Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution au développement d'un vecteur de sécrétion chez Escherichia coli

Marchant, Vincent

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

1989

FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D.DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT D'UN VECTEUR DE SECRETION CHEZ *ESCHERICHIA COLI*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

MARCHANT
VINCENT

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'a pu être réalisé qu'avec le concours d'un certain nombre de personnes auxquelles j'exprime ma reconnaissance. Je tiens à remercier plus particulièrement le professeur J. Delcour qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a bien voulu assurer la direction de mon mémoire, le docteur J. Van den Haute pour ses conseils, tous les membres du laboratoire, Mesdames M. Dewez, R.M. Wilmet, C. Dernoncourt et M. Libion, Mademoiselle G. Renaud, Messieurs O. Laloux, J.P. Cassart, P. Hols et J. Gilliard pour l'aide et les encouragements qu'ils m'ont apportés. Je tiens également à remercier Messieurs J. Delcour, E. Depierreux, J.Mahillon , J. Remacle, P. Van Cutsem, J. Van den Haute qui ont accepté de lire ce mémoire.

1989

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a. : acide aminé.
ARN m ou m RNA : ARN messager.
ARN r ou r RNA : ARN ribosomique.
ARN t ou t RNA : ARN de transfert.
A : Adénine.
bp : paire de bases.
C : Cytosine.
G : Guanosine.
kb : kilobase.
l : microlitre.
ml : millilitre.
mg : milligramme.
g : microgramme.
ng : nanogramme.
mM : millimolaire.
plasmide : ccc : covalently closed circular.
oc : open circular.
l : linear.
réf : référence.
RPM : Rotation par minute.
T : Thymine.
U : Uridine.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. Expression au niveau du gène : transcription - traduction chez les procaryotes

1.1. Transcription

1.1.1. L'initiation
1.1.2. L'élongation
1.1.3. La terminaison
1.1.4. L'atténuation
1.1.5. Stabilité du m RNA

1.2. Traduction

1.2.1. Le ribosome
1.2.2. L'initiation de la traduction

1.2.2.1. Le codon d'initiation
1.2.2.2. La séquence de Shine-Dalgarno
1.2.2.3. Les facteurs d'initiation

1.2.3. L'élongation
1.2.4. La terminaison
1.2.5. L'usage des codons
1.2.6. Régulation autre que par les signaux

2. Mécanismes de sécrétion chez les bactéries

2.1. La paroi bactérienne

2.1.1. Paroi des gram négatives
2.1.2. Paroi des gram positives
2.1.3. Protéines majeures de la membrane externe chez E.coli

2.2. Transport des protéines chez les bactéries

2.2.1. Généralités
2.2.2. La séquence signal
2.2.3. La peptidase signal
2.2.4. Protéines exportées sans clivage ou sans présence d'une séquence signal au NH2-terminal du précurseur
2.2.5. Modèles d'exportation des protéines

2.2.5.1. Hypothèse du signal
2.2.5.2. " Membrane trigger hypothesis "
2.2.5.3. Autres hypothèses

2.2.6. Mutants d'exportation chez E.coli

2.2.6.1. Mutations définissant une information intragénique d'exportation
2.2.6.2. Mutations d'exportation pléiotropiques
2.2.6.3. Suppresseurs spécifiques
2.2.6.4. Conclusion

2.2.7. Applications

3. Données sur les α - amylases

3.1. Amylases : types et mode d'action
3.2. Les α - amylases de Bacillus
3.3. Propriétés des α - amylases produites par le gène Bacillus
3.4. Problèmes de stabilité
3.5. Structure de l' α - amylase de B licheniformis

4. Vecteurs de sécrétion

5. But du travail

MATERIEL ET METHODES

1. Souche

2. Cultures de bactéries

   2.1. Milieux de culture

   2.2. Milieux sélectifs

   2.3. Techniques de culture

3. Plasmides

   3.1. L'opéron lactose et les systèmes qui en dérivent

      3.1.1. L'opéron lactose

      3.1.2. Origines et caractéristiques des vecteurs pUC

   3.2. Plasmide pα 21

   3.3. Purification

      3.3.1. Miniprep

      3.3.2. Maxiprep

4. Techniques utilisées lors d'un clonage

   4.1. Electrophorèse

   4.2. Extraction des bandes

   4.3. Restriction

   4.4. Extraction au phénol

   4.5. Ligation

      4.5.1. Ligation à bouts collants

      4.5.2. Ligation à bouts francs

      4.5.3. Remarque

4.6. " Filling " ou remplissage

4.7. Transformation chez E.coli

RESULTATS

1. Clonage de l'extrémité 5' du fragment de 2,5 kb contenant le gène d'α - amylase en vue de l'obtention d'un vecteur d'expression et de sécrétion

2. Clonage de la partie A' en phase avec le gène de la β - galactosidase

2.1. Description de l'expérience

2.2. Résultats

2.2.1. Témoins de l'expérience

2.2.2. Criblage systématique des transformants

2.2.3. Résultats obtenus par les tests de constitutivité

2.2.3.1. Test de constitutivité

2.2.3.2. Résultats obtenus par ce test

2.3. Conclusion provisoire

3. Clonage de la partie située en amont du peptide signal

3.1. Clonage non discriminant

3.2. Clonage discriminant

3.3. Clonage discriminant avec séparation des fragments résultant de la digestion de A' avec Nde I

4. Clonage du peptide signal seul

5. Conclusion

I N T R O D U C T I O N

1. Expression au niveau du gène : transcription - traduction chez les procaryotes (23) (33) (61) (74)

Il convient de distinguer deux étapes : d'abord la transcription qui permet la production de m RNA, ensuite la traduction où le m RNA servira à la synthèse des protéines.

1.1. Transcription

Elle se fait grâce à la RNA polymérase qui va se positionner sur l'ADN. Un seul brin est " sense " et c'est celui-ci qui sera transcrit.

La RNA polymérase est constituée d'un ensemble de sous-unités ($\beta'\beta\alpha_2\omega$) dont les gènes sont localisés de manière assez proche (à l'exception d'ω) ce qui rendrait compte d'une régulation commune nécessaire à la croissance cellulaire.
A ce complexe encore appelé " core ", s'associe une autre protéine σ dont dépend l'initiation de la transcription.

1.1.1. L'initiation

La spécificité de la transcription chez les bactéries est dépendante de l'association de la partie " core " avec le facteur σ .
Chez E.coli, on connait déjà la séquence de beaucoup de promoteurs. La quasi totalité de ces promoteurs sont reconnus par la même RNA polymérase et le même facteur σ (σ^{70}). La transcription des " heat shock genes " de E. coli dépend d'un autre facteur mineur (σ^{32}).

En comparant les séquences de différents promoteurs, on a relevé que toutes contiennent deux régions d'homologies à - 10 et à - 35 paires de bases, en amont du point de départ de la transcription. La RNA polymérase interagit avec le promoteur

à ces deux endroits. L'homologie à - 10 est appelée " Boîte de Pribnow " et comporte six paires de bases qui sont généralement homologues à la séquence consensus TATAAT .

La deuxième région d'homologie (- 35) est appelée " région de reconnaissance " et est impliquée dans la reconnaissance initiale du site promoteur par la RNA polymérase, avant même la formation du complexe d'initiation.
Cette séquence consensus est TTGACA.
La distance entre ces deux séquences est importante.
Chez E.coli, 15 à 21 paires de bases les séparent avec une distance moyenne de 17 paires de bases.

Il faut signaler que chez les promoteurs de gènes ayant une régulation positive, la séquence de la région à - 35 diffère fort de la séquence consensus.

La RNA polymérase va se fixer sur l'ADN en déroulant celui-ci. La reconnaissance spécifique se fait grâce au facteur σ mais une fois la polymérase établie, ce facteur n'est plus nécessaire n'ayant pas d'activité catalytique propre.
Il se décroche après que les 5 premiers nucléotides aient été joints. Une série de protéines peuvent réguler positivement ou négativement l'initiation .

Mis à part ces régulations, la force d'un promoteur va dépendre de plusieurs facteurs.
Les promoteurs forts montrent une homologie de séquence très forte avec le consensus, à l'opposé des promoteurs plus faibles qui le respectent moins. Les séquences amont peuvent aussi moduler la force du promoteur comme il l'a été démontré chez E.coli (par exemple, le promoteur tyr T). Enfin, le superenroulement de l'ADN exerce également une influence. Le niveau de superenroulement est maintenu par une balance entre les activités opposées d'une topoisomérase I et d'une ADN gyrase.
Mais l'enroulement dépend également de la composition en bases. Celle-ci peut expliquer une différence de force de promoteur permettant un déroulement plus facile.

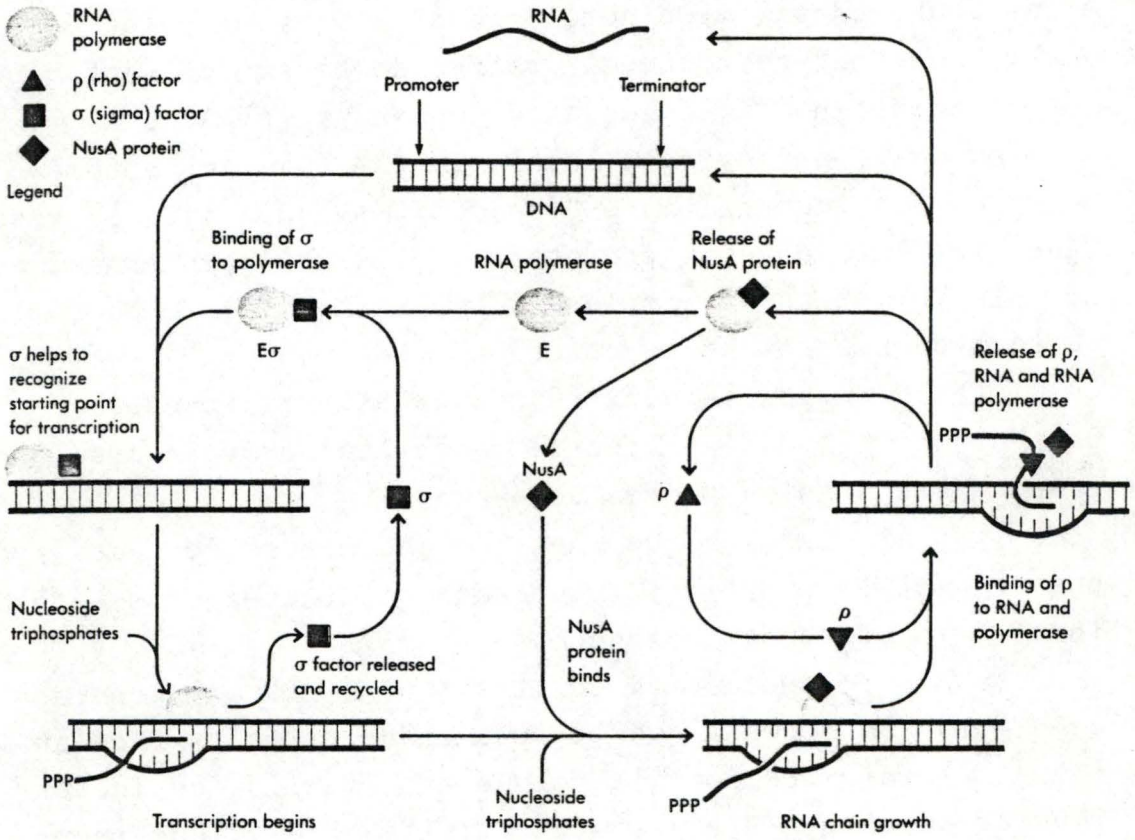


Figure 1 : Initiation et élongation de la transcription.

(WATSON p 375 réf 74)

1.1.2. L'élongation

L'ADN est déroulé et réenroulé par la RNA polymérase lors du déplacement de l'enzyme.

Le nombre de bases désappariées de l'ADN est de 17 en moyenne.

Une autre protéine, NUS A, s'associe à la RNA polymérase de manière non réversible. Elle a un rôle essentiel bien qu'il ne soit pas connu actuellement.

Le schéma ci-contre résume les processus décrits jusqu'à présent.

(figure 1)

1.1.3. La terminaison

Des signaux dans l'ADN bactérien, appelés terminateurs, ont pour fonction de stopper la synthèse de m RNA en des endroits spécifiques sur la matrice qu'est l'ADN.

a) terminateurs ρ- indépendants

Aucune protéine n'est requise si ce n'est la RNA polymérase. Une interaction directe entre l'enzyme et un signal sur l'ADN est suffisante pour provoquer l'arrêt de la transcription.

Ils ont tous deux caractéristiques en commun : une séquence inverse répétée riche en GC qui est immédiatement suivie par une suite de T. La séquence inverse forme un " hairpin " ou épingle à cheveux. Ceci entraîne une pause de la part de la polymérase. Du fait de l'appariement faible qui existe entre les U et les A, le m RNA se dissocierait. (figure 2, page ci-contre).

b) terminateurs ρ- dépendants

Dans ce type de terminateurs, un facteur protéique intervient. Le plus familier de ces facteurs est ρ (rho).

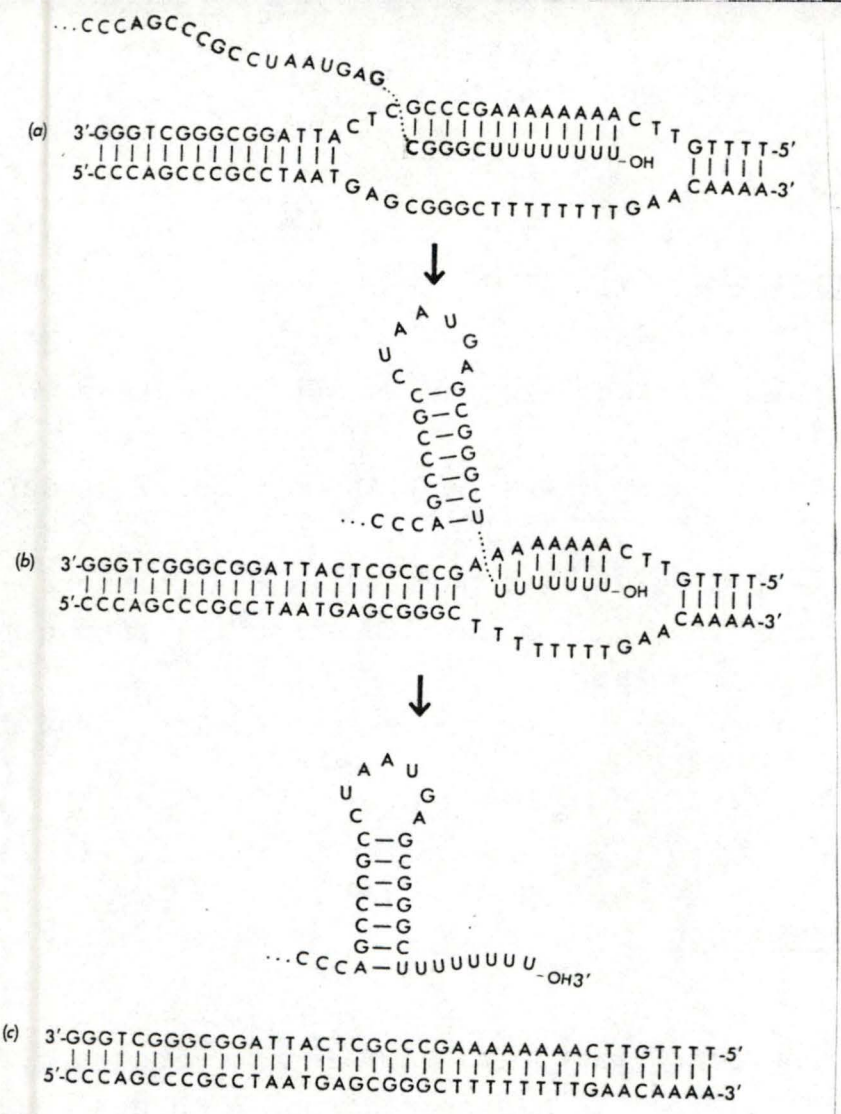


Figure 2 : Terminateur ρ-indépendant (WATSON p 379)

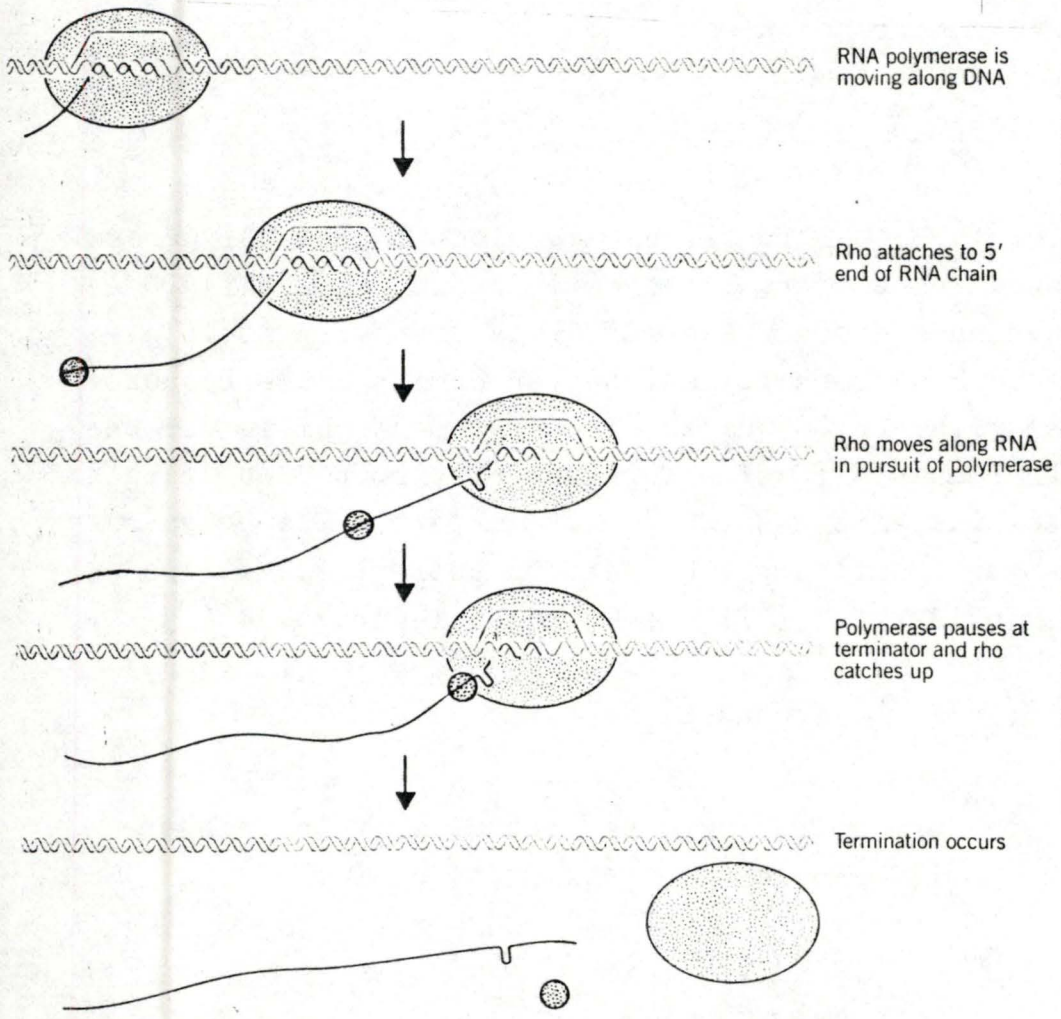


Figure 3 : Terminateur ρ-dépendant (LEWIN p 209 réf 3)

⊛ = FACTEUR ρ

Un " hairpin " apparaît mais on n'observe pas de séquence poly-U immédiatement après les séquences répétées.
Le facteur ρ agirait en permettant à la RNA polymérase de se détacher de l'ADN. (figure 3)

1.1.4. L'atténuation

En terme général, l'atténuation peut être considérée comme la terminaison prématurée de la transcription à l'intérieur d'un opéron. Ce mécanisme a été découvert pour la première fois sur la séquence de l'extrémité 5' - terminale du m RNA de l'opéron tryptophane.
Des épingles à cheveux ou " hairpins " se développent sur l'extrémité 5' du m RNA entre des séquences répétées. Ces associations peuvent se faire de diverses manières possibles suivant la traduction.
L'association entre les séquences C et D mène à la création d'un signal de terminaison.
Si la traduction ne se fait pas, ces structures apparaissent entre les séquences A et B, C et D. (figure 4)
Dans le cas où on a un excès de tryptophane, l'association C D n'est pas démontée et la transcription stoppe avant le gène TrpE.
Par contre, si le tryptophane manque, les ribosomes qui suivent la polymérase vont rester bloqués au niveau de la séquence A.
La polymérase continue à se déplacer et un nouvel " hairpin " va se réaliser entre B et C. La conséquence de cette association est la disparition du terminateur car D ne pourra s'associer avec C. Ceci mènera la polymérase à continuer son action. (figure 4).
Ce système est en bonne logique avec la nécessité de produire le tryptophane s'il vient à manquer.
D'autres exemples existent comme la β - lactamase chez E.coli.

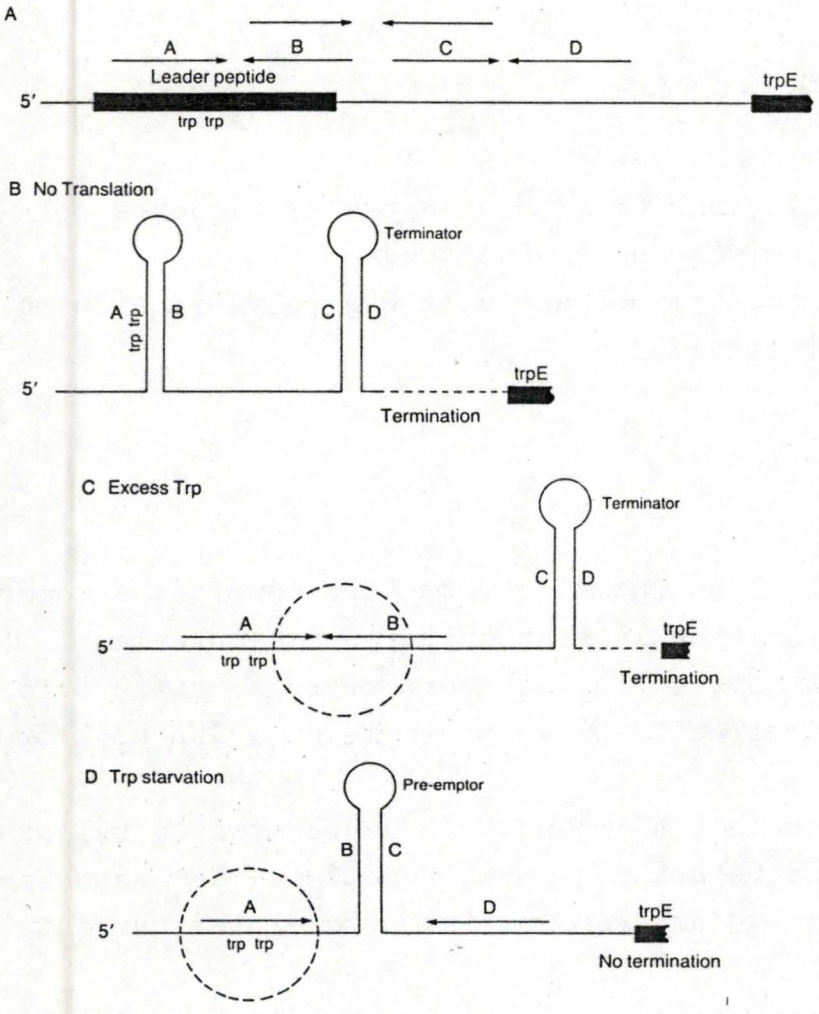


Figure 4: Mécanisme de l'atténuation de l'opéron tryptophane

a. structure
b. absence de traduction
c. traduction lors d'exc de tryptophane
d. traduction lors du ma que de tryptophane

(HIGGINS P16 réf 22)

= RIBOSOME

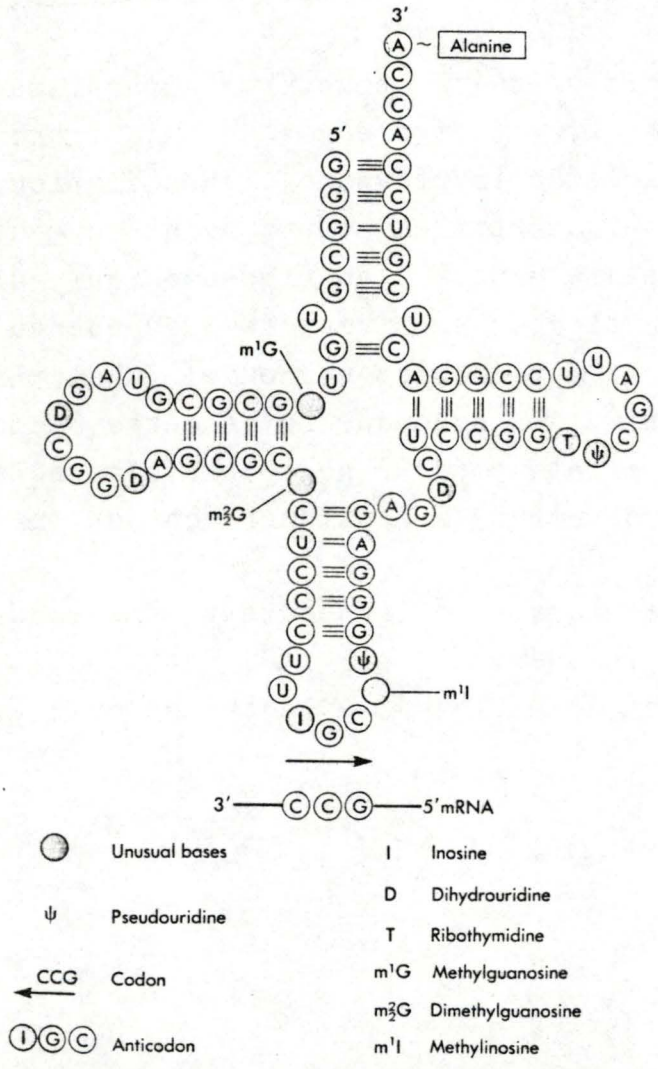


Figure 5: Séquence complèt du ^{t}RNA de l'alanine chez la levure (WATSON p384)

1.1.5. Stabilité du m RNA

Trois facteurs principaux peuvent influencer la stabilité du m RNA :

- la structure secondaire de la molécule elle-même.
  Les RNA stables adoptent un grand nombre de structures en épingles à cheveux, particulièrement dans leurs régions 3' et 5' non traduites.
  Ces structures assureraient une protection contre les exonucléases.
- les interactions entre le m RNA et les ribosomes.
  Ce rôle reste actuellement obscur.
- le clivage du m RNA par des endonucléases spécifiques.
  Celles-ci, en coupant le m RNA, l'exposeraient aux exonucléases.

1.2. Traduction

Il s'agit d'un processus beaucoup plus compliqué que la transcription. L'ARN m contient l'information nécessaire à la synthèse de protéines mais le lien entre les bases azotées et les acides aminés est difficile à entrevoir. D'où la nécessité d'un adaptateur : le ^{t}RNA ou ARN de transfert.

Les ^{t}RNA ont une structure secondaire en forme de feuille de trèfle. Ils comportent un grand nombre de bases modifiées, c'est-à-dire des bases de type A, G, C ou U mais qui comportent des groupements en plus, comme par exemple des groupements méthyles (CH_3). (figure 5)

En plus de cette structure secondaire, des interactions se produisent entre les bases donnant la structure tertiaire en forme de L.

Le ^{t}RNA va reconnaître le codon par une de ces extrémités (anticodon) et porte l'acide aminé y correspondant par l'autre extrémité, ce lien étant réalisé par un ^{t}RNA synthétase.

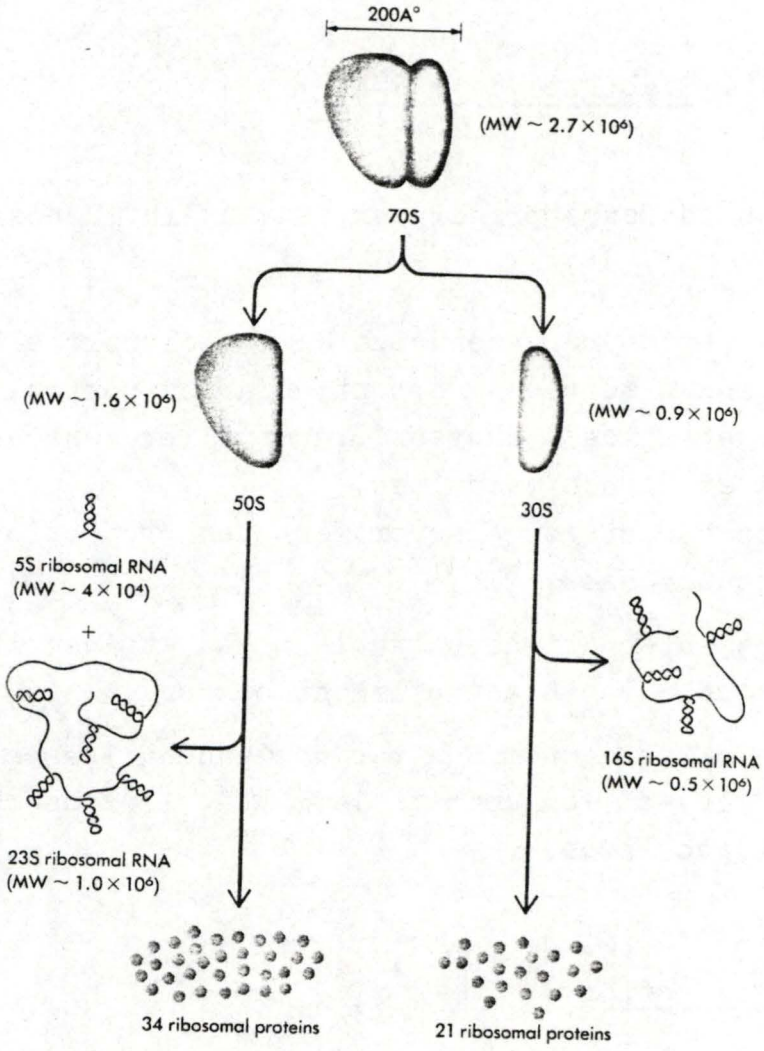


Figure 6: Structure du ribosome de E.coli.

(WATSON p394)

1.2.1. Le ribosome

Il est constitué de deux sous-unités (50 S ou grosse sous-unité et 30 S ou petite sous-unité). Chacune de ces sous-unités est constituée par des protéines ribosomiques qui sont structurées sur une charpente de RNA ribosomique (r RNA). (figure 6)

La grosse sous-unité comporte le 23 S r RNA et le 5 S r RNA alors que la petite sous-unité comporte le 16 S r RNA.
Ces trois molécules possèdent des structures secondaires assez conservées.

L'association des premières protéines avec l'ARN r engendre un changement de configuration de ce dernier. Ceci permet dès lors la fixation des protéines suivantes à l'ensemble. Celui-ci se modifie au fur et à mesure de l'assemblage, permettant l'association progressive de toutes les protéines pour former finalement le ribosome possédant une configuration spatiale déterminée.

Grâce à un système d'interactions entre les différents constituants du complexe ainsi formé, le ribosome va permettre la formation de liens peptidiques entre l'acide aminé apporté et la chaîne protéique naissante.

1.2.2. L'initiation de la traduction

1.2.2.1. Le codon d'initiation

Chez E.coli, la grande majorité des gènes utilise AUG comme codon d'initiation (97 %). Parfois, dans quelques rares cas (3 %), d'autres codons sont utilisés.

Le ^{t}RNA qui correspond à ce codon porte la méthianine qui est modifiée par l'adjonction d'un groupement formyl. Celui-ci sera enlevé lors de l'élongation.

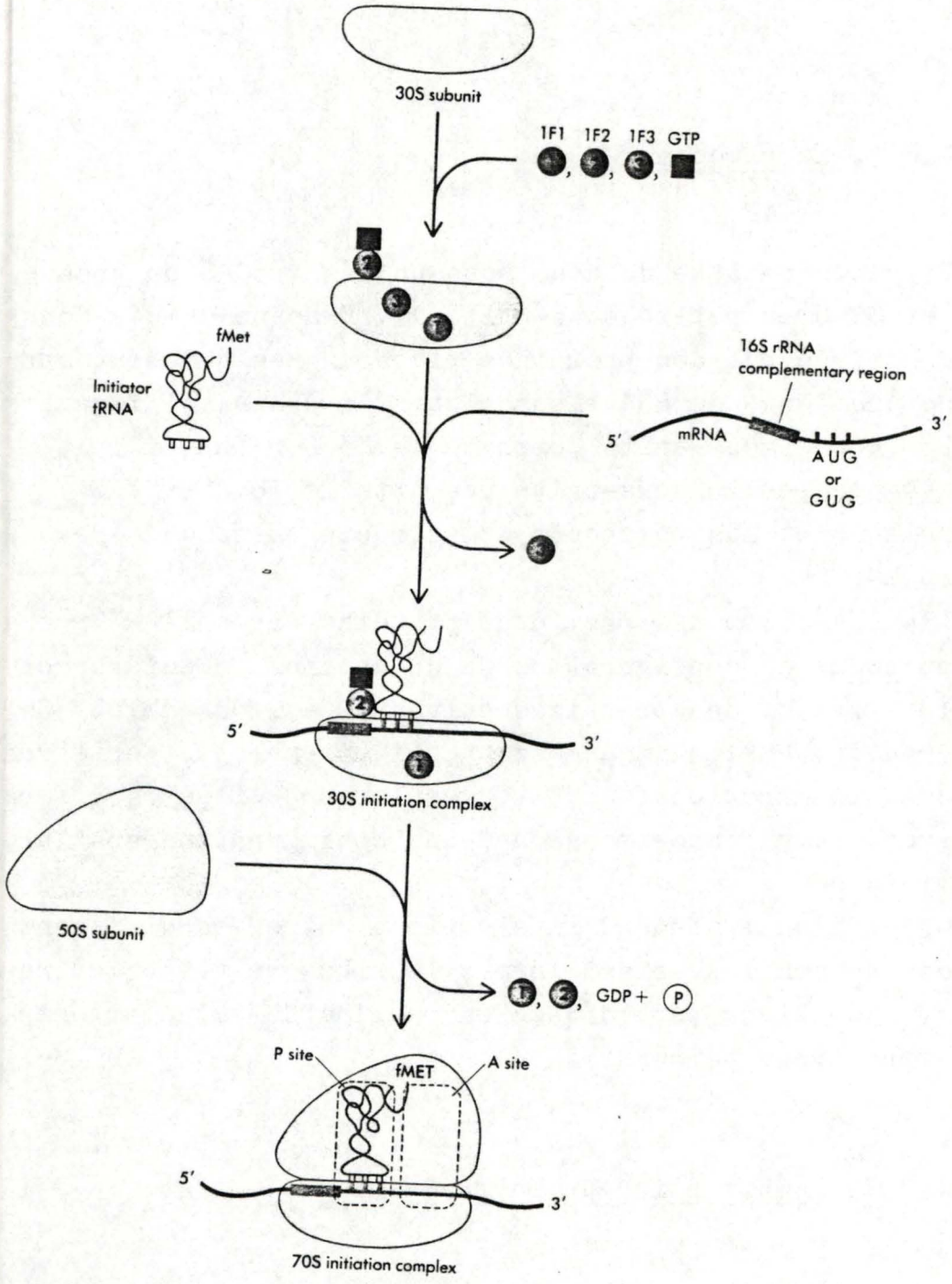
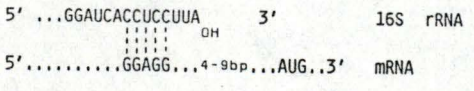


Figure 7: Initiation de la traduction (WATSON p412)

1.2.2.2. La séquence de Shine-Dalgarno

Le site de fixation du ribosome (S F R) ou séquence Shine-Dalgarno, est le signal qui dirige les ribosomes sur le m RNA et leur permet d'initier la traduction au codon correct.

