HANIA KÉBIR

Mise en évidence du rôle d'une « downstream box » et d'une séquence répétée inverse dans l'augmentation de la production de xylanase par *Streptomyces lividans*

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

Jury d'évaluation :

Michel Gilbert, Ph.D. Jean-François Laliberté, Ph.D. Rolf Morosoli, Ph.D.

Juin 2000 INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER Université du Québec

À Yemma, Youti, Loulou, Sosso et Diyo

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES iii			
LISTE DES ABRÉVIATIONS vii			
LISTE DES TA	BLEAUXix		
LISTE DES FIC	GURESx		
SOMMAIRE	xi		
1. INTRODU	UCTION1		
2. REVUE E	SIBLIOGRAPHIQUE		
 2.1 Ini 2.1 2.1<!--</td--><td>tiation de la traduction</td>	tiation de la traduction		
2.2 2.2	172.4Modèle de l'interaction entre la DB et l'ARNr 16S		
2.3 Séd 2.3 2.3 2.3 2.3 2.3 2.3 2.3	crétion223.1Le peptide signal (ou ps)3.2L'organisation du ps3.3Les ps des streptomycètes3.4Mutations au niveau des ps des streptomycètes3.5Échange de ps30		

3.	APPROCHE EXPÉRIMENTALE			34
	3.1	Liste des produits utilisés		
	3.2	Souche	es bactériennes	38
		3.2.1	Escherichia coli	38
		3.2.2	Streptomyces lividans	38
	3.3	Vecteur	rs	39
		3.3.1	Escherichia coli	39
		3.3.2	Streptomyces lividans	39
	3.4	Milieux	c de culture	40
		3.4.1	Escherichia coli	40
			3.4.1.1 Milieu liquide pour la croissance	40
			3.4.1.2 Milieu liquide riche pour l'isolement d'ADN	
			plasmidique	40
		3.4.2	Streptomyces lividans	41
			3.4.2.1 Milieu liquide minimal pour la croissance	41
			3.4.2.2 Milieu solide pour la croissance	42
			3.4.2.3 Milieu solide pour la régénération des protoplastes.	42
			3.4.2.4 Milieu solide pour la detection de l'activité	42
			xylanolytique	43
	3.5	Prépara	ation des spores	44
	3.6	Manip	ulation de l'ADN	45
		3.6.1	Isolement des plasmides d'Escherichia coli	45
		3.6.2	Purification d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de	
			césium	45
		3.6.3	Digestion d'ADN par des enzymes de restriction	47
		3.6.4	Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en gel	
		0.65	d'agarose	47
		3.6.5	Extraction des fragments d'ADN du gel d'agarose	48
		3.6.6	Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur	49
		3.0.7	Sequençage de l'ADN	49
	3.7	Transf	ormation bactérienne	50
		3.7.1	Transformation d'Escherichia coli	50
		3.7.2	Transformation de <i>Streptomyces lividans</i>	50
	3.8	Tests b	biologiques	51
		3.8.1	Mesure de l'activité enzymatique	51
		3.8.2	Mesure de la croissance du mycélium par dosage de l'ADN	
			total	53
	3.9	Prépara	ation des oligonucléotides	53
		-		

	3.10	La mutagenèse dirigée	.55
		3.10.1 Préparation d'ADN simple brin contenant des uraciles	.58
		3.10.2 Isolement de l'ADN simple brin contenant des uraciles	.59
		3.10.3 Phosphorylation de l'oligonucléotide	.60
		3.10.4 Hybridation de l'oligonucléotide avec l'ADN simple brin	.61
		3.10.5 Synthèse du brin complémentaire	.61
		3.10.6 Détection des mutants par hybridation	62
4.	RÉSU	JLTATS	65
	4.1	Existence de la DB	66
	4.2	Alignement de séquences des ps avec l'ARNr 16S de Streptomyces lividans	66
	4.3	Mutagenèse de la DB contenue dans les ps de la cellulase A (CelA), l'acétyl-xylane estérase (Axe) et la xylanase A (XlnA)	69
	4.4	Mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des clones	72
	4.5	Mesure de la croissance du mycélium en milieu liquide	73
	4.6	Effet des mutations de la DB sur la production de xylanase	77
		4.6.1 Ps long de la cellulase A (CelA).	78
		4.6.1.1 Souche contrôle	78
		4.6.1.2 Abolition de la DB et de la séquence palindromique	78
		4.6.1.3 Augmentation de la complémentarité entre la DB et	
		l'ARNr 16S	78
		4.6.1.4 Variation de la longueur de la DB	81
		4.6.1.5 Variation de la distance entre la DB et le premier	
		codon d'initiation de la traduction	81
		4.6.1.6 Effet du palindrome	86
		4.6.2 Ps de l'acétyl-xylane estérase (Axe)	89
		4.6.3 Ps de la xylanase A (XlnA)	89
5.	DISC	USSION	90
	5.1	Influence de la DB et de la séquence palindromique contenues dans le ps long de la cellulase A (CelA), sur la production de xylanase	91
	5.2	Limites de la séquence disponible sur l'ARNr 16S pour l'interaction ARNm-ARNr	92
	5.3	Longueur de la DB du ps long de la cellulase A (CelA)	93

	5.4	Distance entre la DB du ps long de la cellulase A (CelA) et le premier codon d'initiation de la traduction	94
	5.5	Importance de la séquence palindromique relativement à celle de la DB du ps long de la cellulase A (CelA).	95
	5.6	Existence d'une DB dans d'autres ps de Streptomyces lividans	96
	5.7	Rôle de la DB	97
	5.8	Perspectives et travaux futurs	98
6.	CON	CLUSION	100
7.	REM	ERCIEMENTS	103
8.	BIBL	IOGRAPHIE	105
9.	ANN	EXE	114

Alanine (A)

Phénylalanine (F) Glycine (G) Isoleucine (I) Leucine (L)

: Acide aminé

Méthionine (M) Asparagine (N) Proline (P) Arginine (R) Sérine (S) Thréonine (T) Valine (V) Tyrosine (Y) ADB : Anti-Downstream Box ADN : Acide désoxyribonucléique : Acide ribonucléique messager ARNm ARNr : Acide ribonucléique ribosomal : Acide ribonucléique de transfert ARNt : N-formylméthionyl-ARNtf^{Mét} ou fMét-ARNtf^{Mét} ARNt initiateur : Anti-Shine-Dalgarno ASD ATP : Adénosine triphosphate : Protéine de l'acétyl-xylane estérase Axe °C : Degré Celsius celA : Gène de la cellulase A CelA : Protéine de la cellulase A Ci : Curie dATP : 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate DB : Downstream Box dCTP : 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate : 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate dGTP : Dihydrofolate réductase DHFR DO : Densité optique dTTP : 2'-désoxythymidine 5'-triphosphate : 2'-désoxyuridine 5'-triphosphate dUTP E. coli : Escherichia coli : Acide éthylène diaminetétracétique **EDTA** FI : Facteur d'initiation GTP : Guanosine 5'-triphosphate kb : Kilopaire de bases : Molaire Μ : Gène de la mannanase A manA ManA : Protéine de la mannanase A

aa

mL	: Millilitre				
mM	: Millimolaire				
nt	: Nucléotide				
PEG	: Polyéthylène glycol				
pmol	: Picomole				
ps	: Peptide signal ou séquence signal [*]				
p/v	: Poids/volume				
RBB	: Rémazol Bleu Brillant				
RBS	: Site de fixation des ribosomes				
	(de l'anglais « ribosome-binding site »)				
rpm	: Révolutions par minute				
S	: Unité de Svedberg				
SD	: Séquence Shine-Dalgarno				
SDS	: Sodium dodécyl sulfate				
S. lividans	: Streptomyces lividans				
STT	: Tampon Sucrose-Tris-Triton				
TE	: Tampon Tris-EDTA				
TES	: Acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique				
Tris	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane				
UI	: Unité internationale				
μg	: microgramme				
μL	: microlitre				
xlnA	: Gène de la xylanase A				
XlnA	: Protéine de la xylanase A				

^{*} Afin d'alléger le texte et d'en faciliter la compréhension, l'abréviation ps sera utilisée tout au long du document pour désigner aussi bien la séquence en acides aminés du peptide signal que sa séquence en nucléotides.

LISTE DES TABLEAUX

Page	
-	

Tableau 1 :	Liste des oligonucéotides utilisés dans les expériences de mutagenèse dirigée sur les peptides signaux de la cellulase A (CelA), de l'acétyl- xylane estérase (Axe) et de la xylanase A (XlnA) de <i>Streptomyces lividans</i>	54
Tableau 2 :	Température de dénaturation des oligonucléotides dans le chlorure de tétraméthyl d'ammonium en fonction de leur longueur en nucléotides	64
Tableau 3 :	Effet de l'abolition de la « downstream box » des peptides signaux de la cellulase A (CelA), de l'acétyl-xylane estérase (Axe) et de la xylanase A (XlnA), sur la production de xylanase par <i>Streptomyces lividans</i> .	80
Tableau 4:	Effet de la variation de la longueur de la « downstream box » du peptide signal long de la cellulase A (CelA), sur la production de xylanase par <i>Streptomyces lividans</i>	83
Tableau 5 :	Effet de la variation de la distance entre la « downstream box » du peptide signal long de la cellulase A (CelA) et le premier codon d'initiation de la traduction, sur la production de xylanase par <i>Streptomyces lividans</i> .	85
Tableau 6:	Effet de la séquence répétée inverse du peptide signal long de la cellulase A (CelA), sur la production de xylanase par <i>Streptomyces lividans</i> .	88

LISTE DES FIGURES

	F	'age
Figure 1 :	L'initiation de la synthèse des protéines chez les procaryotes	8
Figure 2 :	Exemple de l'interaction entre la séquence Shine-Dalgarno (SD) d'un ARNm et l'anti-Shine-Dalgarno (ASD) de l'ARNr 16S d' <i>Escherichia coli</i>	12
Figure 3 :	Modèle, proposé par Sprengart <i>et al.</i> , de l'interaction entre la « downstream box » (DB) de l'ARNm et « l'anti-downstream box » (ADB) de l'ARNr 16S durant le processus d'initiation de la traduction, en présence d'une séquence Shine-Dalgarno (SD)	20
Figure 4:1	Représentation schématique et caractéristiques générales des peptides signaux (ps) des pré-protéines bactériennes	25
Figure 5 : 1	Effet du remplacement du peptide signal de la xylanase A (XlnA) par les peptides signaux courts et longs de la mannanase A (ManA) et de la cellulase A (CelA) de <i>Streptomyces lividans</i> , sur la production de xylanase	33
Figure 6 : 1	La méthode de mutagenèse dirigée de Kunkel	57
Figure 7 : S	Schéma illustrant le remplacement du peptide signal de la xylanase A (XlnA) par le peptide signal long de la cellulase A (CelA) de <i>Streptomyces lividans</i>	68
Figure 8 : A	Alignement des séquences des peptides signaux de la cellulase A (CelA), de l'acétyl-xylane estérase (Axe) et de la xylanase A (XlnA) avec l'ARNr 16S de Streptomyces lividans	71
Figure 9: 0	Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones, au cours du temps	75

SOMMAIRE

Le peptide signal (ps) du gène de la xylanase A (XlnA) de Streptomyces lividans fut substitué par celui de la cellulase A (CelA), lui-même précédé d'une séquence additionnelle de 57 nt. Cette dernière contiendrait plusieurs éléments qui semblent stimuler la production de xylanase, notamment la présence d'une séquence répétée inverse de 5 nt (5'-TGGGAacgcTCCCA) et celle d'une « downstream box » ou DB (TCCCA) complémentaire aux nt 1461 à 1465 de l'ARNr 16S de S. lividans. L'abolition de ces deux éléments, par introduction de mutations ponctuelles à l'intérieur de leur séquence, a diminué de 75% la production de xylanase. De même, l'augmentation à 17 nt de la complémentarité entre la DB et l'ARNr 16S a conduit à une chute de 90% de l'activité xylanolytique. En revanche, les mutants contenant des DB de 6, 7 et 8 nt ont grandement favorisé la production de xylanase, celle-ci atteignant des niveaux optimaux de plus de 2 g/L avec une DB de 8 nt localisée à 15 nt en aval du codon d'initiation de la traduction. Cette DB optimale interagirait alors avec les nt 1461 à 1468 situés à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S de S. lividans. La suppression du palindrome eut pour sa part un effet négatif sur la production de xylanase, réduisant celle-ci de 69%, mais son influence fut moins marquée que celle de la DB. En effet, en réduisant la taille de la séquence palindromique et celle de la DB à 4 nt, l'activité xylanolytique a baissé de 40% tandis qu'elle a augmenté de 54% avec le même palindrome et une DB de 6 nt. La présence d'une DB fut également décelée dans les ps de l'acétyl-xylane estérase (Axe) (CCAGTaCC) et de la XInA (CGCCctTCCCA) de S. lividans. L'élimination de la DB du ps de l'Axe eut pour conséquence de diminuer de 77% l'activité xylanolytique alors que la suppression de la DB du ps de la XlnA n'eut, quant à elle, aucun effet sur la production de xylanase. Tous ces résultats font l'objet d'une publication (Kébir et al., 2000).

Il existe donc une forte corrélation entre la présence de la DB et la production de xylanase. Il a été proposé que la DB interagisse avec l'ARNr 16S et place celui-ci à proximité du codon d'initiation de la traduction, facilitant alors le processus d'initiation de la synthèse protéique. Mais le mécanisme exact de l'interaction DB-ARNr 16S demeure encore inconnu.

:

1. INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des bactéries aérobies à Gram positif dont la morphologie générale s'apparente à celle des mycètes. Cette étonnante ressemblance découle, en partie, d'une adaptation aux mêmes habitats (Schauer *et al.*, 1988). Comme le sol constitue leur biotope naturel, les streptomycètes produisent un nombre et une variété impressionnants d'enzymes extracellulaires capables de dégrader les composés organiques et les substances résistantes présentes dans leur milieu, telles la cellulose, les hémicelluloses, la chitine etc...(Gilbert *et al.*, 1995; Kutzner, 1981). En plus, ces micro-organismes ont un impact pratique considérable, parce qu'au delà du rôle important qu'ils jouent dans la minéralisation de la matière organique, ils représentent une source précieuse d'antibiotiques (Korn-Wendisch et Kutzner, 1992).

Ayant pour la plupart un comportement de saprophytes non-pathogènes et étant très souples au niveau nutritionnel, les streptomycètes constituent d'excellents modèles pour l'expression de protéines homologues ou hétérologues. Il serait donc avantageux de les exploiter pour l'élaboration d'une souche bactérienne hyper-productrice d'enzymes, d'autant plus que les streptomycètes bénéficient d'un système de sécrétion très efficace (Anné et Van Mellaert, 1993).

Le haut rendement de la mécanique de sécrétion des streptomycètes est attribuable au fait que les protéines sont directement relâchées dans le milieu externe et non point retenues au niveau du périplasme, inexistant chez les bactéries à Gram positif. Le transport des protéines est assuré en partie par une petite séquence, appelée peptide signal (ou ps), localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine destinée à être sécrétée. Les ps des streptomycètes ont la particularité d'être très longs. Certains d'entre eux d'ailleurs, comme les ps des gènes encodant la cellulase A (CelA) et la mannanase A (ManA), pourraient même posséder deux codons d'initiation de la traduction, situés dans le même cadre de lecture et précédés chacun d'un site d'attachement des ribosomes (ou RBS) plus ou moins défini. Selon le codon de départ sélectionné, un précurseur protéique long ou court sera synthétisé (Morosoli *et al.*, 1997). Afin d'optimiser la sécrétion de xylanase A par la bactérie *Streptomyces lividans*, le ps de cette enzyme fut délété puis remplacé par les ps courts et longs de la ManA et de la CelA. Dans cette expérience, menée par Pagé et ses collaborateurs, le gène de la xylanase A occupe la fonction de gène rapporteur. C'est donc dire que le taux de synthèse de cette enzyme obtenu par chacun des clones dépend directement de son ps (Pagé *et al.*, 1996).

Les clones hébergeant les ps courts de la ManA et de la CelA expriment tous deux une activité xylanolytique de 80 UI/mL. C'est également le taux de synthèse de protéine produit par la souche contrôle, contenant le ps sauvage de la xylanase A. Lorsque le ps court de la ManA est remplacé par son homologue long, la production de xylanase double, passant d'un coup à 160 UI/mL. Ce résultat suggère que l'ARNm est traduit simultanément par deux ribosomes, chacun se fixant à un RBS et initiant la synthèse à un AUG différent. En outre, la substitution du codon interne AUG par un AUC, fait rechuter le taux de xylanase au même niveau qu'avec le ps court, soit 80 UI/mL. Les résultats divergent quelque peu en ce qui a trait au ps de la CelA. Le précurseur long de la CelA fait plus que tripler la production de xylanase, celle-ci passant de 80 à 300 UI/mL (Pagé *et al.*, 1996).

Le cas du ps de la CelA soulève donc plusieurs questions. Pourquoi le précurseur long de la CelA triple-t-il la production de xylanase au lieu de la doubler, comme le fait le ps de la ManA? Le ps long de la CelA comprend-t-il un élément additionnel qui promouvoit la traduction du messager ?

Deux séquences pourraient effectivement remplir cette fonction. La première se présente sous la forme d'un palindrome (5'- TGGGAacgcTCCCA) et la seconde serait possiblement une « downstream box » (ou DB). La DB, dont l'existence n'a été prouvée à ce jour que chez *Escherichia coli*, stimulerait le processus de traduction exactement de la même façon que la séquence Shine-Dalgarno (ou SD), c'est-à-dire en s'appariant avec une région complémentaire de l'ARNr 16S. Elle rapprocherait ainsi la méthionine de départ de la portion décodante de l'ARNr, facilitant par le fait même le processus

d'initiation de la traduction (Sprengart *et al.*, 1997). C'est probablement l'action combinée du palindrome et de la « downstream box » qui permet au ps de la CelA de produire de telles quantités de xylanase. Le travail qui suit vise justement à établir l'importance de ces éléments dans la production d'enzyme par *S. lividans*, en procédant à des expériences de mutagenèse dirigée à l'intérieur des deux séquences.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 INITIATION DE LA TRADUCTION

L'élaboration d'une souche bactérienne hyper-productrice d'enzymes passe par une bonne compréhension des processus qui modulent l'expression des gènes codant pour ces protéines. L'évolution a justement mis en place toute une série de mécanismes subtils qui permettent aux bactéries d'ajuster la production de certaines de leurs protéines. Cet ajustement peut être fait à n'importe quelle étape du trajet suivi par l'information biologique, mais il a été mis en évidence surtout au niveau de la transcription. Par contre, même si le contrôle transcriptionnel est prééminent, la régulation des gènes s'effectue aussi fréquemment durant la traduction (Horton *et al.*, 1994).

Toutes les étapes menant à la synthèse protéique représentent des lieux où l'activité traductionnelle peut être régulée. Ainsi, la traduction d'un ARNm peut être contrôlée aussi bien à la phase d'initiation que pendant l'allongement de la chaîne ou au moment de sa terminaison. Toutefois, comme la phase d'initiation est limitante, la régulation a lieu le plus souvent durant cette première étape. C'est pourquoi la section qui suit sera entièrement consacrée à la description du processus d'initiation de la traduction.

2.1.1 Mécanisme de base

Le processus d'initiation de la traduction peut être divisé en plusieurs grandes étapes, illustrées à la figure 1. La petite sous-unité ribosomale 30S se fixe d'abord à l'ARNm. Puis, il y a reconnaissance du codon d'initiation de la traduction, généralement représenté par un AUG et interaction entre ce codon et l'ARNt initiateur (le N-formylméthionyl-ARNt_f^{Mét} ou fMét-ARNt_f^{Mét}). Enfin, la grosse sous-unité 50S du ribosome s'associe au tout pour former le complexe d'initiation de la traduction. Ce n'est qu'à ce moment que le processus d'élongation peut s'amorcer (De Smit et Van Duin, 1994). L'initiation de la traduction fait intervenir plusieurs protéines auxiliaires appelées facteurs d'initiation (FI). Chez les procaryotes, on en dénombre trois : le FI-1, le FI-2 et le FI-3. Le FI-1 agit de concert avec le FI-3 pour empêcher l'association des deux

Figure 1 : L'initiation de la synthèse des protéines chez les procaryotes

- A) Les facteurs d'initiation (FI) FI-1 et FI-3 se lient à la petite sous-unité ribosomale 30S pour empêcher l'attachement de l'élément 50S et la formation du ribosome complet.
- B) La sous-unité 30S du ribosome entre en contact avec l'ARNm en y reconnaissant la séquence Shine-Dalgarno (SD), représentée par la boîte jaune. Il s'effectue alors une interaction entre le codon d'initiation de la traduction, généralement un AUG, et l'ARNt initiateur (fMét-ARNt_f^{Mét}). La protéine FI-2, qui porte un site de fixation pour le GTP, est indispensable à la sélection de l'ARNt initiateur.
- C) L'élément 50S rejoint la petite sous-unité ribosomale 30S pour former le complexe d'initiation 70S. Les facteurs d'initiation FI-1, FI-2 et FI-3 sont relargués à cette étape.

Tiré et adapté de Voet et Voet, 1990.



Complexe d'initiation 70S

éléments du ribosome, avant la formation du complexe d'initiation. Le FI-2, quant à lui, porte un site de fixation pour le GTP et s'avère indispensable à la sélection de l'ARNt initiateur (Gualerzi et Pon, 1990).

De tous les éléments qui jouent un rôle dans l'initiation de la traduction, le plus variable est sans contredit l'ARNm. Sa composition et sa structure déterminent la force ainsi que la fréquence de l'interaction avec le reste de la mécanique de traduction (Farmer et Janssen, 1999). Le contact qui s'établit entre l'ARNm et la petite sous-unité ribosomale occupe une fonction particulièrement importante puisqu'il est grandement responsable de l'efficacité du processus de traduction. Ce contact s'effectue sur l'ARNm, au niveau du site d'attachement des ribosomes : le RBS (de l'anglais « ribosome-binding site »).

2.1.2 Le site de fixation des ribosomes (ou RBS) conventionnel

Le RBS se définit simplement comme étant la région de l'ARNm à laquelle se fixe le ribosome, au tout premier stade de l'initiation de la traduction. Selon Steitz et Jakes (1975), un RBS conventionnel s'étend approximativement de -15 à +15 nucléotides (nt) du codon de départ. La caractéristique principale d'un RBS « fort » ou efficace est de permettre son attachement fréquent aux ribosomes, ce qui a pour conséquence de protéger l'ARNm de la dégradation par les ribonucléases (Farmer et Janssen, 1999). Pour être efficace, le RBS doit donc comporter des séquences spécifiques facilitant sa reconnaissance par les ribosomes. Parmi celles-ci figure, bien entendu, le codon d'initiation de la traduction, un constituant essentiel du RBS. Presqu'invariablement, le RBS des ARNm d'*Escherichia coli* contient également, en amont du codon d'initiation de la traduction, une séquence Shine-Dalgarno (SD) (AGGAGG) complémentaire à une courte région de l'ARNr 16S. La distance qui sépare la séquence SD du codon d'initiation de la traduction joue elle aussi un rôle crucial dans la fixation du ribosome à l'ARNm (Gold *et al.*, 1981).

