UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

.

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE

PAR

ESTHER TREMBLAY

ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU SYSTÈME XYLANOLYTIQUE DE Streptomyces lividans.

TABLE DES MATIÈRES

ii

TABLE DES MATIÈRES		
LISTE DES ABRÉVIATIONS		
LISTE DES FIGURES		
LISTE DES TABLEAUX		
SOMMAIRE		xii
INTRODUCTION		
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE		5
1.	INTRODUCTION	6
2.	CYCLE DE VIE	7
2.1 2.2	Primaire Secondaire	7 9
3.	RÉGULATION	11
3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6	Induction et répression Protéine activatrice Promoteurs Gène <u>bld</u> A: facteur de régulation ARN polymérase et facteurs sigma Système de régulation Deg chez <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	11 15 18 25 28 30
4.	SYSTÈME XYLANOLYTIQUE DE Cryptococcus albidus	34
OBJECTIFS D	DE LA RECHERCHE	37

(

ŧ.

		iii
MATÉRIEL ET MÉTHODES		
1.	LISTE DES PRODUITS	39
2.	SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES	41
3.	CONSERVATION ET CULTURE DES SOUCHES	41
3.1	Milieu pour la conservation des souches	41
3.2	Milieux de culture	42
3.2.1	Milieu pour la production d'inoculum	42
3.2.2	Milieu permettant la croissance et	
	l'induction de la biosynthèse de xylanases	42
323	Milieu solide servant à mesurer l'activité	
5.2.5	enzymatique	43
33	Les substrats	45
3.5	Dréparation de l'inducteur	44
2.4.1	Hudroluse enzymatique	44
2 4 2	Chromotographic par filtration aut col	44
2.4.2	Chromatographie par intration sur ger	43
3.4.3	Concomption des souches	40
3.3	Conservation des souches	49
3.0	Conditions de culture	49
3.6.1	Production d'inoculum	49
3.6.2	Croissance des cellules	50
3.6.3	Induction de l'ARN _m de xylanases	50
3.7	Observation au microscope	51
3.8	Test d'activité xylanasique	51
4.	MÉTHODE D'EXTRACTION DE L'ARN _m	52
4.1	Préparation de la verrerie et des solutions	52
4.2	Isolement d'ARN _m	53
4.3	Mesure de la densité optique	55
4.4	Visualisation de l'ARN: gel d'agarose	56
	Availut date	50
5.	HYBRIDATION DE L'ARN AVEC UNE	
	SONDE RADIOACTIVE	58
5.1	Buvardage de l'ARN	58

(

í

			iv
	5.2 5.2.1 5.2.2 5.3	Préparation de la sonde Marquage par déplacement de l'encoche Préparation de la colonne "spun" Pré-hybridation et hybridation	59 59 61 61
RÉSU	JLTATS		64
	1.	CHOIX DES CONDITIONS DE CULTURE	65
	1.1 1.2	Choix de la source de carbone Choix de l'inducteur	65 67
	2.	INDUCTION AVEC UN HYDROLYSAT (X_2-X_{10}) DE GLUMES D'AVOINE	E 70
	2.1	Préparation de l'hydrolysat de xylane de	70
	2.1.1 2.1.2	Séparation par filtration sur gel Analyse par HPLC	70 74
	3.	DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE D'APPARITION DES ARN _m DE XYLANASES	74
	3.1	Caractérisation des ARN	74
	3.2	trois xylanases	79
	4.	UTILISATION DES OLIGOXYLOSIDES	85
	4.1	Utilisation des oligoxylosides par la souche sauvage S. lividans 1326	85
	4.2	Utilisation des oligoxylosides par les clones S. lividans IAF 18, IAF 42 et IAF 20	90
DISC	USSION		100
	1.	CHOIX DE LA SOURCE DE CARBONE	101
	1.1 1.2	Répression par le glucose Effet du maltose	101 103

í

{

1.3	Effet du mannitol	103
1.4	Effet du glycérol	103
2.	INDUCTION	104
2.1	Les différents xylanes	104
2.2	Acide syringique et arabinose	105
2.3	Induction par des oligosides	105
2.3.1	Répression par le xylose	107
2.3.2	Induction par le $X_2 - X_{10}$	109
3.	PRÉPARATION DU SUBSTRAT (X2-X10)	109
4.	ISOLEMENT D'ARN	110
4.1	Choix de l'inhibiteur d'ARNase	110
4.2	Ultracentrifugation	111
5.	CHOIX DES SONDES ET HYBRIDATION	112
6.	RÉGULATION DU RÉGULON XYLANOLYTIQUE	115
6.1	Apparition des ARN _m	115
6.2	Régulation modulée par les produits de	117
63	Mécanisme de régulation	110
6.5	Apport métabolique de chaquine des vulanases	121
0.4	Apport metabolique de chacune des xylanases	121
CONCLUSION		124
REMERCIEMENTS		128
BIBLIOGRAPHIE	3	129

(

ł

v

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acide ribonucléique ARN ARNm Acide ribonucléique messager ARN₊ Acide ribonucléique de transfert DEPC Diéthylpyrocarbonate Diméthylsulfoxide DMSO Degré de polymérisation DP Chromatographie liquide à haute performance HPLC RBB Rémazol bleu brillant Bouillon de tryptone au soya TSB Hydrolysat de xylane contenant des oligomères de $X_2 - X_{10}$ deux à dix unités de xylose.

vi

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 4: Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène de la glutamine synthétase de *s. coelicolor*.....24
- FIGURE 5: Représentation schématique faisant la comparaison de séquences nucléotidiques de trois promoteurs de *Streptomyces* avec une région promotrice typique de *E. coli*......26

FIGURE 6a:	Représentation schématique du modèle de régula-
	tion médiée par la phosphorylation de DegS et
	DegU

- FIGURE 8: Chromatogramme des produits d'hydrolyse du xylane de glumes d'avoine: hydrolysé par la xylanase C, séparés par la colonne K 50/10072

l

- FIGURE 10: Migration en gel d'agarose de l'ARN isolé après différents temps d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%......78
- FIGURE 12: Contrôles positifs et négatifs pour les xylanases A, B et C......82
- FIGURE 13: Apparition des ARN_m spécifiques aux trois xylanases A, B et C après différents temps d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%83

- FIGURE 16: Chromatographie par HPLC du surnageant d'une culture de la souche S. lividans IAF 18 induite avec X_2-X_{10} 0,3% après différents temps91
- FIGURE 17: Chromatographie par HPLC du surnageant d'une culture de la souche S. lividans IAF 42 induite avec X_2-X_{10} 0,3% après différents temps93
- FIGURE 18: Chromatographie par HPLC du surnageant d'une culture de la souche S. lividans IAF 20 induite avec du X_2-X_{10} 0,3% après différents temps ...95

LISTE DES TABLEAUX

- TABLEAU IIIActivité xylanasique de la souche 1326 suite àl'induction avec X2-X10 de glumes d'avoine0,3%0,3%

SOMMAIRE

Streptomyces lividans produit trois xylanases différentes au cours de l'induction par le xylane. Les xylanases B et C hydrolysent le xylane en oligoxylosides de trois à dix résidus de xylose tandis que la xylanase A libère de ceux-ci principalement du xylobiose qui est une source de carbone assimilable grâce à l'action de la B-xylosidase. Toutes ces enzymes participent donc à la dégradation complète du xylane. Nous avons étudié l'apparition séquentielle des acides ribonucléiques messagers (ARN_m) de chacune des xylanases. Un hydrolysat de xylane de glumes d'avoine contenant des oligoxylosides de deux à dix molécules de xylose (X_2-X_{10}) a été utilisé parce que le xylane ne permet pas la préparation d'ARN pur à cause de ses propriétés physicochimiques semblables à celles de l'acide ribonucléique. L'ARN_m de la xylanase B apparaît après deux heures d'induction tandis que ceux des xylanases A et C ne sont visibles qu'après huit heures. Le xylose provoque de la répression soit catabolique ou par exclusion de substrat. Le xylobiose est l'inducteur direct du régulon. La régulation se fait au niveau transcriptionnel et est modulée par la cinétique du substrat.

xii

INTRODUCTION

(

iif E L'industrie des pâtes et papiers est une des plus importantes au Québec. Malheureusement, elle est aussi une des plus polluantes. Le blanchiment des pâtes pour l'obtention de papiers très blancs nécessite des produits chlorés qui réagissent avec la lignine formant des organochlorés, pas tous inoffensifs, qui sont relargués dans l'environnement (Flandroy, 1991).

Le bois est constitué de trois parties distinctes: la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Les fibrilles de cellulose sont entourées d'hémicellulose. Cette dernière est composée principalement de xylane pour le bois dur (Wong et al., 1988) et de mannane pour le bois mou (Ratto et Poutanen, 1988; Flandroy, 1991). La lignine enveloppe les fibres ainsi formées et est responsable de la coloration lorsqu'elle est présente dans les pâtes de papier. On doit donc enlever le maximum de la lignine afin d'obtenir un papier très blanc. Lors de la fabrication du papier, seule la cellulose est désirée. Étant donné que certaines enzymes (xylanases et mannanases) sont capables d'hydrolyser les hémicelluloses qui forment un lien entre la cellulose et la lignine (Eriksson et al., 1980), il serait intéressant de remplacer les étapes nécessitant du chlore par des hydrolyses enzymatiques qui ne polluent pas (Paice et al., 1988). Nous savons que les xylanases et les mannanases pourraient être utilisées à condition qu'elles soient produites en assez grande quantité. En effet, chaque année au Canada,

plusieurs milliers de tonnes de papier sont fabriquées (Flandroy, 1991). Dans ces conditions, il devient nécessaire d'améliorer tant la production que l'efficacité de ces enzymes.

Grâce aux biotechnologies, nous avons la possibilité d'augmenter la productivité de systèmes enzymatiques utiles en microbiologie industrielle. Il est maintenant possible de modifier autant les microorganismes que les enzymes elles-mêmes. Par exemple, la production de xylanase de la souche sauvage de *Streptomyces lividans* 1326 et de la souche IAF 18 a été accrue par des études sur les conditions de culture et d'induction (Bertrand et al., 1989). Les gènes codant la biosynthèse des xylanases ont été clonés de façon homologue pour obtenir des souches hyperproductrices de xylanases (Mondou et al., 1986; Vats-Mehta et al., 1990; Kluepfel et al., 1991).

Les protéines elles-mêmes peuvent être améliorées par mutagénèse du gène de structure ou chimiquement avec des agents qui vont agir sur des résidus spécifiques (Reinstein *et al.*, 1989). Des travaux complémentaires au niveau de la régulation des systèmes enzymatiques permettront d'augmenter les chances de réussite de l'amélioration des protéines.

La souche sauvage *Streptomyces lividans* 1326 produit trois xylanases : A, B et C. Ces xylanases se différencient par leurs séquences nucléotidique et amino-acidique (Shareck *et al.*, 1991), leur poids moléculaire ainsi que par leurs propriétés physicochimiques et leurs produits d'hydrolyse (Kluepfel *et*

al., 1986 et 1990). Le xylane étant une très grosse molécule, il ne peut pénétrer dans la cellule. Ceci implique que S. lividans doit produire constitutivement une petite quantité de xylanase de facon à obtenir l'inducteur qui peut entrer dans la cellule. L'induction de l' α -amylase de S.limosus est faite par de petites molécules telles le maltose et l'arabinose (Virolle et Bibb, 1988). Il est donc probable que les xylanases soient induites par le xylobiose. La xylanase A dégrade le xylane pour donner majoritairement du xylobiose et du xylotriose. Les xylanases B et C sont dites de type "endo" parce qu'elles hydrolysent leur substrat en créant des oligoxylosides de degré de polymérisation égaux ou supérieurs à trois (Kluepfel et al., 1991). Nous nous sommes intéressés à la séquence d'apparition de ces trois Nous avons procédé en hybridant les ARN_m produits xylanases. après l'induction avec des sondes spécifiques à chacune de ces enzymes. Cette étude avait aussi pour buts de mieux comprendre les différentes interactions entre les trois xylanases et leurs substrats ainsi que les phénomènes d'induction et de répression. Les streptomycètes présentent un degré d'organisation spatiale et physiologique plus élevé que la plupart des autres bactéries. Cela en fait un modèle intéressant pour étudier la régulation de la synthèse des protéines (Jiresova et al., 1983).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

1

ł.

Les streptomycètes font partie de la famille des actinomycètes. Ce sont des eubactéries Gram-positives dont le génome comporte 74% de guanine (G) et cytosine (C). Il est concevable que leur contenu génétique, riche en G + C, puisse avoir une influence substantielle sur leurs mécanismes régulateurs en augmentant la probabilité d'avoir des structures secondaires (Smith et Chater, 1988).

Ces saprophytes du sol obtiennent les nutriments nécessaires à leur sustentation par la sécrétion d'un grand nombre d'enzymes hydrolytiques extracellulaires incluant les protéases, amylases, cellulases, xylanases, lipases et nucléases (Buttner et al., 1987; Virolle et Bibb, 1988). Ces microorganismes filamenteux synthétisent aussi plusieurs antibiotiques médicaux importants ainsi que d'autres agents chimiothérapeutiques qui sont tous des métabolites secondaires (Fisher et Wray, 1989).

Leur cycle de vie étant très complexe, il serait bon de le définir avant d'élaborer sur la régulation. Nous traiterons ensuite de l'induction, de la répression, des protéines activatrices, des promoteurs, du gène <u>bld</u> A et des ARN polymérases, et des facteurs sigma associés à ces dernières. Nous pourrons ainsi mieux comprendre les différents facteurs impliqués dans la régulation.

2. CYCLE DE VIE

2.1 Primaire

1

Les streptomycètes ont un cycle complexe de différenciation morphologique ressemblant à celui des champignons filamenteux (Fig. 1). La formation du mycélium végétatif a lieu durant la phase primaire, suivie de l'apparition du mycélium aérien. La phase secondaire commence au moment de la production de spores.

Ces bactéries croissent en formant premièrement un réseau d'hyphes enchevêtrés (appelé mycélium végétatif) qui pénètre et dégrade le matériel organique complexe par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques. La différenciation peut apparaître lors de la croissance sur milieu solide dans des conditions de limitation nutritionnelle. La plus évidente manifestation de différenciation est la formation du mycélium aérien constitué d'hyphes qui poussent au-dessus du mycélium végétatif. Ce dernier est responsable de l'aspect blanc et brouillé des colonies. L'apparition du mycélium aérien est accompagnée d'une lyse partielle du mycélium végétatif qui procure une source de nutriments pour les étapes subséquentes du développement. Les hyphes aériens passent par un stade de septation pour former de longues chaînes de cellules contenant chacune un seul génôme et qui se pigmentent lors de leur sporulation. Les spores participent donc à la coloration des colonies spécifique à l'espèce. La colonie prend quelques jours à se différencier pour donner



FIGURE 1: Présentation schématique du cycle de différentiation morphologique des streptomycètes (Tiré de Schauer, 1988).

ł

les deux types de mycélium qui seront séparés spatialement (Schauer et al., 1988).

2.2 Secondaire

La sporulation coïncide avec la production de plusieurs métabolites secondaires, dont les antibiotiques et les enzymes extracellulaires. Le processus qui régule la différenciation pourrait aussi régir la production de ces métabolites secondai-Buttner et Brown (1985) ont démontré que certains promores. teurs de S. lividans sont exprimés tôt durant la croissance végétative grâce à des facteurs σ^{35} qui se fixent à l'ARN polymérase tandis que d'autres promoteurs sont exprimés plus tard parce que d'autres facteurs σ^{49} entrent en jeu. En effet, il est connu que les changements du gabarit d'affinité de l'ARN polymérase apparaissent durant le processus de différenciation. Ces modifications sont dues, au moins en partie, à la production d'une série de facteurs sigma de l'ARN polymérase. De plus, Westpheling et al. (1985) ont montré que S. coelicolor contient différentes formes d'holoenzymes d'ARN polymérases qui peuvent être responsables de la régulation de la différenciation.

Le processus de différentiation s'accompagne également de la production de substances chimiques tel le facteur A (2sisocapryloyl-3s-hydroxymethyl- τ -butyrolactone), qui est une substance extracellulaire pouvant être décrite comme une phéromone, et est requis pour la sporulation et la production de streptomycine. La nature lipidique des phéromones leur permet de diffuser librement à travers la membrane cellulaire. Dans le cytoplasme, elles se lient avec beaucoup d'affinité et de spécificité à des protéines réceptrices qui sont en faible concentration. L'effet de ces phéromones permet la différenciation synchrone de la colonie (Chater, 1989).

Chez S. griseus, le facteur A est impliqué dans la différenciation et le métabolisme secondaire ainsi que dans la production de certains métabolites pigmentaires de S. coelico-Stein et Cohen (1989) ont observé que le mutant D1 de S. lor. lividans est sévèrement déficient quant à la production de mycélium aérien. Ce phénomène serait dû à la production du facteur A et de certains pigments. Au début de la croissance, le mutant D1 forme un mycélium végétatif lisse qui est sans pigmentation mais qui devient jaunâtre par la suite. De plus, il est souvent possible d'observer des parties de colonies de D1 qui soient plutôt roses ou rouges. On remarque parfois la présence de mycélium aérien sur le pourtour d'une colonie, bien qu'en général ce clone soit incapable de produire cette structu-L'habileté de D1 à former du mycélium aérien et un pigment re. semble être accrue par la croissance d'une colonie de type sauvage à proximité. Ceci suggère que le phénotype de ce mutant pourrait répondre à un agent diffusible comme le facteur A.

Le gène <u>bld</u> A (pour bald, chauve) code pour l'ARN_t de la leucine (TTA). Les gènes contenant des codons TTA sont très

{

rares dans l'ADN riche en G + C des streptomycètes. S'ils sont présents, ils codent pour des antibiotiques ou des produits tardifs qui apparaissent lors du développement du mycélium aérien (produit secondaire). Le rôle de <u>bld</u> A dans la différenciation n'est pas un attribut spécial de *S. coelicolor* mais il est relatif à plusieurs espèces, telle *S. lividans* (Chater et *al.*, 1988). Plusieurs gènes étant associés à la différenciation, il est possible de croire à de multiples cascades régulatoires. Nous reviendrons plus loin sur le rôle de <u>bld</u> A dans la régulation.

3. RÉGULATION

ł,

3.1 Induction et répression

La régulation génétique des streptomycètes est très peu connue. Il va sans dire que la régulation de leurs xylanases est encore moins étudiée. Le contenu riche en G + C du génôme de ces organismes confère une singularité des régions de régulation transcriptionnelles par rapport à la majorité des autres microorganismes (Pulido et Jiménez, 1987). Par contre, le contrôle de certains autres gènes comme ceux de l'amylase, de l'opéron glycérol, de l'agarase, pour ne citer que ceux-là, est partiellement compris.

