

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

STÉPHANE OSTIGUY

CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE *secY* de
Streptomyces lividans 1326

SEPTEMBRE 1995

A mes parents, Robert et Françoise,
qui ont si bien su me
mettre sur le Sentier...

TABLE DES MATIÈRES

TABLE MATIÈRES.....	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
SOMMAIRE.....	x
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.0 SYSTÈME GÉNÉRAL DE SÉCRÉTION.....	4
1.1 Peptide signal.....	5
1.2 Les protéines Sec.....	8
1.2.1 SecB.....	8
1.2.2 SecA.....	8
1.2.3 SecE.....	10
1.2.4 SecY.....	12
1.2.5 SecD et SecF.....	16
1.2.6 SecG.....	19
2.0 LES PROTÉINES DE RÉPONSE AU STRESS.....	20
2.1 Les protéines GroE.....	21
2.2 Les protéines DnaK (Hsp70).....	21
3.0 MÉCANISMES DE SÉCRÉTION.....	22
4.0 COMPLÉMENTATION.....	27
5.0 AMÉLIORATION DE LA SÉCRÉTION.....	30
6.0 AUTRES SYSTÈMES DE SÉCRÉTION.....	33
6.1 Système sec-dépendant ou de type II.....	33
6.2 Système sec-indépendant (type I) ou les exportateurs ABC.....	38
7.0 SÉCRÉTION CHEZ LES EUCARYOTES.....	42
7.1 Mammifères.....	42

7.2	Mitochondries.....	46
7.3	Levures.....	48
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		51
1.0	PRODUITS.....	52
2.0	SOUCHES BACTÉRIENNES ET VECTEURS.....	53
2.1	<i>Escherichia coli</i>	53
2.2	<i>Streptomyces lividans</i>	54
2.3	Vecteurs de clonage et d'expression.....	54
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	54
2.3.2	<i>Streptomyces lividans</i>	55
3.0	MILIEUX DE CULTURE.....	55
3.1	<i>E. coli</i>	55
3.2	<i>S. lividans</i>	56
4.0	MANIPULATION DE L'ADN.....	57
4.1	Digestions d'ADN par des enzymes de restriction.....	57
4.2	Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur.....	58
4.3	Transformation.....	59
4.3.1	<i>E. coli</i>	59
4.3.2	<i>S. lividans</i>	59
4.4	Sélection des transformants.....	60
4.4.1	<i>E. coli</i>	60
4.4.2	<i>S. lividans</i>	61
4.5	Isolement d'ADN plasmidique.....	61
4.5.1	<i>E. coli</i>	61
4.5.2	<i>S. lividans</i>	61
4.6	Purification de l'ADN plasmidique au chlorure de césium.....	62
4.7	Isolement d'ADN simple brin.....	63
4.7.1	ADN simple brin du phage M13.....	63
4.7.2	ADN simple brin de phagemide.....	63
4.8	Séquençage de l'ADN.....	64
5.0	RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE D'ADN (PCR).....	64
6.0	CLONAGE DU GÈNE <i>secY</i> DE <i>S. lividans</i>	66

7.0	HYBRIDATION MOLÉCULAIRE.....	69
7.1	Transfert "Southern".....	69
7.2	Hybridation.....	69
8.0	CONSTRUCTION D'UNE MINI BANQUE GÉNOMIQUE.....	70
9.0	DÉTECTION DES TRANSFORMANTS PAR COLONIE-HYBRIDATION	70
10.0	ANALYSE DE LA RÉGION PROMOTRICE DE <i>secY</i>	71
11.0	ANALYSE INFORMATIQUE DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES	71
	RÉSULTATS.....	72
1.0	CLONAGE DU GÈNE <i>secY</i>	73
2.0	SÉQUENÇAGE DU FRAGMENT D'ADN PORTANT <i>secY</i>	79
3.0	ANALYSE DE LA SÉQUENCE PROTÉIQUE DE <i>SecY</i>	87
3.1	Analyse du spectre d'hydrophobicité.....	87
3.2	Alignement.....	87
4.0	ANALYSE DE LE RÉGION PROMOTRICE.....	97
5.0	COMPLÉMENTATION DU MUTANT THERMOSENSIBLE <i>E. coli</i> <i>secY24</i>	101
	DISCUSSION.....	104
	CONCLUSION.....	115
	REMERCIEMENTS.....	117
	BIBLIOGRAPHIE.....	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	:Acide aminé
ADN	:Acide désoxyribonucléique
ATP	:Adénosine triphosphate
EDTA	:Acide (éthylènedinitrilo) tétraacétique
GTP	:Guanosine triphosphate
hG-CSF	:Human granulocyte-colony stimulating factor
hIL6	:Interleukine-6 humaine
IPTG	:Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
kb	:Kilo paire de bases (1000 paires de bases)
kDa	:KiloDalton
MBP	:Maltose Binding Protein
nt	:Nucléotide
OmpA	:Outer Membrane Protein A
pb	:paire de bases
PCR	:Polymerase Chain Reaction
RBP	:Ribose Binding Protein
RE	:Réticulum endoplasmique
SDS	:Sodium Dodecyl Sulfate
<i>secY^{SL}</i>	:Gène <i>secY</i> de <i>Streptomyces lividans</i>
<i>SecY^{SL}</i>	:Protéine SecY de <i>Streptomyces lividans</i>
SRP	:Signal Recognition Particle
TSB	:Tryptic Soy Broth
X-gal	:5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

LISTE DES TABLEAUX**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Tableau 1:	Usage des codons chez les streptomycètes....	67
Tableau 2:	Séquences des amorces utilisées dans les différents PCR.....	68

RÉSULTATS

Tableau 3:	Positions et séquences en aa des 10 segments transmembranaires potentiels.....	91
Tableau 4:	Complémentation du mutant <i>E. coli secY24</i> ...	103

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1:	Structure générale du peptide signal.....	7
Figure 2:	Topologie membranaire de la protéine SecY de <i>E. coli</i>	13
Figure 3:	Mécanisme de translocation des protéines à travers la membrane cytoplasmique chez <i>E. coli</i> .	26
Figure 4:	Système de sécrétion sec-dépendant (type II) de la pullulanase de <i>Klebsiella oxytoca</i>	37
Figure 5:	Système de sécrétion sec-indépendant (type I) de l'alpha-hémolysine de <i>E. coli</i>	41
Figure 6:	Translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique chez les mammifères.	45
Figure 7:	Translocation des protéines à travers les deux membranes mitochondriales.....	47
Figure 8:	Translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique chez la levure.....	49

RÉSULTATS

Figure 9:	Alignement des séquences en acides aminés de protéines SecY provenant de différentes bactéries Gram-positives.....	74
Figure 10:	Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour le PCR #1.....	75
Figure 11:	Migration sur gel d'agarose d'un fragment de SecY amplifié par PCR.....	76
Figure 12:	Hybridation moléculaire.....	78
Figure 13:	Carte de restriction et stratégie de séquençage de l'insertion de 3.8 kb portant le gène <i>secY</i> ..	82
Figure 14:	Séquence nucléotidique du gène <i>secY</i> et de la région environnante.....	84

Figure 15:	Arrangement chromosomique des gènes <i>L15</i> , <i>secY</i> et <i>adk</i>	86
Figure 16:	Analyse hydrophobique de <i>SecY</i>	90
Figure 17:	Alignement des séquences en acides aminés de protéines <i>SecY</i> provenant de différents microorganismes.....	93
Figure 18:	Dendogramme basé sur la comparaison entre les protéines <i>SecY</i> de différents microorganismes...	96
Figure 19:	Analyse de l'activité promotrice de la région d'ADN (300 pb) située en amont de <i>secY</i>	100

SOMMAIRE

Afin de mieux comprendre et pour éventuellement améliorer le système de sécrétion de la bactérie Gram-positif *Streptomyces lividans* 66, le gène *secY*, codant pour la protéine SecY impliquée directement dans la sécrétion des protéines, a été cloné. Pour ce faire, une partie du gène a d'abord été amplifiée par la méthode du PCR. Le produit de PCR obtenu (600 pb) a ensuite été utilisé comme sonde pour cloner le gène complet. Une partie d'un fragment *Bgl*III de 3.8 kb contenant le gène *secY* a été séquencé. La séquence en ADN a démontré que le gène *secY* s'étend sur 1311 paires de base et qu'il est encadré par le gène *L15* en amont et le gène *adk* en aval.

Le gène ne possède pas de promoteur et semble faire partie d'un opéron avec les gènes adjacents. La protéine SecY présente 10 segments transmembranaires potentiels et sa séquence déduite en acides aminés démontre une bonne homologie avec les SecY de, entre autres, *Brevibacterium flavum*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

Le gène *secY* de *S. lividans* (*secY^{SL}*) a été surexprimé chez *E. coli* R0112 afin de vérifier s'il pouvait compléter la mutation *secY24* de cette souche. La mutation *secY24* abolit la sécrétion des protéines et la croissance de la bactérie à 42°C. La surexpression de *secY^{SL}* n'a pas permis de rétablir la croissance de la souche R0112 à 42°C et a également nui à la

croissance de la souche témoin DH11S (*secY*⁺) à 30°C et 42°C. Ces résultats ne permettent donc pas de déterminer s'il y a complémentation ou non.

INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses Gram-positives retrouvées majoritairement dans le sol (Chater et Hopwood, 1989). Ces bactéries, dont *Streptomyces lividans*, sont de grandes productrices de protéines d'intérêt industriel, telles les xylanases et les cellulases, qui sont des enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire (Kluepfel et al., 1986). Toutefois, le système de sécrétion des bactéries Gram-positives a été très peu étudié jusqu'à maintenant. L'amélioration du système de sécrétion de ces enzymes favoriserait grandement leur application industrielle. Ces enzymes pourraient entre autres remplacer le chlore dans le processus de blanchiment des pâtes de papier et être utilisées pour produire du carburant (éthanol) à partir des rejets des industries forestière et agricole (Viikari et al., 1994; Lynd et al., 1991; Coughlan, 1985).

Dans le but de rendre le système de sécrétion plus efficace, le facteur SecY, qui est une protéine directement impliquée dans la sécrétion (Ito et al., 1990), a été cloné et caractérisé. Cette protéine forme, avec les autres protéines Sec, le système général de sécrétion, qui, chez les bactéries, est la principale voie de sortie des protéines vers le milieu extracellulaire (Pugsley, 1993).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 Le système général de sécrétion

Chez les bactéries, la sécrétion des protéines a fait l'objet d'études approfondies. Comme c'est le cas pour de nombreux domaines de recherche en biologie moléculaire, la majorité des études effectuées sur la sécrétion des protéines ont été réalisées chez la bactérie *Escherichia coli*. De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence un système général de sécrétion des protéines comportant au moins sept protéines, les protéines Sec. Ce système serait le principal outil utilisé par les bactéries pour intégrer des protéines dans la membrane cytoplasmique ou pour les faire traverser celle-ci (Pugsley, 1993). Sept protéines Sec ont pu être identifiées jusqu'à maintenant: SecA, SecB, SecE, SecD, SecF, SecG et SecY (Kim et al., 1994; Nishiyama et al., 1994; Pugsley, 1993; Bieker et al., 1990). Les gènes codant pour ces protéines ont été découverts grâce à des études utilisant des mutants létaux conditionnels et des systèmes permettant l'identification facile des souches mutantes (Bieker et al., 1990). Selon le cas, les protéines Sec sont plus ou moins essentielles à la survie de la cellule (Bieker et al., 1990).

Dans les pages qui vont suivre, on retrouvera une description du système général de sécrétion d'*Escherichia coli*, une bactérie Gram-négative. Les quelques travaux réalisés jusqu'à maintenant chez les bactéries Gram-positives semblent indiquer

que leur système de sécrétion est identique, à peu de chose près, à celui des bactéries Gram-négatives.

Malgré les récents développements dans le domaine et les nombreux efforts déployés pour mieux comprendre la mécanique de la sécrétion des protéines, beaucoup de détails restent encore à éclaircir.

1.1 Peptide signal

Toutes les protéines sécrétées par le système général de sécrétion possèdent un peptide signal, c'est-à-dire une courte région caractéristique située à l'extrémité N-terminale de la préprotéine. Le peptide signal est essentiel à la sécrétion de la protéine et son rôle serait de diriger celle-ci vers la membrane cytoplasmique (Pugsley, 1993) et/ou de permettre l'ouverture de canaux protéiques situés dans cette membrane (Simon et Blobel, 1992). Tous les peptides signaux présentent les mêmes caractéristiques (figure 1). Les premiers acides aminés, habituellement de charges positives, forment une courte région hydrophilique (domaine N) et sont suivis d'une longue région hydrophobique (domaine H). La région carboxy-terminale (domaine C) du peptide signal est plus polaire et contient un site de clivage permettant, lors de la translocation, la coupure du peptide signal par la signal peptidase pour former la protéine mature (Pugsley, 1993; von Heijne et Abrahmsen,

1989). Bien que présentant toutes ces caractéristiques, les peptides signaux des bactéries Gram-positives sont en général plus long et la charge nette de leur domaine N est plus élevée que ceux des bactéries Gram-négatives (von Heijne et Abrahmsen, 1989).

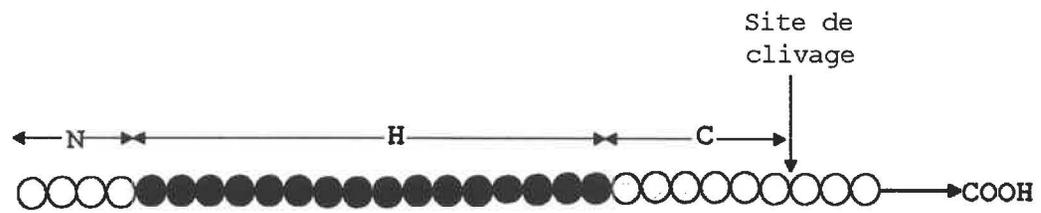


Figure 1. Structure générale du peptide signal.

1.2 Les Protéines Sec

1.2.1 SecB

SecB est une protéine de 16 kDa qui semble fonctionner en tétramère (Watanabe et Blobel, 1989). Elle est retrouvée uniquement dans le cytoplasme des cellules et elle s'associe rapidement aux préprotéines nouvellement synthétisées (Pugsley, 1993; Watanabe et Blobel, 1989). Il s'agirait en fait d'une protéine chaperon dont le rôle serait d'empêcher le repliment des préprotéines afin de les maintenir dans une conformation permettant la sécrétion (Bieker et al., 1990). SecB pourrait aussi diriger les préprotéines vers les sites de translocation ou tout simplement vers la membrane cytoplasmique (Oudega et al., 1993). SecB n'est pas essentielle à la survie de la cellule (Pugsley, 1993; Bieker et al., 1990).

1.2.2 SecA

SecA est une protéine qui a été détectée dans le cytoplasme, attachée à la périphérie de la membrane cytoplasmique ou intégrée dans la membrane des bactéries (Kim et al., 1994; Cabelli et al., 1991). De plus, récemment, Kim et al. (1994) ont obtenu des résultats suggérant qu'une partie de SecA pourrait être exposée au périplasme lors de la translocation.

SecA est absolument essentielle à la survie des cellules (Pugsley, 1993; Bieker et al., 1990). Elle peut lier la préprotéine grâce à son affinité pour le peptide signal et la portion mature de celle-ci (Lill et al., 1990; Akita et al., 1990) de même que par son affinité pour SecB (Douville et al., 1994). Il a aussi été démontré que SecA possède une affinité pour le complexe SecY/SecE, deux protéines Sec transmembranaires, et pour les phospholipides anioniques de la membrane cytoplasmique (Kim et Oliver, 1994; Kim et al., 1994). SecA possède aussi une activité ATPase, c'est-à-dire qu'elle peut lier l'ATP et l'hydrolyser afin d'en retirer de l'énergie (Pugsley, 1993; Bieker et al., 1990). Son rôle consisterait donc à favoriser l'association de la préprotéine à la membrane cytoplasmique en plus de fournir une partie de l'énergie nécessaire au passage des protéines à travers cette même membrane (Kim et al., 1994; Economou et Wickner, 1994; Pugsley, 1993; Bieker et al., 1990).

SecA a d'abord été identifiée chez *E.coli*. Des homologues de cette protéine ont été découverts chez *Bacillus subtilis* (Overhoff et al., 1991), chez la cyanobactérie *Synechococcus* PCC7942 (Nakai et al., 1994), chez l'algue rouge *Antithamnion* sp (Valentin, 1992) et chez l'algue chromophytique *Pavlova lutherii* (Scaramuzzi et al., 1992). Un homologue de SecA a aussi été découvert dans les chloroplastes de pois (Yuan et al., 1994)

1.2.3 SecE

SecE, chez *E. coli*, est une petite protéine transmembranaire de 127 acides aminés, soit environ 13 kd, essentielle à la viabilité des bactéries (Schatz et al., 1991). Elle est codée par le gène *secE* qui est le premier gène d'un opéron comprenant un autre gène essentiel à la viabilité de la bactérie, le gène *nusG*, qui code pour un facteur de transcription (Schatz et al., 1991; Downing et al., 1990). Dans la membrane, SecE forme un complexe protéique avec les protéines SecY et SecG (Douville et al., 1994; Kim et al., 1994; Pugsley, 1993; Schatz et al., 1991). On retrouve de 300 à 500 copies de SecE par cellule (Pugsley, 1993; Schatz et al., 1991).

D'après la séquence protéique de SecE, on peut déduire que cette protéine possède trois segments intégrés dans la membrane et deux régions cytoplasmiques (Pugsley, 1993; Schatz et al., 1991). Toutefois, Schatz et al. (1991) ont démontré que seule la dernière portion de SecE, comprenant les acides aminés 78 à 127, serait suffisante pour assurer un fonctionnement normal de cette protéine. Cette portion comprend la deuxième région cytoplasmique et le dernier segment hydrophobique de SecE. Plus précisément, Murphy et Beckwith (1994) affirment que seule la deuxième portion cytoplasmique est essentielle au bon fonctionnement de SecE et que la dernière région transmembranaire ne

servirait qu'à maintenir le domaine cytoplasmique dans un arrangement topologique correct. Cette hypothèse est renforcée par le fait que, chez *Bacillus subtilis*, on a identifié un homologue de SecE ne comprenant que 59 acides aminés et correspondant à la dernière portion de SecE de *E. coli* (Jeong et al., 1993).

De nombreux mutants *secE* sensibles au froid ont été identifiés chez *E. coli* et il est intéressant de noter que la plupart de ces mutations affectent la bactérie non pas à cause d'une modification dans la structure de SecE mais plutôt à cause d'une diminution de l'expression de cette protéine (Schatz et al., 1991).

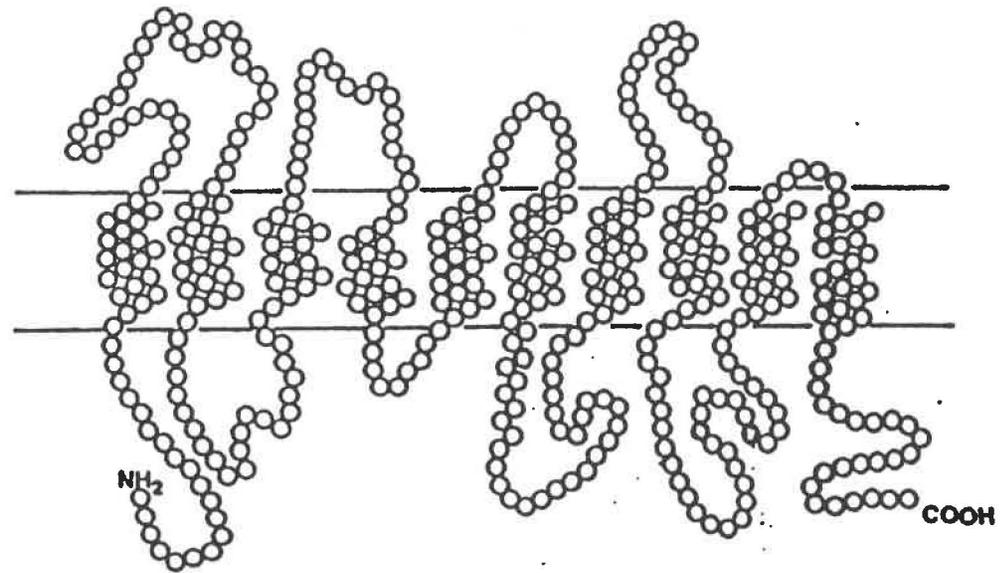
Une protéine SecE a aussi été identifiée chez deux streptomycètes, soient *Streptomyces griseus* et *Streptomyces virginiae*. Chez ces bactéries, SecE est formée de 86 et 84 acides aminés, respectivement (Miyake et al., 1994). De plus, dans les deux cas, le gène codant pour SecE est associé au gène *nusG*, ce qui est un arrangement semblable à celui retrouvé chez *E. coli* et *B. subtilis* (Jeong et al., 1993). Egalement, leur séquence protéique suggère qu'elles ne possèdent qu'un seul fragment transmembranaire qui correspondrait à la troisième portion hydrophobique de SecE d'*E. coli* et à l'unique segment transmembranaire potentiel de *B. subtilis* (Miyake et al., 1994).

1.2.4 SecY

SecY est une protéine comportant dix segments hydrophobiques ancrées dans la membrane interne, cinq segments exposés au périplasma et six régions cytoplasmiques (figure 2). Elle est essentielle à la survie des cellules (Pugsley, 1993; Ito, 1990; Akiyama et Ito, 1987). Le gène *secY* se trouve, chez *E. coli*, dans l'opéron *spc* qui comprend plusieurs gènes de protéines ribosomales (Ito, 1990). Différentes études ont démontré que l'on retrouve entre 200 et 400 molécules de SecY par cellule, ce qui est comparable au nombre de copies de SecE (Pugsley, 1993; Schatz et al., 1991)

SecY a été isolée suite à l'étude de nombreux mutants affectant la sécrétion des protéines (Ito, 1990). Ces mutations ont été appelées *prlA* et permettaient la sécrétion de protéines portant des mutations dans leur peptide signal. D'ailleurs, pour cette raison, il a été suggéré que SecY pouvait interagir avec les peptides signaux des préprotéines (Ito, 1990; Watanabe et al., 1990). D'autres mutants thermosensibles ont ensuite été isolés. Un de ces mutants, *secY24*, s'est révélé particulièrement utile dans l'identification de SecY et est encore utilisé aujourd'hui, surtout pour des tests de complémentation (Baba et al., 1994; Ito, 1990; Bieker et al., 1990; Nakamura et al., 1990a). La mutation *secY24* consiste en un changement d'une glycine en un acide aspartique dans la quatrième boucle

Périplasma



Cytoplasme

Figure 2. Topologie membranaire de la protéine SecY de *E. coli*
(d'après Baba et al., 1990)

cytoplasmique (Ito, 1990). Cette mutation est létale à 42°C, probablement parce qu'elle empêche l'interaction entre SecY et SecE (Baba et al., 1994).

La relation entre SecY et SecE semble très étroite. En effet, si on surexprime SecY, toutes les SecY en excès par rapport à la quantité retrouvée normalement dans la cellule sont rapidement dégradées (Akiyama et Ito, 1986). Toutefois, lorsque SecE est surexprimée en même temps que SecY, on peut augmenter le nombre de molécules de SecY stable dans la cellule (Taura et al., 1993; Matsuyama, 1990). Ceci suggère que si SecY n'est pas rapidement associée à SecE, elle est rapidement dégradée (Taura et al., 1993). D'ailleurs, récemment, la région de SecY permettant son attachement à SecE a été identifiée: il s'agirait du quatrième segment cytoplasmique (Baba et al., 1994). Plus récemment, Kihara et al. (1995) ont identifié un gène, *ftsH*, dont le produit est requis pour la dégradation des molécules de SecY produites en excès. Une mutation dans le gène *ftsH* empêchant la production de la protéine FtsH permet d'augmenter de beaucoup le nombre de SecY stables dans la cellule.