2.1.2.1 Le codon d'initiation de la traduction

Dans plus de 90% des ARNm, le codon qui dicte le démarrage de la synthèse protéique est un AUG. Le codon GUG initie la traduction dans environ 8% des cas tandis que les codons UUG et AUU ne sont que très rarement utilisés (environ 1% et <1% respectivement) (Gualerzi et Pon, 1990). Étant donné que la plupart des ARNm débutent avec le codon méthionine AUG, l'efficacité de traduction n'est influencée qu'exceptionnellement par le choix du codon de départ. De fait, les ARNm qui ne démarrent pas avec un AUG sont tout de même très bien traduits et ce, dans des proportions fort respectables (Gold, 1988). Si la présence d'un codon d'initiation de la traduction est tout à fait indispensable, ce dernier n'est pas suffisant pour permettre l'arrimage du ribosome à l'ARNm. La fixation du petit élément ribosomal à la matrice d'ARNm est assurée en grande partie par l'interaction entre la séquence SD et sa contrepartie sur l'ARNr 16S.

2.1.2.2 La séquence Shine-Dalgarno (ou SD)

La séquence SD (AGGAGG) est une courte région riche en purines, placée juste en amont du codon initiateur de l'ARNm. Elle interagit avec un segment abondant en pyrimidines de l'extrémité 3' de la molécule d'ARNr 16S, qu'on appelle par le fait même l'anti-Shine-Dalgarno (ou ASD) (Shine et Dalgarno, 1974). La figure 2 illustre un exemple de l'interaction SD-ASD entre un ARNm et l'ARNr 16S d'*E. coli*.

L'interaction SD-ASD, proposée pour la toute première fois en 1974 par Shine et Dalgarno, fut confirmée peu de temps après grâce aux travaux de Steitz et Jakes (1975). Aux yeux de ces deux chercheurs, l'hypothèse de Shine et Dalgarno voulant qu'un contact s'établisse entre l'ARNm et l'extrémité 3' de l'ARNr 16S, paraît tout de suite très attrayante pour diverses raisons. Premièrement, des études portant sur nombre d'antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique révèlent que leur site d'action se situe au voisinage de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. Cette observation met en évidence le rôle

Figure 2 : Exemple de l'interaction entre la séquence Shine-Dalgarno (SD) d'un ARNm et l'anti-Shine-Dalgarno (ASD) de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli*

La SD (représentée par une boîte jaune) est une courte séquence riche en purines, localisée sur l'ARNm (en bleu), en amont du codon d'initiation de la traduction (désigné en rouge). Elle est complémentaire à l'ASD (également en jaune), un segment riche en pyrimidines situé à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. Ici l'ASD est comprise entre les nt 1535 et 1541 de l'ARNr 16S.

Tiré et adapté de Steitz et Jakes, 1975.



prépondérant que joue la portion terminale de l'ARNr 16S dans l'initiation de la traduction. Par ailleurs, les co-polymères riches en bases A et G semblent être les meilleurs compétiteurs de ces antibiotiques, ce qui démontre l'importance des polypurines dans le processus de fixation des ribosomes au RBS (Steitz et Jakes, 1975). La séquence SD apparaît dès lors comme étant le principal déterminant dans la sélection du bon site d'initiation de la traduction. En fixant la sous-unité 30S du ribosome au RBS, la séquence SD accroît la probabilité d'une interaction codon-anticodon avec l'ARNt^{Mét} (Calogero *et al.*, 1988).

Outre les expériences de Steitz et Jakes, des mutations ponctuelles au niveau de la séquence SD de nombreux ARNm d'*E. coli* indiquent que celle-ci joue un rôle pivot dans le processus d'initiation de la traduction. Un changement dans l'interaction SD-ASD, par modification d'une seule base de l'ARNm, semble avoir un effet dramatique sur les niveaux de synthèse de la plupart des protéines cellulaires (Jacob *et al.*, 1987; Hui et De Boer, 1987). Toutefois, le degré de complémentarité avec l'ARNr 16S n'est qu'un des facteurs qui affectent l'efficacité de la séquence SD. La force de l'interaction SD-ASD dépend également de l'accessibilité de la séquence SD, elle-même fonction de la distance entre la SD et le codon d'initiation de la traduction (De Smit et Van Duin, 1994).

2.1.2.3 Distance séparant la SD du codon d'initiation de la traduction

La distance entre la séquence SD et le codon d'initiation de la traduction a fait l'objet de plusieurs études. Généralement, cet espace est constitué de 5 à 13 nt. À l'intérieur de ces limites, l'effet sur l'efficacité de traduction est faible (Gold, 1988). Néanmoins, De Smit et Van Duin (1994) suggèrent une distance optimale de 7 à 9 nt pour les ARNm d'*E. coli*. Un tel espacement facilite le positionnement du codon d'initiation de la traduction à proximité de la région décodante de l'ARNr, une fois l'interaction SD-ASD bien établie.

2.1.2.4 Structures secondaires du RBS

Les trois signaux « classiques » du RBS, soient le codon d'initiation de la traduction, la séquence SD et un espacement adéquat entre ces deux éléments, sont également présents en aval du RBS, dans la région codante de plusieurs gènes (Stormo *et al.*, 1982). Il apparaît très clairement qu'aucune synthèse protéique n'est initiée en ces points. La région comprise entre -15 et +15 nt doit donc comporter une information additionnelle qui permet aux ribosomes de différencier le « vrai » site d'initiation de la traduction de ces « faux » RBS. L'ARNm recèle effectivement une information cruciale qui réside dans la structure du RBS.

Il s'opère parfois un appariement intramoléculaire au niveau de l'ARNm qui peut soit cacher ou exposer les éléments de reconnaissance du RBS aux ribosomes. La structure secondaire qu'adopte le RBS est d'ailleurs bien souvent un moyen de contrôle de l'efficacité de traduction. Par exemple, les structures secondaires qui emprisonnent la séquence SD nuisent à la traduction en limitant l'accès des ribosomes à l'ARNm (Wikström *et al.*, 1982 ; Gold, 1988). Par contre, Gold *et al.* (1981) proposent plusieurs structures secondaires du RBS dont s'accomodent très bien les ribosomes.

2.1.3 RBS dépourvus de séquence 5' de tête (ou « leader »)

Pendant longtemps on a cru que le RBS conventionnel, comme il a été décrit plus haut, était représentatif des ARNm procaryotes. Autrement dit, on considérait que tous les ARNm étaient dotés d'une séquence 5' de tête (ou « leader »), c'est-à-dire la région non-traduite localisée juste en amont du codon d'initiation de la traduction et qui comprend, entre autres choses, la SD. On allait même jusqu'à affirmer que la présence de la SD était essentielle à l'efficacité de traduction chez les bactéries. Mais au fur et à mesure que de nouveaux sites d'initiation de la traduction furent cartographiés, on découvrit de plus en plus d'ARNm dépourvus de SD à cause d'une séquence « leader » trop courte, voire même absente. Bien que les gènes qui codent pour des ARNm exempts de « leader » soient relativement peu fréquents dans la nature, plus de 30 cas ont déja été répertoriés (Wu et Janssen, 1996). Parmi ceux-ci, on retrouve beaucoup de transcrits de gènes d'actinomycètes qui codent pour des protéines essentielles conférant une résistance aux antibiotiques (Bibb *et al.*, 1994).

En plus des ARNm sans « leader » retrouvés de façon naturelle, il est possible de supprimer l'extrémité 5' des messagers sans pour autant altérer leur efficacité de traduction (Wu et Janssen, 1996; Van Etten et Janssen, 1998). C'est ce qu'à prouvé l'équipe de Calogero en comparant la traduction de deux ARNm ne différant que par la présence ou l'absence du « leader ». Le retrait de la séquence de tête n'affecte ni l'efficacité de traduction ni le choix du bon site de départ (Calogero *et al.*, 1988). Deux ans plus tard, les expériences de Melançon et ses collaborateurs démontrent, hors de tout doute, que la SD n'est pas indispensable à l'initiation de la traduction. Même en éliminant la séquence ASD par délétion des 32 derniers nt de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S, la traduction a lieu, indépendamment de l'interaction SD-ASD conventionnelle. Les résultats de Melançon rejoignent donc ceux de Calogero et supportent l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de traduction et le choix du site de départ de la synthèse protéique ne sont pas contrôlés uniquement par l'interaction SD-ASD (Melançon *et al.*, 1990).

Mais si ces ARNm sans séquence de tête sont traduits de façon très efficace, qu'est-ce qui leur sert de signal de traduction en absence de séquence SD? Et surtout, qu'est-ce qu'il leur permet d'entrer en compétition avec les ARNm munis de « leader », pour la fixation des ribosomes? La distribution non-aléatoire des nt situés en amont de la SD et en aval du codon méthionine (Stormo *et al.*, 1982; Schneider *et al.*, 1986) suggère l'existence d'alternatives aux mécanismes d'initiation de la traduction jusqu'alors connus. On présume qu'en absence de SD, d'autres séquences de l'ARNm interagissent avec l'ARNr afin d'assurer la sélection du bon site d'initiation de la traduction. Plusieurs éléments, outre la SD, ont donc été reportés comme étant des stimulateurs de traduction chez les ARNm procaryotes. L'analyse du gène *atpE* fortement exprimé chez *E. coli*, a notamment permis au groupe de Mc Carthy de découvrir un élément stimulateur de la traduction en amont de la SD (Mc Carthy *et al.*, 1985). Un autre signal, cette fois-ci situé en aval du codon d'initiation de la traduction, occuperait une fonction similaire chez certains ARNm procaryotes. On a appelé ce nouvel élément la « downstream box » en raison de sa position face au codon d'initiation de la traduction (Sprengart *et al.*, 1990).

2.2 LA « DOWNSTREAM BOX » (OU DB)

2.2.1 Généralités

L'existence de la DB a été mise à jour par une équipe de Singapour, celle de Sprengart et ses collaborateurs, après une étude sur l'expression du RBS très actif du gène 0,3 du bactériophage T7. L'efficacité de ce RBS dépendrait en grande partie d'une séquence localisée en aval du codon initiateur, d'où le nom de « downstream box ». Cette séquence de l'ARNm aurait le potentiel de s'apparier avec les bases 1469 à 1483 de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (« l'anti-downstream box » ou ADB). C'est justement cette complémentarité ARNm-ARNr 16S qui a mené les chercheurs à établir un parallèle avec l'interaction SD-ASD et à conclure que la DB opère de la même façon que la SD pour stimuler le processus de traduction (Sprengart *et al.* 1990).

Depuis cette découverte, d'autres séquences similaires ont été décelées chez plusieurs ARNm d'*E. coli* et de bactériophages. Des études expérimentales tentant de prouver l'existence de la DB ont été menées à bien successivement sur les gènes *rpoH* (Nagai *et al.*, 1991), *glnS* (Faxén *et al.*, 1991) et *lysU* (Ito *et al.*, 1993) d'*E. coli* ainsi que sur le gène *cI* du phage lambda (Shean et Gottesman, 1992).

2.2.2 Importance de la DB dans l'initiation de la traduction

La découverte de la DB a permis d'expliquer les hauts niveaux de traduction de certains ARNm mais jusqu'alors on ne lui attribuait encore qu'un rôle auxiliaire. On s'accordait à dire, qu'en agissant en synergie avec la SD, la DB intensifiait le phénomène de traduction, mais son influence était considérée comme mineure (Nagai *et al.*, 1991;

Mc Carthy et Brimacombe, 1994). Ce n'est que dernièrement, vers la toute fin de 1996, que Sprengart et ses collègues émettent l'hypothèse que la DB occupe une fonction importante, et surtout indépendante, dans le processus d'initiation de la traduction. Pour soutenir leur théorie, ils se servent cette fois-ci du RBS du gène 10 du bactériophage T7, qu'ils couplent au gène rapporteur de dihydrofolate réductase (*dhfr*) d'*E. coli*. Leur expérience consiste à faire varier la complémentarité de la DB avec l'ADB de l'ARNr 16S et ce, en présence comme en absence de SD. L'activité traductionnelle est ensuite mesurée en déterminant le taux de synthèse de la protéine hybride DHFR. Les mutations ponctuelles visant à diminuer l'interaction DB-ADB se traduisent par une baisse des niveaux de production de DHFR. Par contre, l'optimisation de la DB résulte en une hausse de l'activité traductionnelle, même en absence de SD. C'est en combinant l'effet d'une DB optimale avec une SD fonctionnelle que les chercheurs obtiennent les résultats les plus concluants. Avec une telle construction, la synthèse du gène rapporteur augmente par un facteur de huit comparativement au fragment de RBS ne comportant que la SD.

Dans leur étude, Sprengart *et al.* se sont assurés que les différences obtenues dans les taux de synthèse de DHFR ne soient pas dues à des variations au niveau de la stabilité ou de la transcription des ARNm. Étant donné que tous les clones exhibent approximativement les mêmes valeurs pour ces deux paramètres, les écarts quant à la production de DHFR ont pu être attribués à l'effet de la DB. Une étude de structure des 200 premiers nt de l'ARNm a également permis aux chercheurs de s'assurer que le RBS ne contienne aucune structure secondaire pouvant éventuellement stimuler ou inhiber la traduction (Sprengart *et al.*, 1996).

2.2.3 Influence de la position de la DB sur l'initiation de la traduction

Toujours en utilisant la même construction de départ, l'équipe de Sprengart s'est interrogée sur l'importance de la position de la DB au niveau de l'ARNm. Dans un premier temps, la DB a été déplacée entre les positions +1 et +10 de la région codante. Par la suite, la DB a été placée à 8 nt en amont du codon d'initiation de la traduction, à la place de la SD. Ces expériences ont toutes deux été menées à bien en absence de la séquence SD originelle. L'étude révèle que la DB est active en diverses positions sur l'ARNm, même lorsqu'elle chevauche l'AUG de départ, à la position +1. Par contre, elle n'est pas fonctionnelle lorsque localisée à la place de la SD. En effet, on peut considérer la traduction quasiment nulle dans ce cas-là (Sprengart *et al.*, 1996).

En somme, une DB bien positionnée et relativement forte promeut la synthèse de protéine hybride DHFR, même après élimination de la séquence SD. La DB n'est donc plus perçue comme un élément secondaire dans l'initiation de la traduction mais plutôt comme un mécanisme alternatif de reconnaissance des ribosomes, au même titre que la SD.

2.2.4 Modèle de l'interaction entre la DB et l'ARNr 16S

Inévitablement, la découverte de la DB a soulevé un problème d'ordre pratique : comment intégrer l'interaction DB-ADB dans le modèle connu d'initiation de la traduction ? Il est notoire que l'attachement de la SD à l'ARNr 16S s'opère à la fin de la première phase d'initiation de la traduction, juste avant que l'ARNt_f^{Mét} n'entre en contact avec le codon initiateur. Selon Mc Carthy et Brimacombe (1994), il est fort probable que jusqu'à ce moment, l'ARNm localisé en aval du codon AUG initiateur soit suffisamment mobile pour interagir avec l'ADB. Ainsi, dans le cas des ARNm dotés à la fois d'une SD et d'une DB, il semblerait que le contact entre la DB et l'ADB précède celui de la SD avec l'ASD. D'après le modèle proposé par Sprengart *et al.* en 1996 et illustré à la figure 3, l'interaction DB-ADB causerait des changements de conformation au niveau de l'ARNr 16S, rapprochant l'ASD de sa région complémentaire. La SD s'hybriderait alors facilement à l'ASD. Ces deux interactions (DB-ADB et SD-ASD) amèneraient la région décodante de l'ARNr 16S tout près du codon AUG de départ, facilitant par le fait même le processus d'initiation de la traduction (Sprengart *et al.*, 1996).

Dans le cas des ARNm dépourvus de séquence SD, une forte interaction DB-ADB serait en mesure, à elle seule, de positionner le codon méthionine à proximité de la région

Figure 3 : Modèle, proposé par Sprengart *et al.*, de l'interaction entre la « downstream box » (DB) de l'ARNm et « l'anti-downstream box » (ADB) de l'ARNr 16S durant le processus d'initiation de la traduction, en présence d'une séquence Shine-Dalgarno (SD)

La DB (représentée par une boîte bleue), située sur l'ARNm en aval du codon d'initiation de la traduction, s'hybride à l'ADB (également en bleu), entre les nt 1469 et 1483 de l'ARNr 16S. Cette interaction engendre des changements de conformation au niveau de l'ARNr 16S qui rapprochent l'ASD (boîte jaune sur l'ARNr 16S) de la SD (boîte jaune sur l'ARNm). Les interactions DB-ADB et SD-ASD permettent de rapprocher la région décodante de l'ARNr 16S (en rouge) tout près du codon d'initiation de la traduction (représenté également en rouge, par un AUG) ce qui facilite le processus d'initiation de la synthèse protéique.

Tiré et adapté de Sprengart et al., 1996.



décodante de l'ARNr 16S. Pour ce faire, la complémentarité de la DB pour l'ADB doit comprendre au moins 12 à 13 nt consécutifs (Sprengart *et al.*, 1997). L'action indépendante de la DB nécessite en effet une forte complémentarité avec l'ARNr 16S puisque l'interaction DB-ADB prend place dans une région bicaténaire de l'ARNr 16S. La SD, quant à elle, s'hybride à un seul brin d'ARNr et s'accommode donc facilement d'une plus faible complémentarité.

2.2.5 Controverse au sujet de la DB

Comme il s'agit d'un concept relativement nouveau, l'interaction DB-ADB fait encore aujourd'hui l'objet d'une vive controverse. Selon certains, plusieurs points auraient été négligés dans les travaux concernant la DB (Resch et al., 1996; Bläsi et al., 1999). Depuis l'étude de Sprengart en 1990, toutes les expériences au sujet de la DB consistaient à effectuer des mutations ponctuelles au niveau de l'ARNm en vue d'augmenter ou de diminuer sa complémentarité avec l'ADB. À quelques exceptions près, un accroissement de la complémentarité concorde avec une hausse des niveaux d'expression, tandis qu'une réduction de la complémentarité mène à une baisse des taux de traduction (Faxén et al., 1991; Nagai et al., 1991; Shean et Gottesman, 1992; Ito et al., 1993). Ces résultats ont tout de suite été vus comme l'évidence du rôle stimulateur de la DB. Mais dans plusieurs cas, comme celui de Shean et Gottesman (1992), les mutations au niveau de la DB ont conduit à la création de codons rares en aval de l'AUG de départ. Or il a été démontré que les codons rares exercent un effet négatif lorsque placés après le codon initiateur. En effet ces codons affecteraient la stabilité du complexe d'initiation de la traduction en causant la dissociation de celui-ci avant que le ribosome ne puisse lire l'ARNm (Goldman et al., 1995). La faible activité traductionnelle observée dans l'expérience de Shean et Gottesman aurait donc pu être due au changement de codons plutôt qu'à l'abolition de la DB (Resch et al., 1996).

Dans l'expérience de Faxén *et al.* (1991), ce n'est pas tant la rareté des codons que leur vitesse de traduction, qui a rendu l'interprétation des résultats délicate. En prétendant augmenter l'interaction DB-ADB, Faxén et ses collaborateurs ont également

modifié la nature de certains codons. Ainsi le codon GAG a été remplacé par le codon GAA, traduit trois fois plus rapidement. Il est fort probable que l'effet stimulateur de leur mutation soit attribuable au choix du codon plutôt qu'à l'augmentation de l'interaction DB-ADB.

Mais l'élément le plus déconcertant, qui remet en doute l'existence de l'interaction DB-ADB, réside dans l'emplacement de l'ADB sur l'ARNr 16S. D'après le modèle proposé par Sprengart *et al.* (1996), l'ADB serait localisée au sein de la petite sous-unité ribosomale, à un tour et demi d'hélice du site peptidyle (site P) du ribosome. Bläsi *et al.* ne conçoivent donc pas comment les nt 1469 à 1483 de l'ARNr 16S soient disponibles à interagir avec la DB pendant que le codon d'initiation de la traduction est placé au site P (Bläsi *et al.*, 1999).

Jusqu'à ce jour, toutes les expériences de protection d'ARN cherchant à démontrer l'existence de l'interaction DB-ADB se sont soldées par des échecs (Bläsi *et al.*, 1999). Les bases moléculaires et chimiques de l'interaction DB-ADB restent à élucider et beaucoup d'efforts sont encore à déployer pour dissiper la polémique qui entoure la DB.

2.3 SÉCRÉTION

Depuis peu, les scientifiques s'efforcent de mieux comprendre le mécanisme de sécrétion de nombreux micro-organismes, incluant celui de la bactérie *Streptomyces lividans*. Les streptomycètes sont déjà reconnus comme étant de riches producteurs d'enzymes extracellulaires telles des protéases, des agarases, des xylanases, des chitinases etc... (Gusek et Kinsella, 1992). Néanmoins, l'optimisation du système de sécrétion de ces bactéries pourrait faire de celles-ci des compétiteurs fort attrayants pour la production de protéines homologues ou hétérologues. Il est possible d'induire la surexpression d'une protéine en s'attaquant au premier maillon de la chaîne de sécrétion : le peptide signal (ps). Les sections qui suivent seront donc entièrement consacrées à cet élément du système de sécrétion. Il sera question du rôle du ps, de son organisation, des

particularités des ps de *S. lividans*, des échanges de ps et l'incidence de ces mutations sur la production de protéines.

2.3.1 Le peptide signal (ou ps)

Chez les streptomycètes, tout comme les autres bactéries à Gram positif, les protéines destinées à la sécrétion sont libérées directement dans le milieu de culture tandis que la grande majorité des protéines sécrétées par les bactéries à Gram négatif se retrouvent soit dans le périplasme ou intégrées à la membrane externe (Morosoli *et al.*, 1997). Quoiqu'il en soit, toutes les protéines devant éventuellement être exportées sont synthétisées d'abord sous forme de précurseurs, c'est-à-dire qu'elles comportent, à leur extrémité N-terminale, une courte extension appelée peptide signal (ps). Cette séquence, longue d'environ 25 acides aminés (aa), semble essentielle au processus de sécrétion (Von Heijne et Abrahmsén, 1989). On lui connaît plusieurs rôles dont celui de retarder le repliement de la protéine naissante afin de maintenir celle-ci dans une conformation compétente à la translocation. On suppose également que le ps serait responsable de l'acheminement de la pré-protéine vers la membrane cytoplasmique et de son insertion à l'intérieur de cette dernière (Pugsley, 1993 ; Jones *et al.*, 1990). Une fois sa fonction remplie, donc durant ou peu après la translocation, le ps est clivé par une « signal peptidase » et laisse place à la protéine mature (Pugsley, 1993).