Elle consiste en une séquence courte riche en purine qui est complémentaire à l'extrémité 3' du 16 S r RNA et localisée 3 à 13 nucléotides en amont du codon d'initiation chez E.coli.



(HIGGINS p 33)

Les régions d'initiation peuvent former des structures secondaires. Ces structures peuvent être favorables ou défavorables pour l'initiation optimale de la traduction.

Non seulement le degré de complémentarité du r RNA 16 S est important, mais aussi les séquences environnant immédiatement l'aire de complémentarité. Des altérations de ces séquences se répercutent sur le taux d'expression du gène.

La région de Shine-Dalgarno du m RNA apparaît donc comme le déterminant le plus important dans la sélection des sites par les ribosomes procaryotiques pour l'initiation de la synthèse protéique.

1.2.2.3. Les facteurs d'initiation

En plus des molécules évoquées, l'initiation requiert des facteurs d'initiation qui sont, chez E.coli, au nombre de trois : IF 1, IF 2, IF 3.

Dans une première étape, ces facteurs s'attachent à la petite sous-unité. Le GTP stabilise leurs liaisons via l'action de l'IF 2. IF 3 empêche l'association avec la S.U 50 S et favorise la liaison avec le m RNA, sans doute par un changement

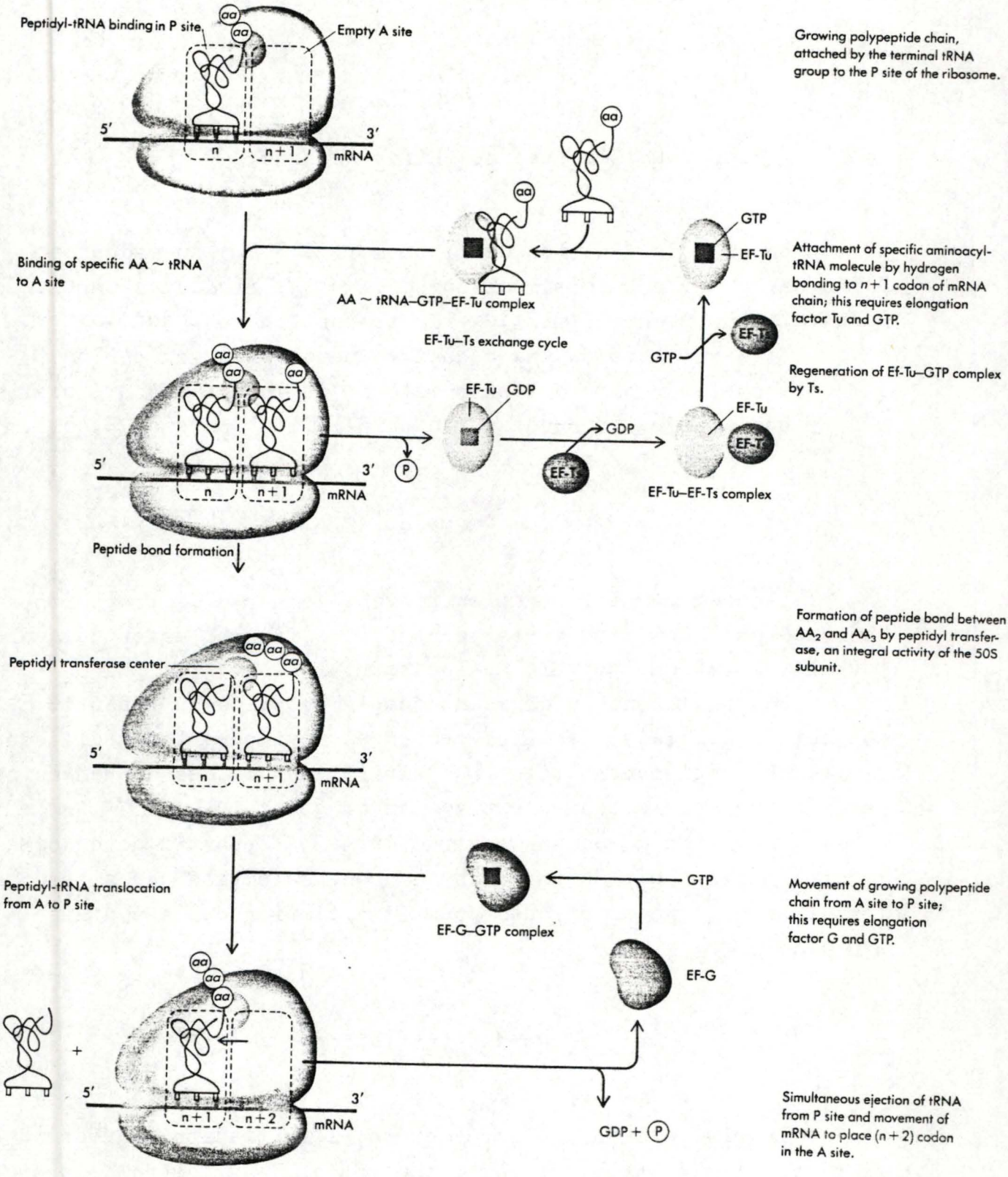


Figure 8: Elongation de la traduction (WATSON p414)

ERRATA

page 11, 26ème ligne, lire méthionine à la place de méthianine
page 17, 8ème ligne, lire externe à la place de esterne
page 18, 1ère ligne, lire milieu à la place de mileu
page 20, 20ème ligne, lire séquences-signal à la place de séquences-signals
page 26; 18ème ligne, lire pour à la place de par
page 26, 19ème ligne, lire Wickner à la place de Wicker
page 26, 28ème ligne, lire certains à la place de certians
page 28, 8ème ligne, lire maturé à la place de processé
page 30, 14ème ligne, lire structuraux à la place de structurels
page 30, 15ème ligne, lire où à la place de ou
page 30, 27ème ligne, lire clonée à la place de classée
page 31, 4ème ligne, lire clonée à la place de classée
page 32, 18ème ligne, lire proches de à la place de proche des
page 32, 23ème ligne, lire histidine jouait dans à la place de histidine dans
page 35, 3ème ligne, lire (22) à la place de (37)
page 35, dernière ligne, supprimer "d'une ARN polymérase"
page 35, figure 14, lire soulignés à la place de sulignés
page 43, 12ème ligne, lire pyranoside à la place de pyramoside
page 43, 18ème ligne, lire délétion à la place de délection
page 44, 2ème ligne, lire délétion à la place de délection
page 47, 15ème ligne, lire incubée à la place d'incubé
page 52, 2ème ligne, lire millilitre à la place de mililitre
page 65, 15ème ligne, lire au au lieu de ou
page 68, 28ème ligne, lire sans à la place de sar
page 68, figure 8, lire CCC_2 au lieu de L
page 72, 5ème ligne, lire test de constitutivité à la place de tests de ....
page 84, 5ème ligne, lire probabilité à la place de propabilité
page 84, 24ème ligne, lire des à la place de dse
page 84, 31ème ligne, lire 550 ng à la place de 550 mg
page 86, 13ème ligne, lire réinséré à la place de réintégré.

subtil de la configuration de la SU 30 S. IF 1 assiste IF 2 et IF 3.

Le ^{t}RNA ^{Met} vient se positionner sur le m RNA. IF 3 est ensuite relâché. C'est alors que la grosse sous-unité vient se joindre à l'ensemble. Ceci est résumé à la figure 7.

1.2.3. L'élongation

Au niveau du ribosome existent deux sites : le site P où va se positionner le ^{t}RNA ^{Met} et le site A où les ^{t}RNA suivants vont successivement venir se positionner.

Une fois les deux ^{t}RNA présents, le premier acide aminé est transféré sur l' aa du ^{t}RNA se trouvant au site A. Ceci se fait grâce à la peptidyltransférase. Il est a noter que l'entrée du ^{t}RNA au site A se fait grâce à un système où deux facteurs d'élongation interviennent : EF-Tu et EF-Ts (E.coli) (figure 8)

Ensuite, la chaîne naissante est alors transférée sur le ^{t}RNA $^{Met}_{1}$ se trouvant au site P via l'intervention du facteur EF - G souvent appelé translocase. (figure 8)

Il se produit également un déplacement de ce ^{t}RNA d'un codon sur le m RNA ainsi que l'expulsion du ^{t}RNA qui a libéré son aa.

Le site A vacant est prêt à accepter un nouveau AA-^{t}RNA. (figure 8)

1.2.4. La terminaison

Les codons stop pour l'arrêt de la traduction sont UAA, UGA et UAG. Chez E.coli, presque chaque site d'attachement au ribosome contient un ou plusieurs codons de terminaison comme UAA, UAG ou UGA en phase ou non avec le gène, localisé dans la partie codante ou avant le codon d'initiation. Atkins avait remarqué

qu'on trouvait souvent les codons stop UAA et UGA (mais jamais UAG) dans une région de 15 nucléotides en amont des codons d'initiation.

Un autre facteur est nécessaire : la présence d'une protéine appelée " facteur de libération " (Release factor, RF).

1.2.5. L'usage des codons

Chez E.coli, l'usage des codons peut avoir une relation avec l'expression d'un gène. Différents groupes de codons synonymes sont utilisés dans le cas où le gène est exprimé faiblement ou fortement.

De manière générale, les gènes hautement exprimés comportent très peu de codons qui sont reconnus par des ^{t}RNA isoaccepteurs mineurs alors que des gènes faiblement exprimés tendent à avoir une plus grande proportion de ces codons rares.

Les modifications différentielles des ^{t}RNA pourraient jouer un rôle majeur dans la régulation de l'expression mais cela n'a pas été établi complètement.

Enfin, pour qu'un gène d'un autre organisme puisse s'exprimer fortement, il faut par conséquent que les codons qu'il comporte correspondent aux codons majeurs utilisés le plus souvent dans le micro-organisme hôte.

1.2.6. Régulation autre que par les signaux

Toute molécule qui peut se lier à un m RNA spécifique à proximité du site de fixation du ribosome pourrait potentiellement réguler la traduction de ce m RNA en inhibant la fixation du ribosome.

L'exemple des protéines ribosomiques est typique. Les gènes codant pour celles-ci sont organisés en opéron où une pro-

téine clef exerce un mécanisme de feedback.

Les r RNA et les sites de régulation sur les m RNA des protéines ribosomiques adoptent des structures secondaires similaires qui fonctionnent comme des sites de fixation pour les protéines ribosomiques régulatrices.

Cependant, l'affinité de celles-ci pour le r RNA est plus grande que celle pour les m RNA (sites de régulations).

Lorsqu'il y a un excès de protéines ribosomiques, celle-ci ne pourra plus être incorporée dans les ribosomes et sera capable de se fixer au site régulateur du m RNA correspondant, ce qui inhibera la traduction de cette même protéine.

Un autre type de régulation a récemment été mis en évidence : les RNA antisense(51).

Cette régulation implique, à la base, la synthèse d'un produit de transcription de petite taille qui ne code pas pour une protéine mais qui a un haut degré de complémentarité avec un deuxième RNA permettant une hybridation des deux RNA.

Un tel type de mécanisme n'est pas limité à la régulation de la traduction mais s'étend à la régulation de la réplication et de la transcription.

Bien que ce type de régulation soit mieux connu chez les procaryotes, des systèmes analogues existent chez les eucaryotes.

L'élément transposable Tn 10 rend compte d'un pareil mécanisme. Quand une copie du Tn 10 est présente sur le chromosome bactérien, un taux normal de transposition, de délétion et d'inversion est observé, mais une nette diminution dans ce processus se produit quand un plasmide à grand nombre de copies portant IS 10 est présent dans la même cellule. IS 10 est la partie qui code pour les fonctions de transposition. Ce phénomène est appelé " inhibition multicopie ".

La région critique, responsable de cette inhibition, contient deux promoteurs : un pour le m RNA de la transposase (p IN) et l'autre pour un petit m RNA antisense(p OUT).

La figure ci-après reprend ces données.

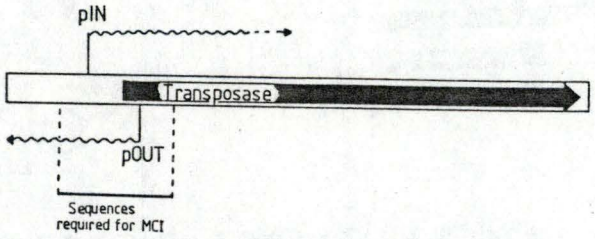


Figure 9 : Structure de l'éxtrémité droite de l'IS-10 (HIGGINS p 40)

Le RNA - OUT (produit à partir de p OUT) contient une série de 35 - 36 bases qui est exactement complémentaire à une région du RNA - IN comportant la Shine - Dalgarno et le codon d'initiation de la traduction.

2. Mécanismes de sécrétion chez les bactéries

2.1. La paroi bactérienne

La paroi est l'enveloppe externe de la bactérie. Son rôle est essentiellement un rôle de protection.

Sa grande rigidité confère à la bactérie sa forme caractéristique, du fait que la cellule bactérienne est souvent exposée à des conditions hypotoniques. Cette résistance est dûe à la présence de la muréine qui est composée de chaînes de sucres aminés reliés par de courtes chaînes peptidiques. On parle également de peptidoglycan.

Un réseau se forme qui assure une certaine rigidité. Les bactéries sont classiquement divisées en organismes gram positifs et gram négatifs suivant leur coloration gram.

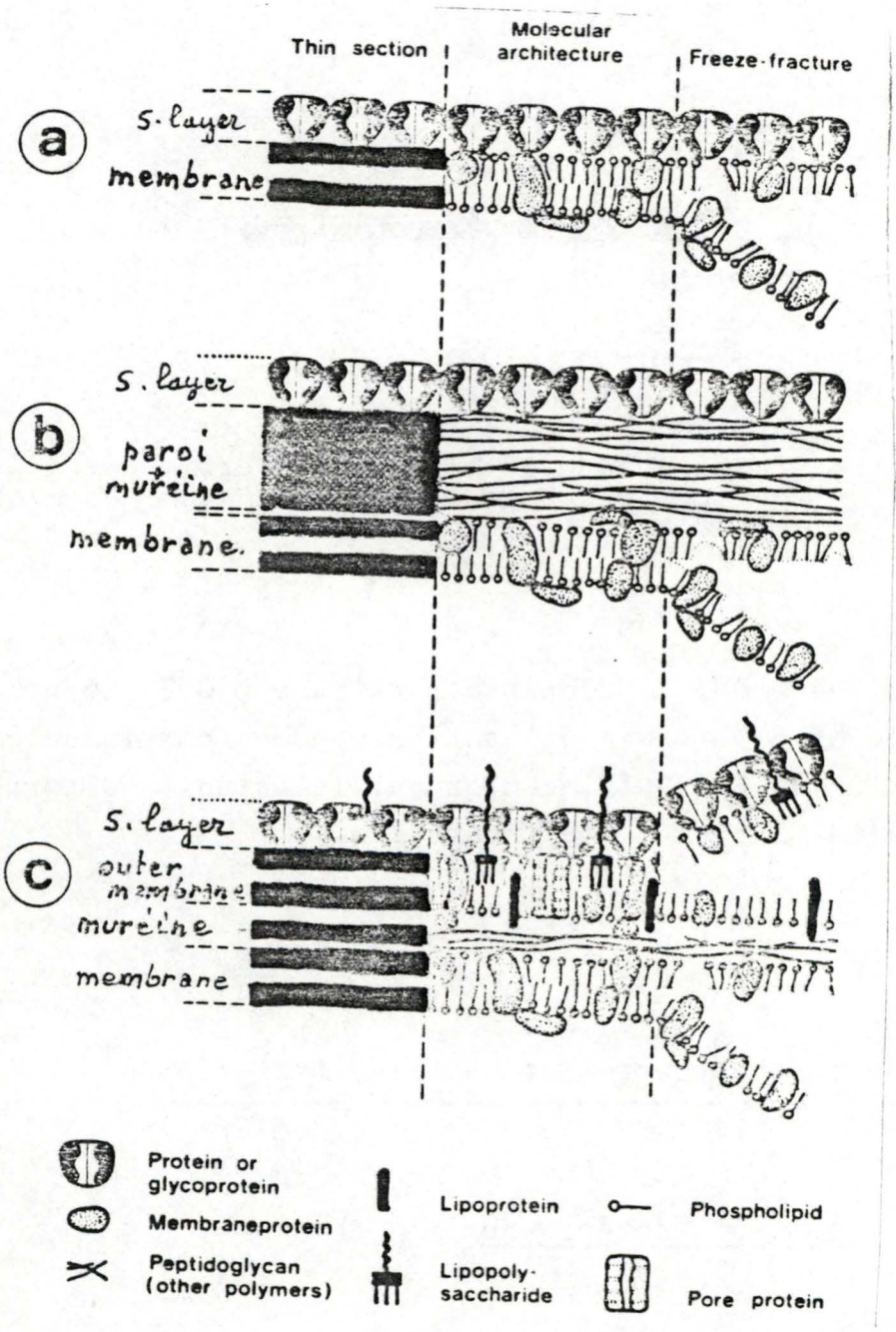


Figure 10 : Parois bactérienes.

a. archébactéries
b. gram positives
c. gram négatives

(DEPELCHIN réf 15)

2.1.1. Paroi des gram négatives

La membrane interne est constituée de phospholipides et de structure analogue à une membrane de cellule supérieure.

Au-dessus se trouve la paroi proprement dite qui offre une structure stratifiée complexe.

La couche rigide de la paroi est constituée de la muréine pure juste au-dessus de la membrane interne. Enfin, recouvrant la couche rigide, l'enveloppe esterne est composée d'une structure à double feuillet très semblable à celle de la membrane interne. Cette enveloppe est composée principalement de lipopolysaccharides et de lipoprotéines. Ce sont des lipopolysaccharides qui portent la spécificité antigénique de la bactérie.

Chez E.coli, la couche de muréine est intimement associée à l'enveloppe externe. Le peptidoglycan est séparé de la membrane cytoplasmique par l'espace périplasmique.

La figure 10 reprend la structure des parois des gram - et gram + dont je vais parler maintenant.

2.1.2. Paroi des gram positives

Les bactéries gram positives ont une paroi épaisse, d'un aspect relativement homogène. Elle est composée essentiellement de muréine et d'acide téichoïque (polysaccharide phosphorylé), en proportions à peu près égales. Ces deux composants sont intimement mêlés et ne forment apparemment pas de couches distinctes.

L'absence d'une membrane externe (en dehors des protéines de surface) explique la fragilité plus grande des grams + à certains agents chimiques.

2.1.3. Protéines majeures de la membrane externe chez E.coli

La membrane externe est avant tout une barrière sélective

vis-à-vis du mileu environnant. Le passage à travers la membrane externe de substances nécessaires à la croissance bactérienne est assurée par les protéines de cette membrane.

Parmi celles-ci, les porines assurent le passage des molécules hydrophiles de masse moléculaire inférieure à environ 600.

Il s'agit de Omp C, Omp F, Pho E et Nnp C. D'autres permettent le passage par exemple de la vitamine B 12 (btu B) ou des nucléosides (tsx). On peut encore citer le gène lam B qui sert au passage spécifique du maltose et du maltotriose.

Par protéines majeures, on considère souvent les deux protéines Omp C et Omp F. Celles-ci sont chimiquement semblables mais elles sont les produits de gènes différents. (78)

Quatre loci génétiques au moins semblent impliquées dans la synthèse de ces protéines : Omp C, Omp F, Omp R et env Z. Omp R et env Z ne sont pas des gènes de structure mais sont impliqués dans la régulation de Omp C et Omp F.

L'importance des protéines Omp F et Omp C dans la membrane externe d'Escherichia coli (K 12) est affectée différemment par de fortes concentrations de substances tel que le sucrose, de telle manière qu'une diminution dans la quantité de Omp F paraît être compensée par un accroissement réciproque de Omp C.

Il a été mis en évidence (47) que le sucrose dans le milieu régule l'expression du gène Omp F, qui à son tour régule l'expression du gène Omp C au niveau transcriptionnel.

2.2. Transport des protéines chez les bactéries

2.2.1. Généralités

Les protéines exportées sont presque toutes synthétisées, dans un premier temps, sous la forme de précurseurs comportant une séquence signal du côté NH 2- terminal.

Cette extrémité sera clivée de façon protéolytique par une peptidase signal durant l'exportation.

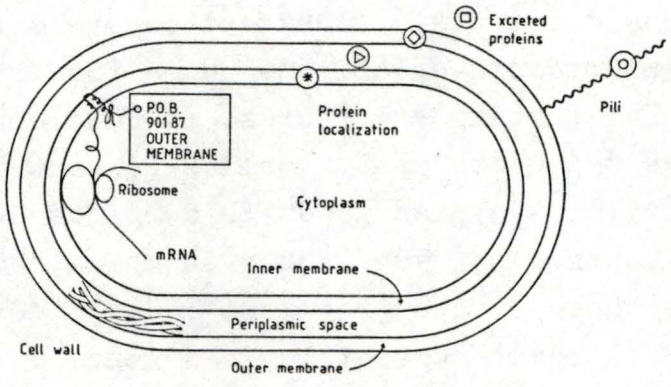


Figure 11: Sous-localisations des protéines chez E.coli

(SJÖSTRÖM fig 2 réf 60)

Des mécanismes fort semblables semblent être utilisés par les procaryotes et les eucaryotes. Le fait que les bactéries exportent différentes protéines sécrétées d'eucaryotes et inversément, est en faveur d'un processus qui aurait été conservé à travers l'évolution.

Une série d'exemples seront développés à la fin de ce chapître.

Chez E.coli et d'autres bactéries à gram négatifs, les protéines peuvent être exportées vers trois localisations non cytoplasmiques : la membrane interne, l'espace périplasmique et la membrane externe. (figure 11)

Les protéines destinées aux pilis sexuels ne sont pas séparées de la localisation " membrane externe ".

Les protéines destinées à la membrane externe et au périplasme seraient exportées via le même chemin.

La sécrétion, c'est-à-dire le transfert effectif et le relâchement de protéines dans le milieu de culture, est exceptionnelle chez E.coli.

La distinction entre les protéines solubles dans l'eau (périplasmiques et extra-cellulaires) et les protéines de la membrane externe est probablement renforcée par des séquences supplémentaires qui reconnaissent certains sites de par leurs préférences intrinsèques pour des environnements respectivement aqueux ou lipidiques.

En ce qui concerne le genre Bacillus, la sécrétion n'est pas encore bien connue. (57)

Les principaux types de protéines exportées chez Bacillus sont les α - amylases et les protéases. Un chapître sera consacré plus particulièrement aux α - amylases de Bacillus.
La sécrétion se fait sans doute à l'intervention de processus fort semblables à ceux admis pour les procaryotes et les eucaryotes.

La structure générale de l'extrémité N-terminale se conforme bien avec la structure générale des peptides-signaux clivables des autres procaryotes. La longueur moyenne du peptide est grande, habituellement entre 30 et 40 résidus, si l'on compare avec la longueur moyenne (22 résidus) chez les gram - et les eucaryotes.

La protéase alcaline et la protéase neutre de B. subtilis et B. amyloliquefaciens ont révélé un nouvel aspect des protéines sécrétées. En effet, l'existence d'un propeptide en plus d'un peptide signal a été mise en évidence. Ce propeptide a, semble-t-il, d'autres fonctions ou rôles non élucidés que les peptides signaux ordinaires.

Parmi les protéines exportées chez les Bacilles, une classe unique de protéines reste attachée à la membrane externe après leur translocation par une moitié lipidique attachée de manière covalente. Un rôle probable attribué à ces protéines, est qu'elles pourraient augmenter la résistance à un antibiotique, par exemple du fait de la proximité de l'enzyme vis-à-vis de la bactérie. Aucune enzyme semblable à la peptidase signal de E.coli n'a encore été identifiée chez Bacillus. Par contre, toute une série de protéases qui permettent de modifier les protéines sécrétées sont présentes.

Ceci laisse penser qu'un système un peu modifié à ce niveau existe chez les bacilles.

2.2.2. La séquence signal

Les séquences - signals provenant de sources diverses, que ce soient eucaryotes ou procaryotes, ont un nombre de similarités structurelles qui leur permettent apparemment de fonctionner au-delà de barrières phylogénétiques distantes.

A partir d'un ensemble de séquences de peptides-signaux (eucaryotes et procaryotes), trois régions fonctionnelles ont pu être mises en évidence.: (60), (70), (78)

1. une partie N - terminale hydrophile avec un ou plusieurs acides aminés basiques (arg, lys).
   Cette partie est donc chargée positivement.

2. une partie médiane avec essentiellement des acides aminés hydrophobes : au moins 8 résidus hydrophobes ou neutres ont tendance à former une hélice.

3. une extrémité C où les trois derniers acides aminés définissent le site de clivage de la peptidase. La séquence la plus courante qui précède ce site est Ala - X - Ala.

Les résidus chargés positivement peuvent former le contact initial précurseur - membrane en interagissant avec des charges négatives (phospho lipides) de la face interne de la membrane; quant à la partie hydrophobe, elle peut s'insérer dans la membrane.

La région N est très variable en termes de longueur et de composition en aa (70). Cependant, la charge positive reste constante quelle que soit la longueur.

Quant à la région H, l'hydrophobicité semble être le principe gouvernant. Des travaux effectués chez E.coli ont montré l'existence de mutants qui empêchent l'exportation de la " Maltose binding protein " (MBP). Ces mutants ont révélé des altérations dans la région H.: le changement d'un seul acide aminé hydrophobe ou non chargé, par un acide aminé chargé est suffisant pour bloquer le processus de sécrétion (5).

Des résultats analogues ont été obtenus pour le récepteur du phage λ (toujours chez E.coli) (18).

Est-ce que le peptide-signal suffit à l'exportation de protéines ?

Des arguments sont pour et d'autres contre.
Chez E.coli, la fusion du gène codant pour la β - galactosidase (cytoplasmique) avec le promoteur suivi de la séquence signal du gène codant pour lam B (membrane externe) conduit à la production d'une protéine qui reste localisée au niveau cytoplasmique. (36). Logiquement, on s'attendrait à retrouver la protéine dans une localisation autre que cytoplasmique.

A côté de cet argument négatif, il existe à l'inverse des cas où la fusion d'un peptide signal avec une protéine à localisation cytoplasmique conduit à une exportation.

Chez E.coli, le gène codant pour la β - lactamase qui confère à la bactérie la résistance à l'ampicilline, a été fusionné à un peptide signal (ainsi qu'au promoteur le précédant) d'un

gène de levure.

Les souches de E.coli ont été rendues résistantes à l'ampicilline en permettant à la β-lactamase d'atteindre l'espace périplasmique qui est le lieu normal d'action de l'enzyme. (56).

Est-ce que la séquence signal contient les informations nécessaires à la sous-localisation de la protéine qui lui correspond ? Je vais ici m'intéresser aux gram - et plus particulièrement à E.coli où diverses sous-localisations sont possibles : périsplasme, membrane interne, membrane externe, excrétion.

Par des techniques de fusions de gènes, on en est venu à la conclusion que l'information qui détermine l'ultime localisation d'une protéine de la membrane externe est localisée dans la séquence structurale de la protéine et pas dans la séquence signal.(64)

Toutefois, une analyse a récemment été effectuée dans le but de distinguer différentes classes de peptides-leader (en fonction de propriétés physico-chimiques) qui correspondraient aux diverses sous-localisations (60) chez E.coli. Une telle distinction a été mise en évidence. Cela signifie en clair que les peptides signaux précédant des protéines périplasmiques, par exemple, ont des propriétés physico-chimiques proches. De la même manière, ces propriétés sont proches pour des peptides signaux précédant des protéines de la membrane externe.

La nature du peptide leader parait donc avoir de l'importance mais ce n'est pas suffisant. La localisation finale tiendrait compte en plus de l'hydrophobicité des protéines ainsi que des séquences " ancres " qui stopperaient le déplacement de la protéine.

2.2.3. La peptidase signal

Il a été démontré qu'E.coli avait au moins deux peptidases signal différentes.: la peptidase signal I (S P ase I) ou " leader peptidase " et la peptidase signal II (S P ase II) ou " lipoprotein signal peptidase ". La S P ase I clive le précurseur de toute une variété de protéines périplasmiques et de la membra-

ne externe.

Le S P ase II clive uniquement le précurseur modifié de la lipoprotéine. Toutes les deux sont localisées dans la membrane interne avec leur site d'action probablement exposé à la surface externe.

Afin de prévenir une accumulation de peptides-signaux dans la membrane plasmique, il existe chez E.coli au moins une peptidase de la membrane (peptidase IV), capable de dégrader les peptides-signaux quand ils ont été clivés du précurseur. (78)

2.2.4. Protéines exportées sans clivage ou sans présence d'une séquence signal au NH2-terminal du précurseur

Au lieu d'une séquence signal NH2-terminale classique, l'ovalbumine par exemple, contient une séquence signal interne.

Bien que cette protéine soit exportée d'une façon ineffective dans le périplasme de E.coli, cela démontre que cette séquence interne est quand même reconnue par E.coli .

Dans le cas de la Pld A phospholipase, où il n'y a pas d'étape de clivage de la séquence NH2-terminale, la localisation de la protéine peut être variable. (78)

2.2.5. Modèles d'exportation des protéines

2.2.5.1. Hypothèse du signal

C'est l'hypothèse généralement acceptée aujourd'hui. Il s'agit d'un modèle simplifié qui n'explique pas toutes les données actuelles que l'on possède en ce domaine. (6)

D'après ce modèle, la traduction du m RNA, pour les protéines exportées, est initiée par des ribosomes solubles dans le cytoplasme.

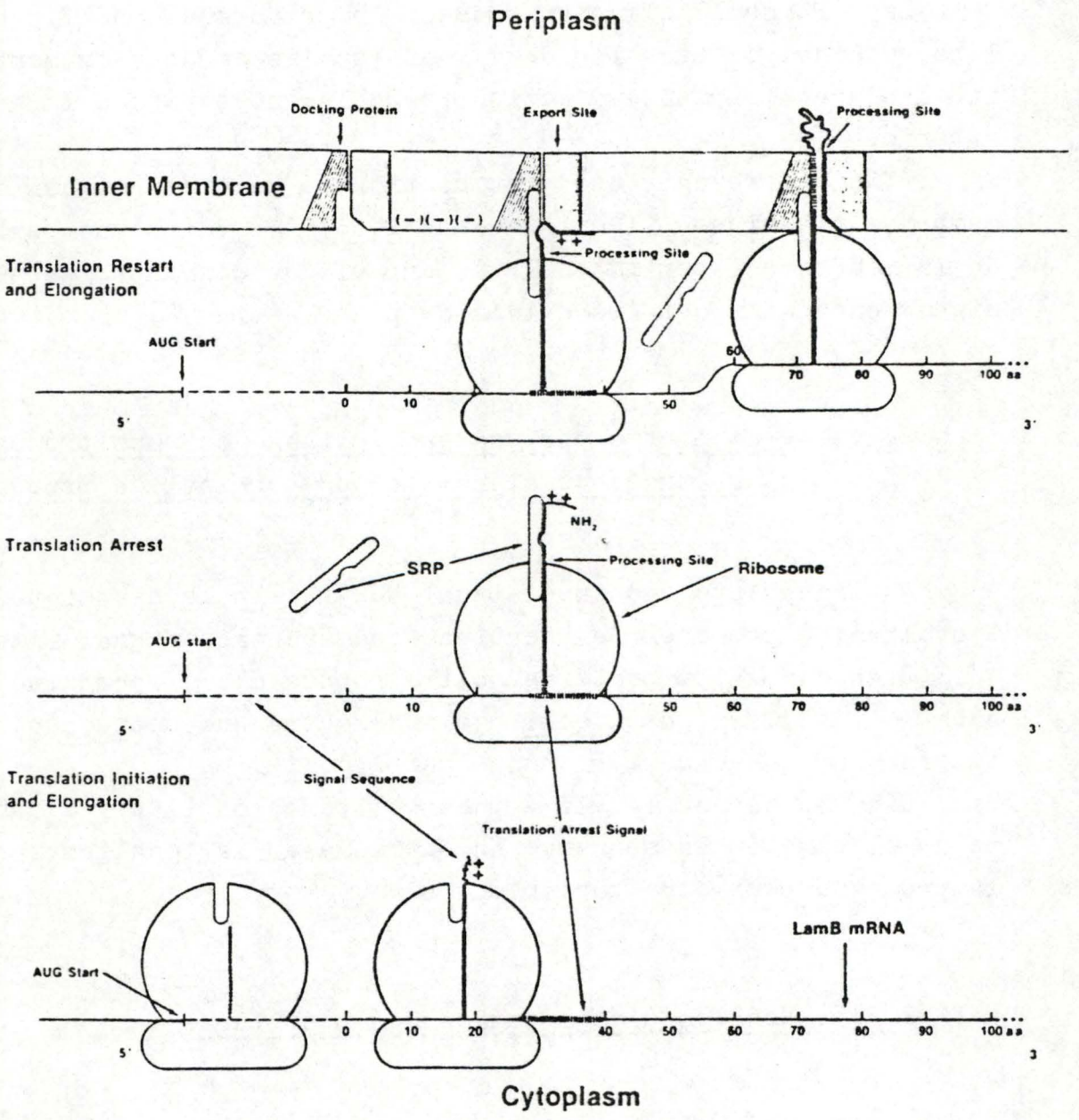


Figure 12: Description schématique des premières étapes dans l'exportation des protéines. (BENSON p101 réf 6)

La traduction se poursuit jusqu'à ce que la séquence-signal émerge de la grosse sous-unité ribosomique. (figure 12)

A ce niveau, la séquence-signal est reconnue par un composant de la machinerie cellulaire d'exportation, appelé " signal recognition particle " (SRP), qui est composée de six protéines différentes ainsi que de 7S RNA (eucaryotes).