SecY, en tant que partie intégrante du complexe SecY/E/G, joue un rôle clé dans la sécrétion des protéines (Douville et al., 1994; Brundage et al., 1992; Bieker et Silhavy, 1990; Bieker et al., 1990). Le rôle exact de SecY n'est pas encore

bien défini mais il a été suggéré que le complexe SecY/E/G pourrait permettre la formation d'un canal protéique permettant le passage des préprotéines (Kim et al., 1994; Brundage et al., 1990).

Des homologues de SecY ont été identifiés chez de nombreuses autres bactéries, chez des plastides d'algues unicellulaires, chez une levure et chez les mammifères. En plus de *E. coli* (Cerretti et al., 1983), chez les bactéries Gram-négatives, *secY* a été cloné chez *Mycoplasma capricolum* (Ohkubo et al., 1987) et chez les archaebactéries *Methanococcus vannielii* (Auer et al., 1991) et *Haloarcula marismortui* (Arndt, 1992). On a aussi retrouvé SecY chez de nombreuses bactéries Gram-positives: *Bacillus subtilis* (Suh et al., 1990; Nakamura et al., 1990b), *Bacillus licheniformis* (Tschauder et al., 1992), *Staphylococcus carnosus* (Tschauder et al., 1992), *Lactococcus lactis* (Koivula et al., 1991), *Micrococcus luteus* (Ohama et al., 1989) et *Brevibacterium flavum* (Kobayashi et al., 1994). De plus, SecY a pu être retrouvée chez le parasite *Chlamydia trachomatis* (Gu et al., 1994), chez la cyanobactérie *Synechococcus* sp. (Nakai et al., 1992) et dans le plastide de deux algues, *Cyanophora paradoxa* (Flachmann et al., 1993) et *Cryptomonas phi* (Douglas, 1992). Enfin, un homologue de SecY, SEC61p a été détecté chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Stirling et al., 1992) et chez les mammifères (Sec61p)

(Gorlich *et al.*, 1992). De plus, tout récemment, les gènes *secY* de *Streptomyces coelicolor* (GenBank, no. d'accèsion X83011) et de *Streptomyces scabies* (GenBank, no. d'accèsion U19606) ont aussi été identifiés. Il est frappant de constater que toutes les SecY ont à peu près la même topologie, c'est-à-dire qu'elles possèdent toutes dix segments transmembranaires potentiels.

1.2.5 SecD et SecF

L'étude approfondie des protéines SecD et SecF n'a commencé que tout récemment. Ces deux protéines sont codées par les gènes *secD* et *secF*, qui font partie d'un opéron comportant un autre gène, *yajC*, dont le rôle est encore inconnu (Pogliano et Beckwith, 1994a). SecD et SecF ont une masse moléculaire de 65 et 35 kDa, respectivement (Gardel *et al.*, 1990). Les deux protéines semblent présenter la même topologie: elles possèdent six segments transmembranaires potentiels et un grand domaine périplasmique, compris entre les deux premiers segments intégrés dans la membrane. Une grande portion de ces protéines est donc située dans le périplasme (Pogliano et Beckwith, 1994a). Matsuyama *et al.* (1992) ont estimé que l'on retrouve dix fois plus de molécules de SecD (autour de 300 copies) que de molécules de SecF (environ 30 copies) dans la cellule. Par

contre, des résultats plus récents indiquent que SecD serait exprimée au même niveau que SecF, soit environ 30 copies de chaque protéine dans la cellule. La cellule posséderait donc 10 fois moins de SecD et SecF que de SecE et SecY (Pogliano et Beckwith, 1994a).

Divers travaux ont cherché à déterminer si SecD et SecF étaient des protéines essentielles à la translocation et à la survie des bactéries. En premier lieu, des expériences *in vitro* ont suggéré que ces deux protéines n'étaient pas nécessaires à la translocation des préprotéines (Matsuyama *et al.*, 1992; Brundage *et al.*, 1990). Toutefois, d'autres expériences ont démontré l'importance de ces protéines *in vivo* (Pogliano et Beckwith, 1994b; Matsuyama *et al.*, 1993; Gardel *et al.*, 1990). Récemment, Pogliano et Beckwith (1994b) ont rapporté que SecD et SecF étaient nécessaires pour une sécrétion efficace des protéines mais qu'elles n'étaient pas essentielles à la survie de la bactérie. En fait, une souche de *E. coli* dont les gènes SecD et SecF ont été délétés pousse presque aussi bien que la souche sauvage sur un milieu minimal solide. On peut expliquer que SecD et SecF ne soient pas essentielles *in vitro* par le fait que les systèmes *in vitro* ne sont pas construits pour élucider ce qui se passe lors des dernières étapes de la sécrétion, là où SecD et SecF interviennent probablement. De

plus, la translocation *in vitro* serait inefficace en comparaison de la translocation *in vivo* (Pogliano et Beckwith, 1994b).

Le rôle de ces deux protéines n'est pas encore très bien défini. Le fait qu'elles possèdent un large domaine périplasmi- que indique qu'au moins une partie de leur action est accomplie dans le périplasme. En fait, ce domaine périplasmi- que est essentiel à la fonction de SecD (Pogliano et Beckwith, 1994a). Tel que mentionné plus haut, on sait qu'elles facilitent la sécrétion sans être absolument requises pour ce processus (Pogliano et Beckwith, 1994a; Arkowitz et Wickner, 1994). De plus, il est généralement reconnu qu'elles entrent en fonction dans les dernières étapes de la translocation (Pogliano et Beckwith, 1994b; Bieker-Brady et Silhavy, 1992). En fait, divers rôles peuvent être attribués à ces deux protéines: elles peuvent i) intervenir dans le repliement ou le détachement, de la membrane cytoplasmique, des protéines nouvellement sécrétées, ii) jouer un rôle dans le recyclage des complexes de translocation (SecY/E/G) après chaque cycle de translocation ou encore iii) présenter les protéines sécrétées à l'enzyme qui détache le peptide signal de la protéine mature ("leader peptidase") (Pogliano et Beckwith, 1994a; Pogliano et Beckwith, 1994b). SecD et SecF pourraient aussi être impliquées dans le maintien d'un potentiel électrochimique ("Proton Motive Force") dans la membrane cytoplasmique. Ce potentiel fournirait une

partie de l'énergie nécessaire à la translocation, l'autre partie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Arkowitz et Wickner, 1994). Enfin, Sagara et al. (1994) suggèrent que SecF stabiliserait SecY et SecD et interagirait directement avec ces protéines lors de la translocation.

1.2.6 SecG

SecG est la protéine Sec qui a été le moins étudiée jusqu'à maintenant. Elle a d'abord été identifiée par Brundage et al. (1990) car elle co-précipitait avec les protéines SecY et SecE. Elle était alors connue sous le nom "Band 1" (Brundage et al., 1992; Brundage et al., 1990). Parallèlement, d'autres auteurs ont aussi isolé une protéine co-précipitant avec le complexe SecY/E et l'ont nommée "P12" (Nishiyama et al., 1993). Plus tard, Douville et al. (1994) ont prouvé qu'ils s'agissait de la même protéine. Ce n'est que très récemment que cette protéine a reçu son appellation "SecG" (Nishiyama et al., 1994). SecG est une protéine de 110 acides aminés (environ 12 kDa) qui contiendrait deux ou trois segments transmembranaires. Le gène *secG* a été cloné et la délétion de ce gène a mis en évidence que, bien qu'elle permette une sécrétion plus efficace, SecG n'est pas essentielle à la survie de la bactérie à 37°C. Par contre, SecG est absolument nécessaire à basse température (20°C) (Nishiyama et al., 1994). Son rôle exact

n'est pas connu mais on sait que SecG forme un complexe avec SecY et SecE et qu'elle est directement impliquée dans la translocation. Le complexe SecY/E/G lié à la protéine SecA forme ce qui est communément appelé la préprotéine translocase (Douville *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1994; Brundage *et al.*, 1992). Egalement, certaines données tendent à démontrer que SecG est impliquée dans les premières étapes de la translocation, peut-être lors de l'insertion du peptide signal dans la membrane cytoplasmique (Nishiyama *et al.*, 1994). Enfin, Hanada *et al.* (1994) ont démontré que SecG a peu d'effet sur l'interaction entre SecA et le complexe SecY/E mais qu'elle stimule grandement l'activité ATPase de SecA. SecG jouerait donc un rôle dans la translocation après que le complexe SecA-préprotéine ait lié le complexe SecE/Y/G.

2.0 Les protéines de réponse au stress

En plus des protéines Sec, d'autres protéines peuvent intervenir dans la sécrétion. Il existe chez les bactéries des protéines dont la synthèse est augmentée lorsque les cellules sont soumises à un stress tel qu'une augmentation subite de la température. Ces protéines sont habituellement appelées des protéines de réponse au stress ou "heat-shock proteins (Hsp)". Elles jouent plusieurs rôles dans une cellule normale, dont

celui de chaperon. Elles sont donc impliquées dans la sécrétion de plusieurs protéines en jouant un rôle semblable à celui de SecB, c'est-à-dire empêcher le repliement des protéines afin de les conserver dans une conformation permettant la sécrétion. Chez *E. coli*, plusieurs protéines de ce type ont été identifiées (Georgopoulos et Welch, 1993).

2.1 Les protéines GroE

Les protéines GroE sont essentielles à la survie de la cellule dans n'importe quelles conditions de croissance. Chez *E. coli*, on retrouve deux protéines GroE, soient GroES (Hsp10) et GroEL (Hsp60). Des homologues de GroEL ont été retrouvés, en plus de chez *E. coli*, chez les plantes, la levure et les eucaryotes plus évolués (Georgopoulos et Welch, 1993). On a aussi identifié deux gènes codant pour des homologues de GroEL chez *Streptomyces albus* (Guglielmi et al., 1991; Mazodier et al., 1991). GroES et GroEL sont des protéines jouant un rôle important, du moins chez *E. coli*, puisque, chez cette bactérie, elles semblent pouvoir se lier à plus de 50% de toutes les protéines (Georgopoulos et Welch, 1993).

2.1 Les protéines DnaK (hsp70)

Chez *E. coli*, ce groupe de protéines compte au moins trois membres, soient DnaK, DnaJ et GrpE (Georgopoulos et Welch,

1993). Ces protéines jouent plusieurs rôles et il n'y a aucun doute quant à leur fonction de chaperon dans la cellule. On a retrouvé de nombreux homologues de DnaK et DnaJ chez les eucaryotes (Georgopoulos et Welch, 1993). Egalement, Bucca et collaborateurs (1993) ont réussi à identifier un homologue de DnaK chez *Streptomyces coelicolor*.

3.0 Mécanisme de sécrétion

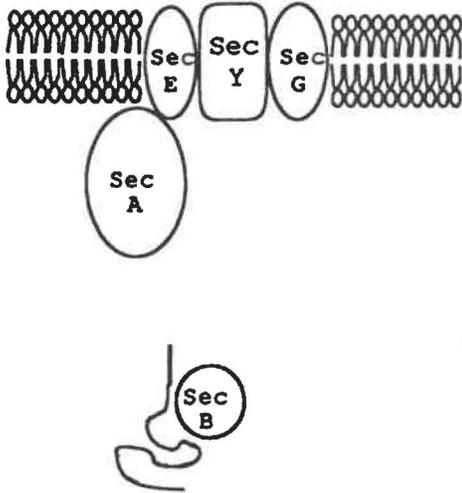
Ayant identifié les molécules impliquées dans la translocation des protéines ainsi que leur rôle respectif, il est possible de développer un modèle expliquant les différentes étapes menant au passage des préprotéines à travers la membrane cytoplasmique (figure 3). Tout d'abord, la préprotéine nouvellement synthétisée est rapidement prise en charge par le chaperon SecB (étape 1), qui la maintient dans une conformation adéquate à la sécrétion (Douville et al., 1994; Bieker et al., 1990). La préprotéine est alors dirigée vers la membrane cytoplasmique et entre en contact avec celle-ci en se liant à SecA, qui est elle-même liée à la membrane par son affinité pour le complexe SecY/E/G et les phospholipides acides (étape 2). SecA possède des sites de liaison pour le peptide signal et la portion mature de la préprotéine ainsi que pour SecB (Kim et al., 1994). Le peptide signal de la préprotéine peut alors provoquer l'ouverture de canaux protéiques permettant le

passage des protéines, tel que suggéré par Simon et Blobel (1992). Ces canaux protéiques pourraient être formés du complexe SecY/E/G (Kim et al., 1994; Brundage et al., 1990). La liaison de la préprotéine à SecA active la propriété ATPase de celle-ci. L'hydrolyse de l'ATP permet l'insertion dans la membrane cytoplasmique d'un domaine de SecA d'environ 30 kDa, entraînant une partie (20 à 30 acides aminés) de la préprotéine à travers la membrane (étape 3). C'est à ce moment qu'une petite région de SecA pourrait être exposée au périplasme. L'hydrolyse d'autres molécules d'ATP permettrait la désinsertion de SecA de la membrane cytoplasmique alors que la préprotéine resterait en place (étape 4). SecA se retrouverait donc libre dans le cytoplasme et c'est alors que le gradient électrochimique prendrait la relève et permettrait de continuer la translocation pendant un certain temps. Ensuite, une nouvelle molécule de SecA pourrait se lier à la préprotéine et initier un nouveau cycle d'insertion/désinsertion de la membrane. Ces cycles se répéteraient jusqu'à la translocation complète de la préprotéine (Economou et Wickner, 1994; Kim et al., 1994). SecD et SecF entreraient ensuite en action, pour permettre le repliement adéquat de la protéine mature et/ou le relâchement de la protéine mature de la membrane cytoplasmique ou encore pour accomplir d'autres fonctions non définies (Pogliano et Beckwith, 1994a; Pogliano et Beckwith, 1994b).

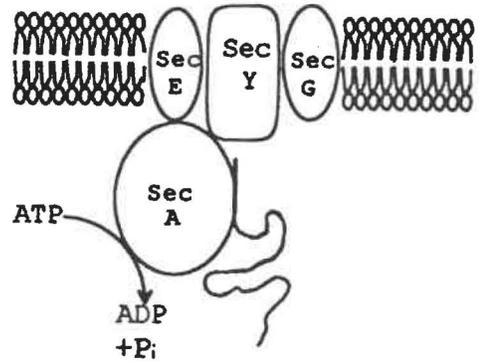
Ce modèle de sécrétion des protéines est basé sur les données disponibles à l'heure actuelle et il est probable qu'il se raffine et évolue, selon les nouvelles données qui deviendront disponibles.

Figure 3. Mécanisme de translocation des protéines à travers la membrane cytoplasmique chez *E. coli*.

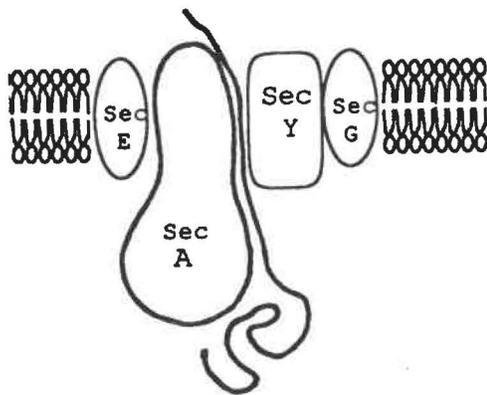
1.



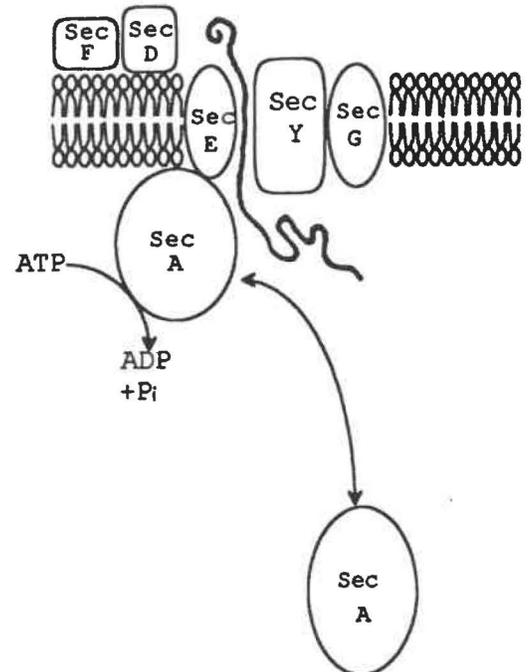
2.



3.



4.



4.0 Complémentation

Tel que mentionné plus haut, toutes les protéines Sec ont d'abord été identifiées chez la bactérie *E. coli*. De nombreuses recherches ont permis de retracer chez d'autres microorganismes des protéines homologues aux protéines Sec de *E. coli*. Afin de confirmer qu'une protéine nouvellement identifiée chez une bactérie quelconque est bien l'homologue d'une protéine Sec de *E. coli*, certains auteurs ont cherché à compléter, avec l'homologue en question, des souches de *E. coli* mutantes pour cette protéine. Les souches de *E. coli* utilisées pour ces tests sont des mutants thermosensibles ou sensibles au froid, c'est-à-dire que la protéine Sec mutée n'est fonctionnelle qu'à température permissive.

Ainsi, Overhoff et al. (1991) ont identifié un homologue de SecA chez *Bacillus subtilis*. Avec cette protéine, les auteurs ont tenté de compléter une souche mutante de *E. coli*. Cette souche (MM52) est un mutant thermosensible. A température non-permissive (42°C), SecA est synthétisée chez la souche MM52 mais la protéine n'est pas fonctionnelle, rendant presque impossible la sécrétion des protéines et, par le fait même, la croissance de la bactérie. Les auteurs ont donc exprimé dans cette souche mutante de *E. coli* un polypeptide correspondant aux 275 premiers acides aminés de SecA de *B. subtilis*. Ce polypeptide a permis la croissance de la souche

MM52 à 42°C et des expériences ont démontré que la translocation des protéines était partiellement rétablie.

De leur côté, Jeong et ses collaborateurs (1993) ont cloné un homologue de SecE chez *Bacillus subtilis* et ils ont tenté de compléter la souche de *E. coli* PR520, qui porte une mutation dans le gène *secE* la rendant sensible au froid. La souche PR520 est incapable de pousser à 20°C. L'expression du gène codant pour SecE de *B. subtilis* chez cette souche de *E. coli* a permis de rétablir la croissance de la bactérie et la sécrétion des protéines à température non-permissive.

Après avoir cloné un homologue de SecY chez *B. subtilis*, Nakamura et al. (1990a) ont pour leur part tenté de compléter la souche de *E. coli* KI297, qui porte une mutation dans le gène *secY* rendant la bactérie thermosensible à 42°C. Des expériences de marquage des protéines à la [³⁵S]méthionine ont démontré que l'expression du gène *secY* de *B. subtilis* chez *E. coli* KI297 pouvait rétablir la translocation des protéines à température non-permissive. Toutefois, la présence de SecY de *B. subtilis* chez *E. coli* KI297 n'a pas permis de rétablir la croissance de cette dernière. De petites colonies apparaissaient après 24 h d'incubation à 42°C mais disparaissaient au bout de 48 h. Il faut souligner que l'expression de SecY de *B. subtilis* chez une souche de *E. coli* SecY⁺ cause le même défaut de croissance. Les auteurs expliquent ces résultats en suggé-

rant que l'accumulation de SecY de *B. subtilis* peut à long terme causer certaines perturbations dans les fonctions physiologiques des cellules de *E. coli*.

D'autre part, Suh et al. (1990) ont rapporté que la protéine SecY de *B. subtilis* ne pouvait pas compléter le défaut de translocation des protéines chez le mutant IQ85 de *E. coli*. Ce mutant possède la même mutation que la souche KI297. Nakamura et al. (1990a) pensent que, dans ce cas, SecY de *B. subtilis* était sous le contrôle d'un promoteur trop puissant, amenant une surproduction continue de SecY qui serait létale pour la bactérie.

Kobayashi et al. (1994) ont quant à eux tenté de compléter le mutant *secY39* d' *E. coli* avec le gène *secY* de *Brevibacterium flavum*, une bactérie Gram-positif. Le mutant *secY39* est sensible au froid et il ne peut donc pas croître à 20°C. Les auteurs ont fait face aux mêmes problèmes que Suh et al. (1990) et Nakamura et al. (1990a). En effet, l'expression de SecY de *B. flavum* chez *E. coli secY39* n'a pas permis de rétablir la croissance de cette dernière à température non-permissive et inhibait grandement sa croissance à température permissive (30°C).

On peut constater que bien que de nombreux homologues des protéines Sec aient été identifiées chez plusieurs bactéries, peu d'essais de complémentation ont été réalisés. Même si deux

protéines présentent une bonne homologie, les quelques études tentées jusqu'ici démontrent qu'il n'est pas évident qu'il puisse y avoir complémentation, de nombreux facteurs physiologiques pouvant entrer en jeu.

5.0 Amélioration de la sécrétion

Les nombreuses recherches réalisées jusqu'à maintenant sur le système général de sécrétion des bactéries ont permis d'en identifier les composantes et d'obtenir une bonne idée de son fonctionnement. Une des raisons qui ont motivé ses études était de savoir s'il était possible de rendre la sécrétion des protéines plus efficace. Quelques études ont justement été menées dans ce sens.

Pérez-Pérez et ses collaborateurs (1994) ont tenté de surexprimer l'interleukine-6 humaine (hIL-6) chez *E. coli*. Afin que cette protéine soit sécrétée dans le périplasme de l'hôte, ils ont fabriqué une protéine de fusion pre(OmpA)-hIL6; le gène de l'hIL-6 a été rattaché au début du gène de OmpA (Outer Membrane protein A), qui est une protéine de *E. coli* possédant un peptide signal et qui est normalement sécrétée. Dans le but d'améliorer la sécrétion de cette protéine de fusion, ils ont aussi surexprimé les gènes *secE* et/ou *prlA4*, qui est un allèle du gène *secY*. La mutation *prlA4* permet la sécrétion de protéi-

nes dont le peptide signal a été muté et qui ne peuvent plus être sécrétées par une protéine SecY normale.

Les résultats obtenus démontrent que la surexpression de SecE n'améliore pas la sécrétion tandis que la surexpression de PrlA4 a permis de doubler la quantité de hIL-6 mature retrouvée dans le périplasme. De plus, lorsque SecE et PrlA4 sont surexprimées en même temps, on retrouve, par rapport au témoin, presque 5 fois plus de hIL-6 mature dans le périplasme. Les auteurs ont aussi tenté de surexprimer la forme sauvage de SecY en même temps que SecE, mais cela n'a aucunement amélioré la sécrétion de hIL-6.

Plus récemment, Pérez-Pérez *et al.* (1995) ont surexprimé les protéines DnaK et DnaJ chez *E. coli* afin d'augmenter la sécrétion de la hG-CSF (Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor) chez cette bactérie. La surexpression de ces deux protéines chaperon a permis d'augmenter la sécrétion de hG-CSF d'environ 70%.

Pogliano et Beckwith (1994b) ont réalisé des études semblables avec les protéines SecD et SecF. A l'aide d'un plasmide à copies multiples, ils ont surexprimé SecD et SecF chez *E. coli* et déterminé l'effet de cette surexpression sur la sécrétion de protéines de type sauvage (maltose-binding protein (MBP) et ribose-binding protein (RBP)) ou de protéines portant des mutations dans le peptide signal (MBP, phosphatase alcaline

et Lamb). Dû à leur peptide signal défectif, ces dernières ne sont pas sécrétées chez une souche sauvage de *E. coli*.

Dans tous les cas, la sécrétion des protéines s'est trouvée grandement améliorée lorsque SecD et SecF étaient surexprimées. Il est intéressant de noter que dans le cas des protéines mutantes, l'efficacité de la sécrétion a doublé.

