

ÉTUDE DU SYSTÈME DE RÉGULATION DU GÈNE DE LA
CHITOSANASE CHEZ *NOCARDIOIDES* SP. N106

par

Sophie Broussau

mémoire présenté au département de biologie
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, avril 2003

Le 3 avril 2003,
Date

le jury a accepté le mémoire de Mme Sophie Broussau dans sa version finale.

Membres du jury

M. Ryszard Brzezinski
Directeur
Département de biologie

M. Luc Gaudreau
Membre
Département de biologie

Mme Carole Beaulieu
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

L'intérêt que suscitent les actinomycètes en recherche provient de leur capacité à produire de nombreux antibiotiques, à produire des enzymes d'intérêt industriel et à être des bons candidats pour la production de protéines homologues et hétérologues. Les activités de recherche ont permis de développer des techniques de laboratoire et des outils biomoléculaires qui permettent la mise en valeur des actinomycètes. L'optimisation de vecteurs pour l'expression de protéines constitue un domaine de recherche très actif. Parmi les vecteurs développés, peu permettent l'induction à un moment précis de l'expression de la protéine. L'établissement d'un système d'induction requiert quelques éléments de base comme un régulateur de transcription, un site d'attachement du régulateur à l'ADN et un inducteur qui provoque soit le détachement (répresseur) soit l'attachement (activateur) du régulateur permettant ainsi la transcription du gène. Ces éléments sont obtenus à partir de systèmes naturels qui ont fait l'objet de différentes études.

Les travaux rapportés dans ce mémoire présentent une étude du système d'expression du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106. Cette étude va permettre la compréhension du système de régulation afin de l'utiliser pour la construction d'un système d'expression inductible par le chitosane. Les premiers arguments de base qui ont permis d'émettre l'hypothèse que le gène de la chitosanase de N106 est régulé est la présence d'une séquence répétée/inversée de 20 pb (AGTTAGGAAACTTTCCTAACT) dans la région régulatrice du gène et l'observation que la chitosanase est exprimée seulement en présence de chitosane. Les objectifs initiaux de ce projet sont de démontrer l'implication de protéines régulatrices dans l'expression de la chitosanase et d'en étudier les caractéristiques comme le site d'initiation de la transcription, les régions d'attachement des protéines sur l'ADN afin de proposer un modèle sur le mode de régulation du gène de la chitosanase.

Un milieu d'induction à base de chitosane hydrolysé a été développé afin d'induire la chitosanase et obtenir des extraits cellulaires pour détecter la présence de protéines qui s'attachent à la région régulatrice du gène de la chitosanase. Des extraits protéiques cytoplasmiques de N106 qui a été induit dans le milieu d'induction ont été testés lors d'une expérimentation par gel à retardement où deux complexes spécifiques ont été détectés, nommés « complexe lent » et « complexe rapide ». Les modulations détectées dans l'expression de ces deux protéines durant l'induction suggèrent que l'une est un répresseur (complexe lent) et l'autre un activateur (complexe rapide). Le temps d'induction relié à la détection de l'activateur potentiel correspond à celui qui permet la détection de l'ARNm par élongation d'amorce. La technique d'élongation d'amorce a aussi permis de déterminer le site d'initiation de la transcription et les séquences promotrices -10 et -35 du gène de la chitosanase de N106. Des tests de compétitions lors de gels à retardement ont permis de déterminer que l'activateur potentiel s'attache à une séquence d'ADN répétée/inversée et que le site d'attachement du répresseur potentiel est situé en amont de la séquence répétée/inversée. Une empreinte à la DNase I a permis d'apporter des précisions sur la région d'ADN que recouvre la protéine du complexe rapide.

Les travaux de ce mémoire rapportent aussi la purification d'une protéine que l'on présume être celle du complexe lent. La purification nécessite trois étapes dont une précipitation au sulfate d'ammonium, une chromatographie sur une colonne d'hydroxyapatite et un traitement avec des billes magnétiques contenant la séquence d'attachement à l'ADN de la protéine. Bien que l'attachement de la protéine sur les billes soit spécifique, il n'a pas été possible jusqu'à maintenant de détecter l'activité de la protéine par gel à retardement après l'élution des billes.

La technique de gel à retardement a permis de confirmer que des régions régulatrices de différents gènes (*Streptomyces* sp. N174 et *Streptomyces coelicolor*) qui contiennent la même

séquence répétée/inversée que celle de la chitosanase de N106 entre en compétition avec le complexe rapide mais pas avec le complexe lent. Il est donc possible que le régulateur du complexe rapide de N106 soit aussi présent chez *Streptomyces* sp. N174 et *Streptomyces coelicolor*.

Afin de cloner un gène codant pour un activateur du gène de la chitosanase, un système de gène rapporteur a été construit afin de cribler le gène dans une banque génomique. La souche dans laquelle la banque est construite contient un vecteur contenant la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 qui a été clonée devant le gène de résistance au chloramphénicol. Le gène codant pour l'activateur qui sera dans un clone de la banque pourra venir activer l'expression du gène responsable de la résistance au chloramphénicol par l'entremise de la région régulatrice du gène de la chitosanase. Il n'a cependant pas encore été possible d'obtenir une banque génomique de *Nocardioïdes* sp. N106 et donc le criblage de l'activateur n'a pu encore être entrepris.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Ryszard Brzezinski, pour sa confiance envers moi, sa grande disponibilité, ses judicieux conseils, sa patience et son support financier. En croyant en mes capacités, il m'a permis de développer une confiance en moi et de développer un esprit scientifique en recherche.

Merci aussi à mes conseillers, Dr Carole Beaulieu et Dr Luc Gaudreau, pour l'implication et le temps qu'ils ont consacrés à mes études graduées. Je tiens à remercier le Département de biologie de l'Université de Sherbrooke, tous mes collègues de travail, l'équipe du Dr Luc Gaudreau et l'équipe du Dr Denis Lebel pour leurs précieux conseils et leurs supports techniques. Un merci particulier à Marie-Pierre Dubeau, Nathalie Côté et Geneviève Couture dont les discussions ont permis d'apporter plusieurs bonnes idées.

Finalement, un grand merci à toute ma famille et ma belle famille. Particulièrement à ma mère et mon père pour leurs encouragements et leur support financier. À mon copain Patrick Langlois, pour son grand support moral, ses conseils et sa patience, sans lui, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
Liste des abréviations	x
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	11
1.1 Préparation de spores	11
1.2 Milieux de base afin d'induire une chitosanase chez <i>Streptomyces coelicolor</i> ..	11
1.3 Induction de la chitosanase et des protéines des complexes lent et rapide ...	12
de <i>Nocardioides</i> sp. N106	
1.4 Préparation d'extraits bruts de protéines cytoplasmiques	13
1.5 Préparation de chitosane hydrolysé de PM 2000 g/mol	14
1.6 Dosage de l'activité de la chitosanase	15
1.6.1 Préparation des réactifs	15
1.6.2 Courbe standard de glucosamine	15
1.6.3 Dosage de l'activité de la chitosanase	16
1.6.4 Calcul de l'activité de la chitosanase	17
1.7 Gel à retardement	17
1.7.1 Préparation de la sonde marquée au ³² P.....	17
1.7.1.1 Préparation de la matrice d'ADN	17
1.7.1.2 PCR radioactif par incorporation de ³² P[dCTP].....	20

1.7.2	Préparation et migration des échantillons	20
1.8	Détermination du site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	21
1.8.1	Extraction d'ARN total par ultracentrifugation sur un coussin de CsCl	21
1.8.2	Élongation d'amorce	23
1.8.2.1	Marquage radioactif de l'amorce par échange de phosphore avec la T4 polynucléotide kinase	23
1.8.2.2	Réaction d'hybridation	23
1.8.2.3	Réaction d'élongation	24
1.8.2.4	Réaction de séquençage	24
1.9	Purification de la protéine du complexe lent de <i>Nocardioides</i> sp. N106	25
1.9.1	Précipitation au sulfate d'ammonium	25
1.9.2	Chromatographie sur hydroxyapatite	25
1.9.3	Adsorption sur billes magnétiques	26
1.9.3.1	Préparation des billes magnétiques	26
1.9.3.2	Procédure d'utilisation des billes magnétiques	26
1.10	Préparation des différents fragments d'ADN compétiteurs utilisés lors d'un gel à retardement	27
1.11	Essai d'empreinte à la Dnase I de la protéine du complexe lent	28
1.11.1	Préparation de la sonde radioactive	28
1.11.1.1	Marquage radioactif de l'amorce par échange de phosphore avec la T4 polynucléotide kinase	28
1.11.1.2	Amplification de la sonde par PCR	29
1.11.2	Préparation et migration des échantillons	29
1.12	Construction d'un système rapporteur dans <i>E. coli</i> cloner un activateur de transcription du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	30

1.12.1 Clonage de la séquence régulatrice du gène de la chitosanase	31
de <i>Nocardioides</i> sp. N106 dans le vecteur pCR2.1	
1.12.2 Clonage de la région régulatrice du gène de la chitosanase de	31
<i>Nocardioides</i> sp. N106 en amont du gène de résistance au chloramphénicol	
1.12.3 Clonage du système rapporteur dans le vecteur à faible nombre	32
de copies pOK12	
1.12.4 Détermination du taux de résistance envers le chloramphénicol de ..	32
la souche <i>E. coli</i> portant l'ADN plasmidique pOKKKBE106	
1.12.5 Essai de construction d'une banque génomique de	33
<i>Nocardioides</i> sp. N106 dans <i>E. coli</i>	
 CHAPITRE 2 - RÉSULTATS	 35
2.1 Essais d'induction d'une chitosanase chez <i>Streptomyces coelicolor</i>	35
2.2 Progression de l'activité de la chitosanase chez <i>Nocardioides</i> sp. N106 dans ...	36
le milieu d'induction	
2.3 Détection par gels à retardement de protéines qui se lient à la région	38
régulatrice du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	
2.4 Détermination du site d'initiation de la transcription du gène de la	41
chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	
2.5 Détermination des régions d'attachement des protéines des complexes	43
lent et rapide sur la région régulatrice du gène de la chitosanase chez <i>Nocardioides</i> sp. N106 par des compétitions lors d'un gel à retardement	
2.6 Empreinte à la DNase I des protéines des complexes rapide et lent sur la	48
région régulatrice du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	
2.7 Purification de la protéine du complexe lent de <i>Nocardioides</i> sp. N106	49
2.8 Compétitions lors d'un gel à retardement des complexes lent et rapide	51
avec différentes régions régulatrices : CAB61194 et CAB71832 de <i>S. coelicolor</i> et celle du gène de la chitosanase de <i>Streptomyces</i> sp. N174	

2.9 Construction d'un système de gène rapporteur chez <i>E. coli</i> de l'activateur	53
de transcription de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	

DISCUSSION	55
CONCLUSION	66
ANNEXE 1	68
BIBLIOGRAPHIE	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Unités de mesure :

cpm :	compte par minute
°C :	degré Celsius
g :	gramme
h :	heure
l :	litre
kDa :	kilodalton
M :	molaire
mg :	milligramme
min :	minute
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
mol :	mole
ng :	nanogramme
nm :	nanomètre
pb :	paire de bases
pmol :	picomole
psi :	pound per square inch
rpm :	rotation par minute
sec :	seconde
U :	unité
μci :	microcurie
μl :	microlitre
μM :	micromolaire

μmol : micromole

V : volt

Composés chimiques/ milieux :

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNt : acide ribonucléique transfert

BSA : bovin serum albumin

dNTPs : désoxyribonucléotide 5'-trisphosphate où N = A, C, G ou T

dDTP : déoxyribonucléotide 5'-trisphosphate où D = A, G ou T

dCTP : déoxycytidine 5'-trisphosphate

DEPC : diethylpyrocarbonate

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

HEPES : N-[2-hydroxyethyl] piperazine- N'-[2-ethanesulfonic acid]

IPTG : isopropylthio- β -D-galactoside

MG : minimal growth

LB : Luria-Bertani

LBA : Luria-Bertani agar

PAHBAH : p-hydroxybenzoic acid hydrazide

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TAE : tris-acetate-EDTA

TBE : tris-borate-EDTA

TE : tris-EDTA

TPNS : sodium-triisopropylnaphthalene sulfonate
TS : tampon substrat
TSB : tryptic soy broth

Autres :

BE : binding element
csn : chitosanase
dB : double-brin
DO : densité optique
LE : limited edition
pI : point isoélectrique
PCR : polymerase chain reaction
PM : poids moléculaire
RBS : ribosome binding site
ROK : repressor ORF kinase

LISTE DES TABLEAUX

1.	Milieus testés pour induire l'expression d'une chitosanase chez <i>Streptomyces coelicolor</i>	13
2.	ADNs plasmidiques utilisés	18
3.	Oligonucléotides utilisés	19
4.	Méthodes chromatographiques testées afin de purifier la protéine du complexe lent	62
5.	Méthodes testées pour concentrer la protéine du complexe lent	62

LISTE DES FIGURES

1.	Progression de l'activité de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106 dans le milieu d'induction durant 10 heures d'incubation	37
2.	Progression de l'activité de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106 dans le milieu d'induction durant 20 heures d'incubation	37
3.	Détection par gel à retardement de protéines qui se lient à la région régulatrice du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106 durant 10h d'incubation dans le milieu d'induction	39
4.	Détection par gel à retardement d'une protéine qui se lie à la région régulatrice du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106 durant 20h d'incubation dans le milieu d'induction	39
5.	Essais d'attachement du complexe lent lors d'un gel à retardement avec 150 mM KCl et 50 mM KCl	40
6.	Élongation d'amorce sur le gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106 afin de déterminer le site d'initiation de la transcription	42
7.	Site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase chez <i>Nocardioides</i> sp. N106	42
8.	Séquence de recouvrement des ADNs compétiteurs	44

9.	Compétitions lors d'un gel à retardement avec des fragments d'ADN recouvrant différentes portions de la région régulatrice du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	45
10.	Compétitions lors d'un gel à retardement afin de préciser la région d'attachement de la protéine du complexe lent sur la région régulatrice du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106	47
11.	Purification de la protéine du complexe lent de <i>Nocardioides</i> sp. N106	50
12.	Absorption de la protéine du complexe lent sur les billes magnétiques	50
13.	Compétitions lors d'un gel à retardement sur les complexes lent et rapide avec différentes régions régulatrices : CAB61194 et CAB71832 de <i>Streptomyces coelicolor</i> et celle du gène de la chitosanase de <i>Streptomyces</i> sp. N174	52
14.	Carte de restriction de la cassette d'expression du système de gène rapporteur dans pOKKKBE106	54
15.	Principe du criblage phénotypique du gène de l'activateur du gène de la chitosanase de <i>Nocardioides</i> sp. N106 dans <i>E. coli</i>	54

INTRODUCTION

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif abondamment retrouvés dans le sol. Ils croissent sous forme d'un mycélium végétatif et aérien et ont la capacité de produire des spores. Ils ont comme autre caractéristique de posséder un génome riche en nucléotides guaniliques et cytidiques variant autour de 70 % (Wright et Bibb, 1992). Les actinomycètes participent au recyclage des polymères du sol, telles la lignocellulose et la chitine, grâce aux nombreuses enzymes extracellulaires qu'ils produisent (Srinivasan et al., 1991 ; McCarthy 1987). Ces bactéries sont généralement saprophytes, mais quelques espèces pathogènes existent chez l'homme comme *Nocardia asteroides* et *Nocardia farcinica* (Schaal et Lee, 1992) ainsi que chez les végétaux comme *Streptomyces scabiei* qui cause la gale commune de la pomme de terre (Goyer et al., 1996). Les actinomycètes produisent les deux tiers des antibiotiques connus produits par les microorganismes (Kieser et al., 2000). Les intérêts portés envers les actinomycètes ne sont pas seulement au niveau des antibiotiques, mais aussi au niveau des nombreuses enzymes d'intérêts industriels qu'ils produisent comme des glucose-isomérases, xylanases, chitinases, chitosanases (Gilbert et al., 1995, Srinivasan et al., 1991). Par exemple, les xylanases peuvent être utilisées comme agents de blanchiment dans les industries de pâtes et papiers (Subramaniyan et Prema, 2002) et les chitosanases peuvent traiter le chitosane dont les produits d'hydrolyse ont de nombreuses applications dans divers domaines comme la médecine, les cosmétiques, l'agriculture et la recherche biomoléculaire (Fort Lee, 1989). De plus, les propriétés antagonistes des actinomycètes envers des microorganismes phytopathogènes leur confèrent des caractères d'intérêts en lutte biologique (Doubou et al., 2002).

Les nombreux intérêts portés envers les actinomycètes ont encouragé les recherches au niveau de la biologie moléculaire afin de développer des techniques de laboratoire pour l'étude de ces microorganismes (Kieser et al., 2000). Les techniques de biologie moléculaire

apportent la possibilité de cloner des gènes pour ensuite apporter des améliorations envers la production des protéines codées par ces gènes (Gilbert et al., 1995). Les actinomycètes possèdent une machinerie enzymatique puissante dans la sécrétion de protéines. Ils ont donc été mis de l'avant pour devenir des hôtes efficaces et pratiques pour la production de protéines homologues et hétérologues (Gilbert et al., 1995). En effet, comparativement à *Escherichia coli* qui est présentement l'organisme le plus utilisé pour l'expression de gènes, il n'y aurait pas de complications reliées aux corps d'inclusions (agrégats formés par l'accumulation de protéines à l'intérieur de la cellule). Les techniques de récupération de la protéine sont simplifiées par le fait qu'elle se retrouve dans le surnageant de culture qui est peu complexe en teneur protéique. Pierce et al. (2002) proposent une étude comparative intéressante entre *Streptomyces lividans* et *E. coli* énumérant les avantages et les désavantages de chacun pour l'expression d'une même protéine. Bien que jusqu'à maintenant, les résultats présentés semblent favoriser légèrement *E. coli*, il est clairement mentionné que *Streptomyces lividans* a reçu beaucoup moins d'attention que *E. coli* au niveau de la recherche fondamentale et appliquée.

Au début des années 80, des vecteurs de clonage chez les actinomycètes ont été développés. Le vecteur pIJ702 (Katz et al., 1983) est un des premiers vecteurs développés et a plusieurs fois été utilisé pour le clonage et l'expression de gènes (Gilbert et al., 1995). Il existe maintenant une grande variété de vecteurs, dont voici quelques exemples : à haut nombre de copies par cellule (pIJ702, Katz et al., 1983), à faible nombre de copies (pIJ922, Lydiate et al., 1985), système de gène rapporteur (pXE4, Ingram et al., 1989) et vecteur multifonctionnel (pFD666, Denis et al., 1992). La plupart des vecteurs utilisés chez *Streptomyces lividans* sont aussi fonctionnels chez *E. coli*. Les manipulations de sous-clonages sont plus simples chez *E. coli* et la construction plasmidique peut être ensuite transformée chez *Streptomyces lividans*. L'augmentation de la production de la protéine, souvent observée lors du clonage d'un gène dans un vecteur à haut nombre de copies, est causée par l'effet de dosage du gène qui se retrouve en plusieurs nombres de copies dans la cellule. Dans le cas de protéines

d'intérêt industriel où la production en grande quantité est nécessaire, il est possible d'apporter des modifications supplémentaires au système d'expression afin de maximiser la production. Ces modifications peuvent être au niveau de la transcription, de la traduction et de la sécrétion du gène.

Le promoteur d'un gène est une région d'ADN impliquée dans l'attachement de l'ARN polymérase afin d'initier la transcription du gène. Les séquences sont généralement situées en position -35 et en -10 du site d'initiation de la transcription (+1). On réfère souvent aux séquences consensus très répandues dans le génome de *E. coli* composées des hexamères TTGACA pour la région -35 et TATAAT pour la région -10. Chez les actinomycètes, il y a une grande variabilité dans les séquences promotrices et plusieurs présentent une certaine similarité avec les séquences consensus de *E. coli*. Cependant, d'autres promoteurs d'actinomycètes diffèrent considérablement et ne montrent pas de régions caractéristiques -35 et -10 (Strohl, 1992). En général, la variabilité des promoteurs confère des différences dans l'efficacité d'initier la transcription, dans le mode de régulation des gènes (implication d'autres molécules régulatrices) et dans le comportement des différents promoteurs dans des organismes hétérologues.

