Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude de la régulation du système général de sécrétion chez *Streptomyces lividans* au moyen de la mutagenèse par transposition.

Par

Alain Alary

Mémoire

présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie Appliquée

© droits réservés de Alain Alary, 2001

À Allan Ruben

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS vi
LISTE DES TABLEAUX viii
LISTE DES FIGURES ix
RÉSUMÉ xi
1. INTRODUCTION 1
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4
2.1 Le système général de sécrétion 5
2.1.2 Le peptide signal 6
2.1.3 SecB 8
2.1.4 SecA 9
2.1.5 Pore de translocation 10
2.1.5.1 SecY 10
2.1.5.2 SecE 13
2.1.5.3 SecG 15
2.1.5.4 SecD, SecF et yajC 17
2.1.6 Mécanisme de sécrétion 19
2.2 Effet de la source de carbone et de la croissance sur l'expression des gènes du système général de sécrétion 24
2.3 Régulation et organisation génique des gènes *sec* 28
2.4 Génétique des Streptomycètes 32
2.5 Mutagenèse par transposition 34
2.5.1 Généralité 34
2.5.2 Répétitions terminales inverses (IR) 34
2.5.3 Répétitions directes (DR) 34
2.5.4 Séquence d'insertion (IS) 35
2.5.5 Transposon composé 35
2.5.6 Contrôle de la transposition 36
2.5.7 Mécanismes de la transposition 37
2.5.8 Applications de la transposition 39

2.5.9 Transposition chez les Streptomycètes 39
2.5.9.1 Transposon Tn5493 39
2.5.9.2 Transposon Tn5424 40
3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE 42
3.1 Liste des produits utilisés 43
3.2 Souches bactériennes 46
3.2.1 *Escherichia coli* 46
3.2.2 *Streptomyces lividans* 46
3.3 Milieu de culture 48
3.3.1 *Escherichia coli* 48
3.3.2 *Streptomyces lividans* 49
3.4 Préparation des spores de *S. lividans* 51
3.5 Mutagenèse par transposition 51
3.5.1 Transposon Tn5424 51
3.5.2 Transposon 5493 52
3.6 Manipulation de l'ADN 52
3.6.1 Extraction de l'ADN chromosomique de *S. lividans* 52
3.6.2 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction 53
3.6.3 Électrophorèse de l'ADN en gel d'agarose 54
3.6.4 Extraction des fragments d'ADN du gel d'agarose 54
3.6.5 Déphosphorylation de vecteurs 54
3.6.6 Production d'extrémités franches 55
3.6.7 Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur 55
3.6.8 Isolement des plasmides chez *Escherichia coli* 55
3.6.9 Purification d'ADN plasmidique de *E. coli* sur un gradient de chlorure de césium 56
3.6.10 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 57
3.7 Transformation bactérienne 57
3.7.1 *Escherichia coli* 57
3.7.2 *Streptomyces lividans* 58
3.8 Hybridation moléculaire 58

3.8.1 Transfert de type Southern 58
3.8.2 Hybridation 59
3.9 Construction d'une mini-banque génomique 59
3.10 Détection des transformants par hybridation de colonies 60
3.11 Séquençage de l'ADN 60
3.12 Comparaison informatique des séquences nucléotidiques 61
3.13 Test biochimiques 61
3.13.1 Mesure de l'activité xylanolytique 61
3.13.2 Mesure de la croissance du mycélium par dosage de l'ADN total 62
3.13.3 Dosage protéique 63
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION 64
4.1 Construction de la souche IAF811-20 65
4.2 Mutagenèse par transposition 72
4.3 Phénotype des transposants 76
4.4 Ciblage des gènes 79
4.4.1 Transposant #103 83
4.4.2 Transposant #22 86
4.4.3 Transposant #C, #20 et #30 87
4.4.4 Transposants #29, #52 et #55 91
4.5 Évaluation biochimique de l'effet de la transposition 93
4.5.1 Courbe de croissance du mycélium 93
4.5.2 Activité xylanolytique 94
4.5.3 Dosage des protéines du surnageant de culture 97
4.5.4 Interprétations des résultats 98
5. CONCLUSION 99
6. REMERCIEMENTS 102
7. LISTE DES RÉFÉRENCES 104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	: Acide aminé
ALA	: Alanine
amp	: Gène de résistance à l'ampicilline
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messager
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	: Acide ribonucléique de transfert
ATP	: Adénosine triphosphate
B. subtilis	: *Bacillus subtilis*
°C	: Degré Celsius
celA	: Gène de la cellulase A
dATP	: 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	: 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	: 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate
DO	: Densité Optique
DR	: Répétition directe
ΔP	: Force proton motrice
dTTP	: 2'-désoxythymidine 5'-triphosphate
E. coli	: *Escherichia coli*
EDTA	: Acide éthylène diaminetétracétique
g	: gramme
IR	: Répétition terminale inverse
IS	: Séquence d'Insertion
kb	: Kilopaire de bases
L	: Litre
lbs	: Livres
M	: Molaire
Mb	: Méga paires de bases
mg	: milligramme
mL	: Millilitre
mM	: Millimolaire
nm	: nanomètre
ORF	: Cadre de lecture ouvert
pb	: Paires de bases
PEG	: Polyéthylène glycol
p.s.	: Peptide signal
p*secA*	: Promoteur *secA*
RBB	: Rémazol Bleu Brillant
rpm	: Révolution par minute
SD	: Séquence Shine-Dalgarno
SDS	: Sodium dodécyl sulfate
S. coelicolor	: *Streptomyces coelicolor*
S. griseus	: *Streptomyces griseus*
S. lividans	: *Streptomyces lividans*

S. scabies	: *Streptomyces scabies*
S. virginiae	: *Streptomyces virginiae*
SNF	: Site de fixation aux nucléotides
TE	: Tampon Tris-EDTA
Tn	: Transposon
Tpase	: Transposase
Tris	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
tsr	: Gène de résistance au thiostrepton
UI	: Unité internationale
μg	: microgramme
μL	: microlitre
xlnA	: Gène de la xylanase A
Xln	: Protéine de la xylanase A

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Quantité de protéines Sec synthétisées en présence de différents milieux de croissance..... 26

Tableau II: Résultats des expériences de mutagenèse par transposition..... 74

Tableau III: Phénotype des transposants obtenus suite à la mutagenèse par transposition à l'aide de deux transposons, le Tn5424 et le Tn5493.... 80

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale du peptide signal..... 7

Figure 2 : Topologie membranaire de la protéine SecY de *E. coli*..... 11

Figure 3 : Topologie membranaire de la protéine de SecE de *E. coli*..... 14

Figure 4 : Topologie membranaire de la protéine de SecG de *E. coli*..... 16

Figure 5 : Topologie membranaire de la protéine SecD de *E. coli*..... 18

Figure 6 : Cycle catalytique de la translocation des protéines.....21- 22

Figure 7 : Carte génétique et physique du chromosome de *S. coelicolor* M145..... 33

Figure 8 : Schéma de la transposition réplicative et de la transposition conservative..... 38

Figure 9 : Plasmide pJOE2577 comprenant le transposon Tn 5493..... 41

Figure 10 : Plasmide pUKG403 comprenant le transposon Tn5424..... 41

Figure 11 : Schéma de la construction p*secA-XylanaseA*..... 47

Figure 12 : Plasmide intégratif pVRC1310..... 47

Figure 13 : Schéma de la construction comportant le promoteur *sec A*, le peptide signal de la Cellulase A et le gène tronqué de la Xylanase A_2 cloné dans le vecteur d'intégration pVRC1310..... 67

Figure 14 : a.Courbe de croissance de la souche IAF811-20
b.Courbe de croissance de la souche IAF10-164..... 70

Figure 15 : Mesure de l'activité xylanolytique et dosage des protéines dans le surnageant de culture de la souche IAF811-20..... 71

Figure 16 : Schéma des différents phénotypes possibles sur milieu RBB-xylane avec et sans glucose..... 78

Figure 17 : Schéma de la sonde utilisée pour l'hybridation de l'ADN des transposants obtenus avec le transposon Tn5424 présent sur le pUKG403..... 82

Figure 18 : Schéma de la sonde utilisée pour l'hybridation de l'ADN des transposants obtenus avec le transposon Tn5493 présent sur le pJOE2577..... 82

Figure 19 : Hybridation de l'ADN chromosomique du transposant #103 digéré par plusieurs enzymes de restriction..... 84

Figure 20 : Séquence du gène interrompu du transposant #103..... 85

Figure 21 : Hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #C, #20 et #22 digéré par plusieurs enzymes de restriction..... 88

Figure 22 : Hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #30 et #46 digérés par plusieurs enzymes de restriction..... 89

Figure 23 : Séquence du gène interrompu du transposant #22..... 90

Figure 24 : Hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #52, #53, #54, #55, #56, #57 et #29 digérés par plusieurs enzymes de restriction..... 92

Figure 25 : Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture de la souche IAF811-20 et des différents transposants, au cours du temps..... 95

Figure 26 : Croissance du mycélium, mesure de l'activité xylanolytique et dosage des protéines dans le surnageant de culture de la souche IAF811-20 et du transposant #22, au cours du temps..... 96

RÉSUMÉ

Streptomyces lividans sécrète de grandes quantités d'enzymes via le système général de sécrétion. Ce système implique plusieurs facteurs protéiques et des études antérieures suggèrent, en outre la présence de facteurs de régulation. Afin d'étudier la régulation et les facteurs impliquées dans le système général de sécrétion, le gène rapporteur de la xylanase A précédé du long peptide signal de la cellulase A, sous le contrôle du promoteur *secA*, a été intégré dans le gène ARNt tyrosine du génome de la souche IAF10-164 de *S. lividans*, négative pour la xylanase et ainsi créer la souche IAF811-20. Cette construction offre plusieurs avantages puisqu'il sera possible de trouver des facteurs qui régulent le promoteur *secA*, qui contrôle un des gènes essentiels du système général de sécrétion, en plus des facteurs impliqués dans la sécrétion des protéines. La souche IAF811-20 possède une croissance normale et sécrète de 8 à 10 UI de xylanase en présence de xylane ou de xylose mais seulement 3 à 4 UI en présence de glucose, ce qui indique que le promoteur *secA* est réprimé par le glucose. Ce résultat est conséquent avec les études de transcription de l'ARNm qui démontraient que SecA était 2 fois plus transcrit en xylane qu'en glucose. Cette souche a été utilisée pour la mutagenèse par transposition avec le Tn5424 ou le Tn5493 qui permettent l'intégration au hasard dans le génome. L'effet de l'interruption de gènes codant pour des facteurs impliqués dans le système général de sécrétion peut facilement être observé par son impact sur la sécrétion de la xylanase. Plusieurs transposants ont été obtenus avec le Tn5424. Pour le transposant #22 le transposon s'est inséré après une glycine correspondant au 1454ième a.a. suivant l'ATG du gène St2.C4.03c. Ce gène est une polykétide synthase de type I. Pour les transposants #C #20 et #30, le transposon s'est inséré au niveau des 34 pb répétées de l'IS469 du gène StE65.05c, et les transposants #20 et #30 présentent une intégration supplémentaire du transposon qui n'a pu être localisée. Pour le transposant #103, le transposon s'est inséré après une tyrosine correspondant au 51ième a.a. suivant l'ATG du gène St1C3.08c. Ce gène serait possiblement un régulateur de transcription et il semble essentiel puisque ce transposant n'a pu être conservé. Pour les transposants obtenus avec le Tn5493, aucun gène interrompu n'a pu être identifié et le plasmide portant le Tn5493 était toujours présent. L'activité xylanolytique mesurée dans le surnageant de culture des différents transposants présente une certaine variation avec différentes sources de carbone. Toutefois, aucune corrélation évidente n'a pu être établie entre le gène interrompu et les variations observées.

1. INTRODUCTION

Streptomyces lividans est une bactérie aérobie filamenteuse du sol à Gram positif. Étant une bactérie du sol, elle dégrade efficacement la biomasse lignocellulosique à l'aide d'une grande variété d'enzymes extracellulaires (Gilbert 1995). La majorité de ces enzymes possèdent un peptide signal et sont sécrétés via le système général de sécrétion (Morosoli *et al.* 1997).

Ce système, largement étudié chez *Escherichia coli*, une bactérie à Gram négatif, implique la force proton motrice et un pore de translocation membranaire composé de sous-unités protéiques codées par les gènes *sec* (Pugsley 1993). Les protéines transmembranaires SecY, SecE et SecG constituent un canal de sécrétion hydrophile au travers duquel les préprotéines traversent la membrane cytoplasmique (Economou 1999; Wickner et Leonard 1996). Situé en périphérie, le complexe de protéines accessoires SecD, SecF et yajC, semble stabiliser la protéine SecA lors de ses cycles d'insertion/désinsertion dans le pore de translocation (Duong et Wickner 1997a et b). SecA, grâce à son activité ATPasique, permet la translocation de la préprotéine par des cycles successifs d'insertion et de désinsertion dans la membrane.

Ces cycles permettent, à chaque reprise, la translocation d'une portion de la préprotéine à travers la membrane, soit environ 5 kDa (Economou 1999). SecD semble requise pour la libération finale de la protéine mature dans le milieu extra-cytoplasmique (Matsuyama *et al.* 1993). La force proton motrice de la membrane, nécessaire à la translocation, est maintenue par SecD et SecF (Arkowitz et Wickner 1994). Ces même protéines préviendraient également le recul de la préprotéine engagée dans le pore de translocation (Duong et Wickner 1997a).

Les préprotéines comportant un peptide signal et émergeant du ribosome sont prises en charge par la protéine cytosolique SecB. SecB permet de garder les préprotéines sous une forme qui favorise leur translocation en plus de les diriger vers la sous-unité SecA au site de translocation (Driessen *et al.* 1998). Seules les protéines SecA, SecY et SecE sont essentielles à la survie des cellules. Des gènes codant pour cinq

protéines Sec homologues (SecA, SecE, SecY, SecD et SecF) ont été identifiés chez *Streptomyces* (Morosoli *et al.* 1997).

Quelques études ont démontré que l'expression de certains gènes *sec* pouvait être sujette à la répression catabolique par le glucose ou uniquement dépendante de la phase de croissance (Morosoli *et al.* 1999). Chez *S. lividans*, le niveau des ARNm des gènes *sec* augmente en fonction d'une demande en exoenzymes, ce qui suggère la présence de facteur de régulation (Morosoli *et al.* 1999). Étant donné le nombre croissant d'applications biotechnologiques possibles pour l'expression et la sécrétion de protéines hétérologues par les streptomycètes (Lammertyn et Anné 1998), une meilleure connaissance du système général de sécrétion et de sa régulation est nécessaire pour cet organisme.

Le travail qui suit vise à identifier ou établir la présence d'éléments génétiques impliqués dans la régulation du système général de sécrétion. La première étape consiste à construire une souche de *Streptomyces lividans* contenant le gène de la xylanase A comme gène rapporteur sous le contrôle du promoteur *secA* intégré dans le génome d'un mutant xylanase et cellulase négatif. Cette nouvelle souche est un outil pratique permettant d'étudier les gènes impliqués dans le système général de sécrétion et leur régulation chez *S. lividans* au moyen de la mutagenèse par transposition.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Le système général de sécrétion

Le système de sécrétion des protéines a été largement étudié chez *Escherichia coli*, une bactérie à Gram négatif. Les recherches effectuées à ce jour chez les bactéries à Gram positif semblent indiquer une grande similitude entre leur système de sécrétion des protéines et celui des bactéries à Gram négatif. Pour cette raison le système décrit sera celui des bactéries à Gram négatif avec les homologies de ce système se rapportant aux bactéries à Gram positif.

Chez *E. coli,* pour la majorité des protéines, la principale voie de sortie vers le milieu extracellulaire s'avère être un système de translocation des protéines comportant au moins sept facteurs appelés protéines Sec (Pugsley 1993).

La translocation des protéines chez *E. coli* est médiée par un chaperon cytosolique, SecB et par un large complexe de sous-unités protéiques transmembranaires appelé pore de translocation (Pugsley 1993). Ce complexe protéique forme des pores de translocation au travers desquels les préprotéines (polypeptides intracellulaires possédant un peptide signal (p.s.) et destinés à l'exportation) franchissent la membrane cytoplasmique (Driessen *et al.* 1998). Ces pores de translocation sont composés de sous-unités protéiques codées par les gènes *sec* (Pugsley 1993). Les protéines transmembranaires SecY, SecE et SecG constituent un canal de sécrétion hydrophile au travers duquel les préprotéines traversent la membrane cytoplasmique (Economou 1999). Situé en périphérie, le complexe de protéines accessoires SecD, SecF et yajC, semble stabiliser la protéine SecA lors de ses cycles d'insertion/désinsertion dans le pore de translocation (Duong et Wickner 1997a et b). SecA, grâce à son activité ATPasique, permet la translocation de la préprotéine par des cycles successifs d'insertion et de désinsertion dans la membrane.

2.1.2 Le peptide signal

Toute préprotéine destinée à l'exportation via le système général de sécrétion contient un p.s. Le p.s. est situé à l'extrémité N-terminale de la préprotéine. Cette séquence a une longueur moyenne de 25 acides aminés (von Heinje et Abrahmsén 1989). Le p.s. a pour rôle d'interagir avec la machinerie de sécrétion et la structure de cette région a un effet primordial sur l'efficacité de sécrétion (Park 1988, Pugsley 1993). Il aurait également pour fonction de retarder le repliement de la protéine naissante et de l'orienter vers la membrane cytoplasmique (Park 1988). Le p.s. permet également la formation d'un complexe entre la préprotéine et une protéine chaperon (récepteur spécifique) appelée SecB (Pugsley 1993; Kumamoto 1990).

Tous les peptides signaux présentent les mêmes caractéristiques (figure 1). De façon générale un p.s. contient une courte région hydrophile (domaine N) contenant des résidus arginines ou lysines conférant une charge positive dans ce domaine. Le domaine N est suivi par une longue région hydrophobe non chargée (domaine H) constituée d'un minimum de 8 résidus adoptant une conformation en hélice α. Finalement une région neutre carboxy-terminale (domaine C) possède un site de clivage Ala-X-Ala reconnu par la signal peptidase (Pugsley 1993; Park 1988). La région C-terminale inclut fréquemment une cassure de l'hélice par un résidu proline situé de 4 à 8 résidus précédent le site de clivage. Ceci permet de rendre le site de clivage plus facilement accessible à la signal peptidase. Ainsi, lors de la translocation, le clivage du p.s. par la signal peptidase permet de libérer la protéine mature (Morosoli *et al.* 1997; Pugsley 1993; von Heinje 1985). De façon générale, les p.s. des bactéries à Gram positif ont la même organisation que ceux des bactéries à Gram négatif. Néanmoins, les p.s. des bactéries à Gram positif sont généralement plus longs et leur région N ont un nombre de charges positives plus élevé (von Heijne et Abrahmsén 1989). Basé sur la séquence de 40 peptides signaux de streptomycètes Gilbert *et al.* (1995) ont calculé que la longueur moyenne était de 35 a.a. alors que la longueur moyenne chez les bactéries à Gram positif est de 29 à 31 a.a. et en général de 24 à 25 a.a. pour *E. coli* (von Heinje et Abrahmsén 1989). Ces a.a. supplémentaires sont localisés dans la région N-terminal. Engels et Koller (1992)

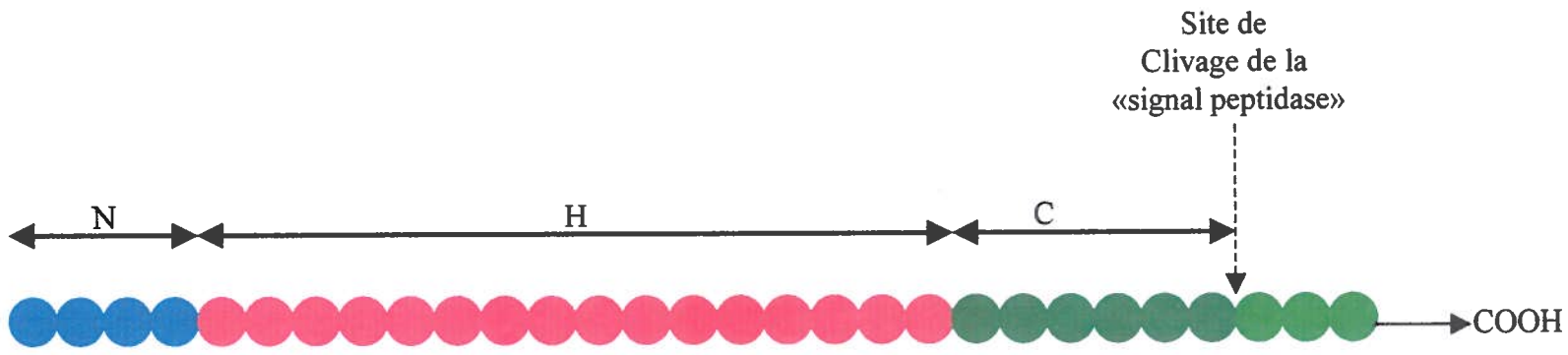


Figure 1. Structure générale du peptide signal. (Pugsley 1993)

suggère que ces p.s. plus longs se sont développés spécifiquement pour l'efficacité du mécanisme de sécrétion des streptomycètes.

2.1.3 SecB

La protéine chaperon SecB est requise pour l'exportation efficace de plusieurs protéines destinées au périplasme ou à la membrane externe. SecB est un homotétramère composé de sous unités de 17 kDa, quatre régions formant potentiellement les sites de fixation pour la préprotéine et SecA (Smith *et al.* 1997; Kumamoto *et al.* 1989). Lorsque la préprotéine émerge du ribosome elle est liée par SecB grâce à une interaction avec les longues chaînes de polypeptides naissantes. SecB agit ainsi dans le cytosol comme un bon catalyseur de repliement en utilisant l'énergie de liaison du peptide afin de stabiliser le nouveau polypeptide dans un état non replié et non agrégé (Fekkes *et al.* 1997). Cet état compétent à la translocation permet au polypeptide une interaction avec le système de translocation afin de traverser la membrane cytoplasmique (Smith *et al.* 1997; Zahn *et al.* 1996; Kumamoto et Francetic 1993). SecB a également pour fonction de diriger les préprotéines vers la sous-unité SecA au site de translocation (Driessen *et al.* 1998; Smith *et al.* 1997).

Ce chaperon serait très sélectif et aurait une affinité particulière pour certaines longues chaînes de polypeptides naissantes (Kumamoto et Francetic 1993). Randall et Hardy (1995) ont remarqué que chez certaines préprotéines le p.s. semble retarder le repliement du domaine mature. Ils ont alors émis l'hypothèse que par cette propriété SecB pourrait différencier les protéines sécrétées des protéines cytoplasmiques. Toutefois, Randall *et al.* (1997) ont démontré que l'interaction entre SecB et le polypeptide naissant est indépendante de la présence du p.s., ainsi, SecB serait apparemment incapable de faire la distinction entre une protéine cytoplasmique et un précurseur protéique en se basant sur la façon dont il est replié. De plus, selon Randall et Hardy (1995), SecB semble lier les préprotéines sans spécificité de séquence ou de structure.

Malgré ces différentes observations la spécificité de l'interaction entre SecB et la préprotéine requiert davantage d'études. Cette protéine ne semble pas être essentielle à la viabilité des bactéries (Pugsley 1993) et aucun homologue de SecB n'a jusqu'à présent été retrouvé chez les bactéries à Gram positif. Le rôle de SecB serait peut-être joué par d'autres protéines chaperons ou SecA interviendrait plus tôt dans le processus de sécrétion. Parmi les protéines cytoplasmiques pouvant jouer le rôle de chaperon mais de moindre importance, on retrouve entre autres les protéines de choc thermique GroEL, GroES et DnaK (Georgopoulos et Welch 1993).

2.1.4 SecA

La protéine SecA est absolument essentielle à la sécrétion des protéines et par le fait même à la survie des cellules. SecA a été identifié chez plusieurs bactéries à Gram positif et sa séquence est fortement conservée (Gilbert *et al.* 1996). SecA est une grosse molécule de 102 kDa qui contient deux domaines primaires distincts soit le domaine ATPasique N-terminal et le domaine de dimérisation C-terminal (Den Blaauwen *et al.* 1996). SecA se retrouve à l'état libre dans le cytoplasme, sur la paroi interne de la membrane cytoplasmique des bactéries ou intégrée à l'intérieur de celle-ci (Matsumoto *et al.* 1997 ; van der Wolk *et al.* 1997). Cependant c'est sous la forme d'un dimère qu'elle assure sa fonction biologique.

Le rôle de SecA serait de favoriser l'association de la préprotéine à la membrane cytoplasmique en plus de fournir une partie de l'énergie requise à la translocation de la préprotéine à travers cette membrane (Pugsley *et al.* 1993; Economou et Wickner 1994). La protéine SecA possède deux sites de fixation aux nucléotides (SFN-I et SFN-II) essentiels et fonctionnant de façon coopérative (Mitchell et Oliver 1993; van der Wolk *et al.* 1997). Le SFNI possède une forte affinité pour les nucléotides et est situé sur le domaine N alors que le SFNII possède une faible affinité pour les nucléotides et se retrouve sur le domaine C (den Blaauwen *et al.* 1997; Mitchell et Oliver 1993; Matsuyama *et al.* 1990a).

2.1.5 Pore de translocation

Le pore de translocation des préprotéines est composé de deux complexes hétérotrimériques. Le complexe SecYEG enchâssé dans la membrane constitue le pore de translocation des préprotéines en fixant la protéine SecA de façon stœchiométrique. Ce complexe forme des canaux protéiques spécifiques permettant le passage des préprotéines à travers la membrane cytoplasmique bactérienne (Pugsley 1993; Duong et Wickner 1997a et b). Ces canaux facilitent ainsi le passage de larges segments polypeptidiques en les protégeant de l'environnement hydrophobe de la double couche lipidique. Ceci implique une importante diminution des besoins énergétiques (Pugsley 1993). Le pore de translocation comporte également un autre complexe hétérotrimérique composé des protéines accessoires SecD, SecF et yajC intégrées à la membrane. Des études de structure et de fonction ont démontré que ces deux complexes forment un large domaine de translocation hexadimérique intégré à la membrane (Duong et Wickner 1997a).

2.1.5.1 SecY

Le gène *secY* présent dans l'opéron *spc* code pour la protéine SecY composée de 438 acides aminés avec un poids moléculaire de 47,5 kDa (Cerretti *et al.* 1983; Pöhling *et al.* 1999). Sa structure est constituée de dix segments transmembranaires hydrophobes ancrés dans la membrane interne, cinq segments exposés au périplasme et six régions cytoplasmiques (figure 2) (Ito 1990). Elle compte également neuf jonctions hydrophiles et des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques hydrophiles (Ito 1990; Akiyama et Ito 1987). SecY est la seule protéine du canal de sécrétion à avoir un contact direct avec la préprotéine lors de la translocation (Joly et Wickner 1993). Cette protéine est essentielle à la survie des bactéries (Pugsley 1993).

Certaines évidences génétiques et biochimiques ont démontré une étroite relation entre les protéines SecY et SecE. L'interaction entre SecY et SecE identifiée par Kaufmann *et al.* (1999) se situe au niveau du segment transmembranaire 2 de SecY

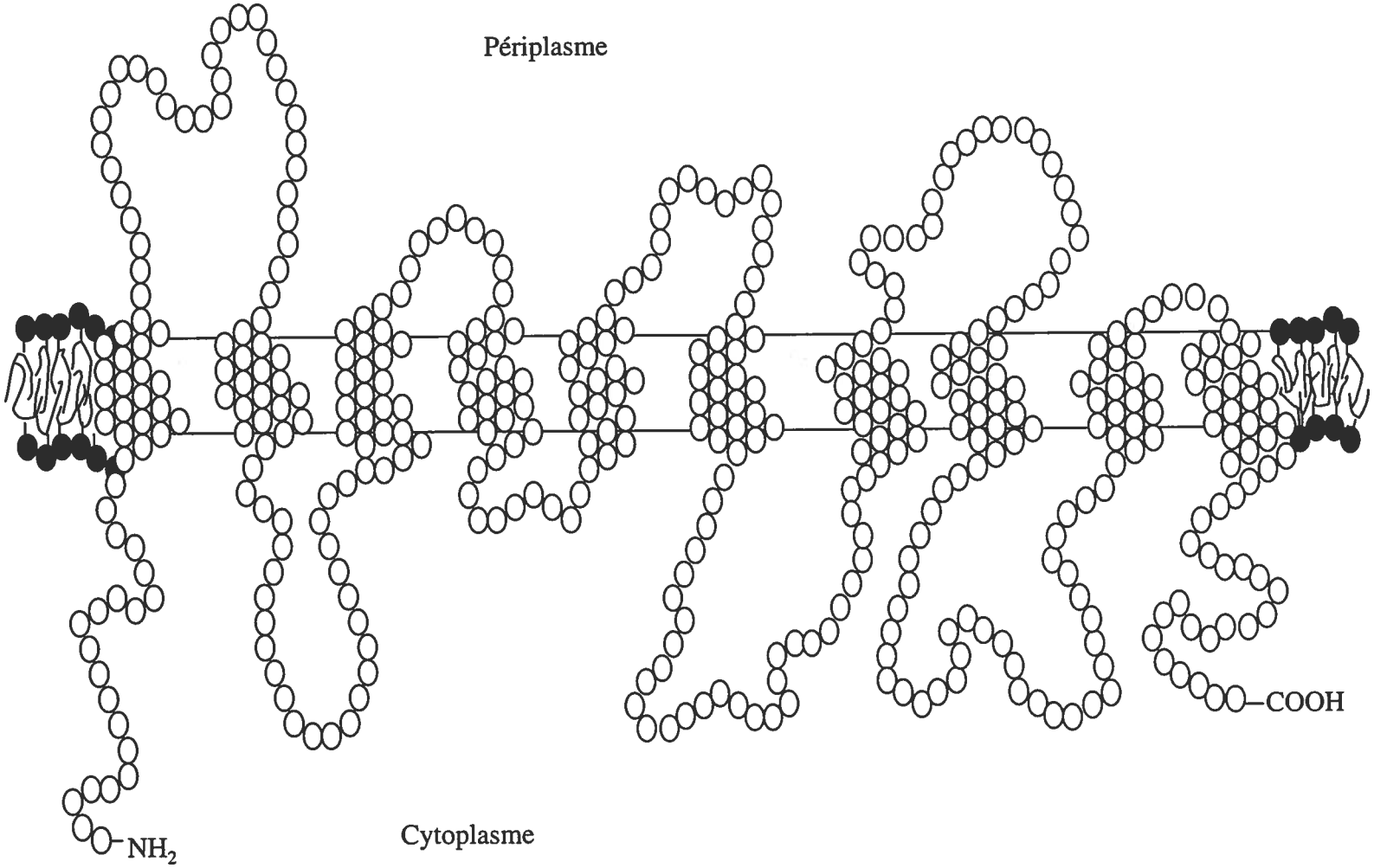


Figure 2. Topologie membranaire de la protéine SecY de *E. coli*. (Ito 1990)

et du segment transmembranaire 3 de SecE. Cette étude de l'architecture moléculaire du complexe SecYEG a été réalisée par la mutagenèse de résidus cystéine; technique qui permet de révéler la disposition des hélices et la relation structure-fonction des sous-unités protéiques membranaires (Kaufmann *et al.* 1999b; Manting *et al.* 1999). Ainsi, le remplacement de l'isoleucine de la position 278 de SecY par une cystéine semble augmenter l'activité de translocation (Manting *et al.* 1999). Cette mutation permet également d'optimiser la translocation des préprotéines par une interaction plus efficace entre SecA et le complexe SecYEG et une diminution de la dissociation des composés du complexe de sécrétion au cours des cycles ATPasique de la translocation (Manting *et al.* 1999).

Le nombre de copies de la protéine SecY oscille entre 200 et 400 par cellule, ce qui correspond au nombre de copies de la protéine SecE (Pugsley 1993; Schatz *et al.* 1991). Selon Taura *et al.* (1993), les molécules de SecY non impliquées dans le complexe de translocation, à cause du manque de protéines d'association SecE, sont rapidement dégradées. La protéine ftsH a été identifiée par Kihara *et al.* (1995) comme étant responsable de la dégradation des protéines SecY produites en excès. Matsuyama *et al.* (1990b), ont démontré que la surproduction de SecY par la cellule peut seulement être effectuée en concomitance avec SecE. Ainsi, le nombre de molécules stables de SecY dans la cellule pourrait être augmenté.

Un homologue de SecY a été identifié chez de nombreuses autres bactéries à Gram négatif ou positif. SecY est présente chez *S. lividans*, *S. griseus* et *S. scabies* (Ostiguy *et al.* 1996; Pölhing *et al.* 1999; Hale *et al.* 1995). Les protéines SecY identifiées chez les bactéries à Gram positif sont similaires au niveau structure et fonction aux protéines SecY de *E. coli*.