Dans une autre étude, la protéine SecB de *E. coli* a été exprimée chez *B. subtilis* (Collier, 1994). Jusqu'à maintenant, aucun homologue de SecB n'a été identifié chez *B. subtilis*. L'auteur a donc supposé que l'expression de SecB de *E. coli* chez cette bactérie pourrait faciliter la sécrétion de protéines hétérologues Sec-dépendantes. Pour ses expériences, l'auteur a choisi d'examiner la sécrétion de deux protéines de *E. coli*, MBP et OmpA, qui sont très mal sécrétées chez *B. subtilis*. La coexpression de SecB et de MBP chez *B. subtilis* a permis de doubler l'efficacité de sécrétion de cette dernière. Toutefois, SecB n'a pas amélioré la sécrétion de OmpA.

Ces études démontrent donc qu'il est possible d'améliorer l'efficacité de la sécrétion de protéines Sec-dépendantes. Souvent, il suffit de surexprimer une ou plusieurs protéine Sec. Toutefois, comme plusieurs facteurs entrent en jeu et que chaque protéine possède ses propres particularités, ce qui

permet une meilleure sécrétion pour une protéine quelconque peut s'avérer tout à fait inefficace pour une autre.

6.0 Autres systèmes de sécrétion

Le système général de sécrétion est la voie majeure empruntée par les protéines pour traverser la membrane cytoplasmique. Toutefois, on retrouve, autant chez les bactéries Gram-positives que gram-négatives, d'autres systèmes nécessaires à la sécrétion de nombreuses protéines.

6.1 Système Sec-dépendant ou système de Type II

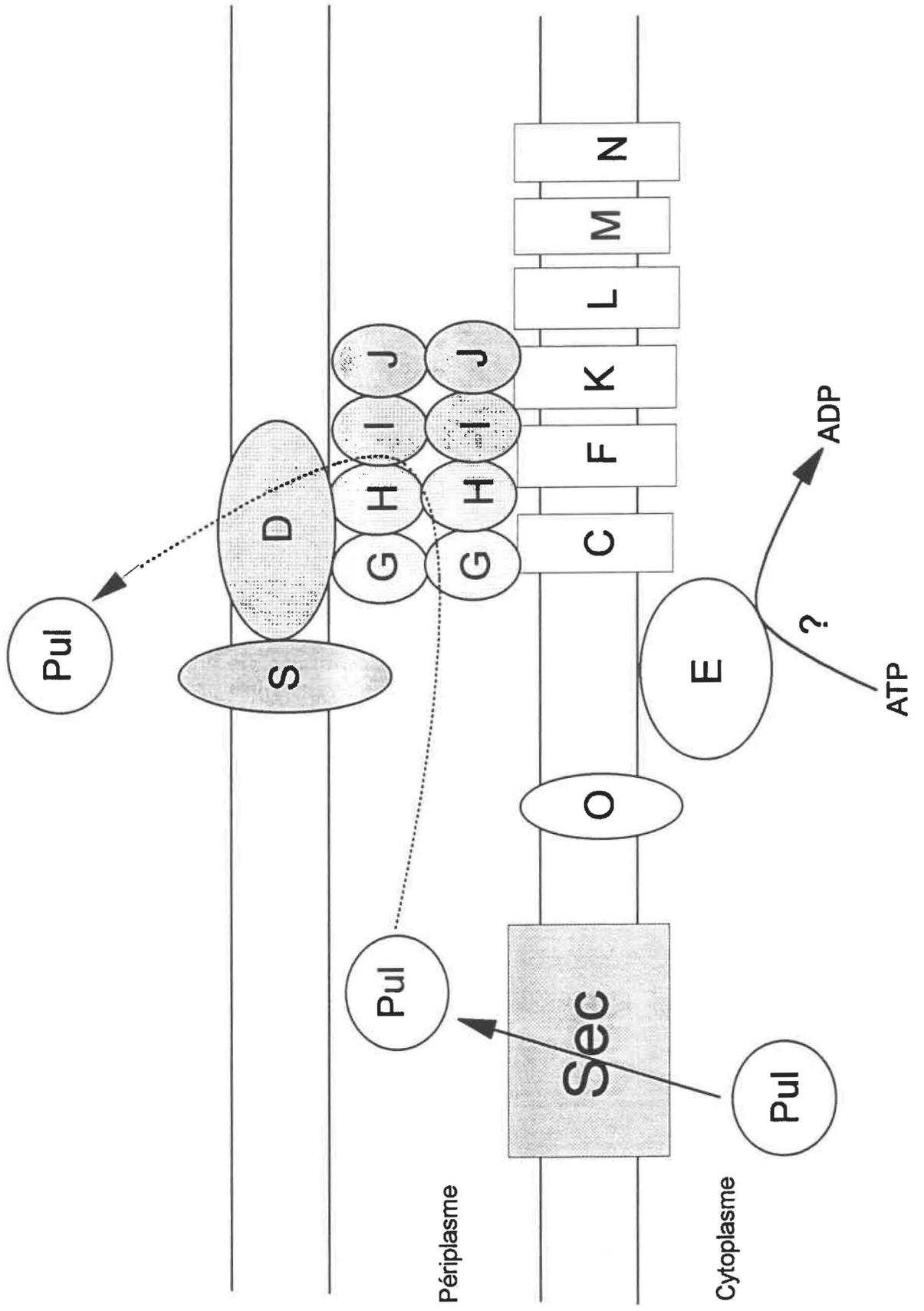
Chez les bactéries Gram-positives, les protéines sécrétées par le système général de sécrétion se retrouvent dans le milieu extra-cellulaire alors que chez les microorganismes Gram-négatives, les protéines aboutissent dans le périplasma. Chez les bactéries Gram-négatives, il existe donc un autre système permettant aux protéines de s'intégrer ou de traverser la membrane externe, après avoir utilisées le système Sec pour parvenir au périplasma. Le passage des protéines à travers la membrane externe est encore assez mal compris mais on sait que plusieurs protéines sont nécessaires pour permettre la sécrétion. D'ailleurs, une caractéristique importante de ce système est que l'on retrouve tous les gènes codant pour les protéines impliquées dans la sécrétion les uns à cotés des autres dans le

génomique de la bactérie, formant probablement un opéron (Salmond et Reeves, 1993).

Le système le mieux caractérisé est probablement celui permettant la sécrétion de la pullulanase (système *Pul*) chez la bactérie *Klebsiella oxytoca* (Salmond et Reeves, 1993) (figure 4). Des homologues de ce système ont été retrouvés, entre autres, chez *Erwinia chrysanthemi* (système *Out*) (Lindeberg et Collmer, 1992), *Pseudomonas aeruginosa* (systèmes *Xcp* et *Pil*, responsables de la sécrétion d'exotoxine A, élastase, phosphatase alcaline et phospholipase C et de la formation du pili de type IV) (Bally et al., 1992; Nunn et al., 1990) et *Xanthomonas campestris* (système *Xps*) (Dums et al., 1991). Un tel système existerait aussi chez *Bacillus subtilis* et serait responsable, entre autres, de l'entrée d'ADN dans la cellule (Stojilkovic et al., 1995; Salmond et Reeves, 1993). Ce n'est que très récemment qu'un système de transport de type II (système *Hop*) a été identifié chez *E. coli* (Stojilkovic et al., 1995). Le système *Pul* de *K. oxytoca* compte au moins 15 protéines et le rôle de certaines de ces protéines a pu être défini. Par exemple, la protéine *PulO* serait une signal-peptidase permettant le clivage de courtes séquences-signal situées à l'extrémité amino-terminale de certaines protéines (Pugsley et Dupuy, 1992). *PulE* contient un site de liaison de l'ATP, suggérant qu'elle pourrait hydrolyser l'ATP pour fournir l'énergie

nécessaire à la translocation (Salmond et Reeves, 1993; Pugsley, 1992). Deux rôles peuvent être attribués à PulG,H,I, J et D: ces protéines pourraient perméabiliser la membrane externe ou encore former, avec d'autres protéines, un canal reliant les membranes internes et externes (Salmond et Reeves, 1993). Le rôle des protéines PulC,F,K,L,M et N n'est pas connu mais ces protéines sont situées dans la membrane cytoplasmique et pourrait peut-être agir en tant que chaperon (Salmond et Reeves, 1993). Enfin, la fonction de PulS est aussi inconnue (Salmond et Reeves, 1993). Ce système Sec-dépendant semble être, chez les bactéries Gram-négatives, la principale voie par laquelle les protéines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire.

Figure 4. Modèle spéculatif du système de sécrétion sec-dépendant (type II) de la pullulanase de *E. coli*. Les différentes protéines Pul impliquées dans la sécrétion sont indiquées par la lettre les représentant. La pullulanase (pul) est aussi indiquée (d'après Salmond et Reeves, 1993).



6.2 Système Sec-indépendant (Type I) ou les exportateurs ABC

Les bactéries produisent un grand nombre de protéines qui ne possèdent pas de peptide signal. Ces protéines, et d'autres produits non-protéiques, ne peuvent donc pas utiliser le système général de sécrétion mais sont néanmoins sécrétées. Il existe donc, chez les bactéries Gram-positives et négatives, d'autres systèmes permettant la sécrétion de ces protéines: les exportateurs ABC. Ces systèmes sont caractérisés par la présence de protéines de transport ATP-dépendantes, les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette). Ces protéines possèdent habituellement deux domaines liant l'ATP et deux domaines transmembranaires et fourniraient l'énergie nécessaire à la translocation (Ames *et al.*, 1990; Higgins *et al.*, 1986). Toutefois, il n'est pas rare de retrouver des "demi-transporteurs" ABC ne comportant qu'un domaine liant l'ATP et un seul domaine transmembranaire (Fath et Kolter, 1993; Kuchler, 1993). En plus de ces protéines, ce système de sécrétion comprend des facteurs accessoires nécessaires à la formation d'un complexe de sécrétion fonctionnel. Chez les Gram-négatives, le rôle de ces protéines accessoires seraient de connecter les membranes internes et externes afin de faciliter le transport des protéines à travers les deux membranes. Chez les Gram-positives, ces facteurs accessoires semblent aussi exister mais leur rôle n'est pas clair (Morrison *et al.*, 1993; Chung *et al.*,

1992; Klein, 1992; Stoddard et al., 1992). Enfin, chez les bactéries Gram-négatives, un troisième type de protéine est habituellement retrouvé. Cette protéine, requise pour la sécrétion, est ancrée dans la membrane externe et est tout simplement appelée le facteur de la membrane externe (Letoffe et al., 1990; Wandersman et Delepelaire, 1990; Glaser, 1988).

La classe d'exportateur ABC la mieux connue est celle permettant la sécrétion des protéines RTX (repeats in toxin) chez les bactéries Gram-négatives. Ces protéines sont des toxines sécrétées dans le milieu extra-cellulaires et sont pourvues d'un signal de sécrétion situé à l'extrémité C-terminale ou N-terminale. Toutefois, ce signal n'est pas clivable et ne ressemble en aucun point au peptide signal typique des protéines utilisant le système Sec (Felmlee et al., 1985)

L'alpha-hémolysine (HlyA) d'*Escherichia coli* est une protéine RTX dont le mode de sécrétion est bien défini (figure 5). Cette protéine possède un signal de sécrétion situé dans sa partie C-terminale et quatre protéines sont impliquées dans sa sécrétion, soient HlyB, HlyC, HlyD et TolC. HlyB est le transporteur ABC et contient un domaine liant l'ATP et six segments transmembranaires; son rôle serait donc de fournir l'énergie nécessaire à la translocation (Koronakis et al., 1991). HlyD comporte un segment transmembranaire et la majorité

de la protéine se retrouve dans le périplasme (Schulein *et al.*, 1992). HylC n'est pas directement impliquée dans la sécrétion mais facilite l'activation de HlyA par l'ajout d'un groupe acide gras (Issartel *et al.*, 1991). TolC correspond au facteur de la membrane externe (Niki *et al.*, 1990; Wandersman et Delepelaire, 1990). En résumé, la sécrétion de HlyA s'effectue comme suit: (i) l'extrémité C-terminale de HlyA s'associe avec la membrane interne; (ii) HlyA interagit ensuite avec HlyB et (iii) un complexe de sécrétion composé de HlyB, HlyD et TolC facilite ensuite la translocation en permettant le passage de la protéine directement à travers les deux membranes. (Fath et Kolter, 1993).

D'autres systèmes, comme le système de sécrétion de protéases de *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens*, ont été identifiés et possèdent les mêmes caractéristiques que le système de sécrétion de HlyA (Wandersman, 1989).

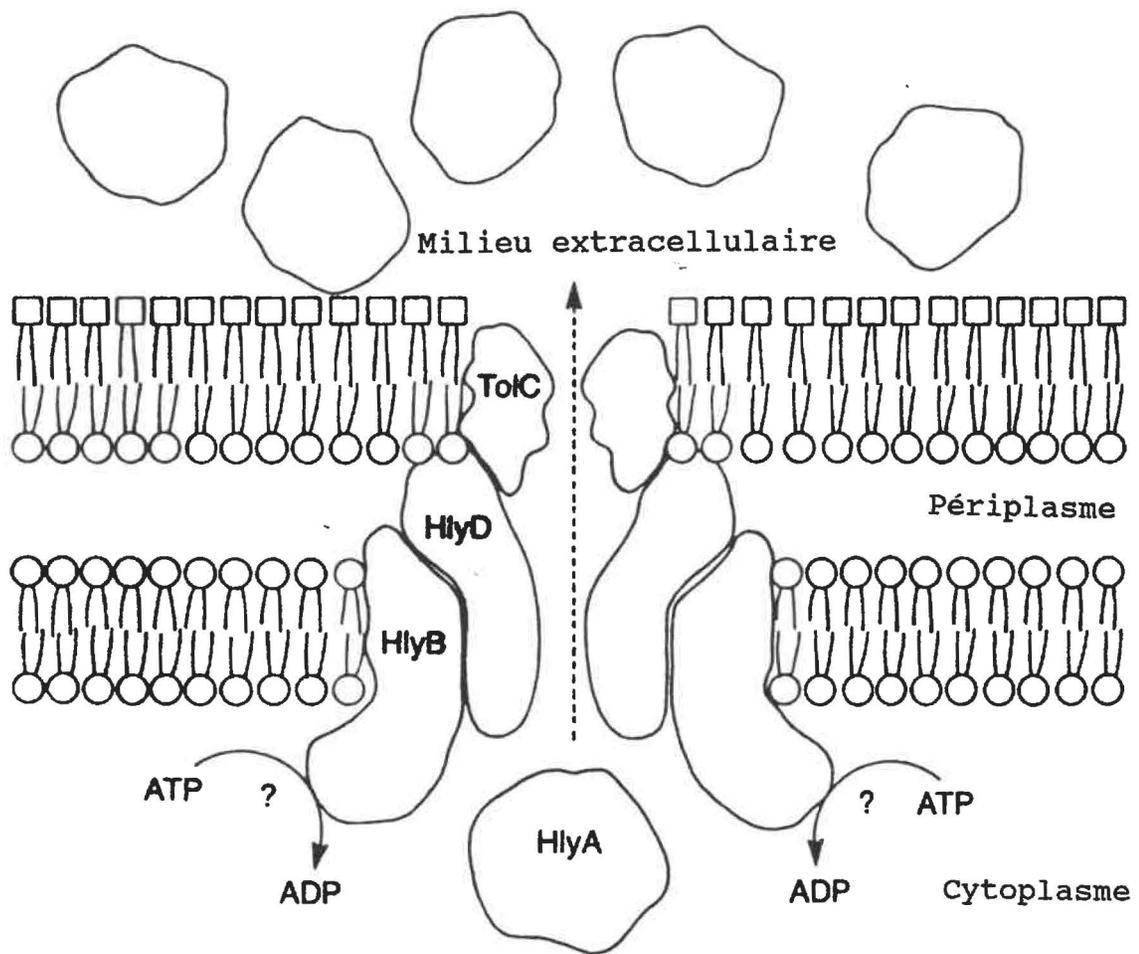


Figure 5. Système de sécrétion sec-indépendant (type I) de l'alpha-hémolysine de *E. coli* (d'après Salmond et Reeves, 1993).

7.0 Sécrétion chez les eucaryotes

7.1 Mammifères

Le passage d'une protéine à travers une membrane peut se faire durant sa synthèse (translocation co-traductionnelle) ou lorsque celle-ci est terminée (translocation post-traductionnelle). On retrouve les deux modes de sécrétion chez les procaryotes et les eucaryotes mais leur importance relative varie. Ainsi, chez les procaryotes et les levures, la plupart des protéines sont sécrétées lorsque leur synthèse est terminée alors que chez les mammifères la sécrétion est majoritairement co-traductionnelle (Jungnickel et al., 1994).

Chez les mammifères, les protéines ne traversent pas directement la membrane cytoplasmique mais sont d'abord sécrétées dans le réticulum endoplasmique (RE) (figure 6). Elles sont ensuite transportées dans des vésicules vers la membrane cytoplasmique (Jungnickel et al., 1994). La sécrétion co-traductionnelle des protéines à travers la membrane du RE semble un phénomène relativement simple et démontre certaines similarités avec le système général de sécrétion des bactéries. Tout comme chez les bactéries, les protéines des eucaryotes sont munies d'un peptide signal, qui est reconnu par le SRP (Signal Recognition Particle) alors que la protéine commence à peine à être synthétisée (étape 2, fig. 6) (Jungnickel et al., 1994). Après la liaison du SRP au peptide signal, la traduction

est interrompue et le complexe ribosome/chaîne naissante/SRP est dirigé vers la membrane du RE, puis lié à celle-ci par interaction avec le récepteur du SRP (étape 3) (Wickner, 1994; Gorlich *et al.*, 1992). Le récepteur hydrolyse ensuite du GTP, ce qui permet le transfert du complexe ribosome/chaîne naissante au complexe Sec61p (étape 3). Le complexe Sec61p, qui est formé de trois sous-unités, démontre certaines similarités avec la préprotéine translocase (SecY/E/G) des bactéries. La sous-unité α , qui comporte dix segments transmembranaires potentiels, est un homologue des protéines SecY des bactéries (Wickner, 1994; Jungnickel *et al.*, 1994; Gorlich *et al.*, 1992). Les sous-unités β et γ sont de petites protéines attachées à la membrane par leur région C-terminale. La sous-unité α formerait probablement à elle seule un canal protéique permettant le passage des protéines. De plus, le complexe Sec61p pourrait servir de récepteur pour la liaison du ribosome à la membrane (Jungnickel *et al.*, 1994).

Après la liaison du complexe ribosome/chaîne naissante au complexe Sec61p, la traduction reprend et, comme le ribosome est intimement associé à la membrane de RE, la chaîne naissante n'a pas d'autres choix que de passer à travers le canal protéique formé par le complexe Sec61p, celui-ci étant la seule sortie possible (étape 4). La protéine traverse donc d'elle-même la membrane par la seule "poussée" générée par son

élongation. La sécrétion ne nécessiterait aucune autre protéine ou énergie quelconque. Toutefois, il est possible que dans la lumière du RE, des protéines-chaperon se lient à la protéine pour en faciliter le transport (Wickner, 1994; Jungnickel et al., 1994).

Il existe une autre composante dans le système de sécrétion des mammifères. Il s'agit de la protéine TRAM. Son rôle n'est pas encore très bien compris. On sait que cette protéine entre en contact avec la chaîne naissante durant les premières étapes de la translocation. Il est possible que cette protéine soit impliquée dans l'insertion de la chaîne naissante dans la membrane. La protéine TRAM est absolument essentielle pour la translocation de certaines protéines, comme le prépro-facteur- α , alors qu'elle ne fait que stimuler la sécrétion d'autres protéines, comme la préprolactine (Jungnickel et al., 1994; Gorlich et al., 1992). Enfin, d'autres protéines sont présentes au site de sécrétion, comme la signal peptidase, une oligosaccharyltransférase, deux enzymes impliqués dans la modification des chaînes naissantes et d'autres protéines, comme la TRAP (aussi appelée SSR) dont la fonction est inconnue (Jungnickel et al., 1994).

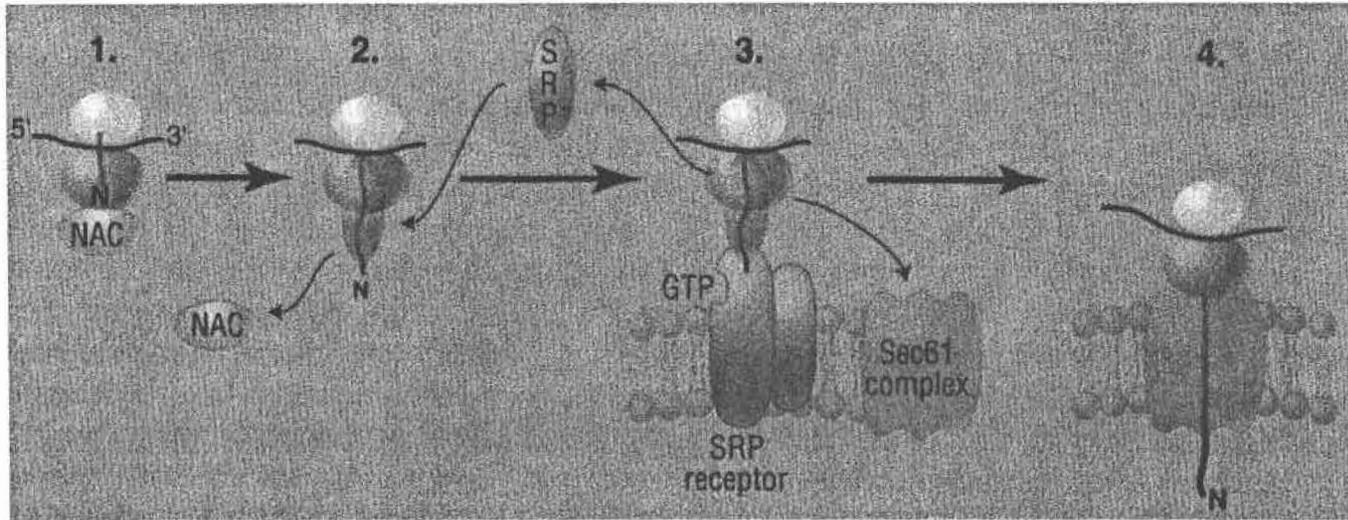


Figure 6. Translocation des protéines à travers la membrane du reticulum endoplasmique chez les mammifères (Wickner, 1994).