Chez les bactéries non cellulolytiques et les levures, les enzymes xylanolytiques semblent être inductibles. En effet, les xylanases et xylosidases sont produites en grandes

quantités durant la croissance sur xylane (Biely et Petrakova, 1984). D'autre part, la synthèse d'enzymes subit une répression catabolique par des sources de carbone qui sont bien métabolisées comme le glucose et le xylose. Une certaine ambiguïté persiste car chez quelques bactéries comme *Bacillus subtilis, Aspergillus niger* et *Cryptococcus flavus*, le système xylanolytique est plus facilement induit par le xylose que par le xylobiose (Panbangred et al., 1985). L'induction du complexe xylanolytique se fait de façon très spécifique: par exemple, la lignine Kraft et l'acide syringique peuvent induire la *B*xylanase et l'endoglucanase mais pas d'autre enzyme (Godden et al., 1989).

Le gène de l'agarase, quant à lui, est sujet à la répression catabolique par le glucose et quelques autres sucres. Ce gène peut aussi être induit par les produits de dégradation de l'agar. (Buttner et al., 1987).

Le gène de l' α -amylase de *S. limosus* semble induit par de petits oligosaccharides qui sont dérivés de l'amidon. De plus, cette enzyme est assujettie à la répression par des sucres plus facilement assimilables comme le glucose (Virolle et Bibb, 1988).

Le gène de l' α -amylase de *S. limosus* est transcrit à partir d'un promoteur unique ayant une apparance typiquement procaryotique. Virolle et Bibb (1988) ont démontré que l'expression du

1

gène est induite au niveau de l'initiation de la transcription par de faibles concentrations de maltose ou de maltodextrine.

Le glucose réprime l'expression de plusieurs gènes de streptomycètes, incluant les gènes responsables de la production d'agarase extracellulaire (Hodgson et Chater, 1981; Hodgson, 1982), de l'utilisation d'une source de carbone quelle qu'elle soit (Hodgson, 1982), du glycérol chez S. coelicolor (Seno et Chater, 1983; Smith et Chater, 1987) et de l'utilisation du galactose chez S. lividans (Fornwald et al., 1987). Chez S. limosus, le mannitol réprime l'expression du gène aml tandis que le glucose a peu ou pas d'effet (Virolle et Bibb, 1988). Par contre, quand ce gène est cloné dans S. lividans 66 et S. coelicolor A3(2), les effets relatifs aux deux sucres sont Par ailleurs, l'induction se fait de la même façon. inversés. Des études antérieures (Hodgson, 1982; Seno et Chater, 1983) ont démontré le rôle essentiel de la glucose kinase dans la médiation de la répression par le glucose chez S. coelicolor. La répression de l'expression du gène aml, chez ces espèces, s'est aussi montrée dépendante du bon fonctionnement du gène de la glucose kinase.

í

L'opéron glycérol de *S. coelicolor* A3(2) a deux principaux gènes: <u>gyl</u> A, codant probablement pour la glycérol kinase, et <u>gyl</u> B, codant pour la <u>sn-glycérol-3-phosphate</u> déshydrogénase. Cet opéron est gouverné par deux types de régulations transcriptionnelles: l'induction spécifique par un

substrat tel le glycérol et la répression générale par le glucose (Smith et Chater, 1988). L'utilisation du glycérol par S. coelicolor démontre que le système est sujet au contrôle par exclusion de l'inducteur (inhibition par le glucose) en plus de la répression par le glucose et l'induction par le glycérol.

La solubilité d'un substrat semble être un facteur important de la régulation de certains systèmes. Par exemple, le sophorose induit le gène de la cellulase de Tricoderma reesei plus rapidement que la cellulose à cause de sa nature soluble (El-Gogary et al., 1989). D'ailleurs, on ne comprend pas comment un polymère insoluble comme la cellulose, qui est incapable d'entrer dans la cellule fongique, peut réguler un système d'enzyme cellulolytique. Il faudrait que T. reesei exprime de façon constitutive une petite quantité de l'ensemble des cellulases et que l'activité de ces enzymes sur la cellulose produise un inducteur soluble, comme le sophorose, qui pourrait entrer dans la cellule et provoquer l'induction. Le système peut être induit par le sophorose et réprimé par le glucose. Le glucose réprime au niveau pré-traductionnel. La transcription du gène CBH-1 est détectée 14 heures après l'addition de cellulose et quatre heures après l'ajout de sophorose. Quand des anticorps anti-cellulose sont introduits dans le milieu de culture avant la cellulose, la transcription est complètement réprimée. Si les anticorps sont ajoutés dix heures après la cellulose, il n'y a pas de répression même si la transcription

du gène <u>CBH</u>-1 n'est pas détectée dans les 14 heures suivant l'ajout de cellulose (El-Gogary *et al.*, 1989). Il est donc possible de conclure que la régulation se fait au niveau de la transcription plutôt que de la traduction.

3.2 Protéine activatrice

ĺ

Dans certains systèmes, la présence d'une protéine activatrice est nécessaire à la régulation de quelques gènes. Ces protéines gèrent l'expression génique en se liant à l'ADN, habituellement près des promoteurs des gènes qu'elles contrôlent. À cause de leur diffusion dans la cellule pour atteindre leur cible, ces protéines sont décrites comme agissant en trans (Rawn, 1989).

Chez S. coelicolor, le glycérol peut entrer dans la cellule par diffusion facilitée en plus de profiter d'une diffusion passive. S. coelicolor catabolise le glycérol grâce à l'action consécutive d'une glycérol kinase soluble dépendante de l'ATP et d'une déshydrogénase du <u>sn</u>-glycérol-3-phosphate (G3P) qui est associée à la membrane. Cette voie est empruntée par la plupart des bactéries. Cependant, contrairement à la majorité des microorganismes étudiés (dont *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*), l'induction par le glycérol et la répression par le glucose des enzymes catabolisant le glycérol chez les streptomycètes sont coordonnées. Il est possible que le gène <u>gyl</u> X, qui n'est pas encore caractérisé, code pour une protéine facilitant

l'utilisation du glycérol. Par analogie avec E. coli, il est probable que l'interruption du gène de la protéine facilitatrice n'affecte pas la croissance de la cellule hôte en présence d'une quantité abondante (0,5%) de glycérol. La croissance se fait normalement puisqu'il y a suffisamment de glycérol qui pénètre dans les cellules par diffusion passive. L'analyse des transcrits de l'opéron gyl révèle une région unique d'initiation de la transcription. De plus, une unité transcriptionnelle additionnelle inductible par le glycérol, gyl R, a été identifiée immédiatement en amont de la région promotrice gyl ABX. Les auteurs proposent que cette dernière unité soit un régulateur transcriptionnel de l'opéron gyl ABX. Le gène gyl R coderait pour une protéine activatrice (Smith et Chater, 1988). Cette hypothèse repose sur les observations suivantes:

1- La région amino-terminale de la protéine Gyl R ressemble à la région amino-terminale de Asn C qui est une protéine activant la transcription chez *E. coli*.

1

{

2- Les acides aminés 27 à 46 de Gyl R semblent idéaux pour former la structure classique liant l'ADN (hélice α , un tour, hélice α).

Dans les systèmes procaryotes, un gène activateur qui est spécifique à une voie métabolique particulière est presque toujours contenu dans une unité transcriptionnelle monocistronique immédiatement en amont de l'unité transcriptionnelle qui est sous son contrôle (Smith et Chater, 1988).

L'induction de la synthèse de la B-lactamase chez Citrobacfreundii est régulée par une protéine (Amp R) agissant en ter trans qui est codée immédiatement en amont du gène de l'amp C Blactamase (Lindberg et al., 1985). Bacillus licheniformis code pour une B-lactamase inductible (Dubnau et Pollock, 1965) qui est sous le contrôle d'un répresseur et d'un antirépresseur. Dans ces deux cas, une protéine régulatrice est impliquée dans le processus d'induction et interagit avec la région promotrice de la B-lactamase. Par contre, la B-lactamase de S. cacaoi peut être fortement induite par un composé faisant partie de la B-lactames, l'acide 6-amino penicillinoïque. famille des L'inductibilité de cette B-lactamase est exercée à un niveau d'initiation transcriptionnelle mais il ne semble pas y avoir de protéine régulatrice impliquée. En observant le code génétique de cet organisme, on trouve un ensemble de six séquences répétées directes en amont du promoteur mais, à ce jour, on ne sait pas si ces structures sont impliquées dans la régulation de la B-lactamase (Forsman et al., 1989).

Les voies de dégradation du glycérol sont très semblables chez E. coli, B. subtilis et S. coelicolor mais leur contrôle est différent. Les gènes <u>glp</u> de B. subtilis, comme leurs homologues chez S. coelicolor, sont apparemment sujets à un contrôle positif tandis que les gènes <u>glp</u> de E. coli sont sous un contrôle négatif. Cette différence pourrait être expliquée par la théorie de la régulation génétique basée sur la demande.

Celle-ci stipule que le mode de régulation d'une voie métabolique dépend de la demande pour son expression (Savageau, 1974 et 1977). Ce phénomène est dicté par l'environnement naturel de la cellule. Les principaux habitats naturels de *S. coelicolor* (un saprophyte du sol) et de *B. subtilis* (trouvé dans les sols riches et la matière organique en décomposition) procurent une abondante source de glycérol (demande élevée, contrôle positif) tandis que le principal habitat de *E. coli* (le côlon des mammifères) est déficient en glycérol (faible demande, contrôle négatif) (Savageau, 1977). Puisque *S. lividans* est aussi retrouvée dans le sol, où le xylane est présent en grande quantité, le contrôle du régulon xylanase devrait être positif.

3.3 Promoteurs

L'interaction entre l'ARN polymérase dépendante de l'ADN et un promoteur est la première étape spécifique d'une série d'événements entraînant l'expression d'un gène individuel (Buttner et Brown, 1985).

Schauer et al. (1988) ont observé que certains promoteurs démontrent une régulation anormale quand ils sont excisés de leur emplacement chromosomique et clonés dans un plasmide à copies multiples.

Le gène de l'agarase de S. coelicolor (Buttner et al., 1988), l'opéron <u>gyl</u> de S. coelicolor (Smith et Chater, 1988) et

les gènes de biosynthèse d'antibiotiques comme l'actinorhodine, le bialaphos, l'undecylprodigiosine et la tylosine sont régulés par différents mécanismes incluant des promoteurs divergents, des gènes régulateurs ou des ARNm anti-sens (Geistlich et al., 1989).

Chez S. glaucescens, l'expression de la tyrosinase est régulée par des inducteurs spécifiques (les acides aminés Lméthionine et L-leucine). L'opéron <u>mel</u> est régulé au niveau de la transcription et les produits de <u>mel</u> A/B sont impliqués dans cette régulation.

La région promotrice de cet opéron peut être divisée en trois domaines fonctionnels (Fig. 2):

1- le site de reconnaissance de l'ARN polymérase (-39 à +21).

2- une région d'ADN cruciale pour la régulation du promoteur. Une séquence en amont de celui-ci est essentielle à la modulation de l'expression par les inducteurs (-101 à -158).

3- un site activateur en amont (-158 à -219).

Une protéine liée à la région -65/-90 réprime l'expression de la tyrosinase en l'absence d'inducteur en masquant le site de liaison du répresseur. Les loci <u>mel</u> A et <u>mel</u> B pourraient coder pour des protéines régulant l'expression de la tyrosinase de concert avec les inducteurs. On peut néanmoins considérer la possibilité que <u>mel</u> A et <u>mel</u> B codent pour une protéine directement impliquée dans l'initiation de la transcription, tel un

- CGAAGGAATTTCCCGTTCCGCCCTTCTCCGCCATCGCCTCCAGGAAGATCAACTTCGTTCAACACTGCACGACATGTGGGCCAATTGTCCG GCTTCCTTAAAGGGCAAGGCGGGAAGAGCCGGTAGCGGGAGGTCGTTCTAGTTGAACAGTTGTGACGTGCTGTACACCGGTAACAGGC
- GATCGGAGCCÅACCGTTCGCGGGAGTGCCCCÅACGGGCCGGTAGGCATGCGGAGTCATCCÅCCCCCTTCACACCCCGAGGTCCGTATGCCC CTAGCCTCGGTTGGCAAGCGCCCTCACGGGGTGCCCGGCCATCCGTACGCCTCAGTAGTGGGGGCAGTGTGGGCCCTCCAGGCATACGGG

FIGURE 2: Séquence nucléotidique du promoteur de l'opéron mel de S. glaucescens montrant les trois domaines fonctionnels (Tiré de Geistlich et al., 1989). facteur sigma, et que les inducteurs influencent l'activité des promoteurs indépendemment de <u>mel</u> A et <u>mel</u> B (Geistlich *et al.*, 1989).

L'utilisation du galactose chez S. lividans est contrôlée par un opéron qui est induit en présence de galactose et réprimée par le glucose. Deux promoteurs, gal P1 et gal P2, dirigent la transcription de deux transcrits polycistroniques distincts. Gal P1 est localisé immédiatement en amont de l'opéron et est induit en présence de galactose. Ce promoteur dirige la transcription des gènes gal T, gal E et gal K. Le second promoteur est responsable de la transcription constitutive des gènes gal E et gal K (fig. 3). Il est possible que l'expression de l'opéron gal implique non seulement la répression et/ou l'activation de gal P1 en réponse au galactose, mais aussi la régulation dépendant de la reconnaissance des promoteurs gal P1 et gal P2 par différentes ARN polymérases (Fornwald et al., 1987).

Le gène <u>afs</u> B de Streptomyces lividans et de Streptomyces coelicolor est pléiotropique. Il agit positivement sur la biosynthèse du facteur A et sur certains antibiotiques comme l'actinorhodine et l'undecylprodigiosine (Horinouchi et al., 1986). Le gène <u>afs</u> R de S. lividans complémente le gène <u>afs</u> B lorsqu'il est présent sur un plasmide multicopie qui contient le promoteur <u>spo</u> VG. Selon Stein et Cohen (1989), ce gène pourrait agir de façon pléiotropique pour supprimer la déficience pigmen-



FIGURE 3: Représentation schématique des promoteurs de l'opéron galactose de S. lividans (Tiré de Fornwald et al., 1987).

(

2

.

taire montrée par différents mutants de S. lividans bloqués aux premiers stades de leur développement. Le gène <u>afs</u> R est exprimé constitutivement chez le type sauvage comportant le plasmide dans lequel est cloné le gène. Il n'est cependant pas clair pourquoi <u>afs</u> R, quand il est présent sur un plasmide, restitue la pigmentation à un hôte muté dans <u>afs</u> B ou d'autres gènes chromosomiques, tandis que la copie du gène <u>afs</u> R localisée sur le chromosome dans ces mutants ne le fait pas. Il est probable que les copies multiples du locus <u>afs</u> R sont requises pour circonvenir aux effets de la première mutation affectant la production pigmentaire. L'explication proposée par Stein et Cohen (1989) est que si on place un promoteur <u>spo</u> VG sur un plasmide, on altère sa conformation et conséquemment cela affecte la régulation et ce qui est requis pour son expression.

Fisher et Wray (1989) ont montré un autre exemple de promoteur transcrit par une ARN polymérase différente. En effet, le gène <u>gln</u> A de *S. coelicolor*, qui code pour la glutamine synthétase, est transcrit à partir d'un promoteur unique durant toute la phase de croissance sur toutes les sources d'azote. La comparaison de la séquence du promoteur de <u>gln</u> A avec les séquences consensus de promoteurs végétatifs (promoteurs de gènes exprimés seulement lors de la croissance végétative) chez *S. coelicolor* révèle qu'une séquence végétative à -10, mais pas à -35, est présente dans le promoteur de <u>gln</u> A (Fig. 4). Cependant, puisque de multiples formes de l'ARN polymérase ont



FIGURE 4: Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène de la glutamine synthétase de *S. coelicolor* (Tiré de Fisher et Wray, 1989).
été détectées chez S. coelicolor (Wespheling et al., 1985; Buttner et al., 1987), il est possible que ce promoteur soit transcrit in vivo par une ARN polymérase différenciée par ses facteurs σ . Au contraire des régions promotrices riches en A + T de E. coli et B. subtilis, la composition nucléotidique des promoteurs de Streptomyces reflète le fort contenu en G + C du chromosome de S. lividans. Ces derniers forment un groupe particulier. Un second groupe de signaux d'initiation de la transcription peut fonctionner autant chez S. lividans que chez E. coli (Fig. 5). Ce deuxième groupe de promoteurs est reconnu par une espèce d'ARN polymérase de Streptomyces qui répond comme la polymérase de E. coli à des mutations dans chacune des régions constituantes d'un promoteur typique d'E. coli (Jaurin et Cohen, 1984 et 1985). Cette polymérase reconnait aussi les séquences promotrices transplantées dans S. lividans à partir de E. coli, Serratia marcescens ou Bacillus licheniformis. On a aussi découvert une ARN polymérase de B. subtilis qui reconnait un promoteur du genre de ceux utilisés par E. coli chez S. coelicolor (Wespheling et al., 1985.)

3.4 Gène bld A: facteur de régulation

(1

{

Chez S. coelicolor, il y a sept mutants <u>bld</u> différents. Ils ont tous une déficience partielle ou complète quant à la production d'enzymes sauf un, nommé <u>bld</u> C (Chater, 1989). Comme il a été mentionné précédemment, le gène <u>bld</u> A des streptomycè-



FIGURE 5: Représentation schématique faisant la comparaison de séquences nucléotidiques de trois promoteurs de Streptomyces avec une région promotrice typique de E. coli (Tiré de Jaurin et Cohen, 1985).

tes code pour l'ARN_t de la leucine (TTA). Les gènes contenant les codons TTA dépendent donc de ce gène pour leur expression. Les souches S. coelicolor et S. lividans doivent avoir leur gène bld A fonctionnel pour que les trois gènes contenant le codon TTA soient exprimés (lac Z de E. coli, le gène de la résistance à la spectinomycine sur le plasmide R-100 et <u>car</u> B de *S*. thermotolerans, ce gène conférant la résistance à certains antibiotiques.). Un quatrième gène (hyq de S. hygroscopicus) donne une expression réduite dans les mutants bld A. Ces résultats, ainsi que l'analyse de la séquence d'ADN, suggèrent que le produit du gène <u>bld</u> A est l'ARN_t qui permet la traduction du codon TTA. Des expériences ont été effectuées sur un milieu contenant du mannitol comme unique source de carbone. Elles indiquent que l'habileté des mutants <u>bld</u> A à recouvrer le type sauvage sur mannitol n'est pas due à la dérépression d'un ARN, TTA alternatif. Généralement, les mutants bld A montrent une bonne croissance car les produits contenant le codon TTA sont S'ils sont présents, c'est sous forme d'enzymes très rares. nécessaires à la biosynthèse d'antibiotiques ou de produits tardifs (Chater et al., 1988).