La SRP se lie à la séquence-signal et stoppe la traduction. L'arrêt est maintenu jusqu'à ce que le polymérase diffuse vers la membrane où une interaction avec un autre composant de la machinerie se produit; il s'agit de la " docking protein" ou récepteur SRP. Cette interaction permet la reprise de la synthèse.

La séquence signal s'accole à l'intérieur de la double couche de lipides (phospholipides) et un site d'exportation se forme.

Ce site semble être composé de protéines non encore découvertes La SRP et la " docking protein " ne font pas partie de ces sites et sont libérées à ce point pour fonctionner à nouveau.

Comme la synthèse se poursuit, la chaîne naissante est transférée à travers la membrane. Pour les protéines sécrétées chez les cellules eucaryotes et pour les protéines périplasmiques (bactéries gram -), ce transfert continue jusqu'à ce que la protéine soit déchargée à l'opposé de la membrane.

Ce modèle donne une prédiction très claire concernant le mécanisme qui couple l'exportation et la traduction, et postule que l'exportation se fasse de façon cotraductionnelle.

Le 7 S RNA interviendrait suivant un des deux modèles suivants

- soit le RNA 7 S pourrait avoir un rôle structural et servirait de charpente pour les protéines SRP (analogie avec ribosomes).
- soit le RNA 7 S pourrait être impliqué dans des interactions avec d'autres acides nucléiques.

Enfin, les 7 S RNA sont très bien conservés à travers l'évolution. Le modèle du signal a été étendu dans le but d'expliquer plus particulièrement la biosynthèse de protéines membranaires

complexes. (73)

A ce niveau, deux modèles ont été avancés :(54)

1° Le modèle d'insertion séquentielle

2° L'hypothèse du tunnel amphipathique

Le premier modèle postule l'existence d'un autre type de séquences dans une seule chaîne polypeptidique qui déterminerait la localisation de la partie suivante de la chaîne naissante : les séquences stop de transfert. Ces séquences déclencheraient un stop de translocation, c'est-à-dire qu'elles auraient l'effet inverse d'une séquence-signal. Il est même postulé dans ce modèle que plus d'un peptide signal pourrait être présent dans une seule chaîne polypeptidique. En supposant la présence alternée de séquences-signal et stop de transfert, le polypeptide serait incorporé par étape à la suite d'initiation et de terminaison de translocation répétées.

L'information structurale de la bactériorhodopsine nécessiterait une telle alternance pour au moins 7 hélices.

La seconde hypothèse est basée sur la prédiction que les protéines transloquées se plient dans l'état le plus stable thermodynamiquement comme cela se produit pour les protéines solubles.

Si les charges ne peuvent être compensées ou que des ponts hydrogènes ne peuvent être formés, le polypeptide est expulsé de la membrane. Par contre, si les charges peuvent être neutralisées par des liaisons ioniques et que des ponts hydrogènes peuvent se former de telle manière qu'une structure stable puisse se former dans l'environnement hydrophobe, la protéine sera retenue dans la membrane.

Cette hypothèse diffère de la précédente dans le fait que la présence de seulement une séquence signal est nécessaire.

Ce modèle semble plus simple dans sa conception et explique mieux certains cas de protéines exportées que le modèle d'insertion séquentielle. Des arguments sont en faveur de l'hypothèse du tunnel amphipathique mais je ne les développerai pas dans le cadre

de ce travail.

2.2.5.2. " Membrane trigger hypothesis "

Un autre modèle a été proposé par Wickner. Cette hypothèse est basée sur des expériences faites sur la protéine de manteau du phage M 13. La protéine majeure de manteau est synthétisée comme un précurseur, libre dans le cytoplasme et elle est insérée dans la membrane interne de E.coli quand la synthèse protéique est terminée.

Le passage à travers la membrane lipidique et l'élimination de la séquence signal exige un potentiel électrochimique de la membrane. Le rôle de la séquence signal NH 2- terminale n'est pas de servir d'intermédiaire dans l'attachement du polypeptide naissant à la membrane, mais plutôt de donner une conformation au précurseur qui le rendrait liposoluble. Celui-ci s'associerait avec la membrane cytoplasmique. Une force motrice, couplée au transport de protons, effectue l'insertion dans la membrane lipidique.

Ce modèle a été adapté par d'autres protéines que la protéine majeure de manteau de M 13. Wicker a proposé que le polypeptide naissant changerait de conformation lors du contact avec la membrane et que le transport ne se ferait pas entièrement de façon posttraductionnelle comme il avait été décrit pour la protéine majeure de manteau de M 13.

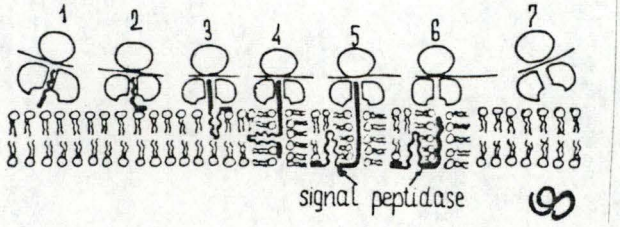
Un modèle similaire a été développé pour la translocation de la " leucine binding protein " de E.coli qui, elle, est périplasmique.

2.2.5.3. Autres hypothèses

Certians auteurs considèrent qu'il peut y avoir deux modes d'exportation des protéines. Certaines protéines seraient expor-

tées de façon cotraductionnelle, d'autres de façon posttraductionnelle , suivant les conditions prédominantes au moment de la synthèse. On peut citer également cette hypothèse : (39)

Le peptide signal permettrait une réorganisation de la double couche de phospholipides dont les têtes polaires formeraient un canal permettant à la chaîne peptidique naissante de passer à travers la membrane; une peptidase clivant la séquence signal après passage.



(NESMEYANOVA fig 1 réf 39)

2.2.6. Mutants d'exportation chez E.coli

Beaucoup de mutants d'exportation ont été décrits et étudiés. Cependant, on ne comprend pas toujours la relation entre leur génotype et leur phénotype.

La distinction entre les mutations qui empêchent l'exportation d'une protéine et les mutations qui empêchent la fonction ou la synthèse de cette protéine est difficile à faire.

En effet, on est forcé d'utiliser d'autres méthodes biochimiques comme l'accumulation cytoplasmique du précurseur de la protéine du fait de l'absence de phénotype spécifique à la déficience d'exportation. Même cette méthode n'est pas toujours valable

car il peut parfois s'agir uniquement d'une altération de la membrane interne.

2.2.6.1. Mutations définissant une information intragénique d'exportation

Des mutations non-sens de la protéine périplasmique Mal E (Maltose binding protein) ont été étudiées.

Une de ces mutations conduit à la production d'un peptide complet à 90 % qui est exporté et processé normalement. Un autre mutant produit un peptide complet à 30 % qui est exporté du cytoplasme mais n'est pas relâché sous forme soluble dans le périplasme.

Des résultats analogues ont été obtenus avec des mutants de l'enzyme périplasmique β - lactamase de E.coli (Bla).

Si l'on considère que les mutations par substitution de base changent un acide aminé dans la séquence signal, trois classes de mutations de la séquence signal peuvent être identifiés :(6)

1. Les mutants de classe I provoquent un blocage sévère de l'exportation (plus de 95 %) par l'introduction d'une charge dans le noyau hydrophobe.
   Ces mutations empêcheraient la reconnaissance par la SRP et inhiberaient aussi l'interaction entre la protéine SRP et la membrane.

2. Les mutants de classe II bloquent l'exportation à différents degrés et peuvent faire varier le niveau d'exportation ou le niveau de maturation ou les deux. Il n'y a pas encore d'explication pour cette classe de mutants.

3. Les mutants de classe III diminuent le taux de traduction plutôt que de provoquer une déficience prononcée d'exportation. Ceci met en évidence le fait qu'il

pourrait y avoir un mécanisme couplant la synthèse et l'exportation.
Ces mutations semblent être confinées aux codons qui spécifient les acides aminés basiques définissant la limite entre la portion NH 2 - terminale hydrophile et le noyau hydrophobe de la séquence signal.
Ces mutants diminuent la synthèse en ne permettant pas la reprise de la traduction après l'arrêt imposé par la protéine SRP.

2.2.6.2. Mutations d'exportation pléiotropiques

La mutation per A qui diminue l'expression de la phosphatase alcaline (enzyme périplasmique) a été identifiée. Par contre, la β - galactosidase (enzyme cytoplasmique) ne voit pas son expression diminuée. Il n'est pas encore clair que cette mutation affecte la régulation de la synthèse de la protéine ou de la sécrétion. A noter que cette mutation per A est située dans le gène env Z qui est impliqué dans la régulation des porines Omp C et Omp F.

De la même manière, une mutation exp A a été identifiée. Elle diminue l'expression des gènes qui spécifient dix protéines périplasmiques et une protéine de la membrane externe. On ne sait pas s'il s'agit d'une mutation qui affecte la synthèse ou l'exportation.

2.2.6.3. Suppresseurs spécifiques

Une approche alternative est de sélectionner la restauration d'un phénotype dans un mutant qui porte un défaut d'exportation.

A titre d'exemple, mentionnons les suppresseurs de sec Ats.

Sec A est un gène qui intervient dans l'exportation chez E.coli. Des mutants sec A^{ts} ont été découverts. Dans chaque cas, à la température non permissive (à 37° C), la traduction des protéines périplasmiques et de la membrane externe est bloquée alors que la synthèse de protéines non exportées reste tout à fait normale.

Récemment, des mutations suppressives ont été mises en évidence, qui permettent aux mutants sec A^{ts} de se développer à 37 ° C et qui permettent également la sécrétion de protéines.

Ces mutations sont localisées aux loci prl A et sec C déjà connus et à 5 nouveaux loci : ssa D, ssa E, ssa F, ssa G et ssa H. (44)

Les produits protéiques de ces gènes suppresseurs pourraient être des composants structurels de la machinerie de sécrétion ou ils pourraient affecter la sécrétion en régulant l'activité de sec A.

2.2.6.4. Conclusion

A partir de toutes ces données, il est difficile à l'heure actuelle de dégager des conclusions, tant les informations sont abondantes et complexes.

La mutagénèse in vitro pourrait fournir des moyens supplémentaires à cette étude.

2.2.7. Applications

Au-delà de l'étude des mécanismes fondamentaux de la sécrétion (chez les eucaryotes et les procaryotes), des applications thérapeutiques peuvent être avancées.

Une streptokinase de Streptococcus equisimilis a été classée chez E.coli et celle-ci a été retrouvée dans diverses localisations

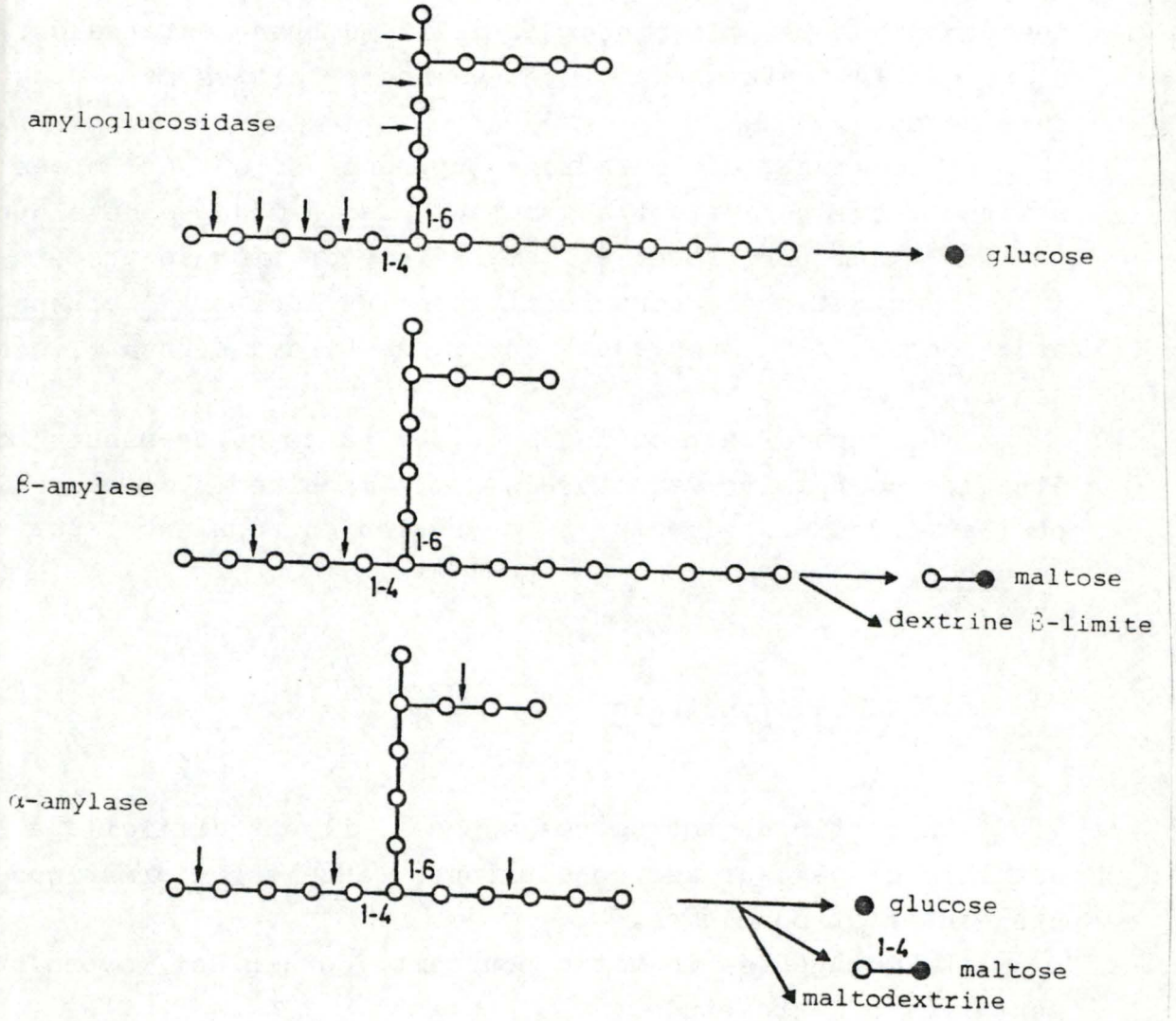


Figure 13 : Dégradation de l'amidon par les amylases(exoenzymes: amyloglucosidases et β-amylases;endoenzymes :α-amylase Les flèches indiquent les sites probables de clivage. ○ :unité de glucose ,● :unité de glucose avec une extrémité réductrice.

(WILLEMOT p3 réf 78)

(périplasme ...). (34)

En tant que médicament, la streptokinase a une place dans la thérapie thrombolytique.

La proinsuline humaine a été classée également chez E.coli en fusionnant le gène de la proinsuline avec le peptide signal de l'ampicillinase. La protéine a été retrouvée dans l'espace périplasmique.(7)

Sa production en quantité adéquate semble faisable.

3. Données sur les α - amylases

3.1. Amylases : types et mode d'action

Avant de décrire les amylases, il convient d'expliquer brièvement la structure du substrat. L'amidon est composé d'amylose et d'amylopectine et deux types de branchements peuvent être observés : les liens α-1,4 et les liens α -1,6, ces derniers étant moins fréquents et nécessitant des enzymes débranchantes comme les amyloglucosidases.

Quatre classes d'enzymes amylolytiques sont distinguées : les exoenzymes qui clivent séquentiellement à partir de l'extrémité réductrice (β amylases et amyloglucosidases), les endoenzymes qui hydrolysent les liens α -1,4 à n'importe quel endroit, auxquelles appartiennent les α - amylases, les enzymes débranchantes et les enzymes produisant des cyclodextrines.

La figure 13 représente l'action de trois enzymes : l'amyloglucosidase, la β -amylase et l' α - amylase.

Dans le cadre de ce mémoire, je m'intéresserai plus particulièrement aux α - amylases du genre Bacillus (et surtout Bacillus licheniformis).

3.2. Les α- amylases de Bacillus

Les amylases sont toutes extracellulaires chez Bacillus, car les macromolécules comme l'amidon ou les dextrines ne peuvent traverser la membrane cellulaire. Ces macromolécules sont, par conséquent dégradées à l'extérieur par des enzymes secrétées en dehors de la bactérie. En effet, celle-ci produit des amylases extra cellulaires aux différentes spécificités.

B.subtilis produit des α - amylases. B megaterium produit une α - amylase dont l'optimum de température pour son activité se situe à 55 ° C.

B coagulans produit une α - amylase dont la température optimum d'activité se situe entre 80 et 100 ° C suivant la concentration en amidon. Il s'agit donc d'une enzyme thermorésistante.

B stearothermophiles et B amyloliquefaciens produisent également des α - amylases.

L'α - amylase qui va être étudiée dans ce travail est celle de B licheniformis. Elle est thermorésistante avec des températures optima d'activité proche des 100 ° C.

Cette enzyme est l'objet d'intérêts économiques et de nombreuses recherches dans ce domaine sont en cours.

3.3. Propriétés des α - amylases produites par le gène Bacillus

Tout d'abord, des expériences ont montré l'importance que l'histidine dans le site actif de l' α - amylase de B amyloliquefaciens.

L'activité pouvait être perdue totalement par modification spécifique chimique de ce résidu (17).

Une autre propriété intéressante qui est présente chez certaines α - amylases est leur thermostabilité. Celle-ci est un pôle très intéressant de la recherche et l'étude de telles enzymes thermostables permettra sans doute d'en élucider les fondements.

Le clonage de l'α - amylase de B.licheniformis chez B subtilis a montré dans un cas une température optimum de 93 ° C (46) et dans l'autre une température proche de 100 ° C (50.).

Une comparaison entre la structure de deux α - amylases (cartes de restriction), dont les températures optima ont été citées, a montré que les régions codantes pour ces enzymes sont très conservées (50.).

Le clonage de la partie codante d'une α - amylase de B licheniformis sous la dépendance d'un promoteur de l'α - amylase de B amyloliquefaciens chez B subtilis a permis d'augmenter significativement la quantité d'enzymes produites sans altérer sa résistance thermique ou la stabilité du gène cloné (59).

D'autres expériences ont montré que les propriétés de thermorésistance étaient inhérentes à la structure de la protéine et qu'il y avait indépendance vis-à-vis de l'hôte (26) .

Enfin, des données récentes semblent indiquer qu'une des propriétés qui pourraient affecter la stabilité des α - amylases est l'hydrophilie des séquences d'aa. Les profils d'hydrophilie de trois enzymes ont été comparés. Ils semblent suggérer que des ponts salins entre des acides aminés polaires sont importants pour la stabilité de ces protéines. (79)

3.4. Problèmes de stabilité

Lors de clonages chez E.coli, des problèmes de stabilité ont été rencontrés.

Les α - amylases ainsi clonées semblent exercer une charge pour la cellule. Il ne faut pas oublier que ces enzymes proviennent de bactéries gram + (Bacillus) et sont exprimées dans des bactéries gram - (E.coli).

Il a été démontré que l'α - amylase de B coagulans s'accumule dans le périplasme de HB 101 (une souche d'E.coli).(78)

Dans la souche de E.coli 188 qui est constitutive pour la

β galactosidase (marqueur cytoplasmique) et la phosphatase alcaline (marqueur périplasmique), le gène d'α - amylase fut cloné. L' α - amylase et la β-galactosidase (qui est cytoplasmique) s'échappent en partie dans le milieu extracellulaire, ce qui n'est pas le cas pour la phosphatase alcaline.

En outre, la croissance est inhibée dans certains milieux. La sortie de l'amylase dans le milieu ne se produit que dans la souche 188, suggérant que la synthèse constitutive de la phosphatase alcaline et/ou de la β galactosidase pourrait être responsable de ce phénomène.

L'inhibition de croissance observée dans un milieu minimum ne contenant que du maltose ou du glycérol comme seule source de carbone parait une conséquence de la synthèse abondante de l'amylase elle-même, de la β galactosidase et de la phosphatase alcaline.

En effet, des mutants qui permettent une meilleure croissance en milieu minimum glycérol ou maltose ont été isolés. Toutes ces mutations affectent la synthèse soit de l'amylase, soit de la β galactosidase et de la phosphatase alcaline. Quelques mutations résultent de l'insertion d'une séquence IS 1 dans le gène α -amylase porté par le plasmide. D'autres sont localisées sur le chromosome et affectent, à différents degrés, l'expression du gène amylase ou l'expression de la β galactosidase, la phosphatase alcaline et les porines Omp C et Omp F. Toutes ces mutations restaurent totalement ou en partie le défaut de croissance et de vitesse de transport du maltose. Les mutations chromosomiques restaurent aussi la localisation périplasmique de l'amylase qui avait été observée dans la souche HB 101.

Des difficultés inhérentes au clonage de gènes codant pour des protéines extracellulaires existent chez E.coli.

Le problème de la stabilité a également été étudié sur l' α - amylase de B.licheniformis par Olivier Laloux (mémoire de licence, FNDP, 1987).

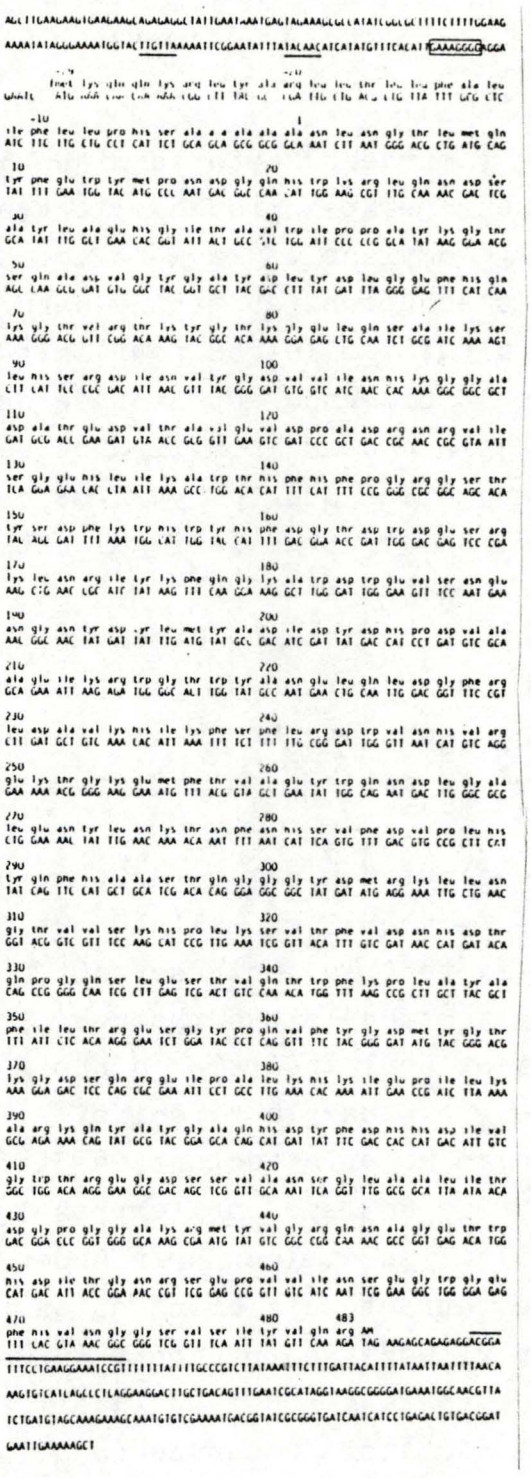



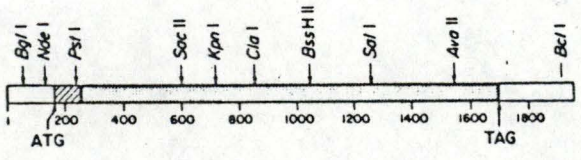
Figure 14 : Séquence de l'α-amylase (GRAY fig2d réf 22)
La Shine-Dalgarno est encadrée. Les consensus en -10 et -35 sont sulignés.

3.5. Structure de l'α - amylase de B licheniformis

Le gène a entièrement été séquencé par deux équipes. (79)(22 La séquence de GRAY (37) a été choisie et est représentée à la figure 14.

A Dublin, Mr Delcour a déterminé une partie de la séquence de l' α - amylase de B.licheniformis (265 bases à partir du site Pst I situé dans le peptide leader) qui correspond à la séquence de GRAY. Celle-ci a alors été choisie pour la suite de mon travail.

Une carte de restriction précise a également été déterminée par cette même équipe et est la suivante :



(GRAY fig2c réf22)

Sur cette figure, on peut distinguer la séquence signal en hachuré ainsi que la partie codante qui la suit immédiatement.

Les différents signaux intervenant dans la régulation de l'expression du gène sont indiqués sur la figure 14 (consensus en - 10 et - 35, codon initiateur ATG, Shine-Dalgarno SD ...).

Toutes les informations nécessaires à la production de l' α - amylase de B.licheniformis sont présents dans un fragment Bcl I- Bcl I de 2,5 kb qui a été cloné dans le PUC 18 pour donner le pα 21 (voir matériel et méthodes).

Des travaux récents ont permis de mettre en évidence l'existence d'une structure de terminaison de la transcription qui permet d'augmenter l'expression du gène d'une ARN polymérase en

empêchant le passage à travers ce gène d'une ARN polymérase ayant commencé la transcription en amont du gène.(45)

4. Vecteurs de sécrétion

L'intérêt pour la production des protéines ou d'enzymes par des microorganismes s'est accrû durant les dernières années.(16,40) Les nouveaux développements sont devenus les cibles d'une exploitation commerciale; ceci inclut :

1. L'industrie pharmaceutique (insuline, interféron, facteur VIII ...)
2. L'industrie d'analyse et de diagnostic (taux de glucose, cholestérol)
3. L'industrie alimentaire (glucosidase, pectinase, α - amylase ...)
4. L'industrie chimique
5. Différentes industries comme l'industrie textile, les manufactures de détergents et le traitement des ordures.

Ce marché est destiné à croître et pourrait atteindre quelques milliards de dollars dans les années à venir suivant les prédictions de Elkington!

Cependant, la surproduction de protéines étrangères pour l'organisme mène fréquemment à d'autres complications qui incluent :

1. La précipitation et l'aggrégation du polypeptide
2. Une dégradation rapide par des protéases

3. Une toxicité pour la cellule hôte

4. Des difficultés de purification sous une forme active.

Ceci a stimulé la recherche concernant les mécanismes de sécrétion, ceux-ci permettant de trouver l'alternative suivante : le polypeptide serait sécrété dans le milieu de culture et diminuerait fortement les problèmes rencontrés ci-dessus.

Différents types d'hôtes se présentent.

Tout d'abord, E.coli est une bactérie où le taux de production d'une protéine désirée est très élevée (jusqu'à 30 % des protéines bactériennes). Ceci lui confère un gros avantage qui est cependant réduit si l'on tient compte du fait que la membrane externe oppose une barrière vis-à-vis de l'exportation de la protéine.

Un certain nombre de procédés ont été conçus en vue de libérer les protéines accumulées dans l'espace périplasmique. L'utilisation de mutants " leaky " a permis d'obtenir des polypeptides extracellulaires. Le clonage d'un fragment d'ADN de 1,7 kb provenant d'une souche de Bacillus alcolophile (N o170) provoque l'affectation de l'intégrité de la membrane externe de E.coli. Ainsi, une β - lactamase a pu être relâchée à 90 % dans le milieu de culture ! (31)

Enfin, la sécrétion propre de protéines de gram + a été rapportée chez E.coli (d'une manière partielle) en l'absence de facteurs additionnels provenant de l'organisme hôte.

C'est le cas d'une glucanase de B subtilis et d'une streptokinase de Streptococcus equisimilis.

La construction de vecteurs chez E.coli a déjà été effectuée : la sécrétion d'interféron α a été obtenue en mettant le gène de cette protéine sous le contrôle du promoteur et de la séquence signal de la phosphatase alcaline de E.coli. (37)

Un hôte fréquemment utilisé est B subtilis. Les bacilles, en général, représentent de bons hôtes du fait que la sécrétion à travers l'unique membrane s'avère être un processus relativement

simple. Un certain nombre de vecteurs de sécrétion ont été construits chez B.subtilis.

Les séquences amino-terminales du gène de la protéase alcaline et du gène de la protéase neutre ont été utilisés pour la sécrétion de protéines A, de β -lactamase et d'interféran humain dans le milieu de culture (68).

D'autres vecteurs font appel au promoteur et la séquence signal du gène d' α - amylase de B.amylaliquefaciens (67) ou du gène d' α - amylase de B.subtilis . (42, 43, 58)

Les deux gros désavantages de cet hôte (Bacillus subtilis et même les Bacillus en général) sont premièrement les taux élévés de protéases présentes dans le milieu qui diminue le rendement fortement et deuxièmement l'instabilité des plasmides ainsi que de l'ADN cloné dans cet organisme.

Des travaux récents rapportent l'existence de souches de B.subtilis qui produisent de faibles taux de protéases (29) Ceci a d'ailleurs été récemment proclamé par la GENEX corporation.

5. But du travail

L'objectif de ce travail est d'obtenir un vecteur d'expression et de sécrétion chez E.coli.

Qui dit expression exige des signaux indispensables à celle-ci. Un promoteur si possible fort, est nécessaire ainsi que les signaux de traduction. En plus d'un vecteur d'expression, on désire obtenir un vecteur de sécrétion. Des signaux d'exportation sont nécessaires et ceux-ci permettent de transporter un polypeptide jusqu'à l'espace périplasmique et même de le voir sécrété en dehors de la bactérie. (cfr introduction). Pour cela, le promoteur et la séquence signal de l' α - amylase de B.licheniformis seraient utilisés pour faire une " cassette ". Un gène étranger pourrait alors être positionné en vue d'une production importante.

M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

1. Souche

Nous avons utilisé exclusivement la souche TG1 de Escherichia coli (AMERSHAM) ayant ces caractéristiques :

K 12 Δ (lac pro) sup E thi Hsd D 5 F' traD 36 pro AB lac i^q Z Δ M15

Explication de caractéristiques nécessaires à la compréhension de la suite du travail :

Δ lac pro : délétion de l'opéron lactose
F' : délétion du facteur F
Lac i^q : gène porté par F' qui code pour le répresseur à un taux dix fois supérieur au gène lac i sauvage
pro AB : opéron proline porté par l'épisome F' sous sa forme intacte entraînant le caractère prototrophe pour la synthèse de la proline. Un milieu minimum permet donc la sélection des bactéries qui ont toujours le facteur F', elles seules étant prototrophes, donc viables sur ce milieu .
Z Δ M 15 : délétion de l'extrémité 5' de la β- galactosidase portée par le facteur F'.

Cette nomenclature se réfère à l'article de BACHMANN (3).

2. Cultures de bactéries

2.1. Milieux de culture

Trois types de milieu ont été utilisés.

1 ° Milieu minimum/glucose (AMERSHAM M 13 cloning and sequencing Handbook, p. 47)

Il contient en poids par volume :

Agar	1,5 %		
10 x M 9	/	10 x M 9	
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,025 %	Na_2 H PO_4	0,6 %
$CaCl_2$ 2 H_2O	0,0015 %	KH_2 PO_4	0,3 %
Vit B1	0,0337 %	NH_4 Cl	0,1 %
Glucose	0,2 %	Na Cl	0,05 %
		A autoclaver séparément	

Le milieu est stérilisé dans une casserole à pression pendant 20 minutes à 121 degrés Celsius dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau. Pour les milieux solides, 1,5 % de Bacto Agar (oxoid) sont ajoutés. Après stérilisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri qui seront séchées à 65 ° C pendant une heure.

2 ° Milieu LB (ou Luria Broth) : milieu riche (MANIATIS)

Bacto-Tryptone (oxoid)	1 %
Yeast Extract (oxoid)	0,5 %
NaCl	0,5 %

Après ajustement à pH neutre à l'aide de Na OH , le milieu est stérilisé.

3 ° Milieu 2 xy T (MANIATIS)

Il s'agit d'un milieu encore plus riche que le LB et qui est utilisé essentiellement pour les " barboteurs " (voir rubrique techniques de culture).

Bacto-Tryptone	1,6 %
Yeast Extract	0,5 %
NaCl	0,5 %

2.2. Milieux sélectifs

Si l'on désire exercer une pression sélective, l'utilisation d'antibiotiques est nécessaire. Au cours de ce travail, j'ai utilisé l'ampicilline à une concentration finale de 50 µg/ml de milieu. A titre d'exemple, 800 µl d'une solution stock d'ampicilline, 25 mg/ml sont pipetés et ajoutés à 400 ml de milieu LB destinés à être coulé en boîtes de Pétri.

2.3. Techniques de culture

+ culture solide en boîtes de Pétri : les boîtes sont simplement incubées à 37 ° C, couvercle en-dessous.

+ culture liquide en erlenmeyer : l'incubation est réalisée à 37 ° C, sous agitation violente (200 rpm), dans un flacon rempli au maximum à un cinquième de son volume nominal.