Dans la plupart des cas, les gènes clonés de streptomycètes sont exprimés sous l'effet combiné de leur propre promoteur et d'un promoteur déjà présent dans le vecteur de clonage (Gilbert et al., 1995). L'utilisation d'un promoteur fort, homologue à la souche hôte, pour l'expression d'un gène hétérologue, résulte souvent en une hausse de l'expression du gène (Tremblay et al., 2002 ; Vigal et al., 1991). Par contre, ce n'est pas toujours le cas. Ainsi, l'expression du gène *cel-1* de *Streptomyces reticuli* n'était pas observée chez la souche hôte *Bacillus subtilis*, et ce même si le gène était sous le contrôle d'un promoteur fort provenant de la souche hôte (Walter et Schrempf, 1995). C'est aussi le cas pour le gène de la chitosanase de *Streptomyces* sp. N174 dont l'essai de trois promoteurs n'a pas provoqué

l'augmentation de l'expression du gène (Masson et al., 1994). Il est aussi possible d'investir un peu de temps sur le promoteur original du gène. Certaines études rapportent des modifications d'une ou plusieurs bases du promoteur afin d'échanger des bases originales contre des bases hautement conservées parmi les différentes espèces de streptomycètes. Ainsi, l'expression chez *Streptomyces lividans* des gènes *chi63* (Ni et Weatpheling, 1997) et *ampC-p* (Jaurin et Cohen, 1984) a été augmentée après de telles mutations. De plus, une augmentation de l'expression de 30 fois a été observée chez *Streptomyces lividans* lorsque la distance entre la région -35 et -10 du gène *ampC-p* était augmentée d'un nucléotide, passant de 16 à 17 nucléotides (Jaurin et Cohen, 1984).

La production d'une protéine n'est pas seulement contrôlée par la transcription génique mais aussi au niveau de la traduction lors de la synthèse de la protéine par les ribosomes sur l'ARNm. Des études ont démontré que certains gènes possèdent deux sites d'initiation à la traduction et que les deux sont utilisés lors de la traduction, augmentant ainsi la quantité de protéines produites (Pagé et al., 1996). Tremblay et al. (2002) ont appliqué cette découverte pour l'expression de deux antigènes produits par *Mycobacterium tuberculosis* clonés dans un vecteur à haut nombre de copies et exprimés chez *Streptomyces lividans*.

En plus des séquences -35 et -10, il est possible de retrouver dans la région régulatrice d'un gène d'autres séquences pouvant être ciblées par des protéines ayant l'effet soit d'empêcher la transcription (répresseurs) soit au contraire d'induire la transcription (activateurs). La régulation des gènes est souvent contrôlée au niveau de l'initiation de la transcription par l'action de protéines régulatrices. Une telle régulation apporte l'avantage de ne pas gaspiller d'énergie dans la production de transcrits qui ne sont pas, pour l'instant, requis. Ces protéines reconnaissent une séquence spécifique en amont du gène à être régulé. Une protéine régulatrice peut contrôler l'expression de plusieurs gènes, à condition d'y retrouver sa séquence spécifique de liaison à l'ADN. Un motif couramment rencontré dans les sites de

liaison à l'ADN est une séquence répétée et inversée. La symétrie de cette séquence peut refléter la symétrie de la protéine régulatrice composée soit d'un dimère ou d'un tétramère. Il est aussi possible qu'une séquence de liaison à l'ADN ne montre pas de motifs particuliers. C'est pourquoi il est pertinent de faire l'étude de la séquence de liaison à l'ADN pour chaque régulateur de transcription. Dans le cas d'un répresseur, la séquence de reconnaissance d'ADN est souvent située de façon à empêcher la machinerie transcriptionnelle d'initier la transcription, comme par exemple en chevauchant soit l'une ou l'autre des séquences promotrices -10 et -35 ou les deux. L'opéron lactose est un exemple où les gènes qui le constituent (*lacZYA*) sont régulés par un répresseur (LacI) qui est composé d'un tétramère, qui reconnaît une séquence d'ADN répétée et inversée et dont le gène est situé de façon adjacente à l'opéron. Un gène codant pour un régulateur est souvent retrouvé près des gènes qu'il régule mais peut tout aussi bien être situé ailleurs dans le génome. Les inducteurs (comme le lactose), cause souvent une diminution de l'affinité du répresseur sur l'ADN libérant ainsi la séquence d'ADN permettant ainsi à la machinerie transcriptionnelle à initier la transcription.

À l'inverse d'un répresseur, un activateur va assister la machinerie transcriptionnelle à initier la transcription. Les activateurs sont souvent requis dans des cas où le promoteur seul d'un gène ne permet pas un taux de transcrits suffisant. La séquence de liaison d'un activateur est souvent située en amont du promoteur ne bloquant pas ainsi la liaison de la machinerie transcriptionnelle aux -10 et -35. L'opéron lactose est aussi régulé par un activateur de transcription (CAP). L'activateur va se lier à l'ADN lorsque qu'il n'y a pas de glucose dans le milieu de culture. L'opéron lactose est donc un bon exemple d'une double régulation, qui permet l'expression des gènes nécessaires au métabolisme du lactose seulement lorsque nécessaire (présence de lactose et absence de glucose). Il est à noter que l'expression de certains gènes est requise en tout temps dans une cellule comme ceux codant pour l'ARNr. Ces gènes ne sont donc pas soumis à une régulation mais exprimés de façon constitutive.

Les gènes codant pour des protéines extracellulaires hydrolytiques sont généralement induits par des sous-produits de dégradation des polymères qu'elles génèrent et sont souvent sous l'effet de répression catabolique causée par des sucres simples comme le glucose (Nguyen et al., 1997). De nombreuses études ont rapporté l'effet de la répression par le glucose et dans la plupart des cas, la répression dépendait d'une séquence répétée et inversée dans la région régulatrice du gène (Schlösser et al., 2000 ; Giannotta et al., 1996 ; Virolle et Gagnat, 1994 ; Ni et Westpheling, 1997 ; Walter et Schrempf, 1996 ; Délic et al., 1992 ; Nguyen et al., 1992). Lors de l'expression d'un gène dans un vecteur à haut nombre de copies, il est possible que l'expression du gène soit gênée par la présence d'un répresseur même lorsque le gène est exprimé dans une souche hétérologue. La présence d'un répresseur dans un système d'expression oblige l'utilisation constante de l'inducteur afin d'empêcher la liaison du répresseur. L'abolition de la séquence ciblée par le répresseur peut donc permettre une expression du gène même en présence de glucose et donc dans des milieux de culture moins complexes (Delic et al., 1992).

Si un répresseur peut nuire à l'expression, alors un activateur peut aider. Dans le cas de gènes qui sont régulés par un activateur de transcription, l'absence de cet activateur peut causer une expression plus faible que prévu lorsque le gène est exprimé dans un système hétérologue. Cette situation a été rapportée pour le gène de la cellulase-1 de *Streptomyces reticuli* (Walter et Schrempf, 1995) et suggérée pour les gènes de la chitinase-63 de *Streptomyces lividans* (Ni et Westpheling, 1997) et de la chitosanase de N106 (Masson et al., 1995).

Les études sur la régulation d'un gène incluent fréquemment les effets de différents composés sur l'induction de gènes (Miyashita et al., 2000 ; Masson et al., 1993). Les inducteurs peuvent être appliqués à des systèmes d'expression afin d'induire spécifiquement l'expression d'un gène à un moment précis. Le système le plus connu étant l'induction du

promoteur *lacZ* par l'ajout d'IPTG, qui est un analogue du lactose (Sambrook et Russell, 2001). Ces systèmes d'induction permettent par exemple d'exprimer des gènes qui ont un effet toxique sur la cellule. L'inducteur est ajouté lorsque la biomasse bactérienne a atteint une densité suffisante pour permettre une bonne production de la protéine. Dans le cas de *lacZ*, l'induction provoque le détachement d'un répresseur, mais dans d'autres systèmes l'induction peut provoquer l'attachement d'un activateur. C'est le cas du système pBAD où la protéine régulatrice AraC (métabolisme de l'arabinose), dont le gène est cloné dans le vecteur, active la transcription au niveau du promoteur BAD (Guzman et al., 1995).

Beaucoup d'efforts ont été consacrés afin d'augmenter la production de la protéine au niveau de l'expression du gène. Cependant, d'autres groupes de recherche se sont penchés sur l'étude du système de sécrétion dont l'efficacité est variable selon les protéines (Morosoli et al., 1997). Les protéines sécrétées chez les streptomycètes sont d'abord produites sous forme d'un précurseur contenant en N-terminal une séquence d'acides aminés appelée peptide signal, qui est clivée lors de la translocation de la protéine à travers la membrane. Un peptide signal typique chez les streptomycètes contient un domaine hydrophile en N-terminal où l'on retrouve couramment des résidus chargés positivement comme l'arginine (Morosoli et al., 1997). On retrouve ensuite un domaine hydrophobe et quelques résidus neutres. Plusieurs études rapportent les effets de modifications (délétions et/ou insertions) dans la séquence du peptide signal sur la production de la protéine (Tremblay et al. 2002 ; Kébir et al., 2000, Morosoli et Dupont, 1999, Lammertyn et Anné, 1998). Ces études peuvent ainsi permettre de déterminer des motifs importants pour la sécrétion pour ensuite utiliser ces connaissances pour modifier d'autres peptides signaux (Lammertyn et Anné, 1998). Tout comme les promoteurs, il est possible de fusionner à une protéine un peptide signal hétérologue afin d'augmenter sa production. C'est le cas de la xylanase A ainsi que deux antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* (Kébir et al., 2000 ; Tremblay et al. 2002).

Dans l'objectif d'optimiser des systèmes d'expression pour produire des protéines d'intérêts industriels, le laboratoire du Dr Brzezinski, dans lequel étaient tenus les travaux présentés dans ce mémoire, s'intéresse depuis plusieurs années à une enzyme nommée chitosanase. La chitosanase est une endoenzyme qui hydrolyse la chaîne de chitosane, produisant un mélange de trimères et de dimères. Le chitosane dont la forme complètement acétylée représente la chitine, est un polymère composé de glucosamine et d'un pourcentage variable de N-acétylglucosamine liés par des liens β -(1-4). Les applications du chitosane sont différentes selon la taille et la charge des oligomères (variant selon le degré d'acétylation). Il est possible d'obtenir ces oligomères par traitements chimiques du chitosane mais il est difficile de contrôler la réaction pour obtenir la taille désirée des oligomères (Roberts, 1992). L'utilisation de la chitosanase pour traiter le chitosane permettrait d'avoir un meilleur contrôle car la réaction est plus graduelle. Afin de rendre possible l'utilisation de la chitosanase en milieux industriels, il faut pouvoir en produire en grande quantité et donc établir un système d'expression puissant.

En 1989, des travaux dans le laboratoire du Dr Brzezinski ont permis d'isoler 70 souches capables de dégrader le chitosane dont deux, N174 et N106, possédaient une forte activité. Ces deux souches sont présentement classées dans le genre *Streptomyces* et *Nocardioides* (Fink et al., 1991 ; Masson et al., 1995) mais des études phylogéniques plus approfondies ont démontré que ces deux souches appartenaient au genre *Kitasatospora* (Blanchard et al., 2001). Afin d'étudier ces chitosanases, chacun des gènes des deux souches a été cloné dans le vecteur pFD666 et exprimé dans *Streptomyces lividans* (Boucher et al., 1992 ; Masson et al., 1995). La chitosanase de N174 a été étudiée en profondeur au niveau de sa structure et de sa fonction (Fukamizo et Brzezinski, 1997). Les gènes des chitosanases sont clonés de façon à être sous le contrôle du promoteur appartenant au gène de résistance à la kanamycine (*neo*) qui est situé dans le vecteur pFD666 et dans chacun des cas, le promoteur original de chaque gène a également été conservé. Dans les mêmes conditions de culture, la production de chitosanase de N106 chez *Streptomyces lividans* était inférieure à la souche originale

N106 (Masson et al., 1995). Par contre, la production de la chitosanase de N174 avait triplé par rapport à la souche originale pour atteindre 37 unités/ml (Fink et al., 1991). Compte tenu de la différence notée dans la production des deux protéines, une hypothèse a été émise concernant la limitation de *Streptomyces lividans* à exprimer le gène de la chitosanase de N106. Cette difficulté peut être causée par une divergence entre les polymérases de N106 et de *Streptomyces lividans* qui n'ont pas la même efficacité à initier la transcription d'un même promoteur ou par l'absence d'un activateur de transcription chez *Streptomyces lividans* qui est serait présent chez N106. L'analyse des séquences régulatrices de N174 et N106 démontre des différences au niveau des séquences -35 et -10 tout en ayant une certaine similarité avec les séquences consensus de *E. coli*. De plus, on note la présence dans les deux cas de la même séquence répétée et inversée de 20 pb pour N106 et de 18 pb pour N174 (Masson et al., 1994 ; Masson et al., 1995) qui comme déjà mentionné est souvent la cible d'un répresseur. De plus, l'implication d'une régulation pour ces gènes est aussi appuyée par le fait que chacune des chitosanases est exprimée seulement en présence de chitosane (Masson et al., 1993).

L'hypothèse que la chitosanase de N106 soit régulée a attiré l'attention dans la perspective d'élaborer un système d'expression inductible par le chitosane. Un gène codant pour un activateur ou un répresseur pourrait être cloné dans un vecteur d'expression ou incorporé dans le génome de la souche hôte. Le régulateur induirait l'expression d'un gène par l'entremise de sa séquence d'attachement à l'ADN située en amont du gène soit en se détachant (répresseur) soit en s'attachant (activateur).

Les travaux présentés dans ce mémoire concernent le système de régulation du gène de la chitosanase chez *Nocardioides* sp. N106. Ces travaux ont comme objectifs d'approfondir les connaissances reliées à la régulation du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106. Le but à long terme étant de cloner le gène d'un régulateur et de construire un système

d'expression de gènes qui seraient induit par le chitosane soit par l'implication d'un activateur ou d'un répresseur. Des efforts préliminaires ont d'abord été consacrés à *Streptomyces coelicolor* dont le séquençage du génome a permis de trouver deux gènes hypothétiques codant pour des chitosanases (T34867 et CAB61194, Bentley et al., 2002). Les étapes de clonage du gène du régulateur seraient simplifiées à cause du génome séquencé. En effet, il est possible d'amplifier le gène par PCR avec des oligonucléotides choisis à partir de la séquence génomique pour ensuite l'insérer dans un vecteur de clonage. De plus, on retrouve devant l'un des deux gènes (CAB61194) la même séquence répétée-inversée que chez N174 et N106, ce qui suggère une similarité de régulation entre les souches. Cette même séquence est d'ailleurs aussi retrouvée devant un autre gène de *Streptomyces coelicolor* codant pour un régulateur de transcription hypothétique appartenant à la famille ROK (« repressor, ORF, Kinase », CAB71832, Titgemeyer et al., 1994). Cependant, malgré les nombreux milieux testés, il n'a pas été possible de détecter la moindre activité chitosanolytique chez *Streptomyces coelicolor*, ce modèle a donc été laissé de côté pour finalement reprendre celui de *Nocardioïdes* sp. N106.

L'étude présentée dans ce mémoire sur le système de régulation du gène de la chitosanase chez *Nocardioïdes* sp. N106 s'attarde aux conditions de culture dans lesquelles on détecte l'activité de la chitosanase dans le surnageant de culture et qui révèlent l'existence de deux régulateurs de transcription du gène de la chitosanase. Les sites d'attachement à l'ADN de ces deux protéines ainsi que le site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase ont été déterminés. La purification d'une protéine permettra d'obtenir la séquences d'acides aminés en N-terminal ainsi qu'une séquence d'acides aminés interne de la protéine. Ces séquences pourront être utilisées afin de déduire des séquences nucléiques pour la synthèse d'amorces PCR. Ces amorces pourront servir à amplifier une partie du gène du régulateur et la séquence amplifiée pourra être utilisée pour le criblage du gène dans une banque génomique.

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Préparation de spores

Un milieu de culture TSB (tryptic soy broth) de 50 ml est inoculé avec 50 µl de suspension de spores (non calibrée) de *Nocardioides* sp. N106 et incubé 24 heures à 30°C avec agitation. La culture est centrifugée 5 min à 4000 rpm (rotation par minute), la moitié du surnageant est enlevée et le culot bactérien est homogénéisé par inversion dans ce qui reste de surnageant. Des volumes de 1 ml sont étalés sur une vingtaine de pétris SLM3 (10 g/l d'amidon, 5 g/l de « corn steep liquor », 3 g/l de CaCO₃, 0,012 g/l de FeSO₄ et 15 g/l d'agar). Les pétris sont incubés à 30°C jusqu'à l'obtention d'un tapis dense de spores (3 à 4 jours). Les spores sont recueillies en recouvrant le quart de chaque pétri avec des billes de verre de 3 mm stériles, pour ensuite les faire rouler sur les pétris en agitant à la main. Les billes sont transférées dans un tube de 50 ml, immergées dans du glycérol 20% stérile et sont agitées quelques minutes. Le glycérol contenant maintenant les spores est transféré dans un autre tube de 50 ml et est centrifugé 5 min à 4000 rpm. Le culot de spores est homogénéisé dans un petit volume de glycérol (500 µl à 5 ml selon la grosseur du culot). Les spores sont conservées à -20°C.

1.2 Milieux de base afin d'induire une chitosanase chez *Streptomyces coelicolor*

Une préculture de *Streptomyces coelicolor* est effectuée dans le milieu J (100 g/l sucrose, 30 g/l TSB, 10 g/l yeast extract, 10 g/l MgCl₂. H₂O) à partir de 50 µl de suspension de spores

(non calibrée) et est incubée 48 heures à 30°C avec agitation. La préculture est centrifugée 5 minutes (min) à 4000 rpm, lavée une fois avec de la saline stérile 0,89% et resuspendue dans 2 volumes de culots bactérien avec de la saline stérile 0,89%. Un volume de 3 ml de suspension bactérienne est ajouté à 100 ml de milieu d'induction MG base (Kieser et al., 2000) et est incubé à 30°C (voir tableau 1 pour les modifications apportées au milieu d'induction MG base).

1.3 Induction de la chitosanase et des protéines des complexes lent et rapide de *Nocardioides* sp. N106

Une préculture de *Nocardioides* sp. N106 est effectuée en milieu TSB à partir de 50 µl de suspension de spores et est incubée 24 heures à 30°C avec agitation. La préculture est centrifugée 5 min à 4000 rpm, lavée une fois avec de la saline stérile 0,89% et resuspendue dans 2 volumes de culot avec de la saline stérile 0,89%. Un volume de 6 ml de suspension bactérienne est ajouté à 100 ml de milieu d'induction (5,0 mM K₂HPO₄, 0,8 mM MgCl₂, 0,036 mM FeSO₄, 1 ml/l de microéléments (40 mg/ml ZnCl₂, 200 mg/ml FeCl₃.6H₂O, 10 mg/ml CuCl₂.2H₂O, 10 mg/ml MnCl₂.2H₂O, 10 mg/ml Na₂B₄O₇.10H₂O, 10 mg/ml (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O), 0,4 g/l Malt Extract, 3,5 g/l de chitosane hydrolysé de poids moléculaire de 2000 g/mol, pH 6,9) et est incubé à 30°C avec agitation 10 heures pour induire la protéine du complexe rapide et 20 heures pour induire la protéine du complexe lent.

Tableau 1. Milieux testés pour induire l'expression d'une chitosanase chez *Streptomyces coelicolor*.

	Milieux
1	MG base (50 mg/ml maltose) + 10 mg/ml chitosane broyé
2	MG base (10 mg/ml maltose)* + 10 mg/ml chitosane broyé
3	MG base (1 mg/ml maltose) * + 10 mg/ml chitosane broyé
4	MG base (0 mg/ml maltose) * + 10 mg/ml chitosane broyé
5	MG base (10 mg/ml maltose et sans azote) * + 10 mg/ml chitosane broyé
6	MG base (10 mg/ml maltose) * + 10 mg/ml D-glucosamine
7	MG base (10 mg/ml manitol)** + 10 mg/ml chitosane broyé
8	MG base (10 mg/ml sorbitol)** + 10 mg/ml chitosane broyé
9	MG base (0,5 mg/ml maltose) *

Légende : Des changements ont été apportés au milieu MG base afin d'induire une chitosanase chez *Streptomyces coelicolor*. * Changement de concentration de maltose par rapport au milieu original MG base (50 mg/ml). ** Changement du sucre dans le MG base.

