

MARCO FILIPE RAPOSO

**ÉTUDE DE LA RÉGULATION DU SYSTÈME XYLANOLYTIQUE DE
*Streptomyces lividans***

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

**Hiver 2000
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec**

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	V
LISTE DES FIGURES	VI
1. INTRODUCTION	2
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
2.1 Régulation des gènes chez les procaryotes	5
2.2 La famille de régulateurs bactériens homologues aux répresseurs GalR et LacI de <i>E. coli</i>	6
2.3 Régulation des gènes chez les Streptomycètes	8
2.3.1. Mécanismes de régulation du contrôle catabolique chez les bactéries Gram positif versus <i>E. coli</i>	8
2.3.2. Existe-t-il un régulateur pléiotropique chez les Streptomycètes ?	9
2.3.2.1. La protéine CcpA de <i>B. subtilis</i>	9
2.3.2.2. La protéine RegI de <i>S. lividans</i>	9
2.3.2.3. La protéine MalR de <i>S. coelicolor</i>	10
2.3.2.4. La mutation <i>ccrA1</i> chez <i>S. coelicolor</i>	10
2.3.3. Régions d'ADN conservées au niveau de différentes régions promotrices chez les Streptomycètes.	11
2.3.3.1. Régions d'ADN conservées au niveau des régions promotrices de gènes impliqués dans la dégradation du xylane	11
2.3.3.2. Régions d'ADN conservées au niveau des régions promotrices de la chitinase et de la cellulase	11
2.3.3.3. Régions d'ADN conservées au niveau des régions promotrices de l' α -amylase et de l'agarase	12
2.3.3.4. Région d'ADN pléiotropique ?	12
2.4 Le système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	13
2.4.1. La dégradation du xylane par <i>S. lividans</i>	13
2.4.2. Le système de transport des oligosaccharides	15
2.4.3. La β -xylosidase et l' α -L-arabinofuranosidase	16
2.4.4. Résumé du système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	17
2.5 Organisation génétique des gènes du système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	17

2.6	Régulation de gènes lignocellulolytiques	18
2.7	Régulation des gènes du système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	19
2.7.1.	BxIR	19
OBJECTIFS		22
3.	PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	23
3.1	LISTE DE PRODUITS	24
3.1.1.	Produits chimiques	24
3.1.2.	Enzymes	25
3.1.3.	Trousses	25
3.2	Souche bactérienne et vecteurs	26
3.3	Milieux de culture	27
3.4	Oligonucléotides	27
3.5	Amplification élective in vitro d'un fragment ADN par PCR.	29
3.5.1.	Purification d'un produit de PCR avec la trousse «GFX PCR DNA and Band Purification Kit»	30
3.6	Analyses et manipulations de l'ADN	30
3.6.1.	Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction	30
3.6.2.	Migration sur gel d'agarose	30
3.6.3.	Élution de fragments d'ADN d'un gel d'agarose avec la trousse «GFX PCR DNA and Band Purification Kit»	31
3.6.4.	Ligation	31
3.7	Transformation d' <i>E. coli</i>	31
3.7.1.	Isolement d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> .	32
3.8	Analyse des protéines	33
3.8.1.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	33
3.8.2.	Dosage du contenu protéique	33
3.8.3.	Immunodétection de type Western	34
3.9	Purification de BxIR et BxIS avec la trousse IMPACT	35
3.9.1.	Clonage de <i>bxIR</i> et <i>bxIS</i> dans le plasmide pCYB2	35
3.9.2.	Purification de la fusion BxIR-intéine et BxIS-intéine	36
3.10	Purification de BxIR et BxIS avec la trousse pMal	37
3.10.1.	Clonage de <i>bxIR</i> et <i>bxIS</i> dans le plasmide pMal-e2	37
3.10.2.	Purification de la fusion BxIR-MBP et BxIS-MBP	37

3.11	Intéractions protéines-ADN	39
3.11.1.	Marquage de l'ADN avec du ³² P	39
3.11.2.	Séquençage de l'ADN avec la méthode des didésoxynucléotides	39
3.11.3.	Études de protection de l'ADN à la DNase I	40
4.	RÉSULTATS	41
4.1	Purification de BxlR et BxlS avec la trousse IMPACT	42
4.1.1.	Clonage des gènes <i>bxlR</i> et <i>bxlS</i> dans le plasmide pCYB2	42
4.1.2.	Expression des fusions BxlR-intéine et BxlS-intéine dans <i>E. coli</i>	47
4.2	Purification de BxlR et BxlS avec la trousse pMAL	50
4.2.1.	Clonage des gènes <i>bxlR</i> et <i>bxlS</i> dans le plasmide pMal-c2E	50
4.3	Purification de la protéine de fusion BxlR-MBP	50
4.3.1.	Expression des fusions BxlR-MBP et BxlS-MBP dans <i>E.coli</i>	50
4.4	Clivage de la protéine de fusion BxlR-MBP par l'entérokinase	54
4.5	Études de protection de l'ADN à la DNase I	57
5.	DISCUSSION	60
5.1	Purification des protéines BxlR et BxlS avec le système IMPACT	61
5.2	Purification de BxlR et BxlS avec le système pMAL	62
5.3	Régulation du système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	64
5.4	Études de protection de l'ADN à la DNase I	65
	REMERCIEMENTS	68
6.	BIBLIOGRAPHIE	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide(s) aminé(s)
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
°C	degré Celsius
DO	densité optique
h	heure (s)
kb	kilopaire(s) de base(s)
kDa	kilodalton(s)
MBP	protéine fixant le maltose (Maltose Binding Protein)
M	molaire
mM	millimolaire(s)
min	minute (s)
µg	microgramme(s)
µl	microlitre(s)
pmol	picomole(s)
pb	paires de base
PCR	amplification élective in vitro
rpm	révolutions par minute
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
UI	unité internationale
UV	ultra-violet
v/v	volume/volume

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1:	Comparaison des demi-sites de fixation des régulateurs bactériens de la famille GalR-LacI.	7
Figure 2:	Modèle hypothétique du système xylanolytique de <i>S. lividans</i> et l'organisation moléculaire des gènes de ce système	14
Figure 3:	Alignement des séquences en acides aminés de régulateurs bactériens de la famille GalR-LacI	20
Figure 4:	Expérience d'altération de la mobilité électrophorétique réalisée par Larocque (1998)	21
Figure 5:	Position du palindrome conservé dans les régions promotrices des gènes du système xylanolytique de <i>S. lividans</i>	21
Figure 6:	Carte physique du plasmide pIAF 300	43
Figure 7:	Carte physique du plasmide pIAF 301	44
Figure 8:	Séquençage du plasmide pIAF 301	45
Figure 9:	Analyse du plasmide pIAF300 par une digestion avec les endonucléases de restriction <i>NdeI</i> et <i>SmaI</i> suivie d'une migration en gel d'agarose 0,7%	46
Figure 10:	Analyse de l'expression de la fusion BxlS-intéine dans <i>E. coli</i>	48
Figure 11:	Analyse de l'expression de la fusion BxlR-intéine dans <i>E. coli</i>	49
Figure 12:	Carte physique du plasmide d' <i>E. coli</i> pMalc2-E	51
Figure 13:	Carte physique du plasmide pIAF 302	52
Figure 14:	Carte physique du plasmide pIAF 303	53
Figure 15:	Analyse de l'expression de la fusion BxlR-MBP dans <i>E. coli</i>	55
Figure 16:	Analyse de l'expression de la fusion BxlS-MBP dans <i>E. coli</i>	56
Figure 17:	Clivage de la fusion BxlR-MBP par l'entérokinase en fonction du temps suivi par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-CcpA	58
Figure 18:	Étude de protection de l'ADN à la DNase I pour la région opératrice de l'opéron <i>bxl</i>	59

1. INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des bactéries Gram-positif à structure filamenteuse principalement retrouvés dans le sol. Ils sont très répandus dans la nature, produisent une grande variété de métabolites secondaires et sécrètent plusieurs enzymes hydrolytiques leur permettant de dégrader la matière organique du sol (Gilbert *et al.*, 1995).

Après la cellulose, le xylane (hémicellulose) est le polysaccharide renouvelable le plus abondant de la biosphère (Biely, 1985). La cellulose constitue 30 à 40% de la biomasse terrestre (Ghose et Bisaria, 1979). On la retrouve dans la paroi des cellules végétales où elle est étroitement associée à la lignine et aux hémicelluloses afin de donner de la rigidité à la cellule végétale. L'hémicellulose lie la cellulose à la lignine en s'imbriquant dans les régions amorphes de la lignine et en enrobant les microfibrilles de cellulose (Flandroy, 1991). Le xylane est un des composés majeurs de l'hémicellulose des parois primaires des plantes monocotylédones et des parois cellulaires secondaires qui forment le bois dans les tissus vasculaires (Wong *et al.*, 1988). Le xylane est un polymère complexe qui nécessite différentes étapes de dégradation afin de le rendre assimilable pour les microorganismes tels les streptomycètes. Ceci implique donc qu'un grand éventail d'enzymes travaille de concert afin de permettre aux streptomycètes d'utiliser le xylane comme source d'énergie. Ce complexe d'enzymes nécessaire à la dégradation du xylane a été nommé le système xylolytique.

L'opéron *bxl* (8.6kb) fait partie de ce système et contient six cadres de lecture ouverts et une région intergénique. Un des cadres de lecture ouvert de l'opéron *bxl* est le gène *bxlR* codant pour une protéine (BxlR) qui se fixe à l'ADN. La séquence primaire en acides aminés de cette protéine comporte une homologie significative avec celle des membres de la famille de régulateurs homologues aux répresseurs GalR et LacI de *Escherichia coli* nommée famille GalR-LacI (Weickert et Adhya, 1992b). Dans la région intergénique de l'opéron *bxl* on retrouve, en amont du promoteur du gène de la β -xylosidase, la séquence palindromique 5'-CGAACTTTCG-3'. Une étude d'altération de la mobilité électrophorétique, effectuée avec un oligonucléotide qui contenait cette séquence palindromique et une fusion de BxlR avec la protéine MalE (ou MBP) de *E. coli* a démontré que BxlR se fixait spécifiquement à cette séquence (Larocque, 1998). Cette

même séquence est également retrouvée à proximité des promoteurs de différents gènes du système xylanolytique de *Streptomyces lividans* tel les gènes *xlnA*, *xlnB*, *xlnC* et *msiK*. Cependant la distance qui sépare la séquence palindromique des promoteurs de ces gènes n'est pas la même. Ainsi, le rôle que joue BxlR dans la régulation des gènes du système xylanolytique de *S. lividans* n'est pas tout à fait compris et donc, le modèle génétique du mécanisme de la régulation des gènes de ce système n'a pas encore été établi. Le but de ce travail est d'augmenter les connaissances sur la fonction de BxlR, c'est-à-dire de préciser son rôle soit comme activateur ou répresseur afin de pouvoir établir un modèle génétique du mécanisme de la régulation du système xylanolytique de *S. lividans*.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Régulation des gènes chez les procaryotes

Chez les procaryotes, un ensemble de gènes impliqués dans la même voie métabolique ou catabolique est souvent organisé en opéron, ce qui permet à ces gènes d'être sous le contrôle d'un seul promoteur nécessaire à la transcription. Ainsi, ils peuvent être exprimés de manière coordonnée par un même opérateur et donc par le même régulateur. C'est pourquoi les gènes impliqués dans le métabolisme des sucres sont souvent organisés en opéron. Par exemple, l'opéron maltose de *Escherichia coli* et *Streptomyces coelicolor* (Reidl *et al.*, 1989; van Wezel *et al.*, 1997), l'opéron lactose de *E. coli* (Gilbert et Muller-Hill, 1967) et l'opéron xylanase de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Matuschek *et al.*, 1996) pour n'en nommer que quelques-uns. Grâce aux études effectuées chez *E. coli*, les connaissances acquises de la régulation de gènes chez les procaryotes ont permis d'établir certains concepts de base qui pourraient s'appliquer à toutes les bactéries. Cependant, à mesure qu'on étend ces études à d'autres organismes, il devient apparent que des stratégies très différentes peuvent être employées chez des bactéries phylogénétiquement distantes de *E. coli*, lors de la régulation de gènes similaires. Parfois ces stratégies impliquent des mécanismes moléculaires singuliers qui ajoutent à notre appréciation de la gamme de moyens utilisés par les bactéries pour réguler leurs gènes. La régulation de la biosynthèse du tryptophane chez *E. coli* et chez *Bacillus subtilis* en est un bon exemple. L'opéron *trp* de *E. coli* est régulé, en partie, par un mécanisme d'atténuation qui implique le piétinement des ribosomes sur les ARN messagers riches en codons Trp (Lee et Yanofsky, 1977). Chez la bactérie Gram-positif *B. subtilis*, l'opéron *trp* est régulé par un mécanisme d'atténuation tout à fait différent. Celui-ci implique plutôt un régulateur pour qui le tryptophane semble être un effecteur allostérique (Shimotsu *et al.*, 1986).

En dépit des différences observées, la régulation de la transcription chez les procaryotes se fait généralement par l'entremise de protéines qui se fixent à l'ADN (protéines régulatrices ou régulateurs). Celles-ci reconnaissent et se fixent à une séquence spécifique (l'opérateur) qui se retrouve à proximité du ou des gènes régulés. Le positionnement de l'opérateur en fonction du promoteur déterminera le rôle du régulateur soit comme

répresseur ou activateur. Par exemple, si l'opérateur se retrouve entre le promoteur et le site d'initiation de la transcription, une protéine se fixant à cet endroit empêchera l'ARN polymérase de transcrire le gène. Par contre, si l'opérateur est situé en amont du promoteur et du gène à être transcrit, une protéine se fixant à cet endroit pourrait plutôt aider l'ARN polymérase à se positionner sur le promoteur.

2.2 La famille de régulateurs bactériens homologues aux répresseurs GalR et LacI de *E. coli*

Un grand nombre de régulateurs bactériens ont été identifiés et leurs séquences en acides aminés ont été établies. Ces régulateurs peuvent être groupés par homologie de séquences en trois familles distinctes : la famille LysR (Henikoff *et al.*, 1988), la famille DeoR (vanRooijen et de Vos, 1990) et la famille de régulateurs homologues aux répresseurs GalR et LacI de *E. coli* (Weickert et Adhya, 1992b). Les membres de la famille GalR-LacI régulent la transcription en se fixant à l'ADN en tant que dimères constitués de sous-unités identiques. Chacune des sous-unités possède un domaine à l'extrémité amino-terminale de type hélice-tour-hélice (HTH) qui reconnaît une moitié de l'opérateur (Weickert et Adhya, 1992b). Le haut degré d'homologie retrouvé dans le motif hélice-tour-hélice des membres de cette famille indique que certaines de ces protéines peuvent se fixer à des opérateurs similaires mais non-identiques. Effectivement, on retrouve une homologie dans la séquence des opérateurs reconnus par les membres de cette famille (Figure 1). Ceci indique également que c'est seulement quelques bases qui sont nécessaires pour une reconnaissance spécifique de l'opérateur. La séquence 5'-AAAC qui se retrouve au milieu du palindrome est hautement conservée chez les opérateurs reconnus par les membres de la famille GalR-LacI. Weickert et Adhya (1992b) ont émis l'hypothèse que cette partie centrale de l'opérateur pourrait avoir comme fonction d'attirer les régulateurs de cette famille et c'est la séquence en périphérie qui est responsable de la reconnaissance spécifique par un régulateur distinct.

celrhp	~ ~	T G G g A g C	~	7	(Spiridonov et Wilson, 1998)
lacihp	~ t	T G t g A g C	~	8	(Sadler <i>et al.</i> , 1983)
cytrhp	~ a	T G c g A t C C		9	(Gerlach <i>et al.</i> , 1990)*
galrhp	~ g	T G k A A A C	~	8	(Majumdar et Adhya, 1987)
galshp	~ g	T G k A A A C	~	8	(Weickert et Adhya, 1992a)
bxlohp	~ ~	~ c G A A A C	~	6	(Larocque et Shareck, 1998)
rafrhp	a w	c c G A A A C	~	9	(Aslanidis et Schmitt, 1990)
scrrhp	~ ~	~ c t A A A C C		7	(Cowan <i>et al.</i> , 1991)
purrhp	~ a	c G c A A A C	~	8	(Rolfes et Zalkin, 1990b)
malihp	~ g	a t a A A A C	~	8	(Reidl <i>et al.</i> , 1989)
rbtrhp	~ g	c t y m A t C	~	8	(Wu <i>et al.</i> , 1985)
Consensus	- -	T G G A A A C		1	.

Figure 1. Comparaison des demi-sites de fixation pour les régulateurs bactériens de la famille GalR-LacI. L'alignement a été réalisé avec le programme Bestfit 6.2 du Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package (GCG; Devereux *et al.*, 1984). Les séquences ont été trouvées dans la base de données GenBank du National Center for Biotechnology Information.

* = Séquence optimale ou consensus, K = G/T, W = A/T, M = A/C, Y = C/T

celrhp = régulateur de la cellulase de *Thermomonospora fusca*, lacihp = répresseur lactose de *Escherichia coli*, cytrhp = répresseur de la cytidine de *E. coli*, galrhp = répresseur du galactose de *E. coli*, galshp = isorépresseur du galactose et du méthylgalactose de *E. coli*, bxlohp = répresseur présomptif du système xylanolytique de *Streptomyces lividans*, rafrhp = répresseur du raffinose de *E. coli*, scrrhp = répresseur du sucrose de *Klebsiella aerogenes*, purrhp = répresseur de la purine de *E. coli*, malihp = répresseur du maltose de *E. coli*, rbtrhp = répresseur ribitol de *K. aerogenes*, ,

En plus du domaine HTH, les membres de cette famille possèdent un autre domaine fonctionnel, situé à l'extrémité C-terminale qui est plus grand et responsable de la fixation d'un effecteur. Tous les membres de cette famille requièrent un effecteur pour moduler la régulation. Ce domaine est également impliqué dans l'oligomérisation (homodimère ou tétramère) de la protéine. Ces régulateurs jusqu'à maintenant seulement identifiés chez des procaryotes, sont présents autant chez des bactéries Gram-positif que des Gram-négatif.

2.3 Régulation des gènes chez les streptomycètes

2.3.1. Mécanismes de régulation du contrôle catabolique chez les bactéries Gram-positif versus *E. coli*

Le contrôle catabolique est un exemple de phénomène de régulation fondamentale qui semble être accompli par des mécanismes différents chez les bactéries Gram-positif et chez *E. coli*. Chez ce dernier, l'AMP cyclique (cAMP) et son récepteur jouent un rôle important dans le contrôle catabolique (Pastan et Adhya, 1976). Des études effectuées chez des bactéries Gram-positif ont démontré que celles-ci répondent à des sources de carbone provoquant une répression catabolique par un mécanisme qui est indépendant de celui de cAMP. Par exemple, chez *S. coelicolor*, le cAMP est présent mais son niveau ne change pas lors de l'ajout d'une source de carbone provoquant la répression catabolique (Hodgson, 1982). On présume que *B. subtilis*, un autre Gram-positif, ne peut pas synthétiser de l'AMP cyclique étant donné qu'on ne retrouve pas d'adénylate cyclase chez cette bactérie (Setlow, 1973).