Certains faits indiquent que <u>bld</u> A n'exerce pas une régulation majeure sur d'autres gènes mais plutôt qu'il influence un régulon indépendant impliqué dans le processus développemental (Chater et al., 1988).

3.5 ARN polymérase et facteurs σ

Les ARN polymérases pourraient jouer un rôle dans la régulation en se fixant à différents promoteurs. Leurs facteurs σ seraient aussi impliqués dans des activités régulatrices en modifiant l'affinité d'une ARN polymérase pour un promoteur spécifique (Chater, 1989).

Les promoteurs et les ARN polymérases de Streptomyces sont très hétérogènes. Du point de vue biochimique on peut distinguer au moins trois formes d'ARN polymérases de S. coelicolor par leur possession de facteurs σ conférant différentes spécificités de transcription. De plus, on a montré l'existence d'au moins quatre facteurs σ additionnels grâce à l'analyse d'ADN cloné (Buttner, 1989). Les unités transcriptionnelles individuelles sont fréquemment contrôlées par des promoteurs multiples, eux-mêmes souvent reconnus par différentes formes d'ARN polymérases. Par exemple: dans le gène whi G (pour white: pas de sporulation du mycélium aérien) de S. coelicolor, l'interrupteur transcriptionnel précoce permettant de poursuivre l'allongement des hyphes aériens en chaînes de spores est contrôlé par un facteur σ^{whiG} . L'inactivation de <u>whi</u> G entraîne la cessation complète du processus de sporulation mais il ne semble pas avoir un rôle important dans la croissance végétative (Chater et al., 1988). Par contre, un grand nombre de copies de whi G amène une sporulation précoce et abondante. Les spores sont même produites sur les hyphes végétatifs

poussant dans l'agar et dans les cultures liquides. Puisque la sporulation n'est habituellement pas détectée dans ces situations, il apparait que la quantité de σ^{whiG} , et non le produit de n'importe quel gène indépendant de <u>whi</u> G, détermine la décision de sporuler. Il a été démontré que le locus <u>whi</u> E de S. coelicolor, quant à lui, est nécessaire pour que les spores blanches immatures acquièrent une coloration grise lors de leur passage à l'état mature (Chater, 1989).

Wespheling et al. (1985) ont été les premiers à découvrir deux formes d'ARN polymérases chez S. coelicolor. Elles contiennent différentes sortes de facteurs σ et on les distingue par leur habileté à reconnaître des classes diverses de promoteurs. Elles peuvent déterminer en partie l'expression sélective des ensembles de gènes distincts de cette bactérie complexe.

 $E\sigma^{35}$ et $E\sigma^{49}$ sont deux membres d'une grande famille d'ARN polymérases qui déterminent l'expression différentielle de divers ensembles de gènes durant le cycle de vie de *S. coelicolor*. Ceux-ci peuvent inclure les gènes impliqués dans la différenciation et le métabolisme secondaire de cette bactérie (Wespheling *et al.*, 1985)

Buttner *et al.* (1988) ont eux aussi séparé trois ARN polymérases différentes de *S. coelicolor* A3(2). Ces holoenzymes dirigeraient la transcription du gène de l'agarase, <u>dag</u> A. Chaque ARN polymérase transcrit seulement un des quatre promo-

l

teurs du gène <u>dag</u> A. Les facteurs σ semblent responsables de deux des promoteurs. E σ^{49} fait la transcription à partir du promoteur <u>dag</u> Ap3 tandis que E σ^{28} reconnait le promoteur <u>dag</u> Ap2. La troisième holoenzyme qui transcrit le promoteur <u>dag</u> Ap4 est identifiée E σ^{35} . Ce niveau de complexité transcriptionnelle suggère que l'hétérogénéité des ARN polymérases peut jouer un rôle central dans la régulation et la coordination de l'expression génétique chez cette bactérie.

Les quatre promoteurs du gène <u>dag</u> A de *S. coelicolor* sont donc transcrits par au moins trois ARN polymérases différentes: $E\sigma^{49}$, $E\sigma^{28}$ et $E\sigma^{35}$. Et pour ne citer qu'un autre exemple: les gènes <u>gal</u> E et <u>gal</u> K de *S. lividans* sont transcrits par deux ARN polymérases différentes à partir de deux promoteurs, <u>gal</u> P1 et gal P2 (Fornwald *et al.*, 1987 et Buttner *et al.*, 1988).

L'existence de formes hétérogènes d'ARN polymérases n'est pas confinée à *S. coelicolor*; certaines formes mineures de l'holoenzyme peuvent déterminer l'expression d'ensembles de gènes qui ont une activité qui n'est pas reliée au développement morphologique (Buttner *et al.*, 1988).

3.6 Système de régulation Deg chez Bacillus subtilis

Les microorganismes du genre *Bacillus* sont positifs à la coloration de Gram comme les streptomycètes. De plus, ils ont plusieurs systèmes en commun. Il est donc intéressant de se pencher sur les gènes <u>deg</u> de *Bacillus subtilis* qui sont impli-

qués dans la régulation d'enzymes dégradatives comme les protéases intracellulaires et certaines protéines extracellulaires telles la levansucrase, des protéases, l' α -amylase, la Bamylase, la B-glucanase et la xylanase (Amory et al, 1987).

Les gènes <u>deq0</u> et <u>deqR</u> codent pour des protéines de faibles poids moléculaires qui ne semblent pas être essentiels à la production des enzymes de dégradation mais qui activent leur synthèse quand ils sont clonés sur des plasmides à copies multiples. Les gènes deqS et deqU, quant à eux, forment un opéron codant pour un système à deux composantes: le modulateur DegS contrôle l'activité de l'effecteur DegU qui est fort probablement un activateur transcriptionnel (Kunst et al., 1988). Le modulateur DegS contient une histidine qui peut s'autophosphoryler en présence d'ATP. Le groupement phosphate est transféré à un acide aspartique de l'activateur DegU (Fig. 6a). Ce dernier peut alors activer l'expression de gènes cibles codant pour des enzymes de dégradation. Cette activation est probablement exercée par la fixation de DegU à des séquences d'ADN en amont des promoteurs des gènes cibles (Fig. 6b) (Kunst et al., 1990). La protéine DegU, une fois phosphorylée, peut activer la levansucrase, les protéases et la B-glucanase tandis qu'elle fait une rétroaction négative sur DegR et DegQ (Tanaka et Kawata, 1988; Kunst et al., 1990).

- FIGURE 6a: Représentation schématique du modèle de régulation médiée par la phosphorylation de DegS et DegU (Tiré de Kunst et al., 1990).
- FIGURE 6b: Mécanismes de contrôle spécifique et pléiotropique affectant le régulon sucrose de Bacillus subtilis (Tiré de Kunst et al., 1990).



a)





4. SYSTÈME XYLANOLYTIQUE DE Cryptococcus albidus

Biely (1985) propose un modèle de régulation du système xylanolytique de *C. albidus*: le xylane n'étant pas soluble, ne peut pénétrer dans la cellule. Il est donc hydrolysé en molécules de faible poids moléculaire comme le xylotriose, le xylobiose et le xylose par la xylanase. Ceci implique que les oligosaccharides sont formés par l'hydrolyse du xylane dans le milieu par de très petites quantités d'enzymes constitutives. Les oligoxylosides passent à travers la membrane plasmique grâce à la xyloside perméase tandis que le xylose entre par diffusion. Une fois dans la cellule, ils vont induire la synthèse d'enzymes dont la *B*-xylosidase. Celle-ci dégrade les oligoxylosides en xylose. Le glucose peut entrer dans la cellule par diffusion passive pour réprimer la synthèse enzymatique (Fig. 7).

FIGURE 7: Représentation schématique du système xylanolytique de Cryptococcus albidus. Glc, D-glucose; Xyl, D-xylose; Xyl₂, xylobiose; Xyl₃, xylotriose (Tiré de Biely, 1985).

(



(

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient les suivants:

 Choisir une source de carbone et préparer un inducteur permettant d'isoler aisément l'ARN_m de la souche sauvage Streptomyces lividans 1326.

- Isoler et déterminer la séquence d'apparition des ARN_m des trois xylanases de la souche sauvage *S. lividans* 1326 afin de mieux comprendre la régulation génétique de ce régulon.

- Analyser l'utilisation de différents oligoxylosides en fonction du temps pour mieux comprendre le rôle de chacune des trois xylanases l'une par rapport à l'autre. Cette dernière étape a été corrélée à l'apparition des ARN_m des trois xylanases.

í

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. LISTE DES PRODUITS

See.

Acétate de sodium (Fisher) Acide citrique (Sigma) Acide syringique (Sigma) Acrylamide (IBI) ADN de sperme de saumon (Sigma) Agar (Difco) Agarose (BioRad) Albumine sérique bovine (Sigma) Arabinose (Sigma) BIS (IBI) Bleu de bromophénol (BDH) Bouillon de tryptone de soya (Gibco Diagnostics) Bromure d'éthidium (Boehringer) CaCl₂ anhydre (BDH) Citrate de sodium (BDH) CoCl₂.6H₂O (J.T. Baker) CsCl (BRL) Déoxycytidine-5'-triphosphate, $[\alpha^{-32}P]$ (ICN) Diéthylpyrocarbonate (Sigma) Diméthylsulfoxide (BDH) EDTA (Fisher) Extrait de boeuf (Difco) Extrait de levure (Difco) FeSO₄ (J.T. Baker) Ficoll (Sigma) Formaldéhyde (J.T. Baker) Formamide (LKB) Glycérol (BDH) Glycine (BioRad) Glyoxal (BDH) Hydrolysat de caséine (Difco) Isothiocyanate de guanidinium (BDH) KCl (J.T. Baker) KH₂PO₄ (J.T. Baker) K₂HPO₄ (J.T. Baker) Lait écrémé (Difco) Maltose (Difco) 2-mercaptoéthanol (BDH) MgSO₄.7 H₂O (J.T. Baker) MnCl₂ (BDH) MnSO₄.H₂O (J.T. Baker) MOPS (BDH) NaCl (BDH) Na₂HPO₄.7H₂O (J.T. Baker) $NaH_2PO_4.H_2O$ (Fisher) (NH₄)₂SO₄ (J.T. Baker) NZ Amine A (Sheffield Products)

```
PEG 6000 (BDH)
Persulfate d'ammonium (BioRad)
Polyvinylpyrrolidone (Sigma)
Protéine A-<sup>125</sup>I (Amersham)
Rémazol bleu brillant (Aldrich)
Sarkosyl (IBI)
SDS (BioRad)
TEMED (BioRad)
Thiostrepton (Squibb Ltée)
TRIS (ICN)
Triton X-100 (BioRad)
Xylane de bouleau (Sigma)
Xylane de glumes d'avoine (Sigma)
Xylane de mélèze (Sigma)
Xylène cyanol (BioRad)
ZnSO<sub>4</sub> (J.T. Baker)
```

ľ

2. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

La principale souche bactérienne utilisée pour ce travail est *Streptomyces lividans* 1326. Cette souche sauvage, contient les gènes des trois xylanases (A, B et C) chromosomiques.

La souche S. lividans 3131 a aussi été utilisée pour la détermination de la source de carbone et de l'inducteur. Cette souche est de type sauvage contenant le vecteur à copies multiples pIJ702.

Les témoins positifs utilisés sont S. lividans IAF18 (Mondou et al., 1986), IAF42 (Vats-Mehta et al., 1990) et IAF20 (Shareck et al., 1991) pour les xylanases A, B et C respectivement. Ce sont des clones qui ont été créés par clonage homologue dans un mutant cellulase et xylanase négatifs (10-164). Ces souches possèdent le vecteur à copies multiples pIJ702 dans lequel est inséré un gène codant pour une des trois xylanases. Ces plasmides sont nommés pIAF18, pIAF42 et pIAF20 pour les xylanases A, B et C respectivement.

3. CONSERVATION ET CULTURE DES SOUCHES

3.1 Milieu pour la conservation des souches

Les souches de la banque utilisées pour faire des tubes de travail (Mondou *et al.*, 1986), sont sporulées dans des tubes inclinés contenant du milieu solide Bennett (Jones, 1949) et l'antibiotique thiostrepton si nécessaire. Chaque litre de milieu contient: 1 g d'extrait de levures; 1 g d'extrait de

boeuf; 2 g de N.Z. amine A; 10 g de maltose. Le pH est ajusté à 7,2 puis 22 g d'agar sont ajoutés. Le milieu est stérilisé 20 minutes à 121°C et 124 kPa. Le thiostrepton (50 mg par L de milieu, dissout dans du diméthylsulfoxide (DMSO)) est additionné après refroidissement du milieu à 42°C.

3.2 Milieux de culture

3.2.1 Milieu pour la production d'inoculum

L'inoculum est produit dans un bouillon au tryptone de soya ne contenant pas de glucose. Ce milieu est préparé en réhydratant 27,5 g de poudre par litre d'eau. Après stérilisation, le pH de ce milieu est de 7,3 à 25°C.

3.2.2 Milieu permettant la croissance et l'induction de la biosynthèse de xylanases

Le milieu minimal utilisé permet à la fois la croissance et l'induction, en contenant toutefois un minimum d'éléments qui pourraient interférer avec la production ou l'isolement d'ARN messager. Chaque litre de ce bouillon NMMP (Hopwood *et al.*, 1985) contient: 2 g de $(NH_4)_2SO_4$; 5 g de casaminoacides; 0,6 g de MgSO_4.7 H_2O; 50 g de PEG 6000; 1 mL d'une solution d'éléments mineurs. Cette solution est constituée de 1 g de ZnSO_4; 1 g FeSO_4; MnCl_2 et de CaCl_2 anhydre dans un litre d'eau. Le milieu de culture est complété à 800 mL d'eau distillée. Les aliquots sont ensuite préparés puis stérilisés 20 minutes à 121°C, 124 kPa. Un tampon NaH_2PO_4/K_2HPO_4 (0,1M, pH 6,8)* est ajouté à raison de 2,5 mL par 80 mL de bouillon de culture. Le thiostrepton (0,1mL de 5 mg/mL de DMSO) et la source de carbone à une concentration finale allant de 0,1% à 1% (p/v) sont aussi additionnés juste avant l'utilisation.

* Les solutions 0,1M de NaH_2PO_4 et de K_2HPO_4 sont mélangées pour donner un pH correspondant à 6,8.

3.2.3 Milieu solide servant à mesurer l'activité xylanasique

L'activité xylanasique peut être quantifiée grâce à un milieu minimal solide contenant du xylane couplé à un colorant: le Rémazol Bleu Brillant (RBB-xylane) (Bertrand, 1988). Chaque litre de milieu est constitué de: $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g; KH_2PO_4 , 1,5 g; K_2HPO_4 , 5,0 g; extrait de levure, 0,5 g; KCl, 0,5 g; agar, 17,0 g; sels minéraux (Pour 100 mL d'eau distillée: $ZnSO_4.7H_2O$, 140 mg; $MnSO_4.H_2O$, 160 mg; $FeSO_4.7H_2O$, 500 mg; $CoCl_2.6H_2O$, 200 mg) 1 mL et 0,2% (p/v) de RBB-xylane. Le pH est ajusté à 7,2. Une solution stérile de $MgSO_4.7H_2O$ à 5% (p/v) est additionnée après stérilisation à raison de 10 mL. La solution de RBBxylane 0,8%, préparée dans 250 mL d'eau distillée, est ajoutée après stérilisation pour éviter la précipitation de ce substrat.

3.3 Les substrats

Dans le milieu de culture solide servant à la détermination de l'activité xylanasique, le substrat utilisé est le xylane de bouleau couplé au colorant rémazol bleu brillant (RBB) selon une méthode présentée par Biely et al. (1985).

Pour la croissance en milieu liquide, le glycérol est choisi. Par contre, quand il s'agit d'induction, on emploie un hydrolysat de xylane total de glumes d'avoine, contenant uniquement des oligoxylosides de deux à dix résidus xylosides de longueur.

3.4 Préparation de l'inducteur

3.4.1 Hydrolyse enzymatique

Pour obtenir un substrat contenant uniquement des oligoxylosides ayant de deux à dix unités de xylose, le xylane de glumes d'avoine est hydrolysé avec la xylanase C; cet hydrolysat est ensuite purifié par chromatographie.

Cinquante grammes de xylane de glumes d'avoine sont dissouts dans 400 mL de tampon McIlvain à pH 6,0 $(Na_2HPO_4.7 H_2O$ 0,2 M et acide citrique 0,1 M mélangés pour obtenir un pH de 6,0). Le substrat est réchauffé à 60°C avant l'ajout de l'enzyme. 500 mg (29 UI/mg de précipité à l'éthanol) de xylanase C sont dissouts dans 100 mL du même tampon et ajoutés au xylane. Cette préparation est incubée 24 heures à 60°C puis bouillie 10 minutes pour inactiver l'enzyme. La partie non hydrolysée est enlevée par centrifugation à 12 100 x g pendant 20 minutes. L'hydrolysat est ensuite lyophilisé et 1 g de la poudre obtenue est dissout dans 5 mL d'eau distillée pour être chromatographié.

3.4.2 Chromatographie par filtration sur gel

Principe: La résine utilisée pour séparer les différents oligosaccharides, est constituée de billes poreuses. Les molécules ayant un poids moléculaire élevé passent entre les billes et sortent rapidement. La trajectoire des plus petites molécules est ralentie car celles-ci pénètrent à l'intérieur de la phase stationnaire. Les oligosaccharides sont donc séparés en fonction de leur poids moléculaire (Browning, D.R. 1971 et Pharmacia, 1985).

Matériel:

-Pompe péristaltique (Microperpex) (modèle 2132)
-Bain chauffant recirculant (MGW Lauda) (modèle RM6)
-Colonnes avec manchon pour maintenir la température (5 x 100 cm) x 2 (Pharmacia) (modèle K 50/100)
-Réfractomètre différentiel (Waters) (modèle R403)
-Collecteur de fractions (Pharmacia) (modèle FRAC-100)
-Enregistreur (Linear Instruments Corp.)

Conditions d'opération:

-Température de la colonne: 50°C -Débit: 62,7 mL/heure -Phase mobile: H₂O -Gel: Biogel P-2 200-400 mesh (BioRad) ayant une limite de résolution de 100 à 1800 Daltons.

La phase mobile est dégaséifiée en la faisant bouillir sous vide pendant cinq minutes.

Traitement des échantillons:

L'échantillon est dégazéifié sous vide à 75°C pendant cinq minutes. Après la chromatographie, les fractions sont analysées par HPLC. Seules les fractions ne contenant pas de xylose ou de molécules supérieures à X10 sont conservées, rassemblées puis lyophilisées.

