

Université du Québec

INRS-Institut Armand-Frappier

PROTÉINES CHAPERONNES IMPLIQUÉES DANS LE
REPLIEMENT DES PROTÉINES SÉCRÉTÉES PAR LE
SYSTÈME TAT CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS*

Par

MARIE-CHRISTINE GROLEAU

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (MSc) en
Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Examineur interne

DENIS FRANÇOIS
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

GILBERT MICHEL
Conseil national de
recherches du Canada

Directeur de recherche

MOROSOLI ROLF
Institut Armand-Frappier

Résumé

Les protéines dont le destin est d'être sécrétées sont synthétisées sous la forme d'un précurseur qui possède à son extrémité N-terminale une séquence appelée peptide signal qui est clivé lors de la sécrétion pour libérer la protéine. La majorité des protéines sécrétées par les bactéries le sont par la voie de sécrétion Sec. Cette voie déjà largement étudiée permet la sécrétion de précurseurs protéiques maintenus non repliés dans le cytoplasme. La voie Tat (*twin-arginine translocation*) est nouvellement étudiée et permet la translocation de précurseurs déjà repliés dans le cytoplasme. Les précurseurs Tat se distinguent par la présence d'une séquence signature (S/T)-R-R-X-F-L-K dans leur peptide signal. Des protéines chaperonnes seraient impliquées dans le repliement des précurseurs Tat. En effet, les chaperonnes peuvent prévenir l'agrégation et la dégradation de protéines sous conformation non-native et favoriser leur repliement.

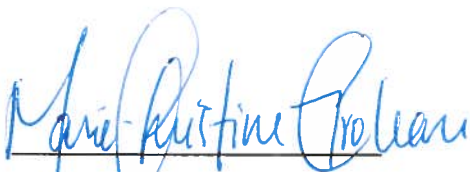
Streptomyces coelicolor est la bactérie possédant le plus grand nombre de substrats Tat parmi les 84 génomes bactériens étudiés, ce qui en fait un organisme intéressant pour l'étude de ce système. Plusieurs enzymes d'intérêt industriel, dont les xylanases, sont sécrétées par *Streptomyces lividans*, une proche parente de *S. coelicolor*. La xylanase C (XlnC), une enzyme exclusivement sécrétée par le système Tat a servi de modèle pour l'étude du système Tat chez *S. lividans*.

Pour cette étude, il s'agissait de purifier le précurseur contenu dans la fraction cytoplasmique en espérant purifier du même coup les protéines chaperonnes qui lui sont associées. Des expériences se basant sur l'affinité d'un précurseur pour sa chaperonne potentielle ont été effectuées. Trois techniques ont été testées soient la co-immunoprécipitation avec des anti-XlnC et deux types de colonnes d'affinité (xylanase C immobilisée à l'aide d'une queue d'histidine sur colonne HiTrap et xylanase C immobilisée sur gel de sépharose activé au CNBr).

Plusieurs protéines ont été recueillies, séparées par SDS-PAGE et identifiées par LC/MS. Les protéines pouvant avoir potentiellement des fonctions de chaperonnes ont été

analysées plus en détails. Parmi celles-ci se retrouvent une protéine de stress, une peptidyl-prolyl isomérase et une protéinase. Un système double hybride avec la *yellow fluorescent protein* (YFP) est présentement en construction afin de confirmer l'interaction entre la XlnC et les chaperonnes hypothétiques.

Des souches hyperproductrices de deux peptidyl-prolyl isomérases (CypA et CypB) ont également été construites afin de vérifier l'impact de la surproduction de ces chaperonnes sur la sécrétion de la XlnC (Tat-dépendante) et de la XlnA (Sec-dépendante). Une inhibition de l'activité xylanasiqne est observée pour les deux systèmes de sécrétion, bien que les deux xylanases se retrouvent dans le surnageant de culture.


Étudiante


Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier grandement mon directeur de recherche, Rolf Morosoli. Ce fût un réel plaisir de travailler dans son laboratoire. Je le remercie sincèrement de son support ainsi que de ses encouragements tout au long de ma maîtrise. Je remercie également Johanne Lemay, une aide précieuse et une collègue de travail vraiment appréciée.

Merci également à mes collègues étudiants pour les partages d'idées, les discussions intéressantes et les soirées amicales.

Un merci spécial aux personnes qui ont partagé ma vie pendant ces deux années, particulièrement, Francine, Yvon, Julie, Véronique, Dany et Seb pour le support, l'amitié et beaucoup plus.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES APPENDICES	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	8
1. REVUE DE LITTÉRATURE	10
1. 1 LA SÉCRÉTION DES PROTÉINES CHEZ LES BACTÉRIES.....	10
1. 1. 1 Généralités.....	10
1. 2 SYSTÈME DE SÉCRÉTION SEC.....	10
1. 2. 1 Peptide signal	10
Région en N-terminal (région n)	11
Région hydrophobe (région h).....	11
Région en C-terminal (région c).....	12
1. 2. 2 Composantes du système Sec.....	12
SecB	12
SecA	12
La translocase membranaire SecYEG	17
Le complexe SecDFYajC	18
1. 3 SYSTÈME DE TRANSPORT SRP.....	19
1. 4 LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION TWIN-ARGININE (TAT)	23
1. 4. 1 Introduction	23
1. 4. 2 Peptide signal	24
Région n.....	24
Région h.....	24
Région c.....	25
1. 4. 3 Composantes du système Tat	25
TatA/B/E	26
TatC.....	27
TatD.....	27
1. 4. 4 Insertion de co-facteurs	28
1. 4. 5 Protéines sans cofacteur.....	30
1. 5 LES SIGNAL PEPTIDASES	31
1. 6 LE REPLIEMENT DES PROTÉINES	32
1. 7 LES PROTÉINES CHAPERONNES.....	33
1. 7. 1. Principales chaperonnes cytoplasmiques.....	33
1. 7. 1. 1 SecB.....	33
1. 7. 1. 2 Les protéines de chocs thermiques (Hsp).....	35
Les Hsp 60 et 10 (GroEL/GroES).....	35
Les Hsp70 (DnaK/DnaJ)	36
Le facteur d'échange GrpE	37
Les Hsp100	38

USP (Universal stress proteins)	38
1. 7. 1. 3 Les catalyseurs du repliement	39
Les Peptidyl-Disulfide Isomérases (PDIases).....	39
Les Peptidyl Prolyl Cis/Trans Isomérases (PPIases).....	40
Trigger factor	41
1. 7. 2. 4 Les protéases	41
La superfamille AAA+.....	42
ClpA/PX (HSP100).....	42
ClpB	43
ClpY	44
Lon	44
FtsH.....	45
Le protéasome 20S.....	46
1. 7. 2 Spécificité des chaperonnes	46
1. 8 LES STREPTOMYCÈTES	47
1. 8. 1 Généralités.....	47
1. 8. 2 Le système <i>Tat</i> chez les <i>Streptomyces</i>	49
1. 8. 3 Les xylanases chez <i>Streptomyces lividans</i>	50
1. 8. 4 Les chaperonnes chez les <i>Streptomyces</i>	52
1. 8. 4. 1 Les protéines de stress	52
1. 8. 4. 2 Les catalyseurs du repliement	54
1. 8. 4. 3 Les protéases	54
2. MÉTHODOLOGIE.....	56
2. 1 SOUCHES UTILISÉES.....	56
2. 1. 1 <i>Streptomyces lividans</i> 10-164.....	56
2. 1. 2 <i>Streptomyces lividans</i> 10-164 Δ <i>tatC</i>	56
2. 1. 3 Souches hyperproductrices de peptidyl-prolyl isomérases A et B (<i>ScCypA</i> et <i>ScCypB</i>).....	56
2. 1. 4 Transformants <i>IAFA.916CH</i> , <i>IAFB.916CH</i> , <i>IAFA.906H</i> , <i>IAFB.906H</i> , <i>IAFA.917CH</i> et <i>IAFB.917CH</i>	57
2. 1. 5 Clones <i>IAFMCypB.C</i> et <i>IAFMCypA.C</i>	57
2. 2 VECTEURS UTILISÉS.....	57
2. 3 MILIEUX DE CULTURE POUR STREPTOMYCES LIVIDANS	58
2. 3. 1 Milieux liquides	58
2. 3. 2 Milieux solides	58
2. 4 CROISSANCE DES CLONES DE <i>S. LIVIDANS</i>	59
2. 5 MANIPULATIONS ET AMPLIFICATIONS DE L'ADN.....	59
2. 5. 1 Amplification de l'ADN par PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	59
2. 5. 2 PCR recombinant ou emboîté.....	60
2. 5. 3 Digestion enzymatique de l'ADN.....	61
2. 5. 4 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	61
2. 5. 5 Déphosphorylation de vecteur digéré par des enzymes de restriction	62
2. 5. 6 Ligation.....	62
2. 6 CLONAGE DANS <i>S. LIVIDANS</i>	63
2. 6. 1 Transformation dans <i>S. lividans</i>	63
2. 6. 2 Mini-préparation de l'ADN plasmidique.....	63
2. 6. 3 Vérification de la présence de l'insert par colonie-PCR.....	63
2. 6. 4 Préparation de spores de <i>S. lividans</i>	64
2. 7 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	65
2. 8 ESTIMATION DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE PAR DOSAGE DE L'ADN.....	65

2. 9 MARQUAGE DES CELLULES PAR PULSE-CHASE	66
2. 10 EXPÉRIENCE DE CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITÉ AVEC LA XLNC	67
2. 10. 1 Chromatographie d’affinité à l’aide d’une colonne HiTrap™	67
2. 10. 1. 2 Préparation de l’échantillon.....	69
2. 10. 1. 3 Passage sur la colonne.....	69
2. 10. 2 Colonne de sépharose activé au CNBr.....	69
2. 10. 2. 1 Préparation du ligand et couplage sur la matrice.....	70
2. 10. 2. 2 Application de l’échantillon	71
2. 10. 2. 3 Élu­tion des protéines d’intérêt.....	71
2. 10. 2. 4 Régénération et conservation de la colonne	71
2. 10. 3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	71
2. 10. 4 Séquençage des protéines d’intérêt au spectromètre de masse	72
2. 10. 4. 1 Digestion tryptique	72
2. 10. 4. 2 Analyse en spectrométrie de masse.....	74
2. 11 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	74
2. 12 EXPÉRIENCES D’IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA XLNC ET DES PROTÉINES ASSOCIÉES....	75
2. 12. 1 Technique d’immunoprécipitation.....	75
2. 12. 2 Électrophorèse bidimensionnelle.....	76
2. 12. 2. 1 Première dimension (focalisation isoélectrique).....	76
2. 12. 2. 2 Réduction et alkylation des protéines.....	77
2. 12. 2. 3 Deuxième dimension (SDS- PAGE).....	77
2. 12. 2. 4 Coloration à l’argent.....	78
3. RÉSULTATS	79
3. 1 ISOLEMENT DES PROTÉINES POUVANT INTERAGIR AVEC LE PRÉCURSEUR DE LA XLNC.....	79
3. 1. 1 Immunoprécipitation avec des anti-XlnC	79
3.1 .1. 1 Analyse des protéines par gels en deux dimensions.....	80
3. 1. 2 Chromatographie d’affinité aux ions métalliques sur colonne HiTrap™ (IMAC).....	82
3. 1. 2. 1 Souches IAF916CΔtatC, IAF917CΔtatC et IAF10-164ΔtatC	82
3. 1. 2. 2 Souches IAF916C et IAF916Chis.....	89
3. 1. 3 Chromatographie d’affinité par gel de sépharose activé au CNBr.....	94
3. 2 ÉTUDE DES EFFETS DE L’HYPERPRODUCTION DE PPIASES SUR LA SÉCRÉTION DE LA XLNC	99
3. 2. 1 Sécrétion de la XlnC et de la XlnA par les transformants hyperproducteurs des PPIases CypA et CypB et par le clone IAFMCypB.C.....	99
3. 2. 2 Maturation des précurseurs de la XlnC et de la XlnA chez les transformants hyperproducteurs des PPIases CypA et CypB	105
4. DISCUSSION.....	107
4. 1 PROTÉINES POUVANT INTERAGIR AVEC LE PRÉCURSEUR DE LA XYLANASE C.....	107
4. 2 DIMINUTION DE L’ACTIVITÉ DES XYLANASES A ET C CHEZ DES SOUCHES HYPERPRODUCTRICES DE CYP A ET CYPB.....	112
BIBLIOGRAPHIE	126

Liste des figures

Figure 1. Composantes du complexe de translocation de la voie Sec.	14
Figure 2. Modèle pour la translocation des précurseurs à travers la membranc à l'aide de l'ATP et de la protéine SecA	16
Figure 3. Co-existence des voies SRP et SecB-dépendante.	21
Figure 4. Composantes du système Tat.	28
Figure 5. Peptidyl-proly cis-trans isomérisation.....	40
Figure 6. Cycle de vie du genre <i>Streptomyces</i>	48
Figure 8. Profils en deux dimensions des protéines cytoplasmiques immunoprécipitées par des anticorps anti-xylanase C.....	81
Figure 9. Profil obtenu à partir des fractions éluées hors de la colonne HiTrap™ pour la souche IAF916Chis Δ tatC.	85
Figure 10. Profils obtenus à partir des fractions éluées lors des expériences de IMAC réalisées à partir des souches IAF10-164 Δ tatC, IAF916Chis Δ tatC et IAF917Chis Δ tatC.	87
Figure 11. Profils obtenus à partir des expériences de colonnes HiTrap™ réalisées à l'aide des souches IAF916C et IAF916Chis.	91
Figure 12. Identification de la protéine correspondant aux bandes 3 et 4 représentées sur la figure 11b pour la souche IAF916Chis.	93
Figure 13. SDS-PAGE des protéines de la fraction cytoplasmique de 10-164 ayant été isolées par chromatographie d'affinité avec un gel de sépharose activé au CNBr sur lequel la XlnC (précurseur ou mature) a été immobilisée.....	97
Figure 14. Identification de la protéine isolée lors des expériences d'affinité à l'aide du gel de sépharose activé au CNBr.....	98
Figure 15. Activité xylanasique (UI/mL) et croissance du mycélium des transformants IAFA.906H, IAFA.916CH ainsi que de la souche Berlin A.	102
Figure 16. Activité xylanasique (UI/mL) et croissance du mycélium des transformants IAFB.906H, IAFB.916CH ainsi que de la souche Berlin B.	103
Figure 17. Immunobuvardage de type Western des surnageants de culture des transformants IAFA.916CH, IAFB.916CH, IAFA.916H, IAFA.906H, des souches IAF916C et IAF906, Berlin A et Berlin B ainsi que du clone IAFMCPB.C.	104
Figure 18. Maturation des précurseurs de la XlnC et de la XlnA chez les transformants de <i>S. lividans</i> IAFA.916CH, IAFB.916CH, IAFA.906H et IAFB.906H.	106

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des XlnA, XlnB et XlnC de <i>S. lividans</i>	51
Tableau 2. Détails des protéines analysées en LC/MS lors de l'expérience de IMAC avec la souche IAF916Chis Δ <i>tatC</i>	86
Tableau 3. Détails des protéines analysées par LC/MS pour les souches IAF916Chis Δ <i>tatC</i> et IAF917Chis Δ <i>tatC</i>	88
Tableau 4. Détails des protéines analysées en LC/MS obtenues à partir de la souche IAF916Chis après élution avec 8M urée.	92
Tableau 5: Détails des différentes souches utilisées pour l'étude des effets de l'hyperproduction de PPIases sur la sécrétion	101

Liste des appendices

APPENDICE A : Caractéristiques des plasmides utilisés chez *S. lividans*

APPENDICE B : Amorces utilisées

APPENDICE C : Conditions des PCR réalisés

APPENDICE D : Composition des milieux de culture et des tampons utilisés

Liste des abréviations

a.a. : acide aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
ATP : Adénosine 5'-triphosphate
CNBr : Bromure de cyanogène
DSP : Dithio-bis-succinimidylpropionate
DTE : Dithioérythritol
EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique
DO : Densité optique
GSP : *General secretion pathway* (voie générale de sécrétion)
GTP : guanosine 5'-triphosphate
HSP : *Heat-shock protein* (protéine de choc thermique)
hyg: gène de résistance à l'hygromycine
kDa : kilodalton
LC/MS: *Liquid chromatography / Mass spectrometry*, Chromatographie liquide/
Spectromètre de masse
PAGE : *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PDI : Peptidyl-disulfide isomérase
pI : Point isoélectrique
PMSF : phénylméthylsulfonylfluoride
PPI : Peptidyl-prolyl isomérase
Rpm : rotation par minute
RBB : *Remazol Brilliant Blue*
SDS : *Sodium dodecyl sulfate*
SRP : *Signal recognition particule*
Tat : *Twin-arginine translocation*
XlnA : Xylanase A
XlnB : Xylanase B
XlnB2 : Xylanase B dépourvue de son domaine de liaison au xylane
XlnC : Xylanase C
tsr : gène de résistance au thiostrepton
YFP: *Yellow fluorescent protein*

Introduction

Les protéines destinées à être sécrétées sont d'abord synthétisées sous forme de précurseurs. Ces derniers possèdent à leur extrémité N-terminale une courte séquence appelée peptide signal. Le peptide signal permet de diriger les précurseurs vers le système de sécrétion approprié et est ensuite clivé par la signal peptidase membranaire.

Différents systèmes de sécrétion sont à la disposition des bactéries. Le système Sec est essentiel à la survie de la cellule bactérienne et est déjà grandement étudié. Ce dernier sécrète des précurseurs en conformation linéaire dans le cytoplasme. Cette conformation est maintenue chez les bactéries Gram négatives par la chaperonne SecB. Aucun homologue de SecB n'a jusqu'à maintenant été répertorié chez les bactéries Gram positives. Un système de sécrétion nouvellement étudié, le système Tat (*Twin arginine translocation*), sécrète des précurseurs ayant déjà atteint un certain degré de repliement dans le cytoplasme. Le peptide signal des précurseurs Tat se démarque par la présence d'une séquence signature (S/T)-R-R-X-F-L-K dans laquelle on remarque un doublet d'arginines invariablement présent. Plusieurs substrats Tat sont sécrétés avec un co-facteur. Des chaperonnes cytoplasmiques sont connues comme étant impliquées dans l'insertion du co-facteur, un processus qui demande un certain contrôle dans le repliement du précurseur. Par ailleurs, certaines protéines Tat ne possèdent aucun co-facteur. C'est le cas entre autre de la XlnC de *Streptomyces lividans* ou encore de PhoD chez *Bacillus subtilis*. Les facteurs impliqués dans le repliement de ces protéines demeurent inconnus.

Les protéines chaperonnes sont impliquées dans le repliement d'autres protéines. Elles peuvent assister ou contrôler le repliement ou encore dégrader les protéines mal repliées ou prévenir la formation d'agrégats protéiques.

Les *Streptomycètes* appartiennent à la famille des Actinomycètes. Il s'agit de bactéries Gram positives saprophytes du sol qui sont reconnues pour produire une grande variété de molécules utilisées tant en industrie qu'en médecine. *S. lividans* produit trois xylanases. Les xylanases sont des enzymes dégradant le xylane, un composé majeur de

l'hémicellulose du bois. Les XlnA et XlnB sont sécrétées par le système Sec, tandis que la XlnC est sécrétée via le système Tat.

L'objectif de cette étude est de rechercher des protéines chaperonnes pouvant être impliquées dans le repliement des précurseurs Tat. Pour ce faire, nous avons utilisé des souches de *S. lividans* produisant la XlnC. Les techniques utilisées cherchaient donc à isoler cette dernière sous forme de précurseur au niveau du cytoplasme de même que les protéines pouvant y être associées. Parmi celles-ci nous espérons retrouver des protéines impliquées dans son repliement. De plus, des souches hyperproductrices de chaperonnes cytoplasmiques connues, CypA et CypB, ont été utilisées afin de vérifier une influence sur la sécrétion par les systèmes Sec et Tat.

1. Revue de littérature

1. 1 La sécrétion des protéines chez les bactéries

1. 1. 1 Généralités

Plusieurs voies de sécrétion différentes permettent aux bactéries de relâcher des protéines dans le milieu extracellulaire. Chez les bactéries Gram-négatives, les protéines sont sécrétées dans l'espace périplasmique, contrairement aux bactéries Gram-positives, chez lesquelles la traversée d'une seule membrane permet d'atteindre le milieu extracellulaire. Pour cette raison, les bactéries Gram positives sont utilisées de façon préférentielle dans l'industrie pour la production commerciale de protéines d'intérêt. Les voies de sécrétion Sec, Tat (*twin-arginine translocation*) et le système de transport SRP (*signal recognition particule*) seront ici traités plus en détails.

1. 2 Système de sécrétion Sec

La majorité des protéines sécrétées le sont via le système sec-dépendant. Ce système est essentiel à la survie des bactéries.

1. 2. 1 Peptide signal

Les protéines dont le destin est d'être sécrétées sont synthétisées sous la forme d'un précurseur protéique. Ce dernier possède à son extrémité N-terminale une séquence appelée peptide signal qui est clivée lors de la sécrétion pour libérer la protéine. Le peptide signal permet de distinguer les protéines sécrétées de celles qui vont demeurer cytoplasmiques. Il est donc requis pour diriger la protéine vers une voie de sécrétion adéquate.

Les peptides signaux possèdent une séquence pouvant varier entre 18 et 35 acides aminés et on y retrouve trois régions distinctes. Ils possèdent une région N-terminale chargée positivement, suivie d'une longue séquence d'acides aminés hydrophobes, ainsi qu'une région plus polaire, la région C-terminale possédant un site de clivage Ala-X-Ala reconnu par la signal peptidase. Les peptides signaux des bactéries Gram positives possèdent entre 29 et 31 a.a. Les peptides signaux chez les Streptomycètes mesurent en moyenne 35 a.a. (Gilbert *et al.*, 1995).

Région en N-terminal (région n)

La partie N-terminale du peptide signal est non-structurée et contient quelques acides aminés chargés positivement. Une diminution des charges positives de la région *n* peut modifier l'efficacité de la sécrétion. Les peptides signaux de *Streptomyces* se distinguent par le fait qu'ils possèdent une région *n* plus longue (environ 12 résidus) et plus riche en résidus arginine (environ 30 %) et très faible en résidus lysine (environ 3 %), ce qui est possiblement causé par la richesse du génome en G + C (von Heijne et Abrahmsen, 1989). La charge positive de la région *n* pourrait favoriser l'interaction avec la protéine SecA, une des composants principales de ce système (Akita *et al.*, 1990). La charge positive de la région *n* favorise également l'interaction avec la membrane qui possède des charges négatives en surface (Fekkes et Driessen, 1999).

Région hydrophobe (région h)

La région *h* est habituellement définie comme étant située immédiatement après le résidu en C-terminal le plus chargé dans la région *n*. Ce résidu est dans la majorité des cas suivi d'un ou de plusieurs acides aminés polaires non chargés avant l'apparition du premier résidu fortement hydrophobe. La région hydrophobe est formée de 10 à 15 acides aminés qui ont tendance à former une structure en hélice- α (von Heijne et Abrahmsen, 1989).

Région en C-terminal (région c)

La région en C-terminal possède une séquence reconnue par la signal peptidase de type I (SPase I), une endopeptidase liée à la membrane qui permet le clivage du peptide signal des précurseurs pendant ou suite à la translocation à travers la membrane (van Roosmalen *et al.*, 2004).

1. 2. 2 Composantes du système Sec

SecB

SecB est la première composante du système Sec à interagir avec le précurseur. SecB est une chaperonne moléculaire qui maintient le précurseur dans une conformation non-repliée de façon à ce que ce dernier puisse être pris en charge par le système Sec de sécrétion des protéines. Elle transfère ensuite la préprotéine à SecA (Driessen, Fekkes et van der Wolk, 1998). SecB est une protéine oligomérique soluble composée de quatre sous-unités de 16,6 kDa chacune (Kumamoto et Nault, 1989; Watanabe et Blobel, 1989). SecB n'est pas essentielle à la survie de la bactérie (van Wely *et al.*, 2001) sauf en milieu riche (Kumamoto et Beckwith, 1985) et son absence n'amène qu'une faible diminution de la translocation de quelques précurseurs (Fekkes et Driessen, 1999).

SecB n'est retrouvée que dans le cytoplasme des bactéries Gram négatives. En effet, aucun homologue de SecB n'a été retrouvé jusqu'à maintenant parmi les microorganismes Gram positifs séquencés (van Wely *et al.*, 2001). Les fonctions de SecB seront traitées plus en détail dans la section sur les chaperonnes cytoplasmiques.

SecA

Le récepteur de SecB à la membrane est la protéine SecA, une protéine homodimérique de 102 kDa (Schmidt *et al.*, 1988). SecA est essentielle à la survie de la cellule puisque

indispensable à la sécrétion des protéines par le système et est fonctionnelle uniquement sous forme de dimère (Driessen, 1993).

Le site de liaison de SecB sur SecA est situé au niveau de l'extrémité C-terminale et est constitué des 22 derniers résidus d'acides aminés. Les extrémités carboxyles de chacun des monomères de SecA sont nécessaires pour l'interaction avec SecB (Fekkes, van der Does et Driessen, 1997). Le domaine de liaison est hautement conservé chez la majorité des SecA bactériens avec pour exception ceux de *Streptomyces*, *Mycobacterium* et *Mycoplasma* (Fekkes et Driessen, 1999). Chez *Bacillus subtilis*, la portion C-terminale de SecA n'est pas essentielle à la viabilité de la bactérie ou la sécrétion des protéines (van Wely *et al.*, 2000).

SecA fixe et hydrolyse l'ATP, ce qui lui donne le rôle de moteur dans le processus de translocation (Wickner, Driessen et Hartl, 1991; van Wely *et al.*, 2001). SecA possède deux domaines de liaison aux nucléotides (NBS pour *nucleotide binding site*), NBS-I et NBS-II. NBS-I, important pour son activité, se situe au niveau du domaine N-terminal et lie l'ATP avec une haute affinité. NBS-II se trouve dans une portion plus centrale et possède une faible affinité pour l'ATP. NBS-II est important pour l'hydrolyse de l'ATP et la translocation des précurseurs. Il semblerait qu'il ne soit pas un NBS indépendant mais fonctionnerait plutôt comme régulateur intramoléculaire de l'hydrolyse de l'ATP au site NBS-I (van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). On retrouve SecA à l'intérieur du cytoplasme, ou encore associée à la membrane ou aux ribosomes (Pugsley, 1993). Elle peut également s'insérer dans la membrane lipidique (Breukink *et al.*, 1992; Pugsley, 1993).

L'interaction entre SecB et SecA est normalement de faible affinité en solution. Par contre, cette affinité augmente en présence d'un précurseur protéique (Hartl *et al.*, 1990; Fekkes, van der Does et Driessen, 1997). Chez *E. coli*, on remarque que l'interaction entre SecA et le précurseur est influencée par la charge positive de la portion N-terminale du précurseur ce qui indique que cette interaction est dépendante du peptide signal. L'intensité de l'interaction augmente d'ailleurs avec la charge positive nette (Akita *et al.*,

1990). Par ailleurs, SecA possède une affinité envers les portions matures des protéines (Wickner, Driessen et Hartl, 1991).

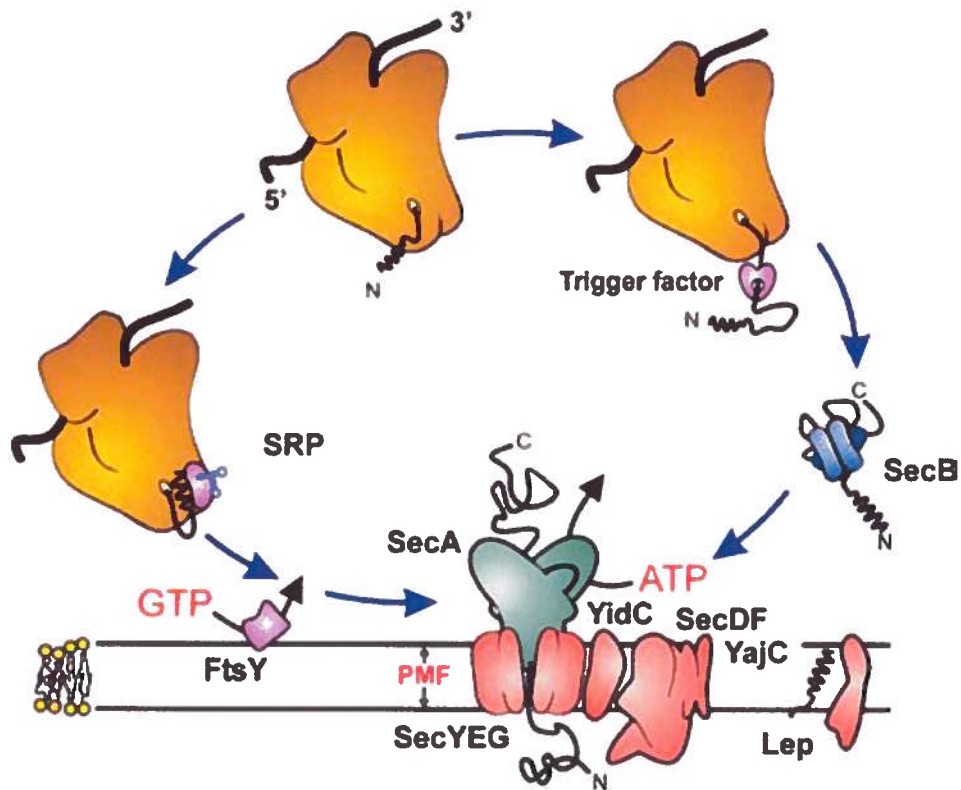


Figure 1. Composantes du complexe de translocation de la voie Sec.

Suite à l'émergence du précurseur du ribosome, il peut être ciblé à la translocase via deux voies distinctes impliquant respectivement la chaperonne SecB et le SRP et son récepteur FtsY. Le *trigger factor* compétitionne avec SRP pour la liaison avec le précurseur. Les protéines sont transloquées à travers la membrane via un complexe formé des protéines SecY, SecE et SecG. La translocation est favorisée par l'hydrolyse de l'ATP par SecA et par la force proton-motrice. Le peptide signal est clivé par la signal peptidase Lep. La protéine YidC et le complexe SecDFYajC sont également impliqués dans la translocation mais leurs fonctions demeurent moins connues. D'après de Keyzer et al. (2003).

Lors de l'initiation de la translocation, SecA possiblement liée à une molécule d'ADP est associée à SecYEG. Elle reconnaît le complexe formé de SecB et d'un précurseur protéique, ce qui induit un échange ADP/ATP. Suite à la liaison de l'ATP à SecA, la

conformation de cette dernière est modifiée, ce qui modifie également le site de fixation du précurseur sur SecB. Celle-ci libère la pré-protéine qui s'associe alors à SecA. SecB est donc relâchée et disponible pour lier de nouvelles pré-protéines (Fekkes, van der Does et Driessen, 1997). Il y a translocation d'une portion amino-terminale du précurseur d'environ 2,5 kDa, ce qui comprend le peptide signal. L'hydrolyse de l'ATP provoque la dissociation du précurseur de SecA et permet à celle-ci de se libérer de la membrane ou encore de se réassocier au précurseur partiellement transloqué. La réassociation induit la translocation d'un 2-2,5 kDa supplémentaire et permet un nouveau cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. Plusieurs cycles d'insertion/désinsertion entraînent donc la pré-protéine à travers la translocase membranaire SecYEG (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). La translocation peut être stimulée à différentes étapes par la force proton-motrice (FPM) (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003).

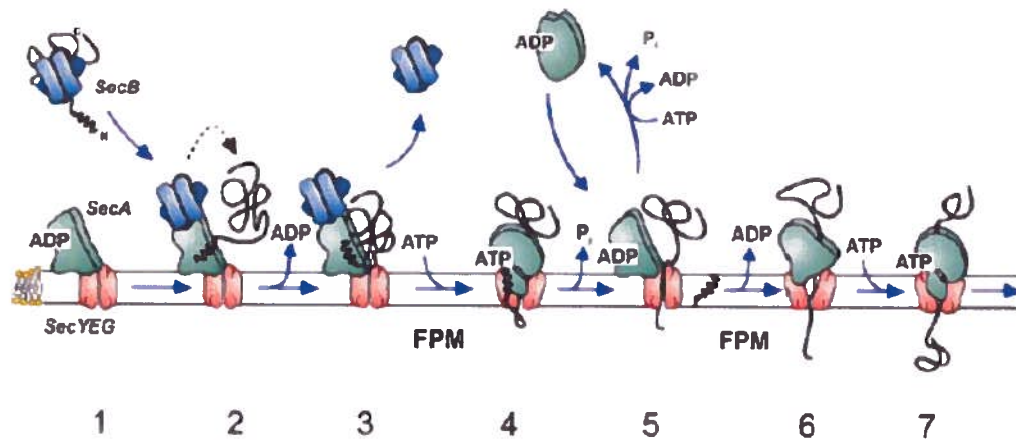


Figure 2. Modèle pour la translocation des précurseurs à travers la membrane à l'aide de l'ATP et de la protéine SecA

- 1- Le précurseur est dirigé vers la translocase via la chaperonne moléculaire SecB. Celle-ci lie SecA, lui-même lié à la translocase SecYEG, avec une forte affinité. La liaison au complexe SecB-précurseur est accompagnée d'un transfert de ce dernier vers SecA. Ceci induit la dissociation du précurseur de SecB.
- 2- La liaison du précurseur à SecA stimule l'échange d'ADP pour de l'ATP. Ceci provoque la dissociation de SecB.
- 3- L'énergie générée par l'attachement de l'ATP induit un changement conformationnel chez SecA et permet ainsi la translocation d'une portion amino-terminale du précurseur d'environ 2,5 kDa.
- 4- L'hydrolyse de l'ATP cause le relâchement du précurseur de SecA. Subséquemment, SecA peut se dissocier de la membrane,
- 5- Ou se réassocier au précurseur partiellement transloqué. Ceci provoque la translocation de 2 à 2,5 kDa supplémentaires.
- 6- Un nouveau cycle de fixation et d'hydrolyse d'ATP est généré
- 7- Des cycles répétés d'association/dissociation permettent une translocation par étapes du précurseur. Modifié à partir de de Keyzer et al., (2003).

La translocase membranaire SecYEG

Les protéines membranaires SecY, SecE et SecG forment un complexe (SecYEG) qui constitue le pore aqueux par lequel les protéines sont sécrétées (Economou *et al.*, 1995; Economou, 2000; van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003).

SecY est la protéine de la translocase avec la plus grande masse, soit 48 kDa. Elle se compose de 10 segments transmembranaires. SecY peut interagir avec SecA, SecG et forme un complexe particulièrement stable avec SecE (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). SecE, en s'associant avec SecY, empêche la dégradation de cette dernière par la protéase membranaire FtsH (van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). Chez *B. subtilis*, la délétion de SecY affecte grandement la croissance de la bactérie ainsi que la sécrétion d'un grand nombre de protéines (van Wely *et al.*, 2001). Un homologue de SecY a été identifié chez *S. lividans* 1326. La séquence déduite serait de 437 a.a. et possède 42 % et 40 % d'identité avec ses homologues de chez *E. coli* et *B. subtilis*, respectivement (Ostiguy *et al.*, 1996).