1.4 Préparation d'extraits bruts de protéines cytoplasmiques

La culture bactérienne induite est centrifugée 5 min à 4000 rpm à 4°C, lavée dans le tampon d'extraction froid (50 mM Tris, 60 mM NaCl, 5% glycérol, 1mM EDTA 1 mM DTT, pH 8,0) et resuspendue dans 2-3 volumes de culot bactérien avec le tampon d'extraction froid contenant cette fois-ci le cocktail d'inhibiteurs de protéases CompleteTM (Roche Molecular Biochemicals, une pastille dans 50 ml de tampon d'extraction). Les cellules sont ensuite brisées par deux passages à la presse de French (French^R Pressure Cell Press, SLM AMINCO) à 18 000 psi. L'extrait cellulaire est centrifugé 10 min à 4000 rpm à 4°C pour enlever les débris cellulaires et le surnageant est congelé dans des tubes déposés dans de la

glace carbonique et les tubes sont conservés à -70°C . La concentration de protéines totales est mesurée par la méthode Bradford (1976) avec le réactif «Bio-Rad Protein Assay» (Bio-Rad).

1.5 Préparation de chitosane hydrolysé de PM 2000 g/mol

Une solution de chitosane 4% (94,2% déacétylé, ISM Biopolymer) est préparée dans du HCl 0,5 M. Le pH de la préparation de chitosane est augmenté à près de 5,0 avec du KOH 2 M. L'ajout du KOH provoque la précipitation locale du chitosane, il faut donc en ajouter peu à la fois et attendre que le chitosane se dissout à nouveau (le volume de la préparation de chitosane va varier selon la quantité de KOH ajoutée). La préparation de chitosane est traitée avec de la chitosanase purifiée (Boucher et al., 1992) à 37°C avec agitation. Le nombre d'unités de chitosanase ajouté doit être évalué par le fait qu'une unité génère $1\ \mu\text{mol}$ de sucre réducteur en 1 min. La progression de l'hydrolyse du chitosane est suivie par dosage des sucres réducteurs (section 1.6). Le niveau de sucres réducteurs désiré est relié avec la concentration initiale de chitosane (après avoir ajusté le pH) et avec le poids moléculaire désiré des fragments de chitosane générés par l'hydrolyse :

$$\text{Concentration de sucres réducteurs (mmol/ml)} = \frac{\text{Concentration de chitosane (mg/ml)}}{\text{PM de chitosane désiré (mg/mmol)}}$$

Dès l'obtention du niveau de sucres réducteurs relié à un poids moléculaire moyen de chitosane de 2000 g/mol, la préparation de chitosane est plongée dans un bain d'eau bouillante durant 30 min, puis congelée à -70°C dans un Pyrex et lyophilisée (Freeze dryer, 24DX24).

1.6 Dosage de l'activité de la chitosanase

Le protocole est inspiré de Lever (1973) et Schep (1984)

1.6.1 Préparation des réactifs

Le réactif PAHBAH (p-hydroxybenzoic acid hydrazide) doit être préparé au maximum 2 heures avant l'expérience. Une dilution 1:20 est effectuée dans de l'eau distillée à partir des solutions mères suivantes : 1 M Na_2SO_3 , 0,2 M CaCl_2 , 0,5 M citrate trisodium et 5 M NaOH. À cette solution, 100 mg/l de p-hydroxybenzoic acid hydrazide est ajouté.

La solution tampon-substrat (TS) est faite à partir d'un stock de 10 mg/ml de chitosane (85% déacétylé, Sigma) préparé dans 1 M d'acide acétique glacial. Ce chitosane est ensuite dilué dans du tampon acétate 0,05 M, pH 5,5 pour obtenir une concentration finale de 0,8 mg/ml.

1.6.2 Courbe standard de glucosamine

Différentes concentrations de glucosamine sont préparées à partir d'une solution mère de glucosamine 2 mM dans un volume final de 500 μl (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM) dans des tubes vissés de 2 ml. À ces échantillons, 1 ml de réactif PAHBAH est ajouté. Les échantillons sont bouillis exactement 5 min et sont immédiatement refroidis dans un bain d'eau froide. Les échantillons sont ensuite centrifugés dans une microcentrifugeuse durant 5

min. La densité optique des surnageants est mesurée à 405 nm avec un spectrophotomètre (Ultrospec^R 2000 sipper, Amersham Biosciences).

1.6.3 Dosage de l'activité de la chitosanase

Un essai est effectué pour doser les sucres réducteurs déjà présents dans l'échantillon. Il faut ajouter dans l'ordre, 490 µl de tampon acétate 0,05 M pH 5,5, 1 ml de réactif PAHBAH et 10 µl d'échantillon dans des tubes vissés de 2 ml. Les tubes sont bouillis exactement 5 min, refroidis dans un bain d'eau froide, centrifugés 5 min et les densités optiques des surnageants sont mesurées à 405 nm.

Un autre essai est effectué pour doser les sucres réducteurs produits par la chitosanase de l'échantillon. Il faut ajouter à des temps fixes, 10 µl d'échantillon dans 490 µl de tampon acétate 0,05 M pH 5,5 préchauffé à 37°C dans des tubes vissés de 2 ml. Les échantillons sont incubés à 37°C durant exactement 10 min. Les réactions sont arrêtées en ajoutant 1 ml de réactif PAHBAH. Les tubes sont bouillis exactement 5 min, refroidis dans un bain d'eau froide et centrifugés 5 min. La densité optique des surnageants est mesurée à 405 nm.

Note : les préparations des échantillons pour les standards de glucosamine, pour les sucres déjà présents dans l'échantillon et pour les sucres produits par la chitosanase à tester sont effectuées en parallèle pour que les tubes puissent être tous bouillis en même temps.

1.6.4 Calcul de l'activité de la chitosanase

Les densités optiques sont converties en μmol de sucre en utilisant la courbe standard de glucosamine. Les concentrations obtenues lors du premier dosage sont soustraites aux valeurs obtenues lors du deuxième dosage des sucres réducteurs. La valeur est ensuite rapportée en unité de chitosanase par ml d'échantillon, où une unité équivaut à la quantité d'enzyme qui génère 1 μmol de sucre réducteur en 1 min.

1.7 Gel à retardement

1.7.1 Préparation de la sonde marquée au ^{32}P

1.7.1.1 Préparation de la matrice d'ADN

La région régulatrice du gène de la chitosanase est amplifiée selon les conditions suivantes : 1,5 ng d'ADN plasmidique (pBE106, tableau 2), 10 μl de tampon 10X (Taq DNA polymerase buffer, Amersham Biosciences), 0,2 mM de dNTP, 50 pmol de chaque oligonucléotide (A-106 et B106, tableau 3), 5 U de l'ADN polymérase Taq (Amersham Biosciences) et le volume est ajusté à 100 μl avec de l'eau. Le programme est effectué dans un thermocycleur (Biometra^R, T-Gradient) selon la programmation suivante : 1- 94 °C, 4 min ; 2- 94 °C, 30 sec ; 3- 50 °C, 45 sec ; 4- 72 °C, 60 sec (étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois) ; 5- 72 °C, 10 min. L'ADN amplifié est purifié en utilisant la trousse de purification de produits PCR QIAquickTM (Qiagen).

Tableau 2. ADNs plasmidiques utilisés

Plasmides	Description	Utilités
pBE106	Vecteur Bluescript possédant la région régulatrice du gène de la chitosanase chez N106 (anti-sens)	Marquage radioactif lors de gel à retardement
pCR2.1	Vecteur commercial linéarisé pour le clonage de produits PCR	Clonage des régions régulatrices des gènes <i>csn</i> de N106, N174, <i>S. coelicolor</i> (CAB61194) et (CAB71832) de <i>S. coelicolor</i>
pCR 2.1 BE106 antisens	Possède la région régulatrice du gène de la chitosanase chez N106 (anti-sens)	BE106 excisé pour le clonage dans pKK232-8
PCR2.1 sdeCSNcoe	Possède la région régulatrice du gène CAB61194 de la chitosanase de <i>S. coelicolor</i>	Utilisation de la région régulatrice pour des compétitions lors de gels à retardement
PCR2.1 sdeROKcoe	Possède la région régulatrice du gène CAB71832 de <i>S. coelicolor</i>	Utilisation de la région régulatrice pour des compétitions lors de gels à retardement
PCR2.1 sdeCSN174	Possède la région régulatrice du gène de la chitosanase de <i>S. N174</i>	Utilisation de la région régulatrice pour des compétitions lors de gels à retardement
pCSN106-2	Possède de gène entier de la chitosanase de N106	Amplification du BE de N106 pour clonage dans pCR2.1
pKK232-8	Vecteur pour la construction de système rapporteur Cm ^r	Pour la construction du système rapporteur
pOK12	Vecteur à faible nombre de copies	Pour la construction du système rapporteur
pKKBE106	pKK232-8 ayant en amont du gène Cm ^r la région régulatrice du gène <i>csn</i> de N106	Pour la construction du système rapporteur
pOKKKBE106	Vecteur à faible nombre de copie possédant la région régulatrice du gène de la chitosanase de N106, clonée en amont du gène Cm ^r	Construction finale du système rapporteur dans <i>E. coli</i> pour le criblage dans une banque génomique de l'activateur de transcription du gène <i>csn</i> de N106

Tableau 3. Oligonucléotides utilisés

Noms	Séquences	Utilités
A-106 B-106	CTC TAG AAC TAG TGG ATC ACG GTA TCG ATA AGC TTG	Amplifient dans Bluscript le BE de N106 (pBE106, insert anti-sens)
A2-106	TTG CGC GGT GGT GGG CGT GAA	Amplifie avec IR2-106 une portion raccourcie en 5' du BE de N106
A3-106	TGG GCG TGA ACG CTT CAA TC	Amplifie avec IR2-106 une portion raccourcie en 5' du BE de N106
A4-106	CGC TTC AAT CTA GTT AGG A	Amplifie avec IR2-106 une portion raccourcie en 5' du BE de N106
B2-106	GTT TCC TAA CTA GAT TGA AGC	Amplifie avec B-106 dans pBE106 une portion raccourcie en 3' du BE de N106
B3-106	TAG ATT GAA CGC TTC ACG CCC	Amplifie avec B-106 dans pBE106 une portion raccourcie en 3' du BE de N106
BIOB3-106	Biotine - TAG ATT GAA CGC TTC ACG CCC	Même chose que B3-106. ADN servant pour la purification avec les billes magnétiques
IR1-106 IR2-106	TGG CGC CAG GGC CTT GCG TGG TCC GGG GCA TGG GGG T	Amplifient le BE complet de N106
PEN106-1	GCG GTG GGG TGC TTG AGA CGC AT	Amorce utilisée lors de l'élongation d'amorce
SB1-106 SB2-106	AAC GCT TCA ATC TAG TTA GGA AAC TTT CCT AAC TCT CCT CAT GGG TCC TCT CCG GAC CCA TGA GGA GAG TTA GGA AAG TTT CCT AAC TAG ATT GAA	Lorsque appariés, ils forment un ADN db qui contient la séquence répétée/inversée de N106 (extrémités cohésives pour marquage)
SDE CNSCOP-1 SDE CNSCOP-2	CTC CGT ACC AGT TCG TGC A CTC ACG GAA TCT CCA GGT G	Amplifient la partie régulatrice du gène de la chitosanase CAB61194 de <i>S. coelicolor</i>
SDEN174-1 SDE N174-2	GGA TTT GGG GCG GGG CCC TT CAT ATG ACG CTC CGT CTT CTG T	Amplifient la partie régulatrice du gène de la chitosanase de N174
SDE ROKCOE-1 SDE ROKCOE-2	CGG GCC TAC GTT CTC CAG GAC CGC TCA GCT TTT CAG G	Amplifient la partie régulatrice du gène CAB71832 de <i>S. coelicolor</i>

1.7.1.2 PCR radioactif par incorporation de ^{32}P [dCTP]

Le protocole est inspiré de Mertz & Rashtchian (1994).

Un deuxième PCR est effectué en utilisant comme matrice, l'ADN préamplifié de la section 1.7.1.1 : 0,1 ng d'ADN, 2 μl de tampon 10X (Taq DNA polymerase buffer, Amersham Biosciences), 16,5 μM de dDTP (dATP, dTTP, dGTP), 4,125 μM dCTP, 5 μl de [α - ^{32}P]dCTP (3000 ci/mM, Perkin ElmerTM life sciences, BLU513H), 50 pmol de chaque oligonucléotide (A-106 et B-106) et 2 U de l'ADN polymérase Taq dans un volume final de 20 μl . Le programme est effectué dans un thermocycleur selon la programmation suivante : 1- 94 °C, 1 min ; 2- 94 °C, 30 sec ; 3- 50 °C, 1 min ; 4- 72 °C, 2 min (étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois) ; 5- 72 °C, 10 min. L'ADN marqué est purifié en utilisant la trousse de purification de produits PCR QIAquickTM (Qiagen) et est compté à scintillation (Beckman LS6000SC, Liquid Scintillation System). L'ADN est ensuite dilué à environ 40 000 cpm/ μl dans du TE contenant 50 ng/ μl de poly-dIdC (Roche Molecular Biochemicals, 10A₂₆₀Units, 108 812).

1.7.2 Préparation et migration des échantillons

Pour chaque échantillon, 12 μl de tampon D2x-KCl (20 mM HEPES pH 7,9, 20% glycérol, 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5 mM DTT), 500 ng poly-dIdC (Roche Molecular Biochemicals, 10A₂₆₀Units 108 812), 150 mM KCl, 1 ng sonde (~ 40 000 cpm, sonde préparée à la section 1.7.1), 4,5 μg d'extrait protéique brut et le volume est ajusté à 24 μl avec de l'eau. Les échantillons sont incubés 15 min à la température de la pièce et sont ensuite déposés dans un gel de polyacrylamide Tris-glycine 6% non dénaturant. Le gel est

préparé la veille en utilisant l'unité verticale d'électrophorèse à 24 puits (SCIE- PLAS, V10-WCDC) et mis à 4°C pour la nuit dans du tampon 1X Tris-glycine (80 mM Glycine , 10 mM Tris, 0,4 mM EDTA). Les échantillons sont déposés sur gel avec un voltage de 135 V. Un puits est réservé pour charger un échantillon contenant un marqueur de migration (10 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% glycérol, 0,05% de bleu de bromophénol, 0,05% de cyanol xylène). Dès que les échantillons sont pénétrés dans gel (environ 5 min après le dernier échantillon), le voltage est descendu à 120 V. La migration est stoppée après que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel. Le gel est fixé dans une solution d'acide acétique 10% et de méthanol 20% durant 30 minutes. Le gel est transféré sur un papier Whatman 3 MM et séché dans un séchoir à gel avec un deuxième papier Whatman en dessous et une pellicule plastique sur le dessus durant 1 heure à 70°C. Le gel est ensuite exposé sur un écran phosphorescent (Molecular Dynamics) et est révélé avec un phosphorimager (Molecular Dynamics). L'image est ensuite traitée avec le logiciel Adobe Photoshop 5,0 LE afin d'améliorer les contrastes.

1.8 Détermination du site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106

1.8.1 Extraction d'ARN total par ultracentrifugation sur un coussin de CsCl

Le protocole est inspiré de Kieser et al. (2000) et Sambrook et Russell (2001).

Le mycélium d'une culture de 50 ml de N106 dans le milieu d'induction (10h et 20h) est rapidement refroidi dans de la glace/eau pour être ensuite centrifugé 5 min à 4000 rpm à 4°C. Le mycélium est lavé dans du tampon P froid (103 g/l sucrose, 0,25 g/l K₂SO₄, 2,02 g/l

MgCl₂.6H₂O, 2 ml de microéléments (section 1.3), 800 ml H₂O, autoclaver, ajouter à 80 ml de cette solution : 1 ml KH₂PO₄ (0,5%), 10 ml CaCl₂.2H₂O (3,68%), 10 ml TES (5,73%) pH 7,2.) et homogénéisé dans 3 ml de ce même tampon. La suspension est transférée dans un tube de 50 ml contenant 14 g de billes froides (Glass Beads, 425-600 microns, Sigma) et 3 ml de la solution Kirby modifiée 2X froide (2% TPNS, 12% 4-amino salicylate sodium, 12% de phénol/chloroforme-isoamyl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3) et est mélangée vigoureusement avec un vortex durant 2 min. Un volume égal de phénol/chloroforme est ajouté et le tout est vortexé pendant 1 min. Le mélange est transféré avec une pipette de transfert stérile dans un autre tube 50 ml (laissant les billes) et est centrifugé 5 min à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est transféré dans un tube de 15 ml et le volume est ajusté à 8 ml avec de l'eau. Le mélange est transféré dans un tube contenant 3,2 g de CsCl (le CsCl est chauffé dans un four à 180°C durant 4h avant l'utilisation) et est ensuite déposé délicatement sur un coussin de 3,5 ml de CsCl 5,7 M dans un tube jetable pour rotor SW41(Ultra clear centrifuge tube, 14 x 89 mm, Beckman 344 059). Le coussin est préparé avec du CsCl chauffé 4h à 180°C et avec de l'eau traitée au DEPC. La préparation est centrifugée à 30 000 rpm (L8-M ultracentrifuge, rotor SW41Ti, Beckman) durant 14-18h à 20°C. Le surnageant est enlevé en changeant souvent d'embouts (embouts certifiés sans RNase). Le tube est coupé à 1,5 cm du fond avec un scalpel chaud. Le culot est lavé avec de l'éthanol 80% et est ensuite séché. Le culot d'ARN est dissolu dans un petit volume (15 à 30 µl) avec de l'eau traitée au DEPC et est transféré dans un microtube 1,5 ml traité au DEPC. Lorsqu'il y a présence d'une suspension blanche, le tube est centrifugé brièvement et le surnageant est récolté. L'ARN est dosé par spectrophotomètre (Ultrospec 3000, Biochrom) et vérifié par électrophorèse dans un gel d'agarose 1% contenant de la formaldéhyde selon le protocole de Ausubel et al. (1987).

1.8.2 Élongation d'amorce

Le protocole est inspiré de Sambrook et Russell (2001) et Kieser et al. (2000)

1.8.2.1 Marquage radioactif de l'amorce par échange de phosphore avec la T4 polynucléotide kinase

L'amorce (PEN106-1, tableau 3) est dissolue à 10 pmol/ μ l dans du TE à partir d'un stock de 40 pmol/ μ l. Le marquage est effectué avec 2 μ l de tampon One-Phor-All (USB), 10 pmol de l'amorce, 20 unités de T4 polynucléotide kinase (USB, 27-0736-01), 3 μ l de [γ ³²P]ATP (3000 ci/mM, Perkin Elmer, BLU502H) et le volume est ajusté à 20 μ l avec de l'eau. Le mélange est incubé 45 min à 37°C et est ensuite purifié avec la trousse de purification de produits PCR QIAquickTM (Qiagen). Le volume est ajusté à 100 μ l avec de l'eau.

1.8.2.2 Réaction d'hybridation

La réaction d'hybridation est effectuée avec un minimum de 40 μ g d'ARN, dans le tampon d'hybridation (20 mM Tris-HCl, pH 8,6, 600 mM NaCl, 2 mM EDTA) et 0,1 pmol de l'amorce marquée au ³²P (section 1.8.2.1). L'échantillon est chauffé 5 min à 95°C pour être ensuite incubé 90 min à 55°C. Le mélange ARN-amorce est précipité en ajoutant 200 μ l d'acétate d'ammonium 1 M et 200 μ l d'isopropanol, incubé 15 min à la température de pièce et centrifugé 10 min. Le surnageant est enlevé, le culot est lavé avec de l'éthanol 70%, séché et ensuite resuspendu dans 10 μ l de 10 mM Tris-HCl, pH 8,6.