2.1.5.2 SecE

SecE est une petite protéine transmembranaire essentielle à la viabilité des bactéries. SecE forme un complexe protéique membranaire avec les protéines SecY et SecG (Pugsley 1993). On retrouve de 250 à 500 copies de SecE par cellule (Shatz *et al.* 1991). Chez *E coli*, elle est constituée de 127 acides aminés, soit 13,6 kDa, formant trois segments transmembranaires et deux régions cytoplasmiques (figure 3) (Shatz *et al.* 1991). Les trois domaines transmembraires, représentés par les résidus 19-39, 45-63 et 93-111, sont d'une longueur de 18 ou 19 a.a et sont dépourvus de résidus chargés. Toutefois, il a été démontré que seule la dernière portion de SecE, comprenant les a.a. 78 à 127 serait suffisante pour assurer l'activité de cette protéine (Shatz *et al.* 1991). Cette portion comprend la deuxième région cytoplasmique qui assure la fonction de la protéine et le dernier segment transmembranaire de SecE qui maintient la protéine dans une position adéquate (Murphy et Beckwith 1994). L'acide aminé terminal de la protéine est localisé sur la surface intérieure alors que le carboxy terminal est situé sur la surface externe de la membrane cellulaire.

SecE serait la première protéine membranaire à interagir avec SecA (Yang *et al.* 1997). SecE permet également de stabiliser une surproduction de SecY. À l'inverse, une surproduction de SecE ne nécessite pas une surproduction de SecY (Yang *et al.* 1997).

Une protéine homologue de SecE a été identifiée chez *Bacillus subtilis*. Cette protéine homologue ne possède que 59 acides aminés dont la séquence correspond à celle de la dernière section de SecE de *E coli* (Jeong *et al.* 1993). Une protéine homologue a également été identifiée chez *S. griseus*, *S.virginiae* et *S. coelicolor* avec respectivement 86, 84 et 94 acides aminés correspondant aussi au troisième segment transmembranaire de SecE d'*E. coli* (Miyake *et al.* 1994).

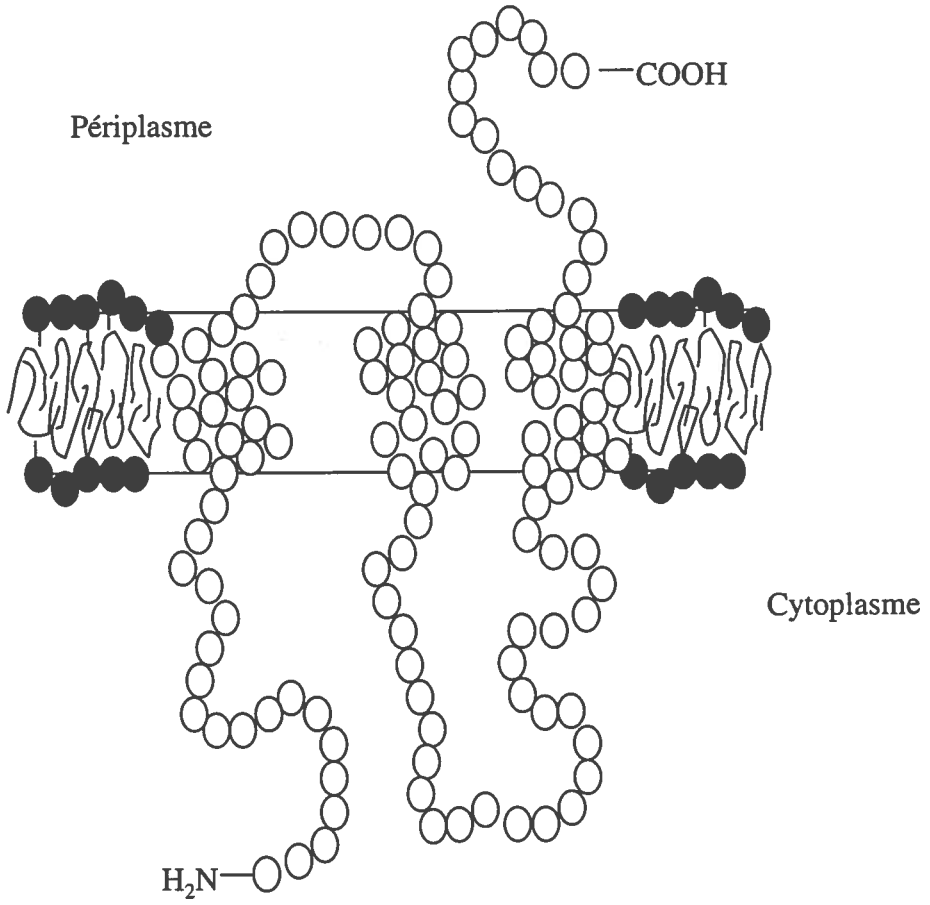


Figure 3. Topologie membranaire de la protéine de SecE de *E. coli.* (Shatz *et al.* 1991)

2.1.5.3 SecG

La protéine SecG a été identifiée par Brundage *et al.* (1990) car elle co-précipitait avec les protéines SecY et SecE. Elle était originellement nommée «Band1» (Brundage *et al.* 1990) et "P12" (Nishiyama *et al.* 1993). SecG est une petite protéine hydrophobe constituée de 110 acides aminés (11,4 kDa) et contient deux segments transmembranaires (figure 4) (Nishiyama *et al.* 1996). Cette protéine ne s'avère pas essentielle pour les bactéries à 37°C mais permet une sécrétion beaucoup plus efficace. Toutefois, elle devient indispensable à plus basse température, comme par exemple à 20°C (Nishiyama *et al.* 1994).

La protéine SecG forme un complexe avec les protéines SecY et SecE et elle est directement impliquée dans la translocation des protéines. Selon, Nishiyama *et al.* (1994), SecG jouerait un rôle dans les premières étapes de la sécrétion, en favorisant l'insertion du p.s. dans la membrane plasmique.

Hanada *et al.* (1994) ont déterminé que SecG stimulait l'activité ATPase de SecA, pour la translocation, tout en ayant peu d'effet sur l'interaction entre le complexe SecY/SecE et SecA. Ainsi, SecG serait impliquée dans la translocation des protéines suite à l'association de SecA au complexe SecY/E/G.

Nishiyama *et al.* (1996) ont démontré que SecG avait un cycle d'inversion topologique couplé au cycle d'insertion/désinsertion membranaire de SecA. Ainsi, en l'absence de préprotéine disponible pour la translocation, les extrémités N- et C-terminales de SecG sont exposées au périplasme, alors que la région faiblement hydrophobe se retrouve du côté cytoplasmique de la membrane (Nishiyama *et al.* 1996). En présence de préprotéine, qui implique l'insertion de SecA dans la membrane, il y a inversion topologique de SecG dans la membrane. Nishiyama *et al.* (1996), proposent que le cycle d'inversion topologique de SecG couplé aux cycles d'insertion/désinsertion de SecA permet de réduire considérablement l'énergie requise en fin de cycle. Ceci a

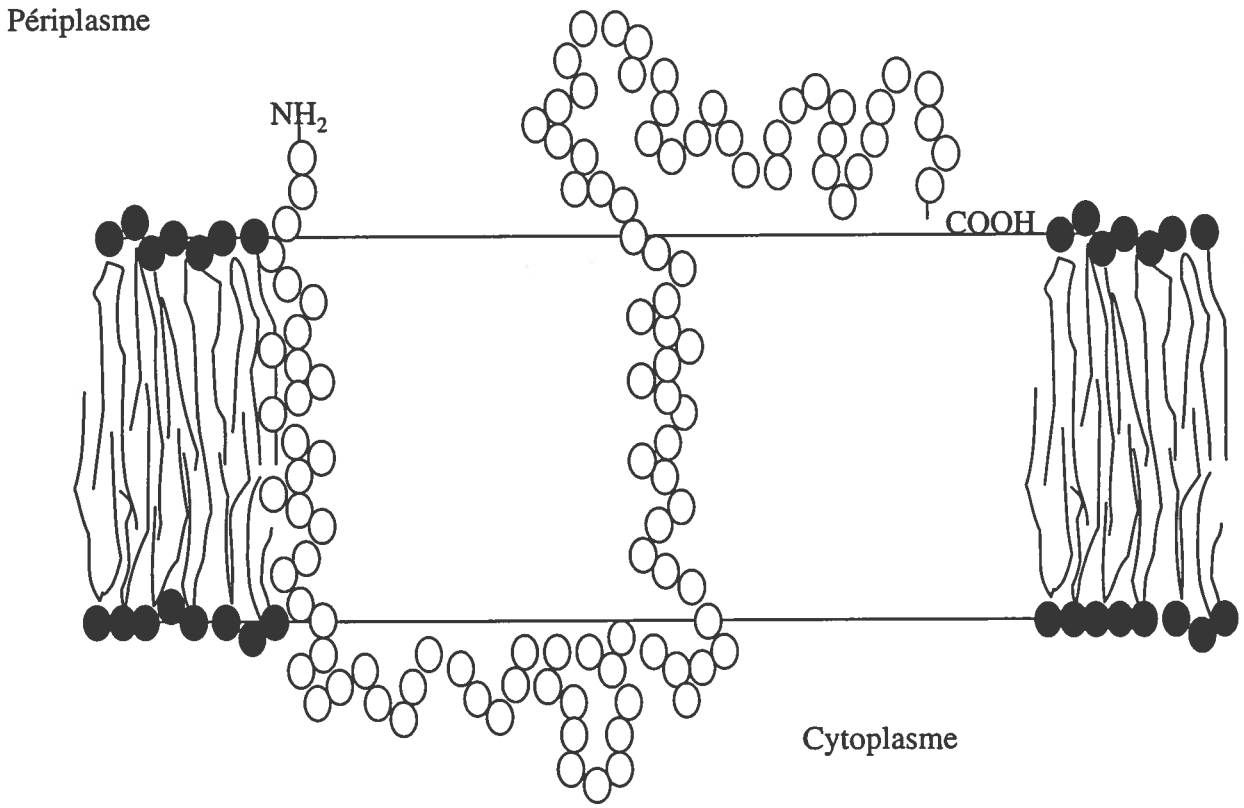


Figure 4. Topologie membranaire de la protéine de SecG de *E. coli.* (Nishiyama *et al.* 1996)

donc pour effet de stimuler de façon remarquable la translocation des préprotéines (Matsumoto *et al.* 1998; Nishiyama *et al.* 1996). Un homologue de la protéine SecG a été identifié chez *Bacillus subtilis* (van Wely *et al.* 1999).

2.1.5.4 SecD, SecF et yajC

Les fonctions des composés du complexe membranaire contenus dans l'opéron *SecD*, comprenant les gènes *SecD*, *SecF* et *yajC* demeurent encore obscures. Les protéines SecD, SecF et yajC ont un poids moléculaire de 65, 35 et 8 kDa, respectivement (Duong et Wickner 1997a; Gardel *et al.* 1990). SecD (figure 5) et SecF présentent une structure similaire par la topologie suivante: six segments transmembranaires et un grand segment périplasmique situé entre les deux premiers segments transmembranaires (SecD 45 kDa, SecF 11kDa) (Pogliano et Beckwith 1994b). La protéine yajC comporte un seul segment transmembranaire (Duong et Wickner 1997a).

La fonction des protéines SecD et SecF est difficile à définir puisque celles-ci sont peu abondantes chez *E. coli* avec seulement 10 à 30 copies par cellule, soit 10 fois moins abondantes que SecYEG (Matsuyama *et al.* 1992; Pogliano et Beckwith 1994b). De plus, il n'y a aucune preuve biochimique de l'existence d'interactions entre SecD, SecF et la translocase, malgré leur liaison physique. Selon Pogliano et Beckwith (1994b), ces protéines ne seraient pas essentielles à la survie des bactéries mais augmenteraient grandement l'efficacité de la sécrétion. L'activité de SecD et SecF se déroule en grande partie dans le périplasme chez *E. coli* puisqu'elles possèdent un large domaine périplasmique. D'ailleurs, ce domaine est essentiel à l'activité de SecD (Pogliano et Beckwith 1994b).

La fonction stimulatrice de ces protéines sur la sécrétion a lieu lors des dernières étapes de la translocation (Duong et Wickner 1997a; Bieker-Brady et Silhavy 1992). SecD et SecF semblent impliquées dans différents aspects de la translocation : (1) dans le repliement ou la libération des polypeptides sécrétés du complexe de translocation (Matsuyama *et al.* 1993; Pogliano et Beckwith 1994a), (2) dans le recyclage des sous-

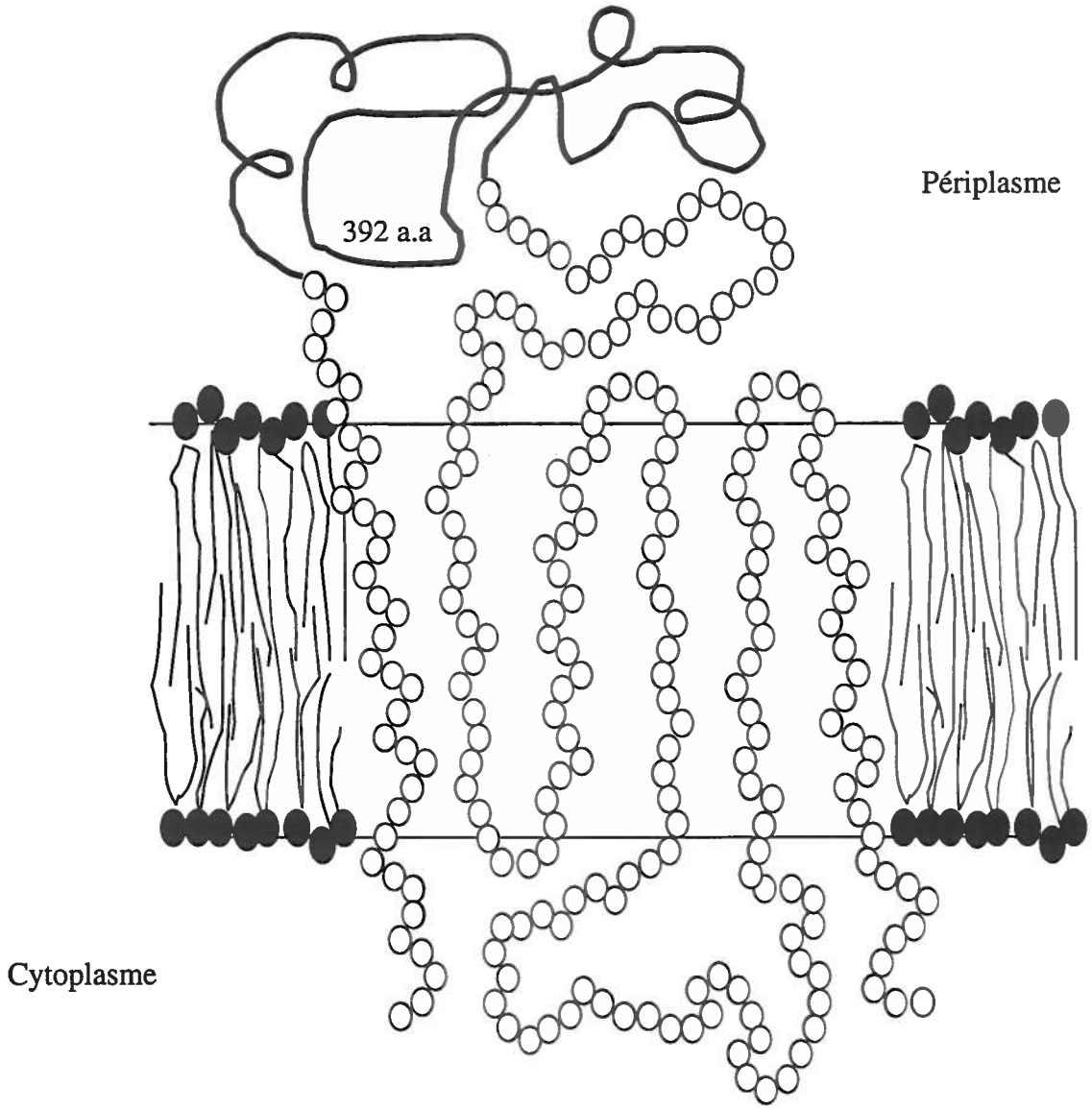


Figure 5. Topologie membranaire de la protéine SecD de *E. coli*. (Pogliano et Beckwith 1994b)

unités de la translocase (SecYEG) après chaque cycle de translocation (Duong et Wickner 1997a; Pogliano et Beckwith 1994a et b) et (3) dans la présentation de la préprotéine à la signal peptidase (Pogliano et Beckwith 1994a et b).

Les protéines SecD et SecF semblent également impliquées dans l'utilisation plus efficace de l'énergie nécessaire à la translocation. Arkowitz et Wickner (1994) ont démontré que SecD et SecF seraient impliquées dans le maintien du gradient électrochimique dans la membrane (force proton motrice). De plus, Duong et Wickner (1997b), ont établi que SecD et SecF supportent directement l'utilisation de l'ATP lors de la translocation, en plus d'agir sur le corps de la translocase en stimulant l'activité de SecYE. La protéine SecF stabiliserait SecY et SecD en interagissant avec celles-ci (Sagara *et al.* 1994). Finalement, SecD et SecF pourraient être impliquées dans la régulation des cycles d'insertion/désinsertion de SecA à travers le pore de sécrétion constitué de SecYEG (Economou *et al.* 1995).

Le rôle de la protéine yajC demeure inconnu. Cette protéine fait partie intégrante du complexe de translocation SecYEG et SecDF (Taura *et al.* 1994). YajC pourrait faire la liaison entre les complexes SecYEG et SecDF au niveau structurel et fonctionnel. Il n'y a toutefois aucune preuve de la nécessité de yajC pour la sécrétion des protéines (Pogliano et Beckwith 1994b).

Un homologue des protéines SecD et SecF a été identifié chez *B. subtilis*, une bactérie à Gram positif (Bolhuis *et al.* 1998). Cet homologue se retrouve sous une forme fusionnée et constitue une seule protéine appelée SecDF. Contrairement à *E. coli*, SecDF de *B. subtilis* ne s'avère pas être requis pour le relâchement de la protéine mature de la membrane (Bolhuis *et al.* 1998).

2.1.6 Mécanisme de sécrétion

À partir des connaissances acquises sur les différents facteurs impliqués dans le système général de sécrétion, il est possible d'élaborer un modèle de sécrétion constitué

de plusieurs étapes menant au passage des préprotéines à travers la membrane cytoplasmique. La figure 6 présente les différentes étapes et les facteurs impliqués dans la translocation de protéines. A) La préprotéine émergeant du ribosome avec son p.s. est rapidement prise en charge par le chaperon SecB. SecB conserve la préprotéine dans un état compétent à la translocation et la dirige ensuite vers la membrane cytoplasmique au site de translocation. Il y a association de SecB avec SecA liée au complexe SecYEG (Driessen *et al.* 1998 et Fekkes *et al.* 1997).

Le site de fixation SecB sur la protéine SecA est situé à l'extrémité C-terminale et correspond aux 22 derniers résidus aminoacyl de SecA (Fekkes *et al.* 1997 ; Breukink *et al.* 1995). Cette région possède une charge nette positive, et elle est constituée d'un taux élevé de glycine, proline et de résidus cysteinyl. La charge de cette région est opposée à celle du site de fixation de SecA sur la protéine SecB, ce qui selon Driessen *et al.* (1998), suggère une interaction électrostatique entre les protéines SecB et SecA. Toutefois, l'affinité de SecB pour SecA dans le cytosol est plutôt faible alors que SecB se fixe avec une forte affinité au complexe SecYEG lié à SecA (Driessen *et al.* 1998; Douville *et al.* 1995; Hartl *et al.* 1990). De plus, en présence d'une préprotéine possédant un p.s. fonctionnel, l'affinité de liaison entre SecB et SecA est augmentée (Fekkes *et al.* 1997).

Ensuite la liaison entre le p.s. et SecA stimule l'interaction entre SecA et SecB. Cette interaction entre SecA et SecB provoque le relâchement du domaine mature de la préprotéine de sa liaison avec SecB. La préprotéine est alors transférée du chaperon SecB vers la protéine SecA par un mécanisme de va-et-vient synchronisé, au cours duquel la liaison entre SecB et SecA se relâche. Il y a alors enclenchement des étapes de transfert de la préprotéine qui implique des changements de conformation de SecB et SecA. Lorsque les sites de fixation de SecA et de la préprotéine sur SecB sont recouvrés, il est possible que le lien fort entre SecB et le C-terminal de SecA dissocie la préprotéine de SecB. Ce mécanisme présente une implication importante vis-à-vis SecB liée à la translocation, car SecB est incapable de lier de nouvelles molécules lorsqu'elle est liée avec SecA. Ainsi, seulement une fois la translocation initiée par la fixation d'un ATP par

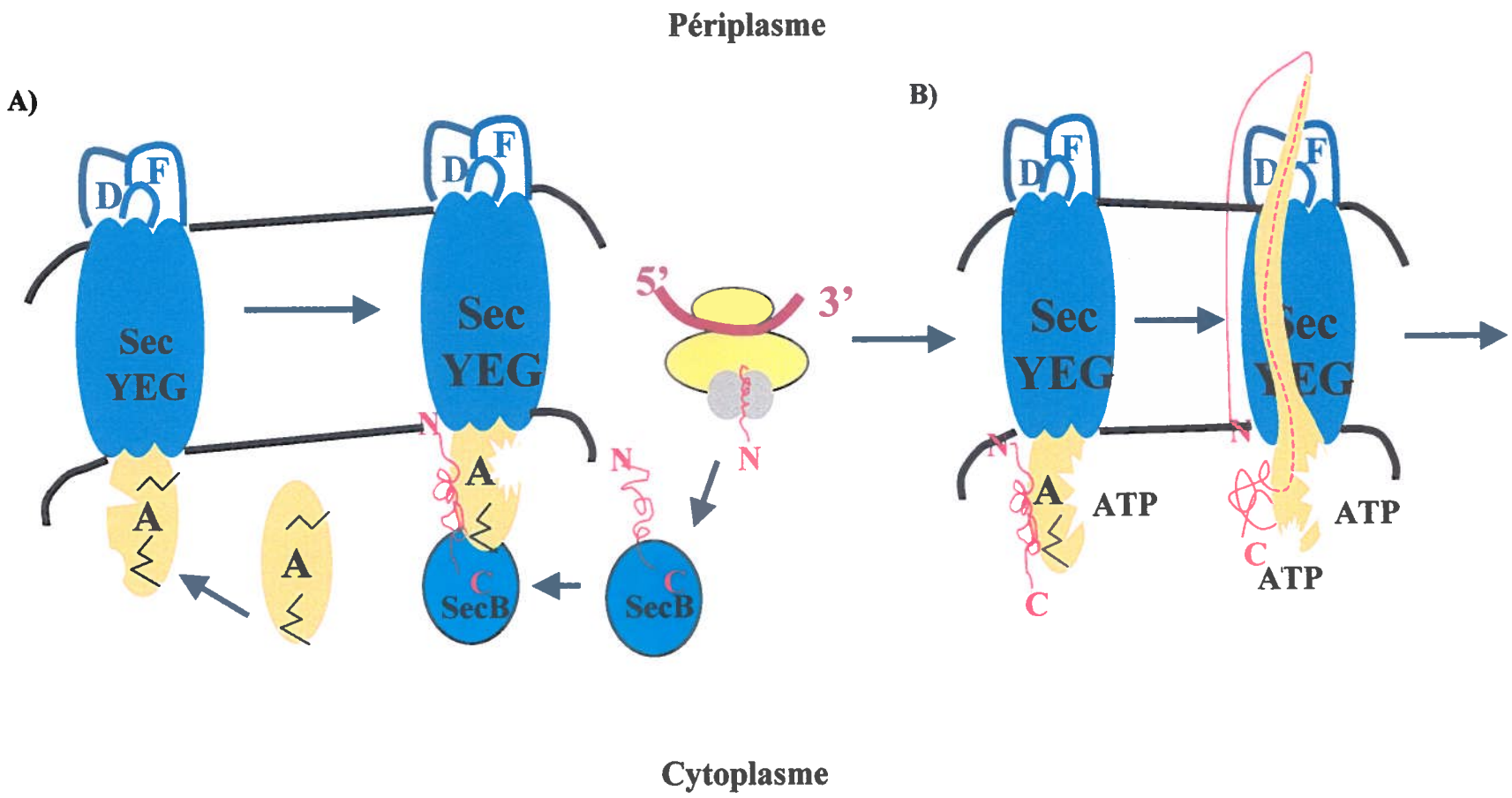
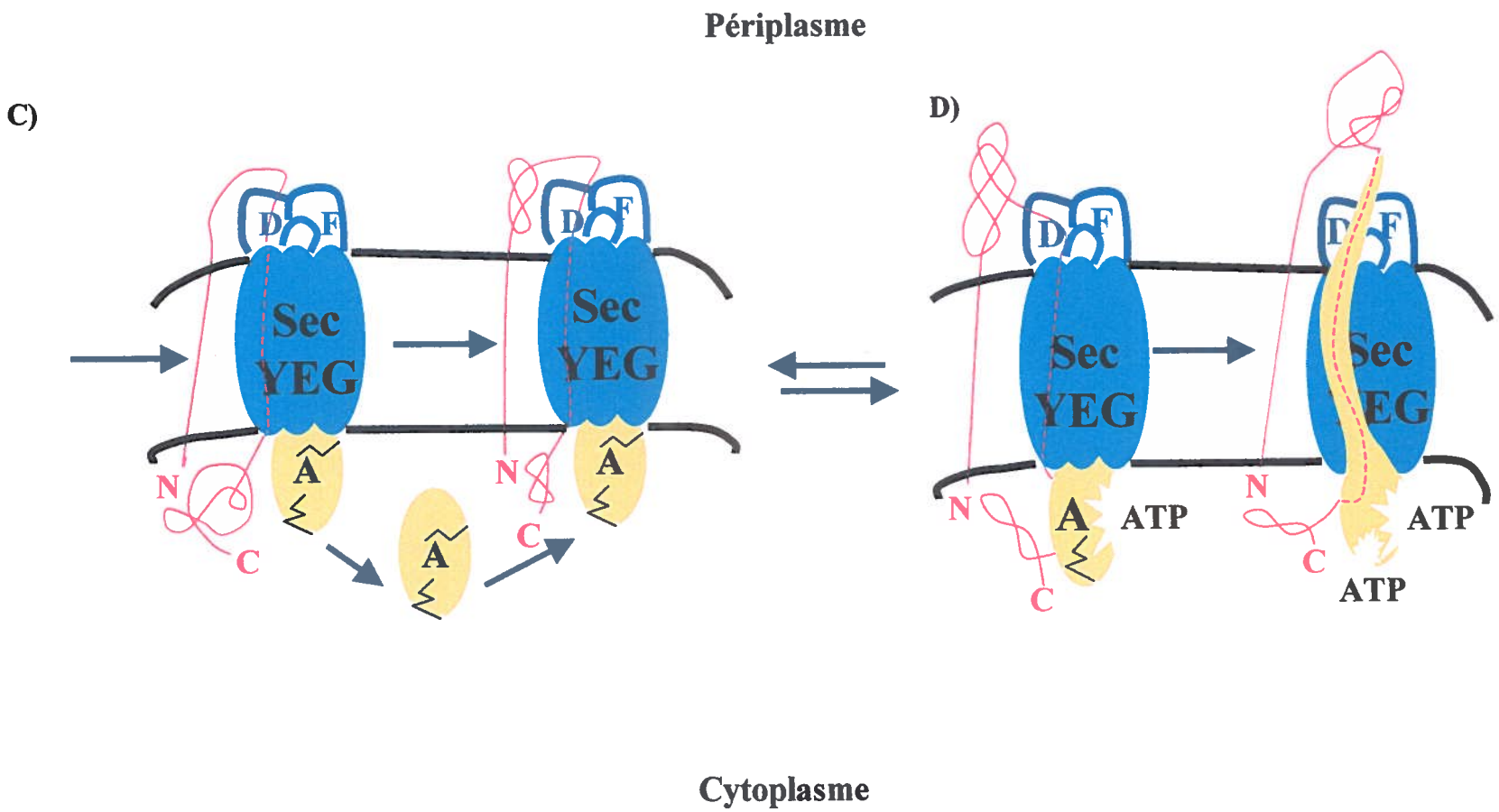


Figure 6. Cycle catalytique de la translocation des protéines


Périplasme
C)
D)
D
F
Sec
YEG
A
N
C
ATP
Cytoplasme

SecA, SecB est relâchée de la membrane afin de lier une nouvelle préprotéine (Driessen *et al.* 1998 ; Fekkes *et al.* 1997).

Selon van der Wolk *et al.* (1997), la translocation des préprotéines nécessiterait deux formes d'énergie, l'ATP comme énergie essentielle et la force proton motrice (Δp) afin de stimuler la translocation. Selon ces même auteurs, les deux formes d'énergie sont essentielles.

Le complexe composé de SecA liée à SecYEG joue un rôle clé dans le processus de translocation. Ce complexe fixe la préprotéine par la reconnaissance du p.s. et du domaine mature puis fixe de l'ATP afin de l'hydrolyser pour en utiliser l'énergie afin d'enclencher la réaction de translocation de la préprotéine (van der Wolk *et al.* 1997; Matsumoto *et al.* 1997).

B) Van der Wolk *et al.* (1997) ont démontré les étapes fonctionnelles de la translocation des protéines par les cycles de fixation et d'hydrolyse de l'ATP par SecA. Ils ont décrit le cycle catalytique de SecA comme suit: la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, impliquant deux étapes distinctes de translocation qui permettent une progression de la translocation d'environ 5 kDa. Suite à la fixation de l'ATP, la protéine SecA se fixe à la chaîne polypeptidique partiellement sécrétée et permet la translocation d'environ 2 à 3 kDa du précurseur protéique en concomitance avec l'insertion du domaine de SecA dans la membrane. Ce processus implique un changement conformationnel important de SecA (Driessen *et al.* 1998; Schiebel *et al.* 1991).

Ce mécanisme d'insertion de SecA a été suggéré après avoir observé que 30 kDa du domaine C-terminal de SecA devenaient résistant aux protéases lors de la liaison entre SecA, l'ATP et une préprotéine (Economou et Wickner 1994). Ainsi, l'hydrolyse subséquente d'ATP démontre la résistance aux protéases du domaine de SecA par le processus de désinsertion du domaine de SecA, accompagné d'un changement conformationnel et ce, pendant le relâchement du précurseur protéique lié (Economou et Wickner 1994). À ce moment, le gradient électrochimique poursuit la translocation

pendant un court moment (Schiebel *et al.* 1991). Ensuite, une nouvelle molécule de SecA est alors disposée pour la re-fixation d'un segment exposé de la préprotéine partiellement sécrétée, et cette étape permet ainsi la translocation d'un autre segment polypeptidique de 2,5 kDa. Par conséquent, la translocation n'est que partiellement conduite par la réaction de co-insertion de SecA, elle est complétée par la réaction de fixation de la préprotéine et par le changement conformationnel associé de SecA (Economou et Wickner 1994). C et D) Ces cycles d'insertion et de désinsertion se répètent jusqu'à la sécrétion complète de la préprotéine (Economou et Wickner 1994; Kim *et al.* 1994). Finalement, SecD et SecF permettent le repliement adéquat de la protéine mature et son relâchement de la membrane cytoplasmique en présentant la préprotéine à la signal peptidase (Pogliano et Beckwith 1994a et b).

2.2 Effet de la source de carbone et de la croissance sur l'expression des gènes du système général de sécrétion

Les cellules possèdent la capacité de réguler l'expression des gènes. Le contrôle de l'expression du génome permet de conserver l'énergie et les matières premières nécessaires à la croissance. Ceci permet de maintenir un équilibre entre les quantités des diverses protéines cellulaires et de s'adapter aux modifications à long terme de l'environnement. L'expression des gènes est le plus souvent contrôlée au niveau de la production de l'ARN. En général, c'est l'initiation de la transcription qui est régulée, le contrôle étant exercé soit par des répresseurs, des protéines qui empêchent la transcription, soit par des activateurs qui sont nécessaires à l'initiation. Dans le premier cas, la transcription ne débute qu'après l'inactivation du répresseur. Dans le second, le gène n'est transcrit que lorsque l'activateur se trouve dans l'état fonctionnel adéquat.

L'expression des gènes peut également être influencée par certains facteurs environnementaux qui ont pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression du génome. En réponse aux éléments nutritifs disponibles dans l'environnement, les cellules bactériennes produisent les composés essentiels pour la croissance cellulaire selon leur niveau de croissance (Dennis et Bremer 1974). Ainsi, dans un milieu riche, les composés

essentiels sont synthétisés en grande quantité de manière à atteindre un niveau de croissance plus élevé. Parmi ces composés on retrouve entre autres l'ARNr, les protéines ribosomiques, les facteurs de traduction et de transcription, les molécules chaperons et les protéines impliquées dans la sécrétion des protéines essentielles à la croissance. La synthèse des protéines de sécrétion Sec doit être en corrélation avec le niveau et les différentes phases de croissance des cellules afin de combler les besoins en matière de sécrétion de protéines essentielles (Pugsley 1993; Van Bogelen *et al.* 1992).