SecE, une protéine de 14 kDa formée de trois segments transmembranaires (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003), contribuerait également à la spécificité ainsi qu'à l'activité catalytique de la translocase. Celle-ci est également essentielle à la viabilité de la cellule, ainsi qu'à la translocation des précurseurs (van Wely *et al.*, 2001). La protéine SecE retrouvée chez *E. coli* est considérablement plus longue que chez les bactéries Gram positives. En effet, SecE se constitue de 60 résidus d'acides aminés et ne possède qu'un seul domaine transmembranaire chez les bactéries Gram positives alors qu'elle se constitue de 127 résidus d'acides aminés chez *E. coli* (Tjalsma *et al.*, 2000; van Wely *et al.*, 2001). Un homologue de SecE a aussi été identifié chez les Streptomycètes (Miyake *et al.*, 1994).

SecG, la troisième composante de la translocase, n'est pas essentielle pour la translocation des précurseurs mais la stimule *in vitro*, surtout à basse température, lorsque la force proton-motrice est faible ou absente ou encore en absence de SecDF (Economou,

1999). SecG n'interagit qu'avec la sous-unité SecY de la translocase (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). SecG (12 kDa) possède deux segments transmembranaires connectés via un segment cytosolique apolaire. Elle est plus courte de 80 a.a. chez les bactéries Gram positives par rapport à celle trouvée chez les bactéries Gram négatives (van Wely *et al.*, 2001). Chez *B. subtilis*, le gène *yvaL* code pour un homologue de SecG (Tjalsma *et al.*, 2000).

Le complexe SecDFYajC

SecD ainsi que SecF sont deux grandes protéines ayant des fonctions accessoires dans la translocation. Elles possèdent chacune six segments transmembranaires et un grand domaine périplasmique. SecD et SecF s'associent à YajC, une protéine membranaire possédant un seul segment transmembranaire ainsi qu'un domaine cytosolique. Ensembles, elles forment le complexe hétérotrimérique SecDFYajC. Chez *E. coli*, *secD*, *secF* et *yajC* se trouvent sur le même opéron (van Wely *et al.*, 2001).

Même si la fonction exacte de SecDFYajC demeure inconnue, chez *E. coli*, le complexe semble impliqué dans le cycle catalytique de SecA lors de la translocation des précurseurs. SecDF pourraient également être impliqués dans des stades ultérieurs de la translocation. Il a en effet été suggéré que SecD soit impliquée dans le relâchement des protéines une fois leur translocation à travers la membrane cytoplasmique complétée (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). SecDF seraient particulièrement importants en absence de SecG et auraient pour fonction de stabiliser la forme membranaire de SecA (Economou *et al.*, 1995). Le complexe SecDFYajC s'associerait faiblement avec SecYEG afin de former une translocase supramoléculaire.

De plus, les mutants ne produisant plus SecD ou SecF sont sensibles au froid lors de la croissance et présentent de graves déficiences au niveau de la translocation protéique. La protéine YajC ne semble toutefois pas essentielle, ni pour la viabilité de la cellule, ni pour la translocation protéique (van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003).

Chez *B. subtilis* et chez quelques autres bactéries, SecD et SecF sont fusionnées pour former une seule protéine membranaire de 571 a.a. possédant 12 segments transmembranaires. Comme chez *E. coli*, la déplétion de SecDF chez *B. subtilis* entraîne une sensibilité au froid lors de la croissance ainsi qu'une déficience au niveau de la sécrétion des protéines mais n'affecte pas la viabilité. Chez *B. subtilis*, l'homologue de YajC est codé par le gène *yrbF* et ce dernier, bien que situé sur la même région du chromosome que *secDF*, n'est pas co-transcrit avec ces derniers (Tjalsma *et al.*, 2000; van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003).

1. 3 Système de transport SRP

Chez les eucaryotes, la translocation de précurseur protéique à travers le réticulum endoplasmique dépend de la particule de reconnaissance du signal ou SRP (*signal recognition particule*). La SRP représente un complexe formé de six protéines (SRP54, SRP19, SRP9/4 et SRP68/22) et d'une molécule d'ARN 7S. SRP19 est impliqué dans l'assemblage de SRP. L'hétérodimère 9/14 est impliqué dans l'arrêt de la translocation et SRP54, une protéine de 54 kDa, est la seule composante du système à reconnaître le peptide signal. Elle est également impliquée dans la fonction GTPase et dans la liaison au récepteur SRP. Le récepteur SRP consiste en deux protéines se liant au GTP, SR α et SR β . SR α est attachée à la membrane via son domaine N-terminal tandis que SR β est une protéine membranaire (Fekkes et Driessen, 1999; Eichler, 2003). La fonction de l'hétérodimère SRP68/71 demeure moins connue. La SRP interagit avec le peptide signal d'une chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée émergente du ribosome et cible ensuite le complexe chaîne polypeptidique-ribosome au récepteur SRP à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique (van Wely *et al.*, 2001). SRP est relâché et la traduction par le ribosome est arrêtée.

La voie SRP est plutôt bien comprise chez les eucaryotes mais on la retrouve aussi chez les archaebactéries ainsi que chez les eubactéries. Certains homologues des composantes du système SRP ont donc été découverts chez les procaryotes. Ffh (*fifty-four homolog*),

une GTPase de 48 kDa et l'ARN 4,5S sont des homologues de SRP54 et de l'ARN7S ayant été trouvés chez *E. coli*. Ffh, comme son homologue eucaryote (SRP54), interagit avec le peptide signal mais seulement lorsqu'il est lié à l'ARN 4,5S. SRP se lie à FtsY, un homologue de la sous-unité α du récepteur chez les eucaryotes (SR α) (Fekkes et Driessen, 1999; de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). FtsY possède des formes cytosoliques ainsi que membranaires ayant une activité GTPase. Le mécanisme d'association avec la membrane demeure toutefois incertain. Il pourrait s'agir d'une interaction protéine-lipide directe impliquant le domaine GTPase de FtsY ou encore d'une interaction protéine-protéine entre le domaine amino-terminal de FtsY et un récepteur membranaire. La SRP reconnaît ses substrats à l'aide de la présence d'une séquence signale hydrophobe.

Chez *E. coli*, la route SRP converge avec la voie dépendante de la protéine SecB au niveau de la translocase. Il a donc été proposé que la voie SRP agisse de façon co-traductionnelle tandis que la voie dépendante de SecB agirait principalement de façon post-traductionnelle. SecA, SecB, SecE et l'ATP seraient dispensables pour le transfert de certaines pré-protéines membranaires vers SecY ainsi que pour leur insertion subséquente dans la membrane, ce qui suggère que SRP-FtsY et SecB-SecA constituent deux voies distinctes, tant pour le ciblage que pour la translocation des précurseurs.

Le choix d'une route en faveur de la seconde dépendrait de l'hydrophobicité des peptides signaux, la voie SRP prenant en charge les protéines ayant un peptide signal plus hydrophobe. Chez *E. coli*, la voie SRP serait donc impliquée dans la prise en charge des protéines destinées à la membrane interne tandis que la voie impliquant SecB-SecA prendrait plutôt en charge les protéines périplasmiques et de la membrane externe. Puisque les peptides signaux de *B. subtilis* sont plus longs et plus hydrophobes que ceux de *E. coli*, il semble normal que la majorité des protéines soient sécrétées de façon SRP-dépendantes (Tjalsma *et al.*, 2000).

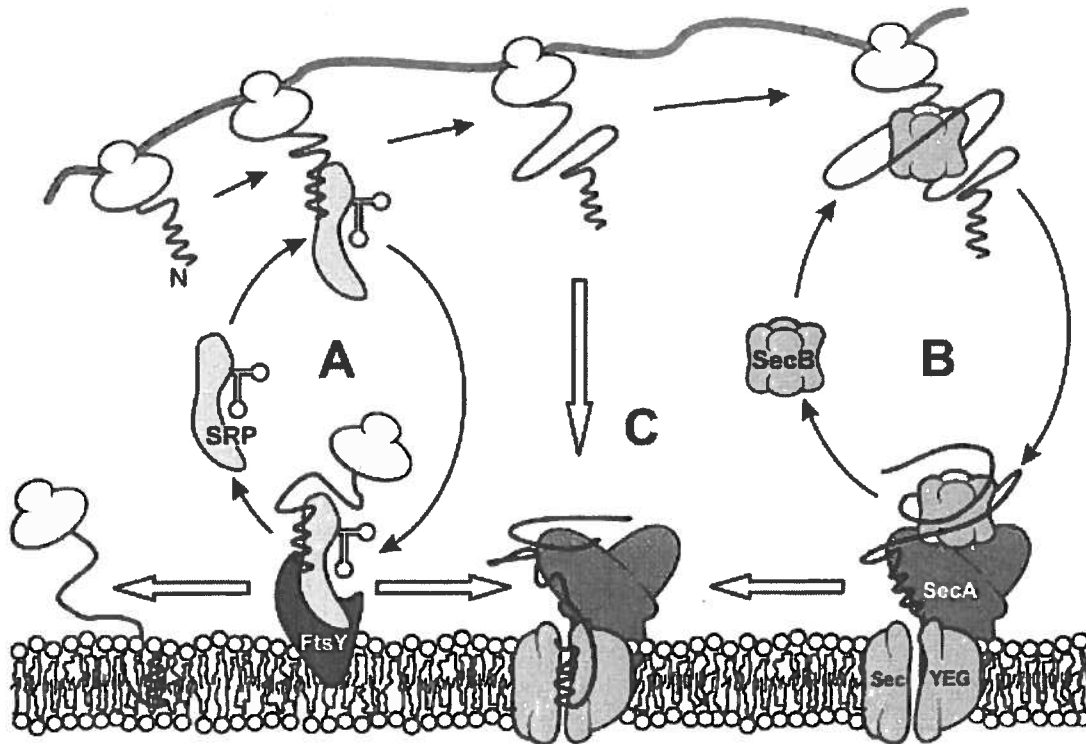


Figure 3. Co-existence des voies SRP et SecB-dépendante.

Lorsqu'un précurseur ou qu'une protéine membranaire émerge du ribosome, le peptide signal est exposé en premier (A). Lorsque ce dernier est fortement hydrophobe, il lie le SRP ainsi que le précurseur pour ensuite être ciblé vers FtsY, qui se lie ensuite à la membrane. Le SRP est alors dissocié du précurseur de façon GTP-dépendante. Le précurseur ou la protéine membranaire est subséquentment transféré à la translocase formée de SecYEG et de l'ATPase SecA OU insérée dans la membrane via une autre voie. (B) Lorsque le peptide signal échappe au système SRP et que la portion mature de la protéine est adéquate, SecB s'y liera et ciblera le précurseur vers l'ATPase SecA. À la membrane, SecB transfère le précurseur à SecA. Suite à la liaison de l'ATP par SecA, la translocation est initiée et SecB est relâchée. (C) Lorsque le précurseur n'est pas reconnu par SecB, le peptide signal peut le dirigé directement vers SecA. D'après Fekkes et Driessen (1999).

Un homologue de SRP9/14 a été identifié chez *B. subtilis* comme étant la protéine HBSu (*histone-like*). Celle-ci s'associe à un court ARN cytoplasmique (scRNA) fonctionnellement apparenté à l'ARN 7S des eucaryotes et à l'ARN 4,5 de *E. coli*. HBSu se lie à une région sur le scRNA qui n'est pas conservée chez l'ARN 4,5 de *E. coli*, ce qui suggère que HBSu y est absent. Elle ne possède pas de similarité significative de séquence avec SRP9 ou SRP14 des eucaryotes mais partage par contre une homologie structurale avec l'hétérodimère SRP9/14. Il n'est toutefois pas certain que la voie SRP de

B. subtilis soit apte à effectuer l'étape d'arrêt de la traduction observée chez les eucaryotes (Eichler, 2003).

Chez *S. lividans*, le système SRP se compose d'un SRP fonctionnelle et d'un complexe ribonucléoprotéique formé de Ffh et d'un court ARN cytoplasmique (scRNA) de 82 nt de long. Le fait que cet ARN soit très court, tel qu'observé chez *E. coli*, laisse croire à la possibilité que d'autres protéines adhèrent au complexe, bien que ceci ne demeure qu'une hypothèse. FtsY fait également partie du système SRP chez *S. lividans* (Palacin *et al.*, 2003). L'équipe de Palacin a également tenté de générer des mutants pour l'une des trois composantes mais ces tentatives s'avèrent un échec, ce qui indiquerait que celles-ci sont essentielles pour *S. lividans*. Malgré la simplicité de sa composition, le système SRP de *S. lividans* semble impliqué dans la sécrétion des protéines. En effet, des expériences de co-immunoprécipitation permettent d'observer que Ffh interagit avec le précurseur de l'agarase. La longueur et l'hydrophobicité des peptides signaux des protéines sécrétées par *S. lividans* semblent être davantage similaires à celles de *B. subtilis* qu'à celles de *E. coli* (Palacin *et al.*, 2003). Chez *B. subtilis*, ces caractéristiques permettraient au système SRP de cibler à la fois les protéines sécrétées et les protéines membranaires, ce qui permet d'assumer que c'est également le cas chez *S. lividans* (Palacin *et al.*, 2003).

1. 4 Le système de sécrétion Twin-Arginine (Tat)

1. 4. 1 Introduction

Un nouveau système de sécrétion bien différent du système Sec est récemment découvert. Ce nouveau système a pour particularité de transporter des protéines déjà repliées dans le cytoplasme. Ce système est nommé Tat pour *Twin-arginine translocation*, puisque le peptide signal des précurseurs possède la signature S-**R-R**-x-F-L-K, où x est un acide aminé polaire, à l'intérieure de laquelle on retrouve un doublet d'arginines invariables, les autres résidus étant présents à une fréquence supérieure à 50%. Le système Tat transporte les protéines à l'aide de la force proton-motrice et est apparenté au système Δ pH-dépendant retrouvé au niveau des membranes thylakoïdes des chloroplastes des plantes.

Le système Tat est en mesure de transporter des protéines associées à des co-facteurs ou encore certaines protéines sans peptide signal qui sont transportées en formant un complexe avec un second précurseur possédant un peptide signal. Ce phénomène est appelé *hitchiking* ou « co-translocation sur le pouce ». Certaines protéines sans co-facteur peuvent également être prises en charge par le système Tat probablement parce qu'elles nécessitent des facteurs cytoplasmiques pour leur repliement ou encore parce qu'elles se replient trop rapidement ou de façon trop serrée pour être sécrétées par le système Sec (Berks, Sargent et Palmer, 2000).

Le système Tat est impliqué dans la sécrétion de différents types de protéines aux fonctions variables. Chez *E. coli*, la majorité des protéines sécrétées par Tat sont des protéines redox. Par contre, chez *Halobacterium*, la plupart des substrats Tat prédits ne sont pas redox et sont plutôt impliqués dans les mécanismes d'adaptation à des fortes concentrations en sels (Rose *et al.*, 2002). La mutation Δ *tatC* chez *Pseudomonas aeruginosa* affecte grandement la virulence de la bactérie et le système Tat serait important pour la sécrétion de plusieurs facteurs de virulence (Ochsner *et al.*, 2002). La spécificité du système pour les précurseurs repliés reste également à élucider. La

machinerie du système Tat pourrait reconnaître les zones hydrophiles retrouvées à la surface des protéines lorsque celle-ci sont repliées, ce qui expliquerait que le système ne peut reconnaître les précurseurs linéaires exposant leurs zones hydrophobes en surface comme c'est le cas au niveau de la voie Sec-dépendante. Le fonctionnement détaillé du système Tat est cependant toujours nébuleux, ce qui ajoute d'ailleurs à l'intérêt de ce projet de recherche.

1. 4. 2 Peptide signal

Tout comme le peptide signal Sec, les peptides signaux Tat sont composés de trois régions comprenant une région N-terminale (région *n*), une région hydrophobe (région *h*) constituée d'une hélice α ainsi qu'une région en C-terminale (région *c*) qui contient le site de clivage pour la signal peptidase. Les peptides signaux Tat peuvent contenir entre 26 et 58 a.a. tandis que les peptides signaux Sec contiennent habituellement entre 18 et 26 a.a. C'est la région *n* qui contribue à cet allongement. (Berks, 1996).

Région n

La région *n* des peptides signaux Tat comprend quelques acides aminés chargés positivement. On retrouve également la présence d'un motif situé à la frontière des régions *n* et *h*. On retrouve dans cette séquence signature (S/T-RR-x-F-L-K) deux résidus arginine consécutifs. La fréquence des autres acides aminés est de plus de 50% et x est normalement un acide aminé polaire (Berks, 1996; Stanley, Palmer et Berks, 2000).

Région h

La région *h* du peptide signal Tat est significativement moins hydrophobe que chez les peptides signaux Sec, ce qui est surtout causé par la plus grande présence de résidus glycine et thréonine et par une quantité moindre de résidus leucine (Berks, Sargent et Palmer, 2000). L'hydrophobicité de la région *h* aurait un rôle crucial dans la direction des

précurseurs vers le système Sec ou Tat. En effet, en augmentant l'hydrophobicité du peptide signal de TorA:P2 (peptide signal de la triméthylamine N-oxide réductase fusionné au domaine périplasmique de la signal peptidase), une protéine Tat-dépendante, celle-ci est redirigée vers le système Sec (Cristobal *et al.*, 1999).

Région c

Les peptides signaux de type Tat possèdent souvent des a.a. basiques à proximité du site de clivage pour la signal peptidase alors que chez les peptides signaux Sec, la présence de résidus chargés positivement près du site de clivage peut être néfaste (Cristobal *et al.*, 1999; Berks, Sargent et Palmer, 2000). La présence de ces résidus chargés positivement dans cette région serait donc pour les précurseur un moyen supplémentaire pour échapper au système Sec. Les sites de clivage des peptides signaux Tat sont très semblables à ceux de la voie GSP et sont représentés par la séquence A-x-A.

1. 4. 3 Composantes du système Tat

Les différents gènes codant pour les composantes du système Tat, à l'exception du gène *tatE*, sont regroupés en opéron (*tatABCD*) (Sargent *et al.*, 1998). *TatA*, *tatB*, *tatC* et *tatE* codent tous pour des protéines membranaires tandis que *tatD* code pour une désoxyribonucléase cytoplasmique. Son implication dans la sécrétion des protéines par le système Tat demeure toutefois incertaine (Wexler *et al.*, 2000). Les gènes codant pour les composantes du système Tat sont retrouvés chez la majorité des génomes procaryotes mais demeurent absents chez les bactéries ne possédant qu'un seul type de métabolisme fermentaire ainsi que chez les méthanogènes et les parasites intracellulaires (Berks, Sargent et Palmer, 2000). Des études chez *E. coli* ont démontré que TatABC co-purifient ensemble sous la forme d'un complexe d'environ 500-600 kDa et que TatB et TatC seraient présentes dans un ratio de 1 :1 (Bolhuis *et al.*, 2001). La majorité des TatA ne co-purifie toutefois pas avec les sous-unités BC et forme à la place des homo-oligomères (de Leeuw *et al.*, 2002; Mangels *et al.*, 2005).

Lorsqu'il y a présence d'un système Tat, le génome code généralement pour une copie de TatC et deux copies des homologues TatA/B/E. Dans quelques cas on retrouve une copie additionnelle de TatC ou de TatA/B/E. Le génome de *Rickettsia prowazekii* code pour une seule copie de TatA/B/E tandis que chez *B. subtilis* le génome code pour deux copies des homologues de TatC (*tatCd* et *tatCy*) (Berks, Sargent et Palmer, 2000; Jongbloed *et al.*, 2000) et trois copies de TatA (*tatAd*, *tatAy* et *tatAc*) (Jongbloed *et al.*, 2000). Chaque gène *tatC* est précédé d'un gène *tatA* sauf pour un qui n'est relié à aucun gène *tatC*. Les trois protéines TatA présentent des similarités avec les protéines TatA/B et TatE de chez *E. coli*, ce qui laisse croire à des équivalences fonctionnelles (Jongbloed *et al.*, 2000). Sur les 69 candidats Tat (protéines présentant des motifs -RR- et -KR- dans le peptide signal) chez *B. subtilis*, 14 sont détectables par électrophorèse bidimensionnelle effectuée à partir du protéome extracellulaire de cellules mises en culture en milieu riche ou en carence en phosphate. Seule PhoD est confirmée comme étant sécrétée strictement pas le système Tat (Jongbloed *et al.*, 2002). Celle-ci n'est toutefois exprimée qu'en situation de carence en phosphate.

TatA/B/E

Les protéines TatA, TatB et TatE présentent des homologies avec la composante HCF106 faisant partie du système Δ pH-dépendant chez le maïs (Sargent *et al.*, 1998). TatA et TatB sont toutes deux ancrées à la membrane par une hélice transmembranaire N-terminale (Muller, 2005). TatA s'associerait avec le complexe formé de TatB et TatC une fois la translocation initiée, c'est-à-dire suite à sa liaison avec le substrat protéique. Par contre, des études de co-immunoprécipitations démontrent que TatA peut s'associer avec le complexe chez des mutants présentant des déficiences au niveau de la translocation autant que chez une souche sauvage (Mangels *et al.*, 2005).

TatA pourrait par ailleurs être impliqué dans la stabilisation du complexe TatABC. En effet, en absence de TatA, il y a toujours assemblage du complexe mais la protéine TatB devient plus sensible à la dégradation (Mangels *et al.*, 2005). Le rôle exact de TatA au niveau du complexe de translocation demeure toutefois à éclaircir.

Le gène *tatE* code pour une protéine hautement similaire à TatA (près de 60% d'identité) et serait possiblement le résultat d'une duplication de gène cryptique. TatB présente une plus faible identité avec les deux autres, soit environ 25 % (Berks, Sargent et Palmer, 2000).

TatC

TatC est une protéine fortement hydrophobe possédant six hélices transmembranaires. Les extrémités C et N-terminales sont situées du côté cytoplasmique de la membrane (Sargent *et al.*, 1998). TatC est également essentielle à la translocation par le système Tat. Il s'agit également de la composante Tat présentant le plus haut taux de conservation au niveau des acides aminés chez ses homologues parmi les eubactéries et les eucaryotes (Palmer et Berks, 2003). Chez *B. subtilis*, la protéine PhoD est sécrétée de façon TatC-dépendante (TatCd). Le génome de *B. subtilis* code pour deux copies des homologues de TatC (*tatCd* et *tatCy*). *tatCy* n'est par ailleurs pas requis pour la sécrétion de PhoD et sa présence interfère même avec sa sécrétion optimale (Jongbloed *et al.*, 2000).

TatD

Chez *E. coli*, le gène *tatD* est situé à la suite de l'opéron *tatABC* et code pour une DNase cytoplasmique. Bien que *tatD* soit co-transcrit avec trois des gènes codant pour des composantes essentiels du système Tat, la protéine TatD (29 kDa) est produite beaucoup plus faiblement que les autres membres de l'opéron et ne semble pas essentielle au fonctionnement du système. Les protéines de la famille TatD présente des similarités de séquence avec les protéines de la superfamille des phosphoestérases métal-dépendantes (Wexler *et al.*, 2000).

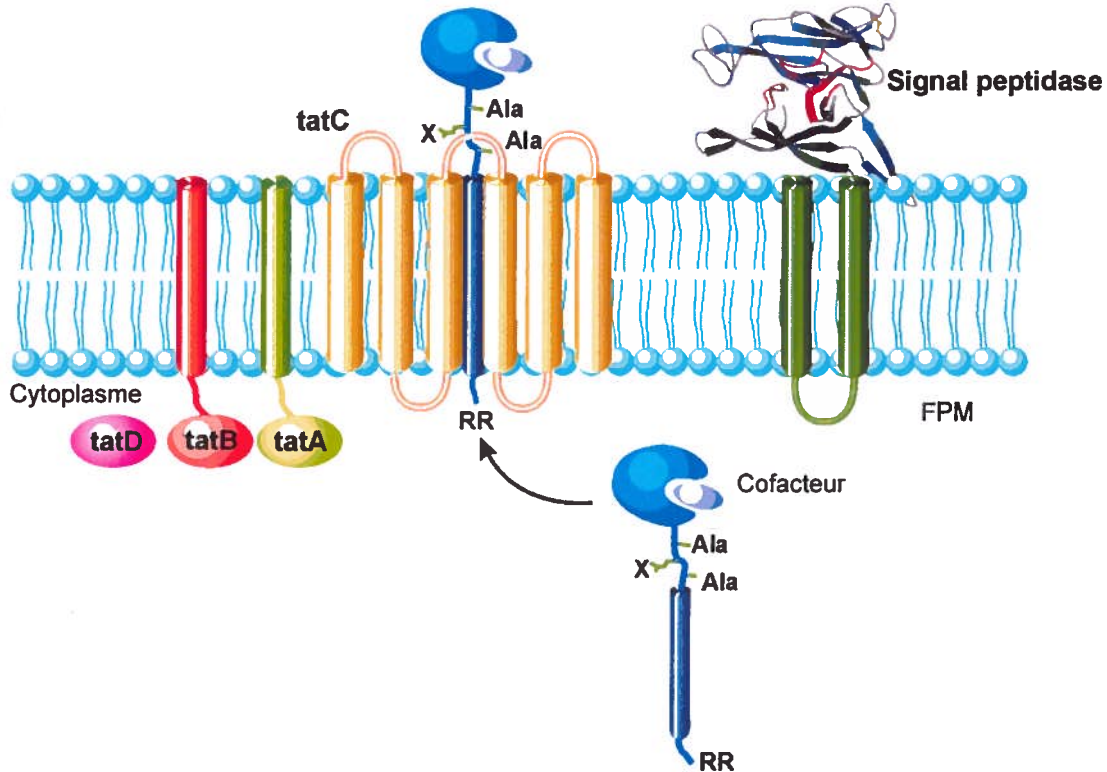


Figure 4. Composantes du système Tat.

Les protéines TatA, TatB et TatC sont impliquées au niveau du système de translocation Tat. La protéine TatD est une DNase cytosolique de fonction encore inconnue. La protéine TatE est absente sur le schéma. La force proton-motrice est fournie l'énergie nécessaire à la translocation. Modifiée à partir de www.biochem.ubc.ca

1. 4. 4 Insertion de co-facteurs

Il a été constaté qu'un bon nombre de précurseurs Tat devaient s'associer à un co-facteur redox pour leur sécrétion. En effet, les protéines sécrétées par Tat sont souvent des enzymes tels que les ferrédoxines, les hydrogénases, les réductases ou les oxydases. Afin d'être actives, ces protéines doivent se fixer à différents cofacteurs comme le fer, le soufre, le molybdène, le cuivre ou le FAD (Berks, 1996). Par exemple, chez *E. coli*, 18 des 28 substrats Tat présumés sont reconnus ou prédits comme se fixant à un cofacteur. Ces protéines jouent des rôles importants dans la flexibilité respiratoire de l'organisme (Palmer, Sargent et Berks, 2005). La fixation au co-facteur serait assistée par des facteurs

cytoplasmiques qui reconnaîtraient et lieraient le précurseur (Berks, Sargent et Palmer, 2000; Palmer, Sargent et Berks, 2005). Plusieurs protéines contenant des co-facteurs sont actives sous forme d'hétérodimères où le peptide signal Tat n'est présent que sur l'une des deux sous-unités. La deuxième sous-unité ne possède pas de peptide signal mais est transloquée grâce à la liaison avec sa partenaire. Ce phénomène est appelé *hitchhiker co-translocation* ou co-translocation sur le pouce (Rodrigue *et al.*, 1999; Palmer, Sargent et Berks, 2005).

La sécrétion de protéines redox n'intervient qu'après la fixation de leur co-facteur. Ceci implique donc la présence d'un système pouvant contrôler cette opération. L'insertion de co-facteur ainsi que l'assemblage des [NiFe] hydrogénases requiert la participation de protéines accessoires. Les protéines HybE et HyaE interagissent avec le peptide signal Tat des précurseurs des hydrogénases-1 et 2 tel que démontré par un système double-hybride chez *E. coli*. L'hydrogénase-1 est un hétérodimère formé d'une sous-unité α (HyaB) se liant au cofacteur NiFe et d'une sous-unité β (HyaA) se liant à un groupe Fe-S. L'hydrogénase-2 se compose du dimère HybOC. Le complexe s'associe avec la férredoxine périplasmique « 16Fe » HybA et la protéine membranaire HybB afin de former un grand complexe tétramérique. HyaE est une chaperonne possible pour la petite sous-unité de l'hydrogénase-1 et HybE a un rôle similaire pour l'hydrogénase-2. HybE interagit également avec le précurseur de HybO (petite sous-unité de l'hydrogénase-2) ainsi qu'avec sa partenaire, la sous-unité HybC. Ces deux sous-unités sont exportées dans le périplasme par le système Tat grâce au peptide signal Tat de la sous-unité HybO (Rodrigue *et al.*, 1999). Une mutation dans le gène *hybE* bloque la protéine HybC dans le cytoplasme alors que HybO peut toujours être exportée dans le périplasme. Ceci implique par ailleurs que HybE effectue un travail de coordination dans l'assemblage de l'hétérodimère HybOC (Dubini et Sargent, 2003).

L'enzyme diméthylsulphoxide réductase est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique (DmsA, 86 kDa), d'une sous-unité Fe-S (DmsB, 23 kDa) et d'une sous-unité membranaire (DmsC, 31 kDa). DmsA et DmsB fonctionnent comme un dimère catalytique tandis que DmsC sert d'ancrage à la membrane et se lie à la ménaquinone. DmsA est responsable de la fixation au cofacteur ainsi que de la translocation du dimère

DmsAB, DmsB étant dépourvu de peptide signal (Sambasivarao *et al.*, 2000). Une fusion entre le peptide signal Tat de la sous-unité DmsA de la diméthylsulphoxide réductase et le N-terminal de la glutathione-*S*-transférase de *E. coli* a été effectuée. DmsA se lie à un co-facteur molybdène lors de sa sécrétion. Des expériences de colonnes d'affinité ont permis de recueillir des protéines pouvant se lier avec le peptide signal de DmsA. Parmi ces protéines se trouve DnaK et la protéine Ynfl (par la suite rebaptisée DmsD). DmsD interagit avec le peptide signal et non avec la portion mature de la protéine. DmsA escorterait le précurseur jusqu'à la translocase de façon à contrôler le repliement et pourrait également interagir avec certaines composantes du système Tat (Oresnik, Ladner et Turner, 2001).

La triméthylamine N-oxide (TMAO) réductase est une protéine rédox périplasmique Tat-dépendente et se liant à un co-facteur molybdène. TorD est une protéine spécifique à TorA qui se lie au peptide signal Tat du précurseur de la TMAO réductase. Ceci empêche le précurseur d'interagir avec la translocase du système Tat localisée à la membrane cytoplasmique. TorD se lie également à la portion mature du précurseur, ce qui maintient ce dernier dans une conformation partiellement repliée nécessaire à l'insertion du co-facteur. L'insertion du co-facteur induit ensuite la libération de TorD et le peptide signal de la TMAO réductase devient libre d'interagir avec la translocase Tat (Berks, Palmer et Sargent, 2005).

1. 4. 5 Protéines sans cofacteur

Certaines protéines ne possédant pas de co-facteurs sont néanmoins transloquées par le système Tat, c'est le cas de la xylanase C (XlnC) chez *S. lividans* ou encore la protéine PhoD chez *B. subtilis* (van Dijl *et al.*, 2002; Pop *et al.*, 2003; Faury *et al.*, 2004). Des facteurs cytoplasmiques comme des protéines chaperonnes pourraient donc être impliquées dans leur repliement avant leur sécrétion.

1. 5 Les signal peptidases

Les signal peptidases (SPases) sont des enzymes clivant le peptide signal des protéines lors des premières étapes de translocation. Le site de reconnaissance des signal peptidases se retrouvent en C-terminal du peptide signal et est généralement A-x-A ou x peut représenter presque n'importe quel résidu. Les SPases procaryotiques de type I, également appelées Lep chez *E. coli* pour *leader peptidase*, prennent en charge la majorité des précurseurs. La majorité des organismes ne possède qu'une seule SPase de type I qui semble essentielle, comme c'est le cas chez *E. coli*. *Bacillus subtilis* possède sept SPases. Cinq gènes *sipS*, *sipT*, *sipU*, *sipV* et *sipW*, sont dispersés sur le chromosome tandis que deux autres (*sipP*) se retrouvent sur des plasmides (Tjalsma *et al.*, 2000). Les signal peptidases d'*E. coli* sont très différentes de celles de *Bacillus*, mais elles reconnaissent toutes le site de coupure A-x-A sur les peptides signaux et de plus elles sont interchangeables entre les deux espèces bactériennes (Simonen et Palva, 1993).

Quatre gènes adjacents (*sipW*, *sipX*, *sipY* et *sipZ*) codant pour différentes SPases de type I ont été identifiées chez *S. lividans* TK21. Trois de ces gènes (*sipW*, *sipX* et *sipY*) constituent un opéron tandis que le quatrième (*sipZ*) est le premier gène d'un autre opéron comprenant trois gènes additionnels non reliés. SipY est ancrée dans la membrane par ses extrémités N et C-terminales et serait celle principalement impliquée au niveau du système Sec puisqu'on la retrouve en plus grande quantité et qu'une mutation du gène *sipY* entraîne des déficiences au niveau de la maturation des précurseurs (Palacin *et al.*, 2002). SipX et SipZ ne sont ancrées à la membrane que via leur extrémité C-terminale tandis que SipW ne possède qu'un segment transmembranaire N-terminal, ce qui est retrouvé chez la plupart des SPases (Geukens *et al.*, 2001).

Lorsque le site de clivage A-H-A est remplacé par V-D-S, la sécrétion de la xylanase A, une protéine Sec-dépendante, chez *S. lividans* est inhibée. Le précurseur est synthétisé mais il n'y a pas maturation de ce dernier. Le remplacement du site de reconnaissance

A-H-A situé sur le peptide signal de la XlnC, une protéine Tat-dépendante, par A-H-E, V-D-S ou R-L-E n'ont aucun effet sur la sécrétion d'une XlnC mature et la production est presque égale à ce qui est observé dans le cas d'une souche sauvage de *S. lividans* (Li, Faury et Morosoli, 2006). Ceci indiquerait que la SPase I impliquée dans le clivage des peptides signaux chez le système Tat diffère de celle impliquée au niveau du système Sec. L'implication et la spécificité des quatre SPases I identifiées chez *S. lividans* au niveau des systèmes Sec et Tat pourraient donc différer. De plus, le site A-x-A, bien que presque toujours présent chez les précurseurs Tat, ne serait pas essentiel à leur maturation (Li *et al.*, 2005).

1. 6 Le repliement des protéines

L'un des événements les plus critiques de la biosynthèse des protéines seraient la conversion entre une chaîne linéaire d'acides aminés en une structure tridimensionnelle adéquatement repliée. En effet, dès que la chaîne polypeptidique émerge du ribosome, différents phénomènes peuvent entraîner des mauvais repliements et/ou l'agrégation de protéines. Les protéines sécrétées par le système Sec doivent être maintenues en conformation linéaire avant la traversée de la membrane. Le repliement de la protéine se produit après la sécrétion, au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatives et dans l'espace situé entre la membrane et la paroi chez les bactéries Gram positives. Des protéines chaperonnes seraient impliquées dans ce repliement bien que leur rôle précis ne soit toujours pas clairement établi.