2.3.2 L'organisation du ps

Si aucune similitude dans la séquence primaire en aa ne peut être déduite à partir d'une simple comparaison entre les ps de divers micro-organismes, ceux-ci présentent toutefois une forte homologie au niveau de leur structure. Ils arborent tous une forme tripartite commune divisée en domaines : les domaines N, H et C (Von Heijne, 1985). La figure 4 A) est une représentation schématique des ps de précurseurs bactériens.

Figure 4 : Représentation schématique et caractéristiques générales des peptides signaux (ps) des pré-protéines bactériennes

A) Représentation schématique d'un ps de précurseur bactérien. Les ps des bactéries possèdent une structure qui se divise en domaines N, H et C. Le domaine N, constitué de 2 à 15 résidus, est polaire et affiche une charge nette positive. Le domaine H (> 8 résidus) est composé en majeure partie de résidus hydrophobes. Son contenu élevé en alanine et en leucine lui confère la configuration d'une hélice α . Le domaine C, généralement moins hydrophobe, débute par un résidu proline ou glycine et porte la séquence reconnue par la « signal peptidase ». Les cercles rouges représentent les résidus chargés ou polaires. Les premiers aa de la protéine mature sont illustrés par des cercles gris. Les aa les plus souvent retrouvés dans chacun des domaines sont indiqués par leur lettre correspondante.

Tiré et adapté de Pugsley, 1993.

B) Caractéristiques générales des ps des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des streptomycètes. La taille des ps des streptomycètes est particulièrement importante et peut atteindre jusqu'à 70 aa. Cela est dû principalement à l'étendue de leur domaine N. Le surplus de résidus arginine dans le domaine N des ps des streptomycètes confère à celui-ci une charge nette positive de 3,5.



B)

CARACTÉRISTIQUES DES PS DES BACTÉRIES			
	Gram -	Gram +	Streptomycètes
Longueur du ps	22 à 25 aa	29 à 31 aa	30 à 70 aa
Longueur du domaine N	3 à 8 aa	3 à 15 aa	3 à 30 aa
Charge du domaine N	+2,9	+3	+3,5
L'extrémité N-terminale du ps est constituée de 2 à plus de 15 résidus polaires et affiche une charge nette positive (Pugsley, 1993). Ce domaine N ou cationique occupe une des fonctions prépondérantes du ps puisqu'il permet l'interaction électrostatique avec la membrane chargée négativement. De plus, le caractère basique de ce domaine renforce le contact avec la protéine SecA, un des constituants principaux de la mécanique de sécrétion (Lammertyn et Anné, 1998). Ce sont autant de raisons qui font que l'élimination des aa chargés de l'extrémité N-terminale du ps aurait pour conséquence de réduire l'efficacité de sécrétion des protéines (Pugsley, 1993).

Le coeur du ps, le domaine H, est composé principalement d'aa hydrophobes. Son contenu élevé en résidus non-polaires, surtout en alanines et en leucines, conduit cette région du ps à adopter la conformation d'une hélice α lorsque la pré-protéine se trouve dans un environnement hydrophobe. De fait, la portion centrale du ps facilite l'insertion de la pré-protéine dans la couche lipidique de la membrane. En diminuant la taille du domaine H, qui dépasse normalement 8 résidus, ou en y introduisant des aa chargés ou fortement polaires, la sécrétion des protéines s'en trouve grandement affectée (Pugsley, 1993). Selon Izard *et al.* (1996) les domaines N et H agissent de concert, et non pas indépendamment l'un de l'autre, puisqu'une mutation dans l'une de ces deux régions peut être compensée par des changements dans l'autre domaine.

Le domaine C est la petite région carboxy-terminale qui contient la séquence consensus reconnue par la « signal peptidase » LepB ou LspA. Ce domaine débute la plupart du temps par un aa comme la proline ou la glycine, capable de former une boucle β qui expose le site de clivage du ps afin de le rendre plus accessible à la « signal peptidase » (Pugsley, 1993).

2.3.3 Les ps des streptomycètes

Outre les caractéristiques communes qui viennent d'être énumérées, la composition des ps connaît des différences notables. Celles-ci sont résumées à la figure 4

B). Par exemple, la taille des ps des streptomycètes atteint en moyenne 35 aa, et on en compte même qui mesurent jusqu'à 70 aa de long, alors que les autres bactéries à Gram positif exhibent des ps de 29 à 31 aa (Von Heijne et Abrahamsén, 1989; Park *et al.*, 1991). Quant aux ps d'*E. coli*, ils dépassent rarement les 25 résidus (Gilbert *et al.*, 1995). Si les ps des streptomycètes sont nettement plus longs que ceux des autres bactéries, c'est principalement à cause de l'étendue de leur domaine N et, dans une moindre mesure, à la présence de résidus supplémentaires dans la région H.

Les aa additionnels localisés dans le domaine N des ps des streptomycètes sont plus souvent qu'autrement des résidus arginine (Lammertyn et Anné, 1998). La section amino-terminale du ps des streptomycètes est composée de 35% d'arginines et 3% de lysines contre 10% d'arginines et 35% de lysines pour les autres bactéries. La portion cationique des ps des streptomycètes affiche donc une charge nette de +3,5 comparativement à +2,9 pour les bactéries à Gram positif et +2 pour *E. coli*. Ce surplus de charges positives est attribuable à la présence des résidus arginine (Von Heijne et Abrahmsén, 1989).

2.3.4 Mutations au niveau des ps des streptomycètes

L'efficacité du système de sécrétion des streptomycètes fait de ces bactéries un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de sécrétion (Gilbert *et al.*, 1996). De fait depuis quelques années, de nombreuses expériences de mutagenèse dirigée ont été menées à bien sur les ps des streptomycètes. Ces mutations visaient d'une part à mieux saisir l'importance de chacun des domaines N, H et C des ps dans le processus de sécrétion, et d'autre part, à déterminer l'influence de la séquence en aa des ps sur les taux de production de protéines (Lammertyn et Anné, 1998).

Afin d'analyser l'effet de la variation de charge du domaine N des ps, Fass et Engels (1996) ont soumis le ps de la tendamistat de *S. lividans* à diverses expériences de mutagenèse dirigée. La charge nette de ce ps à l'état sauvage est de +3 et peut être attribuée à la présence de trois résidus arginine. L'introduction de charges positives

supplémentaires dans le domaine N du ps diminue de façon significative la sécrétion de tendamistat. Ainsi, les ps mutants affichant une charge nette de +4, +5 et +6 ne produisent respectivement que 56%, 21% et 0% de tendamistat comparativement au ps sauvage. De même, l'abolition complète des charges positives du domaine cationique résulte en un taux de sécrétion de 2% relativement au ps sauvage. Par contre, une réduction de la charge nette du domaine N à +2 a permis à l'équipe de Fass et Engels de doubler la production de tendamistat.

Une autre étude, concernant cette fois-ci le ps de l' α -amylase de *S. venezuelae* a conduit à des résultats qui contredisent ceux de Fass et Engels. Après remplacement de l'alanine en position 2 par une arginine, et donc augmentation de la charge nette du ps de +2 à +3, les niveaux de sécrétion d' α -amylase passent de 100% à 770%. En revanche, l'abolition des charges positives du domaine N réduit de façon notable la production d' α -amylase (12%), tout comme il a été observé avec le ps de la tendamistat (Lammertyn *et al.*, 1998).

À la lumière de ces résultats, il serait tentant de croire que la charge positive du domaine N du ps n'exerce aucune influence sur les niveaux de sécrétion de protéines. Pourtant dans tous les cas, l'absence totale de charge positive dans la région N entraîne une diminution de la production de protéines. En réalité, ce que suggèrent les résultats de Fass et Engels et ceux de Lammertyn *et al.* c'est que ce n'est pas tant la charge nette que la présence de charges positives dans le domaine N qui importe pour que le ps soit fonctionnel (Lammertyn et Anné, 1998). Selon Morosoli *et al.* (1997), le ps a besoin d'au moins deux charges positives dans son domaine N pour pouvoir remplir son rôle. Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans l'étude de Fass et Engels, plusieurs mutants affichant une charge nette identique donnent des résultats de production différents. Ceci indique clairement que ce n'est pas seulement la présence de charges dans le domaine cationique qui compte mais aussi l'emplacement de ces charges positives (Fass et Engels, 1996).

En ce qui a trait à la région centrale du ps, elle ne semble tolérer l'ajout d'aucun résidu chargé, à l'exception de certaines arginine qui sont parfois retrouvées entre le domaine N et le domaine H (Pagé *et al.*, 1996). C'est ce que démontre entre autres l'expérience de Leu *et al.* (1992) sur le gène MelC1 de la tyrosinase de *S. antibioticus.* Le mutant arborant un aa chargé négativement à l'intérieur du domaine H du ps ne produit et sécrète que 10% de tyrosinase par rapport à la souche sauvage.

De plus, toutes les études de mutagenèse dirigée ayant pour cible la portion centrale du ps, révèlent qu'un certain degré d'hydrophobicité du domaine H doit être maintenu pour que le ps demeure fonctionnel. Cette hydrophobicité ne doit, en aucun cas, être interrompue. Ainsi, toute tentative d'allongement ou de raccourcissement du domaine H des ps s'est soldée par une réduction des niveaux de sécrétion. Dans le cas du ps de l'estérase de *S. scabies*, une délétion de quatre aa du domaine hydrophobe a réduit la production d'estérase de plus de 200 fois (Hale et Schottel, 1996). L'introduction de trois résidus apolaires dans le domaine H du ps de l' α -amylase de *S. griseus* a également eu un effet négatif sur la sécrétion de protéines (Vigal *et al.*, 1991).

Finalement, le domaine C-terminal du ps a lui aussi été sujet à des mutations. Chang et ses collaborateurs ont porté une attention particulière au ps de la métalloprotéase neutre de *S. cacaoi*. En remplaçant la proline du domaine C par un résidu leucine, ils ont généré un ps complètement défectueux. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle il est absolument nécessaire de retrouver une structure en forme de boucle β quelques nucléotides en amont du site de clivage du ps, afin que le précurseur soit correctement clivé (Chang *et al.*, 1997). En plus, tout comme la région centrale du ps, le domaine C ne doit contenir auc n résidu chargé (Lammertyn et Anné, 1998).

Introduire des mutations au niveau des ps semble donc constituer un bon moyen d'augmenter la production de protéines hétérologues par les streptomycètes. Toutefois, il faut garder à l'esprit que chaque combinaison protéine-ps peut conduire à ses propres résultats. C'est pourquoi ceux-ci doivent être traités avec précaution (Lammertyn et Anné, 1998).

2.3.5 Échange de ps

Toujours en gardant le même objectif, Pagé *et al.* (1996) se sont interrogés quant à savoir si la substitution d'un ps par celui d'une autre enzyme peut également optimiser les taux de sécrétion d'une protéine particulière. Pour tester leur hypothèse, le groupe de chercheurs s'est servi du gène de la xylanase A de *S. lividans* comme modèle. Le ps de cette enzyme fut donc remplacé successivement par six ps homologues provenant eux aussi de *S. lividans*, soient les ps de la xylanase B, la xylanase C, la mannanase A, la cellulase B et l'acétyl-xylane estérase.

Le ps atypique de la xylanase C, avec ses deux résidus aspartiques dans le domaine N, n'est pas interchangeable avec celui de la xylanase A. La construction arborant ce ps ne produit que 10% de xylanase A par rapport au ps sauvage. Des taux de production encore plus faibles sont obtenus avec le ps de la cellulase B, ce qui est probablement dû à la présence de deux codons rares TTA dans la séquence de ce ps. Mais l'approche de Pagé et ses collaborateurs se révèle tout de même un succès en ce qui concerne les précurseurs de l'acétyl-xylane estérase, la xylanase B, la mannanase A et la cellulase A pour lesquels les taux de xylanase A produite atteignent respectivement 120%, 90%, 87,5% et 75% de ceux du ps sauvage (Pagé *et al.*, 1996). Mais bien qu'en interchangeant les ps, les chercheurs parviennent à frôler les niveaux de protéines obtenus grâce au ps sauvage, aucun des remplacements opérés n'augmente de façon significative la production de xylanase A (Morosoli et Dupont, 1999).

Une attention un peu plus soutenue aux séquences des ps des streptomycètes a permis de constater qu'en amont du ps de plusieurs gènes, il est possible de trouver un autre codon d'initiation de la traduction, en phase avec le premier, et précédé d'une séquence SD plus ou moins bien conservée. Une telle organisation est notamment retrouvée dans les ps des gènes encodant la mannanase A (ManA), la cellulase A (CelA), la chitosanase, l'inhibiteur de subtilisine et l'estérase (Pagé *et al.*, 1996). La présence de deux codons d'initiation de la traduction, situés dans le même cadre de lecture, pourrait supposer une forte augmentation des taux de production d'enzyme si ces codons sont utilisés simultanément lors de la traduction. Afin de vérifier cette hypothèse, les séquences encodant les ps de la Man A et celui de la Cel A ont été fusionnées avec le gène de la xylanase A de *S. lividans*. La figure 5 se veut justement une récapitulation des résultats de cette expérience menée par Pagé et son équipe.

Selon l'emplacement de la SD potentielle et du codon d'initiation de la traduction, les précurseurs de la ManA et de la CelA mesurent respectivement 34 aa (ps court de la ManA) ou 43 aa (ps long de la ManA) et 27 aa (ps court de la CelA) ou 46 aa (ps long de la CelA). Les clones construits à partir des ps courts de la ManA et de la CelA ont tous deux produit la même quantité de xylanase que le contrôle, contenant le ps original de la xylanase A. Le clone hébergeant le ps long de la ManA a permis de doubler la production de xylanase A. Ce résultat corrobore l'hypothèse selon laquelle les deux AUG du ps long de la ManA permettent la fixation simultanée de deux ribosomes à l'ARNm, ce qui double l'efficacité du processus de traduction. Qui plus est, lorsque l'AUG interne est muté par un AUC, qui n'est plus un codon d'initiation de la traduction, les niveaux de xylanase produite retombent à 80 UI/mL, comme avec le ps court.

Lorsque le ps de la xylanase A est remplacé par celui de la CelA, le tableau diffère totalement. Avec le ps court, les niveaux de xylanase A sont toujours de 80 UI/mL. Par contre lorsque c'est le ps long de la CelA qui est placé en amont du gène rapporteur, la production de xylanase A ne fait pas que doubler mais passe à 300 UI/mL (Pagé *et al.*, 1996). Le ps long de la CelA doit donc comporter un élément additionnel qui favorise grandement le processus de traduction. Cet élément additionnel figure fort probablement dans la première partie du ps long puisqu'en mutant le codon interne par un AUC, les niveaux de xylanase A ne chutent pas aussi bas qu'avec le ps court.

- Figure 5 : Effet du remplacement du peptide signal de la xylanase A (XlnA) par les peptides signaux courts et longs de la mannanase A (ManA) et de la cellulase A (CelA) de *Streptomyces lividans*, sur la production de xylanase
- A) Expérience de Pagé et al. (1996) concernant l'effet du remplacement du ps de la XlnA par les ps court et long de la ManA de S. lividans, sur la production de XlnA. La boîte grise représente le gène de la XlnA. Le(s) codon(s) d'initiation de la traduction est (sont) indiqué(s) en rouge et le codon interne figure entre parenthèses. Chaque codon d'initiation de la traduction est précédé d'une séquence SD, représentée par la boîte jaune. La production de xylanase A a été mesurée dans le surnageant de culture au temps 96 h et est exprimée en unité internationale par millilitre (UI/mL). Le ps court de la ManA produit 80 UI/mL de xylanase. Le ps long, avec ses deux codons d'initiation de la traduction double la production de xylanase. Lorsque le codon interne est muté par un AUC, la production retombe à 80 UI/mL.
- B) Expérience de Pagé *et al.* (1996) concernant l'effet du remplacement du ps de la XlnA par les ps court et long de la CelA de *S. lividans*, sur la production de XlnA. Le ps court de la CelA produit 80 UI/mL de xylanase. Le ps long triple la production de xylanase prouvant qu'il comporte probablement un élément additionnel, illustré par la boîte bleue.



3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

3.1 LISTE DES PRODUITS UTILISÉS

Acétate de potassium Acétate de sodium Acide acétique Acide chlorydrique Acide citrique Acide dinitrosalicylique Acide éthylène diaminetétracétique Acide molybdique Acide perchlorique ADN ligase du phage T4 ADN polymérase du phage T7 ADN de sperme de saumon Agar Agarose Albumine sérique de bœuf Alcool isoamylique Ampicilline ATP $[\gamma - {}^{32}P] ATP$ Bacto-tryptone Bisulfite de sodium Bleu de bromophénol Borate de sodium Bromure d'éthydium **Butanol** Casamino acids Chloramphénicol Chloroforme Chlorure de calcium Chlorure de césium Chlorure de cobalt Chlorure de cuivre Chlorure ferrique Chlorure de magnésium Chlorure de manganèse Chlorure de potassium Chlorure de sodium Chlorure de tétraméthyle d'ammonium Chlorure de zinc 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate 2'-désoxythymidine 5'-triphosphate Diphénylamine

American Chemical Ltd J.T. Baker Fisher J.T. Baker J.T. Baker **BDH** J.T. Baker Sigma Chemical Co. American Chemical Ltd **Bio-Rad** Laboratories Ltd **Bio-Rad Laboratories Ltd** Sigma Chemical Co. Difco Boehringer Mannheim Sigma Chemical Co. J.T. Baker Sigma Chemical Co. Pharmacia ICN Difco J.T. Baker Anachemia J.T. Baker Sigma Chemical Co. J.T. Baker Difco Sigma Chemical Co. American Chemical Ltd Fisher BDH Analar Fisher Fisher J.T. Baker BDH Merck American Chemical Ltd Aldrich Fisher Pharmacia Pharmacia Pharmacia Pharmacia American Chemical Ltd

Dithiothréitol DNAse I Enzymes de restriction Éthanol 95 % Extrait de bœuf Extrait de levure Ficoll type 400 Glucose Glycérol Hydroxyde de sodium Isopropanol Kanamycine Lysozyme Maltose Marqueur de poids moléculaire 1kb ladder Méthionine N-Z amine A Phénol Phosphate de potassium Phosphate de sodium Polyéthylène glycol 6000 Polynucléotide kinase du phage T4 Polyvinylpyrrolidone L-Proline Rémazol Bleu Brillant RNAse A Sodium dodécyl sulfate Sucrose Sulfate d'ammonium Sulfate de cuivre Sulfate de fer Sulfate de magnésium Sulfate de manganèse Sulfate de potassium Sulfate de zinc Tampon d'hybridation 10X Tampon One-Phor-All Plus 10X Tampon de synthèse 10X Tampon TES Tartrate de sodium de potassium Thiostrepton Tris Triton 100X Tween 80 Tyrosine Uridine Xylane de bouleau

Sigma Chemical Co. Boehringer Mannheim Pharmacia SAO Difco Difco Sigma Chemical Co. American Chemical Ltd J.T. Baker Fisher American Chemical Ltd. Sigma Chemical Co. Sigma Chemical Co. American Chemical Ltd Gibco BRL Sigma Chemical Co. Sheffield Products Gibco BRL J.T. Baker J.T. Baker J.T. Baker **Bio-Rad Laboratories Ltd** Sigma Chemical Co. Sigma Chemical Co. Aldrich Sigma Chemical Co. IBI Fisher BDH Sigma Chemical Co. Merck J.T. Baker J.T. Baker American Chemical Ltd Sigma Chemical Co. **Bio-Rad Laboratories Ltd** Pharmacia **Bio-Rad Laboratories Ltd** Sigma Chemical Co. J.T. Baker **Bristol-Myers Squibb Bio-Rad Laboratories Ltd Bio-Rad Laboratories Ltd** American Chemical Ltd Gibco BRL Sigma Chemical Co. Sigma Chemical Co.

Xylane d'épeautre d'avoine Xylène cyanol Xylose Sigma Chemical Co. BDH Sigma Chemical Co.

3.2 Souches bactériennes

3.2.1 Escherichia coli

Les expériences de mutagenèse dirigée exécutées lors de ces travaux font appel à l'utilisation d'une souche particulière d'*E. coli* : la souche CJ236. Celle-ci est fournie par la compagnie Bio-Rad Laboratories Ltd, tout comme le reste du matériel requis pour la réalisation de la technique de mutagenèse de Kunkel. Comme il est décrit un peu plus loin, à la section 3.10, la première étape de la méthode de Kunkel passe par la production d'ADN simple brin contenant une certaine proportion d'uraciles à la place des thymines. C'est *E. coli* CJ236, grâce à son génotype *dut*1⁻, *ung*1⁻, *thi*1, *rel*A1, pCJ105 (Cm^r), qui sert de souche réceptrice pour le phagemide et le phage auxiliaire en vue d'obtenir cet ADN simple brin uracilé (Kunkel *et al.*, 1991).

Une fois l'ADN simple brin uracilé obtenu et la mutagenèse complétée, on a recours aux cellules compétentes d'*E. coli* MV1190. Elles sont utilisées pour la transformation des produits de mutagenèse. Les cellules MV1190 sont rendues compétentes au moyen de la méthode classique de traitement au CaCl₂ suivi du choc thermique. Leur génotype $\Delta(lac-proAB)$, *thi*, *sup*E, $\Delta(srl-recA)$ 306 :: Tn10 (tet^r) [F' *tra*D36, *pro*AB, *lac*I^qZ Δ M15] permet d'obtenir de l'ADN bicaténaire exempt d'uracile (Kunkel *et al.*, 1991).

3.2.2 Streptomyces lividans

Les mutations introduites dans les différentes constructions sont d'abord générées chez *E. coli*, en raison de la simplicité de manipulation de ce genre bactérien. Mais les gènes mutés doivent ensuite être transférés puis testés chez *S. lividans*. C'est la souche 10-164 de *S. lividans* qui sert d'hôte pour les plasmides portant les mutations dans le gène à tester. Cette souche est en fait un mutant pléiotropique cellulase et xylanase négatif. Elle porte une mutation affectant la protéine msiK, responsable de la liaison de l'ATP.

L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire au transport, à l'intérieur des cellules, des xylooligosaccharides tels le cellobiose et le xylobiose, qui sont les inducteurs respectifs de la cellulase et de la xylanase (Hurtubise *et al.*, 1995). La souche 10-164 de *S. lividans* est donc déficiente en ce qui a trait à ces deux activités enzymatiques. Elle constitue par conséquent un outil idéal pour l'analyse de l'activité xylanolytique des clones obtenus par mutagenèse dirigée, puisque les gènes de xylanase d'origine chromosomique n'y sont pas exprimés.