Seoh et Tai (1997) ont déterminé chez *E. coli* les niveaux de synthèse de SecB et des autres protéines Sec au cours de la croissance cellulaire dans différents milieux. Cette analyse a été faite par immunobuvardage quantitatif à l'aide d'anticorps spécifiques aux protéines Sec (tableau I). Les résultats démontrent que, chez *E. coli*, l'expression du gène *secB* est sujette à la répression catabolique selon la source de carbone présente dans le milieu, alors que l'expression des autres gènes *sec* dépend uniquement du niveau de croissance. Les résultats démontrent une synthèse relativement faible de SecB (~ 220 ng/mg de protéines totales) dans un milieu minimal avec glucose, en comparaison avec celles des «trigger factors» (~4,1 μg/mg de protéines totales) et de deux autres protéines chaperons, DnaK et GroEL (9,8 et 13 μg/mg de protéines totales) (VanBogelen *et al.* 1992). *SecB* n'est donc pas induit par un stress environnemental contrairement aux autres molécules chaperons dont l'expression dépend du niveau de croissance. En effet, l'expression des autres protéines Sec est plus élevée lors d'une croissance accélérée en milieu riche avec glucose que lors d'une croissance lente en milieu minimal avec glucose. Les niveaux d'expression de *secB* sont relativement constants au cours des différentes phases de la croissance (Seoh et Tai 1997).

Les autres protéines Sec sont exprimées au niveau cellulaire en relation avec le taux de croissance. Ainsi, la synthèse des protéines Sec est dépendante du taux de croissance. Il est généralement accepté que la synthèse des composés impliqués dans le système Sec dépend du taux et de la phase de croissance des cellules. Cette dépendance est probablement nécessaire afin de subvenir aux besoins en matière d'exportation de

Tableau I: Quantité de protéines Sec synthétisées chez *Escherichia coli* en présence de différents milieux de croissance. (Seoh et Tai 1997)

Milieu	Temps de génération (min.)	Quantité de protéines Sec (ng/mg)			
		SecA	SecB	SecE	SecY
MinA-acétate	123		415	82	87
MinA-glycérol	95	1 003	470	86	137
MinA-maltose	70		433	94	178
MinA-glucose	63	1 243	224	91	199
Lin-glycérol	33	1,420	338	103	235
Lin-glucose	28	1,560	225	107	266

protéines lors d'une croissance accélérée (Seoh et Tai 1997). Ainsi, le faible niveau de la protéine SecB lorsque les cellules sont dans un milieu contenant du glucose suggère que la synthèse de SecB soit régulée par une répression catabolique.

Pour ce qui est des Streptomycètes, Pöhling *et al.* (1997) ont démontré que l'expression de *secA* chez *Streptomyces griseus* est dépendante de la phase de croissance. Morosoli *et al.* (1999) ont mesuré le niveau d'ARNm des cinq gènes *sec* connus de *S. lividans*, lors de la croissance en différentes sources de carbone. La courbe de croissance bactérienne a d'abord été établie pour les deux sources étudiées soit le glucose et le xylane, afin de pouvoir comparer l'expression des gènes *sec* dans une même phase de croissance. Le xylane est un polymère complexe nécessitant une première dégradation par des enzymes extracellulaires avant d'être transporté dans la cellule sous forme de courts xylo-oligosaccharides, alors que le glucose est une molécule simple facilement assimilée par la cellule. Le xylane étant plus difficile à métaboliser que le glucose, le temps de latence est alors plus long, ce qui allonge la phase logarithmique et entraîne un décalage de 8 heures sur la courbe de croissance (Morosoli *et al.* 1999).

Afin de déterminer si l'expression des gènes *sec* est régulée en fonction de la phase de croissance et de la source de carbone, l'ARN a été extrait à différents stades de croissance. Le niveau d'ARNm des gènes *secA, secD, secE, secF* et *secY* en glucose et en xylane a été relativement constant pendant les phases précoces et logarithmique de la croissance. Puis une baisse marquée au début de la phase stationnaire a été suivie, durant la phase stationnaire tardive, d'une remontée à des niveaux équivalents à ceux observés pendant la phase initiale de croissance. Les résultats de Morosoli *et al.* (1999) démontrent donc que le niveau de l'ARNm des gènes *sec* est dépendant de la phase de croissance. Cela indique aussi que les gènes *sec* sont activement transcrits pendant le processus de différenciation cellulaire. Toutefois, *S. lividans* peut augmenter son niveau primaire d'expression en réponse à une forte demande d'enzymes extracellulaires. L'analyse densitométrique de l'ARNm des cinq gènes *sec* de *S. lividans* indique qu'il y a de 1,5 à 2 fois plus d'ARNm en présence de xylane plutôt que de glucose. Toutefois, cette différence diminue lorsque le mycélium entre en phase stationnaire. Morosoli *et al.*

(1999) ont également démontré que la température n'a aucun effet significatif sur la régulation des gènes *sec*. De plus, cet article suggère que les gènes *sec* de *S. lividans* pourraient être sujet à une certaine régulation.

2.3 Régulation et organisation génique des gènes *sec*

Les premières étapes de régulation de l'expression génique ont lieu lors de la transcription de l'ADN en ARN. Cette transcription est réalisée par l'ARN polymérase, un holoenzyme constitué de cinq sous-unités ayant un poids moléculaire de 400 000 Daltons. Ces sous-unités consistent en deux sous-unités identiques α, deux très longues sous-unités β et β' et un facteur sigma (Travers 1987). Pour amorcer la transcription, l'ARN polymérase doit reconnaître et fixer un promoteur, site de régulation permettant la reconnaissance et la liaison de l'ARN polymérase situé en amont de la région codante. La reconnaissance du promoteur par l'ARN polymérase requiert la présence de la sous-unité sigma. Ce polypeptide confère à la structure d'ARN polymérase l'habileté à fixer spécifiquement le promoteur et ainsi d'initier la transcription.

Chez *E. coli*, la principale sous-unité sigma (σ^{70}) a un poids moléculaire de 70 263 Daltons et reconnaît la majorité des promoteurs (Travers 1987). Chez *S. coelicolor*, il existe plusieurs ARN polymérases, ce qui pourrait être une stratégie potentielle pour différentes régulations de plusieurs groupes de gènes chez les Streptomycètes. De plus, le nombre de facteur sigma chez les Streptomycètes est supérieur à 20 (Hopwood 1999), ce qui suggère que les facteurs sigma jouent un rôle actif dans la régulation de l'expression génique chez ces microorganismes complexes (Hopwood 1999, Strohl 1992; Buttner 1989).

Chez *E. coli*, l'analyse détaillée des promoteurs reconnus par l'ARN polymérase a démontré la présence de deux régions nucléotidiques conservées, TTGACa et TATAAT, appelées les boîtes –35 et –10 d'après leur localisation par rapport au site d'initiation de la transcription, identifiées comme étant les séquences principales reconnues par la sous-unité sigma de l'ARN polymérase (Travers 1987). Chez les Streptomycètes les

promoteurs s'avèrent être très hétérogènes. Par exemple, le gène de l'agarase (*dagA*), permettant l'utilisation de l'agar comme source de carbone, est transcrit à partir de quatre promoteurs (Buttner *et al.* 1987) reconnus par trois ou quatre ARN polymérases différentes (Buttner *et al.* 1988; Brown *et al.* 1992). L'analyse de séquence des différents promoteurs ne permet pas d'établir de séquence concensus (Strohl 1992).

Au niveau du système général de sécrétion, l'organisation linéaire du gène *secY* voisin de l'opéron *spc* et du gène *adk* a été rapportée chez plusieurs organismes tels que *E. coli*, *Bacillus subtilis* et *Streptomyces scabies* (Cerratti *et al.* 1983; Kang *et al.* 1992 et Hale *et al.* 1995). Chez *E. coli*, le gène *secY* fait parti de l'opéron *spc* de protéines ribosomiques. Cet opéron de 5,9 kb code pour 10 protéines ribosomiques et contient deux cadres de lecture ouvert dont un correspond au gène *secY*. Le gène *secY* est situé dans l'opérateur distal de l'opéron *spc* (Cerratti *et al.* 1983 et Ito 1990). Chez *S. lividans* et *S. scabies*, le gène *secY* est exprimé à partir de son propre promoteur avec le gène *adk* (Hale *et al.* 1995; Ostiguy *et al.* 1996 et Pöhling *et al.* 1999). Basé sur la séquence en nucléotides et sur la comparaison de l'organisation génique retrouvée chez les autres organismes, l'ordre des séquences codantes chez *S. lividans* et *S. scabies* est *L15* (gène d'une protéine ribosomique)-*SecY-adk* (gène de l'adénylate kinase). Malgré une organisation similaire, la régulation de la transcription du gène *secY* diffère des autres systèmes étudiés. Une région inter-génique de 243 pb sépare les séquences codantes *L15* et *secY*. Cette région contient une séquence typique de promoteur végétatif de streptomyces situé à 40 pb du codon d'initiation GTC, ce qui suggère une transcription de *secY* indépendante du gène codant pour *L15* (Hale *et al.* 1995). Cette région située immédiatement en amont de la région codante est donc importante pour la transcription (Ostiguy *et al.* 1996).

Le gène *secE*, essentiel pour la viabilité des cellules est situé, chez *E. coli*, dans l'opéron *SecE-nusG* entre les opérons *tufB* et *rplKAJL*. La distance entre l'extrémité du gène *tufB* et le début du cadre de lecture ouvert de *secE* est de 229 nucléotides. Le site d'initiation, codant pour une méthionine est précédé par une séquence de fixation aux ribosomes situé de –10 à –13 nucléotides. Le gène *secE* est séparé par seulement un

nucléotide du cadre de lecture ouvert du gène *nusG*. Les deux gènes sont ainsi cotranscrits et l'initiation de la transcription à lieu au promoteur P_{EG} et la terminaison au terminateur Rho-indépendant situé à proximité du promoteur *rplK* (P_{L11}) (Downing *et al.* 1990).

Chez *S. coelicolor*, Puttikhunt *et al.* (1995), ont déterminé que l'organisation des gènes *secE-nusG-rplKA* correspond exactement à l'arrangement retrouvé chez *E. coli*. Ils ont également déterminé à l'aide de sonde reconnaissant le promoteur que chacun de ces gènes possèdent son propre promoteur. Le gène *secA* de *S. lividans* semble également comporter son propre promoteur (Gilbert *et al.* 1996).

Le gène *secA* de *E. coli* code pour un composé essentiel et important dans le système général de sécrétion. Plusieurs éléments influencent et régulent l'expression de *secA*. *SecA* est le deuxième gène de l'opéron *gèneX-secA* en aval d'un gène non-essentiel appelé gène *X* qui code pour un polypeptide sécrété de 147 a.a. de fonction inconnue (Rajapandi *et al.* 1991).

Schmidt et Oliver (1989), ont étudié la régulation de l'opéron *gèneX-secA* lorsque le système général de sécrétion est inhibé de façon génétique ou biochimique. Ils ont démontré que le niveau de traduction de *secA* est augmenté de 10 à 20 fois lors de l'inhibition. L'expression du gène *secA* est ainsi coordonnée avec la capacité de sécrétion de la cellule chez *E. coli* (Schmidt et Oliver 1989 et Oliver *et al.* 1990). Un contrôle de l'expression de *secA* prioritaire à la réponse de la sécrétion se situe au niveau de la traduction. La régulation de *secA* implique la répression de la traduction lorsque le système de sécrétion dépasse ses capacités et une dérépression lorsque ce système est inhibé (Oliver et Beckwith 1982a). La séquence de régulation dans le transcrit polycistronique est localisée dans une région comprenant l'extrémité du gène *X*, situé en amont et le début du gène *secA* (Schmidt *et al.* 1991). La protéine SecA agit comme un répresseur autogène liant la région initiatrice de la traduction sur l'ARNm du gène X-*secA* afin de bloquer ou déloger les ribosomes initiant la traduction de *secA* aux sites de fixation aux ribosomes et par ce moyen inhibe la traduction de *secA* lorsque le système de

sécrétion dépasse ses capacités (Schmidt et Oliver 1989; Dolan et Oliver 1991; Salavati et Oliver 1997; Oliver *et al.* 1998). Le site de fixation de SecA est très large, il enrobe le site de fixation au ribosome de *secA* et l'extrémité 5' du gène *secA* (Salvati et Oliver 1997).

Kiser et Schmidt (1999) ont analysé la structure de l'ARN comprenant la région inter-génique du gène *X-secA* devant empêcher l'entrée du ribosome dans la séquence Shine-Dalgarno (SD) de *secA* et coordonner la co-traduction de la paire gène *X-secA*. Ainsi, l'analyse de cartographie de structure d'ARNase de l'ARN de *X-secA* suggère que l'expression de *secA* soit coordonnée par la conformation de deux structures d'ARN distincts.

Une première structure, dans laquelle la séquence SD de *secA* et la séquence terminale de *X* sont appariées, semble impliqué dans la co-traduction du gène *X* et *secA*. L'appariement de la séquence SD inhibe l'initiation de la traduction en limitant l'accès des ribosomes. Cette structure peut aussi servir à relier l'initiation de la traduction de *secA* avec la terminaison de la traduction du gène *X* à la suite du désappariement du domaine de régulation de l'ARN par le ribosome traduisant la terminaison du gène *X* (Kiser et Schmidt 1999).

La seconde conformation, dans laquelle la séquence SD de *secA* n'est plus appariée avec la terminaison du gène *X*, contient une queue riche en G+C en amont de la séquence SD de *secA*. La formation de cette structure semble impliquée dans la co-traduction en liant directement les séquences du gène *X* et *secA*, où la traduction du gène *X* active l'initiation de la traduction de *secA* suite au désappariement et du découvrement de la séquence SD de *secA*. De plus, les tests de liaison entre l'ARN et SecA indiquent que cette dernière structure est probablement impliquée dans la liaison de SecA et dans la répression de la traduction du gène *secA* (Kiser et Schmidt 1999).

Finalement, le gène *secD* fait partie de l'opéron *secD* chez *E. coli*. Cet opéron comporte deux gènes *sec*, *secD* et *secF* et le gène *yajC*. Le gène *yajC* est situé en amont du gène *secD* et le gène *SecF* est situé en aval (Pogliano et Beckwith 1994b).

2.4 Génétique des Streptomycètes

Le code génétique est caractérisé par un génome riche en guanines (G) et cytosines (C), soit environ 72% (Volff et Altenbuchner 1998). Des analyses moléculaires de l'ADN chromosomique de plusieurs Streptomycètes, par électrophorèse en champs pulsé (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE), ont permis d'établir la présence d'un chromosome unique (Kieser *et al.* 1992, Leblond *et al.* 1993) et linéaire, d'environ 7,8 à 8 Mb (Lin *et al.* 1993), contenant environ 7 000 gènes (Hopwood 1999). Selon Economou (1998), environ 30% des génomes bactériens coderaient pour des gènes impliqués dans la sécrétion soit pour des protéines d'exportation ou membranaires. Les structures de terminaison sur le chromosome de *S. lividans* sont de longues séquences répétées inversées, d'une longueur de 30 kb (Lin *et al.* 1993). Cette linéarité du chromosome crée une instabilité génétique chez les streptomycètes. Ainsi, des délétions et des amplifications du chromosome y sont fréquentes (Volff et Altenbuchner 1998).

Une banque ordonnée de 319 cosmides, se chevauchant et représentant le chromosome entier de *S. coelicolor* A3(2), a été construite par Redenbach *et al.* (1996). Plus de 170 gènes ou groupes de gènes ont ainsi pu être localisés sur un fragment spécifique du chromosome, par hybridation à l'encyclopédie de cosmides (figure 7). Le séquençage du génome entier de *S. coelicolor* A3 (2) devrait être terminé en 2001 (www.sanger.ca.uk). Il est à noter que l'espèce *S. lividans* 66 (souche 1326) présente une très grande homologie avec *S. coelicolor*.

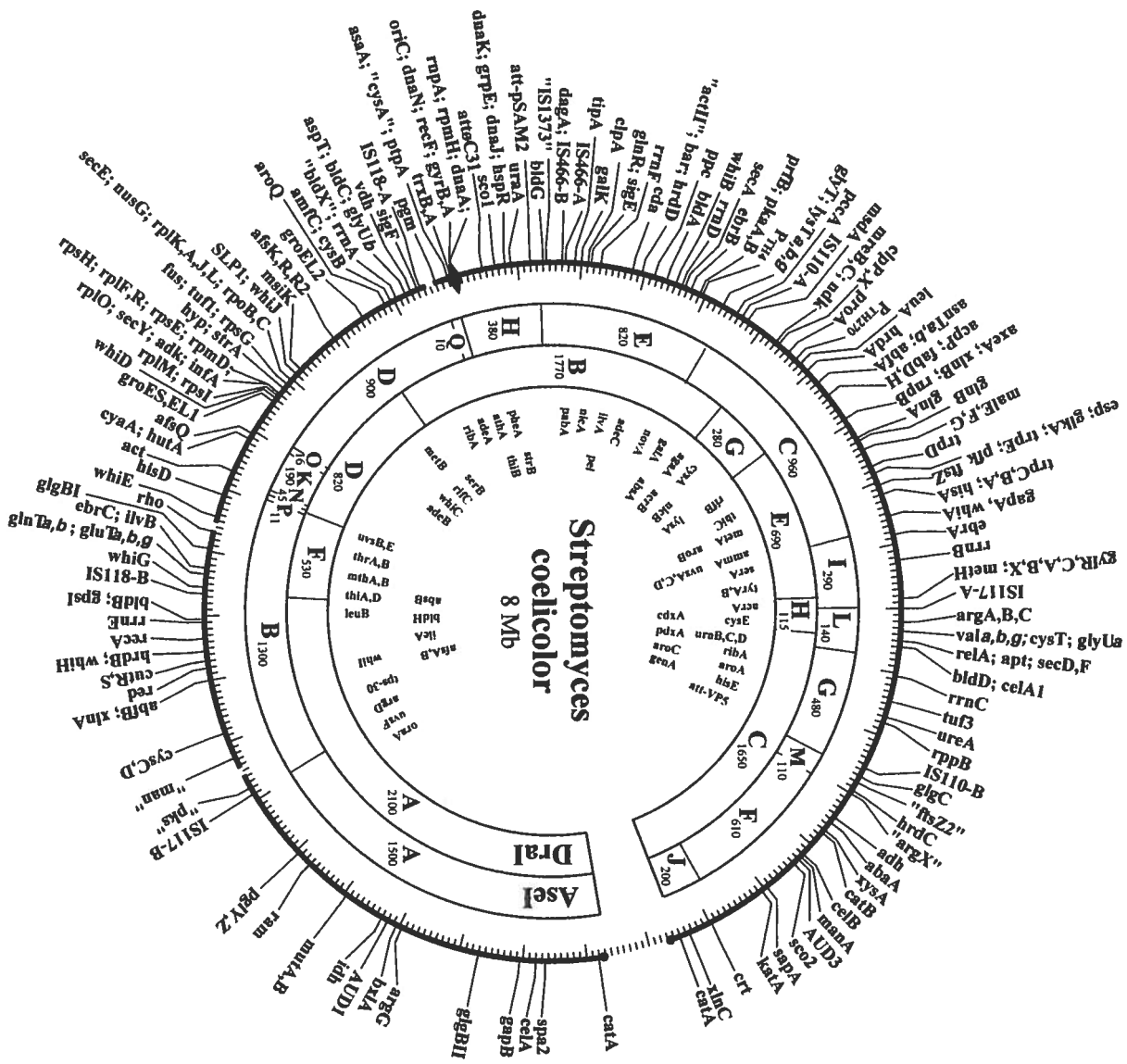


Figure 7. Carte génétique et physique du chromosome de *S. coelicolor* M145.

La position des marqueurs à l'extérieur du cercle a été déterminé grâce à une banque cosmidique ordonnée. Les marqueurs à l'intérieur du cercle on été cartographiés génétiquement seulement et leur position approximative par rapport aux marqueurs cartographiés physiquement a été déterminée par interpolation. La grosseur des fragments obtenus suites à une digestion par *Dra*I ou *Ase*I sont en kb. •, «télomère» du chromosome; ♦, origine de réplication bidirectionnelle du chromosome. Tiré de Redenbach *et al.* 1996, p.90.

2.5 Mutagenèse par transposition

2.5.1 Généralité

Un transposon est un élément génétique pouvant se déplacer ou transposer d'une région du génome à une autre. Les transposons se retrouvent dans tous les organismes, des bactéries aux eucaryotes supérieurs. Le mouvement du transposon est appelé la transposition, et les enzymes qui la catalysent: transposases (Tpase). L'ADN de l'élément lui-même code pour un ou des gènes requis pour la transposition. Les éléments transposables, en général ne présentent, aucune spécificité de site d'insertion. Toutefois, certains éléments se transposent préférentiellement dans des régions riches en paires de bases A-T ou dans des régions palindromiques. L'insertion d'un segment mobile en un nouveau site génomique provoque une mutation si elle interrompt une séquence codante ou régulatrice (Kleckner 1981; Mahillon et Chandler 1998; Saedler et Gierl 1996).

2.5.2 Répétitions terminales inverses (IR)

Une des caractéristiques distinctes des transposons bactériens est la présence d'une répétition terminale inverse (IR) spécifique pour chaque séquence d'insertion (IS). Chaque extrémité possède alors une séquence identique de 10 à 40 pb dont l'orientation est inverse. Il a été déterminé que les IR sont divisés en deux domaines fonctionnels. Un premier domaine positionné dans l'IR est impliqué dans la liaison avec la Tpase. L'autre domaine incluant les 2 ou 3 pb terminales joue un rôle dans le clivage et dans la réaction de transfert du brin d'ADN conduisant à la transposition de l'élément. (Calos et Miller 1980; Johnson et Reznikoff 1983; Derbyshire *et al.* 1987; Makris *et al.* 1988).

2.5.3 Répétitions directes (DR)

Une autre caractéristique générale des transposons est que lors de leur insertion ils génèrent une séquence, appelée répétition directe (DR), par la duplication d'une petite

fraction de l'ADN cible. Ces courtes répétitions sont la conséquence de la coupure décalée de la molécule d'ADN cible. L'ADN transposé serait ligué aux extrémités libres ainsi créées, et les segments à brin simple seraient comblés par synthèse réparatrices (Grindley 1978; Klechner 1981).

2.5.4 Séquence d'insertion (IS)

Il existe plusieurs types de transposons bactériens. Pour les plus petits, les séquences d'insertion, contiennent de 750 à 2000 pb. Les séquences d'insertion ou transposons constituent un élément important dans la grande majorité des génomes bactériens. Jusqu'à présent, plus de 500 IS ont été décrites dans la littérature et plusieurs autres seront sans doute découvertes par les projets de séquençage de génomes procaryotiques (Mahillon et Chandler 1998). Ce sont les structures mobiles les plus simples et elles possèdent toutes une structure commune. Les transposons possèdent seulement les gènes codant pour les transposases qui permettent leurs mouvements dans l'ADN et les gènes qui régulent ces mouvements. Ceci inclut les facteurs requis en cis, et particulièrement les séquences actives d'ADN recombinant qui définissent les extrémités du transposon. Ces facteurs et une enzyme, la transposase, reconnaissent et traitent les extrémités de la séquence d'insertion. Les Tpases sont généralement codées par un ou peut-être deux cadres de lecture ouverts (ORF) et occupent pratiquement toute la longueur de l'IS. La structure du domaine de la Tpase présente, du côté de la région N-terminale, l'activité de liaison spécifique à la séquence d'ADN de la protéine. Le domaine catalytique est situé à l'extrémité du côté C-terminal (Mahillon et Chandler 1998).

2.5.5 Transposon composé

Les transposons composés sont constitués de deux séquences d'insertion du même type insérées dans une molécule d'ADN, pour former un transposon plus large. Les transposons composés peuvent comporter d'autres gènes entre les IS, comme par exemple un gène de résistance à un antibiotique. L'orientation des IS peut varier d'un transposon

composé à l'autre, elles peuvent être dans le même sens ou en sens opposé. Chaque séquence d'insertion peut transposer de façon indépendante dans la mesure où la transposase agit sur chacune des extrémités. Le gène actif de la Tpase se retrouve seulement dans une des deux IS. Les deux IS formant le transposon composé ne sont donc pas complètement autonomes, à cause d'une mutation dans le gène de la Tpase d'un des éléments. Ainsi, seule une des IS code pour une transposase active. Cependant, cette Tpase peut agir sur les extrémités pour provoquer la transposition du transposon composé. Étant donné que les extrémités des IS du transposon composé sont les mêmes, la Tpase codée par une des IS reconnaît les extrémités de chacune (Kleckner 1981).

2.5.6 Contrôle de la transposition

L'activité de transposition est généralement maintenue à un faible niveau. La fréquence des transpositions est d'environ de 10^{-5} à 10^{-7} par génération. Une des raisons de ce faible taux est qu'une forte activité de transposition, accompagnée d'effets mutagènes lors du réarrangement génomique, serait nuisible à la cellule hôte (Doolittle *et al.* 1984). Les promoteurs des Tpases sont généralement faibles et sont situés à l'extrémité des IR pour permettre leur autorégulation par la fixation de Tpase. L'expression de la Tpase est également contrôlée par différents mécanismes comme la production de répresseurs de transcription ou d'inhibiteurs de traduction (Mahillon et Chandler 1998).

L'activité de transposition est également régulée par différents facteurs de l'hôte. Les effets sont généralement spécifiques à chaque élément. Parmi ces facteurs, les chaperons d'ADN jouent un rôle en assurant l'architecture tridimensionnelle dans l'évolution de différents complexes nucléoprotéiques nécessaires pour une transposition efficace. Ils peuvent également être impliqués dans la régulation de l'expression de la Tpase. D'autres facteurs, incluant les facteurs d'intégration de l'hôte, l'inhibiteur de réplication DnaA, le système SOS, qui assure l'intégrité du chromosome, et les protéines qui contrôlent la structure en super-hélice de l'ADN dans la cellule, peuvent aussi influencer la transposition (Mahillon et Chandler 1998).

2.5.7 Mécanismes de la transposition

De très nombreux transposons sont maintenant connus chez de multiples organismes. Leurs structures et leurs mécanismes de fonctionnement sont variés et complexes. Le processus de la transposition implique plusieurs étapes; comprenant généralement la liaison des recombinases aux extrémités du transposon; l'élaboration d'un complexe synaptique impliquant les recombinases, certaines protéines accessoires et les deux extrémités du transposon, cette étape implique le recrutement en concomitance ou subséquente d'ADN cible. Ensuite il y a la coupure et le transfert du transposon dans l'ADN cible; et le traitement du complexe de transfert de l'élément en produit final. (Mizuuchi 1992a et b).

De façon générale il semble y avoir deux sortes de transposition schématisées dans la figure 8: la transposition réplicative et la transposition conservative.

Le premier modèle consiste en une cointégration où le génome donneur de l'élément transposable fusionne avec la molécule d'ADN cible. Le cointégrat, formé de la fusion entre l'ADN donneur et l'ADN cible, code dans une étape intermédiaire de la transposition, pour deux copies du transposon qui se retrouvent à chacune des jonctions entre ces deux molécules. Le cointégrat est alors résolu de manière à reformer les deux ADN originaux, chacun possédant une copie de l'élément transposable. Cette résolution peut être effectuée par les fonctions de recombinaison de l'hôte ou par le transposon qui code pour une résolvase qui catalyse la recombinaison. Le transposon subit donc une duplication complète de l'élément plutôt qu'un déplacement, d'où l'appellation de transposition réplicative (Derbyshire et Grindley 1986).

Le deuxième modèle consiste en une insertion simple où l'élément transposable est transféré en un nouveau site sans réarrangement de l'ADN au site d'insertion. La transposase effectue une coupure sur les deux brins des extrémités du transposon, pour le libérer de l'ADN donneur et le diriger dans l'ADN cible. Une courte séquence est alors

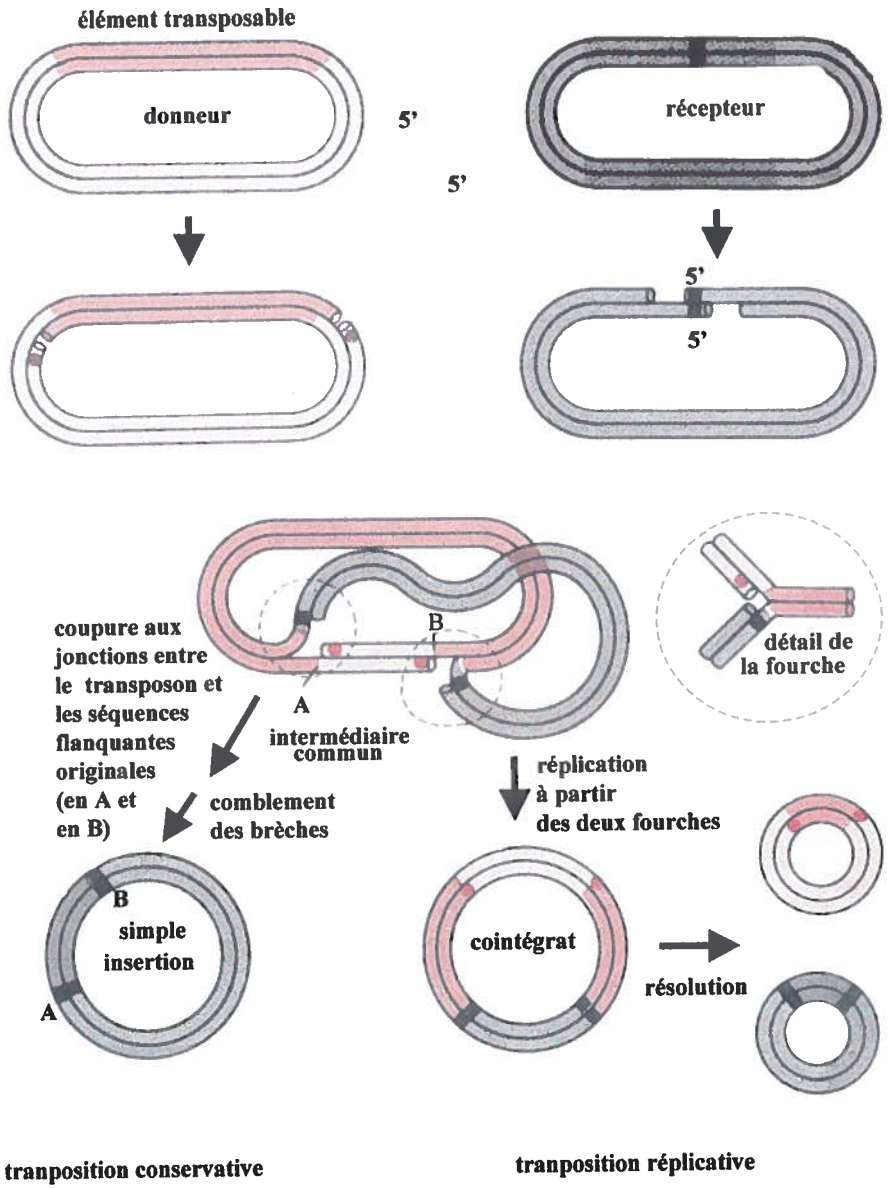


Figure 8. Schéma de la transposition réplicative et de la transposition conservative.

dupliquée par la réparation des brèches de l'ADN cible. Ce mode de transposition est dit conservatif parce qu'il se produit sans la réplication de l'élément transposable (Derbyshire et Grindley 1986).

2.5.8 Applications de la transposition

Les propriétés des éléments transposables sont largement exploitées en génétique. La faible spécificité de site d'insertion de certains éléments transposables est particulièrement utile pour la mutagenèse généralisée. Habituellement, l'insertion d'un transposon inactive un gène complètement et de façon inconditionnelle, et souvent exerce des effets polaires sur les gènes en aval dans un opéron. Les éléments transposables, intégrés dans un plasmide, sont introduits dans la souche à muter par transformation. Une méthode privilégiée consiste à utiliser des vecteurs-suicide qui ne peuvent pas se répliquer dans la bactérie hôte et portent un marqueur de sélection, par exemple un gène qui confère la résistance à un antibiotique. Les bactéries devenues résistantes à l'antibiotique ont intégré l'élément dans un réplicon stable tel le chromosome. La mutation est identifiée par la perte de la fonction correspondant au gène cible. Le suicide du vecteur peut être induit par des conditions expérimentales appropriées (Mahillon et Chandler 1998; Kleckner 1981).

2.5.9 Transposition chez les Streptomycètes

Plusieurs éléments transposables ont été découverts chez les streptomycètes et peu contiennent un marqueur de sélection de façon naturelle. Pour ce travail deux transposons ont été utilisés, le transposon Tn5493 et le transposon Tn5424.

2.5.9.1 Transposon Tn5493

Le transposon Tn5493 est un mini-transposon composé dérivé du Tn5 et spécialement construit par Volff et Altenbuchner (1997) pour transposer efficacement chez *Streptomyces* sp. Le Tn5493 possède les séquences répétées inverses internes et

externes de la IS50 du Tn5, entre lesquelles se retrouve le gène de résistance au thiostrepton (tsr) pour une longueur totale de 1,1 kb. La transposition est réalisée à partir du plasmide thermosensible pJOE2577, dérivé du plasmide pSG5, et elle est induite par un mutant de la transposase *tpnA* du Tn5 offrant une haute fréquence de transposition. Le gène *tpnA* est exprimé sous le contrôle du promoteur *mer* (opéron de résistance au mercure) de *S. lividans* et d'un site de fixation aux ribosomes des streptomycètes. Le Tn5493 est très efficace et transpose à une forte fréquence, puisque lors des expériences de 1 à 6% des colonies de *S. lividans* contiennent le Tn5493 transposé dans le chromosome (Volff et Altenbuchner 1997). L'utilisation du gène de résistance au thiostrepton permet une sélection facile pour les événements de transposition stables. De plus, les insertions dans le génome de *S. lividans* semblent aléatoires. La figure 9 présente le plasmide pJOE2577 comportant le Tn5493.