1.8.2.3 Réaction d'élongation

La réaction d'élongation d'amorce est effectuée en ajoutant aux 10 µl d'ARN complexé à l'amorce (préparé à la section 1.8.2.2), 3 µl d'eau traitée au DEPC, 4 µl de tampon 5X (Reverse transcriptase buffer, Promega), 10 mM de DTT, 1 mM de dNTP, 1 µg d'actinomycine D, 5 unités de la transcriptase reverse AMV (Promega, M5101) et 20 unités de RNAsin (Promega N2111). Le mélange est incubé 60 min à 45°C et la réaction est arrêtée en ajoutant du formamide dye (formamide contenant 20 mM EDTA, pH 8,0, 0,05% de bleu de bromophénol et 0,05 cyanol xylène). L'échantillon est chauffé 5 min à 95°C juste avant d'être déposé dans un gel d'acrylamide 10%, TBE, 5 M urée (mettre seulement la moitié de l'échantillon). Ce gel donnera la confirmation de la réussite de l'expérience avant de faire un gel de séquence (section 1.8.2.4). L'électrophorèse est stoppée lorsque la migration atteint les trois-quarts du gel. Le gel est ensuite fixé, séché, exposé et révélé (section 1.7.2).

1.8.2.4 Réaction de séquençage

La réaction de séquence est faite avec la trousse AutoRead (ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit, Amersham Biosciences) en utilisant la méthode d'appariement rapide avec de l'ADN double brin. L'amorce utilisée est la même que celle utilisée lors de l'élongation d'amorce (section 1.8.2.1). Les réactions sont déposées sur un gel de séquençage 6% polyacrylamide, 1X TBE, 4,6 M urée (Hoefler SQ3 sequencer, Amersham Biosciences) en incluant aussi la réaction faite lors de l'élongation d'amorce (section 1.8.2.3). La migration est menée jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. Le gel est ensuite séché et exposé soit sur un écran phosphore et/ou sur un film Kodak Biomax MR (Amersham Biosciences, 817 5187).

1.9 Purification de la protéine du complexe lent de *Nocardioides* sp. N106

1.9.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait cellulaire brut préparé à la section 1.4 est précipité au sulfate d'ammonium entre 25% et 50% de saturation. Le culot est resuspendu dans deux volumes de tampon d'équilibration (1 mM tampon phosphate, pH 6,8, 5% glycérol) où un volume équivaut au volume initial d'extrait brut .

1.9.2 Chromatographie sur hydroxyapatite

L'échantillon est passé dans une colonne hydroxyapatite (Bio-Gel HTP, Bio-Rad) qui est préparée et utilisée selon les recommandations du fournisseur. La colonne est équilibrée avec un tampon phosphate 1 mM, pH 6,8, 5% glycérol. Après le passage de l'échantillon protéique préparé à la section 1.9.1, un volume de tampon d'équilibration est passé dans la colonne où un volume équivaut au volume de la résine d'hydroxyapatite. Une grande quantité de protéines indésirables est décrochée par le passage de deux volumes de tampon de lavage (150 mM tampon phosphate, pH 6,8, 5% glycérol). La protéine du complexe lent est décrochée de la colonne avec le tampon d'élution (270 mM tampon phosphate pH 6,8, 5% glycérol). Afin de déterminer les fractions où se situent les protéines éluées, certaines fractions sont dosées par la méthode Bradford (1976) pour ensuite y ajouter l'équivalent de 75 µl d'une préparation d'inhibiteur de protéases CompleteTM (Roche Molecular Biochemicals) par ml de fractions.

1.9.3 Adsorption sur billes magnétiques

1.9.3.1 Préparation des billes magnétiques

La région d'attachement de la protéine du complexe lent sur l'ADN est amplifiée par PCR avec les amorces BioB3-106 et B-106 (dont la première est biotinylée en 5', tableau 3) dans les conditions suivantes : 1,5 ng d'ADN (pBE106), 10 µl de tampon (Taq DNA polymerase buffer, Amersham Biosciences), 0,2 mM de dNTP, 30 pmol de chaque amorce, 5 U de l'ADN polymérase Taq (Amersham Biosciences) et le volume est ajusté à 100 µl avec de l'eau. Le mélange réactionnel est soumis à la programmation suivante dans le thermocycleur (Biometra^R, T-Gradient) : 1- 94°C, 4 min ; 2- 94°C, 1 min ; 3- 50°C, 1min ; 4- 72°C, 2 min (les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois) ; 5- 72°C, 10 min. Afin de produire beaucoup d'ADN, 6 réactions d'amplification sont effectuées. L'ADN est ensuite soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose 2% (20 cm x 20 cm) dans un tampon TAE. La migration est poursuivie jusqu'aux trois-quart du gel afin de bien séparer l'ADN amplifié des amorces (qui pourraient interférer lors de la liaison avec les billes). L'ADN est purifié à l'aide de la trousse de purification sur gel QIAquick (Qiagen). La totalité de l'ADN purifié est attachée à 1 mg de billes (Dynabeads M-280, DYNAL A.S. 112.05) par interaction biotine/streptavidine selon le protocole suggéré par le fournisseur.

1.9.3.2 Procédure d'utilisation des billes magnétiques

Afin de favoriser l'attachement de la protéine du complexe lent sur l'ADN et de protéger l'ADN contre l'action des DNases, les fractions sont ajustées à 150 mM de KCl et 1 mM EDTA. Une quantité de 250 µg de billes est ajoutée à 1 ml de fraction éluée de la colonne hydroxyapatite et le mélange est incubé 20 min à la température de la pièce en

homogénéisant à la pipette aux 10 min. Les billes sont concentrées dans le fond du tube à l'aide d'un aimant (Dynal MCP) et le surnageant est conservé aux fins d'analyse lors de gel à retardement et lors de gel SDS-PAGE. Un autre ml est ajouté aux billes et le nouveau mélange suit les mêmes étapes que le premier et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les fractions soient traitées. Les billes sont ensuite lavées avec 1 ml de tampon (270 mM tampon phosphate, pH 6,8, 5% glycérol, 150 mM KCl et 1 mM EDTA) suivis d'un autre lavage avec 200 µl de tampon supplémentés avec 1 µl de poly-dIdC (stock 1 µg/µl, Roche Molecular Biochemicals, 10A₂₆₀Units). Lorsque les billes sont combinées, elles sont transférées dans un tube propre et lavées de nouveau avec le tampon de lavage (sans poly-dIdC). Les billes sont ensuite resuspendues dans 50 µl de tampon d'éluion dénaturant (50 mM tris pH 6,8, 3% SDS) et chauffées 15 min à 70°C. La pureté de l'échantillon est vérifiée avec un gel de protéines.

1.10 Préparation des différents fragments d'ADN compétiteurs utilisés lors d'un gel à retardement

Trois différentes régions régulatrices ont été amplifiées et clonées afin de les utiliser pour des expériences de compétitions (section 2.8) : celle du gène de la chitosanase CAB61194 de *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al., 2002), celle du gène de la chitosanase de *Streptomyces* N174 (Fink et al., 1991) et celle du gène CAB71832 de *Streptomyces coelicolor*, codant pour une protéine régulatrice hypothétique de la famille ROK (Bentley et al., 2002). Les oligonucléotides utilisés sont décrits au tableau 3. Des PCR à gradient de température entre 45°C et 65°C (12 températures au total) sont effectuées pour déterminer la meilleure température d'appariement pour chaque paire d'amorces. Les PCR sont effectuées dans les conditions suivantes : 500 ng d'ADN génomique, 1 µl de tampon 10X (Taq DNA polymerase buffer, Amersham Biosciences), 10 pmol de chaque amorce, 0,2 mM de dNTP, 1 µl DMSO et 0,5 unité de l'ADN polymérase Taq (Amersham Biosciences) pour un volume total de 10 µl. Les mélanges réactionnels sont soumis au programme suivant dans le thermocycleur (Biometra^R, T-Gradient) : 1- 94°C, 4 min ; 2- 94°C, 1 min ; 2- gradient, 1 min ;

4- 72°C, 2 min (les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois) ; 5- 72°C, 10 min. Les PCR sont refaits dans un volume de 100 µl à la température optimale d'amplification spécifique pour chaque paire d'amorces (51,4°C pour SDE CNSCOP-1/SDE CSNCOP-2, 56,2°C pour SDE ROKCOE-1/SDE ROKCOE-2 et 60,9°C pour SDEN174-1 et SDEN174-2, tableau 3). Les fragments amplifiés sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose 2% dans un tampon TAE et purifiés par extraction sur gel d'agarose. Les fragments purifiés sont clonés dans le vecteur pCR2.1 (trousse TA cloning, Invitrogen life technologies, tableau 2) pour former les plasmide pCR2.1sdeCSNcoe, pCR2.1sdeROKcoe, pCR2.1sdeCSN174, tableau 2).

1.11 Essai d'empreinte à la DNase I de la protéine du complexe lent

1.11.1 Préparation de la sonde radioactive

1.11.1.1 Marquage radioactif de l'amorce par échange de phosphore avec la T4 polynucléotide kinase

Le protocole est similaire à celui de la section 1.8.2.1 mais comporte des différences importantes. Le marquage est effectué avec 5 µl de tampon One-Phor-All (USB), 60 pmol de l'amorce (B-106), 40 unités de T4 polynucléotide kinase (USB, 27-0736-01), 6 µl de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (3000 ci/mM, Perkin Elmer, BLU502H) et le volume est ajusté à 50 µl avec de l'eau. Le mélange est incubé 45 min à 37°C et est ensuite passé sur une colonne G-25 MicroSpinTM (Amersham Biosciences, 27-5325) pour enlever les nucléotides libres.

1.11.1.2 Amplification de la sonde par PCR

La région régulatrice du gène de la chitosanase est amplifiée selon les conditions suivantes : 0,75 ng d'ADN plasmidique (pBE106), 5 µl de tampon 10X (Taq DNA polymerase buffer, Amersham Biosciences), 0,2 mM de dNTP, 30 µl de l'amorce B-106 préparée à la section 1.11.1.1, 30 pmol de l'amorce A-106, 2,5 U de l'ADN polymérase Taq (Amersham Biosciences) et le volume est ajusté à 50 µl avec de l'eau. Le programme est effectué dans un thermocycleur (Biometra^R, T-Gradient) selon la programmation suivante : 1- 94 °C, 4 min; 2- 94 °C, 30 sec ; 3- 53 °C, 1 min ; 4- 72 °C, 2 min (étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois) ; 5- 72 °C, 10 min. L'ADN amplifié est purifié en utilisant la trousse de purification de produits PCR QIAquickTM (Qiagen). Un volume de 1 µl de l'ADN purifié est compté par scintillation et un autre µl est dosé sur un pétri d'agarose 1% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium en comparant l'intensité de fluorescence de l'ADN avec des standards. L'ADN purifié est ensuite dilué pour obtenir une activité spécifique entre 10 000 et 40 000 cpm/µl (1 à 2 ng/µl d'ADN).

1.11.2 Préparation et migration des échantillons

Chaque échantillon comprend 1-2 ng d'ADN marqué (entre 10 000 et 40 000 cpm, section 1.11.1.2), 500 ng de poly-dIdC (Roche Molecular Biochemicals), 33,3 µl de tampon A 3X (150 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 60 mM K₃PO₄ pH 7,4, 3 mM β-mercaptoéthanol, 60% glycérol), 0,4 µl de MgCl₂ 1M, 10 à 60 µg d'extrait protéique partiellement purifié avec l'hydroxyapatite (section 1.9.2). Le volume est ajusté à 100 µl avec de l'eau. Un témoin est fait en parallèle selon la même recette mais en omettant l'extrait protéique. Les échantillons sont incubés 20 min à la température de la pièce. Une quantité variant entre 0,5 à 5 ng de DNase (Amersham Biosciences, 27-0514-01) est ajoutée à chaque réaction et les échantillons sont incubés 90 sec à la température de la pièce (seulement 60 sec pour le témoin sans

protéine). La DNase est inactivée en ajoutant 3 µl d'EDTA 0,5 M et 100 µl de phénol/chloroforme. Les échantillons sont centrifugés 5 min et l'ADN du surnageant est précipité en ajoutant 5 µg de ARNt (Sigma, R9001), 10 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 300 µl d'éthanol 95% froid. Les échantillons sont déposés dans de la glace carbonique durant 15 min et sont ensuite centrifugés 15 min. Les culots sont séchés et la radioactivité incorporée est mesurée sans ajout de liquide de scintillation (effet Cerenkov). Les culots sont resuspendus à raison de 2000 cpm/µl dans de la formamide contenant 20 mM EDTA, pH 8,0). Les échantillons sont chauffés 3 minutes à 90°C et 6000 cpm/réaction sont déposés sur un gel de séquençage 10% polyacrylamide, 1X TBE, 4,6 M urée (Sequi-Gen, Bio Rad) en incluant 2 réactions de séquençage obtenues avec la trousse AutoRead (ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit, Amersham Biosciences) en utilisant l'amorce B-106 marquée à la section 1.11.1.1 et en utilisant la méthode d'appariement rapide avec de l'ADN double brin. L'électrophorèse est menée jusqu'à ce que le bleu de bromophénol (mis dans un puits sans réaction) soit à 10 cm au bas du gel. Le gel est ensuite, séché et exposé soit sur un écran phosphorescent et/ou sur un film Kodak Biomax MR (Amersham Biosciences, 871 5187).

1.12 Construction d'un système rapporteur dans *E. coli* pour cloner un activateur de transcription du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106

Les protocoles reliés à la biologie moléculaire avec les différentes souches d'*E. coli* tels la production de cellules compétentes, la ligation de fragments d'ADN, la transformation et l'extraction d'ADN plasmidique ont suivi les procédures standards selon Sambrook et Russell (2001). Les enzymes de restriction ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs (New England BioLabs et Amersham Biosciences). Les extractions d'ADN de gels d'agarose ont été faites en utilisant la trousse d'extraction Qiaex II (Qiagen) pour les fragments de tailles supérieures à 200 pb et la trousse d'extraction QIAquick (Qiagen) pour les fragments de tailles inférieures à 200 pb.

1.12.1 Clonage de la séquence régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 dans le vecteur pCR2.1

Les amorces IR1-106 et IR2-106 (tableau 3) ont été utilisées pour amplifier la région régulatrice du gène de la chitosanase (référée à BE pour Binding Element dans l'identification des plasmides) dans les conditions suivantes : 1,5 µg d'ADN plasmidique (pCSN106-2, tableau 2), 10 µl de tampon 10X (Taq DNA polymerase buffer, Amersham Biosciences), 0,2 mM de dNTP, 80 pmol de chaque oligonucléotide, 5 U de l'ADN polymérase Taq et le volume est ajusté à 100 µl avec de l'eau. Le mélange réactionnel est soumis à la programmation suivante : 1- 94 °C, 4 min ; 2- 94 °C, 30 sec ; 3- 60 °C, 45 sec ; 4- 72 °C, 60 sec (étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois) ; 5- 72 °C, 10 min. L'échantillon est soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose 2% dans un tampon TAE et le fragment de 102 pb est purifié par extraction du gel. L'ADN purifié est quantifié en prélevant 1 µl et en le plaçant sur pétri d'agarose 1% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium par comparaison de l'intensité de fluorescence avec des standards. L'ADN purifié est soumis à une ligation avec le vecteur pCR2.1 (trousse TA cloning, Invitrogen life technologies) suivie d'une transformation dans la souche compétente JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15]*). La présence de l'insert est vérifiée par digestions enzymatiques des ADN plasmidiques avec *HindIII* et *XbaI* et l'orientation est déterminée par digestion avec *NarI*. Ce clonage a produit les plasmides pCR2.1BE106-sens et pCR2.1BE106-antisens (tableau 2).

1.12.2 Clonage de la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 en amont du gène de résistance au chloramphénicol

La région régulatrice du gène de la chitosanase présente dans le vecteur pCR2.1BE106-antisens est isolée du vecteur par digestion avec les enzymes *XhoI* et *HindIII*. Le fragment

de 199 pb est purifié par extraction sur gel d'agarose et ligué avec le vecteur pKK232-8 (Brosius et Lupski, 1987, tableau 2) préalablement digéré avec les enzymes *SalI* et *HindIII* et purifié par électrophorèse sur gel d'agarose et extraction. Le produit de ligation est transformé dans les cellules compétentes JM109 et la présence de l'insert est confirmée par deux digestions doubles avec les enzymes *BstHI-NdeI* et *NarI-NcoI*. Cette construction a produit le vecteur pKKBE106 (tableau 2).

1.12.3 Clonage du système rapporteur dans le vecteur à faible nombre de copies pOK12

Le fragment contenant la région régulatrice du gène de la chitosanase avec le gène de résistance au chloramphénicol (Cm^r) est isolé du vecteur pKKBE106 par digestion avec les enzymes *NdeI* et *BspHI*. Le fragment de 3169 pb est purifié par une électrophorèse dans un gel d'agarose et par extraction et est ligué avec le vecteur pOK12 (Vierira, 1991, tableau 2) qui est préalablement digéré avec les enzymes *NdeI* et *NcoI* et purifié par électrophorèse dans un gel d'agarose et par extraction. Le produit de ligation est transformé dans les cellules compétentes JM109 et la présence de l'insert est confirmée par digestions avec les enzymes *XhoI-XbaI* où avec *BamHI*. Cette construction a produit le vecteur pOKKKBE106 (tableau 2). Des cellules compétentes *E. coli* comportant l'ADN pOKKKBE106 sont faites afin d'y transformer la banque génomique de *Nocardioides* sp. N106 (section 1.12.5).

1.12.4 Détermination du taux de résistance envers le chloramphénicol de la souche *E. coli* portant l'ADN plasmidique pOKKKBE106

Deux cultures de 25 ml de LB (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl) sont inoculées, respectivement, avec la souche portant le plasmide pOKKKBE106 (50 µg/ml kanamycine) et une souche témoin portant le plasmide pKK232-8 (100 µg/ml d'ampicilline).

Ces cultures sont incubées toute la nuit avec agitation à 37°C. Les cultures sont rajeunies dans 25 ml de LB par une dilution 1/50 et incubées avec agitation à 37°C afin d'atteindre une densité optique (D.O.) à 550 nm de 0,6. La culture la plus dense est diluée afin d'obtenir exactement la même D.O. que l'autre culture. Une série de dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} est effectuée avec les cultures et 5 µl des dilutions sont déposés sur différents pétris LBA (avec leur antibiotique de sélection respectif) comportant des concentrations variables de chloramphénicol (0 µg/ml, 10µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml). Les pétris sont incubés toute la nuit à 37°C. La concentration minimale de chloramphénicol qui provoque une inhibition totale de croissance représentera celle qui sera ajoutée lors de la sélection de la banque génomique de N106 (section 1.12.5).

1.12.5 Essai de construction d'une banque génomique de *Nocardioides* sp. N106 dans *E. coli*

L'ADN génomique de *Nocardioides* sp. N106 est extrait par la méthode Kirby selon le protocole suggéré par Kieser et al. (2000). Une quantité de 25 µg d'ADN est digérée de façon partielle avec 0,5 U de *Nla*III. Les fragments de 7000 pb à 12 000 pb sont purifiés suite à une électrophorèse sur gel 0,8% agarose dans un tampon TAE en utilisant la trousse d'extraction QIAquick (Qiagen). Les fragments purifiés sont ligués toute la nuit à 16°C avec le vecteur pUC19 (Sambrook et Russell, 2001) préalablement digéré avec *Sph*I et déphosphorylé 30 min à 37°C avec 0,1 unités de phosphatase alcaline (Amersham Biosciences 27-0620-01). La phosphatase alcaline est inactivée par l'ajout de 5 µl d'EDTA 0,5 M et en chauffant 15 min à 75°C. L'ADN est purifié par électrophorèse sur gel 0,8% agarose dans un tampon TAE et suivis d'une extraction sur gel. Le produit de ligation est transformé dans les cellules compétentes portant le plasmide pOKKKBE106. Les transformants sont étalés sur des pétris LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 50 µg/ml de kanamycine pour ensuite les incubés toute la nuit à 37°C (le chloramphénicol n'est pas encore ajouté afin de pouvoir déterminer la quantité de clones obtenus). On vise l'obtention

d'une banque comportant environ 10 000 clones. Les colonies sont ensuite récoltées dans un petit volume de LB pour être ensuite étalées sur les pétris LBA contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 50 µg/ml de kanamycine, 15 µg/ml de chloramphénicol (établis expérimentalement à la section 1.12.4) et de l'IPTG (40 µl/pétri d'une solution de 100 mM stérilisée par filtration).