+ culture en barboteurs :
  . c'est une technique très fréquemment utilisée en vue d'obtenir une quantité de cellules suffisante pour effectuer une " miniprep " (voir rubrique plasmides)

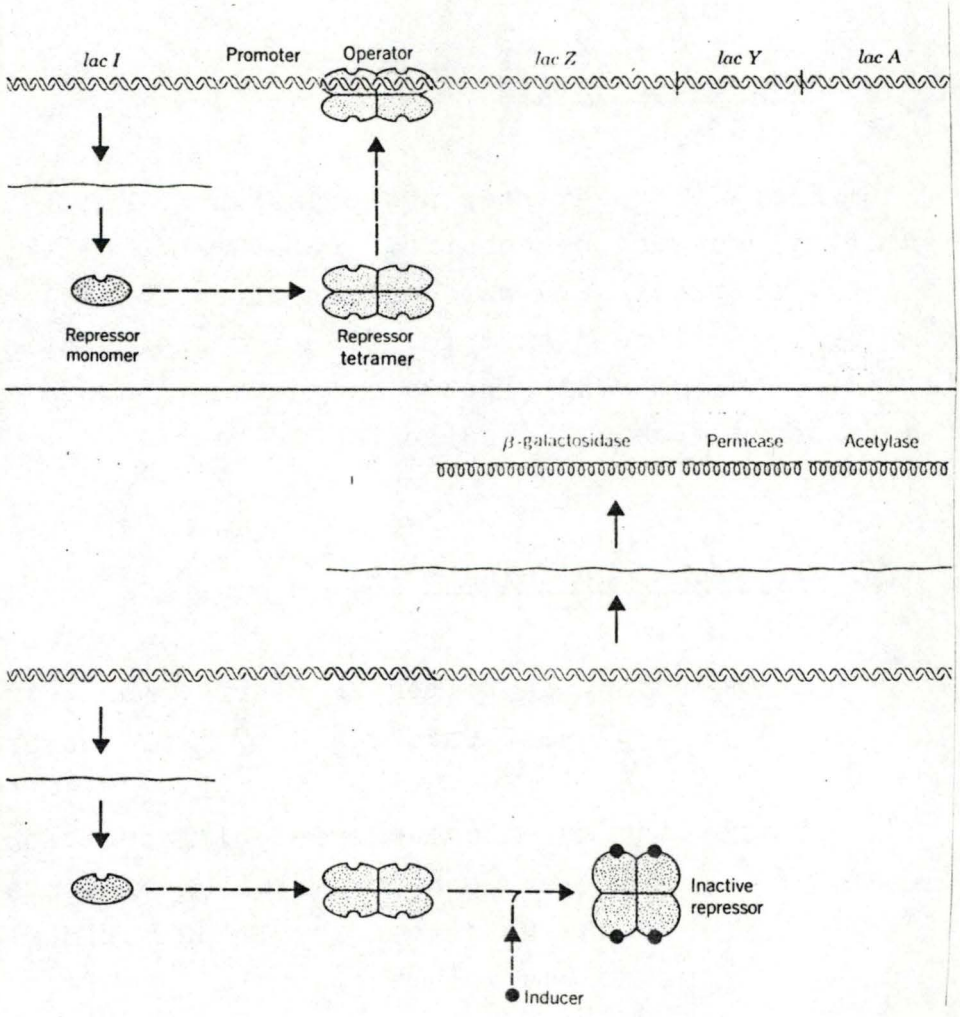
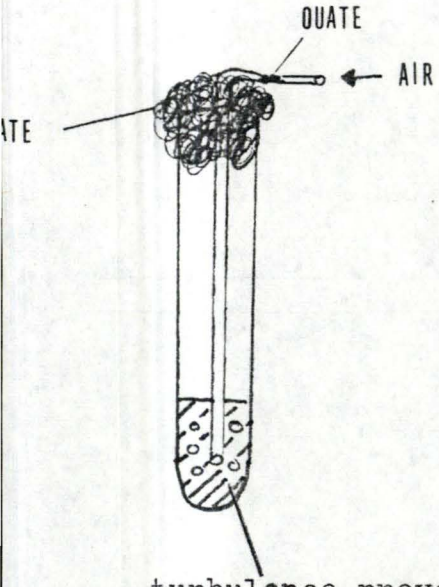


Figure 1: Régulation négative de l'opéron lactose.
Haut de la figure: fixation du répresseur sur l'opérat
empêchant la transcription.
Bas de la figure : fixation de l'inducteur sur le répr
seur empêchant l'action de celui-ci

(LEWIN p 225)



. 10 ml de milieu 2 xy T sont déposés dans un tube en verre de 25 ml et un système d'aération fournit l'oxygène nécessaire au bon développement des bactéries.

Ces bubblers sont préalablement stérilisés sans le milieu. Ils sont incubés à 37 ° C.
Le bouchon en ouate assure la stérilité de l'intérieur du tube.

turbulence provoquée par l'air envoyé par la pompe.

3. Plasmides

3.1. L'opéron lactose et les systèmes qui en dérivent

3.1.1. L'opéron lactose

Cet opéron intervient dans la production de trois gènes; lac Z, lac Y , lac A, codant respectivement pour la β-galactosidase, la β galactoside perméase et la β - galactoside transacétylase.
Ces trois enzymes sont sous le contrôle d'un seul promoteur.
La régulation est de deux types :

1 ° Une régulation négative (figure 1)

Le gène lac I code pour un répresseur qui va se fixer de manière spécifique sur l'opérateur empêchant l'ARN polymérase d'initier la transcrition au niveau du promoteur. Cette répression est levée lors de la présence d'inducteur (ex : lactose) qui en s'associant avec le répresseur provoque un changement dans la configuration spatiale. Le répresseur ne peut plus se fixer sur l'opérateur laissant le champ libre à la polymérase.

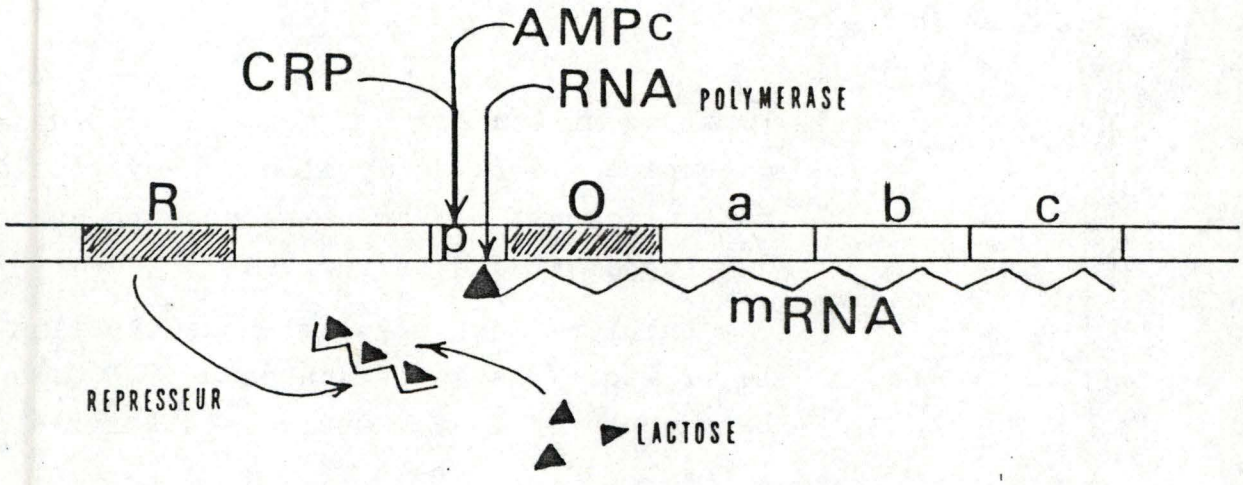


Figure 2: Régulation positive (DEPELCHIN p 6-5)

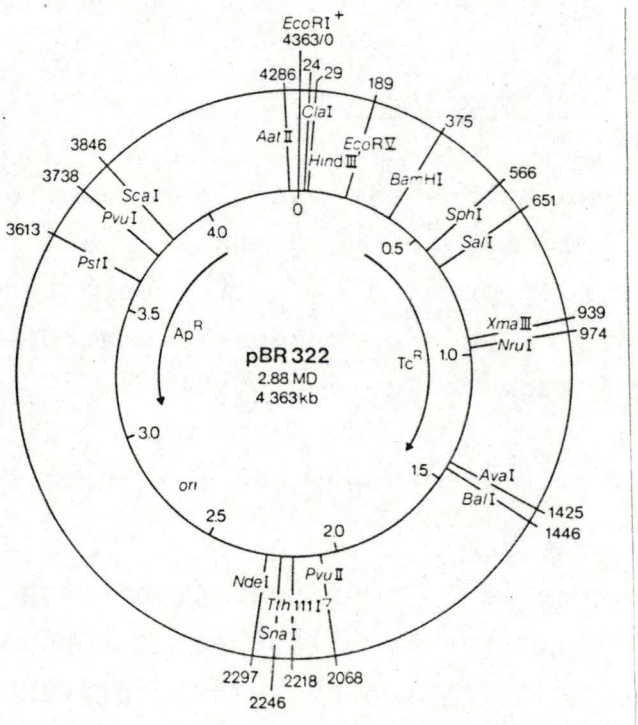


Figure 3: Carte de restriction du pBR 322.(Boehringer)

2 ° Une régulation positive (figure 2)

Pour que la transcription puisse se faire, il faut non seulement qu'il y ait du lactose, ce qui empêche le répresseur d'être actif, mais en plus, il est nécessaire que la concentration en glucose soit faible.

Lorsque celle-ci décroît, l'AMP cyclique s'accumule. Ce nucléotide se fixera sur un récepteur intracellulaire, de nature protéique, dénommé CRP.

Ce complexe va se fixer sur le promoteur, ce qui permet à l'ARN polymérase de commencer la transcription.

Remarque : L'IPTG (Isopropyl - β - D - thiogalacto pyramoside) est un inducteur pour la β - galactosidase qui est non métabolisable par cette enzyme, ce qui est très intéressant car sa concentration restera la même permettant une induction constante.

3.1.2. Origines et caractéristiques des vecteurs pUC

Les vecteurs pUC proviennent de la délection du pBR 322 (figure 3) et contiennent tous un gène de résistance à l'ampicilline. Ces plasmides contiennent une partie de l'opéron lactose comprenant la partie codante de la β - galactosidase tronquée dans son extrémité 3'.

Ceci a pour conséquence que l'enzyme telle quelle est inactive. Cependant, grâce à la présence de la β - galactosidase tronquée dans son extrémité 5' présente sur le facteur F' (intervenant dans le phénomène de conjugaison), l'activité β - galactosidosique est restaurée.

Ce processus est appelé α - complémentation car c'est l'aggrégation de ces deux protéines tronquées qui restaure l'activité de l'enzyme. (55)

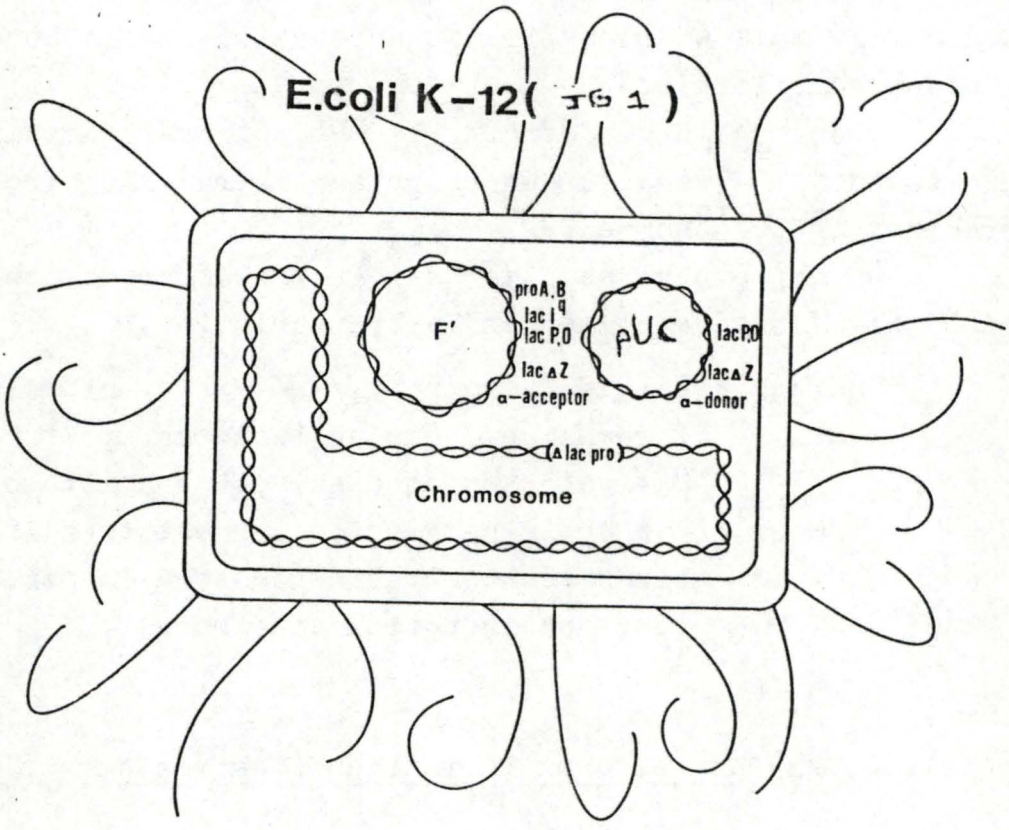
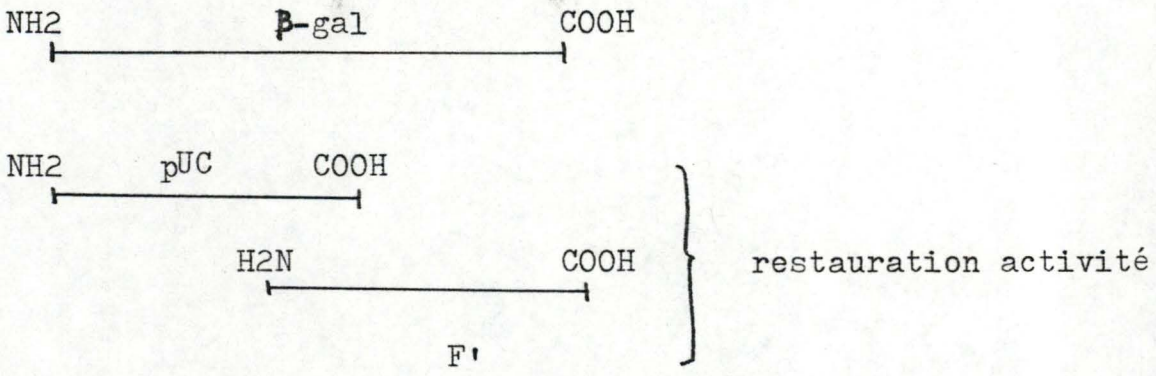


Figure 4: Souche utilisée associée à un vecteur pUC.
(RODRIGUEZ p11 réf 55)



Si l'on désire utiliser ce système, la souche bactérienne doit contenir une délection de l'opéron lactose (Δ lac pro) ce qui est le cas de TG 1 (figure 4)

Une batterie de sites de restriction est introduite dans le gène de β - galactosidase du pUC (ext 5') en <u>phase</u> afin de pouvoir effectuer du clonage (insertion d'ADN étranger).

Cette insertion en phase de la batterie permet de garder l'activité β - galactosidasique.

De plus, le X - gal (5 - bromo - 4 - Chloro - 3 indolyl - β - D - galactopyranoside) est un composé chromogénique qui lorsqu'il est clivé par la β - galactosidase devient bleu.

Lors de l'introduction d'ADN étranger, il y a perte du caractère bleu des colonies, ce qui constitue un diagnostic facile.

Lors de mes expériences, j'ai utilisé le pUC 9 et le pUC 8 dont les cartes sont placées ci-dessous. (figure 5)

Ces deux vecteurs diffèrent par l'orientation de la batterie de sites de restriction. (figure 6)

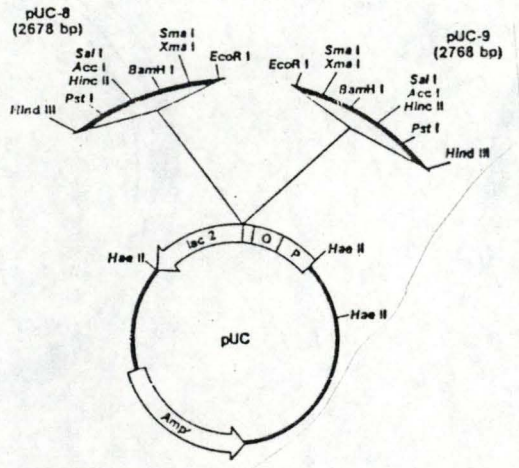


Figure 5: Carte génétique du pUC 9 et du pUC 8 (PHARMACIA).

M13 mp8/pUC8

a.

		1 Thr	2 Met	3 Ile	4 Thr	5 Asn	6 Ser	1 Arg	2 Gly	3 Ser	4 Val	5 Asp	6 Leu	7 Gln	8 Pro	9 Ser	10 Leu	11 Ala	7 Leu	8 Ala
	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCC	CGG	GGA	TCC	GTC	GAC	CTG	CAG	CCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC
						Eco RI			*Bam* HI				*Pst* I			*Hind* III				
								Sma I								*Hinc* III				
								Xma I												
											Sal I									
											Acc I									
											Hinc II									
											Hind II									

M13 mp9/pUC9

b

		1 Thr	2 Met	3 Ile	4 Thr	1 Pro	2 Ser	3 Leu	4 Ala	5 Ala	6 Gly	7 Arg	8 Arg	9 Ile	10 Pro	11 Gly	5 Asn	6 Ser	7 Leu	8 Ala
	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GCT	GCA	GGT	CGA	CGG	ATC	CCC	GGG	AAT	TCA	CTG	GCC
							Hind III			*Pst* I				*Bam* HI				*Eco* RI		
											Sal I				*Sma* I					
											Acc I				*Xma* I					
											Hind II									
											Hinc II									

Figure 6: a. batterie de sites du pUC 8 (BOEHRINGER)
b. batterie de sites du pUC 9

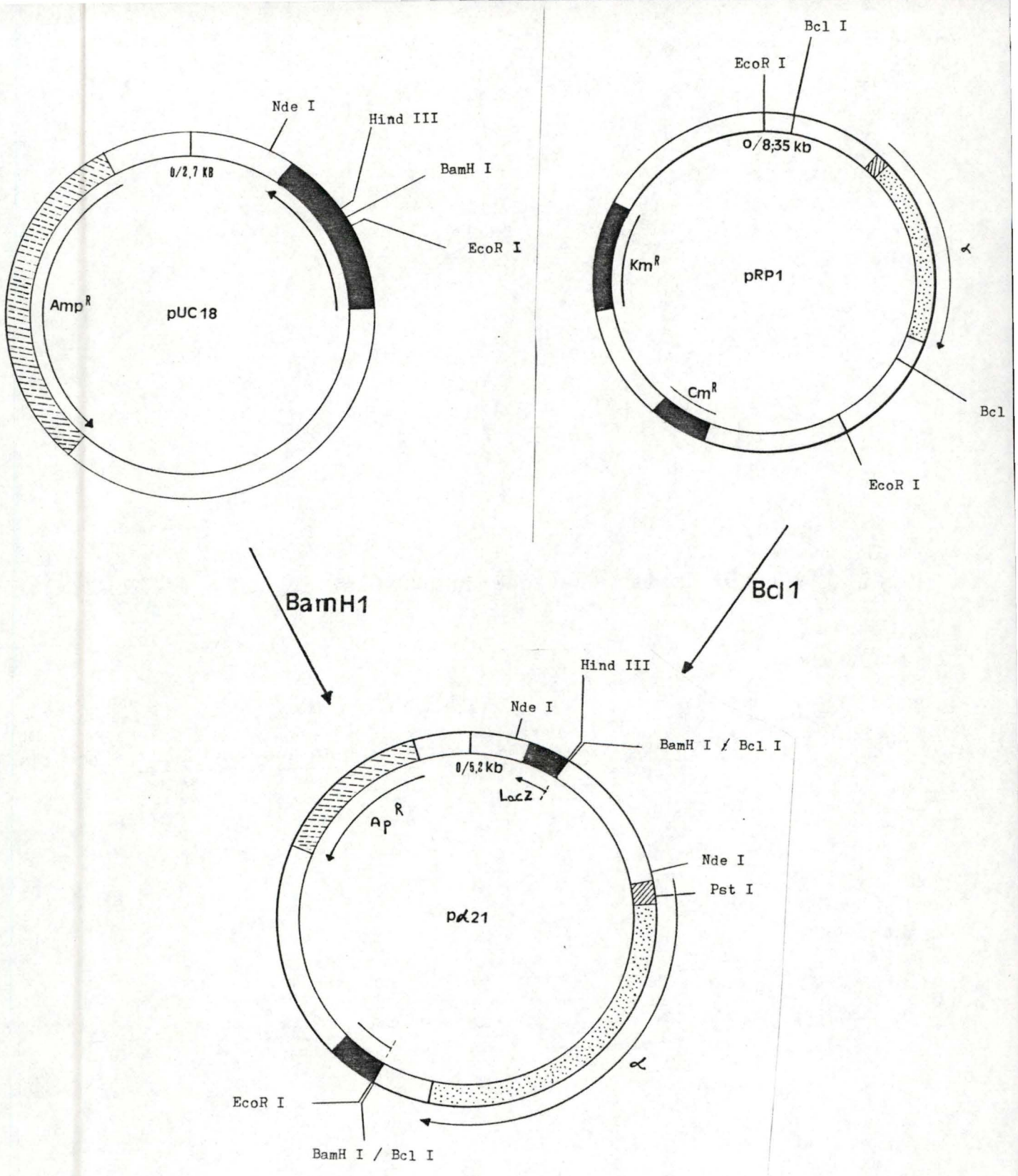


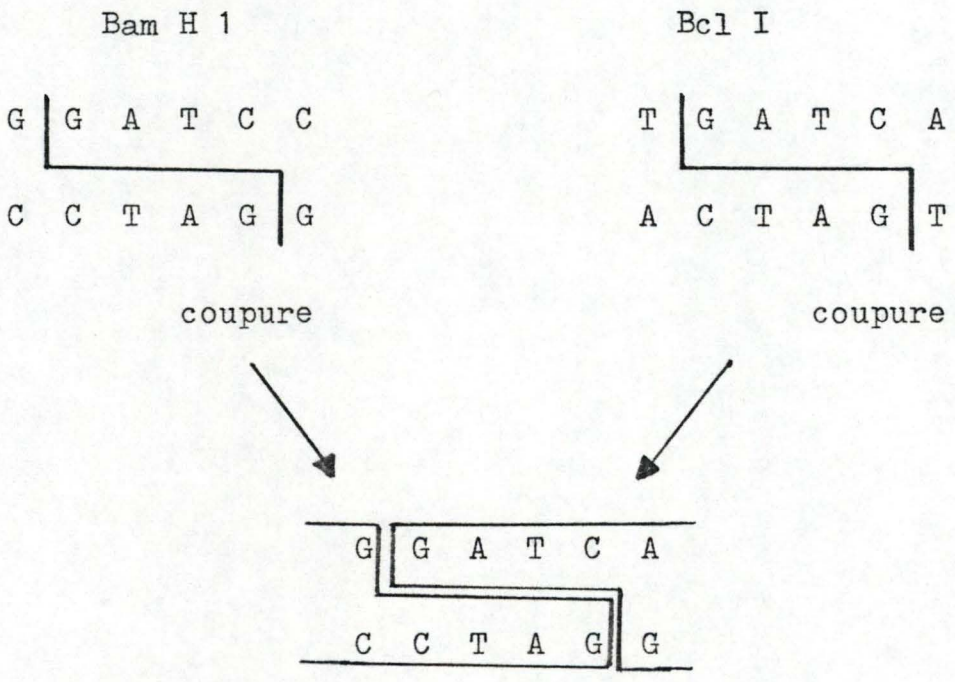
figure 7 : Construction du plasmide
Unfragment EcoR I de 3,5 kb fut ligué avec le pBD 64 ouvert en Eco R I formant le p R p I. Le clonage s'es effectué chez Bacillus subtilis (souche JF 211). Ensuite un fragment de 2,5 kb a été coupé par Bcl I en vue d'une ligation avec le pUC 18 coupé avec BamH I La transformation s'est faite chez E.coli.

3.2. Plasmide p α 21

Ce plasmide est un pUC 18 dans lequel a été inséré au site Bam H I, un gène d'α - amylase de 2,5 kb limité par les sites Bcl I provenant d'un clone de Bacillus licheniformis.

Ce gène a préalablement été cloné chez Bacillus subtilis (souche JF 211) dans un vecteur pBD 64 formant le pRp 1 (figure 7).

Bcl I et Bam H 1 sont des sites compatibles, c'est-à-dire qui peuvent être ressoudés par une ligase mais il s'ensuit la perte de ceux-ci :



Ceci ne correspond ni à Bam H 1,
ni à Bcl I.

Les sites de restriction du gène ont été déterminés ainsi que la séquence (voir introduction pour plus de renseignements).

3.3. Purification

3.3.1. Miniprep : c'est une technique permettant d'obtenir rapidement du plasmide mais le produit obtenu contient encore certaines impuretés (ARN, protéines et ADN chromosomique). Le protocole qui sera décrit est applicable chez E.coli. (24)

Le lysozyme est l'agent qui va permettre la lyse des cellules. Ensuite, un passage à 100 ° C va dénaturer les protéines, l'ARN et l'ADN chromosomique en laissant intacts les plasmides.

Lors de la renaturation, une précipitation massive de protéines, d'ADN chromosomique et d'ARN se produira.

C'est dans le surnageant que le plasmide se trouvera.

Protocole :
- Pipetter 1,5 ml à partir d'une culture en barboteur qui a été incubé toute la nuit à 37 ° C et le mettre dans un ependorf.
- Centrifuger 5' à 12 000 RPM (centrifugeuse de table pour ependorf).
- Enlever le surnageant.
- Si le culot est insuffisant, répéter l'opération.
- Resuspendre dans 200 µl de TELT.

TELT :		
	Tris- HCl	50 mM
	EDTA	62,5 mM
	LiCl	2,5 mM
	Triton X - 100	o,4 %

- Mélanger au vortex jusqu'à resuspension totale
- Ajouter 20 µl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml.
- Mélanger au vortex pour bien mélanger.

- Passer à 100 ° C pendant une minute précisément.
- Laisser dans la glace pendant 5 '.
- Centrifuger 15' à 12 000 RPM
- Prélever le surnageant.
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu.
- Précipiter à - 70 ° C pendant une demi-heure au minimum.
- Centrifuger 14' à 12 000 RPM
- Jeter le surnageant.
- Egoutter sur un kleenex et sécher sous vide.
- Redissoudre dans du tampon TE :

Tris H Cl	10 mM
EDTA	1 mM

3.3.2. Maxiprep : la pureté du matériel obtenu est très supérieure à celle d'un miniprep.

- Ensencement de cultures de 1 l contenant du milieu LB ainsi que l'antibiotique approprié à une concentration finale de 50 µg/ml.
- Laisser se développer les bactéries de manière à atteindre une DO suffisante (0,9 à 1,2 chez E.coli) à 37 ° C.
- Chez E.coli, l'amplification du plasmide est praquée : le chloremphénicol est ajouté aux cultures et celui-ci empêche la réplication de l'ADN bactérien sans altérer celle du plasmide menant à un nombre de copies du plasmide très élevé.
  Ce traitement est effectué une nuit à raison de 170 µg/ml de chloremphénicol.
- Centrifuger les cultures dans 4 flacons de 250 ml au moyen d'un rotor de type GSA (Sorvall).
- Eliminer les surnageants.

- Laver avec 20 ml de STE : Tris H Cl pH 8 10 mM
  NaCl 100 mM
  EDTA pH 8 1 mM
  de manière à resuspendre le " pellet " ou culot.
- Transférer dans des tubes Beckman (polycarbonate) à raison de 10 ml par tube.
- Centrifuger 10' à 5000 RPM dans une centrifugeuse Sorvall au moyen d'un rotor de type Sorvall SS 34.

Toutes ces opérations depuis la centrifugation des cultures se font dans la glace (ou dans des centrifugeuses réfrigérées à 0 ° C).

- Le culot est resuspendu dans 5 ml de solution I qui est : glucose 50 mM
  Tris H Cl pH 8 25 mM
  EDTA 1 mM
  Du lysozyme à une concentration finale de 2 mg/ml est ajouté à la solution I.
  Cette étape vise à provoquer la lyse des cellules que l'on peut suivre : en effet, la viscosité de la solution s'accroît et ceci peut être mis en évidence grâce à une pipette pasteur (15 à 30').
  Cette opération se fait à température de chambre.
- Ensuite, 10 ml d'une solution II qui est NaOH 0,2 N et SDS 1 % sont ajoutés.
  Il s'agit de bien mélanger les tubes mais en douceur. Les tubes sont alors laissés 15' dans la glace. Le Na O H et le SDS ont pour action de dénaturer l'ADN chromosomique et les protéines.
- Après ce délai, 7,5 ml d'une solution Na Ac 3 M pH 4,8 sont ajoutés et mélangés.
  Le tout est mis dans la glace pendant une heure.
  L'ADN chromosomique, les protéines, les ARN de haut poids moléculaire vont s'aggréger et précipiter.
- Une centrifugation d'une heure à 25 000 RPM avec un rotor 60 Ti thermostatisé à 5 ° C dans une centrifugeuse Beckman est effectuée afin d'obtenir

un culot contenant toutes les impuretés (déjà citées). Le plasmide reste dans le surnageant et celui-ci sera recueilli.

- 2,5 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés et le tout est mis à précipiter à - 20 ° C pendant toute la nuit.
- Le lendemain, le précipité est centrifugé une heure à 12 000 RPM dans un rotor type GSA.
- L'étape suivante va viser à purifier ce qu'on a obtenu car malgré les traitements utilisés, il reste encore des protéines, de l'ADN chromosomique et de l'ARN.

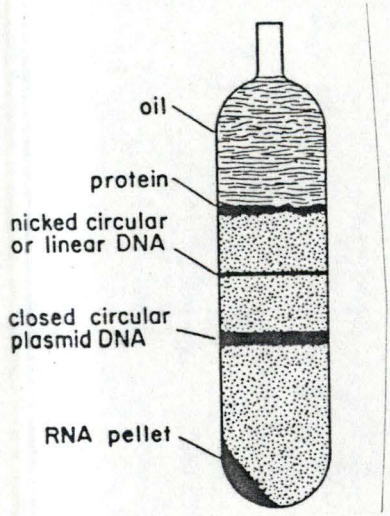
  Lorsqu'on travaille chez E.coli, un traitement à la RNAse (Sigma) est directement fait. Une incubation de celle-ci est effectuée à 37 ° C pour éliminer l'activité DNasique et ne garder que l'activité RNAsique.

  La préparation est soumise à la RNAse à une concentration finale de 10 µg/ml. Le tout est incubé une demi-heure à 37 ° C.

  Maintenant, avec Bacillus subtilis , il est préférable de passer par une digestion des protéines avec la protéinase K à une concentration finale de 0,5 mg/ml. Ceci est fait en raison de la présence de nucléases susceptibles d'attaquer le plasmide que l'on veut purifier. Pour ce faire, il faut resuspendre le précipité dans une solution

Tris pH 8,4	100 mM
Tris pH 9,5	50 mM
EDTA pH 8,0	8 mM
SDS	1 %

  et laisser incuber 30 ' à une heure à 37 ° C.
- Une fois ces opérations effectuées, un gradient sur chlorure de césium (Cs Cl) permet une séparation fine du plasmide (forme O C et CCC) et des impuretés restantes (protéines, ARN ...).



Le chlorure de césium permet d'établir un gradient de densité lorsqu'il est en solution et soumis à une centrifugation dont les caractéristiques sont décrites par-après.
Les particules vont migrer jusqu'à égalité de leur densité avec celle du milieu (Cs Cl).
La densité où la migration d'une particule va s'arrêter, correspond à la densité d'équilibre de cette particule
Chaque constituant de la solution (plasmide, ARN, protéine ...) va se positionner dans le gradient suivant sa propre densité d'équilibre suite seulement à l'utilisation d'un agent intercalant : le bromure d'éthidium (Et Br) (figure 8).

figure 8. Localisation rencontrée des protéines, de l'ARN et du plasmide sur gradient de densité en Cs Cl. (MANIATIS p93 réf 35)

C'est une molécule qui va s'intercaler entre les bases des acides nucléiques. Elle a une affinité plus grande pour les doubles brins. Du fait de la configuration circulaire du plasmide, le bromure d'éthidium ne pourra se positionner que dans une faible mesure entraînant par là une densité d'équilibre fort différente des autres constituants (protéines, ADN chromosomique, ARN ...).

Entre les formes OC et CCC du plasmide, il existe une différence de comportement : en effet, la forme OC acceptera plus de Br Et et de ce fait aura une densité d'équilibre plus faible!

Protocole : Un nombre de grammes de chlorure de césium égal au nombre de mililitres de la solution doit être ajouté à celle-ci. Le Br Et est rajouté à raison de 0,8 ml d'une solution 10 mg/ml par 10 ml de la préparation citée précedemment.
L'indice de réfraction est vérifié (η = 1,3860).
Ensuite, une centrifugation à 45000 RPM pendant 36 h à 20 ° C est effectuée (rotor type 65 Beckman) après avoir scellé les tubes à centrifuger (Quick-Seal Beckman 5/8 x 3 in.(16x76 mm)).