Les chaperonnes cytoplasmiques impliquées dans le système de transport Sec-dépendant favorisent le maintien de la forme linéaire de la protéine pour qu'elle puisse être sécrétée. SecB joue ce rôle chez les bactéries Gram négatives. Jusqu'à présent aucune chaperonne homologue à SecB n'a été découverte chez les bactéries Gram positives.

Chez le système Tat, contrairement au système Sec, on remarque que seules les protéines ayant atteint un certain degré de repliement dans le cytoplasme sont exportées, ce qui indique la présence d'un mécanisme de contrôle du repliement intrinsèque au système

(DeLisa *et al.*, 2002). Les protéines chaperonnes présentes dans le cytoplasme seraient donc nécessaires au repliement adéquat des précurseurs Tat et donc à leur translocation.

1. 7 Les protéines chaperonnes

Les chaperonnes moléculaires forment un groupe de protéines qui favorisent le repliement d'autres chaînes polypeptidiques pour qu'elles adoptent leur conformation active sans toutefois faire partie de la structure finale (Ellis, 1987; Hartl, 1996). Elles peuvent prévenir l'agrégation et la dégradation de protéines mal conformées en rectifiant leur repliement pour en faire une forme active. Les chaperonnes peuvent aussi stabiliser les précurseurs protéiques sous forme dépliée afin de prévenir certains repliements hâtifs, ce qui permet d'éviter la formation de structures incorrectes (par rapport à la conformation finale). Les chaperonnes protègent certaines protéines lorsque les cellules sont soumises à des conditions de stress. Elles jouent aussi un rôle lors de l'assemblage de complexes multiprotéiques. (Hartl, 1996; Fink, 1999). Les chaperonnes agissent en se liant temporairement aux structures intermédiaires formées lors du repliement protéique de façon à prévenir des interactions inter et intramoléculaires entre différentes surfaces hydrophobes temporairement exposées à la surface des molécules (Winter et Jakob, 2004).

1. 7. 1. Principales chaperonnes cytoplasmiques

1. 7. 1. 1 SecB

SecB est une chaperonne qui maintient le précurseur dans une conformation non repliée de façon à ce que ce dernier puisse être pris en charge par le système de sécrétion Sec des protéines. *In vitro*, SecB possède une forte affinité pour un motif d'environ neuf résidus majoritairement aromatiques ou basiques retrouvés statistiquement tous les 20-30 résidus dans le protéome de *E. coli*. Ceci expliquerait d'ailleurs le manque d'homologie au

niveau des séquences de ses différents substrats (Knoblauch *et al.*, 1999). Chez les espèces bactériennes Gram positives, aucun homologue de SecB n'a encore été identifié. SecB agit comme chaperonne chez *E. coli* en interagissant pendant ou suite à la traduction avec de courtes chaînes polypeptidiques qui demeureront dans le cytoplasme ou au contraire, qui seront sécrétées (Ullers *et al.*, 2004). Son mode d'action au niveau de la machinerie de sécrétion demeure encore à déterminer (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). Tout d'abord, le mécanisme par lequel SecB discrimine les protéines destinées à la sécrétion de celles qui ne le sont pas est incertain. Le peptide signal ne serait pas impliqué dans la reconnaissance du précurseur par SecB et cette dernière interagirait principalement avec la portion mature de la protéine (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003). Le peptide signal servirait plutôt à retarder le repliement de la portion mature et favoriser ainsi la liaison de SecB (Liu, Topping et Randall, 1989).

Par ailleurs, certaines études démontrent que la vitesse de liaison entre la chaîne polypeptidique et SecB est plus élevée que celle du repliement en tant que tel. La vitesse de liaison ne serait limitée que par le taux de collisions, ce qui signifierait que la présence du peptide signal ainsi que le repliement tardif du précurseur ne seraient pas nécessaire à une interaction avec SecB. L'élément limitant l'interaction entre SecB et le précurseur émergent du ribosome serait donc la vitesse d'élongation plutôt que celle du repliement (de Keyzer, van der Does et Driessen, 2003).

La surproduction de SecB chez *E. coli* induit la suppression du phénotype de thermosensibilité (ts) ainsi qu'une tendance à l'agrégation protéique chez les mutants ne produisant plus le *trigger factor* et DnaK/DnaJ (Ullers *et al.*, 2004). Ainsi, un mutant *secB* nul est plus thermotolérant que la souche sauvage (Wild *et al.*, 1993). L'induction de la réponse aux chocs thermiques par surproduction de σ^{32} peut se substituer à la fonction de SecB chez *E. coli*. SecB n'est toutefois pas une protéine de choc thermique puisque sa production est moindre suite à l'induction de la réponse aux chocs thermiques (Altman, Kumamoto et Emr, 1991).

Chez un mutant *secB* nul, la croissance est possible sur milieu minimal mais une absence de colonie est observable sur milieu riche (Kumamoto et Beckwith, 1985). La croissance

sur milieu riche est par ailleurs rétablie chez une souche où la réponse aux chocs thermiques est induite par surproduction de σ^{32} ce qui impliquerait que certaines protéines impliquées au niveau de la réponse aux chocs thermiques pourraient agir comme suppléants fonctionnels de SecB (Altman, Kumamoto et Emr, 1991).

Chez *Bacillus*, la protéine CsaA co-immunoprécipite et co-purifie avec la protéine SecA de *E. coli* ainsi que de *Bacillus* CsaA introduite chez *E. coli* interfère avec la translocation du précurseur de OmpA gérée par SecB (Muller *et al.*, 2000; Linde *et al.*, 2003). Bien que l'exportation de la majorité des protéines demeure inchangée chez *B. subtilis* lorsqu'il y a répression du gène *csaA*, on remarque une légère réduction de la sécrétion de YvaY, un facteur transcriptionnel (Linde *et al.*, 2003). CsaA a une affinité pour YvaY aussi bien sous forme de précurseur que sous forme mature, démontrant ainsi que l'affinité est indépendante du peptide signal. L'interaction semble se faire préférentiellement au niveau d'acides aminés chargés positivement, ce qui est le cas également pour SecB (Linde *et al.*, 2003).

1. 7. 1. 2 Les protéines de chocs thermiques (Hsp)

Constituant la principale classe de chaperonnes, les Hsp sont des protéines synthétisées en situation de chocs thermiques i.e. lors d'un changement significatif de la température du milieu. Elles sont impliquées dans le repliement de protéines nouvellement synthétisées ou dénaturées mais aussi dans la dégradation protéique, puisque certaines possèdent une activité protéolytique. On retrouve entre autres parmi les HSP les HSP40, les HSP60, les HSP70, les HSP18 ainsi que les HSP100 nommées ainsi selon leur poids moléculaire respectif.

Les Hsp 60 et 10 (GroEL/GroES)

La chaperonne GroEL (57,3 kDa) de *E. coli*, ainsi que sa co-chaperonne GroES (10,3 kDa), représentantes typiques des familles HSP60 et HSP10 respectivement, ont été parmi les premières étudiées (Georgopoulos *et al.*, 1973). Elles sont codées par l'opéron

groES/EL, sont essentielles à la croissance chez *E. coli* et jouent également un rôle non négligeable dans la réponse au choc thermique à haute (42°C) et à basse température (17°C) (Fayet, Ziegelhoffer et Georgopoulos, 1989). L'interaction entre GroEL et GroES qui forment ensemble un complexe n'est possible qu'en présence de Mg^{2+} et d'ATP (Chandrasekhar *et al.*, 1986; Laminet *et al.*, 1990). Environ 300 protéines du protéome de *E. coli* utilisent GroEL pour leur repliement en conditions de croissance normales tandis que le double l'utilise en conditions de stress (Houry, 2001). Les substrats typiques pris en charge par GroEL et identifiés chez *E. coli* ont des masses moléculaires variant entre 20 et 60 kDa et sont principalement formés de domaines $\alpha\beta$ et de feuillets β hydrophobes internes. Il semblerait que les formes non-natives de ces substrats exposeraient des surfaces hydrophobes permettant la liaison à GroEL pendant l'étape même du repliement ou dans les cas de repliements inadéquats (Houry *et al.*, 1999).

Des études *in vitro* amènent à penser que GroEL peut maintenir les précurseurs protéiques Sec-dépendants en une conformation permettant leur translocation (Lecker *et al.*, 1989; Fisher et DeLisa, 2004). Chez *E. coli*, il a été démontré que le repliement du précurseur de la β -lactamase purifié est inhibé par l'ajout de GroEL ou du complexe GroEL/ES à un ratio d'une particule par molécule de pré- β -lactamase. La présence de GroES seul n'a par ailleurs aucun effet sur le repliement, mais l'ajout de Mg^{2+} et d'ATP, occasionne un repliement permettant d'obtenir un taux de β -lactamase active supérieur à ce qui est observé en absence de GroEL ou de GroEL/ES. GroEL et GroEL/ES en présence du précurseur sous sa forme repliée induisent un « dépliement » de ce dernier. Le phénomène peut être reversé par l'ajout de Mg^{2+} et d'ATP (Laminet *et al.*, 1990).

Les Hsp70 (DnaK/DnaJ)

Les Hsp70 constituent le groupe principal de Hsp. Leur expression peut être constitutive ou inductible par un stress cellulaire (Nicoll *et al.*, 2005). Une représentante de ce groupe est la protéine DnaK identifiée chez *E. coli*. Celle-ci est ATP-dépendante et l'on remarque que sous sa forme couplée à l'ADP, elle se lie très fortement au précurseur, tandis que sous sa forme couplée à l'ATP, elle ne possède qu'une faible affinité envers

son substrat (Winter et Jakob, 2004). Les Hsp40 sont identifiables par la présence d'un domaine J d'environ 70 a.a. tel que retrouvé pour la protéine DnaJ chez *E. coli* (Ohki *et al.*, 1986). Les Hsp40 interagissent avec les Hsp70 via ce domaine J de façon à faciliter et réguler le repliement protéique.

Elles semblent être constitutivement mais faiblement produites chez *E. coli* et d'ailleurs une surproduction de DnaJ chez cette dernière est toxique pour la bactérie. DnaJ est ATP-indépendante. Elle se lie au précurseur ou aux intermédiaires du repliement mais ne semblent pas impliquée directement dans la transition vers la forme native de la protéine. Elle transfère donc son substrat vers DnaK qui prendra en charge le repliement. En période de stress cellulaire, l'activité de DnaJ est augmentée et la protéine demeure liée au précurseur. Lorsque les conditions normales sont régénérées, le précurseur est transféré vers DnaK qui effectuera l'étape du repliement.

Chez *B. subtilis*, un mutant chez lequel le gène *dnaK* a été délété ne montre aucun changement phénotypique apparent et pousse normalement, ce qui indique que DnaK n'est pas essentielle à la croissance. Par contre, la résistance aux chocs thermiques est grandement diminuée (Reyes et Yoshikawa, 2002). Le système DnaK est le plus efficace parmi les systèmes de chaperonnes dans la prévention *in vivo* de l'agrégation protéique. Une forte agrégation des protéines est en effet remarquée chez les mutants $\Delta dnaK$ de *E. coli* à 42°C tandis que le phénomène n'est pas observable chez les souches sauvages ou chez des mutants pour d'autres chaperonnes. Des tests de complémentation du phénotype *ts* (sensible à la température) effectués par surproduction de différentes chaperonnes telles que GroEL/GroES, ClpB, HtpG et IbpA/B chez le mutant $\Delta dnaK$ chez *E. coli* ne permettent pas de restaurer la croissance à 42 °C, ce qui permet d'affirmer que le système DnaK est le plus impliqué parmi les systèmes de chaperonnes pour la prévention de l'agrégation protéique (Mogk *et al.*, 1999).

Le facteur d'échange GrpE

GrpE agit comme facteur d'échange de nucléotides au niveau de la machinerie DnaK en accélérant la dissociation de l'ADP de DnaK pour le remplacer par de l'ATP. Chez *E.*

coli, le facteur d'échange GrpE accélère la dissociation du complexe substrat/DnaK en présence d'ATP seulement (Brehmer *et al.*, 2004). Il a été démontré que l'activité ATPase de DnaK est grandement stimulée (environ 50 fois) par la présence simultanée de DnaJ et de GrpE. L'action des deux protéines serait toutefois séquentielle puisque la présence unique de DnaJ accélère le taux d'hydrolyse de DnaK tandis que celle de GrpE seule n'a un effet que sur le relâchement d'ATP ou d'ADP sans toutefois affecter le taux d'hydrolyse (Liberek *et al.*, 1991). Un mutant pour GrpE devient également plus résistant à une température de 50 °C que la souche sauvage (Delaney, 1990). Un gène homologue au gène *grpE* retrouvé chez *E. coli* a été séquencé chez *B. subtilis* (Wetzstein et Schumann, 1990).

Les Hsp100

Les Hsp100 regroupent les membres de la famille Clp. Ceux-ci seront traités plus en détail dans la section portant sur les protéases.

USP (Universal stress proteins)

Les protéines de stress universelles peuvent être retrouvées chez une gamme variée d'espèces d'archae et d'eubactéries ainsi que chez les plantes, champignons et levures. La bactérie *E. coli* possède six USP différentes ayant été étudiées plus en détail. La production de UspA, la première USP étudiée, est augmentée lors d'un ralentissement de croissance en carence de nutriments ou en présence d'un élément toxique pour la bactérie (métaux lourds, oxydants, acides ou antibiotiques). L'inactivation de UspA affecte grandement la survie de la cellule sous différentes conditions induisant un arrêt de croissance. La surproduction de *uspA* aurait un effet global sur la production protéique ce qui sous-entendrait un rôle dans la régulation génique (O'Toole et Williams, 2003). UspG, une autre protéine universelle de stress retrouvée chez *E. coli* forme un complexe avec GroEL lors de la phase stationnaire (O'Toole et Williams, 2003). Chez *Mycobacterium tuberculosis*, on retrouve huit USP différentes. Celles-ci sont très peu semblables à UspA de *E. coli* (O'Toole et Williams, 2003).

1. 7. 1. 3 Les catalyseurs du repliement

Les catalyseurs du repliement sont des enzymes pouvant accélérer certaines étapes du repliement protéique. Les peptidyl-disulfide isomérases (PDIases) participent au réarrangement des ponts disulfures, tandis que les peptidyl-prolyl isomérases (PPIases) catalysent l'isomérisation *cis-trans* du lien entre un acide aminé donné et une proline, étape possiblement limitante dans le processus de repliement protéique. Ces enzymes ne sont toutefois pas spécifiques à leur substrat (Wang et Tsou, 1993).

Les Peptidyl-Disulfide Isomérases (PDIases)

Les ponts disulfures sont essentiels à la stabilité d'un grand nombre de protéines extracellulaires. Une famille de protéines responsables de la formation de ces liens a été identifiée chez les procaryotes : les Dsbs. Le premier membre de la famille a été baptisé DsbA chez *E. coli*. *DsbA* code pour une thiol : disulfide-oxydoréductase périplasmique. DsbA possède une faible activité isomérase mais possède un puissant pouvoir oxydatif et ce, même en milieu acide. Des mutations de *dsbA* (également appelé *ppfA*) induisent une inhibition d'activité de la phosphatase alcaline, une enzyme possédant deux ponts disulfures, ce qui indique que la structure de celle-ci était incorrecte. De plus, l'enzyme devient sensible à l'action de protéases *in vivo* et de la trypsine *in vitro*. Par ailleurs, la MBP (*maltose binding protein*), une protéine ne possédant aucun pont disulfure, demeure stable et résistante à l'action de la trypsine chez le même mutant (Kamitani, Akiyama et Ito, 1992).

DsbD agit comme une réductase dans le périplasme de *E. coli*. Elle est impliquée dans la formation des ponts disulfures et est essentielle à la croissance de la bactérie à des températures supérieures à 42 °C, tel que démontré chez des mutants *dsbD-* (Missiakas, Schwager et Raina, 1995).

La phosphatase alcaline demeure également instable lorsque sécrétée par *B. subtilis* en absence de BdbB ou BdbC, deux thiol-disulfide oxydoréductases identifiées chez *B. subtilis*. L'absence de BdbA ne semble pas affecter la stabilité de la phosphatase alcaline. BdbB et BdbC sont des protéines membranaires typiques, ce qui laisse croire que leur action serait dirigée à l'interface membrane-paroi. Par ailleurs, BdbB et BdbC ne sont pas requises pour la croissance de la bactérie en présence d'agents réducteurs (Bolhuis *et al.*, 1999).

Les Peptidyl Prolyl Cis/Trans Isomerase (PPIases)

Les PPIases sont des enzymes ubiquitaires retrouvées chez tous les organismes. Trois familles distinctes sont connues : les cyclophilines, les FKBP (FK506-binding proteins) et les parvulines (Fink, 1999).

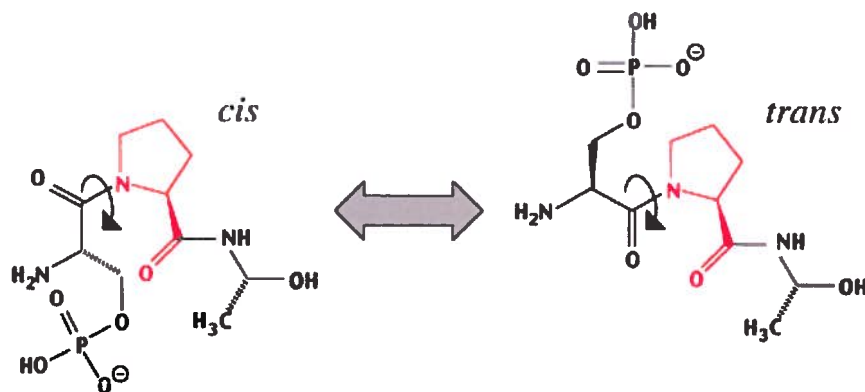


Figure 5. Peptidyl-prolyl cis-trans isomérisation.

Cis/trans isomérisation du lien peptidique (flèche) précédant une proline (en rouge), représentée ici pour le tri-peptide pSer-Pro-Ala. (Shaw, 2002).

Le *trigger factor* est une PPIase présentant des similarités fonctionnelles avec les FKBP malgré une faible homologie (Callebaut et Mornon, 1995).

Trigger factor

Le *trigger factor* serait la première chaperonne ou catalyseur du repliement à interagir avec le précurseur. En effet, ce dernier peut s'associer à la fois au ribosome ainsi qu'aux chaînes polypeptidiques. Il a été démontré chez *E. coli* que les peptides signaux des protéines Tat-dépendantes TorA et SufI demeurent liés fortement et exclusivement aux composantes ribosomales de même qu'au *trigger factor* lors de la synthèse protéique. Elles demeurerait d'ailleurs liées à ce dernier jusqu'à la fin de l'étape de traduction (Jong *et al.*, 2004). Le précurseur de OmpA forme également un complexe avec le *trigger factor* (Lecker *et al.*, 1989). En effet, lorsque dénaturé, le pré-OmpA retrouve son potentiel à être sécrété en présence du *trigger factor*. L'inactivation du *trigger factor* ou sa surproduction n'a par contre aucun effet sur la sécrétion de pré-OmpA mais cause tout de même des déficiences au niveau de la division cellulaire (Guthrie et Wickner, 1990). Des mutants de la bactérie *E. coli* chez lesquels le gène *tig* codant pour le *trigger factor* a été délété demeurent viables et ne présentent aucun déficit au niveau de leur croissance entre 15 et 42 °C, et ce en milieux riche et minimal (Deuerling *et al.*, 1999). Une délétion simultanée des gènes codant pour le *trigger factor* ainsi que pour la chaperonne DnaK cause toutefois une agrégation des protéines cytoplasmiques. De plus, dans les mutants Δ *tig* un plus grand nombre de protéines nouvellement synthétisées s'associent avec DnaK, ce qui permet de soupçonner une coopération entre les deux (Deuerling *et al.*, 1999).

1. 7. 2. 4 Les protéases

La protéolyse cytoplasmique est un procédé important dans la régulation de la sécrétion protéique. Ce procédé permet non seulement de dégrader des protéines anormales suite à des erreurs de transcription ou de traduction mais également de favoriser le renouvellement (*turn-over*) protéique suite à des carences en certains nutriments et de permettre des réponses rapides aux signaux environnementaux tels que les chocs

thermiques (Herman et D'Ari, 1998). Certaines protéases sont en effet induites en situation de stress (Winter et Jakob, 2004). Elles dégradent les protéines mal repliées ayant tendance à s'accumuler lors d'une augmentation de la température et permettent donc de prévenir la formation d'agrégats.

Il a été découvert que les protéases ATP-dépendantes peuvent être classées parmi les chaperonnes puisqu'elles jouent un rôle dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées (Hartl, 1996) Des membres de la superfamille des AAA+ (ClpAP, ClpXP, ClpB, ClpY, FtsH et Lon) ainsi que le protéasome 20S seront ici traités plus en détail.

La superfamille AAA+

Les membres de cette famille sont largement répandus parmi les eubactéries, les archaebactéries ainsi que les eucaryotes et seraient impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que le contrôle du cycle cellulaire, la dégradation protéique, la régulation transcriptionnelle ou la sécrétion protéique. Cette superfamille se caractérise par la présence d'un segment conservé de 222 a.a. appelé domaine AAA. Ce dernier présente des motifs associés dans la liaison à l'ATP ainsi qu'à son hydrolyse. Ces motifs sont appelés Walker A et Walker B respectivement (Dougan *et al.*, 2002). Certains membres possèdent également des domaines plus spécialisés tels que des domaines peptidases. Deux classes distinctes de AAA sont déterminées par le nombre de domaines AAA retrouvés chez la protéine. Les membres de la classe I possèdent deux domaines AAA (D1 et D2) séparés par une région charnière, tandis que ceux de la classe II n'en possèdent qu'un (homologue à D2) (Dougan *et al.*, 2002). La famille des AAA+ comprends plusieurs chaperonnes et protéases telles que les protéases caséinolytiques (*Casein Lytic Protease* ou Clp), Lon ainsi que la protéase membranaire FtsH (HflB).

ClpA/PX (HSP100)

Les protéines Clp sont hautement conservées chez tous les organismes et possèdent des sites de liaison à l'ATP ainsi qu'aux polypeptides (Wickner *et al.*, 1994).

ClpP forme des complexes protéolytiques avec des ATPases telles que ClpA ou ClpX. Celles-ci s'associent aux protéines à dégrader et leur imposent une conformation linéaire pour mieux les acheminer vers ClpP. Ce système est dépendant de l'ATP (Wickner *et al.*, 1994; Frees et Ingmer, 1999; Hoskins *et al.*, 2000). Chez *Lactococcus lactis*, une bactérie Gram positive, l'expression de la protéase ClpP est augmentée lors de chocs thermiques et jouerait un rôle dans la dégradation de protéines inadéquatement repliées (Frees et Ingmer, 1999).

La fonction de ClpA se rapprocherait de celle de DnaK. En effet, ClpA permet l'activation de la protéine RepA à des niveaux comparables à ce qui est observé avec DnaK et DnaJ. RepA est une protéine se liant à l'ADN et est impliquée dans l'initiation de la réplication du plasmide P1 chez *E. coli*. L'activation par ClpA est effectuée par conversion de dimères de RepA en monomères de façon ATP-dépendante, tel qu'observé pour DnaK et DnaJ. ClpB, ClpX et HSP104, une chaperonne trouvée chez la levure, ne permettent pas l'activation de RepA (Wickner *et al.*, 1994). De plus, ClpA agit comme chaperonne ATP-indépendante en permettant de protéger la luciférase d'une inactivation par la chaleur, possiblement en prévenant son agrégation, une fonction également observée avec DnaJ.

ClpB

ClpB collabore avec la machinerie DnaK lors de la solubilisation d'agrégats protéiques pouvant être toxiques pour la cellule. Par exemple, les protéines de hauts poids moléculaires sont particulièrement vulnérables à la dénaturation thermique ainsi qu'à l'agrégation et le coopératif ClpB-DnaK permet leur dégradation (Mogk *et al.*, 1999).

ClpB se lierait directement aux agrégats et l'ATP serait responsable d'un changement structural chez cette dernière permettant une plus grande exposition de régions hydrophobes au niveau des agrégats. Ceci permettrait ensuite à la machinerie DnaK de se lier et de prendre en charge la dissociation et le repliement des polypeptides solubilisés en

protéines natives et fonctionnelles (Goloubinoff *et al.*, 1999). Une mutation au niveau des motifs Walker B des deux domaines AAA de ClpB permet toujours à celui-ci de se lier à l'ATP mais inhibe l'étape d'hydrolyse (Weibezahn *et al.*, 2003). Le mutant est par ailleurs apte à s'associer de façon stable *in vitro* et *in vivo* avec des substrats protéiques contrairement à la souche sauvage. L'hydrolyse de l'ATP est donc essentielle au relâchement du substrat (Weibezahn *et al.*, 2003).

Bien que ClpB possède plusieurs caractéristiques communes aux autres composantes ClpP, elle possède des propriétés fonctionnelles distinctes. Elle ne reconnaît premièrement aucun substrat standard pris en charge par les autres chaperonnes et privilégie plutôt les agrégats protéiques. Deuxièmement, elle ne possède pas de protéase comme partenaire. En effet, le motif présent chez ClpA et ClpX permettant leur association avec ClpP n'est pas conservé chez ClpB (Horwich, 2004). La structure tridimensionnelle du premier domaine D1 de ClpB est semblable à celle de ClpA chez *E. coli* (Lee *et al.*, 2004).

ClpY

ClpY (HslU) est homologue à la protéine ClpX chez *E. coli* et active la peptidase ClpQ (HslV). Aucun substrat pour ClpYQ n'a été identifié jusqu'à maintenant mais des mutations de *clpY* et *clpQ* affectent les niveaux du facteur de choc thermique σ^E (Kessel *et al.*, 1996). ClpQ possède des homologies avec les sous-unités β du protéasome 20S des archae et des eucaryotes (Chuang *et al.*, 1993; Kessel *et al.*, 1996).

Lon

La protéine Lon est une sérine protéase ATP-dépendante de *E. coli* présentant une activité semblable à celle de la chymotrypsine (Vasilyeva *et al.*, 2002). Elle est hautement conservée dans l'évolution et on la retrouve chez une grande variété de bactéries ainsi que dans les mitochondries des levures et des cellules humaines. Lon contribue à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, dont la division cellulaire et la dégradation de certaines protéines anormales ainsi que de protéines régulatrices à courtes

vies telles que Sula et RcsA. Elle a également été reconnue comme intervenant dans la réaction aux chocs thermiques chez *E. coli* (Phillips, VanBogelen et Neidhardt, 1984) et possède la capacité de se lier spécifiquement à l'ADN (Fu, Smith et Markovitz, 1997). La production de Lon est induite chez *E. coli* lors d'un changement de température à 42 °C. Les mutants *lon* sont viables mais sensibles aux dommages causés à l'ADN (Gottesman, 1996). Lon est un tétramère formé de quatre sous-unités identiques. Chaque monomère se divise en trois domaines : le domaine N-terminal ayant une fonction encore obscure, le domaine central porteur de l'activité ATPase et le domaine catalytique C-terminal.

FtsH

La régulation de la réponse aux chocs thermiques chez *E. coli* se fait entre autre via l'activité de la sous-unité σ_{32} de l'ARN polymérase. En l'absence d'un stress inducteur, σ_{32} est rapidement dégradé. Plusieurs chaperonnes connues (DnaK, DnaJ et GrpE) sont impliquées dans la dégradation de σ_{32} mais la protéase spécifique responsable de cette dégradation n'est cependant pas identifiée.

FtsH est identique à *hflB*, un locus originalement identifié comme étant impliqué dans la dégradation de lambda cII, un régulateur dans la réponse lytique/lysogénique chez le bactériophage lambda (Deuerling, Paeslack et Schumann, 1995). *FtsH* (donc également appelée HflB) est une protéase membranaire ATP-dépendante essentielle possédant une activité envers σ_{32} et un domaine de liaison au Zn. *FtsH* possède également des fonctions attribuées à la famille des ATPases AAA (Deuerling *et al.*, 1997).

FtsH serait impliquée *in vivo* dans la dégradation de protéines cytoplasmiques ou membranaires. Elle dégraderait entre autre la protéine de choc thermique RpoH ainsi que la protéine membranaire SecY, un constituant important du système de sécrétion Sec qui forme un complexe stable avec la protéine SecE (Kihara, Akiyama et Ito, 1995; Gottesman, 1996). En effet, lorsque SecY est surproduit ou que SecE est sous-produit, une fraction de SecY est rapidement dégradée *in vivo*. Lorsque *FtsH* est muté, les SecY surproduits sont stabilisés, ce qui entraîne des troubles de croissance. Une surproduction de *FtsH* accélère toutefois le processus de dégradation (Kihara, Akiyama et Ito, 1995).

Un mutant *ftsH* chez *E. coli* présente d'importants troubles de croissance cellulaire. En surproduisant certaines chaperonnes cytoplasmiques telles que HtpG (Hsp90) ou GroES/EL (Hsp60/Hsp10), il est possible de restaurer une partie de la croissance. La surproduction de SecB n'affecte la croissance que faiblement tandis que celle de DnaK n'exerce aucun effet (Shirai, Akiyama et Ito, 1996). Chez *Bacillus subtilis*, il a été montré que *ftsH* est induit suite à une augmentation de l'osmolarité et de la température et que les mutants *ftsH* étaient particulièrement sensibles à la chaleur et aux fortes concentrations en sel (Deuerling, Paeslack et Schumann, 1995; Deuerling *et al.*, 1997). De plus, bien que viables, ces mutants présentaient une incapacité à sporuler et une déficience au niveau de la sécrétion d'une large variété d'exo-protéines (Deuerling *et al.*, 1997).

Le protéasome 20S

Le protéasome est un complexe multiprotéique abondant dans la cellule et bien caractérisé chez les eucaryotes. Le protéasome 20S est également retrouvé chez les actinomycètes tels que *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Streptomyces*. Aucune fonction véritable n'est attribuée au protéasome 20S chez les bactéries et les cibles de celui-ci demeurent inconnues. On remarque toutefois un rôle de protection contre les stress oxydatif et nitrosatif chez *M. tuberculosis* (Darwin *et al.*, 2003).

1. 7. 2 Spécificité des chaperonnes

Les chaperonnes semblent interagir de façon préférentielle avec les résidus hydrophobes avec pour exception SecB qui préfère les acides aminés chargés positivement. Il ne semble avoir aucune séquence spécifique pour les protéases dans le cas de protéines dénaturées ou agrégées. La question demeure à savoir comment la cellule décide de dégrader ou pas ces protéines. Il est possible que l'activité protéolytique soit déclenchée lorsque la chaperonne est incapable d'effectuer son travail. Il existe par contre certains substrats qui sont reconnus par les chaperonnes et pas par les protéases ainsi que d'autres qui sont reconnus par les protéases et non par les chaperonnes.

1. 8 Les Streptomycètes

1. 8. 1 Généralités

Les Streptomycètes sont des bactéries Gram positives saprophytes du sol et constituent le membre du genre Actinomycète le plus étudié. Le génome complet de *Streptomyces coelicolor* a été séquencé. Il s'agit d'un génome linéaire de 8 667 507 bp codant pour environ 7 825 gènes, ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens connus (Bentley *et al.*, 2002). Leur cycle de croissance est complexe et alterne entre des phases de mycélium végétatif, de mycélium aérien et de sporulation (voir fig. 6). Les Streptomycètes sont réputés pour produire 60 à 70% de tous les antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire ainsi qu'une grande variété de molécules (métabolites secondaires, enzymes, etc.) ayant d'intérêt industriel. Les Streptomycètes sont parmi les principaux organismes pouvant dégrader la matière organique du sol. Ils produisent donc en grande quantité des enzymes de dégradation tels que les xylanases, les cellulases et diverses protéases.

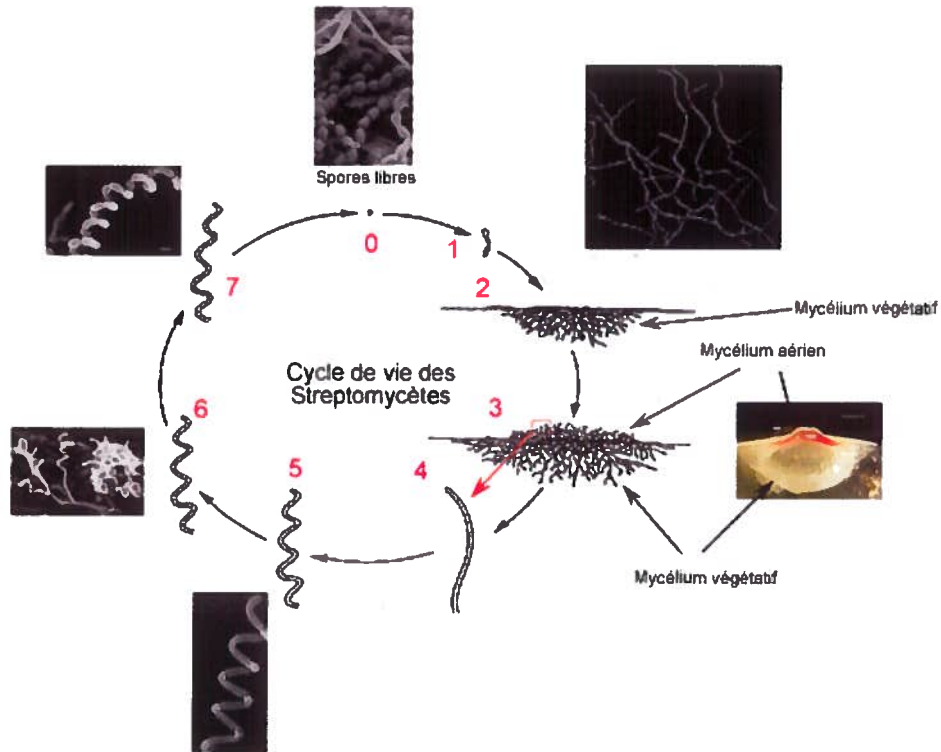


Figure 6. Cycle de vie du genre *Streptomyces*.

La cellule bactérienne initiale, appelée « spore libre » (0), germe (1) et croît à la surface du milieu en s’allongeant et en se ramifiant pour former le mycélium végétatif (2). Après 2-3 jours, le mycélium produit des structures aériennes (sporophores), ce qui forme le mycélium aérien (3, 4). Les sporophores développent des torsades (5). Leur partie terminale, après une série de réplifications du chromosome, subit des étapes de septations (6, 7) pour se différencier en nouvelles spores. Celles-ci sont ensuite libérées pour recommencer le cycle.