CHAPITRE 2

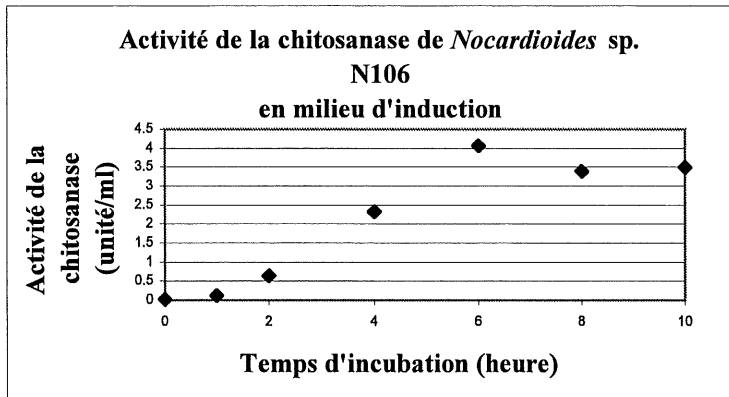
RÉSULTATS

2.1 Essais d'induction d'une chitosanase chez *Streptomyces coelicolor*

Plusieurs variantes du milieu de culture MG base ont été essayées afin d'induire une chitosanase chez *S. coelicolor* (tableau 1, chapitre 1). Le chitosane était broyé afin de favoriser le contact des particules de chitosane avec les cellules bactériennes. Les mesures de l'activité de la chitosanase étaient prises à tous les jours pour une durée totale de 5 jours. Afin de favoriser l'utilisation éventuelle du chitosane par *S. coelicolor*, la concentration du maltose qui était de 50 mg/ml a été réduite à 10 mg/ml, à 1 mg/ml et à 0 mg/ml. La réduction des sucres a seulement causé un ralentissement de la croissance bactérienne, suggérant que *S. coelicolor* n'utilisait pas le chitosane pour sa croissance. Le glutamate de sodium (source d'azote du milieu MG base) a aussi été enlevé afin de favoriser l'utilisation du chitosane comme source d'azote et de carbone. Différents additifs comme le mannitol, le sorbitol, le malt extract et l'amidon ont été essayés afin de favoriser le changement de métabolisme de *S. coelicolor* vers l'utilisation du chitosane. Certains sucres comme le sorbitol ne provoquent pas de répression catabolique (Lopez, 1977) qui pourrait empêcher l'expression de chitosanase. Le chitosane a été substitué par de la glucosamine, qui a la capacité d'induire la chitosanase de la souche N106 (résultats non publiés). Aucun milieu n'a permis de détecter la moindre activité d'une chitosanase chez *S. coelicolor*. Ce modèle a donc été abandonné afin de reprendre celui de *Nocardioides* sp. N106 qui exprime fortement une chitosanase.

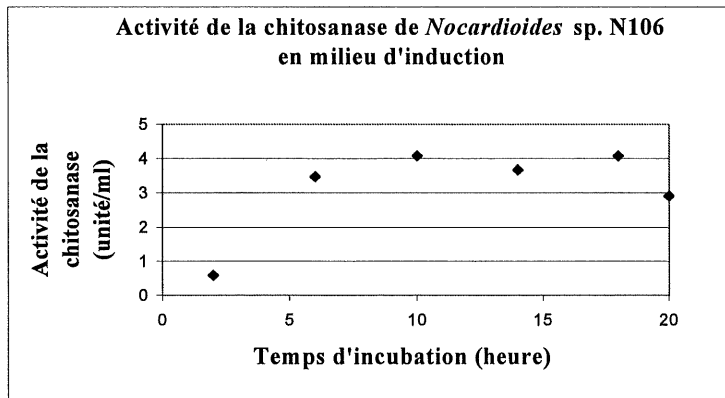
2.2 Progression de l'activité de la chitosanase chez *Nocardioides* sp. N106 dans le milieu d'induction

La figure 1 montre la progression de l'expression de la chitosanase dans le milieu d'induction qui est composé d'un hydrolysate de chitosane de poids moléculaire moyen de 2000 g/mol. Après l'ajout de la biomasse bactérienne de *Nocardioides* sp. N106 dans le milieu d'induction, l'activité de la chitosanase est détectée de façon significative dès la deuxième heure, et son augmentation se poursuit jusqu'à la sixième heure pour ensuite se stabiliser. Le temps d'incubation pour atteindre le maximum d'activité peut varier comme le montre l'essai de la figure 2, où dans ce cas, le maximum d'activité était atteint autour de 10 heures d'incubation. Cette même figure montre que l'activité de la chitosanase dans le milieu d'induction persiste durant plusieurs heures, même après 20 heures d'incubation (figure 2). Il semble y avoir une baisse significative de l'activité après 20 heures d'incubation. La valeur maximale d'activité atteinte dans le milieu d'induction est similaire avec celle atteinte avec le premier milieu développé qui était à base de chitosane de haut poids moléculaire (Fink et al., 1991). Par contre, le temps d'incubation est plus long dans le milieu à base de chitosane de haut poids moléculaires (30 heures). De plus, le chitosane hydrolysé est soluble dans le milieu et permet donc d'éviter une étape de séparation entre le chitosane et le mycélium bactérien au moment de la récupération de la biomasse bactérienne pour études ultérieures.



L'activité de la chitosanase a été mesurée dans le surnageant de culture à différents temps d'incubation dans le milieu d'induction (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h). Des prélèvements de cellules pour l'extraction des protéines cytoplasmiques ont été faits en parallèle pour être testés par la méthode de gels à retardement (voir figure 3).

Figure 1. Progression de l'activité de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106 dans le milieu d'induction durant 10 heures d'incubation.



L'activité de la chitosanase a été mesurée dans le surnageant de culture, à différents temps d'incubation dans le milieu d'induction (2h, 6h, 10h, 14h, 18h, 20h). Des prélèvements de cellules pour l'extraction des protéines cytoplasmiques ont été faits en parallèle pour être testés par la méthode de gels à retardement (voir figure 4).

Figure 2. Progression de l'activité de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106 dans le milieu d'induction durant 20 heures d'incubation.

2.3 Détection par gels à retardement de protéines qui se lient à la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106

Deux séries d'extraits protéiques cytoplasmiques ont été faits à partir des mêmes cultures et des mêmes temps d'incubation utilisés lors des mesures de l'activité de la chitosanase des figures 1 et 2. Les extraits ont été examinés par la méthode de gels à retardement afin de détecter la présence de protéines qui s'attachent à la séquence régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106. Le gel à retardement de la figure 3 montre la présence de deux complexes qui migrent à des distances différentes dans le gel (pointés par des flèches). Le complexe qui migre le plus lentement (complexe lent) est présent dans l'extrait provenant de la préculture en TSB et diminue à la deuxième heure (durant l'augmentation de l'activité de la chitosanase, figure 1) pour ensuite augmenter légèrement à nouveau à partir de la 6^e heure (figure 3). La réapparition de ce complexe coïncide avec la fin de l'augmentation de l'activité de la chitosanase (figure 1). Les extraits de la figure 4 ont été préparés sur une période de 20 heures et montrent que la protéine du complexe lent est fortement exprimée à partir de la 18^e heure. À ces mêmes heures, on peut noter une baisse de l'activité de la chitosanase (figure 2). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que ce complexe implique un répresseur. La meilleure analyse pour appuyer cette hypothèse est la détection même de l'ARNm de la chitosanase car il est possible que la baisse de l'activité de la chitosanase observée soit causée par l'instabilité de la protéine avec le temps dans le milieu de culture. Un échantillon d'ARN extrait après 20h d'incubation a été testé et ne montrait pas la présence d'ARNm de chitosanase (section 2.4).

Le complexe qui migre plus rapidement (complexe rapide) apparaît à partir de la 4^e heure (durant l'augmentation de l'activité de la chitosanase, figure 1) et persiste au moins jusqu'à la 10^e heure (figure 3). Il est donc possible que ce complexe implique un activateur de transcription.

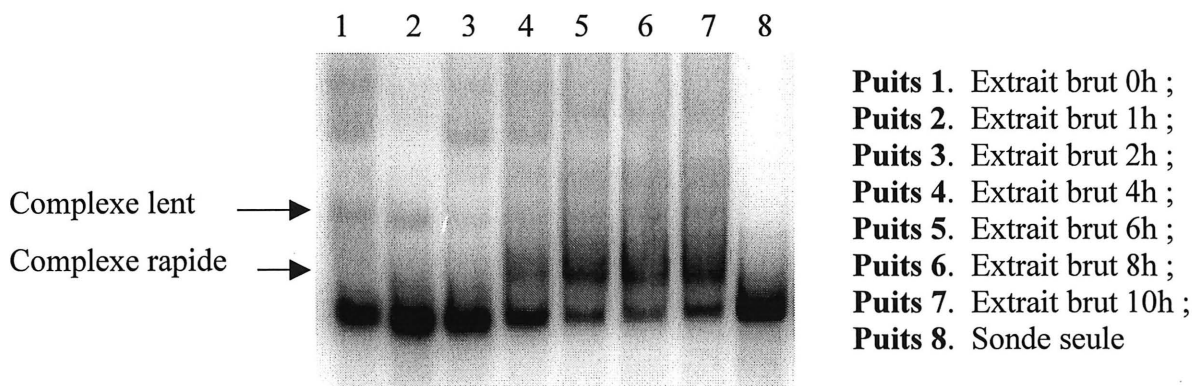


Figure 3. Détection par gel à retardement de protéines qui se lient à la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 durant 10h d'incubation dans le milieu d'induction (gel effectué sans ADNs compétiteurs).

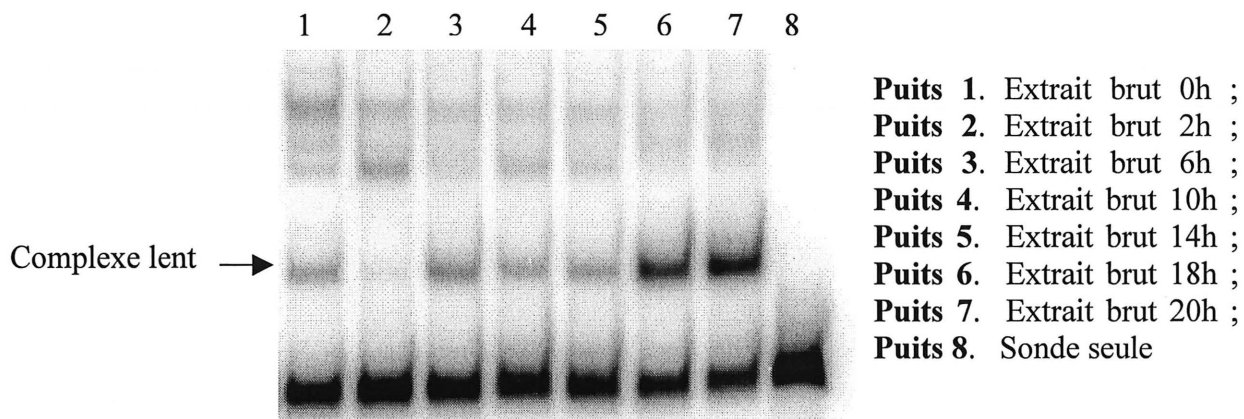
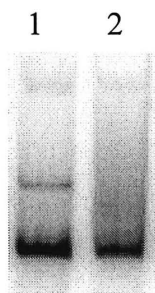


Figure 4. Détection par gel à retardement d'une protéine qui se lie à la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 durant 20h d'incubation dans le milieu d'induction (Chaque puits contient de l'ADN compétiteur spécifique au complexe rapide).

Plusieurs essais de réactions pour le gel à retardement ont été effectués afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales et de vérifier la spécificité des retardements observés. Les paramètres vérifiés sont la concentration de KCl (50 mM et 150 mM) dans la réaction d'attachement des protéines sur l'ADN, le pH du tampon pour l'attachement (7,5, 7,9, 8,5), la quantité de protéines (4,5 µg et 6,0 µg), le temps d'incubation pour l'attachement (15 min et 30 min) et la température d'incubation pour l'attachement (20°C et 30°C). Le seul paramètre qui donne des différences dans les retardements observés est la concentration de KCl. En effet, à 50 mM de KCl, il n'est pas possible d'observer le complexe lent, il apparaît seulement à une concentration de 150 mM (figure 5). Le complexe rapide n'est pas affecté par l'une ou l'autre des concentrations utilisées. De plus, l'ajout d'ATP 10 mM n'affecte aucun des complexes. Donc les conditions d'attachement pour effectuer un gel à retardement sont une concentration de 150 mM dans un tampon d'attachement de pH 7,9, une quantité de 4,5 µg de protéines et le tout est incubé 15 min à la température de la pièce. La spécificité des complexes a été vérifiée par l'ajout de 400 ng de poly-dIdC, qui représente un excès de 400 fois par rapport à la quantité de sonde radioactive. Cette quantité n'affecte pas les retardements tandis que 100 ng d'ADN spécifique fait disparaître les complexes. L'ajout de chitosane dans des réactions d'attachement sans protéines ne provoque pas l'apparition de retardement, donc les retardements observés impliquent bien des protéines.



Puits 1. Attachement du complexe lent avec 150 mM de KCl ; **Puits 2.** Attachement du complexe lent avec 50 mM KCl

Figure 5. Essais d'attachement du complexe lent lors d'un gel à retardement avec 150 mM KCl et 50 mM KCl.

2.4 Détermination du site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106

L'ARN total a été extrait à partir de cultures de *Nocardioides* sp. N106 incubées dans le milieu d'induction durant 10 et 20 heures. Ces extraits ont donc été obtenus aux temps où l'on observe les différentes protéines qui s'attachent à la région régulatrice du gène de la chitosanase de N106. Après avoir effectué une élongation d'amorce sur les extraits d'ARN, l'ARNm de la chitosanase a été détecté dans la culture incubée pendant 10 heures mais pas dans la culture incubée pendant 20 heures (figure 6, puits 5 et 6). Ceci apporte un autre argument suggérant que le complexe rapide observé à 10 heures d'incubation est un activateur et que le complexe lent observé à 20 heures est un répresseur. Afin de renforcer les hypothèses émises concernant le comportement des deux protéines régulatrices, il aurait été pertinent d'effectuer l'analyse d'échantillons d'ARN extraits à des temps plus serrés d'incubation entre 0 et 20h. Cependant, la dégradation rapide de l'ARN rend difficile l'obtention d'échantillons d'ARN de qualité pour l'analyse.

La réaction de séquençage faite en parallèle permet de déterminer le site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase. Il est situé à la 5^e base (adénine) de la séquence répétée/inversée (figure 7). Il est donc possible à partir de ce résultat de déterminer les séquences promotrices -35 et -10 (TTGCGC et TTCAAT). Ces séquences avaient déjà été proposées lors de l'analyse de la séquence régulatrice (Masson et al., 1995) par l'observation de certaines similitudes avec les séquences consensus de *E. coli* (TTGACA et TATAAT).

2.5 Détermination des régions d'attachement des protéines des complexes lent et rapide sur la région régulatrice du gène de la chitosanase chez *Nocardioides* sp. N106 par des compétitions lors d'un gel à retardement

Des compétitions lors d'un gel à retardement avec de petits fragments d'ADN recouvrant différentes portions de la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106 ont permis la localisation à faible résolution des sites d'attachement des deux protéines. La figure 8 montre les régions que recouvrent les différents fragments compétiteurs utilisés et les oligonucléodites utilisés pour créer ces fragments sont décrits au tableau 3 (IR1-106, IR2-106, SB1-106, SB2-106, A2-106, A3-106, A4-106, B2-106 et B3-106). Lorsqu'ils sont ajoutés lors du test d'interaction qui précède l'analyse par gel à retardement, ils sont en compétition avec la sonde radioactive qui contient les deux sites d'attachement. S'ils sont en excès par rapport à la sonde, les protéines vont donc s'attacher aux fragments froids et non à la sonde chaude. Il va donc y avoir disparition du signal par comparaison à un retardement sans compétiteurs.

Deux séries de compétitions ont été effectuées. Dans un premier cas, l'extrait provient d'une culture induite durant 10 heures où l'on observe le complexe rapide (puits 1 à 6, figure 9). La seconde série implique l'extrait d'une culture induite durant 20 heures où l'on observe le complexe lent (puits 7 à 12, figure 9). Les puits 1 et 7 ne contiennent pas de compétiteurs. Les deux complexes disparaissent lorsque que le fragment complet froid est ajouté (IR1-106/IR2-106, puits 2 et 8), ce qui témoigne de l'efficacité de la compétition. Le faible signal du complexe lent observé au puits 8 est probablement causé par une quantité insuffisante de compétiteurs. Le complexe rapide disparaît et le lent n'est pas affecté lorsque les fragments contenant la séquence répétée/inversée sont ajoutés (puits 3, 4, 9 et 10). L'inverse est observé avec les fragments contenant la région en amont de la séquence répétée/inversée. Ils

n'affectent pas le complexe rapide mais provoquent la disparition du complexe lent (puits 5, 6, 11 et 12). À partir de ces résultats, il est possible d'affirmer que la protéine du complexe

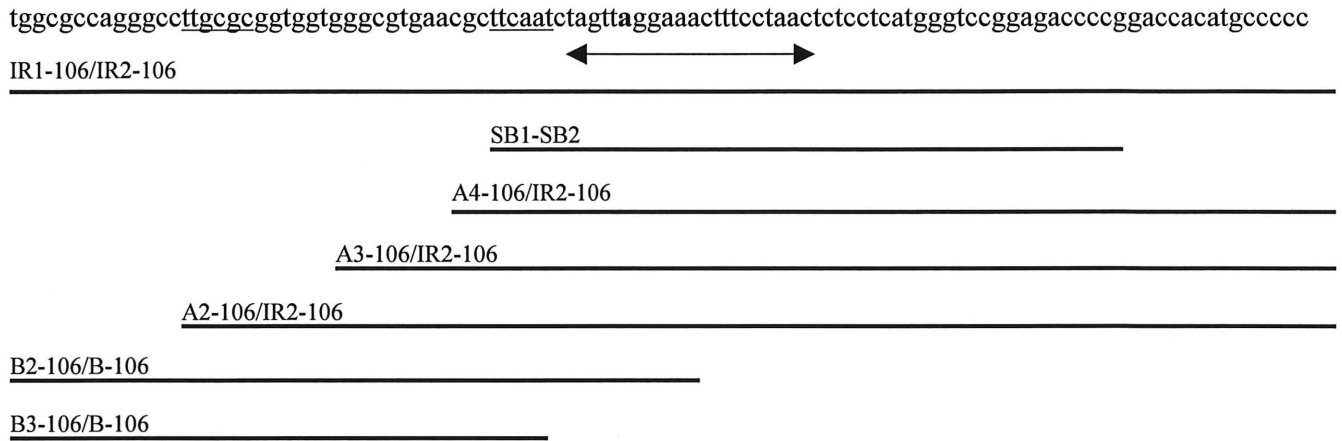


Figure 8. Séquence de recouvrement des ADNs compétiteurs. Ces fragments d'ADN ont été utilisés pour déterminer la localisation (à faible résolution) des sites d'attachement sur l'ADN des protéines qui lient la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106.