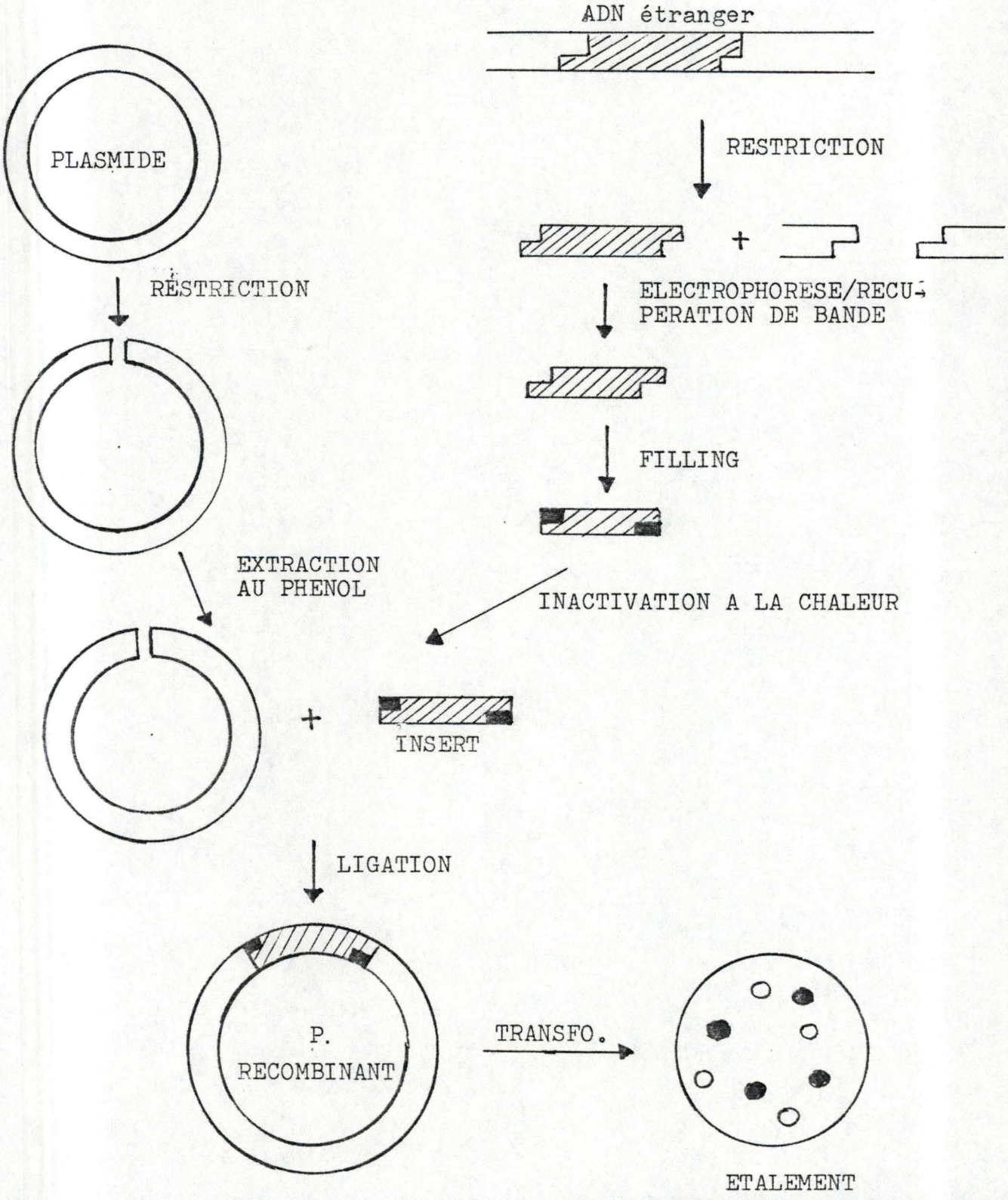
- La récupération de la bande intéressante (CCC) se fait à l'aide d'une séringue sous excitation UV. Il faut alors éliminer le Cs Cl et le Br Et. Celui-ci est enlevé par de l'alcool isoamylique pour lequel il a une grande affinité suivi d'une dilution avec de l'eau ainsi que d'une précipitation à l'éthanol à chaud (température de chambre). Celle-ci se fait à chaud pour éviter la précipitation du Cs Cl encore présent dont on veut se débarasser.
  Après centrifugation et resuspension, il est pratiqué une précipitation à l'éthanol à froid (- 20 ° C). Une dernière centrifugation sera réalisée et le matériel sera resuspendu.

- A la place d'un gradient ou à la suite d'un gradient, un " coussin de Na Cl " peut être effectué. L'échantillon traité à la R N Ase est déposé sur une solution de Na Cl 1 M elle-même déposée dans un tube de type P A S W 60 (Beckman), prêt à être centrifugé.
  La centrifugation est opérée pendant six heures à 40 000 RPM à 20 ° C dans un rotor à godets oscillants (SW 60).
  Après cette opération, le culot est lavé avec de l'alcool à 70 % et par après avec de l'alcool pur. Le tout est séché sous vide et redissout dans du TE.

Explication : L'ADN plasmidien sédimente au fond du tube alors que les ribonucléotides restent dans le surnageant.

4. Techniques utilisées lors d'un clonage

Voici un schéma général qui reprend les techniques utilisées dans ce mémoire :



4.1. Electrophorèse

0,8 % d'agarose sont dissous dans du TBE qui a la composition suivante pour un litre de solution :

Tris HCl	10,8 g
Acide borique	5,5 g
EDTA 0,5 M pH 8	4 ml

Il est nécessaire de chauffer pour bien dissoudre l'agarose et lorsque la solution est bien claire, le gel peut être coulé.

Le tampon utilisé lors de l'électrophorèse est également du TBE dans lequel le gel durci est immergé.

Les échantillons d'ADN à tester (plasmides coupés, non coupés, etc...) sont déposés dans des créneaux ou puits réalisés à l'aide de peignes en plastic.

Une source de tension appliquée au gel permet le déplacement des échantillons au sein du gel. La migration se fera suivant le PM.

On colore ensuite le gel une demi-heure au minimum dans une solution contenant du bromure d'éthidium à 0,5 μg/ml. La fluorescence du complexe ADN bromure d'éthidium est stimulée par illumination à la lumière UV (λ = 302 mm). Suite à la fluorescence produite, l'ADN se présente sous forme de bandes blanches (ainsi que l'ARN qui est plus diffus).

Une photo peut alors être prise en présence de certains filtres arrêtant les UV.

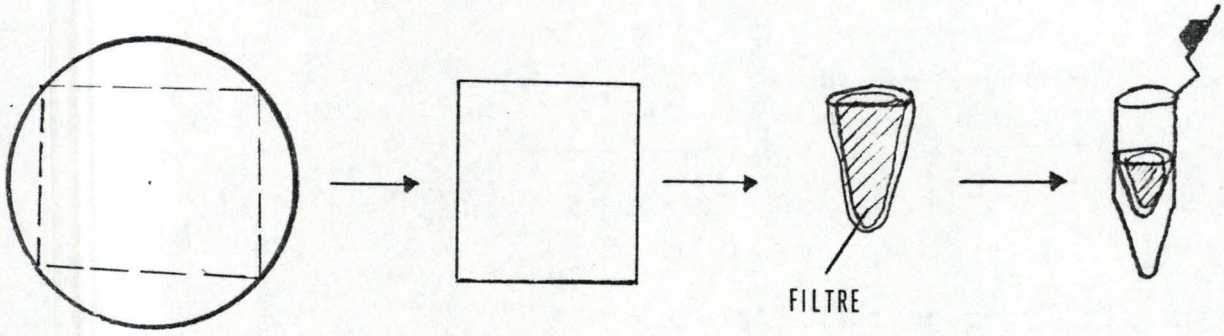
4.2. Extraction des bandes

Il s'agit d'une technique de récupération de bandes d'ADN à partir d'un gel d'agarose. (80)

L'ADN présent dans le gel est centrifugé dans un ependorf et est entraîné à travers le filtre qui retient l'agarose.
Les fragments ainsi récupérés sont suffisamment purs pour beaucoup de réactions enzymatiques.

Une étape de conditionnement du filtre est nécessaire et consiste en ceci :

Le filtre Durapore (Millipore, GVWP 04700) est découpé pour former un carré qui est ensuite humecté avec de l'eau bidistillée. Le filtre est plié et introduit dans un cône (extrémité) d'un ependorf préalablement perçé avec une aiguille portée au rouge. Le tout est placé dans un ependorf et prêt à recevoir la bande de gel.



Toutes ces opérations se font avec des gants stériles. Après découpage de la bande, une centrifugation de 10' est effectuée. Le filtre est à nouveau humecté avec de l'eau stérile et une deuxième centrifugation de 5' est faite.

Le filtrat obtenu est additionné de 2,5 volumes d'éthanol absolu après avoir ajouté 1/10 en volume de Sodium Acétate 3 M pH 5,2.

Une précipitation est effectuée pendant une demi-heure à - 70 ° C (ou 2 heures à - 20 ° C) suivie d'une centrifugation de 20' à 12 000 RPM.

Pour terminer, le culot (non visible) est resuspendu dans du TE.

4.3. Restriction

L'ADN des bactéries et des plasmides peut être clivé in vitro par des enzymes de restriction reconnaissant des sites spé-

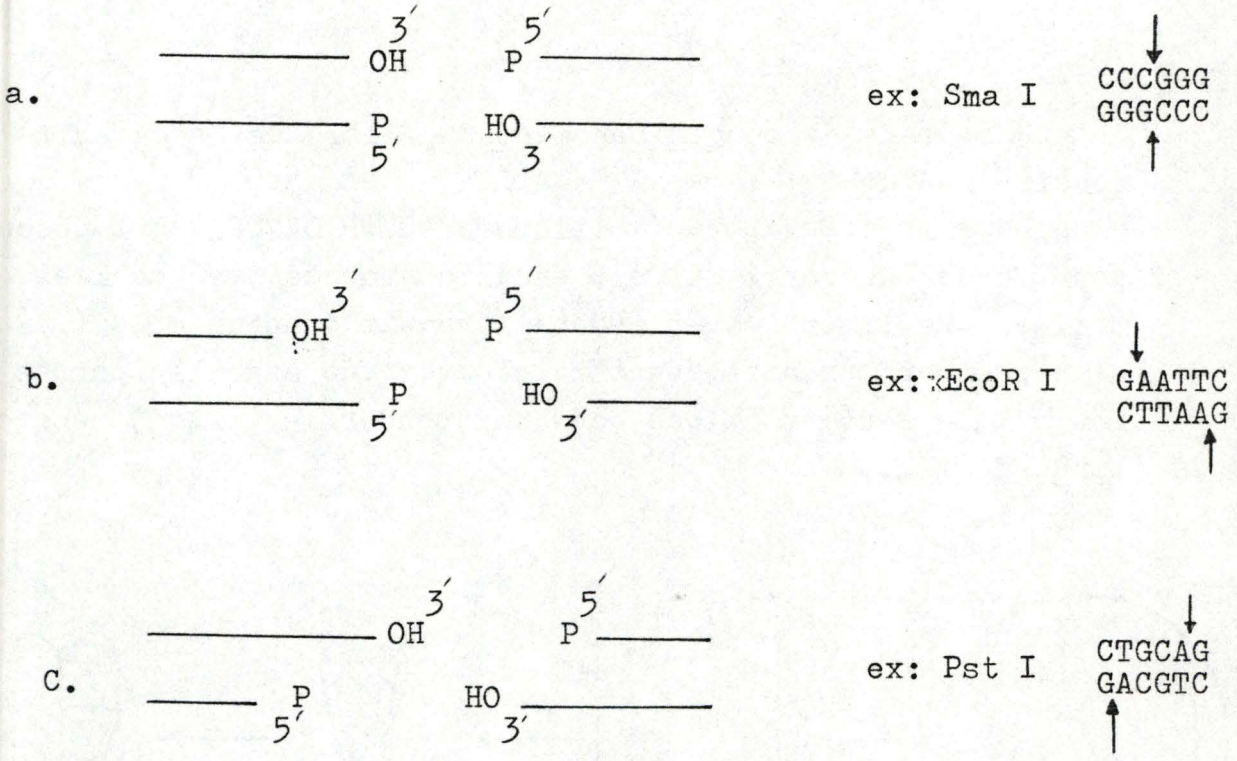


Figure 8: Types de restrictions

Low	Bgl I
	Cla I
Médium	Hind III
	Pst I
	BamH I
	Bcl I
High	EcoR I
	Sal I

Figure 9: Exigences salines de quelques enzymes

cifiques sur l'ADN.

Il existe 3 familles de restriction :

a) restriction à bouts francs :

Le point de coupure est symétrique (figure 8 a)

ex : Sma I

b) restriction à bouts collants :

coupure asymétrique du côté gauche. L'enzyme coupe en biseaux et génère des extrémités 5' faisant saillie : ce qui signifie que c'est le brin portant le phosphate 5' qui est situé en avant de l'ADN (figure 8 b).

ex : Eco R I

Ce type d'extrémité peut être rempli (voir rubrique filling).

c) restriction à bouts collants :

coupure asymétrique du côté droit. L'enzyme coupe en biseaux et génère des extrémités 3' faisant saillie : le brin portant l'hydroxyle 3' est situé en avant de l'ADN (figure 8 c).

ex : Pst I

Ce type d'extrémités ne peut être rempli.

Trois types de tampons sont utilisés suivant l'exigence saline de chaque enzyme. Les concentrations sont les suivantes :

Buffer	NaCl	Tris · Cl (pH 7.5)	$MgCl_2$	Dithiothreitol
Low	0	10 mM	10 mM	1 mM
Medium	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
High	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM

Because the enzyme *Sma*I will not work well in any of the above buffers, a separate buffer should be made up, consisting of:

20 mM KCl
10 mM Tris · Cl (pH 8.0)
10 mM $MgCl_2$
1 mM dithiothreitol

(MANIATIS p 104)

Un tableau reprend quelques enzymes et leurs exigences (figure 9).

Il est également à noter que certaines enzymes exigent un tampon propre : par exemple, Sma I exige du KCl pour fonctionner . Nde I exige des concentrations salines très élevées (

Le nombre d'unités enzymatiques ajoutées dépend du type de préparation (miniprep, maxiprep) que l'on a et de l'efficacité de l'enzyme. Toutes les enzymes qui ont été utilisées dans mes expériences proviennent de Boehringer sauf Nde I (Biolabs, BRL).

4.4. Extraction au phénol

Elle est pratiquée après une restriction, après une miniprep ou à chaque fois que l'on veut se débarrasser de protéines.

Protocole :
- porter le volume à extraire à 75 µl (avec du TE) dans un ependorf
- ajouter un volume équivalent de phénol- chlorophorme
- mélanger au vortex 20 secondes
- centrifuger 4' à 12 000 RPM dans une centrifugeuse de table pour séparer les phases
- reprendre la phase aqueuse supérieure
- remettre 75 µl de TE
- mélanger au vortex 20 secondes
- centrifuger 4' à 12 000 RPM
- reprendre la phase aqueuse supérieure
- rajouter un volume égal de phénol aux phases aqueuses récupérées
- mélanger au vortex 20 secondes
- centrifuger 4' à 12 000 RPM
- reprendre la phase aqueuse
- ajouter 400 ou 600 µl d'éther saturé avec de l'eau
- mélanger au vortex 20 secondes
- centrifuger 1' à 12 000 RPM pour séparer les phases

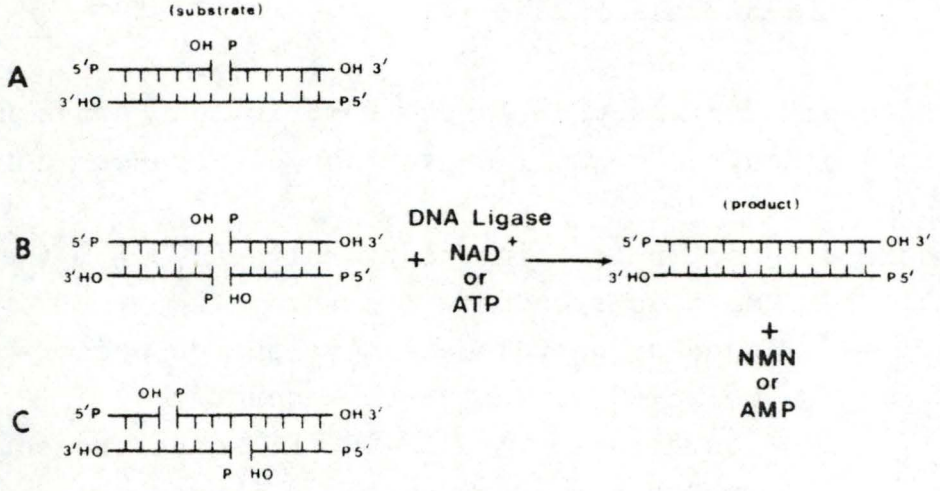


Figure 10 : Type de ligation.
(MANIATIS fig 6-1)

a.lors d'un "nick"
b.bouts francs
c.bouts collants

- prélever la phase éther (supérieure)
- répéter l'opération 3 fois.
- enlever la phase éther finale
- ajouter 1/10 du volume de Sodium Acétate 3 M pH 5,2
- ajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu
- laisser précipiter à - 70 ° C une demi-heure (ou 2 heures à - 20 ° C)
- centrifuger 20' à 12 000 RPM
- sécher sous vide
- resuspendre dans du TE

4.5. Ligation

La ligase (T4 DNA ligase, Boehringer) est une enzyme qui réalise des liens phosphodiesters (entre une extrémité 3' OH et une extrémité 5'P) (figure 10).

Cette enzyme est active sur des bouts collants et sur des bouts francs. Cependant, il est nécessaire, pour obtenir le même rendement dans les deux cas, d'utiliser des tampons différents.

4.5.1. Ligation à bouts collants

L'incubation est opérée à 14 ° C, 12 à 16 heures avec un tampon dont la composition est : (MANIATIS)

Tris H Cl pH 7,4	0,2 M	
$Mg\ Cl_2$	0,1 M	(10 x)
DTT	0,1 M	
ATP	10 mM	

4.5.2. Ligation à bouts francs

La durée d'incubation est de 4 heures et celle-ci se fait à température de chambre (20 - 22 ° C).

Le tampon utilisé a la composition suivante : (30)

Tris H Cl pH 7,4	250 mM	
$Mg\ Cl_2$	50 mM	
Polyéthylène glycol 8000(PEG)	25 %	(5 x)
ATP	5 mM	
DTT	5 mM	

L'action du PEG, qui réduit le volume d'eau libre, permet d'optimiser les conditions de ligation en augmentant la concentration relative des produits à liguer.

4.5.3. Remarque

Dans de nombreux cas, si l'on augmente la concentration en enzymes, l'efficience de la réaction est également majorée.

Cela ne semble pas être le cas pour la ligation. Si l'on augmente la concentration en ligase, une augmentation de l'efficience de la ligation ne se produit pas.

Il se produirait une gène stérique : si toutes les extrémités à liguer portent une molécule de ligase, la ligation ne se produirait plus bien car ces molécules de ligase se gêneraient dans leur action.

4.6. " Filling " ou remplissage

Si deux extrémités qui n'ont pas été coupées par la même enzyme de restriction veulent être soudées, il se pose un problème de compatibilité.

Le " filling " ou remplissage consiste à remplir les extrémités collantes obtenues après restriction et permet de surmonter ce problème. Il nécessite l'utilisation du fragment Klenow qui est la partie de l'ADN polymérase de E.coli responsable de l'activité 5' $\longrightarrow$ 3' polymérase ainsi que de l'activité 3' $\longrightarrow$ 5' exonucléase.

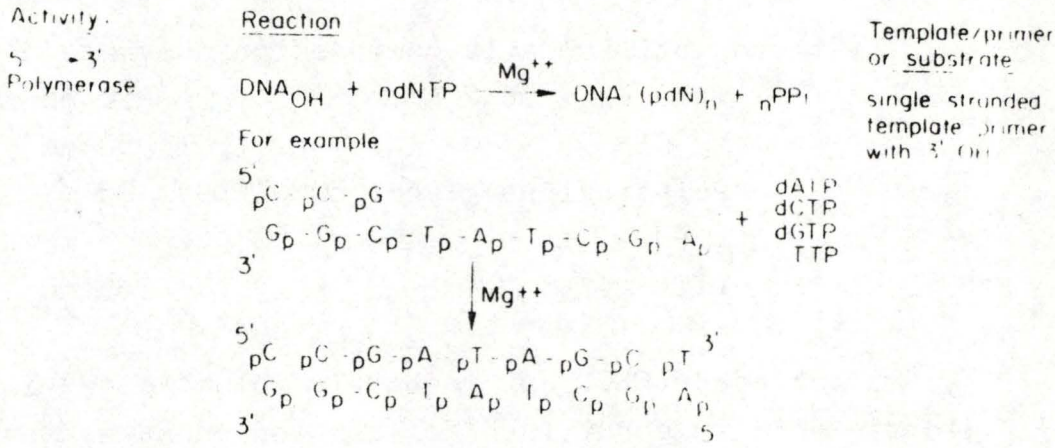


Figure 11: Activité 5' → 3' Polymérase de la Klenow.
(MANIATIS)

La première de ces activités est celle qui nous intéresse lors du " filling " (figure 11).

Grâce à celui-ci, une ligation à bouts francs pourra se faire. Le tampon utilisé est le tampon de Nick - Translation ou " Nick - Translation Buffer " : (MANIATIS)

Tris HCl pH 7,2	0,5 M	
Mg S O_4	0,1 M	10 x
Dithiothreitol	1 mM	
BSA (Bovine Serum Albumin)	500 µg/ml	

Le protocole typique utilisé est celui-ci :

X	µl	d'ADN à remplir
1	µl	d NTP 2 mM
2,5	µl	" Nick-translation buffer " 10 x
Y	µl	H_2O
25	µl	FINAL

Deux unités de Klenow (Boehringer ou AMERSHAM) sont ajoutées puis mélangées et le tout est incubé à 22 ° C pendant 15 à 30'.

Ensuite, l'enzyme est inactivée par un passage de 5' à 70 ° C.

Le " filling " ne peut se faire que sur une extrémité 3' OH à condition que celle-ci ne soit pas saillante, la Klenow nécessitant un " template " que l'extrémité 5' saillante lui offre.

4.7. Transformation chez E.coli

Dans un premier temps, les cellules d'E.coli sont rendues " compétentes ", c'est-à-dire capables d'accepter de l'ADN de plasmide en présence d'ions calcium.

Préparation des cellules compétentes :

Une culture de bactéries est arrêtée en phase exponentielle (à DO 550 nm de 0,3) en la gardant 10 minutes dans un bain de glace; on la centrifuge dans une centrifugeuse de table. Les

cellules sont resuspendues dans la moitié de volume de départ.de $Ca\ Cl_2$ 0,05 M froid et gardées à 0 ° C pendant 20 minutes.

La suspension bactérienne est centrifugée à nouveau et les bactéries remises en suspension dans un 1/10 du volume de départ de Ca Cl2 0,05 M froid. Les différents lavages au $CaCl_2$ 0,05 M ont fragilisés les cellules, désormais prêtes pour la transformation.

La transformation

200 µl de cellules compétentes ainsi obtenues sont ajoutées à l'ADN plasmidien que l'on veut faire entrer.

Le mélange est laissé au froid (0 ° C) pendant 40 minutes.

Les cellules subissent ensuite un choc thermique à 42 ° C pendant 2 minutes. Le passage dans la glace permettrait l'adsorption de l'ADN sur la paroi et le choc thermique, lui, permettrait l'entrée de l'ADN.

Un millilitre de 2x Y T est alors ajouté, ceci afin de permettre aux bactéries de récupérer (= " recovery mix ") à 37 ° C. Durant cette période, la β - lactamase est produite (contre l'ampicilline) et est exportée dans le périplasme où son action est possible.

Si les bactéries étaient directement étalées sur milieu sélectif, elles ne résisteraient pas à l'action de l'antibiotique car leur moyen de défense, c'est-à-dire la β - lactamase dans ce cas-ci, ne serait pas en place.

R E S U L T A T S

La souche à partir de laquelle le gène d'α - amylase est prélevé est B. licheniformis .

1. Clonage de l'extrémité 5' du fragment de 2,5 kb contenant le gène d'α - amylase en vue de l'obtention d'un vecteur d'expression et de sécrétion

Comme il a déjà été dit, le fragment de 2,5 kb limité par les sites Bcl I comporte tous les signaux indispensables à l'expression de l'α - amylase.

Un site pst I partage ce fragment en deux parties qui mesurent respectivement 0,8 kb et 1,7 kb. (figure 1)

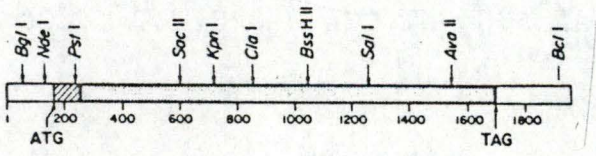
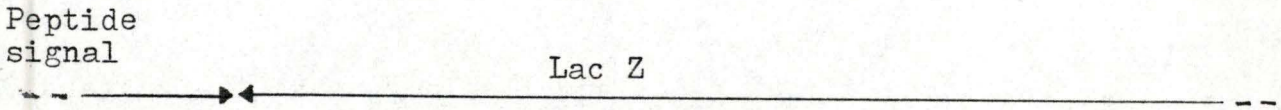


Figure 1. Cartes de restriction du gène d'α - amylase de B.licheniformis.
Partie hachurée = peptide signal.
Encadrement plus prononcé = partie mature de l'α - amylase. (GRAY)

600 bp correspondant à une région de fonction inconnue du fragment de 2,5 kb ne sont pas représentées. Cette région s'étend en amont du promoteur (au-delà de Bgl I) mais ne contient pas de site de restriction à l'exception du site Bcl I terminal.

Par un clivage avec pst I, on produit un fragment comportant le promoteur ainsi que la partie codante correspondant aux 26



-5 -4

SER ALA gly met gln ala trp his trp pro ser phe tyr asn val

TCT GCA GGC ATG CAA GCT TGG CAC TGG CCG TCG TTT TAC AAC GTC

AGA CTC CCG TAC GTT CGA ACC GTG ACC GGC AGC AAA ATG TTG CAG

Pst I

val thr gly lys thr leu ala leu pro asn leu ile ala leu gln

GTG ACT GGG AAA ACC CTG GCG TTA CCC AAC TTA ATC GCC TTG CAG

CAC TGA CCC TTT TGG GAC CGC AAT GGG TTG AAT TAG CGG AAC GTC

his ile pro leu ser pro ala gly val ile ala lys arg pro ala

CAC ATC CCC CTT TCG CCA GCT GGC GTA ATA GCG AAG AGG CCC GCA

GTG TAG GGG GAA AGC GGT CGA CCG CAT TAT CGC TTC TCC GGG CGT

pro ile ala leu pro asn ser cys val ala STOP

CCG ATC GCC CTT CCC AAC AGT TGC GTA GCC TGA

GGC TAG CGG GAA GGG TTG TCA ACG CAT CGG ACT

Figure 2 : Peptide produit si l'insertion de A se produit dans le pUC 18.

premiers acides aminés du peptide signal (ou peptide leader) et la région de fonction inconnue située en amont du promoteur. Ce fragment sera appelé A pour simplifier. L'autre fragment (B) produit, contient la partie codante pour les trois derniers acides aminés du peptide signal et pour l'α - amylase mature, c'est-à-dire sans peptide leader.

Ces deux morceaux ont été soumis à une ligation dans pUC 18 coupé avec Bam H 1 (qui est compatible avec Bcl I, voir matériel et méthodes) et avec Pst I. Ces travaux ont été effectués à Dublin par Monsieur Delcour.

Lors de la ligation, en admettant que les fragments A ou B s'insèrent, ils le feront dans une égale proportion (50-50).

Cependant, lors de la transformation, un plasmide de plus petite taille entre plus facilement dans la bactérie. Donc, dans ce cas-ci parmi les recombinants, un plus grand nombre doit avoir le fragment A.

27 colonies blanches furent obtenues parmi lesquelles les recombinants devaient être présents (cfr matériel et méthodes). Parmi ces colonies, aucune n'avait la partie A comme si une contre-sélection se produisait en faveur de B.

Maintenant, pourquoi cette contre-sélection ?

Regardons le polypeptide qui est produit lors de l'insertion de A. (figure 2). La protéine va résulter de la fusion des 26 premiers acides aminés du peptide signal et de 53 acides aminés provenant eux, de la fusion de A avec le PUC 18 ou site pst I.

La machinerie de traduction s'arrête une fois le STOP arrivé (après 53 + 26 aa = 79 aa).

La taille du peptide étant réduite, la machinerie va " s'emballer ", c'est-à-dire qu'il va y avoir une production de ce peptide en très grande quantité.

Qu'est-ce que la protéine de 79 aa pourrait avoir comme effet ? Elle peut être toxique par elle-même du fait de sa composition en acides aminés. Elle pourrait s'accumuler dans le périplasme où elle aurait une action toxique ou bien encore saturer les sys-

tèmes de transport dans la membrane interne. La β - lactamase, qui est une enzyme périplasmique, a besoin des systèmes de transport. Elle ne sera active contre l'ampicilline uniquement si elle se trouve dans le périplasme. Si les systèmes de transport sont saturés, l'enzyme ne pourra exercer son rôle parce qu'elle n'aura pas la localisation désirée, et lors de l'étalement des produits de transformation sur milieu sélectif (ampicilline), les bactéries comportant le pUC 18 auquel aura été ligué A ne pourront se développer.

En plus de ces 27 colonies, 12 colonies bleues étaient présentes et furent également examinées par miniprep. A partir de celles-ci, des gels furent effectués. Deux des minipreps mises sur gel présentaient un aspect différent des autres. Il pourrait s'agir de clones où les dimères et les trimères de pUC 18 étaient majoritaires, et donc des clones non recombinants.

Pourrait-il s'agir de recombinants ?

A priori, cela paraît impossible du fait de l'insertion de l'ADN étranger qui dirupte le gène de la β-galactosidase (β gal). En effet, l'insertion ne respecte pas la phase et la coloration typique qui apparaissait, suite à l'action de la β gal sur le x gal, n'est plus présente.

Le phénotype bleu n'aurait pu être restauré que si la phase était elle-même restaurée, par exemple suite à la perte d'une base. La protéine obtenue par fusion de la partie codante pour les 26 premiers acides aminés du peptide signal avec la β - galactosidase (1) permettrait peut-être d'éviter le caractère toxique de la protéine de 79 aa dont il a été question.

(1) L'extrémité NH_2 de la β - galactosidase ne semble pas avoir d'importance dans l'activité de l'enzyme. En effet, si cette extrémité est modifiée, cela n'a pas pour conséquence de supprimer cette activité . Donc l'ajout, pourvu qu'il soit en phase, d'un élément supplémentaire au gène codant pour cette enzyme est tout à fait toléré.

Pourquoi une telle protéine de fusion serait-elle acceptée par la bactérie ?

Soit, elle n'aurait plus la toxicité de l'autre peptide. Soit le nombre de protéines produites (messager traduisible plus long !) serait inférieur. Ceci éviterait ou diminuerait la monopolisation des systèmes de transport. De la sorte, la β - lactamase pourrait remplir sa fonction dans le périplasme.

Dans cette optique, il serait bon d'insérer A en phase avec la β- galactosidase. Ceci devient possible avec l'utilisation du pUC 9.

2. Clonage de la partie A' en phase avec le gène de la β- galactosidase

Dans les expériences que j'ai effectuées, j'ai utilisé le gène de l'α - amylase provenant de pα21. Le fragment de 2,5 kb limité par les sites Bcl I a été cloné dans un pUC 18 ou site Bam H 1 (voir introduction).

La dénomination du fragment contenant la séquence de fonction inconnue, le promoteur et la partie codante pour les 26 premiers aa du peptide signal doit être changée. Il ne s'agit plus du fragment A mais bien du fragment A'. A' comporte 18 bp en plus qui s'étendent de la jonction Bam H 1/ Bcl I au site Pst I de la batterie de sites du PUC 18.

La β - galactosidase produite à l'intervention de ce clonage devrait se trouver au niveau du périplasme suite à l'exportation réalisée par le peptide signal.

M13 mp9/pUC9

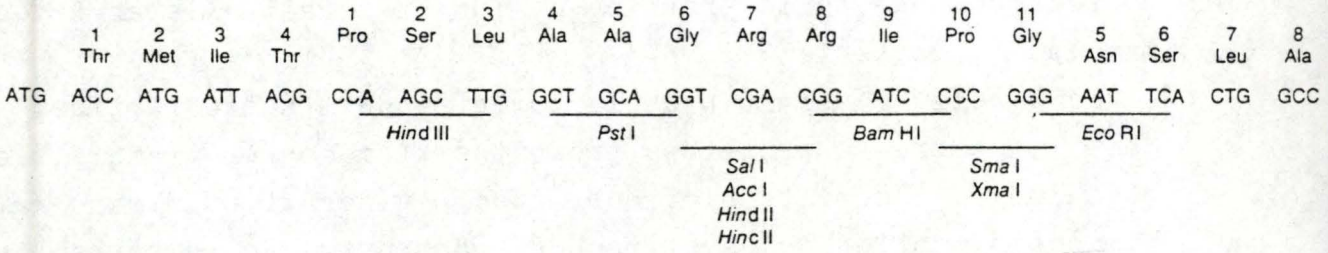


Figure 4: Batterie de sites du pUC 9 (BOEHRINGER).

Voyons maintenant d'un peu plus près comment ceci est réalisable. Tout d'abord, voici le schéma du vecteur que l'on veut obtenir ainsi que le produit de la fusion de A' avec lac Z (figure 3).

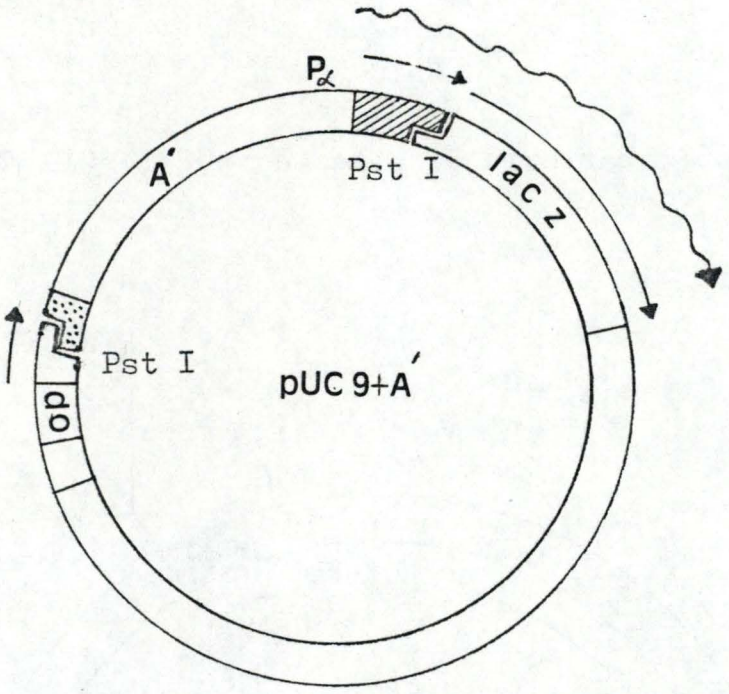


Figure 3 : clonage de A' dans le pUC 9

- Peptide leader, P_{α} = promoteur α - amylase
- ADN provenant de la batterie de site du pUC 18
- Protéine de fusion
- Protéine β - galactosidase
- Peptide signal (26 premiers aa)

1 ° Jonction séquence signal - lac Z :

L'enzyme Pst I coupe entre deux codons (Ala 5, Gly 6) dans la batterie de sites du pUC 9 représentée à la figure 4 (page ci-contre). De la même manière, Pst I coupe entre deux codons (Ala - 4, Ala - 3) dans la séquence signal.

