pulsed-liquid Procise.

III- RÉSULTATS

1. Gènes d'intérêt auxquels sont ajoutés six codons histidine

1.1 Amplification des gènes d'intérêt à partir de l'ADN génomique de la souche BCG

Des essais ont été effectués de manière à amplifier les gènes *PE-PGRS* sélectionnés avec, à leur extrémité 5', un site de restriction *SphI* (5'-GCATGC-3') ou *EcoRI* (5'-GAATTC-3'), six codons histidine, suivis de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase Xa (ATCGAGGGCCGG); à leur extrémité 3', ajout du site de restriction *SacI* (5'-GAGCTC-3'). Des essais ont également été faits pour synthétiser les gènes avec les codons histidine à leur extrémité 3'.

L'utilisation de l'ADN génomique non digéré, ainsi que la *Taq* ADN polymérase selon les recommandations du fournisseur n'a pas permis l'obtention de fragments de longueur attendue (*Rv3812-5 His* : 1550 pb, *Rv1759c-5'His* : 2802 pb, *Rv1651c-5 His* : 3071 pb). La première modification apportée a été au niveau de l'ADN. Celui-ci a été digéré avec les enzymes *EcoRI* et *SacI*. À lui seul, ce changement n'a rien apporté, mais avec le remplacement de la polymérase *Taq* par la *Pwo*, les amplifications du gène *Rv3812* ont été possibles.

D'une part, les amorces *Rv3812-5'* et *Rv3812-3'* ont permis l'obtention du gène auquel ont été ajoutés six codons histidine à l'extrémité 5' (*Rv3812-5'His*). D'autre part, le gène *Rv3812-3'His* a été polymérisé à l'aide des amorces *3812-5'* et *3812-3'His*. Les amplicons ont été vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (figure 12a, puits 3) et purifiés (figure 12b, puits 3).

Les gènes *Rv1651c* et *Rv1759c* étant plus longs que le précédent, le passage du temps d'élongation de 1 minute à 3 minutes semblait une bonne alternative. De cette façon, le gène *Rv1651c-5'His* a été amplifié avec les amorces *Rv1651c-5'* et *Rv1651c-3'*. L'analyse des fragments est présentée à la figure 12a, puits 2 et la purification de la bande d'ADN à environ 3,0 kb se trouve à la figure 12b. Les gènes *Rv3812-5'His*, *-3'His* et *Rv1651c-5'His* ont été digérés avec les enzymes de restriction *SphI-SacI*, puis ligués au vecteur pIAFC109 digéré avec les mêmes enzymes.

N'ayant pas obtenu les gènes *Rv1651c-3'His*, *Rv1759c-5'His* et *-3'His*, la possibilité de les synthétiser en deux fragments a été envisagée (schéma, figure 13). Il est alors nécessaire d'utiliser des amorces pouvant s'apparier près du centre du gène d'intérêt et comprenant un site de restriction unique du gène. Pour *Rv1759c-5'His*, un premier PCR a été fait avec les amorces *Rv1759c-5'* et *Rv1759c3-1545 nt*, ce qui a favorisé la synthèse d'un fragment de près de 1,6 kb comprenant la portion 5' du gène jusqu'au site de restriction unique *PstI*. Une seconde réaction, cette fois avec les amorces *Rv1759c5-1522 nt* et *Rv1759c-3'*, a permis la synthèse du fragment composé de la portion 3' du gène à partir du site *PstI* (1,2 kb). Par analyse des fragments en gel d'agarose (figure 14, puits 2 et 3), il est possible de constater que les amplifications ont réussi. Le gène *Rv1759c-3'His* a également été polymérisé en suivant la même approche, mais avec les amorces *1759c-5'*, *Rv1759c3-1545 nt* et *Rv1759c5-1522 nt*, *1759c-3'His*.

La digestion des fragments avec les enzymes de restriction *EcoRI-SacI* est suivie d'une ligation dans le vecteur pIAFC109MCS. Pour ce qui est du gène *Rv1651c-3'His*, étant donné la présence d'un site de restriction *SacII* unique et situé près du centre du gène, la perspective d'une amplification et d'un clonage en deux étapes a aussi été envisagée. En premier lieu, les amorces *1651c-5'* et *Rv1651c3-1426 nt* ont été utilisées pour amplifier le fragment de 1,4 kb en 5' du gène. En deuxième lieu, les amorces *Rv1651c5-1407 nt* et *1651c-3'His* ont servi à l'amplification du reste du gène d'intérêt (1,6 kb). La figure 15 montre les résultats obtenus en gel d'agarose 0,7 %. Seule la portion 3' du gène (puits 2) a pu être obtenue, la taille du fragment correspondant à la portion 5' n'étant pas conforme à celle attendue, il manque plus de 400 pb (puits 3).

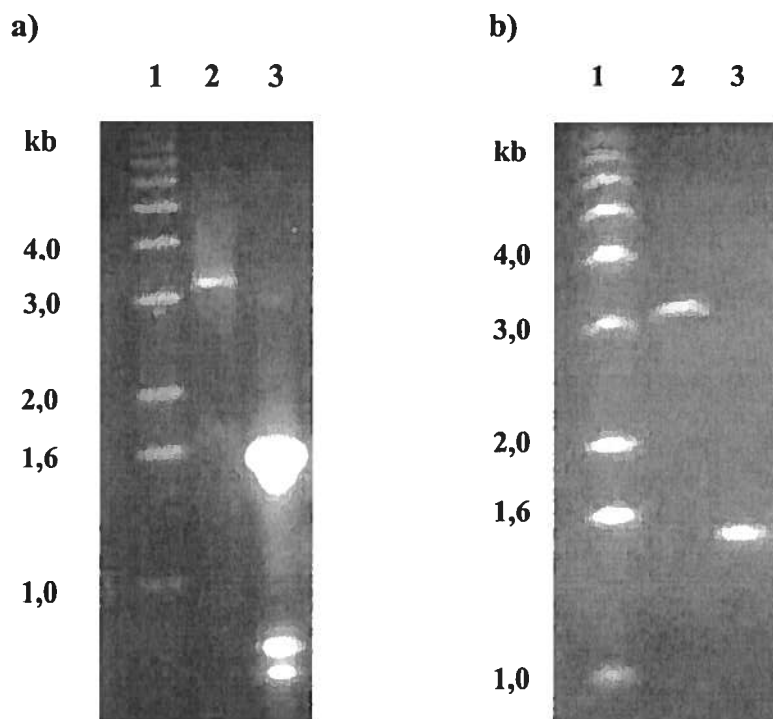


Figure 12a : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des gènes *Rv1651c-5'His* et *Rv3812-5'His* amplifiés. Résultats des PCR effectués à partir de l'ADN génomique de la souche BCG. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 : gène *Rv1651c-5'His* de 3071 pb, puits 3 : gène *Rv3812-5'His* de 1550 pb.

Figure 12b: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des fragments d'ADN purifiés. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 : purification du gène *Rv1651c-5'His*, puits 3 : purification du gène *Rv3812-5'His*.

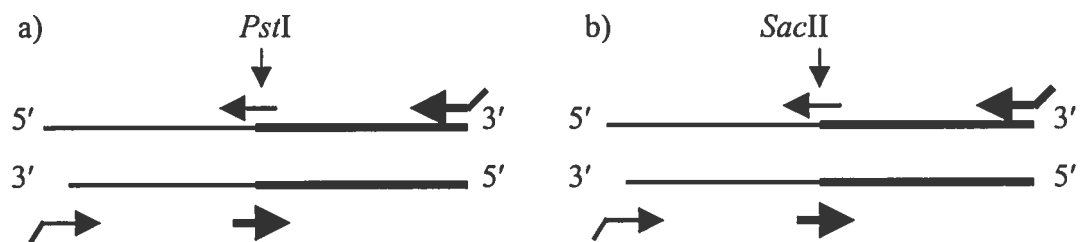


Figure 13 : a) Schéma d'amplification des gènes *Rv1759c*-5'His et -3'His en deux fragments
b) Schéma d'amplification du gène *Rv1651c*-3'His en deux fragments

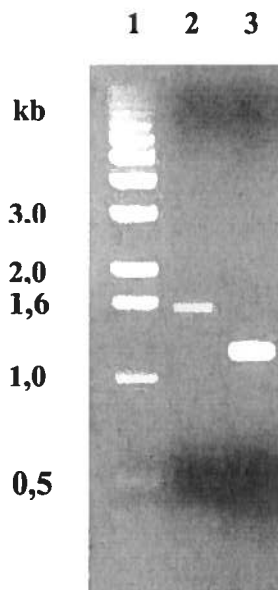


Figure 14 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des portions 5' et 3' du gène *Rv1759c*-5'His amplifiées. Résultats des PCR effectués à partir de l'ADN génomique de la souche BCG. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 : portion 5' du gène *Rv1759c*-5'His de 1587 pb, puits 3 : portion 3' du gène *Rv1759c*-5'His de 1215 pb.

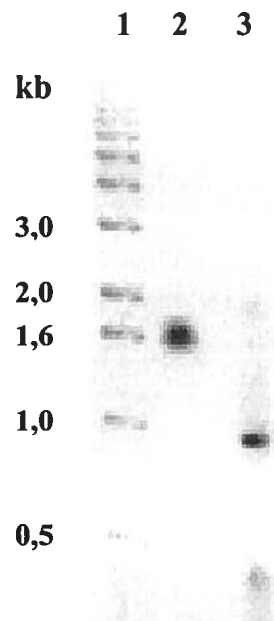


Figure 15: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des portions 3' et 5' du gène *Rv1651c-3'His* amplifiées. Résultats des PCR effectués à partir de l'ADN génomique de la souche BCG. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 : portion 3' du gène *Rv1651c-3'His* de 1626 pb, puits 3 : portion 5' du gène *Rv1651c-3'His* de 1445 pb attendu.

1.2 Transformation de la souche *S. lividans* 10-164

L'ADN recombinant est introduit dans des protoplastes de la souche *S. lividans* 10-164 à l'aide de polyéthylène glycol. Étant donné la présence d'un gène de résistance au thiostrepton (tsr^r) sur le vecteur (pIAFC109 ou pIAFC109MCS), la sélection des transformants se fait facilement. Le tableau VI résume le nombre de colonies ayant poussé sur le milieu R5 et ce, en présence de thiostrepton. Très peu de colonies résistantes à l'antibiotique ont été obtenues (tableau VI).

Tableau VI : Résultats de la transformation de protoplastes de *S. lividans* 10-164

Plasmide	Insert	Colonies tsr^r (transformants)
pIAFC109	<i>Rv3812-5'His</i>	11
pIAFC109	<i>Rv3812-3'His</i>	21
pIAFC109	<i>Rv1651c-5'His</i>	9
pIAFC109MCS	<i>(Rv1759c-1+Rv1759c-2)-5'His</i>	10
pIAFC109MCS	<i>(Rv1759c-1+Rv1759c-2)-3'His</i>	8
pIAFC109 non digéré (contrôle positif)	-----	> 100
pIAFC109 digéré (contrôle négatif)	-----	0

1.3 Extraction de plasmides de la souche *S. lividans* 10-164

En premier lieu, des cultures liquides de 8 transformants *S. lividans* 10-164/pIAF3812-5His ont été préparées dans 5 mL de TSB contenant 5 µg/mL de thiostrepton. L'extraction d'ADN a été effectuée, mais aucun plasmide représenté à la figure 16 n'a pu être observé par analyse en gel d'agarose 0,7 %. Les cultures ont donc été préparées à nouveau, excepté que 2 % de glucose ont été ajoutés au milieu de base, afin de réprimer quelque peu l'expression du gène à l'étude (F. Shareck PhD (INRS-IAF), communication personnelle). À partir de ce moment, l'extraction de plasmide chez 5 transformants *S. lividans* 10-164/pIAF3812-5His a été possible (figure 16). Les plasmides isolés ont été digérés avec les enzymes de restriction utilisées lors du clonage, il a ainsi été possible de voir 2 bandes sur le gel d'agarose 0,7 %. La plus grande est de 5-6 kb et correspond au vecteur, alors que la plus courte est l'insert de 1,6 kb (*Rv3812-5'His*). L'extraction de plasmide recombinant portant l'insert *Rv3812-3'His* a été tentée directement à partir d'un milieu avec du glucose (tout comme les prochaines extractions). Cinq transformants ont été testés et les résultats obtenus, suite à la digestion des extraits avec les enzymes *SphI-SacI*, sont similaires à ceux obtenus précédemment.

Quant à l'extraction du plasmide recombinant pIAF1651c-5His, elle a été faite à partir de 8 transformants, mais aucun plasmide d'intérêt (construction, figure 17) n'a pu être obtenu. Pour ce qui est du gène *Rv1759c-5'His*, l'extraction a été tentée chez 8 clones, mais aucun n'avait le vecteur recombinant au complet (construction, figure 18). Pour l'insert *Rv1759c-3'His*, 6 clones ont été testés et, après digestion des extraits avec les enzymes permettant la libération de l'insert (*EcoRI-SacI*), il a été possible de constater la présence du vecteur recombinant d'intérêt chez un clone. En effet, un fragment de 2,8 kb (insert) et un de 5,0 kb (vecteur) ont été obtenus pour l'un des clones. Les résultats d'analyse sur gel d'agarose sont représentés aux figures 19 et 20.

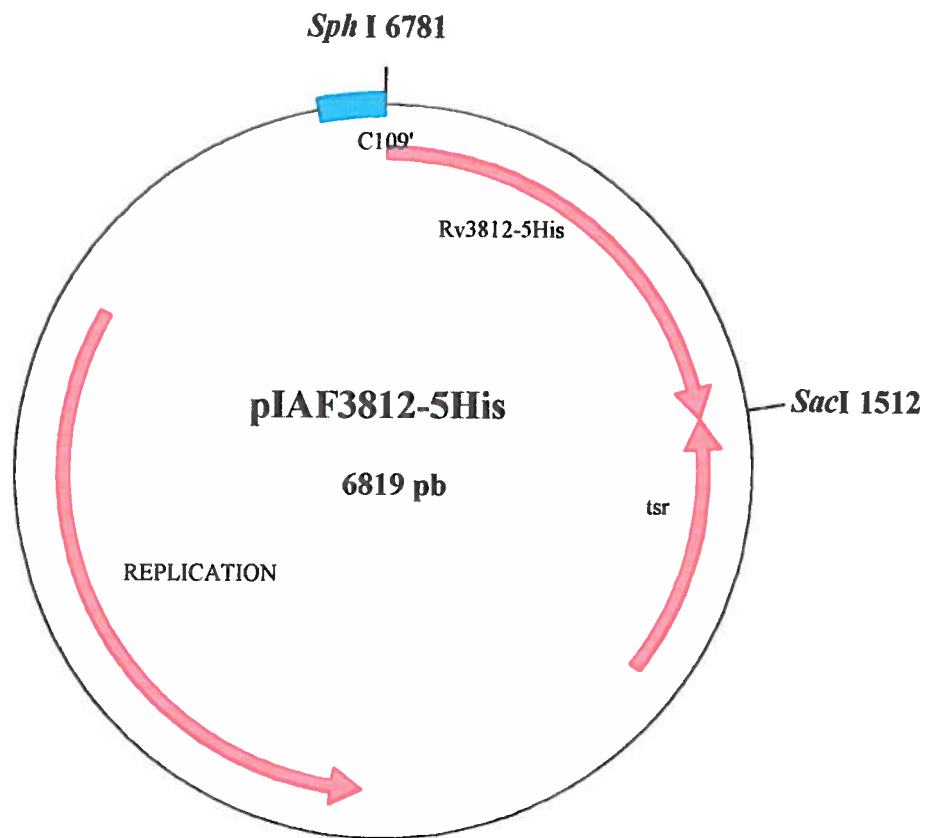


Figure 16 : Carte physique du plasmide pIAF3812-5His. Rv3812-5His, gène *Rv3812-5'His*; tsr, gène de résistance au thiostrepton; réPLICATION, origine de réPLICATION du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de clonage sont en gras.

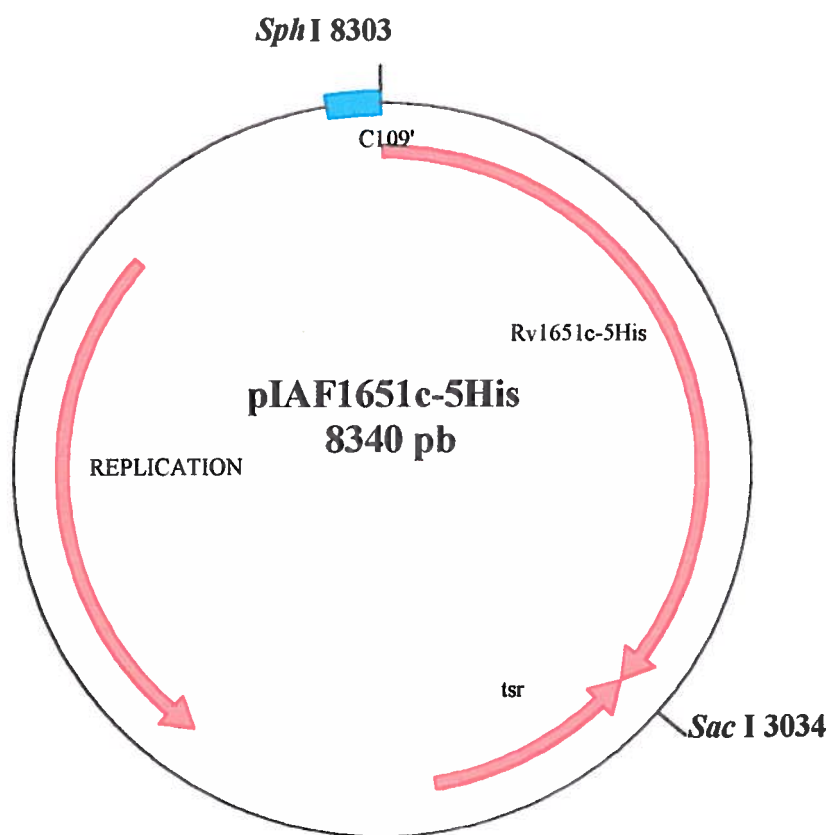


Figure 17 : Carte physique du plasmide pIAF1651c-5His. *Rv1651c-5His*, gène *Rv1651c-5'His*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; répllication, origine de répllication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de clonage sont en gras.

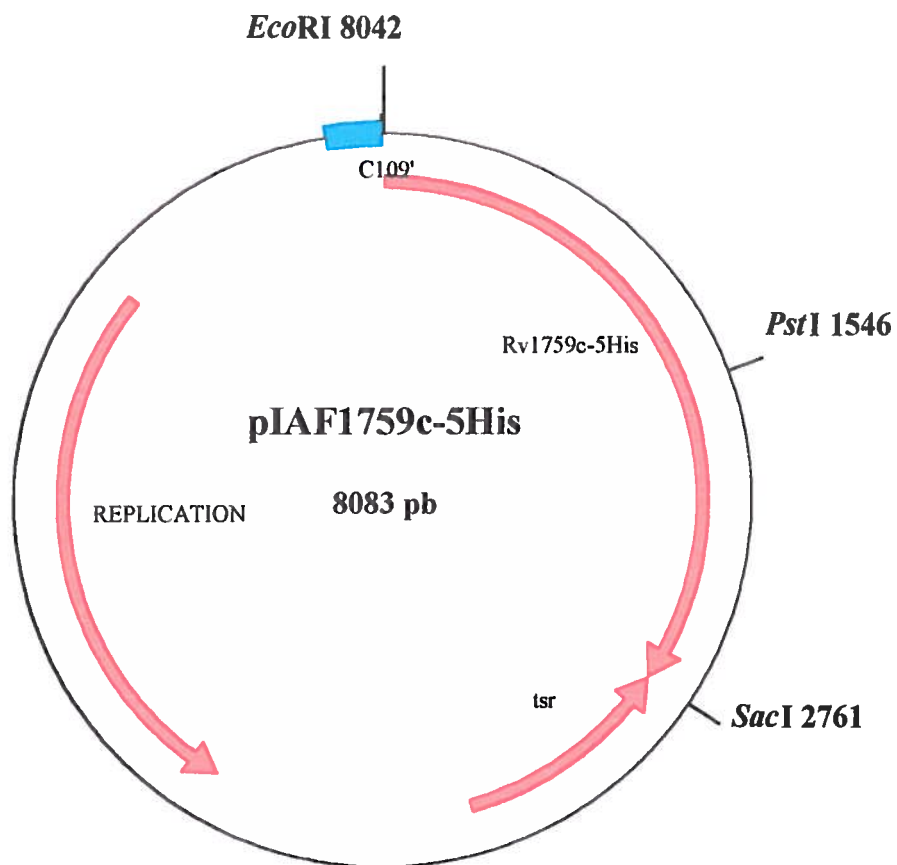


Figure 18 : Carte physique du plasmide pIAF1759c-5His. Rv1759c-5His, gène *Rv1759c-5'His*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; réPLICATION, origine de réPLICATION du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de clonage sont en gras.