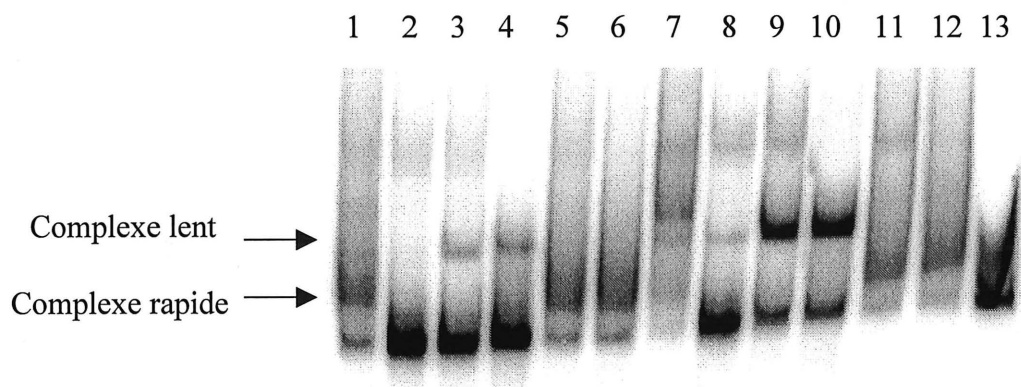


Figure 9. Compétition lors d'un gel à retardement avec des fragments d'ADN recouvrant différentes portions de la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106.

Puits 1. Extrait brut 10h ; **Puits 2.** Extrait brut 10h avec le fragment IR1-106/IR2-106 ; **Puits 3.** Extrait brut 10h avec le fragment A4-106/IR2-106 ; **Puits 4.** Extrait brut 10h avec le fragment SB1-SB2 ; **Puits 5.** Extrait brut 10h avec le fragment B2-106/B-106 ; **Puits 6.** Extrait brut 10h avec le fragment B3-106/B-106 ; **Puits 7.** Extrait brut 20h ; **Puits 8.** Extrait brut 20h avec le fragment IR1-106/IR2-106 ; **Puits 9.** Extrait brut 20h avec le fragment A4-106/IR2-106 ; **Puits 10.** Extrait brut 20h avec le fragments SB1-SB2 ; **Puits 11.** Extrait brut 20h avec le fragment B2-106/B-106 ; **Puits 12.** Extrait brut 20h avec le fragment B3-106/B-106 ; **Puits 13.** Témoin sans protéine.

rapide s'attache à la séquence répétée/inversée et que la protéine du complexe lent s'attache à une séquence située en amont du site d'initiation à la transcription. On peut observer la présence des deux complexes dans chacun des deux extraits utilisés lors des compétitions (10h et 20h). Lorsqu'un complexe est affecté par une compétition, l'autre apparaît car il n'est pas affecté par le compétiteur ajouté (puits 3 à 6 et 9 à 12). L'extrait de 20 heures a été choisi pour les tests de compétition par la grande quantité du complexe lent qu'il renferme par rapport à l'extrait de 10h.

D'autres séries de compétitions lors d'un gel à retardement ont permis de préciser la région d'attachement de la protéine du complexe lent. Les fragments IR1-106/IR2-106 et A2-106/IR2-106 provoquent la disparition du complexe lent (figure 10, puits 2 et 3). Donc ces fragments permettent l'attachement de la protéine. Par contre, les fragments A3-106/IR2-106 et A4-106/IR2-106 ne provoquent pas la disparition du complexe lent (figure 10, puits 4 et 5). Ces fragments ne contiennent pas la séquence nécessaire à l'attachement de la protéine. Tous les fragments utilisés dans cette expérience entrent en compétition avec le complexe rapide car ils contiennent tous la séquence répétée/inversée (figure 10 puits 7 à 10).

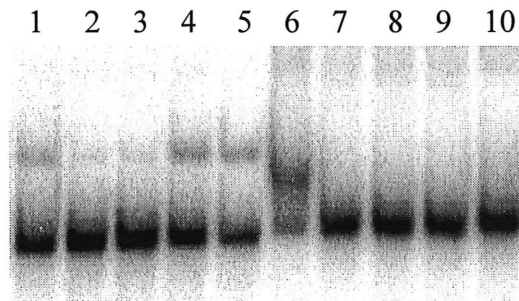


Figure 10. Compétitions lors d'un gel à retardement afin de préciser la région d'attachement de la protéine du complexe lent sur la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106.

Puits 1. Extrait brut 20h ; **Puits 2.** Extrait brut avec fragment IR1-106/IR2-106. **Puits 3.** Extrait brut avec fragment A2-106/IR2106 ; **Puits 4.** Extrait brut avec fragment A3-106/IR2106 ; **Puits 5.** Extrait brut avec fragment A4-106/IR2106 ; **Puits 6.** Extrait brut 10 h ; **Puits 7.** Extrait brut 10h avec fragment IR1-106/IR2-106 ; **Puits 8.** Extrait brut 10h avec fragment A2-106/IR2106 ; **Puits 9.** Extrait brut 10h avec fragment A3-106/IR2106 ; **Puits 10.** Extrait brut 10h avec fragment A4-106/IR2106

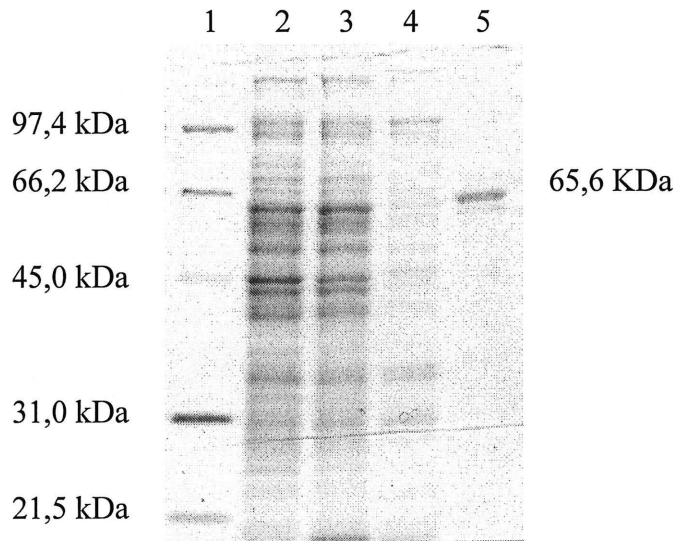
2.6 Empreinte à la DNase I des protéines des complexes rapide et lent sur la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106

L'empreinte à la DNase de la protéine du complexe lent n'a pas encore été obtenue. Les patrons de digestions ne montraient pas de protection avec l'utilisation d'extraits protéiques partiellement purifiés. Le tampon utilisé pour l'attachement pourrait être optimisé en augmentant la concentration de KCl afin d'obtenir une concentration de 150 mM lors de l'attachement (présentement 50 mM). Lors de gel à retardement, il a été démontré que la protéine du complexe lent s'attache à l'ADN de façon optimale à 150 mM (figure 5). De plus, la quantité de DNase ajoutée pourrait être supérieure à 2 ng car avec cette quantité l'ADN n'était pas suffisamment digéré.

Il est à noter qu'une empreinte à la DNase I de la protéine du complexe rapide a été obtenue par Jean-Yves Masson en 1995 (annexe 1, communication personnelle écrite). L'extrait cellulaire brut utilisé provenait d'une culture induite dans un milieu minimal à base de glucosamine (Boucher et al., 1995). L'expérience démontre clairement une protection sur la région contenant la séquence répétée/inversée. Il est fort probable que la protection observée provient de la même protéine que celle du complexe rapide obtenue avec le milieu d'induction à base de chitosane hydrolysé.

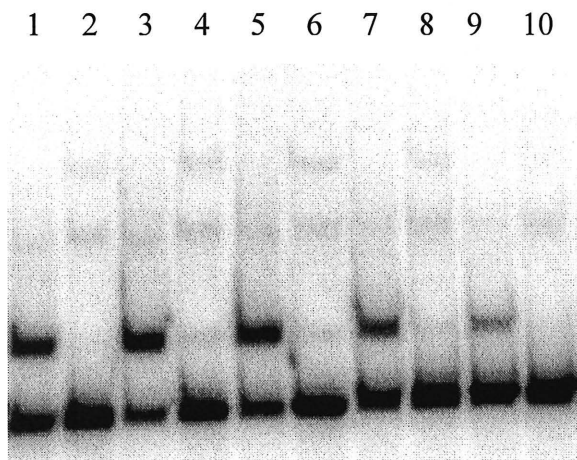
2.7 Purification de la protéine du complexe lent de *Nocardioides* sp. N106

Les extraits cellulaires bruts de départ proviennent d'une culture induite durant 20 heures dans le milieu d'induction où on retrouve en grande quantité la protéine du complexe lent. La première étape consiste à faire une purification au sulfate d'ammonium entre 25% et 50% de saturation. Bien que le taux de purification soit faible (puits 3, figure 11), cette étape permet d'obtenir l'échantillon protéique dans le tampon approprié pour la chromatographie sur hydroxyapatite (tampon phosphate 1mM, pH 6,8). Le lavage de la résine avec le tampon phosphate de 145 mM permet de décrocher une grande quantité de protéines indésirables soit près de 90%. Les fractions contenant les protéines éluées de la colonne d'hydroxyapatite avec le tampon phosphate 270 mM, sont traitées avec les billes magnétiques. Les billes magnétiques sont liées à la séquence d'attachement de la protéine du complexe lent à l'ADN. Comme le montre la figure 12, cette étape est très spécifique. On observe bien la disparition du complexe lent après le traitement avec les billes. Il est donc permis de croire que la bande principale obtenue sur gel SDS-PAGE (puits 5, figure 11), dont le poids moléculaire est estimé à 65,6 kDa, correspond au régulateur transcriptionnel que nous voulions purifier. Sur le gel SDS-PAGE, on peut cependant remarquer la présence d'autres bandes très faibles. Il est possible qu'un lavage préalable des billes avec une concentration plus élevée de poly-dIdC puisse permettre de décrocher une quantité plus grande de ces protéines qui s'attachent de façon non spécifique à l'ADN des billes.



Puits 1. Marqueur de poids moléculaires ; **Puits 2.** Extrait brut 20h (10 µg) ; **Puits 3.** Échantillon après une précipitation au sulfate d'ammonium 25-50% (10 µg) ; **Puits 4.** Échantillon après le passage dans une colonne d'hydroxyapatite (4 µg) ; **Puits 5.** Échantillon après élution des billes

Figure 11. Purification de la protéine du complexe lent de *Nocardioides* sp. N106.



Puits 1, 3, 5, 7, 9. Fractions éluées de l'hydroxyapatite;
Puits 2, 4, 6, 8, 10. Fractions éluées de l'hydroxyapatite et traitées avec les billes magnétiques.

Figure 12. Absorption de la protéine du complexe lent sur les billes magnétiques.

2.8 Compétitions lors d'un gel à retardement des complexes lent et rapide avec différentes régions régulatrices : CAB61194 et CAB71832 de *S. coelicolor* et celle du gène de la chitosanase de *Streptomyces* sp. N174

La séquence répétée/inversée présente dans la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106 est aussi présente dans la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Streptomyces* sp. N174, dans la région régulatrice d'un gène codant pour une chitosanase hypothétique chez *Streptomyces coelicolor* (CAB61194) et dans la région régulatrice d'un autre gène codant pour une protéine régulatrice hypothétique de *Streptomyces coelicolor* (CAB71832). Les régions régulatrices de ces gènes ont été amplifiées par PCR et ajoutées aux mélanges réactionnels lors d'un gel à retardement. La figure 13 montre clairement que tous les ADNs ajoutés entrent en compétition avec la sonde radioactive dans les extraits où la protéine du complexe rapide est présente. Cependant aucun ADN n'entre en compétition avec la sonde dans les extraits où la protéine du complexe lent est présente. Il est donc possible que la protéine du complexe rapide qui cible la séquence répétée/inversée soit aussi présente chez *Streptomyces* sp. N174 et *Streptomyces coelicolor*.

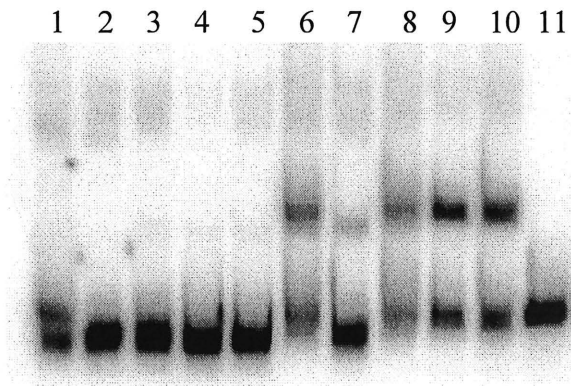


Figure 13. Compétitions lors d'un gel à retardement sur les complexes lent et rapide avec différentes régions régulatrices : CAB61194 et CAB71832 de *Streptomyces coelicolor* et celle du gène de la chitosanase de *Streptomyces* sp. N174.

Puits 1. Extrait brut 10h d'incubation ; **Puits 2.** Extrait brut 10h d'incubation avec amplification IR1-106/IR2-106 ; **Puits 3.** Extrait brut 10h d'incubation avec amplification SDE N174-1/ SDE N174-2 ; **Puits 4.** Extrait brut 10h d'incubation avec amplification SDE CNSCOP-1/ SDE CNSCOP-2 ; **Puits 5.** Extrait brut 10h d'incubation avec amplification SDE ROKCOE-1/ SDE ROKCOE-2 ; **Puits 6.** Extrait brut 20h d'incubation ; **Puits 7.** Extrait brut 20h d'incubation avec amplification IR1-106/IR2-106 ; **Puits 8.** Extrait brut 20h d'incubation avec amplification SDE N174-1/ SDE N174-2 ; **Puits 9.** Extrait brut 20h d'incubation avec amplification SDE CNSCOP-1/ SDE CNSCOP-2 ; **Puits 10.** Extrait brut 20h d'incubation avec amplification SDE ROKCOE-1/ SDE ROKCOE-2 ; **Puits 11.** Témoin sans protéine.

2.9 Construction d'un système de gène rapporteur chez *E. coli* de l'activateur de transcription de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106

Afin de cibler directement le gène de l'activateur potentiel du gène de la chitosanase chez *Nocardioides* sp. N106, un système de gène rapporteur a été construit dans *E. coli*. La région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106 a été clonée devant le gène rapporteur de résistance au chloramphénicol (figure 14). La construction du système a demandé plusieurs sous-clonages mais les difficultés ont été rencontrées lors de la construction de la banque génomique de N106. La banque n'a pas été obtenue et par conséquent, il n'a pas été possible de cribler un clone possédant le gène de l'activateur de transcription du gène de la chitosanase de N106. Le criblage était basé sur le principe que l'activateur du gène de la chitosanase qui serait présent dans un clone de la banque génomique viendrait provoquer la transcription du gène de résistance au chloramphénicol par l'entremise de la région régulatrice du gène de la chitosanase et conférer à la souche hôte une résistance au chloramphénicol (figure 15). Le test de toxicité de la souche de *E. coli* comportant le système de gène rapporteur a révélé que cette souche est très faiblement résistante et donc la présence de l'activateur pourrait permettre une plus grande résistance de la souche hôte. Une quantité de 15 µg/ml de chloramphénicol pourrait être ajoutée lors du criblage de l'activateur.

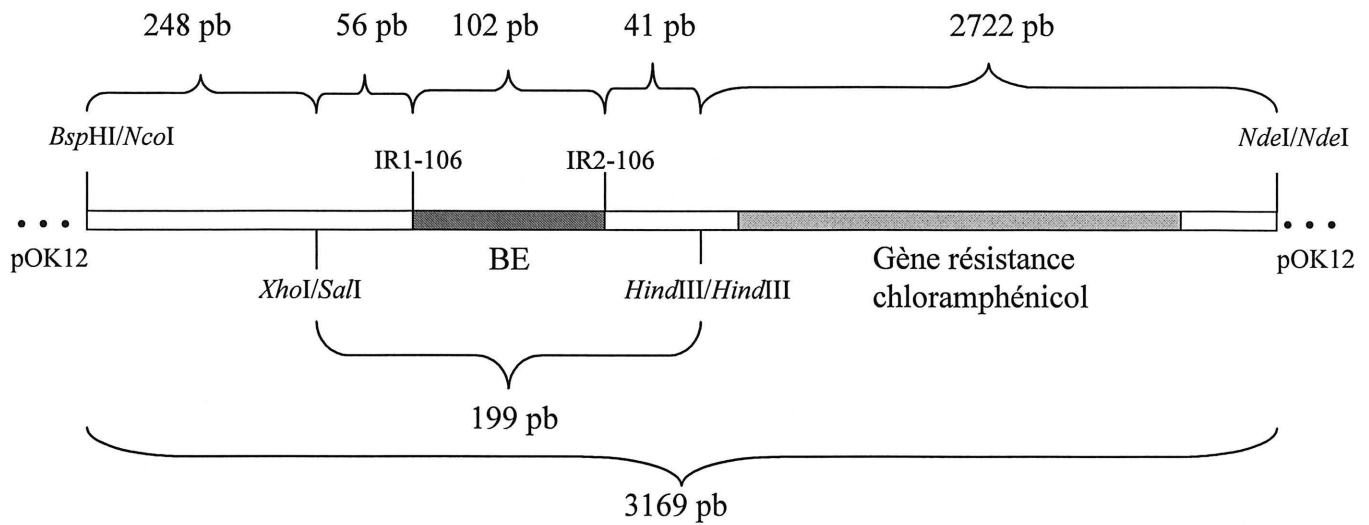


Figure 14. Carte de restriction de la cassette d'expression du système de gène rapporteur dans pOKKKBE106.

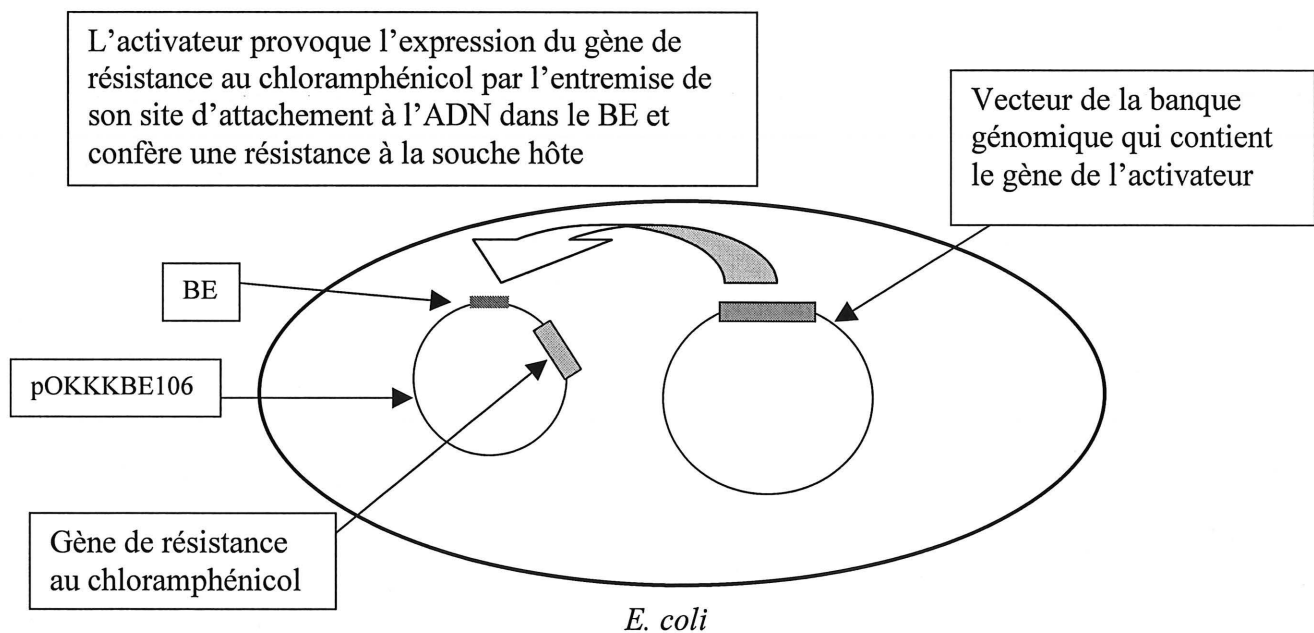


Figure 15. Principe du criblage phénotypique du gène de l'activateur du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 dans *E. coli*.