3.4.3 Chromatographie liquide à haute performance

Colonne à échange ionique

Principe: Les résines utilisées pour l'analyse des sucres sont généralement constituées de polystyrène-divinylbenzène. Elles ont l'avantage d'être très stables, monofonctionnelles et d'avoir un grand nombre d'ions échangeables par unité de volume (Browning, 1971). Cette matrice porte des groupements d'acide sulfonique. Ceux-ci sont chargés avec un ion antagoniste cationique. Le cation sera choisi en fonction de la sélectivité et de la résolution qu'il offre. Les résines comportant des ions Ag(I) sont utiles pour séparer des oligosaccharides ayant jusqu'à 11 résidus ainsi que les monosaccharides. Celles qui sont sous forme Ca(II) ont une bonne performance pour les monosaccharides et les oligosaccharides allant jusqu'à DP4. Par ailleurs, les résines constituées de Pb(II) séparent aisément les monosaccharides (Voragen et al, 1986).

Nous utilisons la colonne Aminex HPX-42A de BioRad. Ce système qui permet la séparation des sucres est réalisée grâce à deux mécanismes. Pour les oligosaccharides, le mécanisme primaire est l'exclusion moléculaire. Les monosaccharides sont séparés surtout par échange d'ions. En effet, la colonne utilisée comporte quatre pourcent d'ions antagonistes Ag(I) qui permettent l'échange ionique. L'échange de ligands prend place quand le complexe échantillon-antagoniste est formé suite au déplacement des molécules d'eau par les groupes hydroxyles des hydrates de carbone (Fiche technique de Bio-Rad).

Matériel:

Le système WatersTM Millipore est équipé des éléments suivants:

- Module intégrateur et enregistreur de données (modèle 746).
- Pompe (modèle 510).

- Injecteur manuel (Rhéodyne) ayant une boucle de 20 µL.
- Réfractomètre différentiel (modèle 410).
- Module de contrôle de température et chauffe-colonne (TCM).
- Pré-colonnes anionique et cationique (Bio-Rad) (modèle 125-0118) servant à retenir toutes molécules n'étant pas neutres. Les sucres pouvant passer à cause de leur neutralité.
- Colonne analytique: Aminex HPX-42A, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad).

Conditions d'opération:

- Température de la colonne: 80°C.
- Débit: 0,5 mL/min.
- Phase mobile: H₂O.

L'eau utilisée pour la phase mobile est épurée des matières organiques et ioniques grâce au système Millipore Milli-Q. Elle est ensuite dégaséifiée sous vide par un passage à travers une membrane de 0,45 μ m. L'eau est ensuite bouillie dix minutes.

Traitement des échantillons:

Les échantillons sont filtrés à travers une membrane de $0,45 \ \mu$ m (AcrodiscTM de Gelman Sciences). Lorsque le surnageant

de culture doit être analysé, il est lyophylisé pour le concentrer par évaporation sous vide (Savant, modèle SpeedVac) après la filtration. Il est ensuite repris dans 30 μ L d'eau distillée puis centrifugé une minute dans une centrifugeuse Eppendorf.

3.5 Conservation des souches

Les souches doivent être préparées en suspension de spores pour le travail. Cette suspension est faite à partir d'un tube de banque bien sporulé auquel on ajoute 10 mL de glycérol 20% La surface de la gélose est grattée avec une pipette. (v/v). Les cellules sont transférées dans un Erlenmeyer de 125 mL contenant des billes de verre et une barre magnétique stériles. La suspension est agitée sur un agitateur Maxi-Mix pendant dix minutes puis filtrée sur laine de verre. L'agitation sert à séparer les spores et la filtration à retenir le mycélium. Le nombre de spores est mesuré au spectrophotomètre à 660 nm puis comparé à une courbe standard. Cette suspension peut être conservée à -80°C pendant plusieurs mois. Elle est utilisée directement dans du milieu TSB pour la production d'inoculum.

3.6 Conditions de culture

3.6.1 Production d'inoculum

La production d'inoculum se fait dans un Erlenmeyer de 125 mL contenant 25 mL de milieu TSB. La culture est incubée à 34°C avec une agitation de 240 RPM (agitateur rotatif Psycrotherm, modèle G-27, New Brunswick Scientific Co.) pendant 24 heures. L'aseptie de la culture est vérifiée au microscope avant l'utilisation de l'inoculum (cf. section 3.7).

3.6.2 Croissance des cellules

Cinq pourcent (v/v) d'inoculum sont distribués dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de bouillon NMMP avec du glycérol comme source de carbone. Ce substrat ayant été choisi préférentiellement au mannitol, maltose, arabinose ou glucose parce qu'il ne semble pas interférer dans le métabolisme des xylanases et qu'il permet une bonne croissance cellulaire. L'incubation se fait à 34°C. La culture est agitée à 240 RPM pour permettre l'aération et le temps d'incubation est de 16 heures.

La croissance peut être évaluée en centrifugeant 10 mL de culture dans un tube conique gradué. La centrifugation est effectuée dans une centrifugeuse clinique à vitesse maximale pendant 10 minutes. Le volume de mycélium séparé par centrifugation est exprimé en pourcentage par rapport à 10 mL de culture.

3.6.3 Induction de l'ARN messager de xylanases

Ę

Les cultures en glycérol sont centrifugées à 7741 x g, à 4°C pendant dix minutes. Le surnageant est jeté puis les cellules sont lavées avec une solution de NaCl 100 mM pour enlever toute trace de glycérol (Jaurin et Cohen, 1984). Les cellules sont ensuite remises dans un milieu NMMP frais contenant l'inducteur comme unique source de carbone. La culture est à nouveau incubée à 34°C avec une agitation de 240 RPM. Les prélèvements sont faits après différents temps d'induction.

3.7 Observation au microscope

Un microscope à contraste de phase (Zeiss) permet de vérifier si la culture n'est pas contaminée. Une goutte de milieu est déposée entre lame et lamelle. Puis une goutte d'huile à immersion est placée au-dessus de cette dernière. L'observation se fait grâce à un objectif 100 X (Neofluar 63/0.90, Zeiss).

3.8 Test d'activité xylanasique

Principe: Lors de l'hydrolyse du xylane couplé au RBB par la xylanase, le colorant est relargué et l'activité enzymatique est mesurée par le diamètre des zones d'éclaircissement.

Méthode:

í

Des puits de 7 mm de diamètre sont faits dans 25 mL de milieu solide. Le surnageant à tester y est déposé à raison de 50 μ L par puits. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées, enveloppées dans un sac à 40°C pendant 18 heures. Le diamètre des zones d'éclaircissement peut alors être mesuré.

.

4. MÉTHODE D'EXTRACTION DE L'ARNM

4.1 Préparation de la verrerie et des solutions:

L'acide ribonucléique est facilement dégradé par les ribonucléases présentes partout dans l'environnement. Pour éviter cette dégradation, les solutions et les objets sont traités avec du diéthylpyrocarbonate (DEPC) quand ils ne peuvent pas être neufs, stériles et jetables.

Principe: Le DEPC inactive les protéines en agissant sur deux acides aminés: le tryptophane et la lysine. Cette action entraîne des modifications structurales irréversibles (Rosén et Fedorcsak, 1966).

Méthode:

Après le lavage habituel, la verrerie est immergée pendant 12 heures dans une solution de DEPC à 0,1%. Par la suite les objets sont séchés au four Pasteur à 250° C pendant au moins trois heures. Les solutions sont ajustées à 0,1% de DEPC et agitées vigoureusement toute la nuit (Maniatis, 1982). Le DEPC n'agissant pas seulement sur les ribonucléases mais aussi sur les résidus adénine de l'ARN, cet inhibiteur doit être détruit par autoclavage. Les produits de dégradation, le CO₂ et l'éthanol, sont facilement volatilisés par agitation (Blumberg, 1987).

4.2 Isolement d'ARNm.

61

L'isolement de l'ARN intact implique trois étapes importantes: premièrement, les nucléases endogènes doivent être inhibées; deuxièmement, l'ARN doit être déprotéiné; troisièmement, l'ARN doit être séparé des autres composantes de l'homogénat (MacDonald et al., 1987).

L'ARN pouvant être facilement détruit par les ribonucléases de la cellule, celles-ci doivent être rapidement inactivées. Pour cette raison, les cellules sont rapidement immergées dans un inhibiteur: l'isothiocyanate de guanidinium. La déprotéination et l'enlèvement des autres composantes se font par ultracentrifugation.

Principe: L'isothiocyanate de guanidinium est un dénaturant protéique puissant parce qu'il contient des cations et des anions qui sont des agents chaotropiques. De plus, il facilite l'isolement d'ARN intact et fonctionnel de façon plus efficace que le phénol ou l'urée. La dénaturation des nucléases est augmentée grâce à l'ajout d'un agent réducteur comme le 2mercaptoéthanol qui brise les ponts disulfures essentiels à l'activité de l'enzyme (Chirgwin et al., 1979). L'ultracentrifugation utilise le principe de sédimentation sélective basée sur la densité de flottaison (MacDonald et al., 1987).

Matériel:

-Presse hydraulique (American Instrument CO.) -Ultracentrifugeuse (Beckman) (modèle L5-50) -Rotor (Beckman) (modèle SW 41Ti) ayant une limite de 41 000 RPM.

Solutions:

Solution D: isothiocyanate de guanidinium 4 M; citrate de sodium 25 mM, pH 7; sarkosyl 0.5% (p/v). La solution est dissoute à 65°C. Cette solution stock peut être conservée au moins trois mois à température ambiante. La solution D est préparée en ajoutant 0,36 mL de 2-mercaptoéthanol à 50 mL de solution stock.

CsCl: ClCs (BRL) 5,7 M; EDTA (Fisher) 0,1 M, pH 7.

Méthode:

Les cultures de cellules, induites pendant les temps requis, sont centrifugées dans des tubes jetables (Sarstedt, tubes coniques à capuchons vissables) de 50 mL pendant dix minutes à 7741 x g à 4°C. Le surnageant peut être conservé pour mesurer l'activité xylanasique (cf. section 3.8). Le culot cellulaire est rapidement complété à 8 mL avec la solution D (Chomczynski et Sacchi, 1987). Les cellules sont ensuite brisées à la presse hydraulique à 13 000 PSI. L'extrait cellulaire (7 mL) est déposé sur un coussin de 3,5 mL de chlorure de césium. La préparation est ultracentrifugée pendant 16 heures à 100 000 x g et 25° C (Fisher et Wray, 1989). Le culot est récupéré, séché par inversion puis redissout dans 400 μ L d'eau traitée au DEPC. L'ARN est précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol 95% froid à -20°C pendant au moins deux heures (Wallace, 1987). L'ARN est ensuite récolté par centrifugation 5 minutes avant d'assécher le culot. Celui-ci est resuspendu dans 300 μ L d'eau traitée au DEPC. L'ARN peut être conservé ainsi à -70°C.

4.3 Mesure de la densité optique

La pureté et la qualité de l'ARN sont évaluées par spectrophotométrie. La densité optique est mesurée à 260 nm et à 280 nm. Ce sont les longueurs d'ondes d'absorption maximale pour les acides nucléiques et les protéines respectivement. Le rapport de ces deux valeurs doit être voisin de deux. Un ratio plus élevé indique une dégradation de l'ARN, tandis qu'un indice inférieur à deux est représentatif d'une présence importante de protéines.

Matériel:

-Spectrophotomètre (LKB) (modèle Ultrospec II) -Cuve d'absorption micro de largeur interne de 2 mm ayant un spectre de transparence de 220 à 2500 nm (Canlab).

Méthode:

À 260 nm, la densité optique est réglée à zéro avec de l'eau distillée. L'échantillon est dilué au 100^{e} de sa concentration avec de l'eau distillée puis sa densité optique est lue. Cette opération est répétée à 280 nm. De plus, la densité optique à 260 nm nous permet de déterminer l'information sur la concentration de l'ARN. En effet, à cette longueur d'onde une D.O. de 1 est égale à 40 μ g/mL d'ARN (Sambrook *et al.*, 1989).

4.4 Visualisation de l'ARN: gel d'agarose dénaturant

Il est bon de vérifier l'état de l'ARN en le faisant migrer dans un gel d'agarose. Les différents ARN sont séparés selon leur poids moléculaire. Les ARN ribosomaux constituant 85% du total de l'ARN, il est facile d'observer les sous-unités 16S et 23S. Cette technique nous permet de nous assurer de l'absence d'ADN chromosomique dans la préparation.

Principe: La formaldéhyde et la formamide permettent la dénaturation des structures secondaires de l'ARN. Le bromure d'éthidium créant un bruit de fond important et empêchant le transfert efficace de l'ARN, il est préférable de mettre ce colorant directement dans l'échantillon plutôt que dans le gel (Sheiness et Sullivan, 1986 et Pappu et Hiruki, 1989).

Matériel:

-Pompe péristaltique (Microperpex) (modèle 2132) -Générateur de courant (BioRad) (modèle 200/2,0) -Bain de migration recirculant (BioRad) (modèle Mini-Sub) -Transilluminateur à U.V. (Fotodyne) -Appareil photographique (Polaroid) (modèle MP-4 land)

Solutions:

Tampon de migration 10X: MOPS 0,2 M; EDTA 10 mM; acétate de sodium 10 mM, pH 7.
Colorant 10X: xylène cyanol 0,2% (p/v); bleu de bromophénol 0,2% (p/v); EDTA 10 mM; glycérol 50% (p/v).

Méthode:

L'agarose (0,6 g) est fondu dans 36 mL d'eau distillée et refroidi à environ 55° C. Le tampon de migration, à raison de 5 mL, y est ajouté avec 9 mL de formaldéhyde 37% (p/v) déionisée avec des billes de résine de 20 à 50 mesh (AG 501-X8 de BioRad). Le gel est coulé et polymérise pendant une heure. Les échantillons d'ARN (2 µL) sont mélangés avec 5 µL de formamide, 2 µL de formaldéhyde, 1 µL de tampon de migration 10X et 1 µL de bromure d'éthidium (400 µg/mL). Les échantillons sont incubés 10 minutes à 65°C. Ils sont ensuite déposés sur de la glace et 1 µL du colorant 10X est ajouté. Ces échantillons sont transférés sur le gel. La migration se fait à 3 V/cm dans du tampon de migration 1X avec une recircularisation constante jusqu'à ce que le colorant bleu soit à 3 cm du bas du gel (Rosen et Villa-Komaroff, 1990). Les bandes d'ARN peuvent être détectées sous un éclairage ultra-violet et le gel est photographié.

5. HYBRIDATION DE L'ARN AVEC UNE SONDE RADIOACTIVE

5.1 Buvardage de l'ARN

Principe: Pour être fixé efficacement à une membrane de nitrocellulose, l'ARN doit être dénaturé. La dénaturation est accomplie avec du glyoxal. Cette molécule permet aux structures secondaires de se défaire, l'ARN se fixe donc mieux à son support (Thomas, 1980). Ainsi immobilisé sur une matrice inerte, l'ARN ne peut se réassocier mais ses sites de liaisons sont disponibles pour l'hybridation avec une sonde (Anderson et Young, 1985).

Matériel:

1

-Appareil à buvardage (BioRad) (modèle Bio-Dot SF) -Membrane de nitrocellulose (BioRad)

Solutions:

-SSC 20X: NaCl 3 M; citrate trisodique 0,3 M. -Tampon sodium-phosphate 0,3 M, pH 7: Na₂HPO₄.7H₂O 0,3 M; NaH₂PO₄.H₂O 0,3 M; Ces deux solutions sont mélangées pour obtenir le pH désiré.

Méthode:

La quantité nécessaire d'ARN est de 60 μ g par échantillon et par membrane. Les contrôles négatifs sont faits en hydrolysant l'ARN avec du NaOH 0,2 M à 37°C pendant 30 minutes (Moser et al., 1989). Pour tous les échantillons, la première étape consiste à dénaturer l'ARN avec du glyoxal 1 M déionisé avec des billes de résines de 20 à 50 mesh (AG 501-X8 de BioRad); tampon sodium phosphate 10 mM. Les échantillons sont incubés à 50°C pendant une heure. Ils sont ensuite mis rapidement sur glace et 200 μ L d'eau DEPC sont ajoutés. Les trois papiers filtres et la membrane de nitrocellulose sont mouillés avec du SSC 20X. Les échantillons sont buvardés sous vide et les puits sont rincés avec du SSC 20X. La membrane est ensuite submergée quelques minutes dans du SSC 2X et cuite au four à vide à 80°C pendant deux heures. Cette étape sert à retirer le glyoxal et à fixer l'ARN (Fiche technique de BioRad et Gietz et Hodgetts, 1985).

5.2 Préparation de la sonde

5.2.1 Marquage par déplacement de l'encoche

Principe: Le procédé de marquage par déplacement de l'encoche (Nick translation) utilise la DNase I pour créer des encoches simple brin dans l'ADN double brin que l'on veut marquer. À partir de ces encoches, la polymérase I peut enlever des segments d'ADN simple brin et les remplacer avec de nouveaux

déoxyribonucléotides contenant un élément radioactif (Arrand, 1985).

Matériel:

Ensemble de marquage par déplacement de l'encoche de BRL.

Solution:

-TE: Tris-HCl (pH 8) 10 mM; EDTA (pH 8) 1mM.

Méthode:

Il faut mélanger 5 μ L de déoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dTTP), 1 μ g d'ADN à marquer, 10 μ L de dCTP, [α -³²P] (111 TBq/mmol) et compléter à 45 μ L avec de l'eau distillée stérile. On ajoute ensuite 5 μ L de la solution contenant la DNase I (40 pg/ μ L) et la polymérase I (0,4 U/ μ L). La préparation est incubée à 13 °C pendant une heure. La réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant 5 μ L de tampon d'arrêt (Na₂EDTA pH 8; 300 mM) et 45 μ L de TE. Les déoxyribonucléotides radioactifs non incorporés sont éliminés par chromatographie sur colonne spun (voir section 5.2.2). La colonne contenant l'ADN marqué est centrifugée 4 minutes à 3000 RPM. On ajoute 100 μ L de TE sur la colonne et celle-ci est recentrifugée 4 minutes à 3000 RPM. Cette dernière opération est répétée une deuxième fois (Rigby et al., 1977).
5.2.2 Préparation de la colonne spun

Principe: Cette colonne sépare les acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire. Elle permet donc de purifier la sonde en éliminant les déoxyribonucléotides qui n'ont pas été incorporés lors du marquage par déplacement de l'encoche (Maniatis *et al.*, 1982).

Méthode:

Le bas d'une seringue de 1 cc est bouché avec une petite quantité de laine de verre siliconisée. La colonne est remplie avec du Sephadex G-50 (Pharmacia) puis centrifugée 4 minutes à 1000 x g dans un tube jetable (Falcon, 2059). Le volume de résine est complété à 1 cc puis recentrifugé dans les mêmes conditions jusqu'à ce que le volume soit constant à 1 cc. Un Eppendorf est déposé au fond du tube pour récupérer la sonde (Maniatis et al., 1982).