2.5.9.2 Transposon Tn5424

Le transposon Tn5424 développé par Irnich et Cullum (1994) est un transposon composé contenant une copie complète de 1628 pb de la IS466 ainsi que 640 pb de l'extrémité de cette même IS avec entre les deux, le gène marqueur de la résistance au thiostrepton (*tsr*) pour une longueur totale de 3,8 kb. Ce transposon composé est porté sur le plasmide thermosensible pUKG403. Le plasmide pUKG403 est stable et ne semble pas effectuer de réarrangement spontané après sa transformation dans *S. lividans*. La fréquence de transposition du Tn5424 est de 1-2 X 10^{-4}. Irnich et Cullum (1994) ont démontré que le Tn5424 peut s'insérer dans plusieurs sites sur le chromosome. La figure 10 présente le plasmide pUKG403 comportant le Tn5424.

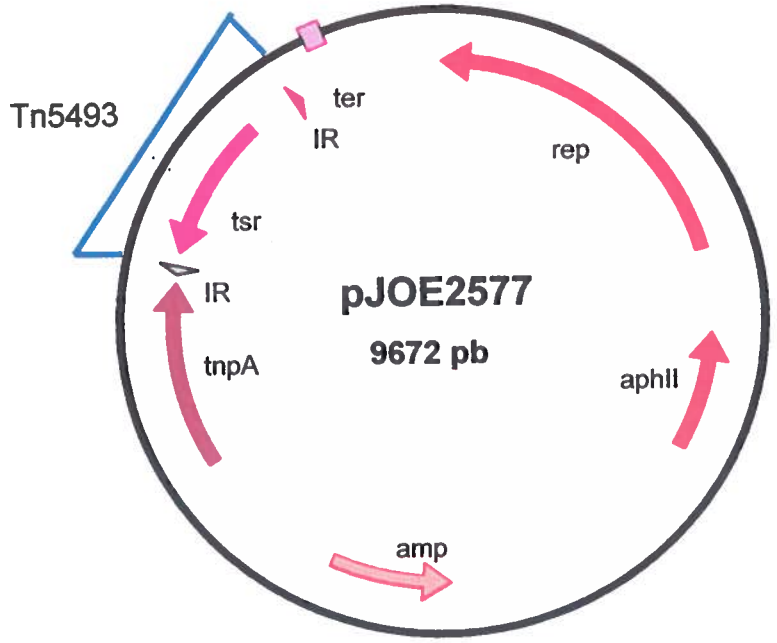


Figure 9. Plasmide pJOE2577 comprenant le transposon Tn 5493.

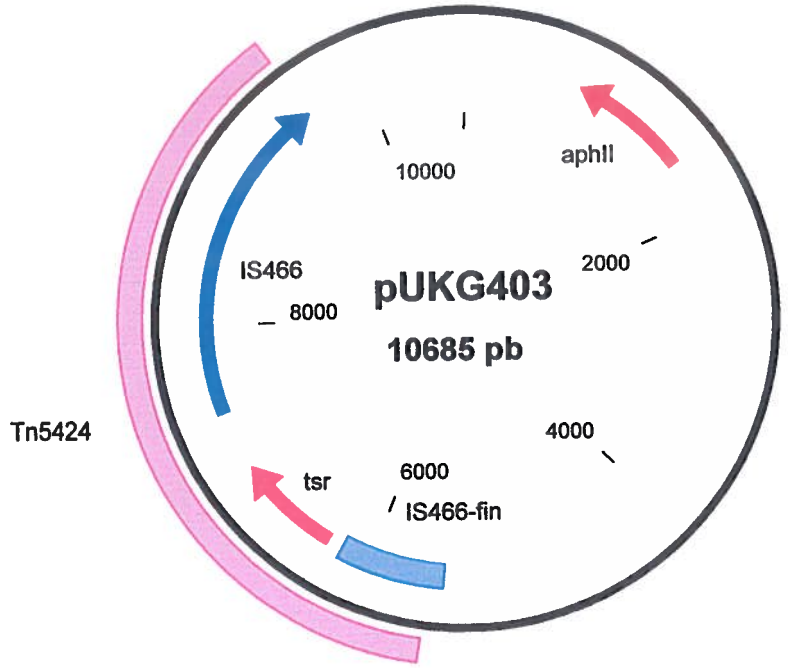


Figure 10. Plasmide pUKG403 comprenant le transposon Tn5424.

3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

3.1 Liste des produits utilisés

Acétaldéhyde	Produits Chimique Américains Ltée
Acétate de magnésium	Sigma Chemical Co.
Acétate de potassium	Produits Chimiques Américains Ltée
Acétate de sodium	J.T. Baker
Acide acétique	Fisher Scientific Co.
Acide citrique	J.T. Baker
Acide chloridrique	J.T. Baker
Acide dinitrosalicylique	BDH
Acide éthylène diaminetére acétique	J.T. Baker
Acide perchlorique	Produits Chimiques Américains Ltée
ADN ligase du phage T4	Bio-Rad Laboratories Ltd
ADN de sperme de saumon	Sigma Chemical Co.
ADN polymérase pfu turbo	Stratagene
Agar	Difco
Agarose	Boehringer Mannheim
Albumine sérique de bœuf	Sigma Chemical Co.
Alcool isoamylique	J.T. Baker
Ampicilline	Sigma Chemical Co.
ATP	Amersham Pharmacia Biotech
Bisulfite de Sodium	J.T. Baker
Bleu de bromophénol	Anachemia
Bromure d'éthidium	Sigma Chemical Co.
Casamino acids	Difco
Chloroforme	Produits Chimiques Américains Ltée
Chlorure de calcium	Fisher Scientific Co.
Chlorure de césium	BioShop
Chlorure de cobalt	Analar
Chlorure de cuivre	Fisher Scientific Co.
Chlorure de magnésium	J.T. Baker
Chlorure de manganèse	BDH
Chlorure de potassium	Merck
Chlorure de sodium	Produits Chimiques Américains Ltée
Chlorure de zinc	Fisher Scientific Co.
Citrate de sodium	Fisher Scientific Co.
dCTP [α^{32}P]	ICN
2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate	Boehringer Mannheim
2'-désoxycytidine 5'-triphosphate	Boehringer Mannheim
2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate	Boehringer Mannheim
2'-désoxythymidine 5'-triphosphate	Boehringer Mannheim
Diphénylamine	Eastman
Enzymes de restriction	Amersham Pharmacia Biotech
Éthanol	SAQ
Extrait de bœuf	Difco

Extrait de levure	Difco
Farine de soya	Five Roses
Ficoll type 400	Sigma Chemical Ltd
Fragment Klenow polymérase I d'*E coli*	Dupont
Glucose	Produits Chimiques Américains Ltée
Glycérol	J.T. Baker
Hydrogeno-orthophosphate de di-potassium	BDH
Hydroxyde de sodium	Fisher Scientific Co.
Hygromycine	Boehringer Mannheim
Isopropanol	Produits Chimiques Américains Ltée
Kanamycine	Sigma Chemical Co.
Lyzosyme	Sigma Chemical Co.
Maltose	Produits Chimiques Américains Ltée
Mannitol	Produits Chimiques Américains Ltée
Marqueur de poids moléculaire de 1Kb	Gibco BRL
Méthionine	Sigma Chemical Co.
Molybdate d'ammonium	Fisher Scientific Co.
N-Z amine A	Sheffield Products
Peptone-tryptone	Difco
Polyéthylène glycol 6000	J.T. Baker
Phénol	BDH
Phosphatase alcaline	Amersham Pharmacia Biotech
Phosphate de potassium	J.T Baker
Phosphate de sodium	J.T Baker
Polyvinylpyrrolidone	Sigma Chemical Co.
L-proline	Sigma Chemical Co.
Proprio-amide	Aldrich
Protéinase K	BRL Life Technologies
Rémazol Bleu Brillant	Aldrich
RNAse A	Sigma Chemical Co.
Sodium dodécyl sulfate	IBI
Sucrose	Fisher Scientific Co.
Sulfate d'ammonium	BDH
Sulfate de cuivre	Sigma Chemical Co.
Sulfate de fer	Merck
Sulfate de magnésium	J.T. Baker
Sulfate de manganèse	J.T. Baker
Sulfate de potassium	Produits Chimiques Américains Ltée
Sulfate de zinc	Sigma Chemical Co.
Tampon One-Phor-All *Plus* 10X	Amersham Pharmacia Biotech
Tampon 10X pour pfu turbo	Stratagene
Tartrate de sodium potassium	J.T. Baker
Thiostrepton	Bistrol-Myers Squibb
Tris	Bio-Rad Laboratories Ltd
Triton X100	Bio-Rad Laboratories Ltd
TSB	Difco

Tween 80	Produits Chimiques Américains Ltée
Tyrosine	Gibco BRL
Xylane de bouleau	Sigma Chemical Co.
Xylane d'épeautre d'avoine	Sigma Chemical Co.
Xylène cyanol	BDH
Xylose	Sigma Chemical Co.

3.2 Souches bactériennes

3.2.1 *Escherichia coli*

Les sous-clonages de différents fragments d'ADN chromosomique de *S. lividans* ont été effectués dans la souche *E. coli* DH11S F^- (mrcA Δ (mrrhsdRMS mcrBC) Δ (lac-proAB) Δ (recA1398) deoR rspL srl thi/F^- pro AB^+ lac I^q ZΔM15) distribuée par Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada).

3.2.2 *Streptomyces lividans*

La souche IAF10-164 a été utilisée pour la production d'une nouvelle souche, IAF811-20, qui permet la sécrétion de xylanase A_2 comme protéine modèle. La souche IAF10-164 est négative pour les activités xylanolitiques et cellulolytiques. Cette souche a été obtenue par la mutation du gène *msiK* à l'aide de la nitrosoguanidine (Hurtubise *et al.* 1995). La souche IAF811-20 a été construite à l'aide du plasmide d'intégration pVRC1310 (figure 11), un dérivé du plasmide pSAM2 (Raynal *et al.* 1998), comportant le gène de résistance à l'hygromycine. Une copie du gène de la xylanase A sous le contrôle du promoteur *secA* a été intégrée dans le chromosome de la souche IAF10-164. La structure tronquée du gène de la xylanase A de *S. lividans* 1326 est un fragment *Hind*III-*Sac*I de 1,3 kb, présent sur le plasmide pIAF811-A (Pagé *et al.* 1996). Cette séquence comporte ni promoteur de Streptomyces, ni domaine de fixation au xylane, mais possède le peptide signal long de la cellulase A et code pour la xylanase A_2 (32 kDa) totalement active. La construction schématisée est présentée à la figure 11.

Le promoteur *secA*, un fragment de 430 pb, a été amplifié par PCR avec un oligonucléotide de 38 mer (5'-GGGATCTGGGATCC**GAGCTC**CATCTGCTCCGTGA AACC-3') contenant le site de restriction ***Sac*I** et un oligonucléotide de 35 mer (5'-GGGAATCC**TCTAGA**TGCCGGTCGGGCCTGGGACGG-3'), contenant le site de restriction ***Xba*I**. Le fragment amplifié, de 430 pb, a été digéré *Sac*I-*Xba*I et inséré dans le plasmide pTZ18U (Pharmacia) digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide a ensuite

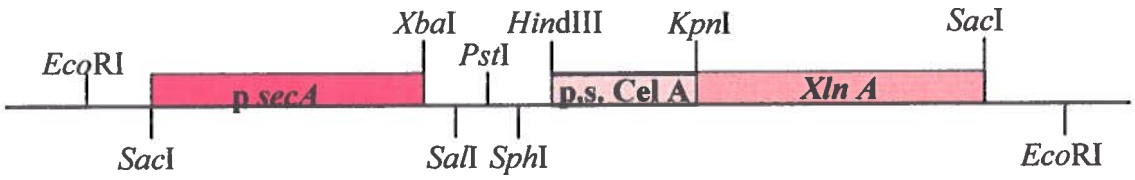


Figure 11: Schéma de la construction p*secA-Xylanase A*.

psecA: promoteur secA; p.s CelA: peptide signal long de la cellulase A; *Xln A*: gène de la xylanase A_2 tronquée.

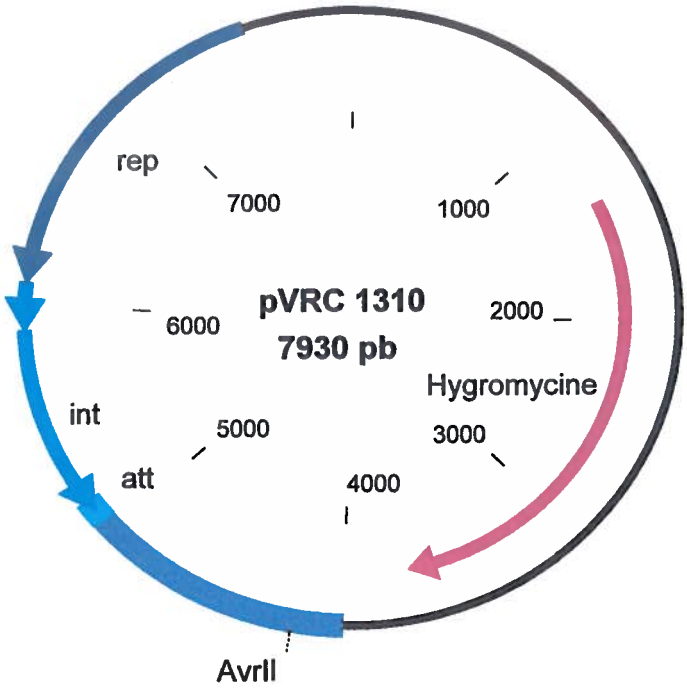


Figure 12: Plasmide intégratif pVRC1310.

été digéré *Hind*III-*Sca*I, générant un fragment de 2,25 kb qui fut purifié et ligué à un autre fragment *Hind*III-*Sca*I de 1,3 kb provenant de pIAF811-A et correspondant au gène de la xylanase A. L'enzyme de restriction *Sca*I coupe au milieu du gène de résistance à l'ampicilline. Suite à la ligation de ces différents fragments, leur introduction dans le plasmide pTZ18u a généré une construction contenant le promoteur *secA* devant le gène de la xylanase A. Cette construction a été amplifiée par PCR avec un oligonucléotide de 32 mer (5'GGGACTAA **CCTAGG**CATCTGCTCCGTGAAACC-3'), correspondant au début de la séquence du promoteur *secA*, et un oligonucléotide de 29 mer (5'-GGCACGA **TCCTAGG**AAAACGACGGCCAGT-3') correspondant à l'amorce #1 de M13 située à l'extrémité 3' du gène de la xylanase A. Les deux oligonucléotides possèdent le site de restriction ***Avr*II**. Le fragment amplifé de 1,7 kb, a été digéré avec l'enzyme de restriction *Avr*II et inséré dans le plasmide d'intégration pVRC1310 au même site. Le plasmide pVRC1310 de 7,93 kb est présenté à la figure 12. Suite à la transformation de protoplastes de *S. lividans* IAF10-164 avec ce vecteur, les intégrants ont été sélectionnés sur des plaques contenant 50 μg d'hygromycine. Les clones stables ayant intégré dans leur génome la construction constituée du promoteur *secA* en amont du gène de la xylanase A expriment la xylanase A_2. Cette nouvelle souche, nommée IAF811-20 a été utilisée pour les expériences de mutagenèse par transposon.

3.3 Milieu de culture

3.3.1 *Escherichia coli*

Toutes les cultures de *E. coli* sont réalisées avec le milieu 2xTY. Ce milieu est composé de 16 g de peptone-tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau. Ce milieu peut être solidifié par l'ajout de 15 g/L d'agar. Le milieu est stérilisé dans l'autoclave, à 121°C pendant 20 minutes. Pour des fins de sélection on ajoute de l'ampicilline à 100 μg/mL au milieu de culture 2xTY. La croissance bactérienne se fait à 37°C avec agitation (240 rpm) pendant 16 heures.

Le milieu TB, composé de 12 g de peptone-tryptone, 24 g d'extrait de levure et 4 mL de glycérol par litre d'eau distillée a été utilisé pour l'isolement d'ADN plasmidique. L'antibiotique de sélection (ampicilline à 100 μg/mL) est aussi ajouté.

3.3.2 *Streptomyces lividans*

Le milieu Bennett a été utilisé pour la maintenance, la croissance et la sporulation des cellules. Ce milieu est composé de 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de bœuf, 2 g de N-Z amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre d'eau. Le pH est ajusté à 7,3 avec du NaOH concentré. Suite à la stérilisation, du thiostrepton à 50 μg/mL est ajouté.

Les transformants de *S. lividans* sont étalés sur un milieu solide R5, qui permet la régénération des protoplastes. Le milieu R5 est composé de 103 g de sucrose, 0,25 g de K_2SO_4, 10,12 g de $MgC_{l2}.6H_2O$, 10 g de glucose, 100 mg de casamino acids, 5 g d'extrait de levure, 5,73 g de tampon TES, 22 g d'agar et 2 mL d'une solution d'éléments en traces. Cette solution contient 40 mg de $ZnCl_2$, 200 mg de $FeCl_3$, 10 mg de $CuCl_2$, 10 mg de $MnCl_2$, 10 mg de $Na_2B_4O_7$ et 10 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ par litre d'eau. Le milieu R5 est amené à 955 ml avec de l'eau distillé et autoclavé.

Le milieu R5 est ensuite complété à 1 litre par l'ajout de 10 mL de KH_2PO_4 0,5 %, 4 mL de $CaCl_2.2H_2O$ 5 M, 1 mL de $CuSO_4$ 5 mg/mL, 15 mL de L-proline 20 %, 10 mL de méthionine 1 % et 5 mL de tyrosine 8 % dissoute dans du NaOH 1 N. Le milieu est réparti dans des plats de Pétri puis séché à température de la pièce jusqu'à perte de 15 % de son poids initial.

Le milieu solide SOY a été utilisé pour la mutagenèse par transposon car il semble faciliter la sporulation. Ce milieu est composé de 20 g de farine de soya, 20 g de mannitol et 16 g d'agar par litre d'eau du robinet. Le milieu est autoclavé deux fois pendant 20 minutes chaque fois. Le milieu doit être bien agité car la farine de soya ne se dissout pas dans le milieu (Hobbs *et al.* 1989).

Le milieu liquide TSB (Tryptic Soy Broth) a été utilisé pour la culture des transformants. Il est composé de 17 g de peptone-tryptone, 3 g de bacto soytone, 5 g de NaCl et 2,5 g de phosphate de dipotassium par litre d'eau. Du thiostrepton à 5 μg/mL est ajouté après stérilisation.

La détection de l'activité xylanolytique des transformants de *S. lividans* est effectuée à l'aide d'un milieu minimal solide comprenant du xylane de bouleau couplé au colorant Rémazol Bleu Brillant (RBB-xylane). L'activité xylanolytique est détectée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies productrices de xylanase. Le milieu RBB-xylane contient deux solutions. La première solution contient dans 750 mL d'eau distillée, 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 g de KH_2PO_4, 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de KCl, 17 g d'agar et 1 mL de solution de sels de Mandel.

La solution de sels de Mandel est constituée de 1,4 g de $ZnSO_4.7H_2O$, 1,6 g de $MnSO_4.H_2O$, 5 g de $FeSO_4.7H_2O$ et 2 g de $CoCl_2.6H_2O$ dans 1 litre d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant stérilisation. La deuxième solution contient 1,5 g de RBB-xylane dissout dans 250 mL d'eau. Une fois le RBB-xylane totalement dissout la solution est stérilisée. Lorsque les 2 solutions ont atteint la température de 55°C, elles sont mélangées. Finalement 10mL de $MgSO_4.7H_2O$ et le thiostrepton à 5 μg/mL sont ajoutés.

Le milieu minimal M14 a été utilisé pour évaluer la sécrétion de xylanase A_2 par les transposants. Ce milieu est composé de 1,4 g de $(NH_4)_2SO_4$, 5 g de K_2HPO_4, 1 g de KH_2PO_4, 2 mL de Tween 80 et 1 mL la solution de sels de Mandel. Le pH est ajusté à 7,4. Suite à la stérilisation le milieu est complémenté avec 1,2 mL de $MgSO_4.7H_2O$ à 5%, 2 mL de $CaCl_2.2H_2O$ à 3 % et 5 μg/mL de thiostrepton. Le milieu minimal M14 doit ensuite être supplémenté d'une source unique de carbone à 1 %. Pour nos expériences, trois sources de carbone différentes sont utilisées: le xylane d'épeautre d'avoine, le xylose et le glucose.

3.4 Préparation des spores de *S. lividans*

À partir d'une colonie, une plaque de milieu solide Bennett-thiostrepton (BT) est ensemencée en effectuant un striage serré. Après une semaine de croissance à 30°C il y a formation d'un tapis de spores. Cette plaque sert ensuite à ensemencer entre 8 et 10 plats de Pétri Bennett-thiostrepton qui sont incubés à 30°C jusqu'à ce qu'ils soient couverts de spores.

Les spores sont alors récoltées dans du glycérol 20 % stérile. Le glycérol (10 mL) est déposé dans un premier plat de Pétri. La surface de la gélose est grattée délicatement à l'aide d'une pipette afin de décoller les spores. Ensuite, le liquide est aspiré et déposé dans un second plat de Pétri, afin d'y récolter les spores. L'utilisation de 10 mL de glycérol permet de récolter les spores de 3 ou 4 plats de Pétri. La suspension de spores est ensuite introduite dans un tube de 35 mL contenant des billes de verre stériles. Le tube est agité vigoureusement au vortex afin de séparer les spores du mycélium et des résidus de gélose. Ensuite, la suspension de spores est filtrée sur laine de verre. La quantité de spores récoltées est déterminée par la mesure de la densité optique à 660 nm. Les spores sont ensuite conservées à -20°C dans 20 % glycérol.

3.5 Mutagenèse par transposition

3.5.1 Transposon Tn5424

Suite à la transformation sur milieu R5 de la souche IAF811-20 avec le plasmide pUKG403 comportant le transposon Tn5424, il y a production et récolte de spores. Ensuite, 10 000 spores sont étalées par plaque de milieu SOY sans antibiotique. Les plats de Pétri sont d'abord incubés à 28°C pour 24 heures. Ensuite, les plats de Pétri sont incubés à 37°C jusqu'à production et récolte de spores. Les transposants sont ensuite isolés par l'ensemencement de cette dernière suspension de spores sur milieu solide Bennett contenant du thiostrepton et une incubation à 37°C. La sélection des différents transposants est effectuée sur milieu RBB-xylane contenant ou non du glucose à 1%. Les

transposants sélectionnés doivent posséder un phénotype différent de celui de la souche non mutée, révélée par la taille d'une zone d'éclaircissement autour de la colonie. Les transposants sont également repiqués sur des milieux Bennett-Hygromycine et Bennett-Kanamycine. La présence de colonies sur le milieu Bennett-Hygromycine confirme que les transposants obtenus ne sont pas des contaminants, et qu'il s'agit bien de la souche IAF811-20. L'absence de colonies sur le milieu Bennett-Kanamycine permet de confirmer la perte du plasmide comportant le transposon.

3.5.2 Transposon 5493

Suite à la transformation sur milieu R5 de la souche IAF811-20 avec le plasmide pJOE2577 comportant le transposon Tn5493, il y production et récolte de spores. La technique de mutagenèse pour ce transposon est la même que celle utilisée pour le transposon Tn5424 et décrite à la section 3.5.1. Toutefois, la température d'incubation pour le Tn5493 est de 40°C comparativement à 37°C pour le transposon Tn5424. La méthode de sélection des transposants est la même que celle décrite pour le transposon Tn5424 à la section 3.5.1.

3.6 Manipulation de l'ADN

3.6.1 Extraction de l'ADN chromosomique de *S. lividans*

L'ADN chromosomique des transposants est extrait selon la méthode décrite par Kieser *et al.* (2000). Après une préculture de 48 heures, à 30°C sous agitation dans 25 mL de milieu TSB contenant 1% de glucose et l'antibiotique thiostrepton à 5 μg/mL, deux échantillons de 1,5 mL sont prélevés et centrifugés 5 minutes à 13K rpm afin de récupérer le mycelium. Le mycelium de chaque échantillon, resuspendu dans un minimum de volume de TSB, est inoculé dans 50 mL de milieu TSB et incubé à 30°C pendant 24 heures sous agitation de 240 rpm. Ensuite, le mycelium est récupéré par filtration sur du papier Whatman #1. Le mycelium est alors resuspendu dans 10 mL d'un tampon NaCl 0,5M et EDTA 0,1 M pH 8,0, et on ajoute de la protéinase K à 50 μg/mL. Afin de faire

éclater les cellules, la suspension est passée une fois à la presse de French sous 10 000 lbs de pression. La suspension est ensuite incubée 1 heure à 37°C suite à l'ajout de SDS à 1%. Ensuite, un volume de phénol acide est ajouté à la suspension préalablement ajustée à 10 mL avec le tampon NaCl 0,5 M et EDTA 0,1 M pH 8,0 et le tout est transféré dans un tube à centrifuger Nalgene de 35 mL. Le mélange est agité 10 minutes au Flask Shaker à la puissance maximale. La phase aqueuse est récupérée après une centrifugation de 10 minutes à 10 K (centrifugeuse Beckman, Rotor JA-20). L'étape d'extraction au phénol acide est effectuée une deuxième fois. La phase aqueuse est récupérée dans un tube de 50 mL, et on y ajoute 20 mL d'EtOH 95 %. Le tube est agité délicatement par inversion afin de faire précipiter l'ADN. L'ADN récupéré avec une pipette Pasteur (Spooling) est déposé dans un microtube et resuspendu dans 1mL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM à pH 8,0). Ensuite, trois extractions au phénol neutre/$CHCl_3$ sont réalisées afin de purifier l'ADN. Il s'agit d'ajouter un volume de phénol et un volume de chloroforme ($CHCl_3$:isoamylalcool) et de bien agiter au vortex après chaque ajout. Les microtubes sont ensuite centrifugés 4 minutes à 13 K rpm et la phase aqueuse est récupérée pour une nouvelle extraction. L'ADN présent dans la phase aqueuse est précipité par l'ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'EtOH 95 %. Après «spooling» l'ADN est récupéré dans un microtube et resuspendu dans 500 μL de TE. L'ADN est incubé à 37°C pendant 1 heure suite à l'ajout de 200 μg/mL de ARNase A bouillie. Après une extraction au phénol neutre/chloroforme, l'ADN est précipité par l'ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'EtOH 95 % et centrifugé 30 minutes à 13 K rpm. Le culot d'ADN est séché et resuspendu dans 600 μL d'eau. La concentration est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de $D.O._{260}$ équivaut à 50 μg/mL d'ADN.

3.6.2 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

La digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (Amersham Pharmacia Biotech) est effectuée dans le tampon «one-for-all buffer plus» (OPA) (10X, Tris-acétate 100 mM pH 7,5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM) à la concentration recommandée (0,5X à 2X). Une unité d'enzyme de restriction permet la

digestion de 1 μg d'ADN en une heure. Le volume requis pour la digestion varie entre 10 et 50 μL. La digestion est effectuée à la température d'activité optimale de l'enzyme pendant au moins une heure.

3.6.3 Électrophorèse de l'ADN en gel d'agarose

Selon la taille des fragments d'ADN à séparer, la concentration d'agarose sera de 0,7% à 2% (p/v) dans le tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM (pH 8,0), acide acétique 20 mM et l'EDTA 1 mM) auquel est ajouté le bromure d'éthidium à 0,5 μg/mL. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel d'agarose suite à l'ajout du tampon de chargement dans un rapport 1:5. Ce tampon 6X contient 0,25 % de bleu de bromophénol, 0,25 % de xylène de cyanol et 30 % de glycérol. Un puit contient une échelle de référence de poids moléculaire 1 kb ladder.

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

Suite à la digestion et à la migration de l'ADN sur gel, une bande d'agarose contenant le fragment d'intérêt est découpée et déposée dans un microtube de 1,5 mL. L'extraction et la purification de l'ADN sont effectuées au moyen de la trousse «QIAEX Gel Extraction Kit», distribuée par Qiagen Inc, selon les recommandations du manufacturier. L'ADN purifié se retrouve dans un volume de 40 μL.

3.6.5 Déphosphorylation de vecteurs

La déphosphorylation d'un vecteur, au moyen de la phosphatase alcaline, permet d'éviter la religation de ce vecteur sur lui-même suite à sa digestion par une enzyme de restriction. Le volume est alors ajusté à 50 μL avec de l'eau et du tampon OPA à 1X. L'enzyme de restriction est inactivée à la chaleur et la solution est refroidie 20 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 0,1 unité de phosphatase alcaline de Amersham Pharmacia Biotech est ajoutée. Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'inactivation de la phosphatase alcaline à 85°C pendant 15 minutes. Le

vecteur est finalement extrait au phénol/chloroforme, précipité à l'éthanol et resuspendu dans de l'eau.

3.6.6 Production d'extrémités franches

La production d'extrémités franches a été effectuée selon la méthode de Sambrook *et al.* 1989). Suite à la digestion enzymatique de l'ADN, celui-ci est soumis à l'action du fragment Klenow polymérase I d'*E. coli* en présence de dATP, dTTP, dCTP et dGTP (2,5 mM chacun) dans le tampon OPA 1X. Le mélange est ensuite incubé 30 minutes à la température de la pièce. La réaction est arrêtée avec 1 μL d'EDTA 0,5 M (pH 8,0) et par une extraction au phénol/chloroforme.

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

Le fragment d'ADN à cloner et le vecteur sont précipités en ajoutant 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol 95 %, placés 10 minutes à -80°C puis centrifugés 30 minutes à 13K rpm. Le vecteur est resuspendu dans 7,5 μL d'eau. Ensuite les fragments d'ADN à liguer, le vecteur et l'insert, sont combinés; la quantité de vecteur est deux fois supérieures à la quantité d'insert. La réaction est complétée par l'ajout de OPA à 1X, d'ATP à 1mM et de 3 unités d'ADN ligase du phage T4. Le mélange de ligation est incubé à 14°C pendant 4 à 16 heures. L'ATP et la ligase sont nécessaires pour générer des liens phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate d'un fragment et 3'-hydroxyl de l'autre fragment.

3.6.8 Isolement des plasmides chez *Escherichia coli*

La méthode élaborée par Liu et Mishra (1995) a été utilisée pour l'extraction rapide des plasmides chez *E. coli*. Les colonies obtenues sont repiquées à la fois sur un milieu solide 2 xTY ampicilline et dans un microtube contenant 0,2 mL de milieu TB ampicilline. Après une incubation de 8 à 16 heures à 37°C sous agitation, les cultures sont centrifugées 15 secondes et le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot

bactérien est resuspendu au vortex avec 30 μL d'une solution de lysozyme fraiche comprenant de 0,1 à 2 mg de lysozyme dans le tampon STT (8% sucrose, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 5 % Triton X-100). Les échantillons sont ensuite bouillis 60 secondes et centrifugés 5 minutes à 13 K rpm. Le surnageant contient l'ADN plasmidique.

3.6.9 Purification d'ADN plasmidique de *E. coli* sur un gradient de chlorure de césium

Une grande quantité de plasmide peut être purifiée selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989). Le clone sélectionné de *E. coli* est ensemencé dans 100 mL de milieu 2xTY ampicilline et incubé 16 heures à 37°C. La culture est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 5 K rpm (centrifugeuse Sorvall RC-5B, rotor GSA). Le culot de cellules est resuspendu dans 2,5 mL de tampon glucose (glucose 50 mM, Tris 25 mM à pH 8,0, EDTA 10 mM). Puis les cellules sont successivement incubées 5 minutes sur glace après l'ajout de 5,5 mL de tampon sodium dodecyl sulfate (SDS) (1 % SDS, NaOH 0,2 N) et de 2,5 mL de tampon acétate de potassium (60 mL d'acétate de potassium 5 M, 11,5 mL d'acide acétique glacial et 28,5 mL d'eau). Après une centrifugation de 10 minutes à 10 K rpm, le surnageant est récupéré et l'ADN est extrait au phénol/chloroforme. L'ADN plasmidique est ensuite précipité dans 0,6 volume d'isopropanol pendant 30 minutes à la température de la pièce et est centrifugé à 10 K rpm durant 15 minutes. Le précipité est resuspendu dans 1 mL de tampon TE. L'ADN plasmidique, en présence de 7,5 ③L de bromure d'éthidium 10X, est séparé sur un gradient de chlorure de césium, dans une ultracentrifugeuse (Beckman TL-100, rotor TLN-100) à 356 000 x g durant 3 heures. Le bromure d'éthidium est éliminé par une succession de précipitations à l'éthanol, selon la méthode de Song *et al.* (1999). L'ADN est resuspendu dans 50 μL d'eau et la concentration de l'ADN est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de $D.O._{260}$ équivaut à 50 μg/mL d'ADN

3.6.10 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification d'ADN a été réalisée avec l'ADN polymérase Pfu de la compagnie Stratagene (La Jolla, Californie). Dans un volume de 100 μL, la solution d'amplification contient le tampon 1X pour Pfu (KCl 10 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, Tris-Cl 20 mM pH 8,75, $MgSO_4$ 2 mM, 0,1 % Triton X 100, BSA 0,1 mg/mL), du Tween 20 à 5 %, 2,5 unités d'ADN polymérase Pfu turbo, 75 pmoles de chacune des amorces, 0,1 μg d'ADN matriciel et 4 % de propionamide. Le génome de *S. lividans* étant riche en G+C, l'ajout de propionamide diminue la formation de structures secondaires nuisibles à la réaction de PCR, en réduisant la force des liens G-C de l'ADN. La réaction de PCR est réalisée avec l'appareil Genius (Techne). La réaction de PCR débute par une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivie d'un appariement des oligonucléotides sur la matrice à 55°C durant 5 minutes et d'une synthèse de l'ADN de 3 minutes à 72°C. Ensuite débute une série de 30 cycles comportant une dénaturation de 1 minute à 94°C, 1 minute d'appariement à 55°C et 3 minutes de synthèse à 72°C. Dans le dernier cycle, la synthèse à 72°C se poursuit durant 3 minutes.