DISCUSSION

L'élaboration d'un système d'expression de protéines nécessite des études préliminaires qui permettent l'obtention et l'optimisation des composantes. La production d'une protéine peut être influencée par le nombre de copies du gène, par l'efficacité de la transcription, par l'efficacité de la traduction, par les peptides signaux utilisés et par le système de sécrétion de la souche hôte. Dans les systèmes développés chez les actinomycètes, peu sont basés sur l'induction. Tremblay et al. (2002) rapportent l'utilisation d'un système d'expression inductible par le xylose. Le vecteur développé résulte de nombreux travaux qui ont permis de cibler les meilleures composantes pour l'élaboration de ce système d'expression puissant. Il inclut, en autres, le promoteur inductible de la xylanase A, le peptide signal de la cellulase A et deux codons d'initiation à la traduction précédés d'une séquence Shine-Dalgarno. Un système inductible permet d'exprimer la protéine au moment désiré et est donc avantageux pour des gènes dont le produit est toxique pour la cellule.

Les composantes de base nécessaires à la construction d'un système d'induction sont un régulateur de transcription, le site d'attachement du régulateur sur l'ADN et un inducteur qui provoque soit le détachement (répresseur) soit l'attachement (activateur) du régulateur. Ces éléments sont obtenus à partir de systèmes naturels qui ont fait l'objet de différentes études. Les travaux présentés dans ce mémoire rapportent l'étude du système de régulation du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 dans le but d'obtenir les composantes de base à la construction d'un système d'expression inductible par le chitosane. Les premiers arguments de base qui ont permis d'émettre l'hypothèse que la chitosanase de N106 était régulée, étaient la présence d'une séquence répétée/inversée de 20 pb (AGTTAGGAAACTTTCCTAACT) dans la région régulatrice du gène de la chitosanase et par l'observation que la chitosanase est exprimée seulement en présence de chitosane. Les objectifs premiers étaient de démontrer l'implication de protéines régulatrices dans le

système d'expression de la chitosanase et d'en étudier les caractéristiques comme le site d'initiation de la transcription et les régions d'attachement des protéines sur l'ADN et de proposer un modèle sur le mode de régulation du gène de la chitosanase. À partir de ces résultats, il sera possible d'élaborer des stratégies pour obtenir le gène d'un régulateur et de construire le système d'expression avec les bonnes composantes.

Afin d'étudier la régulation du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106, un milieu d'induction a été développé. L'ancien milieu d'induction était à base de chitosane de haut poids moléculaire (Fink et al., 1991) et nécessitait, lors de la préparation d'extrait cellulaire, l'utilisation de percoll pour séparer le chitosane insoluble du mycélium bactérien. De plus, ce milieu induisait la chitosanase en 30 heures. L'objectif était d'obtenir un milieu d'induction à base de chitosane soluble qui permettrait d'induire rapidement la chitosanase. L'induction rapide permet d'appliquer au départ, une plus grande quantité de biomasse bactérienne, augmentant ainsi le rendement de protéines récoltées lors d'extraits cellulaires. C'est avantageux lors de la purification de protéines régulatrices car elles sont en petites quantités dans les cellules. Le milieu développé est à base de chitosane hydrolysé de poids moléculaire approximatif de 2000 g/mol et possède une faible quantité de malt extract, soit 0,4 g/l, ce qui permet de détecter l'activité de la chitosanase dès la 2^e heure, pour atteindre un maximum d'activité entre 8 à 10 heures.

La molécule exacte qui induit l'expression du gène de la chitosanase n'est pas connue. Il est fort probable qu'il s'agisse d'un sous produit de dégradation du chitosane qui est assimilable par la cellule comme des dimères, trimères, tétramères ou pentamères de chitosane. Il est aussi possible que la cellule transforme un sous produit de dégradation en un dérivé qui vient ensuite induire l'expression du gène de la chitosanase. En connaissant l'inducteur précis, un milieu d'induction moins complexe pourrait être développé et pourrait être plus efficace pour l'induction du gène. Dans un contexte où l'on veut transférer un système de régulation dans

une souche hétérologue tel *Streptomyces lividans*, il faut s'assurer que l'inducteur est assimilable par la souche et qu'il puisse provoquer le détachement ou l'attachement du régulateur. Lors du clonage du gène de la chitosanase dans *Streptomyces lividans*, celle-ci était induite par la présence de chitosane (Masson et al., 1995), il est donc envisageable de penser que l'inducteur du gène de la chitosanase est assimilable par *Streptomyces lividans*.

Afin de détecter la présence de protéines qui s'attachent à la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106, des extraits protéiques cytoplasmiques ont été faits à différents temps d'incubation dans le milieu d'induction. L'activité de la chitosanase dans le surnageant de culture a été mesurée en parallèle. Par la technique de gels à retardement, il a été possible de détecter une variation d'expression de deux complexes durant 20 heures. Le premier complexe observé (complexe lent) est présent dans le milieu TSB, diminue après 2 heures d'incubation pour ensuite légèrement réapparaître après 4 heures d'incubation pour finalement apparaître fortement à 20 heures d'incubation. Lorsqu'on compare la présence de cette protéine avec l'activité de la chitosanase (augmentation entre 2 et 10 heures et baisse autour de 20 heures), on peut émettre l'hypothèse que cette protéine est un répresseur. De plus, par élongation d'amorce, il n'a pas été possible de détecter d'ARNm de la chitosanase à 20 heures d'incubation (au temps où le complexe est fortement détecté). Après de nombreux tests de compétitions lors de gel à retardement, il est possible d'affirmer que cette protéine s'attache à une région qui est en amont de la séquence répétée/inversée et il est possible qu'elle recouvre la région -35 du promoteur (bloquant ainsi l'attachement de la machinerie transcriptionnelle). La région d'attachement n'a pas pu encore être précisée par empreinte à la DNase. En effet, les conditions expérimentales utilisées n'ont pas permis d'observer de protection. Le tampon utilisé pour l'attachement avait une concentration de 50 mM de KCl et on sait que la protéine du complexe lent s'attache seulement à une concentration de 150 mM de KCl (déterminée lors de l'optimisation des conditions pour la technique de gels à retardement). D'autres essais seront effectués ultérieurement.

Le deuxième complexe observé (complexe rapide) apparaît autour de 4 heures d'incubation et persiste au moins jusqu'à 10 heures. Des extraits protéiques cytoplasmiques effectués après 10 heures ont démontré que ce complexe peu persister jusqu'à 20 heures d'incubation (figure 9, puits 11 et 12). Comme la présence de ce complexe coïncide avec la montée de l'activité de la chitosanase, son comportement ressemble à celui d'un activateur. De plus, par élongation d'amorce, il a été possible de détecter l'ARNm de la chitosanase de N106 à 10 heures d'incubation (où l'on observe le complexe rapide). Les tests de compétition, appuyés par l'empreinte à la DNase effectuée par Jean-Yves Masson (résultat non publié) ont permis de déterminer que la protéine du complexe rapide s'attache à la séquence répétée/inversée. Le milieu d'induction utilisé dans ce temps était différent (à base de glucosamine), mais il est fort probable qu'il s'agisse de la même protéine. Afin de s'en assurer, il serait possible de refaire un extrait protéique cytoplasmique à partir de cellules induites dans ce milieu d'induction et de faire un gel à retardement. La disparition du répresseur après deux heures d'incubation expliquerait l'augmentation de l'activité initiale de la chitosanase et l'apparition de l'activateur expliquerait l'augmentation rapide de l'activité. L'atteinte du plateau serait expliquée par la réapparition du répresseur qui vient contrer l'effet de l'activateur. La baisse de l'activité à 20 heures expliquerait une inhibition totale du gène de la chitosanase par la forte présence du répresseur.

Le signal obtenu par élongation d'amorce sur un extrait d'ARN total de 10 heures d'incubation a permis de déterminer le site d'initiation de la transcription du gène de la chitosanase de N106 par comparaison avec une réaction de séquençage. Il est situé dans la séquence répétée/inversée et le transcrit inclut donc les deux codons d'initiation à la traduction qui sont en phase. Lors de l'analyse de la séquence de différents gènes codant pour des protéines sécrétées, il est possible dans certains cas de retrouver deux codons d'initiation comme dans le cas d'une mannanase (ManA), d'une cellulase (CelA,) et d'une estérase (Morosoli et Dupont, 1999). De plus, il a été démontré que ces codons d'initiation

multiplés sont réellement utilisés lors de la traduction de la protéine, augmentant ainsi la production de la protéine (Morosoli et Dupont, 1999).

Connaissant le site d'initiation de la transcription, il est possible d'identifier les séquences promotrices -35 et -10 (TTCAAT et TTGCGC). À partir de ces séquences, on peut distinguer des motifs communs la séquence consensus de *E. coli* (TATAAT et TTGACA). Par cette légère similitude, ces séquences promotrices avaient déjà été suggérées par l'analyse de la séquence du gène de la chitosanase (Masson et al., 1995). Cette séquence promotrice n'est pas, jusqu'à maintenant, retrouvée devant d'autres gènes.

Selon le modèle suggéré pour la régulation du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106, l'activateur chevaucherait le site d'initiation à la transcription et le répresseur, en amont, chevaucherait la séquence promotrice -35. Ceci peut sembler étrange dans la mesure où l'activateur bloquerait le passage de la machinerie transcriptionnelle. Le rôle d'un activateur est de recruter la machinerie transcriptionnelle. Il est donc possible que dès l'arrivée de celle-ci, l'activateur se détache de l'ADN. Avant de se concentrer sur le mode d'action de cet activateur potentiel, il faut confirmer sa nature par un essai de transcription *in vitro*. Un système impliquant deux protéines de régulation a été rapporté pour le gène de la cellulase de *Streptomyces reticuli* (Walter et Schrempf, 1996). Dans ce cas, l'activateur est en amont de la séquence promotrice -35 et le répresseur est en aval du site d'initiation à la transcription (l'inverse de notre modèle). Il n'est pas possible jusqu'à maintenant de retrouver dans la littérature un modèle semblable à celui suggéré dans le cas de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106. Cependant, on retrouve des cas comme la chitinase-63 de *Streptomyces plicatus* où le site d'attachement d'un répresseur couvre la région -35 du promoteur (Delic et al., 1992). Les répresseurs peuvent agir soit en empêchant l'attachement de la machinerie transcriptionnelle au promoteur ou en empêchant l'initiation de la transcription au site +1 (Salah-Bey et Thompson, 1995).

En connaissant l'implication de deux protéines régulatrices dans le système, il est possible d'envisager la purification de l'une des protéines. Dans un premier lieu, c'est la protéine du complexe lent qui a été purifiée. Une protéine purifiée permet de faire des tests biochimiques comme l'empreinte à la DNase ainsi que de la transcription *in vitro*, mais permet aussi d'obtenir des séquences d'acides aminés en N-terminal par séquençage selon le principe d'Edman (Aebersold et al., 1987). Ces séquences d'acides aminés vont permettre l'obtention de séquences nucléotidiques (dégénérées) qui pourront servir d'amorces PCR pour amplifier une portion du gène du régulateur. Ce fragment amplifié pourra servir de sonde pour cribler dans une banque génomique de *Nocardioïdes* sp. N106 le gène entier du régulateur.

Après avoir testé plusieurs techniques de purification, trois étapes ont été retenues afin d'enrichir suffisamment la protéine pour permettre le séquençage de la protéine. La première étape est la précipitation au sulfate d'ammonium pour ensuite faire une chromatographie sur une colonne d'hydroxyapatite. Les étapes de lavage (145 mM de tampon phosphate) et d'élution (270 mM tampon phosphate) ont dû être optimisées afin de permettre un bon taux de purification. L'absorption du régulateur sur des billes magnétiques où la séquence de liaison à l'ADN du régulateur est attachée par liens biotine/streptavidine permet d'enrichir considérablement l'échantillon d'une protéine que l'on présume être celle impliquée dans le complexe lent (figure 11). On peut noter que l'éluat contient encore plusieurs autres protéines mais après électrophorèse dans un long gel d'acrylamide, il devrait être possible de bien séparer la protéine désirée des autres. Il serait probablement possible de se débarrasser des protéines contaminantes en ajoutant d'avantage de poly-dIdC lors du lavage des billes. Le poly-dIdC est un analogue d'ADN qui permet de décrocher les protéines non spécifiques qui se sont attachées à l'ADN des billes.

Le tableau 4 montre les différents essais de chromatographie qui ont été essayés afin de purifier le régulateur. Les résines échangeuses d'ions, quel que soit le pH, ne permettent pas

l'attachement complet du régulateur. Il ne s'attache pas à l'héparine et il n'est pas récupéré de la résine T-Butyl (interaction hydrophobe). L'hydroxyapatite est la seule résine qui permet l'attachement complet du régulateur. Notre protéine sort dans plusieurs fractions lorsqu'un gradient de tampon phosphate est utilisé. Afin de récupérer le régulateur dans un nombre de fractions plus petit, notre protéine est éluée avec une concentration de 270 mM de tampon phosphate. L'éluion est précédée d'un lavage avec un tampon phosphate de 145 mM. C'est la concentration maximale de tampon phosphate qui ne provoque pas le détachement de notre protéine mais qui provoque le détachement de plusieurs autres protéines. Il est à noter que la complexité de l'échantillon protéique après l'hydroxyapatite est encore grande. C'est probablement causé par le fait que la concentration de 145 mM de tampon phosphate n'est pas suffisamment élevée pour permettre le décrochage complet des protéines contaminantes. Ceci peut être expliqué par comparaison à notre protéine : elle commence à éluer à 150 mM mais est seulement complètement éluée à 270 mM. La concentration de tampon phosphate de 145 mM peut permettre de décrocher complètement ou partiellement certaines protéines. Il est aussi à noter que les fractions sont directement traitées avec les billes magnétiques, sans effectuer d'étape de concentration des protéines. Afin de favoriser la rencontre entre l'ADN des billes avec la protéine, celle-ci ne doit pas être trop diluée. Plusieurs méthodes de concentration ont été testées, mais aucune ne donne de résultats adéquats (voir tableau 5). Un traitement direct des fractions d'hydroxyapatite avec les billes magnétiques a donc été essayé et a donné un résultat satisfaisant (figure 12).

Tableau 4. Méthodes chromatographiques testées afin de purifier la protéine du complexe lent.

Essais de chromatographies	Conditions	Observations
Q-sépharose*	pH 7,6, 8,0, 8,4	Absorption partielle
SP-sépharose*	pH 4,5, 5,5, 6,5, 6,8, 7,5	Absorption partielle faible.
Héparine	Tampon sodium phosphate pH 7,5. Élution de 50 mM à 1 M KCl	Pas d'absorption
HIC (macro-prep t-Butyl)	Tampon sodium phosphate pH 7,5. Élution de 0,9 M à 0 M sulfate d'ammonium	Perte de l'activité
Hydroxyapatite	Tampon phosphate 1 mM pH 6,8 Élution entre 150 mM et 270 mM tampon phosphate pH 6,8	Bonne absorption

Ces techniques ont été essayées afin d'élaborer un protocole de purification de la protéine du complexe lent. * Les tampons diffèrent selon le pH de la solution

Tableau 5. Méthodes testées pour concentrer la protéine du complexe lent

Essais de concentration	Conditions	Observations
Centricon	-	Perte du signal
Sulfate d'ammonium	Saturation 70 % après passage sur hydroxyapatite	Précipitation partielle
Éthanol	3, 4, 5 volumes ajoutés	Inactivation
Acétone	2, 3, 4 volumes ajoutés	Inactivation
Hydroxyapatite	Colonne de 0,5 cm d'épaisseur	Pas d'effet de concentration

Ces méthodes ont été essayées afin de concentrer l'échantillon protéique pour permettre un traitement efficace avec les billes magnétiques.

Il est important de mentionner qu'il n'a pas été possible jusqu'à présent de récupérer notre protéine sous forme active après l'élution des billes. Plusieurs protocoles d'élution ont été testés, inspirés de la littérature (Gabrielsen et Huet 1993 ; McKay et al., 1991 ; Ren et al., 1994 ; Gershon et al., 1990 ; Ozyhar et al., 1992). Des éluions avec des concentrations de sels de 1 M et 2 M ont été testées, mais sans récupérer l'activité. Un contrôle a été effectué en traitant un échantillon contenant la protéine active avec du sel, pour ensuite effectuer un gel à retardement. On a ainsi confirmé que le sel n'est pas responsable de la perte de l'activité. Les billes ont ensuite été traitées à la DNase afin de s'assurer que la protéine est bien décrochée des billes, mais l'activité n'a toujours pas été récupérée. Ces mêmes protocoles d'élution ont été testées en ajoutant du BSA à une concentration de 0,1 µg/µl, mais toujours sans succès. Pour récupérer la protéine, il a finalement été décidé de recouvrir à des conditions d'élution drastiques avec un tampon comprenant 3% SDS et en chauffant 15 minutes à 70°C. Ce mode d'élution provoque la dénaturation de la protéine mais s'avère efficace en permettant de récupérer une forme protéique abondante. Il est permis de croire que la bande principale obtenue (dont le poids moléculaire est estimé à 65,6 kDa) correspond au régulateur transcriptionnel que nous voulions purifier, vu la spécificité d'attachement de ce régulateur aux fragments d'ADN immobilisés sur les billes.

La séquence répétée/inversée de 20 pb retrouvée dans la séquence régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioïdes* sp. N106 est aussi présente dans la région régulatrice de deux gènes de *Streptomyces coelicolor*, soit un gène codant pour une chitosanase hypothétique (CAB61194) et un gène codant pour régulateur de transcription hypothétique appartenant à la famille ROK (CAB71832). Cette même séquence est aussi présente dans la région régulatrice du gène de la chitosanase de *Streptomyces* sp. N174. Par des compétitions lors d'un gel à retardement, il a été démontré que ces régions régulatrices provoquaient la disparition du complexe rapide de N106. Il est donc possible que *Streptomyces coelicolor* et *Streptomyces* sp. N174 possèdent ce même régulateur. C'est intéressant dans la mesure où le génome de *Streptomyces coelicolor* est entièrement séquencé. Le clonage d'un gène est

facilité par la possibilité d'amplifier par PCR le gène ciblé dans la séquence. Lorsqu'une séquence en acides aminés sera obtenue pour la protéine du complexe lent de N106, il sera possible d'effectuer une recherche de similitudes de séquences dans le génome de *Streptomyces coelicolor*. Il serait déjà possible de commencer par le gène CAB71832, le régulateur hypothétique appartenant à la famille ROK. En effet, il est connu que de nombreux activateurs ou répresseurs agissent par autorégulation sur leur propres gènes. Il est donc tout à fait probable que la protéine codée par le gène CAB71832 interagisse avec la séquence retrouvée en amont de ce gène. Le gène a déjà été cloné dans les vecteurs pCR2.1 et pFD666. Ce dernier vecteur permet d'exprimer ce gène chez *Streptomyces lividans* pour ensuite faire un gel à retardement avec un extrait protéique cytoplasmique afin de vérifier si cette protéine s'attache à la région régulatrice du gène de la chitosanase de N106 (résultats à venir). Les protéines régulatrices classées dans famille ROK sont des répresseurs (Titgemeyer, 1994), mais en dehors de la comparaison de séquence, rien ne prouve que le régulateur identifié chez *Streptomyces coelicolor* est un represseur.

Le système rapporteur qui a été construit chez *E. coli* pour cribler l'activateur de transcription de *Nocardioides* sp. N106 n'a pas encore été utilisé car la banque génomique n'a pas encore été obtenue. Cette méthode a été développée afin d'obtenir plus rapidement et plus facilement l'activateur de transcription. En effet, la méthode classique lorsque la séquence d'un génome n'est pas disponible, est de purifier la protéine, de la faire séquencer, de cloner un fragment PCR pour ensuite l'utiliser comme sonde pour le criblage du gène dans une banque génomique. Cette méthode est longue et fastidieuse. Le criblage phénotypique proposé ici est basé sur le fait que le clone de la banque qui possède le gène entier de l'activateur, sera exprimé et viendra activer la transcription du gène de résistance au chloramphénicol par l'entremise de la région régulatrice qui est clonée devant (figure 16). Une idée semblable a été utilisée pour le clonage de l'activateur des gènes impliqués dans l'utilisation du mannitol chez *Pseudomonas fluorescens* (Brünker et al., 1998). Dans ce cas le gène rapporteur utilisé était *galK*. Comme le système est construit dans *E. coli*, il est

possible que l'expression de notre régulateur de N106 soit faiblement efficace (à cause du G/C riche) et que la machinerie transcriptionnelle de *E. coli* ne puisse pas reconnaître l'activateur N106. Compte tenu de ces risques, je tiens à mentionner qu'il est possible de construire un système de gène rapporteur chez *Streptomyces lividans*. Différents systèmes impliquant des gènes rapporteurs ont été développés chez les streptomycètes comme *xylE* (Ingram et al., 1989), *efgp* (Sun et al., 1999), *redD* (van Wezel et al., 2000). L'efficacité d'expression du régulateur cloné ainsi que la reconnaissance de l'activateur par la machinerie transcriptionnelle est supérieure. Par contre, l'obtention de clones en un nombre suffisant pour bâtir une banque génomique statistiquement représentative est beaucoup plus difficile chez *Streptomyces lividans* que chez *E. coli*, d'où l'intérêt de ce dernier pour effectuer au moins un criblage préliminaire.