3.3 VECTEURS

3.3.1 Escherichia coli

Le phagemide qui a servi dans les expériences de mutagenèse dirigée était le pTZ19U dans lequel fut inséré un fragment *Hind*III-*Sac*I de 1,2 kb. Ce dernier contient, entre autres, le gène tronqué de la xylanase A de *S. lividans*, qui ne code que pour le domaine catalytique de l'enzyme. Malgré qu'elle soit dépourvue de son site de fixation au substrat, la forme tronquée de la xylanase A est tout à fait active. En plus du gène de structure de la xylanase A, le fragment de 1,2 kb comprend aussi selon le cas, le peptide signal de la cellulase A, celui de l'acétyl-xylane estérase ou celui de la xylanase A, cloné entre les sites *Hind*III et *Kpn*I. Outre cela, le phagemide renferme le gène de résistance à l'ampicilline, porté par le plasmide pTZ19U et l'origine de réplication f1 qui permet la co-infection avec le phage auxiliaire dans le but de produire l'ADN simple brin servant à la mutagenèse (section 3.10).

3.3.2 Streptomyces lividans

Le fragment *Hind*III-SacI contenant la mutation est ensuite introduit dans le vecteur d'expression pIAF 906 de S. lividans, qui provient du plasmide à copies multiples pIJ702 dans lequel furent insérés le gène de structure de la xylanase A et les sites *Hind*III

et *Kpn*I. Le vecteur pIAF 906 contient le gène *tsr*, porté par le plasmide pIJ702, qui confère aux transformants la résistance au thiostrepton.

3.4 MILIEUX DE CULTURE

3.4.1 Escherichia coli

3.4.1.1 Milieu liquide pour la croissance

Le milieu 2xTY a servi pour tous les travaux effectués avec *E. coli*. Ce milieu comprend 16 g de bacto-tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau. Le milieu solide 2xTY est obtenu en ajoutant 15 g/L d'agar. La stérilisation du milieu est réalisée dans un autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

L'ajout d'antibiotiques au milieu de culture 2xTY est parfois nécessaire pour le maintien ou la sélection de certains clones d'*E. coli*. Selon le cas, les antibiotiques suivants peuvent donc être ajoutés : l'ampicilline, à raison de 100 µg/mL, le chloramphénicol, en concentration de 15 µg/mL et la kanamycine, à raison de 70 µg/mL.

Par ailleurs, les cultures d'*E. coli* sont toujours incubées à 37°C et sous agitation de 240 rpm.

3.4.1.2 Milieu liquide riche pour l'isolement d'ADN plasmidique

Le milieu riche TB sert à stimuler la croissance des clones d'*E. coli* dont l'ADN plasmidique sera éventuellement isolé (section 3.6.1). Ce milieu se compose de 12 g de bacto-tryptone, 24 g d'extrait de levure et 4 mL de glycérol par litre d'eau. L'antibiotique ampicilline y est ajouté, en concentration de 100 μ g/mL.

3.4.2 Streptomyces lividans

3.4.2.1 Milieu liquide minimal pour la croissance

La croissance des transformants de *S. lividans* 10-164 se fait dans un flacon erlenmeyer de 125 mL contenant 20 mL de milieu minimal M14 et 4 petites billes de verre, d'un diamètre d'environ 3 mm, limitant l'agrégation potentielle de mycélium. Un litre de milieu M14 comprend : 1,4 g de (NH₄)₂SO₄, 5 g de K₂HPO₄, 1 g de KH₂PO₄, 2 mL de Tween 80 et 1 mL de solution de sels minéraux de Mandel. Si besoin est, le pH du milieu est ajusté à environ 7,4.

La solution de sels de Mandel est constituée de : 140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 160 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Ces minéraux sont dissous un à un dans 100 mL d'eau distillée et seront ajoutés au milieu de culture à l'état de traces.

Le milieu minimal M14 doit être enrichi d'une source de carbone qui, dans ce cas, est le xylane d'épeautre d'avoine soluble (en anglais, « oat spelt xylan ») à une concentration de 1%. Bien qu'il représente un substrat beaucoup moins coûteux, le glucose ne peut être utilisé comme source de carbone dans cette étude puisqu'il semble agir comme un répresseur catabolique des gènes de xylanase (Kluepfel *et al.*, 1986). Le milieu M14 est stérilisé dans l'autoclave puis complété avec 120 µL d'une solution de MgSO₄ · 7H₂O 5% stérile et 200 µL d'une solution de CaCl₂ · 2H₂O 3%, également stérile. Comme le vecteur d'expression de *S. lividans* contient le gène de résistance au thiostrepton, 5 µg/mL de cet antibiotique sont rajoutés automatiquement à toutes les cultures liquides (Hopwood *et al.*, 1985). Le milieu est alors prêt pour l'inoculation avec 2 x 10⁶ spores/mL. Cependant, avant d'être introduites dans l'erlenmeyer, les spores doivent être soigneusement lavées à deux reprises avec du milieu M14 stérile pour éliminer toute trace de glycérol. Les cultures sont incubées à 34°C dans un agitateur rotatif à 240 rpm. La température optimale de croissance des streptomycètes est de 30°C, mais la production de xylanase est favorisée par des températures de 40°C. 34°C représente par conséquent le meilleur compromis entre une croissance acceptable et une bonne production d'enzyme. Des échantillons de 1 mL sont prélevés à intervalles réguliers à partir de chacune des cultures pour l'analyse subséquente de l'activité xylanolytique et du contenu en ADN (section 3.8) (Hopwood *et al.*, 1985).

3.4.2.2 Milieu solide pour la croissance

Le milieu Bennett a servi de support solide pour la croissance, la sporulation et l'entreposage des transformants de *S. lividans*. La composition de ce milieu est la suivante : 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de bœuf, 2 g de N-Z amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre d'eau. Le pH est élevé jusqu'à 7,3 avec du NaOH puis le milieu est passé à l'autoclave. Après la stérilisation, du thiostrepton est ajouté au milieu à une concentration finale de 50 μ g/mL. Il est important de noter que la concentration de thiostrepton requise pour les milieux solides est 10 fois plus importante que celle des milieux liquides. Les géloses Bennett-thiostrepton sont incubées à 30°C.

3.4.2.3 Milieu solide pour la régénération des protoplastes

La paroi des bactéries à Gram positif, notamment celle des streptomycètes, est assez épaisse et rend la transformation de ces cellules difficile. Pour pallier à ce problème, il est donc nécessaire de recourir à l'utilisation de protoplastes, c'est-à-dire des bactéries dépourvues de paroi, de forme sphérique et osmotiquement sensibles. Les protoplastes de *S. lividans* sont préparés suivant la méthode de Hopwood *et al.* (1985) qui consiste à traiter les cellules avec une solution contenant du lysozyme, qui hydrolyse le peptydoglycane de la paroi cellulaire et libère ainsi les protoplastes. Même s'ils ont complètement perdu leur paroi, les protoplastes continuent à se développer normalement, aussi longtemps que l'isotonie du milieu est maintenue. C'est pourquoi les transformants de *S. lividans* sont étalés sur un milieu solide R5 qui, de par sa nature riche en sucres et en minéraux, permet la régénération des protoplastes. La préparation de ce milieu inclus 103 g de sucrose, 0,25 g de K_2SO_4 , 10,12 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 g de glucose, 100 mg de Casamino acids, 5 g d'extrait de levure, 5,73 g de tampon TES, 2 mL d'une solution d'éléments traces et 22 g d'agar dans un volume total de 955 mL d'eau distillée. Le milieu R5 est stérilisé pendant 20 minutes à l'autoclave à une température de 121°C.

La solution d'éléments traces comporte 40 mg de $ZnCl_2$, 200 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ et 10 mg de (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4H₂O par litre d'eau (Hopwood *et al.*, 1985).

Une fois la stérilisation achevée, le milieu R5 est complété à l'aide des solutions stériles suivantes : 10 mL de KH_2PO_4 0,5%, 4 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5 M, 1 mL de $CuSO_4$ 5 mg/mL, 15 mL de L-proline 20%, 10 mL de méthionine 1% et 5 mL de tyrosine 8% dissoute dans du NaOH 1N. Le milieu est réparti dans des plats de Pétri puis séché à température de la pièce jusqu'à perte de 15% de son poids initial.

3.4.2.4 Milieu solide pour la détection de l'activité xylanolytique

La visualisation de l'activité xylanolytique des transformants de *S. lividans* est assurée grâce à un milieu minimal solide renfermant du xylane couplé au colorant Rémazol Bleu Brillant (RBB-xylane). Ce composé confère une coloration bleue au milieu. Comme les xylanases sont des enzymes extracellulaires, elles sont sécrétées et diffusent dans le milieu. Ces enzymes hydrolysent alors le substrat xylane et une zone d'éclaircissement est générée autour des colonies productrices de xylanase. Le milieu RBB-xylane se prépare dans 750 mL d'eau distillée à laquelle on ajoute successivement 2 g de (NH₄)₂SO₄, 1,5 g de KH₂PO₄, 5 g de K₂HPO₄, 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de KCl, 1 mL de solution de sels de Mandel (section 3.4.2.1 pour la description de cette solution) et 17 g d'agar. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 puis le tout est stérilisé à l'autoclave.

Pendant ce temps, 1,5 g de poudre de RBB-xylane est dissoute dans 250 mL d'eau distillée chaude. Ce mélange est agité puis amené lentement à ébullition sur une plaque

chauffante. Après quoi, cette deuxième solution est également stérilisée pendant 20 minutes à 121°C.

Les deux solutions sont refroidies jusqu'à 55°C puis combinées. Le mélange ne se fait qu'à ce stade-ci afin d'éviter la précipitation du colorant. Finalement 10 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ de même que 1 mL de thiostrepton d'une concentration de 50 mg/mL sont ajoutés de façon stérile au milieu.

3.5 PRÉPARATION DES SPORES

Chaque transformant de S. lividans jugé intéressant, est inoculé à l'aide d'un fil de platine sur le milieu solide Bennett-thiostrepton. Le plat de Pétri est ensuite incubé dans une étuve à 30°C pendant une semaine. C'est le temps requis pour que les spores se forment à la surface des colonies. Le plat de Pétri sert alors à ensemencer sept autres milieux solides Bennett-thiostrepton. De la même façon que précédemment, ces boîtes de Pétri sont incubées une semaine durant, jusqu'à l'obtention d'une couche de couleur grisâtre en surface des colonies, propre à la sporulation. C'est seulement à ce moment que s'effectue la récolte des spores. 10 mL d'une solution stérile de glycérol 20% sont introduits dans un premier plat de Pétri. La surface de la gélose est grattée délicatement avec l'extrémité d'une pipette, afin de détacher les spores. La suspension de spores est récoltée puis transférée dans un second plat de Pétri qui sera gratté à son tour. Les 10 mL de glycérol peuvent servir à recueillir les spores de trois boîtes de Pétri. La suspension de spores est ensuite introduite dans un tube de 35 mL muni d'un bouchon et contenant des billes de verre d'environ 3 mm de diamètre. Le tube est agité vigoureusement au vortex afin de disperser les amas de mycélium. Suite à cela, la suspension de spores est filtrée sur laine de verre. La laine de verre agit comme une barrière qui retient les débris cellulaires et les fragments d'hyphes. La concentration de spores est estimée par mesure de la densité optique à 660 nm. Grâce au glycérol, les spores pourront être conservées très longtemps dans un congélateur à -20°C.

3.6 MANIPULATION DE L'ADN

3.6.1 Isolement des plasmides d'Escherichia coli

L'isolement d'ADN plasmidique d'*E. coli* est effectué selon la méthode décrite par Liu et Mishra (1995). Les clones obtenus par mutagenèse dirigée de Kunkel sont repiqués successivement sur un milieu solide 2xTY-ampicilline et dans un microtube contenant 200 µL du milieu liquide riche TB-ampicilline. Après une incubation de 16 heures à 37°C des cultures liquides, celles-ci sont centrifugées à 13 000 rpm pendant un maximum de 20 secondes. Une centrifugation trop longue aurait pour effet de compacter les cellules. Le surnageant est retiré lentement par aspiration puis le culot de bactéries est resuspendu dans 30 µL de solution de lysozyme. Cette solution comprend 2 mg de lysozyme dissous dans 1 mL de tampon STT (sucrose 8%, Tris-HCl 50 mM à pH 8, Triton 100X 5%). Le lysozyme détruit le peptidoglycane de la paroi cellulaire. Les tubes Eppendorf sont agités vigoureusement au vortex. Par la suite, les échantillons sont bouillis pendant 60 secondes. Finalement, après une centrifugation de 5 minutes à 13 000 rpm, le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré. Cette technique d'isolement d'ADN permet de tester simultanément une multitude de clones différents.

3.6.2 Purification d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium

La purification d'ADN d'*E. coli* est rendue possible grâce à la technique du gradient de chlorure de césium, mise au point en 1957 (Sambrook *et al.*, 1989). Cette méthode démarre par la mise en culture du clone d'*E. coli* désiré dans un flacon contenant 100 mL de milieu 2xTY-ampicilline. Après une incubation d'au moins 16 heures à 37°C, la culture est centrifugée pendant 5 minutes à 5000 rpm (Centrifugeuse Sorvall RC-5B, rotor GSA). Le culot de cellules est resuspendu dans 2,5 mL de tampon glucose (glucose 50 mM, Tris 25 mM à pH 8, EDTA 10 mM). Y est ajouté 5,5 mL d'une solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) 1% et NaOH 0,2 N. Le tout est agité pour être incubé ensuite sur la glace pendant 5 minutes. On complète le mélange avec 2,5 mL de tampon

d'acétate de potassium (60 mL d'acétate de potassium 5M, 11,5 mL d'acide acétique et 28,5 mL d'eau) et on incube encore une fois à 4°C pendant 5 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000 rpm, le surnageant est récolté dans un tube de 50 mL. L'extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique, accompagnée d'une centrifugation de 5 minutes à 6000 rpm (Centrifugeuse Sorvall RC-B5, rotor SA600) permet d'éliminer les protéines emprisonnées dans la phase phénolique, pour ne conserver que la phase aqueuse. À cette dernière est ajouté 0,6 volume d'isopropanol. Le mélange repose pendant 30 minutes à température de la pièce pour être centrifugé ensuite à 10 000 rpm durant 15 minutes. Le surnageant est décanté doucement puis le précipité est resuspendu dans 1 mL de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM à pH 8) et transféré dans un tube contenant 0,5 mL d'eau et 2,625 g de chlorure de césium, ce qui donne un volume total approximatif de 2 mL à une densité d'environ 1,84. Finalement, 7,5 μ L de bromure d'éthidium, à une concentration de 0,5 μ g/mL, sont rajoutés.

Parallèlement à cela, le gradient de chlorure de césium est préparé dans un tube spécial, compatible avec l'ultracentrifugeuse. Dans le fond de ce tube, est déposé 1,8 mL de chlorure de césium 65%. Puis l'échantillon d'ADN préparé précédemment est chargé avec précaution au dessus. Le tube est centrifugé dans une centrifugeuse Beckman TL-100 (rotor TLN-100) à 100 000 rpm pendant 3 heures. Au cours de l'ultracentrifugation, un gradient de chlorure de césium se forme et les différents composants du mélange se répartissent selon leur densité. Le bromure d'éthidium se lie à l'ADN et il se forme des bandes distinctes dans le tube qui fluorescent sous un faisceau de lumière ultraviolette. La bande correspondant à l'ADN plasmidique est récupérée au moyen d'une seringue et le bromure d'éthidium qu'elle contient est retiré avec du butanol saturé d'eau. Cette étape d'extraction est répétée tant que l'échantillon n'est pas complètement débarrassé du bromure d'éthidium. Finalement, l'ADN plasmidique pur est précipité toute une nuit à -20°C avec 2 volumes d'éthanol 70%. Le lendemain, le mélange est centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 400 µL de TE. Puis l'ADN est précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M, 2 volumes d'éthanol 95% et récupéré par une centrifugation de 30 minutes à 13 000 rpm. Le culot d'ADN est séché et resuspendu dans un volume final de 50 μ L d'eau. La concentration d'ADN est déterminée par l'absorbance à 260 nm. Une unité de DO équivaut à 50 μ g/mL d'ADN.

3.6.3 Digestion d'ADN par des enzymes de restriction

Dans la présente étude, les endonucléases de restriction utilisées pour couper l'ADN proviennent toutes de la compagnie Pharmacia. Elles sont vendues avec du tampon One-Phor-All *Plus* 10X (Tris-acétate 100 mM à pH 7,5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM). La digestion de 1 μ g d'ADN est réalisée dans un volume final de 20 μ L comprenant du tampon One-Phor-All *Plus* à la concentration optimale définie pour l'enzyme et 1 unité d'enzyme. Le volume est complété à 20 μ L avec de l'eau. La réaction est incubée à 37°C pendant une à deux heures.

3.6.4 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose

Après leur digestion avec les endonucléases de restriction, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose. La concentration d'agarose employée pour faire le gel varie de 0,7% à 2% (p/v) selon la taille des fragments à séparer. La préparation du gel consiste à dissoudre l'agarose dans un tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM à pH 7,8 et de l'EDTA 1 mM), en portant le mélange à ébullition au micro-ondes. Quand la solution refroidit, on y ajoute du bromure d'éthydium à une concentration de 0,5 μ g/mL, ce qui permet de visualiser les fragments d'ADN sous une lumière ultraviolette. La solution est coulée dans un moule et refroidie jusqu'à formation du gel. Celui-ci est alors plongé dans une cuve à électrophorèse remplie de TAE 1X.

Un tampon de chargement est ajouté, dans un rapport de 1:5, à tous les échantillons d'ADN devant être analysés. Ce tampon 6X comprend 0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol et 30% de glycérol. Les échantillons sont alors

déposés dans les puits du gel d'agarose. Le premier puits est exclusivement réservé au marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder qui permettra d'évaluer la longueur des fragments d'ADN ayant migré dans le gel. Le gel est ensuite soumis à une tension constante d'environ 100 V pendant 3 à 4 heures. Après migration, les gels sont photographiés sous lumière ultraviolette au moyen de l'appareil Gel Doc 1000 de Bio-Rad Laboratories Ltd.

3.6.5 Extraction des fragments d'ADN du gel d'agarose

Le fragment d'intérêt est prélevé du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel puis déposé dans un microtube de 1,5 mL. L'extraction et la purification de l'ADN est ensuite réalisée au moyen de la trousse commerciale « QIAEX Gel Extraction Kit » de Quiagen Inc., conformément aux recommandations du manufacturier. La bande d'ADN découpée à partir du gel est pesée. Pour chaque mg d'agarose, 3 µL de tampon QX1 sont ajoutés dans le microtube. La solution de billes QUIAEX II est agitée pour former une suspension uniforme et 10 µL en sont prélevés et également ajoutés au tube Eppendorf. Le tampon QX1 a pour rôle de dissoudre l'agarose et de favoriser l'adhésion de l'ADN aux billes de verre. Le microtube est agité puis incubé à 50°C pendant 10 minutes. Durant cette période d'incubation, le tube est agité au vortex toutes les 2 minutes afin de resuspendre les billes et faciliter par le fait même le contact et la liaison entre l'ADN et la matrice de verre. Le microtube est ensuite centrifugé pendant 30 secondes à 13 000 rpm et le surnageant est décanté délicatement sans déplacer le culot de billes. Celui-ci est resuspendu de nouveau dans 500 µL de tampon QX1 et une autre centrifugation de 30 secondes est effectuée. Encore une fois, le surnageant est décanté et le culot est lavé à deux reprises avec 500 µL de tampon PE. Le tampon PE élimine les traces d'agarose et autres contaminants présents dans l'échantillon. Le culot est asséché pendant 15 minutes à l'air libre et 20 µL d'une solution de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5 y sont ajoutés. Le tout est incubé 5 minutes à la température de la pièce et centrifugé 30 secondes à une vitesse de 13 000 rpm. Le surnageant, contenant l'ADN mais débarrassé des billes de verre, est recueilli dans un nouveau microtube. Si le surnageant n'apparaît pas suffisamment clair, l'étape de resuspension dans la solution de Tris-HCl peut être reprise une seconde fois.

3.6.6 Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur

Les plasmides contenant les fragments d'ADN à liguer sont digérés avec les enzymes de restriction appropriées (section 3.6.3). Les vecteurs se répliquant chez S. lividans et chez E. coli ainsi que le plasmide portant l'insert obtenu par mutagenèse dirigée sont tous coupés avec les mêmes endonucléases afin de générer des extrémités cohésives identiques. Les fragments d'ADN engendrés par la digestion sont alors séparés sur un gel d'agarose (section 3.6.4). Les bandes d'insert et de vecteur à liguer sont ensuite extraites du gel d'agarose et purifiées (section 3.6.5). L'ADN du vecteur de même que celui de l'insert sont précipités par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol 95%. Les deux échantillons sont incubés 10 minutes dans un congélateur à -80°C pour être centrifugés ensuite à 13 000 rpm pendant 30 minutes. Les surnageants des deux tubes sont éliminés. L'insert demeure à sec tandis que le vecteur est resuspendu dans 7,5 µL d'eau. Finalement, les deux fragments d'ADN à liguer, soit le vecteur et l'insert, sont combinés. Il reste à compléter la réaction de ligation en ajoutant 1 µL de tampon One-Phor-All Plus 10X, 1 µL d'ATP 10 mM et 1 µL d'ADN ligase du phage T4 (3 unités). Le mélange de ligation est incubé à 14°C pendant 16 heures.

3.6.7 Séquençage de l'ADN

Toutes les constructions générées par la mutagenèse dirigée sont séquençées suivant une version légèrement modifiée de la méthode de terminaison de chaînes par les didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1970). Chaque didéoxynucléotide est couplé à un fluorochrome différent. Les réactions sont réalisées par le service de séquençage offert à

l'Institut Armand-Frappier à l'aide du séquenceur automatique ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer de Perkin Elmer.

3.7 TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

3.7.1 Transformation d'Escherichia coli

Une cellule est dite compétente lorsqu'elle devient apte à incorporer de l'ADN exogène. La méthode de préparation de cellules compétentes d'*E. coli* MV1190 est celle du traitement au CaCl₂ décrite dans le protocole « Competent Cell Preparation » de Bio-Rad Laboratories Ltd.

Quant à la transformation des cellules compétentes d'*E. coli* MV1190, elle s'effectue suivant la méthode du choc thermique (Sambrook *et al.*, 1989). En premier lieu, 100 μ L de bactéries compétentes sont déposées dans le fond d'un tube Falcon stérile avec l'ensemble de la réaction de synthèse du brin complémentaire, soit environ 10 μ L (section 3.10.5). Ce mélange est incubé sur glace pendant 30 minutes. Après quoi, le tube est transféré dans un bain à 42°C pendant 2 minutes. Les cellules subissent alors un choc thermique. 400 μ L de milieu 2xTY sont ajoutés au tube et le tout est incubé à 37°C sous agitation durant une heure. Cette étape permet l'expression phénotypique du gène de résistance à l'ampicilline que porte le vecteur. Enfin, 125 μ L du mélange final sont étalés sur 4 plats de Pétri de milieu 2xTY contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. Les boîtes de Pétri inoculées sont introduites dans une étuve à 37 °C pendant 16 heures.