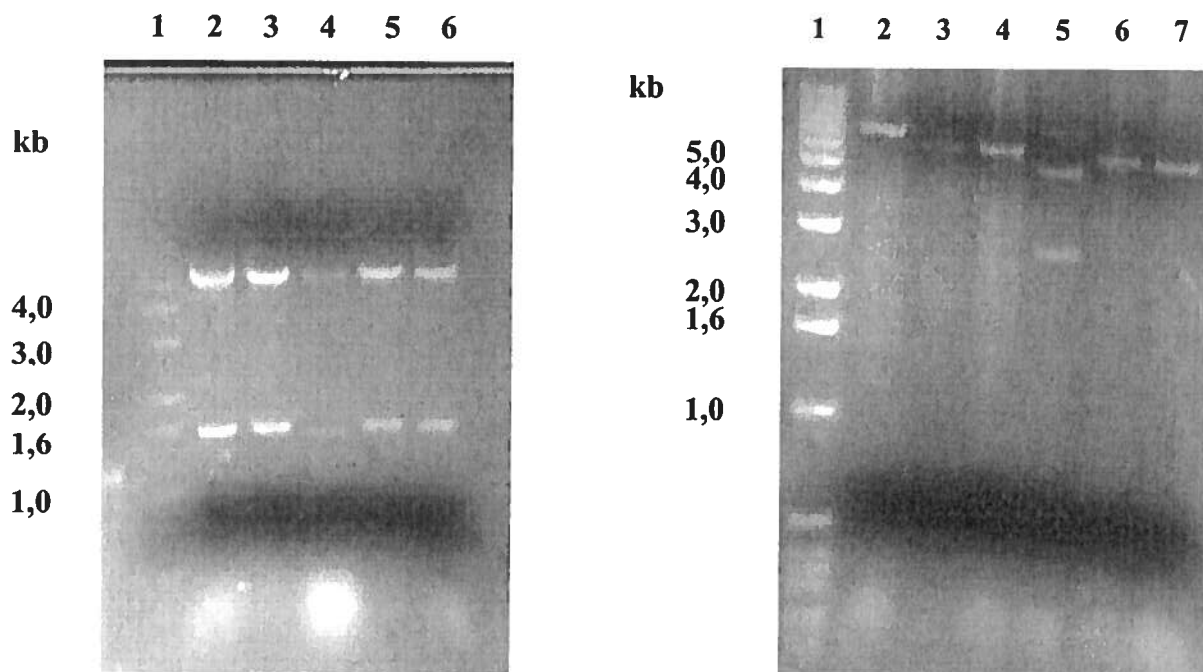


Figure 19 (à gauche): Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF3812-5His. Une digestion avec les enzymes de restriction du clonage a été effectuée. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 à 6 : plasmides extraits des transformants *S. lividans* 10-164 et digérés avec les enzymes de restriction *SphI-SacI*. Les bandes à environ 5,0 et 1,6 kb représentent le plasmide pIAFC109 et le gène *Rv3812-5'His* respectivement.

Figure 20 (à droite): Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF1759c-3His. Une digestion avec les enzymes de restriction du clonage a été effectuée. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 à 7 : plasmides extraits des transformants de *S. lividans* 10-164 et digérés avec les enzymes de restriction *EcoRI-SacI*. Les bandes à environ 5,0 et 2,8 kb du puits 5 représentent le plasmide pIAFC109MCS et le gène *Rv1759c-3'His* respectivement.

1.4 Transformation de la souche *E. coli* DH11S

Les étapes de clonage et de transformation d'*E. coli* ont pour but le séquençage de l'ADN qui a été cloné dans les vecteurs pIAFC109 et pIAFC109MCS. La transformation d'*E. coli* DH11S, avec les phages M13mp18 et M13mp19 portant l'insert *Rv3812-5'His* ou *-3'His* (figures 21 et 22), a permis l'obtention de nombreuses plages comportant des cellules n'exprimant pas le gène codant pour la β -galactosidase.

Quant au gène *Rv1759c-3'His*, le clonage a, tout d'abord, été tenté par digestion *EcoRI-SacI* dans les phages M13mp18 et M13mp19, mais aucun transformant n'a pu être obtenu. Le plasmide pSL1180 (Amersham Pharmacia Biotech) a donc été utilisé, mais cela n'a pas été un succès. En réalité, même le contrôle positif, c'est-à-dire la bactérie transformée avec le plasmide non digéré (sans l'insert), entraînait de nombreuses interrogations. Normalement, des colonies bleues auraient dû croître en surface du milieu 2xTY + amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur lequel ont été étalés 50 μL d'X-Gal 2 % et 10 μL d'IPTG 100 mM. Cela n'a pas été le cas, seulement des colonies blanches ont poussé. Le vecteur lui-même était un mauvais outil, il était donc préférable de changer notre façon de faire. Finalement, le plasmide pTZ19R (Amersham Pharmacia Biotech) a permis le clonage du gène *Rv1759c-3'His*. En effet, deux colonies blanches ont poussé sur le milieu 2xTY + amp + X-Gal + IPTG, suite à la transformation de la souche DH11S avec le produit de ligation pTZ19R + *Rv1759c-3'His*.

1.5 Extraction de plasmides ou de phages de la souche *E. coli* DH11S

Pour *Rv3812-5'His*, l'ADN simple brin de M13mp18 a été récolté pour 24 clones, tout comme l'ADN simple brin de M13mp19. D'une part, les produits recueilli ont été utilisés pour vérifier la présence du gène d'intérêt. Dans le cas où celui-ci serait présent dans les 2 vecteurs mentionnés ci-haut, il y a possibilité d'hybridation au niveau de l'insert lors d'une incubation du M13mp18 recombinant avec M13mp19 recombinant. Après digestion de l'ADN simple brin, il ne devrait rester que le fragment de longueur voulue correspondant au gène cloné. Ce qui a été obtenu sur le gel d'agarose 0,7 % de la figure 23. D'autre part, les extraits du clone 1 et 25 ont servi de matrice pour le séquençage. Ceci a été effectué selon la méthode de Sanger *et al* (1977) et les données obtenues par le séquenceur ABI PRISM (Genetic Analyser 310) ont été analysées par le programme Sequencing Analysis (version 3.0). Les résultats ont démontré qu'il n'y avait pas d'erreur d'amplification du gène. Le même procédé a été suivi pour le gène *Rv3812-3'His* et les résultats ont été identiques.

Quant au plasmide pTZ1759-3His représenté à la figure 24, il a pu être récolté chez deux clones. La digestion des extraits avec l'enzyme de restriction *EcoRI* a permis la linéarisation du vecteur recombinant et ainsi l'estimation de la longueur de celui-ci, par comparaison avec le standard de masse moléculaire 1 kb en gel d'agarose. Un fragment de longueur de 5634 pb était attendu, les produits obtenus sont d'environ 5,6 kb (figure 25). Le séquençage a encore une fois été fait selon la méthode de Sanger *et al* (1977), mais, cette fois, avec le séquenceur LI-COR. Le programme d'analyse utilisé est BaseImagIR v4.2. Les résultats obtenus démontrent des différences à certains endroits dans le gène comparativement à la séquence homologue de la souche H37Rv (annexe II).

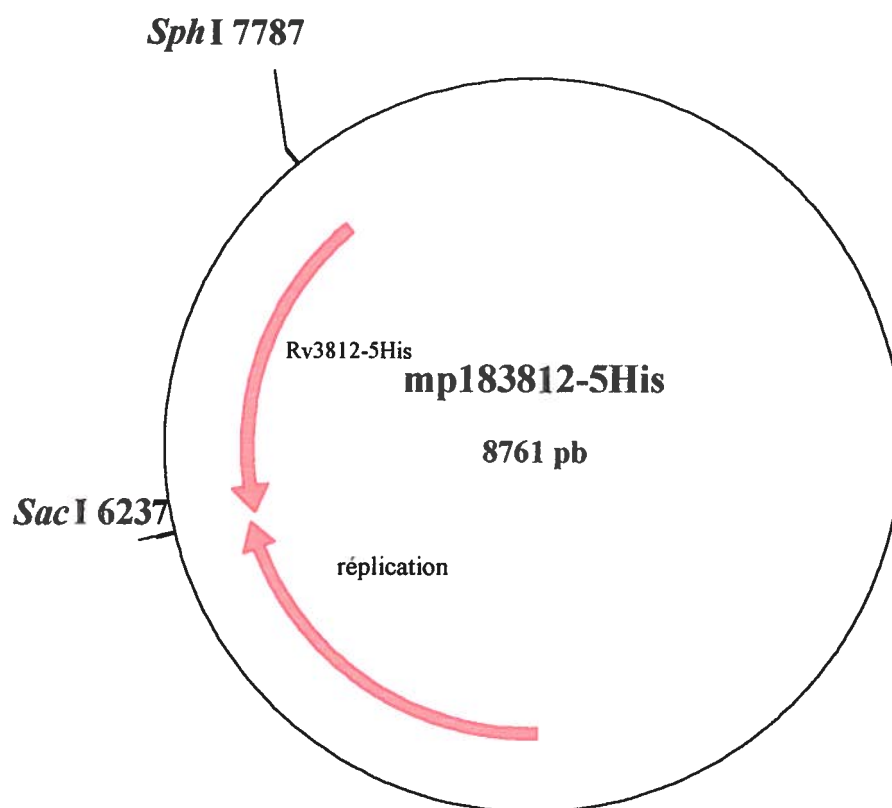


Figure 21 : Carte physique du vecteur mp183812-5His. *Rv3812-5His*, gène *Rv3812-5'His*; réplication; origine de réplication. Les sites de clonage sont en gras.

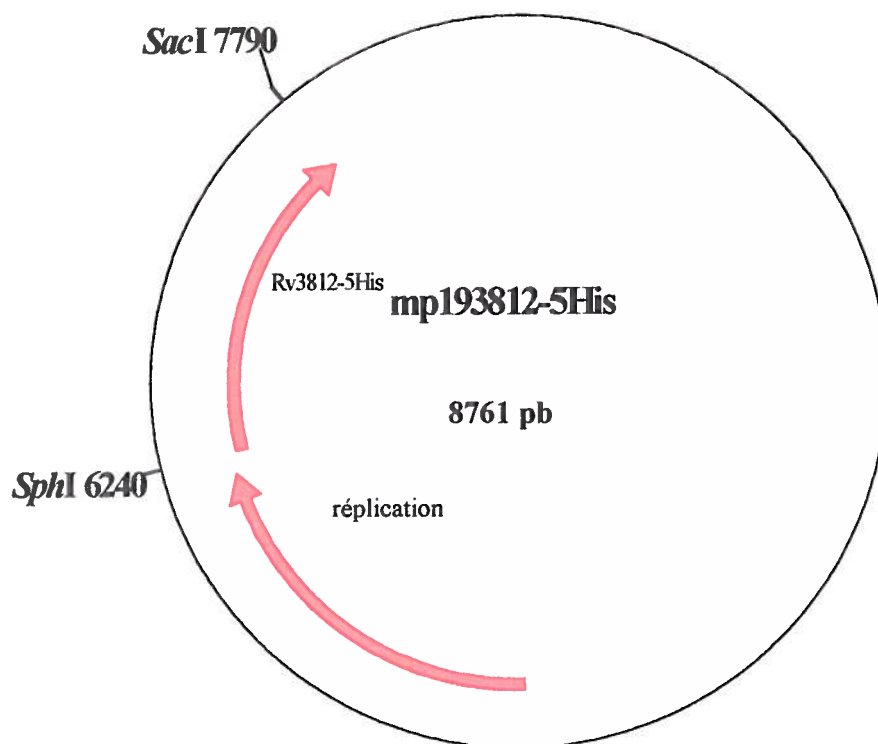


Figure 22 : Carte physique du vecteur mp193812-5His. Rv3812-5His, gène *Rv3812-5'*His; replication, origine de répliation. Les sites de clonage sont en gras.

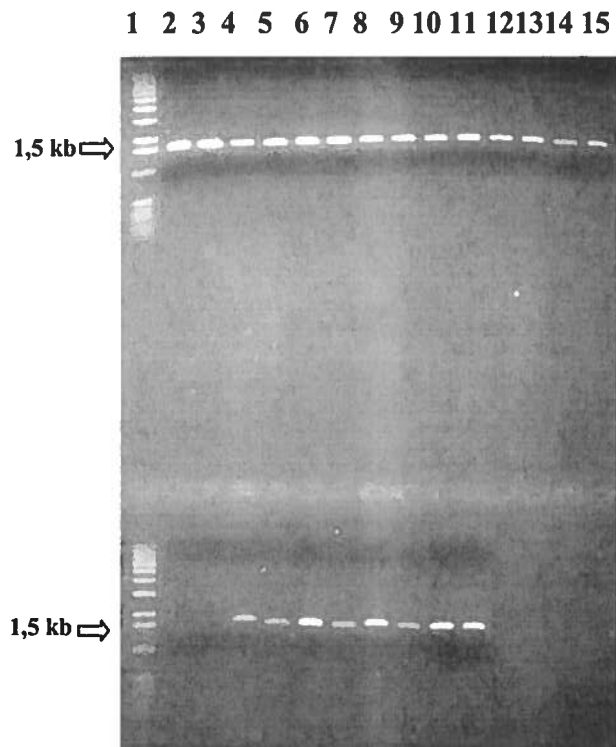


Figure 23: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors du S1 mapping pour le gène *Rv3812-5'His*. Rangée du haut, puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 à 7: ADN (gène *Rv3812-5'His*) obtenu à partir de l'ADN simple brin de M13mp18 recombinant du clone 1 et de celui de M13mp19 recombinant des clones 25 à 30 respectivement, puits 8 à 13 : ADN (gène *Rv3812-5'His*) obtenu à partir de l'ADN simple brin de M13mp18 recombinant du clone 7 et de celui de M13mp19 recombinant des clones 31 à 36 respectivement, puits 14-15 : ADN (gène *Rv3812-5'His*) obtenu à partir de l'ADN simple brin de M13mp18 recombinant du clone 13 et de celui de M13mp19 recombinant des clones 37 à 38 respectivement. Rangée du bas, puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 à 5 : ADN (gène *Rv3812-5'His*) obtenu à partir de l'ADN simple brin de M13mp18 recombinant du clone 13 et de celui de M13mp19 recombinant des clones 39 à 42 respectivement, puits 6 à 11 : ADN (gène *Rv3812-5'His*) obtenu à partir de l'ADN simple brin de M13mp18 recombinant du clone 19 et de celui de M13mp19 recombinant des clones 43 à 48 respectivement. Le fragment d'ADN attendu est de 1,5 kb et correspond au gène *Rv3812-5'His*.

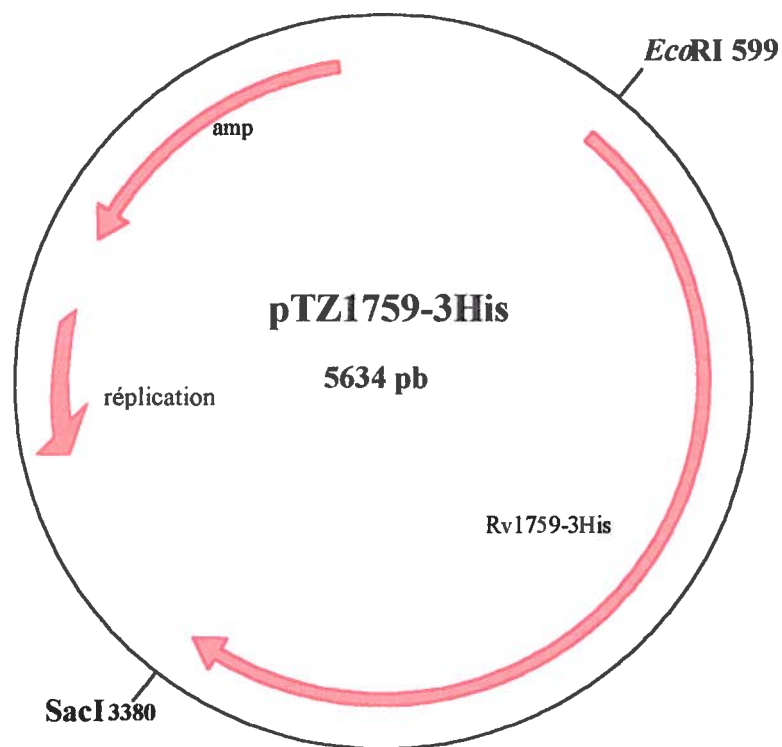


Figure 24 : Carte physique du plasmide pTZ1759-3His. *Rv1759c-3His*, gène *Rv1759c-3'His*; *amp*, gène de résistance à l'ampicilline; répllication, origine de répllication. Les sites de clonage sont en gras.

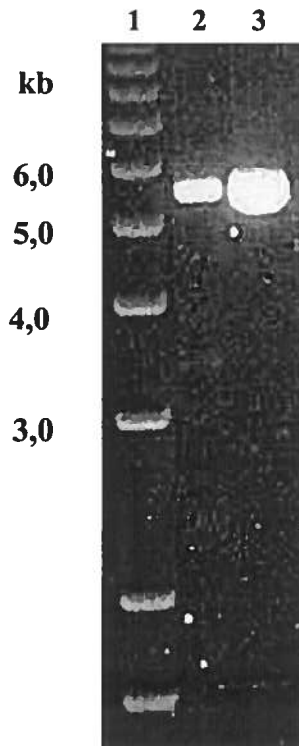


Figure 25: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide recombinant pTZ1759c-3His. Une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* a été effectuée. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 à 3 : plasmides recombinants extraits des transformants *E. coli* DH11S et digérés au site unique de restriction *EcoRI*. Une bande à 5,6 kb était attendue et a été obtenue.

1.6 Analyse du niveau de transcription

L'ARN a été extrait des clones *S. lividans* 10-164/pIAF3812-5His, /pIAF3812-3His et /pIAF1759c-3His. Chaque extrait a été buvardé sur une membrane de nitrocellulose, une pré-hybridation a été effectuée, puis la sonde radioactive est ajoutée pour une incubation de 16 heures à 68°C. Le lendemain, 2 lavages de 30 minutes précèdent l'exposition de la membrane pendant 24 heures dans une cassette possédant un écran sensible à la radioactivité. La figure 26 montre les résultats obtenus lors de l'utilisation de la sonde correspondant au gène *Rv3812* marqué au ³²P. Les puits 1 et 2 confirment la présence de transcrits du gène *Rv3812*, alors que le puits 3 est représenté par un contrôle négatif. Celui-ci comprend des transcrits isolés de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF1759c-3His.