Modifiée à partir de http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html

1. 8. 2 Le système Tat chez les Streptomycètes

Des homologues des gènes codant pour TatA, TatB et TatC ont été retrouvés chez *S. lividans* (Schaerlaekens *et al.*, 2001). TatA et TatB sont des protéines associées à la membrane mais ont également été retrouvées dans le cytoplasme tandis que TatC n'a été isolée que dans des fractions membranaires. La protéine TatC est essentielle au système Tat de *S. lividans*, tel que démontré chez *E. coli* (Schaerlaekens *et al.*, 2001). Les mutants $\Delta tatB$ et $\Delta tatC$ présentent des phénotypes différents de la souche sauvage. En culture liquide, le mycélium est dispersé, la croissance plus lente et la biomasse réduite par rapport à la souche sauvage. La différenciation sur milieu solide est possible bien que plus lente et le mutant $\Delta tatC$ est plus affecté que le mutant $\Delta tatB$, ce qui confirme un rôle plus important pour la protéine TatC (Schaerlaekens *et al.*, 2004). Des complexes TatABC ont également été purifiés à partir de souches hyperproductrices. TatA et TatB peuvent être isolées sous forme de monomère ainsi que sous forme de complexes homo-oligomériques (Keersmaecker *et al.*, 2005). Un programme informatique, TATFIND version 1.2 (Rose *et al.*, 2002) peut être utilisé pour identifier des candidats Tat dans différents génomes bactériens. Chez *S. coelicolor*, 145 candidats Tat ont été répertoriés. Sur ces 145 candidats, 127 sont des protéines sécrétées putatives. Les autres protéines identifiées sont des protéines membranaires putatives. Environ 15 % des protéines sécrétées chez *Streptomyces* le seraient via le système Tat comparativement à 3-9 % chez *B. subtilis* (Schaerlaekens *et al.*, 2004). Lorsque le programme TATFIND est modifié afin d'être mieux adapté aux Streptomycètes, 230 précurseurs Tat potentiels peuvent être répertoriés chez *S. coelicolor*.

Les substrats Tat potentiels n'appartiennent pas à des classes spécifiques de protéines et sont plutôt membres de classes variées (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor). On retrouve donc des substrats potentiels Tat parmi les protéines membranaires, les lipoprotéines, des protéines sécrétées putatives, des protéines impliquées dans la dégradation de macromolécules, dans le transport et l'attachement, ainsi que des protéines du métabolisme secondaire. La plupart de ces protéines n'ont toutefois que des fonctions probables et une minorité d'entre elles se lie à des cofacteurs (Schaerlaekens

et al., 2004), contrairement à ce qui est observé chez *E. coli* (Berks, Sargent et Palmer, 2000). Un deuxième programme informatique, TATscan (Li *et al.*, 2005), prédit 129 substrats Tat putatifs, ce qui est inférieur aux 145 candidats identifiés par TATFIND 1.2. En fait, seulement 80 protéines sont prédites par TATscan et par TATFIND, tandis que 51 protéines trouvées par TATscan ont été aussi identifiées par la version modifiée de TATFIND.

Lors de travaux effectués dans notre laboratoire, la portion mature de la XInC, une protéine exclusivement sécrétée sous forme active par le système Tat, a été fusionnée aux peptides signaux de différents substrats Tat prédits afin de confirmer leur potentiel de sécrétion par le système Tat chez *S. lividans*. Neuf peptides signaux variables au niveau de la longueur de la région *n*, de l'hydrophobicité de la région *h*, de la présence ou de l'absence d'un motif échappatoire au système Sec (*Sec avoidance motif*) ou d'une *lipobox* pour les lipoprotéines ont été sélectionnés. Le peptide signal de la chitosanase (SCO0667) a été choisi pour l'intérêt industriel de l'enzyme et trois peptides signaux (SCO0624, SCO2286 et SCO6557) ont été choisis parce qu'ils n'ont pas été prédits par le programme TATFIND. Ces trois peptides signaux s'avèrent être des peptides signaux Tat fonctionnels. Sept des neuf peptides signaux sélectionnés ont été confirmés comme étant typiquement Tat (Li *et al.*, 2005). Les deux peptides signaux ne présentant pas de production de la chitosanase (SCO0766 et SCO6665) avaient pourtant été sélectionnés comme étant potentiellement Tat dans des recherches précédentes (Dilks *et al.*, 2003; Schaerlaekens *et al.*, 2004). La validation des résultats informatiques quant aux prédictions des substrats Tat est donc importante.

1. 8. 3 Les xylanases chez *Streptomyces lividans*

La sécrétion des xylanases a été particulièrement étudiée par les membres du groupe des *Streptomyces* de l'Institut Armand-Frappier. Ces enzymes ont en effet des applications dans l'industrie des pâtes et papiers pour le bio-blanchiment de la matière première en remplacement du chlore (Bajpai, 1999). *S. lividans* sécrète trois types de xylanases différentes capables d'hydrolyser le xylane (polymère β ,1-4 du xylose), un composant

majeur de l'hémicellulose du bois : la XlnA, la XlnB et la XlnC (Shareck *et al.*, 1991). Les xylanases B et C peuvent dégrader le xylane en xylo-oligosaccharides de 5 à 20 résidus tandis que la xylanase A produit majoritairement du xylobiose et du xylotriose. Dans les surnageants de culture, deux formes de la xylanase A et B sont présentes. Les XlnA1 et XlnB1 correspondent aux protéines complètes tandis que les XlnA2 et XlnB2 correspondent aux domaines catalytiques des protéines dépourvues de leur domaine de liaison au substrat (tableau 1).

La xylanase A et la xylanase B sont toutes deux sécrétées par la voie Sec tandis que la XlnC l'est par le système Tat. En effet, une mutation dans le gène *tatC* qui inhibe complètement la sécrétion des protéines par le système Tat, empêche la sécrétion de la XlnC, ce qui a permis de démontrer que la xylanase C n'est sécrétée que via ce système (Faury *et al.*, 2004; Schaerlaekens *et al.*, 2004). Le peptide signal de la XlnC comporte la séquence -RRGFL- typique de la sécrétion par le système Tat. L'utilisation de deux systèmes de sécrétion différents pour les différentes xylanases est d'autant plus particulière que la xylanase B2 possède 80 % d'identité avec la XlnC.

Tableau 1. Caractéristiques des XlnA, XlnB et XlnC de *S. lividans*

Gène	Protéines	Masse (kDa)	Longueur du peptide signal (a.a.)	Homologie
<i>xlnA</i>	XlnA1, XlnA2	43, 31	41	Non, non
<i>xlnB</i>	XlnB1, XlnB2	31, 22	41	Non, 80% avec XlnC*
<i>xlnC</i>	XlnC	22	49	80% avec XlnB2*

* La XlnC est homologue avec la portion N-terminale de la XlnB (domaine catalytique)
Réf. Morosoli *et al.* (1990) et Shareck *et al.* (1991)

En remplaçant le peptide signal de la XlnB par celui de la XlnC, il est possible de sécréter celle-ci via le système Tat, avec une meilleure production pour la XlnB2 que pour la XlnB1, mais néanmoins avec un rendement comparable à celui de la XlnB1 et de la XlnB2 produite par le système Sec. Les mêmes constructions réalisées avec la XlnA produisent 10 fois moins, indiquant que la XlnA est préférablement sécrétée par le système Sec que par le système Tat. En insérant dans le même plasmide sous le contrôle du même promoteur, la XlnB1 fusionnée à un peptide signal Sec et la XlnB2 fusionnée à un peptide signal Tat, il est possible d'obtenir une activité xylanase similaire à la somme des activités individuelles de deux souches indépendantes. Ceci démontre que les deux systèmes (Sec et Tat) sont fonctionnels et indépendants l'un de l'autre dans une même souche (Gauthier, Li et Morosoli, 2005). Puisque la XlnC est sécrétée par le système Tat, on peut conclure que celle-ci est repliée dans le cytoplasme préalablement à sa sécrétion. Pourtant, celle-ci n'est pas sous sa forme active puisque le précurseur cytoplasmique ne présente aucune activité enzymatique (Faury *et al.*, 2004). Il faut donc que la XlnC traverse la membrane et qu'il y ait formation d'un pont disulfure pour que l'enzyme devienne active. De plus, une fois dénaturée la XlnC ne se renature pas en une forme active, ce qui implique l'intervention de facteurs cytoplasmiques, tels que des protéines chaperonnes, permettant le contrôle du repliement de la XlnC préalable à sa sécrétion par le système Tat de *S. lividans*.

1. 8. 4 Les chaperonnes chez les *Streptomyces*.

1. 8. 4. 1 Les protéines de stress

Plusieurs chaperonnes ont été caractérisées chez *Streptomyces*. Quatre protéines de stress sont retrouvées chez quatre espèces différentes de *Streptomyces* : *S. albus*, *S. lividans*, *S. parvulus* et *S. viridochromogenes*. Trois de ces protéines (Lon, DnaK et GroEL) correspondent à des HSP procaryotes connues ayant respectivement des poids moléculaires de 94-100 kDa, 70 kDa et 56-58 kDa ainsi qu'à une dernière protéine d'environ 16-18 kDa (HSP18) caractérisée chez *S. albus* (Guglielmi *et al.*, 1991).

Un choc thermique induit l'expression de ces quatre protéines. En effet, lorsqu'une culture de *S. albus* en phase exponentielle est transférée de 37 °C à 41 °C, on remarque une augmentation de la production de Lon et de DnaK cinq minutes suivant le changement de température. L'induction de GroEL et de HSP18 persiste jusqu'à deux heures suite au changement de température. Toutefois, lorsque la température est ramenée à 37°C, l'expression de ces dernières chute de façon importante (Guglielmi *et al.*, 1991).

On remarque également une induction par la température de GroEL chez *S. lividans*. En effet, en réponse à choc thermique, la transcription de *groES/EL1* et en particulier de *groEL2* est augmentée (de Leon *et al.*, 1997). *S. albus* et *S. lividans* possèdent chacune deux protéines GroEL : HSP56 et HSP58. Leurs tailles ainsi que l'analyse de leur séquence en N-terminal démontrent des homologies avec des protéines GroEL retrouvées chez d'autres organismes (Guglielmi *et al.*, 1991; de Leon *et al.*, 1997). HSP18 est une troisième protéine GroEL retrouvée chez *S. albus* possédant une séquence N-terminale identique à celle de HSP58. Celle-ci pourrait donc correspondre à un dérivé de HSP58, un traitement qui serait possiblement induit par le changement de température puisque HSP58 est retrouvée dans des extraits d'une culture à 30 °C alors que HSP18 demeure absente et n'apparaît que suite au changement de température (Guglielmi *et al.*, 1991). Le motif « GSHGHSH » est retrouvé à l'extrémité C-terminale de GroEL1 chez *S. coelicolor* et *S. albus* en remplacement du motif « GGM » retrouvé chez la majorité des protéines du même type provenant d'eucaryotes et de procaryotes (Mazodier *et al.*, 1991; Duchene *et al.*, 1994). Un seul gène *dnaK* est retrouvé chez *S. coelicolor* (Bucca *et al.*, 1993). Sa transcription est fortement induite par la température tout au long du cycle de vie de la bactérie. À 30 °C, la température de croissance normale de *S. coelicolor*, les transcrits de *dnaK* sont plus abondants lors des phases précoces du développement du mycélium végétatif ainsi que lors des stades finaux de développement lors de la période de sporulation (Bucca *et al.*, 1995).

1. 8. 4. 2 Les catalyseurs du repliement

Les protéines ScCypA (17,5 kDa) et ScCypB (18 kDa) identifiées chez *S. chrysomallus* sont des PPIases dont l'action est inhibée par la cyclosporine A (CsA) (Pahl, Gewies et Keller, 1997; Berger, Schauwecker et Keller, 1999). ScCypB est de 50 à 100 fois moins abondante que ScCypA dans les fractions protéiques cytosoliques de *S. chrysomallus* et *S. lividans*. L'hyperproduction de ScCypA et ScCypB chez ces deux souches n'induit aucun changement de croissance ou morphologique.

1. 8. 4. 3 Les protéases

L'analyse du génome de *S. coelicolor* permet l'identification de cinq gènes semblable à *clpP* organisés en deux opérons (*clpP1 clpP2* et *clpP3 clpP4*) et le gène *clpP5* isolé, ainsi qu'un gène semblable à *clpX* qui est adjacent à l'opéron *clpP1 clpP2* sur le chromosome (Viala et Mazodier, 2003). ClpX est une ATPase pouvant s'associer avec ClpP. L'induction de ClpX n'est toutefois pas causée par un stress (ajout de NaCl, d'éthanol ou de pristinamycine, le froid, l'acidité ou la basicité) (Viala et Mazodier, 2003). Les souches de *S. lividans* déficientes en la sous-unité ClpP1 présentent des blocages de croissance à différents endroits de leur cycle.

Le système HspR-HAIR est utilisé chez plusieurs bactéries, en particulier chez les bactéries Gram positives ayant un génome riche en G + C, afin de réguler l'expression des gènes codant pour les HSP. L'opérateur HAIR possède un motif (CTT GAG T-N₇-A CTC AAG) qui se retrouve dans le génome de *S. coelicolor* en amont des gènes *lon*, *dnaK* et *clpB* (Sobczyk *et al.*, 2002).

Le mutant *lon-* construit chez *S. lividans* pousse plus lentement que la souche sauvage à 30 °C en milieu liquide et solide. Par ailleurs, à 40 °C, les spores du mutant ne germent pas sur milieu NE après une semaine d'incubation alors que des colonies sont présentes après 2-3 jours chez la souche sauvage, ce qui suggère que le processus de germination est thermosensible chez ce mutant (Sobczyk *et al.*, 2002).

Le protéasome 20S est retrouvé chez les actinomycètes comme *Rhodococcus*, *Mycobacterium* et *Streptomyces*. Le protéasome 20S de *S. coelicolor* a été purifié. Sur gel de polyacrylamide, deux bandes d'intensités semblables ont des masses moléculaires se situant autour de 24 kDa (sous-unité β) et 30 kDa (sous-unité α) (Nagy *et al.*, 1998). L'inactivation du protéasome 20S chez *S. lividans* TK24 (mutant PRO41) n'induit ni différence phénotypique ni difficulté de croissance par rapport à la souche sauvage et ce, en conditions normale et de stress. Toutefois, l'inactivation du protéasome modifie la production de deux protéines hétérologues, shuTRFNII (*human tumor necrosis factor*) et sCT (*salmon calcitonin*), mais n'a aucun effet sur une troisième, shuTNFRI (Hong *et al.*, 2005). En effet chez le mutant, la production des deux premières protéines est supérieure à celle observée chez la souche sauvage. Dans cette étude, les protéines shuTRFNII sont Sec-dépendantes, tandis que la protéine sCT est Tat-dépendante. Le protéasome 20S semblerait être un point de contrôle important pour certaines protéines hétérologues produites chez *S. lividans* telles que shuTRFNII et sCT mais non pour d'autres comme shuTNFRI. Dans le cas des protéines vulnérables à la dégradation par le protéasome, le précurseur pourrait être replié inadéquatement et ne serait donc pas adapté à la sécrétion par l'un des deux systèmes de sécrétion (Sec et Tat), ce qui les rendraient susceptibles à la dégradation par le protéasome 20S (Hong *et al.*, 2005).

Trois mutants protéases de *S. lividans* et deux mutants chaperonnes (GroEL et HSP18) chez *S. albus* n'influencent pas la sécrétion de la XlnA (sec-dépendante) et de la XlnC (tat-dépendante) et n'interviennent donc pas directement dans les systèmes de sécrétion Sec et Tat (Arias Crausaz, 2005).

Les protéines sécrétées par le système Tat étant déjà repliées dans le cytoplasme avant leur sécrétion, on peut se demander quels facteurs pourraient être impliqués à ce niveau. Ce repliement nécessiterait vraisemblablement la présence de protéines chaperonnes. Le type de chaperonnes impliquées demeurent toutefois un mystère et le but du présent projet était donc de rechercher celles pouvant être impliquées dans le repliement des précurseurs Tat chez *S. lividans*.

2. Méthodologie

2. 1 Souches utilisées

Les détails des plasmides utilisés sont fournis en appendice.

2. 1. 1 *Streptomyces lividans* 10-164

La souche utilisée pour les transformations chez *S. lividans* est la souche 10-164. Il s'agit d'un mutant cellulase et xylanase négatif dérivé de la souche sauvage 1326 dans lequel le gène *msiK* est muté. Le produit du gène fournit de l'énergie aux systèmes de transport du cellobiose et du xylobiose qui sont les inducteurs respectifs des gènes de cellulase et de xylanase. (Hurtubise *et al.*, 1995).

2. 1. 2 *Streptomyces lividans* 10-164 Δ tatC

Souche 10-164 portant une mutation au niveau du gène *tatC*. Cette mutation a pour effet d'inhiber la translocation des précurseurs TAT à travers la membrane cytoplasmique (Fauray *et al.*, 2004)

2. 1. 3 Souches hyperproductrices de peptidyl-prolyl isomérases A et B (ScCypA et ScCypB)

Les souches appelées ScCypA et ScCypB (appelée respectivement Berlin A et B dans ce travail) proviennent du laboratoire du Pr Keller de l'Institut de biochimie et de biologie moléculaire de Berlin. Il s'agit de souches de *Streptomyces lividans* transformées avec les plasmides pAGCypA et pAGCypB. Ces derniers sont dérivés du plasmide pIJ702 et codent pour des peptidyl-prolyl isomérases (PPIases), ScCypA et ScCypB (Pahl, Gewies *et Keller*, 1997). Les gènes *ScCypA* et *ScCypB* sont présents en simple copie dans le génome de *S. chrysomallus*. Leur surproduction chez *S. lividans* n'influence pas la

morphologie ou la croissance de la souche. Des protoplastes ont été préparés selon la méthode décrite dans Kieser *et al.* (2000)

2. 1. 4 Transformants IAFA.916CH, IAFB.916CH, IAFA.906H, IAFB.906H, IAFA.917CH et IAFB.917CH

Les souches BerlinA et BerlinB ont été transformées à l'aide des plasmides pIAF916CH, pIAF906H et pIAF917CH. La sélection des transformants a été effectuée à l'aide de l'antibiotique hygromycine (250 µg/mL) et des spores ont été produites sur milieu SFM + hygromycine (voir section 2. 6. 4).

2. 1. 5 Clone IAFMCypB.C

Ce clone a été obtenu en isolant le plasmide pAGCypB de la souche Berlin B. Le gène de la xylanase C avec son promoteur a été isolé par PCR à l'aide des amorces GAU2 et CD401 à partir du vecteur pIAF916C. Le gène a été digéré avec l'enzyme de restriction *SacI* et a été cloné dans le vecteur (pAGCypB), tout deux digérés par le même enzyme. Le vecteur a été déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau (CIP pour *calf intestinal phosphatase*) 20 U/µL (*GE Healthcare*) préalablement à la ligation. La présence de l'insert a été vérifiée par colonie-PCR et/ou par digestion.

2. 2 Vecteurs utilisés

Les plasmides utilisés pour les transformations et les clonages sont dérivés du plasmide multicopie pIJ702 (Kieser, 2000) qui contient plusieurs sites de restriction ainsi que le gène de résistance au thiostrepton. Ce dernier est un antibiotique permettant la sélection des transformants.

2. 3 Milieux de culture pour *Streptomyces lividans*

Les compositions des milieux de culture liquides et solides sont retrouvées en appendice.

2. 3. 1 Milieux liquides

- M14 + xylose 1% : le xylose est utilisé dans ce milieu comme source de carbone. Il a été utilisé pour la culture des souches pour le suivi de la production de xylanase pour l'ensemble des expériences.
- TSB (*Tryptic Soy Broth*) : ce milieu est principalement utilisé pour la culture des transformants lors de l'extraction d'ADN plasmidique (mini-preparation).
- R5 : ce milieu est utilisé lors de la production de protoplastes.

Ces milieux peuvent être additionnés de thiostrepton (25 µg /mL) ou d'hygromycine (250 µg/mL).

2. 3. 2 Milieux solides

- R5 : ce milieu est utilisé pour la régénération des protoplastes après leur transformation.
- SFM (*Soya Flour Mannitol*) : il s'agit du milieu permettant la sporulation de *S. lividans*.
- RBB-Xylan : ce milieu permet la visualisation de l'activité xylanasiqne des transformants. Le xylane de l'épeautre d'avoine est utilisé comme substrat et est lié de façon covalente au colorant *Remazol Brilliant Blue*. L'apparition d'une zone d'éclaircissement autour de la colonie permet de détecter l'activité xylanasiqne.

Ces milieux peuvent être additionnés de thiostrepton (50 µg/mL) ou d'hygromycine (250 µg/mL).

2. 4 Croissance des clones de *S. lividans*

20 mL de milieu minimal M14 sont déposés dans un erlenmeyer stérile contenant 4 billes de verre de 4 mm de diamètre. 1 mL de xylose 20 %, 120 µL de MgSO₄ • 7 H₂O 5%, 200 µL de CaCl₂ • 2H₂O 3%, 100 µL de protéose peptone, extrait de levure (PPYE) ainsi que 2 x 10⁶ spores/mL sont ajoutés stérilement au milieu. 20 µL de thiostrepton 5 mg/mL peuvent être ajoutés selon la souche. Les spores, qui sont conservées dans du glycérol, sont lavées préalablement avec du M14. L'incubation des cultures se fait à 34 °C avec agitation à 240 rpm pour des temps variables selon les expériences.

2. 5 Manipulations et amplifications de l'ADN

Le détail des tampons utilisés est retrouvé en appendice.

2. 5. 1 Amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Le PCR est une méthode permettant d'amplifier *in vitro* une séquence d'ADN à partir d'un génome bactérien à condition de disposer de deux amorces en 5' et 3' dont la séquence est homologue au fragment à amplifier.

On mélange dans un microtube de 0,2 mL, 65 µL d'eau milli-Q, 8 µL des quatre dNTP (2,5 mM chacun), 10 µL de tampon pour *Pfu* 10X, 8 µL de propionamide 50 %, 1 µL de Tween 20 5 %, 3 µL de chacune des deux amorces (concentration de 25 pmol/µL pour une concentration finale de 37,5 pmol), 1 µL de l'ADN matrice (environ 50 ng final) ainsi que 1 µL de la polymérase *Pfu Turbo*® (Stratagene) de concentration 2,5 U/µL (1,25 U final) pour un volume total de 100 µL. La réaction est réalisée dans un thermocycleur *Techne Genius*. Les détails du programme utilisé se retrouvent en appendice. Ce programme comprend tout d'abord une étape de dénaturation à la chaleur permettant

la formation d'ADN simple-brin. Cet ADN sert de matrice pour les étapes de synthèse. On retrouve ensuite une étape permettant l'appariement des amorces à la matrice suivie de l'étape de synthèse de l'ADN par la polymérase. La taille des fragments d'ADN amplifiés est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%.

2. 5. 2 PCR recombinant ou emboîté

Le PCR emboîté est une variante du PCR standard permettant d'introduire une mutation dans un gène à l'aide d'amorces mutées, ou d'effectuer des fusions entre fragments d'ADN. Un premier PCR permet d'amplifier la partie 5' du fragment final désiré tandis qu'un deuxième PCR permet l'amplification de la partie 3'. Les fragments obtenus sont purifiés sur gel d'agarose puis extraits du gel à l'aide du kit QUIAEX II (QUIAGEN Technologies). Le volume obtenu est complété avec la quantité d'eau nécessaire pour la réaction de PCR. On mélange les fragments et on dénature l'ADN des deux premières réactions de PCR en faisant bouillir ces dernières dans un becher pendant 5 minutes. On ajoute finalement le tampon de la *Pfu* polymérase Turbo (*Pfu* buffer 10X), puis pour favoriser l'appariement entre les brins complémentaires on laisse le mélange refroidir à la température de la pièce dans le becher. Les réactifs nécessaires pour la réaction de PCR ainsi que les amorces externes sont ajoutés et l'amplification est effectuée dans le thermocycleur *Techné Genius* à l'aide du programme détaillé dans l'appendice C. La taille du fragment amplifié est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

2. 5. 3 Digestion enzymatique de l'ADN

Lors d'une digestion enzymatique, l'ADN est soumise à l'action catalytique d'enzymes de restriction qui couperont celui-ci à des sites spécifiques générant ainsi des fragments de taille variable. La réaction de digestion est réalisée pendant une heure à 37°C et on prend en considération qu'une unité d'enzyme de restriction est suffisante pour digérer un µg d'ADN. Le volume de digestion est habituellement de 20 µL et contient le tampon de digestion associé à l'enzyme utilisée ou du tampon *One for all* en concentration 1X (GE Healthcare). Les enzymes de restriction utilisées proviennent de la compagnie GE Healthcare. On peut vérifier la digestion par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % en référence à une échelle de poids moléculaire d'ADN (1 kb ladder, Life technologies). Quatre µL de tampon de charge 4X sont ajoutés aux échantillons. Le tampon d'électrophorèse utilisé est du TAE 1X.

Le bromure d'éthidium est utilisé pour la visualisation des fragments d'ADN. Il s'agit d'un agent s'intercalant entre les bases complémentaires de l'ADN et qui, excité par les rayons UV, émet de la fluorescence. Un Gel Doc 1000 (Bio Rad) est utilisé pour visualiser et documenter les images.

2. 5. 4 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Après électrophorèse et visualisation des fragments, le gel d'agarose est découpé afin d'extraire les fragments d'intérêt. Le kit QUIAEX[®]II de *Qiagen* est utilisé pour l'extraction. L'agarose est solubilisé en présence de fortes concentrations de sels, ce qui permet au fragment d'ADN d'être adsorbé de manière sélective sur des billes de silica-gel. On élue l'ADN à l'aide de tampon faiblement concentré en sel.

2. 5. 5 Déphosphorylation de vecteur digéré par des enzymes de restriction

Cette étape permet l'hydrolyse des phosphates situés en 5' d'un vecteur d'ADN linéarisé par digestion à l'aide d'un enzyme de restriction avant l'étape de ligation afin d'éviter la recircularisation de ce dernier.

L'enzyme de restriction utilisée pour la linéarisation du vecteur est d'abord inactivée pendant 20 minutes à 65 °C et l'échantillon est refroidi à température de la pièce. On ajoute la quantité de CIP 20 U/μL (GE Healthcare) nécessaire pour déphosphoryler la quantité d'ADN utilisée (de 0,1 à 0,5 U de CIP par pmol d'extrémité d'ADN, environ 0,2 U pour un plasmide). La CIP est inactivée 30 minutes à 60 °C et l'échantillon est refroidi à température de la pièce. Une extraction au phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol sont effectuées sur le vecteur déphosphorylé avant de procéder à la ligation avec un fragment d'ADN d'intérêt.

2. 5. 6 Ligation

On digère le vecteur ainsi que l'insert à l'aide des mêmes enzymes de restriction ou par des enzymes permettant d'obtenir des extrémités compatibles et l'on récupère les fragments par extraction sur gel d'agarose. Le ratio vecteur/insert sera habituellement de 1 pour 3. La réaction de ligation est effectuée pendant une nuit à 14 °C dans un volume final de 10 μL contenant 1 μL de tampon *One for all* 10X, 1 μL d'ATP 10 mM et 2,5 U d'ADN ligase du phage T4 (USB Corporation).

2. 6 Clonage dans *S. lividans*

2. 6. 1 Transformation dans *S. lividans*

Les transformations de *S. lividans* sont effectuées en utilisant des préparations de protoplastes du mutant 10-164 d'après la technique décrite dans (Kieser, 2000). On peut utiliser 10 µL de mélange de ligation ou 1 µL de plasmide pur pour 50 µL de protoplastes (10^8 - 10^9 protoplastes /mL). La régénération est effectuée sur milieu R5 pendant 16h à 30°C. La sélection des transformants est effectuée par l'étalement de 1,5 mL d'une solution d'antibiotique. Les pétris sont incubés de nouveau à 30 °C et les colonies apparaissent en 2-3 jours. Les antibiotiques utilisés sont le thiostrepton (50 µg/mL) ou l'hygromycine (250 µg/ml).

2. 6. 2 Mini-préparation de l'ADN plasmidique

La méthode utilisée est une variante de la lyse alcaline en présence de SDS. Celle-ci est modifiée de façon à être applicable aux Streptomycètes. Le SDS lyse la paroi des cellules, ce qui permet la libération du contenu cellulaire dans le milieu alcalin et la dénaturation des protéines et de l'ADN chromosomique. La structure super-enroulée de l'ADN plasmidique lui permet de résister à la dénaturation. La trousse QIAprep Spin Miniprep de Qiagen est utilisée pour la majorité des mini-preparations effectuées.

2. 6. 3 Vérification de la présence de l'insert par colonie-PCR

Afin de vérifier la présence de l'insert, une petite portion d'une colonie ayant poussé sur la gélose est prélevée à l'aide d'un cure-dent et inoculée dans un microtube à bouchon vissé contenant 100 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8 et environ 250 mg de billes de verre (0,1 mm de diamètre). Les cellules sont brisées à l'aide de l'appareil FastPrep (FP120, ThermoSavant) à vitesse 6,5 pendant 45 sec. Une centrifugation de 10 min à 13 krpm

permet de récupérer le surnageant contenant l'ADN. Une dilution du surnageant sert de matrice dans une réaction de PCR et permet ainsi de vérifier la présence de l'insert.

2. 6. 4 Préparation de spores de *S. lividans*

Des géloses SFM sont étalées à partir d'une moitié de colonie choisie sur le milieu de transformation R5. La fraction de colonie est prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile, déposée et striée à l'aide d'un fil de platine sur un tier d'une gélose SFM additionnée de thiostrepton ou d'hygromycine, selon le transformant. Les pétris sont incubés pendant environ une semaine à 30 °C. Les spores sont ensuite grattées à l'aide du fil de platine et étalées sur trois pétris de milieu SFM plus antibiotique. Les pétris sont à nouveau incubés pendant une semaine à 30 °C. Afin de récolter les spores, 10 mL de glycérol 20 % stérile sont déposés sur la première gélose. La surface de celle-ci est délicatement grattée à l'aide d'une pipette de plastique stérile. Le maximum de solution est récupéré et déposé sur la gélose suivante. Le même volume de glycérol 20 % peut servir à gratter un maximum de trois pétris. Les spores sont récupérées dans un tube à centrifugation stérile contenant environ 1/3 de billes de verre. Le tube est vortexé pendant 1-2 min et son contenu est filtré sur une laine de verre placée dans un tube troué dans le fond. La laine est rincée avec un peu de solution de glycérol. Le filtrat est recueilli dans un second tube. La DO_{600} (Spectrophotomètre Ultrospec III, GE Healthcare) d'une dilution 1/10 dans du glycérol 20% est comparée à une courbe mettant en relation la DO_{600} en fonction de la concentration de spores. Les spores sont réparties dans des microtubes et conservées à -20 °C.

2. 7 Dosage de l'activité enzymatique

Les spores des divers clones de *S. lividans* sont inoculées dans 20 mL de milieu M14, xylose 1% selon une concentration de 2×10^6 spores/mL. Ces cultures sont incubées à 34 °C avec une agitation de 240 rpm. Des échantillons de 1 mL sont prélevés à partir des cultures à différents temps (h). Ils sont centrifugés 2 min à 13 000 rpm. Le surnageant est prélevé et conservé à 4 °C. Les culots conservés serviront à élaborer la courbe de croissance. La méthode des sucres réducteurs est utilisée afin de déterminer l'activité enzymatique produite par les différentes souches (Miller, 1959). Les xylanases dégradent le xylane en oligoxylosides de différentes tailles. Les extrémités réductrices de ces oligoxylosides réagissent avec l'acide dinitrosalicylique (DNS) ce qui induira une coloration brune qui sera directement proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents. On mesure l'intensité de la coloration au spectrophotomètre à 540 nm. Les résultats sont exprimés en UI/mL où une unité enzymatique internationale (UI) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une μmol de substrat par minute à 57 °C. La concentration en xylane utilisée est de 1%. Les échantillons et témoins sont dilués dans du tampon citrate-phosphate 0,5M, pH 6,0. La durée de l'essai est de 10 min.

2. 8 Estimation de la croissance bactérienne par dosage de l'ADN

L'estimation de la croissance bactérienne est effectuée par dosage de l'ADN selon la méthode décrite par Burton, 1956. Cette expérience permet de s'assurer que les variations d'activités enzymatiques détectées lors des tests de dosage enzymatique ne sont pas causées par des fluctuations de la biomasse des cultures. 1 mL de culture est prélevé et centrifugé. Le surnageant est décanté et 500 μL de SSC 1X (NaCl 15 mM, citrate de sodium 15 mM) sont ajoutés au culot qui est dispersé à l'aide d'un mini-potter. 500 μL supplémentaires de SSC 1X sont ajoutés. On ajoute à chacun des échantillons 1,0 mL d'acide perchlorique (Sigma), 2,0 mL de diphenylamine 4% (Sigma) et 0,2 mL d'acétaldéhyde 0,16 % (Sigma) avant de vortexer. Les tubes couverts sont incubés 16 h à 30 °C sans agitation. 1 mL de chaque suspension est centrifugé 2 min à 14 krpm et le

surnageant est dosé au spectrophotomètre (Ultrospec III, Pharmacia). La différence de DO entre 595 et 700 nm permet de quantifier l'ADN.

2. 9 Marquage des cellules par *pulse-chase*

Le pulse-chase s'effectue à l'aide de la méthionine marquée au soufre³⁵ (S^{35}) qui permet de mesurer la synthèse protéique *in vivo*. La technique de *pulse-chase* consiste à mettre des cellules en présence d'un acide aminé marqué pendant quelques minutes (étape de pulse) suivi d'une dilution avec une forte concentration du même acide aminé non marqué, (étape de *chase*). Cette méthode permet de suivre au cours du temps le devenir d'une protéine sans altérer les conditions de culture des cellules. Le S^{35} est un émetteur β peu stable, principalement utilisé dans le marquage métabolique des protéines.