En fait, la répression entraînée par le glucose chez *S. coelicolor* serait probablement régulée, en partie, par une glucose kinase (Hodgson, 1982). Kwakman et Postma (1994) ont proposé l'action d'une glucose kinase dans la répression catabolique exercée sur la glycérol kinase et l'agarase de *S. coelicolor*. Saito et collaborateurs (1998) ont rapporté

qu'une glucose kinase est responsable de la répression entraînée par le glucose sur l'expression de la chitinase de *S. lividans* TK24.

2.3.2. Existe t-il un régulateur pléiotropique chez les streptomycètes ?

2.3.2.1. La protéine CcpA de *B. subtilis*

Une question qu'on peut se poser est si la répression catabolique chez les streptomycètes implique l'action d'une protéine de régulation générale, similaire à CcpA (Catabolite control protein A) chez *B. subtilis* (Henkin *et al.*, 1991). Cette protéine se fixe spécifiquement à des régions d'ADN nommées *cre* (Catabolite response elements) qui se retrouvent dans plusieurs gènes et opérons de Bacillus (Hueck *et al.*, 1994). Un exemple d'une région *cre* est l'opérateur *amyO* qui s'étend jusqu'au site d'initiation de la transcription du gène codant une α -amylase (*amyE*) de *B. subtilis* (Nicholson *et al.*, 1987).

2.3.2.2. La protéine Reg1 de *S. lividans*

Nguyen et collaborateurs (1997) ont proposé la protéine Reg1 de *S. lividans* comme étant un régulateur pléiotropique chez cette bactérie. La dislocation génétique du gène *reg1* a éliminé la répression catabolique exercée sur l'expression du gène codant l' α -amylase de *S. lividans* et de *S. limosus* et du gène codant pour la chitinase de *S. lividans*. Reg1 possède 31 % d'homologie avec CcpA et 95 % d'homologie avec MalR, le répresseur du gène *malE* de *S. coelicolor* (van Wezel *et al.*, 1997). Étant donné que *S. lividans* et *S. coelicolor* sont presque génétiquement identiques et que la position *reg1* sur le chromosome de *S. lividans* est la même que la position de *malR* sur le chromosome de *S. coelicolor*, Nguyen et ses collaborateurs (1997) proposent que Reg1 et MalR sont la même protéine.

2.3.2.3. La protéine MalR de *S. coelicolor*

La protéine MalR agit sur le niveau d'expression de *malE* mais l'inactivation du gène *malR* affecte également l'expression du gène *dagA* de *S. coelicolor*, codant une agarase. En effet, l'inactivation de ce gène élimine la répression catabolique exercée sur l'expression du gène *dagA* (van Wezel *et al.*, 1997). Étant donné que MalR réagit avec des anticorps Anti-CcpA et que des réactions croisées avec des anticorps Anti-Ccpa ont aussi été observées chez *S. lividans* et *S. reticuli* (Küster *et al.*, 1996), il se pourrait qu'il y ait une protéine de régulation générale pour les streptomycètes, soit MalR/Reg1. Toutefois, la dislocation génétique de *malR* n'a eu aucun effet pléiotropique apparent sur l'utilisation de différentes sources de carbone par *S. coelicolor* et il n'y a aucune preuve qui suggère que MalR soit un homologue fonctionnel de CcpA (van Wezel *et al.*, 1997).

2.3.2.4. La mutation *ccrA1* chez *S. coelicolor*

Ingram et collaborateurs (1995) ont isolé un mutant de *S. coelicolor* affecté par la mutation *ccrA1*. Ils ont proposé que cette mutation touche une protéine qui joue un rôle dans la répression catabolique de plusieurs gènes. Cette mutation a été cartographiée dans une région du génome de *S. coelicolor* où aucune autre mutation affectant la répression catabolique a été localisée. En effet la transcription de l'opéron galactose à partir du promoteur GalP1 chez les souches possédant la mutation *ccrA1*, n'est plus astreinte à la répression catabolique. La répression catabolique exercée sur l'opéron permettant l'utilisation du glycérol (*glyCABX*) et chez le promoteur *chi63* du gène de la chitinase, a aussi été abolie chez les souches mutantes *ccrA1*. Par contre, Hindle et Smith (1994) rapportent plutôt que c'est la protéine GlyR qui régule l'opéron glycérol, qu'une glucose kinase joue également un rôle dans la répression catabolique exercée sur cet opéron mais que l'expression de cet opéron n'est pas régulée par une protéine de régulation générale.

2.3.3. Régions d'ADN conservées au niveau de différentes régions promotrices chez les Streptomycètes.

2.3.3.1. Régions d'ADN conservées au niveau des régions promotrices de gènes impliqués dans la dégradation du xylane

Giannotta et collaborateurs (1996), après avoir comparé sept régions promotrices de xylanases chez différentes souches de streptomycètes, ont démontré que la séquence palindromique 5'-CTTT-N_x-AAAG était spécifiquement reconnue par une protéine seulement retrouvée chez les souches productrices de xylanases. Dans ce même alignement, en plus de la séquence 5'-CTTT-N_x-AAA, on discerne la présence d'une autre séquence palindromique. Cette séquence (CGAAACTTTCG) est présente en amont du gène codant la xylanase C de *Streptomyces* sp. EC3, du gène codant la xylanase I de *Streptomyces* sp. S38 et du gène de la xylanase II de *Actinomadura* sp. FC7.

Cette même séquence est aussi présente dans les régions promotrices de plusieurs gènes de *S. lividans*, soit pour le gène de la xylanase A (CGAAACTTTCG), le gène de la xylanase B (CGAAACTTcta) et le gène de la xylanase C (Shareck et collaborateurs, 1991). Finalement, cette séquence est aussi présente en amont du promoteur du gène *msiK* (CGAAAaTTTCG) (Hurtubise et collaborateurs, 1995) et dans la région promotrice de l'opéron *bxl* (CGAAACTTTCG) de *S. lividans* (Larocque et Shareck, 1998).

2.3.3.2. Régions d'ADN conservées au niveau des régions promotrices de la chitinase et de la cellulase

Delic et collaborateurs (1992) et Ni et Westpheling (1997) ont rapporté l'identification d'une séquence répétée (TTGGTCCAGACCT) retrouvée dans la région promotrice (*chi63*) de la chitinase de *S. lividans*. Cette séquence chevauche celle reconnue par l'ARN polymérase et est impliquée dans la répression du gène de la chitinase. Walter et Schrempf (1996) ont démontré que des protéines liaient spécifiquement une séquence palindromique (TGGGAGCGCTCCCA) d'ADN à

proximité du promoteur du gène *cel-1*, (codant une cellulase) de *S. reticuli* lorsque la bactérie était cultivée en présence de glucose. Cette même séquence a été proposée par Nguyen et collaborateurs (1997) comme étant celle où se fixerait la protéine Reg1 de *S. lividans*.

2.3.3.3. Régions d'ADN conservées au niveau des régions promotrices de l' α -amylase et de l'agarase

Deux séquences ont été rapportées comme site de fixation de MalR TCTTGC-11bp-GCAAGA et CTTGCA (van Wezel *et al.*, 1997). Ces séquences se retrouvent à 35 nucléotides en amont du promoteur de *malE* et du celui du gène *aml* de *Streptomyces limosus*. Tel que mentionné ci haut, la protéine MalR agit également sur le niveau d'expression du gène *dagA* de *S. coelicolor*, codant une agarase. On pourrait donc supposer que ces mêmes séquences pourraient se retrouver au niveau du promoteur de ce gène.

2.3.3.4. Région d'ADN pléiotropique ?

Il ne semble pas y avoir une seule séquence impliquée dans la répression catabolique chez les streptomycètes. Cependant, tel que mentionné ci haut, Giannotta et collaborateurs (1996), ont démontré que la séquence palindromique 5'-CTTT-N_x-AAAG-3' (retrouvée dans sept régions promotrices de xylanases) était spécifiquement reconnue par une protéine retrouvée seulement chez les souches productrices de xylanases. La séquence 5'-CGAAACTTTCG-3' se retrouve également dans les régions promotrices de plusieurs gènes de *S. lividans*. Ces deux séquences sont très similaires et il se pourrait que cette protéine non-identifiée par Giannotta et collaborateurs, soit responsable du contrôle de l'expression des différents gènes impliqués dans la dégradation du xylane par les streptomycètes.

2.4 Le système xylanolytique de *S. lividans*

2.4.1. La dégradation du xylane par *S. lividans*

Le xylane est un polymère complexe qui nécessite différentes étapes de dégradation afin de le rendre assimilable pour les microorganismes tels les streptomycètes. Cette complexité nécessite l'action de différents enzymes (Figure 2). Premièrement, on retrouve les enzymes qui débranchent les groupements latéraux d'arabinose, d'acétyle et d'acide glucuronique. Ces enzymes, sécrétés par *S. lividans*, sont les suivants; l' α -arabinofuranosidase B (Vincent *et al.*, 1997) qui débranche les groupements arabinofuranoses et l'acétyl xylane estérase (AxeA) permet l'hydrolyse des liens esters qui relient les groupements acétyls au xylose en position 2 et/ou 3 (Dupont *et al.*, 1996).

Cette première étape de dégradation permet de diminuer l'encombrement stérique du xylane pour en faciliter l'accès aux xylanases extracellulaires. Chez *S. lividans*, on connaît trois endo- β -1,4-xylanases (XlnA, XlnB, XlnC) qui sont sécrétées et agissent de façon synergique pour hydrolyser le xylane en sucres assimilables. Les xylanases clivent les liens β -1,4 du xylane. Les xylanases B et C agissent en premier et clivent le xylane pour engendrer une multitude d'oligoxylosides multimériques, diminuant le degré de polymérisation du substrat (Biely *et al.*, 1993). Ces oligoxylosides serviraient de substrat à la xylanase A en particulier le xylopentaose (X5) (Moreau *et al.*, 1994). La xylanase A dégrade plutôt le substrat en petits oligoxylosides, générant ainsi surtout du xylobiose (X₂) et du xylotriose (X₃).

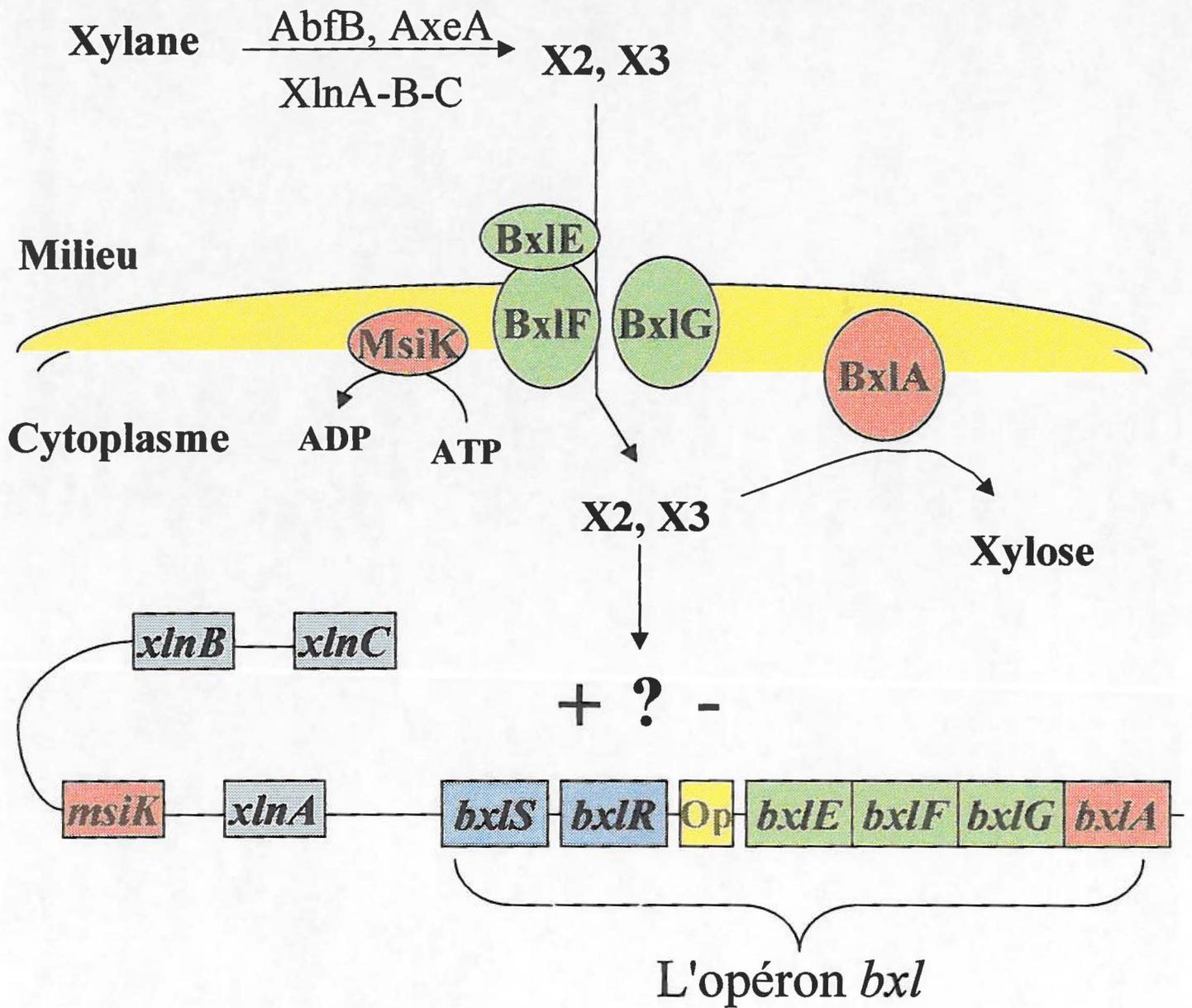


Figure 2. Modèle du système xylyanolytique de *S. lividans* et l'organisation moléculaire des gènes de ce système.

2.4.2. Le système de transport des oligosaccharides

Une fois que le xylane a été dégradé en sucres assimilables dans le milieu extracellulaire, ces sucres doivent entrer à l'intérieur de la cellule pour servir de source de carbone. Une première protéine impliquée dans le transport des sucres, MsiK a été identifiée par Hurtubise et collaborateurs (1995). Un alignement de la séquence de cette protéine avec celle d'autres protéines a démontré une homologie correspondante à la famille des protéines de liaison à l'ATP. La protéine MsiK permet l'apport d'énergie nécessaire au système d'importation de disaccharides, dont le cellobiose, le xylobiose et le xylose dans une moindre mesure, par l'hydrolyse de l'ATP (Hurtubise *et al.*, 1994).

En plus de la protéine MsiK, des perméases sont nécessaires au transport des sucres à l'intérieur de la cellule. En séquençant une partie du cosmide 1H10 de la banque cosmique établie par Redenbach *et al.* (1996), Larocque (1998) a identifié une région de 8.6 kb qui contient six cadres de lecture ouverts et une région intergénique qui jouerait le rôle d'opérateur. Il a nommé la région de 8.6 kb l'opéron *bxl*. Deux de ces cadres de lecture ouverts, *bxlF* et *bxlG*, pourraient coder pour des perméases. Effectivement, l'alignement de la séquence en acides aminés de BxlF et BxlG avec des séquences homologues provenant des banques GenBank et SwissProt a démontré une forte similarité avec des perméases bactériennes du transport des sucres. BxlF et BxlG sont notamment homologues aux sous-familles MalF et MalG, qui comprennent des perméases de disaccharides (Dassa et Hofnung, 1985; Saurin *et al.*, 1994). Un autre cadre de lecture ouvert, nommé *bxlE*, a également été identifié dans l'opéron *bxl* par Larocque (1998). La séquence de la protéine BxlE démontre une homologie avec la séquence signal de lipoprotéines de bactéries Gram-positif. Ces lipoprotéines possèdent la caractéristique de s'attacher à la membrane externe des bactéries Gram positif grâce à une séquence signal hydrophobe d'une vingtaines d'acides aminés, comme dans le cas de la protéine MsmE de *S. mutans* (Sutcliffe *et al.*, 1993).

La lipoprotéine BxlE serait localisée à l'extérieur de la cellule et ancrée dans la membrane grâce à la séquence signal hydrophobe. BxlE possède également de l'homologie avec des

protéines fixatrices de sucres et chimiotactiques envers les sucres. Schlosser et collaborateurs (1999) ont également caractérisé un système de transport du cellobiose chez *S. reticuli*. Ce système est dépendant de l'ATP et est composé d'une protéine de régulation (CebR), une lipoprotéine qui fixe le cellobiose (CebE), deux perméases (CebF and CebG) et ils ont aussi identifié l'extrémité amino-terminale d'une β -glucosidase (BglC) intracellulaire. Tous ces gènes sont organisés en opéron et forment l'opéron *ceb*.

2.4.3. La β -xylosidase et l' α -L-arabinofuranosidase

On retrouve aussi dans l'opéron *bxl*, le cadre de lecture ouvert *bxlA* qui, par un alignement de séquence d'acides aminés, pourrait coder pour une β -xylosidase. Toutes les séquences de protéines homologues à celle de BxlA font partie des glycosyles hydrolases de la famille 3 classifiées selon Henrissat et Bairoch en 1996 (Larocque, 1998). Récemment, la purification de BxlA et sa caractérisation biochimique ont confirmé la fonction de cette protéine (Lam, 1999). Finalement, l' α -L-arabinofuranosidase A (AbfA) est une enzyme intracellulaire située au niveau du cytoplasme qui agit sous forme d'hexamère. L'enzyme hydrolyse les arabino-oligoxylosides (de l'arabino-xylobiose à l'arabinoxylhexaose) pour libérer l'arabinose et l'oligoxyloside correspondant mais n'a pas d'action sur le xylane (Manin *et al.*, 1994). Ceci laisse supposer que l'AbfB sécrétée n'hydrolyse pas la totalité des arabinofuranoses du xylane et que des arabino-oligoxylosides sont transportés par un système de transport encore inconnu.

2.4.4. Résumé du système xylanolytique de *S. lividans*

En somme, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'après l'action de l' α -arabinofuranosidase B, de l'acétyl xylane estérase et des xylanases (A,B et C) sur le xylane, BxlE fixe les oligosaccharides comme le xylobiose ou/et le xylotriose qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Par la suite, le xylobiose ou le xylotriose seraient transférés à l'intérieur de la cellule grâce au complexe de perméases BxlF-BxlG. Le transport par les perméases serait énergisé par l'intermédiaire de la protéine MsiK et finalement, le xylobiose et le xylotriose seraient hydrolysés en xylose à l'intérieur de la cellule par la β -xylosidase BxlA et les arabino-oligoxylosides seraient hydrolysés par l' α -L-arabinofuranosidase A en xylose et arabinofuranose (Figure 2).