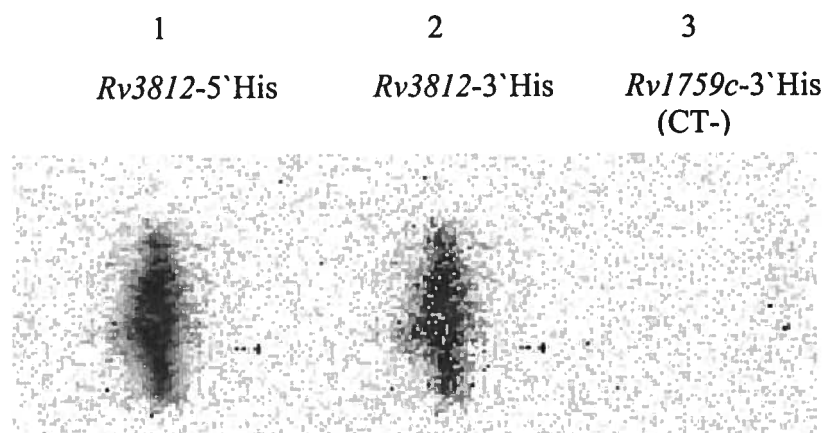


Figure 26 : Détection des transcrits des gènes *Rv3812*-5'His et 3'His à l'aide de la sonde *Rv3812* marquée au ³²P. Puits 1 et 2 : transcrits obtenus à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec : 1- le plasmide pIAF3812-5His, 2- le plasmide pIAF3812-3His, 3 - le plasmide pIAF1759c-3His (CT-, contrôle négatif).

Une autre membrane a été préparée dans les mêmes conditions que précédemment, excepté que la sonde utilisée est le gène *Rv1759c* marqué au ^{32}P . Ici, le contrôle négatif correspond aux transcrits isolés de clones préalablement transformés avec le vecteur recombinant pIAF3812-5His (puits1) ou avec le vecteur recombinant pIAF3812-3His (puits2). Les étapes visant la détection des transcrits *Rv1759c*-3'His n'ont pas permis de démontrer la transcription du gène correspondant (figure 27a). Pour éviter la possibilité d'un faux négatif, le gène *Rv1759c* a été re-vérifié en gel d'agarose et re-dosé, puis le marquage a été recommencé. Des contrôles positifs ont également été préparés (figure 27b) en utilisant une sonde spécifique aux transcrits du gène de résistance au thiostrepton, gène présent sur les vecteurs utilisés pour la transformation de *S. lividans*. Un résultat positif pour la détection des transcrits *tsr* indique que les étapes d'isolement de l'ARN et d'hybridation à la membrane ont bien fonctionnées.

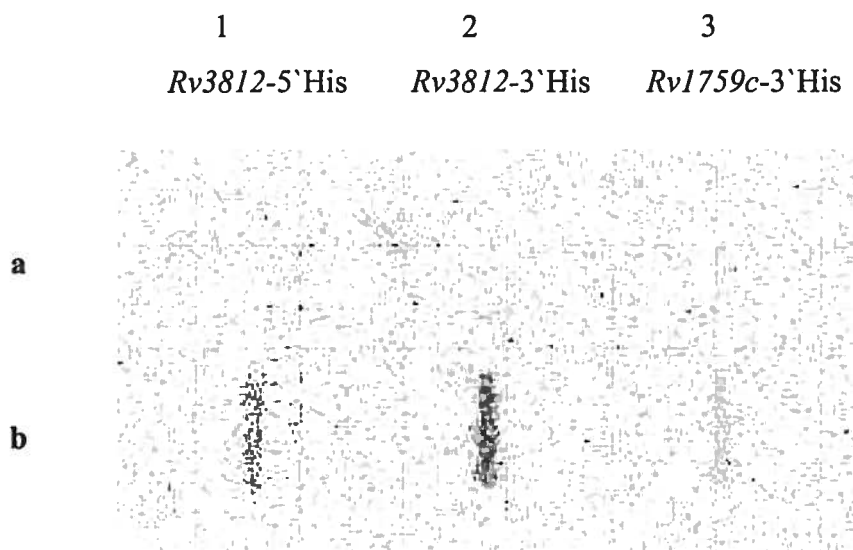


Figure 27a : Détection des transcrits du gène *Rv1759c*-3'His à l'aide de la sonde *Rv1759c* marquée au ^{32}P . Puits 1 à 2: contrôles négatifs (transcrits obtenus à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec : 1- le plasmide pIAF3812-5His, 2- le plasmide pIAF3812-3His), puits 3 : transcrits obtenus à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF1759c-3His.

Figure 27b : Détection des transcrits du gène codant pour la résistance au thiostrepton à l'aide de la sonde *tsr* marquée au ^{32}P . Puits 1 à 3 : contrôles positifs (échantillons distribués comme en a).

2. Analyse des protéines auxquelles sont ajoutés six résidus histidine

2.1 Immunobuvardage de type Western

La souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF38/2-5His a d'abord été cultivée dans un milieu TSB, avant d'être transférée dans 100 mL de M14-glucose (ou xylose) 1 %. Après 48 à 72 heures de culture en milieu minimal, les protéines intra- et extracellulaires ont été analysées par SDS-PAGE (12 %), puis transférées sur une membrane de nylon chargée positivement. Dans ce cas-ci, la détection à l'aide des anticorps dirigés contre les six résidus histidine (anti-His) s'est avérée négative (figure 28). Par contre, il est possible que la protéine d'intérêt soit produite, mais dépourvue de la queue d'histidine par clivage au N-terminal. Ceci peut se produire, par exemple, dans le cas où il y a un peptide signal à l'extrémité N-terminale de la protéine. La procédure a été recommencée de manière à produire la même protéine, mais avec les résidus histidine au C-terminal (culture de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide recombinant pIAF38/2-3His). Cette fois, une réaction aux anticorps anti-His est visible dans le surnageant de la culture obtenu après 48 heures de croissance en M14-glucose 1 % (figure 29). En fait, deux bandes sont apparues sur la membrane, une d'environ 46 kDa, qui pourrait être la protéine d'intérêt dont le poids moléculaire est estimé à 51 kDa, et une autre de près de 28 kDa, qui pourrait être la même protéine, mais tronquée. La détermination de la séquence en acides aminés permettra d'en savoir plus sur l'identité de ces protéines.

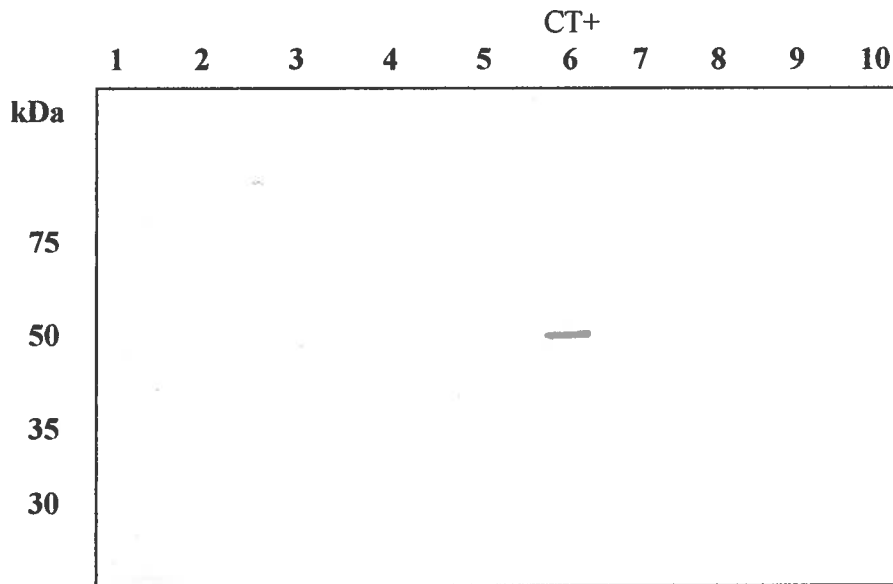


Figure 28 : Détection de la protéine Rv3812-5'His à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine. Puits 1 : marqueur Rainbow, puits 2: surnageant d'une culture de 48 heures en M14-glucose 1 %, puits 3: surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 48 heures en M14-glucose 1 %), puits 4 : surnageant d'une culture de 48 heures en M14-xylose 1 %, puits 5 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 48 heures en M14-xylose 1 %), puits 6 : contrôle positif (CT+, protéine KasA-5'His, puits 7 : surnageant d'une culture de 72 heures en M14-glucose 1 %, puits 8 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 72 heures en M14-glucose 1 %), puits 9 : surnageant d'une culture de 72 heures en M14-xylose 1 %, puits 10: surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 72 heures en M14-xylose 1 %). Les cultures ont été préparées à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF3812-5His.

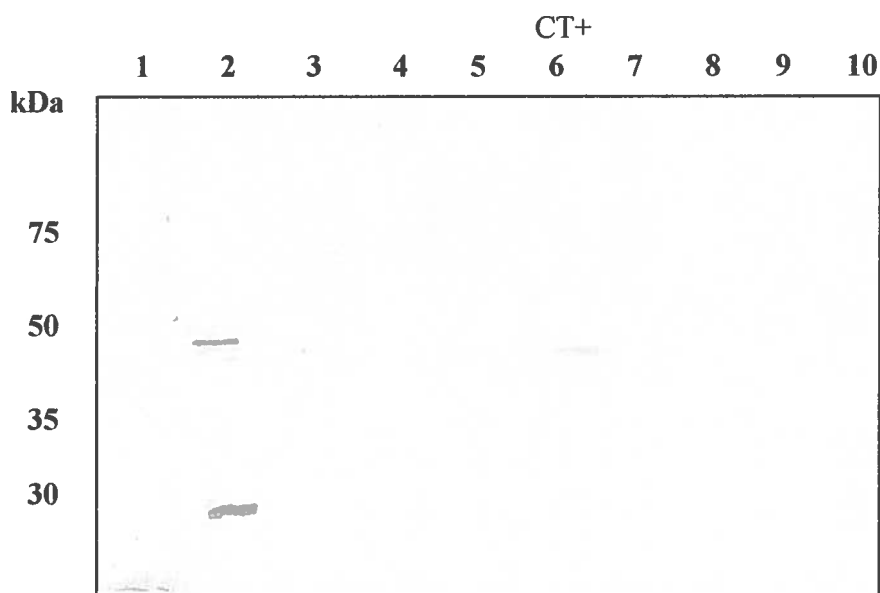


Figure 29 : Détection de la protéine Rv3812-3'His à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine. Puits 1 : marqueur Rainbow, puits 2: surnageant d'une culture de 48 heures en M14-glucose 1 % (protéines extracellulaires), puits 3: surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 48 heures en M14-glucose 1 %), puits 4 : surnageant d'une culture de 48 heures en M14-xylose 1 %, puits 5 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 48 heures en M14-xylose 1 %), puits 6 : contrôle positif (CT+, protéine KasA-5'His, puits 7 : surnageant d'une culture de 72 heures en M14-glucose 1 %, puits 8 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 72 heures en M14-glucose 1 %), puits 9 : surnageant d'une culture de 72 heures en M14-xylose 1 %, puits 10: surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 72 heures en M14-xylose 1 %). Les cultures ont été préparées à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF3812-3His.

La production de la protéine *Rv1759c*-3'His par la souche *S. lividans* 10-164/pIAF1759c-3His n'a pas été détectée, comme le montre la figure 30.

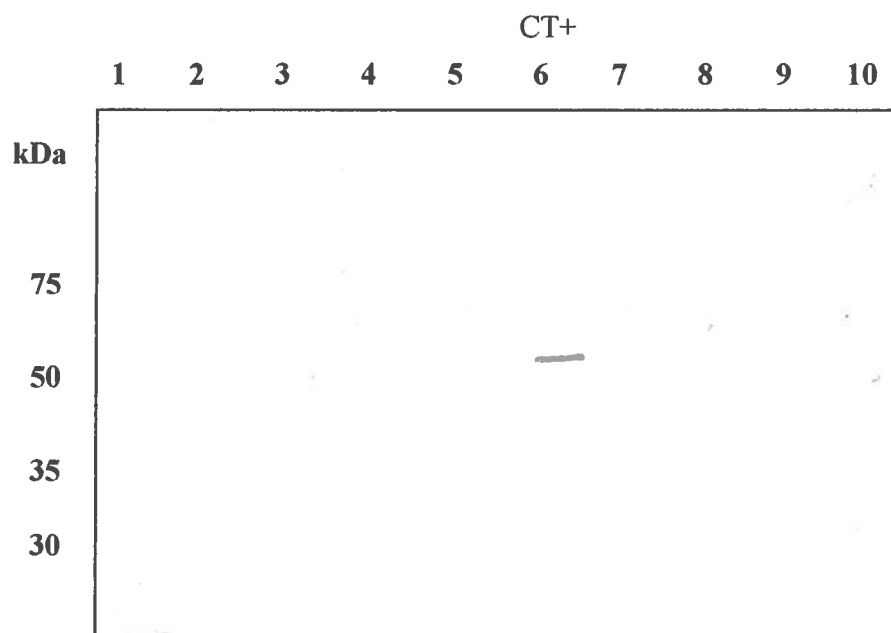


Figure 30: Détection de la protéine *Rv1759c*-3'His à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine. Puits 1 : marqueur Rainbow, puits 2 : surnageant d'une culture de 48 heures en M14-glucose 1 % (protéines extracellulaires), puits 3 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 48 heures en M14-glucose 1 %), puits 4 : surnageant d'une culture de 48 heures en M14-xylose 1 %, puits 5 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 48 heures en M14-xylose 1 %), puits 6 : contrôle positif (CT+, protéine *KasA*-5'His, puits 7 : surnageant d'une culture de 72 heures en M14-glucose 1 %, puits 8 : surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 72 heures en M14-glucose 1 %), puits 9 : surnageant d'une culture de 72 heures en M14-xylose 1 %, puits 10: surnageant obtenu après sonication du mycélium et après centrifugation (culture de 72 heures en M14-xylose 1 %). Les cultures ont été préparées à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF1759c-3His.

2.2 Purification des PE-PGRS par chromatographie d'affinité

Une purification a été effectuée à partir du surnageant de la culture obtenu après 48 heures de croissance, de la souche *S. lividans* 10-164/pIAF3812-3His, en M14-glucose 1 %. La quantité de protéines extracellulaires a été déterminée après l'ultrafiltration et varie entre 19,6 et 28,3 mg/100mL. Le protocole établi au préalable a été suivi à la lettre et s'est avéré un succès. En fait, un pic bien défini peut être vu sur le chromatogramme entre la 40^e et 45^e minute du programme d'élution. Les fractions correspondant au pic B de la figure 31 ont été analysées sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, figure 32), il a ainsi été possible de constater la présence d'une protéine d'un peu plus de 45 kDa et ce, dans deux fractions distinctes. À noter que le poids moléculaire de la protéine Rv3812 est estimé à 51 kDa. Il a fallu 30 % d'imidazole 0,5 M (150 mM) pour éluer près de 0,97 mg d'une protéine et celle-ci semble pure.

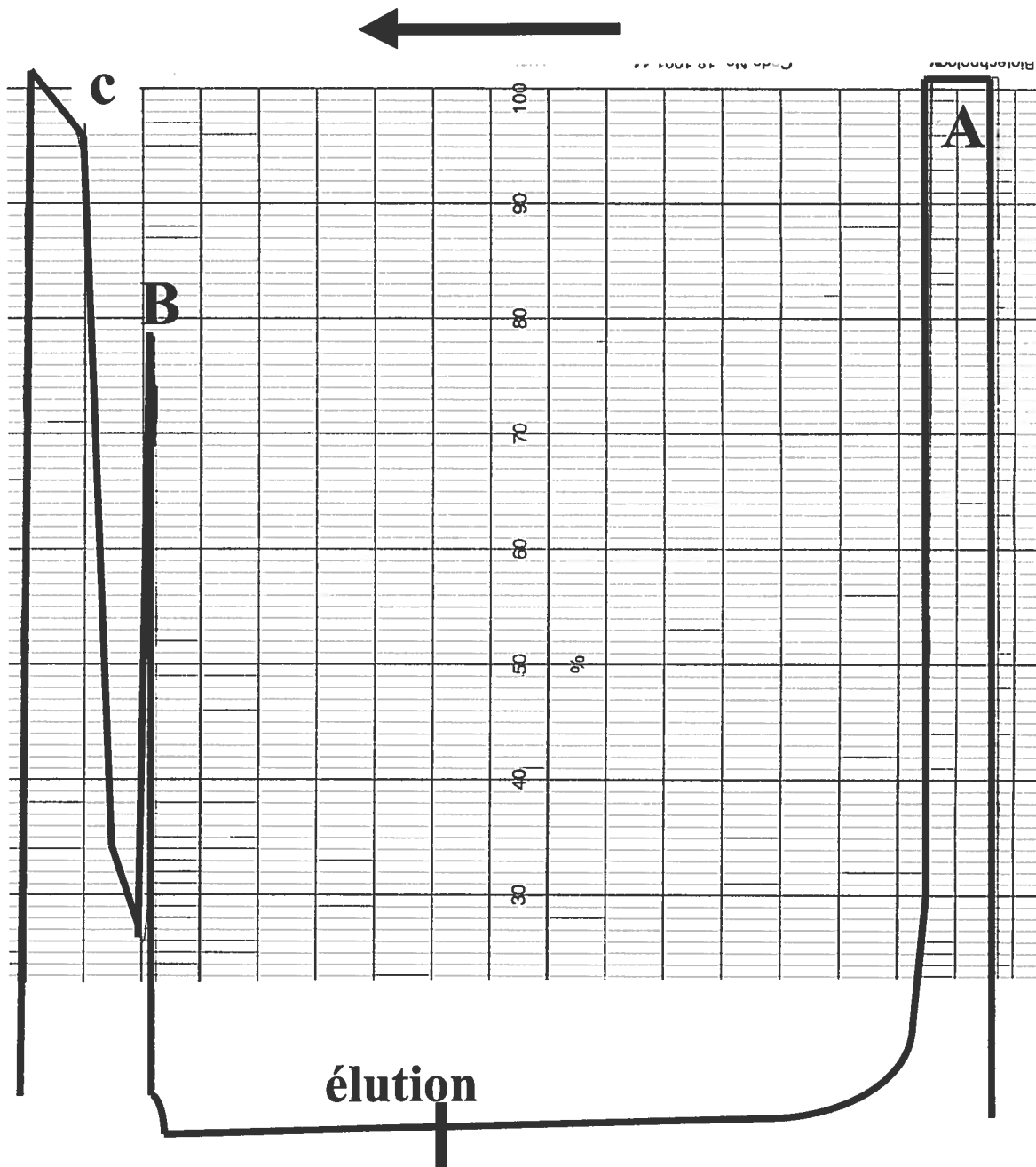


Figure 31: Chromatogramme représentant la purification à partir du surnageant de la culture obtenu après 48 heures de croissance de la souche *S. lividans* 10-164/pIAF3812-3His, en M14-glucose 1 %. Pic A: correspond aux protéines non retenues sur la colonne, pic B: correspond à une protéine qui a été retenue sur la colonne et éluee avec 150 mM d'imidazole, pic C: correspond à l'imidazole. Vitesse du papier : 1 mm/min.

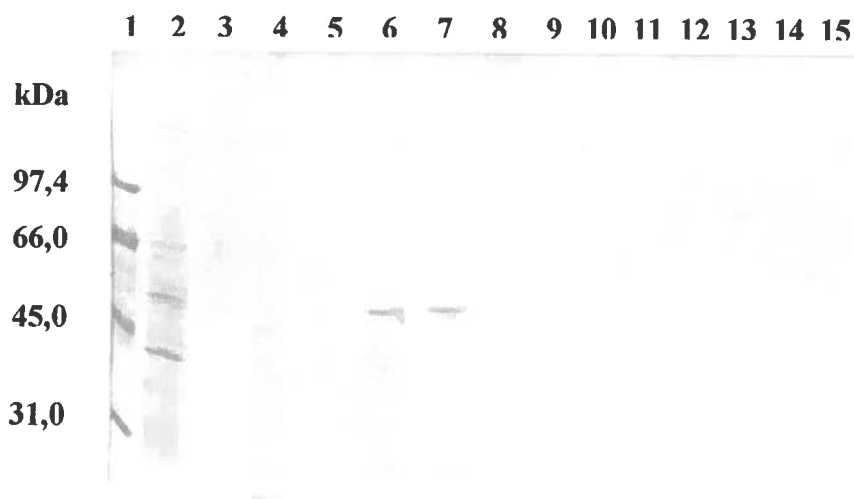


Figure 32 : Photo d'un gel SDS-PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie des fractions récoltées lors de la purification de la protéine Rv3812-3'His. Puits 1 : standard de poids moléculaire (LMW), puits 2 : protéines extracellulaires avant purification, puits 3 : protéines non retenues sur la colonne, les puits 4 à 10 : protéines éluées par gradient de 150 mM à 0,5 M d'imidazole.