Les clones à l'étude sont cultivés dans 20 mL de milieu M14 + xylose 1%ensemencés à partir de 2×10^6 spores/mL et incubés 72 h à 34 °C à 240 rpm. La culture est centrifugée 1 min à 1 500 rpm et le culot obtenu est lavé deux fois avec du milieu M14 avant d'être resuspendu dans 20 mL du même milieu. Cinq mL sont prélevés et dispersés à l'aide d'un potter pour ensuite être transférés dans un erlenmeyer de 25 mL contenant du xylose en concentration finale de 0,5 %. Les suspensions sont incubées 5 min à 34 °C dans un bain-marie avec agitation, puis les cellules sont marquées à l'aide de méthionine *Expre35S35S protein labelling mix* contenant 20% de cystéine (Perkinelmer Wallac Canada, 18mCi) en concentration finale de 180 μ Ci/mL. Une compétition est ensuite après 2 min par ajout d'un mélange de L-méthionine et de L-cystéine. 50 μ g/mL de BSA (*bovine serum albumine*, albumine sérique bovine) sont ajoutée afin de faciliter la précipitation des protéines. Des aliquots de 500 μ L sont prélevés à différents temps prédéterminés et ajoutés à 500 μ L d'acide trichloroacétique (TCA) 10 %. Les aliquots sont incubés sur la glace pour un minimum de 30 min. Ceux-ci sont centrifugés 10 min à 3 500 rpm. Les culots sont lavés deux fois avec de l'acétone. On évapore l'acétone résiduel pendant au moins 15 min puis on suspend les culots dans 40 μ L de Tris, 1 mL de tampon SP et 10 μ L de PMSF (inhibiteur de protéases). Les détails des tampons se retrouvent en appendice. Les cellules sont cassées à l'aide de l'appareil FastPrep (Thermosavant) en

présence de billes de verre de 0,1 mm. 100 µL de SDS 10 % sont ajoutés aux échantillons qui sont chauffés 5 min à 100 °C. 12 mL de tampon IPD sont également ajoutés. Les échantillons subissent une préclarification d'une heure à 4 °C à l'aide de 30 µL de protéine A/Sépharose 10% (Sigma). Après centrifugation de 5 min à 3 500 rpm, les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes auxquels 5 µL d'anti-XlnC ou d'anti-XlnA de lapin sont ajoutés. Suit une incubation de 30 min à 4 °C puis l'ajout de 50 µL de protéine A/Sépharose 10 %. L'incubation est poursuivie toute la nuit à 4 °C sous agitation. Les échantillons sont centrifugés 5 min à 3 krpm et les billes sont récupérées et lavées quatre fois à l'aide de 10 mL de tampon IPW sous les mêmes conditions de centrifugation. Les échantillons sont finalement centrifugés 15 secondes à 13 krpm et les surnageants sont éliminés. Les culots de billes sont repris dans 35 µL de tampon Laemmli 3X, bouillis pendant 5 min et centrifugés 2 min à 13 krpm. Les échantillons sont séparés sur un gel de polyacrylamide (4% concentration/12% séparation) par électrophorèse (SDS-PAGE). Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel de séparation est fixé dans une solution d'isopropanol/eau/acide acétique (25 :65 :10) pendant 20 min sous agitation. Le gel est incubé dans une solution Amplify (GE Healthcare) pendant 30 min. Le gel est déposé sur du papier filtre et séché pendant environ 1h30 à 80 °C à l'aide du *Gel Slab Dryer* de Bio-Rad. Il est par la suite déposé dans une cassette d'autoradiographie (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics) possédant un écran sensible à la radioactivité et incubé à température ambiante pendant 48 h. La cassette est lue et scannée à l'aide du Phospho Imager™ de Molecular Dynamics et analysée à l'aide du logiciel Image Quant® 5,0 de Molecular Dynamics.

2. 10 Expérience de chromatographie d'affinité avec la XlnC

Le détail des tampons utilisés est retrouvé en appendice.

2. 10. 1 Chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne HiTrap™

La chromatographie d'affinité repose sur l'interaction de certaines molécules avec d'autres. Ce type de méthode permet la discrimination de molécules en fonction de leur affinité pour un ligand fixé à une résine ou matrice. La molécule d'intérêt présente une

affinité pour une composante de l'adsorbant et s'y liera de façon stable. Une chromatographie d'affinité comporte généralement deux ou trois étapes soient le couplage du ligand sur la résine, l'adsorption de la molécule d'intérêt suivi de lavages permettant l'élimination de molécules non-spécifiques et finalement l'élution de la molécule d'intérêt. La HiTrap™ est une version en colonne de l'IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*), une chromatographie d'affinité faisant appel à l'immobilisation sur une résine d'acide nitriloacétique (NTA) d'un atome métallique comme le nickel. Le nickel présente une forte affinité pour l'acide aminé histidine. Une queue ou étiquette d'histidine (6-his) peut être ajoutée aux extrémités C ou N-terminale du précurseur afin de permettre sa rétention sur la colonne. L'ion Ni^{2+} possède six liens de coordination. Quatre sont sollicités par le NTA pour l'immobilisation sur la résine, alors que deux interagissent avec les atomes d'azote du cycle de la chaîne latérale de deux résidus histidines. Afin d'éluer la protéine d'intérêt, on utilise un tampon contenant de l'imidazole entrant en compétition avec l'histidine pour le nickel (voir fig. 7). Le but de l'utilisation de cette technique était donc d'isoler le précurseur de la xylanase C ayant une queue d'histidines ainsi que les protéines pouvant interagir avec celle-ci et de les éluer ensemble à l'extérieur de la colonne HiTrap™.

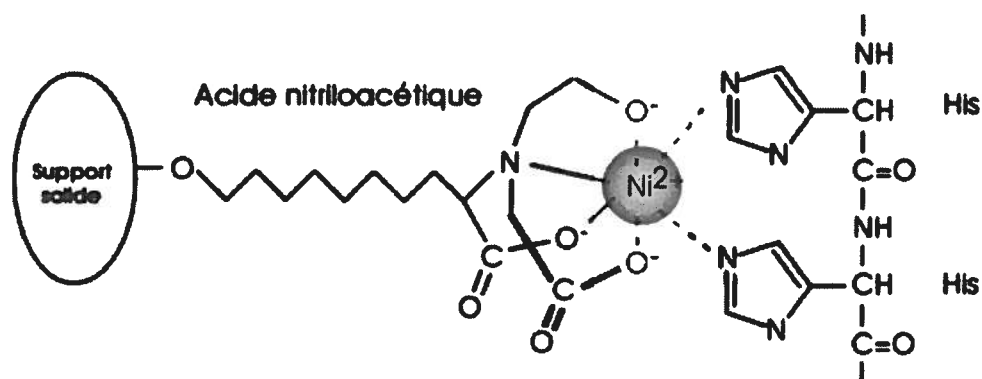


Figure 7. Principe de la chromatographie d'affinité en colonne HiTrap.

Les ions Ni^{2+} sont immobilisés sur la résine (NTA) dans la colonne. Les histidines de la protéine étiquetée interagissent avec les liens de coordination disponibles des ions nickel. D'après <http://www.callisto.si.usherb.ca/~bcm514/5e1.html>

2. 10. 1. 2 Préparation de l'échantillon

D'une culture de 72h, 1 L sont prélevés et les cellules sont récoltées par centrifugation (10 min, 5 krpm). Celles-ci sont lavées dans du tampon 20 mM sodium phosphate, pH 7,4 et récupérées comme précédemment dans les mêmes conditions de centrifugation. Le culot de cellules est suspendu dans 20 mL de tampon 20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl, 50 mM imidazole, pH 7,4. Les cellules sont cassées par trois passages à la presse de French (10 000 PSI). L'homogénat est centrifugé 10 min à 10 krpm afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et centrifugé 30 min à 160 000 g afin d'obtenir la fraction cytoplasmique sans membranes.

2. 10. 1. 3 Passage sur la colonne

La colonne HiTrap (trousse HiTrap™, GE Healthcare) est préparée tel que mentionné par la compagnie. Les lavages et l'équilibration de la colonne sont effectués avec du tampon 20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl, contenant différentes concentrations d'imidazole jusqu'à ce que la DO_{280} soit stable. Les fractions éluées peuvent par la suite être dialysées contre de l'eau et lyophilisées. Les lyophilisats sont suspendus dans 40 μ L de tampon Laemmli 3X et les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE) (voir section 2. 10. 3). Les gels de regroupement et de séparation contiennent respectivement 4% et 12% de polyacrylamide. Les concentrations et quantités des solutions utilisées pour les lavages peuvent varier selon les besoins.

2. 10. 2 Colonne de sépharose activé au CNBr

Ce type de colonne est également basé sur les principes de la chromatographie d'affinité. Le bromure de cyanogène (CNBr) est l'un des réactifs utilisés pour coupler une cible à la matrice d'une colonne. Ce dernier réagit avec les groupements hydroxyle du sépharose pour former des groupements ester cyanate actifs. Les groupements ainsi activés

interagissent avec les groupements amines primaires de la protéine à lier (ligand) pour former des liens iso-urées. Le couplage est fait spontanément. L'échantillon contenant les protéines interagissant potentiellement avec le ligand est appliqué sur la colonne. Les protéines non-spécifiques sont éliminées par lavage. L'élution est effectuée par changement de la force ionique du tampon par l'ajout d'un gradient de NaCl.

2. 10. 2. 1 Préparation du ligand et couplage sur la matrice

Le précurseur de la XlnC est isolé à l'aide d'une colonne HiTrap™ (GE Healthcare) (voir section 2. 10. 1) et servira de protéine à coupler sur la colonne. Un gel auquel fût fixé la xylanase C mature est également utilisé pour voir si des protéines reconnaissent spécifiquement la xylanase sans son peptide signal. Les différentes fractions obtenues à partir de la colonne HiTrap sont combinées et dialysées contre du tampon de couplage (voir annexe) pour un minimum de 16 h. Le ligand dialysé est recueilli et une lecture de la densité optique à 280 nm est effectuée. Le gel est préparé à partir de 0,5 g de préparation lyophilisée de CNBr-sépharose (GE Healthcare) placé dans 10 mL de HCl 1 mM froid. On laisse gonfler le gel 30 minutes à 4 °C avec agitation par rotation. A l'aide d'un filtre en verre, le gel est lavé avec 200 mL de HCl 1 mM froid, puis avec deux fois 10 mL de tampon de couplage en resuspendant le gel à chaque fois. Le gel est introduit dans le tube contenant la protéine à fixer et incubé toute une nuit à 4 °C avec agitation par rotation.

On laisse sédimenter le gel, puis on prend la lecture de la densité optique à 280 nm du surnageant de façon à vérifier si l'antigène s'est bien fixé au gel. Le surnageant est enlevé et conservé à 4 °C. Cinq mL de tampon de blocage sont ajoutés au gel et celui-ci est incubé 4 h à température de la pièce avec rotation. À l'aide du filtre de verre, on procède à huit lavages avec 10 mL de tampon de lavage I en alternance avec 10 mL de tampon de lavage II. Le gel est resuspendu entre chaque opération. Dix lavages avec du tampon PBS sont finalement effectués. Le gel est par la suite placé dans une mini-colonne munie d'un robinet. Une variation du protocole consiste en la dénaturation du ligand lorsqu'il s'agit de la xylanase C mature à l'aide de 5 mL d'une solution de Tris-HCl 10 mM pH 7,5,

d'urée 8M et de DTT 10 mM et ce, avant l'application de l'échantillon. L'excès d'urée et de DTT est éliminé par lavages avec du Tris-HCl 10 mM pH 7,5.

2. 10. 2. 2 Application de l'échantillon

Dix mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 sont passés sur la colonne afin d'équilibrer le gel. La fraction cytoplasmique obtenue à partir d'une culture de 400 mL de la souche 10-164 (culture de 72 h en M14 + xylose 1%) est passée deux fois dans la colonne. Le gel est lavé avec du Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 jusqu'à stabilité de la DO_{280} .

2. 10. 2. 3 Éluion des protéines d'intérêt

L'éluion est effectuée à l'aide de 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contenant différentes concentrations de NaCl variant entre 50 mM et 1 M. La DO_{280} est enregistrée et les fractions représentant un pic d'éluion (DO_{280} maximale) sont séparées par SDS-PAGE.

2. 10. 2. 4 Régénération et conservation de la colonne

Le gel contenu dans la mini-colonne est rééquilibré à l'aide de 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 puis lavé huit fois avec du tampon de lavage I et II en alternance. Suit ensuite dix lavages au PBS. Le gel peut être conservé à 4 °C dans du PBS et de l'azide de sodium 0,1%.

2. 10. 3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont dénaturées par la chaleur et par du dodecyl sulfate de sodium (SDS), un détergent fortement chargé négativement. Le gel de polyacrylamide permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Du tampon Laemmli 3X est ajouté à l'échantillon dans une concentration de 1:2. Pour les échantillons lyophilisés provenant

des colonnes d'affinité, 40 μ L de tampon Laemmli 3X est ajouté au lyophilisat. Les échantillons sont incubés à 100 °C pendant cinq minutes sont ensuite déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide de regroupement (4%). Les protéines seront séparées sur un gel de polyacrylamide à 12%. Un voltage de 90 V est appliqué pendant environ 10 min ou jusqu'à ce que les protéines atteignent le gel de séparation, puis le voltage est augmenté à 200 V jusqu'à la sortie du front de migration. Pour les grands gels, la migration peut s'effectuée pendant la nuit (environ 16h) à 70 V. Le tampon d'électrophorèse utilisé est un tampon Tris-Glycine 1X. Un marqueur de poids moléculaire migre conjointement avec les échantillons. Le marqueur utilisé est le Broad Range de BioRad dilué 1/20 dans du tampon Laemmli 1X pour les gels colorés au bleu de Coomassie ou encore 1/200 pour les gels colorés à l'argent.

2. 10. 4 Séquençage des protéines d'intérêt au spectromètre de masse

2. 10. 4. 1 Digestion tryptique

La trypsine est une enzyme qui clive les protéines en coupant en C-terminal des résidus basiques (lysine ou arginine) si le résidu suivant n'est pas une proline. Les différentes protéines représentées par les bandes obtenues sur un gel de polyacrylamide peuvent donc être digérées en peptides qui seront analysés par la suite en spectrométrie de masse. Les bandes d'intérêt sont découpées du gel, coupées en deux morceaux et déposées dans un microtube de 1,5 mL propre. Les bandes sont lavées sous agitation pendant 10 minutes avec 500 μ L de carbonate d'ammonium 100 mM. 500 μ L d'acétonitrile 100% (HPLC Grade, Sigma) sont ajoutés et les tubes sont agités 15 minutes. Le liquide présent est éliminé et 50 μ L d'acétonitrile sont ajoutés. Les tubes sont incubés 15 minutes à la température pièce. Le liquide est éliminé de nouveau et les échantillons sont asséchés à l'aide d'un évaporateur à vide Speed-Vac (modèle SVC 100H, Savant Instruments Inc.) relié à une trappe de condensation réfrigérée (Savant Instrument Inc.) et une pompe à vide (Cenco-Magavac Vaccum Pump, Central Scientific Co.). Ces étapes peuvent être répétées tant que le gel n'est pas clair. Les prochaines étapes sont réalisées afin de faire une réduction et une alkylation des protéines présentes dans le gel. 160 μ L de

NH_4HCO_3 /DTT sont ajoutés aux tubes qui sont incubés 30 min à 60 °C. Après avoir été refroidis à température de la pièce, les échantillons sont incubés 30 min à température pièce et à l'abri de la lumière en présence de 10 μL d'iodoacétamide 100 mM (Sigma). Le liquide présent est éliminé et 500 μL de NH_4HCO_3 100 mM est ajouté. Les tubes sont ensuite agités 10 min et 500 μL d'acétonitrile 100% est ajouté. Une agitation de 15 min suit. Le liquide est de nouveau éliminé et 50 μL d'acétonitrile est ajouté pour une incubation de 15 min à température de la pièce. Le solvant est éliminé du tube et son contenu est asséché au *Speed-Vac*. La trypsine (Promega, Sequencing Grade) préalablement suspendue dans de l'acide acétique 50 mM tel est diluée dans du tampon NH_4HCO_3 25 mM. Le tampon contenant la trypsine est ajouté aux tubes contenant les échantillons de façon à obtenir 0,2 μg de trypsine par bande et les échantillons sont incubés 15 min à température de la pièce. Du tampon est ajouté afin de couvrir complètement le morceau de gel et l'incubation est poursuivie pendant une nuit à 37 °C. Les peptides résultant de la digestion doivent par la suite être extraits du gel. Les échantillons sont incubés 30 min à 37 °C en présence de 50 μL d'acétonitrile 60% additionné d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (Sigma, HPLC Grade). Les tubes sont agités 5 min et le liquide obtenu est transféré dans un microtube. L'extraction est répétée une deuxième fois et le liquide obtenu est ajouté à celui prélevé précédemment. Afin d'éliminer les résidus, le microtube est centrifugé durant 1 min et le liquide est transféré dans un microtube propre. L'échantillon est complètement évaporé au *Speed-Vac* et resuspendu dans 20 μL de TFA 1%. Les solutions utilisées ont toutes été filtrées sur membrane de 0,2 μm (Fisher). Les étapes de digestion et d'extraction sont effectuées par l'équipe du service de protéomique et de spectrométrie de masse de l'Institut Armand-Frappier dirigée par le Pr. François Lépine.

2. 10. 4. 2 Analyse en spectrométrie de masse

Dans un premier temps on sépare par chromatographie les peptides générés à partir de la digestion tryptique en utilisant une colonne C18 de 75 μm . Le nettoyage de l'échantillon est effectué avec une trappe C18, qui sert à se débarrasser des sels pouvant nuire à l'analyse. L'appareil détecte ensuite les ions obtenus et sélectionne les trois plus intenses. Il détermine leur charge et les fragmente en fonction de la charge et du rapport m/z. Une recherche dans les banques de données à l'aide du logiciel d'analyse Mascot Server 2.0 (Matrix Science, London, U.K.) est effectuée. Ces banques de données permettent de voir quelles protéines, une fois traitée à la trypsine, génèrent des peptides présentant des patrons de fragmentation semblables. Le logiciel liste ensuite ces protéines en commençant par la plus probable en fonction du nombre de peptides assignés et de la qualité des patrons de fragmentation des peptides.

Les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées à l'aide d'un triple quadrupole à trappe d'ions (Q-Trap LC/MS/MS) de la compagnie Applied Biosystems/MDS SCIEX. L'acquisition des données est effectuée à l'aide du logiciel Analyst Software version 1,4

2. 11 Immunobuvardage de type Western

Le précurseur de la xylanase C peut être détecté par la technique d'immunobuvardage de type Western. Les protéines sont d'abord séparées par SDS-PAGE. Vingt μL de la suspension de protéines est additionné de 10 μL de tampon Laemmli 3X et l'échantillon est bouilli 5 min. Les échantillons sont déposés sur un gel de regroupement à 4% et sont séparés sur un gel à 12%. Un voltage de 90 V est appliqué pendant environ 10 min, puis le voltage est augmenté à 200 V jusqu'à la sortie du front de migration. Le tampon d'électrophorèse utilisé est un tampon Tris-Glycine 1X. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protan®, Schleicher & Schuell) par transfert semi-humide à l'aide du Nova-Blot-MultiphorII de GE Healthcare. Trois épaisseurs de papier Whatman sont d'abord imbibés de tampon de transfert (voir annexe) et sont déposées sur la plaque de l'appareil correspondant à la cathode. On empile la membrane, le gel et trois

autres papiers Whatman, tous imbibés de tampon de transfert. Après avoir enlevé les bulles, la plaque correspondant à l'anode est déposée. Le transfert est effectué à 0,8 mA/cm² de membrane pendant 1 h. Les étapes de marquages et de lavages sont par la suite effectuées à l'aide de la trousse BM Chromogenic Western Blotting Ap Mouse/Rabbit (Roche Diagnostic) ou de la trousse WesternBreeze de Invitrogen. Les anticorps primaires sont des anti-XlnC (57 µg/µL) de lapin purifiés sur colonne d'affinité et les anticorps secondaires sont des anticorps anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline. On peut détecter l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide des substrats chromogéniques NBT/X-phosphate (4-nitrobleu tétrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate de Roche Diagnostic) ou BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-phosphate de Invitrogen).

2. 12 Expériences d'immunoprécipitation de la XlnC et des protéines associées

2. 12. 1 Technique d'immunoprécipitation

Dans des micro-tubes à bouchons vissés, on recueille la totalité (environ 20 mL) d'une culture de 72 h en milieu M14 + 1% xylose. On centrifuge quelques secondes afin de ne pas compacter les cellules, puis les culots sont lavés deux fois dans du tampon de lyse 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl. Les culots sont resuspendus dans 750 µL de tampon de lyse additionné de 10 µL de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF), 40 µL d'inhibiteur de protéase *Complete* (GE Healthcare) et 250 mg de billes de verre 0,1 mm. Les cellules sont cassées au *Fastprep*, 45 secondes à vitesse 6,5, puis 30 sec à la même vitesse. On centrifuge les tubes à vitesse maximale pendant 10 min afin de combiner les surnageants. Les surnageants subissent une préclarification d'une heure à 4 °C à l'aide de 30 µL de protéine A/Sépharose 10% (Sigma). Après centrifugation de 5 min à 3 500 rpm, les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes et 5 µL d'anti-XlnC (57 µg/mL) ou d'anti-XlnA (484 µg/mL) de lapin purifiés sont ajoutés. On incube les tubes 30 min à 4 °C on ajoute 50 µL de protéine A-Sépharose 10%. L'incubation est poursuivie toute la nuit à 4 °C sous agitation.

La préparation est centrifugée 5 min à 3000 rpm, le surnageant est décanté et les billes sont récupérées dans un nouveau tube et lavées plusieurs fois par la même méthode dans 1,5 mL de tampon de lyse 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl. On centrifuge à nouveau 5 min à 3000 rpm et les billes sont finalement resuspendues dans le tampon de réhydratation/lyse. On centrifuge 5 min à 3000 rpm et on transfère le surnageant dans un micro-tube propre.

2. 12. 2 Électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse en deux dimensions permet la séparation de protéines en fonction de deux propriétés. La première dimension appelée focalisation isoélectrique sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) sur un gel présentant un gradient de pH. Le point isoélectrique représente le pH auquel la charge nette de la protéine est nulle. Les protéines sont ensuite séparées sur un deuxième gel, cette fois-ci en fonction de leur masse moléculaire par SDS-PAGE.

2. 12. 2. 1 Première dimension (focalisation isoélectrique)

On étend 150 µL d'échantillon suspendu dans le tampon de réhydratation/lyse dans un puit du support à réhydratation (GE Healthcare) sur une longueur d'environ 6 cm (pour une bande de gel de 7 cm). Avec des pinces lavées à l'éthanol, on enlève le plastique protecteur sur le dessus du gel. On dépose la bande de gel *Immobiline Dry Strip* (échelle de pH 3-10 linéaire, GE Healthcare), gel vers le bas, dans l'échantillon en faisant attention de ne pas faire de bulles. Les bandes de gel sont recouvertes d'huile minérale (Sigma). L'hydratation se poursuit toute la nuit, pour un minimum de 10 h. Le lendemain, des papiers électrodes (deux pour chaque gels) d'environ 1,5 cm de long sont imbibés d'eau distillée et éponnés quelque fois afin qu'ils demeurent semi-humides. Les gels hydratés sont déposés sur un papier filtre (gel vers le haut) afin d'enlever l'excédent d'huile. La bande de gel est placée dans un sarcophage en s'assurant que le bout positif demeure vers le haut. Les papiers électrodes sont déposés sur les derniers 0,5 cm du gel et des électrodes sont posées sur les papiers filtres. On place les sarcophages sur la plaque

de l'IPGphor (GE Healthcare). Les bandes de gels et les papiers électrodes doivent être couverts d'huile minérale et la migration est effectuée selon les conditions suivantes : 500 V pour 250 Vh, 1000 V pour 500 Vh, 2000 V pour 2000 Vh, 3000 V pour 3000 Vh et 4000 V pour 3250 Vh pour un total de 9000 Vh

2. 12. 2. 2 Réduction et alkylation des protéines

Lorsque la migration est terminée, le surplus d'huile de la bande de gel est imbibé en la déposant sur un papier filtre. On équilibre le gel dans une solution d'équilibration additionnée de DTE sous agitation pendant 10 min, puis dans la même solution mais additionnée d'iodoacetamide (Sigma) pendant 5 min.

2. 12. 2. 3 Deuxième dimension (SDS- PAGE)

Le gel est déposé sur la plus grande vitre du montage d'électrophorèse, au dessus d'un gel de polyacrylamide 12 % sans gel de concentration en s'assurant que le coté positif de du gel (extrémité acide) soit à gauche. Des morceaux de papiers filtres sont imbibés avec du marqueur de poids moléculaire *Broad Range* de BioRad dilué 1/100 dans du tampon Laemmli 1 X placés à chaque extrémité du gel. Un mL d'une solution d'agarose 1% fondue est ensuite coulé par-dessus la bande de gel et celui-ci est rapidement poussé jusqu'au gel de polyacrylamide 12 %. La migration pour la deuxième dimension d'effectue à 200 V dans une cuve à électrophorèse contenant 500 mL de tampon de migration 1X jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel.

Les gels sont démoulés et l'échelle de pH est identifiée sur le gel. Ce dernier est placé dans une solution de fixation (40% méthanol, 10% acide acétique glacial) pendant 30 min ou toute la nuit pour une coloration à l'argent.

2. 12. 2. 4 Coloration à l'argent

Le protocole de coloration à l'argent a été élaboré à partir du protocole fourni par Pierre Thibault de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie. L'éthanol utilisé dans ce protocole doit être de grade HPLC et l'eau utilisée est de l'eau milli-Q. Les différentes étapes doivent être effectuées sous agitation constante. Les solutions de sensibilisation et de nitrate d'argent doivent être filtrées. Le gel est fixé pendant 30 min ou plus dans une solution de méthanol 40%/acide acétique 10%. Afin d'éliminer la solution de fixation, le gel est lavé trois fois pendant 5 min dans de l'eau milli-Q. Le gel est placé dans une solution de sodium thiosulfate 0,02% pendant 1 à 2 min pour un gel de 0,75 mm d'épaisseur ou pendant 5 min pour un gel de 1,5 mm d'épaisseur. Cette étape permet de sensibiliser le gel. La solution de sensibilisation est éliminée et le gel est lavé deux fois pendant 5 min avec de l'eau milli-Q. Le gel est incubé de 20 à 30 min dans une solution de nitrate d'argent (0,1%) à l'abri de la lumière. La solution est éliminée et le gel est rincé 1 min avec de l'eau milli-Q. Le gel est développé dans une solution fraîche de carbonate de sodium 2% et de formaldéhyde 0,04%. Une première quantité de la solution est ajoutée puis éliminée lorsque celle-ci devient jaunâtre. De la solution fraîche est ensuite rajoutée jusqu'à apparition des bandes. Le développeur est décanté et le gel est rincé légèrement avec de l'eau milli-Q. Une solution d'acide acétique 5% est versé sur le gel avec d'arrêter le développement. Le gel peut être conservé à l'abri de la lumière à 4 °C dans une solution contenant de l'éthanol à 30% et du glycérol à 4%.

3. Résultats

3. 1 Isolement des protéines pouvant interagir avec le précurseur de la XlnC

La XlnC étant une protéine sécrétée par la voie Tat, elle est repliée dans le cytoplasme avant sa sécrétion.

Le but du présent projet était d'isoler des protéines pouvant interagir avec le précurseur de la XlnC, parmi lesquelles pourrait se retrouver des chaperonnes impliquées dans son repliement. Trois techniques se basant sur l'affinité entre le précurseur et des chaperonnes potentielles ont été élaborées.

3. 1. 1 Immunoprécipitation avec des anti-XlnC

Afin d'isoler les protéines pouvant interagir dans le cytoplasme avec le précurseur de la XlnC, des expériences d'immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques à celle-ci ont été effectuées. Les souches de *S. lividans* IAF916C, IAF906, IAF916C Δ *tatC* et IAF917C ont été mises en culture 72 h dans 20 mL de milieu M14 additionné de xylose 1%. IAF916C, IAF917C et IAF916C Δ *tatC* contiennent toutes le gène de la XlnC. Par contre, chez IAF917C le peptide signal a été amputé de sa partie N-terminale tandis que chez IAF916C Δ *tatC*, une mutation du gène *tatC* provoque une déficience du système Tat, ce qui induit une accumulation de la XlnC dans le cytoplasme sous sa forme précurseur. La souche IAF906 produit la XlnA seulement. Les protéines contenues dans les fractions cytoplasmiques des cellules ont été immunoprécipitées à l'aide d'anti-XlnC ainsi que de la protéine A-Sépharose 10%. Les protéines spécifiques ont été décrochées des billes de protéine A-sépharose par resuspension dans du tampon de réhydratation/lyse. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Un témoin pour lequel la fraction cytoplasmique de la souche IAF916C a été précipitée avec la protéine A-Sépharose 10% en absence d'anticorps a également été effectué.

3.1 .1. 1 Analyse des protéines par gels en deux dimensions

La séparation des protéines contenues dans les immunoprécipités obtenus précédemment a été effectuée sur gels en deux dimensions. Les protéines sont donc séparées en fonction de leur pI ainsi que de leurs masses moléculaires. À notre surprise, une grande variété de protéines a été mise en évidence. Au niveau des témoins, IAF906, qui ne produit que la XlnA et IAF916C précipités avec la protéine A-Sépharose 10% en absence d'anticorps, on remarque une faible quantité de protéines sur les gels lorsque comparés avec ceux obtenus avec les souches IAF916C et IAF916C Δ *tatC*. Ces deux souches produisent la XlnC mais une mutation dans le gène *tatC* provoque une accumulation du précurseur dans le cytoplasme de IAF916C Δ *tatC*. Le gel réalisé pour la souche IAF917C, un mutant pour lequel la portion N-terminale du peptide signal de la XlnC a été déléetée, ne permet d'observer qu'une faible quantité de protéines. On remarque la présence des chaînes lourdes (50 kDa) et légères (25 kDa) des anticorps sur les gels. Cette méthode d'analyse par immunoprécipitation du précurseur de la XlnC avec des anticorps a été abandonnée à cause d'un trop grand nombre de protéines non spécifiques.

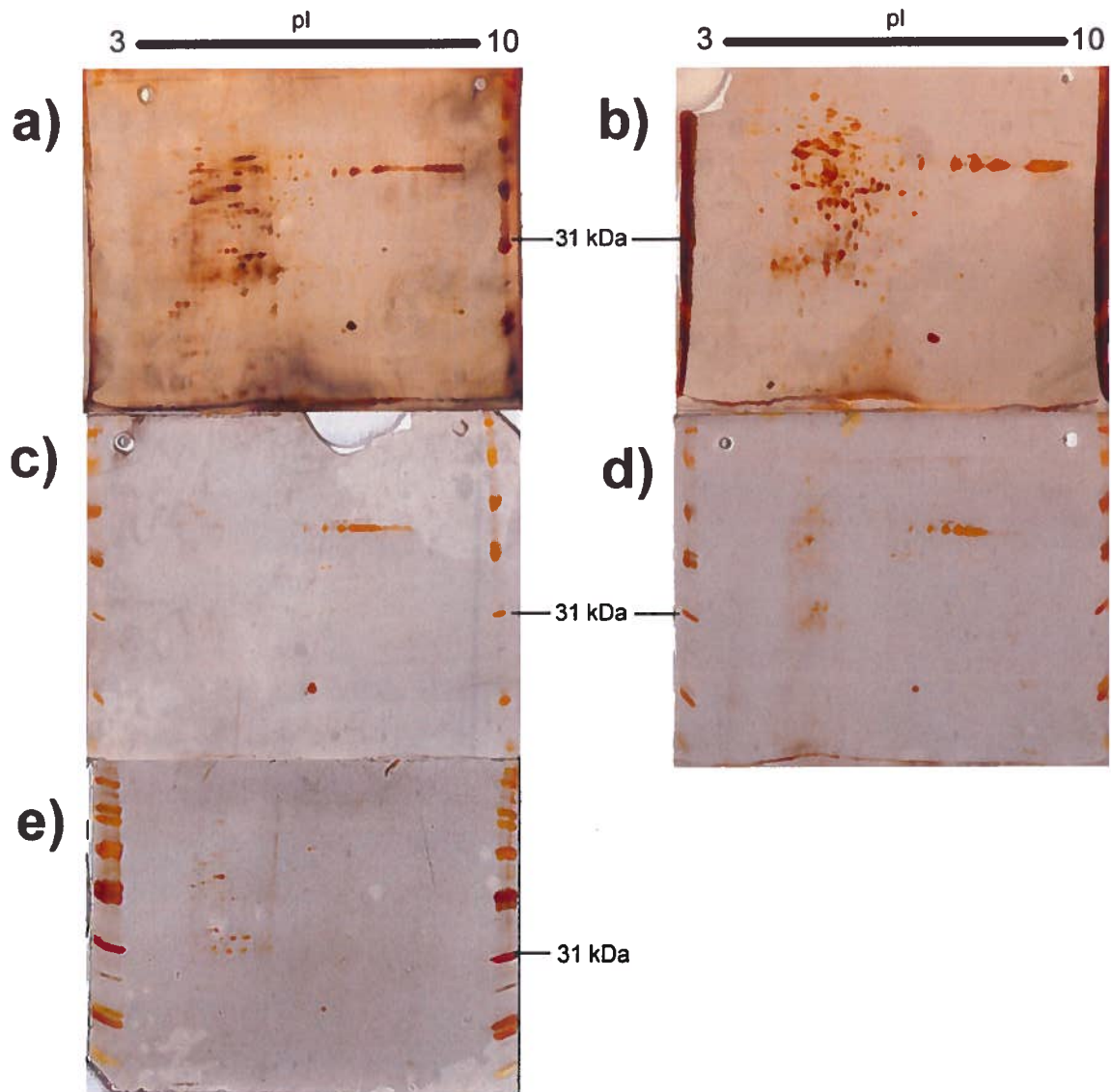


Figure 8. Profils en deux dimensions des protéines cytoplasmiques immunoprécipitées par des anticorps anti-xylanase C.

Les protéines cytoplasmiques des recombinants de *S. lividans* sont immunoprécipitées avec des anti-XlnC et la protéine A-Sépharose 10%. a) IAF916C; b) IAF916C Δ TatC; c) IAF917C; d) IAF906 et e) Contrôle, IAF916C en absence d'anticorps.

3. 1. 2 Chromatographie d'affinité aux ions métalliques sur colonne HiTrap™ (IMAC)

Les profils obtenus à l'aide des gels en deux dimensions étant peu propices à une analyse détaillée, une seconde méthode a été utilisée. En effet, la technique de chromatographie d'affinité aux ions métalliques sur colonne HiTrap™ fournit une alternative intéressante puisqu'aucun intermédiaire n'est utilisé pour l'isolement de la XlnC. En effet, cette technique se base sur l'ajout d'une étiquette de polyhistidine à la protéine d'intérêt. Cette étiquette est composée de résidus histidines. Ce type de colonne est formé d'une résine d'acide nitriloacétique (NTA) sur laquelle est immobilisé un atome de nickel. Le nickel présente une forte affinité pour les résidus histidines de l'étiquette. Afin d'éluer la protéine d'intérêt, on utilise un tampon contenant de l'imidazole compétitionnant pour le nickel.

3. 1. 2. 1 Souches IAF916 Δ tatC, IAF917 Δ tatC et IAF10-164 Δ tatC

Un mutant portant une délétion au niveau du gène *tatC* a été construit (Faury *et al.*, 2004). Cette mutation engendre une inhibition de la sécrétion des protéines par le système Tat. Le gène de la XlnC avec son promoteur a été introduit dans ce mutant (IAF916Chis Δ tatC), qui accumule ainsi le précurseur dans le cytoplasme. Une étiquette de six histidines a également été ajoutée à l'extrémité C-terminale de la XlnC afin de permettre sa rétention sur la colonne d'affinité HiTrap™. La souche IAF917Chis Δ tatC est dérivée de la souche IAF917C qui produit un précurseur de la XlnC chez lequel la région N-terminale du peptide signal est absente. IAF10-164 Δ tatC est la souche 10-164 de *S. lividans* portant une délétion au niveau du gène *tatC* et qui ne sécrète aucun substrat Tat. Cette souche est en outre cellulase et xylanase négative et sert ici de témoin.