Donc, la ligation de ces deux extrémités ne provoque pas un changement de phase de lecture : on passe de l'alanine - 4 du peptide signal à la Glycine 6 de la batterie de sites intercalées dans la β galactosidase. (figure 5, page suivante)

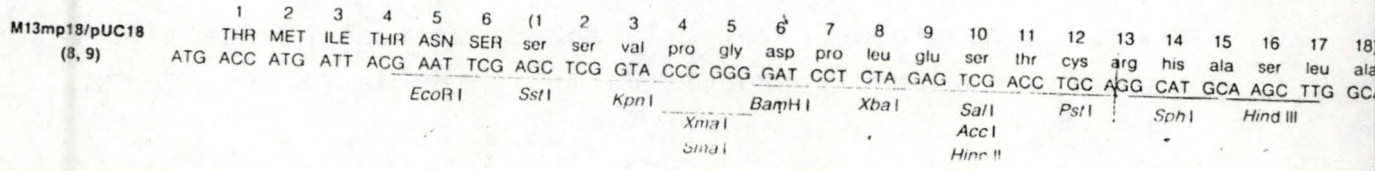


Figure 6 : Batterie de sites du pUC 18 (GIBCO BRL)

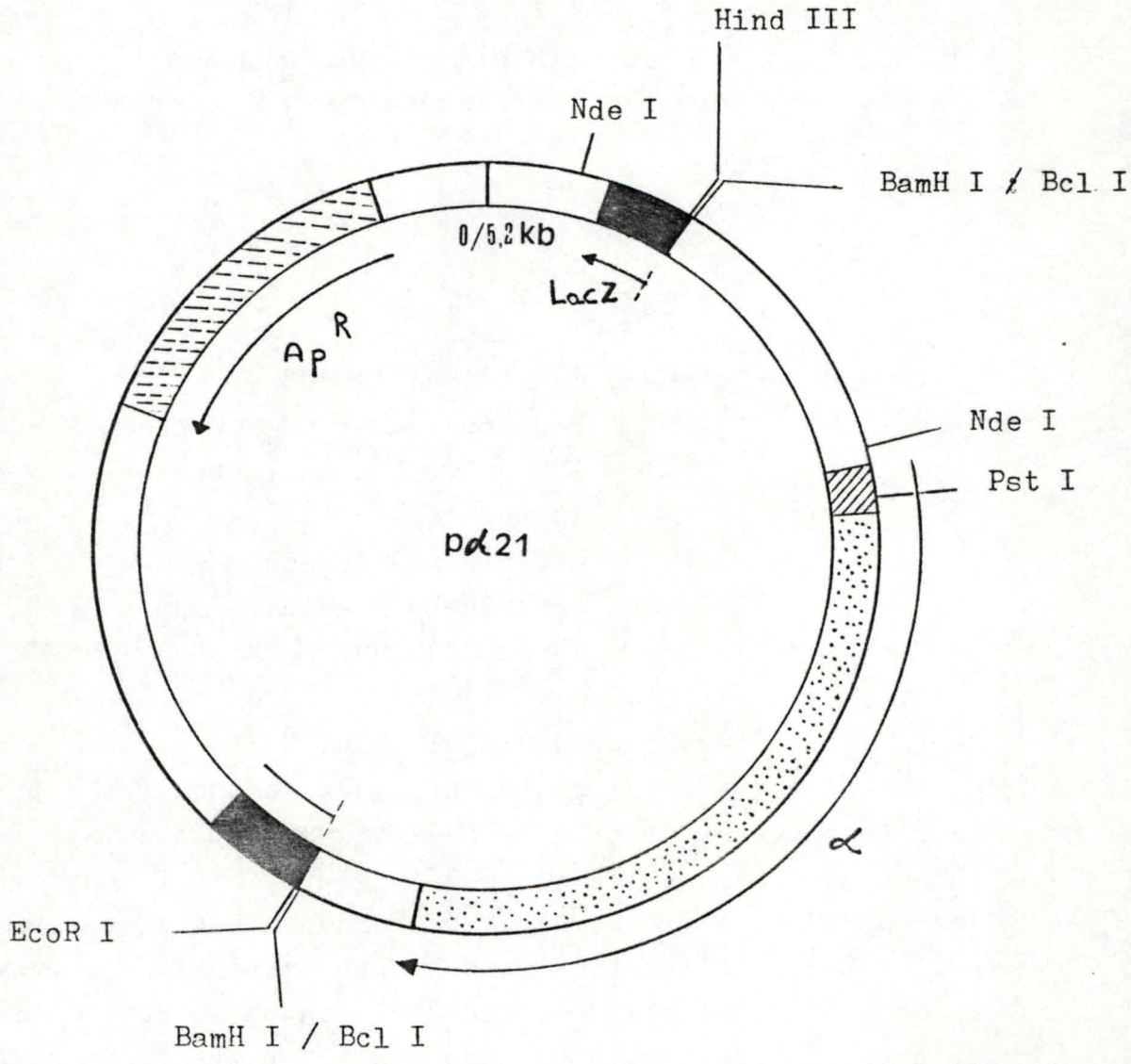


Figure 7 : Schéma du p 21

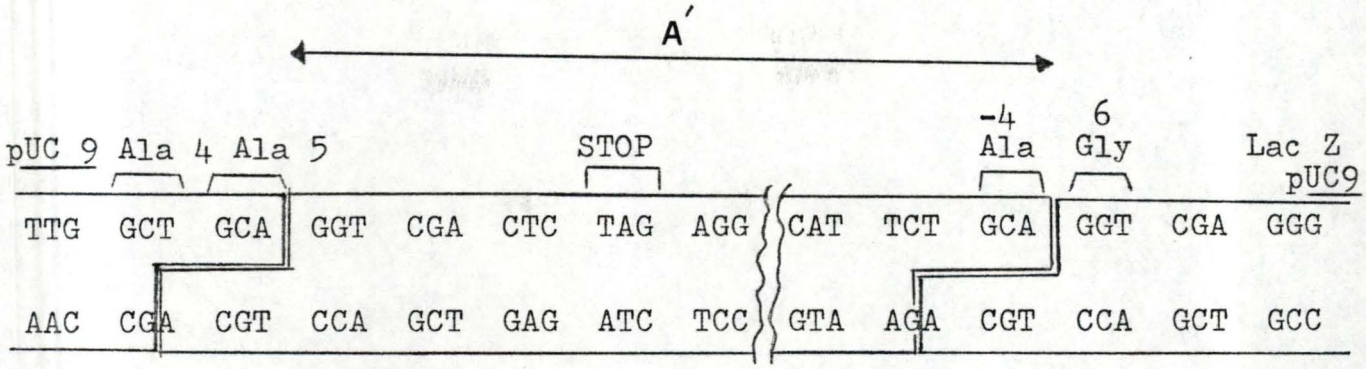


Figure 5. Jonctions du fragment A' avec le pUC 9.

2 ° Jonction gauche (ou point de vue de la transcription) - entre le pUC 9 et A'

Après l'alanine 5 de la batterie de sites du pUC 9, on entre dans le fragment A' sans respect de la phase. Un STOP de traduction TAG est rencontré 4 codons au-delà de la jonction. (figure 5)

Ce STOP est très intéressant : au cas où un messager s'étendant jusqu'à la fin de lac Z serait transcrit, le STOP évite la production d'une protéine sans signification.

2.1. Description de l'expérience

- 2,41 µg de pUC 9 (provenant d'une maxiprep) ont été restreints par Pst I (15 unités) et ensuite extraits au phénol.
- 26 µg de pα 21 ont été restreints par Pst I. Le produit de la restriction a été déposé sur un gel qui a été soumis à une différence de potentiel. Après migration, le gel a été plongé dans une solution de Br Et dans le but de révéler les fragments d'ADN restreint. Deux bandes apparaissent, l'une correspond à A' (0,8 kb), l'autre au pα 21 sans A' (4,3 kb).

A' est alors extrait et traité suivant la méthode d'extraction d'une bande (voir matériel et méthodes). Ensuite, une extraction au phénol est effectuée.

- Le pUC 9 coupé avec Pst I (40 ng) et le fragment A' (200 ng) ont été ligués avec une T4 DNAligase dans une stoechiométrie molaire de respectivement 1 et 15 pour favoriser l'insertion.

200 µl de cellules compétentes ont été ensuite transformées par le produit de ligation pour être finalement étalées sur des boîtes LB A 50 (ampicilline 50 µg/ml) sur lesquelles ont été étalés préalablement du Xgal et de l'IPTG. Les boîtes sont mises à l'étuve pour la nuit à 37 ° C.

2.2. Résultats

2.2.1. Témoins de l'expérience

Pour bien s'assurer que les conditions de l'expérience étaient bonnes, deux témoins ont été utilisés.

1o ng de pUC 9 non coupé ont été utilisés pour transformer 200 µl de cellules compétentes. Les bactéries ayant incorporé le pUC 9 sont seules capables de se développer sur milieu contenant de l'ampicilline et sont également capables de transformer le Xgal en un composé coloré en bleu. En effet, le gène de la β - galactosidase est intact.

20 µl de produit de transformation ont été étalés sur une boîte LB A 50 où 130 colonies bleues ont poussé.

La transformation a marché : les conditions sont bonnes mais on ne peut pas donner un taux de transformation par ce seul étalement.

Durant ce travail, je me réfererai plusieurs fois à ce témoin de transformation.

A côté de celui-ci, j'ai effectué un témoin de ligation : 40 ng de pUC9 coupé avec Pst I ont directement été utilisés dans la transformation sar ligation préalable. Ce témoin est à comparer avec les résultats de l'expérience visant à cloner A'. Le nombre de colonies obtenues pour la même quantité étalée (du mélange de transformation) est plus de 20 fois supé-

rieure quand la ligation a été effectuée. Ceci confirme donc bien que la ligation s'est bien déroulée.

2.2.2. Criblage systématique des transformants

Il consiste à analyser les clones (représentés par des colonies sur boîtes) par miniprep suivie d'un gel.

Le clonage a été répété plusieurs fois mais dans aucun cas, il n'y a eu des recombinants. D'après la construction réalisée, c'est parmi les colonies bleues que l'on devrait trouver les recombinants. 61 colonies bleues ont ainsi été testées mais à chaque fois, le profil en miniprep du plasmide présent dans chacun des clones correspondait à celui du pUC 9.

La figure 8 montre quelques-unes des miniprep mises sur gel.

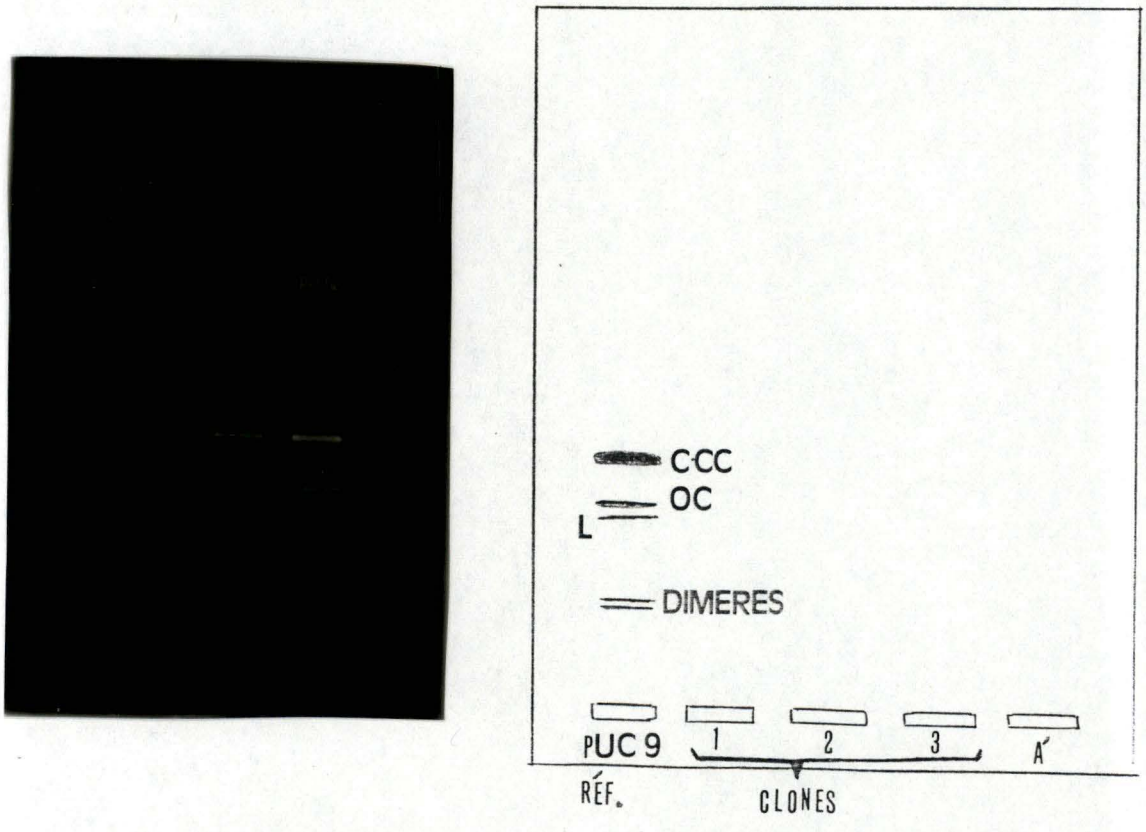


Figure 8 : Gel d'analyse de quelques clones. Le schéma explique le gel (pistes, formes diverses du plasmide)

L'utilisation des miniprep a permis de tester une grande série de colonies bleues où l'on attendait des recombinants. Evidemment, rien ne différenciait les colonies bleues recombinantes attendues des colonies bleues non recombinantes. Du fait de l'absence totale de recombinants, il était logique de mettre en doute la qualité du fragment A'. Il fallait s'assurer de la " ligabilité " du fragment ainsi que de sa nature exacte.

Dans ce but, cette expérience fut réalisée : 500 ng de A' furent soumis à une ligation pendant 36 heures. Si les extrémités des fragments limités par les sites Pst I étaient intacts, la ligation devrait entraîner la formation de multimères de A' liés bout à bout et pouvant atteindre quelques kilobases. Par contre, si une des extrémités était modifiée en moyenne sur deux, rendant non possible l'insertion du fragment, on devrait obtenir au maximum des dimères de A'. Sur gel, de telles différences se seraient directement remarquées.

Pour s'assurer maintenant de la nature exacte de A', une restriction avec Bgl I fut effectuée et devait fournir deux fragments ayant respectivement 0,2 kb et 0,6 kb.

Les produits de ces opérations ont été mis sur gel : figure 9.

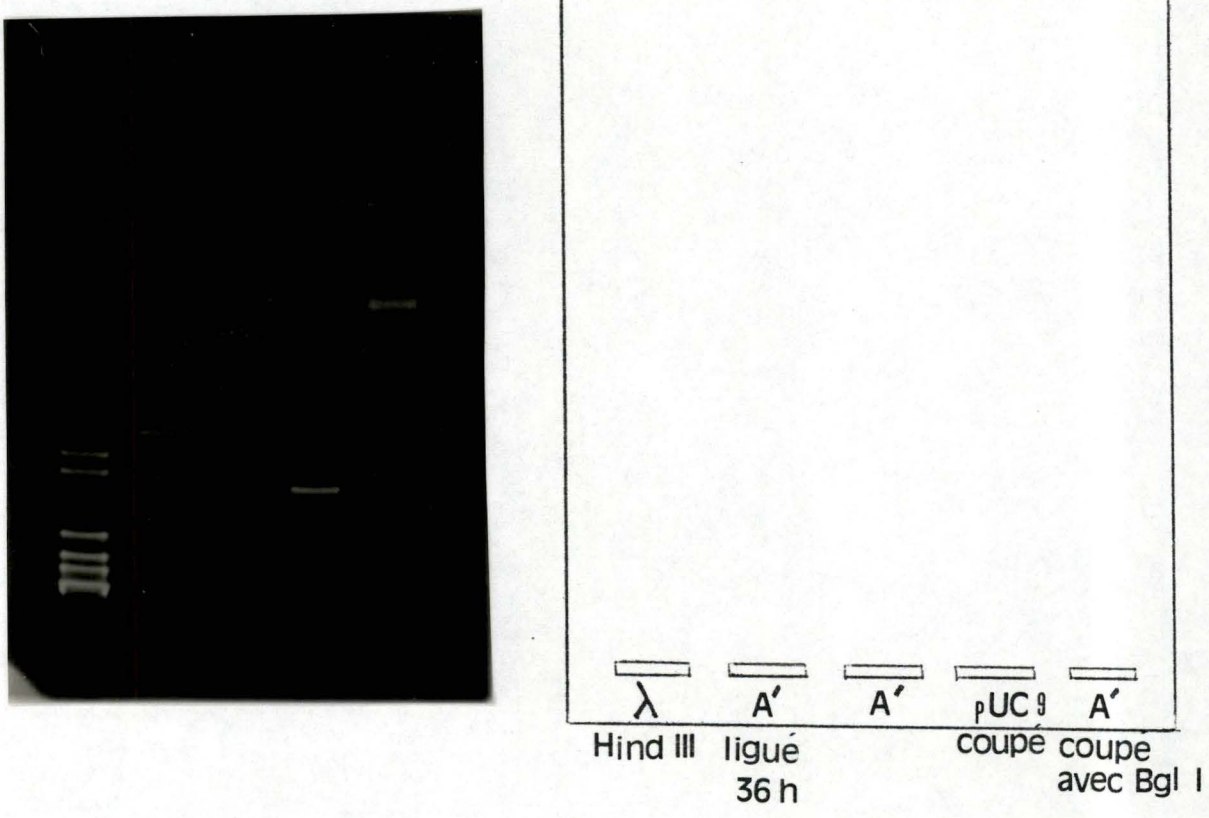


Figure 9 : vérification de la " ligabilité " et de la nature de A'. Pour bien pouvoir analyser le gel, il convient de donner les tailles respectives des morceaux d'ADN du phage λ coupé avec Hind III : 23,13 kb; 9,416 kb, 6,557 kb, 4,361 kb, 2,322 kb, 2,027 kb, 0,564 kb, 0,125 kb (non visible sur le gel).

A partir de ce gel, deux conclusions peuvent être dégagées :

1 ° La restriction Bgl I fournit bien les deux morceaux attendus (bien qu'elle ne soit pas complète)

2 ° Des multimères de A' sont largement présents et certains atteignent jusque 4 à 5 kb (6 à 7 fois A').

Donc, la qualité du matériel n'est pas à mettre en doute : la ligation se produit très bien et l'expérience est une preuve

de l'état intact des extrémités Pst I de A'.

Les résultats obtenus, ainsi que les différents contrôles semblent indiquer que A' ne peut être cloné en phase avec la β. galactosidase.

2.2.3. Résultats obtenus par les tests de constitutivité

2.2.3.1. Test de constitutivité

Dans la partie " Matériel et Méthodes ", j'ai déjà discuté de la régulation de l'opéron lactose. On a vu qu'il y avait deux types de régulation, une négative et une positive. Celle-ci dépendait de la concentration en glucose dans le milieu.

Avant de parler du test, il convient de rappeler quelques notions nécessaires à la compréhension de celui-ci.

La souche de bactéries utilisée, Tg 1, ne possède pas l'opéron lactose (Δ lac pro). Par contre, le pUC 9 (comme les autres pUC) porte une partie de l'opéron lactose qui produit une β galactosidase tronquée en son extrémité 3' qui va pouvoir s'associer avec la β galactosidase tronquée en son extrémité 5' dont le gène est porté par le facteur F' (α - complémentation).

Le gène codant pour le répresseur (lac i) n'est pas fonctionnel. Cependant, le facteur F' porte le gène lac iq qui code pour le répresseur à un taux 10 fois supérieur au gène lac i sauvage.

La raison de ceci tient tout simplement au grand nombre de copies du plasmide pUC 9 (300), et de ce fait au grand nombre de gènes lac Z à réprimer.

En faisant varier la concentration en glucose, la modulation de l'expression (transcription ici) du gène peut être envisagée. En augmentant cette concentration, on pourrait faire pencher la balance en faveur d'une absence d'expression du gène (absence du couple cAMP - CRP).

Dans ce but, il ne faut pas ajouter d'inducteur (IPTG) aux boîtes.

L'étalement des cellules bactériennes ne se fera plus sur milieu LB mais bien sur milieu minimum : le " Yeast extract " qui fait partie du milieu LB (voir Matériel et Méthodes) contiendrait des molécules jouant le rôle d'inducteur, c'est la raison pour laquelle on lui préférera le milieu minimum glucose.

Deux types de boîtes ont été coulées :

1 ° des boîtes Minimum A 50 auxquelles du glucose est ajouté à raison de 0,2 %.

2 ° des boîtes Minimum A 50 auxquelles du glucose est ajouté à raison de 1 %.

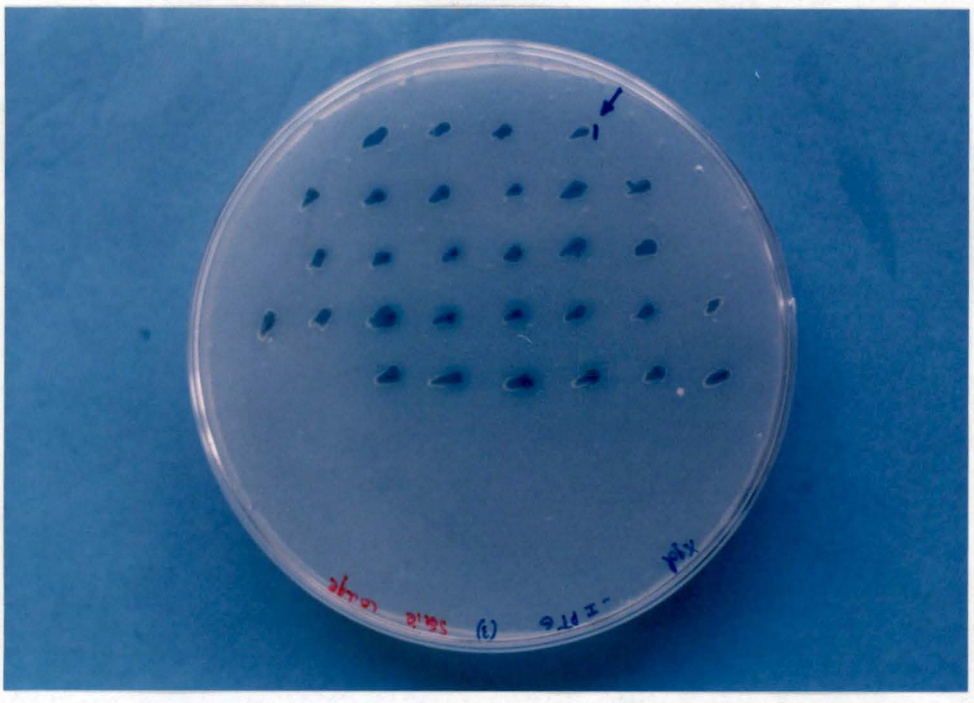
Sur les boîtes comportant 1 % de glucose et sur lesquelles avait été étalé du X gal mais pas d'IPTG, on s'attendait à n'avoir aucune activité β galactosidosique (bactéries possédant le pUC 9).

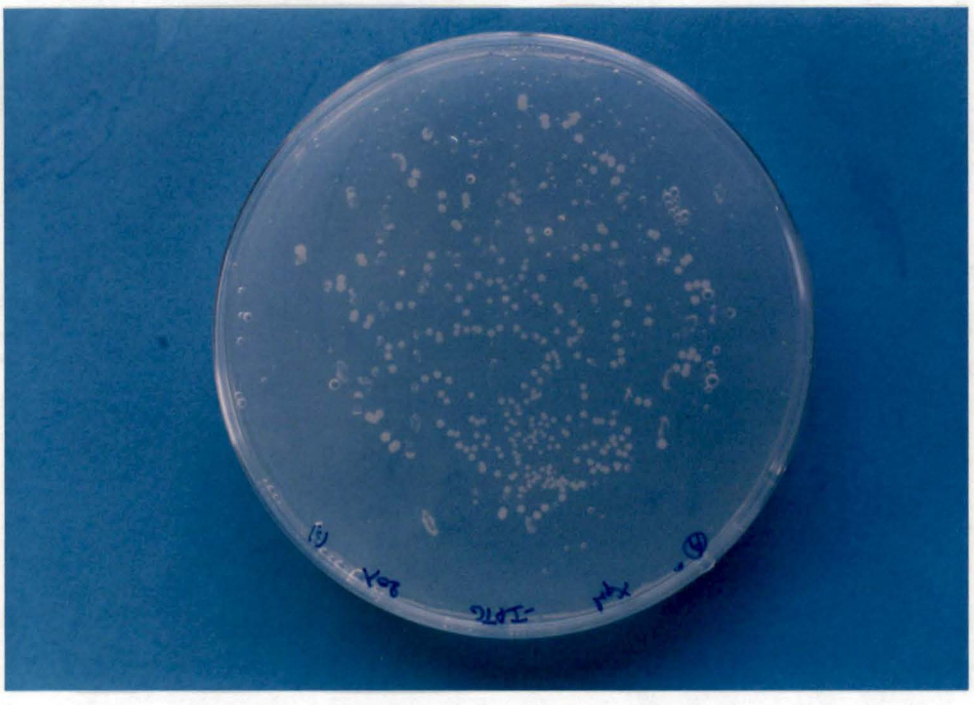
Ceci fut le cas : le phonétype bleu n'est pas apparu. Sur les boîtes comportant 0,2 % de glucose (sans IPTG, en présende de X gal), les colonies comportant le pUC 9 étaient bleues.

Dès ce moment, un test facile était à notre diposition. En supposant que A' soit inséré dans le pUC 9 en phase avec lac Z, l'expression du gène hybride, responsable de la production d'une β-galactosidase à laquelle un peptide signal est couplé, n'était plus soumise à la concentration en glucose ni à l'IPTG.

En effet, ce gène est sous le contrôle du promoteur de l' α - amylase. Donc, il devrait y avoir une ségrégation des colonies bleues, obtenues sur milieu LB au minimum glucose 0,2 % sans IPTG, lorsque l'étalement était effectué sur milieu minimum glucose 1 % sans IPTG (toujours en présence d'ampicilline bien sûr !) : les clones recombinants devaient être bleus dans les deux cas.

Ce test de " constitutivité " allait permettre de gagner du temps et surtout de tester un plus grand nombre de clones.





2.2.3.2. Résultats obtenus par ce test

Une série d'étalements sur boîtes Minimum glucose 1 % (A 50, sans IPTG, avec X gal) et sur boîtes Minimum glucose 0,2 % (A 50, sans IPTG, avec X gal) n'a pu mettre en évidence de clones intéressants :

- sur glucose 1 %, toutes les colonies étaient blanches
- sur glucose 0,2 %, l'aspect des colonies était variable. certaines étaient d'une intensité bleue plus forte que d'autres.
  Ces colonies furent testées par des miniprep. En fin de compte, des restrictions avec Pst I ont confirmé qu'il s'agissait tout simplement de pUC 9 (les plasmides et pas les colonies).

Ensuite, une série de repiquages à partir de boîtes minimum glucose 1 % A 50 (sans IPTG, avec X gal) a été effectuée.

Les colonies blanches furent repiquées sur des boîtes minimum glucose 0,2 % A 50, avec X gal, sans IPTG.

Toutes ces colonies repiquées (167) deviennent bleues, mettant en évidence qu'il s'agissait de clones ayant incorporé le pUC 9 (figure 10).

Une colonie, cependant, qui fut mise en évidence sur LB A 50 avec X gal mais sans IPTG, était bleue; il s'agissait du clone 100.

Une remarque doit être faite :

On pourrait à priori penser que ce test est applicable en utilisant des boîtes comportant du milieu LB à la place du milieu minimum (sans IPTG, avec X gal).
Mais des molécules jouant le rôle d'inducteur seraient présentes dans le " Yeast Extract ". Ce test est moins fiable sans doute pour cette raison : des colonies comportant le pUC 9 apparaissent légèrement bleutées en l'absence d'IPTG !

Le clone 100 fut repiqué sur milieu minimum glucose 0,2 % et était bleu. Sur minimum glucose 1 %, ce clone apparaissait

très légèrement bleuâtre ! Il pouvait s'agir d'un recombinant, bien que, logiquement, la coloration aurait dû être la même que sur milieu minimum glucose 0,2 %.

Pour s'en assurer, ce clone a été soumis à une restriction avec Eco RI (et Hind III également) après qu'un miniprep suivi d'une extraction au phénol ait été effectuée.

Le profil du plasmide du clone 100 restreint correspondait à un pUC 9 coupé !

Une hypothèse fut avancée : deux pUC 9 coupés avec Pst I peuvent très bien se refermer entre eux et former un dimère.

Dans une orientation, deux gènes de β galactosidase sont reconstitués : figure 11.

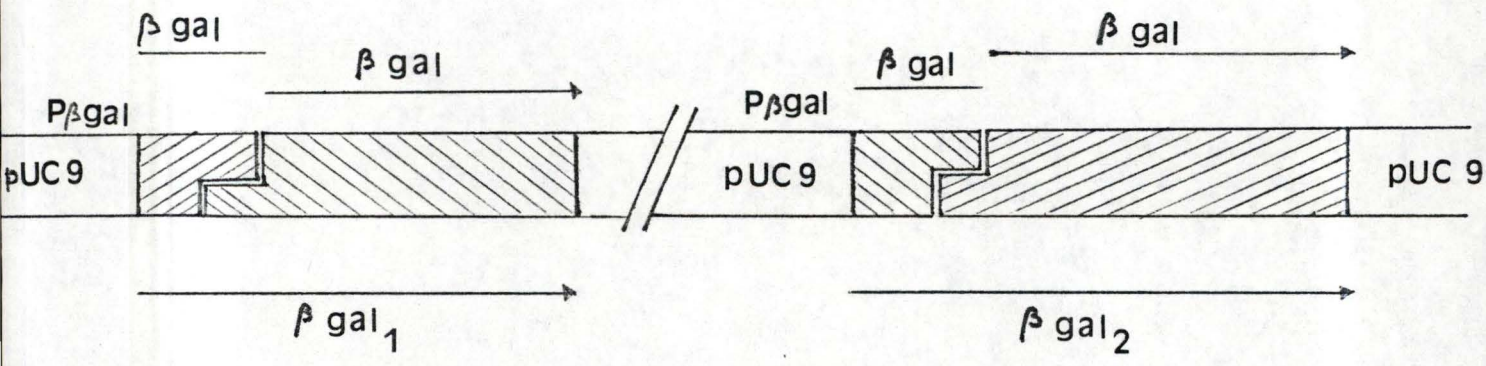


Figure 11 : Formation d'un dimère comportant deux fois le gène codant pour la β galactosidase.

$P\beta_{gal}$ = promoteur β galactosidase

βgal = protéine produite par lac Z

▨ = gène lac Z

Même lorsque le promoteur lac Z est affaibli par l'absence du couple cAMP - CRP (résultant de la haute concentration en glucose), la transcription de l'opéron peut s'effectuer à un niveau relativement faible, comme l'indique la couleur bleuâtre

de la colonie. Ceci résulte vraisemblablement de la carence relative en répresseurs, étant donné que le nombre de sites opérateurs à contrôler est double suite à la dimérisation (encore faut-il que le nombre de copies de dimères reste égal au nombre de copies de monomères normalement atteint).

La miniprep du clone 100 coupée avec Hind III fut soumise à une ligation puis des cellules compétentes (Tg 1) ont été transformées.

Les bactéries sont alors étalées sur des boîtes minimum A 50 glucose 1 % en présence de X gal mais sans IPTG.

Toutes les colonies étaient blanches et le repiquage de 20 d'entre elles sur boîtes minimum A 50 glucose 0,2 % (X gal, sans IPTG) fit apparaître des colonies bleues. Nous avons à faire avec des bactéries comportant le pUC 9.

Cette expérience est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse du dimère puisque l'on ne retrouvait plus de colonies légèrement bleuâtres sur glucose 1 %.

2.3. Conclusion provisoire

Au vu de mes résultats, l'insertion de A' en phase avec le gène de la β galactosidase ne permet pas de surmonter le problème rencontré précédemment. On est en droit de se demander pourquoi le clonage ne marche pas.

Le fragment A' n'est pas toxique lorsqu'il est couplé à l'α - amylase. La production peut se faire, le passage dans le périplasme, voire même la sécrétion (voir introduction).

Il faut cependant moduler cette affirmation.: des problèmes de stabilité ont été rencontrés.

Pourquoi lorsque A' n'est pas couplé à la partie codante de la protéine mature de l'α - amylase, y'a-t-il un obstacle à son clonage ? Est-ce que la séquence en amont du promoteur serait responsable de ces problèmes rencontrés ?