Les fractions d'élution ont été, d'autre part, transférées sur une membrane de nylon chargée positivement. Une détection à l'aide d'anticorps dirigés contre la queue d'histidine a été effectuée, mais aucune réaction antigène-anticorps n'a pu être obtenue. Le gel de polyacrylamide, à partir duquel s'est fait le transfert, a alors été coloré au bleu de Coomassie, ainsi il a été possible de s'assurer que les protéines ont bel et bien été transférées. De plus, pour éviter un résultat négatif occasionné par une faible concentration, les deux fractions contenant la protéine d'environ 46 kDa ont été mises ensemble et le tout a été ultracentrifugé. Malheureusement, la révélation s'est encore avérée négative. Le séquençage du N-terminal de la protéine retenue sur la colonne a été effectué pour vérifier, malgré le résultat de l'immunodétection, que la protéine obtenue n'est pas la protéine d'intérêt.

2.3 Identification de l'extrémité N-terminale des protéines d'intérêt

La séquence obtenue comporte 5 acides aminés, soient les acides aminés ISGEP. Ceci ne correspond pas à la protéine Rv3812 et, suite à une recherche d'homologie de séquence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), nous avons constaté qu'il s'agit d'une estérase de *S. lividans*. La séquence de cette protéine peut être vue à l'annexe III. Il est possible de déduire la présence d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale de l'estérase. Ce qui n'est pas étonnant, puisqu'elle a été détectée dans le surnageant de la culture. Le 43^e acide aminé de la protéine est une proline et cette dernière est suivie du site de coupure putatif de la signal peptidase (AXA). Ce qui vient ensuite est la séquence ISGEP correspondant à l'extrémité N-terminale de la protéine mature. Autre point à remarquer, la présence de 14 résidus histidine, jamais un à la suite de l'autre, mais qui pourrait expliquer l'affinité de la protéine pour la matrice de nickel.

3. Gènes de fusion

3.1 Amplification des gènes d'intérêt sous forme de fusion

Dans le cas où l'expression des gènes précédemment amplifiés ne permettrait pas l'obtention des protéines d'intérêt, la synthèse de différentes protéines de fusion comportant des domaines non étrangers à la cellule hôte est une alternative possible. Il s'agit d'amplifier chaque gène visé avec, à son extrémité 5', un site de restriction *SphI* ou *EcoRI*, les séquences codant pour le peptide signal et le domaine de fixation à la cellulose (CBD) de la cellulase A (CelA) de *Streptomyces lividans*, suivies de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase X_a; en 3', ajout du site de restriction *SacI*. Pour chaque gène, la construction suivante est également préparée : en 5', ajout d'un site de restriction *EcoRI*, des séquences codant pour le peptide signal et le domaine de fixation au xylane (XBD) de l'arabinofuranosidase B (AbfB) de *Streptomyces lividans*, suivies de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase X_a. L'extrémité 3' est pourvue d'un site de restriction *SacI*. Il est à noter que cette section se concentre sur les gènes *Rv3812* et *Rv1759c*. De plus, ce dernier étant près de 2 fois plus long que le premier, il est amplifié directement en 2 fragments. La source d'ADN utilisée est le gène *Rv3812-5 His* ou *Rv1759c-5 His* précédemment polymérisé.

Les amplifications du gène *Rv3812* n'ont pas causé de problème, que se soit au moment de la synthèse avec une portion du gène codant pour la cellulase A (CelA), que lors de la synthèse avec une portion du gène de l'arabinofuranosidase B (AbfB). Le puits 2 de la figure 33a comprend les produits obtenus suite à l'amplification des séquences codant pour le peptide signal et le domaine de liaison à la cellulose (CBD) de la CelA de *S. lividans*, suivies de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase X_a avec le tout début du gène *Rv3812* (PCR1, amorces : *CelA-5* et *Rv3812-CelA*). Le puits 3 représente le gène *Rv3812* avec, en 5', une portion de la séquence codant pour le CBD de la CelA, suivie de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase X_a (PCR2, amorces : *CelA-Rv3812* et *Rv3812-3'*). Les produits des puits 2 et 3, si dénaturés, peuvent s'apparier et ont été utilisés lors d'un troisième PCR qui permet la synthèse complète du gène de fusion (*Rv3812-5' CelA*) de près de 2 kb (puits 7, PCR3, amorces : *CelA-5* et *Rv3812-3'*). Quant au puits 4, il contient les produits obtenus lors de l'amplification des

séquences codant pour le peptide signal et le domaine de liaison au xylane (XBD) de l'AbfB de *S. lividans*, suivies de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase X_a avec le début du gène *Rv3812* (PCR4, amorces *AbfB-5* et *Rv3812-AbfB*). Ce dernier est ensuite polymérisé au complet avec l'ajout, en 5', d'une portion de la séquence codant pour le XBD de l'AbfB, suivie de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase X_a (puits 5, PCR5, amorces *AbfB-Rv3812* et *Rv3812-3'*). Les produits des puits 4 et 5 permettent la synthèse du gène de fusion *Rv3812-5' AbfB* qui est représentée par le puits 8 (PCR6, amorces *AbfB* et *Rv3812-3'*).

Les amplifications n'ont pas été aussi faciles pour le gène *Rv1759c* pour lequel aucun produit de fusion n'a été obtenu. Des changements dans les conditions de polymérisation, soient la source d'ADN, la concentration de MgSO₄, les temps de dénaturation, d'appariement des amorces et d'élongation, n'ont pas permis l'obtention des séquences voulues. Par contre, il a été possible de polymériser le gène en deux fragments non fusionnés (puits 2-3 de la figure 33b) à l'aide des amorces *1759c-5'*, *Rv1759c3-1545 nt* et *Rv1759c5-1522 nt*, *Rv1759c-3'*. À noter que la fusion du gène avait pour but la détection de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques et la purification par chromatographie d'affinité.

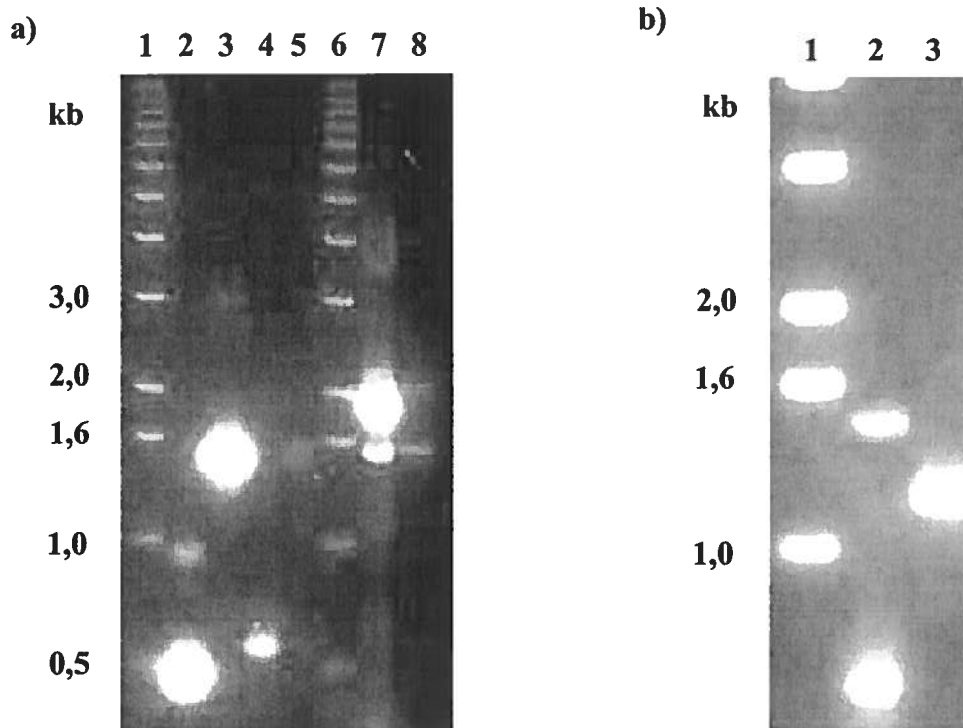


Figure 33a: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % pour les gènes *Rv3812-5'*CelA et AbfB amplifiés. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 : produits du PCR1 (496 pb), puits 3 : produits du PCR2 (1494 pb), puits 4 : produits du PCR4 (570 pb), puits 5 : produits du PCR5 (1500 pb), puits 6 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 7 : produits du PCR3 (1,99 kb), puits 8 : produits du PCR6 (2,07 kb).

Figure 33b: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des portions 5' et 3' du gène *Rv1759c* amplifiées. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 : produit obtenu par PCR à l'aide des amorces *1759c-5'* et *Rv1759c3-1545* nt (portion 5' du gène *Rv1759c* de 1545 pb), puits 3 : produit obtenu par PCR à l'aide des amorces *Rv1759c5-1522* nt et *Rv1759c-3'* (portion 3' du gène *Rv1759c* de 1215 pb).

3.2 Transformation de la souche *S. lividans* 10-164

Le gène *Rv3812-5'CelA* est purifié par extraction sur un gel d'agarose, digéré avec les enzymes de restriction *SphI-SacI*, puis cloné dans le vecteur pIAF550MCSL (figure 34). La purification du fragment *Rv3812-5'AbfB* est, pour sa part, suivie d'une digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI-SacI*, puis du clonage dans le vecteur pIAF550MCSL (figure 35). Le clonage du gène *Rv1759c* a également été réalisé dans le vecteur pIAF550MCSL par digestion *EcoRI-SacI* (figure 36).

Le tableau VII résume le nombre de colonies ayant poussé sur le milieu R5 et ce, en présence de thioestrepton. Notons la présence du gène de résistance à cet antibiotique (*tsr^r*) sur le vecteur pIAF550MCSL.

Tableau VII : Résultats de la transformation de protoplastes de *S. lividans* 10-164 avec les produits de fusion

Plasmide	Insert	Colonies <i>tsr^r</i> (transformants)
PIAF550MCSL	<i>Rv3812-5'CelA</i>	10
PIAF550MCSL	<i>Rv3812-5'AbfB</i>	62
PIAF550MCSL	<i>Rv1759c</i>	8
pIAFC109 non digéré (contrôle positif)	-----	> 100
pIAFC109 digéré (contrôle négatif)	-----	0

3.3 Extraction de plasmides de la souche *S. lividans* 10-164

Pour chaque transformation, trois clones ont été repiqués, chacun dans un milieu TSB contenant 5 µg/mL de thiostrepton et du glucose à une concentration de 2 %. Après une incubation de 48 heures à 34°C et sous agitation (240 rpm), l'extraction de plasmide a été effectuée. La digestion des extraits, à l'aide des enzymes de restriction utilisées lors du clonage, facilite l'analyse des clones sur un gel d'agarose. Pour la transformation avec pIAF3812-CelA, un clone sur deux possédait le plasmide de 4,0 kb avec l'insert de 2,0 kb (figure 37). À noter que le troisième clone n'a pas été utilisé lors de l'extraction, car sa croissance dans le milieu liquide était très faible. Quant à la transformation avec pIAF3812-AbfB, un clone sur trois porte le plasmide recombinant recherché (avec un insert d'environ 2,2 kb) comme montré à la figure 38. Enfin, aucun plasmide pIAF1759c n'a pu être extrait.

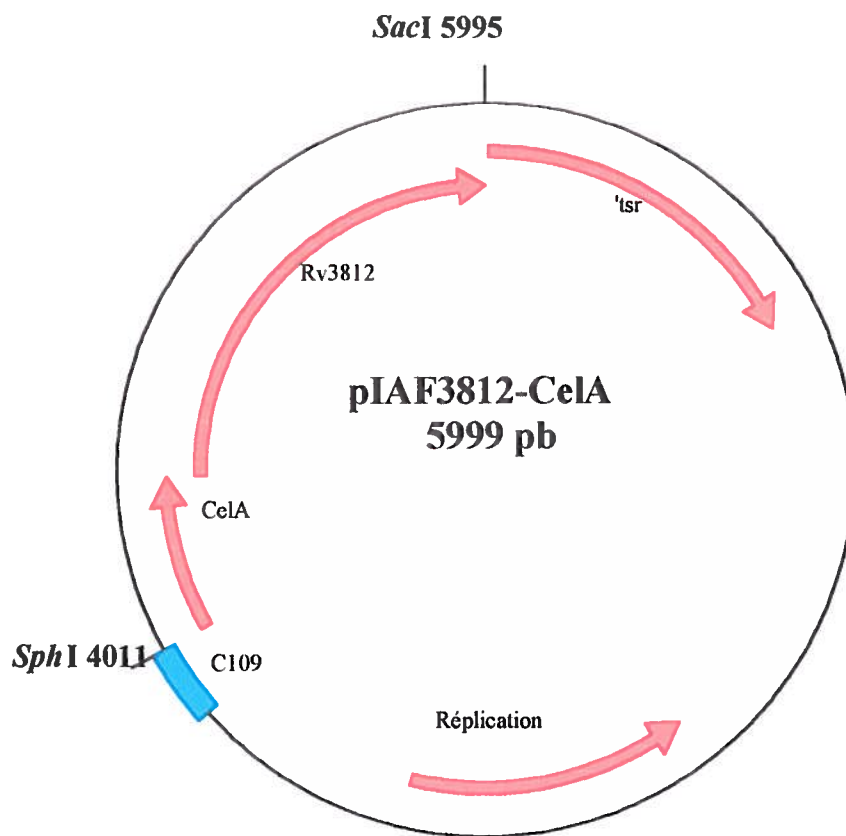


Figure 34 : Carte physique du plasmide pIAF3812-CelA. Rv3812, gène *Rv3812*; CelA, séquences codant pour le PS et le CBD de la cellulase A de *S. lividans*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; réplication, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de clonage sont en gras.

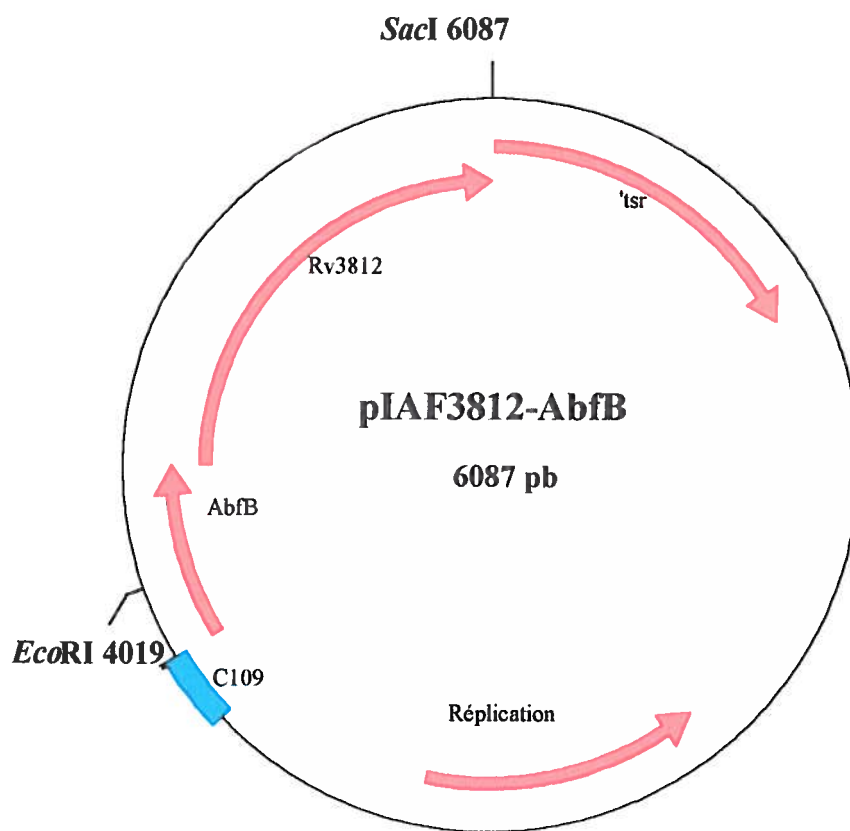


Figure 35 : Carte physique du plasmide pIAF3812-AbfB. Rv3812, gène *Rv3812*; AbfB, séquences codant pour le PS et le XBD de l'arabinofuranosidase B de *S. lividans*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; réplication, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de clonage sont en gras.

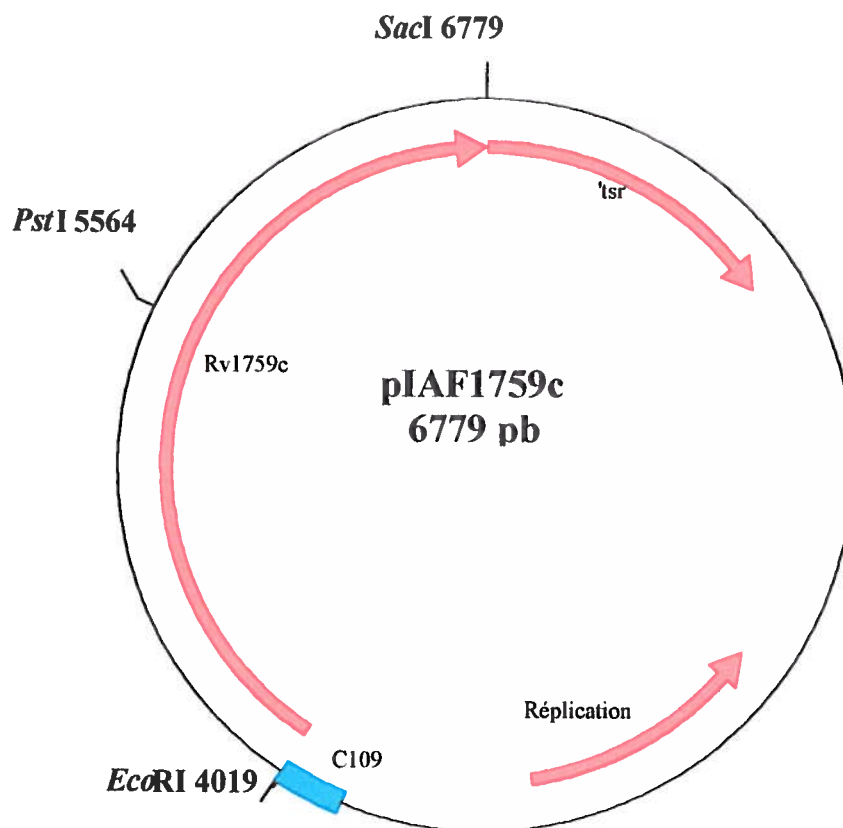


Figure 36: Carte physique du plasmide pIAF1759c. *Rv1759c*, gène *Rv1759c*; *tsr*, gène de résistance au thiostrepton; réplication, origine de réplication du plasmide chez *S. lividans*; C109, promoteur. Les sites de clonage sont en gras.

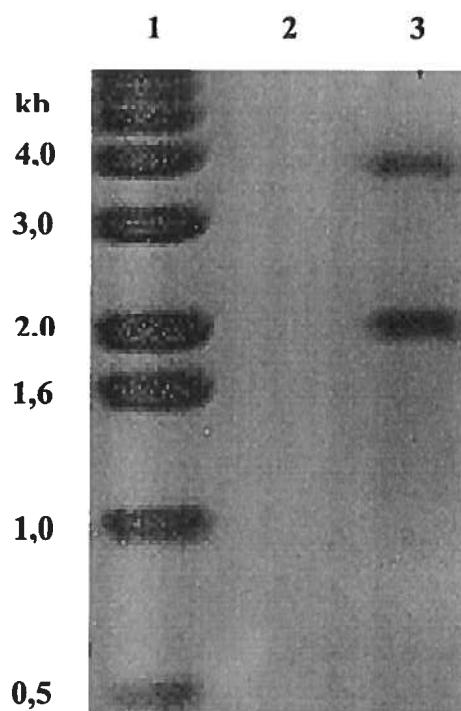


Figure 37: Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF3812-CelA. Une digestion avec les enzymes de restriction du clonage a été effectuée. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2 et 3: extraits d'ADN des transformants *S. lividans* 10-164 digérés avec les enzymes de restriction *SphI-SacI*. Les bandes à 4015 et 1984 pb représentent le plasmide pIAF550MCSL et le gène *Rv3812-5'*CelA respectivement.

