

Université du Québec

INRS – Institut ARMAND-FRAPPIER

**EFFET DES MUTATIONS DE PROTÉASES ET CHAPERONNES
SUR LES SYSTÈMES SEC ET TAT DE
SÉCRÉTION DE PROTÉINES CHEZ *Streptomyces lividans* ET
*Streptomyces albus***

Par

ELIANA A. ARIAS CRAUSAZ

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

BEAUDET Réjean
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

COSSAR Doug
Cangene Corporation

Directeur de recherche

MOROSOLI Rolf
Institut Armand-Frappier

Résumé

Le projet de recherche porte sur l'influence de mutants de protéases et de chaperonnes sur les systèmes de sécrétion des protéines Sec- et Tat-dépendants des Streptomycètes. Nous disposons de trois mutants de protéases de *Streptomyces lividans* (7 Tap⁻, 12 Tap⁻ et Ssp⁻ et 17 à mutations multiples) et de deux mutants de chaperonnes de *Streptomyces albus* (GroEL et HSP18)

La xylanase A et la xylanase B qui sont Sec-dépendantes, ainsi que la xylanase C, qui est exclusivement Tat-dépendante ont été utilisées comme protéines modèles dans cette étude. Les gènes respectifs ont été clonés dans un vecteur à copies multiples portant la résistance à l'hygromycine qui a servi ensuite pour transformer les diverses souches mutantes.

Chez les mutants de protéase de *S. lividans*, bien que la production de XlnA soit considérablement réduite par rapport à la souche de référence, la vitesse de maturation du précurseur demeure inchangée. Ceci indique que le processus de sécrétion Sec lui-même n'est pas affecté par les mutations. Par ailleurs, chez le mutant 12 la diminution de production s'expliquerait peut-être par un défaut de traduction du gène *xlnA* car l'intensité de marquage du précurseur est plus faible que le contrôle. Pour les mutants 7 et 17, la faible production d'enzyme est plutôt à mettre en relation avec leur croissance cellulaire qui est atypique. Pour ce qui est du système de sécrétion Tat-dépendant une diminution de la production de XlnC est observée pour tous les mutants sans que la vitesse de maturation des précurseurs ne soit affectée, ce qui indique que les mutations n'ont pas eu un effet direct sur le système de sécrétion Tat-dépendant.

Les mutants de chaperonnes GroEL1 et HSP18 n'influencent en aucune façon la production de XlnA et de XlnC par *S. albus* et aucun ralentissement de la vitesse de maturation des précurseurs n'a été enregistré. Donc ces deux chaperonnes n'interviennent pas dans les systèmes Sec et Tat de sécrétion des protéines.

La souche sauvage de *S. lividans* sécrète naturellement la XlnB1 et dans une faible mesure la XlnB2 qui dérive de la XlnB1 suite à la perte du domaine d'attachement au xylane situé en C-terminal de la protéine. Était-il possible que nos mutants de protéases soient responsables de cette dégradation? Les trois mutants produisent la XlnB1 et la XlnB2 dans les mêmes proportions que la souche sauvage indiquant qu'elles ne participent pas à l'enlèvement du domaine de fixation au xylane de la XlnB1.

Dans notre construction, le gène de la XlnA est tronqué à son extrémité 3', ce qui occasionne une délétion partielle du domaine d'attachement au xylane. Au lieu d'une xylanase de 46 kDa, les transformants produisent une xylanase de 41-kDa qui est très rapidement dégradée en XlnA2 de 31-kDa contenant uniquement le domaine catalytique de l'enzyme. Ce processus de dégradation est ralenti chez les trois mutants de protéase sans cependant être aboli, ce qui suggère que les protéases manquantes sont en partie responsables de la dégradation du domaine d'attachement au xylane partiellement délété dans notre construction.

Étudiante

Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement à mon directeur de recherche, le professeur Rolf Morosoli qui m'a accueilli généreusement dans son laboratoire. Ses précieuses directives ainsi que sa remarquable disponibilité ont grandement contribué à la réalisation de mon projet.

Ma gratitude va également à madame Johanne Lemay pour son inappréciable assistance technique et sa gentillesse, sans oublier mes collègues de laboratoire docteur Haiming Li et madame Céline Gauthier qui ont contribué à rendre mon séjour à l'INRS-Institut Armand Frappier si agréable.

Ma reconnaissance revient aussi aux membres de ma famille qui m'ont supporté et encouragé tout au long de mes études. Merci à mes parents, Claudio et Éliana qui m'ont fait aimer les sciences ; à mes enfants, Ferial et Wahid pour illuminer les moments difficiles avec leurs sourires et spécialement à mon époux Athmane Taoussi sans qui je n'aurais jamais réussi à me rendre jusqu'à la fin de ce projet.

Finalement, je remercie à la Fondation Armand Frappier pour son support financier.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iv
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des annexes	xi
1 Introduction.....	1
2 Revue de littérature.....	3
2.1 Protéases	3
2.1.1 Principales protéases intracellulaires	3
2.1.1.1 Les protéines Clp	4
ClpA/PX.....	4
ClpY	5
ClpB	6
2.1.1.2 La protéase membranaire FtsH (HflB)	6
2.1.1.3 La protéase Lon.....	6
2.1.1.4 Le protéasome 20S.....	6
2.1.2 Sélection du substrat et mode d'action	7
2.1.3 Les protéases chez les bactéries à Gram positif.....	9
2.2 Chaperonnes.....	9
2.2.1 Principales chaperonnes intracellulaires	10
2.2.1.1 Les protéines de choc thermique « HSP »	10
GroEL	10
Architecture de GroEL.....	11
Interactions GroEL-GroES	11
Mécanisme de base	12
Théories sur le repliement.....	12
Reconnaissance des substrats par GroEL	13
GroEL et la sécrétion de protéines.....	13
GroEL chez les Streptomycètes.....	14
DnaK.....	15
Les HSP 100	15
HSP 18	15
2.2.1.2 Les Peptidyl Prolyl Cis/Trans Isomerases (PPIases)	16
2.3 La sécrétion des protéines.....	16
2.3.1 Caractéristiques des précurseurs	17
2.3.1.1 Le peptide signal Sec	17
2.3.2 Système Sec ou système général de sécrétion	18
2.3.2.1 Composantes du système Sec	18
SecB	18
SecA.....	21
SecY, SecE et SecG	22
SecD, SecF et YajC.....	23
Lep	23

2.3.2.2	Processus de translocation par le système Sec.....	26
2.3.3	Système de sécrétion Tat « Twin-Arginine Translocation »	27
2.3.3.1	Le peptide signal Tat.....	27
2.3.3.2	Composantes du système Tat.....	29
	TatA/B/E.....	29
	TatC.....	30
	TatD	30
2.3.3.3	Énergie de translocation.....	31
2.3.3.4	Le système Tat chez les Gram positif.....	31
2.4	Les streptomycètes.....	34
2.4.1	Généralités	34
2.4.2	Système xylanolytique de <i>Streptomyces lividans</i>	34
2.4.3	La sécrétion de protéines chez <i>Streptomyces albus</i>	35
3	Objectifs.....	37
4	Matériel et méthodes.....	38
4.1	Souches bactériennes	38
4.1.1	Mutants protéase négatifs	38
4.1.1.1	Caractérisation de la protéine Tap	38
4.1.1.2	Caractérisation de Ssp.....	39
4.1.2	Mutants chaperonne négatifs	40
4.2	Milieux de culture et conditions de croissance	41
4.2.1	Milieux liquides	41
4.2.1.1	TSB « Tryptic Soy Broth » sans dextrose.....	41
4.2.1.2	Milieu minimal M14.....	41
4.2.1.3	Milieu M13	41
4.2.2	Milieux solides.....	42
4.2.2.1	R5.....	42
4.2.2.2	Farine de Soja - Mannitol « Soy Flour Mannitol SFM ».....	42
4.2.2.3	RBB-xylane.....	42
4.3	Préparation de protoplastes	42
4.4	Manipulation d'ADN	44
4.4.1	Préparation de l'ADN plasmidique des <i>Streptomycètes</i>	44
4.4.2	Digestion enzymatique.....	45
4.4.3	Migration de l'ADN sur gel d'agarose	45
4.4.4	Extraction de l'ADN du gel d'agarose.....	46
4.4.5	Ligation	46
4.5	Transformation et sélection des transformants	46
4.6	Préparation de spores	47
4.7	Détermination de l'activité xylanolytique	47
4.8	Détermination de la croissance du mycélium	48
4.8.1	Mesure de l'ADN total.....	48
4.9	« Western Blotting »	49
4.10	Suivi de la maturation du précurseur « Pulse-Chase »	51
5	Résultats.....	55
5.1	Caractéristiques des souches mutantes	55
5.1.1	Caractéristiques des souches protéases négatives de <i>S. lividans</i>	55

5.1.2	Caractéristiques des souches chaperonnes négatives de <i>S. albus</i>	62
5.2	Construction des plasmides pour l'étude de la sécrétion des protéines	
	par le système Sec	69
5.2.1	Vecteurs d'expression de la XlnA	69
5.2.1.1	Remplacement du gène de résistance au thiostrepton (<i>tsr</i>)	
	par celui de l'hygromycine (<i>hyg</i>) dans le vecteur pIAF906	70
5.2.1.2	Vérification de la présence du plasmide pIAF906-H chez	
	<i>S. lividans</i> 10-164.....	70
5.2.2	Vecteurs d'expression de la XlnB	77
5.2.2.1	Construction de pIAF SB1 mut3-H	77
5.3	Résultats de la sécrétion par le système Sec chez <i>Streptomyces lividans</i>	80
5.3.1	Sécrétion de la XlnA2 par les mutants protéase négatifs.....	80
5.3.1.1	Détermination de l'activité enzymatique.....	80
5.3.1.2	Estimation de la quantité de XlnA2 sécrétée	86
5.3.1.3	Suivi de la maturation du précurseur de la XlnA2.....	89
5.3.1.4	Mesure de la traduction du gène <i>xlnA2</i>	89
5.3.1.5	Dégradation extracellulaire de la XlnA2	95
5.3.2	Genèse de la XlnB2	105
5.4	Résultats de la sécrétion par le système Sec chez <i>Streptomyces albus</i>	108
5.5	Sécrétion de protéines par le système Tat.....	113
5.6	Construction du plasmide pour l'étude de la sécrétion des protéines	
	par le système Tat	113
5.6.1	Remplacement du gène de résistance au thiostrepton (<i>tsr</i>) par	
	celui de l'hygromycine (<i>hyg</i>) dans le vecteur pIAF916C	114
5.6.2	Vérification de la présence du plasmide pIAF916C-H chez	
	<i>S. lividans</i> 10-164 par digestion enzymatique	117
5.7	Résultats de la sécrétion par le système Tat chez <i>S. lividans</i>	117
5.7.1	Activité xylanasiq et courbes de croissance des mutants de protéases	118
5.7.2	Xylanases présentes dans le surnageant de culture des mutants	
	de protéases.....	123
5.7.3	Maturation du précurseur de la XlnC.....	126
5.8	Résultats de la sécrétion par le système Tat chez <i>S. albus</i>	129
5.8.1	Activité xylanasiq et courbes de croissance.....	129
5.8.2	Maturation du précurseur.....	134
6	Discussion des résultats	137
6.1	Effet des mutations de protéases sur le système de sécrétion Sec	
	chez <i>S. lividans</i>	137
6.1.1	Influence des mutations de protéases sur le repliement de la XlnA2	138
6.1.2	Le processus de sécrétion de la XlnA1 chez les mutants de protéases... ..	139
6.1.3	Traduction de la XlnA1 chez les mutants de protéases	140
6.1.4	Facteurs de régulation chez les mutants de protéases.....	140
6.1.5	Dégradation extracellulaire de la XlnA 41-kDa chez les mutants	
	de protéases.....	141
6.1.6	Influence des mutants de protéases sur le clivage de la XlnB1	
	en XlnB2	144
6.2	Sécrétion de la XlnA par les mutants chaperonne négatifs de <i>S. albus</i>	144

6.2.1	Analyse de la sécrétion Sec chez le mutant <i>hsp18</i>	144
6.2.2	Analyse de la sécrétion Sec chez le mutant <i>groEL1</i>	145
6.3	Effet des mutations de protéase sur le système Tat de sécrétion des	
	protéines de <i>S. lividans</i>	146
6.3.1	Sécrétion de la XlnC par le mutant 12	147
6.3.2	Sécrétion de la XlnC par les mutants 7 et 17	147
6.4	Analyse de la sécrétion par le système Tat chez <i>S. albus</i>	147
6.5	Induction des gènes produisant des xylanases chez <i>Streptomyces albus</i>	148
7	Conclusions.....	150
	Annexes.....	153
	Références.....	174