2.5 Organisation génétique des gènes du système xylanolytique de *S. lividans*

Les gènes du complexe xylanolytique de *S. lividans* ne sont pas localisés dans une région particulière du chromosome mais plutôt dispersés dans le génome. Contrairement à ce qui est observé chez plusieurs micro-organismes, la plupart des gènes codant pour les enzymes lignocellulolytiques sont rarement contigus dans un même opéron chez *S. lividans*. Il existe cependant des exceptions; les gènes *bxlA*, *bxlE*, *bxlF*, *bxlG*, *bxlR* et *bxlS* font tous partie du même opéron (l'opéron *bxl*). Les gènes *xlnB* et *axeA* sont également organisés sous forme d'opéron tandis que les gènes *abfB* et *xlnA* sont transcrits en directions opposées.

2.6 Régulation de gènes lignocellulolytiques

Plusieurs études portant sur la régulation de gènes codant pour des enzymes lignocellulolytiques ont été réalisées chez des champignons filamenteux et certains ont permis l'identification de protéines régulatrices. Van Peij et collaborateurs (1998) ont isolé et analysé la protéine XlnR, un activateur qui coordonne l'expression xylolytique chez *Aspergillus niger*. Cette protéine agit en se fixant à la séquence GGCTAAA, identifiée dans les régions promotrices des gènes xylolytiques de *A. niger* c'est-à-dire les gènes *xlnB*, *xlnC*, et *xlnD* qui codent une endoxygénase B et C et une bêta-xylosidase respectivement. Cette même séquence est également présente dans les régions promotrices des gènes xylolytiques chez d'autres espèces d'*Aspergillus* et chez *Penicillium chrysogenum* (van Peij *et al.*, 1998). Mach et collaborateurs (1996) ont rapporté que l'expression basale du gène *xyn1* de *Trichoderma reesei* est régulé par la protéine Cre1 qui reconnaît un palindrome dans le promoteur de *xyn1*. Orejas et collaborateurs (1999) ont observé que l'expression du gène *xlnA* de *A. nidulans* est réprimée par la protéine CreA qui se fixe au site *xlnA.C1* retrouvé en amont du gène *xlnA*.

Mimura et collaborateurs (1999) ont rapporté que la délétion d'une région de 185 pb de la région promotrice du gène *cgxA* qui code une xygénase de *Chaetomium gracile*, mène à une expression plus élevée de ce gène. La protéine AnrP se fixe spécifiquement à cette région et la séquence TTGACAAAT a été identifiée comme étant nécessaire lors de la fixation. Comme mentionné ci haut (section 2.4), Schlosser et collaborateurs (1999) ont identifié le régulateur de l'opéron *ceb* de *S. reticuli*, la protéine CebR, par contre aucun régulateur n'a été rapporté pour le système xylolytique de *S. lividans*.

2.7 Régulation des gènes du système xylanolytique de *S. lividans*

2.7.1. BxlR

Larocque (1998) a récemment séquencé le gène *bxlR* et le cadre de lecture ouvert *bxlS*, qui se retrouvent tous les deux dans le locus *bxl* de *S. lividans*. La séquence protéique de BxlR a une bonne homologie avec celle du régulateur CcpA de *B. megaterium* (49%) et *B. subtilis* (47%), le régulateur CelR de *Thermomonospora fusca* (44%), l'activateur DegA de *B. subtilis* (46%), le répresseur CebR de *S. reticuli* (42%) et avec celles d'autres régulateurs d'opérons bactériens de la famille GalR-LacI (Figure 3). Ainsi, *bxlR* pourrait donc coder pour une protéine de régulation, faisant partie de la famille GalR-LacI et impliquée dans la régulation du complexe xylanolytique de *S. lividans*. Si tel était le cas, on devrait retrouver un même opérateur conservé dans les régions promotrices des différents gènes du système xylanolytique de *S. lividans* où se fixerait spécifiquement BxlR. Comme mentionné ci-haut, dans l'alignement de séquence effectué par Giannotta et collaborateurs (1996), on retrouve la séquence 5'-CGAAACTTTCG-3' dans les régions promotrices de plusieurs gènes du système xylanolytique de *S. lividans*. La protéine BxlR a été purifiée en fusion avec la protéine de liaison au maltose (MBP) d'*E. coli* (Larocque, 1998). Cette protéine de fusion a ensuite été utilisée dans des expériences d'altération de la mobilité électrophorétique afin de démontrer que BxlR se liait spécifiquement au palindrome CGAAACTTTCG (Larocque, 1998) (Figure 4). Cependant, les expériences réalisées par Larocque n'ont pas permis de cliver la fusion et donc de séparer BxlR de la MBP.

L'homologie des séquences au niveau de la région promotrice de certains gènes du système xylanolytique de *S. lividans* semble indiquer que l'expression de ces gènes soit régulée de concert. Cependant, le positionnement de cette séquence palindromique par rapport aux régions promotrices varie (Figure 5) et donc l'effet que peut avoir BxlR en s'y fixant n'est pas encore connu ce qui ne permet pas encore d'établir un modèle génétique du mécanisme de la régulation des gènes du système xylanolytique de *S. lividans*.

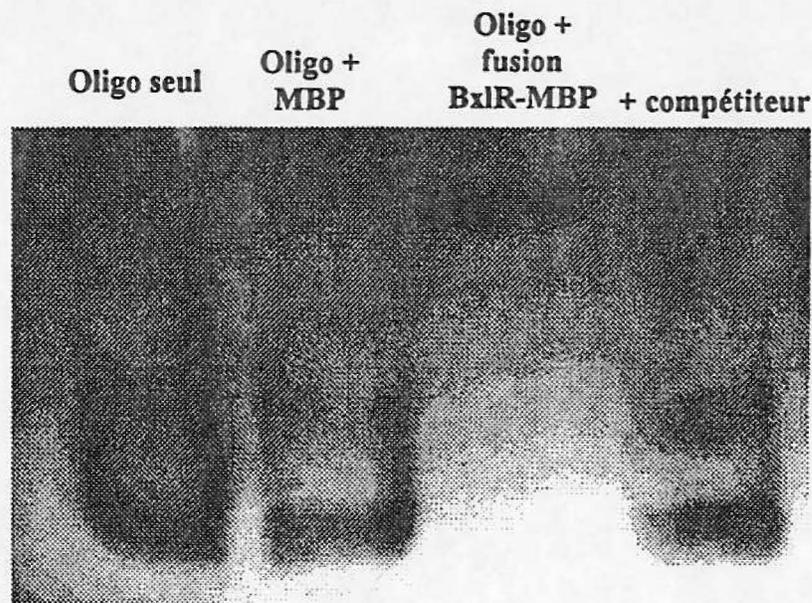


Figure 4. Résultat de l'expérience d'altération de la mobilité électrophorétique réalisé par Larocque (1998). Cette expérience a été effectuée avec un oligonucléotide qui contenait la séquence palindromique CGAAACTTTCG et une fusion de *bxlR* avec la protéine *malE* (ou MBP), de *E. coli*, qui fixe le maltose. Tiré de Larocque (1998).

	-35		-10				
• <i>bxlE</i> :	TTGACC	18 nt	TACTGT	30nt	CGAAACTTTCG	11nt	ATG
• <i>xlnA</i> :	CGAAACTTTCG	20nt	TTGACC	18nt	AATCAT	59nt	ATG
• <i>xlnB</i> :	CGAAACTTcta	9nt	TTGACG	17nt	AACACT	39nt	ATG
• <i>xlnC</i> :	CGAAAgtcTgt	9nt	TTGACA	19nt	AAAAC	144nt	ATG
• <i>msiK</i> :	CGAAAaTTTCG	24nt	CTGACA	18nt	TACCGT	92nt	ATG

Figure 5. Positionnement du palindrome conservé dans les régions promotrices des gènes du système xylanolytique de *S. lividans*.

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail sont premièrement de purifier BxIR et ensuite de déterminer la séquence nucléotidique où se fixe BxIR par la technique de protection de l'ADN à la DNaseI.

3. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

3.1 LISTE DE PRODUITS

3.1.1. Produits chimiques

Acétate de sodium (Fluka)
 Acétate de potassium (Sigma)
 Acide acétique glacial (Fischer)
 Acide borique (Bio-Rad)
 Acide hydrochlorique (Fisher)
 Acrylamide (Bio-Rad)
 Adénosine tri-phosphate : ATP (Pharmacia LKB)
 Agar (Difco)
 Agarose (Boehringer Mannheim)
 Ampicilline (Boehringer Mannheim)
 Anticorps anti-lapin conjugués à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim)
 Anticorps anti-MBP (New England BioLabs)
 Bacto-Tryptone (Difco)
 BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Boehringer Mannheim)
 Bleu de bromophénol (Bio-Rad)
 Bleu de Coomassie (Bio-Rad)
 BSA: Albumine de sérum bovin (Bio-Rad)
 Bromure d'éthidium (Bio-Rad)
 Chloroforme (BDH)
 Chlorure de calcium (BDH)
 Chlorure de magnésium (BDH)
 Chlorure de potassium (BDH)
 Chlorure de sodium (BDH)
 2'-Déoxyadénine-5'-triphosphate: dATP - γ ³²P (ICN)
 2'-Déoxyadénine-5'-triphosphate: dATP (Pharmacia LKB)
 2'-Déoxycytosine-5'-triphosphate: dCTP (Pharmacia LKB)
 2'-Déoxyguanine-5'-triphosphate: dGTP (Pharmacia LKB)
 2'-Déoxythymidine-5'-triphosphate : dTTP (Pharmacia LKB)
 DTT: Dithiothréitol (New England BioLabs)
 EDTA: acide éthylènediamine tétraacétique (Sigma)
 Éthanol (Gouvernement du Québec)
 Extrait de levure (Difco)
 Gélatine (Bio-Rad)
 Glucose (BDH)
 Glycérol (ICN Biomedicals)
 Glycogène (Boehringer Mannheim)
 Guanidine-thiocyanate (Pharmacia LKB)
 Huile de paraffine (BDH)
 Hydroxyde de sodium (J.T. Baker)
 IPTG: Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (GIBCO BRL)
 Isopropanol (J.T. Baker)

Maltose (Difco)
 β -Mercaptoéthanol (Pharmacia)
NBT: Nitro blue tetrazolium chloride (Boehringer Mannheim)
N,N-méthylène BIS acrylamide (Bio-Rad)
Persulfate d'ammonium (Bio-Rad)
Phénol (Boehringer Mannheim)
Polyéthylène glycol 6000 (Sigma)
Propionamide (Aldrich Chemical Co.)
Réactif de Bradford (Bio-Rad)
Standard de masse moléculaire d'ADN«1KB Plus DNA ladder» (GIBCO BRL)
Standard de masse moléculaire pour protéines (Bio-Rad) (BDH)
SDS: sulfate de sodium dodécyl (Bio-Rad)
Spermidine (Sigma)
Sucrose (BDH)
Tampon «One-Phor-All» 10x (Pharmacia LKB)
Tampon *Pfu* (Stratagene)
TBE: Tampon Tris-borate-EDTA
TE: Tampon Tris-EDTA
TEMED: N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (Bio-Rad)
Tris: tris(hydroxyméthyl) aminométhane (Boehringer Mannheim)
Triton X-100 (Bio-Rad)
Tween 20 (Bio-Rad)
Xylène cyanol (Bio-Rad)

3.1.2. Enzymes

Dnase I (Pharmacia LKB)
Taq ADN polymérase (Pharmacia LKB)
Pfu ADN polymérase (Stratagene)
T4 ADN ligase (Pharmacia LKB)
Enzymes de restriction (Pharmacia LKB)
T4 polynucléotide kinase (Pharmacia LKB)
Entérokinase (New England BioLabs)

3.1.3. Trousses

GFX PCR DNA and Band Purification Kit (Pharmacia LKB)
IMPACT™ I : One –Step Protein Purification System (New England BioLabs)
pMAL Protein Fusion and Purification System (New England BioLabs)
T7 Sequencing™Kit (Pharmacia LKB)

3.2 Souche bactérienne et vecteurs

Tableau 1. Description de la souche utilisée et des vecteurs utilisés et construits.

Souche	Génotype/phénotype	Source
<i>E. coli</i>		
DH11S	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>recA1398</i>) <i>deoR supE rpsL srl- thi/F' proAB</i> ⁺ <i>lacI^qZΔM15</i>	Gibco BRL
Vecteur	Description	Source
pCYB2	Vecteur multicopie se répliquant dans <i>E. coli</i> contenant un gène de résistance à l'ampicilline, le promoteur <i>ptac</i> , le N-terminal du gène <i>VMA1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> qui code une inteine fusionnée avec une partie du gène codant le domaine de fixation à la chitine de <i>Bacillus circulans</i> , une cassette de clonage multiple, un terminateur <i>rrnB</i> , l'origine de répllication <i>f1</i> et <i>lacI^q</i>	New England BioLabs
pIAF300	pCYB2 contenant <i>bxIR</i> cloné <i>NdeI-SmaI</i>	Ce travail
pIAF301	pCYB2 contenant <i>bxIS</i> cloné <i>NdeI-SmaI</i>	Ce travail
pMal-e2	Vecteur multicopie se répliquant dans <i>E. coli</i> contenant un gène de résistance à l'ampicilline, le promoteur <i>ptac</i> , les gènes fusionnés <i>malE-lacZα</i> avec une cassette de clonage multiple, un terminateur <i>rrnB</i> , l'origine de répllication <i>f1</i> et <i>lacI^q</i> .	New England BioLabs
pIAF302	pMal-e2 contenant <i>bxIR</i> cloné <i>KpnI-HindIII</i>	Ce travail
pIAF303	pMal-e2 contenant <i>bxIS</i> cloné <i>KpnI-HindIII</i>	Ce travail

3.3 Milieux de culture

Le milieu 2x TY contient 16 g de Bacto tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée. Il est possible de solidifier le milieu en y ajoutant 15 g/L d'agar. Le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave. La sélection de recombinants transformés avec un plasmide exprimant la β -lactamase se fait par l'ajout de 100 μ g/ml d'ampicilline

Le milieu riche-glucose contient 1.0 % de Bacto-tryptone, 0.5 % d'extrait de levure (Bacto yeast extract), 0.5 % NaCl, et 0.2% de glucose.

3.4 Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR et pour les expériences d'altération de la mobilité électrophorétique ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur d'oligonucléotides (Gene Assembler Plus, Pharmacia LKB). Les oligonucléotides nécessaires pour le séquençage d'inserts clonés dans pCYB2 étaient fournis dans la trousse IMPACT™ (New England BioLabs). Les séquences de ces oligonucléotides sont retrouvées au tableau 3.

Tableau 2. Nom et séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés dans ce travail.

Nom	Séquence (5'→3')	Utilisation
MAR01	5'-CCCCATATGGGCGCCCGGGTGACCCT GGCCGAGGTGGCGAAAGAG-3'	Amplification de <i>bxlR</i> pour clonage dans pCYB2
MAR02	5'-CCCCATATGACGCTGGCCGGGCTGCG GTGCTGCGTGAGG-3'	Amplification de <i>bxlS</i> pour clonage dans pCYB2
MAR04	5'-GCAGGCGTCCGCGCCGCCGGGCGCC GCCGCGGA-3'	Amplification de <i>bxlR</i> pour clonage dans pCYB2
MAR05	5'-GCAGTCGGCCAGGTCGGCGGGCGCG-3'	Amplification de <i>bxlS</i> pour clonage dans pCYB2
MAR16	5'-AAGCCGCTCCACCCTGGCCCTGGT-3'	Séquençage de <i>bxlO</i>
MAR19	5'-CCCCCGGTACCATGACGCTGGCCGGG CTGCGGTGCTGCGTGAGG-3'	Amplification de <i>bxlS</i> pour clonage dans pMal-e2
MAR20	5'-CCCCCAAGCTTTCAGTCGGCCAGGTC GGCGGCGCG-3'	Amplification de <i>bxlS</i> pour clonage dans pMal-e2
MAR21	5'-CCCCCGGTACCATGGGCGCCCGGGTG ACCCTGGCCGAGGTGGCGAAAGAG-3'	Amplification de <i>bxlR</i> pour clonage dans pMale2
MAR22	5'-CCCCCAAGCTTTCAGGCGTCCGCGCC GCCGGGCGCCGCCGCGGA-3'	Amplification de <i>bxlR</i> pour clonage dans pMale2
MAR25	5'-TGAAGGTGTCGACGATCTGCTGTT-3'	Amplification de <i>bxlO</i> pour l'étude de protection de l'ADN à la DNaseI

3.5 Amplification élective *in vitro* d'un fragment ADN par PCR.

L'amplification élective *in vitro* par PCR a été utilisée pour amplifier les gènes *bxlR*, *bxlS* dans le but de purifier les protéines codées par ces gènes. Également, une région de 456 pb dans l'opéron *bxl* a été amplifiée pour effectuer les études de protection de l'ADN à la Dnase I. Un cycle de PCR comprend la dénaturation de l'ADN suivie de l'hybridation des amorces spécifiques d'oligonucléotides aux brins d'ADN de la séquence à amplifier et d'une synthèse d'ADN à l'aide de la polymérase *Pfu*. Ce cycle est répété 30 fois. La *Pfu* ADN polymérase démontre le taux le plus faible d'erreur d'incorporations de toutes les ADN polymérases thermostables. Ceci fait de la *Pfu* le choix idéal pour les expériences de PCR qui nécessite une haute fidélité.

Le protocole qui suit est une modification du protocole standard de PCR et il est adapté pour le génome riche en G+C des streptomycètes (Kureishi et Bryan, 1992). Le mélange pour les réactions de PCR est effectué au préalable dans un microtube stérile à paroi mince, dans un volume de 50 μ l contenant: 30 μ l d'eau distillée autoclavée, 5 μ l de tampon 10x pour *Pfu* polymérase, 4 μ l d'un mélange de dNTP à 10 mM, 4 μ l de propionamide à 50%, 1 μ l de Tween 20 à 5%, 1 μ l d'ADN matrice (environ 1 ng), 3 μ l de chaque amorce diluée à 10 pmol/ μ l et 1 μ l (2.5U) de *Pfu* polymérase. Le tout est bien mélangé et recouvert avec 35 μ l d'huile de paraffine.

Le premier cycle d'amplification débute à 95°C pendant 5 min suivi de 5 min à 55°C et 3 min à 72°C. Ensuite, 30 cycles successifs ont été réalisés de la façon suivante: 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 3 min à 72°C. Le programme de PCR se termine par une incubation à 72°C pendant 7 min. Un aliquot de 5 μ l est prélevé pour vérifier le résultat de l'amplification en gel d'agarose.

3.5.1. Purification d'un produit de PCR avec la trousse «GFX PCR DNA and Band Purification Kit»

La purification du produit de PCR a été réalisée avec les solutions et selon le protocole fourni avec la trousse. Un volume de 500 µl d'un tampon favorisant la fixation d'acides nucléiques à une matrice de fibres de silice (3M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, 5% éthanol (v/v), pH 6.6) a été mélangé avec 100 µl du produit de la réaction de PCR. Le tout a été ajouté à un tube filtre qui contient une matrice de fibres de silice et centrifugé à vitesse maximale pendant 1 min. La matrice a été lavée avec un tampon de lavage (20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl et 80% d'éthanol 95%) et l'ADN a été élué de la matrice avec 50 µl de tampon TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.5).