3.7.2 Transformation de Streptomyces lividans

Le processus de transformation des streptomycètes diffère quelque peu de celui d'*E. coli. S. lividans* étant une bactérie à Gram positif, elle possède une paroi épaisse qui rend la pénétration d'ADN difficile. C'est pourquoi, des protoplastes de *S. lividans* sont préparés d'après la méthode décrite par Hopwood *et al.* (1985) (section 3.4.2.3).

La transformation des protoplastes de *S. lividans* s'effectue par la mise en présence, dans un microtube, de 50 μ L de protoplastes (10⁸ à 10⁹ protoplastes/mL) avec l'ensemble du mélange de ligation, c'est-à-dire approximativement 10 μ L (voir section 3.6.6). 200 μ L d'une solution de PEG 25% sont ajoutés au mélange et après une incubation de 2 minutes à température de la pièce, 85 μ L du mélange de transformation sont étalés sur trois géloses de milieu R5. Ce milieu solide permet la régénération des protoplastes (section 3.4.2.3). Les boîtes de Pétri sont incubées durant 16 heures à 30°C.

Pour sélectionner les transformants, chaque gélose est recouverte de 1,5 mL d'eau stérile contenant 10 μ L d'antibiotique thiostrepton à 50 mg/mL puis est incubée de nouveau à 30°C pendant 7 jours.

3.8 TESTS BIOLOGIQUES

3.8.1 Mesure de l'activité enzymatique

Les clones de *S. lividans* 10-164 obtenus par mutagenèse dirigée sont analysés en milieu liquide pour la production de xylanase. 2×10^6 spores/mL sont inoculées dans un milieu minimal M14 contenant du xylane d'épeautre d'avoine comme unique source de carbone. Des échantillons de 1 mL de culture sont prélevés à intervalles de temps réguliers afin d'évaluer l'activité enzymatique et la courbe de croissance des souches mutantes. Comme la xylanase est une enzyme extracellulaire, c'est à partir du surnageant de culture qu'est déterminée la quantité d'enzyme produite par chaque clone. Le surnageant de culture est incubé en présence de xylane de bouleau. L'hydrolyse de ce substrat libère des sucres réducteurs qui sont ensuite dosés, au moyen de l'acide dinitrosalicylique (DNS), selon la méthode de Miller (1959).

La procédure à suivre pour le test des sucres réducteurs est la suivante : l'échantillon de 1 mL de culture est d'abord centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est recueilli dans un microtube et le mycélium est conservé pour le test de dosage de l'ADN (section 3.8.2). Par ailleurs, une éprouvette contenant 300 µL d'eau, 100 μ L de tampon citrate-phosphate et 500 μ L de xylane de bouleau 1% est pré-incubée dans un bain marie à 60°C pendant 3 minutes. Le tampon citrate-phosphate se compose de 17,22 g de Na₂HPO₄ · 7H₂O et 3,43 g d'acide citrique dissous dans 100 mL d'eau. Le pH est ramené à 6 par l'ajout de l'un ou l'autre des composés solides. 100 µL d'une dilution de surnageant sont additionnés à l'éprouvette et le mélange est incubé à 60°C pendant 10 minutes. 60°C représente la température optimale de la xylanase A de S. lividans. Pour mettre fin à la réaction d'hydrolyse, 1mL de solution de DNS, auquel est ajouté au dernier moment 5 μ L de bisulfite de sodium 10%, est introduit dans l'éprouvette. Le mélange est alors chauffé à 100°C pendant 15 minutes. La solution de DNS (10 g de NaOH, 10 g d'acide dinitrosalicylique, 2 g de phénol, 200 g de potassium tartrate dans un volume de 700 μ L d'eau) réagit avec les sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse du xylane de bouleau, pour former un composé de couleur jaune orangée. Le phénol contenu dans la solution de DNS accentue le niveau de coloration de la réaction tandis que le bisulfite de sodium stabilise la couleur obtenue. L'intensité de la coloration est un indicateur direct de la quantité de xylanase produite dans le milieu. On mesure donc, à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque, l'absorbance de l'échantillon à 540 nm après en avoir déposé 300 µL dans une microplaque de 96 puits.

Pour chaque échantillon testé, un témoin correspondant est établi. Ce témoin mesure la quantité de sucres réducteurs présents dans le surnageant, avant l'incubation de 10 minutes à 60°C. Cette seconde valeur est soustraite de la quantité de sucres réducteurs de l'échantillon. Le témoin est préparé et analysé exactement de la même façon que l'échantillon sauf que les 100 μ L de dilution d'enzyme ne lui sont ajoutés qu'une fois que le DNS a été introduit dans l'éprouvette.

Pour pouvoir convertir la DO à 540 nm de l'échantillon et du témoin en unité internationale (UI) de xylanase produite, une courbe standard est effectuée à l'aide de

concentrations connues de xylose. Une UI correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de sucres réducteurs par minute à 60°C.

3.8.2 Mesure de la croissance du mycélium par dosage de l'ADN total

Le prélèvement de 1 mL de culture, effectué à intervalles de temps réguliers, répond à deux usages particuliers : le surnageant sert au dosage de l'activité xylanolytique tandis que l'analyse du culot révèle le contenu en ADN de la souche testée. Le dosage de l'ADN total des échantillons s'effectue par un test de colorimétrie de l'acide désoxyribonucléique via le réactif diphénylamine (Burton, 1956). L'application de cette méthode est très simple. 1 mL de culture est d'abord centrifugé pendant 5 minutes à 13 000 rpm puis le culot est resuspendu dans 1 mL de SSC 1X froid (préparé à partir d'une solution mère de SSC 20X composée de 175,3 g de NaCl et 88,2 g de citrate de sodium par litre d'eau et ajustée à pH 7). Le tout est transféré dans une éprouvette de 5 mL dans laquelle aura lieu le reste du test. Sont ajoutés successivement 1 mL d'acide perchlorique 20%, 2 mL de diphénylamine 4% dissous dans de l'acide acétique glacial et 200 µL d'acétaldéhyde 0,16%. Un témoin contenant ces mêmes solutions mais exempt d'ADN, est également confectionné. Le mélange et le contrôle sont agités au vortex et incubés une nuit à 30°C sans agitation. Le lendemain, l'absorbance des échantillons est lue à 595 nm et à 700 nm. La différence entre ces deux DO permet d'établir la croissance des souches bactériennes en mesurant le contenu en ADN.

3.9 Préparation des oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans l'expérience de mutagenèse dirigée de Kunkel (section 3.10) ont tous été synthétisés avec le Gene Assembler de Pharmacia LKB. Le tableau 1 présente la séquence complète de ces oligonucléotides.

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés dans les expériences de mutagenèse dirigée sur les peptides signaux de la cellulase A (CelA), de l'acétylxylane estérase (Axe) et de la xylanase A (XlnA) de Streptomyces lividans.

Les séquences d'oligonucléotides présentées sont les séquences anticodantes du gène. Les nucléotides modifiés sont indiqués en caractères gras.

Nom	Séquence
CelA.14	5'- CGC TAT AGG TGC ATT CCC A -3'
CelA.2	5'- T CGT GCG AAG CGG ACA CAA GAA G G T GGG A CT G GC GAT AAA GCC CAT GAC GAC TGT GCC T -3'
CelA.10	5'- CGG ACA CAA CGC GA A CA G A CT G G T CCC AAA GCC CAT -3'
CelA.7	5'- CA CAA CGC GAT GGG A CT A TT T CC AAA GCC CAT GAC T -3'
CelA.8	5'- CA CAA CGC GAT GGG A CT GTT T CC AAA GCC CAT GAC T -3'
CelA.6	5'- A CAA CGC GAT GGG ACC ATT TCC AAA GCC CAT GAC T -3'
CelA.11	5'- CGG ACA CAA CGC GAA CAA CGT GGC GAC AAA GCC CAT -3'
CelA.3	5'- AA CGC GAC GGG AGC GT -3'
CelA.9	5'- CGG ACA CAA CGC GGT GGG CGC GTT CCC AAA GCC C -3'
CelA.4	5'- GAT GGG ACC GTT CCC A -3'
Axe.2	5'- GGA CGC GCG TGG TCC CGT CGA TGT ACG CAT GAC TGT GCC T -3'
XlnA.2	5'- CCT GCG GAC ACC TGA TC G C GG TAT TA C GTA GGA GGC CAT GAC -3'

3.10 LA MUTAGENÈSE DIRIGÉE

La mutagenèse dirigée est une technique qui a profondément marqué les études sur la structure et la fonction des protéines. Outil indispensable en génétique, elle permet de créer à volonté des mutations parfaitement définies, tant en ce qui concerne leur nature que la position qu'elles occupent dans un gène. Depuis la découverte du principe de base en 1978, de nombreuses variantes ont vu le jour. La méthode élaborée par Thomas Kunkel en est une, qui tire ses avantages du fait qu'elle sélectionne l'ADN muté aux dépens de la séquence sauvage (Masson, 1987). De plus, la compagnie Bio-Rad Laboratories Ltd a mis au point une trousse commerciale pratique et simple d'utilisation, qui comprend tous les éléments nécessaires à son application. Ce sera donc la procédure préconisée pour les travaux qui suivent.

La méthode de Kunkel peut être divisée en plusieurs grandes étapes, illustrées à la figure 6. Le plasmide qui contient le gène d'intérêt est d'abord introduit dans la souche CJ236 d'*E. coli*, qui incorpore occasionnellement dans l'ADN, des uraciles à la place des thymines. Cela est dû au fait que la souche CJ236 porte les mutations $dut1^{-}$ et $ung1^{-}$. La mutation dut^{-} affecte le gène codant pour l'enzyme dUTP pyrophosphatase. En temps normal cette enzyme dégrade le dUTP présent dans la cellule. La souche CJ236 étant mutante quant à cette enzyme, il en résulte une accumulation importante du désoxyribonucléotide dans la bactérie. Le dUTP entre alors en compétition avec le dTTP pour son incorporation au niveau de l'ADN. La seconde mutation, ungl, concerne l'uracile-N-glycosylase. Habituellement cette enzyme participe à l'élimination des uraciles contenus dans la molécule d'ADN qui sont remplacés ensuite par des thymines. Par conséquent, dans la souche CJ236 les uraciles ne sont pas enlevés du brin d'ADN (Kunkel et al., 1987). La souche CJ236, abritant maintenant le plasmide double brin uracilé, est par la suite infectée avec un phage auxiliaire qui fournira à la bactérie tous les gènes manquants pour la production d'ADN simple brin. Un oligonucléotide contenant la mutation désirée est alors synthétisé chimiquement puis hybridé à l'ADN simple brin uracilé. L'ADN polymérase effectue l'extension de l'amorce pour produire une nouvelle copie du gène, en se servant de l'ADN simple brin comme matrice et de l'oligonucléotide

Figure 6 : La méthode de mutagenèse dirigée de Kunkel

Le plasmide contenant le gène d'intérêt (représenté par le trait gras) est introduit dans la souche CJ236 d'*E. coli*. À cause de ses mutations *dut*1⁻ et *ung*1⁻, cette souche incorpore occasionnellement dans l'ADN des uraciles (U) à la place des thymines. La souche CJ236 abritant le plasmide double brin uracilé est infectée avec le phage auxiliaire M13K07. Celui-ci fournit à la bactérie les gènes qui lui manquent pour produire de l'ADN simple brin. L'oligonucléotide contenant la mutation désirée (en rouge) est hybridé à l'ADN simple brin. Il y a ensuite synthèse du brin complémentaire (brin en rouge) à partir de l'amorce d'oligonucléotide. La transformation dans la souche MV1190 permet de détruire le brin parental uracilé et de régénérer un second brin contenant également la mutation. Le produit de la réaction de mutagenèse dirigée de Kunkel est un plasmide bicaténaire contenant la mutation sur les deux brins.

Tiré et adapté du protocole de Bio-Rad Laboratories Ltd.



Transformation de la souche CJ236

Infection par le phage auxiliaire M13K07

Hybridation de l'oligonucléotide contenant la mutation

Synthèse du brin complémentaire

Transformation de la souche MV1190

comme amorce. Le plasmide résultant est finalement introduit dans une souche normale d'*E. coli* qui, étant $ung1^+$ contrairement à la souche d'*E. coli* CJ236, inactive et détruit le brin parental contenant des uraciles pour régénérer un second brin qui contiendra la mutation. Le produit de la réaction de mutagenèse dirigée est donc un plasmide bicaténaire qui porte la mutation sur les deux brins (Kunkel *et al.*, 1987).

3.10.1 Préparation d'ADN simple brin contenant des uraciles

Cette première étape vise à produire de l'ADN uracilé simple brin. Pour ce faire, la souche d'E. coli CJ236 doit d'abord être transformée avec le phagemide porteur du gène d'intérêt. Un transformant sert ensuite à inoculer une pré-culture constituée de 2 mL de milieu 2xTY additionné d'ampicilline (100 µg/mL) et de chloramphénicol (15 µg/mL). L'ajout d'ampicilline est justifié par le fait que c'est le marqueur de sélection du phagemide. Quant au chloramphénicol, il est requis pour la co-infection de la souche CJ236 avec le phage auxiliaire M13K07. L'infection par le phage implique en effet que la bactérie soit munie d'un pilus sexuel. Or le plasmide F', qui détient l'information codant pour le pilus, est également porteur du gène de résistance au chloramphénicol. Il est donc possible, par l'ajout de ce deuxième antibiotique, d'exercer une pression sélective sur le plasmide F' (Kunkel et al., 1991). Une fois le milieu complété, la préculture est incubée pendant 16 heures à 37°C sous agitation de 240 rpm. 500 µL de préculture sont prélevés pour inoculer 10 mL de milieu frais 2xTY contenant de l'ampicilline, du chloramphénicol mais aussi du glucose 0,5%, afin d'accélérer la croissance de la souche CJ236. Cette nouvelle culture est incubée à 37°C sous agitation, jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO₆₀₀ d'environ 0,5. Les bactéries sont alors infectées avec 10 µL de phage auxiliaire M13K07 (1.38 x 10¹¹ pfu/mL). On préconise l'emploi du phage M13K07 plutôt que celui du phage M13, dont il est issu, afin d'éviter le phénomène d'interférence. Le problème d'interférence se pose lorsque les origines de réplication du phage et du phagemide sont identiques. Comme c'est le cas entre le phage M13 et les phagemides utilisés dans cette étude, l'origine de réplication du phage M13, initialement constituée des domaines A et B, a été légèrement modifiée pour générer le

phage M13K07. Les deux domaines ont été séparés pour y introduire l'origine de réplication p15A de même que le gène de résistance à la kanamycine. L'origine de réplication p15A du phage M13K07 permet de contourner le problème d'interférence tandis que le gène de résistance à la kanamycine facilite la sélection des cellules infectées (Vieira et Messing, 1987). Le phage auxiliaire M13K07 fournit donc les gènes manquants au phagemide pour que celui-ci complète sa réplication et produise de l'ADN simple brin. Ainsi, l'ADN du phagemide est encapsidé aux dépens du phage M13K07. L'ajout du phage à la culture nécessite une incubation d'une heure pour permettre l'infection des cellules.

Enfin, la culture est transvasée dans un flacon erlenmeyer comprenant 40 mL d'un milieu frais de composition identique à celui décrit précédemment, mais contenant en plus de la kanamycine (70 μ g/mL) et de l'uridine (0,25 μ g/mL). La kanamycine n'est introduite qu'à cette étape afin de permettre à la bactérie l'expression phénotypique du gène de résistance. En ce qui a trait à l'uridine, on l'ajoute afin d'en augmenter la concentration dans la cellule. Cette dernière culture est incubée toute une nuit sous agitation à 37°C (Kunkel *et al.*, 1991). Le phagemide simple brin contenant des uraciles devrait se retrouver dans le surnageant, emballé dans la capside fournie par le phage auxiliaire.

3.10.2 Isolement de l'ADN simple brin contenant des uraciles

L'ADN simple brin uracilé, produit à l'étape précédente, est contenu à l'intérieur des capsides de phages. La culture est centrifugée pendant 10 minutes à 10 000 rpm (centrifugeuse Sorvall RC-5B, rotor SA600) pour éliminer les cellules. 20 mL de surnageant contenant les phages sont transférés dans un tube Corex de 30 mL. Y sont ajoutés, goutte à goutte, 5 mL d'une solution à 20 % de PEG 6000 et de NaCl 2,5 M. La solution de PEG-NaCl a pour rôle de précipiter les protéines et les acides nucléiques de phages. Le mélange est incubé 60 minutes sur la glace puis centrifugé à 8000 rpm pendant 20 minutes (centrifugeuse Sorvall RC-5B, rotor SS600). Le surnageant est

.

décanté et le culot de particules phagiques resuspendu dans 400 μ L d'une solution de Tris-HCl 10 mM contenant 5 mM de MgCl₂, 125 μ g/mL de DNAse I et 25 μ g/mL de RNAse A. Puis le tout est incubé 30 minutes à 37°C. Les enzymes DNase I et RNase A éliminent respectivement l'ADN et l'ARN contaminants et nécessitent la présence de MgCl₂ pour fonctionner adéquatement. Seul l'ADN simple brin contenu à l'intérieur des phages n'est pas soumis à l'action de la DNAse I puisque la capside qui l'entoure le protège contre l'attaque de l'enzyme. La réaction est arrêtée par l'ajout de 80 μ L d'une solution d'EDTA 50 mM, acétate de sodium 1,5 M à pH 7,0. L'EDTA est un agent dit chélateur, c'est-à-dire qu'il se lie aux ions Mg²⁺ et empêche par le fait même la DNAse I et la RNAse A de poursuivre leur travail. L'action subséquente de l'acétate de sodium précipite les phages (Kunkel *et al.*, 1991).

L'ADN simple brin est extrait des phages par la méthode du phénol : chloroforme : alcool isoamylique (dans des proportions de 50 : 48 : 2). Les protéines, et par conséquent les capsides de phages, sont emprisonnées dans la phase phénolique tandis que la phase supérieure aqueuse conserve l'ADN simple brin. Celui-ci est précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol 95 % puis est incubé 10 minutes à -80°C. Le simple brin est récupéré par une centrifugation de 20 minutes à 13 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 30 μ L d'eau stérile et la concentration d'ADN simple brin obtenu est calculée par mesure de la densité optique selon l'équation de Sambrook *et al.* (1989) :

$$[pmol/\mu L] = \frac{120 \times (DO_{260} \times facteur \ de \ dilution)}{nombre \ de \ nt \ du \ phagemide}$$

3.10.3 Phosphorylation de l'oligonucléotide

La phosphorylation de l'oligonucléotide rajoute un groupement phosphate à l'extrémité 5' de l'amorce, ce qui permet à la ligase de circulariser le plasmide à la fin de l'étape de synthèse du brin complémentaire. La réaction de phosphorylation s'effectue

dans un volume total de 10 μ L contenant 10 pmol d'oligonucléotide, 10 unités de polynucléotide kinase du phage T4, 1 mM d'ATP et 1 μ L de tampon One-Phor-All *Plus* 10X. Le volume est ajusté à 10 μ L. La réaction est incubée pendant 30 minutes à 37°C puis est arrêtée en incubant le mélange dans un bain à 65°C durant 10 minutes afin d'inactiver l'enzyme polynucléotide kinase.

3.10.4 Hybridation de l'oligonucléotide avec l'ADN simple brin

L'oligonucléotide phosphorylé contenant la mutation désirée est alors hybridé à la copie d'ADN simple brin obtenue précédemment. Le mélange d'hybridation contient 1 μ L d'ADN simple brin de concentration 0,1 pmol/ μ L, 1 μ L d'oligonucléotide phosphorylé (1 pmol/ μ L), 7 μ L d'H₂O et 1 μ L de tampon d'hybridation 10 X (200 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 20 mM MgCl₂ ; 500 mM NaCl). Le mélange est chauffé à 80°C pendant 5 minutes pour éliminer les structures secondaires de l'ADN. Pour l'hybridation, le mélange est ensuite refroidi lentement jusqu'à 30°C (ce qui prend environ 90 minutes).

3.10.5 Synthèse du brin complémentaire

La synthèse du brin complémentaire s'effectue comme suit : aux 10 μ L de la réaction d'hybridation est ajouté 1 μ L de tampon de synthèse 10X (comprenant l'ensemble des dNTP (5 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 mM d'ATP, 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 50 mM de MgCl₂ et 20 mM de dithiothréitol (DTT)) et 1 μ L d'ADN polymérase du phage T7 (0,5 unité). Le nouveau brin d'ADN synthétisé sera complémentaire à la matrice, sauf en ce q i concerne la mutation introduite au niveau de l'amorce d'oligonucléotide. De plus, cette nouvelle copie d'ADN sera exempte d'uracile puisque le mélange de synthèse lui-même ne contient pas de dUTP. Finalement, 1 μ L d'ADN ligase du phage T4 est ajoutée (3 unités). Comme l'extrémité 5' de l'oligonucléotide a été phosphorylée, l'ADN ligase sera en mesure de circulariser le nouveau brin d'ADN. Le mélange de synthèse est incubé d'abord à 4°C pendant 5
minutes, puis à température de la pièce durant 5 minutes additionnelles. Ce changement de température permet de stabiliser l'hétéroduplexe formé par l'amorce d'oligonucléotide et la matrice d'ADN simple brin. Ensuite, une incubation de 90 minutes à 37°C a lieu pour permettre la synthèse d'ADN ainsi que la ligation (Kunkel *et al.*, 1991). Cette étape résulte en une molécule d'ADN bicaténaire dont le brin parental est uracilé mais pas le brin fille. Le mélange de réaction de synthèse est ensuite utilisé pour transformer les cellules compétentes d'*E. coli* MV1190 (section 3.7.1)

3.10.6 Détection des mutants par hybridation

L'ADN plasmidique des clones issus de la mutagenèse dirigée doit être isolé afin d'identifier, parmi tous les transformants, ceux qui sont porteurs de la mutation désirée. Le criblage des mutants s'effectue en repiquant au hasard quelques colonies à partir du plat de Pétri de transformation dans des microtubes contenant 200 μ L de milieu TBampicilline. L'ADN des plasmides est ensuite extrait suivant la méthode décrite à la section 3.6.1.

Les plasmides isolés sont dénaturés à l'aide d'une solution alcaline. 1 μ L d'ADN est traité avec 1 μ L d'une solution de NaOH 800 mM et EDTA 20 mM. Le mélange est incubé pendant 10 minutes à température de la pièce avant d'être déposé sur une membrane de nitrocellulose. Après un court délai de séchage, la membrane est cuite pendant 2 heures sous vide, dans un four à 80°C afin de fixer l'ADN.