3.7 Transformation bactérienne

3.7.1 *Escherichia coli*

Des cellules d'*E. coli* dites compétentes sont d'abord préparées par un traitement au $CaCl_2$ décrit dans le protocole «Competent cell preparation» de BioRad Laboratories Ltd.

La transformation des cellules compétentes d'*E. coli* DH11S s'effectue suivant la méthode du choc thermique (Sambrook *et al.* 1989). Il s'agit de mélanger, dans un tube Falcon stérile de 15 mL, 100 μL de cellules compétentes et l'ADN à transformer, qui est soit un mélange de ligation (voir section 3.6.7) soit 0,1 μg d'ADN pur. Ce mélange est incubé 30 minutes sur la glace. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 2 minutes à 42°C. Après, le choc thermique, 400 μL de milieu 2 xTY sont ajoutés et le

mélange est incubé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Le mélange est ensuite inoculé sur 4 plats de Pétri de milieu 2 xTY contenant 100 μg/mL d'ampicilline. Les transformants sont obtenus après une incubation de 16 heures à 37°C.

3.7.2 *Streptomyces lividans*

La transformation de cellules de *S. lividans* est effectuée à partir de protoplastes préparés selon la méthode de Kieser *et al.* (2000). Les protoplastes sont mis en contact avec le mélange de ligation ou l'ADN plasmidique pur et 200 μL d'une solution de PEG 25 % pendant 2 minutes à la température de la pièce. Ensuite, la préparation est étalée sur milieu solide R5. Après 16 heures d'incubation à 30°C, chaque gélose est recouverte de 1,5 mL de thiostrepton 0,5 mg/mL. Les plaques sont ensuite incubées jusqu'à l'apparition de colonies.

3.8 Hybridation moléculaire

3.8.1 Transfert de type Southern

L'ADN chromosomique du transposant est d'abord digéré par des enzymes de restriction et les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer-Mannheim) à l'aide de l'appareil de transfert Vacuum Blotter modèle 785 (BioRad). Le transfert est effectué selon la méthode standard décrite par BioRad. L'ADN contenu dans le gel est traité avec une solution de HCl 0,25 N durant 15 minutes afin d'être dépuriné. L'ADN est ensuite dénaturé dans une solution de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Le transfert est effectué dans le tampon SSC 10X (87,6 g NaCl, 44,1 g citrate de sodium; pH 7,0) pendant 90 minutes sous une pression de 5 pouces de Hg. Après le transfert, la membrane est équilibrée 5 minutes dans le tampon SSC 2X et l'ADN est fixé sur la membrane par une cuisson de 2 heures à 80°C et/ou par une exposition aux U.V. (50 mJoule) à l'aide de l'appareil GS Gene Linker U.V. chamber de Bio-Rad.

3.8.2 Hybridation

Tout d'abord, la sonde utilisée pour l'hybridation est marquée radioactivement avec du dCTP [$\propto^{32}$P] par la méthode de «Nick Translation» selon les recommandations de la compagnie Boehringer-Mannheim. Pour la mutagenèse réalisée avec le plasmide pJOE2577, la sonde utilisée est un fragment de 325 pb représentant l'extrémité 3' du gène de résistance au thiostrepton. Ce fragment a été amplifié avec un oligonucléotide de 24 mer 5'-CTGTCCTTAGAGCGCCGGTTGGCT-3' et un oligonucléotide de 26 mer 5'-GGGCCAGCCGAGGTTACGTCTTCTCC-3'. Pour la mutagenèse réalisée avec le plasmide pUKG403, la sonde utilisée est un fragment de 339 pb représentant l'extrémité 3' de la séquence d'insertion IS466. Ce fragment est amplifié avec deux oligonucléotides de 15 mer 5'-AGCTGCTCGCGAAAA-3' et 5'-GGCCCTGTCTCACAT. La membrane est préhybridée dans le tampon de préhybridation (SSC 3X, $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mM, SDS 0,1 %, Denhardt 5X (0,1 % d'albumine sérique de bœuf, 0,1 % de polyvinylpyrrolidone, 0,1 % de Ficoll de type 400), 100 μg/mL d'ADN de sperme de saumon) à 68°C pendant 1 heure. La sonde marquée au dCTP [$\propto^{32}$P] est ajoutée au tampon de préhybridation et le mélange est incubé 16 heures à 68°C. La membrane est ensuite soumise à deux lavages de 30 minutes à 68°C dans un tampon SSC 0,1X et SDS 0,1 %. La membrane est ensuite exposée dans la cassette de phosphorScreen pendant 4 heures et numérisée avec l'appareil PhophorImager™ de Molecular Dynamics ou exposée sur un film Kodak X-omat AR (Eastman Kodak) à -80°C durant 16 heures et développé à l'aide de l'appareil Mini-Med/90 X-Ray film processor de AFP imaging.

3.9 Construction d'une mini-banque génomique

Une préparation d'ADN génomique (Section 3.6.1) est digérée par les enzymes de restriction appropriées. Les produits de digestion sont séparés sur un gel d'agarose 0,7%. Le gel est découpé dans la région d'intérêt préalablement déterminée par hybridation et l'ADN est extrait du gel (Section 3.6.4). Cet ADN est ensuite ligué au vecteur pTZ19U, préalablement digéré. Le produit de ligation est ensuite utilisé pour la transformation de la bactérie *E. coli* DH11S.

3.10 Détection des transformants par hybridation de colonies

Une hybridation de colonie est effectuée sur tous les transformants obtenus afin de détecter ceux contenant le fragment d'ADN recherché. Les colonies présentes sur chaque plaque sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protran de Schleicher & Schull). L'ADN des colonies bactériennes est libéré et fixé sur la membrane selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989) où les membranes sont traitées par différentes solutions. Le traitement est effectué en déposant le filtre sur un papier buvard saturé avec la solution traitante. Les membranes sont d'abord traitées 3 minutes avec le SDS 10%, ensuite 5 minutes avec la solution dénaturante (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M) puis 5 minutes avec la solution neutralisante (NaCl 1,5 M, Tris-Cl 0,5 M pH 7,4) et 5 minutes avec du SSC 2X. Les filtres sont ensuite séchés à l'air et l'ADN plasmidique est fixé sur les membranes par une cuisson de 2 heures à 80°C sous vide. L'ADN est ensuite hybridé selon la méthode décrite dans la section 3.8. Toutefois, un seul lavage de 15 minutes à 68°C est effectué après l'hybridation.

3.11 Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est effectué par le service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier, selon la méthode de terminaison des chaînes par les didéoxynucléotides (Sanger *et al.* 1977) avec l'appareil ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corporation, USA). Le fragment à séquencer est amplifié, à l'aide d'amorces spécifiques ou universelles, et les différentes bases sont détectées à l'aide d'un système de deux marqueurs fluorescents. Le maximum d'excitation est celui du marqueur donneur, le 6-carboxyfluoresceine (6-FAM) qui est lié à un marqueur accepteur, le dichlororhodamine (dRhodamine). Chaque nucléotide est lié à un dRhodamine différent, possèdant un spectre d'émission qui lui est propre. Les échantillons sont analysés par électrophorèse capillaire avec un détecteur laser à ions d'argon pour l'excitation du 6-FAM, puis les différentes bases sont déterminées par leur spectre d'émission.

3.12 Comparaison informatique des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques interrompues par le transposon sont comparées sur le site The Sanger Center (http//:www.sanger.ac.uk/Projects/s-coelicolor/micro_images . shtml) afin de repérer la séquence interrompue avec les séquences connues du génome de *S. coelicolor*. Les séquences sont également comparées avec le programme BLAST disponible sur le site de NCBI (http//:www.ncbi.nlm.nih.gov/) afin de déterminer l'homologie de la séquence avec d'autres organismes.

3.13 Test biochimiques

Les transposants d'intérêt sont cultivés pendant une semaine à 30°C sur milieu Bennett-thiostrepton. Les spores de ces transposants sont récoltées et servent d'inoculum pour le milieu minimal M14 contenant comme source unique de carbone, soit le xylane d'épeautre d'avoine, le xylose ou le glucose. L'activité enzymatique des transposants et les quantités totales d'ADN et de protéines sont évaluées sur des prélèvements réguliers d'échantillons de culture. Le milieu de culture minimal M14 est inoculé avec $2X10^6$ spores/mL préalablement lavées afin d'en éliminer toutes traces de glycérol. Les cultures sont incubées à 34°C sous agitation de 240 rpm.

Les transposants ne produisant pas de spore ont été cultivés dans les mêmes conditions mais dans le milieu TSB. Après une préculture de 48h, en milieu TSB suplémenté de glucose, un inoculum de 1,5 mL lavé deux fois à l'eau stérile, afin d'éliminer toute traces de glucose, est ensemencé dans le milieu TSB.

3.13.1 Mesure de l'activité xylanolytique

La méthode des sucres réducteurs est utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique des transposants. La xylanase A présente dans le surnageant est incubée avec du xylane de bouleau, utilisé comme substrat, ce qui entraîne une réaction d'hydrolyse. Les sucres réducteurs libérés sont dosés selon la méthode de Miller (1959)

utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS) (10 g NaOH, 10 g acide dinitrosalicylique, 2 g phénol, 200 g sodium potassium tartrate, pour un volume de un litre, le tout filtré sur papier Whatman #1.) Un échantillon de culture de 1 mL est centrifugé dans un eppendorf à la vitesse maximale pendant 5 minutes. Le surnageant est recueilli et 0,1 mL est incubé 10 minutes dans le mélange réactionnel préchauffé 3 minutes à 60°C. Le mélange réactionnel est composé de xylane de bouleau 1 % (0,5 mL) en présence d'un tampon citrate-phosphate 0,05 M (172,2 g $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ et 34,3 g d'acide citrique pH 6,0, pour un volume de un litre). Suite à l'incubation, 100 mL d'une solution de DNS sont mélangés avec 0,5 mL de bisulfite de sodium 10 % et 1 mL de ce mélange est ajouté dans chacun des tubes pour mettre fin à la réaction. Le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 15 minutes. La réaction entre le DNS et les sucres réducteurs libérés par la réaction enzymatique provoque une coloration jaune-orangée. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs produits par l'activité de l'enzyme sur le xylane de bouleau. Un tube témoin est préparé dans les mêmes conditions pour chaque échantillon analysé. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 540 nm. L'équivalence en μmoles de xylose est déterminée à l'aide d'une courbe standard de xylose. Une unité internationale (UI) de xylanase correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmole de sucres réducteurs par minute dans ces conditions.

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

Le dosage de l'ADN total des échantillons est effectué selon la méthode de Burton (1956) basée sur un test colorimétrique de l'acide désoxyribonucléique par le réactif diphénylamine. Le culot de cellules provenant des échantillons récoltés est resuspendu dans 1 mL de SSC 1X froid. Ensuite, 1 mL d'acide perchlorique 20 %, 2 mL de diphénylamine 4 % dans de l'acide acétique glacial et 200 μL d'acétaldéhyde 0,16 % sont ajoutés successivement. Le mélange est agité et incubé une nuit à 30°C. L'absorbance des échantillons est lue à 595 nm et à 700 nm. La différence entre ces D.O. permet d'établir la courbe de croissance des transposants.

3.13.3 Dosage protéique

Les protéines du surnageant sont dosées selon la méthode de Bradford (Bradford 1976).

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Construction de la souche IAF811-20

L'analyse des gènes impliqués dans le système général de sécrétion chez *Streptomyces lividans* nécessite l'utilisation de moyens versatiles et faciles à utiliser. Pour ce faire, un système permettant d'étudier le système général de sécrétion au moyen de la mutagenèse par transposition a été élaboré. Ce système consiste en l'intégration d'une seule copie d'un gène dans le génome d'une souche de *S. lividans*. Cette construction permet l'expression d'un gène qui code pour une protéine dont la sécrétion par le système général de sécrétion est facilement mesurable. De cette façon, suite à la mutagenèse par transposition, l'impact de la mutation sur le système général de sécrétion peut facilement être observé.

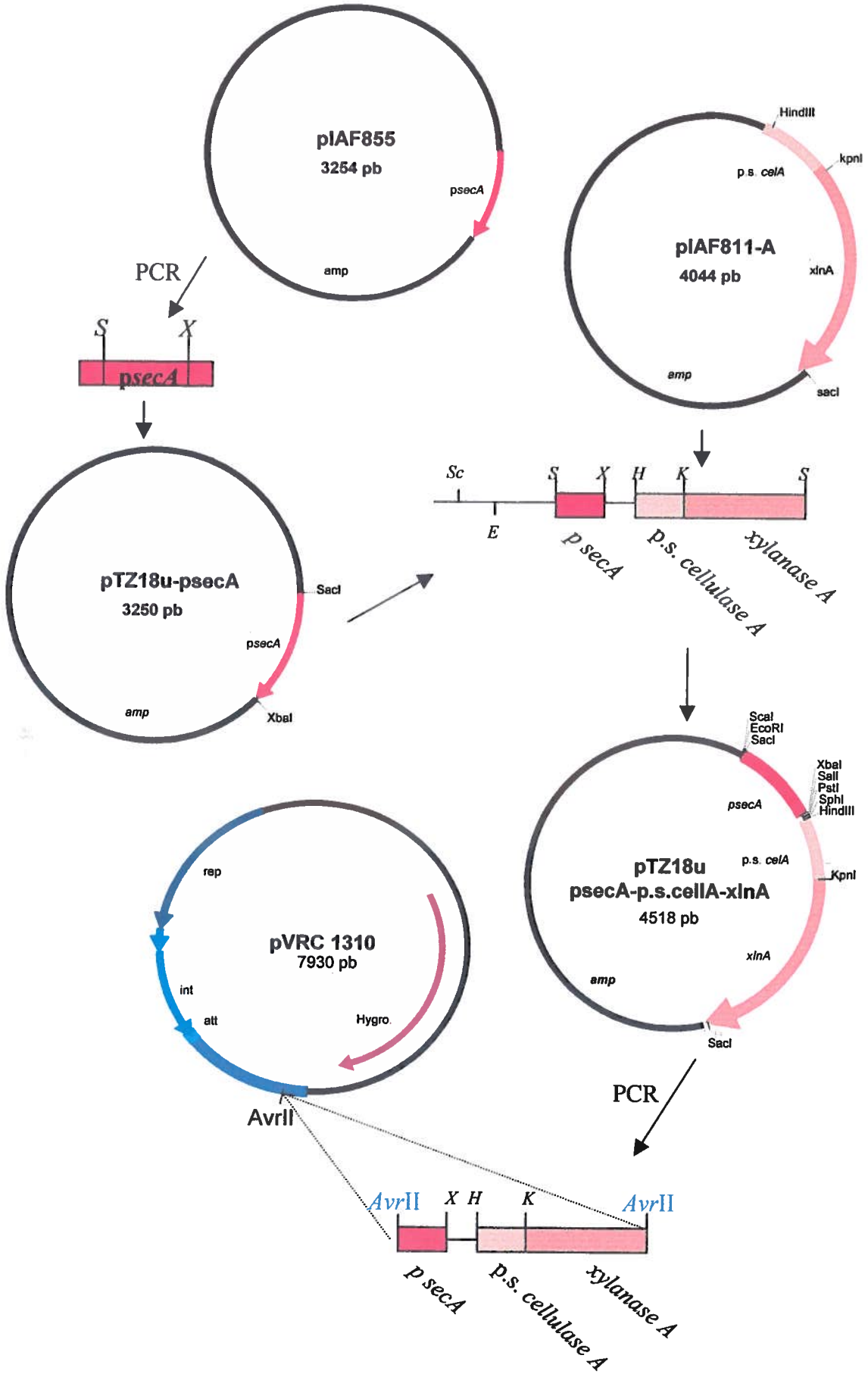
Ainsi le gène codant pour la xylanase A a été choisi comme gène rapporteur. Cet enzyme sécrété dans le milieu de culture, est stable et son activité peut être facilement détectée sur milieu solide RBB-xylane ainsi qu'en milieu liquide. L'activité xylanolytique est observée sur milieu RBB-xylane par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, alors qu'en milieu liquide cette activité est déterminée par la méthode des sucres réducteurs. Dans ce travail, le gène tronqué de la xylanase A_2, qui produit uniquement le domaine catalytique de la xylanase A, dépourvu de son domaine de fixation au xylane et ayant une activité xylanolytique complète, a été utilisé comme gène rapporteur. La xylanase entière ne peut pas être amplifiée à cause de la présence d'une structure en épingle à cheveux, ainsi, seul le domaine catalytique peut être amplifié. Le peptide signal de la xylanase A a été remplacé par le long peptide signal de la cellulase A de *S. lividans*. Cette séquence contient deux codons d'initiation précédés par une séquence Shine-Dalgarno. Cette construction particulière permet alors de tripler la production de xylanase en comparaison avec le peptide signal sauvage de la xylanase A (Pagé *et al.* 1996). Cette construction s'avère donc avantageuse puisqu'une seule copie du gène de la xylanase A est intégrée dans le génome de *S. lividans*, par conséquent une plus grande quantité de xylanase est produite, ce qui en facilitera la détection. Ensuite, le promoteur de la xylanase A a été remplacé par le promoteur du gène *secA*, le facteur central de la sécrétion des protéines (Lill *et al.* 1989). La production de SecA chez les

bactéries Gram négatif est autorégulé par les facteurs du système général de sécrétion (Schmidt et Oliver 1989; Oliver *et al.* 1990). Donc, cette construction offre plusieurs avantages puisqu'il sera possible de trouver des facteurs qui régulent le promoteur *secA*, en plus de ceux qui sont impliqués dans la sécrétion des protéines. La souche utilisée pour l'intégration du gène *xylanase A* est la souche IAF10-164, négative pour les activités xylanolytiques et cellulolytiques. Cette souche est mutée dans le gène *msik*, codant pour une protéine fixant l'ATP et fournissant ainsi l'énergie nécessaire au système de transport des disaccharides, responsables de l'induction des gènes xylanases et cellulases (Hurtubise *et al.* 1995). Ainsi, la xylanase A produite, sera uniquement le résultat de la transcription du gène *xlnA* nouvellement intégré au génome de la souche IAF10-164.

Toutes les constructions ont été réalisées par PCR et la démarche générale est présentée à la figure 13. Le gène tronqué de la xylanase A_2 possédant le peptide signal long de la cellulase A a été isolé du plasmide pIAF811-A (Pagé *et al.* 1996), générant un fragment *Hin*dIII/*Sac*I de 1,3 kb. Ensuite une réaction de PCR réalisée sur le plasmide pIAF855, contenant le promoteur de la protéine SecA (Gilbert *et al.* 1996), a généré un fragment de 430 pb correspondant au promoteur *secA*. Une fois digéré *Sac*I/*Xba*I et inséré dans le plasmide pTZ18U, un fragment *Hin*dIII/*Sca*I de 2,25 kb, contenant le gène *lacZ*, la région intergénique du phage F1 et une partie du gène *beta-lactamase* (*bla*), a été isolé. Ce fragment a ensuite été ligué au site *Hin*dIII avec le fragment de 1,3 kb correspondant au gène de la xylanase A et introduit dans le plasmide pTZ18U digéré *Sca*I/*Sac*I afin d'achever la construction. Ce fragment a dû être amplifié par PCR pour ajouter à chaque extrémité le site de restriction *Avr*II afin de permettre le clonage de la construction dans le plasmide intégratif pVRC1310. L'amplification à l'aide d'amorces comprenant le site de restriction *Avr*II a généré un fragment de 1,7 kb. Suite à la digestion du fragment par l'enzyme de restriction *Avr*II, cette construction a été insérée dans le plasmide pVRC1310 au même site et adjacent au gène de résistance à l'hygromycine. La construction *psecA-xlnA* et le gène de résistance à l'hygromycine ont ensuite été intégrée dans le génome à l'aide du plasmide intégratif pVRC1310.

Figure 13. Schéma de la construction comportant le promoteur *sec A*, le peptide signal de la Cellulase A et le gène tronqué de la Xylanase A_2 cloné dans le vecteur d'intégration pVRC1310.

Abréviations : ***psecA*** promoteur *secA*, **p.s.** ***celA*** peptide signal long de la cellulase A, ***xlnA*** gène de la xylanase A, ***amp*** gène de résistance à l'ampiciline, ***hygro.*** Gène de résistance à l'hygromycine, ***int*** intégrase, ***rep*** replicase, ***att*** segment d'identité, **S** *Sac*I, **X** *Xba*I, **Sc** *Sca*I, **E** *Eco*RI, **H** *Hin*dIII, **K** *Kpn*I.


pIAF855
3254 pb
psecA
amp
PCR
S
X
psecA
pIAF811-A
4044 pb
HindIII
KpnI
p.s. celA
xlnA
amp
SacI
pTZ18u-psecA
3250 pb
SacI
psecA
amp
XbaI
Sc
S
X
H
K
S
E
p secA
p.s. cellulase A
xylanase A
ScaI
EcoRI
SacI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
psecA
pTZ18u
psecA-p.s.cellA-xlnA
4518 pb
p.s. celA
KpnI
xlnA
amp
SacI
rep
pVRC 1310
7930 pb
int
att
Hygro.
AvrII
PCR
AvrII
X
H
K
AvrII
p secA
p.s. cellulase A
xylanase A

Ce plasmide permet une recombinaison conservative de site spécifique qui est une classe importante de réarrangement génétique et distinct des recombinaisons générales. Cette recombinaison a lieu en un site spécifique d'attachement présent sur l'élément transposable (attP) et sur le chromosome (attB) et ne partage qu'une courte séquence identique. Ce type de réaction ne génère pas de courtes duplications comme le mécanisme de transposition mais implique un mécanisme d'échange entre les brins qui ne nécessite pas de synthèse d'ADN (Raynal *et al.* 1998).

Le plasmide pVRC1310, est un plasmide dérivé d'un plasmide isolé chez *Streptomyces ambofaciens*, le pSAM2 (Pernodet *et al.* 1984). Ce plasmide peut s'intégrer de façon spécifique dans le chromosome de plusieurs espèces de *Streptomyces* (Boccard *et al.* 1988; Kuhstoss *et al.* 1989). L'intégration a lieu par recombinaison dans un segment d'identité d'une longueur de 49 pb présent dans la région attP de pVRC1310 et dans la région attB du chromosome de *Streptomyces* (Boccard *et al.* 1989). Boccard *et al.* (1989) ont également démontré la présence de cette séquence attB dans le génome de plusieurs *Streptomyces* et il n'y a qu'un seul site attB fonctionnel primaire chez *S. lividans*. Le segment identique recouvre et dépasse l'extrémité 3' du gène putatif ARNt proline dont la séquence terminale est CCA (Mazodier *et al.* 1990). Les gènes codant pour les ARN de transfert sont fréquemment utilisés comme site d'intégration d'élément génétique chez les procaryotes (Reiter *et al.* 1989), comme le plasmide transmissible SLP1 de *S. coelicolor* qui s'intègre dans le gène ARNt tyrosine du côté de l'extrémité 3' (Omer et Cohen 1986) . Le produit du gène *int* codant pour une intégrase, situé en amont de l'attP, favorise l'intégration en un site spécifique ainsi que la recombinaison intermoléculaire entre attP et attB (Boccard *et al.* 1989; Raynal *et al.* 1998).

Ainsi, suite à la transformation des protoplastes de la souche IAF10-164 par le plasmide pVRC1310 contenant la construction *psecA-xlnA*, les colonies isolées résistantes à l'hygromycine forment une nouvelle souche nommée IAF811-20. Le site d'intégration a été confirmé par hybridation. L'intégration s'avère être très stable et irréversible dû au fait que le gène *xis* a été éliminé du vecteur. De plus, les éléments génétiques pouvant s'intégrer dans les gènes d'ARN de transfert sont aisément transmis chez les populations

bactériennes puisque les structures d'ARNt sont hautement conservées (Reiter *et al.* 1989).

Selon Alegre *et al.* (1994), qui ont fait leurs travaux sur *Frankia Sp.*, cette intégration n'a pas de potentiel létal. Dans une situation où le gène serait le seul à coder pour un ARNt proline, toute modification de l'expression ou du transcrit serait létale pour la bactérie. L'intégration introduit un mauvais appariement dans la séquence ARNt proline, ainsi, la séquence terminale 3' CCA n'est plus codé par le gène. L'intégration ne sépare pas le gène d'ARNt de son promoteur normal mais change la séquence répétée inversée ce qui forme sans doute une structure équivalente (Alegre *et al.* 1994).

La figure 14 démontre que la souche IAF811-20 à une croissance normale en milieu minimal M14 supplémenté d'une source de carbone, soit le xylane, le xylose et le glucose. C'est-à-dire que sa croissance est similaire à la souche IAF10-164. Cette figure permet d'établir que la construction intégrée au chromosome n'affecte pas la croissance bactérienne. Ensuite, la figure 15 présente les résultats d'activités de la xylanase A et le dosage des protéines du surnageant. Ces résultats démontrent que l'activité xylanolytique de la souche IAF811-20 s'avère être de 1,5 à 2,5 fois plus élevée dans un milieu contenant du xylane ou du xylose en comparaison avec un milieu contenant du glucose. Kluepfel *et al.* (1986) ont démontré que les gènes des xylanases sont normalement réprimés par le glucose, indiquant une forte répression catabolique exercée par le glucose sur l'expression de ces gènes. De plus, les résultats obtenus correspondent aux analyses densitométriques effectuées par Morosoli *et al.* (1999) démontrant que l'ARNm des cinq gènes *sec*, dont *secA*, est de 1,5 à 2 fois supérieur dans un milieu contenant du xylane comparativement au glucose. Toutefois, dans ce travail, comme le promoteur *secA* qui n'est pas réprimé par le glucose (Morosoli *et al.* 1999) remplace le promoteur *xlnA* on remarque qu'il y a production de xylanase en glucose. Pour sa part la souche IAF10-164 ne produit à peu près pas de xylanase en glucose et en xylane, on retrouve une activité résiduel de l'ordre de 0,3 U/mL en xylane. Le dosage des protéines indique une sécrétion de protéines similaire en xylane et en xylose alors qu'en glucose une sécrétion légèrement inférieure est observée. Ceci possiblement causé par l'effet répresseur du glucose. Ces

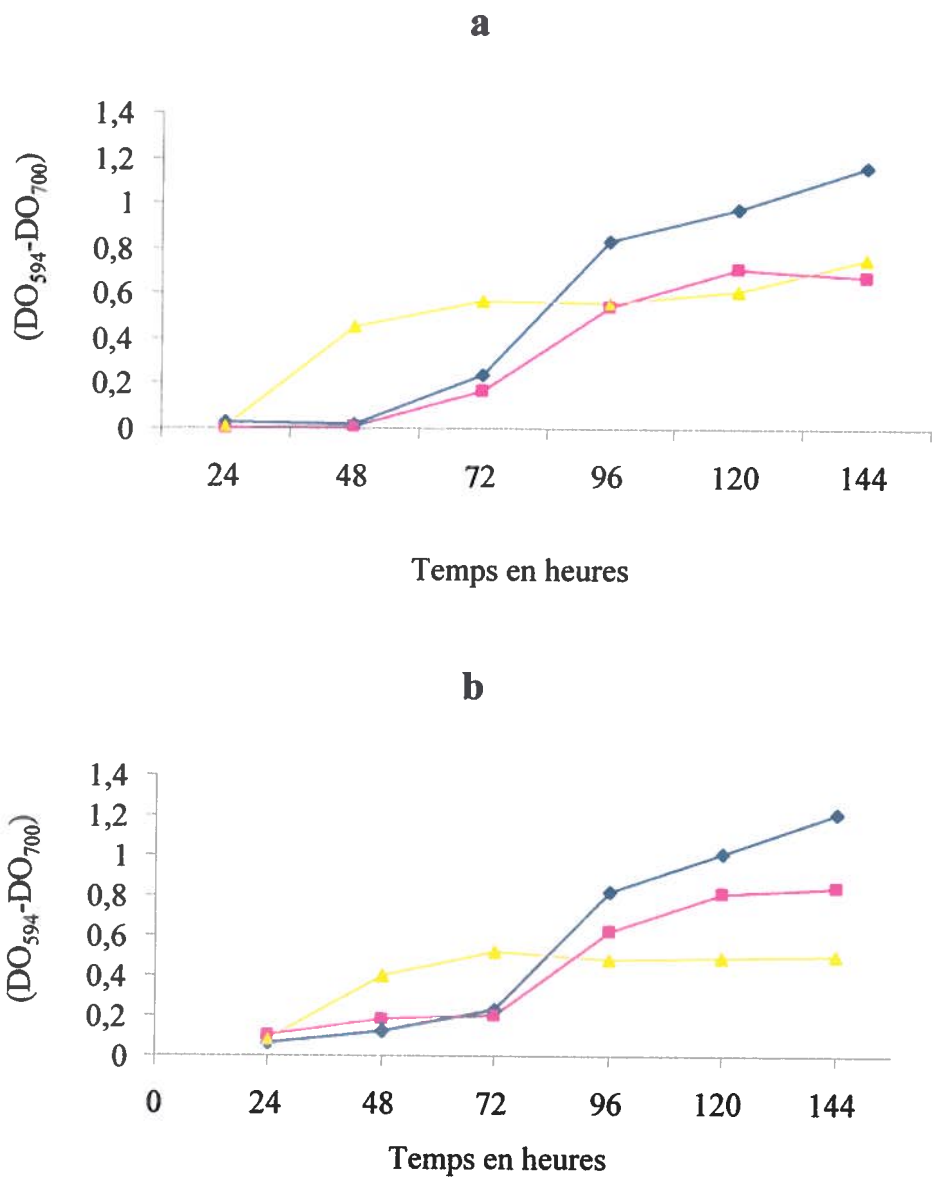


Figure 14: a. Courbe de croissance de la souche IAF811-20.
b. Courbe de croissance de la souche IAF10-164.

La culture des souches a été effectuée à 34°C, en milieu M14 additionné d'une source de carbone, xylane (—◆—), xylose (—■—), glucose (—▲—). La croissance du mycélium a été estimée par le dosage de l'ADN total à la diphénylamine et exprimée par la différence entre la densité optique à 595 nm et la densité optique à 700 nm (DO_{595}- DO_{700}).

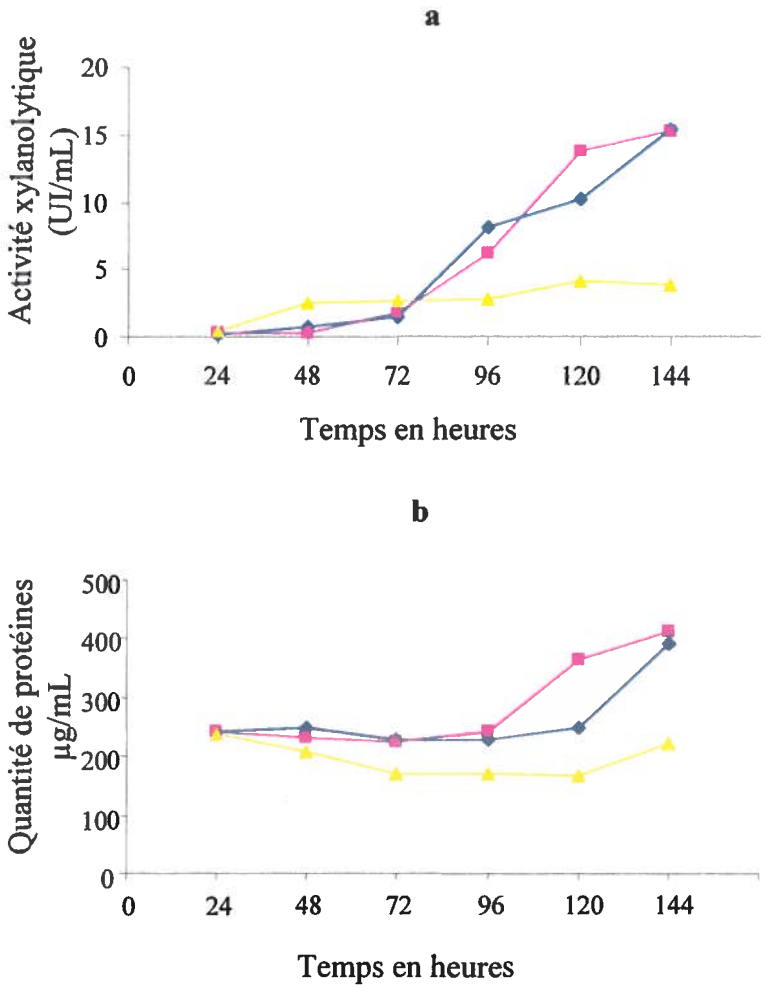


Figure 15: Mesure de l'activité xylanolytique et dosage des protéines dans le surnageant de culture de la souche IAF811-20.

