

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

EFFET DU REMPLACEMENT ET DE L'ALTÉRATION DU PEPTIDE SIGNAL SUR
LA PRODUCTION DE LA XYLANASE A CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS*

PAR

NICOLAS PAGÉ

MARS 1995

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
SOMMAIRE.....	xiii
1- INTRODUCTION.....	1
2- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
2.1 Introduction à la revue bibliographique.....	9
2.1.1 Terminologie.....	9
2.2 Sécrétion chez les bactéries Gram⁻.....	10
2.2.1 Peptide signal.....	13
2.2.2 Organisation du p.s.....	14
2.2.3 Interactions de la pré-protéine avec les chaperons.....	14
2.2.4 SecB.....	17
2.2.5 Interactions du complexe SecB-pré-protéine avec SecA.....	18
2.2.6 Facteurs protéiques membranaires formant un canal pour la sécrétion.....	19
2.2.7 SecE.....	19
2.2.8 SecY.....	20
2.2.9 SecG.....	21
2.2.10 SecD/F.....	21
2.2.11 Énergie nécessaire au transport des protéines.....	22
2.2.12 Passage des protéines à travers la membrane.....	22
2.2.13 Maturation.....	26
2.2.14 "Leader peptidase".....	26
2.2.15 Dégradation des p.s.....	26
2.2.16 Autres mécanismes de sécrétion.....	27
2.3 Sécrétion des protéines chez les bactéries Gram⁺.....	27
2.3.1 Le peptide signal.....	28
2.3.2 Propeptides.....	28
2.3.3 Chaperons, protéines Sec et signal peptidase chez les Gram ⁺	32
2.4 Revue détaillée sur les p.s.....	33
2.4.1 Domaine N du p.s.....	34

2.4.2	Domaine H du p.s.....	36
2.4.3	Domaine C, site de clivage et maturation	37
2.4.4	Intéractions du p.s. avec SecB et SecA.....	39
2.4.5	Liaison des p.s. avec des récepteurs membranaires.....	40
2.4.6	Interaction des p.s. avec les lipides membranaires	41
2.4.7	Échanges de p.s.	43
2.4.8	Expression de protéines hétérologues chez les streptomycètes et rôles du p.s.....	44
2.4.9	Autres types de peptides signaux et de "signal peptidase".....	45
2.4.10	Cas particulier chez les streptomycètes.....	46
2.4.11	Éléments additionnels sur la sécrétion des protéines.....	46
3-	MÉTHODOLOGIE	48
3.1	Souches bactériennes	49
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	49
3.1.2	<i>Streptomyces lividans</i>	49
3.2	Milieux de culture.....	50
3.2.1	Milieux de culture pour <i>E. coli</i>	50
3.2.2	Milieux de culture pour <i>S. lividans</i>	50
3.3	Les vecteurs.....	53
3.3.1	Vecteurs de clonage chez <i>E. coli</i>	53
3.3.2	Vecteurs d'expression chez <i>S. lividans</i>	53
3.4	Transformation bactérienne.....	53
3.4.1	Transformation d' <i>E. coli</i>	53
3.4.2	Transformation de <i>S. lividans</i>	54
3.5	Préparation des spores	55
3.6	Tests biologiques	55
3.6.1	Tests de comparaison entre les mutants	55
3.6.2	Dosage des protéines totales	55
3.6.3	Mesure de l'activité enzymatique.....	56
3.7	Manipulation de l'ADN.....	56
3.7.1	Isolement des plasmides	56
3.7.2	Digestion d'ADN par les enzymes de restriction.....	58
3.7.3	Isolement d'ADN après électrophorèse sur gel d'agarose.....	59
3.7.4	Ligations	60
3.8	Préparation des oligonucléotides.....	60
3.9	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	64
3.10	Mutagenèse dirigée.....	64

3.10.1 Préparation d'ADN simple brin contenant des uraciles.....	65
3.10.2 Isolement d'ADN simple brin.....	66
3.10.3 Phosphorylation des oligonucléotides.....	66
3.10.4 Hybridation de l'oligonucléotide avec l'ADN simple brin.....	67
3.10.5 Synthèse du brin complémentaire.....	67
3.10.6 Identification des plasmides porteurs de mutations par digestion des plasmides.....	68
3.10.7 Identification des plasmides porteurs de mutations par hybridation de colonies	68
3.10.7.1 Préparation de la sonde.....	68
3.10.7.2 Hybridation et lavages.....	69
3.11 Séquençage de l'ADN.....	69
4- RÉSULTATS.....	71
4.1 Introduction aux résultats.....	72
4.2 Résultats partie I - Construction des clones.....	72
4.2.1 Modification du site de reconnaissance de la "signal peptidase".....	73
4.2.2 Élimination du p.s. de la xylanase A.....	76
4.2.3 Mutagénèse dont l'amorce est produite par PCR asymétrique.....	84
4.2.4 Mutagénèse par extension d'amorces chevauchantes synthétisées par PCR.....	90
4.2.5 Mutagénèse par cassette de clonage.....	96
4.3 RÉSULTATS PARTIE II - EFFET DU REMPLACEMENT ET DE LA MUTAGÉNÈSE DU P.S. DE LA XYLANASE A SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES CHEZ <i>S. LIVIDANS</i>	100
4.3.1 Préparation des spores	100
4.3.2 Production de xylanase A2 par <i>S. lividans</i> en milieu liquide.....	105
4.3.3 Mesure de la croissance du mycélium	105
4.3.4 Activité xylanasique dans le surnageant de culture des clones.....	106
4.3.5 Activité enzymatique en fonction de la croissance bactérienne	110
5- DISCUSSION	113
5.1 Critique des méthodes de mutagénèse employées.....	114
5.2 Mesure de l'activité enzymatique des surnageants de culture	116
5.3 Analyse des effets des modifications et du remplacement du p.s. de la XlnA.....	116

5.3.1 Mutants VDS et "loop-out".....	116
5.3.2 P.s. β -Gal.....	118
5.3.3 P.s. CelB.....	118
5.3.4 Mutant cliv. XlnB, p.s. XlnB et p.s. Axe.....	119
5.3.5 P.s. XlnC-49 et XlnC-29.....	120
5.3.6 P.s. Man-35 et Man-44.....	121
5.3.7 CelA-46.....	123
5.3.8 P.s. LamB.....	124
5.4 Études devant faire suite à ces travaux.....	125
6- CONCLUSION.....	126
7- REMERCIEMENTS.....	129
8- BIBLIOGRAPHIE.....	131

Liste des abréviations

~	: environ	
α	: alpha	
a.a.	: acides aminés.	A= alanine
		H= histidine
		V= valine
		D= acide aspartique
		S= sérine
		R= arginine
		X= variable
		M= méthionine
		G= glycine
		L= leucine
		E= acide glutamique
		P= proline
		T= thréonine
Ac	: acétate	
ADN	: acide déoxy-ribonucléique	
ADN _c	: acide déoxy-ribonucléique complémentaire	
ADP	: adénoside di phosphate	
Amp	: ampicilline	
<i>arfA</i>	: gène de la protéine arabinofuranosidase A	
Arg	: arginine	
ARN	: acide ribonucléique	
ARN _m	: acide ribonucléique messenger	
ARN _t	: acide ribonucléique de transfert	
Atomes	Ag: argent	
	Ca: calcium	
	C: carbone	
	Cl: chlore	
	Co: cobalt	
	Cs: césium	
	Cu: cuivre	
	Fe: fer	
	H: hydrogène	
	I: iode	
	K: potassium	
	Mg: magnésium	
	Mn: manganèse	
	N: azote	
	Na: sodium	
	O: oxygène	
	P: phosphore	
	S: soufre	
	Zn: zinc	
ATP	: adénosine triphosphate	
<i>axe</i> et <i>Axe</i>	: gène et protéine de l'acétyl xylane estérase	
β	: bêta	

<i>B.</i>	: <i>Bacillus</i>
BSA	: de l'anglais "bovine serum albumine"
cc	: centimètre cube
<i>celA</i> et CelA	: gène et protéine de la cellulase A
<i>celB</i> et CelB	: gène et protéine de la cellulase B cellulase A
<i>cht</i>	: gène de la protéine chitinase
Ci	: Curie
Cm	: chloramphénicol
CMCase	: carboxy methyl cellulase
<i>Cm^r</i>	: gène de résistance à la canamycine
Δ	: delta
D.O.	: densité optique
dATP	: désoxyadénine triphosphate
dCTP	: désoxycytosine triphosphate
ddATP	: didésoxyadénine triphosphate
ddCTP	: didésoxycytosine triphosphate
ddGTP	: didésoxyguanine triphosphate
ddTTP	: didésoxythymine triphosphate
dGTP	: désoxyguanine triphosphate
DNS	: acide dinitrosalicylique
Dr	: docteur
DTT	: dithiothréitol
dTTP	: désoxythymine triphosphate
<i>dut₁</i>	: dUTPase
dUTP	: désoxyuracile triphosphate
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: acide éthylènediaminetétraacétique estérase
<i>et al.</i>	: et collaborateurs
γ	: gamma
g	: gramme
HaimII	: protéinaceous amylase inhibitor
kDa	: kilo dalton
Kpb	: kilo paires de bases
L	: litre
<i>lac</i>	: gène de la protéine de la β-galactosidase
<i>lamB</i> et LamB	: gène et protéine du récepteur du phage lambda d' <i>E. coli</i>
LEP-10	: <i>Streptomyces</i> protease inhibitor
LepB	: signal peptidase I
LPase	: leader peptisase
LspA	: lipoprotein signal peptidase
LTI	: <i>Streptomyces</i> protease inhibitor
M	: molaire
m	: mili
<i>man</i> et Man	: gène et protéine de la mannanase
<i>melC</i>	: opéron polycistronique qui porte les gènes <i>melC1</i> et <i>melC2</i>
MelC1 et MelC2	: protéines formant le complexe de la tyrosinase
<i>melC1</i> et <i>melC2</i>	: gènes de la synthèse de la tyrosinase
min.	: minute

Mutant Axe	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de l'acétyl xylane
Mutant CelA-27	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de 27 a.a. de la
Mutant CelA-46	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de 46 a.a. de la cellulase A
Mutant CelB	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de la cellulase B
Mutant cliv. XlnB	: XlnA dont le site de reconnaissance de la "signal peptidase" à été remplacé par celui de la xylanase B
Mutant LamB	: XlnA dont le p.s. a été remplacé par celui de LamB
Mutant loop-out	: XlnA dont le p.s. à été retiré
Mutant Man-35	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de 35 a.a. de la mannanase
Mutant Man-44	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de 44 a.a. de la mannanase
Mutant β -Gal	: XlnA dont le site de reconnaissance de la "signal peptidase" à été remplacé par celui de la β -Galactosidase de <i>Streptomyces lividans</i>
Mutant VDS	: XlnA dont le site de reconnaissance de la "signal peptidase" à été remplacé par les a.a. VDS
Mutant XlnB	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de la xylanase B
Mutant XlnC-29	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de 29 a.a. de la xyalnase C
Mutant XlnC-49	: XlnA dont le p.s. à été remplacé par celui de 49 a.a. de la xyalnase C
N	: normal
n	: nano
n.d.	: non déterminé
n.r.	: non rapporté
nt.	: nucléotides
NTG	: nitrosoguanidine
oligo	: oligonucléotide
OmpA	: outer membrane protein A
ORF	: cadre de lecture ouvert, de l'anglais "open reading frame"
p	: pico
p.b.	: paires de bases
p.s.	: peptide signal
p/v	: poids par volume
PCR	: de l'anglais "polymerase chain reaction"
PEG	: polyéthylène glycol
<i>pepN</i>	: gène de la protéine aminopeptidase N
<i>pepP</i>	: gène de la protéine aminopeptidase P
P _i	: phosphate inorganique
Ppp	: pré-pillin peptidase
<i>prt</i>	: gène de la métalloprotéase de <i>S. lividans</i>
RBB	: rémazol bleu brillant
RBS	: site de fixation des ribosomes, de l'anglais "ribosome binding site"
Réf.	: référence
RNase	: ribonucléase
rpm	: rotations par minutes
<i>S. lividans</i>	: <i>Streptomyces lividans</i>

SapA	: spore associated polypeptide
SDS	: dodécylsulfate de sodium, de l'anglais "sodium dodecyl sulphate"
sec.	: secondes
<i>slpA</i>	: gène d'une endoprotéase de <i>S. lividans</i>
sp.	: espèce
SSI	: <i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor
STI-I	: <i>Streptomyces</i> protease inhibitor
STI-II	: <i>Streptomyces</i> protease inhibitor
TAE	: tampon tris-acétate-EDTA
TCA	: acide trichloroacétique
TE	: tampon Tris-EDTA
<i>tet^r</i>	: gène de résistance à la tétracycline
TNF	: facteur nécrosant des tumeurs
Tris	: tris (hydroxyméthyl) aminométhane
<i>tsr</i>	: gène de résistance au thiostrepton
U.I.	: Unité internationale Une unité internationale = 1 µmole hydrolysée/min
<i>ung₁</i>	: uracil N-glycosilase
v/v	: volume par volume
x g	: fois la force centrifuge
<i>xlnA</i> et XlnA	: gène et protéine de la xylanase A
<i>xlnB</i> et XlnB	: gène et protéine de la xylanase B
<i>xlnC</i> et XlnC	: gène et protéine de la xylanase C
µ	: micro

Liste des tableaux

Introduction:

Tableau 1:	Exemples de clonage homologue chez <i>Streptomyces lividans</i>	3
Tableau 2:	Exemples de gènes d'eukaryotes clonés chez <i>Streptomyces lividans</i>	5

Revue bibliographique:

Tableau 3:	Séquence en acides aminés de p.s. de protéines sécrétées chez les <i>streptomycetes</i>	29
------------	---	----

Méthodologie:

Tableau 4:	Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du gène de la xylanase A.	61
Tableau 5:	Liste des oligonucléotides servant à l'amplification par PCR de la séquence du peptide signal des gènes: <i>xlnB</i> , <i>xlnC</i> , <i>man</i> , <i>axe</i> , <i>celA</i> et <i>celB</i>	62

Résultats:

Tableau 6:	Comptage sur pétris du nombre de spores viables pour chaque clone.	104
------------	---	-----

Liste des Figures

Revue bibliographique:

Figure 1:	Transport Sec-dépendant des protéines.	11
Figure 2:	Représentation schématique du p.s. de pré-protéine bactérienne.	15
Figure 3:	Cycles catalytiques de la sécrétion des protéines impliquant l'hydrolyse d'ATP.	24

Résultats:

Figure 4:	Les mutations VDS et β -gal génèrent de nouveaux sites de restriction.	74
Figure 5:	Organisation et cartographie partielle du gène de la xylanase A chez pAM 19.1.	77
Figure 6:	Hybridations possibles de l'oligo NP-11 utilisé pour la mutation "loop out".	80
Figure 7:	Identification du mutant "loop out" par double digestion enzymatique.	82
Figure 8:	Amplification du peptide signal de la cellulase A par PCR asymétrique.	85
Figure 9:	Hybridations possibles de l'oligo produit par PCR asymétrique pour la mutagenèse.	88
Figure 10:	Mutagenèse par extension d'amorces chevauchantes synthétisées par PCR.	91
Figure 11:	Distinction entre les produits d'hybridation spécifique et d'hybridation parasite.	94
Figure 12:	Insertion des sites <i>Hind</i> III et <i>Kpn</i> I dans le gène de la xylanase A.	98

Figure 13:	Amplification de la séquence de divers peptides signaux par PCR.	101
Figure 14:	Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des clones au cours du temps.	107
Figure 15:	Activité enzymatique en fonction de la croissance du mycélium au cours du temps.	111

Sommaire

S. lividans est une bactérie Gram⁺ qui sécrète un grand nombre de protéines dans le milieu de culture. Les protéines sécrétées sont généralement synthétisées avec une courte extension à leur extrémité N-terminale, appelée peptide signal (p.s.), qui permet l'initiation de la sécrétion. Ce peptide de 25 à 45 a.a. de longueur est subséquentement clivé par la signal peptidase pour libérer la protéine mature. Le travail présenté ici a pour but d'optimiser la sécrétion de la xylanase A de *S. lividans* en modifiant le p.s. de cette enzyme d'importance industrielle. Le p.s. a été muté au site de reconnaissance de la signal peptidase et a aussi été remplacé par des p.s. appartenant à d'autres protéines sécrétées par *S. lividans* et par *E. coli*.

Le p.s. de la xylanase A a été délété (mutant loop out). Les mutations du site de clivage concernent le remplacement du site de la xylanase A par ceux de la xylanase B (mutant cliv. XlnB) et de la β -galactosidase (mutant β -Gal) de *S. lividans* et le remplacement de la séquence normalement reconnue (AHA) par la séquence VDS. Les p.s. des cellulases A et B (CelA et B), de la mannanase (Man), de l'acétyl xylane estérase (Axe), et des xylanases B et C (XlnB et C) de *S. lividans*, ainsi que le p.s. de la protéine réceptrice du phage lambda (LamB) d'*E. coli* ont été amplifiés par PCR et insérés à la place du p.s. de la xylanase A.

La production d'enzyme dans le surnageant de culture a été estimée par mesure de l'activité enzymatique en fonction de la croissance du mycélium de chacun des clones. Par rapport à la production du clone sauvage, la production d'enzyme est presque nulle en absence de p.s., de même que chez les mutants VDS, β -Gal et avec le p.s. de la CelB. Elle est réduite de 90% et de 55% respectivement avec ceux de la XlnC et de LamB. Par contre la production d'enzyme est équivalente avec le mutant cliv. XlnB et avec les p.s. de la XlnB, de

l'Axe et de la Man. Enfin, avec l'ajout de 10 a.a. au p.s. de la Man et avec le p.s. de la CelA, le niveau de production est respectivement 1,5 et 2,5 fois plus élevé que celui du clone sauvage.

Ces résultats encourageants ne sont qu'un pas dans la compréhension des mécanismes fondamentaux de la sécrétion et dans l'élaboration d'une souche bactérienne hyperproductrice d'enzymes d'intérêt industriel pharmaceutique ou médical.

1- Introduction

Streptomyces lividans est une bactérie Gram⁺ qui appartient à la grande famille des actinomycètes. Cette bactérie se distingue entre autre par un génome particulièrement riche en nucléotides G et C qui est estimé à 74% (Wright et Bibb, 1992). Elle est considérée parmi les microorganismes les plus importants industriellement en raison de la très grande variété d'antibiotiques qu'elle produit (Korn-Wendisch et Kutzner, 1992).

Le cycle de vie de cette bactérie se divise en deux phases. D'après Schauer *et al.* (1988), la bactérie se développe d'abord dans le sol en formant un réseau d'hyphes enchevêtrés appelé mycélium végétatif. Au cours de cette phase, dite primaire, le microorganisme pénètre et dégrade la matière organique en sécrétant une grande variété d'enzymes hydrolytiques. Certaines comme les cellulases, les hémicellulases et les ligninases permettent de dégrader la biomasse végétale (Kluepfel, 1991). La phase secondaire du développement des streptomycètes coïncide avec la septation des hyphes aériens conduisant à la formation des spores. La sporulation est accompagnée de la production de métabolites secondaires parmi lesquels on retrouve les antibiotiques.

Récemment, l'intérêt industriel pour les streptomycètes s'est encore accru en raison de leur capacité de produire de grandes quantités de protéines extracellulaires. L'expertise développée par les industries pharmaceutiques pour la production d'antibiotiques à grande échelle serait certainement utile dans le développement de procédés de production de protéines sécrétées à l'échelle industrielle. Le tableau 1 fournit quelques exemples d'expression de protéines homologues clonées chez *S. lividans* et démontre bien qu'il est possible d'induire une surexpression efficace des gènes clonés en améliorant par exemple 850 fois la production de l'endoglucanase A.

Tableau 1: Exemples de clonage homologues chez *Streptomyces lividans*. La colonne de la surproduction indique le rapport entre la quantité de protéines (ou d'activité enzymatique) sécrétée par la souche recombinante divisée par la quantité sécrétée par la souche sauvage.

Protéine	Gène	Sur- production	Réf. ^b
Acetyl xylane esterase	<i>axe</i> ^a	n.r.	1
Aminopeptidase N	<i>pepN</i>	n.r.	2
Aminopeptidase P	<i>pepP</i>	4.2	3
Arabinofuranosidase	<i>arfA</i> ^a	50	4
Chitinase	<i>cht</i>	10	5
Endoglucanase A	<i>celA</i> ^a	850	6
Endoglucanase B	<i>celB</i> ^a	n.d.	7
Galactosidase	<i>lac</i>	230	8
Mannanase	<i>manA</i> ^a	60	9
Metalloprotease	<i>prt</i>	n.r.	10
Metalloprotease	<i>slpA</i>	n.r.	11
Xylanase A	<i>xlnA</i> ^a	130	12
Xylanase B	<i>xlnB</i> ^a	60	13
Xylanase C	<i>xlnC</i> ^a	n.r.	14

n.r.: non rapporté.

n.d.: non déterminé.

^aCes gènes ont été exprimés chez le mutant 10-164 de *S. lividans* qui n'exprime pas de cellulases ni de xylanases.

^bRéférences: 1) Shareck, communications personnelle; 2) Butler *et al.* 1994; 3) Butler *et al.* 1993; 4) Manin *et al.* 1994; 5) Miyashita *et al.* 1991; 6) Théberge *et al.* 1992; 7) Wittmann *et al.* 1994; 8) Eckhardt *et al.* 1987; 9) Arcand *et al.* 1993; 10) Lichenstein *et al.* 1992; 11) Butler *et al.* 1992; 12) Bertrand *et al.* 1989; 13) Vats-Mehta *et al.* 1990; 14) Kluepfel *et al.* 1992.

Quelques exemples d'expression de protéines hétérologues clonées chez *S. lividans* sont présentés au tableau 2. Le système de sécrétion de cette bactérie permet d'atteindre des rendements de 200 mg/L lors de la production d'apidaecin et même 300 mg/L dans le cas du récepteur des lymphocytes T humains (CD4). Les performances de la machinerie de sécrétion des streptomycètes s'expliquent entre autre par le fait qu'elles ne possèdent pas d'espace periplasmique ce type d'organisation faciliterait la libération des protéines dans leur environnement extracellulaire (Gilbert, sous presse). Cette caractéristique des bactéries Gram⁺ leur confère un avantage notable par rapport aux bactéries Gram⁻ comme *E. coli*. Chez ces dernières, les protéines doivent traverser la barrière additionnelle que constitue la membrane externe. Généralement elles restent prisonnières dans l'espace périplasmique. Parfois les protéines s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de corps d'inclusion, ce qui complique là encore leur récupération.

L'intérêt de *S. lividans* pour l'expression des protéines ne se situe pas uniquement au niveau des produits hétérologues. Cette bactérie produit aussi des enzymes qui dégradent efficacement les composés lignocellulosiques. Ces enzymes peuvent être utilisées pour la transformation de biomasse de faible valeur comme des déchets de l'agriculture et de la foresterie en des produits utiles comme de l'alcool ou de la nourriture pour les animaux (Coughlan, 1985). Parmi ces enzymes, la xylanase offre d'autres applications dont son utilisation efficace comme agent de bioblanchiment des pâtes de papier (Viikari *et al.* 1994) ce qui réduit considérablement la production de polluants chlorés (Sénior *et al.* 1992; Kluepfel *et al.*, 1993). L'expression de la xylanase chez *S. lividans* 10-164 (un mutant cellulase et xylanase négatif) permet d'obtenir une préparation ne contenant pas de cellulase, utilisable sans

Tableau 2: Exemples de gènes d'eukaryotes clonés chez *Streptomyces lividans*.

Protéine	Origine	Peptide Signal	Production	Réf. ^a
Apidaecin (peptide antibactérien)	<i>Apis mellifera</i> (abeille à miel)	Gène de l'inhibiteur de la subtilisine (SSI) de <i>S. albobriseolus</i>	200 mg/L	1
Hormone de croissance bovine	cDNA de la glande pituitaire	Aucun (non sécrétée)	0,17 % des protéines totales	2
Hirudine (inhibiteur de la thrombine)	<i>Hirudo medicinalis</i> (sangue)	Gène de l'inhibiteur de l' α -amylase (Tendamistat) de <i>S. tendae</i>	250-500 ng/mL	3
Récepteur CD4 humain	Lymphocyte T	Gène de l'inhibiteur de protéases (STI-II) de <i>S. longisporus</i>	300 mg/mL	4
Interferon- α	Souris	Gène de l' α -amylase de <i>S. venezuelae</i>	n.r.	5
Interferon- α 1	Humain	Gène de staphylokinase (<i>sak</i>) du phage 42D de <i>Staphylococcus aureus</i>	$1-2 \times 10^5$ IU/mL	6
Interferon- α 2	Humain	Aucun (non sécrétée)	1×10^6 IU/L	7
Interleukine-1 β	Humain	Gène de la β -galactosidase de <i>S. lividans</i>	n.d.	8
Interleukine-2	Humain	Aucun (non sécrétée)	200 U/mL	9
Interleukine-2	Humain	Gène de l'inhibiteur de l' α -amylase (Tendamistat) de <i>S. tendae</i>	30 ng/mL	10
Proinsuline	<i>Macaca fascicularis</i> (singe)	Gène de l'inhibiteur de l' α -amylase (Tendamistat) de <i>S. tendae</i>	20-100 mg/mL	11
Thaumatine II	<i>Thaumatococcus</i> <i>danielli</i> (plante)	Gène de la β -galactosidase de <i>S. lividans</i>	0,2 mg/mL	12

Facteur nécrosant des
tumeurs (TNF)

Humain

Gène *melC1* de *S. antibioticus*

20 mg/mL

13

n.r.: non rapporté.

n.d.: non déterminé.

^a Références: 1) Taguchi *et al.* 1992; 2) Gray *et al.* 1984; 3) Bender *et al.* 1990b; 4) Fornwald *et al.* 1993; 5) Anné *et al.* 1991; 6) Noack *et al.* 1988; 7) Pulido *et al.* 1986; 8) Lichenstein *et al.* 1988; 9) Muñoz *et al.* 1985; 10) Bender *et al.* 1990a; 11) Koller *et al.* 1989; 12) Illingworth *et al.* 1989; 13) Chang et Chang, 1988.

étape supplémentaire de purification puisqu'elle n'affecte pas l'état de la cellulose durant le procédé.

Ainsi, toute forme d'amélioration de l'expression des protéines chez *S. lividans* se traduit par des retombées industrielles importantes. L'objectif des travaux présentés ici consistent en l'optimisation du premier maillon de la sécrétion d'une protéine. Ainsi, la synthèse des protéines destinées à être sécrétées débute par une courte séquence d'a.a. appelée peptide signal (p.s.) qui est ultimement retirée par une protéase spécifique. Le p.s. est essentiel à la sécrétion puisqu'il est impliqué dans pratiquement toutes les étapes conduisant au transfert des protéines du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. La xylanase A de *S. lividans* sera utilisée comme modèle pour cette étude.

2- Revue bibliographique

2.1 Introduction à la revue bibliographique

Cette revue de littérature expose l'état actuel des connaissances sur la sécrétion. Les mécanismes de sécrétion des eucaryotes et des procaryotes possèdent certaines homologues mais aussi des différences majeures. Seule la littérature ayant trait aux procaryotes sera présentée dans ce mémoire.

En raison des efforts considérables investis dans l'élucidation du processus de sécrétion des protéines chez *E. coli*, les travaux basés sur ce microorganisme sont de loin les mieux documentés. Pour cette raison, le tableau général de la sécrétion chez les bactéries sera brossé à partir de ce qui est connu chez *E.coli*. Dans un deuxième temps, certaines particularités propres aux bactéries Gram⁺ seront soulevées. Les connaissances des mécanismes de sécrétion chez ces dernières sont malheureusement encore très fragmentaires et ne constituent qu'une accumulation d'informations éparses. Dans ce groupe, la bactérie qui a livré le plus d'informations est évidemment *Bacillus subtilis*. Finalement, le p.s. étant l'objet des travaux présentés dans ce mémoire, la dernière partie de la revue de littérature sera consacrée exclusivement à la description des travaux majeurs effectués sur le p.s. Le choix des articles traités sera guidé par les interactions du p.s. avec les différents éléments du système de sécrétion et par des travaux d'altération des p.s. ainsi que leur incidence sur la production de protéines.

2.1.1 Terminologie

Dans ce mémoire, les termes sécrétion, translocation et exportation sont utilisés sans distinction lorsqu'une protéine traverse entièrement ou en partie une membrane. Le terme pré-protéine est appliqué à des polypeptides intracellulaires possédant un p.s. et destinés à l'exportation.

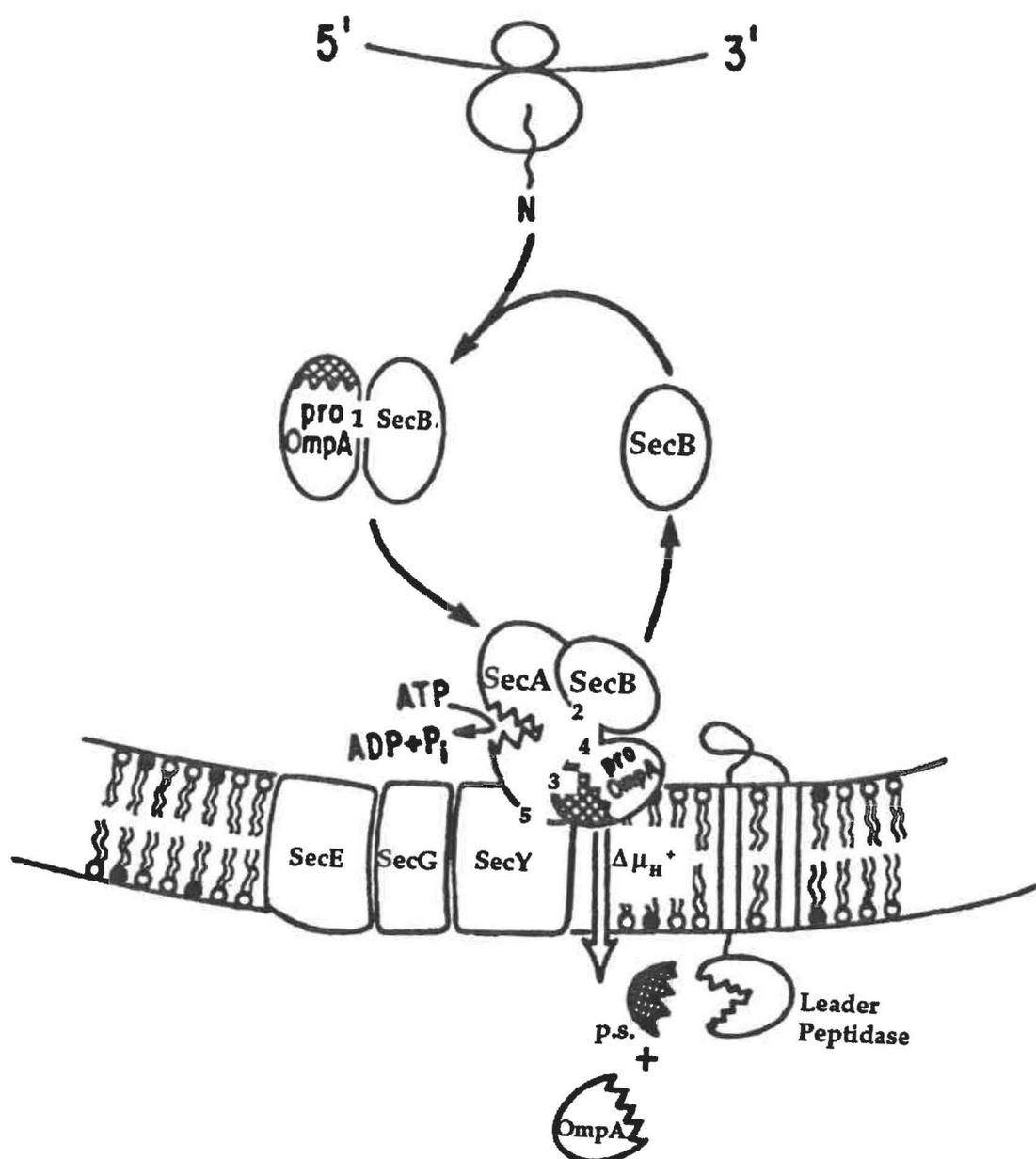
2.2 Sécrétion chez les bactéries Gram⁻

Du point de vue moléculaire, chacune des différentes membranes pose le même problème: comment transporter une grosse molécule hydrophile (la protéine) à travers une double couche de phospholipides hydrophobes (Schatz, 1986). Les bactéries possèdent divers mécanismes permettant le passage d'une protéine à travers la membrane. Toutefois, la grande majorité des protéines sont sécrétées par un système particulier appelé "Sec-dépendant" puisqu'il fait intervenir plusieurs facteurs de sécrétion, regroupés dans la famille des protéines Sec. Une attention particulière sera portée à cette voie dominante tandis que les autres mécanismes seront discutés brièvement à la fin de la revue.

La figure 1 résume les différentes étapes de la sécrétion des protéines chez les bactéries. Le tableau général de la sécrétion débute par la synthèse du p.s. à l'extrémité N-terminale des protéines destinées à l'exportation. Cette courte extension divisée en trois domaines (N, H et C) (von Heijne, 1985) assure une interaction efficace entre les pré-protéines et les diverses composantes du système de sécrétion (Pugsley, 1993). Ainsi le p.s. retarde le repliement de la protéine naissante permettant la formation d'un complexe entre la pré-protéine et une protéine cytoplasmique appelée SecB (Kumamoto, 1990). Ceci prévient les erreurs de repliement et les liaisons du précurseur en des sites non productifs (Hartl *et al.*, 1990). Le complexe précurseur-SecB se lie ensuite à la membrane par l'intermédiaire de la protéine SecA qui possède une affinité pour SecB (Hartl *et al.*, 1990) et aussi pour le p.s. et le domaine mature de la pré-protéine. Des analyses génétiques suggèrent fortement que SecA interagit directement avec le p.s. (Fikes et Bassford, 1989) et avec le complexe membranaire SecY/E/G (Young *et al.*, 1994). SecA se lie à la membrane grâce à son affinité pour le SecY, SecE et les

Figure 1: Transport Sec-dépendant des protéines.