7.2 Mitochondrie

Pour rejoindre la matrice mitochondriale, les préprotéines mitochondriales doivent traverser deux membranes (figure 7) à l'aide d'un système analogue à celui permettant la sécrétion chez les bactéries. La préprotéine se lie d'abord dans le cytoplasme à la protéine Hsp70 cytoplasmique (cHsp70). A l'extrémité N-terminale des préprotéines mitochondriales, on retrouve une préséquence (l'équivalent du peptide signal) qui se lie à des récepteurs ancrés dans la membrane externe des mitochondries. Sous l'influence du potentiel électrique membranaire, cette préséquence traverse les deux membranes entraînant avec elle la préprotéine. La préséquence est ensuite clivée par une protéase de la matrice. Dans la matrice mitochondriale, une protéine appelé mHsp70, qui est attachée à un récepteur membranaire, MIM44, attend la préprotéine. Dès qu'elle se lie à la préprotéine, mHsp70 hydrolyse une molécule d'ATP, ce qui lui permet de se détacher du récepteur MIM44. Il est possible que mHsp70, lorsqu'elle hydrolyse l'ATP, change de conformation pour "tirer" la préprotéine à l'intérieur de la matrice. Etant attachée à la préprotéine, mHsp70 empêche celle-ci de revenir dans le cytoplasme, mais permet son mouvement vers l'intérieur de la matrice. Ensuite, une nouvelle protéine mHsp70 attachée à MIM44 peut lier la préprotéine, hydrolyser son ATP et tirer plus en avant la préprotéine. Plusieurs cycles

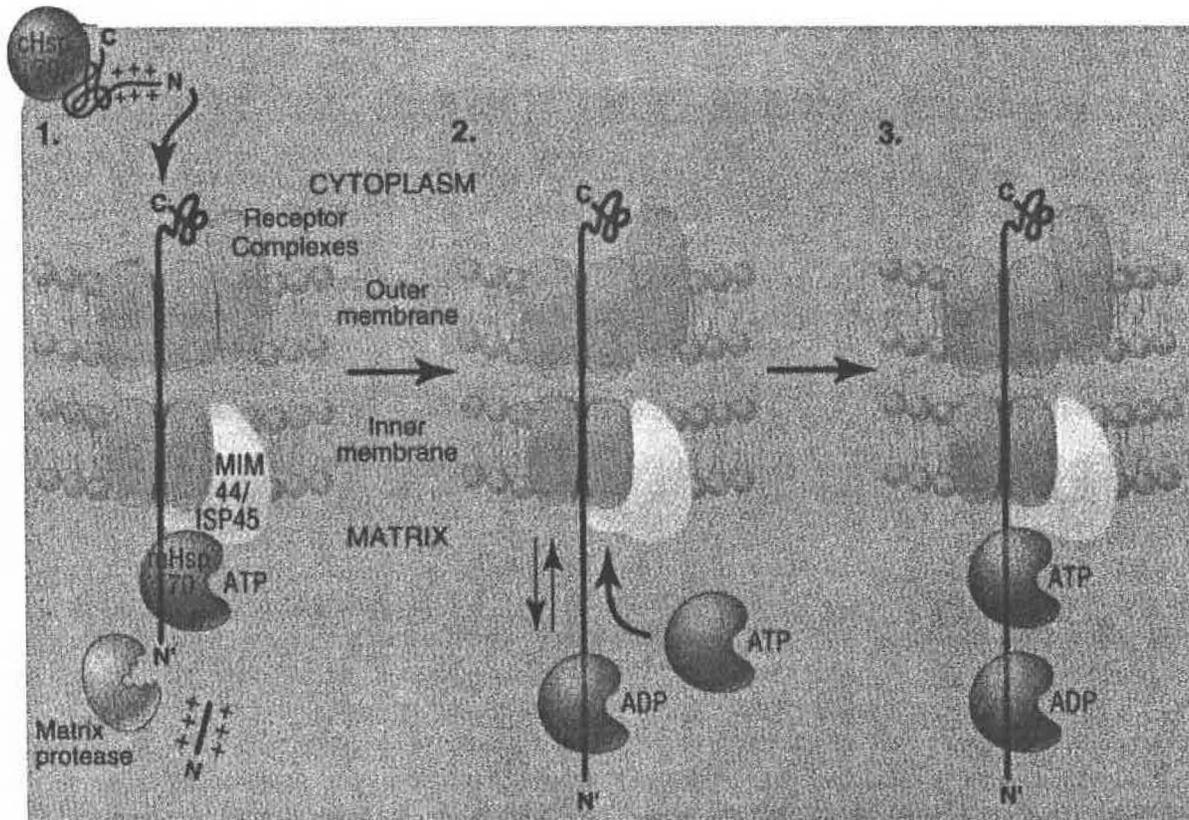


Figure 7. Translocation des protéines à travers les deux membranes mitochondriales (Wickner, 1994).

comme celui-ci se répètent jusqu'à ce que la préprotéine ait complètement franchi les deux membranes (Wickner, 1994).

7.3 Levure

Tout comme chez les mammifères, les protéines sécrétées chez les levures doivent d'abord pénétrer dans le réticulum endoplasmique. Dans ce cas, par contre, la translocation est majoritairement post-traductionnelle et le mécanisme est apparenté au système de translocation mitochondrial. La préprotéine, liée dans le cytoplasme à une protéine cHsp70, entre en interaction avec le complexe protéique Sec63, qui est formé de cinq protéines attachées à la membrane du RE (figure 8) (Wickner, 1994; Jungnickel *et al.*, 1994). Une de ces protéines, BiP, qui est l'équivalent du mHsp70 mitochondrial, hydrolyse l'ATP, ce qui permet son transfert vers le complexe Sec61 en même temps que la préprotéine entre en contact avec le complexe Sec61. BiP peut alors se lier à la préprotéine, hydrolyser l'ATP et tirer la préprotéine dans la lumière du RE, d'une façon semblable à la translocation des préprotéine dans les mitochondries (Wickner, 1994).

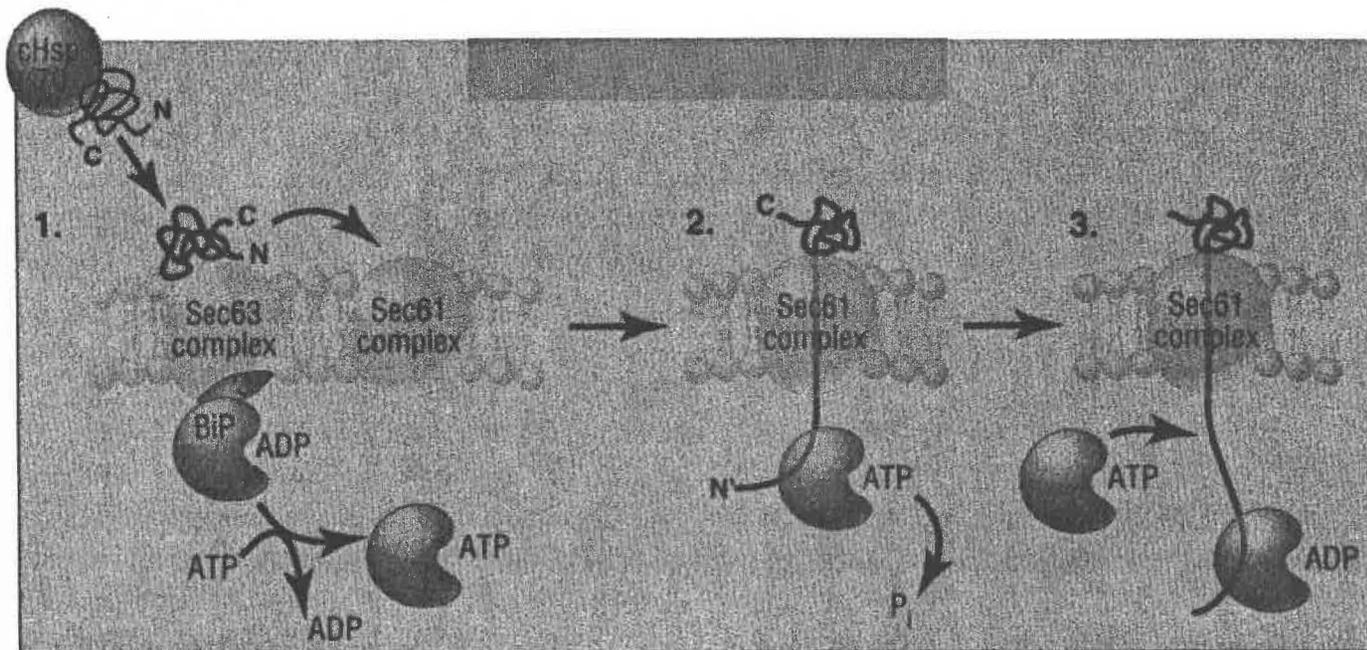


Figure 8. Translocation des protéines à travers la membrane du reticulum endoplasmique chez la levure (Wickner, 1994).

On voit donc que, des bactéries aux mammifères, les stratégies utilisées pour permettre le transport des protéines à travers les membranes phospholipidiques présentent certaines similarités. Souvent, les protéines impliquées dans la sécrétion montrent des ressemblances frappantes et la plus grande différence se situe au niveau des systèmes utilisés pour fournir l'énergie nécessaire à la translocation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 Produits

Acétate de sodium (J.T. Baker)
Acide acétique (J.T. Baker)
Agar (Difco)
Agarose (Gibco BRL)
Ampicilline (Sigma)
ATP (Pharmacia)
Bacto-tryptone (Difco)
Bromure d'éthidium (Boeringher Manheim)
Cathécol (USB)
Chloroforme (BDH)
Chlorure de césium (BDH)
Citrates de sodium (Fisher)
Désoxyribonucléotides (Pharmacia)
EDTA (J.T. Baker)
Ethanol 95% (SAQ)
Extrait de boeuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Glucose (J.T. Baker)
HCl (J.T. Baker)
Hydroxyquinoline (Sigma)
IPTG (Boeringher Manheim)
Isopropanol (BDH)
Lysozyme (Sigma)
Maltose (J.T. Baker)
Milieu Simmons-citrate (Difco)
NaCl (BDH)
NaOH (J.T. Baker)
NZ amine A (Sheffield products)
Paraffine liquide (BDH)
PEG 6000 (J.T. Baker)
Phénol (BDH)
Propionamide (Aldrich)
SDS (IBI)
Sucrose (BRL)
Thiamine (Sigma)
Thiostreptone (Squibb Ltée)
Tris (ICN)
TSB (Difco)
Tween 80 (Aldrich)
X-gal (BRL)

2.0 Souches bactériennes et vecteurs

2.1 *Escherichia coli*

Le sous-clonage du gène *secY* de *S. lividans* a été effectué dans la souche *E. coli* DH11S (*mcrA* Δ (*mrr hsdRMS mcrBC*) Δ (*lac-proAB*) Δ (*recA1398*) *deoR* *rspL* *srl* *thi*/F'*proAB*⁺ *lacI*^q Δ M15) (catalogue Gibco BRL #8307SA p. 339).

Les souches *E. coli* DH11S et MV1190 (Δ (*lac-proAB*) *thi*, *supE* Δ (*srl-recA*)306::*Tn10*(*tet*^r) [F':*traD36 proAB lacI*^q Δ M15) ont été utilisées pour la production d'ADN simple brin.

La souche *E. coli* R0112 (F⁻, *araD139*, D(*argF-lac*)U169, *rspL150*, *relA1*, *fibB5301*, *deoC1*, *ptsF25*, *rbsR*, *secY24* *zhc*::*Tn10*) (Osborne et Silhavy, 1993; Bieker et Silhavy, 1990) a été utilisée pour effectuer les tests de complémentation. Dû à la mutation *secY24*, la protéine SecY de cette souche n'est pas fonctionnelle à température non-permissive (42°C). La souche R0112 est donc thermosensible.

Les cellules compétentes des souches *E. coli* MV1190, DH11S et R0112 sont préparées selon le protocole de Bio-Rad (catalogue #170-3576 p.14). Les cellules subissent un traitement aux cations divalents MgCl₂ et CaCl₂. Ces cations altèrent la membrane cytoplasmique des bactéries, ce qui favorise la pénétration d'ADN étranger. Les cellules sont ensuite mélangées à une solution contenant du CaCl₂ 85 mM et

15% de glycérol. Le glycérol permet de conserver les cellules à -80°C .

2.2 *Streptomyces lividans*

Le gène codant pour la protéine SecY a été isolé à partir d'une préparation d'ADN génomique de *S. lividans* 66 (souche 1326). Le gène *secY* a ensuite été surexprimé dans cette même souche.

La souche *S. lividans* 10-164 (Hurtubise et al., 1995) a été utilisée pour vérifier si le gène *secY* avait son propre promoteur.

2.3 Vecteurs de clonage et d'expression

2.3.1 *E. coli*

Les phagemides pTZ18U, pTZ19U, pBluescript SK+ et pBluescript SK- ont été utilisés pour effectuer les différents sous-clonages et pour la production d'ADN simple brin. Ces vecteurs sont dérivés des plasmides pUC18 et 19 et contiennent en plus l'origine de répllication du phage f1 permettant la production d'ADN simple brin après une co-infection avec le phage auxiliaire M13K07 (Mead et al., 1986). Ces plasmides possèdent aussi le promoteur du gène *lacZ*, ce qui permet l'expression des gènes introduits dans la cassette de clonage multiple. Enfin,

ces plasmides portent aussi le gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les transformants.

Des sous-clonages ont aussi été réalisés dans les phages M13mp18 et M13mp19 afin d'obtenir de l'ADN simple brin utilisé pour le séquençage (Messing et al., 1981).

2.3.2 *S. lividans*

Le plasmide pIJ4083 est un plasmide utilisé pour détecter l'activité promotrice de fragments d'ADN provenant de streptomycètes (Clayton et Bibb, 1990). Ce plasmide porte le gène *xylE* sans son promoteur. Ce gène, provenant de *Pseudomonas putida*, code pour une cathécol 2,3-dioxygénase qui convertit le cathécol en un composé jaune, le 2-hydroxy muconique semi-aldehyde. Ainsi, les colonies de *Streptomyces* exprimant *xylE* deviennent jaunes lorsqu'aspergées de cathécol. Toutefois, dans pIJ4083, *xylE* ne peut être exprimé que si un fragment d'ADN portant une activité promotrice est cloné en amont de ce gène. Le vecteur porte aussi le gène de résistance à la thiostreptone, ce qui permet de sélectionner les transformants.

3.0 Milieux de culture

3.1 *E. coli*

Le milieu 2XTY a été utilisé pour toutes les cultures des souches de *E. coli* MV1190 et DH11S. Ce milieu est composé de 16

g de bacto-tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre. Pour obtenir un milieu solide, on ajoute 15 g de bacto-agar par litre. Si nécessaire, de l'ampicilline est ajoutée à une concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$ après la stérilisation. La croissance bactérienne se fait à 37°C avec agitation (240 RPM) pendant 16 hres.

La souche thermosensible R0112 est maintenue sur un milieu solide minimal Simmons-citrate additionné de 0.4% de glucose et 0.01% de thiamine. Ce milieu sera dorénavant nommé milieu Simmons-citrate modifié.

De l'agar mou et le milieu solide H sont utilisés pour réaliser les infections avec le phage M13. L'agar mou est composé de 10 g de bacto-tryptone, 5 g de NaCl et 7 g de bacto-agar par litre. Le milieu H est composé de 10 g de bactotryptone, 5 g de NaCl et 15 g de bacto-agar par litre.

3.2 *S. lividans*

Les cellules sont cultivées et maintenues sur le milieu solide Bennet-thio. Ce milieu est composé de 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de boeuf, 2 g de NZ amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre. Après stérilisation, de la thiostreptone est ajoutée à une concentration finale de 50 mg/l.

Les protoplastes de *S. lividans* (Hopwood et al., 1985) ayant été transformées sont étalées sur le milieu solide R5 (Hopwood et al., 1985), qui permet la régénération des protoplastes. Le milieu R5 est composé de 103 g de sucrose, 250 mg de K_2SO_4 , 10.12 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 g de glucose, 0.1 g de Bacto Casamino Acid, 5 g d'extrait de levure, 5.73 g de tampon TES, 22 g de Bacto agar et 2 ml d'une solution d'éléments traces par litre. La solution d'éléments traces 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 liquide TSB (Tryptic Soy Broth) est utilisé pour la culture des transformants. Ce milieu est composé de 30 g de TSB par litre. De la thiostreptone est ajoutée à une concentration finale de 5 $\mu g/ml$ après stérilisation.

4.0 Manipulation de l'ADN

4.1 Digestions d'ADN par des enzymes de restriction

La digestion est réalisée avec une unité d'enzyme de restriction (Pharmacia) par μg d'ADN dans un tampon ("one-phor-all buffer" 10X, Pharmacia) à la concentration appropriée. La digestion se fait dans un volume total de 20 μl à 37°C pendant 1 hre.

Lorsque nécessaire, les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose dans du tampon TAE 1X

(Tris-acétate 0.04 M et EDTA 0.001 M). Après la migration, le gel est brièvement coloré dans de l'eau contenant du bromure d'éthidium 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

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

Le fragment d'ADN à cloner (0.2 μg) est obtenu par digestion avec les enzymes appropriés puis séparation sur gel d'agarose. L'ADN est extrait du gel à l'aide du QIAEX Gel Extraction Kit de la compagnie Qiagen. L'ADN purifié se retrouve dans un volume final de 40 μl .

Le vecteur (0.2 μg) est digéré dans les mêmes conditions et avec les mêmes enzymes de restriction que ceux utilisés pour obtenir le fragment d'ADN voulu. Les enzymes sont ensuite inactivés par une incubation à haute température (20 min. à 65°C ou 30 min. à 85°C, selon l'enzyme). Si nécessaire, le vecteur est aussi déphosphorylé en utilisant 0.1 unité de phosphatase alcaline d'intestin de veau (Pharmacia), selon les recommandations du fournisseur. La phosphatase est inactivée par une incubation de 15 minutes à 85°C.

Le fragment d'ADN à cloner et le vecteur sont ensuite précipités en ajoutant 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol 95%, incubés 10 minutes à -20°C puis centrifugés 20 minutes à 13 000 RPM. Le vecteur est resuspendu dans 7.5 μl d'eau, puis combiné au fragment d'ADN à cloner. On

ajoute ensuite 1 μ l de tampon "one-phor-all" 10X (Pharmacia), 1 μ l d'ATP 10 mM et 0.2 unité d'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia). 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. Le mélange est incubé à 13°C durant 16 hres.

4.3 Transformation

4.3.1 *E. coli*

La transformation des cellules compétentes DH11S et MV1190 est effectuée selon la méthode de Hanahan (1983) pour les phagemides et la transfection des phages M13mp18 et 19 selon la méthode de Messing et al. (1981).

4.3.2 *S. lividans*

La transformation de cellules de *S. lividans* est effectuée selon la méthode de Hopwood et al. (1985). Les protoplastes de *S. lividans* sont mis en contact 1 à 2 minutes avec le mélange de ligation et du PEG, puis la préparation est étalée sur milieu solide R5. Les pétris sont incubés à 34°C durant trois jours.

4.4 Sélection des transformants

4.4.1 *E. coli*

Pour la sélection des transformants, 50 μ l de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) 2% et 10 μ l d'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 100 mM sont ajoutés à la surface du pétri avant l'inoculation. Ces deux substances permettent une première identification rapide des transformants. En effet, les phagemides pTZ18U, pTZ19U et pBluescript SK+ et SK- porte un fragment d'ADN codant pour les 145 premiers acides aminés du gène de la β -galactosidase. Ce fragment peut compléter la β -galactosidase tronquée (délétion Δ M15) d'une bactérie hôte appropriée, ce qui produit un enzyme fonctionnel. Cette protéine permet de dégrader le substrat X-gal en un produit bleu. Le site de clonage multiple du phagemide se situe au début du gène de la β -galactosidase et lorsqu'un fragment d'ADN étranger est inséré dans ce site, le fragment intact de la β -galactosidase ne peut plus être synthétisé. Ainsi, les transformants qui ont un plasmide portant une insertion d'ADN restent blancs alors que les transformants portant un plasmide intact deviennent bleus. L'IPTG est un inducteur puissant de l'opéron lactose et il est nécessaire lorsque les souches d'*E. coli* MV1190 et DH11S, qui sont *lacI^q*, sont utilisées.

Les phages M13mp18 et M13mp19 possèdent le même système "bleu-blanc" de sélection de transformants sans toutefois porter la résistance à l'ampicilline.

4.4.2 *S. lividans*

Après 16 hres d'incubation sur milieu R5, 1 ml de thios-treptone 0.5 mg/ml est ajouté à la surface des pétris afin de sélectionner les transformants.

4.5 Isolement d'ADN plasmidique

4.5.1 *E. coli*

L'extraction d'ADN plasmidique de *E. coli* est effectuée selon la méthode de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989). Les différentes solutions utilisées proviennent de la compagnie Pharmacia (Miniprep Kit Plus) et l'extraction est réalisée selon les recommandations du fabricant.

4.5.2 *S. lividans*

L'extraction d'ADN plasmidique de *S. lividans* est réalisée selon la méthode de Hopwood et al. (1985) avec quelques modifications. Un culot de 100 μ l de mycélium, obtenu à partir d'une culture de 12 ml en TSB, est d'abord lavé avec 500 μ l d'une solution contenant 10.3% de sucrose, 25 mM Tris et 25 mM EDTA. Ensuite, le culot est incubé durant 1 hre en présence de cette

même solution contenant du lysozyme à une concentration de 2 mg/ml. 200 μ l d'une solution alcaline (NaOH 0.3 M et SDS 2%) sont ensuite ajoutés et les tubes sont agités au vortex immédiatement. On place alors les tubes dans un bain à 70°C, qu'on laisse refroidir jusqu'à une température inférieure à 40°C. On ajoute ensuite 100 μ l d'une solution phénol acide-chloroforme (5 g de phénol, 5 ml de chloroforme, 1 ml H₂O et 5 mg d'hydroxyquinoline). Après centrifugation, l'ADN de la phase aqueuse est précipité avec 70 μ l d'acétate de sodium 3 M et 700 μ l d'isopropanol. Le culot d'ADN obtenu est resuspendu dans 50 μ l de tampon Tris-EDTA pH 8.0 et 5 μ l d'acétate de sodium 3 M et 25 μ l de phénol neutre sont ajoutés. L'ADN de la phase aqueuse est reprécipité avec 50 μ l d'isopropanol et le culot obtenu est resuspendu dans 50 μ l de H₂O. L'ADN ainsi obtenu est prêt à être utilisé.

4.6 Purification de l'ADN plasmidique au chlorure de césium

La purification de l'ADN se fait sur un gradient de CsCl selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989), dans une ultracentrifugeuse (Beckman TL-100, rotor TLN-100) à 356 000 x g durant trois heures.

4.7 Isolement d'ADN simple brin

4.7.1 ADN simple brin du phage M13

L'ADN simple brin de phage est préparé selon une technique modifiée de Messing *et al.* (1981). Après infection des cellules avec le phage M13, on obtient sur pétri de petites plages blanches de cellules infectées. Ces cellules sont repiquées avec un cure-dent stérile et déposées dans un tube contenant 1.5 ml d'une culture de cellules dans du milieu 2XTY. Cette culture est incubée durant 6 hres à 37°C avec agitation. Ensuite, la culture est centrifugée et l'ADN simple brin contenu dans le bactériophage présent dans le surnageant est précipité avec une solution de PEG 6000 20% et NaCl 2.5 M. Le culot obtenu est resuspendu dans 100 μ l de tampon TE et l'ADN est purifié par deux extractions au phénol/chloroforme. L'ADN simple brin de la phase aqueuse est précipité par l'ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol 95% et le culot est resuspendu dans 30 μ l de H₂O.

4.7.2 ADN simple brin de phagemide

L'ADN simple brin de phagemide est préparé selon une méthode modifiée de Kunkel (1985). Le phage auxiliaire M13K07 est employé pour la production d'ADN simple brin. L'utilisation de ce phage est essentielle car les phagemides ne possèdent pas l'information nécessaire à l'encapsidation de l'ADN simple

brin. Le phage M13K07 produit deux protéines (II et X) qui agissent en *trans* au niveau de la région intergénique f1 du phagemide, ce qui initie la production d'ADN simple brin (Vieira et Messing, 1987). L'ADN simple brin du phagemide est encapsidé et expulsé de la cellule grâce aux protéines produites par le phage auxiliaire. Pour obtenir l'ADN simple brin, une colonie provenant d'un pétri ensemencé 16 h auparavant est inoculée dans 1.5 ml de 2XTY contenant de l'ampicilline et 8 μ l de phage auxiliaire (1.38×10^{11} pfu/ml). Cette culture est incubée à 37°C durant 90 min. et est ensuite utilisée pour inoculer 18.5 ml de milieu 2XTY contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml) et de la kanamycine (70 μ g/ml). Cette culture est incubée à 37°C durant 16 hres. L'ADN simple brin est ensuite récupéré et purifié selon la méthode décrite à la section 4.7.1

4.8 Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est effectué par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier selon la méthode de terminaison des chaînes par les didéoxynucléotides (Sanger et al., 1977).