3.6 Analyses et manipulations de l'ADN

3.6.1. Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction

Toutes les digestions enzymatiques ont été effectuées dans un volume final de 20 µl contenant suffisamment d'unité enzymatique pour digérer 1 µg d'ADN dans le tampon «One-Phor-All» 1x ou 2x (tampon OPA 10x: 100 mM de Tris acétate, 100 mM d'acétate de magnésium et 500 mM d'acétate de potassium) selon la concentration spécifiée par le manufacturier. Le mélange était incubé à 37°C pendant 120 min. Une incubation à 75°C pendant 20 min permettait l'inactivation des enzymes.

3.6.2. Migration sur gel d'agarose

Le gel d'agarose se compose de 0.7% d'agarose solubilisé dans du tampon TBE (90 mM de Tris, 90 mM d'acide borique et 2 mM EDTA). L'agarose a été solubilisé par chauffage, ensuite refroidie à 45 °C et du bromure d'éthidium a été ajouté à la concentration finale de 0.5 µg/ml. Le gel a été laissé à température pièce pendant 1 h pour

qu'il se solidifie. Les échantillons d'ADN à analyser ont été mélangés à raison d'un rapport de 5:1 avec du tampon de chargement (40% sucrose, 0.25% de bleu de bromophénol et 0.25% de xylène cyanol). L'échelle de masses moléculaires utilisée est le «1 kb Plus ladder» de la compagnie Gibco BRL. La migration a été réalisée sous une tension de 35 volts pendant 15 heures ou 3 heures à 100 volts. La détection et la photographie des bandes ADN ont été réalisés sous lumière UV dans l'appareil «Gel Doc 1000» de la compagnie Bio-Rad.

3.6.3. Éluion de fragments d'ADN d'un gel d'agarose avec la trousse «GFX PCR DNA and Band Purification Kit»

Un bloc d'agarose contenant la bande ADN d'intérêt a été découpé à l'aide d'une lame de rasoir et transféré dans un microtube de 1.5 ml. L'extraction et la purification de l'ADN a été réalisé avec les solutions et selon le protocole fourni avec la trousse, tel que décrit à la section 3.5.1.

3.6.4. Ligation

Les ligations ont été réalisées avec 4 unités de T4 ADN ligase dans le tampon OPA à une concentration finale de 1x et 1mM d'ATP. Le tout a été incubé à 15°C pendant 16 h.

3.7 Transformation d' *E. coli*

Les transformations ont été effectuées avec 300 µl de cellules compétentes et 10 µl d'ADN (300 à 1000 ng). À partir de 1 ml d'une pré-culture de cellules d' *E. coli*, 100 ml de milieu 2x TY ont étéensemencés et incubés à 37°C avec agitation jusqu'à ce que l'absorbance de la culture, à une DO₆₀₀ nm, se situe autour de 0.5. Ensuite la culture a été incubée sur glace pendant 15 min et centrifugée à 4°C à une force de 700 x g pendant 15

min. Le culot a été resuspendu délicatement dans 33 ml de Cb1 (15 % de glycérol, 100 mM de KCl, 30 mM d'acétate de potassium et 60 mM de CaCl_2 pH 5.8 ajusté avec de l'acide acétique) et incubée sur glace pendant 15 min. La suspension a été centrifugée de nouveau à 4°C à une force de 800 x g pendant 15 min. Le culot a été resuspendu délicatement dans 4 ml de tampon Cb 2 (20 mM de MOPS, 15 % de glycérol, 10 mM de KCl, 75 mM de CaCl_2 pH 6.8 ajusté avec du NaOH) et incubé sur glace pendant 15 min. Après l'incubation, la suspension de cellules maintenant compétentes pouvait servir immédiatement pour les transformations ou était aliquotée dans des microtubes stériles et conservée à - 80°C.

Toutes les étapes lors de la transformation se font stérilement et les cellules compétentes sont toujours conservées sur glace. L'ADN et les cellules compétentes ont été déposées dans le fond d'un tube Falcon n° 2059 et maintenues pendant 40 minutes sur glace. Ensuite, le mélange a été incubé 2 min à 42°C. Un ml de milieu 2x TY est ajouté et le tout est incubé 45 min à 37°C avec agitation. Après l'incubation, 100 µl de la suspension de cellules transformées ont été étalés sur un milieu solide 2x TY contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et incubé à 37°C pour la nuit. Le reste des cellules transformées ont été conservées à 4°C pour usage ultérieur si nécessaire.

3.7.1. Isolement d'ADN plasmidique d'*E. coli*.

Un certain nombre de transformants ont été prélevés à l'aide de cures-dents stériles et ensemencés dans 1.5 ml de milieu 2x TY contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et incubé à 37°C pendant 16 h. La culture a été transférée dans un microtube de 1.5 ml et centrifugée pendant 1 minute à vitesse maximale. Le culot a été resuspendu avec 200 µl d'une solution de 100mM Tris-HCl, 10 mM EDTA contenant 400 µg/ml de RNaseA. Les cellules ont été lysées par l'ajout de 200 µl d'une solution de lyse (1M NaOH et 5.3 % de SDS). Le tout a été mélangé par inversion et 200 µl d'une solution de 3M potassium et 5M d'acétate ont été ajoutés au lysat. Le mélange a été centrifugé pendant 20 minutes à vitesse maximale. Le surnageant a été récupéré dans un microtube de 1.5 ml et mélangé avec 420µl d'isopropanol. Le tout a été incubé 10 min à la

température de la pièce et ensuite centrifugé à vitesse maximale pendant 10 min. Le culot a été séché à l'air et dissous dans 20 μ l de tampon TE.

3.8 Analyse des protéines

3.8.1. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les protéines ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12.5 %, avec un gel de regroupement de polyacrylamide de 4 %, en présence de SDS selon Laemmli (1970) en utilisant l'appareillage MiniProtean II (Bio-Rad). L'échantillon a été mélangé dans un rapport 4:1 avec le tampon de charge 5X (2 % SDS, avec ou sans 5 % β -mercaptoéthanol, 20 % glycérol, 0.05 % bleu de bromophénol et 62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Le mélange a été bouilli pendant 10 min et ensuite chargé sur le gel. Un standard de protéines de masse moléculaire connu (Bio-Rad) a été également chargé sur le gel. La migration a été réalisée dans le tampon d'électrophorèse (192 mM de glycine, 0.1 % SDS et 25 mM de Tris-HCl, pH 8.3) à 200 volts pendant 50 min. Les protéines ont été visualisées par la coloration du gel dans une solution de Coomassie (0.75g de bleu de Coomassie R-250, 250 ml de méthanol, 50 ml d'acide acétique et 200 ml d'eau distillée) pendant 30 min suivie d'une décoloration de 45 min dans une solution de 10 % d'acide acétique et 30 % de méthanol.

3.8.2. Dosage du contenu protéique

La concentration des protéines solubilisées dans les échantillons à analyser a pu être déterminée en utilisant la méthode de Bradford (1976). Le réactif de Bradford utilisé était celui de la trousse Bio-Rad Protein Assay. La procédure pour le microtest décrite par le manufacturier a été utilisée et la γ -globuline a servi pour établir une courbe standard.

3.8.3. Immunodétection de type Western

Suite à la séparation des protéines par électrophorèse en présence de SDS, le transfert de celles-ci sur une membrane de nitrocellulose a été effectué avec l'appareil de transfert Trans-Blot Semi-Dry Transfert Cell (Bio-Rad) à 20 volts pendant 15 min.

Après le transfert, la membrane a été incubée pendant 30 min dans une solution de blocage (tampon TBS (500 mM de NaCl et 20 mM de Tris-HCl pH 7.5) contenant 3 % de gélatine). Elle a été lavée trois fois pendant 5 min dans une solution de lavage (tampon TBS contenant 0.05 % de Tween 80) suivi d'une incubation pour la nuit à 4°C dans 30 ml de solution d'anticorps primaire (29 ml de solution de lavage, 1 ml de solution de blocage et 50 µl de sérum de lapin anti-MBP dilué 1:1000 ou anti-Intein (New-England BioLabs).

Par la suite, la membrane a été lavée trois fois pendant 5 min dans la solution de lavage et incubée pendant 1 heure avec agitation dans la solution d'anticorps secondaire (20 ml de la solution de lavage, 10 ml de solution de blocage et 15 µl de sérum anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline (750 U/ml) (Boehringer Mannheim). Suite à une autre étape de trois lavages, la membrane a été incubée pendant 5 min dans le tampon TBS.

La détection a été réalisée en incubant la membrane dans 10 ml de solution de coloration (100 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5, contenant 15 µl du réactif NBT/BCIP (Boehringer Mannheim)). La coloration a été arrêtée par trois lavages avec de l'eau distillée.

3.9 Purification de BxlR et BxlS avec la trousse IMPACT

Ce système d'expression et de purification à l'aide d'une fusion avec une intéine a été développé par Chong *et al.* (1997) et commercialisé par la compagnie New England BioLabs. Le gène codant pour la protéine d'intérêt est cloné en fusion avec un élément d'épissage protéique modifié, l'extrémité N-terminal du gène *VMA1* de *Saccharomyces cerevisiae* appelé un *intein*, dans un vecteur d'expression chez *E. coli*, le plasmide pCYB2. La protéine de fusion est produite chez *E. coli* et purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de chitine. La protéine d'intérêt est séparée du reste de la fusion grâce à un épissage protéique qui survient à l'extrémité N-terminal de l'intéine à basse température en présence de thiols comme le dithiothréitol, le β -mercaptoéthanol ou de la cystéine.

3.9.1. Clonage de *bxlR* et *bxlS* dans le plasmide pCYB2

Les gènes *bxlR* et *bxlS* ont été clonés aux sites reconnus par les enzymes de restriction *NdeI* et *SmaI* dans le plasmide pCYB2. Le produit de ces clonages a été transformé dans *E. coli* DH11S. Les clones positifs, identifiés par une digestion enzymatique *NdeI-SmaI* de leur ADN plasmidique, ont été ensemencés dans 1.5 ml de milieu 2x TY contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml) et incubés à 37°C pour la nuit. Ensuite, des cultures de 10 ml de milieu 2x TY contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml) ont été ensemencées à partir de 100 μ l des cultures de 1.5 ml et incubées à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O à 600 nm entre 0.5-0.6. Un échantillon de 1.5 ml a été prélevé avant d'induire l'expression de la protéine de fusion par l'ajout de 0.5 mM d'IPTG à la culture. Après l'ajout d'IPTG, les cultures ont été incubées à 30°C et des échantillons de 1.5 ml ont été prélevés à toutes les heures, pendant 3 h. Tous les échantillons ont été analysés par électrophorèse en présence de SDS et immunodétection de type Western avec des anticorps anti-intéine.

3.9.2. Purification de la fusion BxlR-intéine et BxlS-intéine

Comme il a été mentionné à la section 3.10, la protéine de fusion, soit BxlR-intéine ou BxlS-intéine, a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de chitine. Après l'induction de l'expression de la protéine de fusion dans une culture de 400 ml d'un clone positif, celle-ci a été incubée à 30°C pendant 3 h. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 8 000 rpm à 4°C pendant 10 min. Le culot a été resuspendu dans 20 ml de tampon de colonne froid (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA et 0.1% Triton X-100).

La lyse cellulaire a été effectuée par 5 cycles de sonication d'une minute. La lyse a été vérifiée par examen au microscope et si elle était complète, la préparation a été centrifugée à 12 000 rpm à 4°C pendant 30 min. Le surnageant a été filtré sur un filtre Nalgen 0.45 micron et chargé à un débit de 0.3 ml/min sur une colonne contenant 4 ml de chitine (New England BioLabs). Toutes les étapes de chromatographie d'affinité ont été effectuées à 4°C. La colonne a été lavée avec 40 ml de tampon de colonne à un débit de 1 ml/min. Avant d'induire le clivage entre la protéine d'intérêt et la fusion, la colonne a été lavée 5 fois de façon successive avec 4 ml de tampon de clivage (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA et 30 mM DTT). Au dernier lavage, la colonne a été incubée à 4°C pour la nuit dans le tampon de clivage. La colonne a été éluée avec 8 ml de tampon de clivage sans DTT en collectant des fractions de 1 ml. Des échantillons ont été prélevés après chaque étape de la purification et tous les échantillons ont été analysés par électrophorèse en présence de SDS et immunodétection de type Western avec des anticorps anti-intéine.

3.10 Purification de BxlR et BxlS avec la trousse pMal

Ce système d'expression et de purification à l'aide d'une fusion avec la protéine fixant le maltose (MBP ou MalE) a été développé par di Guan *et al.* en 1988 et commercialisé par la compagnie New England BioLabs. Le gène codant pour la protéine d'intérêt est cloné en fusion avec le gène *malE* dans un vecteur d'expression chez *E. coli*, le plasmide pMal-e2. Le gène *malE* code une protéine fixant le maltose. La protéine de fusion est produite chez *E. coli*, et purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'amylose. La protéine d'intérêt est séparée du reste de la fusion par un traitement à l'entérokinase. Celle-ci est une protéase qui clive après la lysine de la séquence en acides aminés Asp-Asp-Asp-Asp-Lys dans le trypsinogène pour produire la trypsine (LaVallie *et al.*, 1993). Cette séquence se retrouve entre le gène *malE* et la cassette de clonage (Figure 12).

3.10.1. Clonage de *bxlR* et *bxlS* dans le plasmide pMal-e2

Pour ce système, les gènes *bxlR* et *bxlS* ont plutôt été clonés aux sites *KpnI* et *HindIII* dans le plasmide pMale-C2. Le résultat du clonage a été vérifié par une digestion enzymatique *KpnI-HindIII* de l'ADN plasmidique des clones obtenus. L'expression de la protéine de fusion chez les clones positifs a été réalisée de la même façon que celle mentionnée à la section 3.9.1. De même, la production de la protéine de fusion par les clones positifs a été vérifiée par électrophorèse en présence de SDS et immunodétection de type Western avec des anticorps anti-MBP et anti-CcpA. Les anticorps anti-MBP reconnaissent spécifiquement la MBP alors que les anticorps anti-CcpA ont été utilisés afin d'identifier la présence de BxlR

3.10.2. Purification de la fusion BxlR-MBP et BxlS-MBP

La production de la protéine de fusion par un clone positif a été réalisée de la même manière que celle mentionnée à la section 3.9.2. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 8 000 rpm à 4°C pendant 10 min, le culot a été resuspendu dans 20 ml de

tampon de colonne froid (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, et 1 mM EDTA) et la lyse cellulaire a été effectuée par 5 cycles de sonication d'une minute. La lyse a été vérifiée par examen au microscope et, si elle était complète, la préparation a été centrifugée à 12 000 rpm à 4°C pendant 30 min. Le surnageant a été filtré sur un filtre Nalgen 0.45 micron et chargé à un débit de 2 ml/min sur une colonne d'amylose (New England BioLabs) de 2 cm de diamètre et 10 cm de hauteur. Toutes les étapes de chromatographie d'affinité ont été effectuées à 4°C. La colonne a été lavée avec 200 ml de tampon de colonne à un débit de 2 ml/min. La colonne a été éluée avec 100 ml de tampon de colonne contenant 10 mM de maltose. Les fractions ont été analysées par un détecteur d'absorbance à 280 nm et récoltées à raison de 4 ml par fraction. Après l'analyse des fractions par électrophorèse en présence de SDS, les fractions contenant la protéine de fusion ont été rassemblées dans un même tube. Une dernière analyse par électrophorèse en présence de SDS et une immunodétection de type Western avec des anticorps anti-MBP et anti-CcpA ont été réalisées. La régénération et conservation de la colonne ont été effectuées selon le protocole du manufacturier (New England BioLabs).

La séparation de la protéine d'intérêt de la protéine fixant le maltose a été effectuée en incubant 50 µg de protéine de fusion par unités d'entérokinase pendant 16 heures à 23°C en prélevant des échantillons aux 2 h jusqu'à 8 h. Des aliquots de 10 µl ont été analysés par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-MBP (et anti-CcpA pour BxlR) pour évaluer l'efficacité du clivage. Pour éliminer la protéine fixant le maltose, le produit du clivage a été chargé de nouveau dans la colonne.

3.11 Interactions protéines-ADN

3.11.1. Marquage de l'ADN avec du ^{32}P

La réaction de marquage a été effectuée avec 3 μg d'ADN, dans 10 μl du tampon de marquage (20 mM Tris-HCl, pH 9.5 et 5 mM de spermidine), 5 μl du tampon OPA 10X, 200 μCi ATP [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] (4000 Ci/mmmole) et 25U de T4 polynucléotide kinase. La réaction a été incubée à 37°C pendant une heure et l'ATP [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] non-incorporé a été éliminé par un passage du volume total de la réaction sur une colonne de Séphadex G-50.

3.11.2. Séquençage de l'ADN avec la méthode des didésoxynucléotides

Le séquençage de l'opérateur *bx10* a été réalisé avec les solutions et selon le protocole fourni avec la trousse. La matrice utilisée a été de l'ADN simple brin obtenu par clonage du fragment d'ADN cible dans le bactériophage M13mp18. L'amorce MAR16 a été utilisée. La concentration de la matrice a été ajustée de sorte que 10 μl comprend 1.5-2 μg d'ADN. La réaction d'hybridation de l'amorce avec la matrice a été effectuée avec 1-2 pmoles d'amorce et 2 μl de tampon d'hybridation (1 M tris-HCl, pH 7.6, 100 mM MgCl_2 et 160 mM DTT). Le tout a été vortexé, incubé à 60°C pendant 10 min et finalement incubé à la température ambiante pendant au moins 10 min. La réaction de séquençage a été réalisée en ajoutant 3 μl de mélange de marquage (1.375 μM de dATP, dGTP, dTTP et 333.5 mM NaCl), 1 μl [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP et 2 μl de T7 ADN polymérase dilué 1:4 à la réaction d'hybridation. Après une incubation de 5 min à la température ambiante, 4.5 μl de la réaction de séquençage ont été mélangés avec 2.5 μl de chaque ddNTP, suivi d'une incubation de 5 min à 37°C et finalement la réaction a été arrêtée par l'ajout de 5 μl de la solution stop (0.3% de bromophénol bleu et de xylène cyanol, 10 mM EDTA, pH 7.5 et 97.5 % de formamide déionisée).

3.11.3. Études de protection de l'ADN à la DNase I

Les réactions ont été accomplies dans un volume final de 20 µl de tampon de liaison 1 x (20 mM HEPES pH 7.6, 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM EDTA, 1mM DTT, 0.2% Tween 20) avec 17 ng ADN, 1µg poly(dI-dC) et 1µg de protéine. Les réactions ont été incubées pendant 30 min à la température ambiante et ensuite traitées avec différentes quantités de Dnase I soit 15, 20, 30, 40, 50 ng. Le traitement à la Dnase I a été fait à la température ambiante pendant 1 min 30 secondes et arrêté par l'ajout de 2 µl EDTA 500 mM pH 8.0. Finalement, 5 µl de tampon de charge (90 % formamide déionisée, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.01 % bromophénol blue, 0.01 % xylène cyanol) ont été ajoutés au mélange et le tout a été incubé à 90°C pendant 3 min.