Les numéros dans le schéma réfèrent aux liaisons de: 1) SecB avec le domaine de proOmpA; 2) SecB avec SecA; 3) SecA avec le p.s.; 4) SecA avec le domaine mature de proOmpA; 5) SecA avec le complexe SecY/E/G (tiré de Wickner et al., 1991).



phospholipides acides (Hartl *et al.*, 1990). L'énergie nécessaire à la translocation de la protéine est fournie par l'aptitude de SecA à hydrolyser l'ATP lorsqu'elle est liée au précurseur (Lill *et al.*, 1989; Chen et Tai, 1985) et par la force motrice des protons (Schiebel *et al.*, 1991). Durant le processus de sécrétion, le p.s. est retiré par la "leader peptidase" LepB (Wolfe *et al.*, 1983) et les protéines SecD et SecF contribueraient à la libération de la protéine mature (Pogliano et Beckwith, 1994).

La suite de cette revue de littérature reprendra en détail les différentes étapes conduisant à la sécrétion des protéines chez les bactéries.

2.2.1 Peptide signal

Les protéines destinées à l'exportation doivent interagir spécifiquement avec la machinerie de sécrétion pour leur passage à travers une membrane. Ces protéines sont initialement synthétisées sous forme de précurseur avec une extension à l'extrémité N-terminale, appelée le peptide signal (p.s.). Cette séquence d'une longueur moyenne de 25 a.a. (von Heijne et Abrahmsén, 1989) est coupée au cours de la sécrétion. Le p.s. servirait de médiateur entre la pré-protéine et les protéines impliquées dans le transport (Randall *et al.*, 1987). L'état actuel des connaissances sur les différentes interactions impliquant le p.s. sera développé en même temps que les diverses étapes de la sécrétion seront abordées. Il est bon de garder en mémoire que le p.s. intervient directement ou indirectement dans les associations du précurseur avec les lipides de la membrane, avec les protéines SecA et SecB et avec le complexe SecY/E/G de la membrane.

2.2.2 Organisation du p.s.

Bien que la longueur des peptides signaux et leur composition en acides aminés (a.a.) soient très variables, von Heijne a démontré en 1985 que tous les peptides signaux comportent trois régions: une région de taille variable chargée positivement à l'extrémité N-terminale (avec une charge positive moyenne de 1,7) appelée aussi domaine N, qui est suivie d'une région centrale hydrophobique (domaine H) adoptant une conformation en hélice α d'une longueur minimale de 8 résidus chez les procaryotes et d'une région C-terminale polaire comprenant le site de clivage, appelée aussi domaine C (voir figure 2). La région C-terminale du p.s. possède quelques caractères conservés. En positions -5 à -8 on retrouve un a.a. qui induit une rupture de l'hélice α du domaine H (généralement P ou G) qui permet d'exposer le site de reconnaissance de la "signal peptidase" et de le rendre plus accessible. Le site de reconnaissance est une courte section avec de petits a.a. (généralement A ou G) en positions -1 et -3 (Koshland *et al.*, 1982) (voir la section 2.2.13 portant sur la maturation).

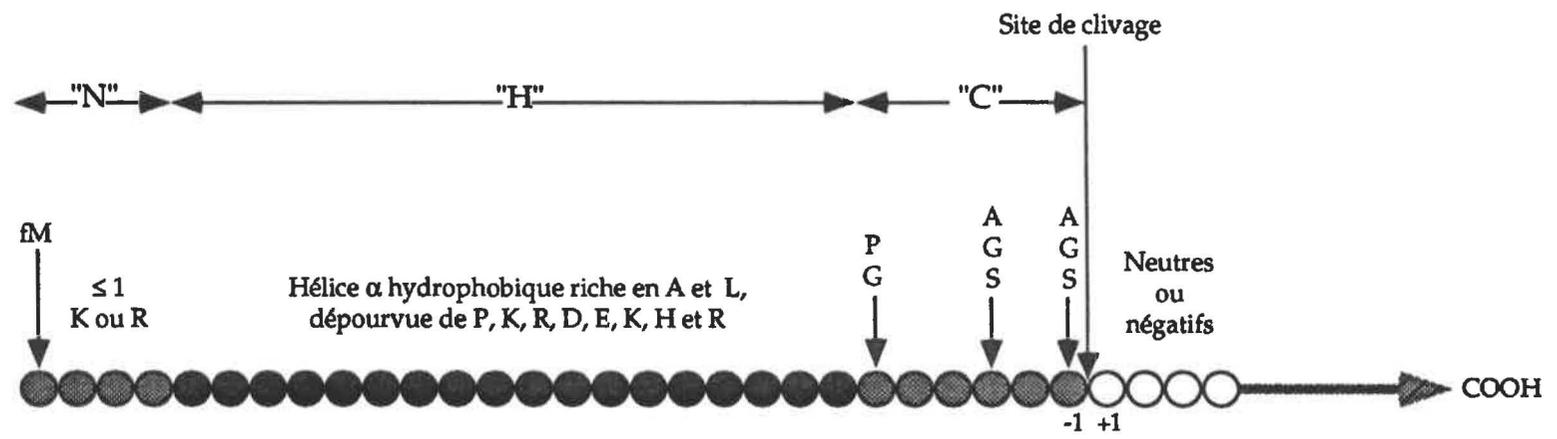
Dans leur revue sur l'enzymologie du transport des protéines chez *E. coli*, Wickner *et al.*, (1991) ont fait clairement ressortir que le caractère basique de l'extrémité N-terminale et la composition apolaire du domaine central des p.s. sont les caractères essentiels pour la translocation des protéines. Les détails de certains travaux qui supportent l'importance particulière de ces deux domaines sont expliqués plus à fond à la section 2.4 sur les p.s.

2.2.3 Interactions de la pré-protéine avec les chaperons

Les p.s. sont capables d'interagir directement avec les lipides des membranes possiblement pour initier la translocation (Pugsley, 1993). Toutefois, dans le cytoplasme, les pré-protéines ont avantage à être guidées

Figure 2: Représentation schématique du p.s. de pré-protéine bactérienne.

La structure des p.s. se divise en trois domaines. Le domaine N (de 2 à 15 résidus) est polaire et porte une charge nette positive. Le domaine H (>8 résidus) est principalement composé de résidus hydrophobes. Le domaine C, généralement moins hydrophobe, porte la séquence reconnue par la signal peptidase. Les acides aminés généralement retrouvés dans les différentes régions sont représentés par les lettres qui leur correspondent. Les cercles gris représentent des résidus chargés ou polaires. Les cercles noirs représentent des résidus hydrophobes ou apolaires et les cercles blancs représentent les premiers a.a. de la protéine mature. (Adapté de Pugsley, 1993).



par des récepteurs spécifiques (communément désignés par le terme de chaperon), dans le but de favoriser des interactions productives entre le p.s. et les sites de sécrétion situés dans la membrane cytoplasmique.

Il semblerait aussi que les chaperons moléculaires préviennent les interactions illicites durant l'intervalle entre la synthèse et la translocation. La stabilisation des intermédiaires au moyen des chaperons réduirait les repliements inadéquats et préviendrait les agrégations de la pré-protéine ou encore les erreurs d'association avec des sites de faible affinité dans la membrane (Wickner *et al.*, 1991).

2.2.4 SecB

Jusqu'à présent il a été démontré que plusieurs protéines cytoplasmiques peuvent jouer le rôle de chaperons parmi lesquelles on retrouve les protéines de choc thermique comme GroEL, GroES, et DnaK. Cependant la protéine SecB semble la plus importante et son rôle est assez bien connu.

La purification de SecB a permis de faire des études biochimiques de ses fonctions et de définir ses interactions avec les autres composantes de la machinerie d'insertion-sécrétion des protéines. Ainsi, elle se retrouve sous la forme d'un tétramère composé de sous-unités de 17 kDa (Kumamoto *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1988). SecB se lie à la majorité des pré-protéines mais seulement à un très petit nombre de protéines cytoplasmiques ce qui indique bien que cette protéine est une composante de la voie générale de sécrétion (Kumamoto, 1991). Certaines mutations de SecB réduisent l'efficacité du transport de nombreuses pré-protéines à l'exception de quelques unes. Cette découverte a conduit au concept de deux classes distinctes de pré-protéines dites "SecB-dépendantes" et "SecB-indépendantes" (Pugsley, 1993). La

littérature n'apporte toujours pas de consensus valable sur les interactions directes ou indirectes du p.s. avec SecB. Quelques unes des principales expériences sur ce sujet sont rapportées dans la section 2.4 portant sur les p.s.

Après sa formation, le complexe SecB-pré-protéine s'associe à la protéine SecA (voir figure 1).

2.2.5 Interactions du complexe SecB-pré-protéine avec SecA

SecA est essentielle à la sécrétion des protéines et donc à la vie de la bactérie. Elle peut se lier avec les pré-protéines aussitôt qu'elles émergent des ribosomes ou lorsqu'elles sont libres dans le cytoplasme ou encore lorsqu'elles s'arriment à la membrane cytoplasmique. La protéine SecA interagit avec les pré-protéines en reconnaissant la charge positive à l'extrémité N-terminale du p.s. (Akita *et al.*, 1990). Une autre étude rapporte que certaines mutations dans le gène de SecA améliorent le transport de la "pré-maltose-binding protein" dont le p.s. est défectueux (Fikes et Bassford, 1989). Selon Pugsley (1993), ces observations suggèrent, mais ne prouvent pas que SecA se lie directement au p.s. Par ailleurs, il a été clairement démontré que SecA se lie aussi à certains domaines correspondant à la séquence de la protéine mature (Lill *et al.*, 1990).

L'étude du gène qui code pour pour cette protéine chez *E. coli* indique qu'elle possède 901 a.a. (Schmidt *et al.*, 1988). Il a été démontré que SecA peut lier au moins trois molécules d'ATP (Lill *et al.*, 1989) indiquant qu'elle possède au moins trois sites distincts de liaison. La reconnaissance spécifique du p.s. est requise pour l'activation de l'activité ATPasique de SecA. En fait, cette activité serait réglée à la fois par les phospholipides acides, les composantes protéiques membranaires, le p.s. et le domaine mature de la pré-protéine (Lill *et al.*, 1990).

Avant de détailler le fonctionnement dynamique de la protéine SecA, il serait bon de passer en revue les différentes composantes membranaires formant le canal de sécrétion des protéines.

2.2.6 Facteurs protéiques membranaires formant un canal pour la sécrétion

Selon Pugsley (1993), il est largement admis que la translocation des protéines à travers la membrane cytoplasmique bactérienne s'effectue grâce à des canaux spécifiques formés par les protéines membranaires SecY, SecE et SecG (figure 1). Ainsi, les pré-protéines en transit seraient complètement protégées du contact avec l'environnement hydrophobique de la double couche lipidique, réduisant les besoins énergétiques. Toujours selon cet auteur, les protéines membranaires formant les canaux possèdent des boucles périplasmiques et cytoplasmiques qui peuvent aider à refermer le canal entre chaque passage de protéines.

Il est évident qu'un pore membranaire doit pouvoir se refermer de façon étanche lorsqu'il n'est pas en service. Le problème qui se pose alors est de déterminer quel est le facteur qui en commande l'ouverture. Dans la littérature, il est rapporté que les p.s. peuvent induire l'ouverture de canaux de sécrétion dans une double couche lipidique formée de membranes cytoplasmiques d'*E. coli* mais uniquement lorsqu'ils sont ajoutés du côté cytoplasmique. Cette observation a été interprétée comme une démonstration que les p.s. se lient à des récepteurs spécifiques du côté cytoplasmique (Simon et Blobel, 1992).

2.2.7 SecE

SecE forme un complexe protéique avec deux autres constituants des membranes: SecY et SecG (Schatz, 1991). Toujours selon cet auteur, elle

possède 127 a.a. et d'après la séquence, il a été proposé que la protéine SecE aurait trois segments transmembranaires et deux régions cytoplasmiques. Par contre un mutant tronqué qui ne possède plus que la partie C-terminale (a.a. 78 à 127) conserve son activité et interagit toujours avec SecY (Nishiyama, 1992).

2.2.8 SecY

La protéine SecY fut initialement découverte en isolant des mutants complétant les défauts de sécrétion chez des souches contenant des mutations dans le p.s. de LamB (Emr *et al.*, 1981). Le gène de SecY code pour une protéine hydrophobe de 443 a.a. (Cerretti *et al.*, 1983). L'analyse de la séquence déduite des a.a. suggère une structure constituée en dix segments transmembranaires avec neuf jonctions hydrophiles et des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques hydrophiles (Ito, 1990). Ces prédictions topologiques sont supportées par des études de susceptibilité aux protéases (Akiyama et Ito, 1987).

Les observations basées sur des mutants de SecY supprimant les défauts de sécrétion dus à des p.s. mutants ont été interprétées en termes d'interactions directes entre Sec Y et les p.s. Toutefois, Randall *et al.* (1987) ont fait la revue de la question et ont montré les faiblesses de ces "preuves". Ils ont suggéré que ces mutations pouvaient supprimer certains défauts de sécrétion d'une manière indirecte plutôt que par une interaction directe entre SecY et les p.s.

Par contre, certaines observations plus récentes (Puziss *et al.*, 1989) supportent à nouveau la thèse selon laquelle SecY interagit directement avec le p.s. des protéines exportées. En fait selon eux, différentes régions de la protéine SecY reconnaîtraient différents caractères structuraux des p.s. L'une

des expériences consistait en l'altération du résidu en position 408 de SecY qui supprimait l'effet de certaines mutations dans les p.s., néfastes à la sécrétion de la pré-MalE et de la pré-LamB ce qui démontre bien qu'il y a interaction (Puziss *et al.*, 1989). Il est intéressant de remarquer que les défauts de sécrétion des protéines dont le p.s. est altéré dans le domaine H sont supprimés par ce mutant de SecY mais pas les défauts résultant d'altération du domaine N de ces mêmes p.s.

2.2.9 SecG

Il a été suggéré que la protéine dénommée "Bande 1" qui co-purifie normalement avec le complexe SecY/E permettrait d'en augmenter la stabilité (Brundage *et al.*, 1992). D'autre part, l'équipe de Tokuda au Japon a découvert une protéine, appelée p12, qui stimule grandement les activités de translocation *in vitro* des protéines dans des membranes reconstituées (Nishiyama *et al.*, 1993). Récemment, les deux groupes ont convenu qu'il s'agissait de la même protéine qu'ils ont nouvellement baptisée SecG (Kim *et al.*, 1994). Il s'agit d'une protéine de 110 a.a. dont le rôle exact n'est pas encore connu (Douville *et al.*, 1994).

2.2.10 SecD/F

La cascade de liaisons SecB à SecA à SecY/E/G se termine avec la participation des protéines SecD et SecF. Ces protéines régleraient l'association de la protéine SecA à la membrane interne et augmenteraient son activité (Young *et al.*, 1994).

La séquence des protéines SecD et SecF laisse supposer que ces deux protéines traversent six fois la membrane cytoplasmique et qu'elles posséderaient un grand domaine périplasmique (Pogliano et Beckwith, 1994).

En raison de la forte similitude de leur séquence, il a été suggéré qu'elles possèdent des fonctions semblables (Arkowitz et Wickner, 1994; Pogliano et Beckwith, 1994). Ces protéines pourraient être des catalyseurs de la sécrétion en couplant la translocation avec le repliement des protéines du côté périplasmique de la membrane (Arkowitz et Wickner, 1994). Il semble qu'elles n'interagiraient pas avec le p.s. puisqu'aucune mutation permettant le transport de pré-protéines dont le p.s. est défectueux n'a été attribuée à ces protéines (Gardel *et al.*, 1990). Par contre il a été proposé qu'elles pourraient contribuer à la maturation des pré-protéines en les présentant à la "leader peptidase" (Pogliano et Beckwith, 1994).

2.2.11 Énergie nécessaire au transport des protéines

Puisqu'il a été démontré que le transport des polypeptides à travers la membrane peut avoir lieu en absence de synthèse protéique (donc de façon post-traductionnelle), il est clair que le modèle de transport qui propose que l'énergie provenant de l'élongation de la chaîne naissante serait la force pour la translocation de la protéine n'est pas satisfaisante (Randall *et al.*, 1987). Chen et Tai (1985) ont été les premiers à démontrer que l'énergie nécessaire à la translocation des protéines chez les bactéries proviendrait de l'hydrolyse de l'ATP. La nécessité d'une source d'énergie additionnelle, comme la force motrice des protons, pour le transport des protéines a été démontrée par la suite (Schiebel *et al.*, 1991) et selon Arkowitz et Wickner (1994) les protéines SecD et SecF contribuent au maintien de ce potentiel électrochimique.

2.2.12 Passage des protéines à travers la membrane

Cette section résume en trois étapes les données les plus récentes à l'heure actuelle sur le mécanisme de transport des pré-protéines à travers la

membrane cytoplasmique chez *E. coli*. La figure 3 reprend schématiquement chacune des étapes.

Étape I:

SecA se lie à la membrane en fonction de son affinité pour le complexe SecY/E et pour les phospholipides acides.

Étape II:

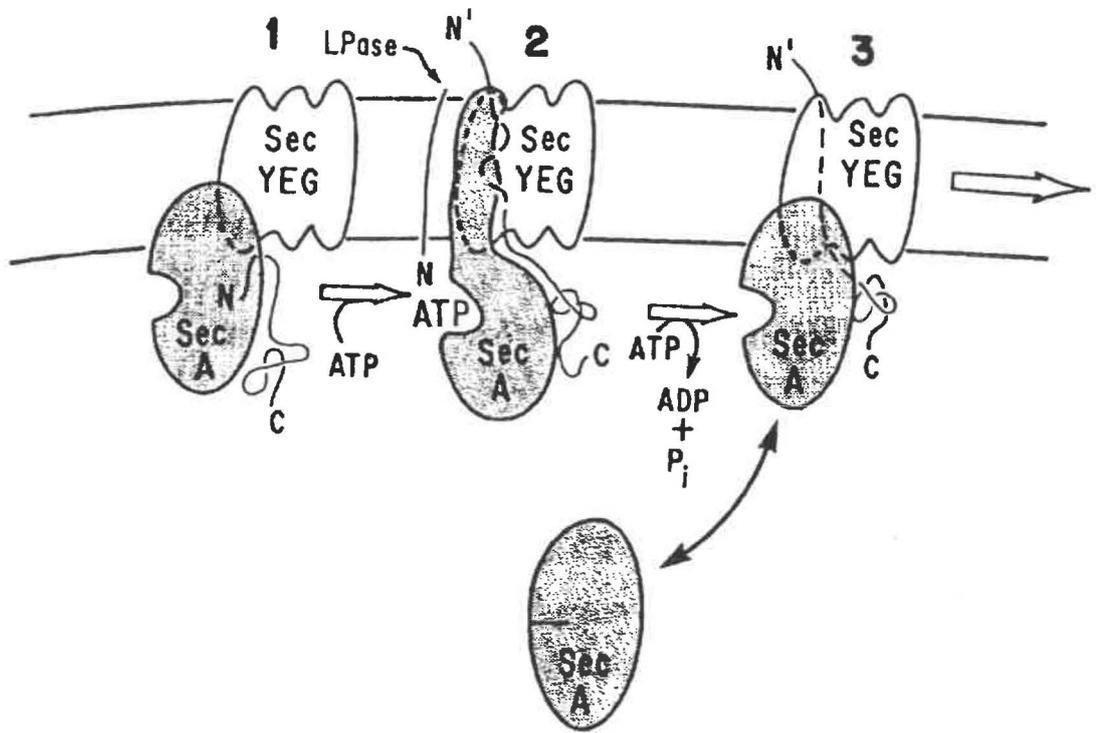
L'hydrolyse d'ATP à un premier site change la structure de SecA ce qui lui permet de s'insérer en partie dans la membrane (environ 30kDa) et d'entraîner à sa suite environ 20 à 30 a.a. de la pré-protéine (Anastasios et Mickner, 1994). L'association de SecA avec SecY/E/G permettrait la formation d'un canal actif de transport des protéines. Des études de digestion aux protéases ont révélé qu'une partie de SecA est exposée à la surface périplasmique de la membrane interne (Kim *et al.*, 1994). Le p.s. est retiré par la "leader peptidase" (LPase) ce qui expose la nouvelle extrémité N-terminale (N') du côté périplasmique de la membrane.

Étape III:

L'hydrolyse d'ATP en un second site de SecA lui permet de relâcher la pré-protéine et de se dégager de la membrane. La force motrice des protons pourrait participer à la translocation des protéines lorsque la pré-protéine n'est pas liée à SecA (Schiebel *et al.*, 1991). Les protéines SecD et SecF régleraient l'assemblage-désassemblage du canal en modulant les étapes d'insertion-désinsertion de SecA (Young *et al.*, 1994).

Figure 3: Cycles catalytiques de la sécrétion des protéines impliquant l'hydrolyse d'ATP.

De multiples cycles d'insertion/désinsertion de SecA dans la membrane peuvent catalyser la translocation complète de certaines pré-protéines (Anastassios et Wickner, 1994). Voir la section 2.2.12 pour plus de détails.



2.2.13 Maturation

Le terme maturation fait référence au clivage du p.s. de la pré-protéine ce qui la transforme en protéine mature. Le rôle premier du clivage du p.s. est de libérer les protéines de leur attache à la membrane pour qu'elles soient localisées adéquatement. Par exemple, le précurseur d'OmpA s'accumule dans la membrane cytoplasmique en absence d'activité de la "signal peptidase" alors que normalement il se retrouve dans l'espace périplasmique (Dalbey et Wickner, 1985). Dans la section 2.2.4 portant sur la protéine SecB, il a été rapporté que le p.s. retarde le repliement de la pré-protéine pour faciliter la formation d'un complexe avec SecB. Il est important de retirer le p.s. puisqu'en retardant le repliement, le p.s. augmente la sensibilité aux protéases (Randall *et al.*, 1987).

2.2.14 "Leader peptidase"

La "leader peptidase" (LepB), aussi appelée "signal peptidase I" est une protéase de 36 kDa (Wolfe *et al.*, 1982 et Wolfe *et al.*, 1983) localisée dans la membrane cytoplasmique qui reconnaît une séquence particulière d'a.a. appelée site de clivage située dans le domaine C du peptide signal (Pugsley, 1993) (voir aussi la section 2.4 portant sur le peptide signal). Puisque l'étape de maturation vient après la translocation (Dalbey et Wickner, 1985), le site catalytique de l'enzyme doit se retrouver du côté périplasmique de la membrane cytoplasmique.

2.2.15 Dégradation des p.s.

Normalement les p.s. sont rapidement dégradés par des peptidases membranaires présumément pour éviter les effets toxiques de leur accumulation dans la membrane (Pugsley, 1989). Puisque les p.s. commandent

l'ouverture des canaux, leur accumulation serait probablement mortelle pour la cellule en entraînant la perte d'électrolytes et la dissipation rapide du potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane (Simon et Blobel, 1992).

2.2.16 Autres mécanismes de sécrétion

Les premières études de sécrétion basées sur le précurseur de la protéine gpVIII des phages filamenteux, comme le phage M13, indiquaient que le transport de cette protéine à travers la membrane cytoplasmique pouvait apparemment se faire sans la participation d'autres facteurs. Cependant les pré-protéines qui ne dépendent pas de la participation d'autres protéines pour leur exportation (regroupées sous le terme Sec-indépendantes) sont en fait de rares exceptions. Généralement les protéines Sec-indépendantes impliquent tout de même la participation d'autres facteurs désignés sous le nom de transporteurs ABC (pour ATP-binding cassette) (Salmond et Reeves, 1993).

2.3 Sécrétion des protéines chez les bactéries Gram⁺

Certaines similitudes entre les composantes du système de sécrétion des bactéries Gram⁺ et des bactéries Gram⁻ laissent supposer qu'elles partagent le même mécanisme. Par exemple, il a été démontré que tous deux ont besoin d'ATP et de la force motrice des protons pour le transport des protéines. De plus, les structures de base des p.s. se ressemblent et certains homologues des protéines Sec d'*E. coli* ont été caractérisés (Simonen et Palva, 1993) chez les bactéries Gram⁺. Toutefois, en dépit de ces homologies certaines différences sont à souligner.

2.3.1 Le peptide signal

Les p.s. des bactéries Gram⁺ possèdent les trois mêmes domaines que les p.s. des bactéries Gram⁻. Par contre l'extrémité N-terminale des p.s. de bactéries Gram⁺ possède davantage de charges positives. Les p.s. sont aussi plus longs et les a.a. supplémentaires se répartissent dans les trois domaines des p.s. Cette différence de taille est assurément associée à des différences dans les composantes de la machinerie de sécrétion (Itoh *et al.*, 1990).

Les enzymes sécrétées par les streptomycètes possèdent parfois des p.s. particulièrement longs. Par exemple le p.s. de l'endoglycosidase de *S. plicatus* est constitué de 42 a.a. (Robbins *et al.*, 1984) et celui de la cellulase de *Streptomyces sp.* KSM-9 possède 70 a.a. (Nakai *et al.*, 1988). Ces p.s. auraient un quatrième domaine désigné sous le terme "Arg-cluster" (Park *et al.*, 1991). Cette région riche en arginine est située entre l'extrémité N-terminale du p.s. et la région hydrophobique. La délétion d'une partie des arginines de cette région conduit à une baisse de sécrétion et la délétion complète du domaine "Arg-cluster" abolit presque complètement la sécrétion. Comme le montre le tableau 3, il semblerait que ce domaine soit aussi présent dans le p.s. de certaines protéines de *S. lividans* comme l'acétyl xylane estérase (Shareck, communication personnelle), la β -galactosidase (Eckhardt *et al.*, 1987), ou les xylanases A et B (Shareck *et al.*, 1991).

2.3.2 Propeptides

Les protéines sécrétées chez *Bacillus* possèdent assez souvent une séquence d'a.a. située entre le p.s. et le domaine mature qui est éliminée de la protéine une fois qu'elle est exportée. Les protéines qui présentent cette structure appelée propeptide sont réparties en deux familles, selon que le propeptide est court ou long. Toutes les exoprotéases connues chez *Bacillus*

Tableau 3: Séquence en acides aminés de p.s. de protéines sécrétées chez les streptomycètes.

Protéines	Souches	Séquence en a.a. et site de clivages ^a	Taille	Réf ^b
α -Amylase	<i>S. thermoviolaceus</i>	MASRTLSGALALAAAATAVLA*A	21	1
Streptavidine	<i>S. avidinii</i>	MRKIVVAIAVSLTTVSITASASA_D	24	2
β -Lactamase	<i>S. cacaoi</i>	VACGQASGSESGQPGLGGCGTSA_H	24	3
β -Lactamase	<i>S. cacaoi</i>	MLHTRRRATLGAVAALSIVPVMACG*Q	26	4
Cellulase A	<i>S. lividans</i>	^d (MGFGSAPIALCRLRTRRNA)LKRLALLATGYSTYGLTALAGPPAQA_A	(46) 27	5
Protéase	<i>S. sp. C5</i>	MRMPLSVLTAAGLSLATLGLGTAGPASA*T	28	6
α -Amylase	<i>S. venezuelae</i>	MARKTVAAALALVAGAAVAVTGNAPAQA*V	28	7
α -Amylase	<i>S. limosus</i>	MARRLATASLAVLAAAATALTAPTAAA_A	28	8
α -Amylase	<i>S. griseus</i>	MARRLATASLAVLAAAATALTAPTAAA_A	28	9
DD-peptidase	<i>S. sp. K15</i>	VRLRRAAATVITITGALLAAGTILGATPATA_V	29	10
MelC1	<i>S. antibioticus</i>	MPELTRRRALGAAA VVAAGVPLVALPAARA*D	30	11
Chitinase	<i>S. plicatus</i>	MRFRHKAAAALAAATLALPLAGLVGLASPAQA*A	30	12
Tendamistat	<i>S. tendae</i>	MRVRLRLAALVGAGAALALSPLAAGPASA_D	30	13
α -Amylase	<i>S. hygroscopicus</i>	MQQRSRVLGGTLAGIVAAAAATVAPWPSQA_T	30	14
Agarase	<i>S. coelicolor</i>	MYNRRDLIKWSAYALGAGAGLAGPAPAAHA_A	30	15
SSI	<i>S. albogriseolus</i>	MRNTGAGPSPSVSRPPSAAPLSGAALAAPG_D	31	16
DD-peptidase	<i>S. sp. R61</i>	MVSGTVGRGTALGAVLLALLAVPAQAGTAAA_A	31	17
HaimII	<i>S. griseosporeus</i>	MKRYVCSTFVACVMVLCVIPASGAAAHEAVA*E	31	18
Protéinase	<i>S. griseus</i>	MKHFLRALKRCVAVATVAIAVVGLOPVTASA*A	32	19
LTI (STI-II)	<i>S. longisporus</i>	MRNTARWAATLALATATAYCGPLTGAALA*TRAAAP*A	28 34	20
Métalloprotéase	<i>S. cacaoi</i>	MPMFRIKLPKPAALIAAGGIGACIATVAVPSAYA*A	34	21
LEP-10 (STI-I)	<i>S. lividans</i>	MRNTARWAATLGLTATAVCGPLAGASLASPATAPA_S	35	22
Mannanase	<i>S. lividans</i>	^d (MLARHRRRH) MRNARSTLITTAGMAFAVLGILFALAGPSAGRAEA_A	(44) 35	23
Chitinase A	<i>S. lividans</i>	VDPVRRRSRGRRLGSLTGAVTAALALAFVAVGPASA_A	36	24
SapA protein	<i>S. coelicolor</i>	MKRSMQAVGATLTAVGAGGAGILLYTAPAAGAATAGAT_A	37	25
Lysozyme	<i>S. coelicolor</i>	MPATSSLARRGRPAVVLLGGLVLSASLALTLAPTA*AA	37	26
Protéase A	<i>S. griseus</i>	MTFKRFSPLSSTSRYARLLAVASGLVAAAAATPSAVA*A	38	27
Protéase B	<i>S. griseus</i>	MRIKRTSNRSNAARRVRTTAVLAGLAAVAALAVPTANA*E	38	28
β -Lactamase	<i>S. albus</i>	VHPSTSRPSRRILLTATAGAALAAATLVPGTAHASSGGR* ^c	39	29
Estérase	<i>S. scabies</i>	MSSAMRKTINSPPVYRRLTAAAYALGSCLALAGPAGSAGA_A	39	30
Chitosanase	<i>S. sp. N174</i>	MHSQHRTARIALAVVLTAPASLATAGVGYASTQASTAVK_A	40	31
Cellulase B	<i>S. lividans</i>	MRTLRPQARAPRGLLAALGAVLAAAFALVSSLVTAAPAAQA_D	40	33
Axe	<i>S. lividans</i>	MRTSTGPRASSRTLRLASGVAVTALAAAAGTVAAGAAPAQA*A	41	41
Xylanase B	<i>S. lividans</i>	MNLLVQPRRRRRGPVILLVRSAAVAALAAALMLPGTAQA_D	41	32
Xylanase A	<i>S. lividans</i>	MGSYALPRSGYRBSIRVLLALVYGYLGTATALLAPPQAAHA_A	41	34

EndoH	<i>S. plicatus</i>	MFTPVRRRVRTAALALSAAAALVLGSTAASGASATPSPAPAP_A	42	35
XP55	<i>S. lividans</i>	MTARRTRWTRRTDRSLPIRSAAAAVAFAGATACSAPTGGGGDGGT* ^c	46	36
Xylanase C	<i>S. lividans</i>	MQQDGTQQDRIKQSPAPLNGMSRRGFLGGAGTLALATASGLLLPGTAHA_A	49	37
Xylanase	<i>S. sp. 36A</i>	MNQDGKRYESEQNPPPSGLSRRGFLVGAGAGAAAAVAGSGLLLPGTAHA_A	50	38
β-Galactosidase	<i>S. lividans</i>	MPHSPYSPAESPAPQPRPRPVYSRRRLLEGGAAVLGAALASASPLTAQAAVRRAA_A	56	39
CMCase	<i>S. sp. KSM-9</i>	MENPRTTPTIPLRRRRSERRARGGRVLTALTGVTLTAGLAIAPAATGASPSAPPASPAP... ...SADSGTADA*G	70	40

^a "*" indique que le site de clivage a été déduit à partir de la séquence en a.a.; "_ " indique que le site de clivage a été confirmé par le séquençage du N-terminal de la protéine mature.

^b Références: 1) Bahri et Ward, 1993; 2) Argarana *et al.*, 1986; 3) Lenzini *et al.*, 1988; 4) Forsman *et al.*, 1989; 5) Théberge *et al.*, 1992; 6) Lampel *et al.*, 1992; 7) Virolle *et al.*, 1988; 8) Long *et al.*, 1987; 9) Vigal *et al.*, 1991a; 10) Palomeque-Messia *et al.*, 1991; 11) Bernan *et al.*, 1985; 12) Robbins *et al.*, 1992; 13) Koller et Riess 1989; 14) Hoshiko *et al.*, 1987; 15) Buttner *et al.*, 1987; 16) Obata *et al.*, 1989; 17) Duez *et al.*, 1987; 18) Nagaso *et al.*, 1988; 19) Kim *et al.*, 1991; 20) Strickler *et al.*, 1992; 21) Chang *et al.*, 1990; 22) Strickler *et al.*, 1992; 23) Arcand *et al.*, 1992; 24) Miyashita et Fujii 1993; 25) Guijarro *et al.*, 1988; 26) Birr *et al.*, 1989; 27) et 28) Henderson *et al.*, 1987; 29) Dehottay *et al.*, 1987; 30) Raymer *et al.*, 1990; 31) Masson, J.-Y., Denis, F., et Brzezinski, R. 1994 (GenBank accession No. L07779); 32) Shareck *et al.*, 1991; 33) Wittmann *et al.*, 1994; 34) Shareck *et al.*, 1991; 35) Robbins *et al.*, 1984; 36) Burnett *et al.*, 1987; 37) Shareck *et al.*, 1991; 38) Nagashima *et al.*, 1989; 39) Eckhardt *et al.*, 1987; 40) Nakai *et al.*, 1988; 41) Shareck, communications personnelles.