5.0 Réaction de polymérisation en chaîne d'ADN (PCR)

Toutes les réactions de PCR ont été effectuées avec l'ADN polymérase *Pfu*, provenant de la bactérie thermorésistante

Pyrococcus furiosus. Cette enzyme est fournie par la compagnie Stratagene et les réactions de PCR ont été réalisées selon les recommandations du fabricant. A 10 μ l de tampon 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, MgCl₂ 15 mM et KCl 500 mM), on ajoute 3 μ l de chaque amorce (25 pmol/ μ l), 1 μ l d'ADN matrice (0.1 μ g/ μ l), 2 μ l de chaque désoxyribonucléotide à 2.5 mM, 1 μ l de Tween 5%, 1 μ l d'ADN polymérase *Pfu* (2.5 U/ μ l), 8 μ l de propionamide 50% et 65 μ l de H₂O. L'ADN de *S. lividans* étant très riche en G+C (74%) (Wright et Bibb, 1992), il y a possibilité de formation de structures secondaires nuisant à la réaction de PCR. La propionamide permet de palier ce problème en diminuant la force des liens G-C de l'ADN.

Le mélange de réaction (100 μ l) est réparti dans deux tubes Eppendorf de 500 μ l et 100 μ l d'huile de paraffine sont ajoutés dans chaque tube, afin d'empêcher l'évaporation. La réaction de PCR débute par une dénaturation initiale de 7 min. à 96°C, suivi d'un appariement à 55°C durant 7 min. et d'une synthèse d'ADN de 3 min. à 72 °C; ensuite commence une série de 30 cycles consistant en une dénaturation de 1 min. à 94°C, suivi de 1 min. d'hybridation à 55°C et de 3 min. de synthèse à 72°C. Dans le dernier cycle, la synthèse à 72°C se poursuit durant 7 min. et la température est ensuite ramenée à 20°C.

6.0 Clonage du gène *secY* de *S. lividans*

Les séquences en acides aminés de SecY provenant de différentes bactéries Gram-positives ont été alignées afin d'identifier certaines séquences conservées. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme Clustal du logiciel PC/Gene de la compagnie IntelliGenetics Inc.

Dans le but de cloner une partie du gène *secY* chez *S. lividans*, un PCR (PCR #1) a été réalisé sur le génome de cette bactérie. Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées ont été déduites à partir des séquences d'acides aminés consensus. Comme dans certains cas plusieurs codons peuvent coder pour un même acide aminé, les codons utilisés pour les amorces ont été choisis selon l'usage des codons chez les streptomycètes (tableau 1), tel que déterminé par Wright et Bibb (1992). En effet, comme le génome de cette bactérie est très riche en G+C (74%), certains codons sont utilisés beaucoup plus fréquemment que d'autres et le troisième nucléotide de chaque codon consiste majoritairement en un G ou un C. Un site de restriction unique a été ajouté à l'extrémité de chaque amorce, afin de faciliter le sous-clonage du produit de PCR et ainsi déterminer sa séquence nucléotidique. Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau 2. Le PCR sur le génome complet de *S. lividans* a été réalisé selon les conditions décrites à la section 5.0

Tableau 1. Usage des codons chez les streptomycètes

Acide aminé	Codon	Nombre	%	Acide aminé	Codon	Nombre	%
Gly	GGG	2294	20	Leu	TTG	380	03
Gly	GGA	1169	10	Leu	TTA	28	01
Gly	GGT	1266	11	Phe	TTT	74	02
Gly	GGC	6915	59	Phe	TTC	2947	98
Glu	GAG	5765	82	Ser	TCG	1895	28
Glu	GAA	1243	18	Ser	TCA	247	04
Asp	GAT	578	08	Ser	TCT	158	02
Asp	GAC	6623	92	Ser	TCC	2418	36
Val	GTG	3811	39	Arg	CGG	4170	35
Val	GTA	378	04	Arg	CGA	792	07
Val	GTT	317	03	Arg	CGT	1041	09
Val	GTC	5327	54	Arg	CGC	5003	42
Ala	GCG	5551	35	Gln	CAG	2902	91
Ala	GCA	889	06	Gln	CAA	276	09
Ala	GCT	753	05	His	CAT	363	11
Ala	GCC	8738	55	His	CAC	2823	89
Arg	AGG	745	06	Leu	CTG	6520	56
Arg	AGA	167	01	Leu	CTA	123	01
Ser	AGT	258	04	Leu	CTT	370	03
Ser	AGC	1732	26	Leu	CTC	4210	36
Lys	AAG	2516	94	Pro	CCG	4254	51
Lys	AAA	147	06	Pro	CCA	420	05
Asn	AAT	128	06	Pro	CCT	594	07
Asn	AAC	2107	94	Pro	CCC	3055	37
Met	ATG	1813	100	Trp	TGG	1865	100
Ile	ATA	95	03	Arrêt	TGA	362	75
Ile	ATT	117	03	Cys	TGT	208	16
Ile	ATC	3253	94	Cys	TGC	1122	84
Thr	ACG	2350	32	Arrêt	TAG	82	17
Thr	ACA	300	04	Arrêt	TAA	37	08
Thr	ACT	231	03	Tyr	TAT	151	06
Thr	ACC	4576	61	Tyr	TAC	2184	94

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées dans les différents PCR.

	Séquence nucléotidique des amorces
PCR #1 ^a	5'-GGGAATTCGGSATCATGCCSTACATCACSGC-3' 3'-CASTAGGGSCASTAGAAGCGSAGATCTGG-5'
PCR #2 ^b	5'-GGAAGCTTGGATCCCAAGGAGAAGATCACCGC-3' 3'-CAGTGGGAACTGCGTCATAGATCTCTTAAGGG-5'
PCR #3 ^c	5'-GGGAATTCTTGGAGGAAAAATTATGCTCACCGCGTTCGCCCCG-3' 3'-GGAACGGCTCTGCGACGTGTAACCTAGGGG-5'

^aLes sites de restrictions *EcoRI* et *XbaI*, respectivement, sont soulignés.

^bLes sites de restrictions *HindIII*, *BamHI*, *XbaI* et *EcoRI*, respectivement, sont soulignés.

^cLes sites de restrictions *EcoRI* et *BamHI*, respectivement, sont soulignés. Le site de fixation des ribosomes est souligné en double. Le codon d'initiation de la traduction du gène *secY* (ATG remplaçant le GTG original) est indiqué en gras.

7.0 Hybridation moléculaire

7.1 Transfert "Southern"

L'ADN 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 (Bio-Rad). Avant le transfert, l'ADN contenu sur le gel est dépuriné dans une solution de HCl 0.25 N durant 15 minutes, puis dénaturé dans une solution de NaOH 0.5 N durant 30 min. Le tampon de transfert SSC 10X est utilisé (87.6 g NaCl, 44.1 g citrate de sodium; pH 7.0). Immédiatement après le transfert, la membrane est exposée aux U.V. (150 mJoule, à l'aide de l'appareil GS Gene Linker UV Chamber de Bio-Rad) afin de fixer l'ADN sur la membrane.

7.2 Hybridation

Tout d'abord, la sonde utilisée pour l'hybridation est marquée radioactivement avec du dCTP (^{32}P) selon la méthode de "nick translation" recommandée par la compagnie Boehringer Mannheim. La préhybridation et l'hybridation de la membrane sont réalisées selon le protocole de Benton et Davis (1977). Un tampon SSC 3X est utilisé et l'hybridation se fait à 68°C durant 16 hres. La membrane est ensuite soumise à deux lavages

de 30 min. dans un tampon 0.1X SSC à 68°C. Après les lavages, la membrane est exposée sur un film Kodak X-Omat AR (Eastman Kodak) à -70°C durant 16 hres.

8.0 Construction d'une mini banque génomique

Une préparation d'ADN génomique est soumise à l'action de l'enzyme de restriction approprié. Les produits de digestion sont séparés sur un gel d'agarose 0.7%. Le gel est découpé dans la région d'hybridation préalablement déterminée et l'ADN est extrait du gel. Cet ADN est ensuite ligué au vecteur pTZ18U, préalablement digéré. Le produit de ligation est utilisé pour transformer la bactérie DH11S.

9.0 Détection des transformants par colonie-hybridation

Après la transformation, toutes les colonies blanches sont repiquées sur un milieu solide 2XTY avec ampicilline. Une plaque servira de plaque-maîtresse et une autre sera utilisée pour effectuer une colonie-hybridation afin de détecter les transformants contenant le fragment d'ADN recherché. Les colonies présentes sur cette plaque sont répliquées sur une membrane de nitrocellulose (Mandel Scientific Company) et l'hybridation est effectuée selon le protocole de Sambrook et al. (1989). La sonde utilisée consiste au produit de PCR obtenu à la section 6.0 marqué radioactivement au ³²P

Les colonies positives sont conservées sur un milieu solide 2XTY avec ampicilline et sont utilisées pour produire de grandes quantités d'ADN plasmidique par la méthode du chlorure de césium.

10.0 Analyse de la région promotrice de *secY*

Afin de déterminer si le gène *secY* possédait son propre promoteur, la majeure partie de l'ADN situé en amont du site de fixation des ribosomes de ce gène a été clonée dans le vecteur pIJ4083. Ce vecteur a été spécialement conçu pour la détection de l'activité promotrice présente sur un fragment d'ADN (voir section 2.3.2).

11.0 Analyse informatique des séquences nucléotidiques

Toutes les analyses informatiques des séquences nucléotidiques ont été réalisées à l'aide du logiciel PC/Gene (version 6.70) de la compagnie IntelliGenetics Inc..

RÉSULTATS

1.0 Clonage du gène *secY*

L'alignement de la séquence en acides aminés (aa) des protéines SecY provenant des six bactéries Gram-positives a permis d'identifier deux courtes séquences bien conservées, GIMPYITA et VIPVIFA, séparées par environ 200 aa (figure 9). A partir de ces séquences en acides aminés, deux oligonucléotides dégénérés ont été synthétisés (figure 10) et utilisés comme amorce dans une réaction de PCR réalisée sur le génôme complet de *S. lividans* 1326. Un produit de PCR de la longueur attendue, soit 600 pb, a été obtenu (figure 11) et séquencé. La séquence en aa du produit de PCR, déduite à partir de la séquence nucléotidique, a démontré une très bonne homologie avec une des protéines SecY déjà identifiées chez d'autres microorganismes. Ce produit de PCR a donc été utilisé en tant que sonde pour cloner le gène *secY* complet.

Une hybridation "Southern" a permis d'identifier un fragment d'ADN chromosomique d'une longueur de 3.8 kb, obtenu par l'enzyme de restriction *Bgl*III, contenant le gène SecY complet (figure 12). Afin de cloner ce fragment d'ADN, une mini-banque génomique a été construite dans le vecteur pTZ18U. Cette mini-banque a fourni 135 clones, dont un seul s'est avéré contenir le fragment de 3.8 kb recherché. Ce clone a été identifié par colonie-hybridation en utilisant le produit de PCR de 600 pb comme sonde. Le plasmide portant l'insertion de 3.8

Amorce SY1

EcoRI
5'- GG GAATTC GGS ATC ATG CCS TAC ATC ACS GC -3'
G I M P Y I T (A)

Amorce SY2

XbaI
3'- CAS TAG GGS CAS TAG AAG CGS AGATCT GG -5'
V I P V I F A

Figure 10. Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour le PCR #1 (S= C ou G). Les sites de restrictions ajoutés à l'extrémité des amorces sont indiqués. Les acides aminés correspondant à chaque codon sont indiqués en gras sous la séquences nucléotidique.

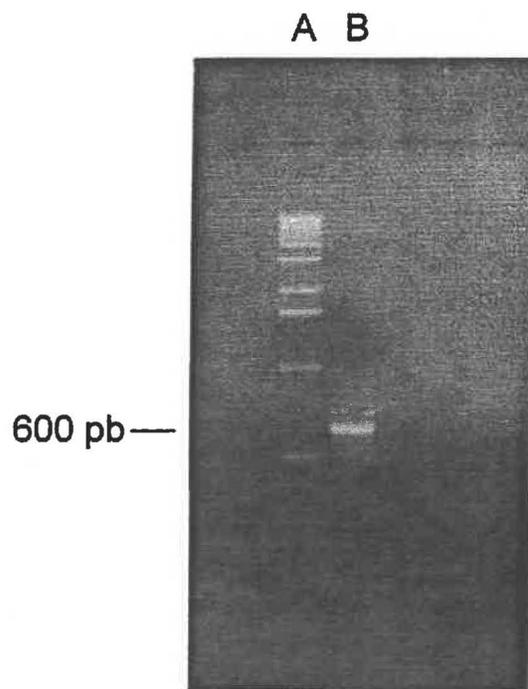


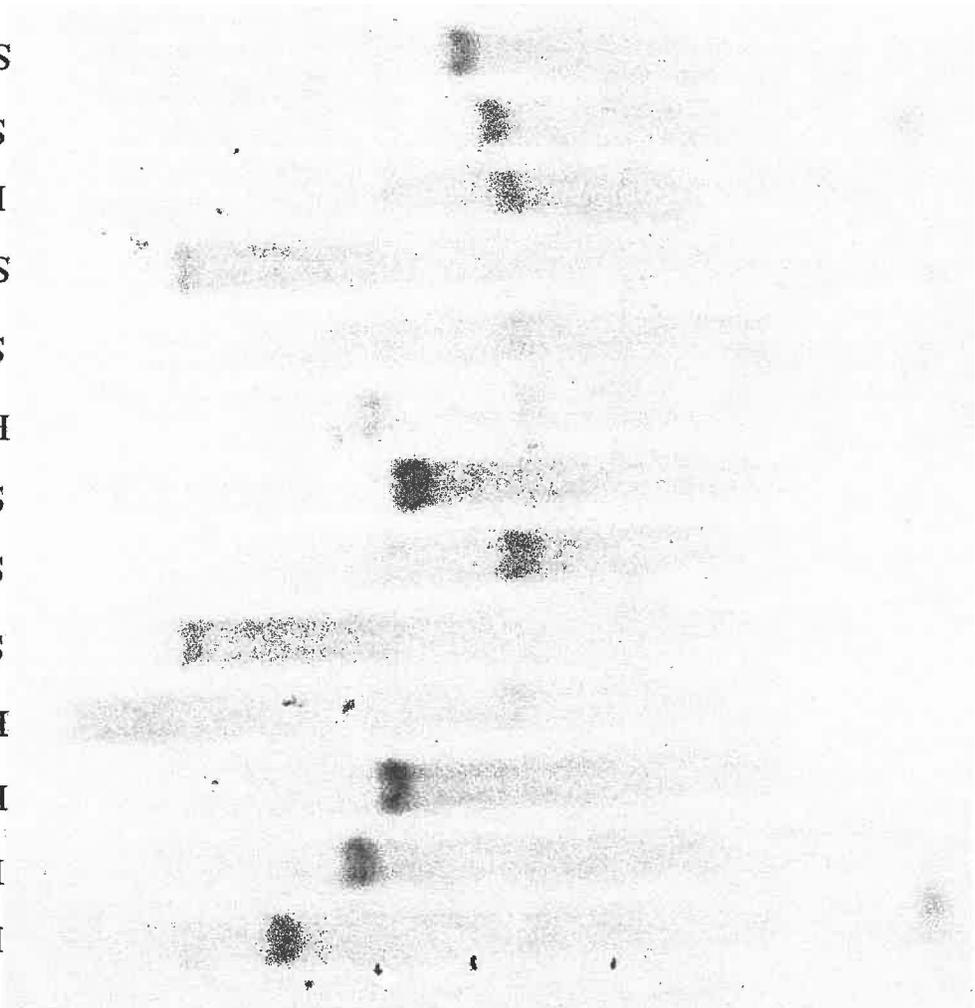
Figure 11. Migration sur gel d'agarose d'un fragment de *secY* amplifié par PCR. Ce produit de PCR a ensuite été utilisé comme sonde pour cloner le gène *secY* complet.

A: Echelle moléculaire

B: Produit de PCR

Figure 12. Hybridation moléculaire. Les enzymes de restrictions avec lesquels le génôme a été digéré sont indiqués au haut de la figure. Une échelle moléculaire est aussi indiquée à la gauche de la figure.

KpnI
PstI
BglIII
BamHI
SphI
Sall
SacI
PstI-KpnI
SphI-Sall
SphI-BamHI
BamHI-Sall
SacI-KpnI
SacI-PstI



5.0 kb
4.0 kb
3.0 kb
2.0 kb

kb, nommé pIAF860, a ensuite été purifié en grande quantité par la méthode du chlorure de césium.

2.0 Séquençage du fragment d'ADN portant *secY*

La carte de restriction de pIAF860 a d'abord été établie. A partir de cette carte, divers fragments d'ADN ont été sous-clonés dans les phages M13mp18 et 19 ou dans les phagemides pBluescript SK+ ou SK- (figure 13) afin de faciliter le séquençage de l'insertion. Des amorces synthétiques ont été utilisées pour compléter le séquençage. L'insertion a été séquencée sur une longueur de 2.2 kb dans les deux orientations. La séquence nucléotidique est présentée à la figure 14.

Un cadre de lecture débute au nucléotide (nt) 347 et se poursuit jusqu'au nt 1660, formant le gène *secY*. Ce gène code pour une protéine de 47 kDa et la séquence déduite en aa montre une bonne homologie avec d'autres protéines SecY (voir section 3.0). Un site de fixation des ribosomes, AGGAGG, se retrouve 10 nt avant le codon d'initiation de ce gène, qui consiste en un GTG. La composition en guanine et cytosine (G+C) du gène *secY* est de 64% et la troisième position des codons est occupée à 92% par une guanine ou une cytosine.

Une analyse de la séquence nucléotidique située en amont et en aval de *secY* a permis d'identifier deux autres cadres de lecture incomplets. On retrouve au tout début de l'insertion

une séquence codant pour la fin de la protéine ribosomale L15. En effet, la séquence en aa codée par les nt 1 à 90 montre une bonne homologie avec l'extrémité c-terminale des protéines L15 de *E. coli* et *B. subtilis*.

La séquence en ADN située entre les gènes *L15* et *secY* ne semble pas contenir de cadres de lecture ouverts. Immédiatement après *secY* débute un autre cadre de lecture ouvert. Les nt 1660 à 2258 codent pour l'extrémité amino-terminale d'une protéine montrant une très bonne homologie avec la protéine adénylate kinase (Adk) de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. flavum*.

Un aperçu global de l'arrangement des gènes retrouvés sur l'insertion de 3.8 kb est présenté à la figure 15.

Figure 13. Carte de restriction et stratégie de séquençage de l'insertion de 3,8 kb portant le gène *secY*. Des fragments ont été sous-clonés dans pBluescript SK +/- (- - - - -) ou M13mp18/19 (———) et la séquence a été établie à l'aide d'ADN simple brin obtenu à partir de ces vecteurs. Des amorces synthétiques (.....) ont été utilisés pour compléter le séquençage.

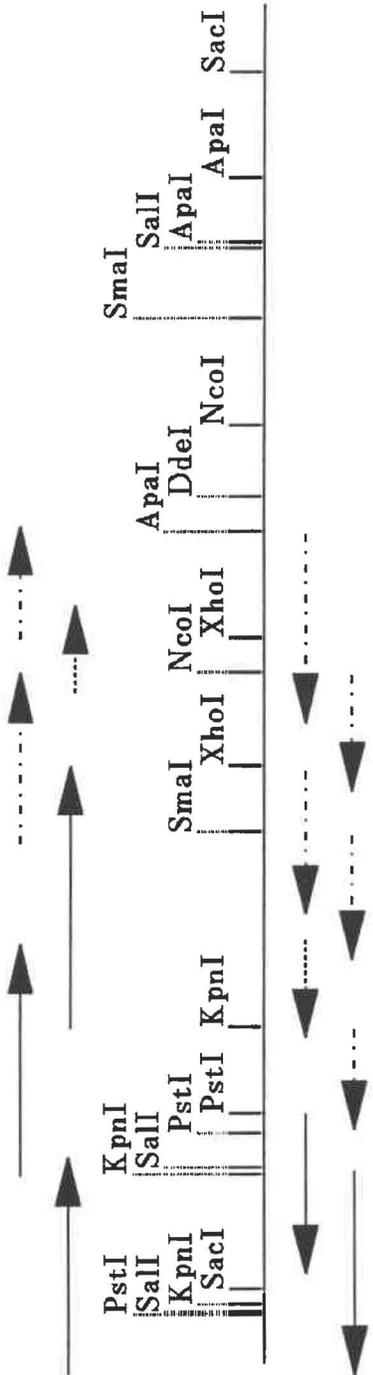


Figure 14. Séquence nucléotidique du gène *secY* et de la région environnante. Les régions conservées sur lesquelles les amorces du PCR#1 ont été basées sont soulignées. Le site de fixation des ribosomes est souligné en double.

L15 --->

TCCGTGGCGCTGACGGTGACGGTCGACGCCGTCTCCGGCTCCGCCAAGGAGAAGATCACCGCCGCCGTACCGTCACCGAGCTCGTCTGAACCACTCGGACGTGTCGAT 109
S V A L Q V T V D A V S G S A K E K I T A A G T V T E L V -

GACATGAGCGATCCCGACCGGGATGCCCAAAAAGGGTATCCCGGTTGGTCGTTCAAGGGGAGTGCTCCCGCCGTAAGGTGGCCTGCGCTGCCCTCTTTCAC 217
GGTGCGTCACATGAGGCACTCTTGACGGCGGTTACGCGTTATCCCTTAGCCGTCACCTATCAGTCGTGAGTCAACCTCAAGACCGTCACCCCTTGACGCAGTAGC 325

secY --->

GCGGGGGTGCAGGAGGACCGTCTCACCGGTTCCGCCCCGGGTTCAAGACGCCGACCTGCGCAAGAAGCTGCTCTTACGCTCGGCATCATCGTGGTGTACCGA 433
M L T A F A P A F K T P D L R K K L L F T L G I I V V Y R 29

CTCGGTACCCACATTCCCATTCAGGCGTCGACTACAAGAAGCTCCAGGAGTGGCTGGACAGGCGTCCGGCAACCAGGGCCTCTTCGGCCTGGTCAACATGTTTCAGC 541
L G T H I P I P G V D Y K N V Q E C V D Q A S G N Q G L F G L V N M F S 65

GGTGGCGCCCTGCTGCAGATCACGGTCTTCGCGCTCGGCATCATGCCGTACATCACGGCGAGCATATTCTGCAGCTGCTGACCGCTCGTGATCCCGCCCTGGAAGCC 649
G G A L L Q I T V F A L G I M P Y I T A S I I L Q L L T V V I P R L E A 101

CTCAAGAAGGAGGGCCAGGCGGTCAGCGAAGATCACGCACTACCCCGTACCTGACCGTCCGCGCTCGCCATTCTCCAGGGCACCGGCTGGTGGCCACCGCCCGC 757
L K K E G Q A G T A K I T Q Y T R Y L T V A L A I L Q G T G L V A T A R 137

AGCGGCGCCCTCTTCTCCGGCTGCACCGTCCGCGGTGAGATCGTGCCCGACAGGCCATCTTACCACCGTCTGTCATGGTTCATCTGCATGACCGCCGGTACCTGCGTC 865
S G A L F S G C T V A G Q I V P D Q A I F T T V V M V I C M T A G T C V 173

GTCATGTGGCTCGCGAGCTGATCACCGACCGCGCATCGGCAACGGCATGTCGATCCTGATGTTTACTCTCGATCGCCGCGACCTTCCCTCCGCCCTGTGGCCATC 973
V M W L G E L I T D R G I G N G M S I L M F I S I A A T F P S A L W A I 209

AAGAAGCAGGGCGAGCTGGCCGACGGCTGGATCGAGTTCGGCAGCGTTCCTCGTCCGCGTGGTTCATGGTCCGCGTGGTGGTCTTCTGTTGAGCAGGGCCAGCGCCGC 1081
K K Q G E L A D G W I E F G T V I L V G L V M V G L V V F V E Q A Q R R 245

ATCCCGTGCAGTACGCGAAGCGCATGATCGGCGCGGCTCCTACGGCGGCACCTCGACGTACATCCCGTCAAGGTGAACCAGGGGGTGTATCCCGTTCATCTTC 1189
I P V Q Y A K R M I G R R S Y G G T S T Y I P L K V N Q A G V I P V I F 281