Liste de figures

Figure 1. Fonctionnement du système Sec	19
Figure 2. Organisation membranaire des principales protéines Sec	24
Figure 3. Système Tat	32
Figure 4. Activité enzymatique et croissance des souches protéase négatives de <i>S. lividans</i>	57
Figure 5. Mise en évidence des xylanases sécrétées par les souches 7, 12 et 17 par « Western Blotting »	60
Figure 6. Activité xylanolytique et croissance de <i>S. albus</i> en présence de xylane	64
Figure 7. « Western Blotting » du surnageant de culture de <i>S. albus</i> WT et les mutants GroEL1 et HSP18, en présence du substrat	67
Figure 8. pIAF906H pour l'expression de la XlnA	71
Figure 9. pIAF906 A3-H pour l'expression de la XlnA3	75
Figure 10. pIAF SB1 H pour l'expression de la XlnB	78
Figure 11. Dosage enzymatique et croissance des souches transformées avec pIAF906H	82
Figure 12. Calcul de la proportion de l'activité enzymatique des souches	84
Figure 13. Résultats de « Western Blotting » mettant en évidence la XlnA2	87
Figure 14. Résultats de « Pulse-Chase » avec la XlnA sécrétée par les mutants 7, 12 et 17 de <i>S. lividans</i>	91
Figure 15. Traduction de la XlnA par les mutants 7, 12 et 17 de <i>S. lividans</i>	93
Figure 16. Patron de transformation dans le surnageant de la XlnA1 en XlnA2 ...	97
Figure 17. Calcul de la demi-vie de la XlnA1 dans le surnageant de culture	99
Figure 18. Proportion de XlnA1 et XlnA2 dans le surnageant de culture	101
Figure 19. Suivi de la dégradation de la XlnA3-H dans le surnageant des mutants protéase négatifs de <i>S. lividans</i>	103
Figure 20. Suivi de la dégradation de la XlnB dans le surnageant de culture des souches 7, 12 et 17 de <i>S. lividans</i> et du contrôle IAF-SB1-H	106
Figure 21. Activité enzymatique et croissance de <i>S. albus</i> WT, HSP18 et GroEL1, transformés avec pIAF906H	109
Figure 22. Maturation du précurseur de la XlnA par <i>S. albus</i>	111
Figure 23. Carte de restriction de pIAF916C-H	115
Figure 24. Activité enzymatique et croissance des mutants de protéases 7-916C-H, 12-916C-H, 17-916C-H et du contrôle IAF916C-H ...	119
Figure 25. Pourcentage de l'activité et de la croissance des mutants 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H par rapport au contrôle IAF916C-H arbitrairement fixé à 100%	121
Figure 26. « Western Blotting » anti-XlnA, -XlnB et -XlnC avec le surnageant de culture des mutants de protéases 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H	124
Figure 27. Maturation du précurseur de la XlnC sécrétée par les mutants 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H	127
Figure 28. Activité enzymatique et croissance de <i>S. albus</i> WT et les mutants <i>groEL1</i> et <i>hsp18</i> négatifs, transformés avec pIAF916C-H	130

Figure 29. Pourcentage de l'activité enzymatique et la croissance des mutants de <i>S. albus</i> par rapport au WT, transformés avec pIAF916C-H	132
Figure 30. Maturation du précurseur de la XlnC sécrétée par <i>S. albus</i> WT et les mutants GroEL1 et HSP18 transformés avec pIAF916C-H	135

Liste des annexes

- ANNEXE A** Description des principales caractéristiques des souches mutantes utilisées
- ANNEXE B** Liste des plasmides utilisés avec leurs principales caractéristiques
- ANNEXE C** Composition et préparation des milieux de culture utilisés
- ANNEXE D** Composition et préparation des tampons et des solutions utilisés pour les expériences de dosage enzymatique
- ANNEXE E** Composition des tampons utilisés pour les expériences de « Pulse-Chase »
- ANNEXE F** Composition des tampons d'électrophorèse
- ANNEXE G** Composition des tampons pour «Western Blotting».
- ANNEXE H** Composition et préparation du tampon P pour la préparation de protoplastes
- ANNEXE I** Composition des solutions utilisées pour la préparation d'ADN plasmidique par la technique de la lyse alcaline

1 Introduction

Chez les bactéries, les protéines destinées au milieu extracellulaire sont synthétisées sous forme de précurseurs qui contiennent à leur extrémité N-terminale une courte séquence appelée peptide signal. Le rôle du peptide signal consiste à diriger le précurseur vers le système de sécrétion approprié, pour être ensuite clivé permettant la libération de la protéine mature dans le milieu.

Parmi les voies de sécrétion des protéines chez les bactéries nous en analyserons deux soit le système général de sécrétion Sec et le système Tat « Twin-Arginine Translocation ». Le système Sec possède la capacité de transporter à travers la membrane des précurseurs linéaires, tandis que la voie Tat se spécialise dans la translocation des précurseurs déjà repliés.

La sécrétion de protéines étant relativement bien connue, l'intérêt croissant pour la production de protéines recombinantes met en évidence l'importance de l'étude des mécanismes cellulaires complémentaires à la sécrétion. Ces processus, comme le repliement du précurseur, le clivage du peptide signal et l'acquisition de modifications post-traductionnelles ou post-translocationnelles, demandent souvent l'intervention de protéases et de chaperonnes.

Les protéases sont des protéines dédiées au processus de dégradation ; les chaperonnes, par contre, protègent les protéines de relations illicites. Dans le système Sec des bactéries Gram négatives, la chaperonne cytoplasmique SecB empêche les précurseurs de se replier hâtivement. Or, l'absence d'un homologue chez les bactéries Gram positives, suggère fortement l'existence d'autres chaperonnes impliquées dans la sécrétion des protéines.

Les *Streptomycètes* appartiennent à la famille des Actinomycètes, bactéries Gram positives filamenteuses du sol reconnues pour produire une grande variété de molécules utilisées en industrie, en agriculture et en médecine.

S. lividans produit trois xylanases. Ces enzymes agissent en tandem pour dégrader le xylane, un polymère du xylose rencontré en abondance chez les végétaux. Les XlnA et XlnB sont sécrétées par le système Sec, tandis que la XlnC dépend exclusivement du système Tat pour sa translocation à travers la membrane.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet des mutations de protéases et de chaperonnes sur les systèmes de sécrétion Sec et Tat en utilisant les xylanases comme protéines modèles de sécrétion.

Pour ce faire, nous avons utilisé trois mutants protéases de *S. lividans* et deux mutants chaperonnes de *S. albus*. Ces souches ont été transformées avec des vecteurs d'expression arborant les gènes *xlnA* et *xlnB* pour l'étude du système Sec et le gène *xlnC* pour le système Tat.

La production d'enzymes, leur dégradation extracellulaire ainsi que la vitesse de maturation de leurs précurseurs ont servi à analyser les effets des diverses mutations.

2 Revue de littérature

2.1 Protéases

Le sort de chaque protéine qui transite par le cytoplasme, dépend constamment de l'équilibre entre les processus de repliement et dégradation (Herman & D'Ari, 1998). Cette règle s'applique aux protéines cytoplasmiques mais elle est aussi vraie pour celles destinées au milieu extracellulaire.

La protéolyse est une fonction très délicate qui permet à la cellule d'éliminer rapidement les protéines inutiles ; les acides aminés libérés peuvent alors être alloués à des nouveaux besoins (Herman & D'Ari, 1998).

Les protéines susceptibles d'entrer dans la voie protéolytique sont celles portant des erreurs de transcription ou traduction ou les protéines natives de courte vie ; dans ce cas, la protéolyse accomplit la fonction de régulation. Finalement, les protéines dénaturées suite à un stress sont aussi dégradées rapidement afin d'éviter la formation d'agrégats toxiques dans le cytoplasme (Gottesman *et al.*, 1997).

Une grande proportion de la dégradation protéique est accomplie par des protéases multimériques de haut poids moléculaire et qui utilisent l'énergie provenant de l'ATP (Gottesman *et al.*, 1997). Chez les procaryotes, il existe au moins six protéases dédiées à la dégradation d'une multitude de protéines (Gottesman, 1999).

2.1.1 Principales protéases intracellulaires

Les protéases intracellulaires sont des molécules de grande taille, largement répandues parmi les bactéries. Généralement elles appartiennent à la superfamille des AAA⁺, ATPases Associés à diverses Activités cellulaires. Les mieux connues sont les protéases

caseinolytiques « Casein Lytic Proteases » ClpAP et ClpXP, ClpYQ (HslUV), la protéase membranaire FtsH (HflB) et Lon (celles de *E. coli* sont entre parenthèses).

Les modules AAA⁺ se forment par assemblage d'anneaux homologues ou hétérologues, pour la plupart hexamériques (Gottesman, 1999). Chaque unité de l'anneau, présente deux sous domaines (D1 et D2), de 230 résidus chacun, avec des séquences et des motifs structuraux bien conservés. Ces domaines ont des rôles non équivalents dans les différentes protéines AAA⁺. Ainsi, D1 est impliqué principalement dans l'assemblage de l'hexamère chez ClpA, tandis que D2 possède une activité ATPasique accrue. Les sites d'attachement aux nucléotides se retrouvent dans l'interface des sous domaines.

Bien que la plupart des protéases soient largement répandues parmi les bactéries, il existe au moins un groupe confiné aux Actinomycètes, c'est le cas du protéasome 20S dont la présence chez les procaryotes n'a été démontrée que dernièrement (Nagy *et al.*, 1998).

Dans les paragraphes suivants nous allons décrire brièvement les principales caractéristiques du groupe Clp, FtsH, Lon et du protéasome 20S.

2.1.1.1 Les protéines Clp

La famille de protéases Clp appartient à la superfamille AAA⁺. ClpA et ClpB sont formées par deux sous unités non identiques disposées en tandem, en contraste, ClpX comme ClpY (HslU), possèdent un seul module AAA⁺.

ClpA/PX

Chez *E. coli*, les complexes ClpAP et ClpXP sont les unités fonctionnelles de ClpP, une protéase de 14 sous unités identiques arrangées en deux anneaux heptamériques avec leurs sites catalytiques séquestrés dans la cavité interne (Wang *et al.*, 1997).

ClpA et ClpX, sont toutes les deux des chaperonnes hexahomomériques ATP dépendantes. C'est uniquement lorsque ClpA ou ClpX est associée à ClpP, que le substrat

est dégradé. Par contre, en absence de la composante protéolytique, ClpA et ClpX agissent comme chaperonnes, en catalysant le remodelage structural des protéines et la désagrégation de complexes protéiques stables.

Dans les complexes protéolytiques, comme ClpAP et ClpXP, seulement une surface de l'anneau de l'ATPase interagit avec ClpP tandis que l'autre surface se lie au substrat. Le contact avec ClpP est en partie fait par une boucle exposée en D2, appelée la boucle ClpP. Récemment, la présence de motifs structuraux dans le domaine N-terminal de ClpA a été identifiée comme favorisant la liaison de substrats peptidiques avec faible affinité et large spécificité. Le modèle fonctionnel propose que le domaine N-terminal de ClpA fonctionne comme des tentacules qui soutiennent faiblement les protéines pour augmenter la concentration locale du substrat (Xia *et al.*, 2004).

La liaison d'ATP et son hydrolyse, ont des rôles distincts et essentiels dans les activités variées de ClpA ou ClpX : la fixation d'ATP est nécessaire pour le montage des anneaux et l'interaction avec ClpP, tandis que l'hydrolyse subséquente d'ATP par les sous-unités de régulation, provoque le dépliement du substrat pour faciliter son passage vers la composante protéolytique de la protéase (Gottesman *et al.*, 1997).

ClpY

ClpY (HslU) est une ATPase homologue de ClpX. ClpY régule le fonctionnement de la protéase ClpQ (HslV). Autant ClpY que ClpQ sont formés par des anneaux homohexameriques ; ainsi, ClpYQ ne présente pas de disparité dans le nombre de sous unités qui forment l'anneau de l'ATPase et celui du module protéolytique, comme c'est le cas pour ClpA/XP (Kessel *et al.*, 1996).

HslV montre une homologie de séquence et une similarité dans le mécanisme catalytique à la sous unité beta du protéasome (Bogyo *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 1998).

ClpB

ClpB est une protéine qui catalyse la dissolution d'agrégats toxiques, une fonction qui par ailleurs est complétée par l'action de la chaperonne DnaK. Ensemble ces deux protéines constituent le principal agent de désagrégation à l'intérieur de la cellule (Mogk *et al.*, 1999).

ClpB, ne se lie pas à une composante protéolytique même si elle partage certaines similarités avec ClpA (Horwich *et al.*, 1999 ; Wickner *et al.*, 1999). La principale différence réside en la longueur plus importante de sa région interdomaine D1-D2. Cette caractéristique influence possiblement la reconnaissance des substrats ainsi que son activité de chaperonne (Lee *et al.*, 2004).

2.1.1.2 La protéase membranaire FtsH (HflB)

FtsH (HflB), est une protéase membranaire de 70kDa dépendante du zinc. Elle est essentielle chez *E. coli*. FtsH est formée d'un domaine metallo-protéase fusionné à l'extrémité carboxyle d'un module AAA⁺. Le domaine N-terminal de FtsH possède deux segments transmembranaires mais le domaine catalytique reste libre pour catalyser des réactions tantôt de chaperonne tantôt de protéase.

2.1.1.3 La protéase Lon

Lon est un homotétramère, chaque sous-unité de 90 kDa contient un domaine ATPase et un domaine de type sérine protéase.

2.1.1.4 Le protéasome 20S

Le protéasome 20S, est une protéase caractéristique des eucaryotes divisée en compartiments. Chez les procaryotes, elle a été décrite pour la première fois chez l'actinomycète *Rhodococcus* (Tamura *et al.*, 1995). *Streptomyces coelicolor*, présente un protéasome 20S constitué d'une sous-unité de type alfa (PrcA) et une unité de type beta

(PrcB). Cette enzyme présente une activité semblable à celle de la chymotrypsine sur un substrat synthétique. Le protéasome 20S de *S. coelicolor* est sensible au peptide-aldéhyde et aux inhibiteurs de type peptide vinyle sulfone ainsi qu'au métabolite de *Streptomyces*, la lactacystin.

Chez *S. coelicolor* les gènes du protéasome 20S sont organisés en opéron (*prcBA*), de la même façon que chez *Rhodococcus* et *Mycobacterium* spp (Knipfer et Shrader, 1997). La sous-unité beta est synthétisée sous la forme d'un propeptide duquel 53 acides aminés sont enlevés pendant l'assemblage du protéasome (Nagy *et al.*, 1998).

Un mutant du protéasome 20S de *Mycobacterium smegmatis* ne montre pas d'effet sur le phénotype. Ceci souligne l'existence d'un autre système qui agit parallèlement au protéasome 20S (Knipfer et Shrader, 1997). Chez *S. coelicolor*, le mutant protéasome 20S négatif, est complémenté avec une protéine native, absente de la souche sauvage provenant d'une mutation secondaire (Nagy *et al.*, 2003)

2.1.2 Sélection du substrat et mode d'action

Chez les procaryotes, les enzymes protéolytiques doivent être hautement spécifiques. En général, elles doivent identifier leurs substrats parmi la multitude de protéines présentes dans le cytoplasme (Gottesman *et al.*, 1997 ; Herman & D'Ari, 1998).