^c Indique que la protéine mature possède plusieurs N-terminaux possibles.

^d Le p.s. de la Cellulase A (27 a.a) débute par une leucine et celui de la Mannanase (35 a.a.) par une méthionine. Pour ces deux p.s., une méthionine en amont du codon d'initiation suggéré pourrait servir de deuxième codon d'initiation mais aucun site de fixation des ribosomes est associé à cette deuxième méthionine. La séquence entre parenthèse représente la portion additionnelle des p.s. de ces enzymes débutant par la deuxième méthionine.

sont d'abord synthétisées en pré-proprotéines portant à la fois un p.s. et un long propeptide dont la taille varie entre 58 et 204 a.a. (Simonen et Palva, 1993). Plusieurs rôles ont été proposés pour les propeptides. Certaines études suggèrent que les propeptides pourraient empêcher que les protéases ne deviennent actives avant qu'elles ne soient sécrétées évitant ainsi qu'elles ne dégradent les protéines intracellulaires ou celles qui participent à leur sécrétion (Wandersman, 1989; Vasantha *et al.*, 1984). Les propeptides pourraient également ancrer temporairement les proprotéases à la membrane via des interactions électrostatiques (Wandersman, 1989). D'autres travaux démontrent que le propeptide participerait au repliement et à l'activation de la protéase. Par exemple la sécrétion de la subtilisine de *Bacillus* chez *E. coli* avec ou sans propeptide n'est pas affectée ce qui suggère qu'il ne joue pas de rôle actif dans la sécrétion. Mais sans son propeptide, l'enzyme reste inactive ce qui supporte l'idée qu'elle est impliquée dans le repliement et l'activation de la protéase (Ikemura *et al.*, 1987).

La famille des propeptides courts regroupe les exoprotéines qui n'ont que quelques a.a. entre le p.s. et la protéine mature. Par exemple, la RNase de *B. amyloliquefaciens* possède un p.s. de 26 a.a. et un propeptide de 13 a.a. (Paddon *et al.*, 1989). *B. subtilis* sécrète une α -amylase avec un p.s. de 33 a.a. et un propeptide de 8 a.a. (Takase *et al.*, 1988) et la β -Lactamase de *B. licheniformis* porte un p.s. de 26 a.a. et un propeptide de 16 a.a. (Imanaka *et al.*, 1983). Aucune fonction ne leur est associée pour l'instant. Aucune protéase spécifique n'a été identifiée pour la dégradation de ces propeptides. Il est généralement admis qu'ils seraient coupés par des protéases non spécifiques (Simonen et Palva, 1993).

2.3.3 Chaperons, protéines Sec et signal peptidase chez les Gram⁺

Malgré les efforts, aucun homologue de SecB (le principal chaperon chez *E. coli*) n'a été trouvé à ce jour chez les bactéries Gram⁺. Toutefois, les protéines GroEL, GroES et DnaK ont été rapportées chez *Bacillus* (Simonen et Palva, 1993). Rappelons que ces protéines cytoplasmiques facilitent la sécrétion de certaines protéines et servent aussi de chaperons lors de choc thermique. Le gène de la protéine SecA qui joue un rôle central dans la sécrétion a été cloné chez *Bacillus* et la protéine présente 50% d'homologie avec SecA d'*E. coli* (Landry et Gierasch, 1991). De même les gènes correspondant à SecY et SecE d'*E. coli* ont été clonés à partir de *B. subtilis* (Nakamura *et al.*, 1990). L'homologie de séquence de SecY de *Bacillus* avec SecY d'*E. coli* est de 40% et peut atteindre 80% dans certaines parties de la protéine. La protéine SecE de *B. subtilis* ne possède qu'un seul segment transmembranaire comparativement à celui d'*E. coli* qui en possède trois (Ito, 1992). En fait la séquence de cette protéine de 59 a.a. correspondrait au domaine C-terminal de SecE d'*E. coli* (Jeong *et al.*, 1993) qui est suffisant pour son activité (Nishiyama, 1992). Il a été démontré que ces gènes pouvaient compléter dans une certaine mesure des souches d'*E. coli* rendues thermosensibles à la suite de mutations dans le gène de SecE (Jeong *et al.*, 1993).

Jusqu'à présent la littérature rapporte quelques gènes dont les produits sont reliés à la voie de sécrétion des protéines Sec chez les streptomycètes. Pour les chaperons on retrouve d'une part un homologue à la protéine GroEL cloné chez *S. albus* (Mazodier *et al.*, 1991) et d'autre part un homologue à la protéine DnaK cloné chez *S. coelicolor* (Bucca, 1993). SecE a été cloné chez *S. griseus* et *S. virginiae* (Miyake *et al.*, 1994). Leurs séquences correspondent au domaine C-terminal de SecE d'*E. coli*. Enfin, les gènes des protéines SecA

(Gilbert *et al.*, 1994) et SecY (Ostiguy, communications personnelles) de *S. lividans* sont actuellement clonés et en cours de caractérisation.

Un gène de "signal peptidase" de *B. subtilis* a été cloné. La protéine appelée SipS correspond à une petite protéine de 184 a.a. qui diffère de celle d'*E. coli* à la fois par sa taille et par sa structure primaire. Toutefois, certaines séquences en a.a. sont conservées entre la protéine SipS de *Bacillus* et les "signal peptidases" des bactéries Gram⁻. La protéine SipS n'est pas essentielle au développement de *Bacillus* et la maturation des protéines peut quand même avoir lieu en son absence. Ceci suggère que *Bacillus* possède plus d'une "signal peptidase". (van Dijl *et al.*, 1992) ou que la protéine isolée n'est pas la véritable "signal peptidase".

Certaines protéines clonées chez *Bacillus* ne présentent aucune homologie de séquence avec les protéines d'*E. coli* mais ont de fortes similitudes fonctionnelles. Ainsi la lipoprotéine PrsA serait requise pour le repliement des protéines sécrétées et probablement aussi pour leur libération de la membrane cytoplasmique. Cette observation est interprétée comme une homologie de fonction avec les protéines SecD et SecF d'*E. coli* (Kontinen *et al.*, 1991).

2.4 Revue détaillée sur les p.s.

Plusieurs fonctions ont été proposées pour le p.s. Par exemple il pourrait aider à maintenir la pré-protéine dans une conformation dépliée (Park *et al.*, 1988) pour favoriser sa liaison avec SecB (Altman *et al.*, 1990a; Altman *et al.*, 1990b). Il serait aussi impliqué directement dans les liaisons de la pré-protéine avec SecA (Fikes et Bassford, 1989; Puziss *et al.*, 1989) et dans l'insertion de la pré-protéine à l'intérieur de la membrane pour amorcer sa translocation (Jones *et al.*, 1990). Enfin, il permettrait les interactions de la pré-

protéine avec diverses composantes de la machinerie de sécrétion comme SecY et SecE (Emr *et al.*, 1981; Stader *et al.*, 1989).

Les sections suivantes traitent exclusivement des principaux travaux qui ont conduit à une meilleure compréhension de la fonction du p.s. Il sera question des trois différents domaines du p.s., de ses interactions avec les autres composantes du système de sécrétion et d'expériences diverses comme les échanges entre p.s. ou l'amélioration des p.s. pour une meilleure sécrétion des protéines.

2.4.1 Domaine N du p.s.

La nécessité d'une charge positive à l'extrémité N-terminale du p.s. est connue depuis une dizaine d'années (von Heijne, 1985). Chez *E. coli*, une protéine membranaire a été sécrétée efficacement suite à l'ajout de quatre résidus lysines à son extrémité N-terminale. En effet, le domaine transmembranaire (donc hydrophobe) de la protéine a été converti en p.s. puisqu'il est situé du côté N-terminal de la protéine (von Heijne, 1989). Cette expérience démontre qu'une charge positive suivie d'un domaine hydrophobe sont nécessaires et suffisants pour la constitution des p.s. lorsqu'ils sont à l'extrémité N-terminale des protéines.

La taille et la charge du domaine N d'*E. coli* diffèrent de celles de *Bacillus*. En moyenne, *E. coli* possède pour ce domaine 5,5 résidus au lieu de 7 chez *Bacillus* et les charges moyennes sont respectivement +2,0 et +3,0 (von Heijne et Abrahmsén, 1989). La diminution de la polarité positive du domaine N des p.s. produit généralement peu d'effets chez *E. coli*. Par exemple, les protéines mutantes dont la charge positive nette de l'extrémité N-terminale est nulle sont exportées relativement efficacement par *E. coli* et parfois même aussi bien que les protéines sauvages. Par contre la présence d'une charge

négative à cette extrémité réduit sévèrement l'efficacité du transport des protéines (Puziss *et al.*, 1989). Des travaux comparatifs entre *Bacillus* et *E. coli* ont démontré que les charges positives de l'extrémité N-terminale des p.s. jouent un rôle plus important chez *Bacillus* que chez *E. coli*. Par exemple, si deux des trois charges positives du p.s. de la levansucrase de *Bacillus* sont éliminées, la maturation est plus lente qu'avec le p.s. sauvage. Le ralentissement de maturation est plus important chez *Bacillus* et l'élimination de toutes les charges positives peut causer même la dégradation de la protéine (Borchert et Nagarajan, 1990). Récemment il a été rapporté que la sécrétion de la cellulase de *Streptomyces sp.* KSM-9 et de l'estérase de *S. scabies* sont dramatiquement affectées en éliminant les a.a. chargés positivement situés dans le domaine N de leur p.s. (Park *et al.*, 1991; Schottel *et al.*, 1993). Ceci tend à démontrer que la présence d'une forte polarité positive à l'extrémité N-terminale des p.s. serait un caractère commun à toutes les bactéries Gram⁺.

La région N du p.s. des streptomycètes se distingue par sa taille particulièrement longue (12 a.a. en moyenne), par sa charge (+3,5 en moyenne) et surtout par l'utilisation particulière de certains a.a. polaires. Ces derniers sont représentés à 35% par des résidus arginine et par 3% de résidus lysine. Chez les autres bactéries, cette région est constituée en moyenne de seulement 10% d'arginine pour 35% de lysine (von Heijne et Abrahmsén, 1989). En fait, ces auteurs ont démontré que plus la composition en arginine est élevée, plus le domaine N tend à être long et fortement chargé positivement, ce qui est souvent le cas pour les p.s. des streptomycètes. Finalement les p.s. des bactéries autres que les streptomycètes possèdent rarement un domaine N totalement dépourvu de résidus lysine (von Heijne et Abrahmsén, 1989).

2.4.2 Domaine H du p.s.

L'expérience de von Heijne décrite précédemment et qui consiste à ajouter une charge positive à l'extrémité N-terminale d'un domaine transmembranaire pour le transformer en p.s. montre aussi l'importance fondamentale du domaine H des p.s. L'une des caractéristiques essentielles de ce domaine est sa propension à adopter une structure secondaire de type hélice α , et ce particulièrement dans un environnement membranaire (Kendall *et al.*, 1986; Rusch *et al.*, 1994). L'hydrophobicité du domaine H semble être un caractère dominant pour le maintien des fonctions du p.s. Par exemple, l'addition d'une charge négative dans le domaine hydrophobe de la levansucrase abolit complètement la sécrétion de cette protéine aussi bien chez *Bacillus* que chez *E. coli* (Borchert et Nagarajan, 1990). Afin de vérifier si l'hydrophobicité du centre du p.s. est la caractéristique la plus importante de ce domaine, Kendall *et al.* (1986) ont remplacé tous les a.a. du domaine H du p.s. de la phosphatase alcaline d'*E. coli* par une suite de résidus hydrophobes comme la leucine. La sécrétion presque normale de la protéine mutante chez *E. coli* tend à confirmer que le domaine H du p.s. doit essentiellement être hydrophobe. Une autre étude a démontré que la séquence des a.a. du domaine H jouerait aussi un rôle très important en modulant le niveau d'hydrophobicité de cette région. Ainsi, le remplacement des a.a. du domaine H du p.s. de la phosphatase alcaline uniquement par des résidus alanine (qui sont hydrophobes) ou leucine (qui sont plus hydrophobes que les alanine) conduit à la formation d'un p.s. fonctionnel mais peu efficace (Doud *et al.*, 1993). Les rapports alanine:leucine de 6:4 et 5:5 produisent les p.s. les plus efficaces ce qui indique que le niveau d'hydrophobicité doit être maintenu dans des limites assez étroites (Rusch *et al.*, 1994).

La taille du domaine H serait un autre paramètre important du p.s. Ainsi, le raccourcissement graduel du domaine hydrophobe du p.s. de la levansucrase ralentit sa maturation et à la limite empêche sa sécrétion (Borchert et Nagarajan, 1990). Des résultats semblables sont obtenus lorsque la protéine est exprimée chez *B. subtilis* ou chez *E. coli*. Des expériences similaires ont été effectuées chez les streptomycètes. Par exemple, il a été démontré que la sécrétion de la cellulase de *Streptomyces sp.* KSM-9 et de l'estérase de *S. scabies* sont dramatiquement affectées en retirant quelques a.a. hydrophobes dans le domaine H de leurs p.s. (Park *et al.*, 1991; Schottel *et al.*, 1993). Les tentatives d'amélioration de la sécrétion en augmentant la taille du domaine H ont été peu fructueuses jusqu'à présent. Par exemple, l'insertion de trois résidus apolaires (Leu-Val-Ile) au centre du domaine H de l' α -amylase de *S. griseus* ont réduit le niveau d'expression de la protéine chez *S. lividans* (Vigal *et al.*, 1991b)

2.4.3 Domaine C, site de clivage et maturation

Comme il a été décrit plus tôt dans cette revue de littérature, le domaine C débute en positions -8 à -5 par une proline ou une glycine qui induit une rupture dans l'hélice α du domaine H, exposant les a.a. du site de reconnaissance de la "signal peptidase" aux positions -3 et -1 (Koshland *et al.*, 1982). Une série de mutations dans le domaine C du p.s. de la levansucrase ont révélé que la "signal peptidase" de *B. subtilis* semble préférer les petits a.a. neutres en positions -1 et -3 du p.s. (Borchert et Nagarajan, 1990).

D'autre part l'étude de la maturation des protéines est particulièrement compliquée puisqu'il s'agit d'un processus extrêmement rapide. La construction d'une souche produisant très peu de "signal peptidase" a conduit à l'accumulation de précurseurs protéiques en transition. En ajoutant

des protéases du côté périplasmique de la membrane, Dalbey et Wickner (1985) ont démontré que les protéines traversent la membrane avant d'être matures. En effet, ces auteurs rapportent que les précurseurs accumulés dans la membrane sont sensibles à l'action des protéases du côté périplasmique. Plusieurs autres travaux renforcent l'idée que la maturation n'est pas requise pour la translocation. Par exemple, certaines mutations abolissent le site de reconnaissance de la "signal peptidase" sans entraver la translocation de la protéine (Koshland *et al.*, 1982; Kuhn et Wickner, 1985).

Malgré que la maturation des pré-protéines ne soit pas nécessaire à leur translocation, son absence conduit à l'accumulation des précurseurs dans la membrane. Les précurseurs non matures occupent alors les sites de sécrétion de la membrane ce qui entrave le passage d'autres protéines. La démonstration en a été faite en exprimant un gène d'une protéine MalE délété des 20 derniers a.a. de son p.s. et des 89 premiers a.a. de son domaine mature. La protéine mutante s'accumule dans la membrane et des tests de "pulse-chase" ont révélé une interférence sur l'exportation et la maturation des précurseurs des protéines OmpA et MalE sauvages *in vivo* (Collier *et al.*, 1988).

L'absence de maturation de certaines protéines n'affecte toutefois pas leur activité. Par exemple, la pré-phosphatase alcaline synthétisée *in vitro* se dimérise pour former une protéine active (Inouye et Berckwith, 1977). De même la "pré-maltose-binding protein" synthétisée *in vitro* (Ferenci et Randall, 1979) ou *in vivo* (Ito, 1982) possède de l'activité même en absence de maturation. En effet, la protéine peut se lier à l'amylose lors d'une chromatographie par affinité. D'autre part il a été rapporté qu'une mutation au niveau du p.s. de l'estérase de *S. scabies* abolit à la fois sa maturation, sa sécrétion et son activité lorsqu'elle est exprimée chez *S. lividans* (Hale *et al.*,

1992). Ceci a été démontré par des analyses de type "western" qui ont révélé la présence d'une protéine intra-cellulaire de 38 kDa correspondant à la protéine mutante avec son p.s. bien qu'aucune activité n'ait été détectée.

Finalement, la maturation peut avoir lieu à plusieurs endroits et il n'est pas toujours possible d'identifier le site de clivage à partir de la séquence en acides aminés de certaines pré-protéines (Gilbert *et al.*, sous presse). Par exemple, la protéine XP55 de *S. lividans* (Burnett *et al.*, 1987), la β -lactamase de *S. albus* (Dehottay *et al.*, 1987) ou l'inhibiteur de la subtilisine (SSI) de *S. albogriseolus* (Obata *et al.*, 1989) ne sont pas coupées en un seul endroit chez les streptomycètes.

2.4.4 Interactions du p.s. avec SecB et SecA

Certaines expériences indiquent que SecB interagit plutôt avec le domaine mature des pré-protéines. Par exemple, Gannon *et al.* (1989) ont procédé à des échanges de p.s. entre deux pré-protéines, l'une fortement dépendante de SecB et l'autre ayant peu d'affinité pour SecB. Puisqu'aucun changement d'affinité pour SecB n'a été enregistré, les auteurs ont conclu que le p.s. n'interagit pas directement avec ce chaperon. D'autres études ont confirmé *in vitro* que SecB s'associe avec le domaine mature des précurseurs. Entre autres, des études de sensibilité des précurseurs à la protéinase K ont démontré que SecB se lie à des sites flexibles et chargés positivement du domaine mature de la pré-protéine et qu'elle recouvre des portions d'environ 15 a.a. (Topping et Randall, 1994). Conformément à ce scénario, il a été rapporté que les p.s. de la "pré-maltose-binding protein" et de la pré- β -lactamase retardent le repliement du domaine mature de ces pré-protéines. Le délai de repliement serait crucial pour les interactions avec SecB (Park *et al.*, 1988; Laminet et Plückthun, 1989).

Néanmoins, le concept que SecB n'interagit pas avec le p.s. ne fait pas l'unanimité comme le montrent les deux exemples suivants. Watanabe et Blobel (1989) ont observé que SecB se lie à la "pré-maltose-binding protein", et non à une forme mutante, dépourvue d'une grande partie de son p.s. Ils interprètent ces résultats comme étant une indication que SecB se lie directement au p.s. Par contre à la même époque, Collier et Bassford (1989) montrent qu'une diminution de l'hydrophobicité du p.s. de la "pré-maltose-binding protein" se traduit par une augmentation de sa dépendance envers SecB. L'interprétation de ces résultats serait que plus le p.s. est hydrophobe, plus il augmente les chances d'un arrimage précoce de la pré-protéine à la membrane et donc plus il facilite son exportation. La relation entre SecB et le p.s. ne serait alors qu'indirecte. De plus, à ce jour il n'y a pas d'évidences que le domaine H du p.s. interagit directement avec les composantes de la voie de sécrétion (Rusch *et al.*, 1994).

D'autre part, il a été clairement établi que SecA se lie directement avec le p.s. des pré-protéines. Ainsi en formant une liaison avec le p.s., SecA devient apte à hydrolyser l'ATP (Young *et al.*, 1994). Il a été démontré aussi que les charges positives à l'extrémité N-terminale du p.s sont essentielles à sa liaison avec SecA (Cunningham et Wickner, 1989; Fikes et Bassford 1989). Ainsi, il est possible que la charge nette plus importante dans le domaine N des bactéries Gram⁺ soit reliée à des caractéristiques particulières de SecA chez ces microorganismes.

2.4.5 Liaison des p.s. avec des récepteurs membranaires

En surchargeant le système de sécrétion d'*E. coli* avec des p.s. d'origine synthétique, il a été possible d'observer une inhibition de la translocation de la ProOmpA et du précurseur de la phosphatase alcaline. Dans un premier

temps l'expérience consistait à ajouter un p.s. synthétique correspondant à la séquence du p.s. de LamB à des vésicules membranaires d'*E. coli*. À partir d'une concentration de 1 μ mole, les auteurs ont observé *in vitro* une inhibition de la translocation de la ProOmpA et du précurseur de la phosphatase alcaline (Chen *et al.*, 1987). Dans un deuxième temps, l'ajout d'un p.s. synthétique correspondant à celui d'une protéine LamB qui n'est pas sécrétée en raison d'une mutation au niveau de son p.s., n'a pas causé d'inhibition de la translocation de la ProOmpA et du précurseur de la phosphatase alcaline. Les auteurs en tirent l'interprétation que le p.s. interagit de façon spécifique avec certains récepteurs (Chen *et al.*, 1987). Plus récemment, il a été publié que la protéine SecE est requise avant SecY dans le processus de translocation ce qui en ferait une meilleure candidate comme récepteur pour p.s. que SecY seule (Bieker et Silhavy, 1990).

La liaison du p.s. avec un récepteur membranaire induit l'ouverture de canaux spécifiques. Ainsi, dans une expérience *in vitro* avec des vésicules formées de membranes d'*E. coli*, l'ajout du p.s. synthétique de LamB du côté cytoplasmique provoque le passage d'un flot d'ions au travers des membranes (Simon et Blobel, 1992). La mesure de la différence de potentiel qui résulte du mouvement des ions indique que les pores membranaires ouverts par l'action du p.s. laissent passer trois fois plus d'ions que les canaux à potassium normalement présent chez *E. coli*. Les auteurs en déduisent que ces pores pourraient permettre le passage de molécules de la taille d'un peptide (Simon et Blobel, 1992).

2.4.6 Interaction des p.s. avec les lipides membranaires

Toujours dans l'optique d'étudier les interactions à l'aide de peptides synthétiques, il a été possible de démontrer expérimentalement que les p.s. se

lient aux lipides membranaires durant la sécrétion. Au cours d'une expérience, trois peptides différents ont été synthétisés. Le premier possédait la même séquence que le centre hydrophobe du p.s. de la protéine LamB sauvage, le deuxième possédait la séquence du centre hydrophobe d'un p.s. mutant de LamB qui ne conduit pas à la sécrétion de la protéine et le troisième présentait la séquence d'un pseudo-révertant (Briggs et Gierasch, 1984). Il a été possible d'établir une corrélation entre la capacité de ces p.s. à promouvoir le transport de la protéine LamB *in vivo* et leur capacité à se lier aux phospholipides *in vitro* (Briggs *et al.* 1985). En d'autres termes, plus le p.s. de LamB est efficace pour la sécrétion *in vivo*, plus son équivalent synthétique s'associe étroitement aux phospholipides *in vitro*.

Des études de dichroïsme circulaire ont démontré que le p.s. sauvage passe d'un état désordonné en solution aqueuse à une structure β lorsqu'il s'associe électrostatiquement à la surface d'une simple couche de phospholipides et adopte une conformation en hélice α lors de son insertion dans les lipides (Brigg *et al.*, 1986). Lorsque le précurseur entre en contact avec la membrane durant le transport *in vivo*, le p.s. s'associe directement avec la double couche lipidique et les changements de conformation observés pourraient jouer un rôle (Brigg *et al.*, 1986). Certains travaux démontrent que les p.s. interagissent plus fortement avec les membranes riches en phospholipides acides. Les interactions électrostatiques impliquant le domaine N du p.s. seraient à la base de ces observations puisqu'il est chargé positivement (Kusters *et al.*, 1991).

L'hydrophobicité du domaine H est essentielle à une sécrétion efficace des pré-protéines mais sert aussi à l'insertion des p.s. dans les membranes. Hoyt et Gierasch (1991) ont observé qu'un peptide synthétique dont la séquence correspond à celle du p.s. de OmpA mais dont l'un des a.a.

hydrophobes du domaine H a été remplacé par une asparagine (un a.a. neutre) ne peut plus s'intégrer à une membrane, contrairement à un peptide dont la séquence correspond à celle de la protéine sauvage. De plus, une pré-OmpA dont le p.s. comporte cette même mutation n'est pas sécrétée *in vivo*.

2.4.7 Échanges de p.s.

Les p.s. des eucaryotes possèdent une structure divisée en trois domaines tout comme les p.s. des procaryotes mais ils comportent aussi quelques divergences, surtout au niveau du domaine H (Pugsley, 1993). En dépit de ces différences, le fait que la machinerie de sécrétion des bactéries puisse exporter et maturer les protéines d'eucaryotes et que la machinerie des eucaryotes puisse de la même façon exporter et maturer des protéines bactériennes (Fecyez et Blobel, 1987) semble démontrer la conservation des mécanismes sécrétoires au cours de l'évolution. Il faut néanmoins garder à l'esprit que des différences importantes sont observées entre les p.s. de plusieurs grands groupes bactériens. C'est ainsi que la taille moyenne des p.s. de *S. lividans* (35 a.a.) est supérieure à celle des p.s. des autres bactéries Gram⁺ en général (30 a.a. en moyenne) qui sont eux-même plus longs que ceux d'*E. coli* (24 à 25 a.a. en moyenne) (Engels et Koller, 1992).

Les différences de tailles et de charges (décrites précédemment) pourraient expliquer certaines incompatibilités entre les p.s. de bactéries Gram⁻ et Gram⁺ (Wang *et al.*, 1993). Par exemple les protéines extra-cellulaires de bactéries Gram⁻ ne sont généralement pas sécrétées chez *B. subtilis* si leur p.s. original est conservé (Mountain, 1989; Behnke, 1992; Zappe *et al.*, 1992). Toutefois, les protéines extra-cellulaires de bactéries Gram⁺ peuvent être sécrétées dans le milieu de culture sans modification de leur p.s. lorsqu'elles sont exprimées chez *E. coli* (Lo *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1990).

Les critères de combinaison optimale entre un p.s. et une protéine sont fort peu documentés. Ainsi une protéine donnée peut être exportée efficacement avec un p.s. et pas du tout avec un autre (Nakamura *et al.*, 1989). La stratégie actuelle lors de la production de protéines homologues consiste à laisser à la protéine son propre p.s. Pour la sécrétion de protéines hétérologues, il est généralement préférable de fusionner le gène d'intérêt avec les séquences régulatrices et le p.s. du gène d'une protéine homologue connue pour être sécrétée en abondance (Gilbert *et al.*, sous presse).

2.4.8 Expression de protéines hétérologues chez les streptomycètes et rôles du p.s.

Les premiers essais d'expression de protéines hétérologues comme l'hormone de croissance bovine, l'interleukine-2 humaine ou l'interféron α -2 chez *S. lividans* ont été peu fructueux puisque ces protéines restaient au niveau intracellulaire (Gray *et al.*, 1984; Muñoz *et al.*, 1985; Pulido *et al.*, 1986). Pour l'expression de protéines hétérologues chez les streptomycètes l'utilisation du p.s. de protéines normalement sécrétées par la bactérie a permis de récupérer les protéines d'intérêt dans le milieu de culture. Toutefois ce type de construction conduit parfois à une certaine hétérogénéité du N-terminal de la protéine sécrétée. Les cas de l'expression de l'interleukine 1- β et de la galactokinase d'*E. coli* (Lichenstein *et al.*, 1988) ou d'une phosphotriestérase (Rowland *et al.*, 1992) chez *S. lividans* illustrent bien cette problématique.

Les variations dans la maturation peuvent être néfastes pour l'activité de certaines protéines. Il est possible d'améliorer la précision de la maturation en optimisant la séquence qui entoure la jonction entre le p.s. et la protéine hétérologue. Par exemple le récepteur CD4 des lymphocytes-T possède deux

arginines à son extrémité N-terminale qui sont importantes pour son activité. Toutefois ces charges positives interfèrent avec le processus de maturation et la protéine mature présente une certaine hétérogénéité au niveau du N-terminal. Pour contourner ce problème, divers peptides ont été introduits entre le p.s. et la protéine d'intérêt dans le but d'améliorer l'uniformité de la coupure de la "signal peptidase" (Fornwald *et al.*, 1993). Selon cette étude, les meilleures productions ont été obtenues avec l'insertion d'une thréonine ou du peptide Thr-Pro-Ala-Ala entre le p.s. et la protéine CD4.

2.4.9 Autres types de peptides signaux et de "signal peptidase"

Deux autres familles de protéines, les pillines et les lipoprotéines sont Sec-dépendantes. Cependant elles possèdent des p.s. particuliers qui sont coupés par deux "signal peptidases" spécifiques (Pugsley 1993).

Par convention, le p.s. des pré-pillines de type IV est considéré comme n'ayant pas de domaine C puisqu'il est coupé entre les domaines N et H, bien que les résidus typiquement retrouvés dans la région C des autres p.s. soient souvent présents à la fin du domaine N. La "signal peptidase" qui coupe ces p.s. est appelée pré-pillin peptidase (Ppp).

Le p.s. des lipoprotéines est généralement plus court et contient un plus grand nombre d'a.a. hydrophobes dans la région H. Le site de clivage est aussi moins bien caractérisé que pour les p.s. standards. La "signal peptidase" qui coupe ces p.s. est appelée "lipoprotéine signal peptidase" (LspA). Elle est aussi appelée "prolipoprotéine signal peptidase" ou "signal peptidase" II. Les p.s. des lipoprotéines des bactéries Gram⁺ présentent beaucoup de similitudes avec ceux des Gram⁻ non seulement dans l'organisation générale du p.s. mais aussi dans la conservation de la séquence de reconnaissance de cette "signal peptidase" (LeuAlaGly ↓ Cys) (von Heijne, 1989).

2.4.10 Cas particulier chez les streptomycètes

Dans le passé, certaines observations ont provoqué toute une controverse sur les mécanismes de sécrétion chez les streptomycètes puisque la tyrosinase ne possède pas de p.s. mais se retrouve abondamment dans le milieu de culture. La croyance à l'époque était que chez les streptomycètes le p.s. n'est pas nécessaire à la sécrétion des protéines. En combinant cette observation au fait que les streptomycètes sont de grands sécréteurs d'enzymes, il était tentant de supposer l'existence d'un mécanisme original de sécrétion. Les gènes responsables de la synthèse de la tyrosinase chez *S. antibioticus* sont localisés dans un opéron polycistronique appelé *melC* (Katz *et al.* 1983) qui porte les gènes *melC1* et *melC2*. Il a finalement été démontré que le p.s. nécessaire à la sécrétion de la tyrosinase (MelC2) est porté par la protéine MelC1. La sécrétion de MelC2 passe par la formation d'un complexe avec la protéine MelC1 et il a été confirmé par mutagénèse que le p.s. de MelC1 est essentiel pour la sécrétion de la tyrosinase (Chen *et al.*, 1992).

2.4.11 Éléments additionnels sur la sécrétion des protéines

Une revue sur la sécrétion ne saurait être complète sans mentionner certains aspects encore obscurs de la sécrétion des protéines. Il est par exemple intrigant d'observer qu'en retirant complètement le p.s. de la "maltose-binding protein" et de la phosphatase alcaline, ces protéines sont sécrétées à un niveau fortement réduit mais détectable (Derman *et al.*, 1993). De plus, dans la souche *prlA4* (une souche mutante pour SecY), la phosphatase alcaline, la "maltose-binding protein" et la protéine LamB, toutes dépourvues de leur p.s. peuvent être sécrétées à ~ 30% de leur niveau normal (Bowden *et al.*, 1992; Derman *et al.*, 1993; Flower *et al.*, 1994).

Comment une cellule pourrait-elle distinguer une protéine cytoplasmique d'une protéine dépourvue de son p.s.? Derman et ses collaborateurs (1993) ont suggéré que la vitesse de repliement des protéines dans le cytoplasme est cruciale à ce niveau. Selon eux les protéines cytoplasmiques se replient rapidement, échappant ainsi à la reconnaissance de SecB alors que les protéines normalement sécrétées se replieraient plus lentement, même en l'absence de leur p.s. (Derman *et al.*, 1993). Cette hypothèse est attrayante car tel que mentionné précédemment, SecB reconnaît les protéines non repliées et en vertu de son affinité pour SecA, elle pourrait les diriger vers la machinerie de sécrétion (Flower *et al.*, 1994).

Il reste donc encore beaucoup d'études à faire avant de comprendre parfaitement le phénomène de la sécrétion chez les bactéries. Toutefois, jusqu'à présent il a été démontré qu'il est possible d'améliorer le niveau de sécrétion des protéines en modifiant le p.s. Par exemple, une mutation remplaçant une alanine par une arginine à l'extrémité N-terminale du p.s. de l' α -amylase de *S. griseus* a augmenté de 2 à 3 fois la sécrétion de cette protéine chez *S. lividans* (Vigal *et al.*, 1991b). Une nouvelle approche conduisant à l'optimisation des p.s. pour la sécrétion serait de comparer l'aptitude de différents p.s. à promouvoir la sécrétion d'une protéine donnée. Les sections qui suivent présentent les résultats de cette démarche et les stratégies employées pour y arriver.