GCCTCGTCCGCTCTACATCCCGGCACTGATCGTCCAGTCTCGAAGTTCGCAACTCGACGGCGGGCTGGGCCACCTGGATCACGAAGAATCTCGCGGACACCGCGCGACGCCG 1297
A S S L L Y I P A L I V Q F S N S T A G W A T W I T K N L A D T A A T P 317

CACATCATCTGTACTTCTTCTGATCGTCTTCTTCGCTTCTTCTACGTGGCCATCTCGTTCAACCCCGAGGAGTCCGGGACACATGAAGAAGTATGGTGGCTTC 1405
H I I L Y F F L I V F F A F F Y V A I S F N P E E V A D N M K K Y G G F 353

ATCCCGGCATCCGGGCTGGCCGACCGCGCTGAGTATCTGAGTACGTAACCGGATCACCTGGCCGGGTTCCGCTGTACTTGGGCTGATCGCTCTCGTCCCG 1513
I P G I R A G R P T A E Y L S Y V L N R I T W P G S L Y L G L I A L V P 289

ACAATGGCGTGGCTGGTTTCGGGGCAAACAGAATTCCTCGTTCGGTGGCACCAGCATCCTGATCATCGTGGTGTGGTCTCGAGACGGTGAAGCAGATCGAGAGC 1621
T M A L A G F G A N Q N F P F G G T S I L I I V G V G L E T V K Q I E S 425

ack --->

CAGCTCCAGCAGCGCAATTACGAAGGGTCTCCGCTGATGCGAATCGTCTCGTCCGCGCTCCGGGTGCCGAAAGGGAACGACGGCCACCCGCTTGCCGAGACGC 1729
Q L Q Q R N Y E G F L R - M R I V L V G P P G A G K G T Q A T R L A E T 460

TGCACATTCGCGACATCTCCACGGGCGACCTGTTCCGCGCGAACATCAGCCAGCAGACCGAAGTGGGCAAGCTCGCGAAGTCTACATGGACGCCGGCAATCTCGTGC 1837
L H I P H I S T G D L F R A N I S Q Q T E L G K L A K S Y M D A G N L V 496

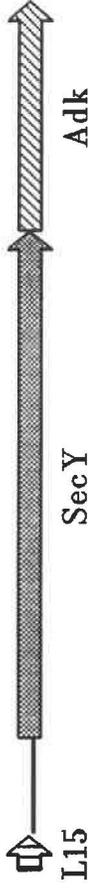
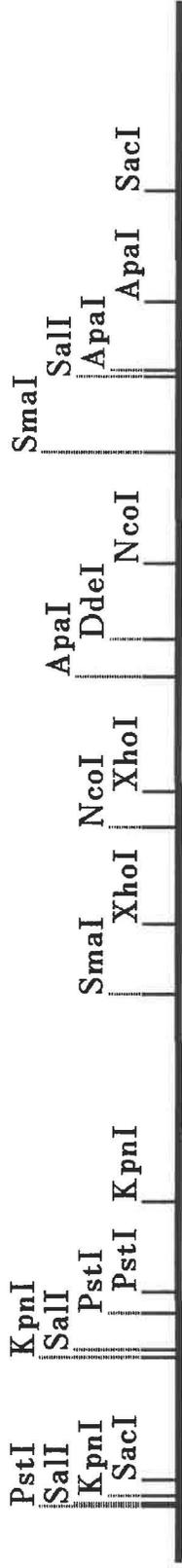
CGGACGAGGTACCATCGCCATGGACAGGACCGCATGGAGCAGCCGACCGGAGGGCCTTCTGCTGGACGGTCTCCCGCGCAACGCTCTCCAGGCGGAGGCGCTGG 1945
P D E V T I A M D R T A W S S P T P R A F L L D G F P R N V S Q A E A L 532

ACGAGTCTCGAGACCGAGGACATGAAGCTCGACGCGGTGCTGGACCTGGAGGCCCGGAGGACGAGGTGCTCAAGCGGATCGCGCGCGGCGCTCTGCCCAACG 2053
D E L L E T E D M K L D A V L D L E A P E D E V V K R I A G R R V C R N 568

ACTCGGCCACGCTCTCCACGTGACGTACACGCCGCGAAGAAGGAAGGCGTCTGCGACGCTGCGCGCGGAGCTGTACCAGCGGGACGACGACTCCGAGGAGACGG 2161
D S A H V F H V T Y T P P K K E G V C D V C G G E L Y Q R D D D S E E T 604

TCCGCAAGCGGCTGGAGGTCTACCACACGACAGCCGAGCCGATCATCGACTACTACAAGTCCGAGGGCCTGGTCCGCCACCATCGCCGCGACGGGCCC 2258
V R K R L E V Y H T Q T E P I I D Y Y K S Q G L V A T I A A T G 636

Figure 15. Arrangement chromosomique des gènes *L15*, *secY* et *adk* chez *S. lividans*.



3.0 Analyse de la séquence protéique de SecY

3.1 Analyse du spectre d'hydrophobicité

Toutes les protéines SecY identifiées jusqu'à maintenant possèdent 10 segments transmembranaires potentiels. A l'aide du programme Raoargos du logiciel PC/Gene, il a été vérifié si SecY de *S. lividans* présentait les mêmes propriétés. L'analyse informatique a démontré que SecY de *S. lividans* possédait bien 10 segments transmembranaires (figure 16 et tableau 3).

3.2 Alignement

La séquence en acides aminés de SecY de *S. lividans* a été alignée avec des protéines SecY provenant d'autres micro-organismes (figure 17). L'alignement de ces quatorze séquences a démontré que 17.5% des aa étaient similaires, dont 2.8% sont identiques. Un dendogramme, construit à partir de cet alignement, montre la similarité relative entre les différentes protéines SecY (figure 18).

Toutefois, en comparant seulement deux séquences entre elles, SecY de *S. lividans* est identique à 42.1%, 40.9% et 56.1% avec les SecY de *E. coli*, *B. subtilis* et *B. flavum*, respectivement.

Une recherche récente dans la base de donnée GenBank a révélé le clonage de gènes *secY* chez deux streptomycètes. Les

gènes *secY* de *S. coelicolor* et *S. scabies* sont identiques à 99.1% et 89.5%, respectivement, à celui de *S. lividans*.

Figure 16. Analyse hydrophobique de SecY. Les segments transmembranaires sont numérotés au bas du graphique.

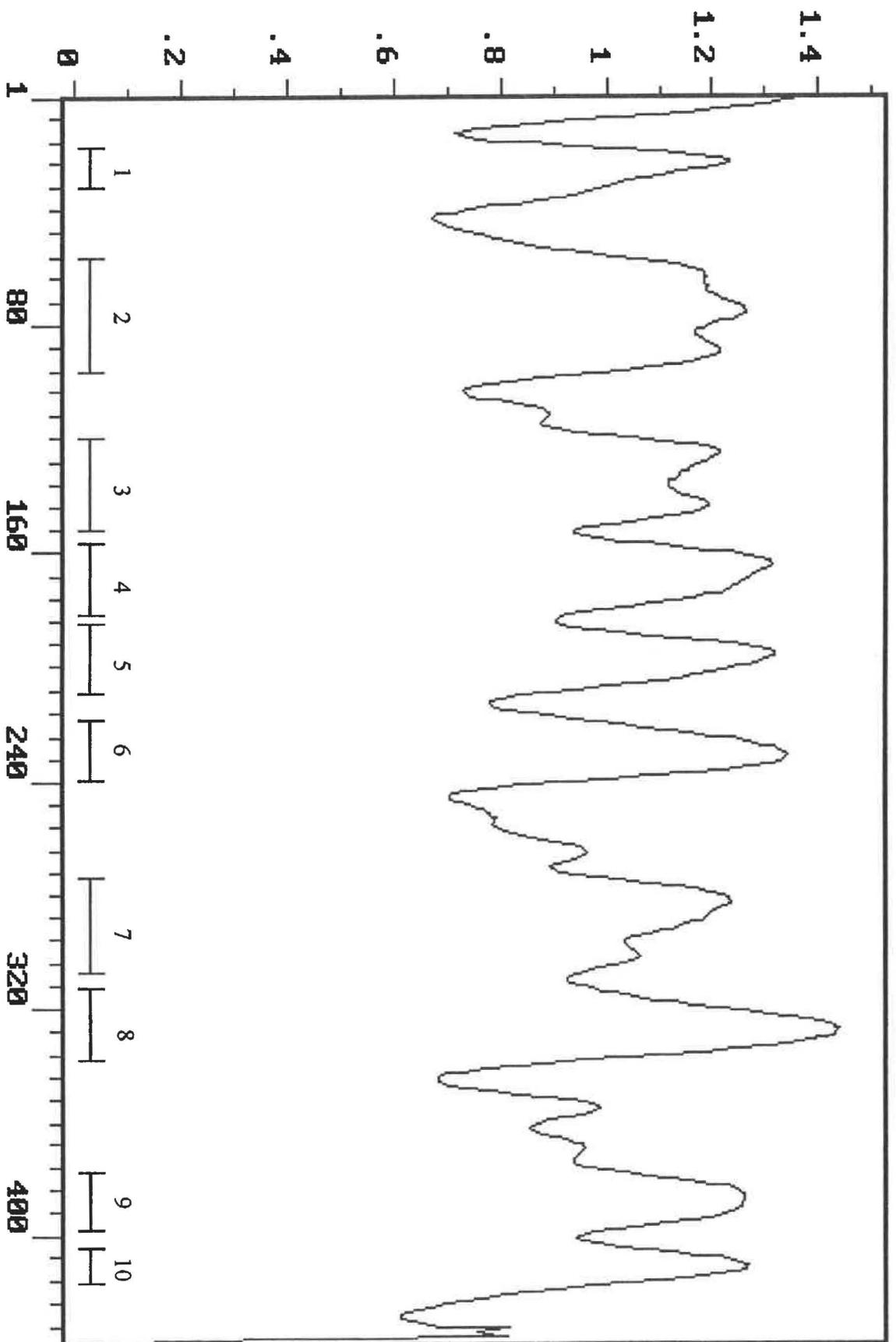


Tableau 3. Positions et séquences en aa des 10 segments transmembranaires potentiels.

#	Position de	à	Séquence
1	18	32	LLFTLGIIVVYRLGT
2	68	96	LLQITVFALGIMPYITASIILQLLTVVI
3	120	143	LTVALAILQGTGLVATARSGALFS
4	156	178	AIFTTVVMVICMTAGTCVVMWL
5	185	209	GIGNGMSILMFISIAATFPSALWAI
6	218	239	GWIEFGTVILVGLVMVGLVVFV
7	274	298	AGVIPVIFASSLLYIPALIVQFSNS
8	313	338	TAATPHIILYFFLIVFFAFFYVAISF
9	378	398	GSLYLGLIALVPTMALAGFGA
10	404	417	FGGTSILIIIVGVGL

Figure 17. Alignement de séquences en acides aminés de protéines SecY provenant de différents microorganismes. Les positions approximatives des différents segments transmembranaires potentiels sont indiqués par des crochets (Sl, *Streptomyces lividans*; So, *Strptomyces coelicolor* (GenBank, X83011); Sb, *Streptomyces scabies* (GenBank, U19606); Bf, *Brevibacterium flavum* (Kobayashi et al., 1994); Ml, *Micrococcus luteus* (Ohama et al., 1989); Ec, *Escherichia coli* (Cerretti et al., 1983); Ss, *Synechococcus* sp. (Nakai et al., 1992); Bl, *Bacillus licheniformis* (Tschauder et al., 1992); Bs, *Bacillus subtilis* (Suh et al., 1990); Sc, *Staphylococcus carnosus* (Tschauder et al., 1992); Ll, *Lactococcus lactis* (Koivula et al., 1991); Mc, *Mycoplasma capricolum* (Ohkubo et al., 1987); Hm, *Haloarcula marismortui* (Arndt, 1992); Mv, *Methanococcus vanniellii* (Auer et al., 1991).

1 2

Sl VLTAFAPAFKTP-----DLRKKLLFTLGIIVVYRLGTHIPIPGVDYKNVQECV-DQASGNQGLFGLVNMFSGGALLQITVFALGIMPYITAS 86
 So MLTAFARAFKTP-----DLRKKLLFTLGIIVVYRLGTHIPIPGVDYKNVQECV-DQASGNQGLFGLVNMFSGGALLQITVFALGIMPYITAS 86
 Sb MLTAFARAFKTP-----DLRKKLLFTLGIIVVYRLGTHIPIPGVDYSAVQFCI-DQTKNSNGLFGLVNMFSGGALLQITVFALGIMPYITAS 86
 Bf V-SAIQAFKDA-----DLRKKIIFTIAMIYLRIGAIIPSPGVDYATISGRLRDLTQDQSSVYSLINLFSGGALLQLSIFAIGIMPYITAS 86
 Ml VLKAIARIVRTP-----DLRRIAFTLGLIIVYRMGDFVPAATGVDYPAVQQCL-AAGNAQGGLYSFMVNFSGGALLQVSVFALGIMPYITAS 86
 Ec MAKQPGDFQSAKGG-----GELKRRLFTVIGALIVFRIGSFIPGIDAAVLA---KLEQQRGTIEMFNMFSGGALSRASIFALGIMPYITAS 89
 Ss MVVSRGKTPNAQETFLQ-----MAQASGLRGRILITVGLLILCRLGIFIPVPGIDRVAFSNDLQGNAN-LGGVIGFLDIFSGGALSALGVFALGILPYINAS 96
 Bl LF-KTISN-----FMRVKDIRNKIIFTLLMLIVFRIGSFIPVPHVNTVEV-L---KA-QDQMSVFGILNLFSGGALLQLSIFAIGIMPYITAS 81
 Bs -----MRVSDIRNKIIFTLLMLIVFRIGAFIPVYVNAEA-L---QA-QSQMGVFDLNTFSGGALYQFSIFAMGITPYITAS 81
 Sc MF-ETIVN-----FFKTKEVRNKIIFTLMLVIFKIGTYIPAPGVNPAF---DNNQSGQVTDLLNTFSGGALKNFISIFAMGIMPYITAS 82
 Ll MFFKTLKE-----AFKVKDVRARILFTIFILVFVRLGAHITAPGVNQN-L---QQV-ADLPFLSMMNLVSGNAMQNYSLFAMGVSPYITAS 82
 Mc MVIKKPANKVDKSTFKSSNKKKNPFKSSFLTKNKDLIYRILFTLLALIIIRLGVYIYTPGVVTLDKRF---ATDSSRIQFFQLLSTLGGGSIGRFSLALGVGSPYITAS 106
 Hm MSWK-----DTAEPLLRMPAVQRP-----EGHVPFKRKLWTGGVLLLYFLLTNVKLFGLD-----IDASQVVFGRFSSILASGQG---SIMQLGIGPIVITAS 86
 Mv MKIK-----PILLEIPEVKRP-----LKGVSFKEKIQWTGLVLLIYFLLGTIDIIY-MG-----GAEMPAMFAFWQVTASKMG---TLITLIGIGPIVITAG 81

.. * *

3 4

Sl IILQLLTV-VIPRLEALKK-EGQAGTAKITQYTRYLTVALAILQGTGLVATARSALFSGCTVAGQIVPDQAIFTTVMVICMTAGTCVVMWLGELIDRIGINGMSILM 194
 So IILQLLTV-VIPRLEALKK-EGQAGTPKITQYTRYLTVALAILQGTGLVATARSALFSGCTVAGQIVPDQAIFTTVMVICMTAGTCVVMWLGELIDRIGINGMSILM 194
 Sb IILQLLTV-VIPRLEALKK-EGQSGTAKITQYTRYLTVALAVLQGTGLVATARSALFSGCQPOANNIPVDDSIFTTLMVVTMTAGTAVVMWLGELIDRIGINGMSILM 194
 Bf IIVQLLTV-VIPHFEEKK-EGQSGQAKMMQYTRYLTVALALLQSSGIVALADREQLGAGIRV--LSADRNFIDLIVLITMTAGAVLVMWLGELITEKGVGNGMSILLI 192
 Ml IIVQLLTV-VIPRFEQLHQ-ERRRQATLTQYTRYLTVALALLQATMASLARTGALL-GCSLP--LLRDGSIITVLLVVIATLTGCLIVMWFGERITSHGVGNGMSILLI 191
 Ec IIVQLLTV-VHPTLAEIKK-EGESGRRKISQYTRYGLVLAIFQSIGIATG-----LPNMPGMQGLVINPGFAFYFTAVVSLVTGTMLMWLGEQITERGIGNGSI III 191
 Ss IILQLLTA-AVPALEDLQKNEGEAGRRKIQAQLTRYVSLGWALLQSIIVAVVTRYAYATPG-----PLFT-IQTALALVAGSMFVMWJSELITERGIGNGASLLI 193
 Bl IIVQLLQMDVVPKFTEWSK-QGEVGRRLKLAQFTRYFTIVLGFIALGMSYGFNNMA-----GGALITDPGVGTYLLIAIVLTAGTAFMLMWLGEQITSHGVGNGSI III 183
 Bs IIVQLLQMDVVPKFTEWSK-QGEVGRRLKLAQFTRYFTIVLGFIALGMSYGFNNLA-----NGMLIEKSGVSTYLLIAIVLTTGTAFLMWLGEQITSHGVGNGSI III 183
 Sc IVMQLLQMDIVPKFTEWAK-QGDVGRKLLNNVTRYFAIILAFIQSIGMAFQFNLYL-----KGALIIDPSPMSYLLIAIVLTTGTAFLMWLGEQITQYGVGNGSI III 184
 Ll IIVQLLQMDILPKFVEWSK-QGEIGRRKLNQATRYITLVLAMAQSIGITAGFQAMS-----SLNIVQNPWQSYLMIGVLLTTGSMVVTWMEQINEKGFSGSVSVI 184
 Mc IIVQLLSTDVIVLTRWSK-SGERGRKLDKLTKIIMPALMQAETIFTLSSQGLIIP-GWNTNAIANSAFYIILIPVLMWGGSFMLWADQITIKGIGNGSI VI 214
 Hm IIVQLLGGADLLGLNTQDDPRDQILYQGLQKL-----LVLVMICTGLPMVFAAGFLPADTAVANSLGIGTAGVQWLIFA-QMFGVGVLLIFMDEVI SKWGVGSGIGLFI 190
 Mv IIMQLLVGSELSIDL-SKPMNRALFQGLQKL-----FG-IFLCFLE-AVMFVG-----AGAFGVNSTLALILVL-QALGAILVIYLDIVSRYGIGSGIGLFI 173

*..*** * * *

5 6

Sl FISIAATFPSAL-----WAIKKQGEADGWIEFGTVILVGLV-----MVGL-----VVFVEQAQRRIIPVQYAKRMIGRRSYGGTSTY---IPLKVNQ 273
 So FISIAATFPSAL-----WAIKKQGEADGWIEFGTVILVGLV-----MVGL-----VVFVEQAQRRIIPVQYAKRMIGRRSYGGTSTY---IPLKVNQ 273
 Sb FISIAATFPSAL-----WSIKEQGLDAGGWIEFGIVAVGLV-----MVAL-----VVFVEQAQRRIIPVQYAKRMIGRRSYGGTSTY---IPLKVNQ 273
 Bf FAGIATRLLPTD-----GMNILGNSSG--VVFVAVLASVLI-----LVIG-----VVFVEQQRRIIPVQYAKRMIGRRSYGGTSTY---IPLKVNQ 267
 Ml FTSIAAGFPAGL-----GQVVQTQGRVFAIVMGIGLL-----TMLA-----IVFVEESQRRIIPVQYAKRQIGSRTVGGSTY---IPVKVNM 266
 Ec FAGIVAGLPPAI-----AHTIEQARQGD--LHFLVLLLVAVL-----VFAVTFVVFVERGQRRIIPVQYAKRQIGRRVYAAQSTH---LPLKVN 271
 Ss FLNIVATLPRSL-----QQTLELAQSGD-RSTVGGIVILLIV-----FLATIVGIVFVQEGTRRIIPVVSARRQVGNRVYSERSSY---LPLRLNQ 274
 Bl FAGIVAGIPQTI-----NQIYA--QQFVD-AGDQLFLQIKVIVLVA-----ILAVIVGVI FIQQAVRKISIQYAKGSRSPVGGQSTH---LPLKVN 268
 Bs FAGIVSSIPKTI-----GQIYE--TQFVG-SNDQLFIHIVKVALLVIA-----ILAVIVGVI FIQQAVRKISIQYAKGTRSPVGGQSTH---LPLKVN 268
 Sc FAGILSTLPSL-----IQFYQ--QAFVG-QSDTS-MAWLQVAGLVIG-----LVLLTMGAVVVLQAVRKIPIQYAKKQSTQRL-GSNATY---LPLKVN 267
 Ll FAGIVSGIPSAI-----KSVYD--EKFLNVRPSEIPMSWIFVIGLILS-----AIVIIYVTVFVQQAERKVP IQYTKLTQ---GAPTSSY---LPLRVN 266
 Mc FIGI IISMPNL-----KSTFEYVWSNSGEEANIFFSGLLNFMIIYSV-----FLLVILSVVIMNEAERKIPIQ--QTGSGLTDSEHTPY---LPLKLN 300
 Hm VAGVTQRLVGGLLTAPFLGNSEGIYTY-WYLFITGERGTGPVLAADGLQTVLQGLLGLFTTVLIFAVVVYAESVVEIPLSNARVKARGRFPVKLIYASVLPMLIVR 299
 Mv AAGVAQTI-----FVGAFAEGYL-WKFF-----SAMSVSLGI AF--EYILPILSTL FVFLVVVYVESIRVEIPLAHRVKGAVGKYPKFIYVSNLPIVLA 264