5.3 Préhybridation et hybridation

Principe: Les acides nucléiques se fixent facilement à la membrane de nitrocellulose. Pour éviter que la sonde radioactive ne s'attache de façon non spécifique, la membrane est préhybridée avec une solution contenant de l'albumine sérique bovine. Celle-ci bloque les sites libres sans toutefois empêcher l'hybridation entre la matrice et la sonde (Denhardt, 1966). Cette dernière peut se fixer à l'ARN complémentaire à sa séquence nucléotidique.

Solutions:

-SSPE 20X: NaCl 3,6 M; NaPO₄ (pH 7,7) 0,2 M; EDTA 20 mM. -Denhardt 50X: Ficoll 0,02% (p/v); polyvinylpyrrolidone 0,02% (p/v); albumine sérique bovine 0,02% (p/v).

Méthode:

Pour la préhybridation et l'hybridation, 150 μ L/cm² de solution sont utilisés. Les filtres de nitrocellulose sont préhybridés pendant 12 heures à 42°C dans une solution fraîche composée de formamide 50% (v/v); SSPE 5X; solution de Denhardt 5X; ADN de sperme de saumon dénaturé 100 μ g/mL; SDS 0,1% (p/v). L'hybridation se fait dans une solution contenant: formamide 50% (v/v); SSPE 5X; solution de Denhardt 2X; ADN de sperme de saumon 100 μ g/mL; SDS 0,1% (p/v). Pour la préhybridation et l'hybridation, l'ADN de sperme de saumon doit être dénaturé en chauffant à 100°C pendant 5 minutes. La sonde est dénaturée 5 minutes à 100°C puis rapidement refroidie dans la glace avant d'être ajoutée à la solution d'hybridation. Les boîtes contenant les membranes sont incubées à 42°C pendant 14 heures (Ingram et al., 1989). Les filtres sont ensuite lavés pour enlever l'excédent de sonde non hybridée à l'ARN. Pour les lavages, au moins 350 μ L/cm² de membrane sont utilisés. Les trois premiers lavages sont effectués à la température de la pièce pendant 30 minutes dans la solution suivante: SSPE 1X et SDS 0,1% (p/v). Un dernier lavage est fait à 60°C, 30 minutes avec SSPE 0,1X et SDS 0,1% (p/v) (Ingram et al., 1989).

Les membranes sont ensuite exposées sur un film à rayon X (Kodak, X-O Mat). Elles sont généralement incubées toute la nuit à -70°C. La densitométrie peut être utilisée pour mesurer l'intensité de chaque bande.

RÉSULTATS

1. CHOIX DES CONDITIONS DE CULTURE

1.1 Choix de la source de carbone

Les ARN_m sont en faible concentration dans les cellules; il est donc important d'obtenir une bonne masse cellulaire avant l'induction si l'on veut obtenir une quantité appréciable d'ARN_m. Nous avons donc cherché à déterminer quelle source de carbone permettrait une bonne croissance des bactéries sans toutefois faire de la répression catabolique ou de l'induction du régulon des xylanases. Nous avons testé différentes sources de carbone telles le glucose, le glycérol, le maltose et le mannitol à une concentration de 1%. La croissance des cellules pouvait être évaluée en mesurant le volume du mycélium après centrifugation. L'activité enzymatique était mesurée qualitativement en mesurant les zones d'hydrolyse sur milieu solide contenant du RBB-xylane. Ces résultats sont présentés au tableau I. La souche 3131 a été utilisé au début parce que nous pensions que le vecteur pIJ702 natif, porté par ce mutant, ne changerait pas la régulation du régulon xylanase. Les souches S. lividans IAF 18 (xln A), IAF 42 (xln B) et IAF 20 (xln C) ont été utilisées comme contrôles positifs car chacune d'elles contient le gène d'une des trois xylanases porté par le vecteur multicopies pIJ702. Toutes les mesures ont été prises après 48 heures de croissance.

Pour la souche IAF 20, le glucose permet une croissance aussi bonne qu'en glycérol. Par contre, le glucose semble faire de la répression de la production de xylanase pour toutes les

TABLEAU I

ÉVALUATION QUALITATIVE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE ET DE LA CROISSANCE MYCÉLIALE EN FONCTION DE LA SOURCE

Souches	Sources de carbone	Zone mm	PMV ^a %
	glucose	0	5,8
	glycérol	9	18,3
1326	maltose	7,5	5,0
	mannitol	7,5	7,0
	glucose	10,0	1,0
	glycérol	13,5	4,0
IAF 18	maltose	13,8	3,4
	mannitol	13,8	3,4
	glucose	10,3	2,9
	glycérol	12,0	3,9
IAF 42	maltose	11,8	2,0
	mannitol	11,3	2,9
	glucose	10,0	2,9
	glycérol	13,0	2,9
IAF 20	maltose	15,0	0,5
	mannitol	16,3	1,5
	glucose	0	3,5
	glycérol	0	3,4
3131	maltose	9	5,9
	mannitol	0	2,2

DE CARBONE

a: PMV: "Packed Mycelium volume"

souches. Le maltose est la meilleure source de carbone pour la souche 3131 mais il induit la xylanase. De plus, pour plusieurs souches, la croissance n'est pas très bonne avec ce sucre. Le glycérol permet une croissance supérieure pour les souches 1326, IAF 18 et IAF 42 et ne semble toutefois ni induire, ni réprimer la production de xylanase. Ce dernier a donc été choisi comme source de carbone pour la croissance cellulaire.

1.2 Choix de l'inducteur

L'étape suivante était de trouver un bon inducteur. 11 s'agissait de prélever du surnageant de culture après 24 heures d'induction en présence de 1% d'inducteur à tester: soit du xylane de glumes d'avoine, du xylane de bouleau, du xylane de mélèze, du xylose, du X₂-X₁₀, de l'acide syringique, de l'arabinose ou du X1-X10. L'activité xylanasique était mesurée qualitativement sur milieu solide contenant du RBB-xylane. Ces résultats sont présentés au tableau II. L'acide syringique et l'arabinose ont été testés comme inducteurs pour la souche 3131. Comme les résultats n'étaient pas concluants, nous n'avons pas poursuivi plus loin nos investigations. Le xylane de glumes d'avoine est le meilleur inducteur dans tous les cas sauf pour la xylanase A de la souche IAF 18 qui a une activité légèrement plus élevée en xylane de mélèze. Nous voulions un bon inducteur des xylanases mais qui permette d'isoler facilement l'ARN des

TABLEAU II

ÉVALUATION QUALITATIVE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

POUR LE CHOIX DE L'INDUCTEUR

a: xylane soluble de glumes d'avoine

b: xylane de bouleau

c: xylane de mélèze

Souches	Inducteurs	Zone (mm)
1326	xylane A ^a	20,5
	xylane B ^b	16
	xylane M ^c	8
	xylose	0
	x ₂ -x ₁₀	12
	xylane A ^a	22
	xylane B ^b	18
TAP 19	xylane M ^C	23
IAF 10	xylose	10
	x ₂ -x ₁₀	17
	xylane A ^a	24
	xylane B ^b	14
TAF 42	xylane M ^C	23
181 76	xylose	12
	x ₂ -x ₁₀	20
	xylane A ^a	29
	xylane B ^b	23
TAF 20	xylane M ^c	25
Int EV	xylose	28
	x ₂ -x ₁₀	28
	acide syringique	0
3131	arabinose	0
	xylane A ^a	17
	xylane B ^b	12
	xylane M ^c	12
	xylose	0
	x ₁ -x ₁₀	0
	x ₂ -x ₁₀	18

ž

ŧ

cellules. Aucun des trois xylanes que nous avons testés ne convenait. Même par ultracentrifugation, ces polymères restaient mélangés à l'ARN et nous n'obtenions donc pas de préparations pures. L'hydrolysat de xylane (X_2-X_{10}) de glumes d'avoine permettait une bonne induction tandis que le xylose semblait plutôt agir comme répresseur. Pour ces raisons, nous avons choisi l'hydrolysat de glumes d'avoine ne contenant pas de xylose (X_2-X_{10}) .

2. INDUCTION AVEC UN HYDROLYSAT (X_2-X_{10}) DE GLUMES D'AVOINE

L'hydrolysat de glumes d'avoine étant très peu disponible, nous avons choisi d'en utiliser le moins possible. Nous avons donc utilisé 0,3% de substrat.

Le tableau III résume les résultats obtenus pour l'induction avec l'hydrolysat de glumes d'avoine en fonction du temps. Nous pouvons remarquer que l'induction prend place très rapidement puisqu'après deux heures nous avons pu observer une zone d'hydrolyse sur milieu solide contenant du RBB-xylane. De façon générale, l'activité augmente jusqu'à 10 heures. Après ce temps, l'activité enzymatique devient stable.

2.1 Préparation de l'hydrolysat de xylane de glumes d'avoine (X_2-X_{10})

2.1.1 Séparation par filtration sur gel

La colonne utilisée à cette étape ayant un pouvoir de séparation limitée à 1 g, celle-ci a été effectuée en plusieurs

TABLEAU III

6

\$

ACTIVITÉ XYLANASIQUE DE LA SOUCHE 1326 SUITE A L'INDUCTION AVEC X₂-X₁₀ DE GLUMES D'AVOINE 0,3%

Temps d'induction (heures)	Zone (mm) ^a	
0,25	0	
0,5	0	
1	3,0	
2	6,8	
4	9,0	
6	9,0	
8	9,5	
10	10,0	
12	10,0	
14	10,0	
16	10,0	
18	10,0	

a: Puits de 2,5 mm contenant 25 μ L de surnageant

FIGURE 8: Chromatogramme des produits d'hydrolyse du xylane de glumes d'avoine: hydrolysé par la xylanase C, séparés par la colonne K50/100 (Pharmacia).

Phase mobile: H₂O Volume mort: 610 mL Volume d'exclusion du xylose: 774 mL

A: Grosses molécules (supérieures à X10).



١

(

fois. Un exemple de chromatogramme est présenté à la figure 8. Cette étape servait à enlever le xylane qui n'avait pas été hydrolysé ainsi que les molécules ayant un degré de polymérisation (DP) supérieur à 10 et le xylose. Plusieurs fractions étaient analysées par HPLC pour connaître leur contenu précis. Seules les fractions contenant des molécules de DP de deux à dix furent conservées puis lyophilisées. À la fin de l'opération, environ neuf grammes de substrat ont été ainsi récupérés.

2.1.2 Analyse par HPLC

La figure 9 montre un chromatogramme du substrat final. Le X_2-X_{10} était à une concentration de 2%. Nous pouvons remarquer que quelques grosses molécules et un peu de xylose étaient toujours présents à raison de 3,6% et 0,3% respectivement. La limite de séparation de la colonne HPX-42A se situe autour de X_7 et nous supposons que les épaulements contenus dans ce pic sont les molécules de DP de 8, 9 et 10.

3. DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE D'APPARITION DES ARN DE XYLANASES

3.1 Caractérisation des ARN

Après avoir isoler l'ARN des cultures de cellules induites avec du X_2-X_{10} , il était nécessaire de vérifier sa qualité et sa concentration. Le ratio des densités optiques à 260 nm et 280



FIGURE 9: Chromatogramme des produits d'hydrolyse de xylane de glumes d'avoine: hydrolysé par la xylanase C, analysé sur HPLC avec la colonne Aminex HPX42A (BioRad).

Phase mobile: H₂O

oliqoxyloside

(

temps de rétention

xylose (X ₁)
$xylobiose(X_2)$
xylotriose (X ₃)
$xylotetraose(X_4)$
xylopentaose (X ₅)
xylohexaose (X ₆)
xyloheptaose (X ₇)
grosses molécules

20,92 18,50 16,68 15,10 13,72 12,29 11,41 <6,84

nm pouvait nous donner un aperçu de la qualité de l'ARN quant à sa pureté et son intégrité. En effet, un ratio supérieur à 2 aurait démontré que l'ARN était dégradé, ce qui ne semble pas être le cas (Tableau IV). Tous les ratios sont inférieurs à 2, ce qui suppose la présence de protéines dans les préparations. Comme ceci ne pouvait pas avoir de conséquences majeures sur les étapes ultérieures, nous n'avons pas cherché à purifier davantage l'ARN au risque de diminuer la quantité. De façon générale, la concentration pour chaque échantillon était assez élevée sauf pour la souche 1326 après 16 et 18 heures d'induction. Comme la concentration de la préparation était très variable d'un échantillon à l'autre, nous avons décidé de mettre la même quantité d'ARN sur la membrane de nitrocellulose plutôt que de déposer le même volume pour chaque préparation.

1

Nous avons utilisé une autre méthode pour déterminer la qualité des préparations d'ARN: la migration en gel d'agarose (Fig. 10). Ceci nous permettait de nous assurer de l'absence d'ADN chromosomique car lorsque celui-ci est présent dans la préparation, il reste dans le puits et ne migre pas dans le gel. Il peut être détecté grâce à la coloration au bromure d'éthidium. Les ARN ribosomaux représentant 85% du total d'ARN de la cellule, nous pouvons les observer facilement en gel d'agarose. Ils forment deux bandes compactes, l'une étant l'unité 16S et l'autre 23S. Le reste de la bande de migration semble plutôt

TABLEAU IV

ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION ET DE LA QUALITÉ DE L'ARN INDUIT AVEC DU X₂-X₁₀ DE GLUMES D'AVOINE 0,3%

Souches	Temps d'induction (heures)	D.O. ₂₆₀	D.O. ₂₈₀	Ratio	Concentration d'ARN (µg/µL)
	2	32,8	19,9	1,6	1,3
	4	113,9	69,2	1,6	4,6
	6	53,7	32,9	1,6	2,1
	8	140,0	34,5	1,9	5,6
1226	10	59,5	37,2	1,6	2,4
1326	12	66,3	41,5	1,6	2,7
	14	88,3	57,1	1,5	3,5
	16	11,2	6,6	1,7	0,4
	18	8,7	4,8	1,8	0,3
IAF 18	5	90,6	54,7	1,7	3,6
IAF 42	5	121,9	70,6	1,7	4,9
IAF 20	5	25,7	15,6	1,6	1,0



FIGURE 10: Migration en gel d'agarose de l'ARN isolé après différents temps d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%.

1- 1326, 2 h 2- 1326, 4 h 3- 1326, 6 h 4- 1326, 8 h 5- 1326, 10 h 6- 1326, 12 h 7- 1326, 14 h 8- IAF 18, 5 h 9- IAF 20, 5 h 10- IAF 42, 5 h

(

diffus parce qu'il y a des ARN de différents poids moléculaires. Les ARN de transfert sont très légers. Quand il sont présents, ils forment un amas assez dense dans le bas du gel. À la figure 10, nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas d'ADN chromosomique ni d'ARN, dans les différentes préparations.

3.2 Hybridation avec des sondes spécifiques aux trois xylanases.

L'ARN a été déposé sur la membrane de nitrocellulose à raison de 20 μ g pour chacun des échantillons. Nous avons mis la même quantité d'ARN total dans chacun des puits pour nous permettre de pouvoir comparer les quantités relatives des ARN_m spécifiques à chacune des xylanases par rapport à l'ARN total. La figure 11 montre un autoradiogramme et un densitogramme de l'ARN de la souche 1326 hybridé avec la sonde correspondant à la xylanase C. Cette figure ne présente qu'un seul exemple mais tous les résultats d'hybridation et de densitométrie sont présentés plus loin sous forme de graphiques, ce qui rend la compréhension des résultats plus facile.

{

Les contrôles positifs et négatifs sont présentés à la figure 12. Les contrôles négatifs étaient constitués d'ARN hydrolysé avec du NaOH 0,2 M. Ceci aurait permis de déceler le bruit de fond causé par de l'ADN chromosomique, s'il avait été présent. Cela nous permettait aussi de nous assurer que les protéines présentes dans les préparations ainsi que les molécu-







- A) Autoradiogramme
- B) Densitogramme

les d'ARN dégradées ne pouvaient pas interférer avec la réaction d'hybridation.

Les contrôles positifs étaient représentés par les clones hyperproducteurs de chacune des xylanases: IAF 18 pour la xylanase A, IAF 42 pour la xylanase B et IAF 20 pour la xylanase C. À la figure 12 nous observons une légère réaction croisée entre les xylanases B et C. La sonde de la xylanase A semble s'être hybridée légèrement sur les ARN des souches IAF 42 et IAF 20.

Les résultats de densitométrie ont été présentés sous forme de graphiques à la figure 13. Nous pouvons voir que l'ARN_m de la xylanase B apparait le premier. Déjà, après deux heures d'induction, une très faible quantité d'ARN est présente. À partir de six heures, cette augmentation s'affirme. Les trois xylanases ont un pic d'apparition après huit heures d'induction qui s'estompe après dix heures d'incubation avec l'inducteur. Par la suite, chacune des xylanases se remanifeste mais à des temps différents. Cette deuxième vague d'apparition se fait plus rapidement que la première, le temps de latence est plus court.



FIGURE 12: Contrôles positifs et négatifs pour les xylanases A, B et C.

- A- Hybridation avec une sonde radioactive correspondant à la xylanase A.
- B- Hybridation avec une sonde radioactive correspondant à la xylanase B.

-

- C- Hybridation avec une sonde radioactive correspondant à la xylanase C.
- 1- Négatif:ARN de 1326 récolté après 2 h d'induction avec du X₂-X₁₀ 0,3%, hydrolysé avec NaOH 0,2 M.
- 2- Négatif:ARN de 1326 récolté après 4 h d'induction avec du X₂-X₁₀ 0,3%, hydrolysé avec NaOH 0,2 M.
- 3- Négatif:ARN de 1326 récolté après 6 h d'induction avec du X₂-X₁₀ 0,3%, hydrolysé avec NaOH 0,2 M.
- 4- Positif: ARN de IAF 18 (xylanase A) après 5 h d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%.
- 5- Positif: ARN de IAF 42 (xylanase B) après 5 h d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%.
- 6- Positif: ARN de IAF 20 (xylanase C) après 5 h d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%.

FIGURE 13: Apparition des ARN_m spécifiques aux trois xylanases A, B et C après différents temps d'induction avec du X_2-X_{10} 0,3%.