CONCLUSION

En conclusion, les travaux rapportés dans ce mémoire ont permis d'approfondir les connaissances sur le système de régulation du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106. Le système de régulation de la chitosanase est étudié afin d'utiliser ces composantes pour la construction d'un système d'expression inductible par le chitosane chez *Streptomyces lividans*.

L'élaboration d'un milieu d'induction a permis d'effectuer des extraits de protéines cytoplasmiques de N106 qui ont révélés par la technique du gel à retardement, la présence de deux complexes qui s'attachent à la région régulatrice du gène de la chitosanase (nommés complexe lent et complexe rapide). Les signaux obtenus pour ces complexes modulent selon le temps d'incubation dans le milieu d'induction. Une hypothèse a été émise suggérant que l'expression de la chitosanase de N106 soit sous le contrôle d'une double régulation qui impliquerait un activateur et un répresseur. La région d'attachement du répresseur potentiel recouvrerait la séquence promotrice -35 tandis que l'activateur potentiel recouvrerait le site d'initiation de la transcription (sur la séquence répétée/inversée). On ne peut affirmer pour l'instant avec certitude qu'il s'agisse bien d'un activateur. Un essai utilisant la technique de transcription *in vitro* pourrait confirmer l'hypothèse. De plus, la région d'attachement du répresseur potentiel devra être précisée par la technique d'empreinte à la DNase I afin de confirmer que celui-ci recouvre bien la séquence promotrice -35.

Le clonage des gènes qui codent pour les protéines des complexes lent et rapide a été initié par deux approches différentes. Dans un premier lieu, un protocole de purification de la protéine du complexe lent a été élaboré. En ayant en main ce protocole, il sera possible d'entreprendre une purification d'une grande quantité de cette protéine. Il sera ensuite

possible d'obtenir des séquences en acides aminés qui à leur tour permettront d'obtenir des séquences dégénérées du gène du régulateur. Ces séquences seront utilisées pour amplifier une portion du gène du régulateur qui sera utilisé pour le criblage du gène entier dans une banque génomique de N106. Dans un deuxième lieu, afin de cloner spécifiquement le gène codant pour l'activateur, un système de gène rapporteur a été développé pour le cribler dans une banque génomique de N106 par sélection sur chloramphénicol. Le système rapporteur est transformé dans *E. coli* qui peut maintenant recevoir la banque. Les essais effectués n'ont pas encore permis d'obtenir les clones de la banque nécessaires pour le criblage du gène de l'activateur.

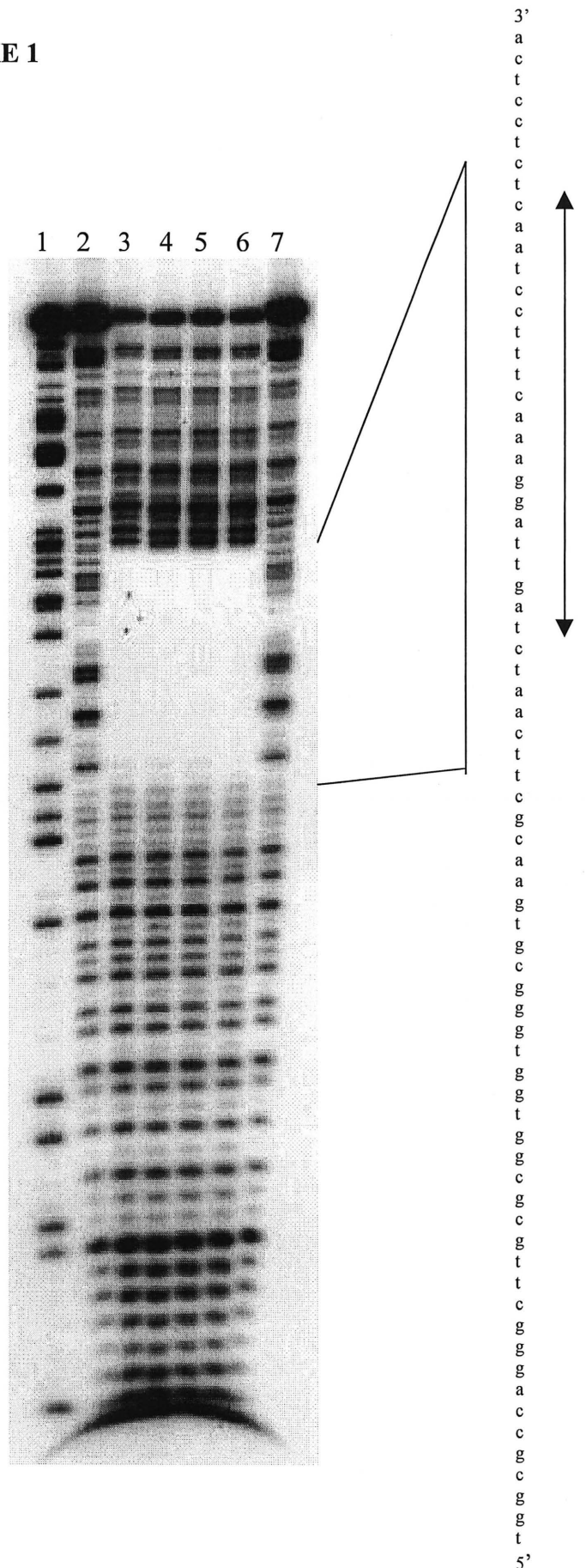
Dès que ces gènes seront obtenus, il sera possible d'envisager la construction du système d'expression inductible par le chitosane. Je vous invite donc à suivre les travaux de Marie-Pierre Dubeau, étudiante à la maîtrise dans le laboratoire du Dr Brzezinski, qui prend la relève du projet. Ces travaux devraient permettre, entre autre, de déterminer la nature des régulateurs des complexes lent et rapide, de préciser par empreinte à la DNase la région d'attachement du complexe lent sur l'ADN, de cribler le gène du complexe lent par hybridation d'une sonde et de cribler le gène de l'activateur par l'obtention de la banque génomique dans le système de gène rapporteur.

ANNEXE 1

Puits 1. Séquence des bases G ; **Puits 2.** Réaction sans protéine ; **Puits 3.** Réaction avec 10 µg d'extrait brut. **Puits 4.** Réaction avec 20 µg d'extrait brut ; **Puits 5.** Réaction avec 30 µg d'extrait brut ; **Puits 6.** Réaction avec 40 µg d'extrait brut ; **Puits 7.** Réaction sans protéine

Empreinte à la DNase I de la protéine du complexe rapide sur la séquence régulatrice du gène de la chitosanase de *Nocardioides* sp. N106.

*Résultats non publiés obtenus par Jean-Yves Masson en 1995



BIBLIOGRAPHIE

AEBERSOLD, R.H., J. LEAVITT, R.A. SAAVEDRA, L.E. HOOD et S.B. KENT. 1987. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (20) : 6970-6974.

AUDET, J-F., J-Y. MASSON, G.D. ROSEN, C. SALESSE et S.L. GUÉRIN. 1994. Multiple regulatory elements control the basal promoter activity of the human $\alpha 4$ integrin gene. DNA and Cell Biology. 13 (11) : 1071-1085.

AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOOR, J.A. SMITH, J.G. SEIDMAN et K. STRUHL. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, New York.

BENTLEY, S.D., K.F. CHATER, A.-M. CERDENO-TARRAGA, G.L. CHALLIS, N.R. THOMSON, K.D. JAMES, D.E. HARRIS, M.A. QUAIL, H. KIESER, D. HARPER, A. BATEMAN, S. BROWN, G. CHANDRA, C.W. CHEN, M. COLLINS, A. CRONIN, A. FRASER, A. GOBLE, J. HIDALGO, T. HORNSBY, S. HOWARTH, C.-H. HUANG, T. KIESER, L. LARKE, L. MURPHY, K. OLIVER, S. O'NEIL, E. RABBINOWITSCH, M.-A. RAJANDREAM, K. RUTHERFORD, S. RUTTER, K. SEEGER, D. SAUNDERS, S. SHARP, R. SQUARES, S. SQUARES, K. TAYLOR, T. WARREN, A. WIETZORREK, J. WOODWARD, B.G. BARRELL, J. PARKHILL, et D.A. HOPWOOD. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 417 : 141-147.

BLANCHARD, J., V.N. AKIMOV, W.A. NEUGEBAUER R. BRZEZINSKI et C. BEAULIEU. 2001. Taxonomic study on two chitosanolytic strains isolated from soil. Eur. Chitin Soc., R.A.A. Muzzarelli, ed., CHITIN ENZYMOLOGY. Italy. pp. 263-271.

BOUCHER, I., A. DUPUY, P. VIDAL, W.A. NEUGEBAUER et R. BRZEZINSKI. 1992. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 188-193.

BRADFORD, MARION M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

BROSIUS, J. et J.R. LUPSKI. 1987. Plasmids for the selection and analysis of prokaryotic promoters. *Meth. Enzymol.* 153 : 54-68.

BRÜNKER, P., M. HILS, J. ALTENBUCHNER et R. MATTES. 1998. The mannitol utilization genes of *Pseudomonas fluorescens* are regulated by an activator : Cloning, nucleotide sequence and expression of the *mtlR* gene. *Gene.* 215 : 19-27

DELIC, I., P. ROBBINS et J. WESTPHELING. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 1885 - 1889.

DENIS, F. et R. BRZEZINSKI. 1992. A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. *Gene.* 111 : 115-118.

DOUMBOU, C.L., M.K.H. SALOVE, D.L. CRAWFORD et C. BEAULIEU. 2002. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82 : 85-102.

FINK, D., I. BOUCHER, F. DENIS et R. BRZEZINSKI. 1991. Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of a chitosanase-encoding gene from the actinomycete *Kitasatosporia* N174 isolated from soil. *Biotechnol. Lett.* 13 (12) : 845-850.

FORT LEE, N. J. 1989. Chitin and chitosan : specialty biopolymers for food, medicine and industry. ED. : Englewood. Technical insights Inc.

FUKAMIZO, T., et R. BRZEZINSKI. 1997. Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 : a comparative review of its structure and function. *Biochem. Cell. Biol.* 75 : 687-696.

GABRIELSEN, O.S., et J. HUET. 1993. Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor. *Methods in Enzymology.* 218 : 508-525.

GERSHON, P.D. et B. MOSS. 1990. Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 4401-4405.

GIANNOTTA, F., J. GEORIS, A. MOREAU, C. MAZY-SERVAIS, B. JORIS et J. DUSART. 1996. A sequence-specific DNA-binding protein interacts with the *xlnC* upstream region of *Streptomyces* sp. strain EC3. FEMS Microbiol. Letters. 142 : 91-97.

GILBERT, M., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1995. Production and secretion of proteins by Streptomyces. Crit. Rev. Biotechnol. 15 (1) : 13-39.

GOYER, C., B. OTRYSKO et C. BEAULIEU. 1996. Taxonomic studies on streptomycetes causing potato common scab : a review. Can. J. Plant Pathol. 18 (2) : 107-201.

GUZMAN, L-M., D. BELIN, M.J. CARSON et J. BECKWITH. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. J. Bacteriol. 177 (14) : 4121-4130.

INGRAM, C. M. BRAWNER, P. YOUNGMAN et J. WESTPHELING. 1989. *xyIE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of *galP1*, a catabolite-controlled promoter. J. Bacteriol. 171 (12) : 6617-6624.

KATZ, E., C.J. THOMPSON et D.A. HOPWOOD. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J. Gen. Microbiol. 129 : 2703 - 2714.

KÉBIR, H., C. DUPONT et R. MOROSOLI. 2000. Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide : dependence on box and inverted repeat sequence. Biochim. Biophys. Acta. 1491 : 177-184.

KIESER, T., M.J. BIBB, M.J. BUTTNER, K.F. CHATER et D.A. HOPWOOD. 2000. Practical Streptomyces Genetics. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.

LAMMERTYN, E. et J. ANNÉ. 1998. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. FEMS Microbiol. Letters. 160 : 1-10.

LEVER M. 1973. Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochem Med.* 7 : 274-281.

LOPEZ, J.M., B. THOMS. 1977. Role of sugar uptake and metabolic intermediates on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 129 (1) : 217-224.

LYDIATE D.J. F. MALPARTIDA, D.A. HOPWOOD. 1985. The *Streptomyces* plasmid SCP2*: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene.* 35 (3) : 223-35.

MASSON, J-Y., T. LI, I. BOUCHER, C. BEAULIEU et R. BRZEZINSKI. 1993. Factors governing an efficient chitosanase production by recombinant *Streptomyces lividans* strains carrying the cloned *chs* gene from *Streptomyces* N174. *Eur. Chitin Soc., R.A.A. Muzzarelli, ed., CHITIN ENZYMOLOGY.* Ancona. pp. 423-430.

MASSON, J-Y., I. BOUCHER, S.L. GUÉRIN et R. BRZEZINSKI. 1994. Effect of regulatory sequence substitution on chitosanase production from a cloned gene in *Streptomyces lividans*. *Chitin World.* Edited by Karnicki, Z. S., Wojtasz-Pajak, A., Brzeski, M. M. et Bykowski, P. J. Proceeding from the 6th international conference on chitin and chitosan, Poland. p. 311-319.

MASSON, J-Y., F. DENIS et R. BRZEZINSKI. 1994. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. *Gene.* 140 : 103-107.

MASSON, J-Y., I. BOUCHER, W.A. NEUGEBAUER, D. RAMOTAR et R. BRZEZINSKI. 1995. A new chitosanase gene from a *Nocardioides* sp. is a third member of glycosyl hydrolase family 46. *Microbiol.* 141 : 2629-2635.

McCARTHY, A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 145-163.

McKAY, S.J., et H. COOKE. 1992. A protein which specifically binds to single stranded TTAGGGn repeats. *Nucleic Acids Res.* 20 (6) : 1387-1391.

MERTZ, L. M. et A. RASHTCHIAN. 1994. Nucleotide imbalance and polymerase chain reaction : effects on DNA amplification and synthesis of high specific activity radiolabeled DNA probes. *Anal. Biochem.* 221 : 160-165.

MIYASHITA, K., T. FUJII et A. SAITO. 2000. Induction and repression of a *Streptomyces lividans* chitinase gene promoter in response to various carbon sources. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (1) : 39-43.

MOROSOLI, R., F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol. Letters.* 146 : 167-174.

MOROSOLI, R. et C. DUPONT. 1999. Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans* : dependence on signal peptides length, number and composition. *FEMS Microbiol. Letters.* 179 : 437-445.

NGUYEN, J., F. FRANCOU, M-J. VIROLLE et M. GUÉRINEAU. 1997. Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *reg1*, a pleiotropic regulatory gene. *J. Bacteriol.* 179 (20) : 6383-6390.

Ni, X. et J. WESTPHELING. 1997. Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 13116-13121.

OZYHAR A., M. GRIES, H-H. KILTZ et O. PONGS. 1992. Magnétic DNA affinity purification of ecdysteroid receptor. 43 (7) : 629-634.

PAGÉ, N., D. KLUEPFEL, F. SHARECK et R. MOROSOLI. 1996. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans* : Dependence on number of ribosome-binding sites. *Nature Biotechnol.* 14 : 756-759.

PIERCE, J.J., S.C. ROBINSON, J.M.WARD, E. KESHAVARZ-MOORE et P. Dunnill. 2002. A comparison of the process issue in expressing the same recombinant enzyme periplasmically in *Escherichia coli* and extracellularly in *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* 92 : 205-215.

REN, L., H. CHEN et E.A. STERNBERG. 1994. Tethered bandshift assay and affinity purification of a new DNA-binding protein. *BioTechniques*. 16 (5) : 852-855.

ROBERTS, GEORGES A. F. 1992. Chitin chemistry. The MacMillan Press LTD, Houndmills, Basingtoke, Hampshire and London

SCHAAL, K.P. et H.J. LEE. 1992. Actinomycete infections in humans—a review. *Gene*. 115 (1-2) : 201-211.

SAITO, A., M. ISHIZAKA, P.B. FRANCISCO JR, T. FUJII et K. MIYASHITA. 2000. Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Microbiol*. 146 : 2937-2946.

SALAH-BEY, K. et C.J. THOMPSON. 1995. Unusual regulatory mechanism for a *Streptomyces* multidrug resistance gene, *ptr*, involving three homologous protein-binding sites overlapping the promoter region. *Molecular Microbiology*. 17 (6) : 1109-1119

SAMBROOK, J., D.W. RUSSELL. 2001. Molecular cloning : a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SCHEP, GP., MG. SHEPHERD et PA. SULLIVAN. 1984. Purification and properties of a β -1,6-glucanase from *Penicillium brefeldianum*. *Biochem. J*. 223 : 707-714.

SCHLÖSSER, A., T. ALDCKAMP et H. SCHREMPF. 2000. Binding Characteristics of CebR, the regulator of the *ceb* operon required for cellobiose/celotriose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiol. Letters*. 190 : 127-132.

SRINIVASAN, M.C., R.S. LAXMAN et M.V. DESHPANDE. 1991. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes : an overview. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 7 : 171-184.

STROHL W.R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res*. 20 (5) : 961-74.

SUBRAMANIYAN, S. et P. PREMA. 2002. Biotechnology of microbial xylanases : enzymology, molecular biology, and application. Crit. Rev. Biotechnol. 22 (1) : 33-64.

SUN, J., G.H. KELEMEN, J.M. FERNANDEZ-ABALOS et M.J. BIBB. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiol. 145 : 2221-2227.

TITGEMEYER, F., J. REIZER, A. REIZER et M.H. SAIER JR. 1994. Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. Microbiol. 140 (9) : 2349-2354.

TREMBLAY, D., J. LEMAY, M. GILBERT, Y. CHAPDELAINE, C. DUPONT et R. MOROSOLI. 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. Can. J. Microbiol. 48 : 43-48.

VAN WEZEL, G.P., J. WHITE, G. HOOGVLIET et M.J. BIBB. 2000. Application of *redD*, the transcriptional activator gene of the undecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2 (4) : 551-556.

VIGAL, T., J.A. GIL, A. DAZA, M.D. GARCIA-GONZALEZ, P. VILLADAS et J.F. MARTIN. 1991. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of α -amylase by *Streptomyces lividans*. Mol. Gen. Genet. 231 : 88-96.

VIEIRA, J. et J. MESSING. 1991. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. Gene. 100 : 189-194.

VIROLLE, M-J. et J. GAGNAT. 1994. Sequences involved in growth-phase-dependent expression and glucose repression of a *Streptomyces* α -amylase gene. Microbiol. 140 : 1059-1067.

VON HEIJNE, G. et L. ABRAHMSSEN. 1989. Species-specific variation in signal peptide design. Implication for protein secretion in foreign host. FEBS Lett. 244 : 439-446.

WALTER S. et H. SCHREMPF. 1995. Studies of *Streptomyces reticuli cel-1* (Cellulase) gene expression in *Streptomyces* strains, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 61 (2) : 487-494.

WALTER S. et H. SCHREMPF. 1996. The synthesis of the *Streptomyces reticuli* cellulase (Avicelase) is regulated by both activation and repression mechanisms. Mol. Gen. Genet. 251 : 186-195.

WRIGHT, F. et M.J. BIBB. 1992. Codon usage in the G + C-rich *Streptomyces* genome. Gene. 113 : 55-65.