Les plasmides contenant la mutation seront identifiés au moyen d'une sonde marquée à la radioactivité. C'est l'oligonucléotide ayant servi à la mutagenèse qui fait fonction de sonde. Il est marqué au ³²P de la manière suivante : 1 μ L d'oligonucléotide de concentration 10 pmol/ μ L est mis en présence de 5 μ L de tampon One-Phor-All *Plus* 10X, 0,5 μ L de polynucléotide kinase du phage T4 (10 unités), 10 μ L de [γ -³²P] ATP (4500 Ci/mmol) et 33,5 μ L d'eau. La réaction se déroule à 37°C pendant une heure.

Avant que la sonde marquée au ³²P ne soit mise en contact avec l'ADN fixé sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci doit être incubée durant une heure à 42°C dans le tampon de pré-hybridation. La membrane de nitrocellulose est donc introduite dans un tube Falcon puis submergée d'une solution de SSC 6X, NaH₂PO₄ · 7H₂O 50 mM à pH 7, SDS 0,1%, 100 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé et Denhardt 5X (0,1% d'albumine sérique de bœuf, 0,1% de polyvinylpyrrolidone, 0,1% de Ficoll type 400). La sonde marquée au [y-³²P] ATP est ajoutée au tampon de pré-hybridation et le mélange est incubé toute la nuit à 42°C. Le lendemain, la membrane est lavée à trois reprises dans une solution de SSC 6X et SDS 0,1%. Ces lavages s'effectuent à température de la pièce et durent chacun 20 minutes. La membrane est alors trempée pendant 20 minutes dans une solution de chlorure de tétraméthyl d'ammonium (Me₄NCl) 3M, Tris-HCl 50 mM à pH 8, EDTA 2 mM et SDS 0,1%. C'est la longueur de l'oligonucléotide, indépendamment de sa composition en bases, qui détermine la température de lavage au Me₄NCl. En effet, ce lavage est effectué à -3°C de la température de dénaturation, elle-même fonction du nombre de nt de l'oligonucléotide. Le tableau 2 indique la température de dénaturation en fonction de la longueur de l'oligonucléotide utilisé pour l'hybridation. Le lavage au Me4NCl est répété une seconde fois puis la membrane de nitrocellulose est exposée sur un film pendant 5 à 16 heures (Wood, 1985).

Longueur de l'oligonucléotide (en nt)	Température de dénaturation dans le chlorure de tétraméthyl d'ammonium (en °C)				
11	45				
13	47				
15	50				
16	54				
18	58				
27	71				
31	75				
36	77				
46	83				
75	87				
78	. 88				
91	89				
105	89				

Tableau 2: Température de dénaturation des oligonucléotides dans le chlorure de tétraméthyl d'ammonium en fonction de leur longueur en nucléotides.

Le lavage de l'oligonucléotide dans le Me_4NCl est effectué à -3°C de la température de dénaturation.

4. RÉSULTATS

4.1 EXISTENCE DE LA DB

L'expérience de Pagé et ses collaborateurs, au sujet de l'effet du remplacement des ps sur la production de xylanase par S. lividans, a suscité plusieurs interrogations. Dans leur étude, le ps situé en amont du gène rapporteur de la xylanase A (XlnA) a été substitué par le ps long de la cellulase A (CelA). Ce dernier a été dénommé ainsi car en amont de la séquence 5' du ps sauvage de la CelA, il est possible de retrouver un deuxième codon d'initiation de la traduction, en phase avec l'autre et précédé d'une séquence SD plus ou moins définie. Celle-ci a été remplacée par un vrai RBS. La construction de Pagé et al., illustrée à la figure 7, comprend donc le promoteur de la XlnA, deux codons d'initiation de la traduction (ATG), précédés chacun d'une SD, et le ps de la CelA. Lorsque cette nouvelle construction fut insérée dans un vecteur à copies multiples et introduite dans S. lividans, elle généra une quantité de protéine trois fois plus importante que la souche contrôle hébergeant le ps sauvage de la XlnA, alors qu'on s'attendait seulement à ce qu'elle double la production de xylanase, comme ce fut le cas avec la construction contenant le ps long de la mannanase A (ManA) (voir figure 5). Il existe donc dans le ps long de la CelA, en amont du deuxième codon d'initiation de la traduction, des éléments qui stimulent la production de xylanase.

4.2 ALIGNEMENT DE SÉQUENCES DES PS AVEC L'ARNR 16S DE STREPTOMYCES LIVIDANS

Une séquence, appelée « downstream box » (ou DB), complémentaire à l'ARNr 16S et qui stimule le processus d'initiation de la traduction a été mise en évidence dans certains ARNm d'*E. coli* (Sprengart *et al.*, 1996 ; Nagai *et al.*, 1991 ; Faxén *et al.*, 1991 ; Ito *et al.*, 1993 ; Shean et Gottesman, 1992). Pour satisfaire les objectifs de la présente étude, quant à savoir si l'élément additionnel figurant dans le ps long de la CelA est bel et bien une DB, un alignement de séquences de ce ps avec l'ARNr 16S de *S. lividans* a été effectué. Comme l'illustre la figure 8, cet alignement de séquences a permis d'identifier une DB probable constituée de 5 nt (TCCCA) complémentaires à l'ARNr 16S (entre les nt 1461 et 1465) et située à 18 nt du premier codon d'initiation de la traduction.

- Figure 7 : Schéma illustrant le remplacement du peptide signal de la xylanase (XlnA) par le peptide signal long de la cellulase A (CelA) de *Streptomyces lividans*
- A) Organisation du gène de la XlnA. La boîte grise représente le gène de la XlnA. Le gène de la XlnA est précédé du ps de la XlnA et du codon d'initiation de la traduction, ATG. En amont de ce dernier on retrouve la séquence Shine-Dalgarno (SD; représentée par la boîte jaune) et le promoteur de la XlnA (*PxlnA*).
- B) Organisation du gène de la CelA. La boîte verte représente le gène de la CelA. Le gène de la CelA est précédé du ps de la CelA et du codon d'initiation de la traduction, TTG. En amont de ce dernier on retrouve la séquence SD (représentée par la boîte jaune) et une séquence additionnelle qui comprend une DB (représentée par la boîte bleue), une séquence répétée (identifiée par les flèches rouges), un autre codon d'initiation de la traduction (ATG) lui-même précédé d'une SD (boîte jaune). *PcelA* représente le promoteur de la CelA.
- C) Construction de Pagé *et al.* (1996) après remplacement du ps de la XlnA par le ps long de la CelA. La boîte grise représente le gène de la XlnA. Le gène de la XlnA est précédé du ps de la CelA et du codon d'initiation de la traduction ATG (le TTG initialement présent dans le ps de la CelA a été muté par un ATG). En amont de ce dernier on retrouve la séquence SD (représentée par la boîte jaune) et une séquence additionnelle qui comprend la DB (représentée par la boîte bleue), la séquence répétée (identifiée par les flèches rouges), l'autre codon d'initiation de la traduction (ATG) lui-même précédé d'une SD (boîte jaune). La construction comprend également le promoteur de la XlnA (*PxlnA*).



D'autre part, le ps long de la CelA contient un palindrome (5'-TGGGAacgc<u>TCCCA</u>) dont la séquence 3' renferme la DB (soulignée dans la séquence palindromique). Ce palindrome, propre au gène de la CelA, semble être le site d'attachement de protéines régulatrices (Walter et Shrempf, 1996).

Afin de vérifier si la complémentarité ARNm-ARNr 16S est un phénomène commun aux ps de la bactérie, les ps de l'acétyl-xylane estérase (Axe), de la XlnA, de la XlnB et de la mannanase A (ManA) de *S. lividans* ont été soumis au même examen de séquences. Une complémentarité a effectivement été trouvée dans chacun de ces cas. La complémentarité de la DB du ps de l'Axe avec l'ARNr 16S est constituée de 7 nt consécutifs avec une interruption de 1 nt (CCAGTaCC) et est située à 8 nt en aval du codon d'initiation de la traduction. Quant à la DB du ps de la XlnA (CGCCctTCCCA), elle est localisée à 12 nt du codon d'initiation de la traduction et semble être divisée en deux régions séparées par 2 nt : la première région est complémentaire à l'ARNr 16S par 4 nt consécutifs et la seconde par 5 nt (figure 8). Les deux autres ps n'ont pas fait l'objet d'une étude plus poussée.

Les caractéristiques de la DB, telles sa séquence et la distance qui la sépare du codon d'initiation de la traduction, diffèrent pour les trois ps examinés chez *S. lividans*. Ainsi, la DB du ps long de la CelA est localisée à 18 nt du premier codon d'initiation de la traduction, celle du ps de l'Axe, à 8 nt et la DB du ps de la XlnA, à 12 nt. L'analyse des séquences des ps de la CelA, de l'Axe et de la XlnA révèle toutefois un profil commun : malgré qu'elle n'implique pas nécessairement les mêmes nt, la complémentarité entre l'ARNr 16S et les différents ps se retrouve toujours dans la région de l'ARNr comprise entre les nt 1456 et 1473.

4.3 MUTAGENÈSE DE LA DB CONTENUE DANS LES PS DE LA CELLULASE A (CELA), L'ACÉTYL-XYLANE ESTÉRASE (AXE) ET LA XYLANASE A (XLNA)

Le rôle de la DB contenue dans les ps de la CelA, de l'Axe et de la XlnA de S. *lividans* a été analysé par mutagenèse dirigée au moyen de la méthode de Kunkel (section

Figure 8 : Alignement des séquences des peptides signaux de la cellulase A (CelA), de l'acétyl-xylane estérase (Axe) et de la xylanase A (XlnA) avec l'ARNr 16S de Streptomyces lividans

- A) Alignement de séquences du ps long de la CelA avec l'ARNr 16S de S. lividans. Une « downstream box » (ou DB ; représentée par la boîte bleue) probable de 5 nt (TCCCA) complémentaires aux nt 1461 à 1465 de l'ARNr 16S a été identifiée dans le ps long de la CelA. Elle est localisée 18 nt en aval du codon d'initiation de la traduction (AUG). Le ps de la CelA contient également une séquence répétée inverse (TGGGAacgcTCCCA), identifiée par les flèches rouges.
- B) Alignement de séquences du ps de l'Axe avec l'ARNr 16S de S. lividans. Une DB (représentée par la boîte bleue) probable de 8 nt (CCAGTaCC) complémentaires aux nt 1462 à 1469 de l'ARNr 16S a été identifiée dans le ps de l'Axe. Elle est localisée 8 nt en aval du codon d'initiation de la traduction (AUG).
- C) Alignement de séquences du ps de la XlnA avec l'ARNr 16S de S. lividans. Une DB (représentée par la boîte bleue) probable (CGCCctTCCCA) a été identifiée dans le ps de la XlnA. Elle semble divisée en deux régions séparées par 2 nt : une première région complémentaire à l'ARNr 16S par 4 nt et une deuxième région complémentaire à l'ARNr 16S par 5 nt consécutifs. La DB du ps de la XlnA est localisée 12 nt en aval du codon d'initiation de la traduction (AUG).







3.10). Le phagemide utilisé pour l'étude de la DB du ps de la CelA était le pTZ19U dans lequel fut inséré un fragment HindIII-SacI de 1,2 kb comprenant le ps long de la CelA et le gène de structure de la XInA tronqué, qui ne code que pour le domaine catalytique de l'enzyme. Pour l'analyse de la DB du ps de l'Axe, le ps originel de la xylanase fut remplacé par celui de l'Axe. Après mutagenèse, les clones furent sélectionnés par hybridation avec l'oligonucléotide contenant la mutation. Les clones furent ensuite séquencés afin de s'assurer de la présence effective de la mutation et de vérifier si d'autres mutations indésirables n'auraient pas été introduites dans la construction. Le fragment HindIII-SacI contenant la mutation a ensuite été cloné dans le plasmide pIAF 906 se répliquant chez S. lividans. Ce vecteur est dérivé du plasmide à copies multiples pIJ702, dans lequel le gène de la XInA a été introduit. Les plasmides résultants ont alors servi à transformer les protoplastes de la souche hôte 10-164 de S. lividans, qui est xylanase et cellulase négative. Afin de distinguer les clones producteurs de xylanase, une première ronde de sélection a été effectuée sur le milieu solide RBB-xylane. Au bout de 24 h d'incubation à 30°C, au moins 40% des clones exhibaient une zone d'éclaircissement, révélatrice de la production de xylanase, sur cette gélose de coloration bleue. Pour permettre les études subséquentes en milieu liquide, des spores de chaque mutant ont été préparées sur milieu riche Bennett-thiostrepton. L'utilisation des spores s'est avérée nécessaire pour standardiser les inoculums.

4.4 MESURE DE L'ACTIVITÉ XYLANOLYTIQUE DANS LE SURNAGEANT DE CULTURE DES CLONES

L'activité xylanolytique des différents mutants générés au cours de cette étude a été mesurée à partir des surnageants de culture en milieu minimal M14-xylane. Ce milieu a été choisi parce qu'il contient aucun élément qui pourrait éventuellement affecter la production de xylanase. Puisque le glucose est reconnu comme étant un répresseur catabolique des gènes de xylanase, on lui a préféré le xylane d'épeautre d'avoine comme source de carbone. Pour pouvoir comparer la production de xylanase de chacun des clones, les milieux de culture ont tous été inoculés avec la même quantité de spores, soit 2 x 10^6 spores/mL. De plus, avant d'être introduites dans le milieu, les spores ont été

soigneusement lavées afin de les débarrasser du glycérol qui a servi à leur conservation. Ce substrat pourrait agir en tant que source de carbone additionnelle et influencer par le fait même la production de xylanase. Les cultures ont été incubées durant 144 heures à 34°C et des échantillons de 1 mL en ont été prélevés à intervalles de temps réguliers pour permettre d'effectuer les tests d'activité enzymatique et de mesurer la croissance des clones.

La production de xylanase de chaque clone a été évaluée grâce à la méthode des sucres réducteurs, telle que décrite à la section 3.8.1. Le graphique 9 illustre la quantité de xylanase sécrétée dans le surnageant de culture par chacun des clones en fonction du temps. L'allure générale des différentes courbes d'activité se ressemble un peu et correspond assez bien aux étapes de croissance des souches. Pendant les 48 premières heures, la production d'enzyme est minimale, ce qui est probablement dû au temps de germination des spores. Cette courte période est suivie d'une augmentation exponentielle du niveau de production d'enzyme. La phase logarithmique dure généralement jusqu'à 96 ou 120 h. Après quoi, le niveau de xylanase semble se stabiliser, voire même diminuer légèrement, à 144 h. Les trois phases sont difficiles à distinguer chez les clones qui produisent moins de xylanase, comme les mutants IAF 911-A.14, IAF 911-A.2, IAF 914.2, IAF 907.2 ainsi que le clone IAF 906.

4.5 MESURE DE LA CROISSANCE DU MYCÉLIUM EN MILIEU LIQUIDE

Comme le développement des streptomycètes passe par la formation de mycélium, il était absolument inconcevable de mesurer la croissance des souches en prenant la densité optique des cultures. La croissance du mycélium aurait pu être évaluée par le dosage des protéines totales mais cette méthode requiert une étape embarrassante de cassage des cellules aux ultrasons. Nous avons plutôt opté pour le dosage de l'ADN total à la diphénylamine (section 3.8.2). Le test de dosage de l'ADN permet de s'assurer que les différences observées au niveau de la production de xylanase des souches ne sont pas dues à des variations de la croissance des clones mais bien à l'effet des mutations qui y ont été introduites. Le contenu en ADN de chaque clone fut évalué à 24 h, 48 h, 72 h,

Figure 9 : Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des différents clones, au cours du temps

La culture des clones a été effectuée à 34°C, en milieu minimal M14-xylane. L'activité xylanolytique (— —) présente dans le surnageant de culture de chaque clone a été évaluée grâce à la méthode des sucres réducteurs. Elle est exprimée en unité internationale par millilitre (UI/mL). La croissance du mycélium (—) a été estimée par le dosage de l'ADN total à la diphénylamine et est exprimée par la différence entre la densité optique à 595 nm et la densité optique à 700 nm (DO₅₉₅ - DO₇₀₀).





96 h, 120 h et 144 h. Les courbes de croissance des différents clones en fonction du temps de culture sont aussi présentées à la figure 9. On note que les courbes de croissance se divisent en trois phases distinctes : une phase de latence durant laquelle les spores s'adaptent à leur nouvel environnement, une phase de croissance exponentielle et une phase stationnaire. La phase de latence se poursuit généralement jusqu'à 48 h tandis que la phase exponentielle prend fin, selon le cas, entre 72 et 96 h. Les cellules entrent alors en phase stationnaire aux alentours de 120 h de culture. À 144 h, elles ont toutes arrêté de croître. C'est donc à ce temps là que la production de xylanase des différentes souches fut comparée. Une autre observation découle de l'analyse des courbes de croissance de la figure 9 : les clones qui produisent le plus de xylanase semblent aussi être ceux dont la croissance est la plus faible. Cela serait dû au fait que le métabolisme de ces clones est davantage orienté vers la production de xylanase et que les cellules disposent alors de moins d'énergie pour leur croissance en milieu minimal.

4.6 EFFET DES MUTATIONS DE LA DB SUR LA PRODUCTION DE XYLANASE

Les propriétés de chacun des clones engendrés par mutagenèse dirigée sont présentées aux tableaux 3, 4, 5 et 6. Ces tableaux reflètent également la production de xylanase des différents clones au temps 144 h puisque c'est à ce moment que la croissance des souches atteint sa phase stationnaire (voir courbe de croissance). Les résultats d'activité enzymatique sont exprimés en UI/mL afin de faciliter leur comparaison avec les résultats obtenus antérieurement dans l'expérience de Pagé *et al.* (1996) sur le remplacement du ps de la xylanase A de *S. lividans* (voir figure 5). D'après l'activité spécifique de la xylanase, qui est de 400 UI/mg, 100 UI/mL correspondraient à 250 mg de xylanase par litre, ce qui donne une idée de la production obtenue par chaque clone, en termes de quantité de protéine.

4.6.1.1 Souche contrôle

Tous les mutants du ps long de la CelA seront comparés à la souche contrôle IAF 911-A. Ce clone de référence possède une DB de 5 nt, localisée à 18 nt en aval du codon de départ de la synthèse protéique. De plus, le palindrome du ps de la souche contrôle IAF 911-A est constitué d'une séquence répétée inversée longue de 5 nt. La DB est contenue dans la séquence 3' du palindrome (figure 8). La souche contrôle IAF 911-A possède une activité xylanolytique de 491 UI/mL, soit quatre fois plus importante que celle de IAF 906, qui contient le ps sauvage de la XlnA (tableau 3).

4.6.1.2 Abolition de la DB et de la séquence palindromique

Il était primordial, au départ, de s'assurer que la forte production de xylanase obtenue avec la souche contrôle IAF 911-A était attribuable à la DB et/ou au palindrome contenus dans le ps long de la CelA. C'est pourquoi, d'entrée de jeu, ces séquences ont toutes deux été éliminées du ps long de la CelA, donnant naissance au mutant IAF 911-A.14 (tableau 3). L'abolition de ces éléments a entraîné une diminution de 75% de la synthèse de xylanase, indiquant qu'ils jouent effectivement un rôle influent dans la stimulation du processus de traduction.

4.6.1.3 Augmentation de la complémentarité entre la DB et l'ARNr 16S

L'emphase fut ensuite dirigée sur la DB du ps long de la CelA, laissant de côté pour l'instant la séquence palindromique. Le rôle de la DB fut analysé en allongeant la complémentarité de celle-ci avec l'ADB de l'ARNr 16S et en éliminant la séquence palindromique. Le ps long de la CelA renferme déjà, en lui-même, une DB de 5 nt. Une complémentarité plus grande entre la DB et l'ARNr 16S pourrait peut-être stimuler encore davantage la production de xylanase. C'est pour confirmer ou infirmer cette

Tableau 3 : Effet de l'abolition de la «downstream box» des peptides
signaux de la cellulase A (CelA), de l'acétyl-xylane estérase
(Axe) et de la xylanase A (XlnA), sur la production de xylanase
par Streptomyces lividans

Seule la séquence nucléotidique située en aval du premier codon d'initiation de la traduction est illustrée. Les aa correspondants sont identifiés, entre parenthèses, au-dessus de la séquence nucléotidique. Les mutations ont été introduites au moyen de la méthode de Kunkel. Elles sont indiquées par des caractères gras, dans la séquence nucléotidique et en vert, dans la séquence en aa. La « downstream box » est représentée par une boîte bleue et la séquence répétée du ps long de la CelA est indiquée par les flèches rouges. L'activité xylanolytique libérée dans le surnageant de culture de chacun des clones, au temps 144 h, est exprimée en unité internationale par millilitre (UI/mL).

Souche	Séquence	Palindrome	DB	Distance entre la DB et l'ATG	Production XlnA à 144 h (en UI/mL)
IAF 911-A	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGG AAC GC <mark>T CCC A</mark> TC GCG .	. 5 nt	5 nt	18 nt	491
IAF 911-A.14	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGG AAT GCA CCT ATA GCG			_	124
IAF 914	(M) (R) (T) (S) (T) (G) (P) (R) (A) ATG CGT ACC AGT ACC GGA CCA CGC GCG		8 nt	8 nt	183
IAF 914.2	(M) (R) (T) (S) (T) (G) (P) (R) (A) ATG CGT AC A TCG AC G GGA CCA CGC GCG	—	_	_	43
IAF 906	(M) (A) (S) (Y) (A) (L) (P) (R) (S) ATG GCC TCC TA <mark>C GCC</mark> CT <mark>T CCC A</mark> GA TCA	. —	9 nt	12 nt	114
IAF 907.2	(M) (A) (S) (Y) (V) (I) (P) (R) (S) ATG GCC TCC TAC GTA ATA CCG CGA TCA	—			148

hypothèse que le mutant IAF 911-A.2, contenant une DB de 17 nt, fut construit (tableau 4). Le mutant IAF 911-A.2 ne produit que 8% de xylanase par rapport à la souche contrôle IAF 911-A, ce qui indique qu'une complémentarité de 17 nt est peut être trop longue et restreint la production de xylanase.

4.6.1.4 Variation de la longueur de la DB

À la lumière des résultats obtenus avec le clone IAF 911-A.2, il devenait intéressant de déterminer la longueur maximale que doit posséder la DB du ps long de la CelA pour optimiser la production de xylanase. Les mutants IAF 911-A.10, IAF 911-A.7 et IAF 911-A.8 qui possèdent des DB de 6, 7 et 8 nt, furent justement construits pour répondre à cette question (tableau 4). Ils produisent respectivement 1,6 fois, 1,8 fois et 1,9 fois la quantité de xylanase de la souche contrôle. Avec sa production qui atteint 1,9 fois celle de la souche contrôle, IAF 911-A.8 représente donc notre meilleur mutant (tableau 4). On en conclut que la longueur optimale de la DB du ps long de la CelA est de 8 nt.