3- Méthodologie

3.1 Souches bactériennes

3.1.1 *Escherichia coli*

La souche *E. coli* CJ236 *dut*₁ (-), *ung*₁ (-), *thi* - 1, *rel* A-1; pCJ 105(Cm^r) (selon Sambrook *et al.*, 1989) vendue par Bio-Rad Laboratories Ltd (Mississauga, Ontario, Canada) a été utilisée pour la production d'ADN simple brin contenant des uraciles. La mutation *dut*₁ (-) résulte en l'absence de l'enzyme dUTPase ce qui cause une élévation de la concentration en dUTP qui entrent alors en compétition avec les dTTP pour l'incorporation dans l'ADN. La mutation *ung*₁ (-) est une absence d'enzyme "uracil N-glycosilase" qui retire les uraciles de l'ADN. L'ADN simple brin a servi de matrice pour la synthèse du brin complémentaire à partir d'un oligonucléotide portant la mutation désirée lors de la mutagenèse dirigée (Kunkel, 1985) (voir section 3.10).

La souche MV1190 qui est $\Delta(lac-pro AB)$, *thi*, *sup* E, $\Delta(srl - rec A)$ 306::Tn10(tet^r)[F':*tra* D36, *pro* AB, *lac* IQZDM15], a été utilisée pour l'analyse des mutants. N'étant pas *ung*₁ (-), cette souche inactive le brin ayant servi de matrice pour la mutagenèse et qui contient des uraciles. De plus, elle peut servir à la production d'ADN simple brin pour le séquençage des diverses constructions.

3.1.2 *Streptomyces lividans*

Les mesures du niveau de sécrétion de la xylanase A à partir des clones portant des modifications au niveau du p.s. ont été effectuées dans une souche de *S. lividans* cellulase et xylanase négative afin d'éviter toute contamination par des xylanases d'origine chromosomique. Cette souche appelée 10-164 a été obtenue par mutagenèse au NTG (agent mutagène appelé: nitrosoguanidine)

par le Dr D. Kluepfel de l'institut Armand-Frappier à partir de la souche de *S. lividans* 66 provenant du Dr D. A. Hopwood du John Innes Institute à Norwich en Grande-Bretagne. La mutation porte sur une protéine qui lie l'ATP. L'hydrolyse de ce substrat fournit l'énergie nécessaire au système de transport des disaccharides comme le cellobiose et le xylobiose qui sont les inducteurs respectifs des cellulases et xylanases (Hurtubise *et al.*, sous presse).

3.2 Milieux de culture

3.2.1 Milieux de culture pour *E. coli*

Le milieu 2xTY a été utilisé pour tous les travaux avec *E. coli*. Il contient par litre: 16 g de bacto-tryptone, 10 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl. 15 g de bacto-agar ont été ajoutés pour le milieu solide. Les cellules ont été incubées à 37 °C dans un agitateur à 240 rpm.

L'ajout d'antibiotiques aux milieux de culture d'*E. coli* a été fait selon les concentrations suivantes: 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma Chem. Co.) comme marqueur de sélection pour le phagemide pTZ19U (Mead *et al.*, 1986); 30 µg/mL de chloramphénicol (Sigma Chem. Co.) pour exercer une pression sélective sur le plasmide pCJ105 qui porte l'information pour la synthèse des pilis dans la souche CJ236 (Joyce et Grindley, 1984); 70 µg/mL de kanamycine (Sigma Chem. Co.) pour assurer la sélection des cellules infectées avec le phage helper M13K07 (Viera et Messing, 1987).

3.2.2 Milieux de culture pour *S. lividans*

La température d'incubation de 34°C pour *S. lividans* était celle qui représente le meilleur compromis entre la température optimale de croissance et la production optimale de xylanases (Kluepfel, communication

personnelle). L'agitation des milieux liquides a été faite à 240 rpm. Le thiostrepton a été ajouté comme marqueur de sélection à tous les milieux de culture pour les transformants de *S. lividans* puisqu'ils contiennent des plasmides dérivés de pIJ702 (voir la section 3.3.2) qui portent un gène de résistance au thiostrepton. La concentration finale de thiostrepton était de 50 µg/mL pour les milieux solides et 5 µg/mL pour les milieux liquides.

Quatre types de milieu solide ont été utilisés pour la croissance de *S. lividans*. Le milieu R-5 (Hopwood *et al.*, 1985) permettait la régénération des protoplastes. Un litre de ce milieu est constitué de 103 g de sucrose; 0,25 g de K_2SO_4 ; 10,12 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 10 g de glucose; 0,1 g de casaminoacide (Difco); 5 g d'extrait de levure; 14,33 g de tampon TES; 22 g d'agar et de 2 mL de la solution de sels minéraux de Mandel (Hopwood *et al.*, 1985). Cette solution comprend: 140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 160 mg de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$; 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; solubilisés dans 200 mL d'eau déionisée. Le mélange est complété avec de l'eau distillée pour un volume total de 950 mL. Les solutions suivantes sont ajoutées après stérilisation: 10 mL de KH_2PO_4 (0,5%); 4 mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M); 1 mL $CuSO_4$ (5 mg/mL); 15 mL de L-proline (20%); 10 mL de méthiomine (1%) et 5 mL de tyrosine (8% dans du NaOH 1 N). Le milieu a été réparti à raison de 20 mL par pétris. Les pétris ont été séchés à la température de la pièce pendant 5 jours, jusqu'à une perte de 15% de leur poids initial. L'intérêt de ce milieu réside dans le fait qu'il est hypertonique ce qui évite aux protoplastes de subir un choc osmotique. De plus, étant riche en glucose et en sels minéraux ce milieu favorise la régénération des protoplastes.

La croissance et l'entreposage des transformants a été fait sur milieu Benett qui contient par litre: 1 g d'extrait de levures, 1 g d'extrait de boeuf, 2 g

de NZ amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar. Le pH est ajusté à 7.3 avec du NaOH.

L'activité xylanasiqne pouvait être visualisée grâce à un milieu minimal solide contenant du xylane couplé à un colorant: le Rémazol Bleu Brillant (RBB-xylane; Bertrand, 1988). Grâce à ce substrat, une zone d'hydrolyse bleu pâle était visible autour des colonies qui produisent des xylanases. Chaque litre de milieu est constitué de: 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5 g de KH_2PO_4 ; 5,0 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de KCl; 17,0 g d'agar; 1 mL de sels minéraux de Mandel (voir la description dans le milieu R-5). Le RBB-xylane en solution a été ajouté au milieu à une concentration finale de 0,15% après la stérilisation afin d'éviter qu'il ne précipite.

Un quatrième milieu solide a été utilisé pour la préparation des spores. Ce milieu "Soy" est composé essentiellement de 2% de farine de soya et de 2% de mannitol. Il augmentait notablement le rendement dans la préparation des spores.

Le milieu M13 modifié (Ishaque et Kluepfel, 1981) a été utilisé pour la culture de *S. lividans*. Il ne contient pas de protéose peptone ni d'extrait de levures afin de ne pas influencer le dosage des protéines, lors de la détermination de la biomasse de la culture. Un litre de ce milieu contient: 1,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5,5 g de K_2HPO_4 ; 1,0g de KH_2PO_4 ; 2,0 mL de Tween 80 (Aldrich Chem. Co. Milwaukee, Wi, É.-U.); 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1,0 mL de sels minéraux de Mandel (voir la description dans le milieu R-5). Si nécessaire le pH était ajusté entre 7,0 et 7,3. Après quoi, 10 mL d'une solution stérile de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3% (p/v) et 1 mL d'une solution de thiostrepton (5 mg/mL) ont été ajoutés au milieu avant utilisation. Le xylane d'épautre d'avoine (oat spelts xylan), utilisé à une concentration de 2%, a été la source de carbone qui s'est avérée la plus efficace. Le glucose ne pouvait être utilisé comme source de

carbone puisqu'il exerce une forte répression catabolique sur les gènes des xylanases (Kluepfel *et al.*, 1986). Enfin, ce milieu a été inoculé avec une concentration finale de 2×10^6 spores/mL.

3.3 Les vecteurs

3.3.1 Vecteurs de clonage chez *E. coli*

Le fragment d'ADN de 3,2 kpb contenant le gène de la xylanase A de *S. lividans* a été inséré au site *Sph* I de la cassette de clonage multiple du phagemide pTZ19U (Mead *et al.*, 1986) qui possède notamment le gène de résistance à l'ampicilline. Grâce à la région intergénique *f1* portée par ce phagemide, il a été possible de produire des particules phagiques contenant de l'ADN simple brin de pTZ19U en co-infectant les souches MV1190 ou CJ236 avec le phage M13K07 (Vieria et Messing, 1987) (voir section 3.10.1).

3.3.2 Vecteurs d'expression chez *S. lividans*

Le fragment *Sph* I - *Sac* I de 2,15 Kpb, dérivé du fragment *Sph* I de 3,2 Kpb, a été inséré dans le plasmide pIJ702 pour l'expression d'une forme tronquée de la xylanase A dans la souche 10-164 de *S. lividans*. En plus d'une origine de répllication reconnue par *S. lividans*, le plasmide pIJ702 (5,8 Kpb) possède le gène *tsr* qui confère aux transformants la résistance au thiostrepton. Ce vecteur est un plasmide à copies multiples (40 à 300 copies par cellule) permettant la sur-expression des gènes clonés (Katz *et ai.*, 1983).

3.4 Transformation bactérienne

3.4.1 Transformation d'*E. coli*

Les cellules d'*E. coli* ont été rendues compétentes par un traitement au CaCl_2 (Mandel et Higa 1970). Les souches bactériennes d'*E. coli* ont d'abord

été ensemencées dans 10 ml de milieu 2xTY et cultivées avec agitation à 37°C pendant environ 16 h. Un mL de cette pré-culture a été ré-ensemencé dans 100 mL de milieu 2xTY et les bactéries ont été incubées avec agitation à 37°C jusqu'à ce qu'une densité optique de 0,2 à 0,4 à 600 nm soit obtenue. La culture a été conservée sur glace pendant 10 min avant d'être centrifugée à 2000 x g pendant 6 min. Le culot de bactéries a été resuspendu dans environ 50 mL de 100 mM CaCl₂ et la suspension a été incubée sur glace 30 min. Les bactéries ont ensuite été centrifugées, le culot a été resuspendu dans 1 mL de 100 mM CaCl₂ et la suspension a été conservée sur glace jusqu'à utilisation.

La transformation des souches d'*E. coli* (Sambrook *et al.* 1989) se résume comme suit: 1 µl d'ADN (20 ng/µL) plasmidique est ajouté à 100 µL de cellules compétentes et le mélange est incubé 30 minutes dans la glace. Après un choc thermique de 2 minutes à 42°C, 400 µl de milieu 2xTY sans ampicilline sont ajoutés aux cellules. Une incubation d'une heure à 37°C permet aux cellules d'exprimer le gène de résistance à l'ampicilline codé par le vecteur. Finalement, 100 µL de culture ont été étalés sur des pétris 2xTY avec ampicilline 100 µg/mL d'ampicilline et incubés durant 16 heures à 37°C.

3.4.2 Transformation de *S. lividans*

Les manipulations génétiques chez les streptomycètes sont décrites par Hopwood *et al.* (1985). Leur transformation passe par la préparation de protoplastes (cellules dépourvues de leur paroi cellulaire). Pour préparer les protoplastes, les streptomycètes ont été cultivés en milieu liquide R-5 (voir section: 3.2.2) ce qui rend la paroi cellulaire plus fragile, favorisant ainsi la digestion ultérieure par le lysozyme.

La transformation des protoplastes selon Thompson *et al.* (1982) a été faite en mélangeant 50 µl de protoplastes (10¹⁰/mL) avec 1 µg de plasmides et

avec 200 µl de PEG 25%. Après une incubation de 2 minutes à la température de la pièce, les protoplastes ont été étalés sur milieu solide R-5 pour leur régénération. Après 16 heures d'incubation à 34°C les pétris ont été recouverts de 1 mL de thiostrepton à 200 µg/mL et incubés à nouveau à 34°C pour la sélection des transformants.

3.5 Préparation des spores

Avant d'entreprendre la préparation des spores, tous les transformants ont été purifiés par isolement de colonies. Ces transformants ont été inoculés sur 10 pétris Soy et incubés à 34°C pendant 7 jours. À ce stade, un volume de 5 mL d'une solution de glycérol stérile a été ajouté à chaque pétri. Les spores ont été grattées avec le bout d'une pipette et la suspension a ensuite été filtrée sur laine de verre pour retenir les fragments d'hyphes et les débris cellulaires. Une mesure de la densité optique à 660 nm permettait d'estimer la concentration de spores. La suspension a été distribuée dans des tubes à raison de 1×10^9 spores /mL et ceux-ci ont été conservés à -20°C.

3.6 Tests biologiques

3.6.1 Tests de comparaison entre les mutants

Pour chaque mutant, 3 cultures indépendantes ont été réalisées. Tous les résultats de mesure d'activité enzymatique et de dosage des protéines présentés dans ce mémoire résultent de la moyenne des mesures effectuées sur les trois cultures.

3.6.2 Dosage des protéines totales

Les échantillons prélevés au cours du temps (1 mL de culture) ont été entreposés à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation. Les échantillons ont

été sonifiés par trois impulsions d'ultrasons de 30 secondes chacune, espacées de 30 secondes de repos sur glace. Durant l'ensemble du traitement, les échantillons ont été maintenus dans la glace pour éviter une hausse importante de température. Ce traitement permettait de doser les protéines totales des échantillons selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) en utilisant l'albumine sérique de boeuf pour générer la courbe standard.

3.6.3 Mesure de l'activité enzymatique

La méthode utilisée (Miller, 1959) (appelée test des sucres réducteurs) se déroule comme suit: tout d'abord 1 mL de culture est centrifugé durant 5 minutes à 3000 x g. Une dilution du surnageant est ensuite incubée à 60°C durant 10 minutes avec 1 mL d'une solution de xylane de bouleau (1%) solubilisé dans du tampon citrate 0,05 M, pH 6,0. L'ajout de 2 mL d'acide dinitrosalicylique (DNS) arrête la réaction et le mélange est chauffé à 100°C durant 15 minutes. Ceci permet le développement d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs produits par l'activité de l'enzyme sur le xylane de bouleau. L'équivalence en μ moles de xylose (déterminée par la densité optique à 575 nm) est estimée en utilisant le xylose pour la courbe standard. Une unité internationale (UI) de xylanase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole d'équivalent xylose par minute dans ces conditions (Miller, 1959).

3.7 Manipulation de l'ADN

3.7.1 Isolement des plasmides

Chez *E. coli*, les plasmides ont été isolés selon la méthode de la lyse alcaline de Birnboim et Doly (1979). D'abord les, cellules cultivées durant 16

heures à 37°C dans un volume de 1,5 mL de 2xTY ont été centrifugées puis resuspendues dans 100 µL de solution I (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). Une fois les cellules en suspension dans la solution I, 200 µL de solution II (NaOH 0.2 N; SDS 1%) ont été ajoutés. Le tout a été mélangé en inversant le tube cinq fois puis 150 µL de solution III (acétate de potassium 3 M; acide acétique glacial 11.5% (v/v)) ont été ajoutés. Le contenu du tube a été mélangé par inversion puis incubé sur glace durant 5 minutes. Ensuite, une centrifugation de 5 minutes à 13 000 x g a permis de récupérer les plasmides dans la phase aqueuse. L'étape suivante consistait à précipiter l'ADN double brin d'abord en ajoutant deux volumes d'éthanol 95% et en agitant le tube avant une centrifugation de 5 minutes à 13 000 x g à la température de la pièce. Le surnageant a ensuite été retiré afin de laisser sécher le culot d'ADN en inversant le tube sur un papier absorbant. Finalement, le culot a été resuspendu dans 50 µL d'eau distillée et entreposé à 4°C.

L'isolement des plasmides chez *S. lividans* a été fait selon la procédure décrite par Kieser (1984). L'extraction d'ADN a été faite à partir de 500 µL de mycélium provenant de cultures de deux jours en milieu liquide M13 modifié (voir la section 3.2.2). Les cellules ont d'abord été centrifugées (environ 10 secondes) pour retirer le surnageant puis lavées avec 500 µl de tampon I sans lysozyme (10,3% sucrose, 25 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8,0). Pour lyser la paroi cellulaire, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C dans un volume de 400 µL de tampon I contenant 2 mg/mL de lysozyme. Un volume de 250 µL de tampon II (NaOH 0,3 M) a ensuite été ajouté, suivi d'une agitation vigoureuse durant environ 10 secondes. L'étape suivante consistait à incuber le mélange durant 15 minutes à 70°C puis à le refroidir lentement (environ 30 minutes) à la température de la pièce. À

ce stade, l'ADN chromosomique restait dénaturé, tandis que l'ADN plasmidique, plus petit, pouvait se renaturer lors du refroidissement. L'ajout de 80 μ L de solution III (phénol, 5 g; chloroforme, 5 mL; hydroxyquinoline, 5 mg; eau distillée, 1 mL) provoquait une baisse du pH ce qui facilitait ainsi la renaturation de l'ADN plasmidique. De plus, une centrifugation de 5 minutes à 13 000 x g permettait de précipiter l'ADN chromosomique (sous forme simple brin) ainsi que les protéines présentes dans le mélange. Le surnageant (700 μ L) contenant le plasmide a été transféré dans un nouveau tube contenant déjà 70 μ L d'acétate de sodium et 700 μ L d'isopropanol. Après centrifugation, tout le surnageant a été retiré et le culot a été resuspendu dans 50 μ L de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). À ce mélange, 25 μ L de phénol neutre (phénol équilibré d'abord avec 0,5 volume de Tris 1 M pH 8,8 puis avec 0,5 volume de Tris 0,1 M pH 8.0) ont été ajoutés. Le tout a été agité vigoureusement durant 15 secondes puis centrifugé durant 5 minutes à 13 000 x g. L'ADN alors contenu dans la phase aqueuse a finalement été retiré puis précipité avec 50 μ L d'isopropanol et resuspendu dans 50 μ L de tampon TE.

3.7.2 Digestion d'ADN par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction provenaient de Pharmacia et la digestion de l'ADN était faite conformément aux recommandations du manufacturier qui accompagnent l'achat des enzymes. Les ADN ont été digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction selon la procédure suivante: l'ADN était dilué dans un volume de 10 à 50 μ l de tampon "One-Phor-All Buffer Plus" (Pharmacia) à la concentration optimale définie pour chaque enzyme (0,5X à 2X). Après addition de l'enzyme, le mélange était ensuite incubé, généralement une heure, à la température optimale pour la digestion (Sambrook *et al.* 1989).

3.7.3 Isolement d'ADN après électrophorèse sur gel d'agarose

Tout d'abord, les fragments d'ADN devaient être séparés sur gel d'agarose. Le gel a été préparé à la concentration désirée (0,8 à 2% (p/v) d'agarose grade électrophorèse (ICN Biomedicals Canada, St-Laurent, Qc) dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate pH 7,8, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Les échantillons à analyser ont été mélangés au tampon de chargement (5X = 0,1% (v/v) bleu de bromophénol, 25 mM EDTA pH 8, 1% (p/v) SDS, 25% (v/v) glycérol) avant d'être déposés dans les puits. Le marqueur de taille utilisé était l'ADN du phage λ digéré par *Hind* III (Gibco/BRL). Après migration, les gels ont été photographiés sous illumination ultra-violette (Fotodyne, New Berlin, NY, É-U).

Le fragment d'intérêt a été prélevé du gel avec une lame de rasoir. L'ADN présent dans la bande de gel a ensuite été purifié à l'aide de la trousse commerciale "Sephaglas BandPrep Kit" (Pharmacia Biotech). Conformément à ce protocole, la bande de gel a été transférée dans un tube à microcentrifuge de 1,5 mL et 250 µL de "gel solubiliser" ont été ajoutés. Cette solution d'iodure de sodium (NaI 6 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; Na₂SO₃ 0.05%; EDTA 10 mM) permettait à la fois de dissoudre l'agarose, de favoriser l'adhésion de l'ADN aux billes de séphaglas (étape suivante) et de dénaturer les protéines. Le mélange a été incubé durant 10 minutes à 60°C et après ce délai, 5 µL de la suspension "Sephaglas BP" (20% de séphaglas BP (p/v) en suspension dans une solution de NaI 6 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; Na₂SO₃ 0.05%; EDTA 10 mM) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à la température de la pièce sous une agitation légère et constante. Cette étape permettait une liaison spécifique de l'ADN aux billes de séphaglas. Une centrifugation de 10 secondes a permis de former un culot avec le séphaglas et de pouvoir retirer le surnageant. Le

culot a été lavé trois fois avec la solution de lavage (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM; NaCl 0,1 mM; éthanol 60% (v/v)) afin de retirer les contaminants comme l'agarose, les protéines et les nucléotides, puis séché à l'air durant 10 minutes. Finalement, l'ADN a été élué de la matrice de séphaglas à l'aide de 20 μ L de tampon d'éluion (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM).

3.7.4 Ligations

Les réactions de ligation ont été effectuées dans un tampon de ligation (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; MgCl₂ 7 mM, DTT 1 mM et 2 mM d'ATP), en présence de 1 unité de ligase du phage T4 (Gibco/BRL), dans un volume réactionnel total de 10 μ L. Le fragment d'ADN à cloner et le vecteur ont été ajoutés dans un rapport molaire (insertion:vecteur) supérieur à trois et la réaction a été incubée pendant toute la nuit à 14°C.

3.8 Préparation des oligonucléotides

Les oligonucléotides servant à la mutagénèse (voir tableau 4) et au PCR (voir tableau 5) ont été produits par un synthétiseur automatique d'ADN (Gene Assembler, Pharmacia LKB). Cet appareil met en application les réactions de synthèse chimique basées sur l'utilisation des β -cyanoethyl phosphoramidites (dont la β -cyanoethyl-N, N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite) développées en 1984 et qui conduisent à la synthèse d'ADN (Sinha *et al.*, 1984).

Tableau 4: Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du gène de la xylanase A.

Nom	Séquence*	Mutation
NP-11	5'-GAGCGTGCTCTCGGCCATGACTGTGCCTCC-3'	Délétion du p. s. de la xylanase A.
NP-14	5'-CCGAGCGTGCTCTCGGCGGC CGCGCGCC GCACCGCCGCGATCAGCGTGGTGGCCG-3'	Changement du site de clivage du p. s. de la xylanase A par celui de la β -galactosidase.
NP-15	5'-GCCCGAGCGTGCTCTCGGC GAGTTCGAC CCCCGGCGCGCGATCAGTG-3'	Abolition du site de clivage du p.s. de XlnA.
NP-20	5'-GCCTCAAAGCTTAGTGGTCAC-3'	Ajout d'un site <i>Hind</i> III en amont du RBS de la xylanase A, à 17 nt de l'ATG.
NP-21	5'-GCCGCGCGGTACCGAGCGTGC-3'	Ajout d'un site <i>Kpn</i> I à 18 nt du début de la séquence de la protéine mature.

* Tous ces oligonucléotides sont des séquences anti-codantes du gène de la xylanase A.

..... : Séquence qui code pour le début de la xylanase A mature.

_____ : Séquence précédant le début du p.s. de la xylanase A, incluant le codon d'initiation de la traduction.

Petits caractères: nucléotides changés par mutagenèse.

RBS: site de fixation des ribosomes "ribosome binding site".

Tableau 5: Liste des oligonucléotides servant à l'amplification par PCR de la séquence du peptide signal des gènes: *xlnB*, *xlnC*, *man*, *axe*, *celA* et *celB*.

Nom	Séquence	Matrice
NP-1 (codant)	5'- <u>GGAGGCACAGTCATG</u> AACCTGCTCGTCCAGCCG-3'	<i>xlnB</i>
NP-2 (anti-codant)	5'-GAGCGTGCTCTCGGC CGCCTGGGCGGTGCCCCGGC -3'	<i>xlnB</i>
vec 1 (codant)	5'-TCACCCGAAGATCTACCCGATGCC-3'	<i>xlnA</i>
oligo 810 (anti-codant)	5'-TCACCATGTTGAACTCA-3'	<i>xlnA</i>
NP-5 (codant)	5'- <u>GGAGGCACAGTCATG</u> GGCTTTGGGAGCGCTCCC-3'	<i>celA</i>
NP-6 (anti-codant)	5'-GAGCGTGCTCTCGGC CGCCTGTGCCGGGGGGCCGGCG -3'	<i>celA</i>
NP-22 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> CGTAACGCAAGAAGCACG-3'	<i>man</i>
NP-23 (anti-codant)	5'- CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC GGCCTCCGCCCTCCGGC-3'	<i>man</i>
NP-24 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> CTCGCCCGCCATCGAAGG-3'	<i>man</i>
NP-25 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> GGCTTTGGGAGCGCTCCC-3'	<i>celA</i>
NP-26 (anti-codant)	5'- CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC GGCCTGTGCCGGGGGGCC-3'	<i>celA</i>
NP-27 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCTTG</u> AAACGCCTTTGGCC-3'	<i>celA</i>
NP-28 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> CGAACGTTACGGCCCCAG-3'	<i>celB</i>
NP-29 (anti-codant)	5'- CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC CGCCTGGGCGGGCGCGGC-3'	<i>celB</i>

NP-30 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> CGTACCAGTACCGGACCA-3'	<i>axe</i>
NP-31 (anti-codant)	5'- <u>CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC</u> GGCCTGGGCCGGGGCGGCGCC-3'	<i>axe</i>
NP-32 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> AACCTGCTCGTCCAGCCG-3'	<i>xlnB</i>
NP-33 (anti-codant)	5'- <u>CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC</u> GGCCTGGGEGGTGCCCGG-3'	<i>xlnB</i>
NP-34 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> CAGCAGGACGGCACACAG-3'	<i>xlnC</i>
NP-35 (anti-codant)	5'- <u>CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC</u> GGCGTGGGCTGTGCCGGG-3'	<i>xlnC</i>
NP-36 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> AGCCGCAGAGGCTTCCTC-3'	<i>xlnC</i>
NP-39 (codant)	5'- <u>GGGAAGCTTTGGAGGCACAGTCATG</u> ATGATTACTCTGCGCAA-3'	<i>lamB</i>
NP-40 (anti-codant)	5'- <u>CCCGGTACCGAGCGTGCTCTCGGC</u> AGCCATTGCCTGAGCAGA-3'	<i>lamB</i>

..... : Séquence qui code pour le début de la xylanase A mature.

_____ : Séquence précédant le début du p.s. de la xylanase A, incluant le codon d'initiation de la traduction.

Petits caractères: Séquence nucléotidiques correspondant aux extrémités 5' et 3' qui bordent les p.s.

Remarques: Les oligonucléotides NP-22 à NP-40 ont servi à l'amplification des divers p.s. pour la mutagenèse par cassette de clonage. Les amorces codantes portent le site de restriction *Hind* III alors que les amorces anti-codantes portent le site *Kpn* I.

3.9 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR a été utilisée pour amplifier les séquences d'ADN qui codent pour les divers p.s. devant remplacer celui de la xylanase A (Saiki *et al.* 1988). La réaction débutait par une dénaturation de l'ADN servant de matrice par chauffage à 96°C durant 5 minutes puis la température était abaissée à 55°C durant 5 minutes pour permettre l'appariement des oligonucléotides sur la matrice. L'ADN polymérase disposait ensuite de 3 minutes pour la synthèse du brin complémentaire à 72°C. Enfin, les réactions de dénaturation (1 minute à 94°C), d'hybridation (1 minute à 55°C) et de synthèse du brin complémentaire (72°C durant 3 minutes) ont été répétées 30 fois. L'ADN polymérase utilisée était la *Pfu* (STRATAGENE, La Jolla, Californie). Il s'agit d'une enzyme isolée de *Pyrococcus furiosus* qui possède à la fois une activité polymérase 5' - 3' et une activité exonucléase 3' - 5' ce qui lui permet de corriger certaines erreurs de polymérisation et augmente de 12 fois la fidélité de la synthèse comparativement à l'ADN polymérase *Taq* normalement utilisée.

3.10 Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée permet de modifier la composition en nucléotides d'une portion d'ADN avec une très grande précision. Parmi les méthodes existantes, celle de Kunkel (1985) a été utilisée pour ces travaux. De plus, il a été possible de se procurer tous les réactifs nécessaires à sa réalisation dans une trousse commerciale (Bio-Rad Laboratories Ltd). Les principales étapes sont: la synthèse d'ADN simple brin par la souche d'*E. coli* CJ236 qui incorpore occasionnellement des uraciles à la place des thymines (voir la section 3.1.1). Ensuite l'hybridation d'une amorce compatible à cet ADN et qui porte la mutation permet la synthèse du brin complémentaire. Ce

nouveau plasmide est utilisé pour la transformation de la souche d'*E. coli* MV1190. Cette dernière détruit le brin contenant les uraciles et se sert du brin complémentaire (qui porte la mutation) pour la synthèse des nouveaux plasmides.

3.10.1 Préparation d'ADN simple brin contenant des uraciles

Cette manipulation débutait par la préparation d'une pré-culture en inoculant 5 mL de milieu (2xTY contenant: glucose 0,5%, ampicilline 100 µg/mL et chloramphénicol 30 µg/mL) à partir d'une colonie obtenue par la transformation de la souche d'*E. coli* CJ236 avec le phagemide pTZ19U. Après 16 heures d'incubation à 37°C, 100 µL de pré-culture ont été utilisés pour inoculer 10 mL de milieu frais (dont la composition était la même que celle du milieu précédent). Cette culture a été incubée à 37°C à 240 rpm. Lorsqu'elle atteignait une D.O.₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,8, 10 µL de phage auxiliaire M13K07 ($\geq 1 \times 10^{11} \leq 5 \times 10^{11}$ unités formatrices de plages, Bio-Rad) étaient ajoutés. Le mécanisme d'action du phage auxiliaire M13K07 se résume comme suit: le phagemide pTZ contient une région intergénique dérivée du phage M13 qui est efficacement reconnue par le produit du gène II porté par le bactériophage M13K07. Ce dernier porte aussi une région intergénique (dérivée des vecteurs mp) mais elle n'est pas aussi bien reconnue que celle du phagemide pTZ puisqu'elle contient une insertion de la séquence de *lacZ*. En raison du fait que le produit du gène II synthétisé par M13K07 interagit préférentiellement avec la région intergénique portée par pTZ, la majorité de l'ADN simple brin produit est dérivée du génome de ce phagemide.

Après l'ajout du phage auxiliaire M13K07 l'incubation se poursuivait encore 1 heure pour permettre l'infection des cellules. Par la suite, 5 mL de cette culture ont été ajoutés à 20 mL de milieu frais dont la composition était

la même que décrite précédemment, mais contenant en plus 70 µg/mL de kanamycine (ce qui permettait de sélectionner les cellules infectées par le phage auxiliaire M13K07 puisqu'il porte aussi un gène de résistance à la kanamycine) et 0,25 µg/mL d'uridine. Cette nouvelle culture a été incubée durant 16 heures à 37°C/240 rpm.

3.10.2 Isolement d'ADN simple brin

La culture a été centrifugée pendant 10 minutes à 10 000 x g et 20 mL de surnageant ont été prélevés. L'ajout de 5 mL d'une solution de PEG 6000 à 20% et de NaCl à 2,5 M permettait de précipiter les particules de phage. Le mélange a été incubé 30 minutes à la température de la pièce et centrifugé à 10 000 x g pendant 10 minutes. Le culot de particules de phage a par la suite été bien asséché après la décantation du surnageant. Il a été resuspendu dans 400 µL d'une solution de Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 5 mM; 50 µg/mL de DNase I, 10 µg/mL de RNase A et incubé 30 minutes à 37°C. L'ajout de 80µL d'une solution d'EDTA 50 mM, acétate de sodium 1,5 M pH 7,0 permettait en suite d'arrêter la réaction. Une extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (50:49:1) suivie d'une précipitation avec 2 volumes d'éthanol permettait de récolter l'ADN simple brin dépourvu de tout contaminant. L'ADN a été resuspendu dans 30 µL d'H₂O et le calcul de sa concentration a été faite selon l'équation:

$$[\text{pmole}/\mu\text{L}] = (120 \times \text{le facteur de dilution} \times \text{D.O.}_{260}/\text{mL}) / (\text{nombre de nt. du plasmide}) \text{ (Sambrook } et \text{ al., 1989)}.$$

3.10.3 Phosphorylation des oligonucléotides

La phosphorylation des oligonucléotides a été essentielle puisqu'elle permettait à la ligase de refermer le plasmide à la fin de l'étape de synthèse du

brin complémentaire. La réaction de phosphorylation se déroulait dans 10 μL comprenant 2 μL d'oligonucléotides (5 pmoles/ μL), 1 μL d'ATP (10 mM), 1 μL de polynucléotide kinase du phage T4 (3 unités), 5 μL d' H_2O et 1 μL de tampon kinase (70 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM de dithiothréitol). Le mélange réactionnel a été incubé durant 30 minutes à 37°C pour permettre la phosphorylation, puis 10 minutes à 65°C pour arrêter la réaction.

3.10.4 Hybridation de l'oligonucléotide avec l'ADN simple brin

Il était important que l'oligonucléotide servant à la mutagenèse s'apparie précisément avec sa portion complémentaire sur l'ADN simple brin. Pour ce faire, 1 μL de cet ADN (0,1 pmole) et 1 μL d'oligonucléotide phosphorylé (1 pmole) ont été mélangés à 7 μL d' H_2O et 1 μL de tampon d'hybridation 10X (200 mM Tris-HCl pH 7,4; 20 mM MgCl_2 ; 500 mM NaCl). Le mélange réactionnel a été chauffé à 80°C durant 5 minutes et refroidi lentement jusqu'à 30°C (environ 90 minutes).