Pou le savoir, il conviendrait alors de cloner ce promoteur

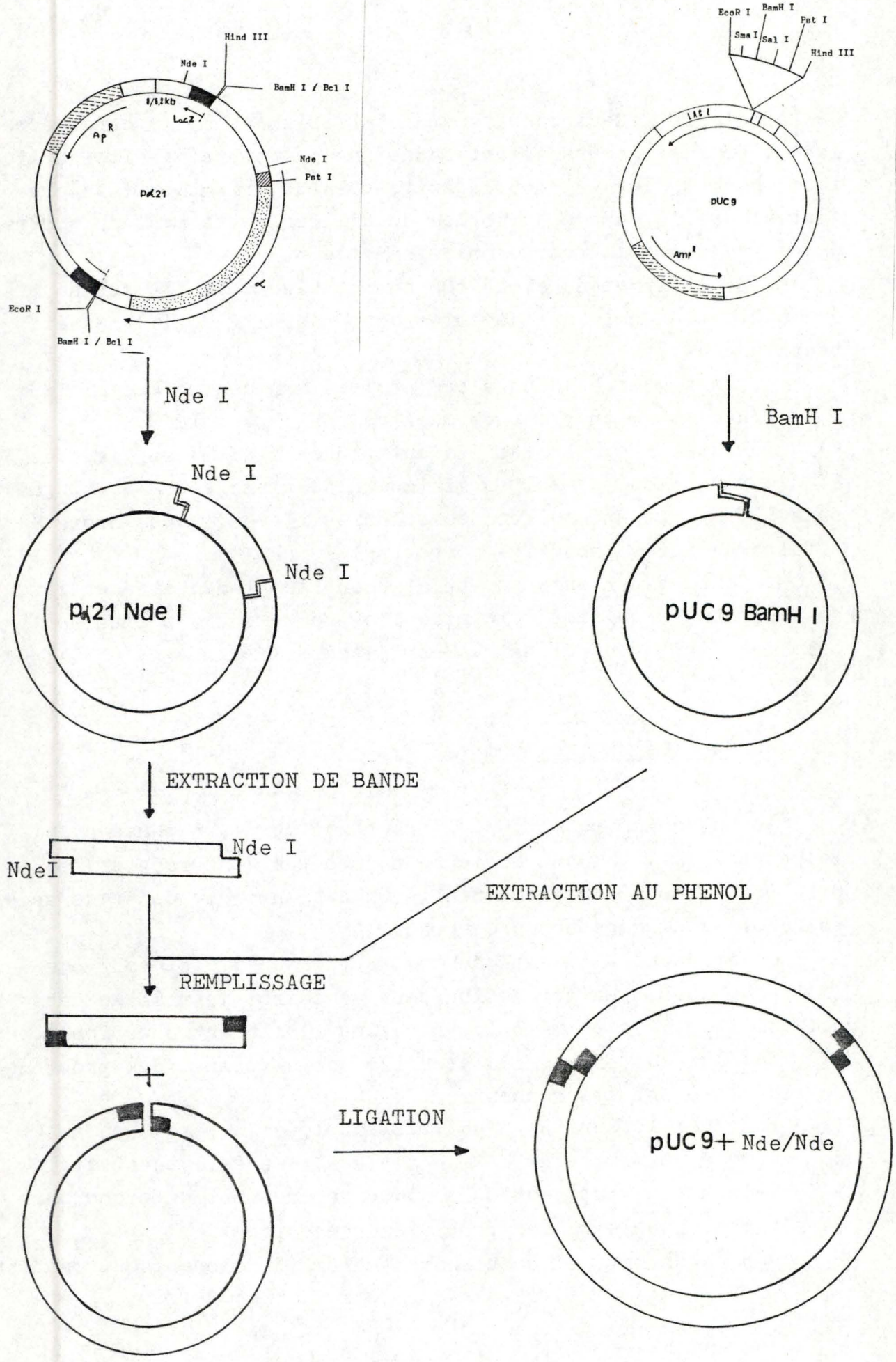


Figure 12 : Clonage non discriminant de la partie située en amont du peptide signal. Une seule orientation de l'insert est représentée. ▬ = extrémité remplie

avec cette séquence de fonction inconnue, sans y adjoindre le peptide signal. De la sorte, on évitera la production d'une protéine sécrétée.

Pour ce faire, je vais utiliser le site Nde I qui précède l'AUG du peptide signal et qui se situe juste après la boîte en - 10.

Donc, le promoteur est toujours entier bien que la Shine-Dalgarno ait été enlevée.

3. Clonage de la partie située en amont du peptide signal

3.1. Clonage non discriminant (figure 12)

12 µg de p α 21 ont été soumis à une restriction avec Nde I. Le site présent sur le pUC 18 natif et le site précédant le peptide signal (cfr carte du p α 21) entraînent la libération d'un fragment de 0,9 kb et d'un autre de 4,2 kb.

La bande de 0,9 kb est traitée suivant la méthode d'extraction d'une bande.

Parallèlement, du pUC 9 coupé avec Bam H 1 (provenant d'un stock comportant initiallement 5 µg coupé avec 20 unités de Bam H 1) et extrait au phénol est soumis à un remplissage (ou " filling ").

20 ng de pUC 9 ainsi traité et 150 ng de fragment Nde I-Nde I de 0,9 kb qui a été rempli en même temps que le pUC 9 Bam H 1, sont mis à liguer dans une stoechiométrie molaire de respectivement 1 pour 20 favorable à l'insertion !

Une transformation est ensuite effectuée et les cellules transformées sont étalées sur boîtes LB A 50 puis mises à 37 ° C toute la nuit.

Les témoins ont montré que les conditions expérimentales étaient correctes :

+ témoin de transformation (déjà décrit à la rubrique 2.2.1)

+ témoin de ligation (idem)
+ témoin de " filling " ou de remplissage : 40 ng de pUC 9 coupé avec Bam H 1 ont été remplis puis ligués et soumis à la transformation.
50 µl du produit de transformation ont été étalés sur boîtes LB A 50 (X gal, IPTG) sur laquelle 85 colonies blanches et une colonie bleue se sont développées.
Le " filling " est donc correct mais il faut quand même signaler qu'il s'agit de pUC 9 de maxiprep.
Donc, les conditions sont optimales (pureté du matériel).

Résultats : Toutes les colonies sont blanches sauf quelques bleues qui sont le résultat soit d'un remplissage incomplet suivi d'une recircularisation du pUC 9, soit d'une restriction incomplète.

Parmi les 162 colonies blanches obtenues (170 µl du produit de transformation étalés), une vingtaine á été analysée par miniprep et celles-ci n'ont pas montré de recombinants.

Le problème posé par ce clonage est l'absence d'identification entre les recombinants et les non recombinants, tous étant blancs.

Plutôt que de poursuivre le criblage systématique par miniprep, je me suis tourné vers une autre clonage me permettant de discriminer les clones.

3.2. Clonage discriminant

a) Expérience : figure 13

40 ng de pUC 9 coupé avec Pst I ont été soumis à une digetion avec Sma I et ensuite extraits au phénol.

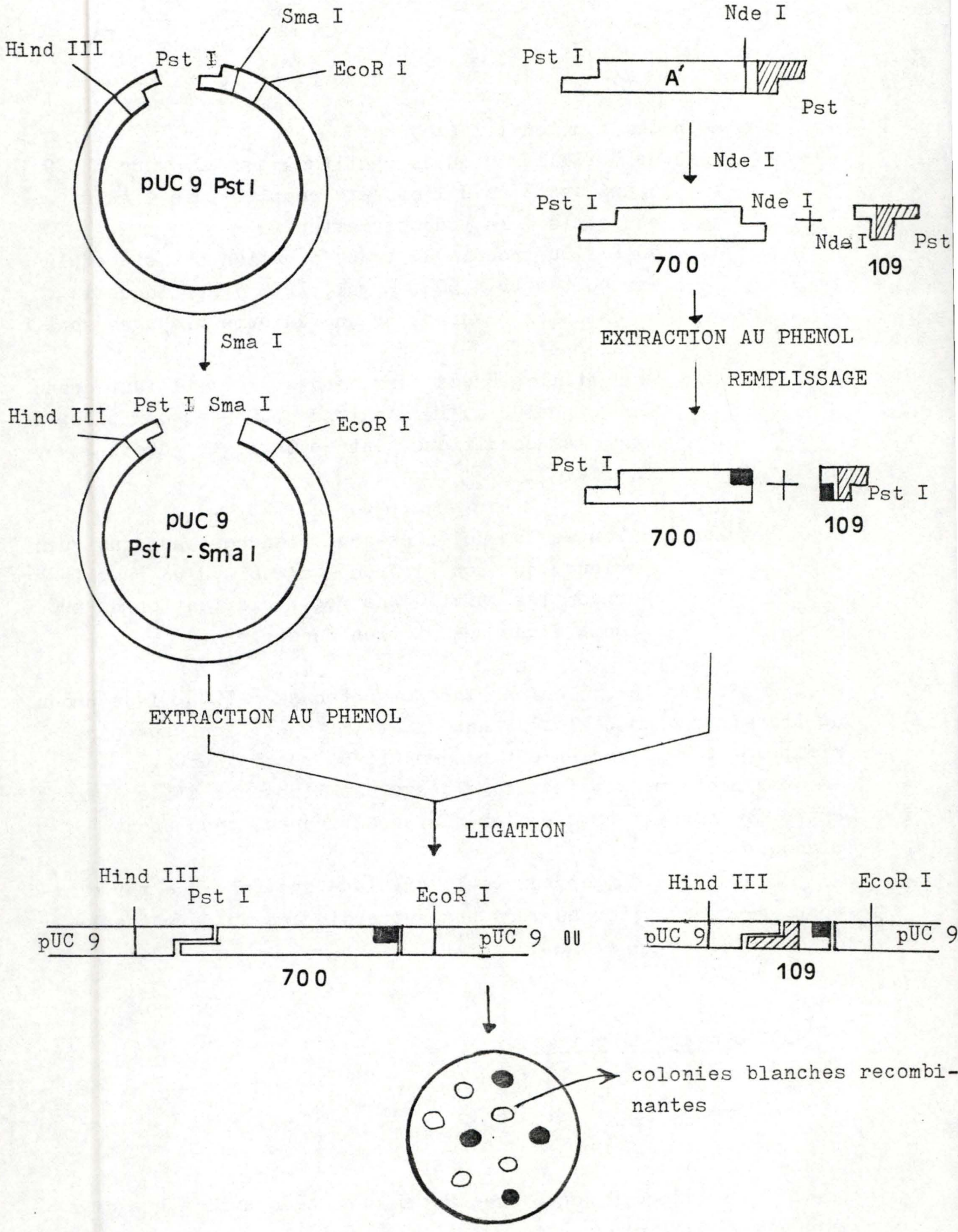


Figure 13 : Clonage discriminant de la partie 5' précédent la séquence signal.

Peptide signal

Extrémité remplie

300 ng de A', provenant de mon stock précédent sont soumis à une digestion avec Nde I et ensuite extraits au phénol.
Suite à cette restriction, le fragment A' de 0,8 kb fournit un fragment de 700 bp et un autre de 109 bp.
Un " filling " est effectué de manière à combler les deux bases manquantes créées par la restriction Nde I. De cette manière, j'obtiens un bout franc qui va pouvoir être collé avec l'extrémité Sma I du pUC 9 qui est également franche.

Une ligation est effectuée et conduit à l'obtention de deux recombinants possibles :

- soit le fragment de 700 bp est inséré
- soit le fragment de 109 bp est inséré

Dans cette expérience, les transformants seront de deux types :

1 ° bleus : + il s'agira de pUC 9 non coupé, ou coupé seulement avec Sma I ou avec Pst I, qui pourront se refermer du fait de la compatibilité des sites.

+ il peut aussi s'agir du petit fragment Sma I - Pst I (15 bp) libéré lors de la restriction du pUC 9 Pst I avec Sma I : ceci est très peu probable vu la stoechiométrie défavorable en faveur de son insertion. En effet, on a autant de ce fragment que de pUC 9 alors que les inserts de 700 bp et de 100 bp sont 21 fois plus nombreux que le pUC 9 (40 ng pUC 9 en opposition au 300 ng de A', ce qui fait une stoechiométrie molaire de 21 - 22).

2 ° blancs : ils doivent provenir de l'insertion d'un des deux fragments de A'.
Un pUC 9 coupé avec Pst I et Sma I ne peut pas se refermer sur lui-même !

Donc, on voit que les transformants blancs doivent comporter logiquement un plasmide recombinant et que l'on évite de perdre du temps à tester des colonies comportant des pUC 9 sans insert.

Il est aussi à remarquer que l'orientation ne peut se faire que dans un seul sens du fait de la différence des extrémités (Pst I - Bout franc).

L'analyse des témoins permet de dire que les conditions sont bonnes : - témoin de transformation : 130 colonies bleues ont poussé (voir rubrique 2.2.1.)

- témoin de " filling " : les colonies sont toutes blanches sauf quelques-unes (bruit de fond habituel) (voir rubrique 3.1.)

b) Résultats obtenus :

J'ai obtenu des colonies bleues en majorité mais également des colonies blanches en proportion plus faible (figure 14)

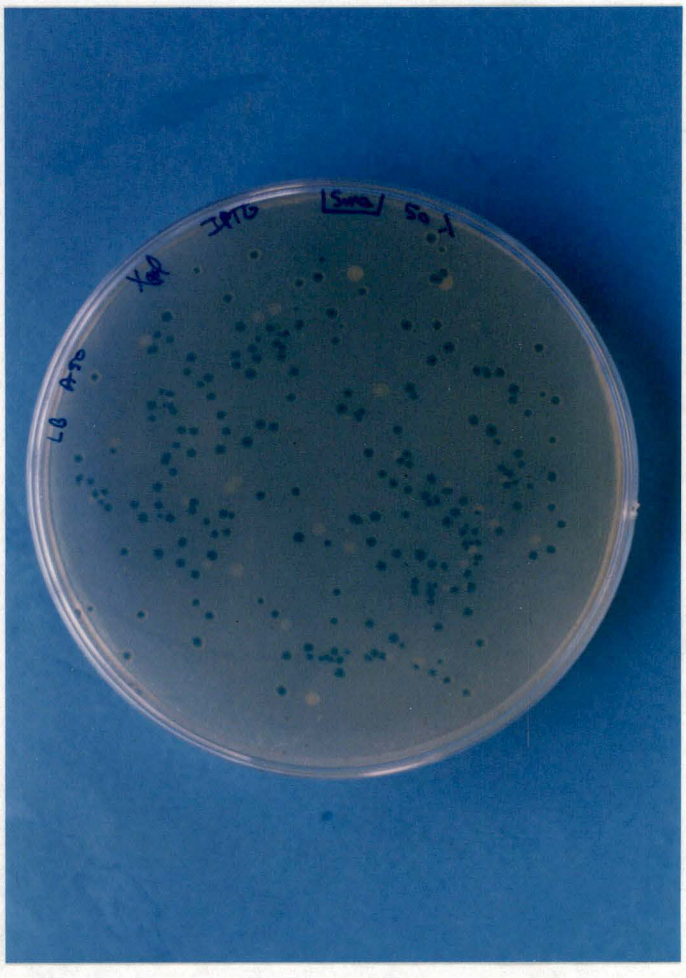


Figure 14 : Aspect des transformants sur une boîte LB A 50 à laquelle a été incorporé du X gal et de l'IPTG

55 colonies blanches furent testées par miniprep mais aucun des clones n'a incorporé le fragment de 700 bp.

Par contre, le fragment de 109 bp, lui, a bien été inséré. Celui-ci avait plus de chances d'être cloné vu sa petite taille. Néanmoins, sur 55 clones, présumés recombinants, j'aurais dû trouver un certain nombre de clones ayant incorporé le fragment de 700 bp.

Des problèmes sont rencontrés lorsqu'on veut vérifier l'insertion du fragment de 109 bp. En effet, l'insertion d'un morceau de si petite taille, ne peut pas être visualisée par un simple gel de miniprep.

Le pUC 9 est constitué de 2768 bp initialement, auquel seulement 109 bp sont ajoutées. Le nouveau plasmide est donc constitué de 2877 bp.

La différence de migration sur gel entre ces deux plasmides est difficile à mettre en évidence. Même si une restriction est effectuée, et même avec un tirage très long du gel, cela ne résoud pas le problème. Un gel comportant des pistes sur lesquelles il n'a été déposé que des miniprep de pUC 9 montre des hétérogénéités de migration entre pistes qui sont de l'ordre de grandeur de ce que l'on veut mettre en évidence.

A priori, l'utilisation d'un site placé dans l'insert aurait pû être discriminant et donner directement la nature recombinante du clone. Cependant, aucun site utilisable n'était présent : N de I par le remplissage était détruit et Pst I ne permettait pas de donner une information directe puisqu'il est déjà présent dans la batterie du pUC 9 !

Donc, il fallait recourir à un autre moyen : une digestion partielle va permettre de surmonter la difficulté rencontrée.

En réalisant une restriction avec Eco R I et Hind III en même temps, l'insert devait être détaché puisque ces deux sites le bordent (voir la batterie de sites du pUC 9 , figure 4 Résultats). Le fragment ainsi libéré est impossible à visualiser sur gel (à partir d'une miniprep).

En effet, du fait de sa faible taille, il va migrer de la même manière que les ARN de faible poids moléculaire.

Vu l'intensité de ceux-ci, il sera impossible de détecter le fragment en question. Par contre, si la digestion n'est pas totale, c'est-à-dire que tous les sites Hind III et Eco R I ne sont pas encore clivés, on va assister à la formation de deux populations de fragments.

Supposons qu'un des deux sites (Eco R I ou Hind III) soit clivé, il va y avoir un morceau de 2877 bp linéaire généré (2768 + 109 bp).

Maintenant, si la restriction est opérée sur les deux sites du même plasmide, deux fragments seront générés :

- un de 109 bp + 12 bp (de la batterie de site) = 121 bp qui ne nous intéresse pas.
- un de 2877 - 121 = 2756 bp.

Donc, sur une même piste, et c'est là que se situe la solution, on aura la présence simultanée des fragments de 2877 bp et de 2756 bp.

Si un tirage long sur gel est opéré, deux bandes distinctes vont apparaître sur la même piste.

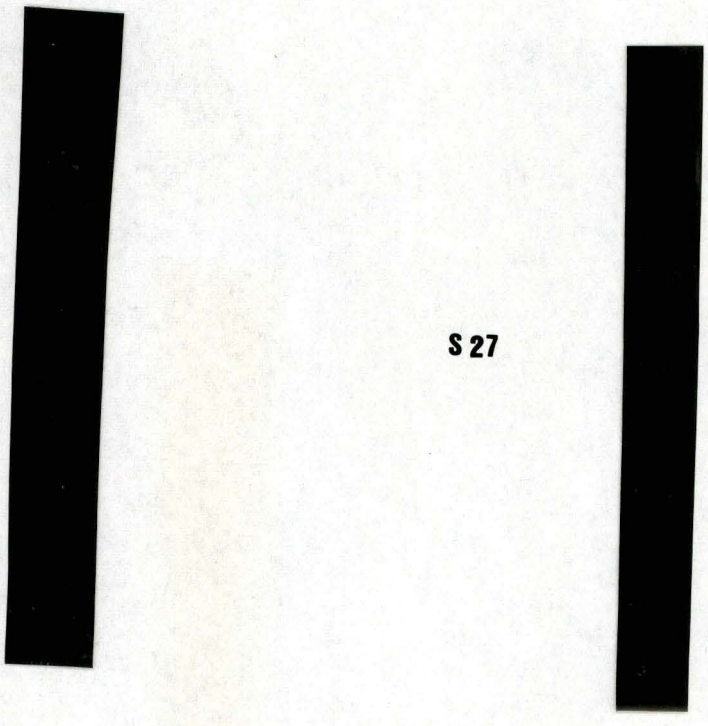


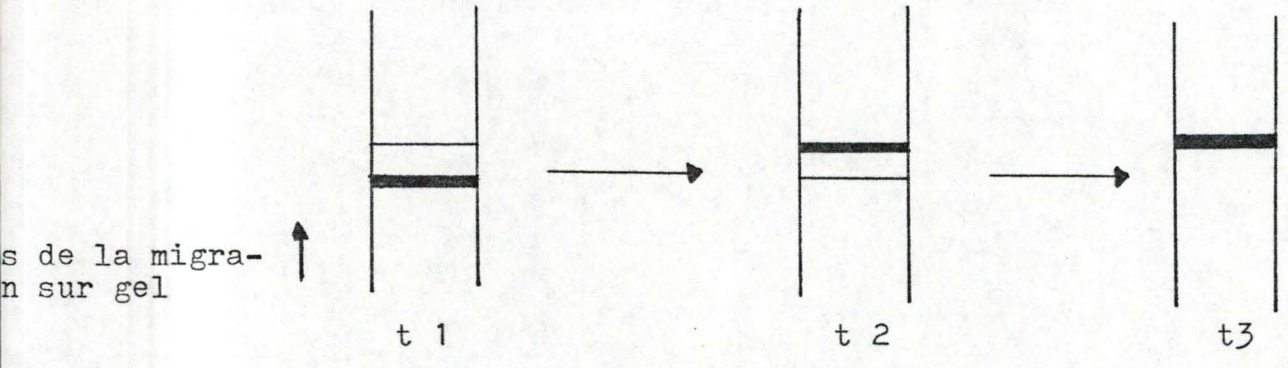
figure 15 : Mise en évidence de la nature recombinante des clones S9 et S 27 par la méthode de digestion partielle.

Les clones S 9, S 27, S 35, S 42 ont été testés par cette technique. Ils se sont avérés comporter l'insert de 109 bp suite à la présence de deux bandes.

A titre d'exemple, voici deux de ces clones sur gel à la figure 15 (page précédente).

Pour bien s'assurer qu'il s'agissait d'une digestion partielle, il fallait faire varier le paramètre temps.

En soumettant un recombinant à une double digestion durant des temps de plus en plus longs, on pouvait voir l'évolution des bandes :



A partir d'une certaine durée, la digestion devient totale. Cette expérience fut réalisée sur le clone S 42 où une telle évolution fut observée (figure 16).

Figure 16.
Evolution de la digestion double. Les temps sont respectivement de trente minutes, une heure et une heure trente. Après ce délai, la digestion est complète pour Eco R I et Hind III.

Le fait qu'un des deux fragments se soient insérés constitue en soi un témoin (standard interne); en effet, si les conditions sont favorables au clonage d'une des deux parties de A', l'autre partie a tout autant de chances d'être clonée même si c'est en proportion plus faible : la propabilité d'insertion lors de la ligation est la même mais plus lors de la transformation où un plus petit plasmide entrera plus facilement dans la bactérie.

Un autre type de colonies a également été observé : ces colonies sont constituées d'une moitié blanche et d'une moitié bleue. Leur nombre est plus réduit (une petite dizaine sur tout le produit de transformation). Peut-être s'agit-il de pUC 9 ayant incorporé le peptide signal (109 bp) mais où le remplissage (" filling ") aurait été incomplet, ce qui assurerait la restauration de la phase sur un des deux brins ?

Donc, apparemment, le clonage de la séquence " promoteur - région de fonction inconnue " n'est pas possible. C'est également le cas lorsque cette séquence est couplée à la séquence signal seule ou à la séquence signal en phase avec la β galactosidase.

Pour en être véritablement sûr, une modification a été apportée au protocole.

3.3. Clonage discriminant avec séparation des fragments résultant de la digestion de A' avec Nde I

Plutôt que de faire la ligation avec le pUC 9, coupé avec Pst I et Sma I, en présence dse deux morceaux résultant de la digestion avec Nde I sur A', ces deux-ci furent séparés.

En effet, supposons qu'un avantage lors de la transformation se produise en faveur du plasmide qui a incorporé le fragment de 109 bp, une séparation va éviter l'obstacle rencontré au clonage du grand fragment (700 bp).

La figure 17 reprend le schéma de l'expérience :

550 mg de A' furent soumis à la restriction Nde I puis mis sur gel afin de récupérer les deux bandes de 109 et 700 bp. Pour s'assurer de l'efficience de la récupération des bandes,

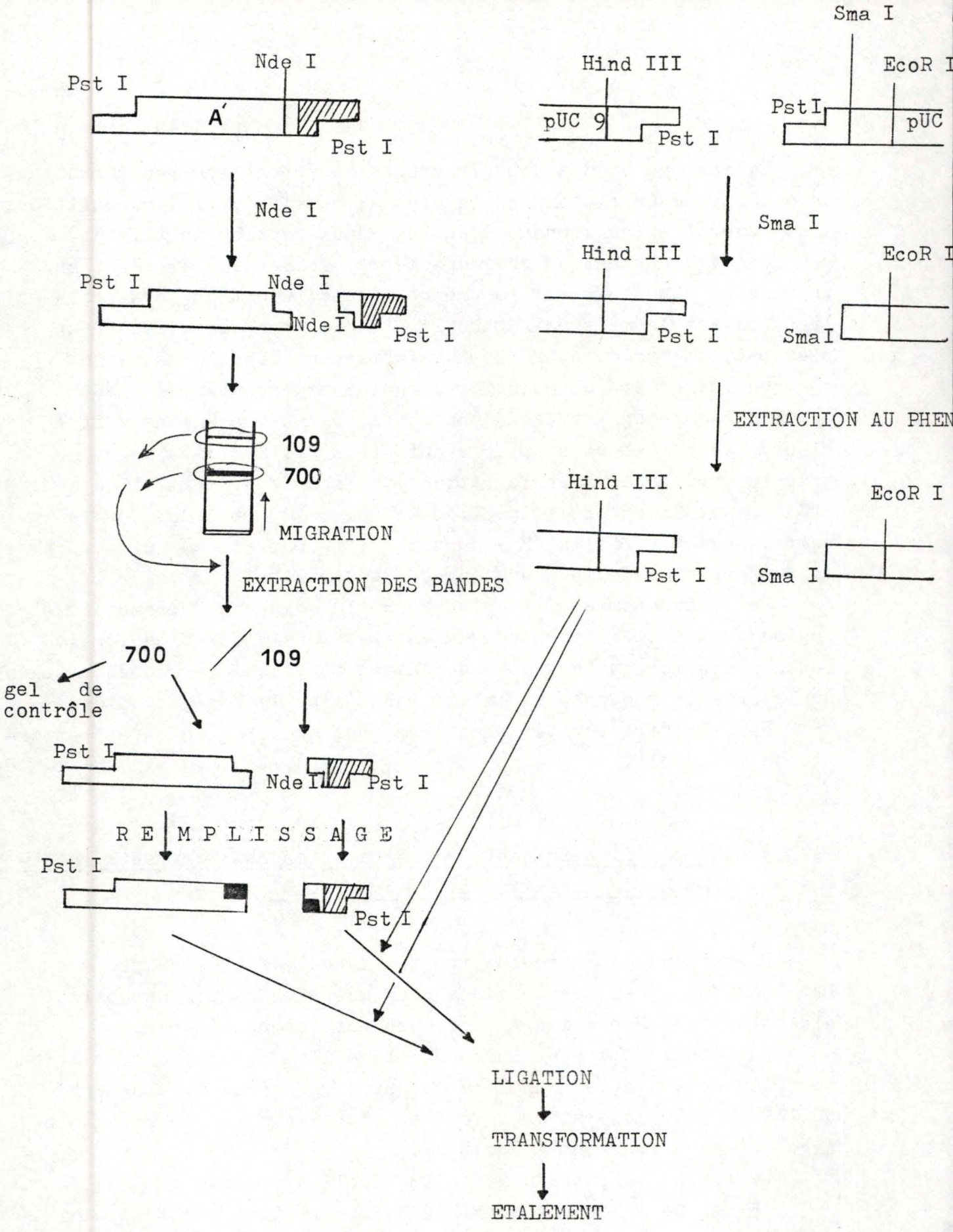


Figure 17 : Schéma du clonage discriminant avec séparation des fragments de 700 et 109 bp.

Peptide signal

Extrémité remplie

un minigel a été effectué où la moitié récupérée a été déposée. Celui-ci s'est révélé positif, montrant une bande correspondant à 700 bp.

Du remplissage fut alors effectué sur l'autre moitié du fragment de 700 bp récupéré ainsi que sur celui-de 109 bp.

Parallèlement, 120 ng de pUC 9 coupés avec Pst I ont été soumis à une restriction Sma I. Une extraction au phénol a été réalisée et le pUC 9 a été resuspendu dans du TE.

Un quart de pUC 9 Sma I Pst I ainsi resuspendu a été mélangé aux deux fragments de 109 et 700 bp séparément.

Une ligation a été effectuée suivie d'une transformation. Enfin, des étalements furent faits et les boîtes mises à 37 ° C la nuit.

Le contrôle de " filling " et le contrôle de transformation dont il a déjà été question avant, se sont avérés positifs.

Un quart de la solution de pUC 9 coupé avec Pst I Sma I a été utilisé :

- en transformation directement comme contrôle : aucune colonie n'a été mise en évidence.
- en ligation sans ajouter d'insert, puis en transformation : une dizaine de colonies bleues ont été obtenues sur toute la solution de transformation ($\simeq$ 1,2 ml) Ceci donne en quelque sorte le bruit de fond qui est comparable au nombre de colonies bleues obtenues sur les boîtes contenant les recombinants.

Les résultats sont repris à la figure 18 (voir page suivante)

Taille des fragments	Nombre de colonies blanches	Nombre de colonies bleues
700 bp	2	8
109 bp	45	12

Figure 18 : Résultats obtenus par le clonage séparé des fragments de 109 bp et de 700 bp.
Toute la solution de transformation (≏ 1,2 ml) a été étalée sur boîtes dans les deux cas.

Les colonies bleues contiennent des pUC 9 qui ont pu se recirculariser :

- soit non coupées ou coupées avec une seule enzyme (Sma I coupé Pst I).
- soit ayant réintégré le morceau Sma I - Pst I (15 bp) libéré lors de la restriction du pUC 9 Pst I avec Sma I.

Au vu du tableau, deux colonies blanches (ligne 700 bp) semblent être les clones attendus. Cependant, les deux clones furent testés par miniprep et par restriction avec Eco R I et Pst I : aucune bande de 700 bp n'a été mise en évidence !

Par contre, parmi les 45 colonies blanches qui étaient supposées avoir l'insert de 109 bp, deux furent examinées et en effet, étaient bien des recombinants. (figure 19)

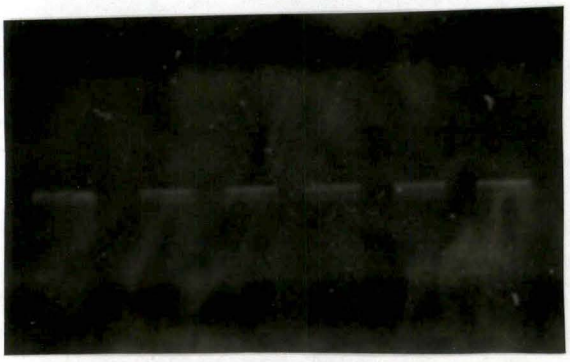


Figure 19 :
Mise en évidence de clones recombinants ayant inséré le fragment de 109 bp par digestion partielle (Eco R I - Hind III) Ces clones ont été baptisés $ 3 et $ 4 : les 3 pistes à gauche représente le clone $ 3, les 3 pistes à droite, le clone $ 4. (plasmides y correspondant Les 3 pistes pour chaque clone correspondent à des temps d'incubation différents : 15', 30', 45'. Pour chaque piste, deux bandes apparaissent (sauf pour la première piste du clone $ 3).

Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus.

4. Clonage du peptide signal seul

Le but de cette démarche était que le peptide signal soit sous la dépendance du promoteur de la β galactosidase et qu'il soit produit avec une protéine sans signification.

Mais aucun moyen de s'assurer de l'expression du peptide signal n'existe. L'idéal pour s'en assurer serait de le coupler avec une protéine dosable comme la β galactosidase.

Voici quand même la construction : voir en parallèle la figure 20.

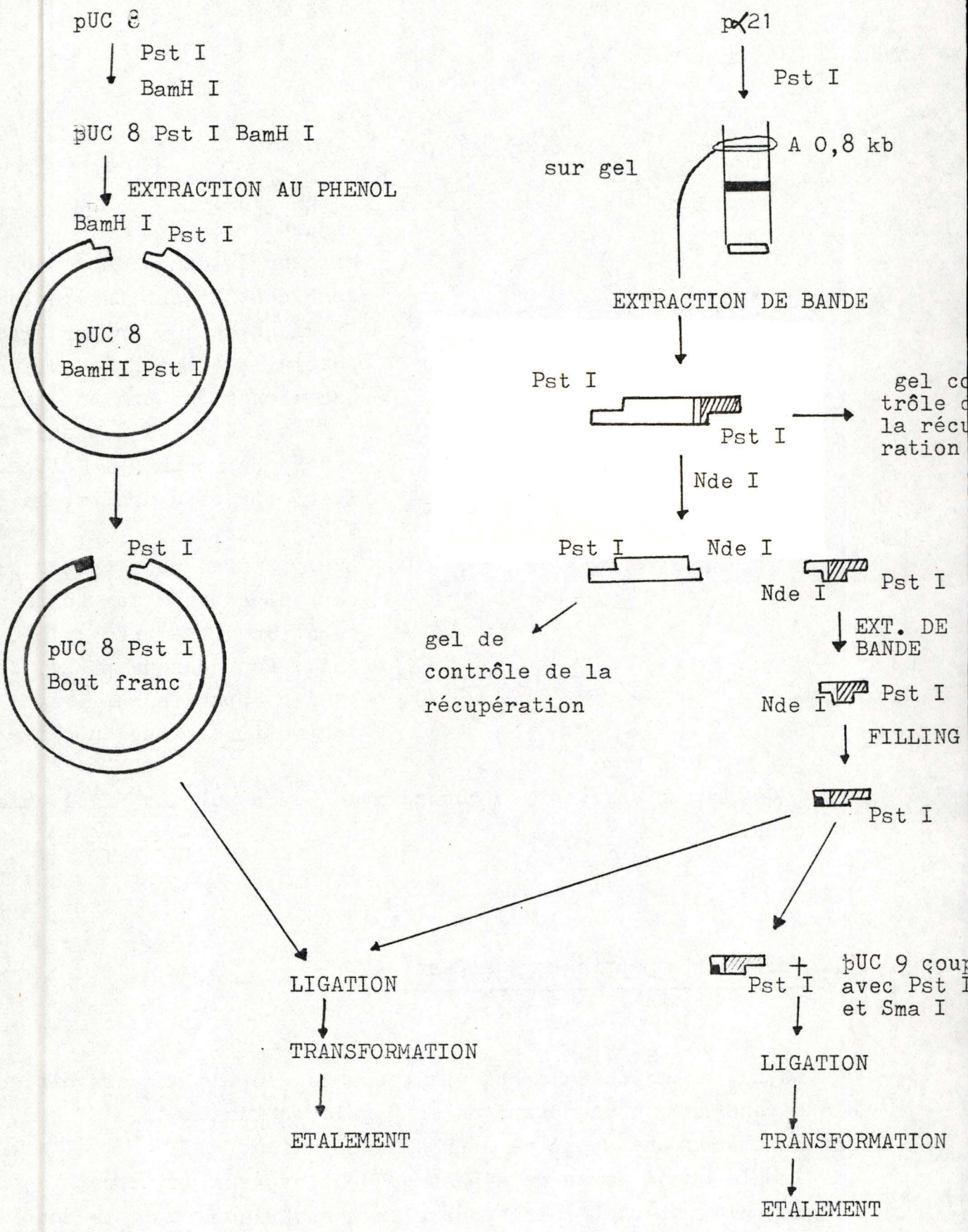


Figure 20: Scéma de clonage du peptide signal seul dans le pUC 8.

Peptide signal

Extrémité remplie

Du pUC 8 (579 ng) a été restreint avec Pst I et Bam H 1, en même temps car l'exigence saline de ces enzymes est la même (tampon Medium).

Après une extraction au phénol, le pUC 8 Pst I Bam H 1 a été soumis au " filling " . De son côté, l'insert de 109 bp comprenant le peptide signal a été produit (du pα 21), en passant par A' et par une restriction Nde I de celui-ci). Une série de gels de contrôle ont été effectués (indiqués sur la figure 20).

Ensuite, du remplissage a été réalisé sur le fragment de 109 bp. 22,5 ng de pUC 8 traité comme ci-dessus ont été ajoutés à 15 ng du fragment de 109 bp, c'est-à-dire dans une stoechiométrie molaire de respectivement 1 pour 16 .