Les cultures des souches ont été effectuées à 34°C, en milieu M14 additionné d'une source de carbone, xylane (—◆—), xylose (—■—), glucose (—▲—). L'activité xylanolytique (**a**) présente dans le surnageant de culture de chaque transposant a été évaluée par la méthode des sucres réducteurs. Elle est exprimée en unités internationales par millilitre (UI/mL). La croissance du mycélium a été estimée par le dosage de l'ADN total à la diphénylamine et exprimée par la différence entre la densité optique à 595 nm et la densité optique à 700 nm (DO_{595}- DO_{700}). Le dosage des protéines (**b**) a été estimé par la méthode de Bradford et est exprimé en µg/mL.

différentes observations sur la souche IAF811-20 permettent de comparer cette souche avec les transposants obtenus et ainsi fournir des indications sur l'effet de la mutation sur la sécrétion. Ces résultats confirment que la souche IAF811-20 se comporte de la manière attendue, c'est-à-dire qu'elle a une sécrétion appréciable de xylanase, de l'ordre de 10 UI en présence de xylane ou de xylose et que cette production semble être régulée par la source de carbone puisque son activité est de l'ordre de 4 UI en présence de glucose. Ainsi la souche peut être utilisée pour nos expériences de mutagenèse par transposition.

4.2 Mutagenèse par transposition

Le système élaboré afin d'étudier les gènes impliqués dans la régulation du système général de sécrétion s'avère très sophistiqué et prometteur. Ce système utilisant l'inactivation de gène suite à l'insertion d'un élément transposable pour produire un mutant, est une approche à haut potentiel pour identifier des gènes du système microbien. Les avantages de cette méthode sont nombreux et incluent la tendance à générer des allèles nuls, il minimise les dommages causés aux autres gènes et les locis interrompus sont facilement clonable (Schauer *et al.* 1991).

Comme pour cette étude, les éléments génétiques de transposition comportant un gène de résistance à un antibiotique sont des outils importants pour l'analyse génétique des bactéries. Les transposants obtenus sont ainsi facilement sélectionnés à l'aide de l'antibiotique. Les plasmides pJOE2577 et pUKG403 comportant respectivement le transposon Tn5493 et Tn5424 de même que le gène de résistance au thiostrepton, ont été utilisés pour transformer les protoplastes de la souche IAF811-20. L'intégration du transposon avec le gène de résistance à l'antibiotique a lieu à ce moment au hasard dans le génome. Les transposants obtenus ont été cultivés à 30°C afin de favoriser la sporulation. Ensuite, 10^4 spores ont été étalées sur plaque et incubées à haute température, afin de provoquer l'élimination du plasmide et jusqu'à la formation de spores. Les plasmides contenant les transposons utilisés possèdent une origine de réplication thermosensible, ainsi lorsque la température est élevée à un niveau non

permissif, le plasmide devrait être éliminé de la cellule. De plus, suite à la transposition le plasmide s'avère non essentiel à la viabilité des bactéries et seulement les transposants pourront croître en présence de thiostrepton puisque ce gène de résistance est intégré au génome avec le transposon.

Les spores récoltées ont été étalées respectivement sur un milieu contenant du thiostrepton et de la kanamycine afin d'isoler les transposants. Les transposants potentiels sont résistants au thiostrepton, car le gène de résistance est intégré au génome avec le transposon, et sensible à la kanamycine, car ce gène est éliminé avec l'élimination du plasmide. Chaque expérience de transposition génère possiblement 4 à 5 transposants potentiel pour pJOE2577 et 1 à 2 pour pUKG403.

Les transposants potentiels sont analysés sur milieu solide contenant du RBB-xylane avec ou sans glucose. Ce milieu contient un colorant bleu et du xylane comme substrat, ainsi lors de l'hydrolyse du xylane il y a apparition d'une zone claire autour des colonies. La taille de la zone claire est évaluée après une période d'incubation de 40 à 48 heures. Les clones présentant une zone claire de taille différente de la souche contrôle IAF811-20, sont analysés.

Le nombre total de transposant probable obtenus est environ 2100, soit 750 contenants le transposon du pUKG403 et 1350 du pJOE2577. Ces 2100 colonies ont été repiquées sur les milieux solides RBB-xylane avec et sans glucose. Parmi ces 2100 transposants probables, 200 ont été retenus car leur phénotype semblait intéressant, soit 75 contenants le transposon du pUKG403 et 125 du pJOE2577. Ensuite, les transposants probables ont étés testés afin de confirmer l'élimination du plasmide, par la vérification de leur sensibilité à la kanamycine. Seulement 5 transposants contenant le transposon du pUKG403 sont sensible à la kanamycine. Parmi les transposants obtenus avec le pJOE2577, aucun n'a éliminé le plasmide. Finalement, 35 transposants probables présentant un phénotype intéressant ont été analysés par Southern et seulement 8 présentent un profile d'hybridation intéressant. Le tableau II présente en détail les résultats obtenus.

Tableau II: Résultats des expériences de mutagenèse par transposition.

Nombre de transposants obtenus	Nombre de transposants sélectionnés	Nombre de transposants ayant éliminé le plasmide	Nombre de transposants analysés par Southern
Total: 2100	Total: 200	Total: 5	Total: 35
pUKG403: 750	pUKG403: 75	pUKG403: 5	pUKG403: 20
pJOE2577: 1350	pJOE2577: 125	pJOE2577: 0	pJOE2577: 15

Ces résultats nous amènent à dire que malgré un potentiel intéressant, le nombre de transposants obtenus est inférieur aux résultats attendus comparés aux résultats obtenus par les créateurs de ces transposons. Par exemple, Irnich et Cullum (1994), ayant construit le transposon Tn5424 présent sur le pUKG403, obtenaient de 1 à 4 transposants par plaque ensemencée de $1\text{-}2X10^4$ spores, ce qui correspond à une fréquence de transposition de $1\text{-}2X10^{-4}$. Toutefois, ces statistiques doivent être considérées avec réserve puisque pour la sélection des transposants, la croissance à haute température est effectuée sur un milieu sans sélection. Ceci est nécessaire pour l'obtention d'une plus grande quantité de clones sensibles à la kanamycine (Irnich et Cullum 1994). Ainsi, sur 19 transposants potentiels analysés par Southern, Irnich et Cullum (1994) ont obtenus 16 profiles d'hybridation différents.

Ensuite, pour le transposon Tn5493 construit par Volff et Altenbuchner (1997), ils obtenaient une fréquence de transposition de 3% sur les clones ayant été sélectionnés sur le thiostrepton. Ainsi, sur 16 transposants potentiels analysés par Southern, Volff et Altenbuchner (1997) ont obtenus 13 profiles d'hybridation différents.

Les travaux de cette nature étant très limités, il devient difficile de trouver des éléments de comparaison. Les études réalisées traitent du développement et des possibilités de système permettant la réalisation de la mutagenèse par transposition (Irnich et Cullum 1994; Volff et Altenbuchner 1997; Herron *et al.* 1999) ou démontrent et caractérisent la transposition de séquence d'insertion chez les *streptomyces* (Solenberg et Baltz 1994; Chen *et al.* 1992; Weaden et Dyson 1998) mais aucune étude n'a été répertoriée pour l'application de ces systèmes de transposition chez les Streptomycètes.

Une des difficultés de la mutagenèse par transposition réside dans la probabilité d'atteindre un gène impliqué dans le système général de sécrétion. Le génome de *S. lividans* contient environ 7 000 gènes (Hopwood 1999). De ces 7 000 gènes, cinq gènes sont directement impliqués dans le système général de sécrétion de *S. lividans*, dont les gènes codant pour les protéines SecA, SecE, SecY, SecD et SecF (Morosoli *et al.* 1997). En plus on peut s'attendre à ce qu'un certain nombre de gènes non identifiés jusqu'à

maintenant puissent être impliqués directement ou indirectement dans le système général de sécrétion. Sachant que la transposition est une technique de mutagenèse aléatoire, il faudrait en théorie analyser au moins 7000 transposants pour couvrir le génome en entier et ainsi atteindre les gènes impliqués dans le système général de sécrétion. Toutefois, en pratique ce nombre d'analyses doit être de 2 à 3 fois plus élevé dû à la présence possible de points chauds ou de régions moins accessibles à cause de la conformation du génome.

4.3 Phénotype des transposants

Le phénotype des transposants est évalué par la taille des zones claires sur les milieux RBB-xylane avec et sans glucose autour des colonies. Cette première étape de sélection permet de distinguer les transposants ayant un phénotype différent par la comparaison de la taille des zones claires des transposants avec la souche IAF811-20 et entre les transposants eux-mêmes. Cette analyse peut donner de l'information à deux niveaux sur le type de gène interrompu. Tout d'abord, l'effet sur les facteurs impliqués dans le système de sécrétion et l'effet direct sur l'expression et la régulation du promoteur *secA* du gène de la xylanase.

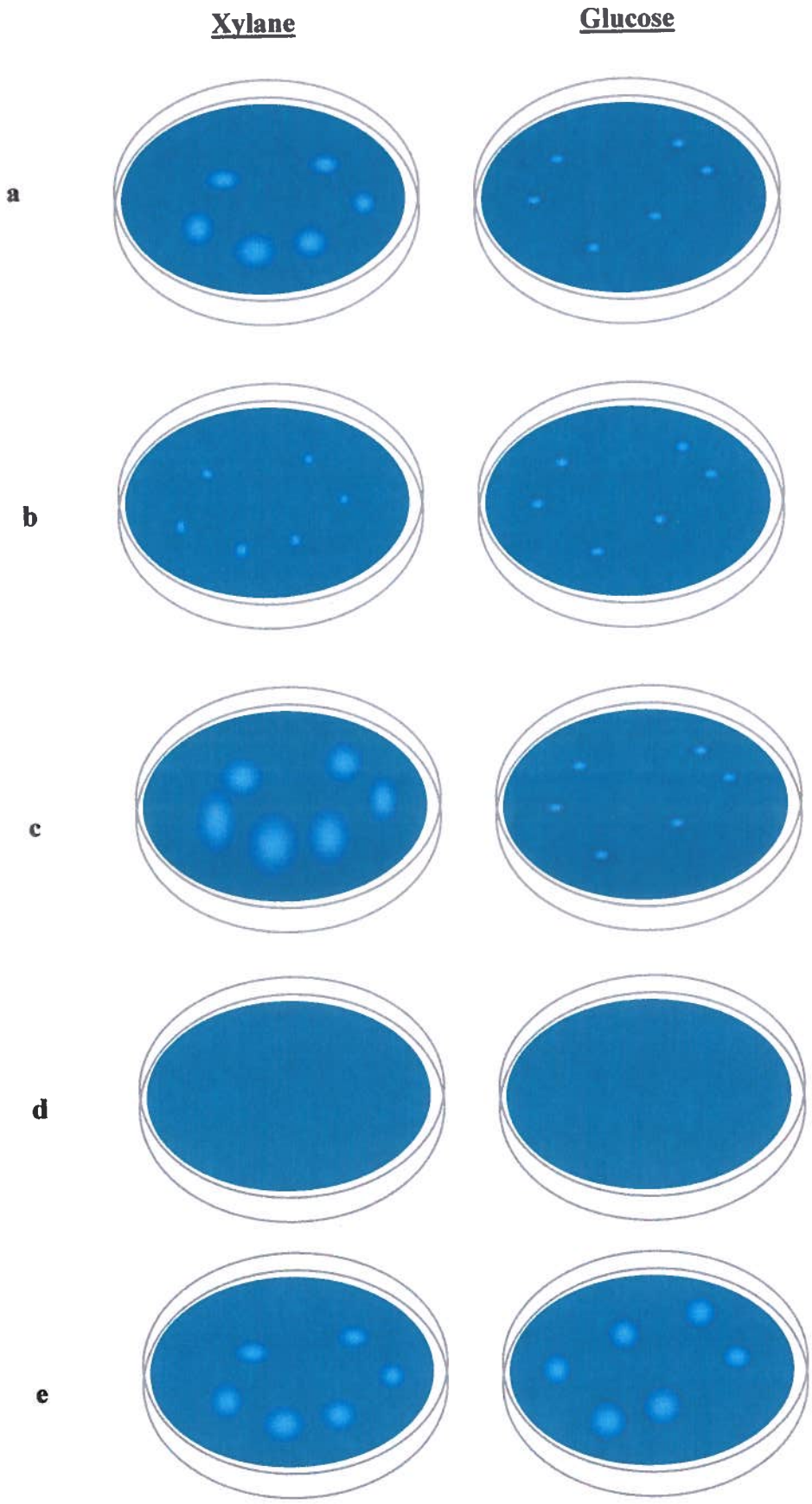
La figure 16 présente de façon shématisée les différents phénotypes. a) L'analyse du phénotype de la souche IAF811-20 ayant la construction *psecA-xlnA* intégrée au génome permet d'établir un standard de comparaison au niveau des zones claires sur 0,1% RBB-xylane avec et sans glucose. Il est alors établi que la taille de la zone en glucose est plus petite que celle en xylane. Ainsi, quatre phénotypes intéressants pouvaient être obtenus lors de l'analyse des transposants sur le milieu 0,1% RBB-xylane avec et sans glucose. b) Une petite zone en xylane et une zone normale en glucose, ce phénotype pourrait indiquer la probable interruption d'un gène agissant possiblement comme activateur du système général de sécrétion puisque nous savons que la transcription du gène *secA* est stimulée en présence de xylane (Morosoli *et al.* 1999). b) Un deuxième phénotype intéressant serait une très grosse zone en xylane et une zone normale en glucose. Ce phénotype pourrait possiblement indiquer une dérépression du système général de sécrétion par l'inactivation d'un gène répresseur. c) Un troisième

phénotype serait l'absence de zone en xylane et en glucose. Ce phénotype est très intéressant mais peu probable, puisqu'il serait létal pour les cellules, car il pourrait indiquer l'atteinte d'un gène essentiel impliqué dans le système général de sécrétion comme SecA, SecY ou SecE (Oliver et Beckwith 1982b; Murphy *et al.* 1995). d) L'absence de zone pourrait aussi signifier l'interruption du gène de la xylanase, qui a été intégré dans la souche, dans ce cas la cellule aurait une croissance normale. e) Un dernier phénotype serait la présence d'une zone normale en xylane et d'une zone aussi grosse en glucose. Ce phénotype peut correspondre à l'annulation de la répression exercée par le glucose. La figure 16 présente de façon schématisée les différents phénotypes. Lorsque le phénotype des transposants identifiés est déterminé, le ciblage des gènes atteints ou interrompus est effectué.

Un premier transposant a été obtenu à l'aide d'une méthode de mutagenèse légèrement différente de celle décrite à la section 3.5. Cette méthode consistait à ensemencer 10^4 spores sur milieu Bennett-thiostrepton (50 μg/ml) et de répliquer les colonies par velours, après 5 jours d'incubation à haute température, sur deux milieux solides contenant de la kanamycine (10 μg/ml) ou du thiostrepton (50 μg/ml) plutôt que d'attendre la sporulation complète. Ainsi, les colonies présentent uniquement sur le milieu contenant du thiostrepton étaient sélectionnées pour ensuite être testées sur milieu RBB-xylane en comparaison avec la souche IAF 811-20. Le transposant #103, a été obtenu à l'aide du Tn5424 présent sur le pUKG403. Le clone #103 présente une importante zone d'éclaircissement sur le milieu contenant 0,1% RBB-xylane.

Après plusieurs essais de mutagenèse sans succès, cette méthode a été modifiée selon la méthode utilisée par Herron *et al.* (1999) et décrite à la section 3.5. Cette méthode consiste à ensemencer 10^4 spores sur un milieu sans sélection et de les incuber 24 heures à 30°C et ensuite à haute température jusqu'à la formation de spores. Les spores récoltées sont ensuite ensemencées sur un milieu contenant du thiostrepton afin de sélectionner les transposants. Cette modification a pour but de faciliter l'élimination du plasmide. Par cette méthode plusieurs transposants potentiels ont été obtenus. Parmi les transposants analysés et obtenus à l'aide du Tn5424 présent sur le pUKG403 il y a les

Figure 16. Schéma des différents phénotypes possibles sur milieu RBB-xylane avec et sans glucose


Xylane
Glucose
a
b
c
d
e

clones #C, #20, #22 et #30. Les clones #20 et #22 présentent une zone claire très petite sur le milieu 0,1% RBB-xylane, alors que les clones C et 30 présentent de grosse zone sur ce même milieu.

Les transposants #29, #52 et #55 ont été obtenus à l'aide du Tn5493 présent sur le pJOE2577. Les transposants #29 et #55 présentent une zone claire très petite sur le milieu 0,1% RBB-xylane alors que le transposant #52 présente une grosse zone sur ce même milieu. Le tableau III résume le phénotype des différents transposants.

L'étape d'évaluation et de comparaison du phénotype des transposants par l'analyse des zones d'hydrolyse sur RBB-xylane constitue la première étape dans la sélection des transposants. Cette étape s'avère subjective puisqu'elle repose uniquement sur une évaluation qualitative. Or, dans cette évaluation plusieurs variables peuvent influencer les résultats observés. Tout d'abord, chaque colonie sélectionnée doit être séparée en deux afin de pouvoir évaluer la sécrétion de la xylanase sur les milieux solides RBB-xylane avec et sans glucose. Il est alors ardu de prélever et de repiquer toutes les colonies de la même façon puisque chaque colonie est différente, certaines sont plus grosses, d'autres plus petites et pas au même stade de différenciation. Ainsi, les colonies n'étant pas tous au même stade de croissance, leur comparaison peut être un peu arbitraire. Il faut alors, dans l'évaluation des zones d'éclaircissement, prendre en considération, la grosseur de la colonie de départ et la croissance de celle-ci au cours du test sur RBB-xylane. Toutes ces variables impliquent la sélection possible de transposants inintéressants dont le phénotype n'implique pas un gène du système général de sécrétion.

4.4 Ciblage des gènes

Le ciblage des gènes a pour but de déterminer le site d'intégration du transposon dans le génome. Le ciblage des gènes se fait par hybridation à l'aide d'une sonde reconnaissant une partie du transposon. La détermination du site d'intégration du transposon au niveau du génome nécessite plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ADN chromosomique des transposants est extrait selon la méthode de Keiser *et al.* (2000).

Tableau III. Phénotype des transposants obtenus suite à la mutagenèse par transposition à l'aide de deux transposons, le Tn5424 et le Tn5493.

		Taille de la zone claire sur milieu RBB-xylane	
		Avec glucose	Sans glucose
	IAF 811-20	+	+++
Transposons	Transposants		
Tn5424	103	+++	+++
	20	+++	+++
	22	-/+	+++
	30	+	+++++
	C	-/+	+++
Tn5493	29	-/+	+++
	52	+++	+++
	55	-/+	+++

Pour la transposition effectuée avec le pUKG403, l'ADN est digéré par l'enzyme de restriction *Pvu*II, car un site *Pvu*II est présent dans le transposon. Une deuxième digestion par d'autres enzymes de restriction tel que *Bam*HI, *Eco*RI, *Sac*I, *Xba*I et autres permet de déterminer s'il y a eu transposition et d'isoler des fragments d'ADN situés du côté de l'extrémité 3' de l'IS466 du transposon. Après électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose et un transfert de type Southern sur une membrane de nylon, une hybridation est réalisée avec une sonde de 339 pb, représentant l'extrémité 3' de l'IS466 du transposon, marquée au [α^{32}P] dCTP et présentée à la figure 17.

Pour la transposition réalisée avec le pJOE2577, l'ADN est digéré par l'enzyme de restriction *Eco*RV, car ce site est présent dans le gène de résistance au thiostrepton inclu dans le transposon. Une deuxième digestion par d'autres enzymes de restriction tel que *Sac*I et autres permet de déterminer s'il y a eu transposition et d'isoler des fragments d'ADN situés du côté 3' du transposon. Après électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose et un transfet de type Southern sur une membrane de nylon, une hybridation est réalisée avec une sonde de 325 pb, représentant l'extrémité 3' du gène de résistance au thiostrepton, marqué au [$\propto^{32}$P] dCTP et présenté à la figure 18.

Ensuite, le gène correspondant au fragment hybridé doit être isolé afin de pouvoir déterminer la séquence du gène interrompu. La méthode d'hybridation de colonies est utilisée pour retrouver le fragment ayant hybridé. Cette méthode consiste à redigérer l'ADN chromosomique avec les enzymes de restriction appropriés, et suite à la migration sur gel d'agarose, éluer la région d'intérêt, c'est-à-dire où les fragments d'ADN ont hybridé. L'ADN récupéré, contenant une multitude d'ADN différents mais de même taille, est cloné dans pTZ19U afin de créer une mini-banque génomique pour récupérer le fragment contenant le transposon. Suite à la transformation chez *E. coli*, les clones sont sélectionnés par hybridation de colonies en utilisant la sonde correspondante. L'ADN plasmidique est ensuite isolé et l'insert séquencé par la méthode des didéoxy nucléotides. Ensuite, les séquences nucléotiques obtenues sont comparées avec les séquences connues de la banque génomique de *S. coelicolor* sur le site The Sanger Center (http//:www.sanger.ac.uk/Projects/s-coelicolor/micro_images.shtml). Les séquences sont

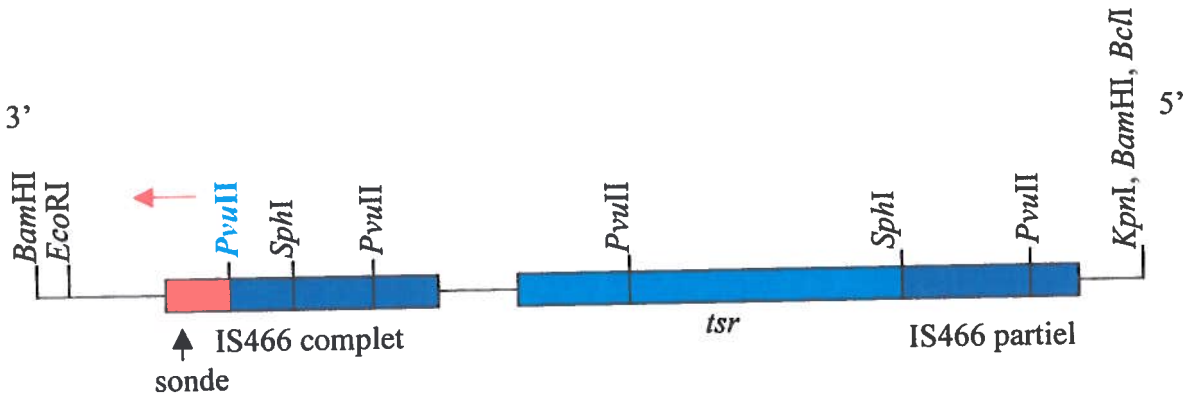


Figure 17: **Schéma de la sonde utilisée pour l'hybridation de l'ADN des transposants obtenus avec le transposon Tn5424 présent sur le pUKG403.**

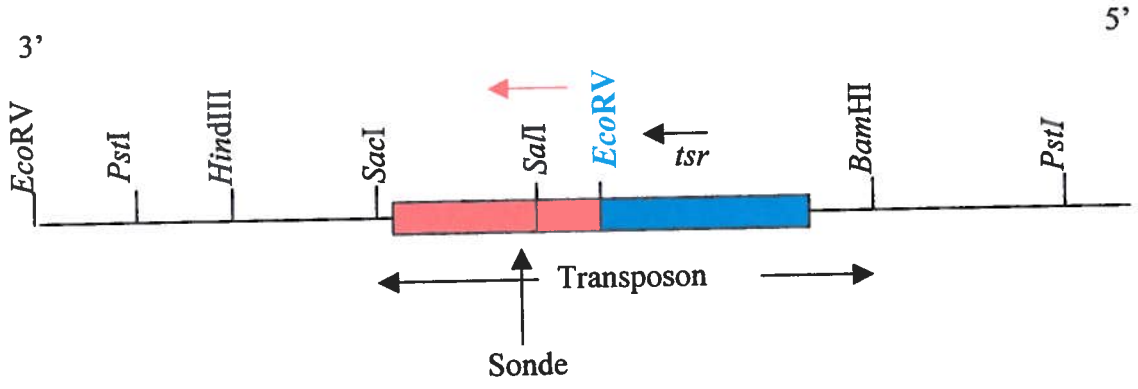


Figure 18: **Schéma de la sonde utilisée pour l'hybridation de l'ADN des transposants obtenus avec le transposon Tn5493 présent sur le pJOE2577.**

également comparées avec le programme BLAST disponible sur le site NCBI (http//:www.ncbi.nlm.nih.gov/) afin de déterminer l'homologie de la séquence avec d'autres organismes.

4.4.1 Transposant #103

La figure 19 montre l'hybridation de l'ADN chromosomique du transposant #103 digéré par plusieurs enzymes de restriction. La digestion avec l'enzyme de restriction *Pvu*II donne un fragment qui hybride à environ 1,3 kb. La digestion double *Pvu*II/*Kpn*I génère un fragment qui hybride à environ 1,1 kb. Pour déterminer la séquence interrompue, la bande d'ADN récupérée du fragment *Pvu*II de 1,3 kb a été clonée dans pTZ19U digéré *Sma*I afin de générer une mini-banque génomique. Suite à la transformation chez *E. coli*, le clone #103 est sélectionné par hybridation de colonies en utilisant la même sonde. Ensuite la séquence de l'insert a été déterminée et elle correspond au gène St1C3.08c. Ce gène se retrouve sur le cosmide St1C3 séquencé dans le cadre du projet de séquençage du génome de *S. coelicolor*.

Le transposon Tn5424 s'est inséré au 154ième nucléotide à partir du codon d'initiation de la traduction et le gène a donc été interrompu après une tyrosine correspondant au 51ième acide aminé du gène (figure 20). Ce gène a été identifié comme étant possiblement un régulateur de transcription comprenant 366 a.a., et pourrait donc avoir un rôle majeur sur la transcription des gènes *sec* impliqués dans le système général de sécrétion. Le rôle de ce régulateur de transcription n'a pu être élucidé puisque pour des raisons indéterminées la croissance du transposant était plutôt difficile en plus de l'absence de sporulation, ce transposant à donc été perdu. Le recouvrement de ce transposant a été tenté par recombinaison homologue à l'aide d'un plasmide intégratif, le pGM160. Un fragment de 645 pb correspondant au gène 103 (régulateur de transcription) a été amplifié par PCR et cloné dans le vecteur pGM160 aux sites de clonage *Hin*dIII/*Bam*HI. Ce vecteur a été conçu par Muth *et al.* (1989) pour effectuer des dislocations géniques. Afin de provoquer la recombinaison entre le vecteur et le chromosome de l'hôte, ce système de plasmide suicide possède une origine de réplication

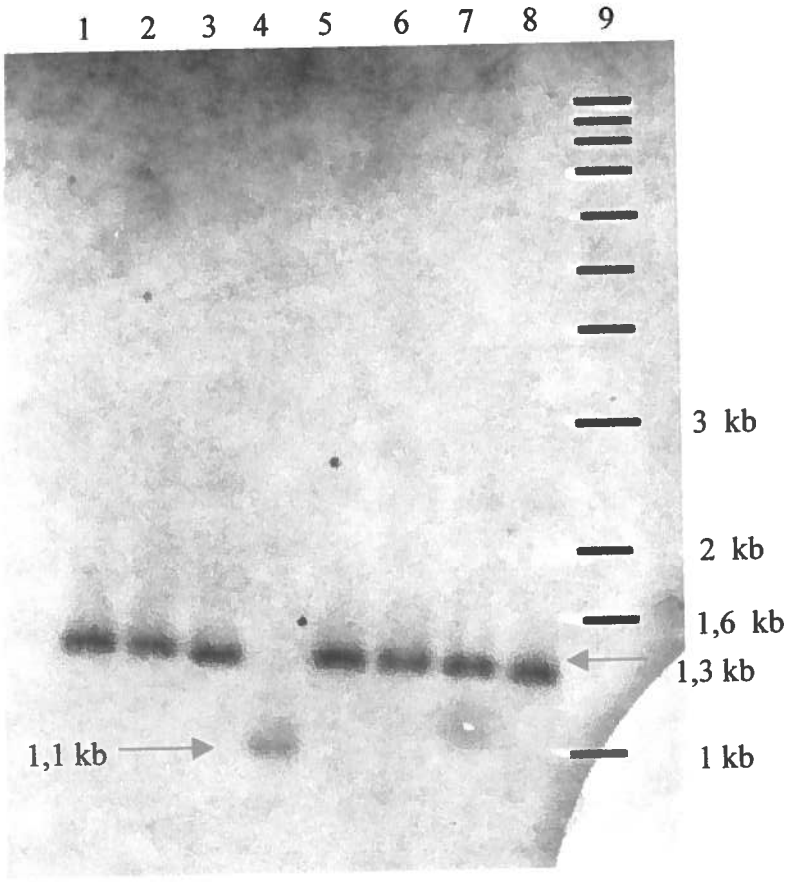


Figure 19. Hybridation de l'ADN chromosomique du transposant #103 digéré par plusieurs enzymes de restriction.

2,5 μg d'ADN ont été digérés et chargés dans chaque puits.Puits: (1) *Pvu*II/*Sph*I, (2) *Pvu*II/*Sac*I, (3) *Pvu*II/*Pst*I, (4) *Pvu*II/*Kpn*I, (5) *Pvu*II/*Eco*RI (6) *Pvu*II/*Bgl*II, (7) *Pvu*II/*Bam*HI, (8) *Pvu*II, (9) échelle de poids moléculaire.

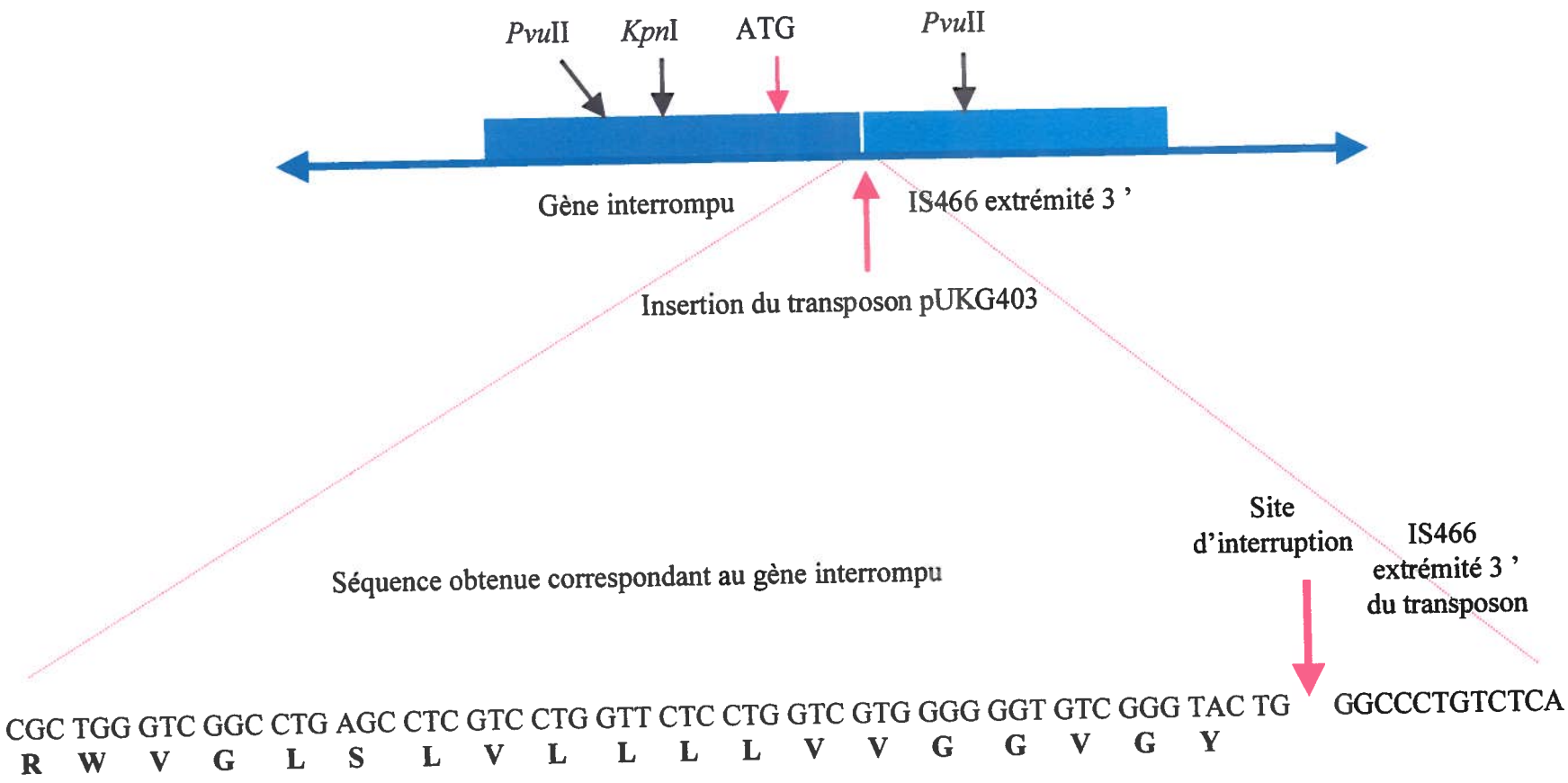


Figure 20. Séquence du gène interrompu du transposant #103

thermosensible. Ainsi, le plasmide est facilement éliminé de la cellule hôte par une augmentation de la température à un niveau non permissif (Muth *et al.* 1989). Le pGM160 est basé sur le plasmide pSG5 qui est naturellement thermosensible chez *S. ghanaensis* (Muth *et al.* 1988). Plusieurs tentatives d'interruption de ce gène ont été infructueuses. Ce qui permet d'en déduire que ce gène est probablement indispensable à la croissance de l'hôte et qu'il faudrait découvrir les conditions de culture qui lui permette de survivre.