.. * * *

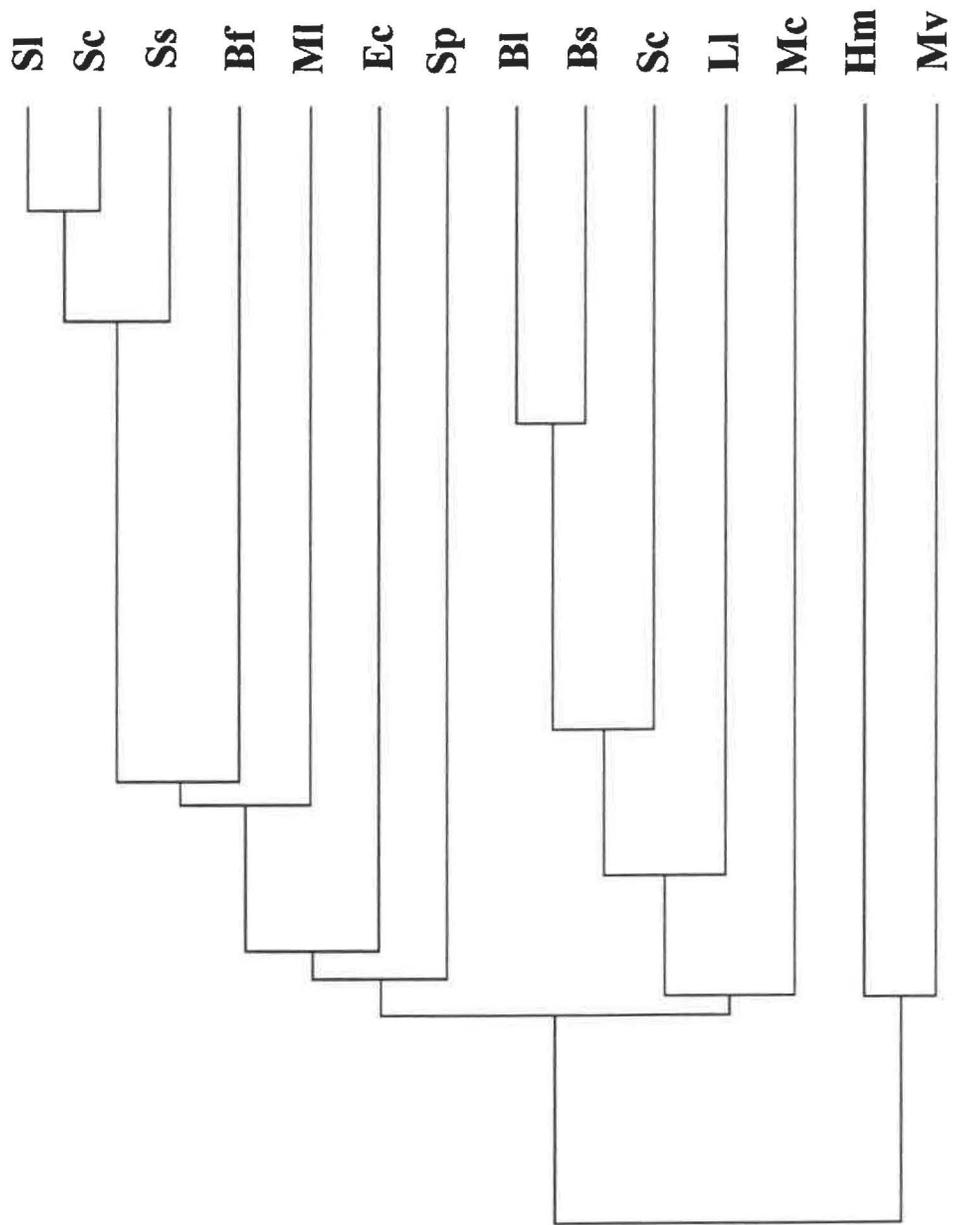
7 8

Sl AGVIPVIFASSLL----YIPALIVQFSNSTAG-----WATWITKNLADTAATP---HIILYFFLI--VFFAFFYV-AISFNPEEVADNMKKGYPG 356
 So AGVIPVIFASSLL----YIPALIVQFSNSTAG-----WATWITKNLADTAATP---HIILYFFLI--VFFAFFYV-AISFNPEEVADNMKKGYPG 356
 Sb AGVIPVIFASSLL----YIPALIVQFSNSTAG-----WAAWIQKNLADTAAPA---HITVYFFLI--IFFAFFYV-AISFNPEEVADNMKKGYPG 356
 Bf AGVIPVIFASSLI----YMPVLIQTIVNSGSLEVSNDW-----WQRNIIAHLQTPSSWQ---YIVLYFALT--IFFSYFYV-SVQYDPAEQANMKKGYPG 356
 Ml ANVIPVIFASSVL----MLPGIILQFNTPDQGSAPAPW-----ITWLSRYFGSGDHPV---YMALYFLLI--IGFTYFYV-SITFNPVISEDNMKRYGGFIPA 354
 Ec AGVIPVIFASSII----LFPATIASWFGGGTG-----W-----NWLTTISLYLQ-PGQPL---YVLLYASAI--IFFCFYF-ALVFNPRETADNLKKSQAFVPG 355
 Ss GGVMPII FASAIL----VLPFSLANFTSNEV-----VLRIANLYSPNGPT-WIYALFYLLI--VAFSYFYV-SLILNPDVLAQNLKKGSSIPG 357
 Bl AGVIPVIFAVAFI----TTPRTVATFFGSNDVTN-----WI-----KQTFDYTH---PVGMGVYAALI--IAFTYFYA-IVQVNPEQMADNLKKGQGYIPG 349
 Bs AGVIPVIFAVAVL----ITPRTIASFFGTNDVTK-----WI-----QNNFDNTH---PVGMAIYVALI--IAFTYFYA-FVQVNPEQMADNLKKGQGYIPG 349
 Sc AGVIPVIFAMAFF----LLPRTLTMFFPKADWAQ-----QI-----ANTANPSS---NIGMVIYIILI--IAFTYFYA-FVQVNPEKMSDNLKKGQSYVPG 348
 Ll AGVIPVIFAGSIT----TAPATILQFLQRSQGSNVG-----WLSTLQNALSYTT---WTGMLFYALLI--VLTFTFFYS-SLILNPEKMAENLQKQGSYIPG 352
 Mc AGVIPVIFASAI----STPITISQIEGVN-PDSG-----FVIFTRDYLFSNT---WVGISIFGILI--VLTFTFLYS-QVQINPEKIAENFQKSGTFIPG 385
 Hm ALQANIQLFLGRILNAQLGSMFAFLGTANGQPTGGL-FYFLAPIQSRGDMWMLLEGTAQPVWQILTRVGDILFVMLVGGAVFAVFWVETDMGPEATAKQIHNSGMQIPG 408
 Mv ALFANIQLWGMFLD-RMGY--PILGQYSNGTAVSGIAYFSTPYGINSI-----ISDPLHAI FYTLMVMVIFCIL----FGLFWVETSGLDAKSMKKGGLNLDMAIKG 359

.. * * *

	9	10	
S _l	IRAGRPTAEYLSYVLNRITWP-GSLYLGLIALVPTMALA---GFGANQNFP-FGGTSLIIIVGVLETVKQIESQLQQRNYE-----GFLR		437
S _o	IRAGRPTAEYLSYVLNRITWP-GSLYLGLIALVPTMALA---GFGANQNFP-FGGTSLIIIVGVLETVKQIESQLQQRNYE-----GFLR		437
S _b	IRAGRPTAEYLSYVLNRITWP-GSLYLGLIALVPTMALA---PLGANQNFP-FGGTSLIIIVGVLETVKQIESQLQQRNYE-----GFLR		437
B _f	IRPGRPTAEYLGFMNRLLFV-GSLYLAVIAPLNIMDLGVDAGSAGATP-FGGTALILVSVALLTTVKQIESQLLQSNYE-----GLLK		440
M _l	SAPAGPTERYLQYVISRITFVVGALYLGIVAMIPLIAFAV---IGTSQNFP-LGGTSLIIIVGVGLQTVKQVSAQMEQRHYE-----GLLR		436
E _c	IRPGEQTAKYIDKVMTRLTL-VGALYITFICLIPEFMRD-----AMKVPFY-FGGTSLIIIVVVIMDFMAQVQTLMMSSQYESALKKANLK-----GYGR		443
S _s	VRPGRATSQYVQGVLNRLT-ILGAVFLGLVAIIPAV----EGATRIRTFQGGFATSLLIIVGVAIDTAKQVQTYVISQRYEGMVKD-----439		
B _l	VRPGKMTQDRITSILYRLTF-VGSI FLAVIAILPVLV----VNIAGLPSSAQIGGTSLLIIVIGVALETMKQLESQLVKRNYRG-----FMKH-----431		
B _s	VRPGKMTQDRITSILYRLTF-VGSI FLAVISILPIFF----IQFAGLPQSAQIGGTSLLIIVGVALETMKQLESQLVKRNYRG-----FMKN-----431		
S _c	IRPGEQTKKYITKVLRYRLTF-VGSI FLAVIAILPILA----TKFMNLPQSIQVGGTSLIIVIGVAIETMKSLEAQVNQKEYKG-----FGGR-----430		
L _l	VRPGKTEKYVSRLLMRLAT-VGSLFLGLISIPIAA----QNVWGLPKIVALGGTSLIILIQVAIQAVKQLEGYLLKRKYAG-----FMDNPLETK-----439		
M _c	IKPGKDTTKYLTGIINRLSV-VGSVFLAIIALLPYVI----SKLTQLPSNLAIGGTGLIICISVAIQTVQQLKGRIIQQNFIEKKKEFTNNINKNKTSHIW		482
H _m	FRQNVGVIEKVLERYIPQVTVIGGALVGLLAVMANMLGTIG-----GVSQTGLLLTVSITYKLYEEIAEEQL-MEMHPMMRQMF-----487		
M _v	FRKSQKSIEQRLKRYIKPITVMGSAFVGFLLAAADFTGALG-----G--GTGVLLTVSIVYRLYEQLVQEQL-SELHPAVAKFVGK-----R		438
	*	*	

Figure 18. Dendogramme basé sur la comparaison entre les protéines SecY de différents microorganismes. Les lettres à droite graphique identifient le microorganisme (se référer à la figure 17 pour les abréviations).



4.0 Analyse de la région promotrice

Afin de déterminer si la région non-codante située en amont du gène *secY* comportait un promoteur, cette région a été clonée dans le vecteur pIJ4083. Ce vecteur est spécialement conçu pour analyser l'activité promotrice chez les streptomycètes. Le fragment à analyser (environ 300 pb) a été amplifié par une réaction de PCR. Deux sites de restriction ont été ajoutés sur chaque amorce (tableau 2) afin de pouvoir ensuite cloner le produit de PCR dans les deux orientations dans le vecteur pIJ4083. Des protoplastes de *S. lividans* 10-164 sont ensuite transformés avec le plasmide pPSY1 (clonage *HindIII-XbaI*) ou pPSY2 (clonage *BamHI-EcoRI*). Les transformants obtenus avec ces plasmides ont été vaporisés au cathécol et aucun d'eux n'est devenu jaune, indiquant que la région d'ADN amplifiée ne contenait pas de promoteur.

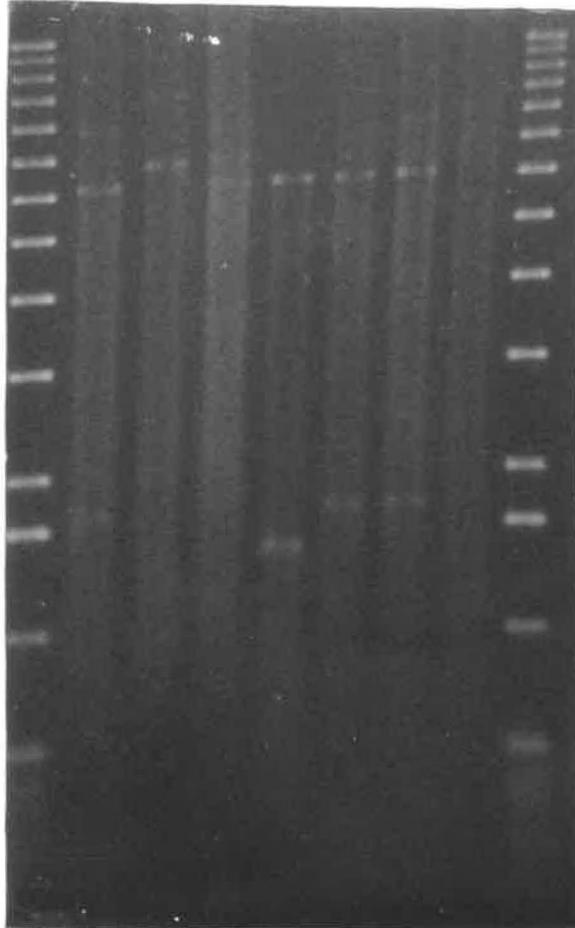
Afin de s'assurer que les transformants vaporisés au cathécol contenaient bien un plasmide avec le fragment de 300 pb, l'ADN plasmidique de quelques transformants a été extrait. Les plasmides obtenus ont ensuite été digérés avec l'enzyme de restriction *BglIII*. On obtient ainsi un fragment d'environ 6200 pb et un autre fragment de 1700 pb si l'insertion est présente. Si il n'y a pas d'insertion, le deuxième fragment ne compte que 1400 pb. Comme le démontre la figure 19, deux transformants de chaque orientation (B et D dans une

orientation et F et G dans l'autre) contenaient bien le fragment d'ADN à analyser.

Figure 19. Analyse de l'activité promotrice de la région d'ADN (300 pb) située en amont de *secY*. Tous les plasmides ont été digérés avec l'enzyme de restriction *Bgl*III.

- A,I : Echelle moléculaire
- B,D : Plasmides portant l'insertion dans l'orientation *Hind*III-*Xba*I
- E : Plasmide contrôle pIJ4083
- F,G : Plasmides portant l'insertion dans l'orientation *Bam*HI-*Eco*RI
- C,H : Plasmides sans insertion

A B C D E F G H I



1.7 kb
1.4 kb

5.0 Complémentation du mutant thermosensible *E. coli* *secY24*

Afin de pouvoir être exprimé chez *E. coli*, le gène *secY* de *S. lividans* a tout d'abord été amplifié par PCR (PCR #3) (tableau 2). Afin de s'assurer que le gène soit bien exprimé chez *E. coli*, un site de fixation des ribosomes très efficace chez cette bactérie a été inclu dans l'amorce codante et le codon de départ GTG a été remplacé par ATG. Le gène a ensuite été cloné dans le vecteur pTZ18U pour former le plasmide pIAF862. Dans ce nouveau plasmide, pIAF862, *secY* est sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose.

Afin de vérifier si la protéine SecY de *S. lividans* pouvait compléter la mutation *secY24* de la souche thermosensible *E. coli* RO112, cette dernière a été transformée avec pIAF862. La souche RO112 peut croître à 30°C mais pas à 42°C, température à laquelle la protéine SecY mutée n'est plus fonctionnelle. Comme témoin, la souche *E. coli* DH11S, qui est *secY*⁺, a également été transformé avec pIAF862. La souche DH11S étant *lacI*^q, c'est-à-dire qu'elle produit une très grande quantité de répresseur de l'opéron lactose, il faut ajouter de l'IPTG au milieu de culture pour que SecY soit exprimée à partir de pIAF862. Par contre, l'IPTG n'est pas nécessaire dans le cas de la souche RO112, cette dernière étant Δ *lac*. Comme témoins, les deux souches de *E. coli* ont également été transformées avec le plasmide pTZ18U.

Les résultats de l'expression de SecY de *S. lividans* chez *E. coli* sont présentées dans le tableau 4. S'il y a de l'IPTG dans le milieu de culture, la souche DH11S (témoin) pousse très bien en présence du plasmide pTZ18U seul, autant à 30°C qu'à 42°C. Par contre, en présence de pIAF862, la croissance est ralentie à 30°C et complètement abolie à 42°C. En absence d'IPTG, la croissance de DH11S est normale dans toutes les conditions. La souche RO112 présente les mêmes résultats qu'il y ait de l'IPTG ou non dans le milieu. En présence de pTZ18U, la bactérie pousse très bien à 30°C mais pas à 42°C, qui est la température non-permissive de cette souche. Par contre, si SecY est exprimée (plasmide pIAF862), la bactérie pousse faiblement à 30°C et pas du tout à 42°C. Donc, en général, la surexpression de SecY de *Streptomyces lividans* chez *E. coli* ne complémente pas le défaut de croissance associé à la mutation *secY24* et nuit considérablement à la croissance de cette bactérie.

Tableau 4. Complémentation du mutant thermosensible *E. coli* *secY24*.

A) Croissance en présence d'IPTG

	Croissance ^a			
	DH11S		RO112	
	pTZ18U	pIAF862	pTZ18U	pIAF862
30°C	+++	+	+++	+
42°C	+++	-	-	-

B) Croissance sans IPTG

	Croissance ^a			
	DH11S		RO112	
	pTZ18U	pIAF862	pTZ18U	pIAF862
30°C	+++	+++	+++	+
42°C	+++	+++	-	-

^aLa croissance est indiquée comme suit:

+++ : croissance normale
 + : faible croissance
 - : aucune croissance

DISCUSSION

L'utilisation en tant que sonde d'une partie du gène *secY* cloné par la méthode du PCR a permis de cloner le gène complet. Le gène comporte 1311 paires de base et code pour une protéine de 437 acides aminés d'un poids estimé de 47 kDa. Ces caractéristiques sont en accord avec les propriétés des protéines SecY d'autres microorganismes. La séquence nucléotidique du gène *secY* est composée à 64% de guanine et de cytosine. Bien que le contenu en G+C du génôme des streptomycètes soit estimé à environ 74%, une étude menée par Wright et Bibb (1992) a démontré que le contenu en G+C de différents gènes de cette bactérie peut varier de 61% à 79%. La troisième position des codons est occupée à 92% par une guanine ou une cytosine, ce qui est normal pour un gène de streptomycète (Wright et Bibb, 1992). Aucun codon rare chez les streptomycètes, tels que TTA, CTA ou TTT (Wright et Bibb, 1992) n'a été retrouvé dans la séquence. La protéine présente également dix segments transmembranaires potentiels, correspondant aux sections hydrophobes identifiées chez *E. coli* (figure 16).

L'alignement de la séquence en acides aminés de SecY de *S. lividans* avec les SecY d'autres microorganismes (14 séquences en tout) a permis d'établir des taux d'identité et de similarité de 2.8% et 14.2%, respectivement. Ces taux paraissent faibles mais il faut tenir compte du fait que l'alignement comporte 14 séquences provenant de microorganismes plus ou

moins éloignés les uns des autres. La majorité des acides aminés identiques ou similaires se retrouvent dans les segments transmembranaires potentiels 1, 2, 5, 9 et 10 de même que dans les segments cytoplasmiques connectant les sections hydrophobes 4 et 5 ainsi que 8 et 9 (figure 17). Le fait que l'on retrouve des acides aminés conservés dans ces régions précises permet de supposer que ces sections jouent un rôle important dans la translocation des protéines ou encore qu'elles sont directement impliquées dans les interactions avec les autres composantes de l'appareil de sécrétion. D'autres chercheurs, tels que Tschauder et al. (1992), Kobayashi et al. (1994) et Gu et al. (1994), ont émis les mêmes hypothèses mais leurs conclusions étaient basées sur des alignements contenant au plus 9 séquences de SecY.

En comparant une seule séquence à la fois avec la séquence de *S. lividans*, on observe un taux d'identité allant de 13.3% à 56.1%, en excluant les séquences provenant de *S. coelicolor* (99.1%) et *S. scabies* (89.5%). La très forte ressemblance entre les protéines SecY de *S. coelicolor* et *S. lividans* était attendue étant donné que ces deux souches sont phylogéniquement très rapprochées. La bactérie Gram-positif *Brevibacterium flavum* est ensuite celle dont la protéine SecY se rapproche le plus (56.1%) de *S. lividans*, comme le démontre le dendrogramme (figure 18). Cette ressemblance peut s'expliquer par le fait

que cette bactérie est un actinomycètes, tout comme *S. lividans*. Les SecY de *E. coli* et *B. subtilis* démontre aussi une bonne homologie (42.1% et 40.9% d'aa identiques, respectivement) avec *S. lividans*. Enfin, comme le démontre le dendogramme, les protéines SecY de *Haloarcula marismortui* et de *Methanococcus vanniellii*, avec des taux d'identité de 15.1% et de 13.3% respectivement, sont celles qui sont le plus éloignées de *S. lividans*. Ces derniers résultats ne sont pas étonnants dans le sens où ces deux microorganismes sont des archaebactéries, donc très éloignés de *S. lividans*.

On retrouve en amont du gène *secY* le gène *L15* (codant pour la protéine ribosomale L15) et en aval, le gène *adk* (codant pour une adénylate kinase). Cet arrangement chromosomique, *L15-secY-adk*, est le même chez toutes les bactéries Gram-positives chez lesquelles SecY a été identifiée. Chez *E. coli*, on retrouve le même arrangement en amont de *secY* mais, en aval, on retrouve plutôt d'autres gènes de protéines ribosomales (Ito, 1990). Chez *S. lividans*, on remarque aussi que le dernier nucléotide du codon d'arrêt de *secY* (l'adénine du codon TGA) est également le premier nucléotide (l'adénine du codon ATG) du gène de l'adénylate kinase (figure 14). On retrouve le même arrangement chez *B. flavum* (Kobayashi et al., 1994) et également chez *S. coelicolor* et *S. scabies*. Chez ces bactéries (toutes des

actinomycètes), ces deux gènes forment probablement un opéron. Chez *E. coli*, il a été suggéré qu'une telle superposition soit impliquée dans la réinitiation de la traduction (Oppenheim et Yanofsky, 1980).

Tous les gènes *secY* identifiés jusqu'à maintenant chez des microorganismes font partie de l'opéron ribosomal *spc* et sont dépourvus de promoteur (Kobayashi et al., 1994; Gu et al., 1994; Flachmann et al., 1993; Tschauder et al., 1992; Suh et al., 1990; Cerretti et al., 1983, etc.). C'est également le cas chez *S. lividans*. En effet, bien que près de 250 nucléotides séparent les gènes *L15* et *secY*, aucune séquence consensus promotrice n'a pu être identifiée en amont de *secY*. De plus, un fragment d'ADN d'environ 300 pb contenant cette longue région intergénique a été cloné dans le plasmide pIJ4083 et aucune activité promotrice associée à ce fragment n'a été détectée. Ces résultats indiquent que *secY* ne possède pas de promoteur. Comme chez *S. lividans* l'organisation des gènes autour de *secY* est la même que chez les autres bactéries gram-positives, il est fort probable que ce gène fasse aussi partie de l'opéron *spc*. On peut imaginer que l'association de *secY* avec des gènes ribosomiaux joue un rôle important dans la coordination de la traduction et de la sécrétion des protéines dans la cellule (Suh et al., 1990). Chez *E. coli* et *B. subtilis*, une telle coordination semble fort probable. En effet, plusieurs données

suggèrent que les gènes *L15* et *secY*, séparés par seulement 7 pb et 1 pb, respectivement, sont traduits simultanément (Suh et al., 1990; Akiyama et Ito, 1985; Ito et al., 1984).

La protéine SecY de *S. lividans* (*secY^{SL}*) a été surexprimée chez *E. coli* R0112 afin de vérifier si elle pouvait compléter la thermosensibilité associée à la mutation *secY24* de cette souche. A une température égale ou supérieure à 42°C, cette mutation rend SecY non fonctionnelle. La sécrétion des protéines est alors interrompue, ce qui entraîne une abolition de la croissance de la bactérie (Ito, 1990). *secY^{SL}* a été cloné dans le vecteur pTZ18U afin qu'il puisse être exprimé chez *E. coli*. Les résultats ont démontré que le gène *secY^{SL}* ne peut rétablir la croissance de la souche R0112 à 42°C (tableau 4). Toutefois, la surexpression de *secY^{SL}* abolit également la croissance de la souche témoin DH11S à 42°C, de même qu'elle ralentit considérablement la croissance des deux souches à 30°C. De tels résultats ont été rapportés à plusieurs reprises dans la littérature (Gu et al., 1994; Kobayashi et al., 1994; Suh et al., 1990; Nakamura et al., 1990a). Dans tous les cas, la surexpression d'une protéine SecY hétérologue a nui à la croissance de *E. coli*. Malgré tout, Nakamura et al. (1990a) ont démontré que la surexpression de SecY de *B. subtilis* permettait de rétablir la sécrétion des protéines dans les conditions non-

permissives. Afin d'expliquer ce défaut de croissance, certains auteurs ont avancé l'hypothèse que la surexpression d'une protéine SecY hétérologue entraîne des défauts physiologiques importants chez la bactérie conduisant éventuellement à la mort de la cellule (Suh et al., 1990; Nakamura et al., 1990a). Il est aussi possible que les SecY étrangers nuisent au système de translocation en séquestrant les autres protéines, telles que SecE et SecG, qui sont impliquées dans la sécrétion (Shimoike et al., 1992; Suh et al., 1990). Ces protéines n'étant plus disponibles, la sécrétion est arrêtée.

Puisqu'on n'observe aucune complémentation, on peut se demander si *secY^{SL}* est bien exprimé chez *E. coli*. Les résultats démontrent que le gène est en effet exprimé car la souche témoin DH11S ne présente le défaut de croissance que dans les conditions où SecY^{SL} peut théoriquement être produite, c'est-à-dire en présence d'IPTG (tableau 4a). En effet, la construction réalisée dans pTZ18U a permis de placer *secY^{SL}* sous le contrôle du promoteur lactose. Dans la souche DH11S, qui est *lacI^q*, le gène ne peut donc être exprimé que si de l'IPTG est ajouté au milieu de culture. C'est pourquoi la croissance est normale en absence d'IPTG (tableau 4b). La souche R0112 ($\Delta lacI$) ne peut produire le répresseur associé à ce promoteur et *secY^{SL}* est donc exprimé de façon constitutive dans cette souche. C'est pour cette raison que, pour R0112, les résultats de la complémen-

tion sont les mêmes qu'il y ait ou non de l'IPTG dans le milieu (tableau 4).