L'extrémité franche de l'insert rempli au site Nde I peut alors s'associer avec l'extrémité franche du pUC 8 (rempli en Bam H 1) et les deux autres extrémités sont compatibles naturellement (Pst I à chaque fois).

L'orientation du peptide signal est la même que le promoteur de la β - galactosidase.

Un témoin supplémentaire, constitué de l'association de l'insert de 109 bp avec le pUC 9 coupé avec Pst I et Sma I (cfr expérience précédente) devait me donner des blanches recombinantes ou des bleues non recombinantes.

Les deux constructions furent liguées et soumises à la transformation. Une série de témoins classiques (transformation, ligation ...) se sont avérés corrects. De plus, 13 colonies blanches se sont développées sur deux boîtes où 200 µ l de la solution de transformation du clonage dans le pUC 9 (= témoin supplémentaire) avaient été étalés à chaque fois.

Ce témoin montre que les conditions de clonage sont bonnes.

Revenons à la construction dans le pUC 8 : il fallait chercher les recombinants parmi les blanches. Cependant, parmi celles-ci, un certain nombre pouvaient provenir d'une recircularisation du pUC 8, seulement coupé avec Bam H 1 et ensuite rempli. La phase étant perdue, le phénotype bleu est perdu.

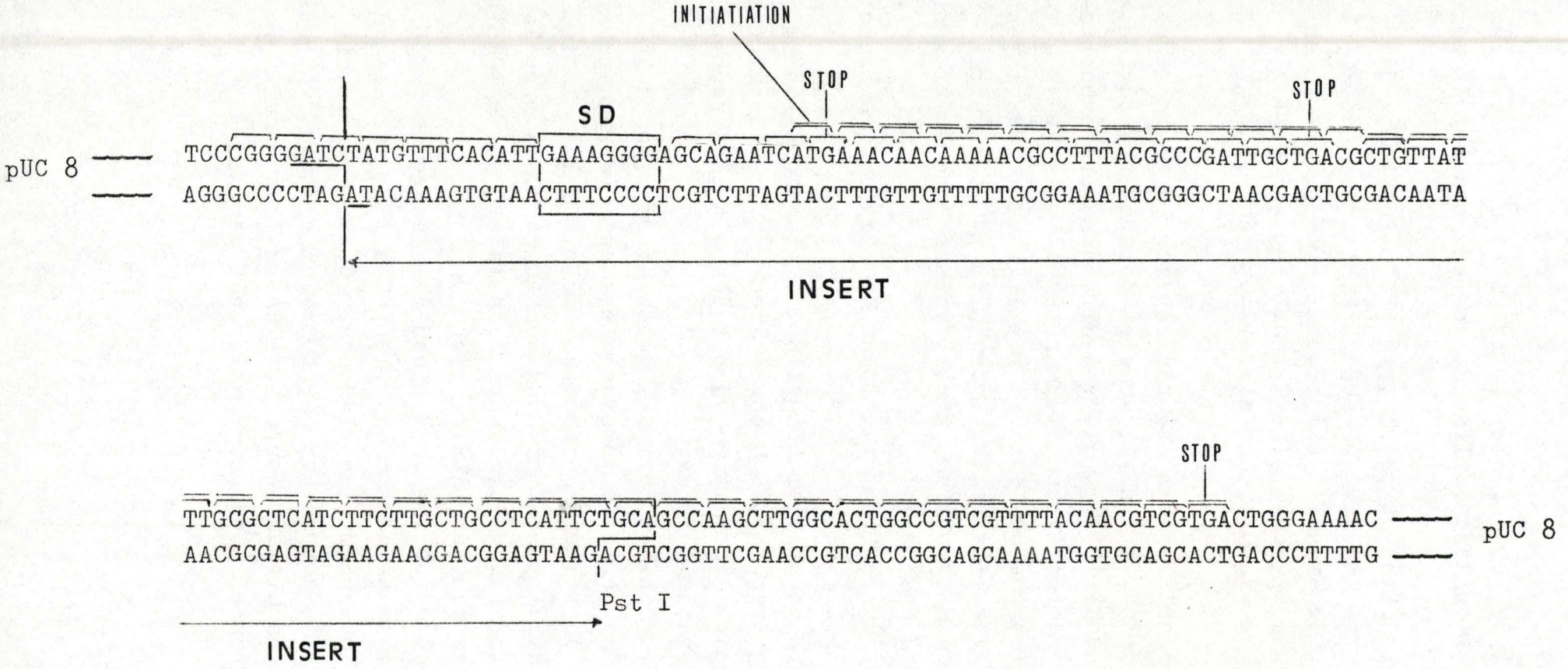


Figure 21 : Séquence nucléotidique à l'endroit d'insertion du fragment de 109 bp dans le pUC 8

SD = Shine-Dalgarno

codons en phase avec lac Z du pUC 8

codons en phase avec le peptide signal

GATC nucléotides soulignés

Voyons d'un peu plus près la construction que l'on devait obtenir : figure 21.

Un messager passant à travers la séquence signal va être transcrit à partir du promoteur de la β galactosidase.

La traduction va s'initier à l'AUG situé après la Shine-Dalgarno de la β - galactosidase mais elle se terminera prématurément dans l'insert où un TGA apparait. En effet, la phase n'est pas respectée et c'est 31 nucléotides après la jonction"pUC 8 - insert " qu'apparait le STOP (un deuxième stop apparait également 11 codons après).

La traduction peut aussi s'initier à l'AUG du peptide signal (la Shine - Dalgarno est toujours présente !) qui se situe au niveau du premier stop dont il a été question. Cet AUG est décalé d'une base par rapport au stop.

Si la traduction s'opère effectivement à ce niveau, une protéine de 38 aa sera produite :

- 26 provenant du peptide signal
- 12 provenant de la β galactosidase

Cependant, comme il l'a déjà été dit, je ne pourrais pas savoir si la protéine est produite !

Un clone recombinant a été mis en évidence par la méthode du standard interne (clone 11). Son principe de base est le même que pour la méthode de la digestion partielle : il s'agit de différencier deux bandes ayant une différence d'une centaine de bases sur la même piste.

Les conditions propres à chaque miniprep sont parfois assez différentes. Cela rend, en pratique, difficile à tester un grand nombre de clones par la technique de la digestion partielle.

Au lieu de réaliser une double restriction, une simple restriction est effectuée.

Du pUC 8 est ajouté en plus de la miniprep du clone à tester. Si celui-ci est un recombinant, il aura une taille supérieure au pUC 8 et cela se verra sur le gel.

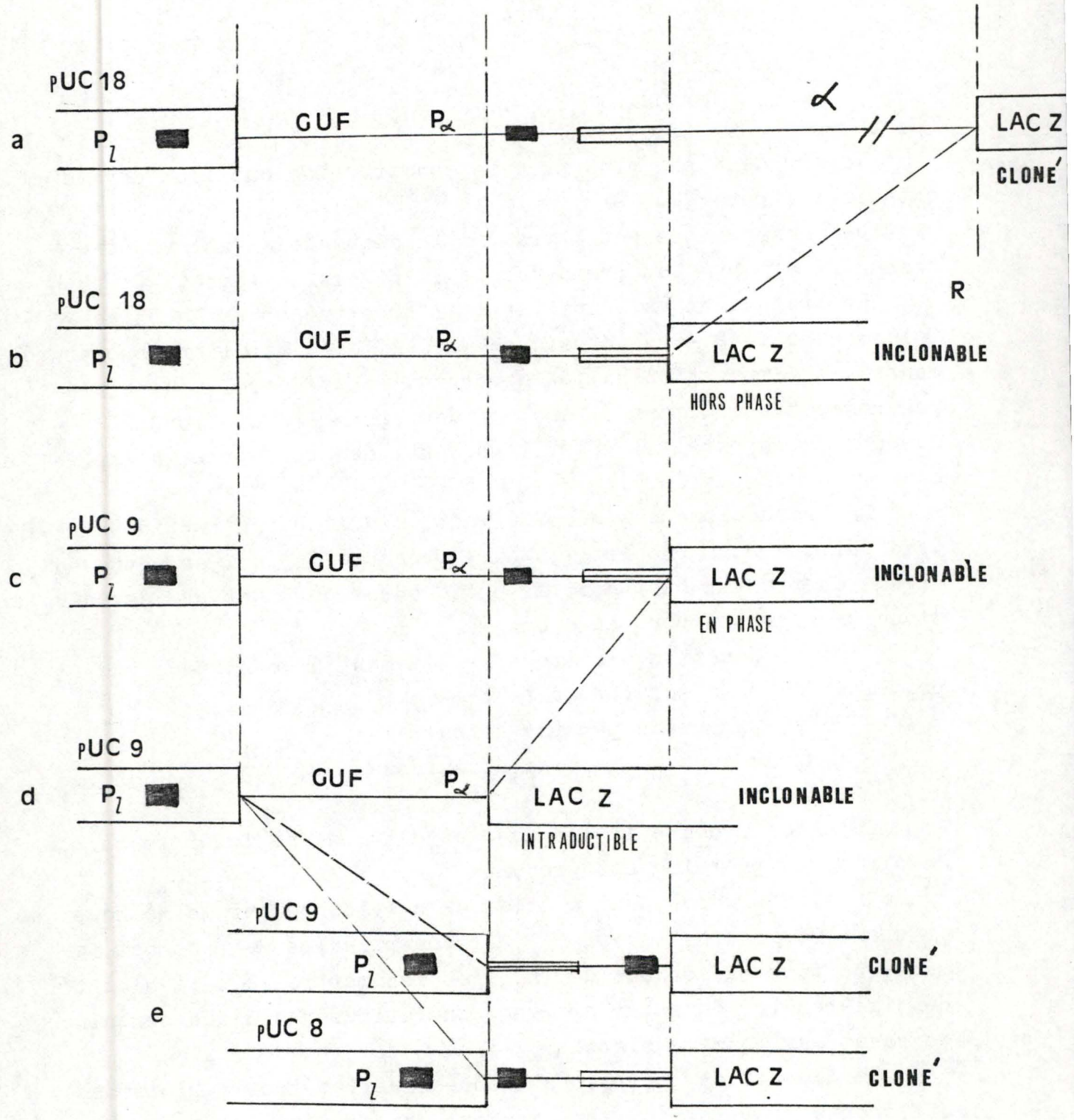


Figure 22 : Résumé de l'ensemble des démarches réalisées lors de ce mémoire.

P_z = promoteur β-galactosidase, P = promoteur α-amylase (α

GUF = "Génome of unknown function" ou Génome de fonction inconnue.

■ = Shine-Dalgarno (site de fixation du ribosome)

▭ = Peptide signal

Donc, la différence entre les deux méthodes est l'apport d'un standard interne. Lors d'une expérience, il est idéal d'avoir un tel type de standard. On est ainsi à l'abri de la variabilité des conditions de chaque miniprep et il suffit de laisser la digestion se dérouler suffisamment longtemps pour qu'elle soit complète.

Le profil sur gel est le même qu'avec la digestion partielle aussi je ne présenterai pas de document ici.

5. Conclusion

La figure 22 résume les démarches qui ont été suivies lors de ce mémoire.

L'objectif du mémoire était de cloner le promoteur de l' α - amylase ainsi que la séquence signal qui lui est associée, en vue d'obtenir un vecteur d'expression et de sécrétion chez E.coli.

Dans ce but, une première construction fut réalisée (figure 22 b) : l'extrémité 5' du gène de l' α - amylase (jusqu'aux 26 acides aminés du peptide signal) a voulu être clonée dans un pUC 18. Aucun transformant n'a montré l'incorporation de cet insert.

A ce moment fut avancée l'hypothèse d'une toxicité provoquée par la protéine aléatoire nouvellement produite comportant 79 aa (dont le peptide signal).

Une alternative visant à surmonter cette " toxicité " fut alors proposée : en clonant le même insert, mais cette fois-ci en phase avec le gène de la β - galactosidase, on pensait supprimer ou tout au moins diminuer le problème de " toxicité " (figure 22 c).

La construction fut réalisée dans le pUC 9 mais aucun recombinant n'a pu être mis en évidence (par criblage systématique ou par le test de constitutivité).

A ce stade, on ne pouvait toujours pas éliminer l'hypothèse que la " toxicité " était liée à la présence du peptide signal. Pour s'en assurer, des démarches visant à cloner uniquement la partie 5' des 2,5 kb sans le peptide signal furent tentées. Des clonages discriminants (3.2 - 3.3.) n'ont pas su montrer le clonage de cette partie. Le clonage non discriminant (3.1) apporte un argument supplémentaire (figure 22 d).

Le peptide signal, lui, fut cloné dans le pUC 9 et dans le pUC 8 (figure 22 e).

Donc, le problème résiderait plutôt au niveau de la région de fonction inconnue et du promoteur.

Une autre constatation importante doit être faite : il semble bien que la " toxicité " soit en rapport avec l'α- amylase. Lorsque la partie codante de celle-ci est présente (protéine mature) , un tel problème ne se présente pas. Bien sûr, des problèmes de stabilité se posent.

Même si le peptide signal est couplé avec la β-gal en phase, le clonage ne réussit pas. Il doit y avoir des rapports très spécifiques entre les régions 5' et 3' du fragment de 2,5 kb ou du gène de l'α - amylase en général.

Des mécanismes entrent en jeu dans la régulation des α- amylases mais ils ne sont actuellement pas résolus. Chez B.subtilis, divers loci sont connus qui semblent être responsables d'une variation de l'expression de l'α - amylase : AMY R 1, AMY R 2, AMY R 3.

De même, chez B.amyloliquefaciens, des séquences dont on croyait qu'elles jouaient ce type de rôle ont été découvertes précédant le gène d'α -amylase. Un fragment d'ADN de 2,8 kb a été isolé et donne un messager de 2,2 kb codant pour 3 polypeptides. L'extrémité 3' de ce m RNA se termine par une structure qui agirait comme un terminateur (répétitions inverses). En effet, des délétions dans cette structure provoquent une diminution du taux d'expression de l'α - amylase. Il semble que cette épingle à cheveux agit comme un terminateur dans la transcription du m RNA de 2,2 kb et sa présence empêche une lecture à travers

le gène d'α - amylase qui pourrait ainsi s'exprimer correctement. Donc, la structure agit non en stimulant la production d'α - amylase mais en empêchant une transcription susceptible de gêner la production de m RNA de l'α - amylase (38,39).

En réalité, les produits du m RNA de 2,2 kb ne semblent pas jouer de rôle de régulation.

Chez B.Licheniformis, une structure analogue à celle chez B.amyloliquefaciens a été mise en évidence. Cette structure constituerait un terminateur de transcription. Immédiatement avant le promoteur de l'α - amylase et cette épingle à cheveux, un gène code pour une protéine de fonction inconnue ayant un poids moléculaire de 15 000 daltons (45).

Suite à mes observations, un modèle peut être formulé.

La région amont au promoteur serait responsable de la production d'une protéine toxique. En présence du gène entier de l'α - amylase, des interactions du m RNA X (appelons X la protéine toxique) avec le m RNA α empêcheraient la traduction du premier, empêchant le rôle toxique d'apparaître.

Par contre, si le gène est tronqué (ou même en phase avec la β galactosidase), la spécificité des interactions serait perdue et la protéine X serait produite.

La production du m RNA X pourrait être initiée au promoteur de la β galactosidase ou à un promoteur propre. Soit ce m RNA serait terminé avant le promoteur α , soit il continuerait à travers le gène d'α - amylase.

Les données reportées au-dessus semblent être en faveur de deux m RNA.distincts . Voici résumée l'idée du modèle en supposant l'existence de deux m RNA.

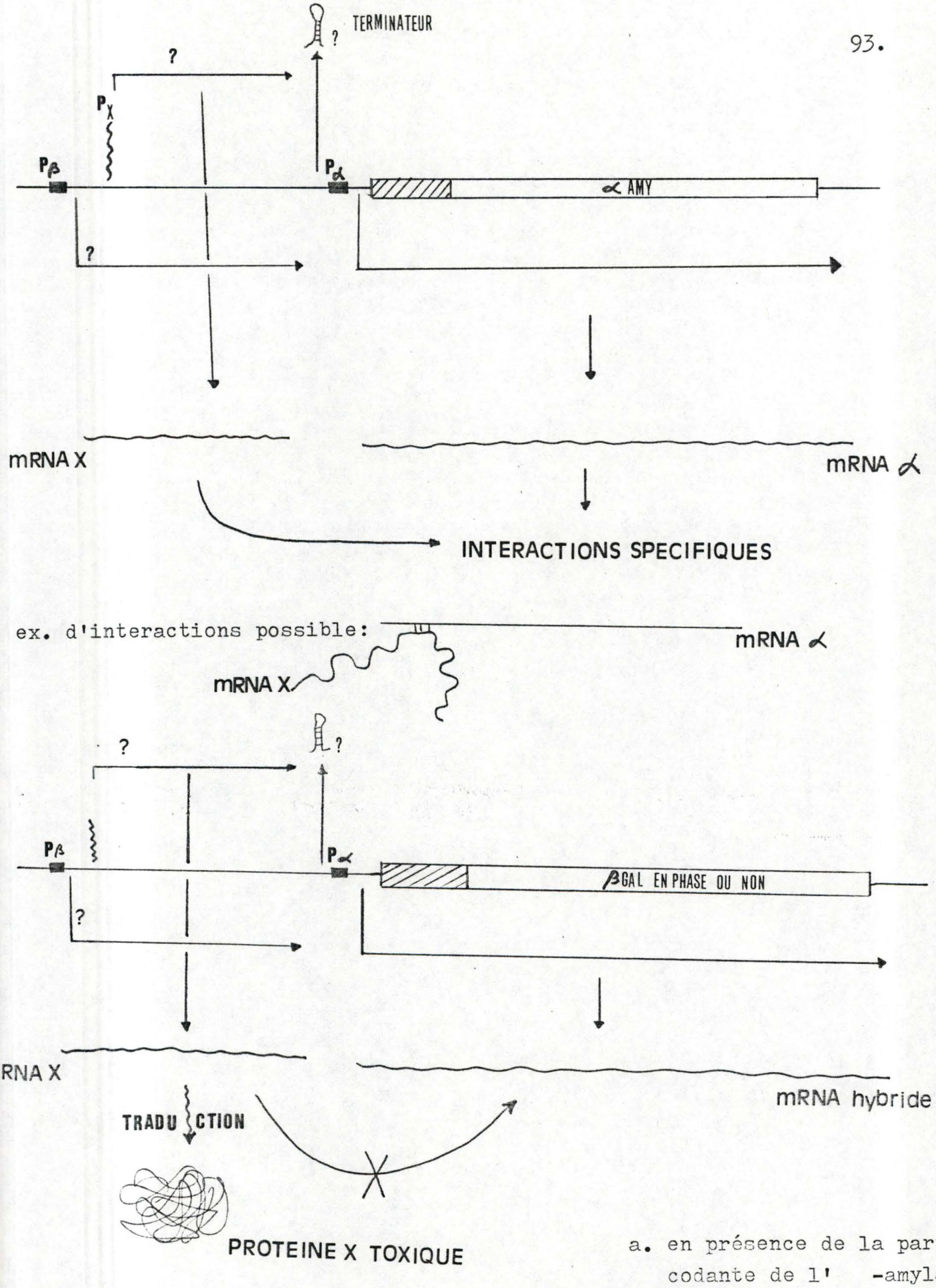


Figure 23 : Modèle d'action proposé

P_X ≒ promoteur possible du gène X

▨ = peptide signal

a. en présence de la partie codante de l' -amylase mature.

b. en l'absence de celle-ci.

L'idée de produire un vecteur de sécrétion ne doit pas être pour autant abandonnée. En ne gardant que le promoteur (et peut-être un terminateur éventuel en amont) et la séquence signal, la construction du vecteur reste envisageable.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMORY A., KUNST F., AUBERT E., KLIER A. and RAPOPORT G. (1987) Characterization of the sac Q genes from Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis.
J. Bacteriol. 169, 324-333.

2. ANDREWS J.C. and SHORT S.A. (1985) Genetic analysis of Escherichia coli oligopeptide transport mutants.
J. Bacteriol. 161, 484-492.

3. BACHMANN B.J. (1983) Linkage map of E scherichia coli K-12, edition 7.
Microbiol. Rev. 47, 180-230.

4. BATY D., MERCEREAU-PUIJALON O., PERRIN D., KOURILSKY P., LAZDUNSKI C. (1981) Secretion into the bacterial periplasmic space of chicken ovalbumin synthesized in Erscherichia coli.
Gene 16, 79-87.

5. BEDOUELLE H., BASSFORD Jr. P.J., FOWLER A.V., ZABIN I., BECKWITH J., HOFNUNG M. (1980) Mutations with alter the function of the signal sequence of the maltose binding protein of Escherichia coli.
Nature 285, 78-87.

6. BENSON S.A., HALL M.N., SILHAVY T.J. (1985) Genetic analysis of protein export in Escherichia coli K-12.
Ann. Rev. Biochem 54, 101-134.

7. CHAN S.J., WEISS J., KONRAD M., WHITE T., BAHL C., YU S.D., MARKS D. and STEINER D.E. (1981) Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in E.coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, S 401-S 405.

8. CORNELIS P., DIGNEFFE C., WILLEMOT K. (1982) Cloning and expression of a B.coagulans amylase gene in Escherichia coli. Mol. Gen.Genet. 186, 507-511.

9. DANIELS C.J., BOLE D.G., QUAY S.C., OXENDER D.L. (1981) Role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5396-5400.

10. DASSA E., BOQUET P.L., (1981) exp. A : a conditional mutation affecting the expression of a group of exported proteins in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 181, 192-200.

11. DATE T., GOODMAN J.M., WICKNER W.T. (1980 a) Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion. Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 4669-4673.

12. DATE T., WICKNER W.T. (1981) Isolation of the Escherichia coli.leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 6106-6110.

13. DAVIS B.D., TAI P.C. (1980) The mechanism of protein secretion across membranes. Nature 283, 433-438.

14. DE GEUS P., VERHEIJ H.M., RIEGMAN N.H., HOEKSTRA W.P.M., DE HAAS G.H. (1984) The pro-and mature forms of the Escherichia coli K-12 outer membrane phospholipase A are identical. EMBO J. 3, 1799-1802.

15. DEPELCHIN A. (1984) Syllabus de microbiologie générale volumes 1 et 2. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.

16. DOI R.H., WONG S.L. and KAWAMURA F. (1986) Potential use of B. subtilis for secretion and production of foreign proteins.
Trends in Biotechnology, september 86, 232-235.

17. DUA R.D. and KOCHLAR S. (1985) Active site studies on Bacillus amyloliquefaciens α - amylase (I).
Molecular and cellular Biochemistry 66, 13-20.

18. EMRS.D., HEDGPETH J., CLEMENT J.M., SILHAVY T.J., HOFNUNG M. (1980) Sequence analysis of mutations that prevent export of λ receptor, an Escherichia coli outer membrane protein.
Nature 285, 82-85.

19. FAHNESTOCK S.R. And FISCHER K.E.(1986) Expression of the staphylococcal protein A gene in Bacillus subtilis by gene fusions utilizing the promotor from a Bacillus amyloliquefaciens α - amylase gene.
J. Bacteriol. 165, 796-804.

20. GILMORE R., WALTER P., BLOBEL G. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor.
J. Cell. Biol. 95, 470-477.

21. GILMORE R., BLOBEL G. (1983) Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation.
Cell 35, 677-685.

22. GRAY G.L., MAINER S.E. ... (1986) Structural genes encoding the thermophilic α - amylases of Bacillus stearothermophilus and Bacillus licheniformis.
J. Bacteriol. 166, 635-643.

23. HIGGINS C.F. (1986) Genetic engineering 5, 2-59. Academic press.

24. HOLMES et QUIGLEY (MARKUS WILIMZIG) (1985) LiCl - boiling method for plasmid mini-preps. Trends in Genetics vol. 1 (6), june 85, 158.

25. ICHIHARA S., BEPPU N., MIZUSHIMA S. (1984) Protease IV, a cytoplasmic membrane protein of Escherichia coli, has signal peptide peptidase activity. J. Biol. Chem. 259, 9853-9857.

26. JOYET P., GUERINEAU M., HESLOT H. (1984) Cloning of a thermostable α - amylase gene from Bacillus licheniformis and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis. FEMS microbiol. Lett. 21, 353-358.

27. KALLIO P. (1986) The effect of the inverted repeat structure on the production of the cloned Bacillus amyloliquefaciens α - amylase. Eur.J. Biochem 158, 491-495.

28. KALLIO P., ULMANEN I. and PALVA I. (1986) Isolation and characterization of a 2,2 kb operon preceding the α - amylase gene of Bacillus amyloliquefaciens. Eur. J. Biochem 158, 497-504.

29. KAWAMURA F. and DOI M. (1984) Construction of a Bacillus subtilis double mutant deficient in extracellular alkalin and neutral proteases. J. Bacteriol 160, 442-444.

30. KING P.V. and BLAKESLEY R.W. (1986) Optimizing DNA Ligations for transformation. Focus (BRL) winter 1986 8, 1-3.

31. KUDO T., KATO C., HORIKOSHI K. (1983) Excretion of the penicillinase of an alkalophilic Bacillus sp. through the Escherichia coli outer membrane.
J. Bacteriol. 156, 949-951.

32. LEHTOVAARA P., ULMANEN I. and PALVA I. (1984) In vivo transcription initiation and termination sites of an α- amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens cloned in Bacillus subtilis.
Gene 30, 11-16.

33. LEWIN B. (1985) Genes (second edition).
New-York,... : John WILEY & Sons.

34. MALKE H., FERRETTI J.J. (1984) Streptokinase : cloning, expression, and excretion by Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 81, 3557-3561.

35. MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 93-94.

36. MORENO F., FOWLER A.V., HALL M., SILHAVY T.J., ZABIN I., SCHWARTZ M. (1980) A signal sequence is not sufficient to lead β - galactosidase out of the cytoplasm.
Nature 286, 356-359.

37. MIYAKE T., OKA T., NISHIZAWA T.... (1985) Sécretion of human Interferon - α induced by using secretion vectors containing a promotor and signal sequence of alkaline phosphatase gene of E.coli.
J. Biochem 97, 1429-1436.

38. MULLER M. , IBRAHIMI I., CHANG C.N., WALTER P., BLOBEL G. (1982) A bacterial secretory protein requires a recognition particle for translocation across mammalian endoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem. 257, 11860-11863.

39. NESMEYANOVA M.A. (1982) On the possible participation of acid phospholipids in the translocation of secreted proteins through the bacterial cytoplasmic membrane.
FEBS Lett. 142, 189-193.

40. NICAUD J.M., MACKMAN N. and HOLLAND I.B. (1986) Current status of secretion of foreign proteins by microorganisms.
J. of Biotechnology 3, 255-270.

41. OHMURA K., YAMAZAKI H., TAKEICHI Y., NAKAYAMA A., OTOZAI K., YAMANE K., YAMASAKI M., TAMURA G. (1983) Nucleotide sequence of the promotor and NH2-terminal signal peptide region of Bacillus subtilis α - amylase gene cloned in pUB 110.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 678-683.

42. OHMURA K. et al. (1984) Length and structural effect of signal peptides derived from B.subtilis α - amylase on secretion of E.coli β - lactamase in B.subtilis cells.
Nucleic acid research 12, 5307-5319.

43. OHMURA K. et al. (1984) A Bacillus Subtilis secretion vector system derived from the B.subtilis α - amylase promotor and signal sequence region, and secretion of E.coli β - lactamase by the vector system.
J. Biochem 95, 87-93.

44. OLIVER D.B. (1985) Identification of five new essential genes involved in the synthesis of a secreted protein in E.coli.
J. Bacteriol. 161, 285-291.

45. ORTLEPP S.A. (1983) Bacillus subtilis as a host for molecular cloning.
Department of Genetics, University of Dublin. A thesis submitted for the degree of Doctor in Philosophy to the University of Dublin.

46. ORTLEPP S.A., OLLINGTON J.F., McCONNELL D.J. (1983) Molecular cloning in Bacillus subtilis of a Bacillus licheniformis gene encoding a thermostable alpha amylase. Gene 23, 267-276.

47. OZAWA Y., MIZUSHIMA S. (1983) Regulation of outer membrane porin protein synthesis in Escherichia coli K-12 : OmpF regulates the expression of OmpC. J. Bacteriol 154, 669-675.

48. PALVA I. (1982) Molecular cloning of α - amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens and its expression in B.subtilis. Gene 19, 81-87.

49. PERLMAN D., HALVORSON H.O. (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. J. Mol. Biol. 167, 391-409.

50. PIGGOTT R.P., ROSSITER A., ORTLEPP S.A., PEMBROKE J.T., OLLINGTON J.F. (1984) Cloning in Bacillus subtilis of an extremely thermostable alpha amylase : comparison with other cloned heatstable alpha amylases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 175-183.

51. PINES O. and INOUYE M. (1986) Antisense RNA regulation in prokaryotes. Trends in Genetics november 86, 284-287.

52. PUGSLEY A.P., SCHWARTZ M. (1985) Export and secretion of proteins by bacteria. FEMS Microbiol.Rev. 32, 3-38.

53. RANDALL L.L., HARDY S.J.S. (1984) Export of protein in bacteria. Microbiol. Rev. 48, 290-298.

54. RAPOPORT T.A. (1985) Extensions of the signal hypothesis - Sequential insertion model versus amphipathic tunnel hypothesis.
FEBS Lett. 187, 1-10.

55. RODRIGUEZ R.L. and TAIT R.C. (1983) Recombinant DNA techniques. An introduction.
Addison-Wesley Publishing Company.

56. ROGGENKAMP R., REIPEN G. and HOLLENBERG C.P. (1986) Mediation by Saccharomyces cerevisiae translocation signals of β - lactamase transport through the E.coli inner membrane and sensitive method for detection of signal sequences.
J. Bacteriol. 168, 467-469.

57. SARVAS M. (1986) Protein secretion in bacilli.
Current topics in Microbiology and Immunology 125, 103-126.

58. SHIROZA T. et al. (1985) Synthesis and secretion of biologically active mouse interferon - β using a Bacillus subtilis α - amylase secretion vector.
Gene 34, 1-8.

59. SIBAKOV M., PALVA I. (1984) Isolation and the 5'-end nucleotide sequence of Bacillus licheniformis α - amylase gene.
Eur. J. Biochem. 145, 567-572.

60. SJÖSTRÖM M., WOLD S., WIESLANDER A. and RILFORS L. (1987) Signal peptide amino acid sequences in E.coli contain information related to final protein localization A multivariate data analysis.
EMBO Journal 6, 823-831.

61. STANSSENS P., REMAUT E. and FIERS W. (1985) Alterations upstream from the Shine-Dalgarno region and their effect on bacterial gene expression.
Gene 131, 211-223.

62. STEPHENS M.A., ORTLEPP S.A., OLLINGTON J.F., McCONNELL D. (1984) Nucleotide sequence of the 5'region of the Bacillus licheniformis α - amylase gene : comparison with the B. amyloliquefaciens gene.
J. bacteriol. 158, 369-372.

63. TAKKINEN K., PETTERSSON R.F., KALKKINEN N., PALVA I., SODERLUND H., KAARIAINEN L. (1983) Amino acid sequence of α - amylase from Bacillus amyloliquefaciens deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene.
J. Biol. Chem. 258, 1007-1013.

64. TOMMASSEN J., VAN TOL H., LUGTENBERG B. (1983) The ultimate localization of an outer membrane protein of Escherichia coli K-12 is not determined by the signal sequence.
EMBO J. 2, 1275-1279.

65. TSUKAGOSHI N., IHARA H., YAMAGATA H., ODAKA S. (1984) Cloning and expression of a thermophilic α - amylase gene from Bacillus stearothermophilus in E.coli.
Mol. Gen. Genet. 193, 58-63.

66. TSUKAGOSHI N. et al.(1985) Efficient synthesis and secretion of a thermophilic α - amylase by protein producing Bacillus brevis 47 carrying the Bacillus stearothermophilus amylase gene.
J. Bacteriol. 164, 1182-1187.

67. ULMANEN I., LUNDSTRÖM K., LEHTOVAARA P., SARVAS M., RUOHONEN M. and PALA I. (1985) Transcription and translation of foreign genes in Bacillus subtilis by the aid of a secretion vector.
J. Bacteriol 162,176-182.

68. VASANTHA N. and THOMPSON L.D. (1986) Secretion of heterologous protein from Bacillus subtilis with the aid of protease signal sequences.
J. Bacteriol 165, 837-842.

69. VON HEIJNE G. (1984) How signal sequences maitain cleavage specificity.
J. Mol. Biol. 173, 243-251.

70. VON HEIJNE G. (1985) Signal sequences, the limits of variation.
J. Mol. Biol. 184, 99-105.

71. WALTER P., BLOBEL G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.
J. Cell. Biol. 91, 551-556.

72. WALTER P., BLOBEL G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum.III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence - dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes.
J. Cell. Biol. 91, 557-561.

73. WALTER P., BLOBEL G. (1982) Signal recognition particle contains 7 S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum.
Nature 299, 691-698.

74. WATSON, HOPKINS, ROBERTS, STEITZ and WEINER (1987) Molecular biology of the gene.
Fourth edition, vol. 1, 359-429.

75. WICKNER W. (1979) The assembly of proteins into biological membranes : the membrane trigger hypothesis.
Ann. Rev. Biochem. 48, 23-45.

76. WILLEMOT K. (1980) Etude d'un gène amylase de Bacillus megaterium cloné dans E.coli. Mémoire du diplôme spécial en génétique.

77. WILLEMOT K., CORNELIS P. (1983) Growth effect of E.coli cells which contain the gene of an α - amylase from Bacillus coagulans on a multicopy plasmid.
J. Gen. Microbiol. 129, 311-319.

78. WILLEMOT K. (1986) Etude physiologique et génétique de deux α - amylases de Bacillus (B . megaterium et B . coagulans) dont les gènes ont été clonés chez E.coli et B.subtilis.
Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences.

79. YUUKI T., NOMURA T., TEZUKA H., TSUBOI A., YAMAGATA H., TSUKAGOSHI N., UDAKA S. (1985) Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat - and pH stable α - amylase of Bacillus licheniformis : comparison of the amino acid sequence, of three bacterial liquefying α - amylases deduced from the DNA sequences.
J. Biochem. 98, 1147-1156.

80. ZHU J., KEMPENAERS W., VAN DER STRAETEN D., CONDRERAS R. and FIERS W. (1985) A method for fast and pure DNA elution from agarose gel by centrifugal filtration.
Biotechnology 3, 1014-1016.