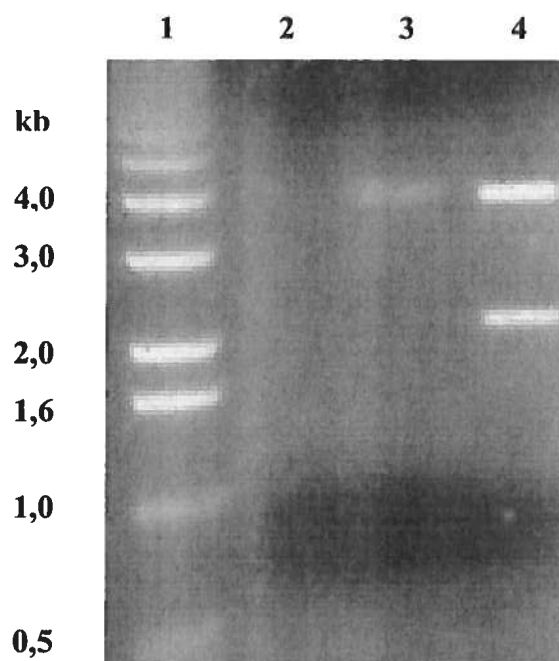


Figure 38 : Photo d'un gel d'agarose 0,7 % des bandes d'ADN obtenues lors de l'extraction de plasmide pIAF3812-AbfB. Une digestion avec les enzymes de restriction du clonage a été effectuée. Puits 1 : le standard de masse moléculaire 1 kb de Gibco BRL, puits 2-3: extraits des transformants *S. lividans* 10-164 digérés avec les enzymes de restriction *EcoRI-SacI*. Les bandes à 4019 et 2068 pb représentent le plasmide pIAF550MCSL et le gène *Rv3812-5'AbfB* respectivement.

3.4 Analyse du niveau de transcription

L'ARN a été extrait des clones *S. lividans* 10-164/pIAF3812-CelA, et /pIAF3812-AbfB. La sonde utilisée est le gène *Rv3812* marqué au ^{32}P et le contrôle négatif correspond aux transcrits isolés précédemment à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF1759c-3His. La figure 39 montre la présence de transcrits du gène *Rv3812* après un exposition de 24 heures.

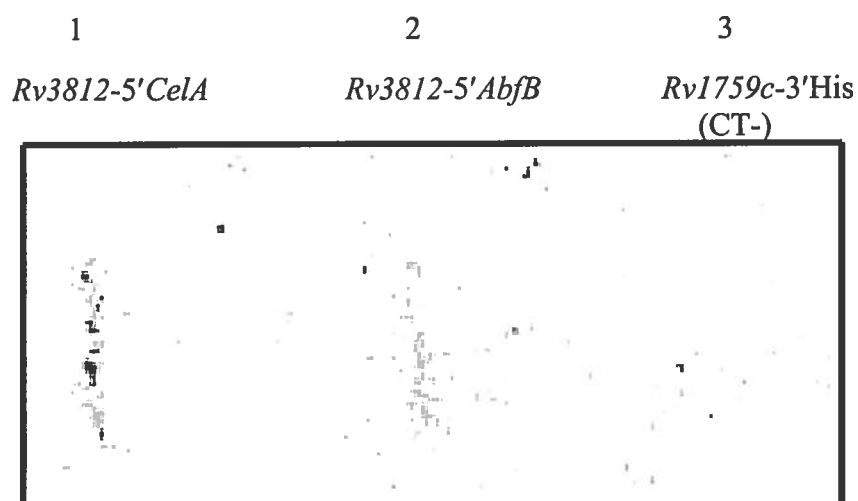


Figure 39 : Détection des transcrits des gènes *Rv3812-5' CelA* et *AbfB* à l'aide de la sonde *Rv3812* marquée au ^{32}P . Puits 1 et 2 : transcrits obtenus à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec : 1- le plasmide pIAF3812-CelA, 2- le plasmide pIAF3812-AbfB, 3- le plasmide pIAF1759c-3His (contrôle négatif).

4. Analyse des protéines de fusion

4.1 Immunobuvardage de type Western

La détection des protéines fusionnées au peptide signal et au CBD de la CelA a nécessité l'utilisation d'un antiserum de lapin spécifique à la CelA comme anticorps primaire et d'un anti-IgG de lapin/phosphatase alcaline comme anticorps secondaire. À la figure 40, il est possible de voir différentes bandes au niveau des puits contenant le milieu extra- ou intracellulaire du clone d'intérêt. Par contre, le même profil a été obtenu pour le contrôle négatif. Celui-ci a été préparé à partir de la souche 10-164 transformée avec le vecteur sans insert. Les résultats obtenus à partir des cultures en M14-xylose 1% sont similaires à ceux de la figure 40, c'est-à-dire que la protéine Rv3812-5'CelA n'a pu être détectée.

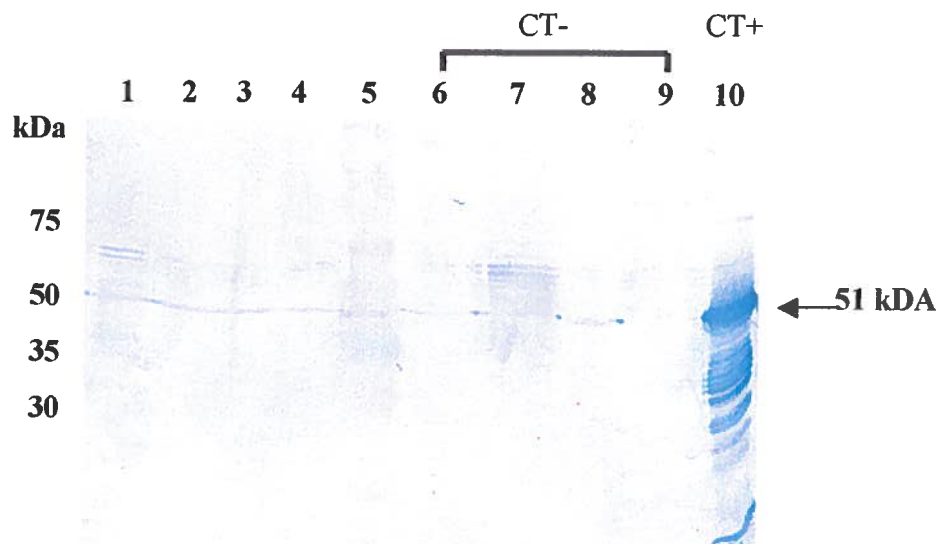


Figure 40 : Détection de la protéine Rv3812-5'CelA à l'aide des anticorps dirigés contre la cellulase A. Puits 1 à 4 : protéines obtenues à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF3812-CelA, puits 5 : marqueur Rainbow, puits 6 à 9 : protéines obtenues à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide sans insert (CT-), puits 10 : contrôle positif (CT+, cellulase A). Puits 1 et 6: protéines extracellulaires obtenues après 48 heures en M14-glucose 1 %, Puits 2 et 7 : protéines intracellulaires obtenues après 48 heures en M14-glucose 1 %, puits 3 et 8 : protéines extracellulaires obtenues après 72 heures en M14-glucose 1 %, puits 4 et 9 protéines intracellulaires obtenues après 72 heures en M14-glucose 1 %.

Pour ce qui est de la fusion avec le peptide signal et le XBD de l'AbfB, l'antisérum de lapin spécifique à l'AbfB a été utilisé comme anticorps primaire au moment de la détection. Une fois encore, la révélation démontre un profil similaire pour le clone d'intérêt et le contrôle négatif., tant pour les cultures en présence de glucose (figure 41) que pour celles avec du xylose.

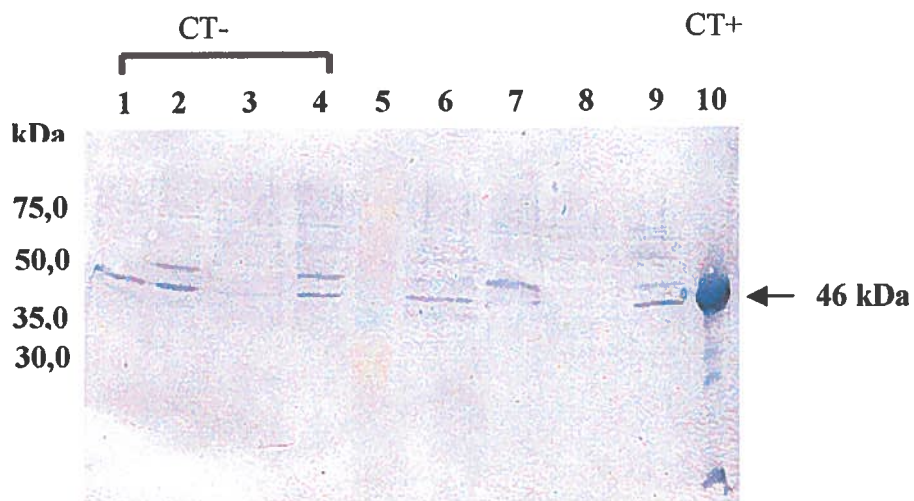


Figure 41 : Détection de la protéine Rv3812-5'AbfB à l'aide des anticorps dirigés contre l'arabinofuranosidase B. Puits 1 à 4 : protéines obtenues à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide sans insert (CT-), puits 5 : marqueur Rainbow, puits 6 à 9 : protéines obtenues à partir de la souche *S. lividans* 10-164 transformée avec le plasmide pIAF3812-AbfB, puits 10 : contrôle positif (CT+, arabinofuranosidase B). Puits 1 et 6 : protéines extracellulaires obtenues après 48 heures en M14-glucose 1 %, Puits 2 et 7 : protéines intracellulaires obtenues après 48 heures en M14-glucose 1 %, puits 3 et 8 : protéines extracellulaires obtenues après 72 heures en M14-glucose 1 %, puits 4 et 9 protéines intracellulaires obtenues après 72 heures en M14-glucose 1 %.

IV- DISCUSSION

1. Réaction de polymérisation en chaîne

1.1 Amplification des gènes d'intérêt à partir de l'ADN génomique

Tous les essais d'amplification ont été faits à l'aide d'amorces dont l'extrémité 5' est pourvue d'un site de restriction, ce qui a pour but de faciliter le clonage. Certaines amorces ont, en plus, été additionnées de six codons histidine, ainsi que de la séquence codant pour le site de coupure de la protéase Xa permettant, respectivement, une purification éventuelle des protéines par chromatographie d'affinité et l'élimination des résidus histidine selon les besoins.

L'amplification des gènes d'intérêt a été effectuée, malgré les difficultés rencontrées. D'abord, l'utilisation de l'ADN génomique non digéré n'a pas permis l'obtention des fragments souhaités. Il arrive que l'encombrement, dû au repliement de l'ADN, limite l'appariement des amorces, ainsi que l'action de la polymérase. Pour pallier à ce problème, l'ADN utilisé a été digéré, mais cela n'a pas modifié les résultats obtenus. Ce n'est qu'à la suite du remplacement de la *Taq* ADN polymérase, par la *Pwo*, qu'il a été possible d'obtenir un premier gène (*Rv3812* auquel sont ajoutés six résidus histidine, respectivement à l'extrémité 5' (*Rv3812-5'His*) et à l'extrémité 3' (*Rv3812-3'His*)). Dans un livre d'instruction de la compagnie Roche, on démontre que la *Pwo* est plus efficace que la *Taq* pour amplifier des fragments d'ADN de plus de 1,1 kb (Roche Molecular Biochemicals, 1999). Entre autres, parce que la *Pwo* démontre une plus grande stabilité que la *Taq*. De plus, il faut savoir que le tampon utilisé pour le PCR peut déterminer le succès de la réaction. Par exemple, la *Taq* requiert du $MgCl_2$ pour une activité optimale, alors que la *Pwo* montre une plus grande activité avec du $MgSO_4$. Ne sachant pas ces faits, j'ai utilisé du $MgSO_4$ dans les deux cas. Ceci favorise davantage la *Pwo* par rapport à la *Taq*.

Bien qu'un temps d'élongation de 1 minute soit adéquat pour polymériser le gène de 1,5 kb, ce temps s'avérait insuffisant pour les gènes *Rv1651c* et *Rv1759c* de 3,0 et 2,7 kb respectivement. Rappelons que la *Pwo* polymérise approximativement 1400 pb à la minute (www.roche-applied-science.com), donc qu'il lui faut un peu plus de 2 minutes

pour synthétiser un gène de 3000 pb. Suite au passage du temps d'élongation de 1 minute à 3 minutes, le gène *Rv1651c-5'His* a été obtenu, mais les gènes *Rv1651c-3'His*, *Rv1759c-5'His* et *-3'His* étaient encore manquants.

Le gène *Rv1759c* (2,7 kb) a causé des problèmes, malgré le fait que, précédemment, il a été possible d'amplifier un gène de 3,0 kb. Il faut, toutefois, remarquer que le gène de 2,7 kb (*Rv1759c*) possède un contenu en G + C de 77,3 % (séquence à l'annexe V), comparativement au gène de 3,0 kb (*Rv1651c*) qui est de 71,1 % (séquence à l'annexe IV). En tenant compte du fait que deux liaisons hydrogènes sont formées entre une adénine et une thymine, alors qu'il y en a trois entre la guanine et la cytosine, il est possible de déduire que plus le pourcentage en G + C est élevé, plus le temps de dénaturation est long (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~chen/protocols/PCR.html>). Deux options étaient alors possibles, soit d'augmenter le temps de dénaturation, soit de synthétiser le gène en deux fragments. C'est cette dernière option qui a été choisie et qui a permis l'obtention des gènes *Rv1759c-5'His* et *-3'His*, chacun en deux fragments de 1,5 et de 1,2 kb. Quant au gène *Rv1651c-3'His*, il n'a pu être synthétisé de la même façon que son correspondant (*Rv1651c-5'His*). Il a donc fallu essayer de le synthétiser en deux fragments. Malheureusement, cette tentative a également échoué, car seul le fragment en 3' du gène a été obtenu. La taille du fragment correspondant à la portion 5' n'étant pas conforme à celle attendue. Une cause possible, quant à la difficulté de polymériser le début du gène, est l'amorce *1651c-5'* qui est dégénérée. D'abord, il était préférable de remplacer le codon TTA, présent au début du gène (séquence du gène à l'annexe IV), pour la raison que l'ARN de transfert correspondant est rare chez *S. lividans*. Mentionnons qu'un gène portant un ou plusieurs codons rares pour l'hôte peut causer un problème au moment de la traduction, donc entraîner un faible rendement ou une impossibilité à produire la protéine d'intérêt (Ueda *et al.*, 1993). Pour cette raison, le codon TTA a été changé pour un codon TTG qui code aussi pour une leucine et qui est plus abondant chez l'hôte. De plus, étant donné l'insertion du site de restriction *SphI* à l'extrémité 5' de l'amorce *1651c-5'*, le codon TCG codant pour une sérine devait être changé pour le codon CCG. La raison est que l'ATG du site de restriction GCATGC sert de méthionine de départ. Le

codon suivant se retrouve alors avec un C comme première base. Par contre, le codon CCG code pour une proline, laquelle peut causer un encombrement par la présence de son cycle. Le codon CCG a donc été changée pour le codon CGC (arginine). Ces substitutions ont été insérées à l'extrémité 5' de l'amorce *1651c-5'* dans les 17 premiers nucléotides, alors que les 31 nucléotides suivants respectent la séquence du gène d'origine, afin de faciliter l'appariement de l'amorce à l'endroit désiré. D'un autre côté, le gène *Rv1651c-5'His* a pu être polymérisé, malgré l'amorce *Rv1651c-5'* dégénérée. La différence est que seul le codon TTA a été modifié ici, car le codon suivant le site de restriction GCATGC est celui codant pour un résidu histidine (CAC).

1.2 Amplification des gènes d'intérêt à partir de l'ADN cosmique (S. Cole, Institut Pasteur)

La disponibilité des cosmides a permis de faire d'autres tentatives d'amplification avec une source d'ADN différente. L'avantage principal des cosmides, par rapport à l'ADN génomique, est que l'amplification non spécifique est limitée. Il est à noter que l'extrémité N-terminale des PE-PGRS est très conservée (figure 42), il est donc probable que des gènes, autres que celui ciblé, soient amplifiés lorsque l'ADN génomique était utilisé. Par contre, les cosmides ont causé plus de problème qu'attendu. Étant en faible quantité, il a fallu en produire chez *E. coli*. La transformation par électroporation n'a donné que peu de transformant. Mentionnons que les cosmides ont entre 30 000 et 41 000 pb, étant de grosses molécules, il n'est pas surprenant que la transformation soit peu efficace. Tout de même, des cosmides MTCY06H11 ont été extraits et l'amplification du gène *Rv1651c-3'His* a été tentée. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir ce gène en un ou deux fragments.


```

100                                     149
***      *      ***  **      *      *  ***      ** *  *  **  *  *
Rv1759c MSFVIAVPETIAAAATDLADLGSTIAGANAAAAANTTSLLAAGADEISAA
Rv1651c MSFLLVEPDLVTAAAAANLAGIRSALSEAAAAASTPTTALASAGADEVSAA
Rv3812  MSFVVTVPEAVAAAAGDLAAIGSTLREATAAAAAGPPTGLAAAAADDVSIA

150                                     199
***      *      *      *  **  **  *  *  **      *  *
Rv1759c IAALFGAHGRAYQAASAEAAAFHGRFVQALTGGGAYAAAEAAAVTP---
Rv1651c VSRLFGAYGQQFQALNARAATFHAEFVSLNKGAAAYTGAEAAASVSSMQA
Rv3812  VSQLFGRYGQEFQTVSNQLAAFHTEFVRTLNRGAAAYLNTEANGGQ---

```

Figure 42 : Homologie de séquences pour les 98 premiers acides aminés des PE-PGRS Rv1759c, Rv1651c et Rv3812. Les astérisques représentent les régions d'identité.

1.3 Amplification des gènes de fusion

Dans le cas où les gènes précédemment amplifiés ne permettraient pas l'obtention des protéines recherchées, la fusion des gènes d'intérêt à des séquences propres à la cellule hôte est une alternative possible. Les essais d'amplification ont alors été faits de manière à synthétiser les gènes additionnés des séquences codant pour le PS et le CBD de la cellulase A ou des séquences codant pour le PS et le XBD de l'arabinofuranosidase B à leur extrémité 5'.

Le gène *Rv3812* n'a pas causé de problème, ce qui n'est pas le cas du gène *Rv1759c*. Ce dernier, en raison de sa longueur et de sa composition en G + C, est plus difficile à amplifier. Les essais d'amplification n'ont pas permis l'obtention du fragment en 5', lequel est fusionné. Nous nous sommes donc résolus à synthétiser le gène sous la forme non fusionnée. Il faut alors savoir que la purification par chromatographie

d'affinité et la détection à l'aide d'anticorps spécifiques ne sont plus possibles. Il reste l'analyse des protéines en gel de polyacrylamide par comparaison avec un contrôle négatif, c'est-à-dire avec la souche transformée avec le vecteur sans insert.

2. Transformation bactérienne

2.1 Transformation de la souche *S. lividans* 10-164 avec de l'ADN plasmidique recombinant

La transformation de *S. lividans* a été faite à l'aide de polyéthylène glycol qui précipite l'ADN sur les protoplastes et, du même coup, favorise l'entrée de l'ADN dans les cellules. La sélection des transformants est effectuée par ajout de thiostrepton (50 µg/mL) et cet ajout n'est fait que le lendemain de la transformation, car il faut laisser le temps à l'expression du gène de résistance. Rappelons que celui-ci est présent sur le vecteur pIAFC109, pIAF550MCSL, ainsi que sur pIAFC109MCS.