Chez les protéases du complexe ClpP, on observe que la spécificité du substrat dépend du composant ClpA ou ClpX qui est associé avec ClpP, ce qui amène à penser qu'il doit y avoir un certain degré de spécificité dans le choix des cibles (Gottesman *et al.*, 1997).

Les études relatives aux motifs d'identification des protéases ont démontré que les extrémités des protéines sont souvent en cause, en raison de leur accessibilité (Gottesman, 1999). Selon le cas, il est aussi possible que l'extrémité en soi comporte un motif de reconnaissance, ce qui signifie que NH₂ ou COOH feraient partie de ce motif (Gottesman, 1999).

Les études portant sur des protéines produites par ingénierie avec leur coté amino-terminal anormal, montrent que celles-ci sont dégradées rapidement *in vivo* chez *E. coli*, par son extrémité N-terminale. Cette dégradation est effectuée par ClpAP (Tobias *et al.*, 1991). De plus, ClpAP, ClpXP et parfois FtsH, reconnaîtraient l'addition expérimentale d'une séquence du coté C-terminal de la protéine (Gottesman, 1999). Ces observations montrent que ClpAP reconnaît autant le coté N-terminal que C-terminal dans des circonstances différentes (Gottesman, 1999).

Par ailleurs, ils existent plusieurs exemples où la spécificité du substrat est la même pour la chaperonne que pour la protéase (Gottesman *et al.*, 1997) : ClpX n'agit pas sur la protéine d'initiation de la réplication, RepA mais par contre ClpA le fait, ainsi ClpAP dégrade RepA mais ClpXP ne le fait pas (Wickner *et al.*, 1994). D'une façon similaire, ClpX catalyse la désagrégation des complexes de la transposase MuA liée à l'ADN (Krukltis *et al.*, 1996) tandis que ClpXP les dégrade (Gottesman *et al.*, 1997).

Ces observations confirment que les ATPases n'ont pas seulement des fonctions catalytiques mais elles sont aussi responsables de la sélection du substrat (Gottesman *et al.*, 1997). Ainsi, le repliement ou la dégradation des protéines, pourraient être déterminés par leur affinité relative avec des chaperonnes et des protéases (Gottesman *et al.*, 1997).

La dégradation semble parfois être modulée par l'interaction du substrat avec d'autres composants de la protéase, autant pour stimuler la dégradation que pour séquestrer le substrat dans des complexes et le soustraire à la dégradation (Gottesman, 1999).

Ainsi les modules ATPase sont responsables de la sélection du substrat, ils catalysent aussi son dépliement et translocation subséquente vers la chambre protéolytique. En effet, les images de micrographie électronique montrent que les ATPases de régulation se lient à la surface des anneaux protéolytiques, elles sont donc, dans une position idéale pour réguler l'entrée du substrat après remodelage. Le substrat accède à la chambre interne pour y être dégradé uniquement si le remodelage est couplé à la liaison du module protéolytique ClpX (Gottesman *et al.*, 1997; Gottesman, 1999).

Une fois que le polypeptide a été reconnu et lié au domaine de régulation de l'ATPase, le processus de dégradation s'effectue par le clivage à tous les cinq à dix acides aminés (Gottesman, 1999).

2.1.3 Les protéases chez les bactéries Gram positives

Chez *S. coelicolor*, deux gènes *clpP* (*clpP1* et *clpP2*) ont été caractérisés en amont du gène *clpX*. Par ailleurs, il est possible de trouver une protéine avec les caractéristiques de ClpP chez *S. lividans* et *S. albus* (Crécy-Lagard *et al.*, 1999).

Streptomyces albus est le premier organisme Gram⁺ dont on a décrit la co-régulation de DnaK et ClpB (Grandvalet *et al.*, 1999). On a aussi observé que les gènes qui codent pour ces deux protéines appartiennent au même régulon HspR.

Une autre protéase dépendante de l'ATP qui a fait l'objet d'étude chez les Actinomycètes est Lon. L'interruption du gène *lon* chez *S. lividans* suggère que cette protéine appartient aussi au régulon HspR et qu'elle est produite de façon concomitante avec les autres membres de ce régulon (Sobczyk *et al.*, 2002).

Les protéases Clp jouent un rôle important dans les systèmes de développement chez les bactéries, comme la sporulation chez *Bacillus subtilis* et le cycle cellulaire chez *Caulobacter crescentus* (Gottesman, 1999) et *S. lividans* (Viala *et al.*, 2000).

2.2 Chaperonnes

L'intérêt croissant pour l'expression de protéines recombinantes, a grandement contribué à améliorer les connaissances sur la fonction et l'acquisition de la structure protéique dans l'environnement cellulaire. En complément, les études sur la réponse cellulaire au stress, ont mis en évidence, *in vivo*, l'importance du repliement protéique assisté. Ainsi, en conditions normales, une protéine naissante est souvent prise en charge par un

ensemble de protéines chargées de lui conférer une structure adéquate. Ces protéines se nomment chaperonnes.

La fonction générale des chaperonnes consiste à maintenir un polypeptide dans l'état approprié à l'accomplissement de sa fonction. Cette action dérive de trois rôles spécifiques : prévenir l'agrégation dans le cytoplasme des polypeptides non repliés, assister au repliement adéquat des polypeptides et catalyser la solubilisation d'agrégats stables (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001).

2.2.1 Principales chaperonnes intracellulaires

Il existent plusieurs molécules qui agissent comme chaperonnes, nous allons décrire les principales soit les protéines de choc thermique « HSP » et les Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases (PPIases).

2.2.1.1 Les protéines de choc thermique « HSP »

Les protéines de choc thermique ou « Heat Shock Protein », sont connues pour être surexprimées dans le cytoplasme en réponse à un changement environnemental ; leur rôle consiste à contrer les dommages qu'un tel phénomène puisse causer à la cellule. Par ailleurs, plusieurs HSP sont intimement impliquées dans la biogenèse d'une variété de protéines, dans ce cas elles sont appelées chaperonnes moléculaires.

Les groupes principaux de chaperonnes HSP sont les suivants : HSP60 (GroEL), HSP70 (DnaK), et les HSP18 ainsi que les HSP100 (ClpA/B/X, HslU) protéines de grande taille qui peuvent accomplir aussi des rôles catalytiques. (Les chaperonnes de *Escherichia coli* sont entre parenthèses).

GroEL

Pendant plusieurs années, la théorie préconisée par Anfinsen (1973) du repliement spontané des polypeptides, était la seule explication à l'acquisition des structures

secondaires et tertiaires des protéines dans le cytoplasme, mais dans les dernières années le rôle des chaperonnes moléculaires dans le repliement protéique a été mis en évidence.

La chaperonne GroEL de *E. coli* et sa co-chaperonne GroES, ont été les premières à être étudiées (Georgopoulos et *al.*, 1973), elles ont donc servi de modèle pour la compréhension d'autres chaperonnes cytoplasmiques.

Architecture de GroEL

GroEL est un cylindre formé par l'assemblage de 14 sous unités identiques de 57 kDa chacune. Les 14 sous unités composent 2 anneaux empilés dos à dos, chaque anneau est formé par 7 sous unités qui donnent lieu à une cavité fermée destinée au repliement des polypeptides (Braig et *al.*, 1993 ; Braig et *al.*, 1994).

Chacune des sous unités comporte trois domaines. Le domaine équatorial présente les sites de réception de l'ATP et forme la base de l'anneau. Le domaine central relie la région équatoriale avec le domaine apical. Les domaines apicaux se situent du côté de l'ouverture du cylindre et contiennent les sites de liaison pour GroES et pour le polypeptide.

Interactions GroEL-GroES

GroES, est un heptamère en forme de dôme. Lorsque les sites de liaison des nucléotides « Nucleotide Binding Site (NBS) » de GroEL sont occupés par de l'ATP ou l'ADP, GroES s'associe fermement à sa portion apicale.

Une fois le complexe GroEL-GroES formé, la molécule GroEL subit d'importants arrangements structuraux. Les domaines apicaux de l'anneau auquel GroES est lié, pivotent vers le haut et tournent vers l'extérieur, ce qui provoque l'agrandissement de la cavité centrale.

Dans un deuxième temps, les résidus hydrophobes qui tapissent l'espace central de GroEL s'enfoncent dans la paroi et la cavité devient hydrophile. Dans cette position GroES ferme complètement la sortie de la cavité.

Mécanisme de base

Même, si plusieurs détails restent encore à éclaircir, à présent ce mécanisme d'action est largement accepté. Le repliement par GroEL se ferait en trois étapes : un polypeptide intermédiaire est capturé par GroEL qui le protège des agrégations. Une fois que l'ATP et GroES sont liés avec le complexe GroEL-polypeptide, ce dernier est éjecté dans la cavité fermée pour commencer le repliement. Après hydrolyse d'ATP, GroES et le polypeptide sont relâchés.

Théories sur le repliement

Deux théories ont été avancées pour expliquer ce qui arrive à l'intérieur de la cavité de repliement. Le modèle de la « cage de repliement » suggère que la cavité interne de GroEL forme un environnement isolé (Agard, 1993) où le polypeptide est protégé des agrégations indésirables (Buchner et *al.*, 1991). La présence de GroES et l'hydrolyse d'ATP, favoriseraient le retour du polypeptide à son état natif, puis le repliement se ferait partiellement à l'intérieur de la cage par la voie utilisée normalement par la protéine.

Le deuxième mécanisme, suggère que GroEL se lie à des protéines mal repliées pour agir comme « unfoldase ». L'hydrolyse d'ATP servirait à déplier la protéine (Hubbard & Sander, 1991), dont le repliement final se ferait soit dans la cavité soit à l'extérieur.

Reconnaissance des substrats par GroEL

In vitro, GroEL, comme plusieurs chaperonnes, peut se lier à des polypeptides dénaturés chimiquement et prévenir leur agrégation. Dans ce groupe, pas moins du 50% des protéines mal conformées de *E. coli* se lient à GroEL (Viitanen *et al.* 1992).

Chez *E. coli*, le mécanisme de repliement par GroEL de la beta-lactamase dénaturée à 48°C a été analysé par digestion partielle et spectrométrie de masse (Gervasoni, *et al.*, 1998). Cette étude montre que GroEL reconnaît chez la beta-lactamase une large région hydrophobe découverte lors de la dénaturation. La température élevée provoque le dépliement de l'hélice alpha H11 située du côté C-terminal de la beta-lactamase. Ce dépliement expose partiellement une grande région hydrophobe constituée par 5 feuillets beta, qui devient le site de reconnaissance par GroEL. L'hélice H11 et les boucles découvertes lors de la dénaturation, interagissent alors avec le domaine apical de GroEL pour former un complexe stable et réversible, qui obtient l'énergie nécessaire à la liaison de l'importante contribution hydrophobe du substrat.

Dernièrement, la structure du substrat caractéristique de GroEL a été déterminée *in vivo*. Il varie entre 20 et 60 kDa de poids moléculaire et comporte de préférence plusieurs domaines alpha-beta contenant des hélices alpha et des feuillets beta à grande surface hydrophobe. Selon le modèle proposé, les résidus hydrophobes de la région apicale de GroEL se lient aux surfaces hydrophobes exposées des feuillets beta ou des hélices alpha des substrats (Houry, 2001^b).

GroEL et la sécrétion de protéines

Il a été observé que GroEL et GroES sont nécessaires pour l'exportation efficace d'au moins une protéine, la beta-lactamase (Kusukawa *et al.*, 1989) et que GroEL interagit avec les protéines de sécrétion de façon similaire à la chaperonne du système de sécrétion, SecB (Lecker *et al.*, 1989) ; par ailleurs, il a été démontré que la fonction de

SecB chez *E. coli* peut être substitué par d'autres HSP (Altman *et al.*, 1991), il serait donc raisonnable de soupçonner la participation de GroEL ou d'autres HSP dans la sécrétion de protéines.

GroEL chez les Streptomycètes

Streptomyces lividans possède deux gènes homologues de *groEL* de *E. coli*, *groEL1* et *groEL2* ainsi qu'un gène *groES*. Les gènes *groES/groEL1* sont organisés en opéron (de Léon *et al.*, 1997).

Advenant un choc thermique, les deux gènes *groEL* sont transcrits, mais le niveau de transcription de *groEL2* est considérablement plus élevé par rapport à l'opéron *groES/EL1*. La protéine GroEL2 de 62-kDa de *S. lividans* présente une conformation en cylindre et des caractéristiques de chaperonne, similaires à son homologue chez *E. coli*, néanmoins, la présence de la co-chaperonne GroES ne semble pas être essentiel pour son activité (de Léon *et al.*, 1997).

S. albus produit trois protéines similaires à GroEL : HSP56 (GroEL2), HSP58 (GroEL1) et HSP18 (Mazodier *et al.*, 1991). La séquence amino terminale de HSP18 étant identique à celle de GroEL1, il a été démontré que HSP18 est le résultat de la régulation post-traductionnelle de GroEL1 (Servant et Mazodier, 1995). La séquence amino terminale de HSP58 qui correspond à HSP18, ainsi que la séquence qui code pour GroEL2 sont essentielles pour la croissance chez *S. albus* (Servant *et al.*, 1994).

Chez *S. albus*, les chaperonnes DnaK, GroEL et HSP ainsi que leur régulation transcriptionnelle ont fait l'objet de nombreuses études (Guglielmi *et al.*, 1991; Mazodier *et al.*, 1991; Servant & Mazodier, 1995). Néanmoins, leur participation dans la sécrétion de protéines, n'a pas été étudiée chez les Streptomycètes.

DnaK

Le système Hsp70, est formé par DnaK (Hsp70) avec son co-facteur DnaJ (Hsp40) et le facteur d'échange de nucléotides GrpE.

DnaJ accélère la liaison avec le substrat et l'action ATPasique de DnaK, tandis que GrpE agit comme facteur d'échange de l'ADP par ATP. Ce système reconnaît des chaînes linéaires de polypeptides.

Chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*, les organismes Gram⁻ et Gram⁺ modèles, à la différence de *groEL*, *dnaK* n'est pas essentiel, même si les mutants *dnaK* des deux espèces présentent des sérieux problèmes de croissance et viabilité, lorsqu'on les soumet à hautes températures (Paek et Walker, 1987).