Les échantillons ont été analysés dans un gel dénaturant de 6 % polyacrylamide: bisacrylamide (19:1) qui contenait 1 x TBE (90 mM Tris, 90 mM d'acide borique pH 8.3 et 2 mM EDTA) et 42 % d'urée. Le gel a été pré-migré pendant 30 min à 1600 V, 30 mA avant d'être chargé et la migration a été réalisée à 1600 V, 30 mA pendant 5 h. Le gel a été exposé avec un film à autoradiographie pendant une période de 16 h.

4. RÉSULTATS

4.1 Purification de BxlR et BxlS avec la trousse IMPACT

4.1.1. Clonage des gènes *bxlR* et *bxlS* dans le plasmide pCYB2

Les gènes *bxlR* et *bxlS* ont été amplifiés par PCR à partir du cosmide 1H10 digéré par *KpnI* et avec les amorces MAR01-MAR04 (*bxlR*) et MAR02-MAR05 (*bxlS*). L'efficacité de chaque amplification a été vérifiée par une migration en gel d'agarose. Les produits de PCR ont été purifiés, digérés par *NdeI* pour ensuite être clonés dans le vecteur pCYB2. Le vecteur pCYB2 a été digéré *NdeI-SmaI*, puis après migration en gel d'agarose, le plasmide linéarisé a été isolé du gel à l'aide de la trousse GFX (Pharmacia LKB). Il a été ligué aux produits de PCR digérés produisant les plasmides pIAF 300 et pIAF 301 (Figures 6 et 7). Ces plasmides ont été transformés dans *E. coli* DH11S. Les plasmides de colonies résistantes à l'ampicilline ont ensuite été isolés, digérés par *NdeI* et *SmaI* et séparés en gel d'agarose afin de vérifier la présence d'un insert de masse moléculaire attendue. Les clones positifs pour *bxlS* ont été séquencés pour vérifier si le gène cloné était dans le même cadre de lecture que l'intéine. Parmi 12 transformants analysés pour *bxlS*, seulement deux contenaient un insert de masse moléculaire attendue en plus du plasmide. Le séquençage de ces deux transformants a démontré qu'ils étaient dans le même cadre de lecture que l'intéine (Figure 8). Quant à *bxlR*, parmi 12 transformants analysés, un seul contenait un insert de masse moléculaire attendue en plus du plasmide (Figure 9). Cependant, ce clone n'a pas été séquencé, nous avons plutôt vérifié l'expression de la fusion BxlR-intéine par électrophorèse en présence de SDS (section 4.1.2).

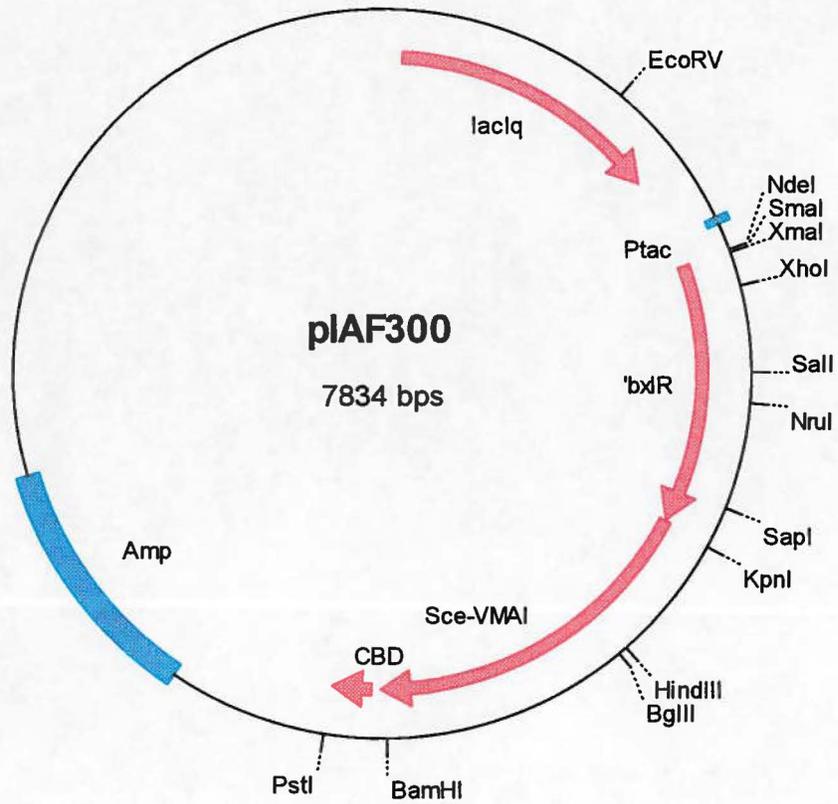


Figure 6. Carte physique du plasmide d'*E. coli* pIAF 300. Ce plasmide est le produit du clonage du gène *bxlR* dans le plasmide pCYB2

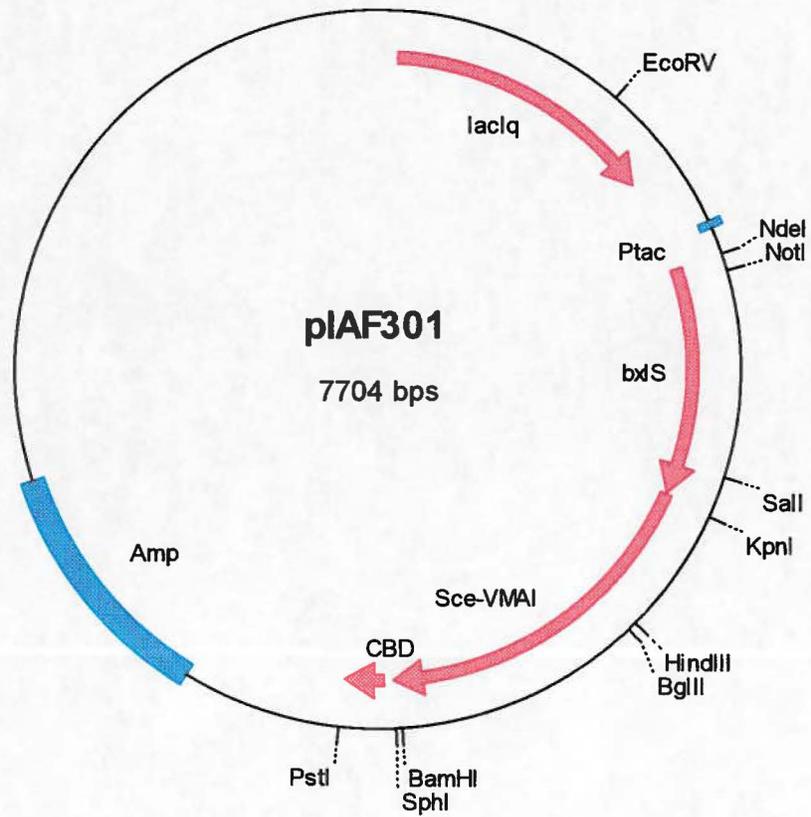


Figure 7. Carte physique du plasmide d'*E. coli* pIAF 301. Ce plasmide est le produit du clonage du gène *bxlS* dans le plasmide pCYB2

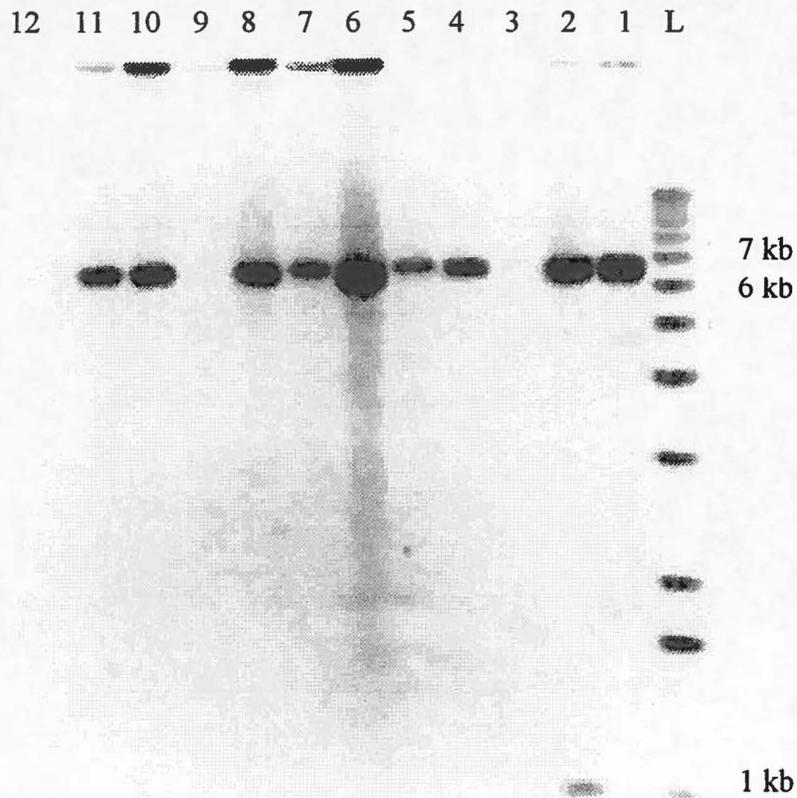
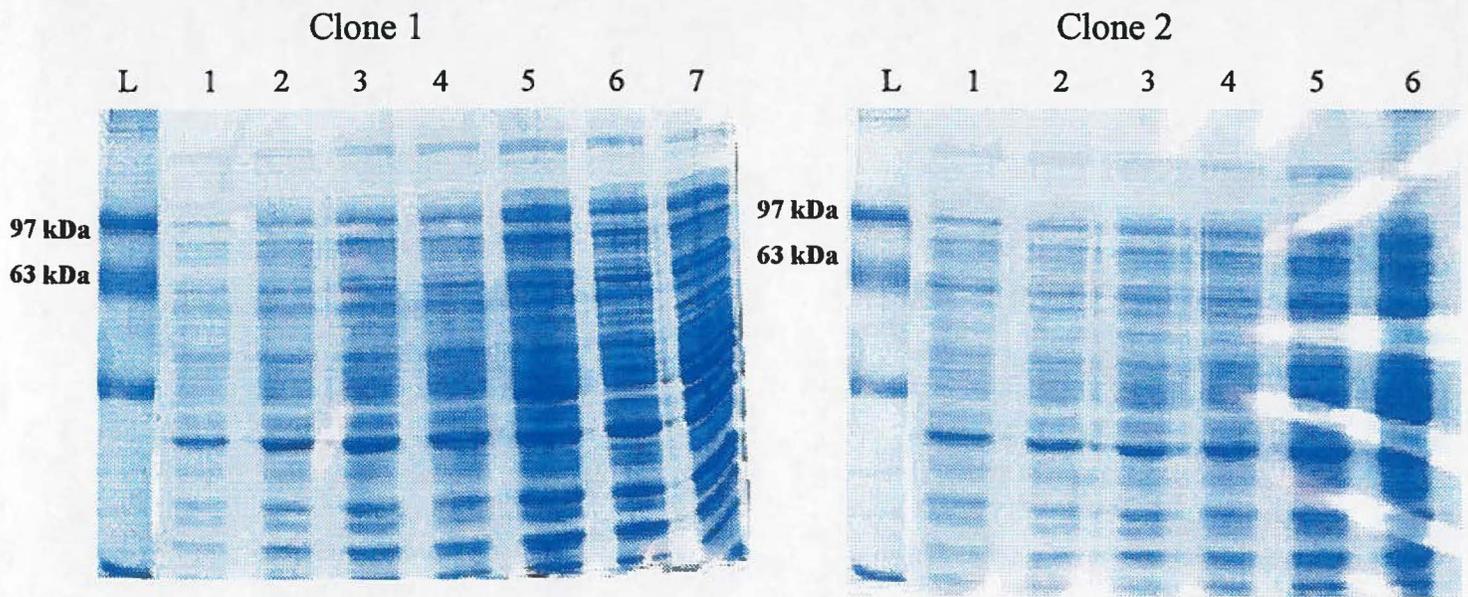


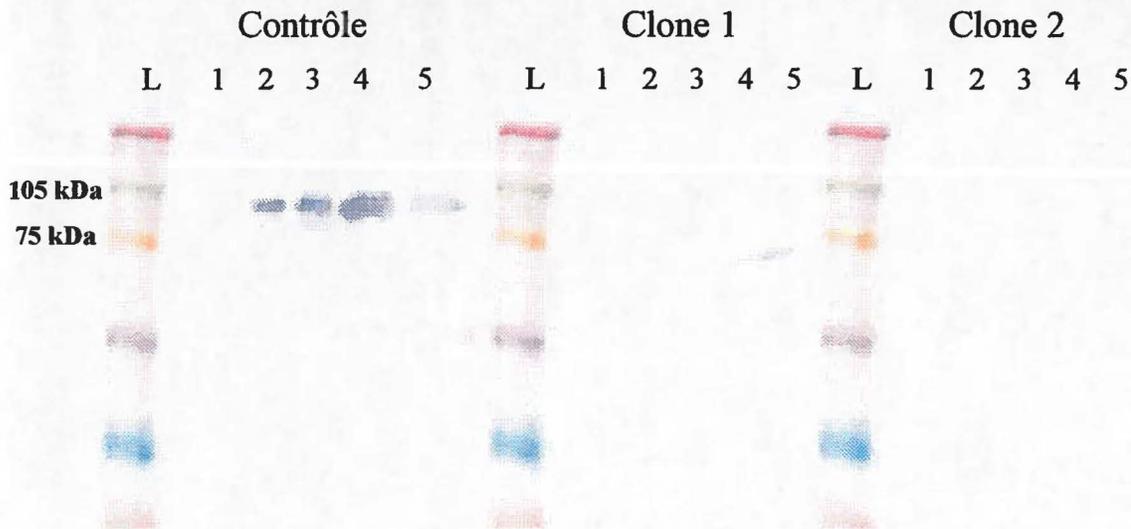
Figure 9. Analyse du plasmide pIAF300 par une digestion avec les endonucléases de restriction *NdeI* et *SmaI* de l'ADN plasmidique isolé de 12 clones suivie d'une migration en gel d'agarose 0,7%. Le gène *bxlR* a une masse moléculaire de 1030 pb et celle du vecteur est de 6843 pb. L= standard de poids moléculaire "one kb ladder" de Gibco BRL.

4.1.2. Expression des fusions BxIR-intéine et BxIS-intéine dans *E. coli*

L'expression des protéines de fusion BxIR-intéine et BxIS-intéine des clones sélectionnés a été examinée par électrophorèse en présence de SDS et immunodétection de type Western avec des anticorps anti-intéine. Comme il a été mentionné à la section 3.11.2, l'expression de la protéine de fusion est inductible par l'ajout d'IPTG au milieu de culture. Après l'induction, il devrait y avoir apparition d'une bande ou une augmentation dans l'intensité d'une bande correspondant à la masse moléculaire de la protéine de fusion. La masse moléculaire théorique de la fusion BxIS-intéine est de 79 kDa (32 kDa pour BxIS et 47 kDa pour l'intéine) et de 84 kDa pour la protéine de fusion BxIR-intéine (37 kDa pour BxIR et 47 kDa pour l'intéine). Le résultat de l'électrophorèse en présence de SDS ne présente pas une induction manifeste des protéines de fusion BxIR-intéine et BxIS-intéine chez les clones positifs (Figure 10A et 11A). Également, l'immunodétection réalisée avec les anticorps anti-intéine ne révèle pas la présence apparente des protéines de fusion BxIR-intéine et BxIS-intéine comparativement au contrôle qui est la protéine de fusion MBP-intéine où les bandes correspondent à la masse moléculaire théorique de celle-ci soit 97 kDa (Figure 10B et 11B). Ces résultats ont mené à l'abandon de cette méthode d'expression.



A)



B)

Figure 10. Résultat de l'expression de la fusion BxlS-Intéine chez deux clones de *E. coli*. L'expression de la protéine de fusion a été vérifiée par électrophorèse en présence de SDS (A) et par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-Intéine (B). Le plasmide contrôle contient une fusion de la MBP avec l'intéine (poids moléculaire total 89 kDa) et il a été fourni avec la trousse IMPACT.

L = Standard de poids moléculaire

1 = Avant induction

2 = 2 h après induction

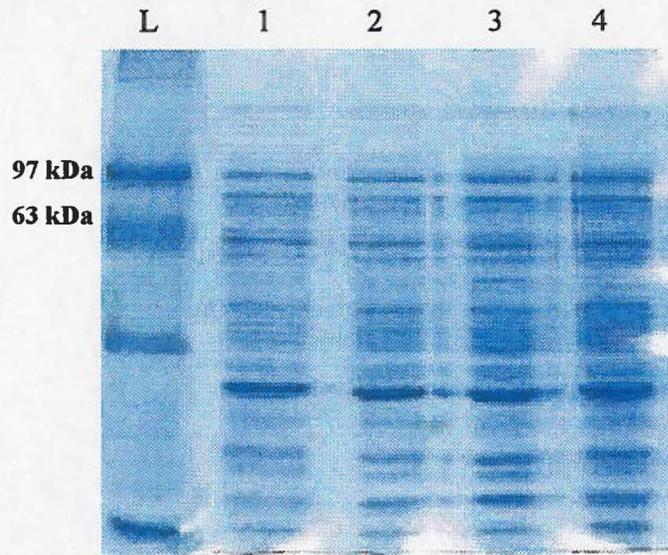
3 = 3 h après induction

4 = 4 h après induction

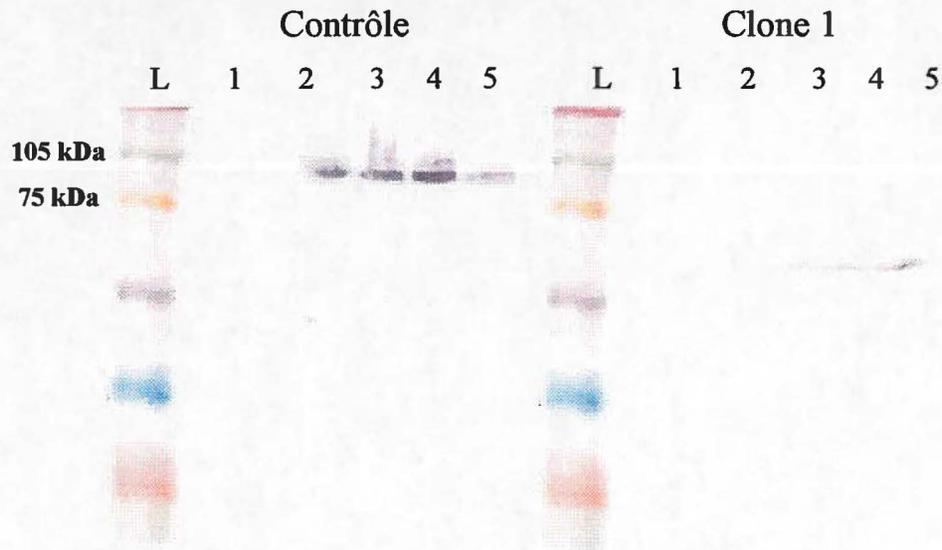
5 = 5 h après induction

6 = 6 h après induction

7 = 7 h après induction



A)



B)

Figure 11. Résultats de l'expression de la fusion BxlR-Intéine chez un clone de *E. coli*. L'expression de la protéine de fusion a été vérifiée par électrophorèse en présence de SDS (A) et par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-Intéine (B). Le plasmide contrôle contient une fusion de la MBP avec l'intéine (poids moléculaire total 89 kDa) et il a été fourni avec la trousse IMPACT.