Peu de transformants de la souche *S. lividans* 10-164 ont été obtenus. Il ne faut, toutefois, pas mettre la procédure de transformation en cause, puisque sur le milieu comportant le contrôle positif (cellules transformées avec le vecteur non digéré et sans insert), une croissance abondante a pu être remarquée. Est-ce un problème au niveau de la ligation ou est-il possible que les protéines d'intérêt empêchent la bactérie de croître normalement ? Si ce dernier point est vrai, il faudrait penser à utiliser le glucose dans nos cultures pour éviter une sur-expression des gènes ciblés. Rappelons que ces gènes sont sous le contrôle d'un promoteur sensible à la répression catabolique exercée par le glucose (F. Shareck PhD (INRS-IAF), communication personnelle). L'utilisation de ce sucre s'explique donc par le fait que mieux vaut diminuer la production que de l'empêcher par inhibition de la croissance. Par contre, l'utilisation d'un faible pourcentage (1 à 2 %) est un choix judicieux pour ne pas empêcher totalement la production des protéines recherchées.

Au moment du clonage des gènes *Rv3812-5'CelA*, *-5'AbfB* et *Rv1759c*, le vecteur pIAF550MCSL (4042 pb) a été utilisé. Étant plus petit que pIAFC109 (5269 pb) et pIAFC109MCS (5296 pb), nous pensons que la transformation serait plus facile. Toutefois, des résultats similaires à précédemment ont été obtenus. Une fois encore, l'hypothèse de toxicité de la protéine d'intérêt, laquelle empêche la bactérie de croître normalement, peut être soulevée.

2.2 Transformation de la souche *E. coli* DH11S avec de l'ADN plasmidique ou phagique recombinant

La transformation de la souche *E. coli* DH11S a été faite lors d'un choc thermique. Par la suite, la sélection des transformants a été effectuée avec de l'ampicilline. Dans le but de distinguer les transformants d'intérêt, c'est-à-dire les cellules ayant incorporé un plasmide recombinant, de l'X-Gal et de l'IPTG sont utilisés. Ce dernier permet l'induction du promoteur de la séquence *lacZ α* présente sur les vecteurs choisis. Il en découle la production de la β -galactosidase qui hydrolyse l'X-Gal en un composé bleu. Toutefois, s'il y a incorporation d'un insert au niveau du vecteur, le gène de la β -galactosidase est inactivé et il en résulte la formation de colonies claires ou de plages claires, selon le cas

Pour les gènes *Rv3812-5'His* et *-3'His* insérés dans les phages M13 par digestion *SphI-SacI*, de nombreuses plages claires ont été obtenues sur le milieu 2xTY avec ampicilline, X-Gal et IPTG. Pour ce qui est du gène *Rv1759c-3'His*, une tentative de clonage dans les phages M13 a été réalisée, malgré le fait que les sites de restriction *EcoRI* et *SacI* soient l'un à côté de l'autre au niveau de ces vecteurs. Il est difficile de digérer efficacement dans ces conditions, mais la tentative a tout de même été faite et aucun transformant n'a été obtenu de cette façon. Il a donc fallu utiliser un autre vecteur se répliquant chez *E. coli* pour le clonage du gène *Rv1759c-3'His*. Un essai avec le plasmide pSL1180 (Amersham Pharmacia Biotech) a été effectué, mais n'a pas été un succès. En fait, le vecteur lui-même était une source de problème. Remarquons que le contrôle positif (sans insert) se comportait comme s'il était recombiné, des colonies

claires ont poussé sur le milieu de sélection indiquant l'absence de la β -galactosidase active. Pourtant, le vecteur semblait intact et non recombiné lors de l'analyse en gel d'agarose. Il est, toutefois, possible qu'il y ait eu mutation spontanée empêchant ainsi la transcription ou la production de la β -galactosidase fonctionnelle. Il était donc souhaitable de travailler avec un autre vecteur. Il restait pTZ19R (Amersham Pharmacia Biotech) à notre disposition, mais le même problème que les phages M13 se pose, c'est-à-dire que les sites *EcoRI* et *SacI* sont l'un à côté de l'autre. La tentative a, tout de même, été faite et s'est avérée un succès.

3. Extraction d'ADN recombinant à partir des transformants

3.1 Extraction de plasmides recombinants de la souche *S. lividans* 10-164

Il est vrai qu'il n'a pas été possible d'avoir beaucoup de transformants de *S. lividans* 10-164, mais ceux obtenus devraient contenir un plasmide d'intérêt. Notons que le gène de résistance au thiostrepton s'exprime seulement si le vecteur est circulaire. Ayant été digéré de façon à générer deux extrémités non compatibles, il est peu probable qu'il se referme sur lui-même.

Contrairement à ce qui était attendu, l'extraction de plasmide n'a pas été une étape facile. En fait, pour plusieurs transformants, aucun plasmide n'a été obtenu. Trois explications sont possibles : de un, la technique d'extraction applicable aux streptomycètes (bactéries avec une paroi et une membrane cytoplasmique) n'est pas efficace à 100 %; de deux, des mutants spontanés de *S. lividans* (acquisition d'une résistance au thiostrepton) sont apparus; de trois, les cellules avaient acquis le plasmide, mais elles l'ont perdu. Cette dernière option est envisageable, par exemple, dans le cas où la protéine d'intérêt serait toxique pour la bactérie. Ce qui semble le cas pour le gène *Rv3812*, puisque des plasmides n'ont pu être obtenus qu'à partir de culture comportant 2 % de glucose (répression du promoteur). Par contre, cela n'a pas été possible pour les

tentatives d'extraction des plasmides recombinants pIAF/65/c-5His, pIAF/759c-5His et pIAF/759c, peu importe la présence ou l'absence de glucose. Les cellules alors résistantes au thiostrepton ne semblent pas avoir le vecteur leur conférant cette résistance. Dans ce cas-ci, une combinaison des explications décrites ci-haut peut s'appliquer. Quant au plasmide pIAF/759c-3His, il a pu être extrait intègre qu'une seule fois sur six. En fait, suite à la digestion des produits obtenus et à l'analyse en gel d'agarose 0,7 %, une bande entre 6-7 kb a été obtenue pour cinq des clones testés. Ce qui ne correspond pas au vecteur (5,3 kb) ou à l'insert (2,7 kb) seul, ni au vecteur avec l'insert (une bande à 5,3 kb et une autre à 2,7 kb ou, si digestion avec une enzyme, une bande à 8,0 kb). Il semble que ce soit un vecteur recombinant partiellement dégradé. Une dégradation qui s'est produite avant ou pendant l'extraction.

3.2 Extraction de plasmides ou de phages recombinants de la souche *E. coli* DH11S

Les phages M13 recombinants sont utilisés pour la transformation d'*E. coli* DH11S. À l'intérieur de la cellule-hôte, l'ADN phagique est converti en ADN double brin qui se réplique, mais qui peut aussi donner de l'ADN simple brin. Celui-ci est encapsidé, libéré de la cellule hôte et peut être séquencé par la méthode de Sanger *et al.* (1977). Dans le cas des gènes *Rv3812*-5'His et -3'His, le séquençage n'a démontré aucune erreur d'amplification.

D'autre part, le plasmide pTZ19R portant l'insert *Rv1759c*-3'His a été récolté et a servi de matrice pour le séquençage. Cette fois, il a été possible de constater des différences au niveau de l'extrémité 3' de l'insert. En fait, on constate 52 % d'homologie par rapport à la séquence attendue. Ceci peut être attribué au fait que la source d'ADN utilisée pour l'amplification est celle de la souche BCG, alors que la séquence de référence est celle de la souche H37Rv. Cole *et al.* (1998) ont rapporté des différences au niveau de l'extrémité C-terminale entre la protéine Rv0746 (PE-PGRS) chez la souche BCG et la protéine correspondante chez la souche H37Rv. Ils ont remarqué qu'il y avait 89 % d'homologie pour les 257 derniers acides aminés. Pour la protéine *Rv1759c*, il y aurait 21 % d'homologie pour les 167 derniers acides aminés. Les conséquences de ces

variations ont pu être élucidées par Brennan *et al.* (2001) qui ont noté que la localisation cellulaire d'une protéine PE-PGRS peut différer chez la souche BCG comparativement à la localisation cellulaire de la même protéine, mais chez la souche H37Rv.

4. Analyse du niveau de transcription

Les résultats pour la détection des transcrits du gène *Rv3812* révèlent que l'ARN_m correspondant au gène d'intérêt est présent, mais peu abondant comparativement à des résultats obtenus précédemment dans le laboratoire avec des gènes comme celui de la *CelA*. Il se pourrait donc que le niveau de transcription soit faible ou que les transcrits soient instables. La première possibilité est peu envisageable, puisque le promoteur du vecteur pIAFC109 a déjà été utilisé auparavant et a démontré de hauts niveaux de transcription. Par contre, la deuxième possibilité est probable, étant donné l'abondance des RNAses. Toutefois, ces dernières ont été, pour la plupart, inhibées par le DEPC (RNAses exogènes) ou l'isothiocyanate de guanidium (RNAses endogènes). Pour ce qui est des transcrits du gène *Rv1759c-3'His*, la détection s'est avérée négative, résultat confirmé à l'aide de contrôles positifs. Une fois encore, l'hypothèse d'instabilité des transcrits est possible.

5. Analyse des protéines

5.1 Immunobuvardage de type Western

Tout d'abord, la détection de la protéine *Rv3812* fusionnée à 6 résidus histidine à l'extrémité N-terminale (*Rv3812-5'His*) a été entreprise et ce, par analyse en gel de polyacrylamide et par immunobuvardage de type Western. Les résultats de l'immunodétection, à l'aide des anticorps dirigés contre la queue d'histidine, suggèrent que la protéine d'intérêt est peu ou pas du tout produite. Par contre, il faut tenir compte du fait qu'il est possible qu'elle soit présente sous la forme non-fusionnée, c'est-à-dire dépourvue de la queue d'histidine. Ce qui peut être le cas si un peptide signal est présent

à l'extrémité N-terminale de notre protéine. Donc, pour éviter un faux négatif, il est préférable de recommencer l'analyse à partir d'une culture de la souche *S. lividans* 10-164/plAF3812-3His. Ce qui sous-entend la production de notre protéine avec la fusion à l'extrémité C-terminale. Cette fois, une réaction aux anticorps est visible dans le surnageant de la culture obtenu après 48 heures de croissance en M14-glucose 1%. Il s'agit donc d'une protéine extracellulaire, ce qui confirme l'hypothèse quant à la présence d'un peptide signal. De plus, c'est une protéine qui n'est pas stable : elle est présente dans une culture de 48 heures, mais n'est pas détectée après 72 heures; elle n'est pas produite en présence de xylose, mais peut l'être en présence de glucose. Rappelons que le glucose exerce une répression catabolique sur le promoteur du vecteur. Ainsi, en présence de ce sucre, il est possible d'éviter la sur-expression du gène d'intérêt. Dans le cas d'une protéine toxique, il est préférable de limiter l'expression du gène pour obtenir une croissance adéquate de l'hôte et ainsi un rendement protéique appréciable. Enfin, en ce qui concerne la protéine Rv1759c-3'His, elle n'a pu être détectée, ni au niveau cytoplasmique, ni au niveau du surnageant d'une culture en présence de glucose ou xylose. Les transcrits du gène correspondant étant peu ou pas présent, il n'est pas surprenant de ne pas détecter la protéine.

5.2 Purification des PE-PGRS par chromatographie d'affinité

L'objectif premier était de purifier les protéines selon un protocole comportant un nombre limité d'étape. À noter que plus le procédé est long, moins le rendement en protéine est élevé. Pour ce faire, seule la chromatographie d'affinité a été effectuée.

L'expression du gène *Rv3812-3'His* a permis la production d'une protéine avec la fusion à l'extrémité C-terminale. La purification a été entreprise sur une colonne Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) et l'analyse en gel de polyacrylamide des fractions d'éluion obtenues a révélé la présence d'une protéine de poids moléculaire attendu, éluée avec 150 mM d'imidazole. Ce qui a également été la concentration nécessaire pour éluer deux autres protéines cytoplasmiques de *M. tuberculosis* qui étaient aussi fusionnées à une queue de six résidus histidine (stage à l'été 2000). Tout semblait concorder jusqu'au moment de l'immunodétection dont le résultat a été négatif. En fait, il n'a même plus été

possible d'obtenir un résultat positif pour les protéines totales d'un surnageant de culture obtenu après 48 heures de croissance en M14-glucose. Doutant alors des résultats de l'immunodétection, le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine retenue sur la colonne a été effectué. La séquence obtenue, soit ISGEP, ne correspond pas à la protéine Rv3812. Suite à une recherche d'homologie de séquence, nous avons conclu qu'il s'agissait d'une estérase de *S. lividans* (annexe III). Le fait qu'elle soit retenue à la colonne Ni-NTA peut être justifié par la présence de nombreuses histidines. Lorsque la protéine est repliée, des motifs peuvent être formés permettant ainsi la liaison avec le nickel de la colonne.

La protéine Rv3812-3'His n'a donc pas pu être détectée et trois raisons peuvent justifier ceci : absence de traduction, possibilité de clivage de l'extrémité C-terminale ou présence de dégradation. Dans le cas où cette dernière alternative serait la bonne, la fusion de la protéine à des domaines non étrangers à la cellule hôte pourrait être une bonne solution. Malheureusement, les protéines Rv3812-5'CelA et -5'AbfB n'ont pas été détectées. Tremblay *et al* (2002) ont également produit des protéines de *M. tuberculosis* chez *S. lividans*. Leurs résultats démontrent la présence de protéases au niveau extracellulaire, protéases pouvant s'attaquer aux protéines hétérologues sécrétées. La localisation cellulaire des PE-PGRS n'est pas connue, mais du moins lors des fusions avec un PS, elles devraient être sécrétées. Il se peut donc que les protéines d'intérêt aient été complètement dégradées par les protéases relatées par Tremblay *et al*. Il est également possible qu'il y ait des problèmes au niveau de la traduction de l'ARN messager en protéines. Il faut noter la présence d'un codon TTA (Leu) dans le gène *Rv3812* (annexe VI). Ce qui peut entraîner un faible rendement ou une impossibilité à produire la protéine, car ce codon est rare chez *S. lividans* (www.kazusa.or.jp/codon/). Nous avons déjà pris connaissance de ce problème dès le début, mais nous avons tout de même voulu produire la protéine telle quelle. Maintenant, une solution serait de faire de la mutagenèse dirigée, afin de vérifier si le problème se situe principalement au niveau du codon TTA.

V- CONCLUSION

La recrudescence de la tuberculose, le déclin de l'efficacité du vaccin BCG et l'apparition de souches, de *M. tuberculosis*, résistantes aux antibiotiques incitent la recherche pour l'élaboration de nouveaux traitements et moyens de prévention de la tuberculose. L'objectif de mon projet était de faciliter ces recherches en développant un système d'expression où l'hôte est non pathogène et à croissance rapide. *S. lividans*, en plus de posséder ces caractéristiques, est proche génétiquement de *M. tuberculosis*. Ce dernier élément est un net avantage par rapport à d'autres cellules microbiennes, comme *E. coli*, communément utilisées comme hôte. L'hypothèse que *S. lividans* serait un bon candidat pour produire des protéines fonctionnelles de *M. tuberculosis* restait à prouver.

Des travaux précédents ont permis de valider l'hypothèse, car il a été possible de produire deux protéines intracellulaires de *M. tuberculosis* chez *S. lividans* (travaux de stage à l'été 2000). D'abord, la protéine KasA qui est la cible thérapeutique de l'isoniazide et ensuite, la protéine Hsp16,3 qui est une protéine produite en réponse à un stress. Chacune d'elles a été retrouvée dans le surnageant obtenu après lyse cellulaire et centrifugation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à des protéines de la famille PE-PGRS dont la localisation cellulaire et la fonction ne sont pas connues. Plusieurs spéculations existent actuellement quant au rôle des PE-PGRS, entre autres qu'elles auraient une implication dans la capacité de persistance de *M. tuberculosis* dans le macrophage (Ramakrishnan, 2000). Elles pourraient donc être des cibles thérapeutiques intéressantes dans la lutte contre la tuberculose. La première étape de mon projet était d'amplifier les gènes d'intérêt, soient les gènes *Rv3812*, *Rv1651c* et *Rv1759c*. Leur amplification n'a pas été facile et cette difficulté était envisageable, puisque les gènes choisis sont longs et riches en G+C. De plus, dans le cas du gène *Rv1651c*, l'amorce en 5' était dégénérée. Rappelons que nous avons remplacé le codon TTA par un codon TTG qui code aussi pour une leucine, mais qui est plus abondant chez l'hôte. La deuxième étape du projet était de cloner les gènes dans un vecteur à multiples copies et de transformer la souche *S. lividans* 10-164. Alors qu'on s'attendait à avoir beaucoup de transformants, très peu ont été obtenus. La raison expliquant ceci n'est pas claire, mais pourrait être liée à la toxicité

des protéines d'intérêt pour l'hôte. La troisième étape du projet était de purifier les vecteurs recombinants pour ensuite séquencer l'insert. Le point important à retenir est que, dans certains cas, les vecteurs d'intérêt étaient obtenus qu'à partir de cultures en présence de glucose. En d'autres mots, la répression du promoteur des gènes à l'étude était nécessaire pour éviter la perte du plasmide. La théorie reposant sur le fait que les protéines d'intérêt seraient toxiques pour l'hôte était, encore une fois, une explication probable. La quatrième étape du projet était la production et la purification. Les protéines totales des transformants d'intérêt ont alors été analysées, mais les protéines recherchées ne semblaient pas présentes. La production des PE-PGRS sous une forme fusionnée a été tentée, car il est maintenant reconnu que l'interaction entre une protéine hétérologue et le CBD de la CelA de *S. lividans* peut avoir un effet stabilisateur (Richins *et al.*, 2000). L'utilisation du XBD à ces fins n'est pas rapportée dans la littérature, mais pourraient être également une bonne option. Malheureusement, l'ajout de ces séquences aux gènes d'intérêt n'a pas permis l'obtention des protéines recherchées. Le faible niveau de transcription, de traduction ou la possibilité de dégradation peut expliquer ceci.

Il a été démontré que les transcrits des gènes d'intérêt étaient peu ou pas présents. Précédemment, nous avons indiqué que ce résultat n'était pas occasionné par la répression du promoteur, mais plutôt par l'instabilité des ARN messager. Pour ce qui est de la traduction, mentionnons que deux des trois gènes choisis possédaient un codon TTA qui est un codon rarement retrouvé dans le génome de *S. lividans*. Pour l'un des gènes (*Rv1651c*), le codon TTA a été facilement remplacé par un codon plus abondant (TTG), car la modification a pu être faite dans l'amorce en 5'. Par contre, nous n'avons pu savoir si ce changement avait eu une importance sur le niveau de traduction, puisque aucun transformants avec le plasmide pIAF1651c n'a été obtenu. Pour ce qui est du gène *Rv3812*, le codon TTA n'a pas été remplacé et l'expression du gène n'a pas permis la synthèse de la protéine recherchée. Le remplacement du codon rare (codon TTA), par mutagenèse dirigée, permettra de déterminer si la protéine est peu ou pas produite en raison de la présence du codon rare dans le gène correspondant.

Il faut aussi tenir compte du fait que les protéines peuvent aussi bien être produites en quantité appréciable, puis dégradées. Tremblay *et al.* (2002) ont remarqué

une hétérogénéité au niveau de l'extrémité N-terminale de deux protéines de *M. tuberculosis* (Rv0934 et Rv3763) produites chez *S. lividans* sous forme de protéines sécrétées. Paradis *et al* (1996) ont rapporté que la souche *S. lividans* sécrète des enzymes protéolytiques dans le milieu de culture qui peuvent éliminer des acides aminés à l'extrémité N- et C-terminale des protéines sécrétées. Il est possible que les PE-PGRS soient des protéines extracellulaires très sensibles aux protéases décrites précédemment.