Par contre, chez d'autres bactéries, comme *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* et *Bradyrhizobium japonicum*, l'impossibilité de construire un mutant *dnaK* suggère un rôle essentiel (Naberhaus, 2002).

Les HSP 100

Les ATPases Clp, appartiennent à la famille des HSP 100. Certaines de ces ATPases comme ClpB, peuvent déplier les nombreuses protéines qui forment des agrégats (Houry, 2001^a), mais par leur activité protéolytique dans les complexes ClpAX/P, les HSP 100 ont été décrites plus en détail dans le chapitre 2.1.1.1 dédié à la protéolyse.

HSP 18

La chaperonne HSP 18 appartient aussi aux protéines de choc thermique. Sa fonction ne consiste pas à participer au repliement des protéines mais à éviter leur agrégation (Naberhaus, 2002).

2.2.1.2 Les Peptidyl Prolyl Cis/Trans Isomerasases (PPIases)

Le rôle général de ces enzymes consiste à catalyser l'interconversion *cis/trans* des liens peptidyl-prolyl chez les protéines. Néanmoins, il a été démontré *in vivo* que plusieurs PPIases accomplissent la fonction de chaperonne pour certaines protéines ou groupes de protéines, intervenant dans l'assemblage et la régulation des complexes protéiques ainsi que le trafic intracellulaire. En effet, leur présence dans des complexes hétéro oligomériques semble indiquer qu'elles peuvent accomplir d'autres rôles dont celui de chaperonne en contribuant à la stabilisation de ces complexes (Kieffer *et al.*, 1992). L'intérêt de ces protéines dans cette étude est leur rôle de chaperonnes cytoplasmiques.

2.3 La sécrétion des protéines

Le mécanisme de sécrétion permet aux protéines destinées au milieu périplasmique ou extracellulaire d'atteindre leur destination. Ce processus est accompli par un ensemble de facteurs protéiques spécialisés qui les prennent en charge, dès leur synthèse jusqu'à leur passage à travers la membrane cytoplasmique.

L'importance de ce processus se reflète dans la proportion élevée de protéines sécrétées. En effet, il a été suggéré que la cellule sécrète au moins 20% de toutes les protéines synthétisées dont de nombreuses enzymes (Pugsley, 1993).

Chez les bactéries, plusieurs voies de sécrétion ont été identifiées. Le système Sec-dépendant est le plus fréquemment utilisé et aussi le mieux connu, par ailleurs, récemment un nouveau système a été répertorié chez les bactéries. La voie Tat « **T**win-**A**rginine **T**ranslocation », est un système spécialisé dans le transport de protéines qui doivent être repliées avant même d'initier leur processus de translocation. Dans cette étude nous allons expliquer brièvement le fonctionnement des systèmes Sec et Tat, mais

avant, il est nécessaire de connaître les principales caractéristiques des protéines destinées à la sécrétion.

2.3.1 Caractéristiques des précurseurs

De façon générale, les protéines destinées au milieu extracellulaire sont synthétisées sous la forme de précurseurs. Le précurseur comporte le domaine mature de la protéine précédé d'une courte séquence d'acides aminés à son extrémité N-terminale appelée peptide signal. Une fois l'exportation du précurseur amorcée, le peptide signal est clivé pour libérer la protéine mature dans le milieu externe (Pugsley, 1993).

La longueur des peptides signaux varie en fonction du type de bactérie, ainsi, chez les bactéries Gram négatives on retrouve des peptides signaux plus courts que chez les Gram positives. Par exemple, *E. coli*, présente des peptides signaux dont la longueur moyenne est de 25 acides aminés, contre 29 à 31, chez les Gram positif. Parmi ces dernières, *S. lividans* se démarque avec des peptides signaux de 35 acides aminés en moyenne (Gilbert *et al.*, 1995).

Tous les peptides signaux sont composés de trois domaines dont les propriétés physico-chimiques sont bien conservées même si leur séquence ne l'est pas. Ces domaines sont : la région N-terminale généralement chargée positivement (N), la région centrale hydrophobe (H) et la région C-terminale (C), contenant un site de reconnaissance pour la signal peptidase (Fekkes et Driessen, 1999).

2.3.1.1 Le peptide signal Sec

Dans les peptides signaux de type Sec les trois domaines se répartissent ainsi : la région N comporte entre 1 à 5 acides aminés, cette région hydrophile est chargée positivement du à la présence fréquente de lysine ou arginine; ce domaine interagirait avec les portions négatives de la membrane cytoplasmique (De Vrije *et al.*, 1990).

La région H contient entre 7 et 15 acides aminés non-polaires et hydrophobes. Chez les peptides signaux de type Sec, cette région adopte une forme en épingle à cheveux pour favoriser l'insertion du précurseur dans la membrane. Il a été observé que l'efficacité de translocation diminuait proportionnellement à l'hydrophobicité du domaine H (Chou et Kendall, 1990).

La région C, moins hydrophobe, comporte de 3 à 7 acides aminés. Ce domaine présente le site de clivage du peptide signal, généralement composé par trois résidus dont deux alanines en position -1 et -3 entourant un résidu quelconque (A-X-A), (Fekkes & Driessen, 1999).

2.3.2 Système Sec ou système général de sécrétion

Le système Sec est responsable du transport à travers la membrane des précurseurs linéaires avant qu'ils n'acquièrent leur structure finale (Pugsley, 1993). Il est composé de la chaperonne SecB, qui se lie au polypeptide naissant pour le transporter activement vers l'ATPase SecA, tout en empêchant un repliement hâtif (figure 1) ; finalement, grâce à des insertions répétées, SecA emporte le précurseur à travers le canal membranaire SecYEG. Une fois la translocation du précurseur amorcée, le peptide signal est clivé par l'intervention d'une signal peptidase (Mori et Ito, 2001).

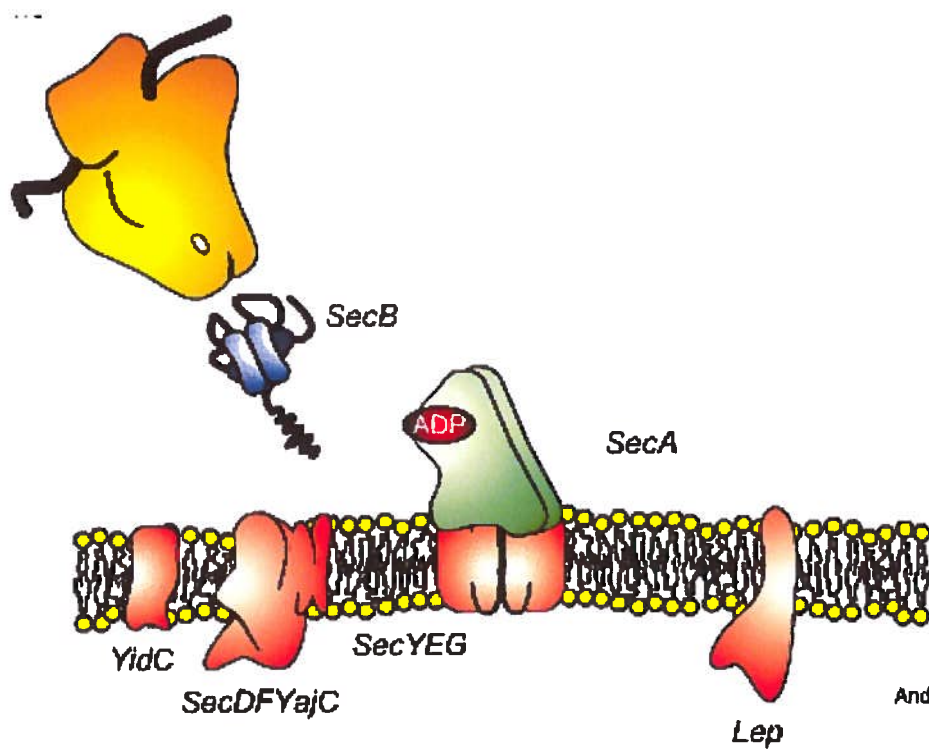
Parmi les diverses composantes du système, la protéine SecA et le complexe SecYEG sont les éléments les plus importants et constituent ensemble la translocase membranaire.

2.3.2.1 Composantes du système Sec

Sous ce sous titre nous allons décrire le système Sec d'*E. coli* qui est le plus largement étudié.

Figure 1. Fonctionnement du système Sec

<http://molmic35.biol.rug.nl/SEC/Sechome.htm>



SecB

SecB est un homotetramère dont chacune des sous unités a un poids moléculaire de 17-kDa. (Kumamoto et Nault, 1989). À la différence de nombreuses chaperonnes, SecB n'est pas une ATPase ni une protéine de choc thermique. SecB ne montre aucune spécificité pour la séquence ou la structure de ses substrats (Randall et Hardy, 1995). Bien qu'il soit raisonnable de croire que la présence du peptide signal pouvait lui permettre de discriminer les précurseurs parmi toutes les protéines cytoplasmiques, il a été démontré qu'en plus de la présence du peptide signal, SecB requiert des éléments additionnels contenus dans le corps de la protéine pour reconnaître les précurseurs (Mallik *et al.*, 2002 ; Randall *et al.*, 1997). En effet, SecB interagit avec les portions non repliées du domaine mature en proportion stœchiométrique pour former le complexe SecB-précurseur (Randall et Hardy, 1995). Dans cet état, le repliement du précurseur est stabilisé mais il est aussi protégé de l'agrégation éventuelle avec d'autres polypeptides (Fekkes *et al.*, 1998). Par ailleurs, la formation du complexe SecB-précurseur permet l'association avec la sous unité SecA pour initier la translocation. À cette étape l'affinité de SecB avec SecA est améliorée par la présence du peptide signal dans le précurseur (Fekkes *et al.*, 1998).

Il a été démontré que la délétion de *secB* chez *E. coli* affecte la translocation d'un groupe de précurseurs (Kumamoto et Beckwith, 1983). Cependant la présence de SecB n'est indispensable qu'à des taux de croissance élevés. Sa présence n'a jamais été confirmée chez les bactéries Gram positives, ainsi SecB est la seule chaperonne dédiée au transport de protéines par le système Sec qui soit spécifique aux bactéries Gram négatives.

SecA

SecA est un élément essentiel du système de sécrétion et contrairement à SecB, SecA se retrouve conservée chez toutes les bactéries autant Gram positives que Gram négatives (Driessen *et al.*, 1998).

SecA est une protéine de 102-kDa qui se présente autant comme protéine cytoplasmique que membranaire. Dans ce dernier cas (Figure 2), SecA interagit avec les phospholipides ainsi qu'avec les sous unités membranaires de la translocase, SecY, SecE et SecG (Driessen *et al.*, 1998).

SecA est une ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la translocation. Pour le faire, elle possède deux sites d'attachement aux nucléotides « NBS », tous les deux indispensables pour son activité de translocation. NBS-I est situé dans le domaine N-terminal de la protéine et possède une affinité élevée à lier des nucléotides ; NBS-II a une faible affinité pour les nucléotides et il est situé dans le dernier tiers de la séquence protéique. À cause de cette différence d'affinité, les NBS de SecA semblent travailler en coopération afin que l'ATPase agisse comme un dimère (Driessen *et al.*, 1998). La présence d'un site de liaison pour SecB dans l'extrémité C-terminale de SecA a par ailleurs, été suggérée (Driessen *et al.*, 1998).

SecY, SecE et SecG

SecY, SecE et SecG s'assemblent *in vivo* pour former un complexe hétérotrimérique stable (Figure 2). Ce complexe constitue un pore de sécrétion encastré dans la membrane cellulaire (Driessen *et al.*, 1998).

SecY est un polypeptide de 49-kDa contenant 10 segments transmembranaires (Akiyama et Ito, 1987). SecE est plus petit (14-kDa) et présente entre 1 à 3 segments transmembranaires dépendant de l'espèce bactérienne (Schatz *et al.*, 1989). Chez *E. coli*, les deux premiers segments de SecE sont indispensables pour la translocation (Schatz *et al.*, 1989). Il a aussi été suggéré que SecY interagisse intimement avec SecE (Driessen *et al.*, 1998).

SecG est un polypeptide de 11.4-kDa avec deux segments transmembranaires suivis d'un large domaine C-terminal cytoplasmique (Nishiyama *et al.*, 1993). Ce domaine est essentiel pour la croissance cellulaire et la translocation à basse température. Le rôle de

SecG est de faciliter l'insertion du peptide signal dans la translocase tout en stimulant l'activité ATPasique de SecA (Driessen *et al.*, 1998).

SecD, SecF et YajC

Trois autres protéines membranaires SecD, SecF et YajC ont été identifiées comme les produits de l'opéron *secD* chez *E. coli* (Pogliano et Beckwith, 1994). Ces protéines ont un poids moléculaire de 65, 35 et 8-kDa respectivement. SecD et SecF présentent chacune six segments transmembranaires et un segment périplasmique, tandis que YajC comporte un seul de ces segments.

Le rôle de ces protéines demeure obscur ; néanmoins, il a été suggéré qu'elles augmentent l'efficacité de la sécrétion par leur intervention dans les étapes tardives de la translocation, comme la présentation du précurseur à la signal peptidase ou la libération et le repliement des protéines (Pogliano et Beckwith, 1994).