-

A: ARN de la xylanase A B: ARN de la xylanase B C: ARN de la xylanase C



ł

4. UTILISATION DES OLIGOXYLOSIDES

4.1 Utilisation des oligoxylosides par la souche sauvage S. lividans 1326

Nous avons ensuite voulu faire la corrélation entre l'apparition des différents ARN_m et l'utilisation des oligoxylosides. Certains chromatogrammes de l'utilisation des différents oligoxylosides par la souche 1326 sont présentés à la figure 14. Nous pouvons remarquer que les grosses molécules disparaissent au profit des plus petites comme le xylose, le xylobiose et le xylotriose principalement. Avec le temps, les petites molécules sont épuisées à leur tour. Les résultats des chromatogrammes sont présentés sous forme de graphiques à la figure 15. Cette figure exprime l'utilisation des différents oligoxylosides par la cellule. Le xylose apparaît en quantité décelable après huit heures d'induction et est rapidement utilisé par la cellule tandis que la quantité de xylobiose croît jusqu'à dix heures pour diminuer par la suite. Le xylotriose, le xylotétraose et le xylopentaose ont un schéma d'utilisation relativement Ils augmentent en nombre jusqu'à quatre heures en semblable. présence de l'inducteur et ils décroissent par la suite. Pour les xylohexose et heptaose, nous observons une augmentation de leur quantité jusqu'à deux heures après l'induction. Nous pouvons observer que leur quantité diminue plus rapidement que les xylotriose, xylotétraose et xylopentose. Les valeurs

FIGURE 14: Chromatographie par HPLC des surnageants de culture de la souche S. lividans 1326 après différents temps d'induction.

- A) 30 minutes
- B) 2 heures
- C) 6 heures D) 10 heures
- E) 14 heures
- F) 18 heures

Temps de rétention: 20,68: X₁ 18,58: X₂

16,76: X₃ 15,22: X₄ 13,62: X₅ 12,42: X₆ 11,54: X₇ <7,00: Grosses molécules ſ



_ X2

B)

G

1X1



D)





×6 X5 X4

X₃



X3 X2

dun (e.s. =

Ę

)

FIGURE 15: Utilisation des différents oligoxylosides par la souche S. lividans 1326.

- A) xyloseB) xylobioseC) xylotriose
- D) xylotétraose E) xylopentaose
- F) xylohexaose G) xyloheptaose
- H) molécules ayant un degré de polymérisation supérieur à 10.

{



relatives au xyloheptaose sont probablement surestimées à cause de la présence des autres molécules plus grosses dans les pics identifiés comme étant X_7 sur les chromatogrammes.

4.2 Utilisation des oligoxylosides par les clones S. lividans IAF 18, IAF 42 et IAF 20

Pour étudier l'action d'une seule enzyme à la fois sur les différents oligoxylosides, nous avons utilisé les trois souches ne produisant qu'une seule des trois xylanases. Les figures 16 et 19 nous permettent de voir l'effet de la xylanase A sur les différents oligoxylosides. En observant les quelques chromatogrammes présentés, nous pouvons remarquer que les molécules ayant un DP supérieur à 5 sont, de façon générale, très peu hydrolysées. Par contre, il est facile d'apercevoir l'accroissement du xylose, du xylobiose et du xylotriose tandis que le X_4 et le X_5 diminuent. L'observation du chromatogramme de la figure 16c nous a permis de remarquer que certains pics avaient été séparés en deux par l'intégrateur. Pourtant, ces deux valeurs correspondent au total d'un seul pic. Nous les avons donc tout simplement additionnées pour présenter les graphiques de la figure 19.

Le clone IAF 42 nous a permis d'observer l'action indépendante de la xylanase B. Nous pouvons remarquer que le schéma général ne varie pas beaucoup dans le temps, mais que c'est FIGURE 16: Chromatographie par HPLC du surnageant d'une culture de la souche S. lividans IAF 18 induite avec X_2-X_{10} 0,3% après différents temps.

- A) 15 minutes
- B) 1 heure
- C) 4 heures
- D) 8 heures
- E) 12 heures
- F) 16 heures

Temps de rétention: 20,45: X₁ 18,23: X₂ 16,40: X₃ 14,48: X₄ 12,88: X₅ 11,94: X₆ 10,92: X₇ 10,47: X₈ 9,47: X₉ 8,62: X₁₀ <7,00: Grosses molécules













(

(

FIGURE 17: Chromatographie par HPLC du surnageant d'une culture de la souche S. lividans IAF 42 induite avec X_2-X_{10} 0,3% après différents temps.

A) 15 minutesB) 1 heureC) 4 heuresD) 8 heures



(

i

(











FIGURE 18: Chromatographie par HPLC du surnageant d'une culture de la souche S. lividans IAF 20 induite avec du X_{2} - X_{10} 0,3% après différents temps.

- A) 15 minutes
- B) 1 heure
- C) 4 heures
- D) 8 heures
- E) 12 heures
- F) 16 heures

Temps de rétention: 19,89: X1

18,08:	X_2	
16,60:	X ₃	
14,74:	X ₄	
13,20:	X ₅	
12,02:	X ₆	
11,20:	X7	
9,22:	Xg	
8,81:	X10	
<7,00:	Grosses	molécules
	18,08: 16,60: 14,74: 13,20: 12,02: 11,20: 9,22: 8,81: <7,00:	18,08: X ₂ 16,60: X ₃ 14,74: X ₄ 13,20: X ₅ 12,02: X ₆ 11,20: X ₇ 9,22: X ₉ 8,81: X ₁₀ <7,00: Grosses

f













l

(
FIGURE 19: Utilisation des différents oligoxylosides par les souches S. lividans IAF 18 (xln A), IAF 42 (xln B) et IAF 20 (xln C).

(

- A) Xylose (X₁)
- B) Xylobiose (X₂)
 C) Xylotriose (X₃)
- D) Xylotetraose (X_4) E) Xylopentaose (X_5)
- F) Xylohexaose (X_6) G) Xyloheptaose (X_7)
- H) Xylooctaose (X_8) I) Xylonanose (X_9)
- J) Xylodécaose (X_{10})

-8-	XLN A
	XLN B
	XLNC



ŧ

plutôt l'ensemble des molécules qui tend à diminuer (Fig. 17). À la figure 18, qui représente l'effet de la xylanase C sur les oligoxylosides, nous pouvons noter la diminution des molécules supérieures à X_{10} et l'apparition d'éléments intermédiaires tels X_8 et X_9 . Il semble y avoir plus de xylobiose et de xylotriose générés qu'avec la xylanase B mais de façon générale, le patron d'hydrolyse de la xylanase C est plus semblable à celui de la xylanase B qu'à celui de la A.

La figure 19 résume l'activité des différentes enzymes indépendemment et sur chaque oligoxyloside. La souche IAF 18 génère nettement plus de xylose et de xylobiose que les souches IAF 42 et IAF 20. Cette souche utilise aussi plus de xylotriose que les deux autres. Par contre, la xylanase C tend plutôt à produire le xylotriose tandis que la xylanase B semble utiliser cet oligoxyloside à peu près autant qu'elle en produit puisque l'allure générale de la courbe est un plateau. Pour les trois enzymes, le graphique indique que le tétraose semble avoir une certaine stabilité. Le X_5 et le X_6 ont tous les deux une légère tendance à la baisse. Vu dans l'ensemble, le xyloheptaose tend à diminuer dans le temps. Les X_8 , X_9 et X_{10} sont très faiblement représentés pour les trois souches et disparaissent aussitôt qu'ils sont formés.

DISCUSSION

. .

1. CHOIX DE LA SOURCE DE CARBONE

Nous avons cherché à obtenir une source de carbone qui permettrait une bonne croissance cellulaire sans toutefois modifier l'induction de la souche sauvage. Plusieurs sources de carbone ont ainsi été testées en fonction de ces qualités par différents chercheurs.

1.1 Répression par le glucose

Le glucose provoque très souvent de la répression catabolique des enzymes extracellulaires en particulier. Par exemple, ce sucre réprime la synthèse de l'a-amylase de S. lividans, S. venezuelae et de S. coelicolor (Virolle et Bibb, 1988; Virolle et al., 1988), ainsi que celle de la xylanase et de la Bglucosidase de Bacillus pumilus (Panbangred et al., 1985). L'expression du gène dagA, codant pour l'agarase de S. coelicolor, est aussi sujette à la répression catabolique par le glucose (Buttner et al., 1987). Celui-ci peut aussi empêcher la transcription de plusieurs autres gènes tels ceux de l'opéron galactose de S. lividans (Fornwald et al., 1987) et de Streptomyces spp. (Ingram et al., 1989), de la B-xylanase de Streptomyces sp. (EC1) (Godden et al., 1989), du régulon de la dégradation du xylose de S. rubiginosus (Wong et al., 1991), de l'opéron glycérol de S. coelicolor (Smith et Chater, 1988) et de l'utilisation des B-xylosides par Streptomyces sp. (Nakanishi et Yasui, 1980a).

Le mécanisme de répression par le glucose n'est pas encore clair, mais Fornwald et collaborateurs (1987) suggèrent que dans le cas de l'opéron galactose de S. lividans ce phénomène pourrait être dû à l'exclusion du galactose par le glucose. De plus, Smith et Chater (1988) ont démontré que l'inhibition par le glucose de l'opéron glycérol de S. coelicolor se fait par exclusion de l'inducteur. Il est maintenant clair que ce mécanisme n'est pas couplé à l'activation positive modulée par l'AMP, puisque sa concentration dans Streptomyces ne dépend pas de la source de carbone (Chatterjee et Vining, 1981; de Chrombrugghe et al., 1984 et Ingram et al., 1989). D'ailleurs, ce nucléotide n'a pas le pouvoir de lever la répression catabolique par le glucose du gène de la xylanase de Streptomyces sp. (Nakanishi et Yasui, 1980b).

Par contre, dans certains cas, le glucose ne produit pas de répression catabolique. Nous pouvons citer l'exemple du gène de l' α -amylase de *Streptomyces thermoviolaceus* (Bahri et Ward, 1990).

Kluepfel et al. (1991) ont remarqué que le glucose réprimait l'expression des xylanases des souches 3131, IAF 18 et IAF 42 de *S. lividans*. Dans la présente étude, cette source de carbone diminue l'activité enzymatique des trois clones hyperproducteurs de 35 à 60% par rapport au X_2-X_{10} . Cette discordance pourrait être attribuée au milieu de culture différent utilisé dans cette expérience. Nous pouvons cependant constater que le glucose réprime l'activité xylanasique des souches 3131 et 1326.

1.2 Effet du maltose

Le maltose ne semble pas avoir aucun effet sur la production de l' α -amylase de *S. thermoviolaceus* (Bahri et Ward, 1990) mais il induit ce gène chez *S. venezuelae*, *S. lividans* et *S. coelicolor* (Virolle *et al.*, 1988). Pour les souches que nous avons étudiées, le maltose ne semble pas être une bonne source de carbone pour la croissance cellulaire sauf pour la souche 3131.

1.3 Effet du mannitol

Barhi et Ward (1990) ont étudié l'effet du mannitol comme source de carbone. Ils ont démontré que celui-ci réprimait le gène de l' α -amylase de *S. thermoviolaceus*. Des résultats similaires ont été observés chez *S. limosus* (Virolle et Bibb, 1988). Le mannitol ne semble pas induire les enzymes sauf pour la souche IAF 20. La xylanase C est peut-être favorisée par cette source de carbone. De façon générale, la croissance cellulaire n'est pas très bonne sur le mannitol.

1.4 Effet du glycérol

Le glycérol, lorsqu'il est couplé à un inducteur, semble diminuer l'activité xylanasique de la souche *Streptomyces* sp (EC1) isolée à partir d'un compost (Godden et al., 1989). Ces chercheurs ont tout de même utilisé cette source de carbone dans les pré-cultures. D'ailleurs le glycérol est aussi utilisé en tant que source de carbone neutre pour les pré-cultures de S. limosus, S. lividans, S. coelicolor (Virolle et Bibb, 1988) et S. thermoviolaceus (Barhi et Ward, 1990). Cette source de carbone ne semblait ni induire, ni réprimer les xylanases des différentes souches de S. lividans testées dans cette étude. De plus, la croissance était relativement bonne pour toutes les souches et particulièrement pour la souche 1326.

2. INDUCTION

Nous avons ensuite cherché un inducteur des xylanases. Celui-ci devait nous permettre d'isoler facilement l'ARN des cultures cellulaires.

2.1 Les différents xylanes

Le premier inducteur auquel on puisse penser est le xylane. Habituellement, les xylanases sont induites par ce substrat (Godden et al., 1989). De plus, Bertrand et al. (1989) ont démontré que l'activité xylanasique de *S. lividans* 1326 est maximale et stable après 48 heures de culture en présence de 18 de xylane de glumes d'avoine. Effectivement, ce substrat donne une très bonne induction dans tous les cas (Tableau II). Malheureusement, il était difficile d'obtenir des préparations pures d'ARN en induisant avec ce polysaccharide puisque leur propriétés physicochimiques semblables ne permet pas la purification de l'ARN (Logemann et al., 1987). Nous avons donc testé deux autres xylanes provenant du bouleau et du mélèze parce que ceux-ci se dissolvent mieux dans le milieu de culture. De façon générale, ces xylanes induisent les xylanases plus faiblement que le xylane de glumes d'avoine mais les zones d'hydrolyse étaient supérieures à celles produites en glycérol. Les étapes ultérieures d'extraction d'ARN ce sont aussi soldées par un échec.

2.2 Acide syringique et arabinose

Godden et al. (1989) ont démontré une induction de la B-xylanase de Streptomyces sp. (EC1) par l'acide syringique. Nous avons donc vérifié l'induction des xylanases de S. lividans 3131 par cette molécule. Il n'y a eu aucune détection d'activité xylanasique. Nous n'avons donc pas poursuivi plus loin nos investigations. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'arabinose, ce qui n'est pas surprenant compte tenu du fait que ce sucre réprime aussi la B-xylanase de Streptomyces sp. (EC1) (Godden et al., 1989).

2.3 Induction par des oligosides

Suite à ces essais infructueux, nous avons pensé utiliser des oligoxylosides. Ceux-ci étant de petites molécules, ils ne pourraient probablement pas contaminer les préparations d'ARN et

plusieurs chercheurs ont décrit que les produits de dégradation d'un substrat sont souvent de bons inducteurs. Le gène de l'agarase de *S. coelicolor* peut être induit par des produits de dégradation de l'agar (Buttner et al., 1987). D'après Nakanishi et Yasui (1980a), les *B*-xylosides ne sont pas métabolisés par les *Streptomyces* et sont de meilleurs inducteurs des xylanases que le xylane. Dans le cas de la *B*-xylanase de *Streptomyces* sp. (EC1), le xylobiose semble être un meilleur inducteur que le xylane (Godden et al., 1989).

Chez Trichoderma reesei, l'induction de la cellulase se fait après quatre heures en présence de sophorose, qui est un produit de dégradation de la cellulose. D'autre part, la transcription d'un des gènes de la cellulase, CBH-1, est détectée 14 heures après l'ajout de cellulose (EL-Gogary et al., 1989). Les petites molécules induisent donc plus rapidement que les molécules plus complexes.

D'après Biely (1985), dans une revue sur la question, le xylane est une trop grosse molécule pour pouvoir entrer dans la cellule d'un microorganisme. Ainsi, chez *Cryptococcus albidus*, la xylanase est sécrétée de façon constitutive en faible quantité. Il pourra donc y avoir une légère quantité de xylobiose et de xylotriose produits. Ces derniers sont les inducteurs de la production massive de xylanase. Par contre, le xylose et le glucose provoquent de la répression catabolique.

Le gène de l' α -amylase de *S. limosus* peut être induit par aussi peu que 0,003% (p/v) de maltose ou de petites molécules comme le maltotriose, le maltopentaose et le maltoheptahose. Ces trois dernières maltodextrines peuvent être les inducteurs directs ou être préalablement dégradées en maltose (Virolle et Bibb, 1988).

La plus petite molécule qui induit l' α -amylase de S. thermoviolaceus est le maltotriose. D'autres oligosaccharides ayant des liens glucosiques α -1,4 tels le maltotétraose et le maltopentaose peuvent aussi induire l' α -amylase. On ne sait pas si ces oligosaccharides sont eux-mêmes les inducteurs ou s'ils sont d'abord dégradés en maltotriose (Bahri et Ward, 1990).

L'induction de la cellulase de *Streptomyces caespitosus* par la cellulose montre une phase de latence de 2,25 heures tandis qu'elle est seulement de 45 minutes avec du carboxyméthylcellulose. Cette phase de latence indique que l'inducteur réel serait plutôt des oligocellulosides solubles produits par l'action de cellulases pré-existantes. La présence de l'inducteur est nécessaire à la production massive d'enzyme (Patni et Rege, 1975).

2.3.1 Répression par le xylose

Grâce à l'utilisation d'hydrolysat de xylane contenant des oligoxylosides de X_1 à X_{10} , nous espérions obtenir une induction des enzymes du système xylanolytique de la souche *S. lividans* 3131. Le résultat étant négatif, nous avons pensé que le xylose contenu dans l'hydrolysat pouvait causer de la répression catabolique.

De fait, le xylose seul utilisé dans le milieu de culture n'induit pas les souches 3131 et 1326. Très souvent le xylose cause de la répression de la synthèse xylanasique. Pour illustrer ceci, nous pouvons citer l'exemple de la répression de la xylanase par le xylose chez C. albidus (Biely, 1985) et de la B-xylanase de Streptomyces sp. (EC1) (Godden et al., 1989). Le glucose fait de la répression catabolique sur le système streptomycètes (Daigneault-Sylvestre cellulasique des et Kluepfel, 1979). Comme le glucose est l'unité de base de la cellulose, il est possible de faire un parallèle avec la répression par le xylose sur le système xylanasique. Vats-Metha et al. (1990) et Kluepfel et al. (1991) ont démontré que le xylose réprime l'activité xylanasique de la souche 3131 mais pas celle de IAF 18 et IAF 42. Ceci est probablement dû à un effet de dosage génique provoqué par le grand nombre de copies des Ce phénomène peut sûrement aussi être gènes de xylanases. appliqué à la production de xylanase de la souche IAF 20. Celle-ci donne plus d'activité sur xylose que sur xylane et ceci est probablement dû au fait que la croissance est meilleure sur le monomère.

2.3.2 Induction par le $X_2 - X_{10}$

Nous avons donc éliminé le xylose de l'hydrolysat de xylane que nous avons utilisé comme inducteur. Cette étape fût la bonne. Le X_2-X_{10} induit le système xylanasique de toutes les souches étudiées.

3. PRÉPARATION DU SUBSTRAT (X2-X10)

Les polysaccharides ont des propriétés physicochimiques très similaires à l'ARN. Il est donc difficile d'obtenir des préparations d'ARN pures même en exploitant les propriétés isopicniques d'un gradient de chlorure de césium (Logemann et al., 1987). Nous avons donc essayé plusieurs méthodes pour isoler l'ARN provenant de cultures induites avec du xylane mais sans succès. C'est pour cette raison que nous avons utilisé un hydrolysat de xylane, substrat plus complexe, mais qui nous permettait d'isoler l'ARN.