Une première expérience a été effectuée avec la souche IAF916Chis Δ tatC afin de déterminer les conditions optimales de lavages et d'élution. Les cellules ont été recueillies à partir de cultures (400 mL) de 72 h en milieu M14 avec du xylose 1% comme source de carbone. La fraction cytoplasmique des cellules a été passée sur la

colonne. Après passage, la colonne a été lavée pour éliminer les protéines non-spécifiques à l'aide de 50 mL de tampon contenant 50 mM imidazole puis une deuxième fois cette fois-ci avec 100 mM d'imidazole. Ces lavages sont importants afin d'éliminer la majorité des contaminants pouvant accrocher dans la colonne. L'élution a été effectuée à l'aide de 5 mL de tampon à 250 mM imidazole. Une quinzaine de bandes ont été observées sur le gel. Celles-ci ont été découpées et envoyées au département de spectrométrie de masse pour identification. Ces bandes sont numérotées sur le gel tel qu'illustré à la figure 9. Les détails des protéines identifiées se retrouvent dans le tableau 2. On remarque la présence du précurseur de la XInC ainsi que de plusieurs protéines aux fonctions diverses. Une bande intense se situant aux environs de 33 kDa a été identifiée comme étant une protéine semblable à CbiX et possède une région riche en histidines, ce qui lui permet d'adhérer fortement dans la colonne. Une deuxième bande très rapprochée correspond à la protéine hypothétique SC5C7.34, une autre protéine possédant une région riche en histidine.

Afin de tenter de réduire le nombre de bandes sur le gel, une deuxième expérience a été effectuée avec des conditions plus raffinées. L'élution a été effectuée à 200 mM d'imidazole et les lavages ont été augmentés (70 mL à 50 mM imidazole et 100 mL de à 100 mM imidazole). Afin de distinguer les protéines ne pouvant être éluées qu'en présence du précurseur, la souche IAF10-164 Δ *tatC* a été utilisée comme témoin. On remarque une grande quantité de bandes sur le gel, et ce pour les trois souches utilisées. La souche IAF10-164 Δ *tatC* a permis d'éliminer quelques bandes correspondant à des contaminants propres à la technique. Les bandes étant présentes pour IAF10-164 Δ *tatC* ainsi que pour les deux autres souches n'ont donc pas été analysées. 19 protéines ont été sélectionnées chez les souches IAF916Chis Δ *tatC* et IAF917Chis Δ *tatC* et les bandes ont été découpées et envoyées au département de spectrométrie de masse pour identification (voir fig. 10).

Une plus grande variété de protéines a cette fois-ci été identifiée et très peu de protéines ont été recueillies en commun pour les deux expériences. Parmi les protéines identifiées (tab. 3) se retrouvent encore une fois le précurseur de la XInC, la protéine semblable à CbiX identifiée précédemment, plusieurs enzymes aux fonctions diverses dont une

peptidyl-prolyl isomérase, des protéines sécrétées et des protéines possédant des régions riches en histidines. On remarque tout de même la présence de la protéine de la famille des USP (SCJ12.12C) qui avait été retenue lors de l'expérience préliminaire. Puisque dans le cadre de ce projet nous recherchons des protéines chaperonnes pouvant être impliquées dans le repliement des protéines Tat (telle que la XlnC), notre attention s'est concentrée sur des protéines pouvant potentiellement remplir ces fonctions telles que des protéines de stress ou des protéases. Les protéines retenues comme ayant des fonctions potentielles de chaperonnes seront discutées plus en détails dans la prochaine section.

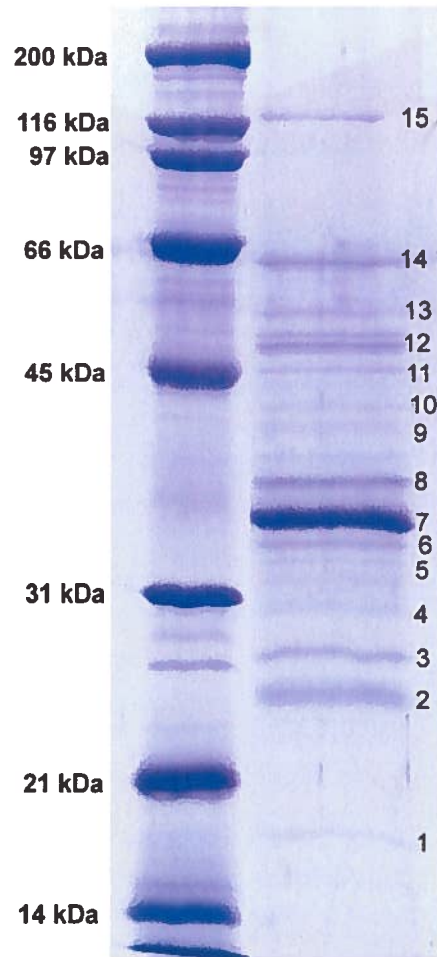


Figure 9. Profil obtenu à partir des fractions éluées hors de la colonne HiTrap™ pour la souche IAF916Chis Δ tatC.

SDS-PAGE est réalisé à partir des fractions éluées hors de la colonne HiTrap à 250 mM d'imidazole pour la souche IAF916Chis Δ tatC.

Tableau 2. Détails des protéines analysées en LC/MS lors de l'expérience de IMAC avec la souche IAF916Chis Δ tatC.

	Protéine	Gène	PM (Da)	pI	Caractéristiques
1	Protéine hypothétique (SCO4465)	CAC08372	19 705	8,04	Type PadR
2	Précurseur de la XlnC	XYNC_STRL1	25 771	8,44	Endo-1,4-beta-xylanase C
3	Régulateur transcriptionnel probable	CAA20000	25 016	11,24	Famille iclR, motif HTH en N-term.
4	Phosphodiesterase putative	CAC44700	31 151	7,25	Métabolisme du glycérol
5	Protéine hypothétique (SCJ12.12C)	CAB53424	32 237	5,90	Famille des USP (<i>Universal stress protein</i>)
6	Protéine hypothétique (SC5C7.34)	CAA20646	33 623	5,44	Région riche en H en N-term., méthyltransférase
7	Protéine hypothétique (SCO1858)	CAC38793	33 405	5,65	Région riche en H en C-term., semblable à Cbi-X
8	Protéine de type PhoH	CAB66426	39 122	6,61	ATPase possible
9	Protéine hypothétique (SCO2582)	CAB66260	44 014	5,94	Domaine peptidase (famille M48), homologue de HtpX, liaison au Zn
10	Hypothetical protein (SC3F9.15)	CAD55381	44 564	7,94	Peptide signal TAT détecté
11	Protéine de la biosynthèse du cofacteur Mo	CAB46950	48 373	6,14	
12	Idem				
13	Kinase (SCO939109 NID)	CAC36363	56 178	4,80	Site de liaison à l'ATP (RAEAGDLLFGTMD)
14	Protéine régulatrice putative	CAB91114	57 383	5,85	Régulateur transcriptionnel dépendant de l'ADN probable
15	Protéine se liant à l'ADN	CAB55732	121 729	6,18	Peptide signal TAT probable, motif HTH

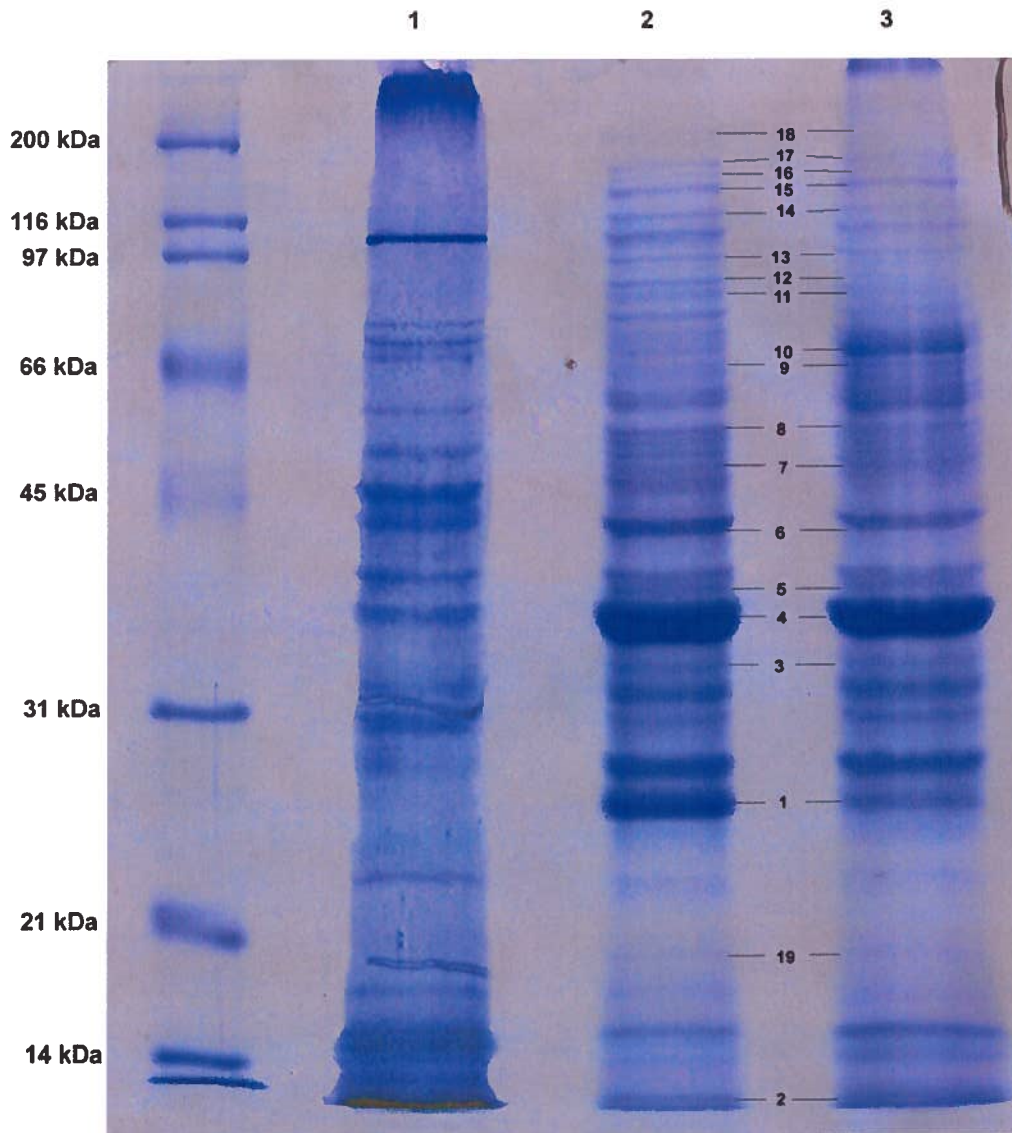


Figure 10. Profils obtenus à partir des fractions éluées lors des expériences de IMAC réalisées à partir des souches IAF10-164 Δ *tatC*, IAF916Chis Δ *tatC* et IAF917Chis Δ *tatC*.

SDS-PAGE est réalisé à partir des fractions éluées hors de la colonne HiTrap à 200 mM d'imidazole. Puits 1) IAF10-164 Δ *tatC*, 2) IAF916Chis Δ *tatC* et 3) IAF917Chis Δ *tatC*. Les bandes ayant été analysées au LC/MS sont numérotées de 1 à 19.

Tableau 3. Détails des protéines analysées par LC/MS pour les souches IAF916Chis Δ atC et IAF917Chis Δ atC.

	Identification	Gène	PM (Da)	pI	Caractéristiques
1	Précurseur de la XlnC	XYNC_STRL1	25 771	8,44	Précurseur endo-1,4-beta-xylanase C
2	Protéine hypothétique (SCO939114 NID)	CAB72196	9845	9,45	Facteur d'intégration (IHF) et HU, domaine de liaison à l'ADN
3	Protéine hypothétique (SCJ12.12C)	CAB53424	32 237	5,90	Famille des USP (<i>Universal stress protein</i>)
4	Protéine hypothétique (SCO1858)	CAC38793	33 405	5,65	Protéine semblable à Cbi-X, région riche en H
5	SCO939121 NID	CAB97430	34 679	5,00	Malate déshydrogénase possible
6	SCO939108 NID	CAB82827	42 949	5,06	Région riche en H
7	SCO939109 NID (score 415)	CAB76898	43 547	4,98	S-adenosylmethionine synthétase, site de liaison à l'ATP, site de liaison au Mg, site de liaison au K
7.1	Facteur d'élongation EF-Tu.1 (score 380)	S50138	43 811	5,01	Site de liaison au GTP
8	Déshydrogénase dihydrolipoamide probable	T35296	51 536	5,92	
9	Glucose-6-phosphate 1-déshydrogénase	T35160	65 631	5,32	
10	Protéine hypothétique (SC9A10.09)	T35845	61 254	6,06	Hydrolase métal-dépendante
11	Isocitrate déshydrogénase	CAB88977	79 585	5,04	
12	Idem				
13	polyribonucléotide nucleotidyltransférase (chaîne α)	T10932	79 481	5,04	Transférase
14	SCO939115 NID	CAB95920	101 349	5,48	Phosphoenolpyruvate carboxylase
15	Protéine se liant à l'ADN	CAB55732	121 729	6,18	Protéine sécrétée putative
16	Protéine de la biosynthèse de la cobalamine	CAB59465	131 336	4,77	CobN/Magnesium Chelatase
17	SCO939121 NID	CAB77428	128 585	6,44	rpoB
18	Protéine hypothétique (SCO2999)	CAD55461	183 751	5,25	NAD-glutamate déshydrogénase bactérienne
19	Peptidyl prolyl <i>cis-trans</i> isomérase Q93J09 STRCO	CAC42137	17 878	5,53	

3. 1. 2. 2 Souches IAF916C et IAF916Chis

Afin de diminuer la variété de protéines co-élues avec la XInC, des expériences avec des souches aux propriétés différentes ont été réalisées. En effet, l'utilisation de souches ayant une mutation dans le gène $\Delta tatC$ peut amener un surplus de protéines dans le cytoplasme puisque des protéines Tat normalement sécrétées s'y retrouvent concentrées. Certaines de ces protéines peuvent par ailleurs avoir des affinités pour la colonne (des régions riches en histidines par exemple) et donc être retenues sur celle-ci. De plus, un mutant $\Delta tatC$ est en situation de stress, ce qui peut augmenter ou induire la sécrétion de certaines protéines impliquées dans ce type de conditions. L'utilisation de souches n'ayant pas de mutation au niveau du système de sécrétion mais produisant la XInC normalement a donc été envisagée. La souche IAF916C produit la XInC et IAF916Chis sécrète la XInC à laquelle une queue d'histidines a été ajoutée. L'expérience a été réalisée telle que pour les souches précédentes (section 3. 1. 2. 1) mais un inhibiteur de protéase a été ajouté aux fractions ayant été appliquées sur la colonne. Cette précaution a été prise dans le but de réduire la variété de bandes sur le gel et donc de faciliter les analyses. En effet, la présence de protéolyse était soupçonnée suite à l'identification dans certains cas d'une même protéine pour plusieurs bandes distinctes, ce qui a eu pour effet d'augmenter la complexité des profils de protéines obtenus sur le gel et de rendre l'analyse plus fastidieuse. Le gel obtenu est illustré en figure 11a et permet malgré tout d'observer un profil semblable à ce qui a été obtenu pour les souches $\Delta tatC$, c'est-à-dire une variété de bandes assez importante.

Par ailleurs, une deuxième approche basée sur l'interaction entre la XInC et sa chaperonne potentielle a été abordée. En effet, nous cherchions un moyen d'éluer hors de la colonne uniquement les protéines interagissant avec la XInC et non celles étant retenues sur la colonne elle-même. Ceci pourrait permettre de réduire la présence de protéines non-spécifiques causées par la technique elle-même (certaines protéines ayant naturellement des affinités pour le nickel de la colonne). L'ajout d'urée, un agent dénaturant, au tampon d'élution en remplacement de l'imidazole a donc été réalisée. Lors du passage de l'urée, les protéines n'étant pas retenues sur la colonne mais étant

plutôt accrochées à une protéine retenue sur la colonne seront dénaturées et ainsi éluées. L'expérience a été réalisée avec les deux mêmes souches (IAF916C et IAF916Chis) que précédemment. L'élution a tout d'abord été effectuée avec 5 mL du tampon sans imidazole mais contenant 8M urée et une seconde élution avec le même tampon mais en absence d'urée et en présence de 200 mM d'imidazole a subséquemment été réalisée. Les fractions ont été dialysées, concentrées par lyophilisation ainsi que séparées sur gel de polyacrylamide par SDS-PAGE.

Le gel obtenu pour cette expérience (fig. 11b) permet d'observer un profil différent de ce qui avait été obtenu précédemment. Tout d'abord, la fraction obtenue pour la souche IAF916Chis lors de l'élution avec l'urée permet d'observer quatre bandes distinctes qui ont été découpées pour analyse en LC/MS. Les deux premières bandes (1 et 2 sur le gel de la figure 11b) correspondent à des protéines possédant des régions riches en histidines (voir tab. 4) tandis que les deux autres (3 et 4) correspondent à la même protéine. Celle-ci est une protéine hypothétique de 23 kDa (SCO5256) possédant un domaine de fonction inconnue (DUF1470) qui est conservé chez plusieurs micro-organismes tels que *Rhizobium sp.*, *Agrobacterium sp.* et *Bradyrhizobium sp* (PubMed). Il s'agit d'une protéine cytoplasmique. Son intérêt en tant que chaperonne sera discuté plus en détail dans la prochaine section.

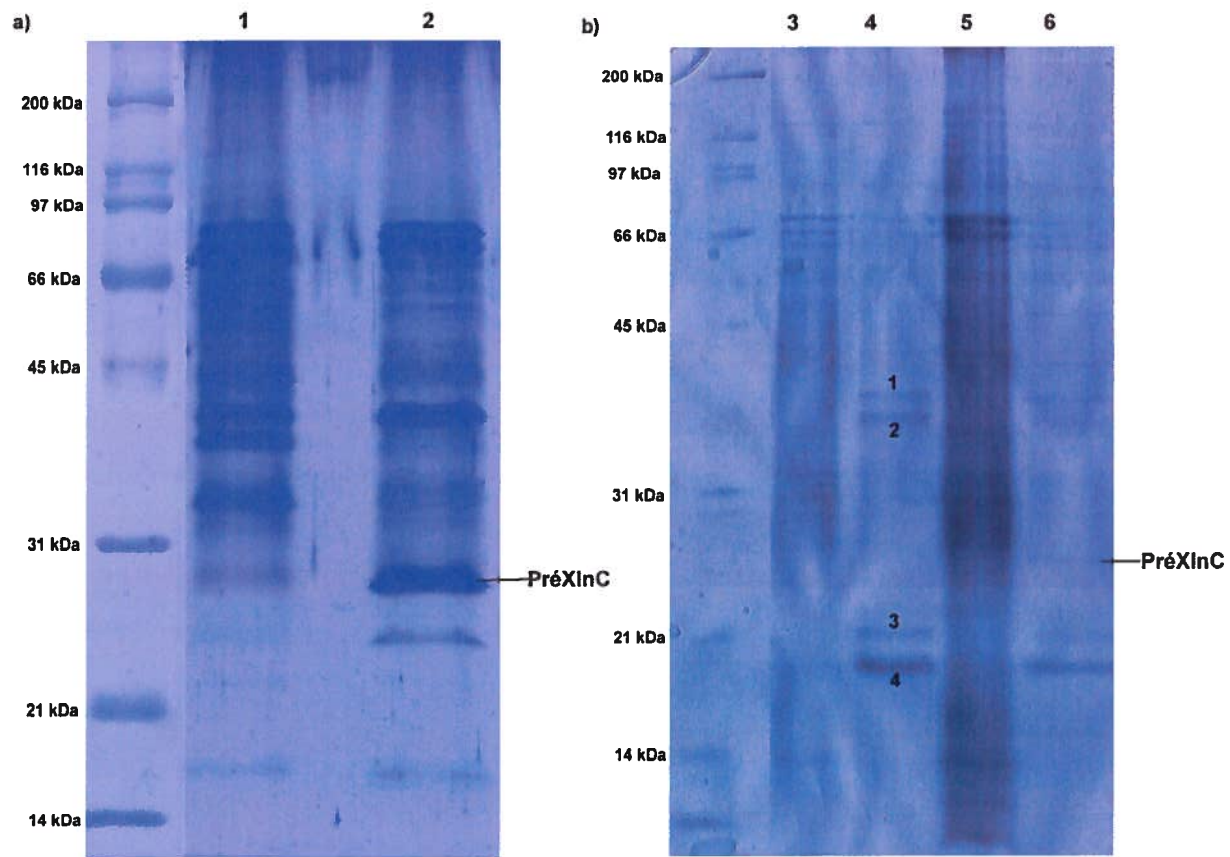


Figure 11. Profils obtenus à partir des expériences de colonnes HiTrap™ réalisées à l'aide des souches IAF916C et IAF916Chis.

SDS-PAGE est réalisé à partir des fractions éluées hors des colonnes HiTrap™ pour les souches IAF916C et IAF916Chis. 1a) Élué à 200 mM d'imidazole, IAF916C; 2a) Élué à 200 mM d'imidazole, IAF916Chis; 3b) Élué avec 8M urée, IAF916C; 4b) Élué avec 8M urée, IAF916Chis; 5b) Élué avec 200 mM d'imidazole suivant l'élué avec l'urée, IAF916C; 6b) Élué avec 200 mM d'imidazole suivant l'élué avec l'urée, IAF916Chis

Tableau 4. Détails des protéines analysées en LC/MS obtenues à partir de la souche IAF916Chis après élution avec 8M urée.

	Identification	Gène	PM (Da)	pI	Caractéristiques
1	Protéine hypothétique (SCO6580 ou SC3F9.15)	CAD55381	44 594	7, 94	Phosphate isomérases des sucres/épimérases, peptide signal Tat, région riche en H
2	Protéine hypothétique (SCO1858)	CAC38793	33 405	5, 68	Région CbiX, région riche en H
3	Protéine hypothétique (SCO5256)	CAC05963	22 925	6, 08	Domaine DUF1470, protéine de fonction inconnue
4	Idem				

a) Match: Q9F3K9_STRCO Score: 226
Identification: Protéine hypothétique SCO5256 - *Streptomyces coelicolor*
Masse moléculaire: 22925 Da ; pI: 6.08

Couverture de la séquence: 15%

Séquence:

```
1 MELAYSDYA VRLVNTEEPS RGQDSLTSVE AVRELFGANQ SAARRASDAD
51 VTRFRSVRGR LRAVFEAADG GDETLAVDLL NSLLEFPVS PQISGHDHRA
101 EDGSPLWHMH LADHPSNATA GFAAIAAMGL AFHLTEYGVD RLGICEAAPC
151 RNAYLDTSTN RSRRYCSDRC ATRANVAAYR ARKRLEADRS AGTGLTADSA
201 QRTTASGER
```

b) Match to: Q9F3K9_STRCO Score: 302
Identification: Protéine hypothétique SCO5256 - *Streptomyces coelicolor*

Masse moléculaire: 22925 Da; pI: 6.08

Couverture de la séquence: 21%

Séquence:

```
1 MELAYSDYA VRLVNTEEPS RGQDSLTSVE AVRELFGANQ SAARRASDAD
51 VTRFRSVRGR LRAVFEAADG GDETLAVDLL NSLLEFPVS PQISGHDHRA
101 EDGSPLWHMH LADHPSNATA GFAAIAAMGL AFHLTEYGVD RLGICEAAPC
151 RNAYLDTSTN RSRRYCSDRC ATRANVAAYR ARKRLEADRS AGTGLTADSA
201 QRTTASGER
```

Figure 12. Identification de la protéine correspondant aux bandes 3 et 4 représentées sur la figure 11b pour la souche IAF916Chis.

Identification des protéines extraites du gel de la figure 11b, obtenue par analyse au LC/MS. a) protéine 3, b) protéine 4. Les scores sont des indices de la probabilité que le résultat ne soit pas dû au hasard. Les peptides identifiés sont en rouge.

3. 1. 3 Chromatographie d'affinité par gel de sépharose activé au CNBr

La technique utilisant la colonne HiTrap™ permettait de retenir une grande variété de protéines. Par ailleurs, nous cherchions une technique plus spécifique, c'est-à-dire nous permettant d'isoler les protéines interagissant avec la XlnC sans la présence de contaminants causée par la colonne. Nous avons donc purifié le précurseur et l'avons immobilisé afin de pouvoir tester son affinité avec des protéines contenues dans la fraction cytoplasmique de *S. lividans*.

Le bromure de cyanogène (CNBr) est un réactif utilisé afin de coupler une cible à un gel de sépharose. Les groupements activés réagissent spontanément avec les groupements amines primaires du ligand (précurseur de la XlnC dans le cadre de ce travail) pour former des liens iso-urées. Un gel de sépharose activé au CNBr a été utilisé pour immobiliser le précurseur de la XlnC. Notre hypothèse était que les protéines contenues dans la fraction cytoplasmique de IAF10-164 pouvant interagir avec le précurseur resteraient accrochées à ce dernier, lui-même fixé au CNBr. Une élution par changement de la force ionique du tampon par ajout de NaCl en concentrations croissantes (gradient) a été effectuée afin de recueillir les protéines retenues.

Un gel de sépharose activé au CNBr a été utilisé pour immobiliser le précurseur de la XlnC et le précurseur de la XlnC avec un N-terminal tronqué. Ceux-ci ont été isolés à l'aide des colonnes HiTrap™ à partir des souches IAF916Chis Δ tatC et IAF917Chis Δ tatC. Le gel d'affinité a ensuite été placé dans une mini-colonne et la fraction cytoplasmique de la souche de *S. lividans* IAF10-164 y a été appliquée. Les protéines indésirables ont été éliminées par lavage. L'élution des protéines ayant été retenues dans la colonne a été effectuée par gradient de NaCl. Les concentrations en NaCl utilisées ont été de 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 350 mM, 500 mM et 1 M. Les éluats ont été recueillis par fraction de 1 mL (10 mL par concentration de sel) et les DO₂₈₀ de chaque fraction ont été mesurées. Les 2^e et 3^e mL de chaque élution présentaient les DO₂₈₀ maximales et ont été combinées. Les gels obtenus ont été colorés à l'argent et les protéines d'intérêt ont été découpées et digérées à la trypsine. Les peptides obtenus ont été extraits du gel et analysés par LC/MS.

Lorsqu'un précurseur protéique est sécrété, la signal peptidase s'occupe de cliver le peptide signal et la portion mature de la protéine est relâchée. Chez le système Sec, la protéine se replie suivant sa translocation à travers la membrane. Dans le cas du système Tat, puisque la protéine est repliée dans le cytoplasme sous forme de précurseur, le peptide signal pourrait être impliqué dans l'interaction avec les protéines responsables du repliement. La xylanase C mature avait été préalablement immobilisée sur un gel de sépharose activé au CNBr et ce dernier a donc été utilisé comme témoin afin de vérifier si la présence d'un peptide signal pouvait influencer le type de protéines pouvant interagir avec la XlnC.

Lorsque le précurseur de la XlnC est utilisé comme ligand, une bande située autour de 80 kDa semble ressortir, et ce dès le début de l'élution. L'intensité de la bande diminue toutefois pour finalement augmenter lorsque l'élution est effectuée à une concentration en NaCl de 1 M (voir fig. 13a). La protéine a été identifiée comme étant une protéinase probablement sécrétée. Lorsque le précurseur de la XlnC avec un N-terminal tronqué est immobilisé sur le gel, une grande variété de protéines est visible sur le gel mais la même protéine demeure toutefois présente. Cette même bande revient sur tous les gels sauf dans le cas où la XlnC mature a été utilisée comme ligand (fig. 13c) où aucune bande n'est visible sauf pour les plus faibles concentrations en NaCl.

Par ailleurs, la XlnC mature possède une structure finale repliée, ce qui pourrait empêcher son interaction avec des chaperonnes. Les chaperonnes impliquées dans le repliement préalable à la translocation au niveau du système Tat interagiraient préférentiellement avec une forme linéaire ou partiellement repliée de la protéine. Un second témoin pour lequel la XlnC a été dénaturée par le passage d'un tampon contenant 8M urée et 10 mM DTT avant le passage de la fraction cytoplasmique de IAF10-164 a donc été testé. Un inhibiteur de protéase a été ajouté à la fraction avant son passage dans la colonne afin de limiter la protéolyse et de réduire au minimum la quantité de bandes sur le gel.

Lorsque la XlnC mature est dénaturée avant le passage de la fraction cytoplasmique de IAF10-164 sur la colonne, une protéine située au environ de 80 kDa est éluée à 1 M NaCl

(fig. 13d). Celle-ci correspond également à la protéinase déjà identifiée et observable sur le gel. Les détails de l'identification se retrouvent à la fig. 14. La possibilité que cette protéine possède des fonctions de chaperonnes sera discutée plus en détail dans la section suivante.

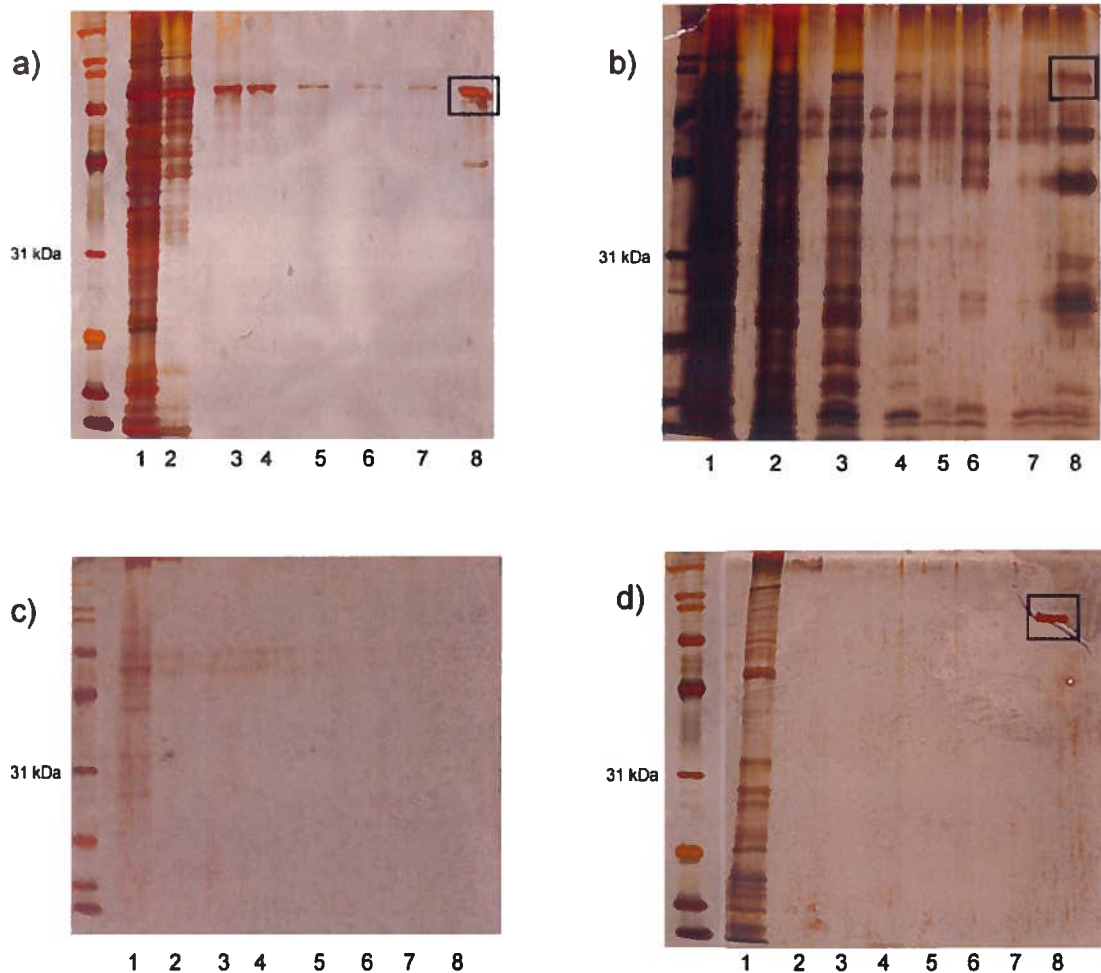


Figure 13. SDS-PAGE des protéines de la fraction cytoplasmique de 10-164 ayant été isolées par chromatographie d'affinité avec un gel de sépharose activé au CNBr sur lequel la XlnC (précurseur ou mature) a été immobilisée.

L'éluion a été effectuée par changement de la force ionique du tampon par l'ajout de NaCl en concentrations croissantes (gradient). Puits 1 : 50 mM NaCl, 2 : 100 mM, 3 : 150 mM, 4 : 200 mM, 5 : 250 mM, 6 : 350 mM, 7 : 500 mM, 8 : 1 M. Le précurseur de la XlnC (pré-XlnC), le précurseur de la XlnC avec le N-terminal tronqué ou la XlnC mature ont été immobilisés sur les différents gels de sépharose a) Pré-XlnC; b) Pré-XlnC avec le N-terminal tronqué; c) XlnC mature; d) XlnC mature dénaturée. L'identification de la protéine encadrée se trouve à la figure 14.

Match: T36143 Score: 472

Identification: **probable secreted proteinase - *Streptomyces coelicolor***

Masse moléculaire: **85820 kDa**; pI: **4.95**

Couverture de la séquence: **12%**

Séquence:

```
1  MTRRSWTFRT  AATTVAFAAA  AATFSAAGVA  QADSPSRPEA  VDRHDPSPDK
51  TTRSHDLKGP  LSDTQAAQRE  EALKQVISGN  ASVKKKDGSN  VVQLKSKKGD
101 AKYVELGREK  TDKIFTILVE  FGDKVDSRYG  GDAGPLHNEI  AKPNRRTDNS
151 TAWQEDYDQE  HFQDLYFGSG  KGVNSVKTYI  EKQSSGRYSV  DGEVSDWVKV
201 PYNEARYGSN  KCDPDNCAWY  AVQDGVTAWI  ADQKAAGRTD  AQIKSQLTOY
251 DQWDYDFDQ  DGDFNEPDGY  IDHFQIVHAG  EDESAGGGAQ  GEDAIWAHRW
301 YAFGTDAGAT GPADNKLGST  QIGDTGIWVG  DYTIQPENG  LGVYAHEYGH
351 DLGLPDHYDT  AGGDNSTGFW  TLMSSGSWLG  TGRNEIGDLP  GDMNAWDKLQ
401 LGWLNVDYAK  AGVNSWHKLG  LAEYNTKHKQ  GLVVELPKEK  VTTEIVTPAE
451 GETQWWSGSG  NDLKNTLSRS  VDLTGKSAAS  LTLDGWYDIE  ADYDFLYTEV
501 STDGGANWTA  IDGTFDGNPI  QRDGSDKPAL  SATVDAYGKL  VYPLDAYAGK
551 KIDLRFYQY  DGGLAMKGFT  ADEIAVTADG  ETLFSDNAET  ADDAWTAVGF
601 TRKGASFTKE  YAQYYIAENR  QYVSYDKTLK  TGPYNFGFSE  RPNWVEHYAY
651 QNGLLIWKWD  TSQADNNTSQ  HPGKGLVLP  DSHPTALKWK  DGTVMRNMMQ
701 AYDSPFSLYR  TDGMTLHKAD  VAKYVPGSKG  VSVFNDRKND  YYDPANPTGG
751 VKITDTNTKI  KILKEAKNGS  TIELEVGPAG  R
```

Figure 14. Identification de la protéine isolée lors des expériences d'affinité à l'aide du gel de sépharose activé au CNBr utilisant la XlnC comme ligand.