3.10.5 Synthèse du brin complémentaire

Les réactifs suivants ont été ajoutés aux 10 μL de la réaction d'hybridation: 1 μL de ligase (5 à 7 unités/mL), 1 μL d'ADN polymérase du phage T4 (8 à 12 unités/mL), 1 μL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de protéine "gène 32" du phage T4 (pour déstabiliser les éventuelles structures secondaires dans l'ADN simple brin) et 1 μL de tampon de synthèse 10X (5 mM de dATP; dCTP; dGTP; dTTP; 10 mM d'ATP; 100 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM MgCl_2 ; 20 mM DTT). Le mélange a été incubé successivement 10 minutes à 4°C, 10 minutes à la température de la pièce et 90 minutes à 37°C. De ce mélange, 10 μL ont été

utilisés pour transformer 100 μL de cellules compétentes de la souche d'*E. coli* MV1190 (section 3.4.1).

3.10.6 Identification des plasmides porteurs de mutations par digestion des plasmides

Après extraction des plasmides des transformants, l'ADN a été digéré avec les enzymes de restriction appropriées pour identifier les plasmides porteurs des modifications. Les détails de ces digestions sont présentés dans la section des résultats.

3.10.7 Identification des plasmides porteurs de mutations par hybridation de colonies

Dans un cas, la recherche de clones porteurs de la mutation a été faite par le transfert de colonies bactériennes sur membrane de nylon (Amersham), suivi de la lyse des bactéries, de la dénaturation et de la fixation de l'ADN plasmidique tel que décrit par Sambrook *et al.* (1989). L'ADN a ensuite été hybridé avec l'oligo ayant servi pour la mutagenèse, préalablement marquée au [^{32}P].

3.10.7.1 Préparation de la sonde

D'abord, 1 μL d'oligonucléotides (100-200 ng) a été incubé à 37°C durant une heure en présence de 5 μL de tampon kinase 10X (Tris-HCl 0.5 M, pH 7.6; MgCl_2 0.1 M; DTT 50 mM; spermidine HCl 1 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0), de 0,5 μL de polynucléotide kinase, 10 unités (Pharmacia), de 10 μL de [γ - ^{32}P]ATP (4500 Ci/mmol) et de 33.5 μL d'eau. Après la réaction de marquage, les nucléotides radioactifs non-incorporés ont été éliminés en ajoutant 50 μL d'eau au mélange et en faisant migrer les oligonucléotides sur une colonne de

séphadex G-25 (Pharmacia) préparée telle que décrit par Sambrook *et al.*, (1989).

3.10.7.2 Hybridation et lavages

Les conditions utilisées pour l'hybridation ainsi que pour le lavage des membranes ont été décrites par Sambrook *et al.* (1989). Les filtres ont été pré-hybridés 4-6 h à 65°C dans 100 ml d'une solution de SSC 6X, NaH₂PO₄·7H₂O 50 mM (pH 7.0), SDS 0,1%, Denhardt 5X (0,1% (p/v) albumine sérique de boeuf, 0,1% (p/v) polyvinylpyrrolidone, 0,1% (p/v) Ficoll type 400), et de 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Cette solution a été remplacée par 50 ml d'une solution fraîche contenant 400 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. La sonde a été ajoutée et l'incubation s'est poursuivie toute la nuit à 65°C. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois en présence de 2X SSC durant 5 min à la température ambiante; deux fois avec du 2X SSC, 0,1% SDS pendant 1 h à 65°C et deux fois avec du 0,1X SSC durant 1 h à 65°C. Par la suite, les membranes ont été séchées et exposées.

3.11 Séquençage de l'ADN

Toutes les constructions génétiques ont été séquencées selon la méthode de terminaison de chaînes par les didéoxyribonucléotides (Sanger *et al.*, 1977). La première étape consiste en l'appariement des amorces sur l'ADN à séquencer. Pour cette réaction, 1 µL d'amorce (0.5 à 1.0 pmol/µL) a été mélangé à 2 µL de tampon de réaction (Tris-HCl 200 mM, pH 7.5; MgCl₂ 100 mM; NaCl 250 mM) et 7 µL d'ADN à séquencer (environ 1 µg). Ce mélange a été porté à 65°C durant 2 minutes puis refroidi lentement à la température de la pièce (environ 30 minutes). À ce mélange, les réactifs suivants ont été ajoutés afin de procéder à la réaction de marquage: 1 µL de DTT (0.1 M), 2.0

μL d'un mélange de nucléotides (dGTP 7.5 μM ; dCTP 7.5 μM ; dTTP 7.5 μM), 0.5 μL de [α - ^{35}S]dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ et 10 μM (1000 Ci/mmol)) et 2,0 μL de Sequenase 2.0 (l'ADN polymérase du bactériophage T7 génétiquement modifiée de façon à éliminer son activité exonucléase 3' - 5') diluée 1:8 dans du tampon (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; DTT 5 mM; BSA 0.5 mg/mL). Le mélange a été incubé 5 minutes à la température de la pièce et distribué dans 4 tubes (à raison de 3,5 $\mu\text{L}/\text{tubes}$) contenant respectivement 2,5 μL de réactifs de terminaison de séquence. La composition de ces mélanges de terminaison (différente pour chacun des quatre tubes) était la suivante: tube ddG: dGTP 80 mM; dATP 80 mM; dCTP 80 mM; dTTP 80 mM; NaCl 50 mM et ddGTP 8 μM ; tube ddA: dGTP 80 mM; dATP 80 mM; dCTP 80 mM; dTTP 80 mM; NaCl 50 mM et ddATP 8 μM ; tube ddT: dGTP 80 mM; dATP 80 mM; dCTP 80 mM; dTTP 80 mM; NaCl 50 mM et ddTTP 8 μL ; tube ddC: dGTP 80 mM; dATP 80 mM; dCTP 80 mM; dTTP 80 mM; NaCl 50 mM et ddCTP 8 μM . Les réactifs ont par la suite été incubés à 37°C durant 5 minutes. Finalement la réaction a été arrêtée par l'ajout de 4 μL de solution d'arrêt (formamide 95%; EDTA 20 mM; bleu de bromophénol 0.05% (p/v); cyanol de xylène 0,05% (p/v)). Avant de charger les échantillons (3 $\mu\text{L}/\text{puits}$), ils ont été incubés à 80°C durant 2 minutes. Toutes les réactions ont été effectuées par le service de séquençage de l'institut Armand-Frappier. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel A.L.F. Manager, version 2.1.

4- Résultats

4.1 Introduction aux résultats

Les résultats seront présentés en deux parties. La première sera consacrée à la construction des clones, puis dans la deuxième partie l'effet du remplacement et de la mutagenèse du p.s. de la xylanase A sur la production de cette enzyme chez *S. lividans* sera étudié. La section portant sur la construction des clones se divise en cinq sous-sections correspondant aux diverses stratégies employées. Certaines ont conduit aux mutations recherchées (sections 4.2.1, 4.2.2 et 4.2.5) alors que d'autres se sont avérées infructueuses (sections 4.2.3 et 4.2.4) mais riches en informations.

Avant d'aborder les résultats, une précision s'impose. La sécrétion de protéases par *Streptomyces lividans* conduit à la formation de deux formes de xylanases A (codées par le même gène) dans le milieu de culture à raison de 90% de xylanase A1 (43kDa) et de 10% de xylanase A2 (32 kDa). La séquence du N-terminal de ces deux enzymes est la même, cependant la xylanase A2 se termine au résidu alanine 299 tandis que la xylanase A1 prend fin au résidu thréonine 436. Pour éviter des problèmes d'interprétation dans la mesure de l'activité enzymatique, une délétion dans la partie 3' du gène de la xylanase A a été réalisée et ce clone produit exclusivement de la xylanase A2. L'ensemble du travail a donc été effectué avec ce délétant. Les appellations xylanase A sauvage et gène de la xylanase A (*xlnA*) sont employées tout au long de ce travail indifféremment qu'il s'agisse de la xylanase A1 ou A2 sauf dans le cas de la détermination de l'activité enzymatique où seule la xylanase A2 intervient, l'enzyme portera donc sa dénomination propre de xylanase A2.

4.2 Résultats partie I - Construction des clones

Plusieurs techniques de mutagenèse seront abordées. La présentation et la discussion des résultats de deux de ces méthodes seront traitées

simultanément. Il s'agit des sections 4.2.2 et 4.2.3. L'interprétation des résultats obtenus par ces méthodes permettra d'aborder plus facilement les stratégies de mutagénèse qui leur font suite.

4.2.1 Modification du site de reconnaissance de la "signal peptidase"

Deux mutations ont été dirigées au site de clivage du p.s. de la xylanase A par l'utilisation de la technique de mutagénèse de Kunkel. La première consiste en l'abolition du site de reconnaissance de la "signal peptidase" dont la séquence normale en acides aminés est AHA * A (l'astérisque représente ici le site de clivage du p.s.). Elle a été remplacée par la séquence VDS * A puisqu'elle n'a pas d'homologie avec le site de reconnaissance de la "signal peptidase". La séquence normalement reconnue par la "signal peptidase" étant mutée, le p.s. de ce mutant appelé VDS ne devrait plus être excisé du reste de la protéine.

La deuxième mutation produite par cette technique a été la substitution du site de reconnaissance de la "signal peptidase" de l'enzyme sauvage par la séquence proposée comme étant le site de reconnaissance de la "signal peptidase" de la β -galactosidase de *S. lividans* (Eckhardt *et al.*, 1987). Cette séquence (...AVRRAA * A...) ne correspond pas à la forme générale AXA * A décrite précédemment dans la revue de littérature. De plus, la présence de deux charges positives portées par des résidus arginine tout près du site de clivage, laisse supposer un mécanisme particulier de maturation de cette protéine. La figure 4 montre que la mutation VDS introduit un nouveau site de restriction *Sal* I dans le gène de la xylanase A tandis que la mutation β -Gal crée un nouveau site *Not* I. Ces sites ajoutés à la séquence originale ont permis d'identifier les clones porteurs de la mutation.

Figure 4: Les mutations VDS et β -gal génèrent de nouveaux sites de restriction.

La séquence du gène de la xylanase A sauvage est présentée en A. Celle du mutant VDS est présentée en B et celle du mutant β -Gal en C. Les acides aminés et les nt. qui diffèrent de ceux de l'enzyme sauvage sont soulignés et les nt. formant les nouveaux sites de restriction sont mis en évidence par des caractères gras, plus grands.

A)

	Peptide signal	Site de clivage	Gène de structure
Brin codant :	5' GGC ACG GCC ACC GCA CTG ATC GCG CCG CCG GGG GCA CAC GCC	↓	GCC GAG AGC ACG CTC GGC GCC GCG 3'
XlnA:	[...] G T A T A L I A P P G A H A *		A E S T L G A A [...]

B)

	<i>Sal</i> I		
Séquence de l'oligo:	3' GT GAC TAG CGC GGC GGC CCC	<u>CAGCTGAGG</u>	CGG CTC TCG TGC GAG CCG CG 5'
Mutant VDS:	[...] G T A T A L I A P P G	<u>V D S</u> *	A E S T L G A A [...]

C)

	<i>Not</i> I		
Séquence de l'oligo:	3' GC CGG TGG OGT GAC TAG CGC	<u>CGC CAC GCC GCG CGCCGG</u>	CGG CTC TCG TGC GAG CC 5'
Mutant β-Gal:	[...] G T A T A L I A	<u>A V R R A</u> *	A E S T L G A A [...]

Dans le but d'exprimer le gène de la xylanase A chez *E. coli*, et de réaliser les travaux de mutagenèse, un fragment *Sph* I - *Sph* I de 3,2 Kpb isolé du plasmide pIAF18 (Mondou *et al.*, 1986), contenant le gène *XlnA* a été inséré dans le site *Sph* I du phagemide pTZ19U générant ainsi le phagemide pAM19.1. Le schéma de la figure 5 montre que la digestion de ce phagemide avec l'enzyme *Sal* I génère deux fragments de 1441 pb et de 4622 pb. Le site *Sal* I ajouté par la mutation VDS a permis de couper le fragment de 4622 pb en deux fragments, respectivement de 689 pb et de 3933 pb ce qui permettait de distinguer facilement les phagemides porteurs de la mutation.

Les mutants β -Gal ont été mis en évidence par une digestion double avec les enzymes de restriction *Bgl* II et *Not* I. Selon la figure 5, le fragment de 375 pb pour le phagemide non muté résultant de cette digestion passe à 337 pb chez le mutant. Un gel d'agarose de 2,5% offre une résolution suffisante pour distinguer la taille de ces fragments. Enfin, les mutations β -Gal et VDS ont été confirmées par le séquençage de la région concernée selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) (résultats non présentés).

4.2.2 Élimination du p.s. de la xylanase A

Cette mutation consistait en la construction d'un gène de xylanase A dépourvu de la séquence correspondant au p.s. Ceci a été réalisé par l'élimination des 120 pb qui précèdent le début de la protéine mature tout en conservant le codon d'initiation de traduction. La mutation positionne donc la méthionine de départ juste avant l'alanine du N-terminal de la protéine mature. L'oligonucléotide NP-11 utilisé pour cette mutagenèse hybridait sur 15 nt. de chaque côté de la séquence du p.s. c'est-à-dire à partir du site de fixation des ribosomes jusqu'à l'ATG du début de la traduction d'une part et

Figure 5: Organisation et cartographie partielle du gène de la xylanase A chez pAM 19.1.

Cette carte montre l'emplacement des sites de restriction mentionnés dans ce mémoire. Un fragment *Sph* I de 3202 pb portant le gène de la xylanase A a été cloné dans le vecteur pTZ 19U.

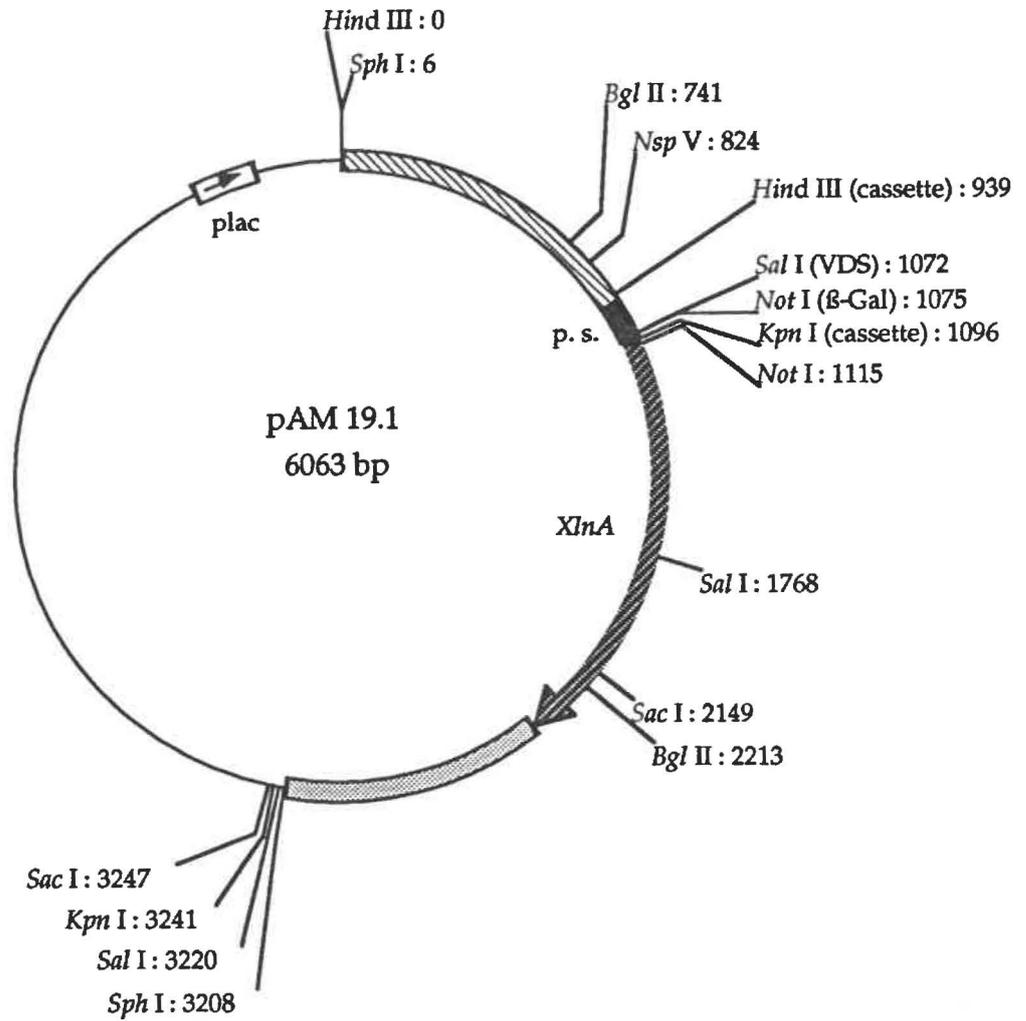
⋈⋈⋈⋈ = Amont du site d'initiation de la traduction de la xylanase A.

▬ = Peptide signal de la xylanase A.

⋈⋈⋈⋈⋈⋈ = Région en aval de la xylanase A.

▬▬▬▬ = Gène de structure de la xylanase A.

— = Vecteur pTZ19U.



sur les premiers 15 nt. correspondant au N-terminal de la protéine mature d'autre part (voir la figure 6A).

Le clone portant cette mutation (élimination du p.s.) est désigné par le terme de mutant "loop out" et la sélection des clones portant la mutation a d'abord été faite par hybridation de colonies en utilisant comme sonde radioactive l'oligonucléotide NP-11 ayant servi à la mutagenèse. Le phagemide des colonies positives à l'hybridation a été digéré avec les enzymes *Bgl* II et *Not* I ce qui a généré un fragment de 375 pb pour le gène sauvage (figure 5) ou un fragment de 255 pb lorsque la portion correspondant au p.s. a été éliminé. Il a été aisé de repérer les phagemides ne possédant plus le p.s. de la xylanase A par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5% (figure 7) et la délétion a été confirmée par séquençage (résultats non présentés). Par contre, la tentative de repérer les mutants par l'hybridation des colonies avait généré un nombre considérable de faux positifs rendant cette technique peu efficace pour identifier les colonies porteuses de phagemides ne possédant plus le p.s. de la xylanase A.

La figure 6 explique aussi pour quelle raison l'hybridation des colonies avec cette sonde génère un bruit de fond aussi important. La séquence nucléotidique dans la région du site de fixation des ribosomes est fortement homologue à celle qui correspond à l'extrémité 3' de la séquence du p.s. favorisant ainsi l'hybridation de l'oligonucléotide NP-11 sur le phagemide non mutant. Ceci est présenté à la figure 6B, qui montre que 24 nt. sur 30 de l'oligonucléotide NP-11 peuvent s'hybrider sur la séquence du gène sauvage. De plus il est à remarquer que cette hybridation non souhaitée pourrait être à l'origine du faible rendement de cette mutagenèse. En effet, l'extrémité 3' de l'oligonucléotide NP-11 hybridait sur pratiquement 9 nt. permettant à l'ADN polymérase du phage T4 de synthétiser *in vitro* un brin complémentaire à

Figure 6: Hybridations possibles de l'oligo NP-11 utilisé pour la mutation "loop out".

L'oligo conçu pour éliminer le peptide signal de la xylanase A peut s'hybrider de deux façons sur *xlnA*. A) L'hybridation de 30 nt. sur 30 nt. de l'oligo NP-11 conduit à l'élimination du peptide signal. B) L'hybridation parasite de 24 nt. sur 30 nt. entraîne un changement de cadre de lecture.

- | = Appariement entre bases.
- ⋈ = Amont du site d'initiation de la traduction de la xylanase A.
- ▬ = Peptide signal de la xylanase A.
- ▨ = Gène de structure de la xylanase A.
- RBS = Site de fixation des ribosomes.

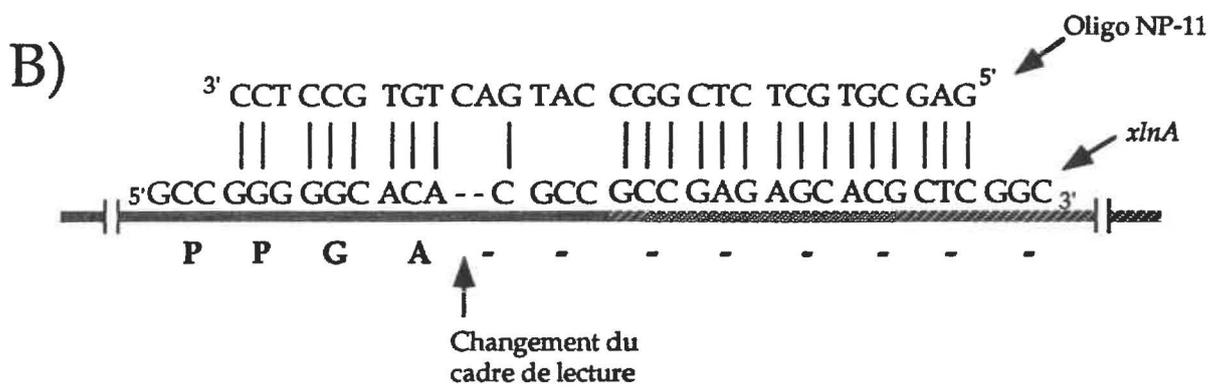
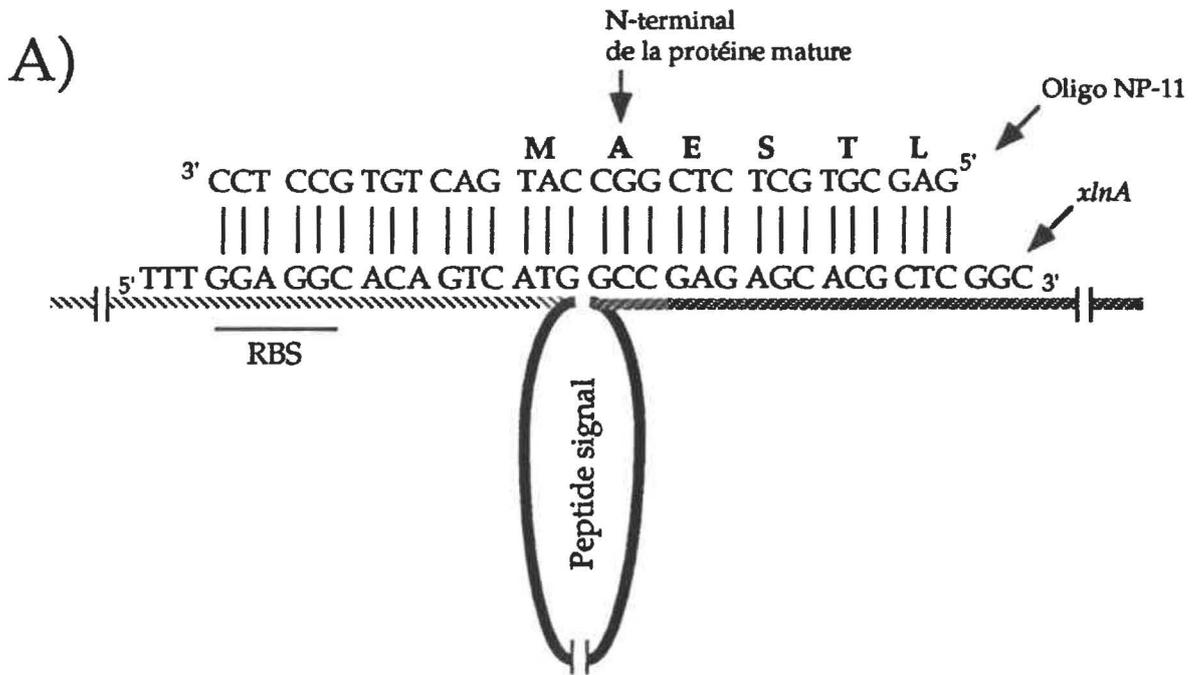
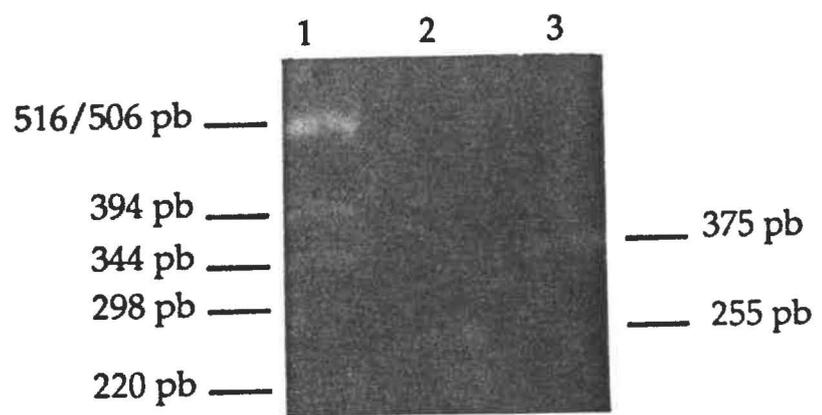


Figure 7: Identification du mutant "loop out" par double digestion enzymatique.

La mutation "loop out" peut être détectée par double digestion enzymatique avec les enzymes Bgl II et Not I. 1) échelle moléculaire; 2) mutant "loop out"; 3) xlnA.



partir de l'amorce appariée à cet endroit. Ces conditions ont été suffisantes pour qu'apparaissent deux populations de mutants, l'une correspondant à la mutation "loop out" recherchée et l'autre conduisait à une mutation qui introduit un changement du cadre de lecture à la fin de la séquence du p.s. par l'ajout de deux bases. Cette dernière mutation était évidemment inutilisable.

4.2.3 Mutagenèse dont l'amorce est produite par PCR asymétrique

Cette méthode permettait de contourner une difficulté technique dans la préparation des oligonucléotides de plus de 100 nt. En effet la synthèse chimique ne peut produire les oligonucléotides de 150 nt. et plus qui étaient nécessaires au remplacement du p.s. de la xylanase A par celui d'une autre enzyme avec la méthode de mutagenèse de Kunkel. Le remplacement du p.s. par la méthode de Kunkel offrait l'avantage de ne pas modifier la composition des acides aminés de la protéine mature. La figure 8A décrit comment il a été possible de générer de l'ADN simple brin par PCR asymétrique du p.s. de la cellulase A en limitant la concentration de l'une des deux amorces dans le mélange réactionnel. Tel que rapporté par Peter C. McCabe (1990), durant les 15 à 25 premiers cycles la plupart du produit synthétisé est à double brins et s'accumule exponentiellement, jusqu'à épuisement de l'amorce limitante (l'oligo NP-5 dans cet exemple). Lorsque cette dernière vient à manquer, les cycles suivants synthétisent un excès d'ADN simple brin à partir de l'oligonucléotide NP-6. Cet ADN complémentaire à la séquence de l'amorce limitante s'accumule alors de façon linéaire au cours des cycles d'amplification. La figure 8B montre la séparation des produits de PCR asymétrique après électrophorèse sur gel d'agarose. La bande à 168 pb correspond au produit double brins de l'amplification du p.s. de la cellulase

Figure 8: Amplification du peptide signal de la cellulase A par PCR asymétrique.

La technique du PCR asymétrique permet de générer de l'ADN simple brin.

A) Schéma du principe de la technique du PCR asymétrique. B) Séparation du produit de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose; 1) échelle moléculaire; 2) PCR asymétrique.

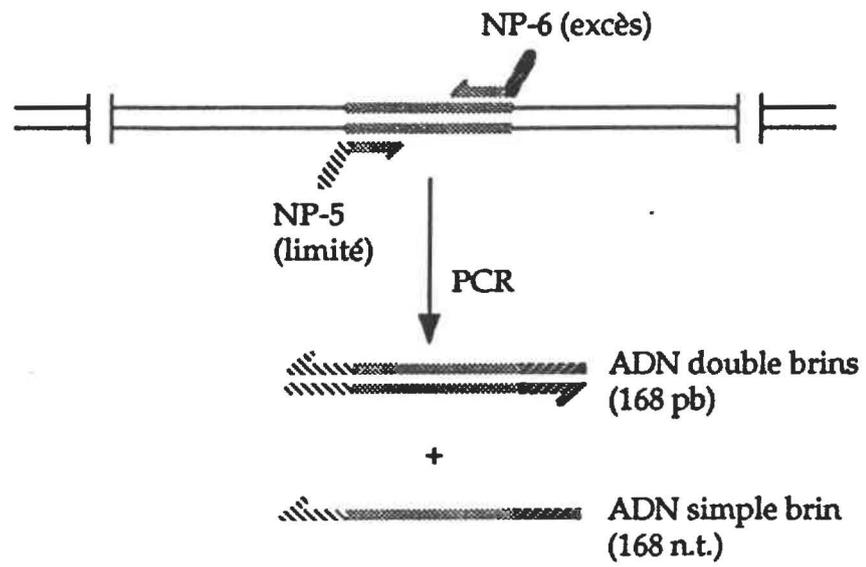
La pointe de la flèche représente l'extrémité 3' des amorces.

~~~~~ = Région non traduite adjacente au site d'initiation de la traduction de la xylanase A.

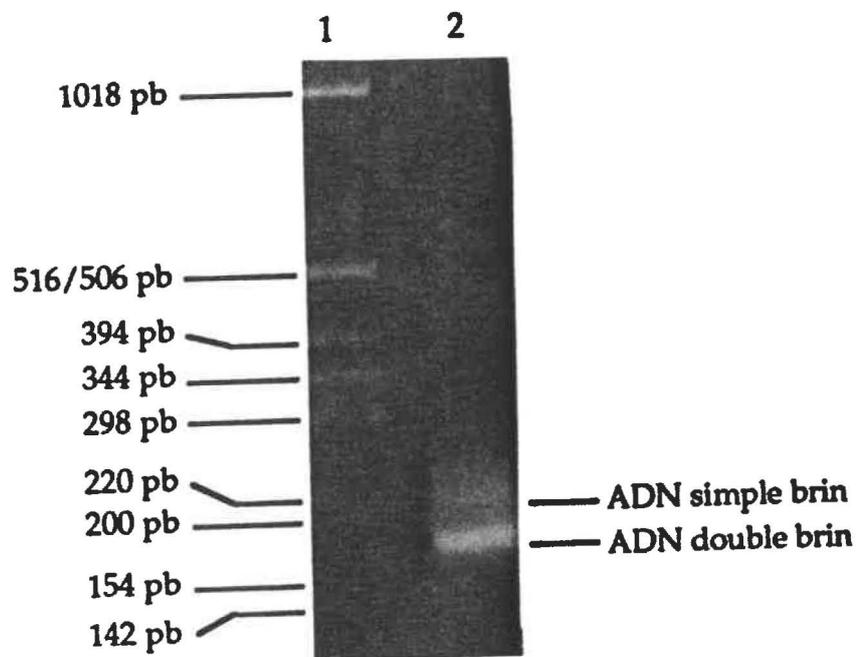
===== = Portion correspondant au peptide signal de la cellulase A

===== = Début du gène de structure de la xylanase A.

A)



B)



A (voir le tableau 3). La bande d'ADN supérieure à 168 pb représente de l'ADN simple brin. En effet, selon McCabe (1990), l'ADN simple brin migre moins rapidement que son homologue à double brins et peut être visualisé par coloration au bromure d'éthidium bien que la fluorescence soit moins intense.

Le produit du PCR asymétrique a été par la suite utilisé comme amorce pour la mutagénèse dirigée. Le rendement de cette méthode n'a été que de quelques dizaines de transformants par mutagénèse. Les colonies porteuses de mutations ont été recherchées à la fois par hybridation et par digestion. L'une des deux amorces du PCR asymétrique a été utilisée comme sonde radioactive. Malgré bien des efforts aucune des mutations espérées n'a été obtenue.

Cette méthode peut donner lieu à diverses combinaisons moléculaires possibles comme le montre la figure 9. L'appariement de l'oligonucléotide conduisant à la mutation recherchée est présenté en A. Il est possible que la séquence de 15 nt. ajoutée à chaque extrémité ne soit pas assez longue pour assurer un bon appariement avec sa cible comme le montrent les schémas B et C. Le schéma D décrit un autre type d'hybridation probable puisque l'extrémité 3' de l'oligonucléotide servant à cette mutagénèse peut s'hybrider avec celle de la région 3' du p.s., tel que démontré pour l'oligo NP-11 (figure 6B). Les hybridations incomplètes en C et en D mobilisent une partie de la machinerie de synthèse du brin complémentaire sans aboutir à la mutation désirée. L'analyse de ces divers arrangements moléculaires a conduit à la stratégie de mutagénèse basée uniquement sur par PCR qui fait l'objet de la prochaine section.

**Figure 9: Hybridations possibles de l'oligo produit par PCR asymétrique pour la mutagenèse.**

L'ADN simple brin produit par PCR asymétrique peut s'hybrider de plusieurs façons sur le gène de la xylanase A. A) Appariement recherché qui apporte la bonne mutation. B et C) Hybridations parasites (qui ne produisent aucune mutation). D) Hybridation parasite qui entraîne des mutations non attendues.

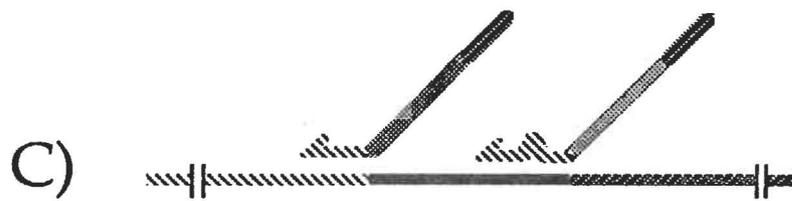
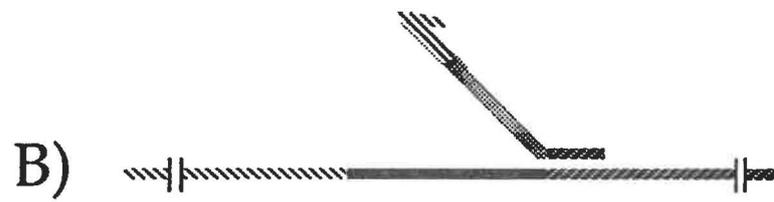
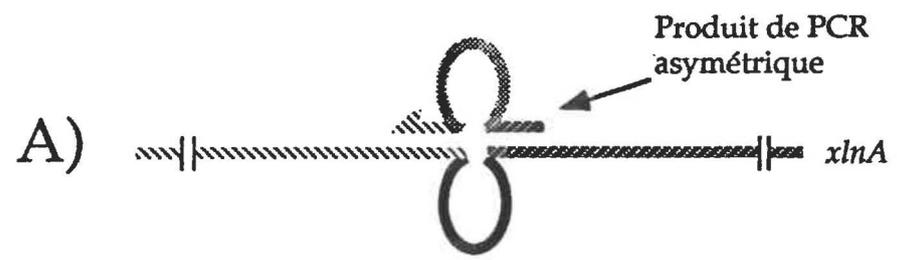
La pointe de flèche représente l'extrémité 3' des amorces.