4.4.2 Transposant #22

La figure 21 montre l'hybridation de l'ADN chromosomique du transposant #22 digéré par plusieurs enzymes de restriction. La digestion avec l'enzyme *Pvu*II donne deux fragments qui hybrident à environ 3,5 et 2,3 kb. Normalement, un seul fragment devrait hybrider pour chaque digestion, sauf dans la situation où le plasmide n'a pas été éliminé, mais dans ce cas le fragment hybridé correspondant est facilement identifié. Une autre explication réside dans une double transposition, c'est-à-dire deux évènements de mutagenèse par transposition dans un même génome. Ainsi, pour déterminer un premier gène interrompu, la bande d'ADN récupérée du fragment *Pvu*II de 2,3 kb a été clonée dans pTZ19U digéré *Sma*I afin de générer une mini-banque génomique. Suite à la transformation chez *E. coli*, le clone #22 est sélectionné par hybridation de colonies en utilisant la même sonde. Ensuite la séquence de l'insert a été déterminée et elle correspond au gène St2C4.03c. Ce gène se retrouve sur le cosmide St2C4 séquencé dans le cadre du projet de séquençage du génome de *S. coelicolor*. Le transposon Tn5424 s'est inséré au 4363ième nucléotide à partir du codon d'initiation de la traduction et le gène a donc été interrompu après une glycine correspondant au 1454ième acide aminé du gène (figure 23).

Ce gène a été identifié comme étant possiblement une polykétide synthase de type I, comprenant 2152 a.a.. L'interruption aurait eu lieu dans un domaine acyl transférase. Le rôle de la polykétide synthase, un large système d'enzymes multiples, est de contrôler la biosynthèse de produits naturels très complexes à partir de précurseurs simples tels que

le propionyl CoA et le méthylmalonyl CoA. Ces produits sont des agents anti-microbiens (tetracycline, erythromycine), anti-tumorales (adriamycine), anti-parasitaires (avermectine) ou des agents ayant des propriétés immunosuppressives (FK-506) et sont reconnus pour leur importante activité pharmacologique (Khosla *et al.* 1999).

Plusieurs tentatives ont été effectuées pour cloner le fragment *Pvu*II de 3,5 kb dans pTZ19U digéré *Sma*I afin d'identifier cet autre gène interrompu. Toutefois, aucune colonie positive n'a été obtenue à l'hybridation. Cette séquence est possiblement non clonable ou elle est instable chez *E. coli* (Witmann *et al.* 1994).

4.4.3 Transposant #C, #20 et #30

Les figures 21 et 22 montrent l'hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #C, #20 et #30 digérés par plusieurs enzymes de restriction. Pour ces trois transposants la digestion double *Pvu*II/*Bam*HI génère un fragment qui hybride à environ 3,2 kb et la digestion double *Pvu*II/*Eco*RI génère un fragment qui hybride à environ 1,8 kb. Le transposant #20 lorsque digéré *Pvu*II/*Bam*HI génère un fragment supplémentaire de 3,5 kb, alors que le transposant #30 lorsque digéré *Pvu*II génère deux fragments qui hybride à 3,8 kb et à plus de 7,0 kb. Pour la digestion double *Pvu*II/*Bam*HI on retrouve également un fragment supplémentaire qui hybride à 3,8 kb. Ces résultats suggèrent à nouveau une double intégration du transposon pour les transposants #20 et #30. Pour déterminer la séquence d'un premier gène interrompu, la bande d'ADN récupérée du fragment *Pvu*II/*Eco*RI de 1,8 kb de chaque transposant a été clonée dans pTZ19U digéré par *Sma*I/*Eco*RI afin de générer une mini-banque génomique. Suite à la transformation chez *E. coli*, chaque clone est sélectionné par hybridation de colonies en utilisant la même sonde. La séquence des insertions correspond tous à la transposase de l'IS469 et précisément au 34 pb répétées de l'IS469 du gène stE65.05c. Ce gène se retrouve sur le cosmide stE65 séquencé dans le cadre du projet de séquençage du génome de *S. coelicolor*. Les autres fragments n'ont pu être clonés dans pTZ19U pour les mêmes raisons évoquées plus tôt. Finalement, le transposant #46 présent sur la figure 22 n'a pas été analysé puisque son profile d'hybridation correspond exactement avec celui du

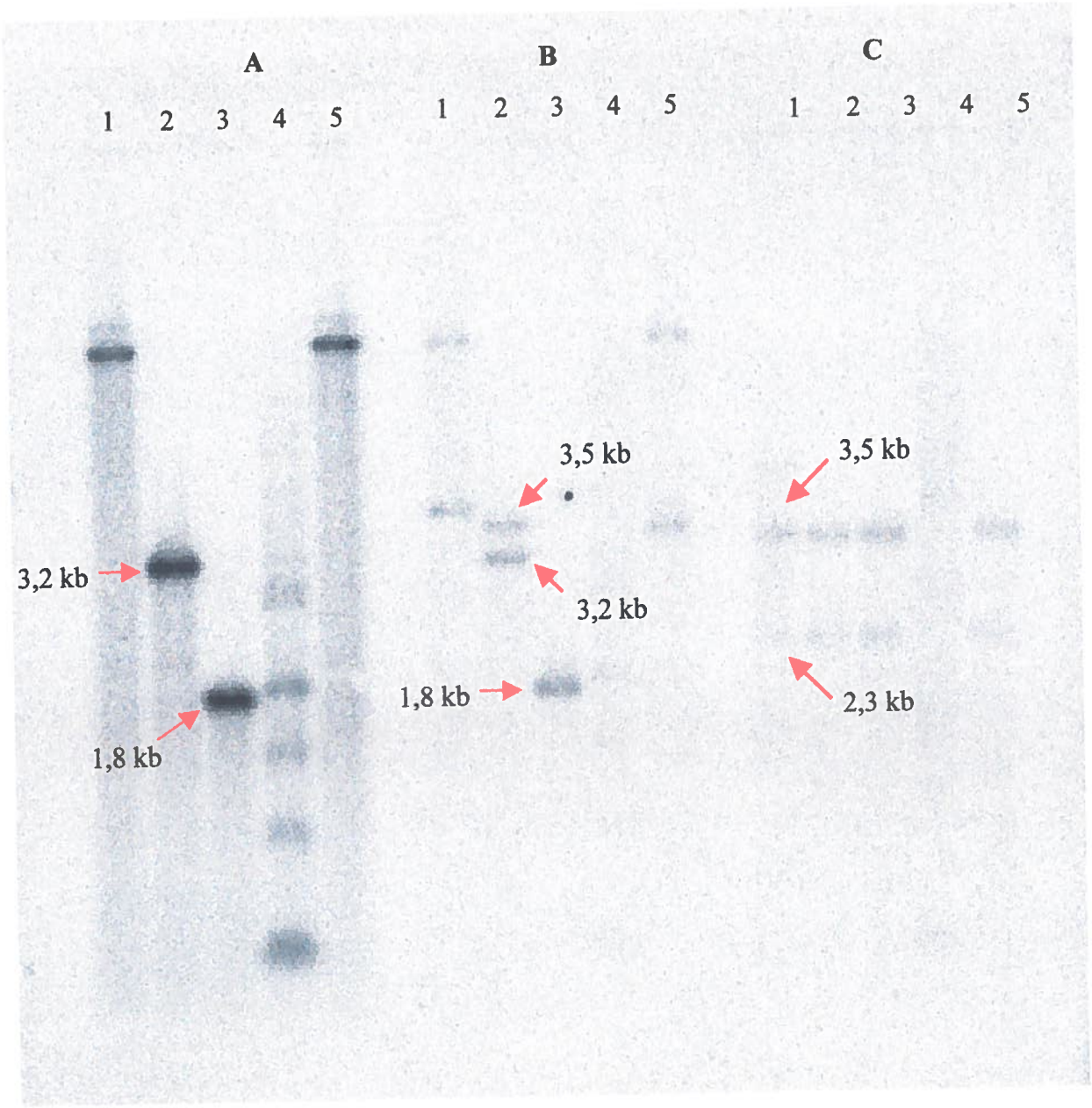


Figure 21. Hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #C, #20 et #22 digéré par plusieurs enzymes de restriction.

2,5 μg d'ADN ont été digérés et chargés dans chaque puits.A: #C, B: #20 et C:#22
Puits: (1) *Pvu*II, (2) *Pvu*II/*Bam*HI, (3) *Pvu*II/*Eco*RI, (4) *Pvu*II/*Sac*I, (5) *Pvu*II/*Xba*I

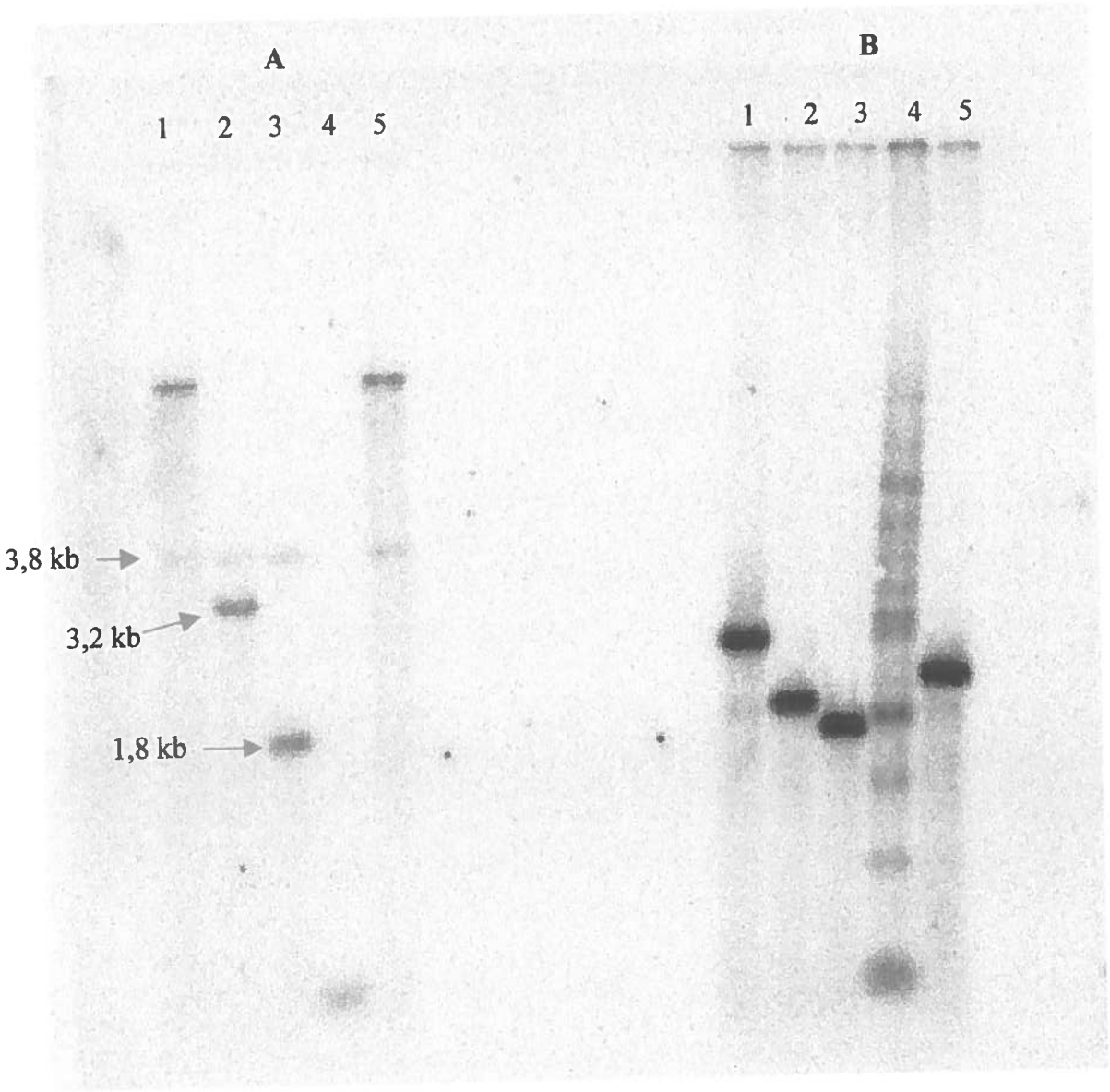


Figure 22. Hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #30 et #46 digéré par plusieurs enzymes de restriction.

2,5 μg d'ADN ont été digérés et chargés dans chaque puits.A: #30 et B: #46
Puits: (1) *Pvu*II, (2) *Pvu*II/*Bam*HI, (3) *Pvu*II/*Eco*RI, (4) *Pvu*II/*Sac*I, (5) *Pvu*II/*Xba*I

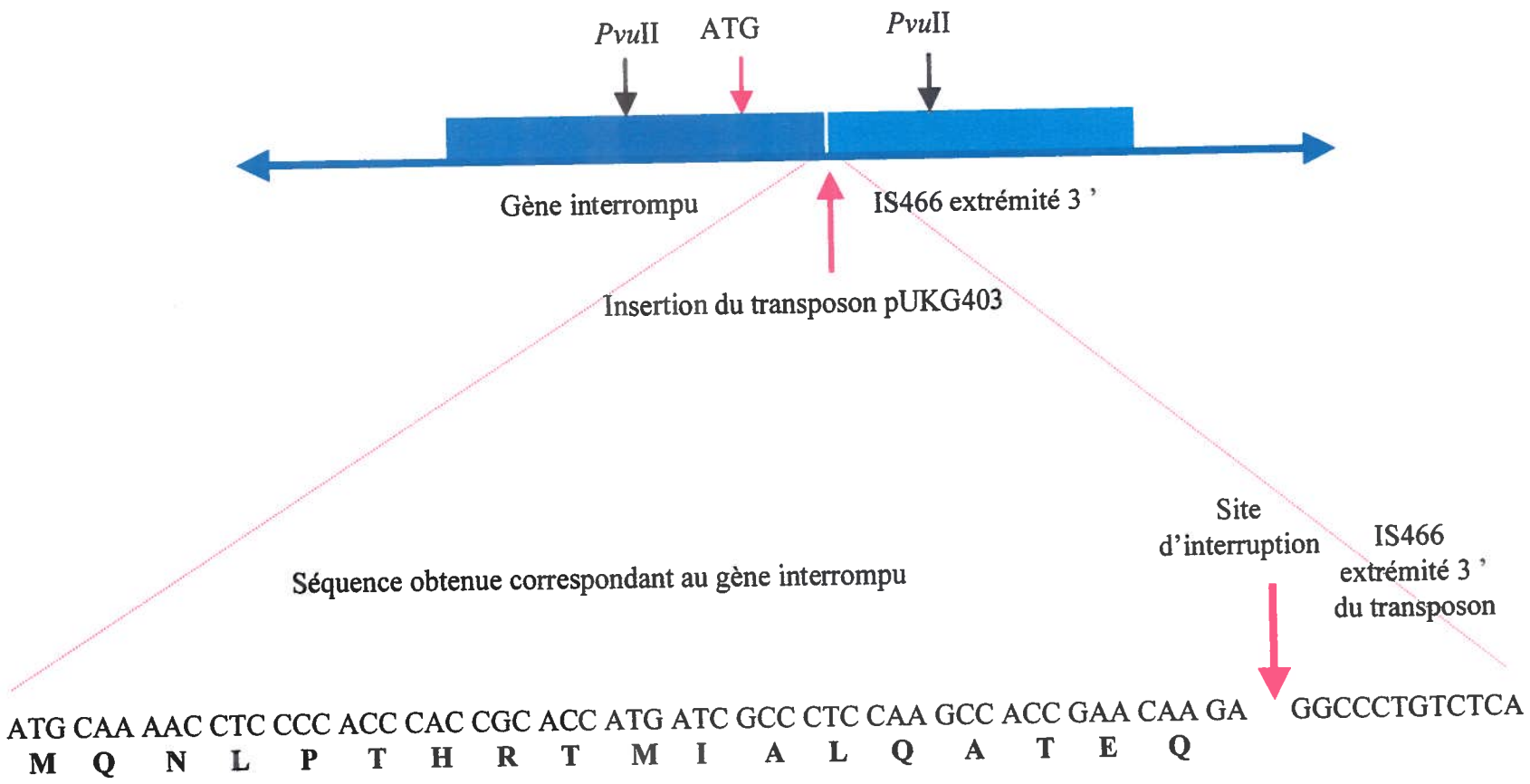


Figure 23. Séquence du gène interrompu du transposant #22

plasmide pUKG403 contenant le Tn5424. Ceci signifie qu'il n'y a pas eu de transposition et que le plasmide n'a pas été éliminé.

4.4.4 Transposants #29, #52 et #55

La figure 24 présente le profile d'hybridation pour les transposants #29, #52 et #55. Pour chaque transposant on peut observer la présence de fragments correspondant au plasmide pJOE2577, soit un fragment de 2,3 kb lorsque digéré par l'enzyme *Eco*RV seul et un autre fragment de 0,5 kb obtenu suite à la digestion double *Eco*RV/*Sac*I. Ceci indique la conservation du plasmide dans la cellule, possiblement dû à la stabilité du vecteur (Herron *et al.* 1999). Une des principales difficultés rencontrées lors de la mutagenèse par transposition est justement l'élimination du plasmide porteur du transposon. Les plasmides utilisés, pUKG403 et pJOE2577, sont décris comme ayant une origine de réplication thermosensible (Irnich et Cullum 1994; Volff et Altenbuchner 1997). Ainsi, lorsque la température est élevée à un niveau non permissif, soit 37°C pour le pUKG403 et 40°C pour le pJOE2577, le plasmide devrait en principe être éliminé. Toutefois, les expériences réalisées démontrent une plus grande stabilité des plasmides, phénomène observé par l'obtention d'une grande majorité de colonies résistantes à la kanamycine. De plus, Herron *et al.* (1999) ont également observé une certaine stabilité du pJOE2577 en comparaison avec leur plasmide, le pSIT151 comportant le Tn1792.

Le transposant #52 présente un fragment supplémentaire à 2,6 kb obtenu lors de la digestion double *Eco*RV/*Sac*I. Le transposant #55 présente deux fragments supplémentaires de 3,3 kb et 1,8 kb lorsque digéré par *Eco*RV seul alors que le transposant #29 présente un fragment supplémentaire de 3,2 kb lorsque digéré *Eco*RV et un fragment de 3,1 kb obtenu lors de la digestion double *Eco*RV/*Sac*I. Pour les mêmes raisons évoquées plus tôt aucun clonage dans pTZ19U n'a été réussi. Les transposants #53, #54, #56 et #57 n'ont pas été analysés puisque leur profile d'hybridation est identique au transposant #52. Ce résultat est probablement causé par un événement de transposition survenu très tôt car ces transposants proviennent de la même suspension de spores (Volff et Altenbuchner 1997).

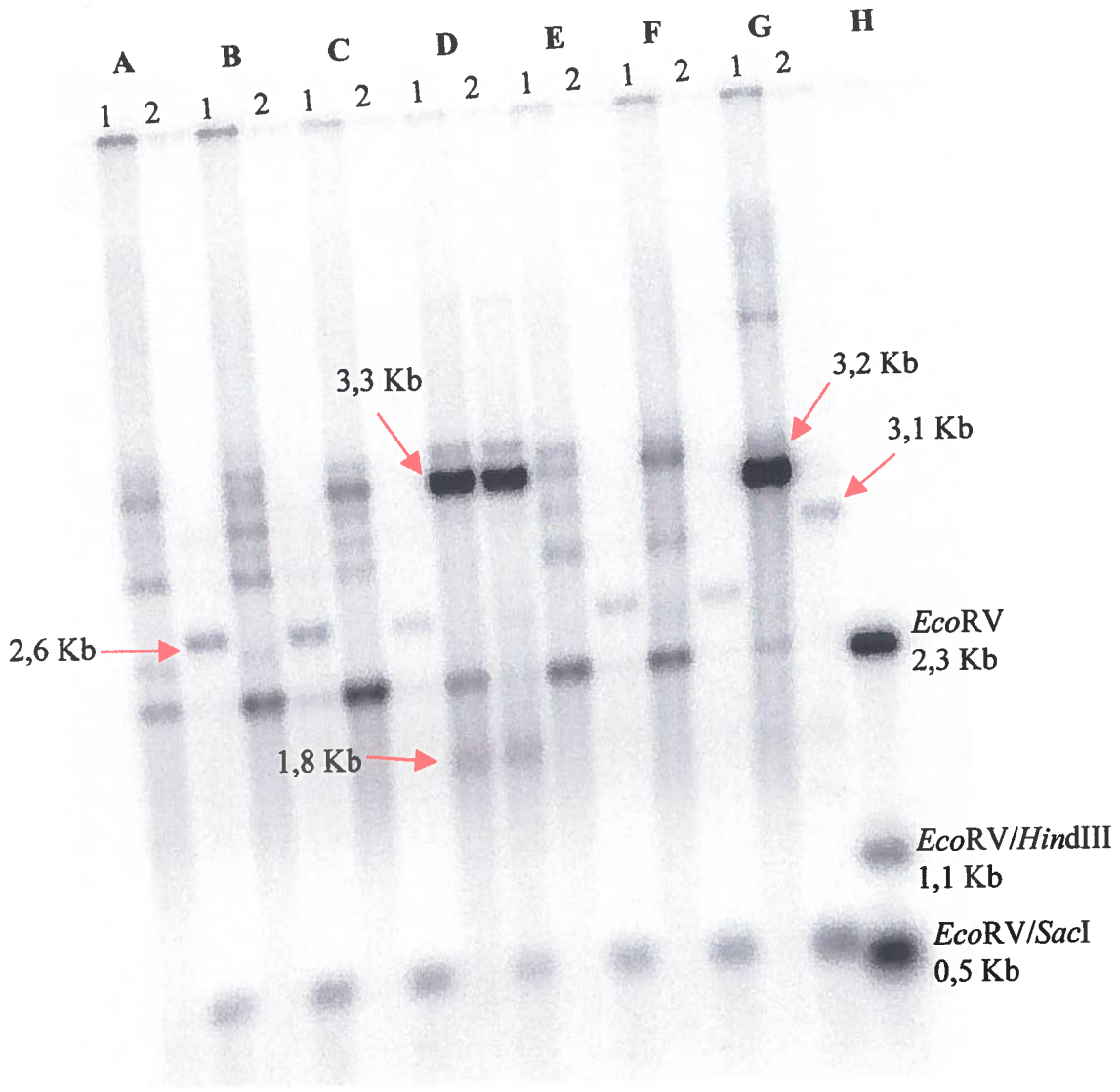


Figure 24. Hybridation de l'ADN chromosomique des transposants #52, #53, #54, #55, #56, #57 et #29 digéré par plusieurs enzymes de restriction.

2,5 μg d'ADN ont été digérés et chargés dans chaque puits.A: #52, B: #53, C: #54, D: #55, E: #56, F: #57, G: #29 et H: échelle du pJOE2577
Puits: (1) *Eco*RV, (2) *Eco*RV/*Sac*I

4.5 Évaluation biochimique de l'effet de la transposition

Les différents tests biochimiques effectués, soit la détermination de la croissance, de l'activité xylanolytique et le dosage des protéines du surnageant, permettent de déterminer quantitativement l'impact de la transposition sur le fonctionnement de la cellule et sur le système général de sécrétion en comparaison avec la souche IAF811-20. Pour pouvoir comparer les transposants avec la souche contrôle IAF811-20, les milieux de culture, composé du milieu minimal M14 supplémenté d'une source de carbone, ont été inoculés avec $2X10^6$ spores/mL. Les cultures ont été incubées durant 144 heures à 34°C et des échantillons en ont été prélevés aux 24 heures pour permettre d'effectuer les tests d'activité enzymatique, de mesurer la croissance et de doser les protéines extracellulaires de chaque transposant. Tous les tests ont été effectués en duplicata, et les écarts type ne sont pas présentés pour ne pas surcharger la présentation graphique.

4.5.1 Courbe de croissance du mycélium

La courbe de croissance du mycélium permet d'établir l'impact de la transposition sur la croissance des transposants et déterminer si le gène interrompu est impliqué d'une façon ou d'une autre dans la croissance. Le dosage de l'ADN permet également de s'assurer que les différences observées au niveau de la production de xylanase des transposants ne sont pas causées par des variations de la croissance des transposants mais bien par l'effet de la transposition. Le dosage de l'ADN total a été effectué à l'aide de la diphénylamine (section 3.13.2). L'ADN total de chaque transposant a été évalué à 24h, 48h, 72h, 96h et 144h. Le courbe de croissance des transposants #C, #20 et #30 sous différentes sources de carbone est présenté à la figure 25 a_1, b_1 et c_1. La courbe de croissance de chaque transposant et pour chaque source de carbone se divise en trois phases distinctes: une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire. Lorsque la source de carbone supplémentée est le xylane (figure 25 a_1) on observe une croissance plus rapide dans la première phase de croissance pour les transposants #20 et #30, pour ensuite avoir une croissance inférieure à la souche contrôle IAF811-20. Le transposant #C présente également une croissance plus lente. Des croissances très similaires sont observées en présence de xylose et de glucose (figure 25 b_1 et c_1). En

présence de xylane et de xylose on observe un ralentissement de la croissance à environ 96 heures ce qui correspond à la phase stationnaire. Pour sa part, le glucose disparaît du milieu en environ 48 heures, ainsi à 72 heures les cultures ont épuisé le glucose, on observe alors la fin de la croissance.

La culture du transposant #22 n'a pu être réalisé dans les mêmes conditions que les autres transposants puisqu'il ne produit pas de spores et que sa croissance en milieu minimal M14 est pratiquement nulle. La culture du transposant #22 a donc été effectuée dans un milieu plus riche afin de favoriser une meilleure croissance. Le milieu TSB contenant du peptone-tryptone et du bacto soytone s'avère être un milieu plus favorable à sa culture. La figure 26 a_1, b_1 et c_1 présente la croissance du transposant #22 pour les différentes sources de carbone. L'ADN total de ce transposant en comparaison avec la souche contrôle IAF811-20, a été évalué seulement à 24h, 48h et 72h, puisqu'en raison de l'absence de production de spores, l'inoculum de départ doit être du mycélium provenant d'une pré-culture, ce qui implique l'absence de la phase de latence dans la croissance. Les résultats montrent une meilleure utilisation à long terme du xylane par le transposant #22. En présence de xylose et de glucose on observe une croissance légèrement plus lente.

4.5.2 Activité xylanolytique

L'activité xylanolytique des différents transposants et de la souche IAF811-20 a été mesurée à partir des surnageants de culture en milieu minimal M14 supplémenté d'une source de carbone, soit le xylane, le xylose et le glucose. Le xylane et le xylose sont des sources de carbone favorables aux gènes du système général de sécrétion alors que le glucose a été utilisé pour évaluer l'effet de la transposition sur sa répression des gènes de ce système.

La production de xylanase de chaque transposant a été évaluée grâce à la méthode des sucres réducteurs (section 3.13.1). La figure 25 a_2, b_2 et c_2, illustre la quantité de xylanase sécrétée dans le surnageant de culture. En xylane (figure 25 a_2) on observe une plus faible production par les transposants #C et #30 possiblement dû à leur plus faible croissance en xylane, alors que le transposant #20 a une production légèrement supérieure

Figure 25. Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture de la souche IAF811-20 et des différents transposants, au cours du temps.

Les cultures de la souche IAF811-20 (—◆—) et des transposants #C (—■—), #20 (—▲—) et #30 (—×—) ont été effectuées à 34°C, en milieu minimal M14 supplémenté d'une source de carbone, soit le xylane (**a**), le xylose (**b**) et le glucose (**c**). La croissance du mycélium (**a_1, b_1 et c_1**) a été estimée par le dosage de l'ADN total à la diphénylamine et exprimée par la différence entre la densité optique à 595 nm et la densité optique à 700 nm (DO_{595}-DO_{700}).

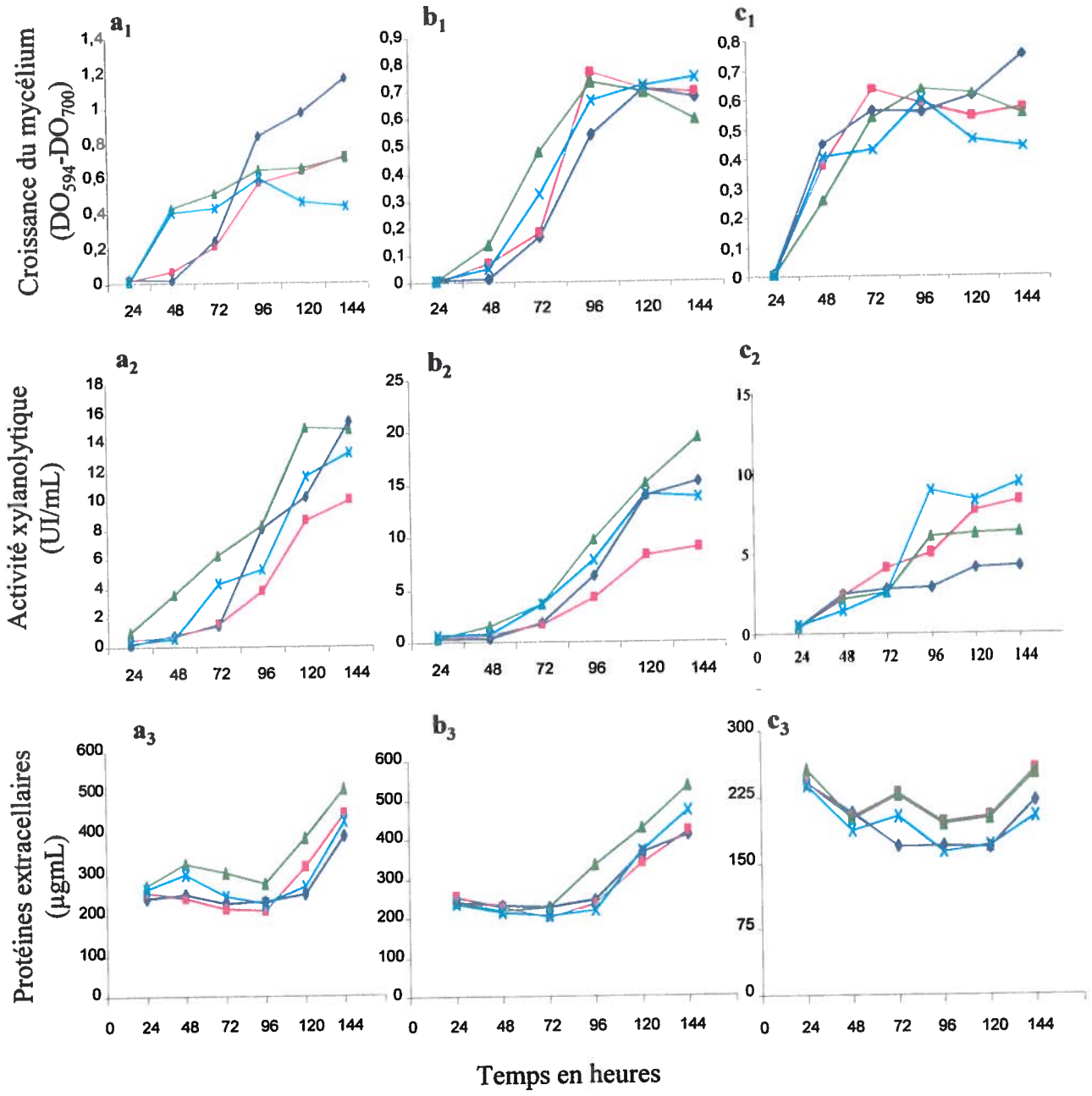
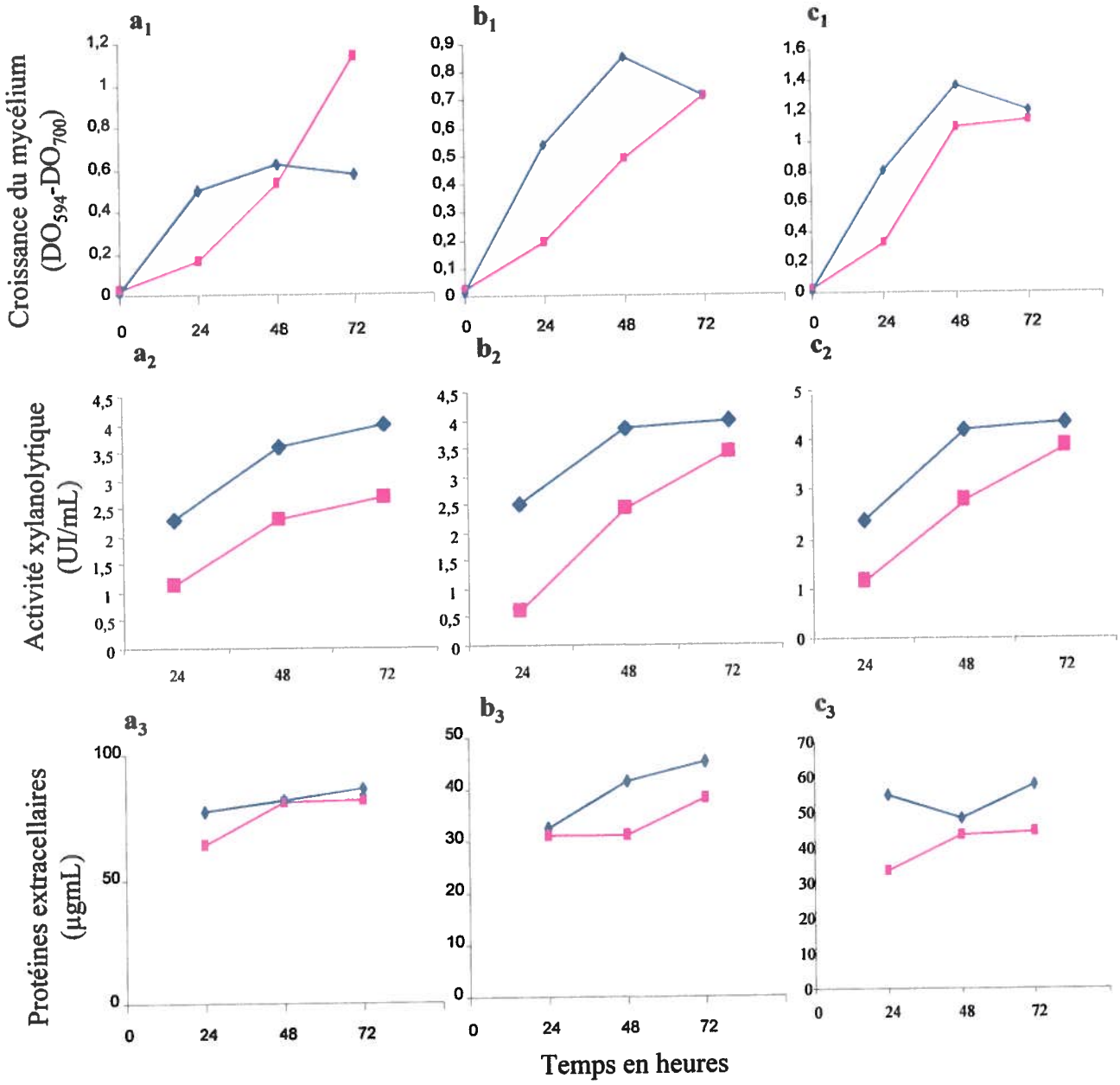

a1
b1
c1
Croissance du mycélium
(DO594-DO700)
a2
b2
c2
Activité xylanolytique
(UI/mL)
a3
b3
c3
Protéines extracellaires
(µgmL)
Temps en heures

Figure 26. Croissance du mycélium, mesure de l'activité xylanolytique et dosage des protéines dans le surnageant de culture de la souche IAF811-20 et du transposant #22, au cours du temps.