L = Standard de poids moléculaire
 1 = Avant induction
 2 = 2 h après induction

3 = 4 h après induction
 4 = 6 h après induction
 5 = 8 h après induction

4.2 Purification de BxlR et BxlS avec la trousse pMAL

4.2.1. Clonage des gènes *bxlR* et *bxlS* dans le plasmide pMal-c2E

Le clonage des gènes *bxlR* et *bxlS* dans le plasmide pMal-c2E a été réalisé de la même façon que dans pCYB2 (section 4.1.1). Par contre, les produits de PCR purifiés ont été clonés aux sites *KpnI* et *HindIII* dans le vecteur pMal-c2E (Figure 12). Le clonage des gènes *bxlR* et *bxlS* dans le plasmide pMal-c2E a donné les plasmides pIAF 302 et pIAF 303 (Figures 13 et 14). Ces plasmides ont été transformés dans *E. coli* DH11S. Comme mentionné à la section 4.1.1, les colonies résistantes à l'ampicilline ont ensuite été isolées, digérées par *KpnI* et *HindIII* et séparées en gel d'agarose afin de vérifier la présence d'un insert de masse moléculaire attendue. Le clonage de *bxlR* a donné seulement un clone qui contenait l'insert attendu. Également pour *bxlS*, des 10 transformants analysés, seulement un contenait un insert de masse moléculaire attendue. Cependant, la digestion des plasmides des 9 autres transformants obtenus pour *bxlS* a engendré plusieurs bandes inattendues à des masses moléculaire variées, autres qu'au poids correspondant au plasmide ou à l'insert.

4.3 Purification de la protéine de fusion BxlR-MBP

4.3.1. Expression des fusions BxlR-MBP et BxlS-MBP dans *E.coli*

Les deux clones positifs mentionnés à la section 4.2.1, soit celui pour *bxlR* et celui pour *bxlS*, n'ont pas été séquencés, nous avons plutôt vérifié l'expression des fusions BxlR-MBP et BxlS-MBP par électrophorèse en présence de SDS (Figures 15 et 16). Comme pour le système IMPACT (section 3.9), l'expression de la protéine de fusion est inductible par l'ajout d'IPTG au milieu de culture. Le clone obtenu avec le clonage de *bxlR* dans pMal-c2E présente une induction apparente d'une protéine ayant une masse

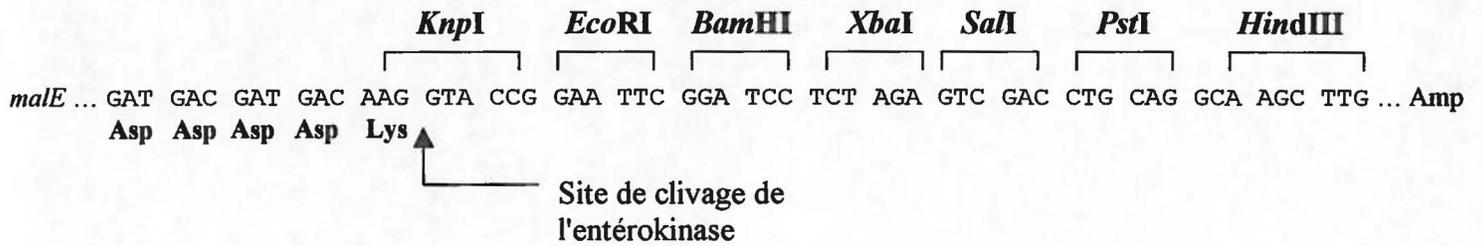
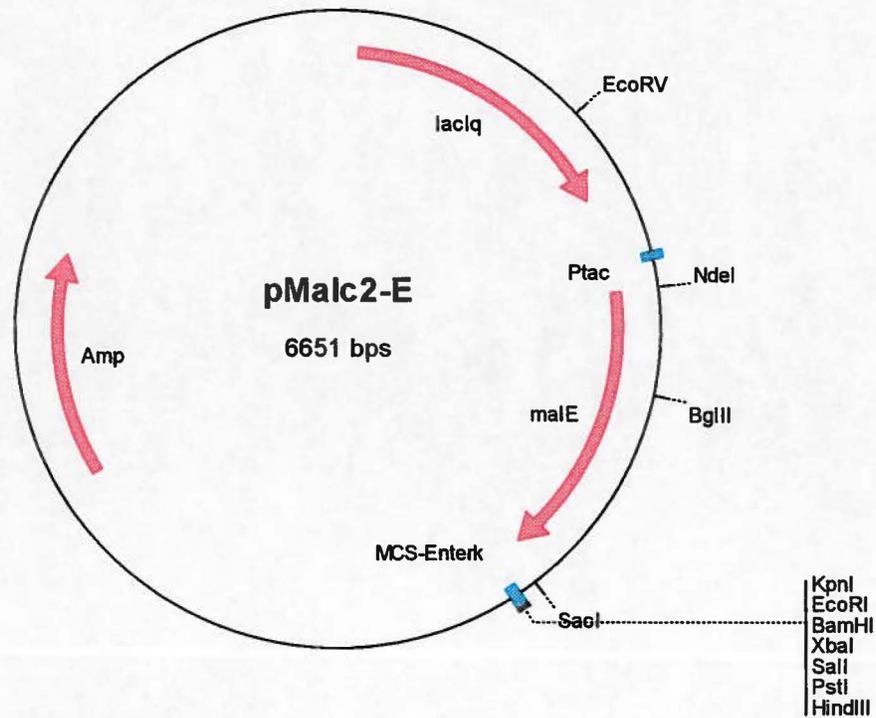


Figure 12. Carte physique du plasmide d'*E. coli* pMalc2-E. On retrouve le site de clivage de l'entérokinase entre le gène *malE* et la cassette de clonage.

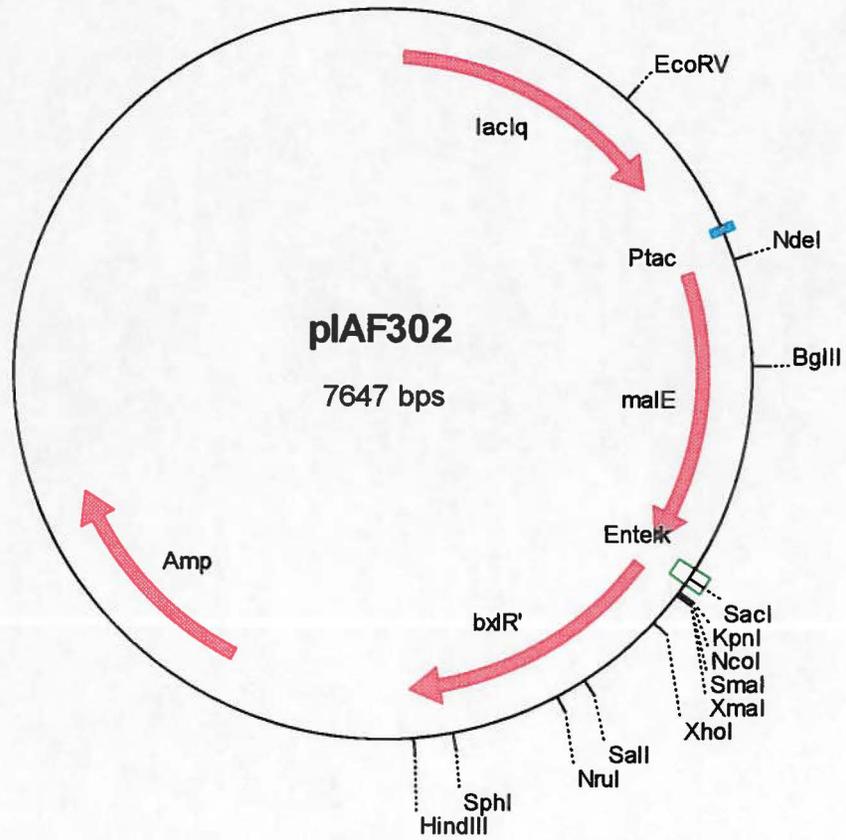


Figure 13. Carte physique du plasmide d'*E. coli* pIAF 302. Ce plasmide est le produit du clonage du gène *bxlR* dans le plasmide pMalc2-E

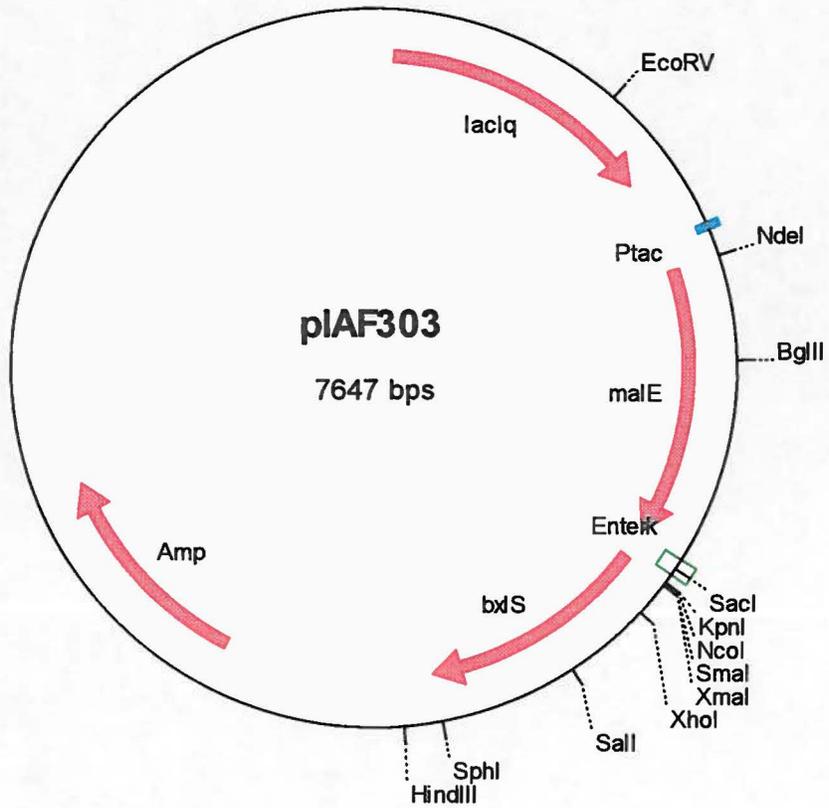


Figure 14. Carte physique du plasmide d'*E. coli* pIAF 303. Ce plasmide est le produit du clonage du gène *bxlS* dans le plasmide pMalc2-E

moléculaire correspondant à la masse moléculaire théorique de la protéine de fusion BxlR-MBP (79 kDa ; 37 kDa pour BxlR et 42 pour MBP) (Figure 15A). Puisque BxlR et CcpA ont une forte homologie et que des anticorps anti-BxlR n'étaient pas disponibles, les anticorps anti-CcpA ont été utilisés pour vérifier la présence de BxlR. L'immunodétection réalisée sur les protéines produites avec les anticorps anti-MBP et anti-CcpA montre la présence évidente d'une protéine qui semble être à la masse moléculaire théorique de la protéine de fusion BxlR-MBP (Figure 15B). Par contre, le clone avec le gène de *bxlS* dans pMal-c2E ne présente pas d'induction manifeste et l'immunodétection réalisée avec les anticorps anti-MBP ne révèle pas la présence de la protéine de fusion BxlS-MBP (Figure 16A et 16B).

La protéine de fusion BxlR-MBP a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine d'amylose selon le protocole décrit à la section 3.12. Le contenu protéique de la fraction résultant de l'élution de la résine d'amylose a été séparé par électrophorèse en présence de SDS et visualisées par la coloration du gel au bleu de Coomassie et par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-MBP et anti-CcpA. La coloration au bleu de Coomassie révèle la purification partielle d'une protéine ayant une masse moléculaire estimée à 80 kDa. Ceci concorde avec la masse moléculaire théorique de la protéine de fusion BxlR-MBP (79 kDa). L'immunodétection réalisée avec les anticorps anti-MBP et anti-CcpA confirme la purification de la protéine BxlR en fusion avec la protéine MBP (Figure 15A et 15B).

4.4 Clivage de la protéine de fusion BxlR-MBP par l'entérokinase

Cinquante microgrammes de la protéine de fusion BxlR-MBP purifiée ont été incubée avec 15 ng d'entérokinase pendant 16 h. Des échantillons ont été prélevés à 2, 4, 6, 8 et 16 h d'incubation. Chaque échantillon a été analysé par immunodétection effectuée avec les anticorps anti-CcpA (Figure 17). Après 2 h d'incubation, il y a apparition d'une protéine à environ 37 kDa (Figure 17a). Cette bande paraît plus intense après 4 h d'incubation mais

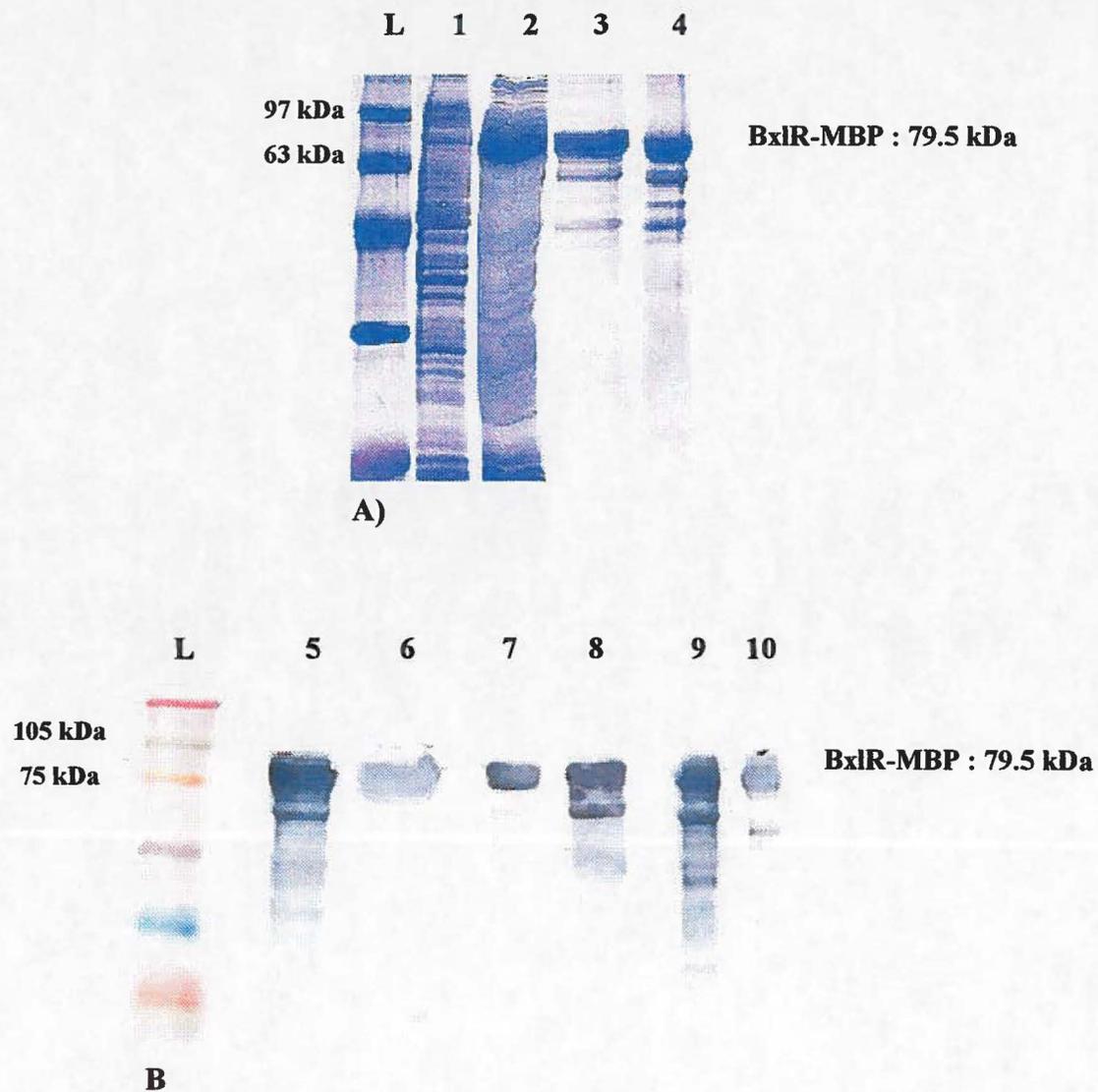
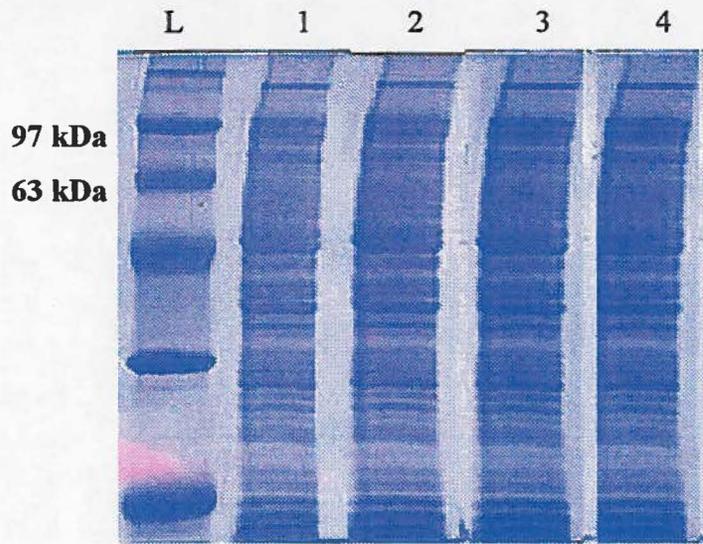


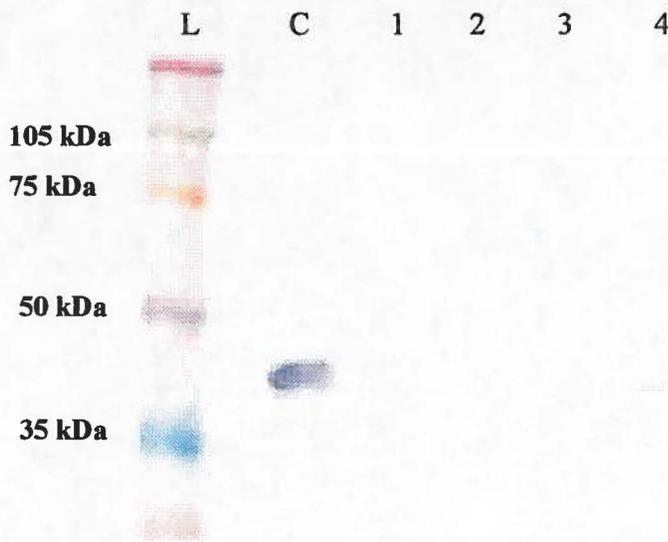
Figure 15. Résultat de l'expression de la fusion BxlR-MBP dans *E. coli*. La production de la protéine de fusion et sa purification ont été vérifiées par électrophorèse en présence de SDS (A) et par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-MBP et anti-CcpA (B)

L : Standard de poids moléculaire
 1 : Avant induction
 2 : 2 h après induction
 3 : Après chromatographie d'affinité
 4 : Contrôle = Fusion BxlR-MBP purifiée par Larocque (1998)
 5 : 2 h après induction avec anti-MBP

6 : 2 h après induction avec anti-CcpA
 7 : Après chromatographie d'affinité avec anti-CcpA
 8 : Après chromatographie d'affinité avec anti-MBP
 9 : Contrôle avec anti-MBP
 10 : Contrôle avec anti-CcpA



A)



B)

Figure 16. Résultats de l'expression de la fusion Bx1S-MBP chez un clone de *E. coli*. L'expression de la protéine de fusion a été vérifiée par électrophorèse en présence de SDS (A) et par immunodétection de type Western avec des anticorps anti-MBP (B). Le contrôle est de la MBP pure (poids moléculaire 42 kDa) fourni avec la trousse pMal.