Pour hydrolyser le xylane de glumes d'avoine, nous avons utilisé la xylanase C parce qu'elle génère beaucoup moins de xylose que la xylanase A et qu'elle est très active sur ce substrat. Les quelques 3,6% de molécules de DP élevé, toujours présentes dans cet hydrolysat, ne peuvent pas nuire à l'extraction de l'ARN puisque qu'elles ne représentent qu'un dix millième de 1% en concentration finale. La même chose est aussi vraie pour le xylose qui, une fois dans le milieu d'induction, est à une concentration de 9 x 10^{-6} %, ce qui est négligeable (Fig.9). Les quelques molécules présentes seront rapidement absorbées par la cellule et l'induction pourra avoir lieu.

4. ISOLEMENT D'ARN

C .

L'isolement d'acide ribonucléique se fait essentiellement en trois étapes: 1- inhibition des nucléases endogènes, 2déprotéination de l'ARN et 3- séparation physique de l'ARN des autres composantes de l'homogénat (MacDonald et al., 1987).

4.1 Choix de l'inhibiteur d'ARNase

L'isothiocyanate de guanidinium peut détruire les ARNases en quatre secondes, ce qui est très rapide comparativement à l'hydro-chlorure de guanidine (10 secondes) et à l'urée (3 minutes à une concentration de 8 M). La raison de cette vitesse peut être expliquée par le fait que le sel de guanidinium contient un cation et un anion qui sont tous deux de forts agents chaotropiques (Chirgwin et al., 1979).

Nous avons choisi l'isothiocyanate de guanidinium pour inhiber les nucléases endogènes parce que ce sel est le meilleur inhibiteur. Lorsqu'il est couplé à un réductant comme le 2mercaptoéthanol, il est encore plus efficace. La solution D que nous avons employée pouvait donc à la fois inhiber les nucléases et dénaturer les protéines.

4.2 Ultracentrifugation

La troisième étape de la préparation de l'ARN était effectuée par ultracentrifugation. La préparation d'ARN recouvrée par cette méthode devrait être exempte de protéine (MacDonald et al., 1987). Par contre, Chomczynski et Sacchi (1987) ont démontré que les préparations d'ARN faites par ultracentrifugation sur un coussin de chlorure de césium après le passage dans la solution D, contenait plus de protéines comparativement aux préparations obtenues par extractions successives avec la solution D et du phénol/chloroforme. Le ratio des densités optiques à 260 et à 280 nm étaient de 1,75 et 1,85 pour l'ultracentrifugation et les différentes extractions respectivement. Ils ont aussi démontré que les ARN_t sont enlevés plus efficacement par l'ultracentrifugation que par les extractions au phénol/chloroforme. Nous avons essayé d'épurer les préparations d'ARN des protéines qu'elles contenaient à l'aide d'extractions au phénol/chloroforme, mais les rendements étaient si faibles que nous avons abandonné cette méthode. De plus, les manipulations successives rendait les préparations d'ARN plus sujettes à la dégradation de ce dernier. D'ailleurs, la moyenne des ratios que nous avons obtenus (Tableau IV), qui est égale à 1,7, est comparable au ratio obtenu par Chomczynski et Sacchi (1987) guand ils extraient l'ARN par ultracentrifugation.

5. CHOIX DES SONDES ET HYBRIDATION

Pour doser les ARN_m de chacune des xylanases, nous voulions des sondes internes aux gènes de structure. Les inserts clonés dans pIJ702 étant très longs, il est possible qu'ils contiennent d'autres transcrits que ceux codant pour une des enzymes. Les cartographies des trois plasmides portant chacun une des xylanases sont présentés à la figure 20. Pour éviter le bruit de fond causé par de l'interférence avec des ARN_m ne nous intéressant pas, nous avons utilisé des fragments plus petits identifiés sur la figure 20, clonés dans le vecteur M13. La sonde de la xylanase A contient donc le fragment BglII. La sonde de la xylanase B est constituée de la partie KpnI-BglII et celle de la xylanase C, la fraction PstI. Les séquences des xylanases B et C ayant beaucoup d'homologies entre elles (Shareck et al., 1991), il aurait été intéressant d'utiliser de courts oligomères pour accomplir l'hybridation. Nous avons essayé la méthode de Woods (1984) et celle décrite dans la fiche technique d'Amersham (1988) mais sans succès puisque les signaux étaient beaucoup trop faibles même après 16 jours d'exposition entre des écrans amplificateurs. Nous croyons que cela serait causé par la faible concentration des différents ARN_m des xylana-Il était donc important d'avoir une méthode puissante. ses. Les sondes marquées radioactivement par déplacement de l'encoche nous ont donc semblé les plus appropriées. Celles-ci étant très longues, elles ont la possibilité d'amplifier le message en

FIGURE 20: Sondes radioactives utilisées pour l'hybridation avec l'ARN.

.

,



1 Kb

(

s'empilant grâce aux régions complémentaires pouvant s'hybrider. Les signaux étant amplifiés également, nous pouvons tirer profit de cet avantage.

De légères réactions croisées sont apparentes entre les différentes xylanases des contrôles positifs. Nous nous y attendions pour les xylanases B et C compte tenu de leur homologie de séquence. Pour les trois enzymes, l'effet d'amplification expliqué plus haut pourrait avoir un rôle à jouer dans cette réaction. Les contrôles négatifs démontrent que les résultats obtenus ne sont pas faussés par de l'ADN chromosomique ou affectés par la dégradation possible de l'ARN.

6. RÉGULATION DU RÉGULON XYLANOLYTIQUE

6.1 Apparition des ARN_

Plusieurs gènes des streptomycètes sont induits au niveau de la transcription. Nous pouvons citer les exemples de l'opéron galactose de S. lividans (Fornwald et al., 1987), de la cellulase de S. caespitosus (Patni et Rege, 1975), de l'aamylase de S. lividans, S. coelicolor et S. venezuelae (Virolle et al., 1988), de la B-lactamase de S. cacaoi (Forsman et al., 1989 et Urabe et al., 1990), de l'opéron mel de S. lividans (Geistlich et al., 1989), du régulon de la dégradation du xylose de S. rubiginosus (Wong et al., 1991) et de la biosynthèse de la desferrioxamine B de S. pilosus (Schupp et al., 1988). Le gène de la B-glucosidase cloné dans S. lividans est exprimé en quantité variable selon la source de carbone. La régulation de l'expression de la B-glucosidase s'effectue à un niveau transcriptionnel puisque l'ARN_m de cette enzyme est exprimé en différentes concentrations dépendemment de la source de carbone (Jaurin et Granström, 1989).

Nous avons vu que plusieurs enzymes des streptomycètes sont régulées au niveau transcriptionnel. Nous avons cependant des exemples où ce n'est pas le cas. D'après Kroening et Kendrick (1989), l'histidase de *S. griseus* est synthétisée de façon constitutive mais son utilisation est contrôlée à un niveau post-traductionnel.

L'apparition des ARN_m par vagues successives est un peu étonnante. Nous nous attendions plutôt à voir une montée graduelle suite à l'induction, puis un plateau jusqu'à la disparition du substrat. Pourtant, certains systèmes biologiques sont connus pour leur régulation par vague comme le phénomène que nous observons pour les xylanases de *S. lividans*. Par exemple, l'apparition de l'ARN du virus de l'hépatite dans des cellules LM-K de souris peut être observée par vagues successives en fonction du temps (Cheley et Anderson, 1984).

Schauer et ses collaborateurs (1988) ont démontré que le gène endoH codant pour l'endoglycosidase H de S. coelicolor apparaissait par vagues successives lors de la croissance du microorganisme.

t

6.2 Régulation modulée par les produits de dégradation

6

Į.__

Les réactions du métabolisme primaire sont finement balancées et les intermédiaires métaboliques autres que ceux nécessaires pour la survie de la cellule sont rarement accumulés. Pour certains antibiotiques, la régulation rétroactive contrôle leur production. Cette rétroaction est parfois faite par les produits finaux de la voie métabolique (Martin et Demain, 1980).

Mishra et al. (1991) ont étudié la régulation de la transcription de différents gènes codant pour des endoglucanases de Clostridium thermocellum en présence de cellobiose. Des quatre gènes qu'ils ont étudiés, celA, celC, celD et celF, aucun n'est transcrit tôt dans la phase exponentielle ou tard dans la phase stationnaire. Ils sont plutôt produits de part et d'autre de la limite entre ces deux phases, sauf le gène celC qui n'est transcrit qu'au début de la phase stationnaire. Tôt dans la phase exponentielle, le cellobiose étant le facteur limitant de la croissance, les gènes des endoglucanases subissent de la répression catabolique par ce substrat. Donc, l'expression des gènes cel peut être contrôlée par des concentrations de cellobiose plus grandes que celles pour lesquelles ce substrat devient limitant pour la croissance. L'arrêt de la transcription de ces gènes durant la phase stationnaire peut être corrélé avec le changement des facteurs σ à ce stade. Un changement dans le ratio des enzymes ayant différentes spécificités

pourrait être requis pour la dégradation d'un substrat dynamiquement changeant comme la cellulose. Le xylane, de même que le X_2-X_{10} , sont aussi des substrats qui varient en composition dans le temps. Il est donc normal de s'attendre à une dynamique de l'apparition des différents ARN_m.

La xylanase A produit principalement du xylotriose et du xylobiose après 20 heures d'hydrolyse du xylane tandis que la xylanase B donne une variété de xylosides de cinq résidus de xylose ou plus. Kluepfel et al. (1991) suggèrent donc que la xylanase B est nécessaire pour initier l'hydrolyse du xylane. L'action séquentielle des xylanases A et B a été étudiée sur le xylane total de glumes d'avoine. Le patron d'hydrolyse avec la xylanase A demeure essentiellement inchangé guand la xylanase B est ajoutée par la suite indiquant que le xylobiose et/ou le xylotriose n'induisent pas cette dernière enzyme. En inversant l'ordre des deux xylanases, il y a hydrolyse rapide menant à la formation de grandes quantités de xylose, xylobiose et xylotriose. Nous nous attendions donc à ce que les transcrits du gène de la xylanase B, et probablement du gène de la xylanase C, apparaissent en premier lieu dans la cellule. L'ARN_m de la xylanase B est effectivement plus rapidement quantifiable que les deux autres.

6.3 Mécanisme de régulation

Il est plus facile de comprendre ce métabolisme complexe quand on observe les figures 13 et 15 ensemble. La courbe des molécules ayant un DP supérieur à 10 tend à diminuer dans le temps (Fig. 15H). Certains chercheurs ont émis l'hypothèse que certaines xylanases de Streptomyces possédaient une activité xylosyltransférase (Dekker, 1985). Il est donc possible que les réapparitions des ces oligomères soient dues à cette activité. Après deux heures d'induction l'ARN_m de la xylanase B apparait et il y a probablement synthèse très rapide de cette enzyme, entraînant l'hydrolyse des grosses molécules pour donner des oligoxylosides intermédiaires de DP de 3 à 5 principalement et un peu de xylobiose. Ce dernier peut être produit en plus grande quantité mais la cellule l'utilise, c'est pourquoi son augmentation ne paraît pas si évidente. À partir de quatre heures, les xylopentaose, xylotétraose et xylotriose diminuent à leur tour, hydrolysés par la xylanase B. Lorsque le xylobiose atteint une quantité appréciable, les xylanases A et C sont induites. Au moment où celles-ci apparaissent, il y a plus de xylobiose formé et il y a avènement du xylose. Il est fort probable que ce phénomène soit attribuable plus particulièrement à la xylanase A puisque la xylanase C a une activité semblable à la xylanase B (Fig. 19). Quand le xylose atteint son niveau maximal, les ARN_m des trois xylanases s'estompent. Ce n'est que quand la cellule a épuisé pratiquement tout le xylose que l'ARN_m

de la xylanase B est produit à nouveau de même qu'un peu de l'ARN_m de la xylanase A. Par la suite le xylobiose est probablement absorbé par la cellule. Il est donc logique de croire que le xylose provoque de la répression au niveau transcriptionnel (Tremblay et al., 1991). De même, l'induction doit agir aussi à ce niveau. Nous savons aussi que le glucose réprime l'expression de la xylanase de *Streptomyces* sp. jusqu'à ce qu'il soit disparu du milieu de culture (Nakanishi et Yasui, 1980b). Cette situation semble être analogue pour le xylose. Il est cependant difficile de déterminer, à la lumière de nos résultats, si cette répression est catabolique, ou si elle est due à une exclusion de substrat, c'est-à-dire le xylose compétitionnant avec le xylobiose qui est probablement l'inducteur direct.

Dans le cas de la B-glucosidase de Streptomyces granaticolor, la première quantité d'enzyme mesurable est détectée après seulement deux heures d'induction avec du cellobiose. L'enzyme n'est pas inductible à la même intensité selon l'âge de la culture. Cela pourrait être dû au fait que le système de transport du cellobiose, qui est aussi inductible, peut changer durant la croissance (Jiresova et al., 1983).

La deuxième induction se fait plus rapidement que la première. C'est probablement parce que les mécanismes d'utilisation des oligoxylosides, par exemple les perméases, sont déjà en place (Hurtubise *et al*, 1991).

6.4 Apport métabolique de chacune des xylanases

Les études concernant le mode d'action des hémicellulases sont compréhensibles seulement lorsque les préparations utilisées ne contiennent qu'une seule enzyme (Dekker, 1985). C'est pour cette raison que nous avons décidé d'observer l'utilisation des différents oligoxylosides à l'aide des souches IAF 18, IAF 42 et IAF 20. En effet, chacune des xylanases étant clonée dans le mutant 10-164 qui est négatif quant aux xylanases, il est possible d'étudier l'action indépendante de chacune d'elles.

À la figure 19, nous pouvons remarquer que la xylanase A produit moins de molécules de DP supérieur à quatre que ses congénères. Par contre, elle génère beaucoup plus de xylobiose et de xylose. Au moment où le xylotriose et le xylotétraose diminuent, il y a formation du xylose et augmentation du xylobiose. Ceci confirme que cette enzyme favorise l'hydrolyse des petits oligomères. C'est ce qui nous laisse croire que l'apparition du xylose et du xylobiose dans le surnageant de culture de la souche sauvage 1326 est conjointe à l'émergeance de la xylanase A. Cette enzyme ressemble beaucoup à celle purifiée d'un Streptomyces par Kusakabe et al. (1977). Cette dernière dégrade premièrement le xylane principalement en xylotriose avec de petites quantités de xylotétraose et de xylobio-À une étape ultérieure de l'hydrolyse, les oligoxylosides se. de DP de 3 à 5 sont dégradés en xylobiose et un peu de xylose. L'hydrolyse à long terme montre que le xylobiose est aussi

dégradé en xylose. L'attaque sur des oligoxylosides de DP 3 à 6 montre que ces substrats sont dégradés en xylobiose, celui-ci étant par la suite hydrolysé en xylose (Dekker, 1985).

Les xylanases B et C sont très semblables. Elles hydrolysent plus particulièrement les grosses molécules, d'où la disparition plus lente du xyloheptaose puisqu'il est probablement continuellement reformé. Cette observation peut aussi s'appliquer au xylohexaose et au xylopentaose. La xylanase C semble cependant produire plus de xylotriose que la xylanase B.

La xylanase B produit sensiblement les mêmes quantités de xylobiose et de xylotriose. Pourtant, dans la souche sauvage, lorsque la xylanase B est transcrite seule, il y accumulation beaucoup plus importante de xylotriose que de xylobiose. Ceci semble indiquer que le xylobiose est l'inducteur vrai du régulon xylanasique puisqu'il peut pénétrer dans la cellule. La plupart des hémicellulases d'origine bactérienne sont produites de deux façons: soit de manière constitutive ou induite (Dekker, 1985). Quand la cellule est en présence de xylane, elle peut, grâce à des enzymes constitutives, se procurer une petite quantité de xylobiose, ce qui entraînera l'induction massive de tout le régulon.

La xylanase C est très peu produite en milieu de culture par la souche sauvage (Kluepfel, communication personnelle). Ceci nous laisse croire qu'elle est peut-être une simple duplication de la xylanase B. Ce phénomène a été observé pour plusieurs gènes de streptomycètes (Hopwood, 1989).

 $(\cap$

(

CONCLUSION

(

Cette étude portant sur la régulation du système xylanolytique de *Streptomyces lividans* nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

-Le glycérol est une bonne source de carbone pour la croissance cellulaire. Il n'induit pas, ni ne réprime la production de xylanases.

-Les xylanes sont de bons inducteurs mais ils ne permettent pas l'extraction d'ARN à cause de leurs propriétés physicochimiques semblables aux acides ribonucléiques.

-L'acide syringique et l'arabinose ne sont pas des inducteurs des xylanases de Streptomyces lividans.

-L'utilisation des oligoxylosides (X_2-X_{10}) s'avère efficace dans l'induction des xylanases tout en n'interférant pas lors de l'extraction de l'ARN.

-La xylanase B est induite après deux heures en présence de X_2-X_{10} tandis que les transcrits des xylanases A et C apparaissent après huit heures d'induction.

-La xylanase B hydrolyse les grosses molécules d'oligoxylosides principalement en xylobiose et xylotriose. Le xylotriose ne pouvant entrer dans la cellule, il est accumulé dans le milieu de culture. Quand la xylanase A apparait, le xylotriose est hydrolysé en xylobiose et xylose.

-Le xylose provoque la répression de la transcription des ARN_m des trois xylanases puisque le niveau de ceux-ci diminue lors de l'apparition du monomère dans le milieu de culture. Ce

phénomène peut être dû soit à la répression directe par le xylose, soit à l'exclusion de substrat, le xylose compétitionnant avec le xylobiose qui est probablement l'inducteur spécifique. Quand le xylose disparaît du milieu de culture, le xylobiose peut induire à nouveau la xylanase B ainsi que les xylanases A et C. Cette seconde induction est plus rapide que la première parce que les mécanismes sont déjà en place.

-Le rôle de la xylanase C n'est pas clair. Son patron d'hydrolyse étant semblable à celui de la xylanase B, nous nous attendions à ce qu'elle soit transcrite au début de l'induction. Cependant, nous observons son transcrit en même temps que celui de la xylanase A.

Il aurait été intéressant de pouvoir utiliser des oligoxylosides pures et en particulier du xylobiose et du xylotriose pour bien comprendre les mécanismes d'induction. Malheureusement, ces produits ne pouvant être préparés en quantité suffisante pour faire des culture d'extraction d'ARN, il nous a été impossible d'investiguer plus avant cette étude.

L'analyse approfondie des ARN_m par des techniques de cartographie de transcrits par la nucléase S_1 ou par extension de l'amorce nous permettrait de connaître, dans des recherches ultérieures, le début génique de chaque transcrit. Ces expériences permettraient aussi de mettre en évidence la présence probable de deux promoteurs, l'un étant inductible et l'autre constitutif.