Lep

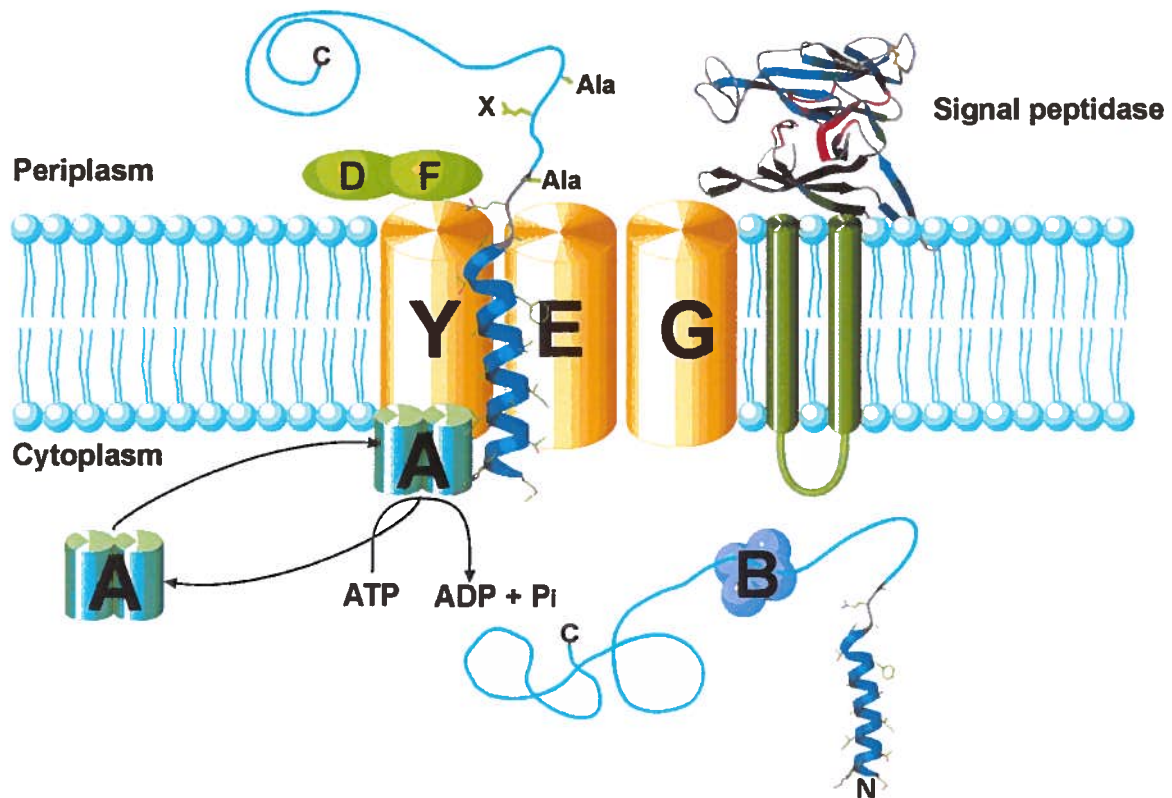
La signal peptidase de type I, Lep (Figure 2), est ancrée du côté périplasmique de la membrane par une courte région N-terminale. Cette enzyme reconnaît le site de clivage du peptide signal pour libérer le domaine mature de la protéine (Wolfe *et al.*, 1983).

Figure 2. Organisation membranaire des principales protéines Sec

.

<http://byron.biochem.ubc.ca/research2.sec2.htm>

Sec Dependent Bacterial Protein Secretion System



2.3.2.2 Processus de translocation par le système Sec

La translocation par le système Sec est un processus par étapes, où l'ATPase SecA, transporte activement le précurseur à travers la membrane par des mouvements d'insertion profonde et recul dans le pore de sécrétion. Ce phénomène est décrit plus en détail dans les paragraphes suivants.

Comme il a été mentionné précédemment, SecB interagit avec les portions non repliés du domaine mature du précurseur (figure 1). Une fois que le complexe SecB-précurseur a été formé, SecB le conduit vers la sous unité membranaire SecA.

Le peptide signal interagit alors avec le domaine N-terminal de SecA, ce qui a comme conséquence l'augmentation de l'affinité de SecB pour SecA : SecB se lie à l'extrémité C-terminale de SecA et la chaperonne transfère vers l'ATPase, le domaine mature du précurseur, qui se lie à son tour à la portion N-terminale de SecA (Driessen *et al.*, 1998).

L'échange subséquent d'ADP par ATP, produit des changements dans la conformation de SecA : tout d'abord, son extrémité C-terminale s'enfonce dans la membrane et SecB est libérée dans le cytoplasme. En même temps, la fixation d'ATP provoque l'insertion de la région C-terminale de SecA dans le pore SecYEG. Avec ce mouvement, l'ATPase emporte avec elle, une portion du domaine mature et du peptide signal du précurseur. Celui-ci présente alors la forme d'une épingle à cheveux enfoncée dans la membrane avec le corps de la protéine toujours dans le cytoplasme. L'interaction avec la translocase stimule chez SecA, l'hydrolyse d'ATP au site NBS-I ; cette réaction provoque la libération du précurseur dans le canal membranaire. L'hydrolyse subséquente d'ATP au site NBS-II, favorise le recul de SecA pour permettre la liaison de l'ATPase avec la portion C-terminale du précurseur située près de la membrane. Plusieurs cycles d'insertion et recul de SecA peuvent être nécessaires pour la translocation complète de la protéine (Driessen *et al.*, 1998). La région N-terminale du précurseur reste ancrée à la membrane en attendant la reconnaissance de la séquence A-X-A et de son clivage par

Lep. La protéine mature est alors libérée pour atteindre sa structure finale tandis que le peptide signal entre dans la voie protéolytique.

2.3.3 Système de sécrétion Tat « Twin-Arginine Translocation »

Le système Tat, pour « Twin-Arginine Translocation », doit son nom à une particularité des peptides signaux des précurseurs sécrétés par cette voie. En effet, le motif consensus (S/T)-**R-R**-x-F-L-K, est toujours présent à la limite des régions N et H. Dans ce motif les arginines consécutives sont invariables et les autres acides aminés sont conservés dans plus de 50% des cas.

Contrairement aux protéines sécrétées par le système Sec qui se replient instantanément après leur sécrétion, la voie Tat permet la sécrétion de protéines déjà repliées dans le cytoplasme. Plusieurs des protéines Tat-dépendantes possèdent des co-facteurs qui exigent le repliement partiel de la protéine pour leur incorporation ; ainsi, les protéines qui empruntent le système Tat, ont probablement besoin de chaperonnes cytoplasmiques pour se replier.

La sécrétion par la voie Tat, est un phénomène très apparenté au système dépendant du delta pH retrouvé dans les membranes des thylacoïdes chez les plantes (Chaddock *et al*, 1995) et il n'a été décrit chez les bactéries que récemment (Berks *et al.*, 2000).

2.3.3.1 Le peptide signal Tat

Bien que considérablement plus long, le peptide signal Tat conserve la structure tripartite du peptide signal de type Sec. Mais, puisque la fonction principale du peptide signal est de diriger le précurseur vers le système de sécrétion approprié, il est normal, même souhaitable, de trouver quelques différences entre les peptides signaux compatibles avec le système Sec ou Tat.

Malgré que la signification fonctionnelle de cette caractéristique ne soit pas claire, la première différence entre les peptides signaux de type Sec et Tat, consiste en leur longueur.

La longueur des peptides signaux Tat est considérablement plus importante que celle des peptides signaux Sec, pouvant varier entre 26 et 58 acides aminés en moyenne, tandis que comme nous l'avons mentionné précédemment, la taille moyenne des peptides signaux Sec varie entre 18 et 26 acides aminés. L'étude plus en détail des trois régions du peptide signal, montre que cette différence de taille est due à l'allongement des domaines N et H chez les peptides signaux Tat. La disparité dans la taille, mais aussi dans la charge, fournit à ces régions des caractéristiques physico-chimiques particulières, dont le rôle est d'orienter la prise en charge du précurseur par le système de sécrétion approprié.

Tout comme son homologue de type Sec, la région N de type Tat est hydrophile et chargée positivement. Chez les peptides signaux Tat, cette région présente de 5 à 24 acides aminés, comparativement de 1 à 5 acides aminés trouvés chez les peptides signaux Sec (Cristóbal *et al.*, 1999).

Comme chez les peptides signaux Sec, la région H du peptide signal Tat est hydrophobe et non polaire, tout en étant considérablement plus longue. Ainsi la séquence d'acides aminés peut atteindre entre 12 et 20 chez le peptide signal Tat, comparativement à entre 7 et 15 acides aminés chez le peptide signal Sec.

Mis à part sa longueur, la région H des peptides signaux de type Tat présente une autre différence par rapport à celle des peptides signaux Sec. En effet, du à la prépondérance de glycine et thréonine au détriment de leucine, la région H de type Tat est moins hydrophobe. Cette caractéristique empêche probablement un précurseur de type Tat d'emprunter la voie Sec : l'hydrophobicité du domaine H devient ainsi une propriété essentielle pour la discrimination des précurseurs, puisque, par ailleurs, il a été démontré qu'il est possible de rediriger un précurseur Tat vers le système Sec uniquement en augmentant l'hydrophobicité relative de cette région (Cristóbal *et al.*, 1999).

La caractéristique la plus remarquable du peptide signal de type Tat est située à la limite des régions N et H. Il s'agit de la séquence consensus qui correspond au motif (S/T)-**R-R-x-F-L-K** (Berks, 1996). Dans ce patron, les arginines consécutives sont invariables et s'avèrent essentielles pour l'exportation ; par ailleurs, il a été observé que la substitution de la première arginine l'inhibe partiellement (Nivière *et al.*, 1992), tandis que les autres résidus de la séquence consensus sont présents dans 50% des cas (Berks, 1996).

La région C du peptide signal de type Tat est de taille similaire à son homologue Sec et présente aussi le site typique de clivage de la signal peptidase, A-X-A. Néanmoins, le peptide signal Tat, présente fréquemment une proline en position -6 par rapport au site de clivage (Cristóbal *et al.*, 1999). Ce phénomène est tout à fait incompatible avec les précurseurs de type Sec. En effet, la présence de résidus chargés près du site de clivage peut s'avérer néfaste pour la sécrétion Sec mais, la présence d'une charge dans cette région, ne semble pas être déterminante pour la sécrétion Tat (Stanley *et al.*, 2000), autrement que par l'empêchement d'un précurseur Tat d'interagir avec le système Sec.

2.3.3.2 Composantes du système Tat

Chez *E. coli*, les gènes du système Tat sont organisés en deux opérons, *tatABCD* et *tatE* (Figure 3), (Berks *et al.*, 2000). Les gènes *tat* ont été retrouvés dans plusieurs génomes bactériens (Berks *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2002).

TatA/B/E

TatA, TatB et TatE sont des protéines intégrées dans la membrane. Il a été suggéré qu'avec TatC, ces protéines forment un canal encastré dans la membrane. Ce canal, éventuellement la translocase, pourrait atteindre un diamètre interne d'au moins 60Å pour permettre le passage des protéines repliées (Berks *et al.*, 2000). TatA serait la principale sous-unité de la chambre de translocation (Berks, 2000).

TatA partage une homologie de 60% avec la séquence de TatE. Cette homologie expliquerait que TatA et TatE peuvent se substituer mutuellement pour la sécrétion, puisqu'il a été démontré qu'uniquement le double mutant *delta tatAE* semble l'inhiber complètement (Sargent *et al.*, 1998). Par ailleurs, ces deux protéines partagent 25% d'homologie avec TatB.

TatA, TatB et TatE, présentent chacune un segment transmembranaire dans leur extrémité N-terminale (figure 3), ce domaine est suivi d'une région amphiphatique riche en résidus basiques qui interagirait avec les charges négatives des phospholipides membranaires. L'extrémité C-terminale de TatA/B/E est située dans le cytoplasme, sa séquence est peu conservée et de taille variable (Berks *et al.*, 2000).

TatC

TatC est constituée par six segments transmembranaires avec ses deux extrémités terminales situées du côté cytoplasmique (figure 3). Cette protéine présente une région de 15 acides aminés très conservés, ce qui suggère que TatC reconnaisse le doublet d'arginines des précurseurs Tat par des interactions électrostatiques (Berks *et al.*, 2000), elle pourrait d'ailleurs agir comme le récepteur membranaire du précurseur. Chez *E. coli*, les résultats des expériences de co-immunoprécipitation des protéines Tat, privilégient l'hypothèse du canal membranaire formé par TatA/B/E/C. Apparemment, TatC est étroitement liée avec TatB, en effet, ces deux protéines sont présentes dans les mêmes proportions et toutes les deux sont nécessaires pour le fonctionnement adéquat du système Tat (Sargent *et al.*, 1999).

TatD

La dernière protéine de ce système, TatD est une désoxyribonucléase cytoplasmique dont la fonction dans la sécrétion est à présent inconnue (Wexler *et al.*, 2000).

2.3.3.3 Énergie de translocation

À différence du système Sec qu'utilise l'énergie de l'ATP pour la translocation, le système Tat se servirait exclusivement de la force proton motrice.

Si l'hypothèse du pore de translocation Tat était vraie, l'utilisation du gradient de protons (Δp) poserait le problème de l'étanchéité, ainsi, le pore de translocation devrait forcément comporter deux « portes » imperméables aux protons, une de chaque côté du canal, qui ne s'ouvriraient jamais simultanément (Berks *et al.*, 2000).

2.3.3.4 Le système Tat chez les Gram positif

Peu d'informations concernent les bactéries Gram positives comme *Bacillus* sp. et *Streptomyces* sp..