Dans notre cas, on ne peut donc pas déterminer s'il y a complémentation ou non. Il reste possible que la protéine SecY de *S. lividans* présente certaines divergences fonctionnelles avec celle de *E. coli* ne permettant pas la complémentation. Par exemple, la mutation *secY24* consiste chez *E. coli* en un changement de la glycine 240 pour un acide aspartique dans le gène *secY*. Bien qu'elle cause un important dérangement dans la fonction de SecY chez *E. coli*, la glycine 240 n'est pas conservée parmi les différents microorganismes. Chez *S. lividans*, ainsi que chez *B. subtilis*, on retrouve plutôt à la position correspondante une alanine (figure 18). Il serait intéressant de remplacer par mutagenèse dirigée l'alanine 242 de *S. lividans* afin de vérifier si SecY deviendrait aussi thermosensible.

Une autre mutation bien caractérisée chez *E. coli* est la mutation *secY39*. Cette mutation a provoqué le remplacement de l'arginine 357 par une histidine et rend la souche sensible au froid (Baba et al., 1990). Taura et al. (1994) ont isolé un mutant (*secY110*) affectant le même acide aminé: dans ce cas, l'arginine 357 a été remplacée par une cystéine et la souche est aussi devenue sensible au froid. Contrairement à la glycine 240, l'arginine 357 est assez bien conservée chez les bacté-

ries, dont *S. lividans*. Il aurait été intéressant d'exprimer *secY^{SL}* chez le mutant *secY39* de *E. coli* afin de vérifier si dans ce cas il pourrait y avoir complémentation. Par contre, Kobayashi et al. (1994) ont tenté de compléter ce mutant avec le gène *secY* provenant de *Brevibacterium flavum*, chez qui l'arginine est aussi conservée, mais ils n'ont observé aucune complémentation.

Baba et al. (1990) ont isolé un autre mutant sensible au froid, le mutant *secY40*. Dans ce cas, l'alanine 363 a été remplacée par une thréonine. Taura et al. (1994) ont aussi isolé un mutant identique qu'ils ont appelé *secY115*. Chez *S. lividans*, on retrouve à la position correspondante (364) une alanine, comme chez *E. coli*. Toutefois, cet acide aminé n'est pas conservé chez les bactérie (glutamine chez *B. subtilis* et *B. licheniformis*) et on retrouve même une thréonine à cette position chez *Mycoplasma capricolum*. Cette mutation dans le gène *secY* est particulière dans le sens où elle empêche la croissance de la bactérie à 20°C mais n'affecte presque pas la translocation des protéines examinées, soit MBP (Maltose Binding Protein) et OpmA (Outer Membrane Protein A) (Taura et al., 1994; Baba et al., 1990). Baba et al. (1990) ont supposé que cette mutation affecte spécifiquement le transport d'une protéine importante pour la croissance cellulaire de *E. coli* ou encore que SecY joue un rôle dans la croissance autre que la

translocation des protéines. Là encore, il serait intéressant de voir si une mutation de l'alanine 364 de *S. lividans* provoquerait le même phénotype que chez *E. coli*.

Une mutation dans le gène *secY* a aussi été identifiée chez *B. subtilis* (Yoshikawa et al., 1993). Cette mutation, *secY76*, a provoqué le changement de la proline 76 en une leucine. A cause de cette mutation, la bactérie n'est plus capable de sporuler à 45°C, bien qu'elle sporule normalement à 37°C, et la compétence est grandement réduite, autant à 37°C qu'à 45°C. Par contre, la sécrétion de l' α -amylase et de protéases n'est pas affectée. La proline 76 affectée par cette mutation est conservée chez tous les SecY identifiée jusqu'à maintenant et se situe dans le deuxième segment transmembranaire, qui est une région très conservée. Bien que cet acide aminé semble jouer un rôle essentiel chez SecY, une mutation de la proline 76 n'affecte pas uniformément la sécrétion de toutes les protéines. Yoshikawa et al. (1993) suggère que la mutation *secY76* affecte le transport d'une exoprotéine impliquée dans l'initiation de la sporulation. *Streptomyces lividans* est aussi une bactérie sporulante et il serait des plus intéressant de vérifier si la mutation de la proline 81 causerait le même défaut de sporulation que chez *B. subtilis*. De tels travaux pourraient nous donner quelques indices sur la façon dont la

sporulation, qui est un mécanisme très complexe, est enclenchée.

CONCLUSION

- Le gène *secY* de *Streptomyces lividans* 66 a été cloné et sa séquence en ADN a été déterminée.
- Le gène *secY* comporte 1311 paires de bases et code pour une protéine d'un poids moléculaire estimé à 47.2 kDa.
- Le gène *secY* est encadré par le gène *L15* en amont et le gène *adk* en aval.
- Le gène *secY* ne possède pas de promoteur et fait probablement partie d'un opéron avec les gènes *L15* et *adk*.
- La protéine SecY de *S. lividans* (SecY^{SL}) est composée de 10 segments transmembranaires potentiels et démontre une bonne homologie avec les protéines SecY d'autres bactérie, dont *E. coli* (42.1% d'identité), *B. subtilis* (40.9% d'identité) et *B. flavum* (56.1% d'identité).
- L'expression de SecY^{SL} chez le mutant thermosensible *E. coli* *secY24* n'a pas permis de rétablir la croissance de cette souche à température non-permissive et a nui à sa croissance à température permissive. La souche témoin DH11S a présenté les mêmes défaut de croissance.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Rolf Morosoli pour avoir dirigé ce travail ainsi que pour sa disponibilité et sa confiance continue envers mes capacités à accomplir un tel travail.

Je ne peux pas passer sous silence l'énorme contribution du Dr. Michel Gilbert, stagiaire post-doctoral dans le laboratoire du Dr. Morosoli, sans qui ce travail n'aurait pas été le même. Merci Michel pour ton aide précieuse, tes conseils toujours judicieux, ta grande disponibilité et les nombreuses pizzas partagées au lab.!

Je tiens aussi à remercier les Dr. François Shareck et Dieter Kluepfel pour leur appui et leur contribution scientifique.

Un grand merci également à Serge Durand, technicien du Dr. Morosoli, pour son aide et son expertise.

Un merci tout spécial à Patricia pour ton amour, ta générosité, ton appui constant et les nombreuses fois où tu m'as donné un coup de main au lab.!

Enfin, merci à Nicolas Pagé, collègue de laboratoire durant deux ans et excellent ami, ainsi qu'aux nombreux autres étudiant(e)s avec qui j'ai partagé une vie sociale très active durant toute ma maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

AKITA, M., S. SASAKI, S. MATSUYAMA et S. MIZUSHIMA. 1990. SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 8164-8169.

AKIYAMA, Y. et K. ITO. 1985. The SecY membrane component of the bacterial export machinery: analysis by new electrophoresis methods for integral membrane proteins. *EMBO J.* **12**: 3351-3356.

AKIYAMA, Y. et K. ITO. 1986. Overproduction, isolation and determination of the amino-terminal sequence of the SecY protein, a membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **159**: 263-266.

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

AMES, G. F.-L., S. MIMURA, V. SHYAMALA. 1990. Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *E. coli* to human: traffic ATPases. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**: 429-446.

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

ARNDT, E. 1992. The genes for ribosomal protein L15 and the protein equivalent SecY in the archaeobacterium *Haloarcula (Halobacterium) marismortui*. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 113-116.

AUER, J., G. SPICKER et A. BOCK. 1991. Presence of a gene in the archaeobacterium *Methanococcus vannielii* homologous to *secY* of eubacteria. *Biochimie* **73**: 3465-3470.

BABA, T., A. JACQ, E. BRICKMAN, J. BECKWITH, T. TAURA, C. UEGUCHI, Y. AKIYAMA et K. ITO. 1990. Characterization of cold-sensitive *secY* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 7005-7010.

BABA, T., T. TAURA, T. SHIMOIKE, Y. AKIYAMA, T. YOSHIHISA et K. ITO. 1994. A cytoplasmic domain is important for the formation of a SecY-SecE translocator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4539-4543.

- BALLY, M., A. FILLOUX, M. AKRIM, G. BALL, A. LAZDUNSKI et J. TOMMASSEN. 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven *xcp* genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.* **6**: 1121-1131.
- BIEKER, K.L. et T.J. SILHAVY. 1990. PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in *E. coli*. *Cell* **61**: 833-842.
- BIEKER, K.L., G.J. PHILIPS et T. SILHAVY. 1990. The *sec* and *prl* genes of *E. coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 291-309.
- BIEKER-BRADY, K. et T.J. SILHAVY. 1992. Suppressor analysis suggests a multi-step, cyclic mechanism for protein secretion in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**: 3165-3174.
- BRUNDAGE, L., J.P. HENDRICK, E. SCHIEBEL, A.J.M. DRIESSEN et W. WICKNER. 1990. The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**: 649-657.
- BRUNDAGE, L., C.J. FIMMEL, S. MIZUSHIMA et W. WICKNER. 1992. SecY, SecE and Band 1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **267**: 4166-4170.
- BUCCA, G., C.P. SMITH, M. ALBERTI, G. SEIDITA, R. PASSANTINO et A.M. PUGLIA. 1993. Cloning and sequencing of the *dnaK* region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **130**: 141-144
- CABELLI, R.J., K.M. DOLAN, L. QIAN et D.B. OLIVER. 1991. Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and *SecA51(TS)* mutant strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 24420-24427.
- CERRETTI, D.P., D. DEAN, G.R. DAVIS, M. BEDWELL et M. NOMURA. 1983. The *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2599-2615.
- CHATER, K.F. et D.A. HOPWOOD. 1989. Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. Dans: *Genetics of bacterial diversity* (éd. D.A. Hopwood et K. E. Chater). Academic Press, Toronto. p. 129-150.

CHUNG, Y.J., M.T. STEEN et J.N. HANSEN. 1992. The subtilin gene of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is encoded in an operon that contains a homolog of the hemolysin B transport protein. *J. Bacteriol.* **174**: 1417-1422.

CLAYTON, T.M. et M.J. BIBB. 1990. *Streptomyces* promoter-probe plasmids that utilise the *xyle* gene of *Pseudomonas putida*. *Nucl. Acids Res.* **18**: 1077.

COLLIER, D.N. 1994. Expression of *Escherichia coli* SecB in *Bacillus subtilis* facilitates secretion of the SecB-dependent Maltose-Binding protein of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 4937-4940.

COUGHLAN, M.P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **3**: 39-109.

DOUGLAS, S.E. 1992. A *secY* homologue is found in the plastid genome of *Cryptomonas phi*. *FEBS Lett.* **298**: 93-96.

DOUVILLE, K., M. LEONARD, L. BRUNDAGE, K. NISHIYAMA, H. TOKUDA, S. MIZUSHIMA et W. WICKNER. 1994. Band 1 subunit of *E. coli* preprotein translocase and integral membrane export factor P12 are the same protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 18705-18707.

DOWNING, W.L., S.L. SULLIVAN, M.E. GOTTESMAN et P.P. DENNIS. 1990. Sequence and transcriptional pattern of the essential *Escherichia coli* *secE-nusG* operon. *J. Bacteriol.* **172**: 1621-1627.

DUMS, F., J.M. DOW et M.J. DANIELS. 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other Gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 357-364.

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

FATH, M.J. et R. KOLTER. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**: 995-1017.

FELMLEE, T., S. PELLETT, E.-Y. LEE et R.A. WELCH. 1985. *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J. Bacteriol.* **163**: 88-93.

FLACHMANN, R., C.B. MICHALOWSKI, W. LOFFELHARDT et H.J. BOHNERT. 1993. SecY, an integral subunit of the bacterial preprotein translocase, is encoded by a plastid genome. *J. Biol. Chem.* **268**: 7514-7519.

GARDEL, C., K. JOHNSON, A. JACQ et J. BECKWITH. 1990. The *secD* locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **9**: 3209-3216.

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

GLASER, P.-H., H. SAKAMOTO, J. BELLALOU, A. ULLMANN et A. DANCHIN. 1988. Secretion of cytolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO. J.* **7**: 3997-4004.

GORLICH, D., S. PREHN, E. HARTMANN, K.-U. KALLES et T. RAPO-PORT. 1992. A mammalian homolog of SEC61p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**: 489-503.

GU, L., M. REMACHA, W.M. WENMAN et R. KAUL. 1994. Cloning and characterization of a *secY* homolog from *Chlamydia trachomatis*. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 482-487.

GUGLIELMI, G., P. MAZODIER, C.J. THOMPSON et J. DAVIES. 1991. A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two *GroEL*-like genes and three *GroEL*-like proteins in *Streptomyces albus*. *J. Bacteriol.* **173**: 7374-7381.

HANADA, M., K. NISHIYAMA, S. MIZUSHIMA et H. TOKUDA. 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.

HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

HIGGINS, C.F., I.D. HILES, G.P.C. SALMOND, D.R. GILL, J.A.D.-I.J. EVANS, I.B. HOLLAND, L. GRAY, S.D. BUCKEL, A.W. BELL et M.A. HERMODSON. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulations of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, 85-92.

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

ISSARTEL, J.P., V. KORONAKIS et C. HUGHES. 1991. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependant fatty acylation. *Nature* **351**: 759-761.

ITO, K., D.P. CERRETTI, H. NASHIMOTO, M. NOMURA. 1984. Characterization of an amber mutation in the structural gene for the ribosomal protein L15, which impairs expression of the protein export gene, *secY*, in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **3**: 2319-2324.

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

JEONG, S.M., H. YOSHIKAWA et H. TAKAHASHI. 1993. Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**: 133-142.

JUNGNICKEL, B., T.A. RAPOPORT, E. HARTMANN. 1994. Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett.* **346**: 73-77.

KLEIN, C., C. KALETTA, N. SCHNELL et K.-D. ENTIAN. 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 132-142.

KIHARA, A., Y. AKIYAMA et K. ITO. 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., T. RAJAPANDI et D. OLIVER. 1994. SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the *E. coli* inner membrane in its active state. *Cell.* **78**: 845-853.

KIM, Y.J. et D.B. OLIVER. 1994. *Escherichia coli* SecY and SecE proteins appear insufficient to constitute the SecA receptor. *FEBS Lett.* **339**: 175-180.

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

KOBAYASHI, M., N. FUGONO, Y. ASAI, M. INUI, A.A. VERTES, Y. KURUSU et H. YUKAWA. 1994. Cloning and sequencing of the *secY* homolog from coryneform bacteria. Gene **139**: 99-103.

KOIVULA, T., I. PALV et H. HEMILA. 1991. Nucleotide sequence of the *secY* gene from *Lactococcus lactis* and identification of conserved regions by comparison of four SecY proteins. FEBS Lett. **288**: 114-118.

KORONAKIS, V., C. HUGHES et E. KORONAKIS. 1991. Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes. EMBO J. **10**: 3263-3272.

KUCHLER, K. 1993. Unusual routes of protein secretion: the easy way out. Trends Cell Biol. **3**: 421-426.

KUNKEL, T. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 488-492.

LETOFFE, S. P. DELEPELAIRE et C. WANDERSMAN. 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion function are analogous to those of *Escherichia coli* α -haemolysin. EMBO J. **9**: 1375-1382.

LILL, R., W. DOWHAN et W. WICKNER. 1990. The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. Cell **60**: 271-280.

LINDEBERG, M. et A. COLLMER. 1992. Analysis of eight *out* genes required for pectic enzyme secretion by *Erwinia chrysanthemi*: protein sequence comparison with secretion genes from other Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **174**: 73385-7397.

LYND, L.R., J.H. CUSHMAN, R.J. NICHOLS et C.E. WYMAN. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science **251**: 1318-1323.

MATSUYAMA, S., J. AKIMARU et S. MIZUSHIMA. 1990. SecE-dependent overproduction of SecY in *Escherichia coli*. FEBS Lett. **269**: 96-100.

- MATSUYAMA, S.I., Y. FUJITA, K. SAGARA et S. MIZUSHIMA. 1992. Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *Biochimica Biophysica Acta* **1122**: 77-84.
- MATSUYAMA, S., Y. FUJITA et S. MIZUSHIMA. 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., G. GUGLIELMI, J. DAVIES et C.J. THOMPSON. 1991. Characterization of the *GroEL*-like genes in *Streptomyces albus*. *J. Bacteriol.* **173**: 7382-7386.
- MEAD, D.A., E. SZCZESNA-SKORUPA et B. KEMPER. 1986. Single-stranded DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engineering* **1**: 67-74.
- MESSING, J., R. CREA et P.H. SEEBURG. 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9**: 309-321.
- MIYAKE, K., H. ONAKA, S. HORINOUCI et T. BEPPU. 1994. Organization and nucleotide sequence of the *secE-nusG* region of *Streptomyces griseus*. *Biochimica Biophysica Acta.* **1217**: 97-100.
- MORRISON, D.A., F.M. HUI et L. ZHOU. 1993. Competence for transformation in *Streptococcus pneumoniae*: regulatory genes and sequences, p. 3-11. In E. Balla et G. Berencsi (éd.), *Genetic transformation: DNA transfer and gene expression in microorganisms*. Intercept, Ltd., Publishers, Andover, Grande-Bretagne.
- MURPHY, C. et J. BECKWITH. 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. Acad. Sci. USA* **91**: 2557-2561.
- NAKAI, M., A. TANAKA, T. OMATA et T. ENDO. 1992. Cloning and characterization of the *secY* gene from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**: 113-116.
- NAKAI, M., T. NOHARA, D. SUGITA et T. ENDO. 1994. Identification and characterization of the SecA protein homologue in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **200**: 844-851.

NAKAMURA, K., H. TAKAMATSU, Y. AKIYAMA, K. ITO et K. YAMANE. 1990a. Complementation of the protein transport defect of an *Escherichia coli* SecY mutant (*secY24*) by *Bacillus subtilis* *secY* homologue. FEBS Lett. **273**: 75-78.

NAKAMURA, K., A. NAKAMURA, H. TAKAMATSU, H. YOSHIKAWA et K. YAMANE. 1990b. Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene homologous to *E. coli* *secY*. J. Biochem. **107**: 603-607.

NIKI, H., R. IMAMURA, T. ORUGA et S. HIRAGA. 1990. Nucleotide sequence of the *tolC* gene of *Escherichia coli*. Nucleic Acid Res. **18**: 5547.

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

NISHIYAMA, K., M. HANADA et H. TOKUDA. 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.

NUNN, D., S. BERGMAN et S. LORY. 1990. Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, *pilD* are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. J. Bacteriol. **172**: 2911-2919.

OHAMA, T., A. MUTO et S. OSAWA. 1989. Spectinomycin operon of *Micrococcus luteus*: evolutionary implication of organization and novel codon usage. J. Mol. Evol. **29**: 381-395.

OHKUBO, S., A. MUTO, Y. KAWAUCHI, F. YAMAO et S. OSAWA. 1987. The ribosomal protein gene cluster of *Mycoplasma capricolum*. Mol. Gen. Genet. **210**: 314-322.

OPPENHEIM, D.S. et C. YANOFSKY. 1980. Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. Genetics **95**: 785-795.

OSBORNE, R.S. et T. SILHAVY. 1993. PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. EMBO J. **12**: 3391-3398.

OUDEGA, B., O. MOL, P. van ULSEN, F. STEGEHUIS, F.-J. van der WAL et J. LUIRINK. 1993. *E. coli* SecB, SecA and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein. *J. Bacteriol.* **175**: 1543-1547.

OVERHOFF, B., M. KLEIN, M. SPIES et R. FREUDL. 1991. Identification of a gene fragment which codes for the 364 amino-terminal amino acid residues of a SecA homologue from *Bacillus subtilis*: further evidence for the conservation of the protein export apparatus in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 417-423

PEREZ-PEREZ, J., G. MARQUEZ, J.-L. BARBERO et J. GUTIERREZ. 1994. Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **12**: 178-180.

PEREZ-PEREZ, J., C. MARTINEZCAJA, J.L. BARBERO et J. GUTIERREZ. 1995. DnaK/DnaJ supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **210**: 524-529.

POGLIANO, K.J. et J. BECKWITH. 1994a. Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli* *secD* operon and its product. *J. Bacteriol.* **176**: 804-814.

POGLIANO, J.A. et J. BECKWITH. 1994b. SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13**: 554-561.

PUGSLEY, A.P. 1992. Superfamilies of bacterial transport systems with nucleotide binding components? *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **47**: 223-248.

PUGSLEY, A.P. et B. DUPUY. 1992. An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process a component of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Mol. Microbiol.* **6**: 751-760.

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

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

SALMOND, G.P.C. et P.J. REEVES. 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 7-12.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463.

SCARAMUZZI, C.D., R.G. HILLER et H.W. STOKES. 1992. Identification of a chloroplast-encoded *secA* gene homologue in a chromophytic alga: possible role in chloroplast protein translocation. *Curr. Genet.* **22**: 421-427.

SCHULEIN, R., I. GENTSCHEV, H.-J. MOLLENKOPF et W. GOEBEL. 1992. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 155-163.

SHATZ, P.J., K.L. BIEKER, K.M. OTTEMANN, T.J. SILHAVY et J. BECKWITH. 1991. One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *E. coli* secretion machinery. *EMBO J.* **10**: 1749-1757.

SHIMOIKE, T., Y. AKIYAMA, T. BABA, T. TAURA et K. ITO. 1992. SecY variants that interfere with *E. coli* protein export in the presence of normal SecY. *Mol. Microbiol.* **6**: 1205-1210.

SIMON, S.M. et G. BLOBEL. 1992. Signal peptides open protein-conducting channels in *E. coli*. *Cell* **69**: 677-684.

STIRLING, C.J., J. ROTHBLATT, M. HOSOBUCHI, R. DESHAIES et R. SCHEKMAN. 1992. Protein translocation mutants defective in the insertion of the integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **3**: 129-142.

STODDARD, G.W., J.P. PETZEL, M.J. van BELKUM, J. KOK et L.L. MCKAY. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1952-1961.

STOJILJKOVIC, I., R. SCHONHERR et J. G. KUSTERS. 1995. Identification of the *hopG* gene, a component of *Escherichia coli* K-12 type II export system, and its conservation among different pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates. *J. Bacteriol.* **177**: 1892-1895.

SUH, J.W., S.A. BOYLAN, S.M. THOMAS, K.M. DOLAN, D.B. OLIVER et C.W. PRICE. 1990. Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Mol. Microbiol.* **4**: 305-314.

TAURA, T., T. BABA, Y. AKIYAMA et K. ITO. 1993. Determinants of the quantity of the stable SecY complex in the *Escherichia coli* cell. *J. Bacteriol.* **175**: 7771-7775.

TSCHAUDER, S., A. DRIESSEN et R. FREUDL. 1992. Cloning and molecular characterization of the *secY* genes from *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus carnosus*: comparative analysis of nine members of the SecY family. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 147-152.

VALENTIN, K. 1993. SecA is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of plastid genomes and the thylakoid protein import apparatus. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 245-250.

VIEIRA, J. et J. MESSING. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in enzymology* **153**: 3-11.

VIIKARI, L., A. KONTELINEN, J. SUNDQUIST et M. LINKO. 1994. Xylanases in bleaching-From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 335-350.

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

WANDERSMAN, C. 1992. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* **3**: 1825-1831.

WANDERSMAN, C. et P. DELEPELAIRE. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4776-4780.

WATANABE, M. et G. BLOBEL. 1989. SecB functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in *E. coli*. *Cell.* **58**: 695-705.

WATANABE, M., C.V. NICCHITTA et G. BLOBEL. 1990. Reconstitution of protein translocation from detergent-solubilized *Escherichia coli* inverted vesicles efficiently translocate precursor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 1960-1964.

WICKNER, W.T. 1994. How ATP drives proteins across membrane. Science **266**: 1197-1198.

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

YOSHIKAWA, H., S.M. JEONG, A. HIRATA, F. KAWAMURA, R.H. DOI et H. TAKAHASHI. 1993. Temperature-sensitive sporulation caused by a mutation in the *Bacillus subtilis* *secY* gene. J. Bacteriol. **175**: 3656-3660.

YUAN, J., R. HENRY, M. McCAFFERY et K. CLINE. 1994. SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. Science **266**: 796-798.