Les futures utilisations de *S. lividans*, pour la production de protéines hétérologues provenant de *M. tuberculosis*, devront se limiter à des protéines intracellulaires. Ce qui est tout de même dommage, car plusieurs protéines d'intérêt ne pourront être obtenues chez cet hôte. De plus, l'avantage des protéines sécrétées est qu'elles peuvent être récupérée directement dans le milieu de culture, l'étape de lyse cellulaire n'étant alors plus nécessaire. Il faut aussi noter que le choix de *S. lividans*, comme hôte alternatif, repose souvent sur ses grandes capacités de sécrétion. Il serait donc intéressant d'envisager le développement de souches mutantes de *S. lividans* pour une ou des protéases susceptibles de dégrader les protéines d'intérêt.

Les perspectives d'avenir du projet sont donc de vérifier, par mutagénèse dirigée, l'effet du codon rare sur l'expression du gène *Rv3812*. L'identification, ainsi que la mutation de protéases extracellulaires connues pourraient aussi apporter une contribution significative pour l'obtention et l'étude des protéines d'intérêt. Un autre élément consiste à empêcher la sécrétion des PE-PGRS. Ce qui implique d'identifier le peptide signal de la protéine et amplifier que la séquence codant pour la protéine mature.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, M. Claude Dupont, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour les nombreux conseils qu'il m'a donnés. Je suis très reconnaissante envers M. Dupont, celui qui m'a fait confiance et qui m'a permis de faire ma maîtrise au sein d'une merveilleuse équipe. Je voudrais également remercier mon co-directeur, M. François Shareck, pour m'avoir appris tant de choses, mais surtout pour sa grande générosité. Il a toujours été disponible pour répondre à mes questions et pour me guider dans des moments où c'était plus difficile. Je me considère très chanceuse d'avoir pu profiter du grand savoir-faire de mon directeur et de mon co-directeur. Un grand merci à M. Rolf Morosoli pour son aide dans l'isolation de l'ARN et pour m'avoir permis de travailler avec la radioactivité dans ses installations.

J'aimerais remercier les techniciens et techniciennes que j'ai côtoyés, ils m'ont tous apporté, à un moment ou un autre, une aide précieuse. Un merci tout spécial à Lise Trempe qui m'a accordé beaucoup de son temps dans mes débuts en biologie moléculaire. Je suis très consciente que je lui dois beaucoup et je ne suis pas prête de l'oublier. Elle a été une excellente confidente et une bonne amie. Prends soin de toi Lise! Merci également à Lisette Duval pour ses conseils en purification de protéine. Gentillesse et douceur sont deux mots qui la caractérisent tellement bien. Un grand merci à Liette Biron pour tous ses encouragements, pour sa confiance sans borne et pour son aide.

Merci à tous les étudiants. Christine pour m'avoir assistée dans mes premiers pas dans le laboratoire. Nabil pour son support moral dans les situations stressantes et aussi pour sa belle table des codons d'usage. Patrick pour avoir toujours été disponible pour répondre à mes interrogations. Dominique pour son sourire et Éric pour son exemple de détermination. Merci.

Finalement, j'ai veu remercier sincèrement les trois personnes les plus importantes dans ma vie. D'abord, mon père, Gilles, non seulement pour son aide financière tout au long de mes études, mais aussi pour sa confiance. Je sais que tu as trouvé difficile mon départ pour Laval, mais je sais qu'aujourd'hui tu comprends mon choix et que tu es fier de moi.

Je t'aime énormément. Ma mère, Henriette, a passé beaucoup de son temps à m'aider dans mes leçons lorsque j'étais petite. Elle m'a toujours encouragée à poursuivre mes études et je crois que c'est, en grande partie, grâce à elle si je suis rendue où je suis aujourd'hui. Maman, je te dois tellement. Une autre personne que j'aimerais remercier est l'amour de ma vie, David, sans qui la vie ne serait pas aussi belle. Je t'aimais, je t'aime et je t'aimerai... Merci de tout cœur pour tes encouragements, ta compréhension et ta patience.

BIBLIOGRAPHIE

Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR Jr. 2001. Evidence that mycobacterial PE-PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect. Immun.*, 69 (12) : 7326-33.

Campbell N et Mathieu R. 1995. Les manipulations génétiques. *Biologie*. Chapitre 19 : 390-419.

Chang Z, Primm T, Jakana J, Lee I, Serysheva I, Chiu W, Gilbert H et Quiocho F. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* 16-KDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J. Biol. Chem.*, 271 (12) : 7218-23.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393 (6685) : 537-44.

Erm S. 1990. Heterologous gene expression in yeast. *Methods in Enzymology*, vol. 185 : 231-33.

Espitia C., Lacleste JP, Mondragon-Palomino M., Amador A., Campuzano J., Martens A., Singh M., Cicero R., Zhang Y., Moreno C. 1999. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis* : a new family of fibronectin-binding proteins ? *Microbiology*, 145 (12): 3487-95.

Gilbert M., Morosoli R. Shareck F et Kluepfel D. 1995. Production and secretion of protein by Streptomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15 (1) : 13-39.

Gusek TW, Kinsella JE. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. Crit. Rev. Microbiol. 18 (4) : 247-60.

Hatfull G.F. 1996. The molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis : 29-47

Heym B, Philipp W, Cole S.T. 1996. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis : 49-69.

Hopwood D., Bibb M., Chater K. et Kieser T. 1987. Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*. Methods in Enzymology, vol. 153: 116-66.

Hurtubise Y, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R. 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol. Microbiol. 17 (2) : 367-77.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Center, Norwich Research Park, Colney, Norwich, UK.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Production and secretion of proteins by *Streptomyces*. Practical *Streptomyces* Genetics :385-92.

Kieser T. et Hopwood D. 1991. Genetic manipulation of *Streptomyces* : integrating vectors and gene replacement. Methods in Enzymology, vol. 204: 430-58.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227 (259) : 680-85.

Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* 10 (5) :923-33.

Lowry O.H., Rosenbrough N.H., Fan A.L. et Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.

Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mdluli K, Slayden R, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane D, Musser J, Barry C. 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science*, 280 (5369) : 1607-10.

Michele T, Ko C et Bishai W. 1999. Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis sigF* gene : implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (2) : 218-25.

Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test. *Vet Microbiol.* 40 (1-2) : 111-24.

Orfanoudaki G. et Egly JM. 1993. L'expérience des protéines recombinantes chez *E. coli*. *Le technoscope de biofuture.* 124 : 3-13.

Pagé N, Kluepfel D, Shareck F, Morosoli R. 1996. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. *Appl Environ. Microbiol.* 62 (1) :109-14.

Piatek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs WR Jr, Kramer FR, Alland D. 2000. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (1) :103-10.

Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S. 2000. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycin-rich PE-PGRS family. *Science*, 288 (5470) : 1436-39.

Richins RD, Mulchandani A, Chen W. 2000. Expression, immobilization, and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (6) :591-96.

Roche Molecular Biochemicals. 1999. Long template PCR. PCR application manual. Deuxième édition. Chapitre 4: 59-86

Sanger F, Nicklen S et Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 : 5463-67.

Sharma AK, Verma I, Tewari R, Khuller GK. 1999. Adjuvant modulation of T-cell reactivity to 30-kDa secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its protective efficacy against experimental tuberculosis. *J. Med. Microbiol.* 48 (8) : 757-63.

Shin CS, Hong MS, Kim DY, Shin HC, Lee J. 1998. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (4) : 364-70.

Thompson C.J., Ward J.M. et Hopwood D.A. 1980. DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature*, 286 (5772) : 525-27.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (9): 4350-54

Tremblay D, Lemay J, Gilbert M, Chapdelaine Y, Dupont C, Morosoli R. 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Can. J. Microbiol.* 48 (1) :43-48.

Ueda Y., Taguchi S., Nishiyama K., Kumagai I. et Miura K. 1993. Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1172(3) : 262-266.

Wayne L, Kubica G. 1984. The Mycobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 : 1435-57.

Weicker M, Doherty D, Best E et Olin P. 1996. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. in Biotechnol.*, 7 (5): 494-499.

Yuan Y, Crane D et Barry C. 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis* : function of the mycobacterial α -crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 178 (1) : 4484-92.

ANNEXES

Annexe I : Liste des produits utilisés

Acétate de sodium (Sigma)
Acide acétique glacial (BDH)
Acide borique (Mallinckrodt)
Acide casamino (Difco)
Acide chlorhydrique (Fisher)
Acide cyclohexylaminopropane sulfonique (CAPS) (Sigma)
Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (BDH)
Acrylamide (Roche)
Adénosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech)
ADN de sperme de saumon (Sigma)
Agar (Difco)
Agarose (Roche)
Albumine de sérum bovin (BSA) (Bio-Rad)
Alcool iso-amylque (J.T. Baker)
Ampicilline (Roche)
Anticorps monoclonal de souris spécifique à la queue d'histidines (Amersham Pharmacia Biotech)
Anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech)
Bactotryptone (Difco)
Bleu de bromophénol (Bio-Rad)
Bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad)
Borate de sodium (J.T. Baker)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) (Bio-Rad)
Bromure d'éthidium (Bio-Rad)
Butanol (Fisher)
Carbonate de sodium (J.T. Baker)
Chloroforme (Fisher)
Chlorure de calcium (Sigma)
Chlorure de césium (Bioshop)
Chlorure de cobalt (BDH)

Chlorure de fer (Fisher)
Chlorure de magnésium (BDH)
Chlorure de manganèse (Fisher)
Chlorure de potassium (Sigma)
Chlorure de sodium (Sigma)
Chlorure de zinc (Fisher)
Citrates de sodium (Fisher)
Coloration de l'argent (Bio-Rad)
2-Désoxyadénine-5-triphosphate (Roche)
2-Désoxycytosine-5-triphosphate (Roche)
2-Désoxycytosine-5-triphosphate marqué au ^{32}P (Amersham Pharmacia Biotech)
2-Désoxyguanine-5-triphosphate (Roche)
2-Désoxythymine-5-triphosphate (Roche)
Diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma)
Dihydrogène-orthophosphate de potassium dibasique (BDH)
Dihydrogène-orthophosphate de potassium monobasique (J.T. Baker)
Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma)
Dithiothreitol (DTT) (BDH)
Dodécylsulfate de sodium (Bio-Rad, Roche)
Enzyme Pwo polymérase 5 U/ μL (Roche)
Enzymes de restriction (Amersham Pharmacia Biotech)
Éthanol (Gouvernement du Québec)
Extrait de bœuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Ficoll de type 400 (Sigma)
Formaldéhyde (BDH)
Formamide (Fisher)
Glucose (Sigma)
Glycérol (ICN)
Glycine (ICN)
Hydroxyde de sodium (J.T.Baker)

Hydroxyquinoline (Sigma)
Imidazole (Roche)
Isopropanol (J.T. Baker)
Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Roche)
Isothiocyanate de guanidium (Gibco BRL)
Lait écrémé (Difco)
L-Méthionine (Sigma)
L-proline (Gibco BRL)
L-Tyrosine (Gibco BRL)
Lysozyme (Amersham Pharmacia Biotech)
Maltose (Difco)
Membrane de nylon chargée positivement (Roche)
Membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride) (Xymotech Biosystems Inc.)
 β -mercaptoéthanol (Bio-Rad)
Méthanol (Gouvernement du Québec)
Molybdate d'ammonium (Fisher)
N.Z amine (Sheffied products)
O-dianisidine (Sigma)
Peroxyde d'hydrogène (Laboratoire Mat)
Persulfate d'ammonium (ICN)
Phénol (BDH)
Phénol neutre (Roche)
Phosphate de sodium dibasique (Fluka)
Phosphate de sodium monobasique (Fluka)
Polyéthylène glycol (Roche)
Polyvinylpyrrolidone (Sigma)
Propionamide (Aldrich chemical Company Inc.)
Pwo DNA polymérase 5 U/ μ L (Roche)
S1 nucléase (Amersham Pharmacia Biotech)
Sarkosyl (IBI)
Séphadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech)

Solution de Folin (ICN)
Standard de masse moléculaire «1 kb DNA ladder» (GICO BRL)
Standard de poids moléculaire (Low Molecular Weight) (Bio-Rad)
Standard de poids moléculaire (Rainbow) (Amersham Pharmacia Biotech)
Sucrose (Amersham Pharmacia Biotech, Bio-Rad)
Sulfate d'ammonium (Fisher)
Sulfate de cuivre (J.T. Baker)
Sulfate de fer (J.T. Baker)
Sulfate de magnésium (J.T. Baker)
Sulfate de manganèse (J.T. Baker)
Sulfate de nickel (Amersham Pharmacia Biotech)
Sulfate de potassium (Anachemia)
Sulfate de zinc (Sigma)
T₄ ADN ligase (Amersham Pharmacia Biotech)
Tampon «One-Phor-All» 10X (Amersham Pharmacia Biotech)
Tampon PCR 10 X avec MgSO₄ (Roche)
Tampon S1 5X (Amersham Pharmacia Biotech)
Taq ADN polymérase (Amersham Pharmacia Biotech)
Tartrate potassium de sodium (BDH)
Temed (Sigma)
TES (acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique) (Sigma)
Thiostrepton (Squibb Canada Ltée)
Tris (Roche)
Trousse commerciale Flexiprep™ (Amersham Pharmacia Biotech)
Trousse commerciale «Gel Drying Film» (Promega)
Trousse commerciale GFX (Amersham Pharmacia Biotech)
Trousse commerciale marquage par déplacement de l'encoche (Roche)
Tryptone de soya (Difco)
Tween 80 (Aldrich Chemical Compagny, Inc)
Xylène cyanol (BDH)
Xylose (Sigma)

ANNEXE II : a) Comparaison de l'extrémité 3' de l'insert *Rv1759c-3'*His cloné avec la séquence homologue chez la souche H37Rv. Les zones ombragées représentent les régions d'identité.

		1		50
BCG	(1)	AAAGCTTGCATCCCT	CAAGTCACCTAGAGGATCCCGGGACGAGG	
H37Rv	(1)	-----GGGTGGCGTG	IAGGCGCAATGCTGGCTCGTCAC	
Consensus	(1)		G GG G T G A C GG T C C	
		51		100
BCG	(51)	TCTAATCGTGATGCTAATGGTCGTCAAGCCTGCTGCC--CAATCCGG		
H37Rv	(38)	CCTCAATCGTCCGCTCGTCCGCGGCAGCGCGCTCCAGCTGTAA		
Consensus	(51)	C AATG GG G TG G AGC G G CC C T C G		
		101		150
BCG	(99)	CAGATA CAGC CACGGGGCCCG--CACCGCCGTGCCCGGGTTT		
H37Rv	(88)	GCAAGC GGTG TGGGGGGCCCGGGCAGGCGGATTGTTTAAAGC		
Consensus	(101)	C AG C C CGGCGCCG CG CA C G C C		
		151		200
BCG	(148)	TCCGGATTGCCCTCCGGTCAACCTTCCGCTGGTGGGGCAT--CC		
H37Rv	(138)	TCCGGGGGGGCCGCGGAAAG-----GGGCTACAGCTCAATGGAT		
Consensus	(151)	TCCGGC GCCG CGGC C G GCT G C C AT C C		
		201		250
BCG	(196)	CCGGCCACCGTACCGCCTTGCCGTACAGC---CCGGCCTTGC		
H37Rv	(183)	GGCGTATGGCGACCGGTGGGCCGCCAATCACCGGCCTTCCAG		
Consensus	(201)	G CGG G CG CACCG G GCCG CA CCGGCCTT C		
		251		300
BCG	(243)	CGGGCCCGTTCGCCCGGGCGCCCGCGCCGGGGCTGGGAAAGCCG		
H37Rv	(233)	CGGGTTCCGGCGCGGGGGGGGGGGGGCGCCAGCCATACCGGCCCG		
Consensus	(251)	CGGC CG CG CCG CGGCGCCG CG CC GCG T CCG GCCG		
		301		350
BCG	(293)	CTCGAAGCCCGTATTTGCCGGGCCCAACCGGTGCCGCATCACCGC		
H37Rv	(283)	GCAGAACGGCGCC---CGGGCAAGGCCGGCTGTAGGCAAGCG		
Consensus	(301)	G GAA G CGG G G CGGC CCGG C CA CG C		
		351		400
BCG	(343)	AGTCTATAGGCTTATACCCCGTTGCCGCGGCCCG-----CCGAGC		
H37Rv	(330)	GGTCAAGTGGCGCCGCGGGGATGCGCCACAGCGGCAAGGTGAGC		
Consensus	(351)	GTG C TG GC G G G GCC CC GC C G GAGC		
		401		450
BCG	(389)	CGTAAACATCCCGCCCTGC--CGCGGGCGCGCAAGACCGGGCTTGG		
H37Rv	(380)	CGGCAG-CAACGCGTGGTATCGGAACGGCGGCAAGCGGGAAATGG		
Consensus	(401)	CG G CAA CCG G TG CG C CG CG CA C CGGC TGCC		
		451		500
BCG	(438)	TGACGGCTGACCGGCTCCGCCGGCACCGCCACCATG--A		
H37Rv	(429)	GGAAGCGCGGGAAGCGGTGCCGGGGGGGGGGGGTGGTGGTACT		
Consensus	(451)	GA A GC GG G C C GC G GCCGGC CGCC G G T G A		
		501		550
BCG	(485)	-GGTCAACGAC CAGCA TTCCGCCTACAC		
H37Rv	(479)	CGCCGATGGAGCAGCGCTTGACGTAG		
Consensus	(501)	GG G G G CAGCA GC A		

ANNEXE II : b) Comparaison de l'extrémité C-terminale de la protéine Rv1759c-3'His
avec la séquence homologue chez la souche H37Rv

```

BCG      (    1) -----agrripgyrapnddgdgassraahpgrvpahrrrrrtraprf
H37Rv    (    1) gggvggnasstlnasggaggsagsslsgka-----gag

BCG      (   44) sliastlaaqaipaatvtavavqpalaaga-----avpa
H37Rv    (   36) agsalfygsagaggnagyslngtggdgtgagqitglrsgfggagga

BCG      (   82) gaapgaieaaakagdlagptaaaitasieavapvaagpaepinpappp
H37Rv    (   86) ggsdtggngngagkaglynggdggaggdatsgkagagg-----

BCG      (  132) ppapalpdrlepplppappdalrvsepalpptpppppa
H37Rv    (  130) vvingngngnagkaggtagaggagglvgrdgqhglt

```

Annexe III: Recherche d'homologie avec la séquence ISGEP.