Identification de la protéine extraite des gels de la figure 9, obtenue par analyse au LC/MS. Les scores sont des indices de la probabilité que le résultat ne soit pas dû au hasard. Les peptides identifiés sont en **rouge**.

3. 2 Étude des effets de l'hyperproduction de PPIases sur la sécrétion de la XlnC

Toujours dans le but d'identifier des protéines chaperonnes potentiellement impliquées dans le repliement des protéines sécrétées par le système Tat, différentes expériences à l'aide de souches surproduisant des protéines impliquées dans le repliement protéique ont été effectuées. Des recherches dans la littérature ont permis de trouver des souches surproductrices de peptidyl-prolyl isomérases (PPIases). Ces souches appelées ScCypA et ScCypB (rebaptisées respectivement Berlin A et B dans ce travail) proviennent du laboratoire du Pr Keller de l'Institut de biochimie et de biologie moléculaire de Berlin. Il s'agit de souches de *Streptomyces lividans* transformées à partir des plasmides pAGCypA et pAGCypB. Ces derniers sont dérivés du plasmide pIJ702 et codent pour des peptidyl-prolyl isomérases (PPIases), respectivement CypA et CypB ainsi que pour la résistance au thiostrepton (Pahl, Gewies et Keller, 1997). Les peptidyl-prolyl isomérases (PPIases) catalysent l'isomérisation *cis-trans* du lien entre un acide aminé donné et une proline.

3. 2. 1 Sécrétion de la XlnC et de la XlnA par les transformants hyperproducteurs des PPIases CypA et CypB et par le clone IAFMCypB.C

CypA et CypB ayant des fonctions de catalyseurs lors du repliement, notre hypothèse était que leur surproduction induirait une augmentation de la sécrétion des protéines. Les xylanases ont été utilisées comme protéines modèles puisqu'il est simple de les doser dans le surnageant de culture. Des tests de dosage de l'activité xylanasiqne ont donc été effectués à partir des surnageants de culture des transformants IAFA.906H, IAFB.906H, IAFA.916CH et IAFB.916CH. Les transformants IAFA.906H et IAFB.906H ont été obtenus par transformation des souches de *S. lividans* Berlin A et Berlin B à l'aide du plasmide pIAF906H. Ce dernier code pour la XlnA, une protéine Sec-dépendante, et pour la résistance à l'hygromycine. Le gène codant pour cette résistance (*hyg*) remplace celui codant pour la résistance au thiostrepton (*tsr*) sur ce plasmide et permet une double-sélection des transformants, la souche initiale étant déjà résistante au thiostrepton.

Les transformants IAFA.916CH et IAFB.916CH ont été obtenus à partir des mêmes souches, mais cette fois-ci transformées avec le plasmide pIAF916CH qui code pour la XlnC et la résistance à l'hygromycine. La XlnA étant sécrétée par le système Sec et la XlnC par le système Tat, ces souches permettaient de tester l'influence de la surproduction de CypA et CypB sur les deux systèmes de sécrétion. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu R5 + hygromycine. Des spores ont été générées à partir des colonies obtenues lors de la transformation.

Les activités xylanasiques des différentes souches sont représentés chez les figures 14 et 15. On remarque que l'activité xylanasique est particulièrement faible comparativement à ce qui est observé chez une souche produisant la xylanase C normalement. En effet, les activités xylanasiques à 120 h de IAFA.906H, IAFB.906H, IAFA.916CH et IAFB.916CH sont de 2,63, 0,23, ainsi que 2,17 et 1,71 UI/mL respectivement, tandis qu'elles se situent autour de 67 UI/mL pour la souche IAF906H et de 32 UI/mL pour la souche IAF916CH (Arias Crausaz, 2005).

La présence de deux plasmides chez une même souche présente un problème pour la croissance de la bactérie. La construction de clones à partir des plasmides originaux de Berlin A et B afin de confirmer les résultats obtenus avec les transformants a donc été envisagée. Le gène de la XlnC a donc été directement cloné de façon adjacente au gène codant pour l'une des PPIases, ce qui a permis d'éliminer la double sélection puisque les clones obtenus ne possèdent qu'un seul plasmide codant pour la résistance au thiostrepton.

Le clone IAFMCypB.C a été construit à partir de la souche originale Berlin B. Faute de temps, les clones producteurs de XlnA ainsi que les surproducteurs de CypA n'ont pas été terminés et donc ne sont pas pris en compte pour ces résultats.

Les résultats obtenus avec le clone IAFMCypB.C, où l'activité demeure inférieure à 5,0 UI/mL, concordent avec ce qui a été observé pour les co-transformants. Les souches Berlin A et Berlin B ne présentent aucune activité xylanasique significative, la culture ayant été réalisée en absence de substrat (xylane).

Afin de vérifier si les résultats obtenus lors des dosages de xylanase concordent avec une absence de la protéine mature dans le surnageant de culture, une expérience d'immunobuvardage a été réalisée à l'aide des transformants IAFA.916CH, IAFB.916CH, IAFA.906H, IAFB.906H et du clone IAFMCypB.C. Les souches IAF916C et IAF906 (souche 10-164 transformée respectivement avec les plasmides pIAF916C et pIAF906) ont été utilisées comme témoins positifs tandis que les souches Berlin A et Berlin B servent de témoins négatifs. Les anticorps primaires utilisés sont des anti-XlnA et des anti-XlnC de lapin purifiés. Les résultats de cette expérience se retrouvent à la figure 16.

La XlnC est bel et bien détectée dans les surnageants de cultures des transformants IAFA.916CH et IAFB.916CH de même que chez le clone IAFMCypB.C tandis que la XlnA se retrouve dans les surnageants des transformants IAFA.906H et IAFB.906H.

Tableau 5: Détails des différentes souches utilisées pour l'étude des effets de l'hyperproduction de PPIases sur la sécrétion

	Gène de Xln	PPIase hyperproduite	Gène de résistance
IAF916C	<i>xlnC</i>	Aucune	<i>tsr</i>
IAF906	<i>xlnA</i>	Aucune	<i>tsr</i>
IAFMCypB.C	<i>xlnC</i>	CypB	<i>tsr</i>
IAFA.916CH	<i>xlnC</i>	CypA	<i>tsr, hyg</i>
IAFB.916CH	<i>xlnC</i>	CypB	<i>hyg</i>
IAFA.906H	<i>xlnA</i>	CypA	<i>hyg</i>
IAFB.906H	<i>xlnA</i>	CypB	<i>hyg</i>

tsr : gène de résistance au thiostrepton; *hyg* : gène de résistance à l'hygromycine

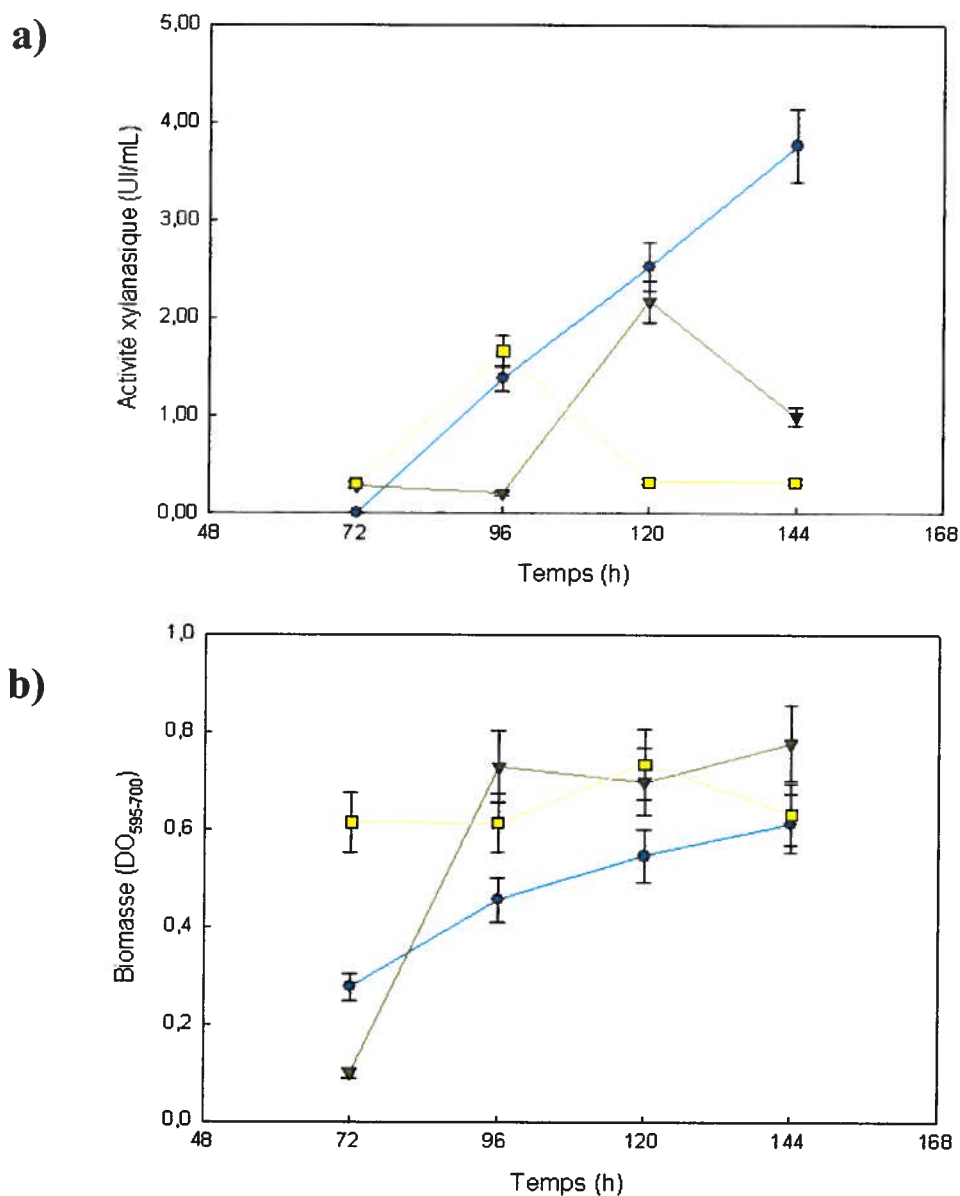


Figure 15. Activité xylanasique (UI/mL) et croissance du mycélium des transformants IAFA.906H, IAFA.916CH ainsi que de la souche Berlin A.

Transformants IAFA.906H (—●—) (Sec-dépendants), IAFA.916CH (—▼—) (Tat-dépendants) et la souche Berlin A (—■—). a) Activité xylanasique exprimée en UI/mL b) Croissance du mycélium mesurée par dosage de l'ADN total.

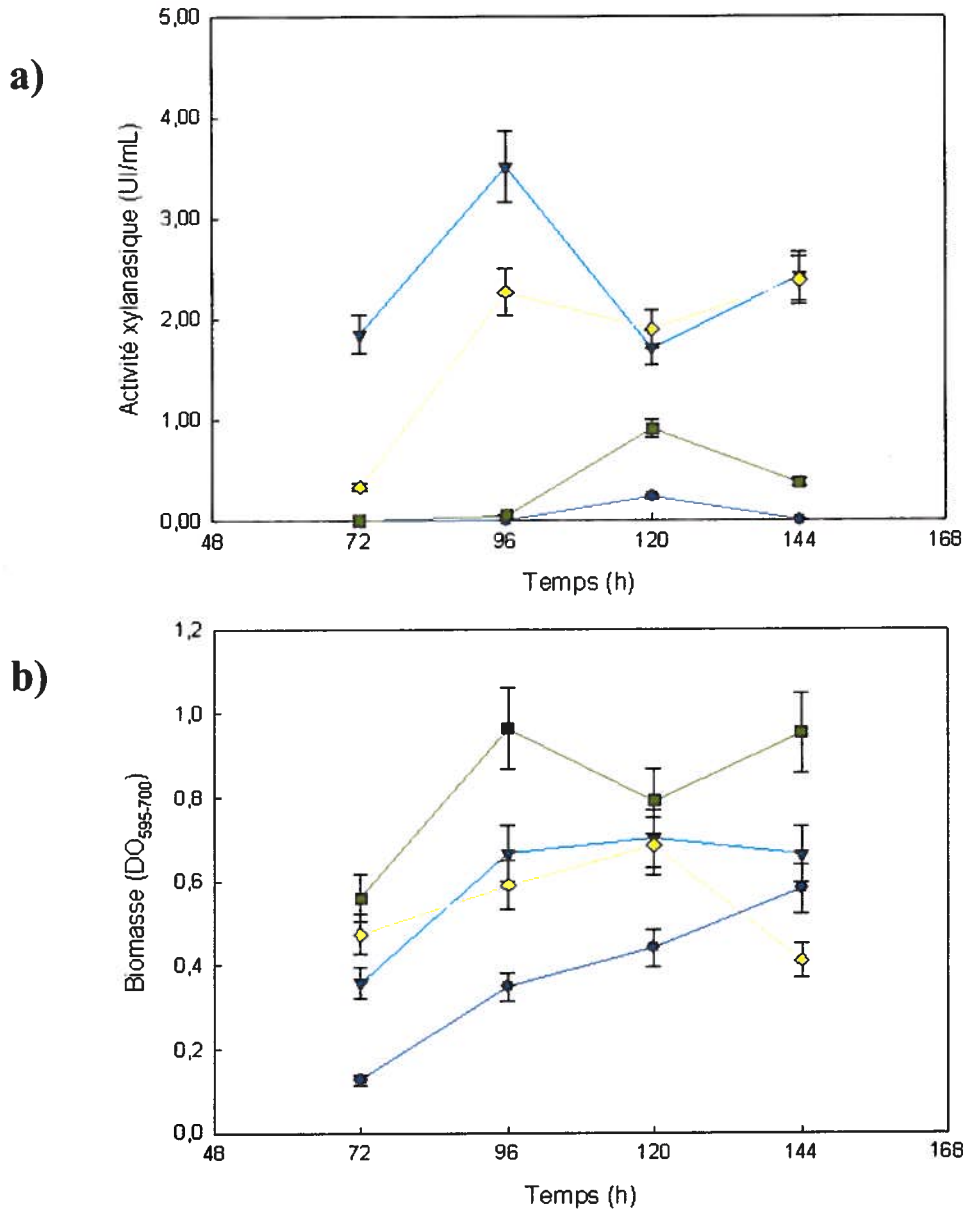


Figure 16. Activité xylanasiq (UI/mL) et croissance du mycélium des transformants IAFB.906H, IAFB.916CH ainsi que de la souche Berlin B.

Transformants IAFB.906H (—●—) (Sec-dépendant) et IAFB.916CH (—▼—) (Tat-dépendant) ainsi que Berlin B (—■—) et le clone IAFMCypB.C (—◆—) (Tat-dépendant). a) Activité xylanasiq exprimée en UI/mL b) Croissance du mycélium mesurée par dosage de l'ADN total.



Figure 17. Immunobuvardage de type Western des surnageants de culture des transformants IAFA.916CH, IAFB.916CH, IAFA.916H, IAFA.906H, des souches IAF916C et IAF906, Berlin A et Berlin B ainsi que du clone IAFMCypB.C.

Les anticorps utilisés sont des anti-XlnC (57 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et des anti-XlnA (484 $\mu\text{g}/\text{mL}$) purifiés. c1, contrôle de xylanase C mature; c2, témoin de xylanase A mature; 1, IAF906; 2, IAF916C; 3, Berlin A; 4, Berlin B; 5, IAFA.906H; 6, IAF.B906H; 7, IAFA.916CH; 8, IAFB.916CH; 9, IAFMCypB.C

3. 2 .2 Maturation des précurseurs de la XlnC et de la XlnA chez les transformants hyperproducteurs des PPIases CypA et CypB

Puisque les deux xylanases sont présentes dans les surnageants de culture mais qu'une très faible activité xylanasique est détectée chez ces derniers, la maturation des précurseurs des XlnA et C a été vérifiée par une expérience de *pulse-chase*. Les spores obtenues pour les différentes souches ont été lavées au M14 et ont ensuite été cultivées en milieu minimal M14 supplémenté avec du xylose 1% et additionné d'hygromycine à 34 °C, à 240 rpm pendant 48 h. Le mycélium a ensuite été recueilli et soumis à une expérience de *pulse-chase*. Il a tout d'abord été marqué à la méthionine (³⁵S) (étape de *pulse*) et puis additionné de méthionine non marquée (étape de *chase*). Pour les transformants utilisés pour l'étude du système Sec (IAFA.906H et IAFB.906H), les prélèvements ont été effectués au temps 0' ainsi que 30 secondes, deux minutes, cinq minutes suivant l'ajout de la méthionine non marquée. Ces temps ont été sélectionnés puisque la maturation des substrats Sec se produit rapidement (dans les 5 min). Pour les transformants utilisés pour l'étude du système Tat (IAFA.916CH et IAFB.916CH) les prélèvements ont été effectués au temps 0' ainsi que deux minutes, 10 minutes, 20 minutes et une heure suivant l'étape de *chase*, la maturation des précurseur Tat étant plus lente (la demi-vie d'un précurseur se situe autour de 11 min). Les cellules prélevées ont été cassées et une immunoprécipitation a été effectuée à l'aide d'anti-XlnA et d'anti-XlnC, selon le cas. Les résultats de ces étapes de *pulse-chase* sont présentés à la figure 17.

Le plasmide pIAF906H code pour la XlnA, une protéine Sec-dépendante. L'extrémité C-terminale de la XlnA (41 kDa) est dégradée dans le surnageant de culture pour générer la XlnA2 (31 kDa). La totalité du précurseur synthétisé est pris en charge par le système Sec et mûri dans les cinq minutes suivant le début de l'étape de *chase*, ce qui est également observé chez la souche de référence (IAF906) (Page *et al.*, 1996).

Dans le cas du système Tat, un précurseur à 25 KDa et une protéine mature à 20 KDa sont obtenus. La demi-vie du précurseur semble correspondre à ce qui est attendu pour la XlnC (environ 11 min) (Faury *et al.*, 2004).

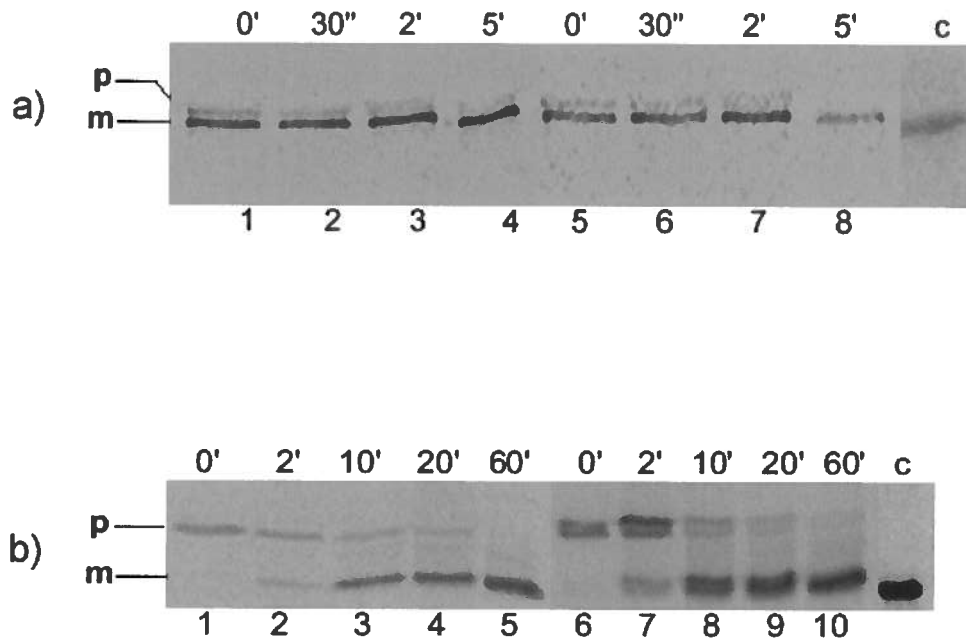


Figure 18. Maturation des précurseurs de la XlnC et de la XlnA chez les transformants de *S. lividans* IAFA.916CH, IAFB.916CH, IAFA.906H et IAFB.906H.

a) Les souches IAFA.906H (puits 1 à 4) et IAFB.906H (puits 5 à 8) qui résultent des transformations des souches Berlin A et Berlin B surproduisant les PPIases CypA et CypB respectivement avec le plasmide pIAF906H qui code pour la XlnA (Sec-dépendante); c, contrôle XlnA mature. b) Les souches IAFA.916CH (puits 1 à 5) et IAFB.916CH (puits 6 à 10) qui résultent des transformations des souches Berlin A et Berlin B surproduisant les PPIases CypA et CypB respectivement avec le plasmide pIAF916CH qui code pour la XlnC (Tat-dépendante) c, témoin XlnC mature. p, précurseur; m, protéine mature

4. Discussion

4. 1 Protéines pouvant interagir avec le précurseur de la xylanase C

L'objectif principal du projet était d'isoler des protéines chaperonnes qui participent au repliement des protéines sécrétées par le système Tat. Les différentes techniques utilisées ont permis d'isoler une grande variété de protéines aux fonctions diverses. Il était donc nécessaire d'analyser plus en profondeur les résultats afin de retenir les protéines pouvant potentiellement posséder des fonctions de chaperonnes.

Les protéines ayant été isolées par immunoprécipitation n'ont pas été analysées. En effet, les gels étaient difficiles à analyser et la technique nécessitait l'ajustement d'un grand nombre de paramètres avant d'obtenir les conditions optimales pour l'expérience. En effet, la technique d'immunoprécipitation demandait à être optimisée de même que les conditions de l'électrophorèse bidimensionnelle (échelle de pH utilisée, pourcentages des gels de polyacrylamide, temps de migration, etc.) Les anticorps utilisés étaient des anticorps polyclonaux, la spécificité est donc moins élevée que ce qui pourrait être anticipé. L'utilisation d'un lysat ne contenant pas la XlnC afin d'éliminer le plus de protéines non spécifiques aurait pu être envisagé. Le temps imparti pour la maîtrise étant limité, nous avons concentré nos efforts sur d'autres techniques ayant une meilleure reproductibilité et nous permettant d'obtenir des résultats plus facilement analysables.

La colonne d'affinité HiTrap™ a permis d'isoler une quinzaine de protéines. Plusieurs protéines étaient d'un intérêt moindre pour la présente étude et n'ont donc pas été retenues. Par exemple, plusieurs protéines retrouvées sur le gel possèdent naturellement des régions riches en histidines qui se lient à la colonne. C'est le cas entre autre de la protéine hypothétique semblable à CbiX (SCO1858). Celle-ci possède en effet une région C-terminale enrichie en résidus histidines ce qui provoque sa forte rétention sur la colonne. Cette protéine est éluée aux mêmes concentrations d'imidazole que le précurseur de la XlnC et se retrouve donc inévitablement sur le gel. Les protéines

hypothétiques SC3F9.15 et SC5C7.34 possèdent également des régions riches en histidines mais en N-terminal (réf. tableau 2).

La fonction probable des autres protéines a par la suite été recherchée pour déterminer lesquelles pourraient potentiellement agir comme chaperonnes selon ce qui est déjà connu dans la littérature. Dans le cas de la deuxième expérience pour laquelle les profils obtenus pour les souches IAF916Chis Δ tatC et IAF917Chis Δ tatC ont été comparées à 10-164 Δ tatC (témoin), les protéines prises en considération devaient être absentes du témoin. Une souche produisant une autre protéine, comme la XlnA, aurait également pu être utilisée comme témoin.

La première expérience nous permis d'isoler une peptidase (SCO2582). Cette protéine a été retenue puisque les chaperonnes peuvent posséder en plus une activité protéolytique. La protéine ClpA est par exemple une chaperonne moléculaire qui fait également partie du complexe protéolytique ClpAP (Pak *et al.*, 1999). La protéine de choc thermique DegP alterne également entre un rôle de chaperonne à basse température et de protéase à température élevée (Spiess, Beil et Ehrmann, 1999). La protéine SCO2582 possède un domaine HtpX associé aux protéases Zn-dépendantes de la famille M48. Chez *E.coli*, HtpX est impliquée dans la dégradation de protéines membranaires en association avec FtsH, une protéase membranaire essentielle ATP-dépendante possédant une activité envers σ 32 et un domaine de liaison au Zn. En présence de zinc, elle peut cliver la forme solubilisée de la protéine membranaire SecY (Sakoh, Ito et Akiyama, 2005).

Une seconde protéine attira notre attention. La protéine hypothétique SCJ12.12C est une protéine de la famille des USP ou *universal stress protein*. Ce type de protéines est largement retrouvé chez les micro-organismes et possède habituellement un domaine de liaison à l'ADN. Une douzaine de USP serait codée chez *S. coelicolor* tandis que chez *E. coli* on en retrouve six. Parmi ces protéines, UspG formerait des complexes avec la chaperonne GroEL (O'Toole et Williams, 2003). Cette protéine est de plus isolée une deuxième fois lorsque les conditions de l'expérience ont été raffinées (voir tab. 3).

Une peptidyl-prolyl isomérase (PPIase) a également été retenue sur la colonne (voir tab. 3). Les PPIases accélèrent le repliement protéique en catalysant l'isomérisation *cis-trans* du lien entre une proline et un autre résidu. Par contre, la bande obtenue pour cette protéine est de faible intensité, ce qui pourrait diminuer son intérêt.

Chez les souches $\Delta tatC$, la sécrétion par le système Tat est inhibée. Bien que non létale, cette mutation provoque tout de même une situation de stress pour la cellule. Les précurseurs Tat se retrouvent entre autre séquestrés à l'intérieur du cytoplasme. L'utilisation d'une telle souche amène la présence de plusieurs protéines sécrétées qui normalement ne seraient pas recueillies à partir de la fraction cytoplasmique. Dans ces conditions, il est également possible que certaines protéines s'accrochent au précurseur précisément parce que ce dernier n'est pas pris en charge par le système de sécrétion. Ceci pourrait expliquer la présence de la peptidase ou de la protéine de stress mais ne diminue toutefois pas leur intérêt dans le cadre de cette étude. Ces facteurs pourraient être requis pour éliminer les précurseurs indûment accumulés dans le cytoplasme. Néanmoins, des profils semblables d'élution à la souche $\Delta tatC$ ont été obtenus avec les souches ne portant pas la mutation $\Delta tatC$ (fig. 11).

Une autre approche a été envisagée pour éluer les protéines de la colonne. En effet, en utilisant de l'urée, un agent dénaturant, il était possible d'éluer les protéines interagissant avec le précurseur de la xylanase C sans décrocher les protéines qui avaient une affinité pour la colonne HiTrap™ et qui sont éluées par une augmentation de la concentration d'imidazole. L'élution avec l'urée a permis d'obtenir quatre bandes distinctes sur le gel. Les deux premières bandes représentent des protéines qui contiennent des segments riches en histidines et que l'on retrouve dans les extraits contenant le précurseur de la xylanase C muni ou non d'une queue d'histidine. Par conséquent elles ne présentent pas d'intérêt. Par contre, les deux autres bandes ressortent comme étant une seule et même protéine (SCO5256). La présence de deux bandes suggère une dégradation protéolytique de la protéine initiale. Cette protéine ne possède pas de fonction connue mais possède le domaine conservé DUF1470 qui est également retrouvé chez les genres *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Agrobacterium* et *Bradyrhizobium*. DUF1470 étant un domaine de fonction inconnu, nous avons très peu d'indices permettant d'associer une fonction à cette

protéine. Toutefois, une étude des gènes adjacents à SCO5256 nous permet de détecter la présence du gène SCO5255 qui code pour une signal peptidase de type I. Celle-ci possède un domaine semblable à celui de la protéine LepB trouvée chez *E. coli* et ne correspond pas aux peptidases signal déjà identifiées. La protéine retrouvée pourrait être impliquée dans la reconnaissance du peptide signal par la signal peptidase. On soupçonne d'ailleurs la présence d'une peptidase signal spécifique au système Tat parmi les quatre signal peptidases déjà identifiées chez *S. lividans* (sipW, sipX, sipY et sipZ), ce qui n'exclue par le fait qu'une autre signal peptidase pourrait être impliquée. (Li, Faury et Morosoli, 2006). On remarque que les bandes correspondant à la protéine SCO5256 sont plus intenses sur le gel que celle obtenue pour le précurseur de la XInC, ce qui pourrait laisser croire que la présence de cette protéine n'est pas nécessairement reliée à celle du précurseur.

Des expériences supplémentaires avec les colonnes HiTrap pourraient être effectuées afin d'obtenir des résultats plus concluants. Par exemple, l'utilisation d'une molécule comme le dithio-bis-succinimidylpropionate (DSP) pourrait augmenter nos chances d'accrocher la chaperonne. Le DSP est une molécule utilisée dans les expériences d'associations protéiques (*cross-linking*). Elle traverse la membrane de la bactérie et possède des extrémités NHS-esters qui réagissent avec des groupements amines primaires. L'ajout de DSP aux cellules avant le passage de la fraction cytoplasmique sur la colonne pourrait favoriser l'interaction entre la XInC et la chaperonne potentielle. Le choix de la molécule d'association ainsi que les conditions de l'expérience peuvent varier selon les caractéristiques des deux protéines. Puisque l'une des protéines à l'étude demeure inconnue, la DSP s'avère être une candidate intéressante puisqu'une grande quantité de protéine possèdent plusieurs groupements amines primaires retrouvés au niveau des résidus lysine. En favorisant l'interaction entre la chaperonne et la XInC, on pourrait augmenter les chances que celles-ci éluent conjointement hors de la colonne.

Les expériences effectuées sur gel de sépharose sur lequel est lié le précurseur de la xylanase C auraient pu nous permettre de confirmer les résultats obtenus précédemment. Pourtant, la protéine recueillie par cette méthode ne faisait pas partie des protéines déjà identifiées provenant de l'élution des colonnes HiTrap. Une protéase probable de 86 kDa

a été identifiée. Celle-ci posséderait toutefois une séquence signale Sec en N-terminale, ce qui en fait une protéine possiblement sécrétée. Bien que les chaperonnes soient majoritairement des protéines cytoplasmiques, on pourrait émettre l'hypothèse que la chaperonne soit en mesure d'accompagner le précurseur tout au long de sa translocation, ou bien d'être sécrétée de façon indépendante mais en reprenant en charge la xylanase C une fois sécrétée. Il n'est donc pas impossible que la même protéine soit responsable du contrôle des repliements pré et post-sécrétion. La protéase identifiée se retrouve sur le gel aussi bien lorsque le ligand est sous forme de précurseur, donc avec peptide signal que lorsque celui-ci est sous forme de protéine mature dénaturée. Le peptide signal ne serait donc pas impliqué dans l'interaction avec la XlnC. Chez les protéines avec co-facteur, il a déjà été démontré que la chaperonne interagit avec le peptide signal lors de l'insertion du co-facteur afin d'empêcher ce dernier d'interagir avec la machinerie de sécrétion (Berks, Palmer et Sargent, 2005; Hatzixanthis *et al.*, 2005). Par ailleurs, chez *B. subtilis*, l'interaction entre préYvaY et la chaperonne CsaA n'est pas dépendante du peptide signal (Linde *et al.*, 2003).

Un témoin utilisant un gel de sépharose sans aucun ligand devrait être réalisé afin de confirmer que la rétention de la peptidase soit vraiment liée à la présence de la XlnC sur le gel. D'autres expériences du même genre seront également réalisées avec d'autres ligands comme la XlnA, par exemple. De plus, il serait utile de reprendre les expériences en normalisant plus attentivement les quantités de protéines injectées sur la colonne. En effet, bien que la quantité de protéines présentes dans les fractions cytoplasmiques ait été vérifiée, celle-ci n'a pas été contrôlée.

Il est important de confirmer l'interaction entre ces protéines et notre protéine Tat modèle : la XlnC. Un système double hybride à l'aide de la YFP (*yellow fluorescent protein*) est donc en élaboration. Afin de confirmer une interaction déjà soupçonnée entre la XlnC et une protéine ayant été isolée à partir des expériences précédentes, ces dernières sont fusionnées chacune à une portion de la YFP. Ainsi, le gène de la XlnC est fusionné avec la partie 5' codant pour les 150 premiers acides aminés de la YFP tandis que le gène codant pour la protéine d'intérêt est fusionné avec la partie 3' du gène qui code pour la partie C-terminale de la YFP. Ces constructions sont ensuite co-exprimées

chez *S. lividans*. Une interaction entre les deux protéines permettra d'observer de la fluorescence au microscope confocal. La première protéine testée est la protéine de stress SCJ12.C. Aucun résultat n'est toutefois disponible.

4. 2 Diminution de l'activité des xylanases A et C chez des souches hyperproductrices de CypA et CypB

Les peptidyl-prolyl isomérases CypA et CypB catalysent l'isomérisation cis-trans des liens entre une proline et un autre résidu. La maturation d'un précurseur Tat est plus lente que celle d'un précurseur Sec, ce qui est fort probablement causé par le repliement cytoplasmique pré-sécrétion de celui-ci (Page *et al.*, 1996; Faury *et al.*, 2004). Puisque CypA et CypB catalysent l'une des étapes du repliement, notre hypothèse de départ était que la surproduction de ces protéines allait avoir un impact sur le repliement des précurseurs Tat et donc sur la sécrétion par le système en question.

Les résultats des tests de dosage des xylanases A (Sec-dépendante) et C (Tat-dépendante) démontrent une diminution de l'activité xylanasique dans les surnageants de culture des souches hyperproductrices de CypA et CypB, comparativement à ce qui est obtenu avec des souches sauvages. La vitesse de maturation des précurseurs Sec et Tat n'est par ailleurs pas affectée. Les expériences d'immunobuvardage confirment la présence des deux xylanases (A et C) dans les surnageants de culture. Il est impossible de comparer la production d'enzymes à partir des expériences d'immunobuvardages puisqu'aucune normalisation de la quantité de protéines utilisées n'a été effectuée.

Toutefois, en observant les résultats des dosages enzymatiques, on peut se demander pour quelle raison l'activité est-elle si basse ? On pourrait émettre l'hypothèse que le repliement final des deux enzymes n'est pas adéquat dans le surnageant de culture et que la fonction de ces dernières est donc inhibée. Par contre, si tel est le cas, le repliement cytoplasmique permet tout de même la translocation des deux protéines chez chacun des deux systèmes. CypA et CypB étant cytoplasmiques, un repliement n'aurait pas permis la sécrétion au niveau du système Sec, celui-ci requérant la linéarité du précurseur. De plus,

la quantité des deux xylanases sécrétées (A et C) devrait être équivalente à ce qui est observé chez la souche sauvage pour conclure que la faible activité détectée soit dû à une malformation de la protéine, ce qui ne peut être démontré. Pour les co-transformants, la présence de deux plasmides portant deux sélections différentes auraient pu amener des problèmes de ségrégation plasmidique et expliquer les résultats. Par contre, le premier clone construit (IAFMCypB.C) semble confirmer ce qui a été obtenu pour les co-transformants. Les souches déficientes pour les gènes *cypA* et *cypB* n'étant malheureusement pas disponibles, il aurait été intéressant d'observer les effets de l'absence de ces deux protéines sur la sécrétion par les deux systèmes (Sec et Tat). Il est toutefois connu que ces mutants sont peu viables. La surproduction ou au contraire l'abolition de la production de CypA et CypB semble donc amener des déficiences au niveau de la cellule plutôt qu'au niveau de la sécrétion protéique. On pourrait donc conclure que les peptidyl-prolyl isomérases CypA et CypB ne sont pas des chaperonnes impliquées directement dans les deux systèmes de sécrétion Sec et Tat.