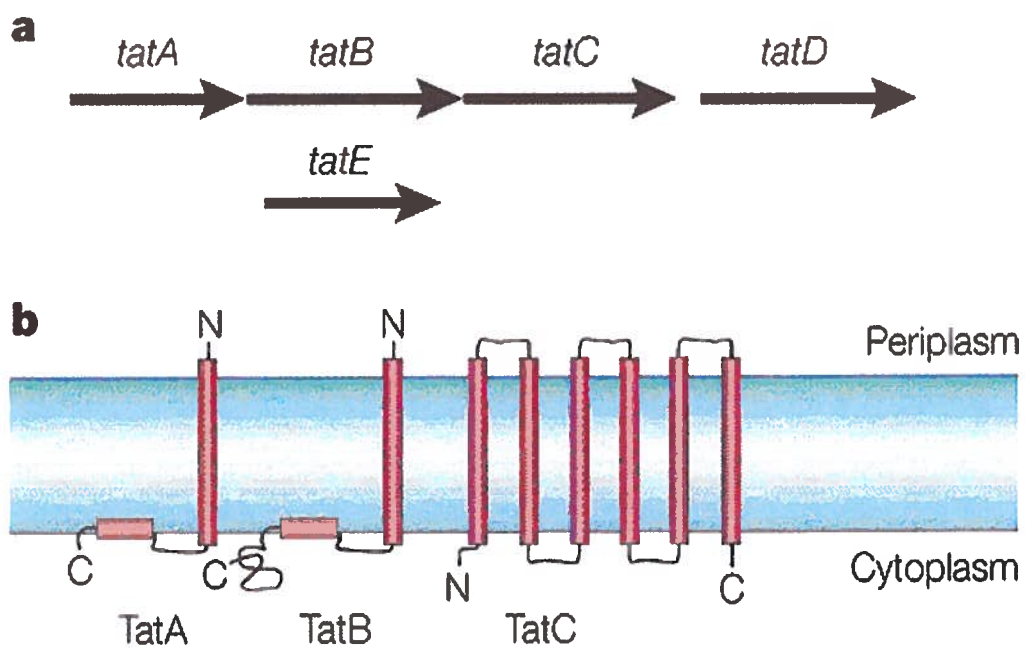
Bien qu'en général, les organismes possèdent une copie de TatC et deux copies de TatA/B/E, chez *Bacillus subtilis* deux copies du gène *tatC*, *tatCd* et *tatCy* et trois copies du gène *tatA*, *tatAd*, *tatAy* et *tatAc* ont été identifiées, (Jongbloed *et al.*, 2000), parmi ces protéines, TatCd et TatCy sont déterminantes pour la spécificité du substrat. Ces protéines forment deux complexes Tat distincts : TatAd-TatCd et TatAy-TatCy, la fonction de TatAc est néanmoins inconnue (van Dijl *et al.*, 2002). Il a été démontré, par ailleurs, que chez *B. subtilis* la sécrétion d'au moins une protéine est Tat dépendante, il s'agit de la phosphodiesterase, PhoD (Jongbloed *et al.*, 2000).

Chez *Streptomyces coelicolor*, les gènes *tatA*, *tatB* et *tatC* ont été identifiés et chez *S. lividans* un système Tat est également retrouvé. Celui-ci contient une copie du gène *tatC* et deux copies des homologues *tatA/E/B* (Schaerlaeckens *et al.*, 2001). Le système Tat des *Streptomycètes* semble important physiologiquement puisque, les mutations Δ *tatB* et Δ *tatC* affectent le phénotype des mutants de *S. lividans* (Schaerlaeckens *et al.*, 2004).

Figure 3. Système Tat.

a) Organisation des gènes *tat* de *E. coli*. Les gènes *tatA*, *tatB*, *tatC* et *tatD* sont organisés en opéron.

b) Organisation membranaire des protéines Tat pour former le canal de sécrétion. La protéine homologue de TatA, TatE n'est pas représentée dans le graphique.



2.4 Les streptomycètes

2.4.1 Généralités

Les *Streptomycètes* sont des bactéries non pathogènes du sol. Leur habitat étant un milieu complexe composé de matière organique de sources diverses, ils ont développé une stratégie de vie tout aussi élaborée. La germination d'une spore produit un mycélium. Le mycélium est un amas de filaments entrecroisés, non septés qui comportent plusieurs copies de l'information génétique. Ce premier mycélium est appelé basal, mais lorsque l'espace et les ressources commencent à manquer, les filaments se développent de façon verticale donnant naissance au mycélium aérien pour finalement produire des spores comme résultat d'une carence aiguë de ressources (Kieser *et al.*, 2000).

Les *Streptomycètes* sécrètent de nombreuses molécules, dont plusieurs sont largement utilisées dans le domaine de la médecine, l'agriculture et l'industrie. En effet, ils sont des excellents sécréteurs d'antibiotiques : autour du 60% des antibiotiques connus ont leur origine chez diverses espèces de ce groupe bactérien.

Par ailleurs, les *Streptomycètes* se retrouvent parmi les principaux organismes responsables de la dégradation de la matière organique du sol. Cette matière étant composée principalement de débris végétaux, il n'est pas étonnant qu'ils produisent principalement des enzymes de dégradation comme les xylanases, cellulases et protéases. La sécrétion de xylanases a été longtemps étudiée à cause de son application pratique dans l'industrie des pâtes et papiers pour le bioblanchiment de la matière première.

2.4.2 Système xylanolytique de *Streptomyces lividans*

Le xylane est la principale composante des hémicelluloses du bois. Ce polysaccharide complexe est un polymère de molécules de D-xylose liées par les liens beta-1,4 susceptibles d'être hydrolysés par des xylanases.

Plusieurs microorganismes secrètent un ensemble de xylanases qui agissent en tandem pour dégrader le xylane : le produit de sa dégradation par une xylanase devient le substrat pour une autre, permettant ainsi la dégradation complète du xylane et l'obtention de molécules de xylose assimilables.

C'est le cas pour *S. lividans*, chez qui on a trouvé trois gènes de xylanase *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* (Kluepfel *et al.*, 1990 ; Kluepfel *et al.*, 1992 ; Morosoli *et al.*, 1986 ; Shareck *et al.*, 1991). En absence du substrat, toutes les trois enzymes sont sécrétées à niveau basal, mais lorsque le substrat est disponible la XlnB et XlnC agissent en premier pour dégrader le xylane. L'action de ces deux enzymes produit des oligosaccharides de 11 molécules de xylose et plus ; ces molécules, qui par leur taille ne peuvent traverser la membrane, signaleraient indirectement à la cellule, la présence de xylane dans le milieu pour induire l'expression des gènes *xlnB* et *xlnC*. La XlnA est alors produite pour dégrader ces oligosaccharides et obtenir des molécules assimilables (Arhin *et al.*, 1994).

Selon Pagé *et al.*, 1996, la XlnA est sécrétée par le système Sec, la XlnB semble être également Sec dépendante. Par contre, des récentes études ont montré que la XlnC, qui arbore un peptide signal avec la séquence consensus RR, est sécrétée exclusivement par le système Tat (Faury *et al.*, 2004).

2.4.3 La sécrétion de protéines chez *Streptomyces albus*

Streptomyces albus n'a pas fait l'objet de nombreuses études portant sur la sécrétion de protéines. Par contre, comme cela a été indiqué précédemment, les gènes impliqués dans la réponse au stress et leur régulation sont amplement caractérisées chez *S. albus*. L'importance de cette espèce dans les études de sécrétion, réside dans l'implication probable des protéines de choc thermique dans le transport des précurseurs vers la membrane ainsi que dans leur repliement cytoplasmique.

En ce qui concerne la présence de xylanases natives de *S. albus*, une seule étude fait référence à la production de xylanase extracellulaire pour le bioblanchiment de pâte à papier (Antonopoulos *et al.*, 2001), sans toute fois être très concluante.

3 Objectifs

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet des mutations de protéases et chaperonnes sur les systèmes Sec et Tat de sécrétion de protéines.

Plus spécifiquement, nous avons essayé de comprendre le rôle de certaines protéases et chaperonnes dans les systèmes de sécrétion Sec et Tat chez *Streptomyces lividans* et chez *Streptomyces albus*.

4 Matériel et méthodes

4.1 Souches bactériennes

Les caractéristiques des diverses souches mutantes utilisées sont résumées dans l'Annexe A.

4.1.1 Mutants protéase négatifs

Plusieurs espèces du genre *Streptomyces* sont largement utilisées pour la production industrielle d'antibiotiques et autres molécules. Ces bactéries Gram positives sont très prisées pour leur capacité de produire des protéines recombinantes et de les sécréter directement dans le surnageant de culture. Si cette caractéristique facilite la récupération et la purification du produit, leur inclination naturelle à sécréter de nombreuses protéases limite leur utilisation dans un processus industriel.

Une équipe de chercheurs de la firme Cangene Corporation a caractérisé plusieurs protéases extracellulaires dont deux ayant une activité amino-terminale. La première est une tripeptidyl amino peptidase (Tap) et la deuxième une serine protéase (Ssp) homologue de la subtilisine BPN'. L'interruption de ces gènes a permis l'obtention de plusieurs souches mutantes dont trois nous ont été fournies.

Afin de déterminer l'effet de certaines protéases sur les systèmes de sécrétion bactériens, nous avons utilisé ces trois souches dont les caractéristiques sont résumées dans l'Annexe A.

4.1.1.1 Caractérisation de la protéine Tap

Il a été souvent observé de l'activité protéolytique amino-terminale dans le surnageant de culture de *S. lividans*. Ainsi, la croissance des colonies sur le substrat chromogénique

Gly-Pro-Leu-beta-naphthylamide a révélée une activité tripeptidique élevée procédant à partir de l'extrémité N-terminale des polypeptides. La protéase sécrétée de 55-kDa, hydrolyse les tripeptides mais ne montre aucune activité sur des substrats contenant un mono ou un dipeptide. Par ailleurs, sa caractérisation biochimique montre qu'il s'agit d'une serine protéase qui est inhibée par le phényle méthyle sulfonyl fluoride (PMSF).

Le gène *tap* a été interrompu en utilisant le plasmide d'intégration pINT (Butler *et al.*, 1992). Ce plasmide, dérivé de pUC, arbore le gène de résistance au thiostrepton *tsr* pour la sélection des colonies ainsi que le gène *xyIE* pour le criblage sur le substrat de la catéchol dioxygénase en plus du fragment *Bgl*III homologue à une région interne du gène *tap*, pour favoriser la recombinaison. Le mutant obtenu a été appelé No.7 (Butler *et al.*, 1995).

4.1.1.2 Caractérisation de Ssp

Afin de découvrir d'autres aminopeptidases, le mutant 7 *tap*⁻ a été utilisé pour le criblage d'une librairie génomique de *S. lividans* 66. Ceci a donné lieu à la caractérisation de l'aminopeptidase Ssp « *Streptomyces subtilisin-like protease* », homologue de la subtilisine BPN'. Ssp est une protéase de 45-kDa qui, comme la subtilisine, est sécrétée sous forme d'un précurseur inactif. L'activité enzymatique de Ssp s'est révélée dépendante du Ca⁺ et inhibée par le PMSF et l'EDTA, confirmant sa nature de serine protéase.

Comme précédemment, l'utilisation du vecteur d'intégration pINT a permis d'obtenir une souche avec une double mutation *tap*⁻ et *ssp*⁻ ; cette souche a été appelée No.12. Elle présente une activité aminopeptidique résiduelle comparativement à la souche 7 et à la souche sauvage (Butler *et al.*, 1996).

Le troisième mutant, No.17, est aussi le résultat d'une ou plusieurs interruptions de protéases sécrétées. La compagnie Cangene maintient la confidentialité sur la nature exacte des mutations de la souche 17.

4.1.2 Mutants chaperonne négatifs

Chez les *Streptomycètes*, la réponse aux chocs thermiques a été étudiée afin d'analyser l'implication des HSP, « Heat Shock Protein », dans la différenciation morphologique et physiologique.

Il a été largement démontré que les protéines comme DnaK (HSP70) et GroEL (HSP60) agissent comme chaperonnes favorisant l'assemblage ou le repliement adéquat d'autres protéines. Par ailleurs, certaines évidences suggèrent que les HSP de petite taille comme HSP18 agissent comme chaperonnes moléculaires dans des événements de repliement de protéines, néanmoins, leur rôle chez les bactéries reste méconnu.

Chez *Streptomyces albus*, deux gènes homologues de *groEL* ont été identifiés. Il s'agit de *groEL1* et *groEL2*. *groEL1*, forme un opéron avec *groES* et produit deux protéines, HSP58 et Cpn18. Cpn18 est identique à l'extrémité N-terminale de HSP58 tandis que *groEL2* code uniquement pour HSP56 (Mazodier *et al.*, 1991 ; Servant et Mazodier, 1995). *S. albus* possède aussi une HSP18 qui s'est avérée indépendante de Cpn18 (Servant et Mazodier, 1995).

Le groupe de recherche de Mazodier à l'Institut Pasteur à Paris, a effectué l'interruption des gènes *groEL1* et *hsp18* de *S. albus*. Les mutants résistants au thiostrepton, nous ont été envoyés de même que la souche sauvage *S. albus* WT.

Nous avons utilisé ces mutants afin de déterminer l'effet des chaperonnes GroEL et HSP18 sur les systèmes bactériens de sécrétion des protéines, Sec et Tat.

4.2 Milieux de culture et conditions de croissance

La composition et préparation de tous les milieux utilisés, sont détaillées dans l'appendice C. L'hygromycine est utilisé en concentration de 50µg/ml pour les cultures liquides et de 250µg/ml pour les milieux solides.

4.2.1 Milieux liquides

4.2.1.1 TSB « Tryptic Soy Broth » sans dextrose

Ce milieu est utilisé afin d'obtenir une croissance mycélienne rapide. Généralement, ces cultures sont utilisées pour isoler l'ADN plasmidique.

4.2.1.2 Milieu minimal M14

Milieu utilisé pour déterminer la production de xylanase par les différents transformants. Généralement, une source de carbone y est ajoutée en proportion de 1%, il peut s'agir du xylose ou du xylane d'épeautre d'avoine.

4.2.1.3 Milieu M13

Dans cette étude, le milieu M13 est utilisé pour les mutants qui présentent des difficultés de croissance en milieu M14. Ce milieu, enrichi avec du protéose-peptone et extrait de levures, est généralement utilisé dans les cultures destinées aux expériences de « Pulse-Chase » et dosage enzymatique.

4.2.2 Milieux solides

4.2.2.1 R5

C'est un milieu riche à base de sucrose et acides aminés. Il est utilisé pour la régénération des parois des protoplastes après transformation.

4.2.2.2 Farine de Soja - Mannitol « Soy Flour Mannitol SFM »

Le SFM est le milieu utilisé pour la sporulation chez les *Streptomycètes*.

4.2.2.3 RBB-xylane

Milieu utilisé pour cribler rapidement les colonies par leur activité xylanolytique. Le milieu RBB-xylane est originalement bleu foncé, où le xylane d'épeautre d'avoine a formé des liens covalents avec le colorant « Remazol Brilliant Bleu ».

Lorsqu'une colonie déposée sur ce milieu sécrète de la xylanase, le substrat est hydrolysé pour donner lieu à une zone décolorée autour de la colonie productrice de xylanase.