~~~~~ = Région non traduite adjacente au site d'initiation de la traduction de la xylanase A.

———— = Peptide signal de la xylanase A.

~~~~~ = Peptide signal de la cellulase A.

~~~~~ = Gène de structure de la xylanase A.



4.2.4 Mutagénèse par extension d'amorces chevauchantes synthétisées par PCR.

Cette stratégie de mutagénèse offrait elle aussi l'avantage de changer le p.s. de la xylanase A sans altérer la composition en acides aminés de la protéine mature. Les résultats présentés dans cette section ne concernent que le remplacement du p.s. de la xylanase A par celui de la xylanase B (voir tableau 3). Tel qu'expliqué à la fin de cette section, cette méthode n'a pas conduit à l'obtention de la mutation attendue et elle n'a donc pas été tentée pour générer d'autres mutations. Cette technique proposée par Ho *et al.* (1989) comporte 4 étapes. La figure 10A à D illustre brièvement les différentes étapes de cette méthode.

A) Le p.s. de la xylanase B a été amplifié par les oligos NP-1 et NP-2 qui produisaient un fragment de 120 pb bordé de deux courtes portions de xylanase A de 15 nt. chacune soit un fragment de 150 pb (figure 10A).

B) Cette réaction utilisait le gène de la xylanase A comme matrice et le produit de la première amplification comme amorce avec l'oligonucléotide vec 1 qui s'hybridait à 201 nt. en amont du p.s. de la xylanase A. Après les 5 premiers cycles l'ajout de 100 pmoles de l'oligonucléotide NP-2 stimulait la synthèse du produit de cette PCR pour les 25 cycles suivants. En effet, cette amorce permettait de régénérer les produits de la première amplification utilisés comme amorce et participe aussi à l'amplification du deuxième produit de PCR (voir la figure 10B).

C) La troisième réaction de PCR est décrite à la figure 10C. Cette amplification de la séquence du début de la protéine mature générant une bande de 244 pb lors de l'utilisation des amorces suivantes: l'oligo "810", qui hybridait à 117 nt. en aval du N-terminal de la protéine mature et le produit de la première amplification obtenu en A comme deuxième amorce. Cette

Figure 10: Mutagénèse par extension d'amorces chevauchantes synthétisées par PCR.

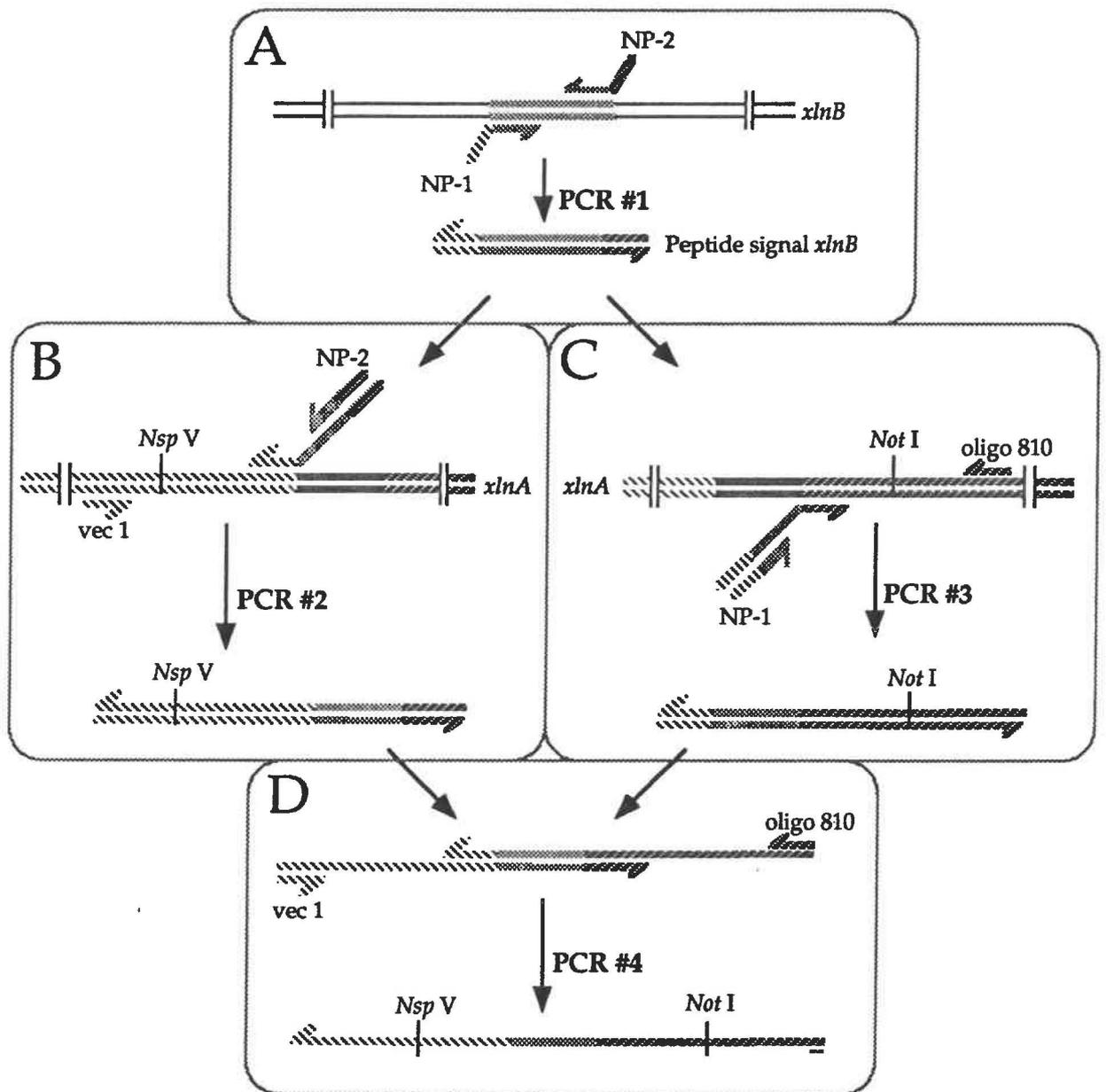
A) Amplification de la séquence codant pour le p.s. de la XlnB avec des amorces dont les extrémités 5' sont compatibles avec le gène *xlnA*. B) Amplification de la région en amont de *xlnA* portant un site *Nsp V*. C) Amplification de la région en aval de la séquence qui code pour le N-terminal de la XlnA portant un site *Not I*. D) Extension et amplification des brins d'ADN des PCR # 2 et 3 se chevauchant. La pointe de flèche représente l'extrémité 3' des amorces.

~~~~~ = Région non traduite adjacente au site d'initiation de la traduction de la xylanase A.

———— = Peptide signal de la xylanase A.