Cette étude nous a facilité la compréhension de la cinétique de la régulation de ce système complexe. Les connaissances acquises au niveau fondamental nous permettront de mieux guider les développements pratiques futurs.

C

REMERCIEMENTS

Merci est un bien petit mot pour exprimer toute la gratitude que j'ai envers mon directeur de recherche, François Shareck. Merci pour m'avoir permis d'accéder au monde de la recherche. Merci pour avoir été ma mamelle intellectuelle pendant tout ce temps. Merci pour le support financier et moral. Merci pour tout le temps qu'il m'a consacré. Et finalement, merci pour avoir su m'insuffler un peu de sa passion pour la recherche.

Je voudrais remercier aussi toute l'équipe des Streptomycètes pour le support technique et intellectuel, particulièrement Lise pour son aide quand j'étais débordée, Nicole pour l'aide précieuse au HPLC et les professeurs, Rolf Morosoli et Dieter Kluepfel pour leurs bons conseils.

Un gros merci à Catherine, Yves et Marie-Josée qui ont passé beaucoup de leur temps à la correction de ce mémoire.

Je ne peux pas terminer sans remercier tous mes amis qui m'ont donner le courage d'aller jusqu'au bout. Ceux avec qui j'ai partagé tous mes repas du midi, mes activités sportives et mes 5 à 7.

J'exprime aussi ma reconnaissance au FCAR qui m'a accordé une aide financière bien appréciée.

Un dernier remerciement à Yves pour ce qu'il sait.

BIBLIOGRAPHIE

.

AMORY, A., F. KUNST, E. AUBERT, A. KLIER, G. RAPOPORT. 1987. Characterization of the sacQ genes from Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. <u>169</u>:324-333.

ANDERSON, M.L.M. et B.D. YOUNG. 1985. "Quantitative filter hybridisation" dans Nucleic acid hybridization. IRL Press, Washington, pp: 73-112.

ARRAND, J.E. 1985. "Preparation of nucleic acid probes" dans Nucleic acid hybridization. IRL Press, Washington, pp: 17-46.

BAHRI, S.M. et M. WARD. 1990. Regulation of a thermostable α amylase of *Streptomyces thermoviolaceus* CUB74: maltotriose is the smallest inducer. Biochimie. <u>72</u>:893-895.

BERTRAND, J.L. 1988. Purification et étude de l'expression de la xylanase (endo-1,4-B-xylanase) du clone Streptomyces lividans IAF 18. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, 87 pp.

BERTRAND, J.L., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1989. Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. Biotechnol. Bioeng. <u>33</u>:791-794.

BIELY, P. et E. PETRAKOVA. 1984. Novel inducers of the xylandegrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*. J. Bacteriol. <u>160</u>:408-412.

BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology <u>3</u>:286-290.

BIELY, P., D. MISLOVICOVA et R. TOMAN. 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-B-xylanases and endo-1,4-B-glucanases. Anal. Biochem. <u>144</u>:142-146.

BLUMBERG, D.D. 1987. "Creating a ribonuclease-free environment" dans methods in enzymology, Berger et Kimmel (Eds), Academic Press, Orlando: <u>152</u>:20-24.

BROWNING, D.R. 1971. "Chromatographie par filtration sur gel" dans Chromatographie, Masson et Cie (Eds), Paris, pp: 144-152.

BUTTNER, M.J. et N.L. BROWN. 1985. RNA polymerase-DNA interactions in *Streptomyces -- in vitro* studies of a *S. lividans* plasmid promoter with *S. coelicolor* RNA polymerase. J. Mol. Biol. <u>185</u>:177-188.

BUTTNER, M.J., I.M. FEARNLEY et M.J. BIBB. 1987. The agarase gene (dag A) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. Mol. Gen. Genet. 209:101-109.

BUTTNER, M.J., A.M. SMITH et M.J. BIBB. 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (dag A) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Cell 52:599-606.

BUTTNER, M.J. 1989. RNA polymerase heterogeneity in Streptomyces coelicolor A3(2). Mol. Microbiol. <u>3</u>:1653-1659.

CHATER, K.F., E.J. LAWLOR, C. MENDEZ, C.J. BRUTON, N.K. DAVIS, K. PLASKITT, E.P. GUTHRIE, B.L. DALY, H.A. BAYLIS et K. VU TRONG. 1988. Gene expression during *Streptomyces* development. Proc. of Int. Symp. of Actinomycete Biology. Tokyo.

CHATER, K.F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. Trends in Genetics <u>5</u>:372-377.

CHATTERJEE, S. et L. C. VINING. 1981. Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of B-galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations. Can. J. Microbiol. <u>28</u>:311-317.

CHELEY, S. et R. ANDERSON. 1984. A reproducible microanalytical method for the detection of specific RNA sequences by dot-blot hybridization. Anal. Biochem. <u>137</u>:15-19.

CHIRGWIN, J.M., A.E. PRZYBYLA, R.J. MACDONALD et W.J. RUTTER. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry. <u>18</u>:5294-5299.

CHOMCZYNSKI, P. et N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. <u>162</u>:156-159.

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

DE CHROMBRUGGHE, B., S. BUSBY et H. BUC. 1984. Cyclic AMP, the cyclic AMP receptor protein, and their dual control of the galactose operon. Science. <u>224</u>:831-838.

DEKKER, R. F. H. 1985. "Biodegradation of the hemicelluloses" dans Biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi (Ed), Academic Press, New-York, pp.: 505-533.

DENHARDT, D.T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641-652.

DUBNAU, D.A. et M.R. POLLOCK. 1965. The genetics of *Bacillus licheniformis* penicillinase: a preliminary analysis from studies on mutation and inter-strain and intra-strain transformations. J. Gen. Microbiol. <u>41</u>:7-21.

EL-GOGARY, S., A. LEITE, O. CRIVELLARO, D.E. EVELEIGH et H. EL-DORRY. 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. <u>86</u>:6138-6141.

ERIKSSON, O., D.A.I. GORING et B.O. LINDGREN. 1980. Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood. Wood Sci. Technol. <u>14</u>:267-279.

FISHER, S.H. et L.V.JR. WRAY. 1989. Regulation of glutamine synthetase in *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. <u>171</u>:2378-2383.

FLANDROY, L. 1991. Industrie papetière: une page à tourner. Biofuture <u>102</u>:21-35.

FORNWALD, J.A., F.J. SCHMIDT, C.W. ADAMS, M. ROSENBERG et M.E. BRAWNER. 1987. Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. <u>84</u>:2130-2134.

FORSMAN, M., L. LINDGREN, B. HAGGSTROM et B. JAURIN. 1989. Transcriptional induction of *Streptomyces cacaoi* B-lactamase by a B-lactam compound. Mol. Microbiol. <u>3</u>:1425-1432.

GEISTLICH, M., S. IRNIGER et R. HUTTER. 1989. Localization and functional analysis of the regulated promoter from the *Streptomyces glaucescens <u>mel</u> operon. Mol. Microbiol. <u>3</u>:1061-1069.*

GIETZ, R.D. et R.B. HODGETTS. 1985. An analysis of dopa decarboxylase expression during embryogenesis in *Drosophila* melanogaster. Dev. Biol. <u>107</u>:142-155.
GODDEN, B., T. LEGON, P. HELVENSTEIN et M. PENNINCKX. 1989. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. <u>135</u>:285-292.

HODGSON, D.A. et K.F. CHATER. 1981. A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1. J. Gen. Microbiol. <u>124</u>:339-348.

HODGSON, D.A. 1982. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. J. Gen. Microbiol. <u>128</u>:2417-2430.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. "Techniques for handling RNA" dans Genetic manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation (Eds), Norwich, pp:213-243.

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

HORINOUCHI, S., H. SUZUKI et T. BEPPU. 1986. Nucleotide sequence of <u>afs</u>B, a pleiotropic gene involved in secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. <u>168</u>:257-269.

HURTUBISE, Y., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1991. Uptake of different carbohydrates by *Streptomyces lividans* and its mutant 10-164. Int. Symp. on Biology of Actinomycetes (ISBA) P2-070.

INGRAM, C., M. BRAWNER, P. YOUNGMAN, J. WESTPHELING. 1989. xylE functions as an efficient reporter gene in Streptomyces spp.: Use for the study of galP1, a catabolite-controlled promoter. J. Bacteriol. <u>171</u>:6617-6624.

JAURIN, B. et S.N. COHEN. 1984. Streptomyces lividans RNA polymerase recognizes and uses Escherichia coli transcriptional signals. Gene. <u>28</u>:83-91.

JAURIN B. et S.N. COHEN. 1985. Streptomyces contain Escherichia coli-type A+T-rich promoters having novel structural features. Gene. <u>39</u>:191-201. JAURIN, B. et M. GRANSTRÖM. 1989. B-Glucosidase genes of naturally occurring and cellulolytic *Streptomyces* species: characterization of two such genes in *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. <u>30</u>:502-509.

JIRESOVA, M., Z. DOBROVA, J. NAPRSTEK, P. RYSAVY et J. JANECEK. 1983. Induction of B-D-Glucosidase in Streptomyces granaticolor. Folia Microbiol. <u>28</u>:379-385.

JONES, K.L. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctualing characteristic. J. Bacteriol. <u>57</u>:141-145.

KLUEPFEL, D., F. SHARECK, F. MONDOU et R. MOROSOLI. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of Streptomyces lividans. Appl. Microbiol. Biotechnol. <u>24</u>:230-234.

KLUEPFEL, D. S. VATS-MEHTA, F. AUMONT, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. Biochem. J. <u>267</u>:45-50.

KLUEPFEL, D., R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1991. "Homologous cloning of the xylanase genes and their expression in *Streptomyces lividans* 66" dans Genetics and product formation in *Streptomyces*. Baumberg, Krügel et Noack (Eds), New-York, pp:207-214.

KROENING, T.A. et K.E. KENDRICK. 1989. Cascading regulation of histidase activity in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. <u>171</u>:1100-1105.

KUNST, F. M. DÉBARBOUILLÉ, T. MSADEK, M. YOUNG, C. MANUEL, D. KARAMATA, A. KLIER, G. RAPOPORT, R. DEDONDER. 1988. Deduced polypeptides encoded by the *Bacillus subtilis sacU* locus share homology with two-component sensor-regulator systems. J. Bacteriol. <u>170</u>:5093-5101.

KUNST, F., T. MSADEK, I. MARTIN-VERSTRAETE, M. DÉBARBOUILLÉ, M. ARNAUD, A. KIJER et G. RAPOPORT. 1990. The sucrose system of *Bacillus subtilis*. Proc. of 6th Int. Symp. GIM. <u>2</u>:703-713.

KUSAKABE, I., T. YASUI et T. KOBAYASHI. 1977. The action of the *Streptomyces* xylanase on various xylans and xylooligosaccharides. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. <u>51</u>:439-448.

LINDBERG, F., L. WESTMAN et S. NORMARK. 1985. Regulatory components of *Citrobacter freundii* <u>amp</u>C B-lactamase induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>82</u>:4620-4624.

LOGEMANN, J., J. SCHELL et L. WILLMITZER. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal. Biochem. <u>163</u>:16-20.

MACDONALD, R.J., G.H. SWIFT, A.E. PRZYBYLA et J.M. CHIRGWIN. 1987. "Isolation of RNA using guanidinium salts" dans Methods in enzymology, Orlando, Academic Press, <u>152</u>: 219-227.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. "Extraction, purification, and analysis of mRNA from eucaryotic cells" dans Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (Eds), New-York, pp:187-210.

MARTIN, J. et A.L. DEMAIN. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. <u>44</u>:230-251.

MISHRA, S., P. BÉGUIN et J.P. AUBERT. 1991. Transcription of *Clostridium thermocellum* endoglucanase genes *celF* and *celD*. J. Bacteriol. <u>173</u>:80-85.

MONDOU, F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. Gene <u>49</u>:323-329.

MOSER B., N.R. GILKES, D.G. KILBURN, R.A.J. WARREN et R.C. MILLER JR. 1989. Purification and characterization of endoglucanase C of *Cellulomonas fimi*, cloning of the gene, and analysis of *in vivo* transcripts of the gene. Appl. Env. Microbiol. <u>55</u>:2480-2487.

NAKANISHI, K. et T. YASUI. 1980a. Uptake of B- xyloside by Streptomyces sp. during Induction of xylanase. J. Ferment. Technol. <u>58</u>:171-174.

NAKANISHI, K. et T. YASUI. 1980b. Kinetic studies on xylanase induction by B-xyloside in *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem. <u>44</u>:1885-1889.

PAICE, M.G., R. BERNIER Jr, L. JURASEK. 1988. Viscosityenhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. Biotechnol. Bioeng. <u>32</u>:235-239.

PANBANGRED, W., E. FUKUSAKI, E.C. EPIFANIO, A. SHINMYO et H. OKADA. 1985. Expression of a xylanase gene of *Bacillus pumilus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. <u>22</u>:259-264.

PAPPU, H.R. et C. HIRUKI. 1989. Improved RNA visualization in formaldehyde-agarose gels. Focus (Fiche technique de BRL)<u>11</u>:6-7.

PATNI, N.J. et D.V. REGE. 1975. Induction of cellulolytic enzymes in *Streptomyces caespitosus*. Ind. J. Exp. Biol. <u>13</u>:551-554.

PHARMACIA. 1985. Gel filtration: theory and practice, Rahms i Lund, Suède, pp:3-61.

PULIDO, D. et A. JIMENEZ. 1987. Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator. Nucleic Acids Res. <u>15</u>:4227-4240.

RATTO, M. et K. POUTANEN. 1988. Production of mannan-degrading enzymes. Biotechnol. Lett. <u>10</u>:661-664.

RAWN, J.D. 1989. "Regulation of gene expression 1". dans "Biochemistry", Neil Patterson Publishers, Burlington, pp:885-935.

REINSTEIN J., A.M. GILLES, T. ROSE, A. WITTINGHOFER, I. SAINT GIRONS, O. BARZU, W.K. SUREWICZ et H.H. MANTSCH. 1989. Structural and catalytical role of arginine 88 in *Escherichia coli* adenylate kinase as evidenced by chemical modification and site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 264:8107-8112.

RIGBY, W.J., M. DIECKMANN, C. RHODES et P. BERG. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. <u>113</u>:327-251.

ROSÉN, C.G. et I. FEDORCSAK. 1966. Studies on the action of diethyl pyrocarbonate on proteins. Biochim. Biophys. Acta, 130:401-405.

ROSEN, K.M. et L. VILLA-KOMAROFF. 1990. An alternative method for the visualization of RNA in formaldehyde agarose gels. Focus. <u>12</u>:23-24.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. "Commonly used techniques in molecular cloning" dans Molecular cloning: a laboratory manual (2^e édition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, pp: E1-E39.

SAVAGEAU, A.M. 1974. Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. <u>71</u>:2453-2455.

SAVAGEAU, M.A. 1977. Design of molecular control mechanisms and the demand for gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5647-5651. SHARECK, F., C. ROY, M. YAGUCHI, R. MOROSOLI, D. KLUEPFEL. 1991. Nucleotide sequence of the xylanase A, B and C genes of Streptomyces lividans. Gene <u>107</u>:75-83.

SCHAUER, A., M. RANES, R. SANTAMARIA, J. GUIJARRO, E. LAWLOR, C. MENDEZ, K. CHATER et R. LOSICK. 1988. Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor*. Science <u>240</u>:768-772.

SCHUPP, T., C. TOUPET et M. DIVERS. 1988. Cloning and expression of two genes of *Streptomyces pilosus* involved in the biosynthesis of the siderophore desferrioxamine B. Gene <u>64</u>:179-188.

SENO, E.T. et K.F. CHATER. 1983. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. <u>129</u>:1403-1413.

SHEINESS, D. et D. SULLIVAN. 1986. Staining of RNA in formaldehyde gels. Focus (Fiche technique de BRL). <u>8</u>:11.

SMITH C.P. et K.F. CHATER. 1987. Physiology, genetics and molecular biology of glycerol utilisation in *Streptomyces* coelicolor. Proc. 5th Int. Symp. GIM Partie B:7-15.

SMITH, C.P. et K.F. CHATER. 1988. Cloning and transcription analysis of the entire glycerol utilization (gyl ABX) operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and identification of a closely associated transcription unit. Mol. Gen. Genet. <u>211</u>:129-137.

STEIN, D. et S.N. COHEN. 1989. A cloned regulatory gene of *Streptomyces lividans* can suppress the pigment deficiency phenotype of different developmental mutants. J. Bacteriol. <u>171</u>:2258-2261.

TANAKA, T. et M. KAWATA. 1988. Cloning and characterization of *Bacillus subtilis iep*, which has positive and negative effects on production of extracellular proteases. J. Bacteriol. <u>170</u>:3593-3600.

THOMAS, P. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. <u>77</u>:5201-5205.

TREMBLAY, E., F. SHARECK., R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1991. Regulation of the xylanolytic regulon of *Streptomyces lividans*. Int. Symp. Biol. Actinomycetes (ISBA). P1-128. URABE, H., M.V. LENZINI, M. MUKAIDE, J. DUSART, M.M. NAKANO, J.M. GHUYSEN et H. OGAWARA. 1990. B-Lactamase Expression in Streptomyces cacaoi. J. Bacteriol. <u>172</u>:6427-6434.

VATS-MEHTA, S., P. BOUVRETTE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1990. Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans* 66. Gene <u>86</u>:119-122.

VIROLLE, M.-J. et M.J. BIBB. 1988. Cloning, characterization and regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces limosus*. Mol. Microbiol. <u>2</u>:197-208.

VIROLLE, M.J., C.M. LONG, S. CHANG et M.J. BIBB. 1988. Cloning, characterisation and regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. Gene. <u>74</u>:321-334.

VORAGEN, A.G.J., H.A. SCHOLS, M.F. SEARLE-VAN LEEUWEN, G. BELDMAN et F.M. ROMBOUTS. 1986. Analysis of oligomeric and monomeric saccharides from enzymatically degraded polysaccharides by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 370:113-120.

WALLACE, D.M. 1987. "Precipitation of nucleic acids" dans Methods in Enzymology. Burger et Kimmel (eds), Academic Press, Orlando, <u>152</u>:41-48.

WESTPHELING, J., M. RANES et R. LOSICK. 1985. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. Nature. <u>313</u>:22-26.

WONG, H.C., Y. TING, H.C. LIN, F. REICHERT, K. MYAMBO, K.W.K. WATT, P.L. TOY, R.J. DRUMMOND. 1991. Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces* rubiginosus. J. Bacteriol. <u>173</u>:6849-6858.

WOODS, D. 1984. Oligonucleotide screening of cDNA librairies. Focus (bulletin technique de BRL). <u>6</u>:1-3.