L = Standard de poids moléculaire
 C = Contrôle
 1 = Avant induction

2 = 2 h après induction
 3 = 4 h après induction
 4 = 6 h après induction

semble rester stable jusqu'à 16 h. Cependant la bande correspondant à la protéine de fusion est toujours présente et ne diminue pas d'intensité en fonction du temps d'incubation avec l'entérokinase. Une faible quantité de SDS a été ajoutée à la réaction de clivage dans le but de défaire la structure tri-dimensionnelle de BxIR et ceci afin d'exposer davantage le site de clivage de l'entérokinase. Ceci a eu une influence sur le résultat de cette réaction. Après 2 h d'incubation, il y a apparition de la protéine à environ 37 kDa en plus de trois autres protéines de masse moléculaire plus faible (Figure 17B). La quantité de toutes les protéines observées par immunodétection diminuent en fonction du temps d'incubation et elles disparaissent complètement après 16 h.

4.5 Études de protection de l'ADN à la DNase I

BxIO a été amplifié par PCR à partir du plasmide p1H10 avec les amorces MAR16 et MAR25, purifié et finalement marqué à l'ATP [γ - 32 P]. Une étude de protection de l'ADN à la DnaseI a été effectuée avec cette région d'ADN et la protéine de fusion BxIR-MBP purifiée par Larocque (1998) (Figure 18). Cette étude a démontré que la protéine de fusion BxIR-MBP s'attache et protège une région de 52 pb et que le palindrome CGAAACTTTCG se trouve dans la région protégée (Figure 16A). Nous ne constatons aucune région protégée lorsque que la même expérience est réalisée avec seulement la MBP (Figure 16B).

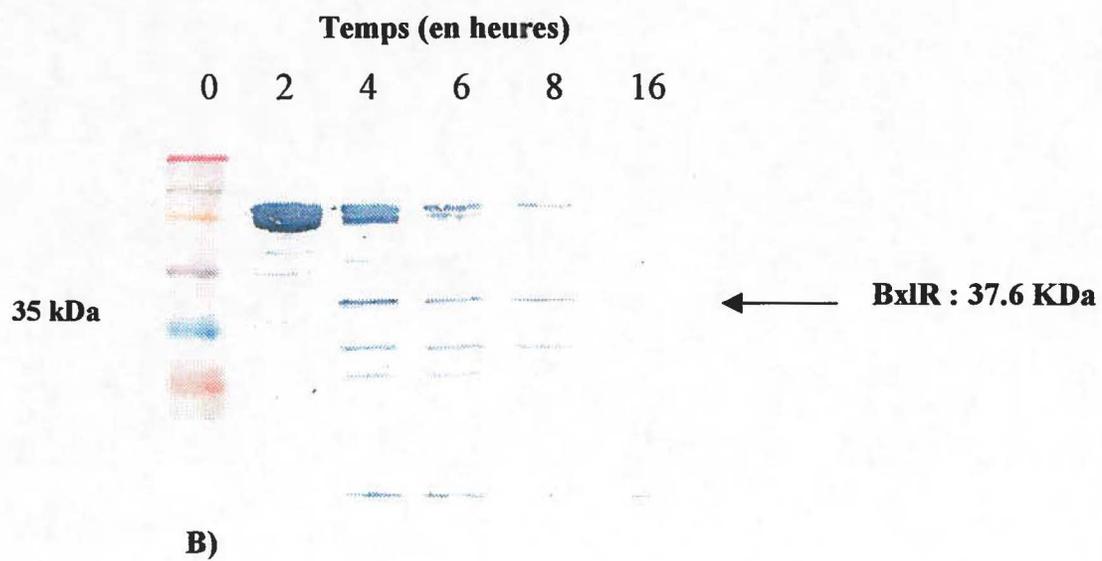
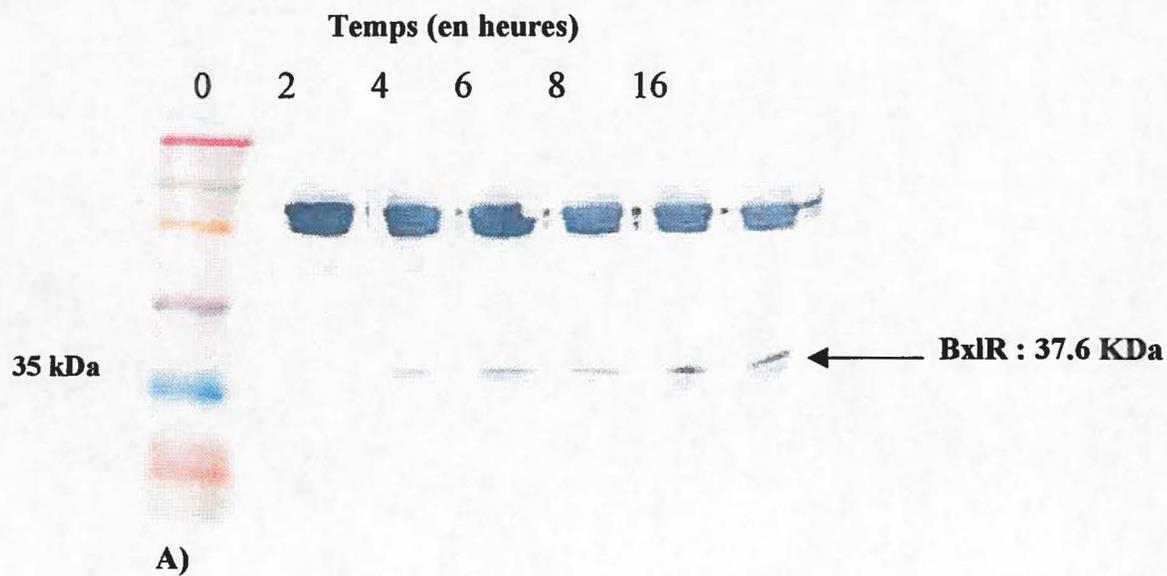


Figure 17. Clivage de la fusion BxlR-MBP par l'entérokinase en fonction du temps suivi par immunodetection de type Western avec des anticorps anti-CcpA. A) en absence de SDS B) en présence de 0.05% SDS.

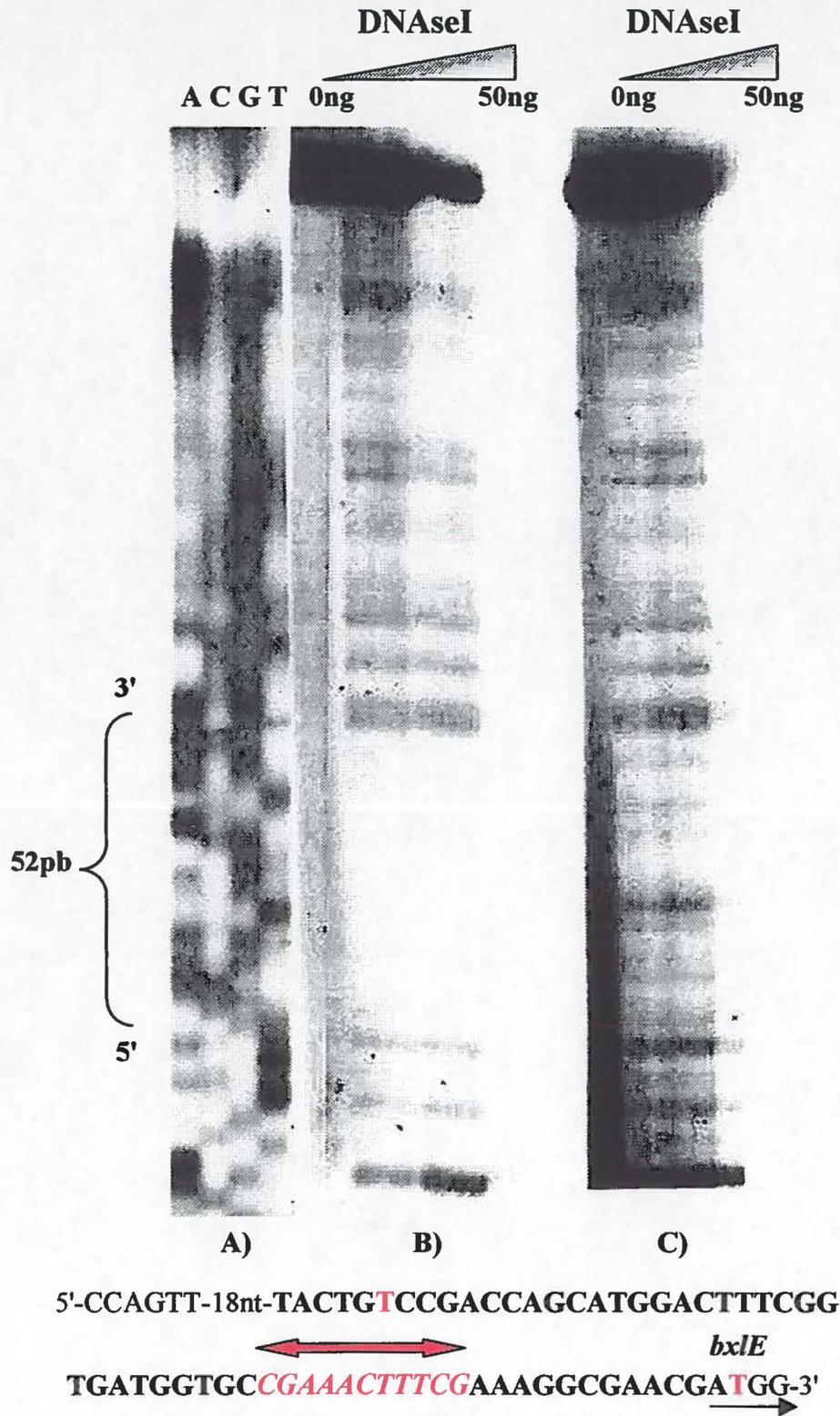


Figure 18. Résultat de l'étude de protection de l'ADN à la DNase I pour la région opératrice de l'opéron *bxl*. Le complexe protéine-ADN a été traité avec des quantités croissantes de DNase I.

A) Résultat du séquençage de la région opératrice de l'opéron *bxl* à partir de l'amorce MAR16.

B) Un produit de PCR de 474 pb qui contenait la séquence de la région opératrice de l'opéron *bxl* incubée avec une fusion de *bxlR* avec MBP.

C) Un produit de PCR de 474 pb qui contenait la séquence de la région opératrice de l'opéron *bxl* incubée avec le MBP.

5. DISCUSSION

5.1 Purification des protéines BxlR et BxlS avec le système IMPACT

Les essais réalisés avec la trousse IMPACT afin de purifier les protéines BxlR et BxlS n'ont pas donné les résultats escomptés. Il est probable que ceci serait dû à un faible taux de transcription des gènes codants ces protéines dans le vecteur pCYB2. Le résultat du séquençage du gène *bxlS* confirme que celui-ci a été inséré dans le bon cadre de lecture. Également, la digestion enzymatique de l'ADN plasmidique du clone obtenu pour *bxlR* a démontré la présence d'un insert de masse moléculaire attendue cloné dans le plasmide pCYB2. Cependant, le résultat de l'électrophorèse en présence de SDS ne présentait pas une induction manifeste des protéines de fusion BxlR-intéine et BxlS-intéine chez les clones positifs (Figure 9A et 10A). Également, l'immunodétection réalisée avec les anticorps anti-intéine n'a pas révélé la présence des protéines de fusion BxlR-intéine et BxlS-intéine comparativement au contrôle. Il est donc probable que l'absence de détection des deux protéines par coloration au bleu de Coomassie et par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-intéine soit le reflet d'une absence ou d'une faible transcription (Figures 9 et 10). Il est à remarquer que la compagnie New England BioLabs ne vend plus la trousse IMPACT avec le promoteur Ptac. Leurs nouveaux vecteurs d'expression (les vecteurs pTYB) contiennent plutôt le promoteur T7. Une autre hypothèse est que, en plus d'un faible taux de transcription, les fusions BxlR-intéine et BxlS-intéines seraient dégradées par des protéases lors de la culture des clones à 30°C. Il se peut qu'en effectuant la culture des clones à une température plus basse que 30°C ceci aille comme effet de diminuer l'action des protéases.

5.2 Purification de BxlR et BxlS avec le système pMAL

Suite aux échecs avec le système IMPACT, celui-ci a été abandonné en faveur de la trousse pMAL. Ce système de purification a été choisi vu les réussites de Larocque (1998) à exprimer la protéine BxlR fusionnée à la protéine MBP, avec un rendement de l'ordre de 5 mg de protéine de fusion par 500 ml de culture en phase exponentielle de croissance. La différence entre le système utilisé par Larocque et celui rapporté dans cette étude est au niveau du site de clivage permettant la séparation de BxlR du MBP. Dans la protéine de fusion BxlR-MBP purifiée par Larocque, on retrouvait plutôt le site de clivage reconnu par la protéase nommé facteur Xa, soit I-E-G-R. Toutefois, tel que mentionné à la section 2.7.1, les expériences réalisées par Larocque n'ont pas permis de cliver la fusion et donc de séparer BxlR de la MBP.

Tel que mentionné à la section 4.3, une protéine de fusion BxlR-MBP a été purifiée. Après un passage sur la résine d'amylose, le contenu protéique de la fraction résultant de l'éluion a été séparé par électrophorèse en présence de SDS et visualisées par la coloration du gel au bleu de Coomassie. Cette fraction semble contenir, en plus de la protéine de fusion BxlR-MBP, d'autres protéines de masse moléculaire apparente plus faible que celle de la protéine de fusion BxlR-MBP (Figure 15A). Le manuel d'utilisation de la compagnie New England BioLabs explique ce fait par la présence d'autres protéines qui peuvent se lier par affinité à l'amylose et au maltose, comme la MBP endogène de *E. coli* ou d'autres protéines cytoplasmiques. Le même patron de protéines et donc possiblement les mêmes protéines, ont été retrouvées dans la fraction contenant la fusion BxlR-MBP purifiée par Larocque (1998).

L'analyse par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-MBP révèle également la présence d'une autre protéine dans l'échantillon protéique purifié (Figure 15B). Une hypothèse possible serait que le résultat observé par immunodétection représente soit un produit dégradation de la protéine de fusion, soit une traduction incomplète de celle-ci, soit une forme non réduite de la protéine de fusion.

De même, on peut discerner deux protéines de faible intensité sous celle montrant la fusion BxIR-MBP lors de l'analyse par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-CcpA de l'échantillon protéique purifié (Figure 15B).

La protéine de fusion BxIR-MBP purifiée a été incubée avec l'entérokinase afin de séparer la protéine BxIR de la MBP. Des échantillons ont été prélevés après 2, 4, 6, 8 et 16 h d'incubation et analysés par immunodétection effectuée avec des anticorps anti-CcpA (Figure 17). La détection d'une protéine unique ayant une masse moléculaire similaire à celle de BxIR, soit 37 kDa, après 2 h de clivage (Figure 17A), indique que le clivage de la fusion a réussi. Cette bande paraît plus intense après 4 h d'incubation mais semble rester stable jusqu'à 16 h et la bande correspondante à la protéine de fusion est toujours présente et ne diminue pas d'intensité en fonction du temps de clivage. On s'attendrait à voir une protéine à 37 kDa augmenter d'intensité en fonction du temps de clivage alors que celle représentant la protéine de fusion devrait plutôt diminuer. Le résultat obtenu semble révéler un clivage partiel de la protéine de fusion par l'entérokinase. Comme il a été mentionné à la section 2.2, les membres de la famille GalR-LacI, possède un domaine à l'extrémité amino-terminale de type hélice-tour-hélice (HTH). Il est probable que cette conformation encombre l'accès de l'entérokinase à son site de clivage, diminuant ainsi son efficacité à cliver la fusion BxIR-MBP. Tel que mentionné à la section 4.4 une faible quantité de SDS a été ajoutée à la réaction de clivage dans le but de défaire la structure tri-dimensionnelle de BxIR et ceci afin d'exposer davantage le site de clivage de l'entérokinase.

L'ajout de SDS a eu une influence manifeste sur le clivage de la fusion BxIR-MBP. Après 2 h d'incubation, il y a apparition de la protéine à environ 37 kDa en plus de trois autres bandes de masse moléculaire plus faible (Figure 17B). Toutes les protéines détectées lors de l'analyse Western diminuent en fonction du temps d'incubation et disparaissent complètement après 16 heures. Ceci semble indiquer un clivage complet de la protéine de fusion et également la dégradation de BxIR. Ce résultat était inattendu étant donné le fait que l'entérokinase est une protéase spécifique qui clive après la lysine du site D-D-D-D-K et on ne retrouve pas cette séquence dans BxIR. Par contre, le manuel

d'utilisation de l'entérokinase mentionne que celle-ci clive parfois après d'autres résidus basiques dépendant de la conformation de la protéine à cliver. BxlR est composé à 15 % d'acides aminés basiques (34 R, 11 H et 4 K sur 338 aa) et le fait d'avoir défait sa structure tri-dimensionnelle, exposant ainsi davantage ses acides aminés basiques, aurait pu favoriser l'activité non-spécifique de l'entérokinase. Il est donc probable que les bandes de masse moléculaire apparente plus faible que celle de BxlR (Figure 17B) représentent le résultat d'un clivage non-spécifique de la fusion BxlR-MBP par l'entérokinase. Comme il a été mentionné plus haut, les signaux détectés par immunodétection, soit la protéine de fusion à 79.5kDa, BxlR à 37.6 kDa et les produits du clivage non-spécifique de BxlR, diminuent en fonction du temps d'incubation et disparaissent complètement après 16 h. Ceci soutient l'hypothèse d'un clivage non-spécifique car on s'attendrait à ce que ce phénomène résulte en la dégradation complète de la protéine de fusion et des produits du clivage de celle-ci. Une autre hypothèse serait que BxlR soit instable après avoir été libérée de la fusion et donc il se pourrait que celle-ci se dénature pendant la réaction de clivage de la protéine de fusion.