~~~~~ = Peptide signal de la xylanase B.

~~~~~ = Gène de structure de la xylanase A.



troisième PCR était stimulée par l'ajout de 100 pmoles de l'une des amorces ayant participé à la première PCR qui porte le nom d'oligo NP-1 dans ce cas.

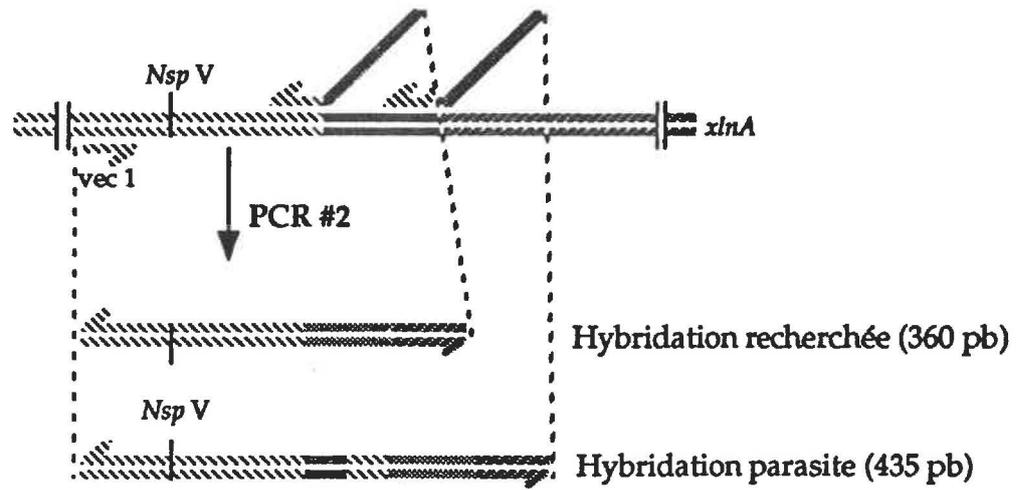
D) Les produits purifiés des étapes d'amplification B et C ont été utilisés comme matrices et les oligonucléotides "810" et "vec 1" comme amorces. Cette PCR générait un fragment de 460 pb (figure 10D). Il a ensuite été extrait du gel et digéré avec les enzymes *Nsp V* et *Not I* produisant un fragment de 291 pb qui a été cloné dans le phagemide contenant le gène *xlnA* préalablement digéré avec les mêmes enzymes. Comme le montre la figure 5 ces sites de restriction sont uniques dans le phagemide. Cette méthode permettait de sélectionner les fragments amplifiés de la taille attendue qui peuvent être séparés sur gel d'agarose. Ainsi lors de la deuxième PCR (étape B) il y a synthèse du fragment de 360 pb recherché et d'un fragment parasite de 435 pb. Ce dernier s'explique en raison de l'homologie entre la région 5' du gène de la xylanase A et la portion 3' de la séquence du p.s. (figure 11).

Finalement la construction a été séquencée afin de vérifier la présence éventuelle de mutations ponctuelles pouvant résulter de ces multiples étapes d'amplification par PCR. Un résultat inattendu a été obtenu. En effet, la mutation n'était pas la bonne et la seule mutation présente était le remplacement du site de reconnaissance de la "signal peptidase" de la xylanase A (AHA \* A) par celui de la xylanase B (TAQA \* A)! Ce mutant appelé cliv. XlnB a été analysé pour la production de xylanase chez *S. lividans*. Cette technique qui donne des résultats imprévisibles a été abandonnée dans la suite du travail.

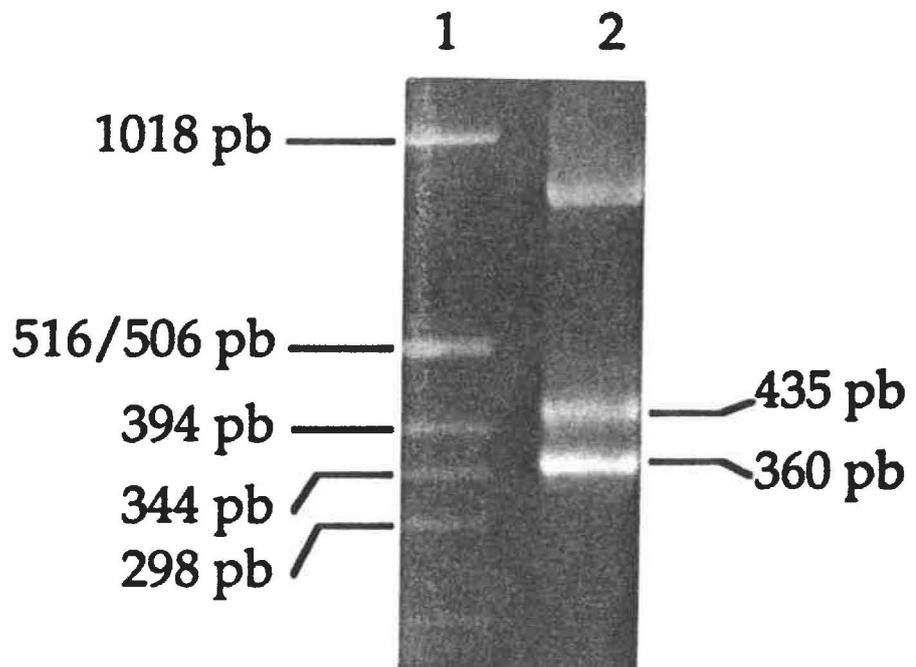
**Figure 11: Distinction entre les produits d'hybridation spécifique et d'hybridation parasite.**

A) Schéma des deux hybridations possibles lors de l'amplification de la région en amont de la xylanase A. B) Séparation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose; 1) échelle de poids moléculaire; 2) produit de PCR.

A)



B)



#### 4.2.5 Mutagénèse par cassette de clonage

Cette technique directe permettait de remplacer une portion d'ADN par une autre en introduisant des sites de restriction de part et d'autre de la région à changer. Elle possède néanmoins un inconvénient. Le changement dans la séquence de quelques nucléotides peut se traduire par des changements dans la composition en acides aminés de la protéine correspondante.

Le principe général de la méthode se présente comme suit: par la technique de mutagénèse de Kunkel, un site de restriction *Hind* III a été introduit en amont du p.s. de la xylanase A et un site *Kpn* I en aval. La séquence du p.s. original pouvait ainsi être remplacée par celle d'un p.s. de toute autre protéine préalablement amplifié par PCR avec deux amorces dont l'une porte le site *Hind* III et l'autre le site *Kpn* I. Avant d'entreprendre la mutagénèse du gène de la xylanase A, celui-ci a été délété de 1441 pb à son extrémité 3' par l'enzyme *Sac* I ce qui élimine le site *Kpn* I de la cassette de clonage multiple du vecteur (figure 5). Le gène code alors pour une xylanase A tronquée (32 kDa au lieu de 43 kDa). Cette délétion n'affecte pas l'activité de l'enzyme mais élimine le domaine de fixation au xylane (Derewenda *et al.*, 1994).

Par la suite, la méthode de mutagénèse dirigée selon Kunkel a été appliquée sur ce phagemide délété afin d'introduire un nouveau site *Hind* III à 16 nt. en amont de l'ATG qui marque le début de la traduction de la protéine. Comme en témoigne la figure 12A, cette mutation ajoutait 2 nt. en amont du site de fixation des ribosomes de la xylanase A ce qui ne modifie pas la région de "Shine-Dalgarno". Simultanément une deuxième mutation ajoutait un site *Kpn* I à 18 nt. en aval de la séquence du N-terminal de la protéine mature. La figure 12B montre que ce changement de nucléotides

remplace l'alanine normalement présente dans la protéine sauvage par une thréonine. La production du clone comportant les deux mutations était identique à celle de l'enzyme sauvage (résultats non présentés).

La délétion de 951 pb par digestion *Hind* III permettait d'enlever le promoteur de la xylanase A et de rapprocher le promoteur P-lac du gène de structure (voir la figure 5). Ainsi le gène pouvait s'exprimer chez *E. coli* et le phagemide ne possédait plus qu'un seul site *Hind* III. Ce nouveau vecteur porte le nom de pIAF 807. Une digestion double avec les enzymes *Hind* III et *Kpn* I permettait de retirer le p.s. de la xylanase A et d'y insérer un nouveau fragment d'ADN portant des extrémités compatibles. Dans un deuxième temps, les séquences qui codent pour les p.s. de diverses protéines provenant aussi bien de *S. lividans* que d'*E. coli* ont été amplifiées par PCR. Puisqu'il y a parfois 2 méthionines possibles pour l'initiation de la traduction de certaines protéines (voir le tableau 3), les deux versions du p.s. de ces protéines ont été amplifiées afin d'en comparer l'effet sur la production de xylanase A. Les oligonucléotides utilisés à cette fin sont décrits à la section matériel et méthodes (tableau 4). Les p.s. proviennent de la mannanase (35 a.a. et 44 a.a.), de la cellulase A (46 a.a. et 27 a.a.), de la cellulase B (40 a.a.), de l'acétyl xylane estérase (41 a.a.), de la xylanase B (41 a.a.), de la xylanase C (49 a.a. et 29 a.a.) et de la protéine LamB d'*E. coli*. (25 a.a.). Ce dernier permettait d'observer l'effet d'un p.s. de bactérie Gram<sup>-</sup>, chez une bactérie Gram<sup>+</sup>.

Afin de permettre l'expression des gènes mutants chez *S. lividans*, il suffisait de sous-cloner le fragment *Hind* III-*Sac* I de pAM19.1 (voir la figure 5) dans un vecteur d'expression pour les streptomycètes pIJ702 (voir section 3.3.2). Précisons que ce dernier portait le gène de la xylanase A et son promoteur (fragment *Sph* I - *Sac* I de 2,15 Kpb) avec le site *Hind* III en amont

**Figure 12: Insertion des sites *Hind* III et *Kpn* I dans le gène de la xylanase A.**

A) La mutation de *xlnA* par introduction d'un site *Hind* III avec l'oligo NP-20 ajoute deux nucléotides représentés par "- -" dans la séquence sauvage. Cet ajout se situe en amont du site de fixation des ribosomes (RBS). B) L'introduction du site *Kpn* I avec l'oligo NP-21 change une alanine (A) pour une thréonine (T). Les acides aminés et les nt. qui diffèrent de l'enzyme sauvage sont soulignés. Les nt. formant les nouveaux sites de restriction sont mis en évidence par des caractères gras, plus grands et l'extrémité N-terminale de la protéine mature est indiquée par la flèche.



du p.s., ajouté par mutagénèse. Les sites *Hind* III et *Sac* I étant uniques dans ce vecteur, il s'agissait d'un clonage directionnel.

La figure 13 présente les résultats d'amplification après séparation des produits par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5%. En effet, la taille des fragments correspond assez bien à la taille prévue selon le nombre d'a.a. Cette taille est calculée en ajoutant au nombre de nt. du p.s. les 22 nt. supplémentaires de l'amorce codante (celle qui porte le site *Hind* III) et les 24 nt. supplémentaires de l'amorce anti-codante (celle qui porte le site *Kpn* I). Toutefois, la résolution de ce type de gel ne permettait pas de discriminer la taille des produits de PCR dont l'écart est inférieur à 10 pb. Les fragments amplifiés par PCR ont été purifiés sur gel d'agarose puis digérés avec les enzymes *Hind* III et *Kpn* I. Par la suite ils ont été ligués au vecteur pIAF807 préalablement digéré par *Hind* III et *Kpn* I pour enlever la séquence codante pour le p.s. sauvage. Par la suite les mutations recherchées ont été confirmées par le séquençage des diverses constructions (résultats non présentés).

#### **4.3 Résultats partie II - Effet du remplacement et de la mutagénèse du p.s. de la xylanase A sur la production d'enzymes chez *S. lividans***

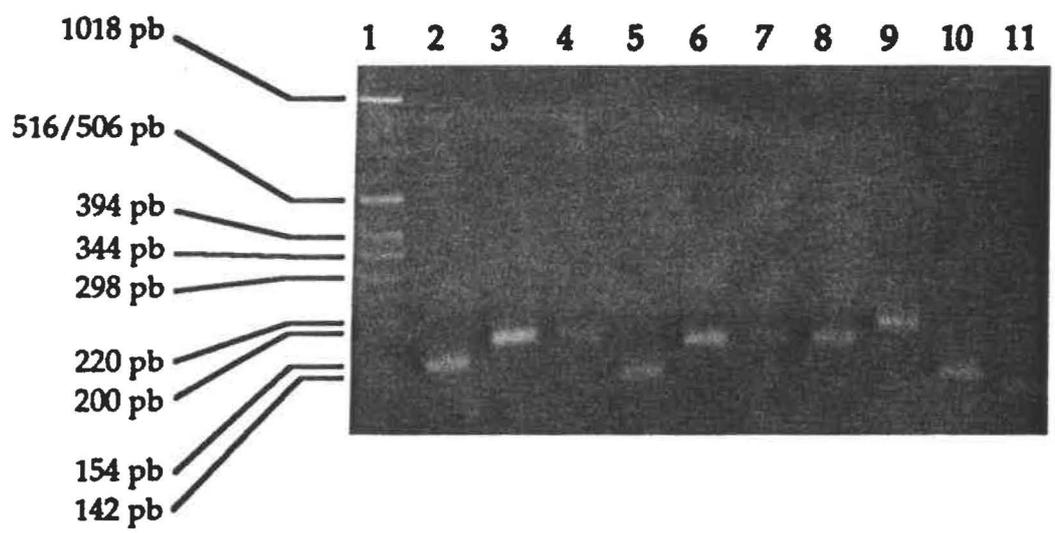
Les prochains résultats concernent la production de xylanase A chez *S. lividans* et correspondent à l'expression des diverses constructions dans la souche 10-164 (voir la section 3.1.2).

##### **4.3.1 Préparation des spores**

Puisqu'il est nécessaire que l'état physiologique des divers clones de *S. lividans* soit identique en début de culture pour permettre leur comparaison, l'utilisation de spores s'est avérée indispensable pour inoculer les milieux de

**Figure 13: Amplification de la séquence de divers peptides signaux par PCR.**

Séparation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. 1) échelle de poids moléculaire; 2) Man-35, 166 pb ; 3) Man-44, 193 pb ; 4) CelA-46, 196 pb ; 5) CelA-27, 139 pb ; 6) CelB, 178 pb ; 7) Axe, 181 pb ; 8) XlnB, 181 pb ; 9) XlnC-49, 205 pb ; 10) XlnC-29, 145 pb ; 11) LamB, 133 pb.



culture. Pour chacune des préparations, une centaine de spores (concentration estimée par densité optique) ont été étalées sur un milieu Stewart RBB-xylane sans thiostrepton. Cette procédure avait trois objectifs. D'une part, la préparation des spores implique plusieurs manipulations, d'où un risque élevé de contaminations. L'absence d'antibiotique dans le milieu permettait aux éventuels contaminants de se développer. Ainsi il a été possible de s'assurer que tous les préparations de spores étaient exemptes de contaminations.

D'autre part la sporulation peut porter atteinte à l'intégrité des plasmides puisque le confinement du matériel génétique dans un espace réduit (la spore) favorise le phénomène de recombinaison chez les streptomycètes (Hopwood *et al.*, 1985). En faisant germer les spores sur un milieu avec RBB-xylane, il a été possible d'évaluer la stabilité des constructions dans les souches ayant sporulé en observant l'uniformité des zones d'hydrolyse résultant de la production de xylanase autour des colonies. Bien que le diamètre des zones soit très variable d'une construction à l'autre, il était remarquablement stable pour un clone donné (résultats non présentés).

Enfin, le nombre réel de spores viables était déterminé par comptage de colonies. La mesure de densité optique de la suspension ne fournit qu'une approximation du nombre de spores viables en solution. Ainsi, comme le montre le tableau 6, le nombre de spores estimé par densité optique était généralement différent du nombre de colonies obtenues sur pétri. Dans ce cas, il est à remarquer que les comptages cellulaires se divisent en deux groupes. Les cinq premières constructions du tableau 6: XlnA, cliv. XlnB, loop out,  $\beta$ -Gal et VDS, montrent un nombre inférieur à  $1 \times 10^9$  spores viables par mL tandis que les mutants Man-35, Man-44, CelA-46, CelB, Axe, XlnB, XlnC-49, XlnC-29 et LamB ont un nombre de spores viables qui est supérieur à  $1 \times 10^9$

**Tableau 6:** Comptage sur pétris du nombre de spores viables pour chaque clone. Selon la D.O. les échantillons sont ajustés à  $1 \times 10^9$  spores par mL et le nombre de spores viables a été déterminé par le décompte du nombre de colonies résultant de la germination des spores sur pétri.

| Construction | Colonies viables<br>(spores / mL) |
|--------------|-----------------------------------|
| XlnA         | $0,69 \times 10^9$                |
| cliv. XlnB   | $0,61 \times 10^9$                |
| loop out     | $0,42 \times 10^9$                |
| $\beta$ -Gal | $0,45 \times 10^9$                |
| VDS          | $0,47 \times 10^9$                |
| Man-35       | $2,49 \times 10^9$                |
| Man-44       | $3,55 \times 10^9$                |
| CelA-46      | $3,40 \times 10^9$                |
| CelB         | $3,03 \times 10^9$                |
| Axe          | $2,23 \times 10^9$                |
| XlnB         | $2,30 \times 10^9$                |
| XlnC-49      | $3,29 \times 10^9$                |
| XlnC-29      | $2,25 \times 10^9$                |
| LamB         | $1,96 \times 10^9$                |

par mL. Cela provient de différences subtiles dans la procédure de préparation des spores entre les deux séries de mutants.

#### 4.3.2 Production de xylanase A2 par *S. lividans* en milieu liquide

L'évaluation de l'influence des mutations du p.s. de la xylanase A et de son remplacement sur la production de la xylanase A2 a été faite en culture liquide. Un milieu de culture minimal permettait d'éviter que ses constituants n'interfèrent lors du dosage des protéines. La procédure de mise en culture des spores décrite par Hopwood *et al.* (1985) comprend normalement une étape de préculture dans un milieu de germination, suivie de lavages et de l'inoculation du milieu de culture proprement dit avec les spores germées. Afin d'éviter des manipulations additionnelles, le milieu de culture liquide M14 a été utilisé. C'est un milieu minimal dérivé du milieu M13 (Ishaque et Kluepfel, 1981) qui ne contient ni protéose peptone ni extrait de levures qui affecteraient le dosage des protéines. Cependant, la germination des spores avec ce type de milieu varie beaucoup en fonction de la source de carbone. Le milieu M14 contenant du xylane d'épautre d'avoine (*oat spelts xylan*) donnait les meilleurs résultats. D'autre part, l'utilisation du xylane de bouleau ou du xylose ne permettaient pas la germination des spores tandis que le glucose ne pouvait être utilisé car il exerce une forte répression catabolique sur les gènes de xylanase (Kluepfel *et al.*, 1986).

#### 4.3.3 Mesure de la croissance du mycélium

Les streptomycètes se développent en mycélium ce qui rend impossible l'utilisation des techniques usuelles d'estimation de la croissance cellulaire basées sur la mesure de densité optique des cultures ou l'énumération des cellules au microscope. La croissance a donc été mesurée

par le dosage des protéines totales de la culture. La procédure consistait à prélever des échantillons d'un mL de culture au cours du temps. Les échantillons ont été sonifiés puis entreposés à - 70°C. Le dosage a été fait selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les graphiques de la figure 14 présentent la courbe de croissance cellulaire des divers clones au cours du temps.

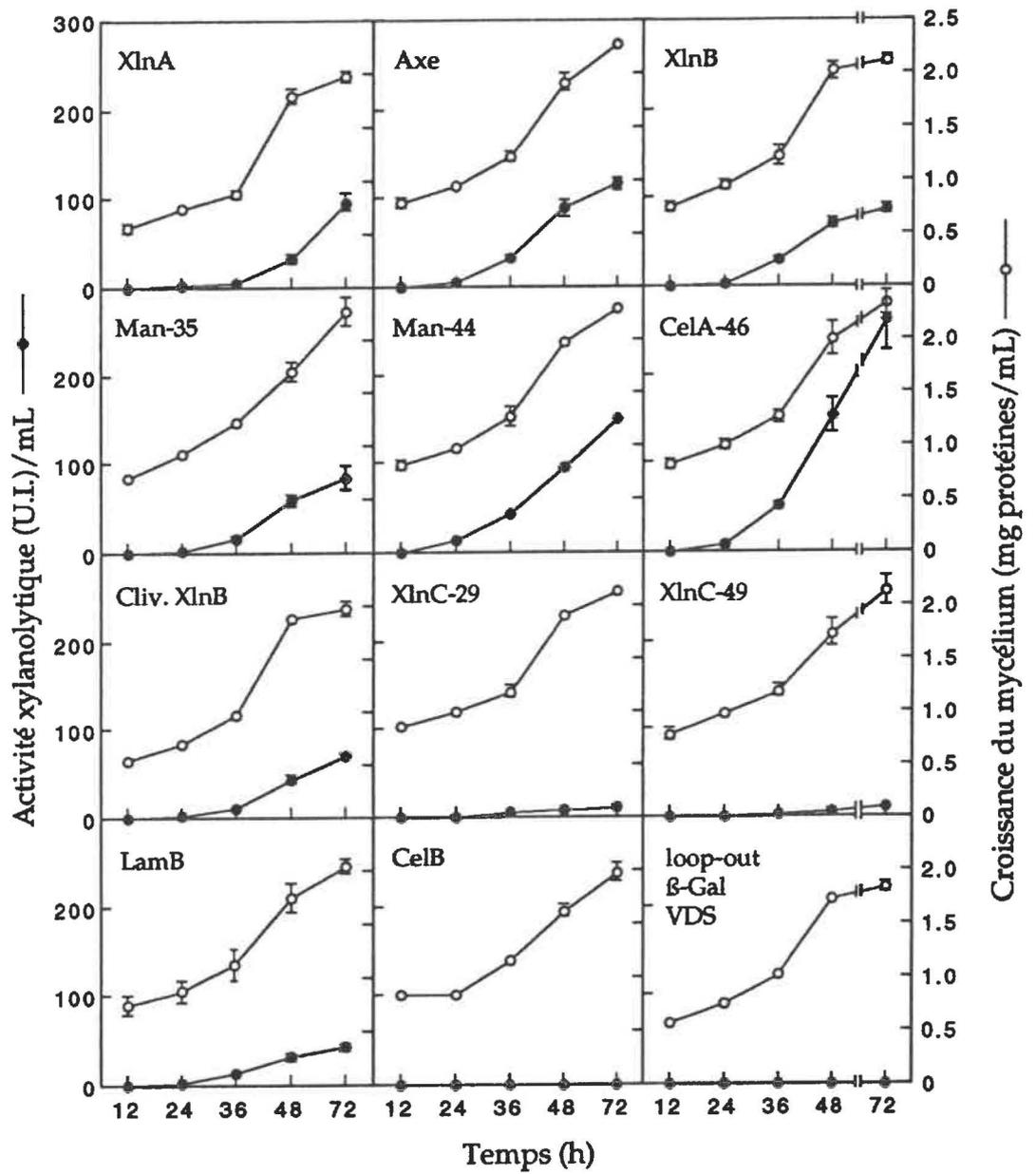
La forme générale de la courbe de croissance de chacun des clones se ressemble beaucoup. Il y a une phase de latence qui dure environ 36 heures. Puis entre 36 et 48 heures, la biomasse s'accroît exponentiellement pour atteindre un plateau à 72 heures. Cependant, la biomasse du mutant Man-35 ne suit pas exactement le profil général de croissance observé puisque la courbe des protéines est plutôt linéaire au cours du temps. Une phase exponentielle de croissance entre 36 et 48 heures n'est donc pas observée. Cependant, à 72 heures la biomasse est la même que celles des autres souches. Une autre particularité des graphiques de la croissance cellulaire concerne l'uniformité des biomasses. Celle-ci se range en deux catégories. Les clones XlnA, loop out,  $\beta$ -gal, VDS et cliv. XlnB ont une biomasse inférieure d'environ 10% par rapport à celles des autres mutants. Ceci est attribuable à la différence des inoculums. Le nombre de spores ajoutées aux milieux de culture était de  $2 \times 10^6$  spores par mL estimé selon la densité optique. Toutefois, comme le montre le tableau 6, la quantité de spores viables n'était pas la même pour ces deux groupes.

#### 4.3.4 Activité xylanasiqne dans le surnageant de culture des clones

L'activité xylanolytique donne une mesure de la quantité de xylanase A2 sécrétée dans le surnageant de culture de chaque clone (voir la figure 14). La forme générale des courbes d'activité ressemble un peu à celles de la croissance cellulaire. Au cours des 24 premières heures il y a peu d'enzymes

**Figure 14: Croissance du mycélium et mesure de l'activité xylanolytique dans le surnageant de culture des clones au cours du temps.**

La croissance du mycélium est estimée par le dosage des protéines totales des échantillons prélevés au cours du temps et s'exprime en mg de protéines par mL de culture. L'activité xylanolytique permet de mesurer la quantité de xylanase A2 libérée dans le surnageant de culture des différents clones. L'activité est exprimée en U.I./mL.



libérées dans le surnageant de culture et cette tendance peut se poursuivre jusqu'à 36 heures pour les clones XlnA, cliv. XlnB, XlnC-29 et 49. Cet épisode correspond à la phase de latence observée au début de la croissance du mycélium. Elle est attribuable au temps de germination des spores et à l'acclimatation du mycélium au milieu de culture. Cette phase initiale est suivie d'une augmentation exponentielle du niveau de production d'enzymes qui ne diminue que légèrement après 48 heures. Cependant les mutants XlnC-29 et 49 ne présentent pas de phase exponentielle de production d'enzymes. Certaines mutations du p.s. réduisent ou même abolissent la production de xylanase A2. Les mutations: loop out,  $\beta$ -gal, VDS et CelB abolissent totalement la production de la xylanase A2 puisqu'aucune activité n'a été détectée dans le surnageant de culture et ce même après 72 heures d'incubation. Pour leur part, les p.s. XlnC-49 et XlnC-29 conduisent à une baisse de production d'environ 90% de celle de la xylanase A2 sauvage après 72 heures. Le p.s. LamB qui provient d'*E. coli* réduit la quantité d'enzymes produites de 55 % de celle de l'enzyme sauvage après 72 heures.

Le remplacement du site de clivage de la xylanase A par celui de la xylanase B (mutant cliv. XlnB) et les mutants Man-35, Axe et XlnB ne causent pour leur part aucun changement dans la production d'enzymes puisque l'activité du surnageant de culture de ces mutants est presque identique à celle du clone sauvage. Enfin, la production d'enzymes est 2 et 2,5 fois supérieure à celle du clone sauvage pour les mutants Man-44 et CelA-46 respectivement.

Les p.s. de la mannanase et de la xylanase C possèdent deux sites possibles d'initiation de la traduction (voir le tableau 3) d'où la construction des mutants Man-35 et 44 et des mutants XlnC-29 et 49. Bien que les deux formes XlnC-29 et XlnC-49 ne présentent aucune différence significative dans

le niveau de production de xylanase A, le mutant Man-44 produit 2 fois plus d'enzymes que le mutant Man-35.

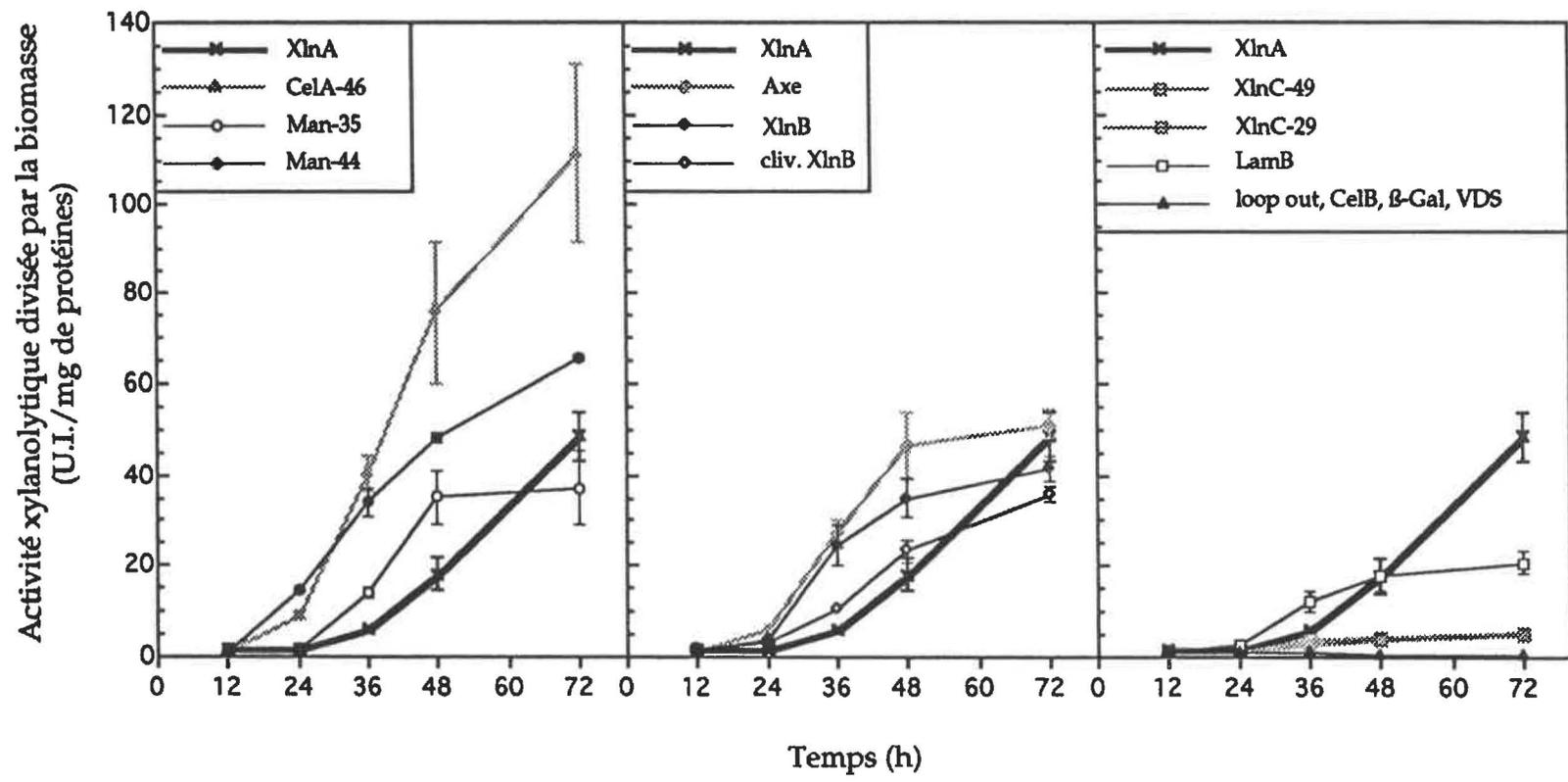
#### 4.3.5 Activité enzymatique en fonction de la croissance bactérienne

Afin d'évaluer la production enzymatique réelle des divers mutants, l'activité enzymatique mesurée doit être exprimée en fonction de la croissance du mycélium. De cette façon il est possible de discriminer entre une augmentation de production simplement due à l'augmentation de biomasse ou celle attribuable au changement apporté dans le gène de la xylanase A. La valeur de l'activité xylanolytique, exprimée en unités internationales (U.I.)/mL, est divisée par celle de la croissance bactérienne, exprimée en mg de protéines/mL. Cette représentation (voir la figure 15) ne fait pas qu'accentuer les tendances déjà observées à la figure 14. Elle permet aussi d'observer une diminution de la pente de l'activité pour la plupart des constructions à partir de 48 heures de culture. L'activité tend même à plafonner pour les mutants XlnC-49, XlnC-29, LamB, et Man-35.

**Figure 15: Activité enzymatique en fonction de la croissance du mycélium au cours du temps.**

Les valeurs d'activité des surnageants de culture exprimées en U.I./mL sont divisées par la biomasse bactérienne calculée en mg de protéines/mL. Les résultats sont exprimés en U.I./mg de protéines.

---



## **5- Discussion**

---

Au moins deux approches différentes peuvent être utilisées pour augmenter la production d'enzymes extracellulaires chez les streptomycètes: (1) augmenter la synthèse de la protéine, à l'aide de promoteurs forts, d'activateurs, etc... et (2) augmenter la sécrétion en optimisant la machinerie d'exportation des protéines (Vigal *et al.*, 1991b).

En introduisant le gène de la xylanase A dans le vecteur à copies multiples pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) il a été possible d'augmenter plus de 60 fois le niveau de synthèse de la protéine comparativement à la souche sauvage (Kluepfel *et al.*, 1986). Ces résultats confirment qu'il est possible d'augmenter fortement le niveau de production de protéines extra-cellulaires chez *S. lividans* et il est acceptable d'envisager une amélioration de la sécrétion en agissant sur la machinerie d'exportation des protéines. Le p.s. étant le caractère qui distingue les protéines destinées à la sécrétion, il apparaît logique d'en étudier les fonctions.

Avant de discuter des effets du remplacement du p.s. et de ceux des mutations portées à cette structure, il serait bon de consacrer quelques lignes aux méthodes de mutagenèse employées pour la construction des mutants.

### 5.1 Critique des méthodes de mutagenèse employées

La mutagenèse par extension d'amorces chevauchantes synthétisées par PCR est couramment utilisée pour fusionner de longs segments d'ADN. Le séquençage du seul mutant obtenu par cette méthode a révélé que le site de reconnaissance de la "signal peptidase" sur le p.s. de la xylanase A (AHA \* A) a été changé par celui de la xylanase B (AQA \* A) au lieu du remplacement du p.s. de la xylanase A par celui de la xylanase B.

La deuxième PCR (figure 10 B) utilise le gène de la xylanase A comme matrice. C'est à cette étape que les résultats d'amplification ont divergé du

mécanisme normalement prévu. Dans cette réaction, il est recommandé d'ajouter 100 pmoles de l'oligonucléotide ayant initialement servi à la synthèse du premier produit de PCR (figure 10 A) et dans cet exemple, il s'agit de l'oligo NP-2. Il permet de régénérer les produits de la première amplification consommés durant la réaction de la deuxième PCR.

La figure 10 A montre que l'extrémité 3' de l'oligo NP-2 est constituée des 15 derniers nt. du p.s. de la xylanase B et ne peut donc pas servir d'amorce sur la xylanase A lors de la deuxième PCR. Dans les faits, la séquence nucléotidique de la fin du p.s. de la XlnA est extrêmement semblable à celle de la fin du p.s. de la XlnB et 26 nt. sur les 30 de l'oligo NP-2 peuvent s'hybrider sur le gène de la xylanase A. Ceci en fait une bien meilleure amorce que le produit de la première amplification. De cette façon, le produit de la deuxième PCR correspond à un p.s. de XlnA dont le site de reconnaissance de la "signal peptidase" est celui de la XlnB.

Compte tenu du pourcentage élevé des nucléotides G et C, qui atteint jusqu'à plus de 85% à l'intérieur des cadres de lecture ouverts (ORF) chez les streptomycètes (Wright et Bibb, 1992), de telles hybridations indésirables sont courantes et la PCR est donc peu approprié pour la mutagenèse chez ces micro-organismes. Les échanges de p.s. par l'introduction de sites de restriction de part et d'autre du p.s. de la xylanase A (méthode par cassette de clonage) représentaient finalement le meilleur compromis. Les autres techniques ont été tentées d'abord parce qu'elles offraient la possibilité d'interchanger les p.s. sans modifier la séquence de la protéine mature. La méthode par cassette de clonage implique en effet le changement d'une alanine pour une thréonine (figure 12) dans la séquence de la protéine mature. Toutefois, cette mutation n'affecte probablement pas le niveau de synthèse de la protéine puisque des quantités semblables de xylanase sont produites avec

le clone sauvage et le clone muté (Morosoli, communication personnelle). De plus, la mutation n'affecte pas l'activité de l'enzyme car elle est située à l'extérieur du domaine catalytique.

## 5.2 Mesure de l'activité enzymatique des surnageants de culture

La xylanase a été choisie dans cette étude pour son intérêt industriel. La mesure de l'activité enzymatique permet de comparer aisément la quantité de xylanase A sécrétée dans les milieux de culture des différents mutants. Il existe des tests à la fois rapides et simples pour mesurer l'activité xylanasique d'un surnageant de culture. Ces tests utilisent des substrats synthétiques comme le PNPC (*para* nitrophénol cellobioside) et le PNPX (*para* nitrophénol xylobioside) qui permettent un dosage colorimétrique direct de l'activité de l'enzyme. Ils sont toutefois inutilisables pour ce travail en raison de la présence de  $\beta$ -glucosidase et de  $\beta$ -xylosidase libérées dans le milieu de culture par la souche 10-164 de *S. lividans* et qui hydrolysent de préférence ces substrats. Pour cette raison il était préférable d'utiliser le test de Miller, basé sur le dosage des sucres réducteurs libérés par l'activité de la xylanase sur le xylane (Miller, 1959), qui est moins affecté par ces contaminants.

## 5.3 Analyse des effets des modifications et du remplacement du p.s. de la XlnA

### 5.3.1 Mutants VDS et "loop-out"

Les pré-protéines dont le site de reconnaissance de la "signal peptidase" est altéré ne sont pas maturées et restent ancrées à la membrane cytoplasmique avec l'extrémité C-terminale exposée du côté periplasmique de la membrane cytoplasmique (Fikes et Bassford, 1987). En supposant que la portion exposée

à l'extérieur de la cellule soit accessible et reconnaissable par les anticorps dirigés contre la XlnA, il serait possible de déterminer le patron de répartition de la protéine dans la membrane et de localiser d'éventuels pores de sécrétion par microscopie électronique. Trois clones sont nécessaires pour tester cette hypothèse, le premier exprimant la xylanase A avec un p.s. normal. Le deuxième clone est le mutant VDS dont le site de clivage de la xylanase A est aboli, ce qui lui permet d'accumuler l'enzyme dans sa membrane. Enfin, en l'absence de p.s., la xylanase A devrait s'accumuler à l'intérieur du troisième mutant.

Tel que prévu, en abolissant le site de reconnaissance de la "signal peptidase" de la XlnA (AHA \* A) par la séquence VDS \* A ou en retirant complètement le p.s., aucune activité n'a été observée dans le surnageant de culture et donc il n'y a plus d'enzyme sécrétée. Une étude détaillée de ces mutants est actuellement en cours et fournit déjà quelques éléments additionnels (Morosoli, communications personnelles) qui méritent d'être mentionnés. D'abord, en supposant que la xylanase A reste captive de la membrane chez le mutant VDS, il était possible que le site actif de l'enzyme soit exposé du côté extra-cellulaire et qu'une activité enzymatique soit détectable à la surface des cellules. Toutefois, aucune activité n'a été associée à la surface des cellules ni aux protéines intra-cellulaires du mutant VDS. De même, le mutant "loop-out" ne possède pas d'activité intra-cellulaire et les anticorps ne détectent pas de protéines pouvant ressembler à la xylanase A à l'intérieur de ces deux mutants. Il se peut donc que l'enzyme soit dégradée en absence de p.s. ou lorsqu'elle n'est pas mature.

### 5.3.2 P.s. $\beta$ -Gal

Le site de clivage du p.s. de la  $\beta$ -galactosidase de *S. lividans* (AVRRAA \* A) (Eckhardt *et al.*, 1987) ne correspond pas à la forme générale AXA \* A et la présence de deux charges positives portées par des résidus arginine tout près du site de clivage, laisse supposer un mécanisme particulier de maturation de cette protéine. Lorsque cette séquence remplace celle de la XlnA, l'effet est comparable à celui de la mutation VDS. Tout se passe comme si la "signal peptidase" ne parvenait plus à maturer la protéine. En fait, Eckhardt et ses collaborateurs ont présenté cette séquence comme site d'action de la "signal peptidase" en se basant uniquement sur le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine mature (Eckhardt *et al.*, 1987). Toutefois, comme le montre le tableau 3, le p.s. de la  $\beta$ -galactosidase de *S. lividans* possède un site potentiel de reconnaissance de la "signal peptidase" juste avant le N-terminal de la protéine mature qui correspond à la forme générale AXA \*A.

Il est donc possible de supposer que le p.s. de cette enzyme se termine plutôt par la séquence "... ASPLTAQA \* AVRRAA \_ A ..." où le symbole "\*" représente le site de coupure du p.s. par la "signal peptidase" et le symbole "\_" représente un site de maturation ultérieure de la protéine. La  $\beta$ -galactosidase de *S. lividans* serait donc probablement un pro-peptide de la famille des pro-peptides courts, présentée à la section 2.3.2 de la revue de littérature. Une autre observation qui supporte l'hypothèse de la séquence AQA \* A comme site de reconnaissance de la "signal peptidase" est qu'une proline précède le site de coupure potentiel "\*" de 6 a.a.

### 5.3.3 P.s. CelB

Il était prévisible que la production de xylanase soit fortement réduite avec le p.s. de la cellulase B. En effet, ce p.s. possède deux leucines codées par

des codons TTA (Wittmann *et al.*, 1994) et les gènes contenant le codon TTA sont rares. Ce codon ne se retrouve que dans des gènes exprimés tardivement car il est sous le contrôle du gène *bald* (*bld A*) qui code pour l'ARN<sub>t</sub> de la leucine (TTA) (Chater *et al.* 1988). Puisque ce gène ne s'exprime que durant la phase secondaire du cycle de vie des streptomycètes, il en va de même pour l'expression des protéines portant le codon TTA (Chater *et al.* 1988). Toutefois, après 72 heures, les cellules ont normalement atteint la phase secondaire dans les conditions de culture utilisées pour les tests (Kluepfel, communication personnelle). Dans ce cas, l'absence d'activité tout au long de l'expérience est quelque peu inattendue. Ayant des caractéristiques peu communes, le p.s. de la cellulase B fait présentement l'objet d'une étude portant sur le remplacement des codons leucine TTA par des codons d'un usage plus courant chez les streptomycètes.

Il a été rapporté que certaines protéines normalement bien sécrétées ne sont plus exportées lorsque leur p.s. est remplacé par certains autres p.s. (Nakamura *et al.*, 1989). C'est peut-être ce qui explique l'absence de production de XlnA par le p.s. de CelB. Il serait donc intéressant d'observer l'effet du p.s. de la cellulase B sur une autre protéine comme la manannase par exemple. Si la production de cette deuxième enzyme n'est pas abolie, il serait possible d'investiguer comment le p.s. de la CelB affecte spécifiquement la production de XlnA. Cette étude serait probablement facilitée par la connaissance de la structure tridimensionnelle de la xylanase A (Derewenda *et al.*, 1994).

#### 5.3.4 Mutant *cliv*. XlnB, p.s. XlnB et p.s. Axe

Le mutant *cliv*. XlnB a permis de confirmer que la "signal peptidase" de *S. lividans* reconnaît tout aussi bien la séquence AHA \* A que la séquence

AQA \* A. La séquence générale AXA \* A du site de reconnaissance de la "signal peptidase" des bactéries Gram<sup>-</sup> (Pugsley, 1993) est aussi commune pour les protéines des streptomycètes (Tableau 3).

Pour ce qui est du mutant Axe, il est à remarquer qu'après 48 heures, le niveau d'enzyme dans le surnageant est déjà comparable à celui du clone sauvage après 72 heures de culture. C'est-à-dire que même si la production d'enzyme atteint un plateau vers 48 heures avec le mutant Axe (figure 15), le rendement peut être considéré comme supérieur puisque la production maximale est atteinte en 2 jours plutôt que 3. De tels résultats offrent un intérêt industriel certain, permettant de réduire de 24 heures le temps de production.

### 5.3.5 P.s. XlnC-49 et XlnC-29

Le niveau de production de xylanase C par la souche sauvage de *S. lividans* est particulièrement faible (Shareck *et al.*, 1991). D'autre part le p.s. de cette enzyme a la particularité de posséder deux codons d'initiation de la traduction. La présomption que le codon utilisé serait la méthionine à 49 a.a. du site de clivage du p.s. s'appuie sur la présence d'un RBS (AGGAG) à 8 nt. en amont de cet ATG (Shareck *et al.*, 1991). De plus, aucun RBS n'est situé à proximité du deuxième ATG situé à 29 a.a. du site de clivage du p.s. Toutefois, il est à remarquer que les 19 a.a. qui séparent le premier et le deuxième ATG ne correspondent pas aux caractéristiques du domaine N d'un p.s. normal (voir tableau 3). Ainsi cette portion comporte deux acides aspartiques (chargés négativement) contre une arginine et une lysine (chargées positivement). D'un autre côté, à partir du deuxième codon ATG la séquence en a.a. correspond davantage au domaine N d'un p.s. avec deux arginines suivies de 18 a.a. hydrophobiques.

La construction des mutants XlnC-49 et XlnC-29 positionne le RBS de la xylanase A respectivement en amont de la première et de la deuxième méthionine du p.s. de la xylanase C. Chez le mutant XlnC-29, le niveau de production d'enzyme relativement faible (environ 10% de la XlnA sauvage) peut s'expliquer par la taille relativement courte de ce p.s. (29 a.a.) et par la faible polarité positive de son extrémité N-terminale (deux arginines). En effet, l'extrémité N-terminale des p.s. de bactéries Gram<sup>+</sup> possède davantage de charges positives et les p.s. sont aussi plus longs (Itoh *et al.*, 1990). Néanmoins, le p.s. original de la xylanase C ne possède pas de RBS en amont de cette méthionine et il est remarquable que le niveau de production de xylanase A soit le même pour les mutants XlnC-29 et XlnC-49 (voir figure 15).

Pour déterminer si la traduction normale débute à partir de la première ou de la deuxième méthionine, il suffirait d'introduire un changement dans le cadre de lecture entre les deux codons ATG. Si le niveau de production d'enzyme est réduit à zéro, cela indiquera que le premier codon ATG est utilisé pour initier la traduction. D'autre part, si le deuxième codon ATG est celui responsable de l'initiation de la traduction, il resterait à déterminer où se situe son RBS.

Enfin, cette étude a permis d'incriminer le p.s. de la xylanase C dans le faible rendement de cette enzyme observé par Shareck et ses collaborateurs (1991) chez la souche sauvage de *S. lividans*. Malgré tout, une question se pose. Quel est l'avantage évolutif qui a conduit à la sélection d'un p.s. aussi restrictif sur l'expression de la xylanase C ?

### 5.3.6 P.s. Man-35 et Man-44

Le cas du p.s. de la manannase est tout aussi intéressant. Tout comme le p.s. de la XlnC, il possède deux codons possibles d'initiation de la traduction

ATG (voir tableau 3) mais cette fois, le RBS est situé à 9 nt. en amont de la deuxième méthionine ce qui génère un p.s. de 35 a.a. Il comporte deux arginines (donc deux charges positives) à son extrémité N-terminale et une troisième à 4 a.a. du site de clivage. Le site de reconnaissance de la "signal peptidase" est donc "RAEA \* A". Malgré cette singularité, il conduit à une production de xylanase A comparable à celle du gène sauvage (voir figure 14).

La construction du mutant Man-44 ajoute un RBS en amont du premier ATG. Le p.s. de ce mutant possède 4 arginines additionnelles, faisant passer la charge positive de l'extrémité N-terminale de +2 à +6. De plus, le p.s. de ce mutant possède deux RBS et deux codons d'initiation de la traduction. Comme le montre la figure 14, le niveau de production de xylanase A avec ce p.s. est environ deux fois supérieur à celui du gène sauvage. Pour déterminer si cette amélioration résulte d'une utilisation coopérative des deux sites d'initiation, il suffirait de changer la deuxième méthionine pour un a.a. qui ne peut servir de codon d'initiation afin d'obliger le système de traduction à n'utiliser que la première méthionine. Ce type d'expérience a déjà été réalisé avec le gène codant pour la protéine SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) qui possède lui aussi deux séquences de Shine-Dalgarno et deux codons d'initiation ATG (Obata *et al.*, 1989). Dans le cas de mutants ne possédant qu'un des deux ATG, le niveau de production de l'enzyme est comparable à celui du gène sauvage (Taguchi *et al.*, 1991). Les auteurs en concluent que chez *S. lividans*, les deux méthionines ne fonctionnent pas de façon coopérative. Toutefois, ces gènes mutants exprimés chez *E. coli* produisent notablement moins d'enzyme que le clone portant le gène sauvage qui possède les deux ATG. Il semble donc qu'*E. coli* utilise avantageusement les deux méthionines (Taguchi *et al.*, 1991). Il serait intéressant de comparer le

niveau d'expression des mutants Man avec celui de l'enzyme sauvage chez *E. coli*.

En se basant sur les travaux de Taguchi et ses collaborateurs (1991), il est possible que l'utilisation des deux ATG du p.s. de Man-44 ne soit pas coopérative chez *S. lividans*. Dans ce cas, l'augmentation de la production de xylanase A serait probablement due à une augmentation de la charge positive du domaine N-terminal du p.s. Par exemple, il a été possible d'augmenter par deux ou trois fois l'expression de l' $\alpha$ -amylase de *S. griseus* chez *S. lividans* en remplaçant une alanine par une arginine dans la région N-terminale du p.s. (Vigal *et al.*, 1991b).

### 5.3.7 CelA-46

Le p.s. de la cellulase A est particulier à bien des égards. D'abord, il ne possède pas de codon d'initiation ATG ou GTG précédé d'un RBS. Toutefois, un codon TTG, précédé d'un RBS (GGAGG), a été proposé comme site d'initiation de la traduction puisque ce genre de codon d'initiation a déjà été rapporté pour certains gènes de procaryotes (Théberge *et al.*, 1992). De plus, ce codon TTG est précédé d'un palindrome de 14 nt. comme pour le gène de la cellulase du streptomycète KSM-9 (Nakai *et al.*, 1988). Ainsi le p.s. de la cellulase A de *S. lividans* aurait 27 a.a. dont une lysine et une arginine (pour un total de 2 charges positives) à l'extrémité N-terminale.

D'autre part, le codon d'initiation TTG est précédé d'un codon ATG à 57 nt. en amont mais ce dernier n'a pas de RBS, raison pour laquelle il n'avait pas été reconnu comme codon d'initiation. Il conduirait à la formation d'un p.s. de 46 a.a. dont l'extrémité N-terminale porterait 5 arginines et une lysine faisant passer la charge positive de cette région de +2 à +6. Ainsi la construction du mutant CelA-46 a été tentée en introduisant le RBS de la XlnA

en aval de cette méthionine. La production de xylanase A avec ce p.s. est environ 2,5 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage, alors qu'elle est nulle avec le mutant CelA-27 (Morosoli, communication personnelle).

Ces résultats indiquent que le codon d'initiation du p.s. de CelA n'est pas le TTG proposé originalement. Le niveau très élevé de production d'enzyme par le mutant CelA-46 pourrait s'expliquer par la forte polarité positive de l'extrémité N-terminale ou par une stabilité supérieure de l'ARN messager de CelA-46 comparativement au gène sauvage. Cette hypothèse se base sur la présence du palindrome de 14 nt. qui se situe juste après l'ATG de CelA-46.

### 5.3.8 P.s. LamB

Ce mutant a permis de confirmer une observation déjà bien documentée: à savoir que les p.s. des bactéries Gram<sup>-</sup> sont généralement peu fonctionnels chez les bactéries Gram<sup>+</sup> (Simonen et Palva, 1993). Ainsi, la production de xylanase A par ce mutant est d'environ la moitié de celle de la souche sauvage.

En s'inspirant de la séquence du p.s. de la protéine LamB, il est possible de concevoir une autre expérience d'optimisation des p.s. En effet, ce p.s. débute par deux méthionines successives ce qui facilite peut-être l'initiation de la traduction. De plus, ce p.s. comporte deux sites successifs de reconnaissance de la "signal peptidase" soit la séquence "AQA \* AQA \* A". Ayant démontré l'importance de la maturation des protéines pour leur libération dans le milieu, un double site de clivage pourrait être avantageux. Toutefois, l'influence qu'auraient ces deux particularités du p.s. de LamB ajoutées à un p.s. typique de *S. lividans* reste à démontrer.