4.6.1.5 Variation de la distance entre la DB et le premier codon d'initiation de la traduction

Nous avons voulu, tout comme l'équipe de Sprengart, évaluer l'effet du déplacement de la DB, par rapport au premier codon d'initiation de la traduction, sur la production de xylanase. Il fallait pour ce faire comparer des clones semblables, c'est-àdire dont le seul paramètre variable était la distance séparant la DB du premier codon d'initiation de la traduction. Les mutants qui ont servi à cette partie de l'étude étaient donc tous dotés d'une DB de 6 nt mais dépourvus de palindrome. Ils ont été comparés au mutant IAF 911-A.10, qui possède lui aussi ces deux mêmes caractéristiques et dont la DB est localisée à 14 nt du codon d'initiation de la traduction (tableau 5). Dans le clone IAF 911-A.6, la DB a été déplacée à 17 nt (tableau 5). Au contraire, chez le mutant IAF 911-A.11, la DB a été rapprochée à 11 nt. Ces mutations ont permis d'établir la position optimale de la DB du ps long de la CeIA, relativement au premier codon d'initiation de la

Tableau 4 : Effet de la variation de la longueur de la « downstream box » dupeptide signal long de la cellulase A (CelA), sur la production dexylanase par Streptomyces lividans

Seule la séquence nucléotidique située en aval du premier codon d'initiation de la traduction est illustrée. Les aa correspondants sont identifiés, entre parenthèses, au-dessus de la séquence nucléotidique. Les mutations ont été introduites au moyen de la méthode de Kunkel. Elles sont indiquées par des caractères gras, dans la séquence nucléotidique et en vert, dans la séquence en aa. La « downstream box » est représentée par une boîte bleue et la séquence répétée du ps long de la CelA est indiquée par les flèches rouges. L'activité xylanolytique libérée dans le surnageant de culture de chacun des clones, au temps 144 h, est exprimée en unité internationale par millilitre (UI/mL).

Souche	Séquence	Palindrome	DB	Distance entre la DB et l'ATG	Production XlnA à 144 h (en UI/mL)
IAF 911-A	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGG AAC GC <mark>T CCC A</mark> TC GCG	5 nt	5 nt	18 nt	491
IAF 911-A.2	(M) (G) (F) (I) (A) (S) (P) (T) (F) ATG GGC TTT ATC GCC AGT CCC ACC TTC .		17 nt	11 nt	43
IAF 911-A.10	(M) (G) (F) (G) (T) (S) (L) (F) (A) ATG GGC TTT GGG A <mark>CC AGT C</mark> TG TTC GCG	_	6 nt	14 nt	803
IAF 911-A.7	(M) (G) (F) (G) (N) (S) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGA AAT AGT CCC ATC GCG		7 nt	16 nt	886
IAF 911-A.8	(M) (G) (F) (G) (N) (S) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGA AA <mark>C AGT CCC A</mark> TC GCG		8 nt	15 nt	928

Tableau 5 : Effet de la variation de la distance entre la « downstream box »du peptide signal long de la cellulase A (CelA) et le premiercodon d'initiation de la traduction, sur la production de xylanasepar Streptomyces lividans

Seule la séquence nucléotidique située en aval du premier codon d'initiation de la traduction est illustrée. Les aa correspondants sont identifiés, entre parenthèses, au-dessus de la séquence nucléotidique. Les mutations ont été introduites au moyen de la méthode de Kunkel. Elles sont indiquées par des caractères gras, dans la séquence nucléotidique et en vert, dans la séquence en aa. La « downstream box » est représentée par une boîte bleue et la séquence répétée du ps long de la CelA est indiquée par les flèches rouges. L'activité xylanolytique libérée dans le surnageant de culture de chacun des clones, au temps 144 h, est exprimée en unité internationale par millilitre (UI/mL).

Souche	Séquence	Palindrome	DB	Distance entre la DB et l'ATG	Production XlnA à 144 h (en UI/mL)
IAF 911-A	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (I) (A ATG GGC TTT GGG AAC GC <mark>T CCC A</mark> TC GC) G 5 nt	5 nt	18 nt	491
IAF 911-A.10	(M) (G) (F) (G) (T) (S) (L) (F) (A ATG GGC TTT GGG A <mark>CC AGT C</mark> TG TTC GC	^{A)} 2G —	6 nt	14 nt	803
IAF 911-A.6	(M) (G) (F) (G) (N) (G) (P) (I) (A ATG GGC TTT GGA AAT G <mark>GT CCC A</mark> TC GC	.) 2G —	6 nt	17 nt	187
IAF 911-A.11	(M) (G) (F) (V) (A) (T) (L) (F) (A ATG GGC TTT G <mark>TC GCC A</mark> CG TTG TTC GO	A) CG —	6 nt	11 nt	425

traduction. Lorsque la DB de 6 nt est placée à 17 nt (mutant IAF 911-A.6), les niveaux de production de xylanase diminuent de 62% (tableau 5). Cette réduction n'est que de 13% quand la même DB est localisée à 11 nt (mutant IAF 911-A.11). Donc, la distance permissive sur l'ARNm pour optimiser la production de xylanase se situe entre 13 et 15 nt du premier codon d'initiation de la traduction.

4.6.1.6 Effet du palindrome

Finalement, pour terminer l'analyse du ps long de la CelA, l'attention fut portée vers sa séquence palindromique. Il fut toutefois difficile de dissocier le rôle du palindrome de celui de la DB, en raison du fait que celle-ci est contenue dans la séquence 3' du palindrome. Le mutant IAF 911-A.4, dont la DB fut allongée à 6 nt tout en gardant intacte sa séquence palindromique de 5 nt, produisait 593 UI/mL de xylanase dans son surnageant de culture, soit une augmentation de 20% par rapport à la souche contrôle (tableau 6). En éliminant complètement la séquence répétée et en conservant la même DB de 6 nt (mutant IAF 911-A.6), l'activité xylanolytique baissa de 69%, prouvant que le palindrome joue un rôle stimulateur dans la production de xylanase. Une mutation fut ensuite introduite dans la séquence 3' du palindrome afin de réduire sa taille de 5 à 4 nt chez le clone IAF 911-A.3, ce qui eut également pour conséquence de diminuer la DB de ce mutant à 4 nt (tableau 6). IAF 911-A.3 a abaissé la production de xylanase de 40% par rapport à la souche contrôle. Par contre, le clone IAF 911-A.9, dont la séquence 3' du palindrome fut aussi réduite à 4 nt mais dont la DB fut augmentée à 6 nt (tableau 6), entraîna une hausse de 54% de la production de xylanase. Il semblerait donc que le palindrome exerce une influence positive sur la production de xylanase mais son effet n'apparaît pas aussi évident que celui de la DB.

Tableau 6 : Effet de la séquence répétée inverse du peptide signal long de lacellulase A (CelA), sur la production de xylanase parStreptomyces lividans

Seule la séquence nucléotidique située en aval du premier codon d'initiation de la traduction est illustrée. Les aa correspondants sont identifiés, entre parenthèses, au-dessus de la séquence nucléotidique. Les mutations ont été introduites au moyen de la méthode de Kunkel. Elles sont indiquées par des caractères gras, dans la séquence nucléotidique et en vert, dans la séquence en aa. La « downstream box » est représentée par une boîte bleue et la séquence répétée du ps long de la CelA est indiquée par les flèches rouges. L'activité xylanolytique libérée dans le surnageant de culture de chacun des clones, au temps 144 h, est exprimée en unité internationale par millilitre (UI/mL).

Souche	Séquence	Palindrome	DB	Distance entre la DB et l'ATG	Production XlnA à 144 h (en UI/mL)
IAF 911-A	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGG AAC GC <mark>T CCC A</mark> TC GCG	5 nt	5 nt	18 nt	491
IAF 911-A.4	(M) (G) (F) (G) (N) (G) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGG AAC GGT CCC ATC GCG	5 nt	6 nt	17 nt	593
IAF 911-A.6	(M) (G) (F) (G) (N) (G) (P) (I) (A) ATG GGC TTT GGA AAT G <mark>GT CCC A</mark> TC GCG	_	6 nt	17 nt	187
IAF 911-A.3	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (V) (A) ATG GGC TTT GGG AAC GCT CCC GTC GCG	4 nt	4 nt	18 nt	296
IAF 911-A.9	(M) (G) (F) (G) (N) (A) (P) (T) (A) ATG GGC TTT GGG AAC GCG CCC ACC GCG	4 nt	6 nt	19 nt	758

4.6.2 Ps de l'acétyl-xylane estérase (Axe)

Le clone IAF 914, contenant le ps sauvage de l'Axe renferme une DB de 8 nt (CCAGTaCC) située à 8 nt du codon AUG (figure 8). Un seul clone mutant fut produit à partir de la souche IAF 914. Il s'agit de IAF 914.2, dans lequel la DB fut complètement détruite. L'élimination de la DB du ps de l'Axe a été effectuée par remplacement de 5 nt, sans engendrer de modification de la séquence en aa du ps sauvage (tableau 3). Cette mutation a engendré une baisse de 77% de la production de xylanase, ce qui prouve l'existence et le rôle stimulateur de la DB dans le ps de l'Axe.

4.6.3 Ps de la xylanase A (XInA)

IAF 906 représente la souche contrôle dans l'étude de la DB du ps de la XlnA. Plus que cela, elle est considérée comme la souche de référence pour l'ensemble du travail puisqu'elle contient le ps sauvage originel de la XlnA. La DB du ps de la XlnA offre une forte complémentarité pour l'ARNr 16S (CGCCctTCCCA) qui débute au 12 ^{ième} nt en aval du codon d'initiation de la traduction (figure 8). Les nt formant potentiellement la DB du ps de la XlnA ont été modifiés afin d'éliminer cet élément du plasmide pIAF 906. Cette mutation a donné naissance au clone IAF 907.2. L'activité du mutant IAF 907.2 est presque identique à celle de la souche sauvage (tableau 3). L'abolition de la DB du ps de la XlnA ne cause aucun changement dans la production d'enzyme. Contrairement au cas de la DB des ps de la CelA et de l'Axe, la DB du ps de la XlnA ne semble pas jouer de rôle particulier dans la production de xylanase.

5. DISCUSSION

Plusieurs éléments retrouvés dans le ps long de la CelA, telle la présence d'un palindrome (5'-TGGGAacgcTCCCA) et celle d'une DB (TCCCA) conduisent à une surproduction de xylanase. Cependant certains points concernant le rôle que jouent ces éléments dans la stimulation des taux de production d'enzyme, demeurent inexpliqués.

5.1 INFLUENCE DE LA DB ET DE LA SÉQUENCE PALINDROMIQUE CONTENUES DANS LE PS LONG DE LA CELLULASE A (CELA), SUR LA PRODUCTION DE XYLANASE

L'abolition de la DB et du palindrome contenus dans le ps long de la CelA, par introduction de mutations ponctuelles à l'intérieur de ces deux séquences (mutant IAF 911-A.14), a diminué de 75% l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture, par rapport à la souche contrôle IAF 911-A. Ceci prouve que les hauts niveaux de production de xylanase obtenus avec le ps long de la CelA sont attribuables à sa DB, à son palindrome ou encore à la combinaison de ces deux éléments. Ce résultat corrobore celui de l'équipe de Sprengart, qui rapporte que l'élimination de la DB du gène 0,3 du bactériophage T7 abolit presque entièrement l'activité traductionnelle de cet ARNm (Sprengart *et al.*, 1990). Nagai *et al.* (1991) démontrent que la présence d'une DB est également requise pour l'induction des hauts niveaux de traduction du gène *rpoH* d'*E. coli*. De la même façon, il a été proposé qu'une DB stimule l'expression des gènes *glnS* et *lysU* d'*E. coli* (Faxén *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1993).

Quant au palindrome, il pourrait former une structure en « épingle à cheveux » qui stabiliserait l'ARNm ou qui exposerait les éléments de reconnaissance du RBS (comme la SD, par exemple) aux ribosomes (Gold *et al.*, 1981). Walter et Schrempf (1996) proposent plutôt que le palindrome soit un site d'attachement de répresseurs, comme il fut démontré pour le palindrome de 14 nt (5'-TGGGAGCGCTCCCA) de *S. reticuli*.

5.2 Limites de la séquence disponible sur l'ARNr 16S pour l'interaction ARNM-ARNR

De quelle manière l'effet stimulateur de la DB peut-il être expliqué ? Mc Carthy et Brimacombe (1994) pensent que la partie de l'ARNm située en aval du codon d'initiation de la traduction est assez mobile pour permettre son interaction avec l'ARNr 16S. D'après le modèle de Sprengart et al., la DB située sur l'ARNm s'hybriderait avec l'ADB de l'ARNr 16S, causant ainsi des changements de conformation au niveau de l'ARNr. Ces changements rapprocheraient alors la région décodante de l'ARNr, du codon d'initiation de la traduction, facilitant par le fait même l'initiation de la synthèse protéique (Sprengart et al., 1996). Mais alors, quelle est exactement la région de l'ARNr 16S disponible pour interagir avec la DB? Selon nous, dans le cas du ps long de la CelA, cette région serait située approximativement entre les nt 1461 et 1468 (5'-UGGGACUG). Comme le prouve le mutant IAF 911-A.8, à l'intérieur de cette marge, la production de xylanase est maximale. Même si nous n'avons pas établi avec précision les limites de l'ADB sur l'ARNr 16S, nous croyons qu'au-delà de ces deux points, l'efficacité de l'interaction DB-ADB diminue. Ainsi, lorsqu'on dépasse la limite supérieure et qu'on la place à 1472 (mutant IAF 911-A.11), la production de xylanase baisse de 54% par rapport au clone IAF 911-A.8. Quant à la limite inférieure, lorsqu'elle est déplacée au nt 1459 (mutant IAF 911-A.9), la production de xylanase baisse de 19%. Les limites que nous avons déterminées pour l'ARNr 16S de S. lividans se rapprochent de la séquence ciblée par Sprengart et al. pour l'ARNr 16S d'E. coli. En effet, dans le modèle que proposent Sprengart et al., la DB interagirait avec les nt 1469 à 1483 (5'-CUUUGUGAUUCAUGA) de l'ARNr 16S d'E. coli (Sprengart et al., 1990). Cependant, cet intervalle n'a été évalué qu'approximativement après alignement de séquences de plusieurs ARNm avec l'ARNr 16S d'E. coli. Sprengart et ses collaborateurs ne se sont pas intéressés à établir plus exactement les limites de la séquence disponible sur l'ARNr. On remarque que, malgré qu'elles occupent la même fonction, les séquences d'ARNr 16S disponibles pour interagir avec la DB chez E. coli (5'-CUUUGUGAUUCAUGA) et chez S. lividans (5'-UGGGACUG) ne présentent aucune homologie.

5.3 LONGUEUR DE LA DB DU PS LONG DE LA CELLULASE A (CELA)

La DB de 5nt (TCCCA) du ps long de la CelA semble jouer un rôle dans l'augmentation de la production de xylanase. Quelle serait donc sa longueur idéale pour permettre une stimulation maximale de la production d'enzyme? Dans le but de déterminer si une complémentarité plus forte entre la DB et l'ARNr 16S pourrait, à elle seule, stimuler la production de xylanase, la DB du ps long de la CelA fut allongée à 17 nt (mutant IAF 911-A.2). Ce mutant a entraîné une baisse de plus de 90% de la quantité de xylanase libérée dans le surnageant de culture. L'hypothèse qui permet d'expliquer cette chute drastique de production est qu'une complémentarité trop forte entre la DB et l'ARNr 16S unit ces deux éléments d'une manière telle que le ribosome a de la difficulté à se détacher de l'ARNm pour poursuivre le processus de traduction. De plus, cette forte interaction entre l'ARNm et l'ARNr créerait un obstacle qui empêcherait l'attachement d'un deuxième ribosome au site interne d'initiation de la traduction. Malheureusement, aucune étude excluant la nôtre ne fait état d'un tel phénomène puisque personne, avant nous, n'a augmenté d'autant de nt la complémentarité entre la DB et l'ARNr 16S.

Si une DB de 17 nt restreint la production de xylanase, il fut établi en revanche qu'une DB de 8 nt (mutant IAF 911-A.8) l'augmente de 1,9 fois. D'ailleurs, 8 nt représenterait, selon nous, la longueur optimale de la DB du ps long de la CelA. D'après Sprengart *et al.* (1990), la longueur optimale de la DB du gène 0,3 du bactériophage T7 serait, quant à elle, de 13 nt. Cette différence s'explique par le fait que le contenu en G+C du gène 0,3 du bactériophage T7 est de 53% alors que celui de la CelA de *S. lividans* est de 70%. Il est donc prévisible que la DB du ps de la CelA requière moins de nt que celle du gène 0,3 pour générer, en termes de force d'appariement, la même interaction avec l'ARNr 16S.

D'après notre étude, il semblerait que des DB de 6 (mutant IAF 911-A.10) et 7 nt (mutant IAF 911-A.7) permettent également de hausser la production de xylanase de 1,6 et 1,8 fois par rapport à la souche contrôle IAF 911-A, qui possède une DB de 5 nt. L'augmentation de la production de xylanase n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la longueur de la DB. En allongeant la DB du ps long de la CelA de 5 à 6 nt, on fait un bond de 1,6 fois dans les niveaux de xylanase du surnageant de culture. Ensuite, lorsqu'on passe d'une DB de 6 à 7 nt, on augmente encore de 0,2 fois la production de xylanase. L'allongement de la DB d'un nt supplémentaire accroît seulement encore de 0,1 fois les taux de xylanase. Au fur et à mesure qu'on allonge la DB, on atteint une sorte de plateau de la production de xylanase. C'est pour cette raison que nous ne nous sommes pas attardés à évaluer l'effet de l'allongement de la DB au delà de 8 nt.

5.4 DISTANCE ENTRE LA DB DU PS LONG DE LA CELLULASE A (CELA) ET LE PREMIER CODON D'INITIATION DE LA TRADUCTION

Ce qui détermine l'efficacité d'une DB, outre sa longueur, c'est son accessibilité sur l'ARNm c'est-à-dire la distance qui la sépare du premier codon d'initiation de la traduction. Sprengart et ses collaborateurs affirment que la DB est active en diverses positions sur l'ARNm et devrait absolument être située en aval du codon d'initiation de la traduction (Sprengart *et al.*, 1996).

La distance optimale de la DB du ps long de la CelA semble être située aux alentours de 15 nt en aval du premier codon d'initiation de la traduction. Ce résultat concorde tout à fait avec les conclusions de l'équipe de Sprengart. Leurs études d'expression avec le RBS modifié du gène 10 du bactériophage T7 révèlent que sa DB est très efficace lorsque positionnée à 15 nt du codon d'initiation de la traduction (Sprengart *et al.*, 1996). Nous n'avons pas effectué d'étude systématique sur la position exacte de la DB, relativement au premier codon d'initiation de la traduction. Pour ce faire, il aurait fallu varier la distance de la boîte en se servant toujours de la même DB de 8 nt. Dans notre étude, nous avons varié la distance de la DB en changeant également la composition de celle-ci.

5.5 IMPORTANCE DE LA SÉQUENCE PALINDROMIQUE RELATIVEMENT À CELLE DE LA DB DU PS LONG DE LA CELLULASE A (CELA).

Il fut impossible de dissocier le rôle du palindrome de celui de la DB du ps long de la CelA puisque c'est la DB qui constitue la séquence 3' répétée du palindrome (5'-TGGGAacgcTCCCA). Pour tenter de comprendre l'effet du palindrome du ps long de la CelA sur la production de xylanase, nous avons donc dû mener plusieurs expériences. Tout d'abord, le mutant IAF 911-A.4, pourvu d'une séquence palindromique intacte de 5 nt et d'une DB de 6 nt, fut comparé au mutant IAF 911-A.6, qui possède exactement les mêmes caractéristiques en ce qui a trait à la DB mais dans lequel le palindrome a été supprimé. L'abolition du palindrome diminue de 69% la production de xylanase, prouvant qu'il joue effectivement un rôle dans la stimulation des niveaux de traduction. La séquence palindromique du ps long de la CelA pourrait conférer une structure secondaire particulière à l'ARNm qui le stabiliserait ou favoriserait son accès aux ribosomes (Wilkström et al., 1982; De Smit et Van Duin, 1990). Walter et Schrempf (1996) suggèrent plutôt que le palindrome agisse à titre d'opérateur pour l'attachement de répresseurs. Cette hypothèse n'a pas été retenue dans notre étude puisqu'on suppose que les cellules ne synthétisent pas assez de répresseurs pour être en mesure de saturer tous les sites opérateurs présents sur les 40 à 100 copies du gène par cellule.

Dans un deuxième temps, en réduisant la taille de la séquence répétée à 4 nt et en changeant également la longueur de la DB, la production de xylanase a chuté de 40% avec une DB de 4 nt (mutant IAF 911-A.3) et augmenté de 54% avec une DB de 6 nt (mutant IAF 911-A.9). Cette seconde expérience semble indiquer que la production de xylanase est davantage influencée par la longueur de la DB que par celle du palindrome. Probablement que dans le cas du ps long de la CelA, le palindrome et la DB agissent de concert pour moduler la production de xylanase, en stimulant les niveaux de traduction de l'ARNm.

5.6 EXISTENCE D'UNE DB DANS D'AUTRES PS DE STREPTOMYCES LIVIDANS

La présence d'une DB dans un gène de *S. lividans* ne semble pas être un cas isolé puisque des DB probables avaient déjà été identifiées dans les gènes *ermE*1, *aph*1, *cdh*1, *aacc*71 et *sta*1 (Bibb *et al.*, 1994 ; Janssen, 1993). Étant donné qu'à l'origine le ps long de la CelA permettait la meilleure production de xylanase, la majeure partie de notre étude fut consacrée à ce ps.. Néanmoins, nous avons aussi décelé la présence d'une DB dans d'autres ps d'enzymes sécrétées par *S. lividans*, comme le ps de l'Axe (CCAGTaCC) et celui de la XlnA (CGCCctTCCCA). Tout comme avec le ps long de la CelA, la suppression de la DB du ps de l'Axe (mutant IAF 914.2) eut pour conséquence de diminuer de 77% la production de xylanase. Avec un tel résultat, l'existence ainsi que le rôle de la DB pouvaient difficilement être remis en doute.

L'élimination de la DB du ps de la XlnA (mutant IAF 907.2) n'eut pour sa part aucun effet sur la production de xylanase. Ce résultat était quelque peu déconcertant puisqu'il allait à l'encontre de nos propres observations sur le rôle évident de la DB des ps de la CelA et de l'Axe. L'explication la plus plausible réside dans le fait que la DB du ps de la XlnA (CGCCctTCCCA) se divise en deux régions complémentaires à l'ARNr 16S et séparées par 2 nt. Ces deux boîtes, d'une longueur respective de 4 et 5 nt, sont localisées si près l'une de l'autre qu'elle agissent de concert comme une seule DB de 9 nt. Cette interaction de 9 nt serait trop forte pour favoriser la production de xylanase, comme ce fut le cas pour la DB de 17 nt du ps long de la CelA. La production d'enzyme avec une boîte de 9 nt deviendrait comparable à celle d'une souche ne contenant pas de DB. Pour vérifier cette hypothèse, il suffirait d'observer l'effet de la suppression de la première boîte de 4 nt, sur la production de xylanase. On ne conserverait ainsi que la seconde boîte, qui correspond assez bien à la DB du ps long de la CelA et qui, en outre, est située à la même distance du codon d'initiation de la traduction. Si la théorie énoncée est juste, cette mutation devrait permettre une plus forte production de xylanase.