Résultat :

Estérase de *Streptomyces lividans*

peptide signal
 1 matlipkkgs tlnkgirtr rargalaggt vltaaaallt avpaaqaisg eppaatdhaf
 61 tarlhigegd tlragsaalv hqqwlltats cfaatpggev ksgkpalkst atlggktlgi
 121 vevvprddrd vamvrlaepv tvepvrlaa dapvaaetll gagfgtrte wapdqllhtge
 181 frvdsvtggt veltgqdgvs vckgdtggpa lrgtggevel aavhsrswgg gcfgetert
 241 gavdaradgl adwvtdvnr drtqsadvdg dgradlvvlr sngdvvvhm lgdsfaagr
 301 msggwglfvt wkdlgrlyfa dvdgdrkadm ivhtsdgnie vrfnhgtywd qgthwsggw
 361 rfidgsdlgr lyfadvdgdg radmivhtgd gnvevrfnhg tywdqgthws ggwgrfvtk
 421 dlgrlyfadv dgdgradmiv htgdgnvevr fnhgtywdqg thwsggwgrf vdgsdlgsle
 481 fgdatgdgka dllvrtkdgv valrtnhgty wdqgkfmitt

Annexe IV : Séquence du gène *Rv1651c* (3036 pb)

1 atgtcgttct tactcgtgga gccggacttg gtcacagcag cggccgcaa tttagctggt
 M S F L L V E P D L V T A A A A N L A G
 61 attcgtcgcg cactgagcga agccgctgcc gccgcacga cccccacgac cgcgctggca
 I R S A L S E A A A A A S T P T T A L A
 121 tcggccggcg ccgatgaggt gtcggcggct gtctcgcgac tattcggcgc ctacggtcag
 S A G A D E V S A A V S R L F G A Y G Q
 181 caatttcaag cgctcaacgc cggggcggcg acgtttcacg ccgagttcgt gagcttggtg
 Q F Q A L N A R A A T F H A E F V S L L
 241 aacggcggcg cggcggccta taccggcgcc gaggcggcca gcgtgctgtc gatgcaggcc
 N G G A A A Y T G A E A A S V S S M Q A
 301 ctgctcgaag cgggtgaatgc gccacgcag acgtcgtcgg ggcgcccact gatcggcaac
 L L D A V N A P T Q T L L G R P L I G N
 361 ggcgccgatg gagtggcggg gaccgggtca aatgcggcg gcaacggcgg gcccggtgga
 G A D G V A G T G S N A G G N G G P G G
 421 attttgtacg gcaacggcgg caacggcggg gccggcggta acggcggggc cgcgggattg
 I L Y G N G G N G G A G G N G G A A G L
 481 atcggcaacg gcggcgccgg cggcgccggc ggtgctggag gtgcaggcgg cgtgggcggg
 I G N G G A G G A G G A G G A G G A G G
 541 gccggcggca ccggcggact gttgtatggc aacggcggtg ccggcggcaa cgggggcagt
 A G G T G G L L Y G N G G A G G N G G S
 601 gccgctcgcg ccggtggggc cggcggcaac gccctgctgt tcggcaacgg cgggaacggc
 A A A A G G A G G N A L L F G N G G N G
 661 ggaagtgggg cttccggcgg agccgccggc cacgccggga cgatatttgg taacggcggc
 G S G A S G G A A G H A G T I F G N G G
 721 aatgctgggg ccgatcggg gctagccggc gccgacggcg gttgttcgg caatggcggg
 N A G A G S G L A G A D G G L F G N G G
 781 gacggtggtt ccagcacctc gaaggctggc ggtgcaggtg gaaatgact gttcggcaac
 D G G S S T S K A G G A G G N A L F G N
 841 ggcggggacg gcggatcgag caccgtcgc gccgggggtg cgggcgggaa taccctggtc
 G G D G G S S T V A A G G A G G N T L V
 901 ggcaatggcg gtgccggcgg cgctggcggc accagcggtc tcaccggtag cggcgtggcc
 G N G G A G G A G G T S G L T G S G V A
 961 ggcggggccg gcggcagcgt cggcctgtgg ggctccggcg gtgccggcgg cgacggcggc
 G G A G G S V G L W G S G G A G G D G G
 1021 gccgccacgt cattgttggg cgtcggcatg aacgcggcg ctggcggggc cggcggcaac
 A A T S L L G V G M N A G A G G A G G N

1081 gccggcctgc tgtacggcaa cggcgggtgcc ggtggggccg ggggcaatgg tggggatacg
 A G L L Y G N G G A G G A G G N G G D T

1141 acggtgccat tgttcgactc cggcgtcggc ggtgccgggg gtgctggcgg caacgccagc
 T V P L F D S G V G G A G G A G G N A S

1201 ttgttcggta acggtgggac cggtggcgtc ggcggcaagg gggggaacgag cagcgatctg
 L F G N G G T G G V G G K G G T S S D L

1261 gccagcgcta ccagcggagc cggcggggcc ggcggggccg gcggcgtcgg cgggctgctc
 A S A T S G A G G A G G A G G V G G L L

1321 tacggcaacg gcgggaacgg gggggccggt ggcacggcg gggctgctat caacatactc
 Y G N G G N G G A G G I G G A A I N I L

1381 gccaacgccg gtgccggcgg cgccgggtgt gcccggggca gtagcttcat cggcaatggc
 A N A G A G G A G G A A G S S F I G N G

1441 ggcaacggtg gggccggtgg cgccggtggg gctgcagcgc tatttagctc cggtgtcggc
 G N G G A G G A G G A A A L F S S G V G

1501 ggtgccggcg gcagcggcgg caccgcgttg cttctcggca gcggtggggc cggtgggaac
 G A G G S G G T A L L L G S G G A G G N

1561 ggcggcactg gtggggctaa ctctggctcc ctcttcgcaa gtcccggcgg taccggcggg
 G G T G G A N S G S L F A S P G G T G G

1621 gccggcggtc acggcgggtgc cggcgggctg atatggggca acggtggggc cggtgggaac
 A G G H G G A G G L I W G N G G A G G N

1681 ggcggcaacg gtggcaccac cgccgatggc gcccttgagg gtggcaccgg cggtatcggc
 G G N G G T T A D G A L E G G T G G I G

1741 ggcaccggag gcagcgccat cgcgttcggt aatggcgggc agggcggcgc cggtggtacc
 G T G G S A I A F G N G G Q G G A G G T

1801 ggtggggate acagtggcgg caacggatc ggcgtaagg gcggtgccag cggaaacggc
 G G D H S G G N G I G G K G G A S G N G

1861 ggcaacgccg gccaaagtgt cggcgacggc gggaccggcg gaaccggcgg cgcggggcgg
 G N A G Q V F G D G G T G G T G G A G G

1921 gccggttccg gtaccaaggc cggcggcacc ggtagcgcag gcggtcacgg cggcaacgcc
 A G S G T K A G G T G S D G G H G G N A

1981 accttgatcg gcaacggtgg tgacggtggc gccggtggcg cggcggcgc cggcagcccg
 T L I G N G G D G G A G G A G G A G S P

2041 gccggtgccc cgggtaatgg cggcaccggg ggcaccggcg ggggtgtggt cggccaaagt
 A G A P G N G G T G G T G G V L F G Q S

2101 ggcagctccg gtccaccggg cgcggcagcg ctggccttcc ctagcctgag cagcagtgtt
 G S S G P P G A A A L A F P S L S S S V

2161 cccatcctcg ggccatacga agacctcatc gccaacacgg tcgccaacct ggcgagcatc
 P I L G P Y E D L I A N T V A N L A S I

2221 ggcaatacct ggcttgccga cccggcgccg ttcctgcagc agtacctcgc caaccagttc
 G N T W L A D P A P F L Q Q Y L A N Q F

2281 ggctacggcc agctgaccct aaccgcgctg acagatgcca ccagggactt cgctattggg
 G Y G Q L T L T A L T D A T R D F A I G

2341 ctggctggca taccgccgag cctgcaatcg gccttgcaag ccctcgcggc aggcgacgtc
 L A G I P P S L Q S A L Q A L A A G D V

2401 agcggcgccg tgaccgacgt gttagggcg gtggggaagg tcttcgctcag cgggtgtgac
 S G A V T D V L G A V V K V F V S G V D

2461 gcgagtgact tgtcgaacat cctgctgctc gggccggtgg gagacctgtt ccccatcctg
 A S D L S N I L L L G P V G D L F P I L

2521 agcatccccg gcgccatgtc acaaaacttc accaatgtgg tgatgacggt cacggacaca
 S I P G A M S Q N F T N V V M T V T D T

2581 accatcgcct tttcgatcga taccacgaac ttgaccgggg tgatgacggt tggattgccg
 T I A F S I D T T N L T G V M T F G L P

2641 ctggcgatga cccttaatgc ggtgggttcg ccgatcacga cggcaatcgc attcggccgag
 L A M T L N A V G S P I T T A I A F A E

2701 agcacgacag cgttcgtcag cgccgtgcag gccggaaacc tgcaggcggc agcggcggcc
 S T T A F V S A V Q A G N L Q A A A A A

2761 ctggtcggtg ctcccgccaa cgtcgccaac ggcttcctca atggcgagge caggetgccc
 L V G A P A N V A N G F L N G E A R L P

2821 ctggccctgc caacatcggc gacagggggg attccggtga cggtcgaggt tcccgtcggc
 L A L P T S A T G G I P V T V E V P V G

2881 ggcattcttg cgctctgca gccgtttcag gccacggcgg taataccggt catcgggccg
 G I L A P L Q P F Q A T A V I P V I G P

2941 gttaccgtta cgctcgaagg tacgcccgcc ggccggcatcg ttcccgcggt ggtgaactac
 V T V T L E G T P A G G I V P A L V N Y

3001 gctcccacac agctagcgcga ggcaattgcc ccttag
 A P T Q L A Q A I A P -

Annexe V : Séquence du gène *Rv1759c* (2745 pb)

1 atgtcgtttg tgatcgcggt gccggagact atcgcggcgg cggcgacgga tctagccgat
 M S F V I A V P E T I A A A A T D L A D
 61 ctcggctcga cgatcgcctg ggccaacgcg gctgcggcgg ccaacacgac gagcctgctg
 L G S T I A G A N A A A A A N T T S L L
 121 gccgcccgtg ccgatgagat ctcggcggca atcgcctgctg tgttcggcgc gcacggcccg
 A A G A D E I S A A I A A L F G A H G R
 181 gcctatcagg cggcgagcgc cgaggcggcg gcgtttcatg gtcggttcgt gcaggcctg
 A Y Q A A S A E A A A F H G R F V Q A L
 241 accaccgggg ggggcgccta tgcggcccgc gaggcccgcg ccgtgacgcc gctgctcaac
 T T G G G A Y A A A E A A A V T P L L N
 301 tcgatcaacg cgcccgtcct ggccgctacc ggccgtccgc tgatcggtaa cggggctaac
 S I N A P V L A A T G R P L I G N G A N
 361 ggtgctcccg gcaccggggc caacggaggg gatgcccggct ggttgatcgg caacggtggc
 G A P G T G A N G G D A G W L I G N G G
 421 gccggcggat ccggtgcaaa gggcgccaac ggccgggctg gtggccctgg tggggccgcc
 A G G S G A K G A N G G A G G P G G A A
 481 gggctgttcg gcaacggcgg ggccggcggg gccggcggaa ccgccaccgc caacaacggg
 G L F G N G G A G G A G G T A T A N N G
 541 atcggcgggg ccggtggcgc tggcgggtcc gccatgctgt ttggggccgg cggcgcggc
 I G G A G G A G G S A M L F G A G G A G
 601 ggcgccggcg gggctgcgac gtctcttgtc ggtggcatcg gcggtaccgg cggaaccggc
 G A G G A A T S L V G G I G G T G G T G
 661 ggcaacgccg gtatgctcgc cggcgccgcc ggggccggcg gtgccggcgg gttcagcttc
 G N A G M L A G A A G A G G A G G F S F
 721 agcactgccg gtggggctgg cggcgccggc ggggccgggt ggctgttcac caccggcggg
 S T A G G A G G A G G A G G L F T T G G
 781 gtcggcggcg ccggtgggca gggtcacacg ggcggggcgg gcggcggcgg cggggccggc
 V G G A G G Q G H T G G A G G A G G A G
 841 gggttgtttg gtgccggcgg catgggcggg gcgggcggat tcggggatca cggaacgctc
 G L F G A G G M G G A G G F G D H G T L
 901 ggcaccggcg gggccggcgg ggacgggtgg ggcggcgggt tgttcggcgc cggcggggac
 G T G G A G G D G G G G G L F G A G G D
 961 ggcggggcag gcggtcagg actgaccacc ggcggcggctg ccggtaacgg tggtaacgcc
 G G A G G S G L T T G G A A G N G G N A

1021 gggacgcttt ccctgggtgc cgccgggtggc gccggcggca ccggtggggc tggcggcact
 G T L S L G A A G G A G G T G G A G G T

1081 gtcttcggtg gtggtaaggg cggcgccggc ggagccggcg gtaacgccgg catgctcttc
 V F G G G K G G A G G A G G N A G M L F

1141 ggctccggcg ggggtggcgg caccggcggg ttcggcttcg ccgccggcgg gcaggggtggg
 G S G G G G T G G F G F A A G G Q G G

1201 gtcggcggca gcgccggcat gctcagcggc tccggcggct ccggcgggtgc tggcggctct
 V G G S A G M L S G S G G S G G A G G S

1261 gggggccccc cgggcaccgc cgcaggtggg gccgggtgggg cgggtggggc gcccggttg
 G G P A G T A A G G A G G A G G A P G L

1321 atcggcaacg gcggcaacgg cggcaacggc ggcgagagtg gcggcaccgg tgggtgctggc
 I G N G G N G G N G G E S G G T G G V G

1381 ggggccggtg gaaatgccgt gctgatcggc aacggcggcg agggcggcat cggcgcgctc
 G A G G N A V L I G N G G E G G I G A L

1441 gccggcaagt ccggcttcgg cggcttcggc gggttgctgc tgggcgccga cggatataac
 A G K S G F G G F G G L L L G A D G Y N

1501 gctcccgaga gcacctcgcc atggcacaac ctgcagcagg acattctcag tttcatcaac
 A P E S T S P W H N L Q Q D I L S F I N

1561 gaaccaccg aggcattgac cggacgcccg ctgatcggta acggcgacag tgggacgccg
 E P T E A L T G R P L I G N G D S G T P

1621 ggaaccgggg acgatggcgg tgccggcggc tggttgttcg gcaacggcgg caacggcggg
 G T G D D G G A G G W L F G N G G N G G

1681 gccggtgcgg ccggcaccaa cggcagcggc ggcggcggcg gtggggcagg cgggatcctg
 A G A A G T N G S A G G A G G A G G I L

1741 tttggcaccg gtggcgccgg cggggccggc ggcgtcggaa cggcgggtgc cggcggggcc
 F G T G G A G G A G G V G T A G A G G A

1801 ggtggcgccg gcggatccgc cttcttgatc ggttccggcg gtaccggtgg tgtcggcggg
 G G A G G S A F L I G S G G T G G V G G

1861 gccgccacca ccaccggcgg cgtcggcggg gccggcggga acgccggctt gctcatcggc
 A A T T T G G V G G A G G N A G L L I G

1921 gcggctgggg tcggcgggtg tggcggcggc gctttcaccg caggcgttac cactggcggc
 A A G L G G C G G G A F T A G V T T G G

1981 gccggcggga ctggcggcgc tgccgggttg ttcgccaacg gggggcggc cggcgccggc
 A G G T G G A A G L F A N G G A G G A G

2041 gggaccggca gcaccgccgg gggcgccggc ggggcccggc gggccggcgg gctgtacgcc
 G T G S T A G G A G G A G G A G G L Y A

2101 cacgggggaa ccggcggacc aggtgggaac ggcggctcca cggggcggc agggacaggc
 H G G T G G P G G N G G S T G A G G T G

2161 ggtgccggcg ggcccgggtg gctgtacggt gccggcggct ctggcggggc cggcggcat
G A G G P G G L Y G A G G S G G A G G H

2221 gggggcatgg ccggcggggg tggcggtgta ggcggcaatg ctggctcgct caccctcaat
G G M A G G G G G V G G N A G S L T L N

2281 gcgtcgggcg gtgccggcgg cagcggcggc tccagcctgt caggcaaggc cggtgctggc
A S G G A G G S G G S S L S G K A G A G

2341 ggcgccggcg gcagcggggg attgttctac ggctccggcg gggccggcgg caacgggggc
G A G G S A G L F Y G S G G A G G N G G

2401 tacagcctca atggcactgg cggtgatggc ggcaccggtg gggccggcca aatcaccggc
Y S L N G T G G D G G T G G A G Q I T G

2461 cttcgcagcg gcttcggcgg cgccggcggc gccggcggcg ccagcgatac cggcgccggc
L R S G F G G A G G A G G A S D T G A G

2521 gggaaacggcg gcgccggcgg caaggccggg ctgtacggca acggcggtga cggtgggcggc
G N G G A G G K A G L Y G N G G D G G A

2581 ggcgggggatg gcgccaccag cggcaagggt ggagccggcg gcaacgccgt ggtgatcggc
G G D G A T S G K G G A G G N A V V I G

2641 aacggcggca acggcggcaa tgccggaaaa gccgggggca cggcgggtgc cggcggcggc
N G G N G G N A G K A G G T A G A G G A

2701 ggtgggctgg tactcggccg ggatgggcag cacggcttga cgtag
G G L V L G R D G Q H G L T -

Annexe VI : Séquence du gène *Rv3812* (1515 pb)

1 atgtcgttctg tggtcacagt gccggaggcc gtggcggctg cggcggggga tttggcggcc
 M S F V V T V P E A V A A A A G D L A A
 61 atcggctcga cgcttcggga agcgcaccgt gcggcggcgg gccccacgac cgggctggcg
 I G S T L R E A T A A A A G P T T G L A
 121 gccgcgcccg ccgacgacgt gtcgatcgt gtctcgcagc tgttcggcag gtacggccag
 A A A A D D V S I A V S Q L F G R Y G Q
 181 gaatttcaaa ccgtgagcaa ccaactggcc gcgtttcata ccgagttcgt acgcacgttg
 E F Q T V S N Q L A A F H T E F V R T L
 241 aaccgcgggc cggcggcgta tctcaacacc gaaagcgcta acggcgggca gctgttcggt
 N R G A A A Y L N T E S A N G G Q L F G
 301 cagatcgagg cgggacagcg cgccgtttcc gcggcgcgg cgcgcgctcc gggcggcgca
 Q I E A G Q R A V S A A A A A A P G G A
 361 tacggccaac tcgttgccaa cacggccacc aacctggaat ccctctacgg cgcattggtcg
 Y G Q L V A N T A T N L E S L Y G A W S
 421 gccaacccgt tcccattcct ccgccagatc atcgccaacc agcaggttta ctggcagcag
 A N P F P F L R Q I I A N Q Q V Y W Q Q
 481 atcgccggcg cgctcgccaa cgccgtccag aacttccccg ccctggtggc gaatttgcca
 I A A A L A N A V Q N F P A L V A N L P
 541 gcggccatcg acgcggccgt ccagcaattc ctggccttca acgcggcgta ctacatccaa
 A A I D A A V Q Q F L A F N A A Y Y I Q
 601 cagattatta gctcgcagat cggcttcgcc cagctattcg ccacgacggt cggtcagggg
 Q I I S S Q I G F A Q L F A T T V G Q G
 661 gtcaccagcg tcattgccgg gtggcccaac cttgcggcgg agcttcagct agcgtttcaa
 V T S V I A G W P N L A A E L Q L A F Q
 721 cagcttctgg tgggtgacta caacgccgcg gtggcgaacc tgggtaaggc catgacaaac
 Q L L V G D Y N A A V A N L G K A M T N
 781 cttctggtca cggggttcga caccagcgac gtgacgatcg gcacaatggg caccaccatt
 L L V T G F D T S D V T I G T M G T T I
 841 agtgtcaccg cgaaacccaa gctgctgggc ccgctgggag atctgttcac catcatgacc
 S V T A K P K L L G P L G D L F T I M T
 901 atccccgcac aagaggcgca gtacttcacc aacctgatgc ccccctccat cctgcgagac
 I P A Q E A Q Y F T N L M P P S I L R D
 961 atgtcgcaga acttcaccaa cgtgctcagc acgctctcca acccgaacat ccaggcggtc
 M S Q N F T N V L T T L S N P N I Q A V
 1021 gcttcggtcg atatcgcaac caccgcccgg actttgagca ccttcttcgg ggtgccattg
 A S F D I A T T A G T L S T F F G V P L

1081 gtgctcactt acgccacatt gggtgcgccg ttcgcgtcac tgaacgcgat tgcgacgagc
V L T Y A T L G A P F A S L N A I A T S

1141 gcggaaccca tcgagcaggc cctggtggcc ggcaactacc taggggcggt gggtgcgctt
A E T I E Q A L L A G N Y L G A V G A L

1201 atcgacgccc cggcccacgc gttagacggc ttctcaaca gcgcaaccgt gttggatacg
I D A P A H A L D G F L N S A T V L D T

1261 ccgatcctgg tgcccacggg gctcccgtcc cctctgcccc cgacggtcgg gatcacgctg
P I L V P T G L P S P L P P T V G I T L

1321 cacttgccct tcgacgggat tctcgtgccg ccgcatcccg tcaccgcgac gatcagcttc
H L P F D G I L V P P H P V T A T I S F

1381 ccgggtgctc cggttcctat tcccggtttc ccaaccaccg taaccgtttt cggcacaccc
P G A P V P I P G F P T T V T V F G T P

1441 ttcatgggaa tggctccgct gctgatcaac tacattcccc aacagctcgc cctggcaatc
F M G M A P L L I N Y I P Q Q L A L A I

1501 aaaccggcgg cttag
K P A A -