APPENDICE A

Caractéristiques des plasmides utilisés chez *S. lividans*

Plasmides	Caractéristiques importantes	Références
pIJ702	Vecteur portant les marqueurs <i>mel</i> et <i>tsr</i>	(Kendall et Cohen, 1988)
pIAF20	Dérivé de pIJ702 portant le gène <i>xlnC</i> complet et son promoteur	(Moreau <i>et al.</i> , 1992)
pIAF906	Dérivé du pIJ702 contenant une séquence codante de 2 kb correspondant à <i>xlnA</i> entre les sites de restriction <i>SphI</i> et <i>SacI</i> , ainsi que les sites de restriction <i>HindIII</i> et <i>SacI</i> de chaque côté du peptide signal. L'extrémité C-terminale de la XlnA (41 kDa) est dégradée dans le surnageant de culture pour générer la XlnA2 (31 kDa)	Pagé <i>et al.</i> , 1996
pIAF916	Dérivé du pIAF906 contenant la séquence du peptide signal de la XlnC	Pagé <i>et al.</i> , 1996
pIAF916C	Dérivé du pIAF916 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été remplacé par celui de la XlnC	Faury <i>et al.</i> 2004
pIAF906H	Dérivé de pIAF906. Le gène de résistance au thiostrepton (<i>tsr</i>) a été remplacé par celui de la résistance à l'hygromycine (<i>hyg</i>)	Arias Crauzaz, 2005
pIAF916CH	Dérivé de pIAF916C. Le gène de résistance au thiostrepton (<i>tsr</i>) a été remplacé par celui de la résistance à l'hygromycine (<i>hyg</i>)	Arias Crauzaz, 2005
pIAF917	Dérivé de pIAF906 dans lequel la séquence du peptide signal a été tronqué des nucléotides correspondant aux 20 premiers a.a. de la région-n du peptide signal, soit juste avant la séquence signature TAT	Pagé <i>et al.</i> 1996
pIAF917C	Dérivé du pIAF917 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été remplacé par celui de la XlnC	Faury <i>et al.</i> 2004
pAGCypA	Dérivé de pIJ702 dans lequel on retrouve le gène <i>ScCypA</i> dans le site de restriction <i>SphI/SacI</i> .	Pahl <i>et al.</i> 1997
pAGCypB	Dérivé de pIJ702 dans lequel on retrouve le gène <i>ScCypB</i> dans le site de restriction <i>SphI/SacI</i> .	Pahl <i>et al.</i> 1997
pMCypA.C	Vecteur pAGCypA dans lequel le gène <i>xlnC</i> avec son promoteur a été inséré en <i>SacI</i>	Ce travail
pMCypB.C	Vecteur pAGCypB dans lequel le gène <i>xlnC</i> avec son promoteur a été inséré en <i>SacI</i>	Ce travail
pIAF917Chis	Dérivé du pIAF917C mais pour lequel une queue de six histidines (his-tag) est ajoutée à la suite du gène <i>xlnC</i> avec son promoteur	Ce travail
pIAF916Chis	Dérivé du pIAF916C mais pour lequel une queue de six histidines (his-tag) est ajoutée à la suite du gène <i>xlnC</i> avec son promoteur	Ce travail

APPENDICE B

Amorces utilisées

Amorces	Séquences	Commentaires
GAU2	5'-GGC CGA GCT CTT GAC CGA GGA TCG TCA A- 3'	Extrémité 5' du promoteur de la XlnA
CD-401	5'-GGG GAG CTC TCA ACC GCT GAC CGT GAT GTT- 3'	Extrémité 3' du gène de la XlnC
CD-101	5'-ATA TAG AGC TCT CAG CCG TTG AGT GC-3'	Extrémité 3' du gène de la XlnA
NP34	5'-GGG AAG CTT TGG AGG CAC AGT CAT GCA GCA GGA CGG CAC ACA G-3'	Extrémité 5' du gène de la XlnC
XlnC-6his	5'-CGC <i>CGA GCT</i> CTC AGT GAT GGT GAT GGT GAT GAC CGC TGA CCG TGA TGT TCG A- 3'	Séquence codant pour six histidines (en gras), un Stop et un site <i>SacI</i>

APPENDICE C

Conditions des PCR réalisés

Couvercle : 105 °C

- 1- 95 °C, 5 min
- 2- 50 °C, 5 min
- 3- 72 °C, 3 min
- 4- 94 °C, 1 min
- 5- 50 °C, 1 min
- 6- 72 °C, 3 min
- 7- Répétition des étapes 4 à 6 pour 30 cycles
- 8- 4 °C, pause

Pour les PCR recombinants

Couvercle : 105 °C

- 1- 72 °C, 3 min
- 2- 94 °C, 1 min
- 3- 50 °C, 1 min
- 4- 72 °C, 3 min
- 5- Répétition des étapes 2 à 4 pour 30 cycles
- 6- 72 °C, 10 min
- 7- 4 °C, pause

APPENDICE D

Composition des milieux de culture et tampons utilisés

Milieux liquides

TSB

Tryptic Soy Broth sans dextrose : 27,5 g

Eau milli-Q: 1L

Milieu M14 + xylose 1%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1,4 g

K_2HPO_4 : 5,0 g

KH_2PO_4 : 1,0 g

Sels de Mandel: 1 mL

Tween 80: 2 mL

Ajuster le pH à 7,4

Eau milli-Q : jusqu'à 1 L

Pour 20 mL de M14, il faut ajouter stérilement

Xylose, 20% : 1 mL

CaCl_2 , 3% : 200 μL

MgSO_4 , 5% : 120 μL

Sels de Mandel:

$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,14 g

$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$: 0,16 g

$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g

$\text{COCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g

R5 liquide

Sucrose : 51,5 g

K_2SO_4 : 0,125 g

$MgCl_2$: 5,06 g

Glucose: 5,0 g

Casamino acids: 0,05 g

Éléments traces: 1,0 mL

Extrait de levure : 2,5 g

Tampon TES : 2,87 g

Eau milli-Q jusqu'à 500 mL

Autoclaver et ajouter après stérilisation pour chaque 100 mL de milieu R5

- 1 mL de KH_2PO_4 0,5%
- 0,4 mL de $CaCl_2$ 5 M
- 1,4 mL de NaOH
- 2,5 mL de Glycine 20%
- 0,1 mL de $CuSO_4$ 5 mg/mL
- 1,5 mL de L-Proline 20%
- 1,0 mL de L-Méthionine 1%

Milieux solides

RBB-Xylan

Solution 1:

RBB xylane : 1,0 g

Eau : 125 mL

Mélanger et faire bouillir 30 min

Solution 2:

Sels de Mandel : 0,5 mL

(NH₄)₂SO₄ : 1,0 g

KH₂PO₄ : 0,75 g

K₂HPO₄ : 2,5 g

Extrait de levure : 0,25 g

KCl : 0,25 g

Eau : 375 mL

Ajuster le pH à 7,2 et ajouter 8,5 g d'agar

Stériliser 20 min et laisser refroidir à 50 °C. Mélanger les solutions 1 et 2. Ajouter stérilement 5 mL de MgSO₄.7H₂O et 0,5 mL de thioestrepton (50 mg/mL)

SFM

Farine de soja: 20 g

Mannitol: 20 g

Agar: 20 g

Compléter à 1L avec de l'eau du robinet

Autoclaver deux fois 15 min

R5 solide (recette pour 2L)

Préparer :

- 10 mL de KH_2PO_4 0,5% (autoclavé)
- 4 mL de CaCl_2 5M (autoclavé)
- 1 mL de CuSO_4 5 mg/mL (autoclavé)
- 15 mL de L-Proline 20% (filtré)
- 10 mL de L-méthionine 1% (filtré)
- 0,4 g de L-tyrosine dans 5 mL de NaOH 1N (filtré)

et

Sucrose : 103 g

K_2HPO_4 : 0,25 g

MgCl_2 : 10,12 g

Glucose : 10 g

Casamino acids : 0,1 g

Éléments traces : 2 mL

Extrait de levure : 5 g

Tampon TES : 5,73 g

Eau milli-Q : 955 mL

Agar : 11 g

Autoclaver

Laisser refroidir et ajouter les six solutions préparées individuellement. Faire ensuite sécher les boîtes jusqu'à perte de 15% de leur poids.

Composition des tampons d'électrophorèse

Tampon de chargement 4X

Bleu de bromophénol : 25 mg

Xylène cyanol : 25 mg

Glycérol : 3 mL

Eau : 3 mL

Tampon TAE (Tris Acetate EDTA) 50X

Tris-base : 242 g

Acide acétique glacial : 57,1 mL

EDTA 0,5 M (pH 8,0) : 100 mL

Eau mili-Q : jusqu'à 1 L

Diluer 1/50 avec de l'eau mili-Q avant utilisation

Tampon de chargement Laemmli 3X

Eau distillée : 0,6 mL

Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 :

Glycérol : 4,8 mL

SDS : 0,48 g

B-mercaptoéthanol : 1,2 mL

Bleu de bromophénol 0,5% : 0,4 mL

Pour le Laemmli 1X, diluer 1/3 dans de l'eau mili-Q stérile.

Tampon d'électrophorèse Tris-glycine 5X pour SDS-PAGE

Tris base : 15,1 g

Glycine : 72,0 g

Ajouter 900 mL d'eau

SDS 10% : 50 mL

Ajuster le pH à 8,3

Eau milli-Q : jusqu'à 1 L

Diluer 1/5 avec de l'eau milli-Q avant utilisation (concentration finale 1X).

Tampon de transfert-Immunobuvardage de type Western

39 mM glycine

48 mM Tris

0,0375% SDS

20% méthanol

Tampons utilisés pour l'électrophorèse bidimensionnelle

Tampon de lyse

50 mM Tris-HCl pH 8,0

150 mM NaCl

Tampon de réhydratation/lyse

8M Urée

2M Thio-urée

CHAPS 4%

40 mM DTE

20 mM Tris base

Eau mili-Q : 9,75 mL

*2% IPG buffer

*Bleu de bromophénol 0,5%

Conservé en aliquotes de 500 µL à -20 °C

*Ajouté avant utilisation

Solution d'agarose 1%

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,0 : 6,25 mL

SDS 10% : 0,5 mL

Glycérol 99% : 4,52 mL

Agarose : 0,5 g

Bleu de bromophénoï 0,5% : 0,5 mL

Compléter à 50 mL avec de l'eau milli-Q

Conservé en aliquotes de 10 mL et garder à 4 °C.

Composition des tampons pour les expériences de *Pulse-Chase*

Tampon SP

Tris-HCl 1M, pH 6,8 : 0,5 mL

EDTA 100 mM : 0,2 mL

B-mercaptoéthanol 1% : 0,1 mL

Eau milli-Q : jusqu'à 10 mL

Tampon IPD

Tris-HCl 1M, pH 7,4 : 6 mL

Triton X-100 5% : 12 mL

EDTA 100 mM : 2,4 mL

NaCl 1M : 18 mL

Gélatine 2,5% dans 0,02% azoture de sodium : 12 mL

Eau milli-Q : 120 mL

Tampon IPW

Tris-HCl 1M, pH 7,4 : 1,5 mL

NaCl 1M : 22,5 mL

Triton X-100 5% : 15 mL

Na-désoxycholate 5% : 15 mL

Eau milli-Q : 150 mL

Solutions-Expérience de gel de sépharose activé au CNBr

Tampon de couplage (1,5 L)

NaHCO ₃	12,6 g
NaCl 0,5 M	43,83 g
H ₂ O	Jusqu'à 1,5 L
Ajuster le pH à 8,3	

Tampon de blocage

Ethanolamine 1M	1,2 mL
Tampon de couplage	18,8 mL
Ajuster le pH à 8,5	

HCl 1 mM (1 L)

HCl concentré	1 mL conc. dans 10 mL H ₂ O = 1M
HCl 1M	1 mL 1M dans 9 mL H ₂ O = 100 mM
HCl 100 mM	10 mL 100 mM dans 1000 mL H ₂ O = 1 mM
Garder à 4°C	

Tampon de lavage I (100 mL)

Tris-HCl 50 mM pH 8,0	10 mL de 0,5 M pH 8,0
NaCl 0,5 M	2,92 g
Glycine 50 mM	0,3754 g
H ₂ O	100 mL (vol. final)

Tampon de lavage II (100 mL)

Tampon acétate :	Na Acétate 50 mM	0,4102 g
	H ₂ O	100 mL (vol. final)
	Ac. acétique jusqu'à pH 4,0	
NaCl 0,5 M		2,92 g

Tampon PBS

NaCl	16 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	2,88 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
H ₂ O	Jusqu'à 2 L
Ajuster le pH à 7,4	

Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (500 mL)

Tris base 0,61 g
H₂O 500 mL
Ajustez le pH à 7,5 avec du HCl conc.

Tampons d'éluion (Tris-HCl 10 mM pH 7,5)

Conc. NaCl	Qté NaCl (g)	Vol tot. (mL)
50 mM	0,029	10
100 mM	0,058	10
150 mM	0,087	10
200 mM	0,116	10
250 mM	0,145	10
350 mM	0,203	10
500 mM	0,290	10
1M	0,580	10

Tampon de préparation des membranes à dialyse (500 mL)

NaHCO₃ 0,2 % (w/v) 1g
EDTA 1 mM pH 8,0 1 mL de 0,5 M pH 8,0
H₂O Jusqu'à 500 mL

EDTA 1mM pH 8,0

EDTA 0,5 M pH 8,0 1 mL
H₂O 500 mL tot.

Bibliographie

- Akita, M., S. Sasaki, S. Matsuyama et S. Mizushima (1990). SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. J Biol Chem **265**(14): 8164-9.
- Altman, E., C. A. Kumamoto et S. D. Emr (1991). Heat-shock proteins can substitute for SecB function during protein export in *Escherichia coli*. Embo J **10**(2): 239-45.
- Arias Crausaz, E. A. (2005). Effet des mutations de protéases et chaperonnes sur les système Sec et Tat de sécrétion de protéines chez *Streptomyces lividans* et *Streptomyces albus*. Laval, INRS-Institut Armand-Frappier: 184.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol Prog **15**(2): 147-57.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill et D. A. Hopwood (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature **417**(6885): 141-7.
- Berger, R., F. Schauwecker et U. Keller (1999). Transcriptional analysis of the cyclophilin A gene (*cypA*) of *Streptomyces chrysomallus*. FEMS Microbiol Lett **178**(1): 39-45.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? Mol Microbiol **22**(3): 393-404.
- Berks, B. C., T. Palmer et F. Sargent (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. Curr Opin Microbiol **8**(2): 174-81.
- Berks, B. C., F. Sargent et T. Palmer (2000). The Tat protein export pathway. Mol Microbiol **35**(2): 260-74.
- Bolhuis, A., J. E. Mathers, J. D. Thomas, C. M. Barrett et C. Robinson (2001). TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. J Biol Chem **276**(23): 20213-9.

- Bolhuis, A., G. Venema, W. J. Quax, S. Bron et J. M. van Dijl (1999). Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **274**(35): 24531-8.
- Brehmer, D., C. Gassler, W. Rist, M. P. Mayer et B. Bukau (2004). Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. J Biol Chem **279**(27): 27957-64.
- Breukink, E., R. A. Demel, G. de Korte-Kool et B. de Kruijff (1992). SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and inhibited by ATP: a monolayer study. Biochemistry **31**(4): 1119-24.
- Bucca, G., G. Ferina, A. M. Puglia et C. P. Smith (1995). The dnaK operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. Mol Microbiol **17**(4): 663-74.
- 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**(1): 141-4.
- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J **62**(2): 315-23.
- Callebaut, I. et J. P. Mornon (1995). Trigger factor, one of the *Escherichia coli* chaperone proteins, is an original member of the FKBP family. FEBS Lett **374**(2): 211-5.
- Chandrasekhar, G. N., K. Tilly, C. Woolford, R. Hendrix et C. Georgopoulos (1986). Purification and properties of the groES morphogenetic protein of *Escherichia coli*. J Biol Chem **261**(26): 12414-9.
- Chuang, S. E., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, D. L. Daniels et F. R. Blattner (1993). Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. Gene **134**(1): 1-6.
- Cristobal, S., J. W. de Gier, H. Nielsen et G. von Heijne (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. Embo J **18**(11): 2982-90.
- Darwin, K. H., S. Ehrt, J. C. Gutierrez-Ramos, N. Weich et C. F. Nathan (2003). The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. Science **302**(5652): 1963-6.
- de Keyzer, J., C. van der Does et A. J. Driessen (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. Cell Mol Life Sci **60**(10): 2034-52.

- de Leeuw, E., T. Granjon, I. Porcelli, M. Alami, S. B. Carr, M. Muller, F. Sargent, T. Palmer et B. C. Berks (2002). Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. J Mol Biol **322**(5): 1135-46.
- de Leon, P., S. Marco, C. Isiegas, A. Marina, J. L. Carrascosa et R. P. Mellado (1997). *Streptomyces lividans* *groES*, *groEL1* and *groEL2* genes. Microbiology **143** (Pt **11**): 3563-71.
- Delaney, J. M. (1990). A *grpE* mutant of *Escherichia coli* is more resistant to heat than the wild-type. J Gen Microbiol **136**(5): 797-801.
- DeLisa, M. P., P. Samuelson, T. Palmer et G. Georgiou (2002). Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. J Biol Chem **277**(33): 29825-31.
- Deuerling, E., A. Mogk, C. Richter, M. Purucker et W. Schumann (1997). The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. Mol Microbiol **23**(5): 921-33.
- Deuerling, E., B. Paeslack et W. Schumann (1995). The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. J Bacteriol **177**(14): 4105-12.
- Deuerling, E., A. Schulze-Specking, T. Tomoyasu, A. Mogk et B. Bukau (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. Nature **400**(6745): 693-6.
- Dilks, K., R. W. Rose, E. Hartmann et M. Pohlschroder (2003). Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. J Bacteriol **185**(4): 1478-83.
- Dougan, D. A., A. Mogk, K. Zeth, K. Turgay et B. Bukau (2002). AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. FEBS Lett **529**(1): 6-10.
- Driessen, A. J. (1993). SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is functional as a dimer. Biochemistry **32**(48): 13190-7.
- Driessen, A. J., P. Fekkes et J. P. van der Wolk (1998). The Sec system. Curr Opin Microbiol **1**(2): 216-22.
- Dubini, A. et F. Sargent (2003). Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. FEBS Lett **549**(1-3): 141-6.

- Duchene, A. M., H. M. Kieser, D. A. Hopwood, C. J. Thompson et P. Mazodier (1994). Characterization of two groEL genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Gene **144**(1): 97-101.
- Economou, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. Trends Microbiol **7**(8): 315-20.
- Economou, A. (2000). Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates. FEBS Lett **476**(1-2): 18-21.
- Economou, A., J. A. Pogliano, J. Beckwith, D. B. Oliver et W. Wickner (1995). SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. Cell **83**(7): 1171-81.
- Eichler, J. (2003). Protein targeting across evolution: SRP in the three domains of life. ASM News **69**(6): 277-281.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. Nature **328**(6129): 378-9.
- Faury, D., S. Saidane, H. Li et R. Morosoli (2004). Secretion of active xylanase C from *Streptomyces lividans* is exclusively mediated by the Tat protein export system. Biochim Biophys Acta **1699**(1-2): 155-62.
- Fayet, O., T. Ziegelhoffer et C. Georgopoulos (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J Bacteriol **171**(3): 1379-85.
- Fekkes, P. et A. J. Driessen (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 161-73.
- Fekkes, P., C. van der Does et A. J. Driessen (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. Embo J **16**(20): 6105-13.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. Physiol Rev **79**(2): 425-49.
- Fisher, A. C. et M. P. DeLisa (2004). A little help from my friends: quality control of presecretory proteins in bacteria. J Bacteriol **186**(22): 7467-73.
- Frees, D. et H. Ingmer (1999). ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol **31**(1): 79-87.
- Fu, G. K., M. J. Smith et D. M. Markovitz (1997). Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. J Biol Chem **272**(1): 534-8.

- Gauthier, C., H. Li et R. Morosoli (2005). Increase in xylanase production by *Streptomyces lividans* through simultaneous use of the Sec- and Tat-dependent protein export systems. Appl Environ Microbiol **71**(6): 3085-92.
- Georgopoulos, C. P., R. W. Hendrix, S. R. Casjens et A. D. Kaiser (1973). Host participation in bacteriophage lambda head assembly. J Mol Biol **76**(1): 45-60.
- Geukens, N., E. Lammertyn, L. Van Mellaert, S. Schacht, K. Schaerlaekens, V. Parro, S. Bron, Y. Engelborghs, R. P. Mellado et J. Anne (2001). Membrane topology of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases. J Bacteriol **183**(16): 4752-60.
- Gilbert, M., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel (1995). Production and secretion of proteins by streptomycetes. Crit Rev Biotechnol **15**(1): 13-39.
- Goloubinoff, P., A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu et B. Bukau (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13732-7.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Annu Rev Genet **30**: 465-506.
- Guglielmi, G., P. Mazodier, C. J. Thompson et J. Davies (1991). A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two groEL-like genes and three groEL-like proteins in *Streptomyces albus*. J Bacteriol **173**(22): 7374-81.
- Guthrie, B. et W. Wickner (1990). Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export. J Bacteriol **172**(10): 5555-62.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature **381**(6583): 571-9.
- 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**(2): 269-79.
- Hatzixanthis, K., T. A. Clarke, A. Oubrie, D. J. Richardson, R. J. Turner et F. Sargent (2005). Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8460-5.
- Herman, C. et R. D'Ari (1998). Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. Curr Opin Microbiol **1**(2): 204-9.
- Hong, B., L. Wang, E. Lammertyn, N. Geukens, L. Van Mellaert, Y. Li et J. Anne (2005). Inactivation of the 20S proteasome in *Streptomyces lividans* and its influence on the production of heterologous proteins. Microbiology **151**(Pt 9): 3137-45.

- Horwich, A. L. (2004). Chaperoned protein disaggregation--the ClpB ring uses its central channel. Cell **119**(5): 579-81.
- Hoskins, J. R., S. K. Singh, M. R. Maurizi et S. Wickner (2000). Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8892-7.
- Houry, W. A. (2001). Mechanism of substrate recognition by the chaperonin GroEL. Biochem Cell Biol **79**(5): 569-77.
- Houry, W. A., D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich et F. U. Hartl (1999). Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. Nature **402**(6758): 147-54.
- Hurtubise, Y., F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli (1995). A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol Microbiol **17**(2): 367-77.
- Jong, W. S., C. M. ten Hagen-Jongman, P. Genevaux, J. Brunner, B. Oudega et J. Luirink (2004). Trigger factor interacts with the signal peptide of nascent Tat substrates but does not play a critical role in Tat-mediated export. Eur J Biochem **271**(23-24): 4779-87.
- Jongbloed, J. D., H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron, U. Airaksinen, F. Pries, W. J. Quax, J. M. van Dijl et P. G. Braun (2002). Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **277**(46): 44068-78.
- Jongbloed, J. D., U. Martin, H. Antelmann, M. Hecker, H. Tjalsma, G. Venema, S. Bron, J. M. van Dijl et J. Muller (2000). TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. J Biol Chem **275**(52): 41350-7.
- Kamitani, S., Y. Akiyama et K. Ito (1992). Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. Embo J **11**(1): 57-62.
- Keersmaecker, S. D., L. V. Mellaert, K. Schaerlaekens, W. V. Dessel, K. Vrancken, E. Lammertyn, J. Anne et N. Geukens (2005). Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. FEBS Lett **579**(3): 797-802.
- Kendall, K. J. et S. N. Cohen (1988). Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties. J Bacteriol **170**(10): 4634-51.

- Kessel, M., W. Wu, S. Gottesman, E. Kocsis, A. C. Steven et M. R. Maurizi (1996). Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. FEBS Lett **398**(2-3): 274-8.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D. A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. Colney, Norwich.
- Kihara, A., Y. Akiyama et K. Ito (1995). FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4532-6.
- Knoblauch, N. T., S. Rudiger, H. J. Schonfeld, A. J. Driessen, J. Schneider-Mergener et B. Bukau (1999). Substrate specificity of the SecB chaperone. J Biol Chem **274**(48): 34219-25.
- Kumamoto, C. A. et J. Beckwith (1985). Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*. J Bacteriol **163**(1): 267-74.
- Kumamoto, C. A. et A. K. Nault (1989). Characterization of the *Escherichia coli* protein-export gene secB. Gene **75**(1): 167-75.
- Lamiet, A. A., T. Ziegelhoffer, C. Georgopoulos et A. Pluckthun (1990). The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the beta-lactamase precursor. Embo J **9**(7): 2315-9.
- Lecker, S., R. Lill, T. Ziegelhoffer, C. Georgopoulos, P. J. Bassford, Jr., C. A. Kumamoto et W. Wickner (1989). Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*--SecB, trigger factor and GroEL--form soluble complexes with precursor proteins in vitro. Embo J **8**(9): 2703-9.
- Lee, S., M. E. Sowa, J. M. Choi et F. T. Tsai (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone--a protein disaggregating machine. J Struct Biol **146**(1-2): 99-105.
- Li, H., D. Faury et R. Morosoli (2006). Impact of amino acid changes in the signal peptide on the secretion of the Tat-dependent xylanase C from *Streptomyces lividans*. FEMS Microbiol Lett **255**(2): 268-74.
- Li, H., P.-E. Jacques, M. Gabriela Ghinet, R. Brzezinski et R. Morosoli (2005). Determining the functionality of putative Tat-dependant signal peptides in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by using two different reporter proteins. Microbiology **151**.
- Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos et M. Zylicz (1991). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2874-8.

- Linde, D., R. Volkmer-Engert, S. Schreiber et J. P. Muller (2003). Interaction of the *Bacillus subtilis* chaperone CsaA with the secretory protein YvaY. FEMS Microbiol Lett **226**(1): 93-100.
- Liu, G., T. B. Topping et L. L. Randall (1989). Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9213-7.
- Mangels, D., J. Mathers, A. Bolhuis et C. Robinson (2005). The core TatABC complex of the twin-arginine translocase in *Escherichia coli*: TatC drives assembly whereas TatA is essential for stability. J Mol Biol **345**(2): 415-23.
- Mazodier, P., G. Guglielmi, J. Davies et C. J. Thompson (1991). Characterization of the groEL-like genes in *Streptomyces albus*. J Bacteriol **173**(22): 7382-6.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry **31**: 426-428.
- Missiakas, D., F. Schwager et S. Raina (1995). Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. Embo J **14**(14): 3415-24.
- Miyake, K., H. Onaka, S. Horinouchi et T. Beppu (1994). Organization and nucleotide sequence of the secE-nusG region of *Streptomyces griseus*. Biochim Biophys Acta **1217**(1): 97-100.
- Mogk, A., T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rudiger, D. Roder, H. Langen et B. Bukau (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. Embo J **18**(24): 6934-49.
- Moreau, A., F. W. Paradis, R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel (1992). A novel shuttle vector for *Streptomyces spp.* and *Escherichia coli* as a tool in site-directed mutagenesis. Can J Microbiol **38**(4): 350-3.
- Muller, J. P., J. Ozegowski, S. Vettermann, J. Swaving, K. H. Van Wely et A. J. Driessen (2000). Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. Biochem J **348 Pt 2**: 367-73.
- Muller, M. (2005). Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. Res Microbiol **156**(2): 131-6.
- Nagy, I., T. Tamura, J. Vanderleyden, W. Baumeister et R. De Mot (1998). The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol **180**(20): 5448-53.
- Nicoll, W. S., A. Boshoff, M. H. Ludewig, F. Hennessy, M. Jung et G. L. Blatch (2005). Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. Protein Expr Purif.

- Ochsner, U. A., A. Snyder, A. I. Vasil et M. L. Vasil (2002). Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8312-7.
- Ohki, M., F. Tamura, S. Nishimura et H. Uchida (1986). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* dnaJ gene and purification of the gene product. J Biol Chem **261**(4): 1778-81.
- Oresnik, I. J., C. L. Ladner et R. J. Turner (2001). Identification of a twin-arginine leader-binding protein. Mol Microbiol **40**(2): 323-31.
- Ostiguy, S., M. Gilbert, F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli (1996). Cloning and sequencing of the secY homolog from *Streptomyces lividans* 1326. Gene **176**(1-2): 265-7.
- O'Toole, R. et H. D. Williams (2003). Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol **154**(6): 387-92.
- Page, N., D. Kluepfel, F. Shareck et R. Morosoli (1996). Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol **62**(1): 109-14.
- Pahl, A., A. Gewies et U. Keller (1997). ScCypB is a novel second cytosolic cyclophilin from *Streptomyces chrysomallus* which is phylogenetically distant from ScCypA. Microbiology **143** (Pt 1): 117-26.
- Pak, M., J. R. Hoskins, S. K. Singh, M. R. Maurizi et S. Wickner (1999). Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. J Biol Chem **274**(27): 19316-22.
- Palacin, A., R. de la Fuente, I. Valle, L. A. Rivas et R. P. Mellado (2003). *Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion. Microbiology **149**(Pt 9): 2435-42.
- Palacin, A., V. Parro, N. Geukens, J. Anne et R. P. Mellado (2002). SipY Is the *Streptomyces lividans* type I signal peptidase exerting a major effect on protein secretion. J Bacteriol **184**(17): 4875-80.
- Palmer, T. et B. C. Berks (2003). Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. Microbiology **149**(Pt 3): 547-56.
- Palmer, T., F. Sargent et B. C. Berks (2005). Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. Trends Microbiol **13**(4): 175-80.

- Phillips, T. A., R. A. VanBogelen et F. C. Neidhardt (1984). Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. J Bacteriol **159**(1): 283-7.
- Pop, O. I., M. Westermann, R. Volkmer-Engert, D. Schulz, C. Lemke, S. Schreiber, R. Gerlach, R. Wetzker et J. P. Muller (2003). Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **278**(40): 38428-36.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol Rev **57**(1): 50-108.
- Reyes, D. Y. et H. Yoshikawa (2002). DnaK chaperone machine and trigger factor are only partially required for normal growth of *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem **66**(7): 1583-6.
- Rodrigue, A., A. Chanal, K. Beck, M. Muller et L. F. Wu (1999). Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. J Biol Chem **274**(19): 13223-8.
- Rose, R. W., T. Bruser, J. C. Kissinger et M. Pohlschroder (2002). Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. Mol Microbiol **45**(4): 943-50.
- Sakoh, M., K. Ito et Y. Akiyama (2005). Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. J Biol Chem **280**(39): 33305-10.
- Sambasivarao, D., R. J. Turner, J. L. Simala-Grant, G. Shaw, J. Hu et J. H. Weiner (2000). Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. J Biol Chem **275**(29): 22526-31.
- Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks et T. Palmer (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. Embo J **17**(13): 3640-50.
- Schaerlaekens, K., M. Schierova, E. Lammertyn, N. Geukens, J. Anne et L. Van Mellaert (2001). Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. J Bacteriol **183**(23): 6727-32.
- Schaerlaekens, K., L. Van Mellaert, E. Lammertyn, N. Geukens et J. Anne (2004). The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. Microbiology **150**(Pt 1): 21-31.
- 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**(8): 3404-14.

- Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli et D. Kluepfel (1991). Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. Gene **107**(1): 75-82.
- Shirai, Y., Y. Akiyama et K. Ito (1996). Suppression of ftsH mutant phenotypes by overproduction of molecular chaperones. J Bacteriol **178**(4): 1141-5.
- Simonen, M. et I. Palva (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol Rev **57**(1): 109-37.
- Sobczyk, A., A. Bellier, J. Viala et P. Mazodier (2002). The lon gene, encoding an ATP-dependent protease, is a novel member of the HAIR/HspR stress-response regulon in actinomycetes. Microbiology **148**(Pt 6): 1931-7.
- Spiess, C., A. Beil et M. Ehrmann (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. Cell **97**(3): 339-47.
- Stanley, N. R., T. Palmer et B. C. Berks (2000). The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. J Biol Chem **275**(16): 11591-6.
- Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron et J. M. van Dijl (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 515-47.
- Ullers, R. S., J. Luirink, N. Harms, F. Schwager, C. Georgopoulos et P. Genevax (2004). SecB is a bona fide generalized chaperone in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7583-8.
- van Dijl, J. M., P. G. Braun, C. Robinson, W. J. Quax, H. Antelmann, M. Hecker, J. Muller, H. Tjalsma, S. Bron et J. D. Jongbloed (2002). Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. J Biotechnol **98**(2-3): 243-54.
- van Roosmalen, M. L., N. Geukens, J. D. Jongbloed, H. Tjalsma, J. Y. Dubois, S. Bron, J. M. van Dijl et J. Anne (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 279-97.
- van Wely, K. H., J. Swaving, R. Freudl et A. J. Driessen (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Rev **25**(4): 437-54.
- van Wely, K. H., J. Swaving, M. Klein, R. Freudl et A. J. Driessen (2000). The carboxyl terminus of the *Bacillus subtilis* SecA is dispensable for protein secretion and viability. Microbiology **146** (Pt 10): 2573-81.

- Vasilyeva, O. V., K. B. Kolygo, Y. F. Leonova, N. A. Potapenko et T. V. Ovchinnikova (2002). Domain structure and ATP-induced conformational changes in *Escherichia coli* protease Lon revealed by limited proteolysis and autolysis. FEBS Lett **526**(1-3): 66-70.
- Viala, J. et P. Mazodier (2003). The ATPase ClpX is conditionally involved in the morphological differentiation of *Streptomyces lividans*. Mol Genet Genomics **268**(5): 563-9.
- von Heijne, G. et L. Abrahmsen (1989). Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. FEBS Lett **244**(2): 439-46.
- Wang, C. C. et C. L. Tsou (1993). Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. Faseb J **7**(15): 1515-7.
- Watanabe, M. et G. Blobel (1989). SecB functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in *E. coli*. Cell **58**(4): 695-705.
- Weibezahn, J., C. Schlieker, B. Bukau et A. Mogk (2003). Characterization of a trap mutant of the AAA+ chaperone ClpB. J Biol Chem **278**(35): 32608-17.
- Wetzstein, M. et W. Schumann (1990). Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* gene homologous to the grpE gene of *E. coli* located immediately upstream of the dnaK gene. Nucleic Acids Res **18**(5): 1289.
- Wexler, M., F. Sargent, R. L. Jack, N. R. Stanley, E. G. Bogsch, C. Robinson, B. C. Berks et T. Palmer (2000). TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. J Biol Chem **275**(22): 16717-22.
- Wickner, S., S. Gottesman, D. Skowyra, J. Hoskins, K. McKenney et M. R. Maurizi (1994). A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12218-22.
- Wickner, W., A. J. Driessen et F. U. Hartl (1991). The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. Annu Rev Biochem **60**: 101-24.
- Wild, J., W. A. Walter, C. A. Gross et E. Altman (1993). Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. J Bacteriol **175**(13): 3992-7.
- Winter, J. et U. Jakob (2004). Beyond transcription--new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. Crit Rev Biochem Mol Biol **39**(5-6): 297-317.