4.3 Préparation de protoplastes

Les protoplastes sont des cellules individuelles dépourvues de leur paroi cellulaire. Ils sont préparés à partir du mycélium digéré au moyen du lysozyme.

Les spores sont incubées dans 20 ml du milieu TSB (Difco) sans dextrose, pendant 24 heures à 34°C et 240rpm. À partir de cette pré-culture, 3ml servent à ensemer 100 ml de milieu R5 liquide avec glycine à une concentration de 0,5%, cette culture est à son tour incubée pendant 24 heures dans les mêmes conditions. L'utilisation du milieu R5 (Annexe C), permet une croissance rapide de la culture bactérienne. Par ailleurs,

l'incorporation de glycine dans la paroi cellulaire favorise l'action ultérieure du lysozyme.

La culture est répartie dans 4 tubes stériles et centrifugée pendant 15 minutes à 3 000 x g. Après décantation du surnageant, le mycélium est lavé 2 fois avec 20 ml d'une solution de sucrose à 10,3%. À chaque lavage le mycélium est mélangé doucement avec une pipette stérile avant d'être centrifugé à nouveau. À la fin du deuxième lavage les culots sont combinés deux à deux.

Le mycélium est incubé à 30°C durant 60 minutes, dans 20 ml du tampon P (Annexe H) contenant du lysozyme de marque Sigma, à une concentration de 2 mg/ml et stérilisée par filtration sur membrane de 0,2 µm. La formation des protoplastes par l'action enzymatique du lysozyme est suivie au microscope et toutes les quinze minutes, le mycélium est mélangé doucement par aspiration avec une pipette stérile.

Le mycélium résiduel est séparé des protoplastes par filtration sur laine de verre stérile. Les protoplastes sont finalement lavés au tampon P et centrifugés à deux reprises à 3 000 x g pendant 10 minutes.

La concentration de protoplastes par millilitre a été déterminée par la lecture de la densité optique à 600 nm. Ils sont ensuite distribués par 100 µl et congelés à -80°C.

La viabilité des protoplastes est testée en étalant 50 µl de la suspension de protoplastes sur une plaque de Pétri contenant du milieu R5 et leur régénération est confirmée par l'apparition de colonies.

4.4 Manipulation d'ADN

4.4.1 Préparation de l'ADN plasmidique des *Streptomycètes*

La lyse alcaline est utilisée pour la préparation de l'ADN plasmidique. Dans un premier temps la lyse des parois cellulaires est effectuée avec du lysozyme, après éclatement des cellules, l'ajout d'une solution très alcaline (pH 12) dénature l'ADN chromosomique, puis, l'addition d'une solution acide (pH 5) favorise la dénaturation des protéines. Finalement, l'ADN est précipité à l'éthanol 95%.

Le tiers d'une colonie sert à ensemer 10 ml de milieu TSB (Difco, sans dextrose) dans des Erlenmeyer de 125 ml. La culture est incubée à 34 °C à 240rpm pendant 48 heures.

Dans un tube Eppendorf, 1,5 ml de culture sont récoltés et centrifugés pendant deux minutes à 18 000 x g. Le surnageant est ensuite décanté par aspiration.

Un volume 300 µl de solution I (Annexe I) avec lysozyme à une concentration de 4mg/ml, est ajouté à chaque culot de mycélium. Les culots sont resuspendus au vortex et incubés à 37°C pendant 30 minutes.

400 µl de solution II (Annexe I) fraîchement préparée, sont ajoutés dans chaque tube en prenant soin de mélanger tout de suite par inversion. Cette solution doit agir pendant 10 minutes.

Ensuite, 400 µl de solution III (Annexe I) sont ajoutés à leur tour et les tubes sont placés sur la glace pendant 10 minutes.

Après 15 minutes de centrifugation à 18 000 x g, 1ml de surnageant est précipité par 2 volumes d'éthanol 95% et incubé 15 minutes à température de la pièce ; les échantillons sont centrifugés à 18 000 x g et leur surnageant est décanté par aspiration.

Les culots sont lavés avec de l'éthanol 70% et après décantation, les culots sèchent à l'air pendant 5 minutes. Une fois que tout l'éthanol est évaporé, les culots sont suspendus dans 50 µl de tampon TE et conservés à -20°C.

4.4.2 Digestion enzymatique

Cette technique est utilisée pour libérer un fragment d'ADN, soit pour vérifier sa présence dans une colonie par électrophorèse, soit pour le récupérer à des fins de clonage.

Le volume final de la digestion est généralement de 20 µl où la préparation d'ADN a été diluée afin de respecter la proportion de 1 unité d'enzyme pour 1µg d'ADN. La digestion se réalise pendant 1 heure à 37°C en présence de tampon OPA « One For All », selon les instructions du fabricant.

4.4.3 Migration de l'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN résultant de la digestion, sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le produit de la digestion est additionné de 4µl de tampon de chargement et chargé dans un puits d'un gel d'agarose à 0.7%, pour migrer pendant 1 heure à 100V, vis-à-vis du standard d'ADN 1-kb Ladder.

Afin de visualiser les molécules d'ADN, 0.5µg/ml de bromure d'éthidium est ajouté pendant la préparation du gel. Ce produit, qui s'intercale entre les bases de l'ADN, a la propriété de briller lorsque illuminé avec des rayons UV.

Une fois la migration terminée, les gels sont exposés aux UV dans une chambre GelDoc (Bio-Rad) pour la prise d'une photo des bandes d'ADN.

S'il est nécessaire d'extraire l'ADN de l'agarose à des fins de clonage, le gel sans bromure d'éthide peut être découpé après la migration à la hauteur désirée.

4.4.4 Extraction de l'ADN du gel d'agarose

Afin d'extraire les molécules d'ADN contenues dans un fragment de gel d'agarose, la trousse commerciale QiaexII (Quiagen) a été utilisée.

La première étape consiste à solubiliser l'agarose, pour ensuite favoriser l'adsorption des molécules d'ADN à la surface des billes de silica gel et l'élimination des impuretés. Finalement l'élution de l'ADN se fait par lavage des billes avec une solution à faible teneur en sels.

4.4.5 Ligation

Par cette technique on vise introduire une séquence d'ADN appelée insert à un endroit précis d'un vecteur.

Les préparations de l'insert et du vecteur sont digérées séparément avec les mêmes enzymes. Le produit des deux digestions est mélangé tout en respectant le ratio 3 : 1 pour les quantités d'insert et de vecteur utilisées.

La ligation s'effectue en présence de 1µl d'ATP 10mM, 2.5 unités de Ligase T4 et 1µl de tampon OPA « One For All », avec de l'eau distillée pour compléter le volume final à 10µl.

4.5 Transformation et sélection des transformants

La transformation consiste à introduire l'ADN plasmidique dans des protoplastes. Le milieu utilisé, le R5 (appendice C) est un milieu riche qui favorise la régénération de la paroi cellulaire. La sélection des transformants se réalise avec l'antibiotique dont le plasmide porte le gène de résistance, dans ce cas l'hygromycine.

Le mélange pour transformation a été préparé en ajoutant stérilement le mélange de ligation dans 50 µl d'une suspension de protoplastes. Deux cents µl de PEG 25% (polyéthylène glycol) ont servi à homogénéiser le tout et à favoriser l'entrée de l'ADN dans les cellules. Après une attente de 2 minutes ce mélange a été étalé stérilement avec des billes en verre sur 3 plaques Pétri de milieu R5.

La sélection des transformants a été réalisée 20 heures plus tard, par l'addition de 250µg/ml d'hygromycine dilués dans de l'eau distillée stérile. 1.5 ml d'eau ont été nécessaires pour recouvrir aisément une boîte Pétri. Les premières colonies étaient attendues deux jours plus tard.

4.6 Préparation de spores

La sporulation est effectuée sur milieu solide SFM (Annexe C) à 30°C pendant 10 jours. Les spores sont récoltées à raison de 4ml de glycérol 20% pour 3 plaques. Le tapis de spores est gratté doucement avec une pipette et la suspension est conservée pour être réutilisée sur un nouveau Pétri. La suspension de spores est ensuite agitée violemment avec des billes de verre afin de disperser les spores. Cette suspension est ensuite filtrée sur laine de verre pour éliminer le mycélium.

La concentration de spores est déterminée par la lecture de la densité optique à 660 nm. Les spores sont par la suite congelées à -20°C pour leur conservation.

4.7 Détermination de l'activité xylanolytique

L'activité enzymatique des xylanases présentes dans le surnageant de culture est déterminée par la méthode des sucres réducteurs en utilisant l'acide dinitrosalicylique « DNS », (Miller, 1959). L'activité enzymatique est exprimée en unités internationales

(UI). Une unité internationale est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 μ mole de sucres réducteurs à 60°C pendant une minute.

La courbe standard est établie avec des concentrations de xylose variant de 0 à 2 μ moles. Une solution fraîche de xylane de bouleau 1% sert de substrat pour l'enzyme. Pour les détails sur les solutions utilisées dans cette expérience se référer à l'Annexe D.

Chaque éprouvette avec 500 μ l de la solution de xylane 1%, 300 μ l d'eau et 100 μ l de tampon citrate-phosphate est pré-incubée à 60°C pendant 3 minutes.

Un volume de 100 μ l d'une dilution appropriée de surnageant de culture y est ajoutée et l'enzyme est incubée avec le substrat pendant 10 minutes à 60°C. La réaction catalytique est arrêtée par l'ajout de 1ml de « DNS ».

Les éprouvettes servant de témoins sont traitées de la même façon que les échantillons mais l'addition de l'enzyme s'effectue après l'ajout du « DNS ».

Le même volume de « DNS » a aussi été ajouté dans chaque éprouvette de la courbe standard avant de placer tous les tubes dans un bain en ébullition pendant 15 minutes pour développer la couleur. L'activité enzymatique de chaque échantillon est déterminée à partir de la lecture de la densité optique à 540 nm.

4.8 Détermination de la croissance du mycélium

4.8.1 Mesure de l'ADN total

Cette technique permet de déterminer la croissance cellulaire par la réaction colorimétrique de l'ADN avec la diphenylamine, (Burton, 1956).

Les culots de mycélium obtenus après centrifugation des échantillons de 1ml de culture prélevés au cours du temps, sont conservés à 4°C avec 500 µl de tampon SSC 1X (15mM NaCl, 15mM citrate de sodium). Les culots sont écrasés avec un petit « potter » en plastique et transférés dans des éprouvettes. 500 µl de SSC 1X sont ajoutés à chaque échantillon ainsi que 1 ml d'acide perchlorique 20%, 2 ml de diphénylamine 4% préparée dans l'acide acétique glacial et finalement 200 µl d'acétaldéhyde 0,16%. Après mélange les échantillons sont couverts et incubés pour une nuit à 30 °C.

Le lendemain 1ml de chaque échantillon est centrifugé et la densité optique de l'échantillon est mesurée au spectrophotomètre. La croissance est exprimée par la différence de densité optique mesurée à 595 et 700nm.

Le témoin est composé de 1ml de SSC 1X avec les réactifs mentionnés.

4.9 « Western Blotting »

L'expérience de « Western Blotting » (Towbin et *al.*, 1979) permet de détecter la présence d'une protéine par sa réaction avec des anticorps. Cette expérience se réalise en trois étapes consécutives. La première consiste à séparer les protéines selon leur poids moléculaire pour ensuite les transférer sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle elles peuvent être détectées par des anticorps.

Pour cette expérience, 20µl de surnageant de culture sont utilisés.

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à une concentration de 12,5%, en présence de SDS, « SDS-PAGE » (Laemmli, 1970), avec l'ensemble Mini-Protean II de Bio-Rad. Le gel de regroupement contient 4% de polyacrylamide (Annexe F). Le regroupement s'effectue pendant 10 minutes à 90V suivi de la séparation pendant 45 minutes à 200V.

Le transfert des protéines du gel sur la membrane s'effectue au moyen d'un courant électrique en milieu semi-humide dans l'appareil Multiphor II Nova Blot de Pharmacia.

Trois couches de papier filtre 3MM trempées préalablement dans le tampon de transfert « Continuous Buffer System » (Annexe F) sont empilées et déposées sur l'anode humidifiée ; la membrane de nitrocellulose de 0.45 μm , trempée dans le même tampon, est placée au dessus du papier et recouverte par le gel. Finalement, trois autres épaisseurs de papier trempé sont ajoutées à la pile. L'ensemble est recouvert par la cathode humidifiée. Le transfert se déroule à 8mA par cm^2 pendant une heure. Une fois le transfert terminé, les membranes sèchent à l'air libre pendant 5 minutes.

À l'exception des anticorps primaires qui sont des anticorps spécifiques anti-XlnA , anti-XlnB ou anti-XlnC, les principaux réactifs utilisés dans cette expérience, ainsi que le protocole général, proviennent d'une trousse commerciale, « BM Chromogenic Western Blotting kit, AP, mouse/rabbit », fabriquée par la compagnie Roche. Cette trousse comprend la solution de blocage concentrée, le mélange d'anticorps secondaires et la solution de révélation.

La solution de blocage 1% (v/v) est diluée selon les instructions du manufacturier, dans une solution d'acide maléique 100mM et NaCl 150mM, pH ajusté à 7.5 avec du NaOH.

La mixture d'anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline, est préparée avant chaque utilisation en diluant le mélange d'anticorps dans la solution de blocage 1% en proportion 1 : 200 v/v.

La solution de révélation fournie est utilisée tel quelle. Cette solution comporte un pigment qui colore la phosphatase alcaline couplée aux anticorps secondaires, pour mettre en évidence la protéine.

Par ailleurs, les anticorps spécifiques anti-XlnA, anti-XlnB ou anti-XlnC ont aussi été dilués dans la solution de blocage 1% (1 : 2000 v/v), avant leur utilisation.

Les nombreux lavages s'effectuent avec TBST (Annexe G) à température de la pièce et sous agitation.

Une fois que tous les réactifs ont été préparés, chaque membrane est incubée avec 30ml de la solution de blocage 1%, pendant 30 minutes sous agitation. La mise en présence des anticorps primaires se déroule pendant toute une nuit à 4°C, cette incubation est suivie de 4 lavages de 10 minutes avec 30 ml de TBST.