5.3 Régulation du système xylanolytique de *S. lividans*

Le fait de retrouver une séquence conservée présentant un caractère palindromique 5'-CGAAACTTTCG-3' au niveau des régions promotrices de certains gènes du système xylanolytique de *S. lividans* suggère que l'expression de ces gènes soit régulée de concert par un opérateur et donc par le même régulateur en trans. Il a été montré par des études d'altération de la mobilité électrophorétique que la protéine BxlR se fixe spécifiquement sur cette séquence (Larocque, 1998). Par ailleurs, outre sa capacité à se fixer sur cette séquence, BxlR présente également de fortes homologues avec d'autres protéines qui ont un rôle de régulateur de la transcription. Ainsi, même si aucune donnée expérimentale *in vivo* n'a pu démontrer son rôle, on peut penser que BxlR est le régulateur de certains gènes du système xylanolytique possédant cette séquence palindromique dans leur région promotrice.

Dans le cas de la région opératrice de l'opéron *bxl*, ce palindrome se situe entre le promoteur et le site d'initiation de la transcription du gène *bxlE* (Figure 2). De ce fait, BxlR en se fixant sur cette séquence inhiberait la transcription de ce gène et du reste de l'opéron, et agirait donc comme un répresseur. Chez les autres gènes du système xylanolytique, la séquence palindromique est toujours en amont des promoteurs et la distance qui sépare le palindrome du promoteur varie (de 24 nt pour *msiK* à 9 nt pour *xlnB* et *xlnC*, Figure 2). Conséquemment on peut envisager deux possibilités: en se fixant sur le palindrome, BxlR "cache" le promoteur empêchant ainsi la transcription du gène ou elle ne "cache" pas le promoteur et pourrait plutôt activer la transcription. Afin d'avoir une meilleure idée sur la fonction de BxlR, soit comme activateur ou répresseur du système xylanolytique, on doit au préalable identifier la séquence complète où cette protéine se fixe.

5.4 Études de protection de l'ADN à la DNase I

La détermination de la séquence nucléotidique susceptible d'être protégée par BxlR a été réalisée par une étude de protection de l'ADN lors d'un traitement à la DNaseI. La protéine de fusion BxlR-MBP a été incubée avec un produit de PCR de 474 pb qui contenait la séquence de la région opératrice de l'opéron *bxl*. Ensuite, ce complexe protéine-ADN a été traité à la DNaseI. Le résultat a démontré que la fusion BxlR-MBP protégeait une région d'ADN de 52 pb qui contient la séquence palindromique 5'-CGAAACTTTCG-3'. Ce résultat confirme celui de Larocque, c'est-à-dire que BxlR se fixe sur le palindrome 5'-CGAAACTTTCG-3' mais il nous permet également de connaître la région d'ADN totale protégée par la fusion BxlR-MBP lorsqu'elle se fixe sur le palindrome. Ainsi une région de 52 pb qui débute à la région -35 du promoteur jusqu'au site d'initiation de la transcription du gène *bxlE*. Étant donné que toute la région opératrice de l'opéron *bxl* a été utilisée lors de cette expérience, ce résultat nous indique aussi que BxlR ne se fixe pas ailleurs dans cette région. Par conséquent, le rôle de BxlR dans la régulation de l'opéron *bxl* ne peut être que celui d'un répresseur. Cependant ce

résultat a été obtenu avec une protéine de fusion qui est plus grosse que BxlR seule. En effet, la protéine de fusion BxlR-MBP (79 kDa) a une masse moléculaire deux fois plus grande que celle de BxlR (37 kDa). Il se pourrait que la protéine de fusion BxlR-MBP protège une région plus grande que BxlR seule due à un encombrement stérique causé par la MBP. Effectivement, ce qu'on retrouve dans la littérature au sujet des régions protégées par d'autres régulateurs de la famille LacI-GalR ne concorde pas avec le résultat obtenu avec la protéine de fusion BxlR-MBP. Rolfes et Zalkin (1988) rapportent que le répresseur PurR, une protéine de 38 kDa, protège une région d'ADN de 23 pb. De même, Mortensen et collaborateurs (1989) rapportent que DeoR, un répresseur de 28,5 kDa, protège une région de 16 pb.

Toutefois, les résultats obtenus par l'étude de protection de l'ADN à la DNaseI permettent de préciser que la taille de la région protégée entre la fin du palindrome et la région -35 du promoteur du gène *bxlE* est de 13 pb. Dans le cas des gènes *xlnA* et *msiK* la distance entre la fin du palindrome et la région -35 du promoteur (20pb) pourrait être trop importante pour que BxlR puisse exercer un rôle de répresseur (Figure 2). Par contre, dans le cas de *xlnB* et *xlnC*, cette distance est de 9 pb, ce qui pourrait permettre à BxlR de se fixer au moins en partie sur la région -35 et de réprimer ces gènes. À l'inverse, cette distance pourrait ne pas être suffisante pour que BxlR affecte la transcription négativement. Par contre, l'étude de protection de l'ADN à la DNase I de ces région n'a pu être réalisée faute de temps. Conséquemment, à ce stade de l'étude, il n'est pas possible de tirer une conclusion. Un moyen d'apporter un élément de réponse serait de voir l'effet de la délétion de *bxlR* sur l'activité des enzymes du système xylolytique. En effet, le fait d'avoir une souche possédant une délétion chromosomique du gène *bxlR* permettrait de constater l'effet de l'absence de cette protéine sur le niveau d'expression des autres protéines du système xylolytique.

Si la fonction précise de BxlR n'est pas clairement établie, certaines données obtenues dans des systèmes similaires attribuent au régulateur un rôle à la fois de répresseur et d'activateur. Ainsi, van Wezel et collaborateurs (1997) rapportent que le régulateur MalR de *S. coelicolor* pourrait jouer à la fois un rôle d'activateur et de répresseur suivant la

séquence sur laquelle la protéine se fixe. Selon van Wezel et collaborateurs (1997), MalR activerait la transcription du gène *malE* lorsque celle-ci se fixe à la séquence répétée 5'-CTTGCA-3', qui se retrouve à 176 pb de la région -35 du promoteur du gène *malE*. De même, MalR réprime la transcription du gène *malE* lorsque cette protéine se fixe à la séquence palindromique 5'-TCTTGC-11pb-GCAAGA-3' qui se retrouve entre le promoteur et le site d'initiation de la transcription du gène *malE*. Delic et collaborateurs (1992) ont rapporté également ce même mécanisme de régulation chez le gène codant la chitinase de *S. plicatus*. Cependant, ils n'ont pas identifié le régulateur de ce gène.

Dans le cas de BxlR, il paraît peu probable qu'une région autre que celle mise en évidence par l'étude de protection de l'ADN à la DNaseI soit impliquée. À ce stade, même si une fonction de répresseur ne peut lui être attribuée de façon évidente, il est raisonnable de penser que BxlR est le répresseur du système xylanolytique car on peut difficilement imaginer qu'une même protéine puisse avoir des effets opposés sur des gènes qui ont le même but, soit permettre à la bactérie d'utiliser le xylane comme source de carbone.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs Dieter Kluepfel et François Shareck pour leurs nombreux conseils et surtout pour leur patience. Je sais que je n'ai pas toujours été "l'étudiant parfait". Merci à Lise Trempe pour son aide dans mon travail, pour son humour et sa bonne humeur. Merci à tout le monde du labo pour votre gentillesse et pour m'avoir écouté quand ça allait mal: Maité, Stéphanie, Martin, Valérie, Thuy et Daniel. Merci à tous les membres du groupe des streptomycètes pour leurs commentaires et suggestions lors des rencontres de groupe. Je remercie également la Fondation Armand-Frappier et le Ministère de l'Industrie, Commerce, Science et Technologie du Québec pour la bourse qu'ils m'ont accordée pour la durée de ma maîtrise.

En dehors du labo, j'aimerais remercier ma copine Sylvie et mes parents pour leur support (morale et financier) et leurs encouragements tout au long de mes études. Également, j'aimerais remercier tous les joueurs de volleyball et de hockey bottine qui venaient jouer le midi et écouter mes niaiseries (Pat "My Main Man" St-Pierre, Martin "La catapulte" Leduc, Roberge aka "The Rat", Steph Ostiguy, Louis "The Root" Racine, Serge "I can kill a bear with my bare hands" Durand, José Marcoux, Hania, Christine, Pascale, M-C, Danielle, Raymonde, etc, you know who you are.). "Who's your Daddy?". Merci à vous tous, it was fun.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Aslanidis, C. et Schmitt, R. 1990. Regulatory elements of the raffinose operon: nucleotide sequences of operator and repressor genes. *J. Bacteriol.* **172**: 2178-2180
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, **72**, 248 -254
- Biely, P., Mislovicova, D. et Toman, R. 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-beta-xylanases and endo-1,4-beta-glucanases. *Anal. Biochem.* **144**: 142-146
- Biely, P., Kluepfel, D., Morosoli, R. et Shareck, F. 1993. Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1162**: 246-254
- Bussey, L.B. et Switzer, R.L. 1993. The *degA* gene product accelerates degradation of *Bacillus subtilis* phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 6348-6353
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., et Xu, M.-Q 1997. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* **192**: 277-281.
- Cowan, P.J., Nagesha, H, Leonard, L., Howard, J.L. et Pittard, A.J. 1991. Characterization of the major promoter for the plasmid-encoded sucrose genes *scrY*, *scrA*, and *scrB*. *J. Bacteriol.* **173**: 7464-7470
- Dassa, E. et Hofnung, M. 1985. Homologies between integral proteins of the inner membrane of binding protein transport systems in enterobacteria. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **136A**: 281-288
- Delic, I., Robbins, P. et Westpheling J. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 1885-1889
- Devereux, J., Haerberli P. et Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387-95
- di Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. et Inouye, H. 1988. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30
- Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* **319**: 881-886
- Flandroy, L. 1991. Industrie papetière: une page à tourner. *Biofutur* (juin): 21-35

- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M, *et al.* 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512
- Gerlach, P., Valentin-Hansen, P. et Bremer, E. 1990. Transcriptional regulation of the *cytR* repressor gene of *Escherichia coli*: autoregulation and positive control by the cAMP/CAP complex. *Mol. Microbiol.* **4**: 479-488
- Ghose, T.K. et Bisaria, V.S. 1979. Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 131-146
- Giannotta, F., Georis, J., Moreau, A., Mazy-Servais, C., Joris B. et Dusart, J. 1996. A sequence-specific DNA-binding protein interacts with the *xlnC* upstream region of *Streptomyces sp.* strain EC3. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**: 91-97
- Gilbert, W. et Muller-Hill, B. 1967. The lac operator is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**: 2415-2421
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**: 13-39
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M. et Wallace, J.C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 6602-6606
- Henkin, T.M., Grundy, F.J., Nicholson, W.L et Chambliss, G.H. 1991. Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**: 575-584
- Henrissat, B. et Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696
- Hindle, Z. et Smith, C.P. 1994. Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* **12**: 737-745
- Hodgson, D.A. 1982. Glucose repression of carbon uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2417-2430
- Hueck, C., Kraus, A. et Hillen, W. 1994. Sequences of *ccpA* and two downstream *Bacillus megaterium* genes with homology to the *motAB* operon from *Bacillus subtilis*. *Gene* **143**: 147-148

- Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **17**: 367-377
- Iida, A., Teshiba, S. et Mizobuchi, K. 1993. Characterization of rbsR: the repressor gene for ribose operon in *Escherichia coli*. Unpublished.
- Ingram, C., Delic, I. et Westpheling, J. 1995. *CcrA1*: a mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* **177**: 3579-3586.
- Kureishi, A et Bryan, LE. 1992. Pre-boiling high GC content, mixed primers with 3' complementation allows the successful PCR amplification of *Pseudomonas aeruginosa* DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 1155
- Küster, E., Luesink, E.J., de Vos, W.M. et Hillen, W. 1996. Immunological crossreactivity to the catabolite control protein CcpA *Bacillus megaterium* is found in many gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 109-115
- Kwakman, J.H. et Postma, P.W. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **176**: 2694-2698
- Lam, T. 1999. Purification et caractérisation de la protéine codée par le gène *bxlA* de *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larocque, D. 1998. Analyse moléculaire du locus *bxl* de *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec.
- Larocque, D. et Shareck, F. 1998. *Streptomyces lividans* *bxlS*, *bxlR*, *bxlE*, *bxlF*, *bxlG* and *bxlA* genes complete cds. Genbank AF043654
- LaVallie, E.R., Rehemtulla, A., Racie, L.A., DiBlasio, E.A., Ferenz, C., Grant, K.L., Light, A. et McCoy, J.M. 1993. Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol.Chem.* **268**: 23311-23317
- Lee, F. et Yanofsky, C. 1977. Transcription termination at the trp operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 4365-4369
- Lee, J.K. 1998. Characterization of *ccpA*, a gene coding for the catabolite control protein A of *Thermoactinomyces* sp. E79. Genbank AF055979

- Mach, R.L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M. et Kubicek, C.P. 1996. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol. Microbiol.* **21**: 1273-1281
- Majumdar, A. et Adhya, S. 1987. Probing the structure of gal operator-repressor complexes. Conformation change in DNA. *J. Biol. Chem.* **262**: 13258-13262
- Manin, C., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1994. Purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). *Biochem. J.* **302**: 443-449
- Matuschek, M., Sahm, K. et Bahl, H. 1997. Molecular characterization of genes encoding a novel ABC transporter in *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *Curr. Microbiol.* **35**: 237-239
- Mimura, S., Rao, U., Yoshino, S., Kato, M. et Tsukagoshi, N. 1999. Depression of the xylanase-encoding *cgxA* gene of *Chaetonium gracile* in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Res.* **153**: 369-376
- Moreau, A., Roberge, M., Manin, C., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1994. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* **302**: 291-295
- Mortensen, L., Dandanell, G et Hammer, K. 1989. Purification and characterization of the deoR repressor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**: 325-331
- Nguyen, J., Francou, F., Virolle, M.J. et Guerineau, M. 1997. Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by reg1, a pleiotropic regulatory gene. *J. Bacteriol.* **179**: 6383-6390
- Ni, X. et Westpheling, J. 1997. Direct repeat sequences in the Streptomyces chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 13116-13121.
- Nicholson, W.L., Park, Y.K., Henkin, T.M., Won, M., Weickert, M.J., Gaskell, J.A. et Chambliss G.H. 1987. Catabolite repression-resistant mutations of the *Bacillus subtilis* alpha-amylase promoter affect transcription levels and are in an operator-like sequence. *J. Mol. Biol.* **198**: 609-618
- Orejas, M., MacCabe, A.P., Perez Gonzalez, J.A., Kumar, S, et Ramon, D. 1999. Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. *Mol. Microbiol.* **31**: 177-184
- Pastan, I. et Adhya, S. 1976. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* **40**: 527-551

- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., Hopwood, D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96
- Reidl, J., Roemisch, K., Ehrmann, M. et Boos, W. 1989. MalI, a novel protein involved in regulation of the maltose system of *Escherichia coli*, is highly homologous to the repressor proteins galR, cytR, and lacI. *J. Bacteriol.* **171**: 4888-4899.
- Rolfes, R.J. et Zalkin, H. 1990. Autoregulation of *Escherichia coli* purR requires two control sites downstream of the promoter. *J. Bacteriol.* **172**: 5758-5766
- Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T. et Miyashita, K. 1998. *GlkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **180**: 2911-2914.
- Sadler, J.R., Sasmor, H. et Betz, J.L. 1983. A perfectly symmetric lac operator binds the lac repressor very tightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 6785-6789
- Saurin, W., Koster, W. et Dassa, E. 1994. Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **12**: 993-1004
- Schlosser, A., Jantos, J., Hackmann, K. et Schrempf, H. 1999. Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2636-2643
- Setlow, P. 1973. Inability of detect cyclic AMP in vegetative or sporulating cells or dormant spores of *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**: 365-372
- Shimotsu, H., Kuroda, M.I., Yanofsky, C. et Henner, D.J. 1986. Novel form of transcription attenuation regulates expression the *Bacillus subtilis* tryptophan operon. *J. Bacteriol.* **166**: 461-471
- Spiridonov, N.A. et Wilson, D.B. 1998. Isolation, characterization and cloning of CelR, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*. GenBank AF086819
- Sutcliffe, I.C., Tao, L., Ferretti, J.J. et Russell, R.R. 1993. MsmE, a lipoprotein involved in sugar transport in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **175**: 1853-1855
- Thomsen, L.E., Pedersen, M., Norregaard-Madsen, M., Valentin-Hansen, P. et Kallipolitis, B.H. 1999. Protein-ligand interaction: grafting of the uridine-specific determinants from the CytR regulator of *Salmonella typhimurium* to *Escherichia coli* CytR. *J. Mol. Biol.* **288**: 165-175

- Valentin-Hansen, P., Larsen, J.E., Hojrup, P., Short, S.A. et Barbier, C.S. 1986. Nucleotide sequence of the CytR regulatory gene of *E. coli* K-12. *Nucleic. Acids. Res.* **14**: 2215-2228
- van Peij, N.N., Gielkens, M.M., de Vries, R.P., Visser, J. et de Graaff, L.H. 1998. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3615-3619
- van Rooijen, R.J. et de Vos, W.M. 1990. Molecular cloning, transcriptional analysis, and nucleotide sequence of *lacR*, a gene encoding the repressor of the lactose phosphotransferase system of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 18499-18503
- van Wezel, G.P., White, J., Young, P., Postma, P.W. et Bibb, M.J. 1997. Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by *malR*, a member of the *lacl-galR* family of regulatory genes. *Mol. Microbiol.* **23**: 537-549
- Vincent, P., Shareck, F., Dupont, C., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1997. New alpha-L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **322**: 845-852
- Walter, S et Schrempf, H. 1996. The synthesis of the *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase) is regulated by both activation and repression mechanisms. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 186-195
- Weickert, M.J. et Adhya, S. 1992a. Isorepressor of the gal regulon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **226**: 69-83
- Weickert, M.J. et Adhya, S. 1992b. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *Biol. Chem.* **267**: 15869-15874
- Wong, J., K.K.Y., Tan, U.L. et Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Res.* **52**: 305-317
- Wu, J., Anderton-Loviny, T., Smith, C.A. et Hartley, B.S. 1985. Structure of wild-type and mutant repressors and of the control region of the *rbt* operon of *Klebsiella aerogenes*. *EMBO* **5**: 1339-1344