Les cultures de la souche IAF811-20 (—◆—) et du transposant #22 (—■—) ont été effectuées à 34°C, en milieu TSB supplémenté d'une source de carbone, soit le xylane (**a**), le xylose (**b**) et le glucose (**c**). La croissance du mycélium (**a_1, b_1 et c_1**) a été estimée par le dosage de l'ADN total à la diphénylamine et exprimée par la différence entre la densité optique à 595 nm et la densité optique à 700 nm (DO_{595}- DO_{700}). L'activité xylanolytique (**a_2, b_2 et c_2**) présente dans le surnageant de culture de chaque transposant a été évaluée par la méthode des sucres réducteurs. Elle est exprimée en unités internationales par millilitre (UI/mL). Le dosage des protéines (**a_3, b_3** et **c_3**) a été estimé par la méthode de Bradford et exprimé en µg/mL.


a1
b1
c1
Croissance du mycélium
(DO594-DO700)
a2
b2
c2
Activité xylanolytique
(UI/mL)
a3
b3
c3
Protéines extracellaires
(µgmL)
Temps en heures

à la souche IAF811-20 et ce malgré une croissance similaire au transposant #C qui lui présente une plus faible croissance. En présence de xylose (figure 25 b_2) la production est très similaire pour les transposants #20 et #30 et la souche IAF811-20 alors que le transposant #C a une production inférieure, malgré une croissance similaire aux autres transposants. En glucose (figure 25 c_2) les transposants se comportent de façon similaire pour les premières 72 heures. Ensuite, tout les transposants présentent une activité nettement supérieure à la souche contrôle. C'est le transposant #30 qui présente la meilleure activité et ce malgré sa croissance légèrement inférieure aux autres transposants. Ces résultats indiquent que ces transposants semble moins réprimés par le glucose.

L'activité xylanolytique du transposant 22 est présenté à la figure 26 a_2, b_2 et c_2. De façon générale la production de xylanase est inférieure à la souche contrôle pour les trois sources de carbone.

4.5.3 Dosage des protéines du surnageant de culture

Le dosage des protéines du surnageant permet de déterminer si la mutation causée par le transposon affecte la sécrétion des protéines bactériennes dans son ensemble ou s'il s'agit d'un phénomène spécifique à la xylanase. Les protéines du surnageant ont été dosées par la méthode de Bradford (section 3.13.3). La figure 25 a_3, b_3 et c_3 montre la quantité de protéines produites au cours du temps pour les trois sources de carbone utilisées. En présence de xylane (figure 25 a_3), on observe une quantité de protéines similaire pour tout les transposants avec une quantité légèrement supérieure pour les transposants #20 et #30 pour les premières 72h, et qui est à mettre en relation avec une croissance plus rapide au cours de cette période. En présence de xylose et de glucose (figure 25 b_3 et c_3) la quantité de protéines est semblable pour tous les transposants incluant la souche contrôle IAF811-20.

Pour le transposant #22, la quantité de protéines dosée présentée à la figure 26 a_3, b_3 et c_3, est légèrement inférieure à la souche contrôle pour toutes les sources de carbone.

Ceci est possiblement causé par sa croissance plus faible, ce qui implique une moins grande quantité de protéines produites.

4.5.4 Interprétations des résultats

Les résultats obtenus par ces différents tests biochimiques sont plutôt difficile à interpréter mais peuvent s'expliquer par différentes hypothèses. Tout d'abord, les transposants #20, #22 et #30 semblent posséder une double intégration du transposon dans leur génome, phénomène observé par l'hybridation de deux fragments pour une même digestion. Toutefois, pour chacun de ces transposants un seul gène interrompu a été identifié. On peut alors supposer que l'effet sur la croissance ou sur l'activité enzymatique serait causé par la mutation du gène non identifié, et par le fait même déduire que ce gène serait possiblement impliqué dans le système général de sécrétion. En plus, pour les transposants #20 et #30 une des deux mutations est la même mais ils se comportent de façon différente. Ceci peut également s'expliquer par la double intégration du transposon mais par l'interruption d'un gène différent pour chacun. En ce qui concerne le gène interrompu et identifié, nous avons observé les gènes situés de part et d'autre du gène interrompu afin de voir si la mutation pouvait affecter le promoteur d'un gène situé à proximité. En aval, on retrouve le gène codant pour une transposase de l'IS460 et en amont le gène codant pour la transposase de l'IS469 et étant une cible possible impliquée dans la régulation du gène *bldA*.

Ensuite, dans le cas du transposant #22, l'interruption d'une polykétide synthase de type I, gène relativement important pour la survie de la bactérie, peut possiblement avoir un effet sur le métabolisme secondaire de la bactérie, ce qui pourrait entre autre expliquer l'absence de sporulation, ce qui a un effet d'enchaînement comme une croissance plus lente et une plus faible production de xylanase.

5. CONCLUSION

Étant donné le nombre croissant d'applications biotechnologiques possibles pour l'expression et la sécrétion de protéines homologues et hétérologues par les streptomycètes, il est impératif d'approfondir les connaissances du système général de sécrétion, afin d'en améliorer l'exploitation. Jusqu'à présent, les résultats obtenus ne permettent pas d'établir une relation simple ou directe avec le système général de sécrétion. À première vue, les gènes interrompus ne semblaient pas impliqués dans le système général de sécrétion et de plus dans certain cas la nature de l'interruption n'a pu être identifiée. Cependant, le système utilisé, soit le gène *xylanaseA* précédé du long peptide signal de la cellulaseA, sous le contrôle du promoteur *secA*, comme protéine modèle semble efficace et prometteur. Par contre, l'utilisation de la mutagenèse par transposition apparaît plutôt difficile à réaliser soit par sa faible fréquence et par l'élimination laborieuse du plasmide porteur, ce qui diminuent d'autant la probabilité d'atteindre un gène en relation avec le système général de sécrétion. Bien que la méthode de mutagenèse par transposition soit une méthode de choix pour l'analyse des gènes, peu d'études chez les streptomycètes utilisant le système de transposition ont été réalisées jusqu'à présent. Il faudrait donc améliorer le vecteur de transposition essentiellement dans l'étape de l'élimination du plasmide dans la souche, par l'utilisation d'une meilleure séquence suicide.

L'étape de sélection des transposants par l'analyse et la comparaison des phénotypes observés par l'apparition d'une zone claire autour des colonies du milieu RBB-xylane permet la sélection des transposants intéressants. Toutefois, il faudrait trouver un moyen de repiquer les transposants de façon à ce que la grosseur de la colonie ne soit pas un facteur additionnel dans l'évaluation de la grosseur de la zone. Il faudrait pour cela inoculer des spores de chacun des transposants et suivre leur développement. La difficulté réside cependant dans le fait que certains transposants ne sporulent pas très bien ou pas du tout, ce qui réduit d'autant la validité de cette approche.

D'autres techniques de mutagenèse pourraient être envisagées comme l'utilisation d'un agent chimique comme la nitrosoguanidine, technique puissante mais n'offrant aucune possibilité de déterminer le site muté, à moins de retransformer ces souches mutantes avec une banque d'ADN pour recouvrer le phénotype initial. C'est une étape

longue et laborieuse. La mutagenèse dirigée pourrait également être utilisée advenant l'identification de gènes régulateurs de la sécrétion ou impliqués dans le système général de sécrétion à partir de séquences connues repérés dans le génome de *Streptomyces coelicolor*, dont le séquençage devrait se terminer sous peu. Il s'agit alors d'effectuer une dislocation génétique du gène identifié à l'aide d'un plasmide intégratif tel que le pGM160, contenant des portions de séquences du gène à disloquer (Muth *et al.* 1989).

Nous croyons qu'il serait intéressant de poursuivre les travaux afin de tenter d'interrompre des gènes qui pourraient être impliqués dans le système général de sécrétion. Par contre certaines modifications devraient être apportées. Il faudrait sélectionner uniquement les transposants ayant éliminés le plasmide portant le transposon et tenter de trouver les conditions optimales rendant son élimination plus facile. De plus, l'utilisation du plasmide pSIT151, portant le transposon Tn1792, pourrait être envisagée. Ce transposon vient d'être mis au points récement et est décrit comme étant moins stable que ces prédécesseurs (Herron *et al.* 1999).

Finalement, cette technique de mutagenèse pourrait être utilisée pour l'étude d'un autre système de sécrétion, le système TAT (twin-arginine-translocation), système de sécrétion nouvellement identifié (Berks *et al.* 2000). En utilisant par exemple comme gène rapporteur celui de la xylanase C qui est uniquement sécrété par le système TAT et sous le contrôle du promoteur d'un des facteurs impliqués dans le système TAT par exemple le promoteur du gène *tatA*. Dans cette étude le système de transposition pourrait être utilisé de façon analogue à ce travail.

6. REMERCIEMENTS

La réalisation de ma maîtrise n'aurait pas été la même sans la présence de plusieurs personnes. Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Rolf Morosoli pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire et pour m'avoir fait progresser au niveau scientifique et personnel.

Je remercie également Serge Durand pour sa grande générosité, ses rires, son support technique et moral ainsi que pour les bonnes discussions sur tout et sur rien. Peut-être aurais-je un jour la chance d'aller pêcher avec toi et au plaisir de te revoir au Dieu du Ciel !!!

Merci également à Johanne pour son aide, sa simple présence et ses bonbons, et aux compagnons du groupe, Stéphanie ma voisine de labo, Donald, Patrick, Pascal, Marco et Marie-Claude, pour tous les bons moments partagés. Julie et les Boys : Christian, Frank, Jean-Stéphane, Mathieu, Pascal et Patrick merci pour votre soutien et votre affection, dans les bons et les mauvais moments, toujours très apprécié.

Ma gratitude et ma reconnaissance aux membres de ma famille, Monique, Jean, Marie, Isabelle et Benoît pour leur soutien inconditionnel.

7. LISTE DES RÉFÉRENCES

Akiyama, Y. et Ito, K. 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6**: 3465-3470.

Alegre, M.-T., Cournoyer, B., Mesas, J.-M., Guérineau, M., Normand, P. et Pernodet, J.-L. 1994. Cloning of *Frankia* species putative $tRNA^{Pro}$ genes and their efficacy for pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces lividans*. *App. Environ. Microbiol.* **60**: 4279-4283.

Arkowitz, R.A. et Wickner, W. 1994. SecD and SecF are required for proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *EMBO J.* **13**: 954-963.

Berks, B.C., Sargent, F. et Palmer, T. 2000. The TAT protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**: 260-274.

Bieker-Brady, K. et Silhavy, T.J. 1992. Suppressor analysis suggest a multistep, cyclic mechanism for protein secretion in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**: 3165-3174.

Boccard, F., Pernodet, J.-L., Friedmann, A. et Guérineau, M. 1988. Site-specific integration of plasmid pSAM2 in *Streptomyces lividans* and *S. ambofaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 432-439.

Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.-L., Friedmann, A. et Guérineau, M. 1989. Structural analysis of loci involved in pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces*. *Plasmid.* **21**: 59-70.

Bolhuis, A., Broekhuizen, C.P., Sorokin, A., van Roosmalen, M.L., Venema, G., Bron, S., Quax, W.J. et van Dijl, J.M. 1998. SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J. Biol. Chem.* **273**: 21217-21224.

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

Breukink, E., Nouwen, N., van Raalte, A., Mizushima, S., Tommassen, J. et De Kruijff, D. 1995. The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and Sec B binding. *J. Biol. Chem.* **270**: 7902-7907.

Brown, K.L., Wood, S. et Buttner, M.J. 1992. Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): renaturation of a sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* **6**: 1133-1139.

Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J.M. et Wickner, W. 1990. The purified *Escherichia coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for

reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**: 649-657.

Burton, K. 1956. A study on the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction fot the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**: 315-323.

Buttner, M.J., Fearnly, I.M. et Bibb, M.J. 1987. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 101-109.

Buttner, M.J., Smith, A.M. et Bibb, M.J. 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell.* **52**: 599-607.

Buttner, M.J. 1989. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **3**: 1653-1659.

Calos, M.P. et Miller, J.H. 1980. Transposable elements. *Cell* **20**: 579-595.

Cerretti, D.P., Dean, D., Davis, G.R., Bedwell, D.M. et Nomura, M. 1983. The *spc* ribosomal operon of *Escherichia coli*: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. *Nucl. Ac. Res.* **11**: 2599-2616.

Chen, C.W., Yu, T.-W., Chung, H.-M. et Chou, C.-F. 1992. Discovery and characterization of new transposable element, Tn4811, in *Streptomyces lividans* 66. *J. Bacteriol.* **174**: 7762-7769.

Den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J.G., Kuiper, W. et Driessen, A.J.M. 1996. Domain interactions of the peripheral preprotein translocase sunbunit SecA. *Biochemistry* **35**: 11994-12004.

Dennis, C. et Bremer, F. 1974. Differential rate of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* **84**: 407-422.

Derbyshire, K.M. et Gringley, N.D.F. 1986. Replicative and conservative transposition in bacteria. *Cell* **47**: 325-327.

Derbyshire, K.M., Hwang, L. et Gringley, N.D. 1987. Genetic analysis of the interaction of the insertion sequence IS903 transposase with ist terminal inverted repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 8049-8053.

Dolan, K.M. et Oliver, D.B. 1991. Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation. *J. Biol. Chem.* **266**: 23329-23333.

Doolittle, W.F., Kirkwood, T.B. et Dempster, M.A. 1984. Selfish DNAs with self-restraint. *Nature* **307**: 501-502.

Douville, K., Price, A., Eichler, J., Economou, A. et Wickner, W. 1995. SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **270**: 20106-20111.

Downing, W.L., Sullivan, S.L., Gottesman, M.E. et Dennis, P.P. 1990. Sequence and transcriptional pattern of the essential *Escherichia coli secE-nuG* operon. *J. Bacteriol.* **172**: 1621-1627.

Driessen, A.J.M., Fekkes, P. et van der Walk, C. 1998. The Sec system. *Cur. Opi. Microbiol.* **1**: 216-222.

Duong, F. et Wickner, W. 1997a. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* **16**: 2756-2768.

Duong, F. et Wickner, W. 1997b. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA mebrane cycling. *EMBO J.* **16**: 4871-4879.

Economou, A. et Wickner, W. 1994. Sec A promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**: 835-843.

Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B. et Wickner, W. 1995. SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**: 1171-1181.

Economou, A. 1998. Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol. Microbiol.* **27**: 511-518.

Economou, A. 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends microbiol.* **7**: 315-320.

Engels, J.W. et Koller, K.-P. 1992. Gene expression and secretion of eukaryotic foreign proteins in *Streptomyces*, in *Transgenesis*, Murray, J.A.H. Ed., John Wiley & sons, New York.

Fekkes, P., van der Does, C. et Driessen, AJM. 1997. The molecular chaperone Sec B is released from the carboxy-terminus of Sec A during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16**: 6105-6113.

Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. et Beckwith, J. 1990. The *SecD* locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **9**: 3209-3216.

Georgopoulos, C. and Welch, W.J. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 601-634.

Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. et Kluepfel, D. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit. Rev. Biotech.* **15**: 13-39.

Gilbert, M., Ostiguy, S., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1996. Cloning of a *secA* homolog from *Streptomyces lividans* 1326 and overexpression in both *S. lividans* and *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1296**: 9-12.

Grindley, N.D. 1978. IS1 Insertion generates duplication of a nine basepair sequence at its target site. *Cell* **13**: 419-426.

Hale, V.A., O'brien, I et Schottel, J. 1995. Cloning and sequencing of a *secY* homolog from *Streptomyces scabies*. *Gene* **163**: 87-92.

Hanada, M., Nishiyama, K., Mizushima, S. et Tokuda, H. 1994. Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising secA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J. Biol. Chem.* **269**: 23625-23631.

Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P. et Wickner, W. 1990. The binding casade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to *Escherichia coli* plasma membrane. *Cell* **63**: 269-279.

Herron, P.R., Meirwyn, C.E. and Dyson, P.J. 1999. Low target site specificity of an IS3100-based mini-transposon, Tn1792, developed for transposon mutagenesis of antibiotic-producing *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**: 215-221.

Hobbs, G., Frazyr, C., Gardner, C.J., Cullum, J.A. et Oliver, S.G. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 272-277.

Hopwood, D.A. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiol.* **145**: 2183-2202.

Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1995. A cellulase/xylanase negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homolgous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **17**: 367-377.

Irnich, S. et Cullum, J. 1994. Construction of Tn5424 – A new transposon for *Streptomyces*. *Biotechnol. Let.* **16**: 437-442.

Ito, K. 1990. Structure, function, and biogenesis of SecY, an integral membrane protein involved in protein export. *J. bioener. Biomemb.* **22**: 353-367.

Jeong, S.M., Yoshikawa, H. et Takahashi, H. 1993. Isolation and characterization of the SecE homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**: 133-142.

Joly, J.C. et Wickner, W. 1993. The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.* **12**: 255-263.

Johnson, R.C. et Reznikoff. 1983. DNA sequences at the ends of transposon Tn5 required for transposition. *Nature* **304**: 280-282.

Kang, S.K., Kudo, T. et Horikoshi, K. 1992. Molecular cloning and characterization of an alkalophilic *Bacillus* sp. Ca/25 gene homologous to *Bacillus subtilis* secY. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1365-1370.

Kaufmann, A., Manting, E.H., Veenendaal, A.K.J., Driessen, A.J.M. et van der Does, C. 1999. Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE. *Biochem.* **38**: 9115-9125.

Kihara, A., Akiyama, Y. et Ito, K. 1995. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4532-4536.

Kim, Y.J., Rajapandi, T. et Oliver, D. 1994. SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the *E. coli.* inner membrane in its active state. *Cell* **78**: 845-853

Kieser, H.M., Kieaser, T. et Hopwood, D.A. 1992. A combined and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 5496-5507.

Kieser, T., Bibb, J., Buttner, M.J., Chater, K.F. et Hopwood, D.A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, Noreich

Kiser, K.B. et Schmidt, M.G. 1999. Regulation of *Escherichia coli secA* gene is mediated by two distinct RNA structural conformations. *Curr. Microbiol.* **38**: 113-121.

Kleckner, N. 1981. Transposable elements in prokaryotes. *Ann. Rev. Genet.* **15**: 341-404.

Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou, F. et Morosoli, R. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 230-234.

Khosla, C., Gokhale, R.S., Jacobsen, J.R. et Cane, D.E. 1999. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Ann. Rev. Biochem.* **68**: 219-253.

Kumamoto, C.A., Chen, L., Frandl, J. et Tai, P.C. 1989. Purification of the *Escherichia coli* secB gene product and demonstration of its activity in an in vitro protein translocation system. *J. Biol. Chem.* **264**: 2242-2249.

Kumamoto, C.A. 1990. SecB protein: a cytosolic export factor that associates with nascent exported proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 337-351.

Kumamoto, C.A. et Francetic, O. 1993. Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein *in vivo*. *J. Bacteriol.* **175**: 2184-2188.

Kuhstoss, S., Richardson, M.A. et Raon, N. 1989. Site-specific integration in *Streptomyces ambofaciens*: localization of integration functions in *S. ambofaciens* plasmid pSAM2. *J. Bacteriol.* **171**: 16-23.

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

Leblond, P., Redenbach, M. et Cullum, J. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **175**: 3422-3429.

Lill, R., Cunninghan, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D. et Wickner, W. 1989. SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**: 961-966.

Lin, Y.-S., Kieser, H.M.,Hopwood, D.A. et Chen, C.W. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **10**: 923-933.

Liu, Z. and Mishra, NC. 1995 Single-tube method for plasmid miniprep from large numbers of clones for direct screening by size or restriction digestion. *Biotechniques* **18**: 214-7.

Mahillon, J. et Chandler, M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725-774.

Makris, J.C., Nordmann, P.L. et Reznikoff, W.S. 1988. Mutational analysis of insertion sequence 50 (IS50) and transposon (Tn5) ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 2224-2228.

Manting, E.H., Kaufmann, A., van der Does, C. et Driessen, A.J.M. 1999. A single amino acid substitution in SecY stabilizes the interaction with SecA. *J. Biol. Chem.* **274**: 23868-23874.

Matsumoto, G., Yoshihisa, T. et Ito, K. 1997. Sec Y and Sec A interact to allow Sec A insertion and protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *EMBO J.* **16**: 6384-6393.

Matsumoto, G., Mori, H. et Ito, K. 1998. Roles of SecG in ATP- and SecA-dependant protein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13567-13572.

Matsuyama, S., Kimura, E. et Mizushima, S. 1990a. Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of *Escherichia coli*, allows ATP binding to its amino-terminal region. *J. Biol. Chem.* **265**: 8760-8765.

Matsuyama, S., Akimura, J. et Mizushima, S. 1990b. SecE-dependent overproduction of SecY in *Escherichia coli*. Evidence for interaction between two components of the secretory machinery. *FEBS Lett.* **269**: 96-100.

Matsuyama, S., Fujita, Y., Sagara, K. et Mizushima, S. 1992. Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1122**: 77-84

Matsuyama, S., Fujita, Y. et Mizushima, S. 1993. SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 265-270.

Mazodier, P., Thompson, C. et Boccard, F. 1990. The chromosomal integration site of *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 431-434.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent fot determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

Mitchell, C. et Oliver, D.B. 1993. Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.* **10**: 483-497.

Miyake, K., Onaka, H., Horinouchis, S. et Beppu, T. 1994. Organization and nucleotide sequence of the secE-nusG region of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1 217**: 97-100.

Mizuuchi, K. 1992a. Polynucleotidyl transfer reactions in transpositional DNA recombination. *J. Biol. Chem.* **267**: 21273-21276.

Mizuuchi, K. 1992b. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1011-1051.

Morosoli, R., Sharek. F. et Kluepfel, D. 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 167-174.

Morosoli, R., Ostiguy, S. et Dupont, C. 1999. Effect of carbon source, growth and temperature on the expression of the *sec* genes of *Streptomyces lividans* 1326. *Can. J. Microbiol.* **45**: 1043-1049.

Murphy, C.K. et Beckwith, J. 1994. Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proc. Natl. Sci. USA* **91**: 2557-2561.

Murphy, C.K., Stewart, E.J. et Beckwith, J. 1995. A double counter-selection for the study of null alleles of essential genes in *Escherichia coli*. *Gene*. **155**: 1-7

Muth, G., Wohlleben, W. et Pühler, A. 1988. The minimal replicon of the *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5 identified by subcloning and Tn5 mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 424-429.

Muth, G., Nuβbaumer, B., Wohlleben, W et Pühler, A. 1989. A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 341-348.

Nishiyama, K., Mizushima, S. et Tokuda, H. 1993. A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 3409-3415.

Nishiyama, K., Hanada, M. et Tokuda, H. 1994. Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**: 3272-3277.

Nishiyama, K., Suzuki, T. et Tokuda, H. 1996. Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**: 71-81.

Oliver, D.B. et Beckwith, J. 1982a. Identification of a new gene (*secA*) and gene product involved in the secretion of envelope proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **150**: 686-691.

Oliver, D.B. et Beckwith, J. 1982b. Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell*. **30**: 311-319

Oliver, D.B., Cabelli, R.J. et Jarosik, G.P. 1990. SecA protein: autoregulated initiator of secretory precursor protein translocation across the E. coli plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr.* **22**: 311-36.

Oliver, D.B., Norman, J. et Sarker, S. 1998. Regulation of *Escherichia coli secA* by cellular protein secretion proficiency requires an intact gene X signal sequence and an active translocon. *J. Bacteriol.* **180**: 5240-5242.

Omer, C.A. et Cohen, S.N. 1986. Structural analysis of plasmid and chromosomal loci involved in site-specific excision and integration of the SLP1 element of Streptomyces coelicolor. *J. Bacteriol.* **166**: 999-1006.

Ostiguy, S., Gilbert, M., Sharek, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1996. Cloning and sequencing of the *secY* homolog from *Streptomyces lividans* 1326. *Gene* **176**: 265-267.

Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F. et Morosoli, R. 1996. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 109-114.

Park, J.S., Liu, G., Topping, T.B., Cover, W.H. et Randall, L.L. 1988. Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* **239**: 1033-1035.

Pernodet, J.-L., Simonet, J.-M. et Guérineau, M. 1984. Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens* free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 35-41.

Pogliano, J.A. et Beckwith, J. 1994a. SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13**: 554-561.

Pogliano, K.J. et Beckwith, J. 1994b. Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli secD* operon and its products. *J. Bacteriol.* **176**: 804-814.

Pöhling, S., Piepersberg, W. et Wehmeier, U.F. 1999. Analysis and regulation of the *secY* gene from *Streptomyces griseus* N2-3-11 and interaction of the SecY protein with the SecA protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **147**: 298-302.

Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.

Puttikhunt, C., Nihira, T. et Yamada, Y. 1995. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *nusG* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2), wich encodes a putative transcriptional antiterminator. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 118-122.

Rajapandi, T., Dolan, K.M. et Oliver, D.B. 1991. The first gene in the *Escherichia coli* secA operon, gene X, encodes a nonessential secretory protein . *J Bacteriol.* **173**: 7092-7097.

Randall, L.L. et Hardy, S.J.S. 1995. Hight selectivity with low specificity: how Sec B has solved the paradox of chaperone binding. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 65-69.

Randall, L.L., Topping, T.B., Hardy, S.J., Pavlov, M.Y., Freistroffer, D.V. et Ehrenberg, M. 1997. Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denaturated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 802-807.

Raynal, A., Tuphile, K, Gerbaud, C., Luther, T., Guérineau, M. et Pernodet, J.-L. 1998. Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: functional analysis in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* **28**: 333-342.

Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H et Hopwood, D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96.

Reiter, W.-D., Palm, P. et Yeats, S. 1989. Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. *Nucl. Ac. Res.* **17**: 1907-1914.

Saedler, H. et Gierl, A. 1996. Transposable elements. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **204**.

Sagara, K., Matsuyama, S.-I. et Mizushima, S. 1994. SecF stabilizes SecD and SecY, components of the protein translocation machinery of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **176**: 4111-4116.

Salavati, R. et Oliver, D. 1997. Identification of elements on gene*X-secA* RNA of *Escherichia coli* required for SecA binding and *secA* autoregulation. *J. Mol. Biol.* **265**: 142-152.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ième Édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklein, S. et Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5 463-5 467.

Schatz, P.J., Bieker, K.L., Ottemann, K.M., Silhavy, T.J. et Beckwith, J. 1991. One of three transmembrane stretches is sufficient for functioning of the SecE protein, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion machinery. *EMBO J.* **10**: 1749-1757.

Schauer, A.T., Nelson, A.D. et Daniel, J.B. 1991. Tn4563 transposition in *Streptomyces coelicolor* and its application to isolation of new morphological mutants. *J. Bacteriol.* **173**: 5060-5067.

Schiebel, E., Driessen, A.J., Hartl, F.U. et Wickner, W. 1991. Delta mu H+ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**: 927-939.

Schmidt, M. et Oliver, D.B. 1989. SecA protein autogenously represses its own translation during normal protein secretion in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **171**: 643-649.

Schmidt, M.G., Dolan, K.M. et Oliver, D.B. 1991 Regulation of *Escherichia coli* secA mRNA translation by a secretion-responsive element. *J Bacteriol.* **173**: 6605-6611.

Seoh, H.K. et Tai, P.C. 1997. Carbon source-dependent synthesis of SecB, a cytosolic chaperone involved in protein translocation across *Escherichia coli* membranes. *J. Bacteriol.* **179**: 1077-1081.

Smith, V.F., Hardy, S.J.S. et Randall, L.L. 1997. Determination of the binding frame of the chaperone Sec B within the physiological ligand oligopeptide-binding protein. *Prot. Sci.* **6**: 1746-1755.

Solenberg, P.J. et Baltz, R.H. 1994. Hypertransposing derivatives of the streptomycete insertion sequence IS493. *Gene* **147**: 47-54.

Song, J., Kanazawa, I., Sun, K., Murata, T. and Yokoyama, KK. 1999. Removal of ethidium bromide and cesium chloride from plasmid DNA by ethanol precipitation. *BioTechniques* **26**:1056-1060.

Strohl, W.R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucl. Ac. Res.* **20**: 961-974.

Taura, T., Baba, T., Akiyama, Y et Ito, K. 1993. Determinants of the quantity of the stable SecY complex in the *Escherichia coli* cell. *J. Bacteriol.* **175**: 7771-7775.

Taura, T., Akiyama, Y et Ito, K. 1994. Genetic analysis of SecY: additional export-defective mutations and factors affecting their phenotypes. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 261-269

Travers, A.A. 1987. Structure and function of *Escherichia coli* promoter DNA. *Crit. Rev. Biochem.* **22**: 181-219.

VanBogelen, R. A., Sankar, P., Clark, R.L., Bogan, J.A. et Neidhardt, F.C. 1992. The gene-protein database of *Escherichia coli* : edition 5. *Electrophoresis* **13**: 1013-1054.

van der WolK, J.P.W., de Wit, J.G. et Driessen A.J.M. 1997. The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J.* **16**: 7297-7304.

van Wely, K.H.M., Swaving, J., Broekhuizen, C.P., Rose, M., Quax, W.J. et Driessen, A.J.M. 1999. Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis yvaL* gene as a SecG homologue. *J. Bacteriol.* **181**: 1786-1792.

Vigal, T., Gil, J.A., Garcia-González, M.D., Villadas, P. et Martin, J.F. 1991. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of ∝-amylase by *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 88-96.

Volff, J.-N. et Altenbuchner, J. 1997. Hight frequency transposition of Tn5 derivative Tn 5493 in *Streptomyces lividans*. *Gene* **194**: 81-86.

Volff, J.-N. et Altenbuchner, J. 1998. Genetic instability of *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.* **27**: 239-246.

von Heinje, G. 1985. Ribosome-SRP-signal sequence interactions. The relay helix hypothesis. *FEBS Lett.* **190**: 1-5.

von Heinje, G. et Abrahmsén L. 1989. Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**: 439-446.

Weaden, J. et Dyson, P. 1998. Transposon mutagenesis with IS6100 in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology* **144**: 1963-1970.

Wickner, W. et Leonard, M.R. 1996. *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **271**: 29514-29516.

Wittmann, S., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1994. Purification and characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1701-1703.

Yang, Y.-B., Yu, N. et Tai, P.C. 1997. SecE-depleted membranes of *Escherichia coli* are active. *J. Biol. Chem.* **272**: 13660-13665.

Zahn, R., Perrett, S. et Fersht, A.R. 1996. Conformational states bound by the molecular chaperones GroEL and SecB: a hidden unfolding (annealing) activity. *J. Mol. Biol.* **261**: 43-61.