#### 5.4 Études devant faire suite à ces travaux

La forte sécrétion d'une protéine semble réduire la sécrétion des autres protéines chez *Bacillus* (Vehmaanperä, 1990) et chez *S. lividans* (Shareck, communication personnelle). Inversement, la délétion des gènes codant pour des exo-protéines normalement bien exprimées chez *Bacillus* peut augmenter le rendement d'une protéine désirée (Vehmaanperä, 1990). Ceci suggère qu'il existe une compétition pour les sites de sécrétion dans la cellule et qu'en éliminant un des compétiteurs, la machinerie de sécrétion peut transporter une plus grande quantité de la protéine désirée. Une autre approche pour augmenter la production d'une enzyme (et qui a fait l'objet de ces travaux) consiste à améliorer les interactions de la protéine avec la machinerie de sécrétion de façon à la rendre plus compétitive. Des études de "pulse-chase" permettraient de vérifier si un p.s. donné facilite ou non le transport de la xylanase A en visualisant la vitesse de disparition de la pré-protéine. De plus, cette méthode permet de mesurer si le niveau de synthèse d'une protéine dépasse les capacités de sécrétion (Simonen et Palva, 1993). Toute augmentation ou diminution de la quantité du précurseur de la xylanase A dans les cellules est directement attribuable à l'action du p.s.

Les études quantitatives de l'ARN messager de la xylanase A produit par les clones sont essentielles pour s'assurer que les variations du niveau de production de la XlnA ne sont pas attribuables à des variations de transcription.

## **6- Conclusion**

---

Les principales difficultés rencontrées dans ces travaux concernent la mutagénèse basée sur le PCR. En raison du haut contenu en G et C dans le génome de *S. lividans*, il est parfois difficile de concevoir des amorces vraiment spécifiques à certaines régions. Même avec l'assistance d'un micro-ordinateur, il n'est pas toujours possible de prédire les résultats d'amplification. Pour la mutagénèse, il est préférable d'utiliser des méthodes comme celle de Kunkel qui offre moins de souplesse sur la taille des sections à muter mais qui est beaucoup plus prévisible. En introduisant des sites de restriction uniques de part et d'autre du p.s. de la XlnA, il a finalement été possible d'interchanger son p.s. avec ceux d'autres enzymes.

Il était déjà connu que la séquence en a.a. du p.s. d'une protéine donnée n'est pas nécessairement celle qui conduit à la meilleure sécrétion et qu'il est possible d'améliorer son efficacité par mutagénèse. Ainsi, en remplaçant une alanine par une arginine dans la région N-terminale du p.s. de l' $\alpha$ -amylase de *S. griseus*, il a été possible d'augmenter par deux ou trois fois sa production chez *S. lividans* (Vigal *et al.*, 1991b). Les résultats des travaux faisant l'objet de ce mémoire démontrent que le remplacement du p.s. original de la xylanase A par ceux d'autres protéines sécrétées n'a généralement aucun effet mesurable et peut même conduire à une baisse de la quantité de protéines sécrétées. Il semble néanmoins possible d'améliorer la composition du p.s. de cette enzyme. L'effet le plus remarquable a été observé avec le p.s. de la cellulase A qui augmente de 2,5 fois la production de la xylanase A. Il reste encore quelques travaux à faire pour comprendre la nature exacte de cette augmentation et il est probable que les connaissances acquises pourront s'appliquer à d'autres protéines. Ces travaux suggèrent donc que la sur-expression de toute protéine, tant homologue qu'hétérologue, devrait passer par un processus d'optimisation du p.s. Compte tenu des améliorations

quantitativement appréciables dans la production d'une protéine simplement en agissant au niveau du p.s., il est fondamental d'approfondir nos connaissances sur cette séquence. Une compréhension plus détaillée des relations entre la séquence en a.a. du p.s. et son efficacité à promouvoir la sécrétion d'une protéine donnée aurait des conséquences d'une très grande portée dans le domaine des biotechnologies. Certaines questions sont toujours sans réponse. Quelles sont les pressions sélectives qui imposent les différences observées au niveau du p.s. des protéines de bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> ? Si le p.s. d'une protéine ne conduit pas à son exportation maximale, se pourrait-il qu'il soit impliqué aussi dans la régulation de l'exportation de la protéine dans le milieu ? Ces travaux soulèvent aussi une autre interrogation à propos des sites de fixation des ribosomes chez *S. lividans*. Dans certains cas, des séquences consensus peuvent être identifiées mais le cas de la cellulase A suggère que les connaissances sont encore incomplètes dans ce domaine. Il est en effet étrange que la seule séquence correspondant à un site de fixation des ribosomes se trouve à l'intérieur même du p.s.

Finalement, il ne faut pas considérer le p.s. comme étant la pierre angulaire des recherches visant à améliorer la sécrétion des protéines. Une autre stratégie très prometteuse pour contourner les limitations de la machinerie d'exportation serait de sur-exprimer les composantes du système de sécrétion. En raison de son implication dans la sécrétion, chaque protéine Sec recèle un certain potentiel d'optimisation. Déjà les gènes des protéines SecA et SecY ont été clonés et sont en cours de caractérisation. La sur-production, d'une ou de plusieurs de ces protéines devrait permettre d'améliorer encore la sécrétion. Puisque leurs fonctions sont complémentaires à celles du p.s., il est possible que leur sur-expression combinée à un p.s. optimisé sera synergique.

## **7- Remerciements**

Plusieurs personnes sont à remercier tout particulièrement pour leur apport dans la réalisation de mes travaux de maîtrise. D'abord, je me dois de mentionner mon professeur titulaire, le Dr Rolf Morosoli, qui a su baliser mes efforts et mettre mes énergies à profit. Je suis aussi très reconnaissant envers le Dr François Shareck pour la générosité de son support qui s'est entre autre manifesté sous forme de conseils applicables partout et par d'innombrables tasses de café ;-).

Je réserve la portion centrale de mes remerciements à Serge Durand. Il est vraiment celui qui m'a fourni un enseignement et une assistance technique de tous les instants ce qui l'associe étroitement à la qualité des résultats obtenus. Plus qu'un collègue de labo, c'est un ami avec qui j'espère partager encore quelques bonnes sorties.

J'aimerais profiter de cet espace pour remercier un autre bon ami, le Dr Michel Gilbert, qui a porté une attention soutenue à ma progression et dont je suis fier d'avoir subi l'influence. Il ne faudrait pas oublier non plus le Dr Kluepfel dont les conseils m'ont décidé à entreprendre une carrière scientifique, et les deux techniciennes Lise Trempe et Liette Biron.

Enfin, l'espace me manque pour citer tous les nombreux amis de l'institut qui ont vraiment été ma famille durant ces deux superbes années. Je dois au moins mentionner Catherine<sup>3</sup>, Pierre, Francis, Éric, Stéphane, Martin, Bertrand, François W., le groupe du volley-ball, des 5 à 7, des partys, des sorties en plein air, le groupe d'histo., etc.

## **8- Bibliographie**

---

AKITA, M., S. SASAKI, S. I. MATSUYAMI 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. 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. EMBO J. 6: 3465-3470.

ALTMAN, E., V. A. BANKAITIS et S. D. EMR. 1990a. Characterisation of a region in mature LamB protein that interacts with a component of the export machinery of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265: 18148-18153.

ALTMAN, E., S. D. EMR et C. A. KUMAMOTO. 1990b. The presence of both the signal sequence and a region of mature LamB protein is required for the interaction of LamB with the export factor SecB. J. Biol. Chem. 265: 18154-18160.

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

ANNÉ, J., I. VAN MELLAERT, F. CORNETTE, B. BRAU, et H. EYSSEN. 1991. Secretion of murine interferon- $\alpha$  by *Streptomyces* using the  $\alpha$ -amylase signal peptide. Proc. of the Eighth International symposium on Actinomycete Biology. P1-001.

ARCAND, N., D. KLUEPFEL, F. W. PARADIS, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1993.  $\beta$ -mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the manA gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. 290: 857-863.

ARGARANA, C. E., I. D. KUNTZ, S. BIRKEN, R. AXEL et C. R. CANTOR. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. Nucl. Acids Res. 1871-1882.

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.

BAHRI, S. M. et M. WARD. 1990. Regulation of a thermostable  $\alpha$ -amylase of *Streptomyces thermoviolaceus* CUB74: maltotriose is the smallest inducer. Biochimie. 72: 893-895.

BEHNKE, D. 1992. Protein export and the development of secretion vectors. DOI, R. H. et M., MCGLOUGHLIN. (Eds.), Biology of Bacilli: Applications to industry. Butterworth-Heinemann, Boston. pp. 143-188.

BENDER, E., K. P. KOLLER et J. W. ENGELS. 1990a. Secretory synthesis of human interleukin-2 by *Streptomyces lividans*. Gene. 86: 227-232.

- BENDER, E., R. VOGEL, K. P. KOLLER et J. ENGELS. 1990b. Synthesis and secretion of hirudin by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 203-207.
- BERNAN, V., D. FILPULA, W. HERBER, M. BIBB et E. KATZ. 1985. The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene.* **37**: 101-110.
- BERTRAND, J. L., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1989. Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 791-794.
- BERTRAND, J. L.. 1988. Purification et étude de l'expression de la xylanase (endo-1,4- $\beta$ -xylanase) du clone *Streptomyces lividans* IAF18. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier. 87 pp.
- 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.
- BIRNBOIM, H. C. et J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* **7**: 1513.
- BORCHERT, T. V. et V. NAGARAJAN. 1990. Structure-function studies on the *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase signal peptide. *Genetic and Biotechnology of Bacilli.* **3**: 171-177.
- BORCHERT, T. V. et V. NAGARAJAN. 1991. Effect of signal sequence alterations on export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 276-282.
- BOWDEN, G. A., F. BANEYX et G. GEORGIU. 1992. Abnormal fractionation of  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli*: evidence for an interaction with the inner membrane in the absence of a leader peptide. *J. Bacteriol.* **174**: 3407-3410.
- BRIGGS, M. et L. GIERASCH. 1984. Exploring the conformational role of signal sequences: synthesis and conformational analysis of l-receptor protein wild-type and mutant signal peptides. *Biochem.* **23**: 3111-3114.
- BRIGGS, M., D. CORNELL, R. DLUHY et L. GIERASCH. 1986. Conformations of signal peptides induced by lipids suggests initial steps in protein export. *Science.* **233**: 206-208.
- BRIGGS, M., L. GIERASCH, A. ZLOTNICK, J. LEAR et W. DeGRADO. 1985. *In vivo* function and membrane binding properties are correlated for *Escherichia coli* LamB signal peptides. *Science.* **228**: 1096-1099.

- 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.
- BUNDAGE, L., C. FIMMEL, S. MIZUSHIMA et W. WICKNER. 1992. SecY, SecE, and band 1 from the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* 267: 4166-4170.
- BURNETT, W. V., J. HENNER et T. ECKHARDT. 1987. The nucleotide sequence of the gene coding for XP55, a major secreted protein from *Streptomyces lividans*. *Nucl. Acids Res.* 15: 3926.
- BUTLER, M. J., A. BERGERON, G. SOOSTMEYER, T. ZIMNY et L. T. MALEK. 1993. Cloning and characterisation of an aminopeptidase P-encoding gene from *Streptomyces lividans*. *Gene*. 123: 115-119.
- BUTLER, M. J., C. C. DAVEY, P. KRYGSMAN, E. WALCZYK et L. T. MALEK. 1992. Cloning of genetic loci involved in endoprotease activity in *Streptomyces lividans* 66: a novel neutral protease gene with an adjacent divergent putative regulatory gene. *Can. J. Microbiol.* 38: 912-920.
- BUTLER, M. J., J. S. APHALE, C. BINNIE, M. A. DIZONNO, P. KRYGSMAN, G. A. SOLTES, E. WALCZYK et L. T. MALEK. 1994. The Aminopeptidase N-Encoding Pepn Gene of *Streptomyces Lividans* 66. *Gene*. 141: 115-119.
- BUTTNER, M. J., I. M. FEARNLEY et M. J. BIBB. 1987. The agarase gene (dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* 209: 101- 109.
- CERRETTI, D. P., D. DEAN, G. R. DAVIS, D. 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. *Nucleic Acids Res.* 11: 2599-2616.
- CHANG, P. C., T. C. KUO, A. A. TSUGIT et Y. H. LEE. 1990. Extracellular metalloprotease gene of *Streptomyces cacaoi*: structure, nucleotide sequence and characterization of the cloned gene product. *Gene*. 88: 87-95.
- CHANG, S. Y. et S. CHANG. 1988. Secretion of heterologous proteins in *Streptomyces lividans*. *Proc. of Seventh Intl. Symposium on Biology of Actinomycetes.* 103-106.
- CHEN, L. et P. TAI. 1985. ATP is essential for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 169: 2373-2379.
- CHEN, L. Y., W. M. LEU, K. T. WANG et Y. H. LEE. 1992. Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1. *J. Biol. Chem.* 267: 20100-20107.

- CHEN, L., P. C. TAI, M. S. BRIGGS et L. M. GIERASCH. 1987. Protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles is inhibited by functional synthetic signal peptides. *J. Biol. Chem.* 262: 1427-1429.
- COLLIER, D. N. et P. J. BASSFORD. 1989. Mutations that improve export of maltose-binding protein in Sec<sup>-</sup> cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 4640-4647.
- COLLIER, D. N., V. A. BANKAITIS, J. B. WEISS et P. J. BASSFORD. 1988. The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein. *Cell.* 53: 273-283.
- 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.
- CUNNINGHAM, K. et W. WICKNER. 1989. Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8630-8634.
- DALBEY, R. E. et W. WICKNER. 1985. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 260: 15925-15931.
- DE VRIJE, T., J. TOMMASSEN et B. de KRUIJFF. 1987. Optimal posttranslational translocation of the precursor of PhoE protein across *Escherichia coli* membrane vesicles requires both ATP and the proton motive force. *Biochim. Biophys. Acta.* 900: 63-72.
- DEHOTTAY, P., J. DUSART, F. DE MEESTER, B. JORIS, J. VAN BEEUMEN, T. ERPICUM, J. M. FRÈRE et J. M. GHUYSEN. 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the *Streptomyces albus* G  $\beta$ -lactamase precursor. *Eur. J. Biochem.* 166: 345-350.
- DEREWENDA, U., L. SWENSON, R. GREEN, Y. Y. WEI, R. MOROSOLI, F. SHARECK, D. KLUEPFEL et Z. S. DEREWENDA. 1994. Crystal structure, at 2.6-angstrom resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *J. Biol. Chem.* 269: 20811-20814.
- DERMAN, A. I., J. W. PUZISS, J. P. BASSFORD et J. BERCKWITH. 1993. A signal sequence is not required for protein export in *prlA* mutants of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12: 879-888.
- DOUD, S. K., M. M. CHOU et D. A. KENDALL. 1993. Titration of protein transport activity by incremental changes in signal peptide hydrophobicity. *Biochemistry.* 32: 1251-1256.
- DOUVILLE, K., M. LEONARD, L. BRUNDAGE, K. NISHIYAMA, H. TOKUDA, S. MIZUSHIMA et W. WICKNER. 1994. Band 1 subunit of

- Escherichia coli* preprotein translocase and integral membrane export factor P12 are the same protein. *J. Biol. Chem.* 269: 18705-18707.
- DUEZ, C., C. PIRON-FRAIPONT, B. JORIS, J. DUSART, M. S. URDEA, J. A. MARTIAL, J. M. FRERE et J. M. GHUYSEN. 1987. Primary structure of the *Streptomyces R61* extracellular DD-peptidase. 1. Cloning into *Streptomyces lividans* and nucleotide sequence of the gene. *Eur. J. Biochem.* 162: 509-518.
- ECKHARDT, T., J. STRICKLER, L. GORNIK, W. BURNETT et L. R. FARE. 1987. Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted  $\beta$ -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 169: 4249-4256.
- EMR, S. D., S. HANLEY-WAY et T. J. SILHAVY. 1981. Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell.* 23: 79-88.
- ENGELS, J. W. et K. P. KOLLER. 1992. Gene expression and secretion of eukaryotic foreign proteins in *Streptomyces*. In: MURRAY, J. A. H., Ed. *Transgenesis*. : John Wiley & Sons. 31-53.
- FECYZE, I. T. et G. BLOBEL. 1987. Soluble factors stimulating secretory protein translocation in bacteria and yeast can substitute for each other. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 3723-3727.
- FERENCI, T. et L. L. RANDALL. 1979. Precursor maltose-binding protein is active in binding substrate. *J. Biol. Chem.* 254: 9979-9981.
- FERENCI, T. et T. SILHAVY. 1987. Sequence information required for protein translocation from the cytoplasm. *J. Bacteriol.* 169: 5339-5342.
- FIKES, J. D. et P. J. BASSFORD. 1987. Export of unprocessed maltose-binding protein to the periplasm of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 169: 2353-2359.
- FIKES, J. D. et P. J. BASSFORD. 1989. Novel *secA* alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide. *J. Bacteriol.* 171: 402-409.
- FIKES, J. D., G. A. BARKOCY-GALLAGHER, D. G. KLAPPER et P. J. BASSFORD. 1990. Maturation of *Escherichia coli* maltose-binding protein by signal peptidase I *in vivo*. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site. *J. Biol. Chem.* 265: 3417-3423.
- FLOWER, A. M., R. C. DOEBELE et T. J. SILHAVY. 1994. Pr1A and Pr1G suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J. Bacteriol.* 176: 5607- 5614.
- FORNWALD, J. A., M. J. DONOVAN, R. GERBER, J. KELLER, D. P. TAYLOR, E. J. ARCURI et M. E. BRAWNER. 1993. Soluble Forms of the Human T-Cell Receptor CD4 Are Efficiently Expressed by *Streptomyces-Lividans*. *Bio - Technology.* 11: 1031-1036.

- FORSMAN, M., L. LINDGREN, B. HAGGSTROM ET B. JAURIN. 1989. Transcriptional induction of *Streptomyces cacaoi* beta-lactamase by a beta-lactam compound. *Mol. Microbiol.* 3: 1425-1432.
- GANNON, P. M., P. LI ET C. A. KUMAMOTO. 1989. The mature part of *Escherichia coli* maltose-binding protein (MBP) determines the dependence of MBP on SecB for export. *J. Bacteriol.* 171: 813-818.
- 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.
- GELLER, B., N. MOVVA ET W. WICKNER. 1986. Both ATP and the electrochemical potential are required for optimal assembly of pro-OmpA into *Escherichia coli* inner membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4219-4222.
- GILBERT, M., S. DURAND, D. KLUEPFEL, F. SHARECK ET R. MOROSOLI. 1994. Cloning, sequencing and characterization of the *secA* gene from *Streptomyces lividans*. Abstr. P. 267. Seventh International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, GIM 94. National Research Council of Canada, Montréal, Canada.
- GRAY, G., G. SELZER, G. BUELL, P. SHAW, S. ESCANEZ, S. HOFER, P. VOEGELI ET C. J. THOMPSON. 1984. Synthesis of bovine growth hormone by *Streptomyces lividans*. *Gene.* 32: 21-30.
- GUIJARRO, J., R. SANTAMARIA, A. SCHAUER ET R. LOSICK. 1988. Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J. Bacteriol.* 170: 1895-1901.
- HALE, V., M. MCGREW, B. CARLSON ET J. L. SCHOTTEL. 1992. Heterologous expression and secretion of a *Streptomyces scabies* esterase in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 2431-2439.
- HARTL, F. U., S. LECKER, E. SCHIEBEL, J. P. HENDRICK ET W. WICKNER. 1990. The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell.* 63: 269-279.
- HENDERSON, G., P. KRYGSMAN, C. J. LIU, C. C. DAVEY ET L. T. MALEK. 1987. Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 169: 3778-3784.
- HO, S. N., H. D. HUNT, R. M. HORTON, J. K. PULLEN, L. R. PEASE. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 77: 51-59.

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 Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich: The John Innes Foundation.

HOSHIKO, S., O. MAKABE, C. NOJIRI, K. KATSUMATA, E. SATOH et K. NAGAOKA. 1987. Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygroscopicus*  $\alpha$ -amylase gene. J. Bacteriol. 169: 1029-1036.

HOYT, D. W. et L. M. GIERASCH. 1991. A peptide corresponding to an export-defective mutant *OmpA* signal sequence with asparagine in the hydrophobic core is unable to insert into model membranes. J. Biol. Chem. 266: 14406-14412.

IKEMURA, H., H. TAKAGI et M. INOUE. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262: 7859-7864.

ILLINGWORTH, C., G. LARSON et G. HELLEKANT. 1989. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans*. J. Indust. Microbiol. 4: 37-42.

IMANAKA, T., W. OSHIHARA, T. HIMENO et S. AIBA. 1983. Comparative studies on extracellular penicillinases of the same structure gene, *panP*, expressed in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 129: 2621-2628.

INOUE, H. et J. BECKWITH. 1977. Synthesis and processing of alkaline phosphatase precursor *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 1440-1444.

ISHAQUE, M. ET D. KLUEPFEL. 1981. Production of xylanolytic enzymes by *Streptomyces flavogriseus*. Biotechnol. Lett. 3: 481- 486.

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

ITO, K. 1982. Purification of the precursor form of maltose-binding protein, a periplasmic protein of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 257: 9895-9897.

ITO, K. 1992. *SecY* and integral membrane components of the *Escherichia coli* protein translocation system. Mol. Microbiol. 5: 2423-2428.

ITOH, Y., K. KANO, K. NAKAMURA, K. TAKASE et K. YAMANE. 1990. Artificial insertion of peptides between signal peptide and mature protein: effect on secretion and processing of hybrid thermostable  $\alpha$ -amylases in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cells. J. Gen. Microbiol. 136: 1551-1558.

- JEONG, S. M., H. YOSHIKAWA et H. TAKAHASHI. 1993. Isolation and Characterization of the *secE* Homologue Gene of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 10: 133-142.
- JONES, J. D., C. J. MCKNIGHT et L. M. GIERASCH. 1990. Biophysical studies of signal peptides: implications for signal sequence functions and the involvement of lipid in protein export. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 213-232.
- JOYCE, C. M. et N. D. F. GRINDLEY. 1984. Method for determining a gene of *Escherichia coli* is essential: Application to the *polA* gene. *J. Bacteriol.* 158: 636-643.
- KATZ, E., C. J. THOMPSON et D. A. HOPWOOD. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2703-2714.
- KENDALL, D. A., S. C. BOCK et E. T. KAISER. 1986. Idealization of the hydrophobic segment of the alkaline phosphatase signal peptide. *Nature*. 321: 706-708.
- KIESER, T.. 1984. Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 12: 19-36.
- KIM, J. C., S. H. CHA, S. T. JEONG, S. K. OH et S. M. BYUN. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 707-713.
- 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.
- KLUEPFEL, D., F. SHARECK, D. J. SENIOR, R. L. BERNIER et R. MOROSOLI. 1993. Homologous gene expression and secretion of hemicellulases by *Streptomyces lividans* and their potential use in bleaching of paper pulps. *Industrial Microorganisms: Basic Applied Molecular Genetics*. 137-142.
- 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.
- KLUEPFEL, D., N. DAIGNEAULT, R. MOROSOLI, et F. SHARECK. 1992. Purification and characterization of a new xylanases (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 626-631.
- KLUEPFEL, D.. 1991. Protein biosynthesis and secretion. In: BAUMBERG, S. [and others]. *Genetics and product formation in Streptomyces*. New York: Plenum Press. 203-205.

KOLLER, K. P. et G. RIESS. 1989. Heterologous expression of the  $\alpha$ -amylase inhibitor gene cloned from an amplified genomic sequence of *Streptomyces tendae*. J. Bacteriol. 171: 4953-4957.

KOLLER, K. P., G. RIESS, K. SAUBER, E. UHLMANN et H. WALLMEIER. 1989. Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of tendamistat and proinsulin. Biotechnol. 7: 1055-1059.

KONTINEN, V. P., P. SARIS et M. SARVAS. 1991. A gene (*prsA*) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. Mol. Microbiol. 5: 1273-1283.

KORN-WENDISCH, F. et H. J. KUTZNER. 1992. The Family Streptomycetaceae. In: BALOWS, A., M. G. TRUPER, M. DWORKIN, W. HARPER et M. H. SCHLEIFER, Eds. The prokaryotes. New York: Springer Verlag. 921-995.

KOSHLAND, D., R. T. SAUER et D. BOTSTEIN. 1982. Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of  $\beta$ -lactamase in *Salmonella typhimurium*. Cell. 30: 903-914.

KUHN, A. et W. WICKNER. 1985. Conserved residues of the leader peptide are essential for the cleavage by leader peptidase. J. Biol. Chem. 260: 15914-15918.

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

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

KUMAMOTO, C. A.. 1991. Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. Mol. Microbiol. 5:19-22.

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

KUSTERS, R., W. DOWHAN et B. de KRUIJFF. 1991. Negatively charged phospholipids restore *prePhoE* translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membrane vesicles. J. Biol. Chem. 266: 8659-8662.

LAMINET, A. A. et A. PLÜCHTHUM. 1989. The precursor of  $\beta$ -lactamase: purification, properties and folding kinetics. EMBO J. 8: 1469-1477.

LAMPEL, J. S., J. S. APHALE, K. A. LAMPEL et W. R. STROHL. 1992. Cloning and sequencing of a gene encoding a novel extracellular neutral proteinase from *Streptomyces* sp. strain C5 and expression of the gene in *Streptomyces lividans* 1326. J. Bacteriol. 174: 2797-2808.

- LANDRY, S. J. et L. M. GIERASCH. 1991. Recognition of nascent polypeptides for targeting and folding. *Trends Biochem. Sci.* 16: 159-163.
- LENZINI, M. V., H. ISHIHARA, J. DUSART, H. OGAWARA, B. JORIS, J. VAN BEEUMEN, J. M. FRÈRE et J. M. GHUYSEN. 1988. Nucleotide sequence of the gene encoding the active-site serine  $\beta$ -lactamase from *Streptomyces cacaoi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 371-376.
- LICHENSTEIN, H. S., L. A. BUSSE, G. A. SMITH, L. O. NARHI, M. O. MCGINLEY, M. F. ROHDE, J. L. KATZOWITZ et M. M. ZUKOWSKI. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding extracellular metalloprotease from *Streptomyces lividans*. *Gene.* 111: 125-130.
- LICHENSTEIN, H., M. E. BRAWNER, L. M. MILES, C. A. MEYERS, P. R. YOUNG, P. L. SIMON et T. ECKHARDT. 1988. Secretion of interleukin-1 beta and *Escherichia coli* galactokinase by *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 170: 3924-3929.
- LILL, R., K. CUNNINGHAM, L. A. BRUNDAGE, K. ITO, D. OLIVER et W. WICKNER. 1989. *SecA* protein hydrolyse ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8: 961-966.
- 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.
- LO, A. C., R. M. MACKAY, V. L. SELIGY et G. E. WILLICK. 1988. *Bacillus subtilis*  $\beta$ -1,4-endoglucanase products from intact and truncated genes are secreted into the extracellular medium by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2287-2292.
- LONG, C. M., M. J. VIROLLE, S. Y. CHANG, S. CHANG et M. J. BIBB. 1987.  $\alpha$ -amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate  $\alpha$ -amylases. *J. Bacteriol.* 169: 5745-5754.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MANDEL, M. et A. HIGA. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162.
- MANIN, C., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1994. Purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). *Biochem. J.* 302: 443-449.
- MASSON, J. Y, F. DENIS et R. BRZEZINSKI. 1994. Primary Sequence of the Chitosanase from *Streptomyces Sp* Strain N174 and Comparison with Other Endoglycosidases. *Gene.* 140: 103-107.

- 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.
- McCABE, P. C.. 1990. Production of single-stranded DNA by asymmetric PCR. Dans: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. A. I. MICHAEL, H. G. DAVID, J. J. SINSKY et T. J. WHITE (Eds.). Academic Press, Inc. pp: 76 à 83.
- 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. Prot. Eng. 1: 67-74.
- MILLER, G. L.. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426- 428.
- MIYAKE, K., H. ONAKA, S. HORINOUCI et T. BEPPU. 1994. Organization and Nucleotide Sequence of the *SecE-NusG* Region of *Streptomyces Griseus*. Biochim. Biophys. Acta - Gene Structure and Expression. 1217: 97-100.
- MIYASHITA, K. et T. FUJII. 1993. Nucleotide Sequence and Analysis of a Gene (*chiA*) for a Chitinase from *Streptomyces lividans* 66. Bioscience Biotech. Biochem. 57: 1691-1698.
- MIYASHITA, K., T. FUJII et Y. SAWADA. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. J. Gen. Microbiol. 137: 2065-2072.
- MOUNTAIN, A.. 1989. Gene expression systems for *Bacillus subtilis*. HARWARD, C. R. (Ed.), Biotechnology Handbook 2. *Bacillus*. Plenum Press, New York, NY. pp. 73-114.
- MUNOZ, A., A. PEREZ-ARANDA et J. L. BARBERO. 1985. Cloning and expression of human interleukin 2 in *Streptomyces lividans* using the *Escherichia coli* consensus promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133: 511-519.
- NAGASHIMA, M., Y. OKUMOTO et M. OKANISHI. 1989. Nucleotide sequence of the gene of extracellular xylanase in *Streptomyces sp. no. 36a* and construction of secretion vectors using xylanase gene. Trends in Actinomycetologia. 91-96.
- NAGASO, H., S. SAITO, H. SAITO et H. TAKAHASHI. 1988. Nucleotide sequence and expression of a *Streptomyces griseosporus* proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitor (*HaimII*) gene. J. Bacteriol. 170: 4451-4457.
- NAKAI, R., S. HORINOUCI et T. BEPPU. 1988. Cloning and nucleotide sequence of a cellulase gene, *casA*, from an alkalophilic *Streptomyces* strain. Gene. 65: 229-238.

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

NAKAMURA, K., Y. FUJITA, Y. ITOH et K. YAMANE. 1989. Modification of length, hydrophobic properties and electric charge of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase signal peptide and their different effects on the production of secretory proteins in *B. subtilis* and *Escherichia coli* cells. *Mol. Gen. Genet.* 216: 1-9.

NISHIYAMA, K. I., S. MIZUSHIMA et H. TOKUDA. 1992. The carboxyl-terminal region of *SecE* interacts with *SecY* and is functional in the reconstitution of protein translocation activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 7170-7177.

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.

NOACK, D., R. GEUTHER, M. TONEW, R. BREITLING et D. BEHNKE. 1988. Expression and secretion of interferon-alpha 1 by *Streptomyces lividans*: use of staphylokinase signals and amplification of a neo gene. *Gene.* 68: 53-62.

OBATA, S., S. TAGUCHI, I. KUMAGAI et K. MIURA. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of gene encoding *Streptomyces subtilisin* inhibitor (SSI). *J. Biochem.* 105: 367-371.

PADDON, C. J., N. VASANTHA et R. W. HARTLEY. 1989. Translocation and processing of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular RNase. *J. Bacteriol.* 171: 1185-1187.

PALOMEQUE-MESSIA, P., S. ENGLEBERT, M. LEYH-BOUILLE, M. NGUYEN-DISTECHE, C. DUEZ, S. HOUBA, O. DIDEBERG, J. VAN BEEUMEN et J. M. GHUYSEN. 1991. Amino acid sequence of the penicillin-binding protein/DD-peptidase of *Streptomyces K15*. Predicted secondary structures of the low Mr penicillin-binding proteins of class A. *Biochem. J.* 279: 223-230.

PARK, J. S., S. HORINOUCI et T. BEPPU. 1991. Characterization of the leader peptide of an endo-type cellulase produced by an alkalophilic *Streptomyces* strain. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1745-1750.

PARK, S., G. LIU, T. B. TOPPING, W. H. COVER et L. L. RANDALL. 1988. Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science.* 239: 1033-1035.

POGLIANO, J. A. et J. BECKWITH. 1994. *SecD* and *SecF* Facilitate Protein Export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 13: 554-561.

- PUGSLEY, A. P.. 1989. Protein targeting. Academic Press, San Diego, Calif.
- PUGSLEY, A. P.. 1993. The complete general secretory pathway in Gram<sup>-</sup> negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108.
- PULIDO, D., J. A. VARA et A. JIMENEZ. 1986. Cloning and expression in biologically active form of the gene for human interferon alpha 2 in *Streptomyces lividans*. *Gene.* 45: 167-174.
- PUZISS, J. W., J. D. FIKES et P. J. BASSFORD. 1989. Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. *J. Bacteriol.* 171: 2303- 2311.
- RANDALL, L. L., S. J. S. HARDY et J. R. THOM. 1987. Export of protein: a biochemical view. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 507- 541.
- RAYMER, G., J. M. WILLARD et J. L. SCHOTTEL. 1990. Cloning, sequencing, and regulation of expression of an extracellular esterase gene from the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *J. Bacteriol.* 172: 7020-7026.
- ROBBINS, P. W., K. OVERBYE, C. ALBRIGHT, B. BENFIELD et J. PERO. 1992. Cloning and high-level expression of chitinase-encoding gene of *Streptomyces plicatus*. *Gene.* 111: 69-76.
- ROBBINS, P. W., R. B. TRIMBLE, D. F. WIRTH, C. HERING, F. MALEY, G. F. MALEY, R. DAS, B. W. GIBSON, N. ROYAL et K. BIEMANN. 1984. Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* 259: 7577-7583.
- ROWLAND, S. S., J. J. ZULTY, M. SATHYAMOORTHY et B. M. POGELL. 1992. The effect of signal sequences on the efficiency of secretion of a heterologous phosphotriesterase by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 94-100.
- RUSCH, S. L. et D. A. KENDALL. 1994. Transport of an Export-Defective Protein by a Highly Hydrophobic Signal Peptide. *J. of Biol. Chem.* 269: 1243-1248;
- RUSCH, S. L., H. F. CHEN, J. W. IZARD et D. A. KENDALL. 1994. Signal peptide hydrophobicity is finely tailored for function. *J. of Cellular Biochemistry.* 55: 209-217.
- SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS et H. A. ERLICH. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239 : 487-491.
- SALMOND, G. P. et P. J. REEVES. 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. [Review]. *Trends Biochem. Sci.* 18: 7-12.

- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIAKIS. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. : 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: 5463-5467.
- SCHATZ, G.. 1986. Protein translocation. A common mechanism for different membrane systems? Nature. 321: 108-109.
- SCHATZ, 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.
- SCHAUER, A., M. RANES, R. SANTAMARIA, J. GUIJARRO, E. LAWLOR, C. MENDEZ, K. CHATER et R. LOSICK. 1988. Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor*. Science. 240: 768-772.
- SCHIEBEL, E., A. J. DRIESSEN, F. U. HARTL et W. WICKNER. 1991. Delta mu H<sup>+</sup> and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. Cell. 64: 927-939.
- SCHMIDT, M. G., E. E. ROLLO, J. GRODBERG et D. B. OLIVER. 1988. Nucleotide sequence of the *secA* gene and *secA*(Ts) mutations preventing protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 3404-3414.
- SCHOTTEL, J. L., M. J. BABCOCK et V. A. HALE. 1993. Expression and secretion of a *Streptomyces scabies* esterase. In: BALTZ, R. H., G. D. HEGEMAN, P. L. SKATRUD, Ed. Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics. Washington: American Society for Microbiology. 127-135.
- SENIOR, D. J., J. HAMILTON, R. L. BERNIER et J. R. DU MANOIR. 1992. Reduction in chlorine use during bleaching of kraft pulp following xylanase treatment. Tappi Journal. 125-130.
- SHARECK, F., C. ROY, M. YAGUCHI, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. Gene. 107: 75-82.
- SIMON, S. M. et G. BLOBEL. 1992. Signal peptides open protein- conducting channels in *E. coli*. Cell. 69: 677-684.
- SIMONEN, M. et I. PALVA. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. 57: 109-137.
- SINHA, N. D., J. BIERNAT, J. MCMANUS et H. KOSTER. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-

dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Research*. 12: 4539-57.

STADER, J., L. J. GANSHEROFF et T. J. SILHAVY. 1989. New suppressor of the signal-sequence mutation, *prlG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev*. 3: 1045-1052.

STRICKLER, J. E., T. R. BERKA, J. GORNIK, J. FORNWALD, R. KEYS, J. J. ROWLAND, M. ROSENBERG et D. P. TAYLOR. 1992. Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. Purification, activity, cloning, and expression. *J. Biol. Chem*. 267: 3236-3241.

TAGUCHI, S., M. MAENO et H. MOMOSE. 1992. Extracellular production system of heterologous peptide driven by a secretory protease inhibitor of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 36: 749-753.

TAKASE, K., H. MIZUNO et K. YAMANE. 1988. NH<sub>2</sub>-terminal processing of *Bacillus subtilis* α-amylase. *J. Biol. Chem*. 263: 11548-11553.

THÉBERGE, M., P. LACAZE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: 815-820.

THOMPSON, C. J., J. M. WARD et D. A. HOPWOOD. 1982. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol*. 151: 668-677.

TOPPING, T. B. et L. L. RANDALL. 1994. Determination of the Binding Frame Within a Physiological Ligand for the Chaperone *SecB*. *Protein Science*. 3: 730-736.

VAN DIJL, J. M., A. de JONG, J. VEHEMAANPERÄ, G. VENEMA et S. BRON. 1992. Signal peptidase I of *Bacillus subtilis* patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J*. 11: 2819-2828.

VASANTHA, N., L. D. THOMPSON, C. RHODES, C. BANNER, J. NAGLE et D. FILPULA. 1984. Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J. Bacteriol*. 159: 811-819.

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

VIEIRA, J. et J. MESSING 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Dans: *Methods in Enzymology* Vol. 153, R. WU et L. Grossman (éd.): Academic Press (New York) pp.3-11.

- VIGAL, T., J. A. GIL, A. DAZA, M. D. GARCIA-GONZALEZ et J. F. MARTIN. 1991a. Cloning, characterization and expression of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU3570. *Mol. Gen. Genet.* 225: 278-288.
- VIGAL, T., J. A. GIL, A. DAZA, M. D. GARCIA-GONZALEZ, P. VILLADAS et J. F. MARTIN. 1991b. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the amy gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of  $\alpha$ -amylase by *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* 231: 88-96.
- VIKARI, L., A. KANTELINEN, J. SUNDQUIST et M. LINKO. 1994. Xylanases in Bleaching - From an Idea to the Industry. *FEMS Microbiology Reviews.* 13: 335-350.
- VIROLLE, M. J., C. M. LONG, S. CHANG et M. J. BIBB. 1988. Cloning, characterisation and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Gene.* 74: 321-334.
- VON HEIJNE, G. et L. ABRAHMSSEN. 1989. Species-specific variation in signal peptide design: Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEB.* 244: 439-446.
- VON HEIJNE, G.. 1985. Signal sequences: the limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184: 99-105.
- VON HEIJNE, G.. 1989. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* 341: 456-458.
- WANDERSMAN, C.. 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 3: 1825-1831.
- WANG, L. F., A. A. KORTT et D. J. STEWART. 1993. Use of a Gram<sup>-</sup> Signal Peptide for Protein Secretion by Gram<sup>+</sup> Hosts - Basic Protease of *Dichelobacter-nodosus* Is Produced and Secreted by *Bacillus subtilis*. *Gene.* 131: 97-102.
- WANG, L. F., S. M. EKKEL et R. J. DEVENISCH. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus subtilis* neutral protease gene (*nprE*) lacking its ribosome binding site. *Biochem. Int.* 22: 1085-1093.
- WATANABE, M. et G. BLOBEL. 1989. *SecB* functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in *E. coli*. *Cell.* 58: 695-705.
- WEISS, J. B., P. H. RAY et P. J. BASSFORD. 1988. Purified *SecB* protein of *Escherichia coli* retards folding and promotes membrane translocation of the maltose-binding protein *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8978-8982.

- WICKNER, W., A. J. M. DRIESSEN et F. U. HARTL. 1991. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 60:101-124.
- WITTMANN, S., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1994. Purification and Characterization of the *Celb* Endoglucanase from *Streptomyces Lividans* 66 and DNA Sequence of the Encoding Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1701-1703.
- WOLFE, P. B., P. SILVER et W. WICKNER. 1982. The isolation of homogeneous leader peptidase from a strain of *Escherichia coli* which overproduces the enzyme. *J. Biol. Chem.* 257: 7879-7902.
- WOLFE, P. B., W. WICKNER et J. M. GOODMAN. 1983. Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of the leader peptidase in the bacterial envelope. *J. Biol. Chem.* 258: 12073-12080.
- WRIGHT, F. et M. J. BIBB. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene.* 113: 55-65.
- YAMANE, K., S. ICHIHARA et S. MIZUSHIMA. 1987. *In vitro* translocation of protein across *Escherichia coli* membrane vesicles requires both the proton motive force and ATP. *J. Biol. Chem.* 262: 2358-2362.
- YOUNG, J. K., T. RAJAPANDI et D. OLIVER. 1994. *SecA* protein is exposed to the periplasmic surface of the *Escherichia coli* inner membrane in its active state. *Cell.* 78: 845-853.
- ZAPPE, K., G. L. BLATCH et D. R. WOODS. 1992. Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase and *Vibrio alginolyticus* protease A fusion genes. *J. Gen. Microbiol.* 138: 319-327.