5.7 RÔLE DE LA DB

Comme la DB est une découverte relativement récente, elle soulève encore aujourd'hui une vive controverse. Quelques chercheurs remettent en doute le fait que la DB soit responsable de l'induction des hauts niveaux de traduction de certains ARNm (Resch *et al.*, 1996 ; Bläsi *et al.*, 1999). Selon eux, plusieurs facteurs comme les niveaux de transcription, la substitution d'aa et l'utilisation de codons rares, auraient été négligés dans les études concernant la DB et seraient peut-être la véritable cause des variations dans la production de protéine.

Dans notre étude, les variations au niveau de la production de xylanase ne peuvent être attribuées à des différences dans les taux de transcription de la XlnA puisque toutes nos constructions renferment le même promoteur de *XlnA*. Les niveaux de transcription devraient être identiques pour chacune des souches, comme il fut prouvé antérieurement dans des expériences d'hybridation après extraction de l'ARN total de différents clones (Pagé *et al.*, 1996). Cependant, pour être plus conforme, il aurait fallu extraire l'ARN de toutes les cultures, au même stade de croissance, et comparer la quantité d'ARNm de chacune d'entre elles en hybridant l'ARNm avec une sonde marquée.

Il est également notoire que la substitution d'un codon ou d'un aa dans la séquence d'un gène peut affecter la production d'enzyme sécrétée (Hale et Schottel, 1996; Binnie *et al.*, 1997). Ainsi, dans l'expérience de Shean et Gottesman (1992), la faible activité traductionnelle observée pour le gène *cI* était probablement due à l'introduction de codons rares plutôt qu'à l'abolition de sa DB. Dans l'expérience de Faxén *et al.* (1991), c'est le remplacement du codon GAG par le codon GAA, traduit trois fois plus rapidement, qui était la cause possible de l'augmentation de la production de la protéine glnS (Resch *et al.*, 1996). Même si nous ne pouvons exclure l'hypothèse que ce facteur ait pu jouer un rôle dans les variations de production de xylanase, il apparaît très clair, dans certains cas, que la DB et le palindrome soient les seuls responsables de la forte activité xylanolytique de nos constructions. Par exemple, le mutant IAF 911-A.14 qui résulte de l'abolition de la DB et du palindrome contenus dans le ps de la CelA,
produit 75% moins de xylanase que la souche contrôle alors qu'il contient exactement la même séquence en aa que cette dernière. Aussi, le mutant IAF 911-A.4 produit trois fois plus de xylanase que le clone IAF 911-A.6 alors que dans les deux cas, l'alanine en position +16 fut substituée par le codon glycine GGT. Enfin, chez le mutant IAF 911-A.11, la substitution de 5 aa a résulté en une baisse de seulement 13% de la production de xylanase.

Il est important de noter par ailleurs que les substitutions d'aa effectuées dans le ps long de la CelA étaient toutes ciblées dans la première partie de la construction du ps long, c'est-à-dire celle qui précède le deuxième codon d'initiation de la traduction. Or, la partie qui débute au deuxième codon d'initiation de la traduction, dans le ps long de la CelA, contient à elle seule tous les éléments nécessaires pour constituer un ps fonctionnel. Les mutations effectuées dans la séquence additionnelle située en amont de l'extrémité Nterminale du ps ne devraient donc pas affecter le système de sécrétion de la bactérie.

5.8 PERSPECTIVES ET TRAVAUX FUTURS

La DB a été décrite comme un élément stimulateur de la traduction qui agit en s'appariant avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (Sprengart *et al.*, 1990). Les résultats obtenus dans notre étude semblent apporter des évidences additionnelles de l'existence et du rôle de la DB dans le processus d'initiation de la traduction. Mais les bases moléculaires et biochimiques de l'interaction DB-ADB restent encore à élucider. Les expériences de protection d'ARN tentant de prouver directement la présence de l'interaction DB-ADB se sont toutes soldées par des échecs (Etchegaray et Inouye, 1999). Tout ce qu'il est possible d'affirmer avec nos résultats, c'est que la présence d'une DB, d'un palindrome ou de ces deux éléments dans les ps de *S. lividans* semble favoriser la production de xylanase.

Il serait intéressant également de savoir si les deux codons d'initiation de la traduction, présents dans le ps long de la CelA, sont utilisés naturellement par la bactérie.

Pour ce faire, il suffirait de substituer le codon interne d'initiation de la traduction par un ATC, dans le gène de la CelA et d'observer s'il y a production de cellulase.

L'optimisation des caractéristiques de la DB située en aval du premier codon d'initiation de la traduction a déjà permis la production de plus de 2 g/L de xylanase dans le surnageant de culture (mutant IAF 911-A.8). Comme les deux codons d'initiation de la traduction sont utilisés dans notre construction, nous pourrions imaginer une construction encore plus efficace dans laquelle nous rajouterions une DB optimale après le deuxième codon d'initiation de la traduction.

6. CONCLUSION

÷.

Étant donné l'attrait important que représentent les xylanases pour les industries de bioblanchiment des pâtes de papier, il apparaissait intéressant d'élaborer une souche hyper-productrice de cette enzyme. Une expérience de Pagé *et al.* (1996) avait déjà démontré dans le passé, qu'il était possible de surproduire la xylanase en remplaçant le ps sauvage de cette enzyme par le ps long de la CelA, dans la bactérie *S. lividans*. Cette surproduction d'enzyme était due en partie au fait que le ps long de la CelA renferme deux codons d'initiation de la traduction. Par nos travaux, nous avons réussi à démontrer que la présence, dans ce même ps long, d'une courte séquence complémentaire aux nt 1461 à 1465 de l'ARNr 16S de *S. lividans* contribue, elle aussi, à stimuler la production de xylanase. Cette séquence (TCCCA) présente des caractéristiques analogues à celles de la « downstream box » (ou DB) découverte un peu plus tôt par l'équipe de Sprengart, dans certains ARNm de la bactérie *E. coli* (Sprengart *et al.*, 1996).

Dans le but de caractériser la DB du ps long de la CelA, celle-ci fut soumise à une série de mutations ponctuelles. Le retrait de cette séquence du ps long de la CelA a conduit en une baisse importante du niveau de xylanase, démontrant ainsi le rôle évident qu'elle jouerait dans la stimulation des taux de production de l'enzyme. De même, une complémentarité trop forte (17 nt) entre la DB et l'ARNr 16S empêcherait le ribosome de se détacher de l'ARNm pour poursuivre le processus de traduction, ce qui s'est traduit par une chute de 90% de la production de xylanase. D'après nos travaux, il semble que la longueur optimale de la DB du ps long de la CelA soit de 8 nt et que sa position la plus favorable sur l'ARNm soit environ à 15 nt en aval du premier codon d'initiation de la traduction.

Il se pourrait également que la DB ne soit pas le seul élément qui stimule la production de xylanase dans le ps long de la CelA. En effet, celui-ci contient en plus, une séquence répétée de 5 nt (5'-TGGGAacgcTCCCA) qui pourrait former une structure favorisant le processus de traduction. L'élimination de cette séquence du ps long de la CelA prouve qu'elle est impliquée dans la forte production de xylanase, mais son rôle semble moins considérable que celui de la DB. Ce palindrome agirait en synergie avec la DB pour moduler les niveaux de xylanase produite.

L'existence de la DB a été confirmée dans d'autres ps d'enzymes sécrétées par *S. lividans*, soit ceux de l'Axe et de la XlnA. Dans ces deux cas, comme dans celui de la CelA, il semble qu'il y ait une forte corrélation entre la présence de la DB et la production de xylanase.

En somme, nos travaux nous ont permis de prouver que la DB occupe une fonction prépondérante dans la stimulation des taux de production de xylanase. Cela nous aide à mieux comprendre comment certains ARNm dépourvus de séquence de tête (ou « leader ») sont tout de même traduits de façon très efficace. Mais le mode d'action de la DB reste encore à élucider. Jusqu'à aujourd'hui, les efforts pour tenter de prouver chimiquement l'existence de l'interaction DB-ARNr 16S ont tous été vains. Par contre, grâce à notre étude, nous avons été en mesure de produire plus de 2 g/L de xylanase avec le meilleur mutant, ce qui correspond à environ huit fois la production de xylanase obtenue avec la souche hébergeant le ps sauvage de la XlnA. Compte tenu de l'amélioration appréciable dans la production de xylanase, suite à l'optimisation des paramètres de la DB, il serait intéressant de pousser plus avant la recherche sur cette boîte stimulatrice. Ces travaux pourraient avoir des conséquences d'une grande portée dans le domaine des biotechnologies en ouvrant la voie vers d'autres expériences de surproduction d'enzymes, importantes autant au niveau industriel que médical.

7. **REMERCIEMENTS**

12

La maîtrise n'aurait pas été cette belle aventure sans le concours, l'appui et le soutien inconditionnels de mon entourage professionnel et familial. C'est maintenant à mon tour de vous exprimer toute ma reconnaissance.

Tout d'abord, merci à mon directeur de recherche, le Dr. Rolf Morosoli. Vous m'avez éveillée au monde de la recherche scientifique et de la biologie moléculaire. Vous y avez mis toute votre passion, votre savoir, votre pugnacité et votre persévérance. Votre confiance en moi, dès les débuts, m'a donné les ressources et l'assurance nécessaires qui ont contribué à la réalisation de ma maîtrise.

Ma gratitude et ma reconnaissance vont également aux docteurs Claude Dupont, Dieter Kluepfel et François Shareck.

Je suis par ailleurs très redevable à Serge Durand pour l'aide précieuse qu'il m'a procurée, pour sa serviabilité, sa bonne humeur constante, sa générosité, son entrain et son enthousiasme contagieux. Serge, plus qu'un collègue de travail, tu es devenu un ami, mon complice...

Johanne, Lise, Maité et tes « Bondjours », Stéphanie, Marco, Patrick, Christine, Alain et Donald, vous avez tous contribué à maintenir une ambiance amicale et bon enfant tout au long de ces deux années. Un clin d'œil tout spécial aussi à Stéphane et à Jean-François. Les vapeurs du « Dieu Du Ciel » n'ont pas réussi à m'embrumer l'esprit ni à me détourner de mes objectifs. Mélanie et Sébastien, votre immense sollicitude et votre affection m'ont accompagnée sans faillir, dans mes moments de joie et de doute.

Mehdi, Soraya et Feyla, votre fraternelle tendresse m'a soutenue en tout temps, même si elle se manifestait souvent un peu trop bruyamment à mon goût.

Un immense merci à Maman et à Papa. Votre amour a fait fi des distances, des mers et des continents pour parvenir jusqu'aux portes de l'Institut. Tendres bisous et toute ma gratitude à vous deux.

8. **BIBLIOGRAPHIE**

- ANNÉ, J. et L. VAN MELLAERT. 1993. *Streptomyces lividans* as a host for heterologous protein production. FEMS Microbiol. Lett. **114**: 121-128.
- BIBB, M.J., J. WHITE, J.M. WARD et G.R. JANSSEN. 1994. The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. Mol. Microbiol. 14: 533-545.
- BINNIE, C., D. JENISH, D. COSSAR, A. SZABO, D. TRUDEAU, P. KRYGSMAN, L.T. MALEK et D.I. STEWART. 1997. Expression and characterization of soluble human erythopoietin receptor made in *Streptomyces lividans* 66. Protein Expr. Purif. 11: 271-278.
- BLÄSI, U., M. O'CONNOR, C.L. SQUIRES et A.E. DAHLBERG. 1999. Misled by sequence complementarity: does the DB-anti-DB interaction withstand scientific scrutiny? Mol. Microbiol. 33: 438-441.
- BURTON, K. 1956. A study on the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315-323.
- CALOGERO, R.A., C.L. PON, M.A. CANONACO et C.O. GUALERZI. 1988. Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **85**: 6427-6431.
- CHANG, S.C., M.H. SU et Y.H.W. LEE. 1997. Roles of the signal peptide and mature domains in the secretion and maturation of the neutral metalloprotease from *Streptomyces cacaoi*. Biochem. J. **321**: 29-37.
- DE SMIT, M.H. et J. VAN DUIN. 1994. Translational initiation on structured messengers : another role for the Shine-Dalgarno interaction. J. Mol. Biol. 235: 173-184.
- ETCHEGARAY, J-P. et M. INOUYE. 1999. DB or not DB in translation? Mol. Microbiol. 33: 438-441.
- FARMER, J.M. et G.R. JANSSEN. 1999. A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **31**: 1025-1038.

- FASS, S.H. et J.W. ENGELS. 1996. Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the alpha-amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. J. Biol. Chem. **271**: 15244-15252.
- FAXÉN, M., J. PLUMBRIDGE et L.A. ISAKSSON. 1991. Codon choice and potential complementarity between mRNA downstream of the initiation codon and bases 1471-1480 in 16S ribosomal RNA affects expression of *glnS*. Nucl. Acids Res. 19: 5247-5251.
- GILBERT, M., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1995. Production and secretion of proteins by Streptomycetes. Crit. Rev. Biotechnol. 15:13-39.
- GILBERT, M., S. OSTIGUY, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1996. Cloning of a secA homolog from Streptomyces lividans 1326 and overexpression in both S. lividans and Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta. **1296**: 9-12.
- GOLD, L., D. PRIBNOW, T. SCHNEIDER, S. SHINEDLING, B. SWEBILIUS SINGER et G. STORMO. 1981. Translational initiation in procaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 35: 365-403.
- GOLD, L. 1988. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Biochem. 57: 199-233.
- GOLDMAN, E., A.H. ROSENBERG, G. ZUBAY et F.W. STUDIER. 1995. Consecutive lowusage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **245**: 467-473.
- GUALERZI, C.O. et C.L. PON. 1990. Initiation of mRNA translation in procaryotes. Biochemistry 29: 5881-5889.
- GUSEK, T.W. et J.E. KINSELLA. 1992. Review of the *Streptomyces lividans* vector pIJ702 system for gene cloning. Crit. Rev. Microbiol. **18**: 247-260.
- HALE, V.A. et J.L. SCHOTTEL. 1996. Mutational analysis of the *Streptomyces scabies* esterase signal peptide. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**: 189-198.

- HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D. J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation.
- HORTON, R.H., L.A. MORAN, R.S. OCHS, J.D. RAWN et K.G. SCRIMGEOUR. 1994. Principes de biochimie. Éditions De Boeck-Wesmael, Bruxelles. 659-692.
- HUI, A. et H.A. DE BOER. 1987. Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **84**: 4762-4766.
- HURTUBISE, Y., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1995. A cellulase/xylanase negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol. Microbiol. 17: 367-377.
- ITO, K., K. KAWAKAMI et Y. NAKAMURA. 1993. Multiple control of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase expression involves a transcriptional repressor and a translational enhancer element. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **90**: 302-306.
- IZARD, J.W., S.L. RUSCH et D.A KENDALL. 1996. The amino-terminal charge and core region hydrophobicity interdependently contribute to the function of signal sequences. J. Biol. Chem. 271: 21579-21582.
- JACOB, F.W., M. SANTER et A.E. DAHLBERG. 1987. A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84: 4757-4761.
- JANSSEN, G.R. 1993. Eubacterial, archaebacterial and eukaryotic genes that encode leaderless mRNA. In : Industrial Microorganisms : Basic and Applied Molecular Genetics. BALTZ, R.H., G.D., HEGEMAN et P.L. SKATRUD, Eds. American Society for Microbiology, Washington. 59-67.
- JONES, J.D., C.J. MCKNIGHT et L.M. GIERASCH. 1990. Biophysical studies of signal peptides : implications for signal sequence functions and the involvement of lipid in protein export. J. Bioenerg. Biomembr. 22: 213-232.

- KÉBIR, H., C. DUPONT et R. MOROSOLI. 2000. Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide : dependence on box and inverted repeat sequence. Biochim. Biophys. Acta. **1491 :** 177-184.
- KLUEPFEL, D., F. SHARECK, F. MONDOU et R. MOROSOLI. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 230-234.
- KORN-WENDISCH, F. et H.J. KUTZNER. 1992. The family Streptomycetaceae. In: BALOWS, A., M.G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARPER et M.H. SCHLEIFER, Eds. The prokaryotes. Springer-Verlag, New York. 921-995.
- KUNKEL, T.A., J.D. ROBERTS et R.A. ZAKOUR. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods in Enzymol. 154: 367-382.
- KUNKEL, T.A., K. BEBENEK et J. MCCLARY. 1991. Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. Methods in Enzymol. 204: 125-139.
- KUTZNER. 1981. The family Streptomycetaceae. In: STARR, M.P., H. STOLP, H.G. TRÜPER, A. BALOWS et H. SCHLEGEL, Eds. The prokaryotes : a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin. 2028-2090.
- LAMMERTYN, E. et J. ANNÉ. 1998. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. FEMS Microbiol. Lett. 160: 1-10.
- LAMMERTYN, E., S. DESMYTER, S. SCHACHT, L. VAN MELLAERT et J. ANNÉ. 1998. Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 424-430.
- LEU, W.M., L.Y. CHEN, L.L. LIAW et Y.H. WU LEE. 1992. Secretion of the Streptomyces tyrosinase is mediated through its trans-activator protein MelC1. J. Biol. Chem. 267: 20108-20113.

- LIU, Z. et N.C. MISHRA. 1995. Single-tube method for plasmid miniprep from large numbers of clones for direct screening by size or restriction digestion. Biotechniques. 18:214-216
- MASSON, J.M. 1987. La mutagenèse dirigée. Biofutur. Novembre : 57-65.
- MC CARTHY, J.E.G. et R. BRIMACOMBE. 1994. Prokaryotic translation : the interactive pathway leading to initiation. Trends Genet. 10: 402-407.
- MC CARTHY, J.E.G., H.U. SCHAIRER et W. SEBALD. 1985. Translation initiation frequency of *atp* genes from *Escherichia coli* : identification of an intercistronic sequence that enhances translation. EMBO J. **4**: 519-526.
- MELANÇON, P., D. LECLERC, N. DESTROISMAISONS et L. BRAKIER-GINGRAS. 1990. The anti-Shine-Dalgarno region in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA is not essential for the correct selection of translational starts. Biochemistry 29: 3402-3407.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- MOROSOLI, R. et C. DUPONT. 1999. Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans*: dependence on signal peptides length, number and composition. FEMS Microbiol. Lett. **179**: 437-445.
- MOROSOLI, R., F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1997. Protein secretion in streptomycetes. FEMS Microbiol. Lett. 146: 167-174.
- NAGAI, H., H. YUZAWA et T. YURA. 1991. Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of σ^{32} synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **88**: 10515-10519.
- PAGÉ, N., D. KLUEPFEL, F. SHARECK et R. MOROSOLI. 1996. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 109-114.

- PAGÉ, N., D. KLUEPFEL, F. SHARECK et R. MOROSOLI. 1996. Increased xylanase yield in Streptomyces lividans: dependence on number of ribosome-binding sites. Nature Biotechnol. 14: 756-759.
- PARK, J.S., S. HORINOUCHI et T. BEPPU. 1991. Characterization of the leader peptide of an endo-type cellulase produced by an alkalophilic *Streptomyces* strain. Agric. Biol. Chem. 55: 1745-1750.
- PUGSLEY, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57: 50-108.
- RESCH, A., K. TEDIN, A. GRÜNDLING, A. MÜNDLEIN et U. BLÄSI. 1996. Downstream box-anti-downstream box interactions are dispensable for translation initiation of leaderless mRNAs. EMBO J. 15: 4740-4748.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2^{ième} Édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
- SCHAUER, A., M. RANES, R. SANTAMARIA, J. GUIJARRO, E. LAWLOR, C. MENDEZ, K. CHATER et R. LOSICK. 1988. Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor*. Science **240**: 768-772.
- SCHNEIDER, T.D., G.D. STORMO et L. GOLD. 1986. Information content of binding sites on nucleotide sequences. J. Mol. Biol. 188: 415-431.
- SHEAN, C.S. et M.E. GOTTESMAN. 1992. Translation of the prophage λ cl transcript. Cell **70**: 513-522.
- SHINE, J. et L. DALGARNO. 1974. The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA : complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **71**: 1342-1346.
- SPRENGART, M.L., H.P. FATSCHER et E. FUCHS. 1990. The initiation of translation in E. coli : apparent base pairing between the 16S rRNA and downstream sequences of the mRNA. Nucl. Acids Res. 18: 1719-1723.

- SPRENGART, M.L., E. FUCHS et A.G. PORTER. 1996. The downstream box : an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. EMBO J. 15: 665-674.
- SPRENGART, M.L. et A.G. PORTER. 1997. Functional importance of RNA interactions in selection of translation initiation codons. Mol. Microbiol. 24: 19-28.
- STEITZ, J.A. et K. JAKES. 1975. How ribosomes select initiator regions in mRNA : base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 4734-4738.
- STORMO, G.D., T.D. SCHNEIDER et L.M. GOLD. 1982. Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. Nucl. Acids Res. 10: 2971-2996.
- VAN ETTEN, W.J. et G.R. JANSSEN. 1998. An AUG initiation codon, not codonanticodon complementarity, is required for the translation of unleadered mRNA in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **27**: 987-1001.
- VIEIRA, J. et J. MESSING. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods in Enzymol. 153: 3-11.
- VIGAL, T., J.A. GIL, A. DAZA, M.D. GARCÍA-GONZÁLEZ, P. VILLADAS ET J.F. MARTÍN. 1991. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of αamylase by *Streptomyces lividans*. Mol. Gen. Genet. 231: 88-96.
- VOET, D. et J.V. VOET. 1990. Biochemistry. Editions John Wiley and sons, New York. 925.
- VON HEIJNE, G. 1985. Signal sequences : the limits of variation. J. Mol. Biol. 184 : 99-105.
- VON HEIJNE, G. et L. ABRAHMSÉN. 1989. Species-specific variation in signal peptide design : implications for secretion in foreign hosts. FEBS Lett. 244: 439-446.

- WALTER, S. et H. SCHREMPF. 1996. The synthesis of *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase) is regulated by both activation and repression mechanisms. Mol. Gen. Genet. 251: 186-195.
- WIKSTRÖM, P.M., L.K. LIND, D.E. BERG et G.R. BJÖRK. 1992. Importance of mRNA folding and start codon accessibility in the expression of genes in a ribosomal protein operon of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **224**: 949-966.
- WOOD, W.I. 1985. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride. PNAS. 82:1583-1588.
- WU, C.J. et G.R. JANSSEN. 1996. Translation of vph mRNA in Streptomyces lividans and Escherichia coli after removal of the 5' untranslated leader. Mol. Microbiol. 22: 339-355.

9. ANNEXE