Par la suite, l'incubation de la membrane avec les anticorps secondaires se déroule pendant 30 minutes à 20°C sous agitation, la membrane est ensuite lavée pendant 15 minutes avec 30 ml de TBST à 4 reprises.

Finalement, la révélation des résultats se fait avec 6 ml de révélateur pendant 30 minutes à température de la pièce. La réaction est arrêtée par le rinçage de la membrane à l'eau distillée.

4.10 Suivi de la maturation du précurseur « Pulse-Chase »

L'expérience de « Pulse-Chase » permet de suivre le devenir d'une protéine depuis sa synthèse jusqu'à sa destination finale. Elle consiste à effectuer un court marquage avec un acide aminé radioactif, suivi d'une dilution avec le même acide aminé non radioactif, ce qui arrête le marquage. Finalement, l'échantillonnage à des temps prédéterminés permet d'observer la disparition progressive du précurseur et l'apparition de la protéine mature dans le surnageant de culture. Cette expérience se déroule à 34°C sous agitation constante à 240 rpm (Morosoli et Dupont, 1999).

Dans un Erlenmeyer de 125 ml, 20 ml de milieu M14 sontensemencés avec 2×10^6 spores/ml et 50µg/ml d'hygromycine ; le flacon est incubé à 34°C et 240 rpm. Afin d'assurer une bonne croissance bactérienne le milieu de culture a été enrichi avec du

protéose-peptone (1mg/ml) et extrait de levures (0,5 mg/ml). Dépendant de la croissance de chaque souche, une culture de 48 h ou 72 h est utilisée. Entre 3 et 5 ml de mycélium sont récoltés par culture. Le mycélium est lavé à deux reprises avec du milieu M14 frais (dépourvu de protéose-peptone et d'extrait de levures) ; par la suite, ce mycélium est repris dans du milieu M14 jusqu'à rétablir le volume initial de 20 ml et homogénéisé avec un « potter » en verre.

Cinq millilitres de mycélium ainsi préparés sont utilisés pour le marquage. Du xylose est ajouté comme source de carbone, à une concentration finale de 1%. L'étape de « Pulse » commence 5 minutes plus tard. Cette étape consiste à ajouter à la culture de la méthionine marquée au S^{35} à une concentration de 200 μ Ci/ml. Toutes les protéines synthétisées désormais vont incorporer de la méthionine radioactive. Ce processus est arrêté 2 minutes plus tard grâce à l'ajout de 40 μ l d'un mélange de L-méthionine et L-cystéine non-radioactives à une concentration de 10mg/ml. Une plus grande proportion de ces dernières par rapport à la méthionine radioactive, provoque compétition dans l'incorporation et par conséquent l'arrêt du marquage. Simultanément, 50 μ l de BSA « boeuf serum albumin » à une concentration de 5mg/ml sont ajoutés à la culture. Le BSA favorise la précipitation des protéines.

L'étape de « Chase » commence alors. Elle consiste à prélever des échantillons à des temps prédéterminés. Chaque échantillon (500 μ l) est tout de suite précipité avec 500 μ l de TCA 10% (acide trichloracétique) et incubée à 4°C pendant 30 minutes. Le TCA dénature les protéines de la membrane et arrête le processus de sécrétion ; il favorise également la précipitation des protéines présentes dans le milieu extracellulaire.

Finalement, les échantillons sont centrifugés à 18 000 x g et le surnageant est décanté par aspiration.

Afin d'éliminer le TCA, les culots sont par la suite incubés pendant 15 minutes dans 1 ml d'acétone à deux reprises, chaque période d'incubation étant suivie de 2 minutes de

centrifugation à 18 000 x g et de la décantation du surnageant. Finalement l'acétone résiduelle est évaporée.

Les échantillons ont ensuite été suspendus dans 1 ml de tampon SP (Annexe E), 40µl de Tris 1M, 40µl de l'inhibiteur de protéases *Complete*™ 25X (Boehringer Mannheim), 10µl de PMSF (100mM dans l'isopropanol), 100µl de sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% et environ 250 mg de billes de verre de 0,1 mm de diamètre. Les échantillons sont traités avec le FastPrep™ de Q-BIOgene, à une vitesse de 6,5 m/sec pendant 45 secondes. Cette étape permet de casser les cellules pour récupérer les précurseurs.

Une fois les cellules cassées, les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes pour solubiliser les protéines. Par la suite une centrifugation de 5 minutes à 18 000 x g, permet de récupérer le surnageant qui contient maintenant autant la phase intracellulaire (précurseurs) que extracellulaire (protéine mature).

Le surnageant est dilué dans 12 ml de tampon IPD (Annexe E) et incubé pendant 1 heure à 4°C sous agitation avec 30µl d'une suspension de protéine A Sépharose (Sigma) à une concentration de 10%. Cette première incubation sert uniquement à éliminer les protéines qui s'attacheraient de façon non spécifique à la protéine A Sépharose. Les échantillons sont ensuite centrifugés afin d'en conserver le surnageant.

Des anticorps anti-XlnA, anti-XlnB ou anti-XlnC, ont été utilisés pour immunoprécipiter avec la XlnA, XlnB ou XlnC respectivement. Le surnageant de chaque échantillon est mis en présence de 5µl de sérum de lapin contenant les anticorps spécifiques et incubé à 4°C pendant 30 minutes sous agitation.

Par la suite, le complexe protéine-anticorps est précipité par l'entremise de 50µl de protéine A Sépharose 10% . L'incubation avec la protéine A Sépharose s'effectue sous agitation à 4°C pendant 16 heures. Après centrifugation, les billes de Sépharose sont lavées avec du tampon IPW (Annexe E), d'abord avec 10ml et par la suite avec 1ml à deux reprises.

Lorsqu'il était nécessaire d'avoir un échantillon de la protéine mature du surnageant, les échantillons de 0,5 ou 1ml sont prélevés et centrifugés à 18 000 x g pour en conserver uniquement le surnageant. Afin de favoriser l'immunoprécipitation du NaCl est ajouté pour atteindre une concentration finale de 150mM.

De façon similaire aux échantillons dont le mycélium a été conservé, les échantillons du surnageant sont soumis à l'incubation préliminaire avec 30µl de protéine A Sépharose 10%, la mise en présence avec 5 µl d'anticorps et l'incubation définitive avec 50µl de protéine A Sépharose 10%. Finalement, après centrifugation, les billes ont été lavées avec 1ml de tampon IPW à trois reprises.

La séparation des protéines contenues dans les échantillons est réalisée par électrophorèse comme décrit dans la section 4.9.

Un volume de 35µl de tampon de migration 1X est ajouté à chaque échantillon avant de les amener à ébullition pendant 5 minutes. Le surnageant est chargé dans le gel à raison de 30µl par puits.

Une fois la séparation terminée, les gels sont fixés pendant 20 minutes sous agitation, dans un mélange d'isopropanol : eau : acide acétique (25 : 65 : 10 v/v), ils sont incubés ensuite 30 minutes sous agitation, dans le réactif flurographique *Amplify*TM de Amersham Life Science. Cette étape se déroule à 20°C.

Les gels fixés sont déposés sur du papier filtre 3MM et séchés sous vide à 80°C pendant une heure, avant d'être exposés 72 heures dans une cassette à écran sensible à la radioactivité (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Le Phosphor ImagerTM SI de Molecular Dynamics a été utilisé pour numériser les traces laissées par la radioactivité et le logiciel QuantumTM 5.0 du même fabricant, a permis l'analyse des images et la quantification des signaux radioactifs.

5 Résultats

5.1 Caractéristiques des souches mutantes

5.1.1 Caractéristiques des souches protéases négatives de *S. lividans*

La souche sauvage de *S. lividans* sécrète trois xylanases en présence de xylane, son système Sec est responsable de la translocation de la XlnA et XlnB, tandis que la XlnC est dépendante du système Tat pour atteindre le milieu extracellulaire. Puisque les mutations de protéases affectent parfois la sécrétion de protéines, il était envisageable que les mutants dépourvus de certaines protéases aient perdu leur capacité à sécréter des xylanases. Afin de déterminer la capacité naturelle des souches mutantes de sécréter des xylanases, nous avons mis en culture chacune des souches et mesuré l'activité xylanolytique du surnageant.

Nous avons préparé deux groupes de cultures, dans le premier, le xylane a servi de source de carbone comme inducteur de la sécrétion de xylanase. Dans le deuxième, nous avons utilisé une source de carbone neutre comme le xylose, parce que ce sucre est utilisé pour la production d'enzyme par des clones qui hébergent les plasmides à copies multiples contenant les gènes codant pour des xylanases. Les spores ont été incubées dans du milieu M14 et des échantillons ont été prélevés toutes les 24 heures. L'activité xylanolytique du surnageant de culture et la croissance du mycélium ont été déterminées pour chaque souche.

Puisque le mutant 17 ne poussait pas en milieu M14, le milieu M13 a été utilisé. Il est constitué du milieu M14 supplémenté d'extraits de levure et de protéose peptone.

Les résultats de l'activité xylanolytique du surnageant de culture des souches protéases négatives de *S. lividans* ainsi que leur croissance sont présentés dans les figures 4a et 4b.

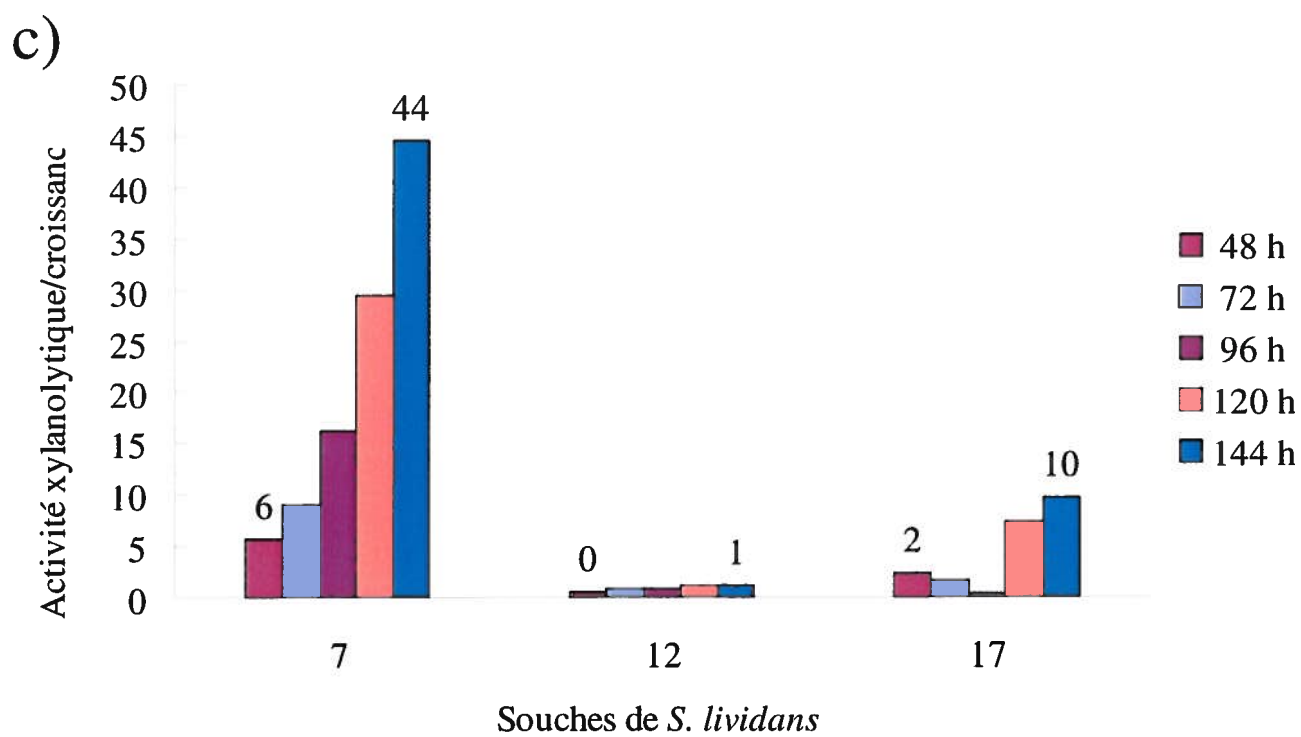
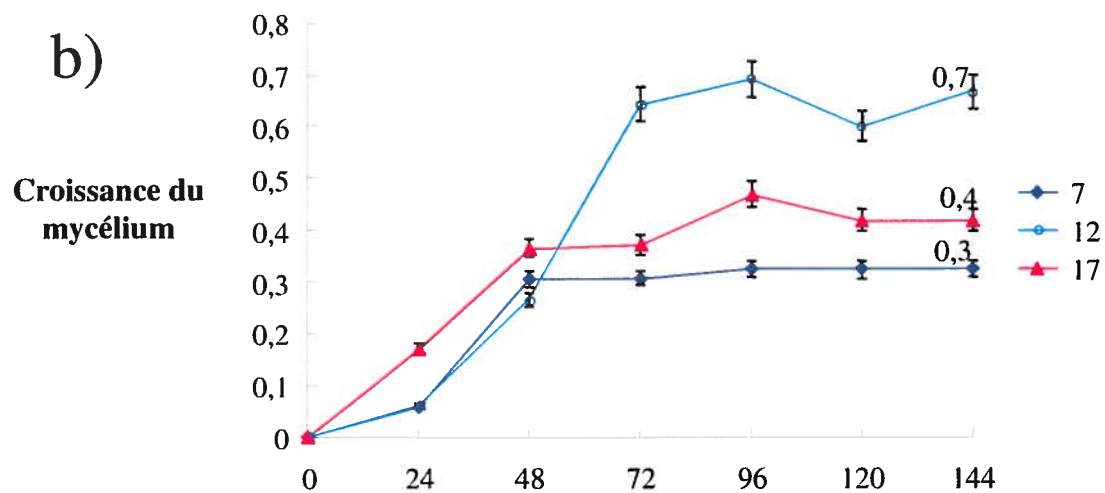
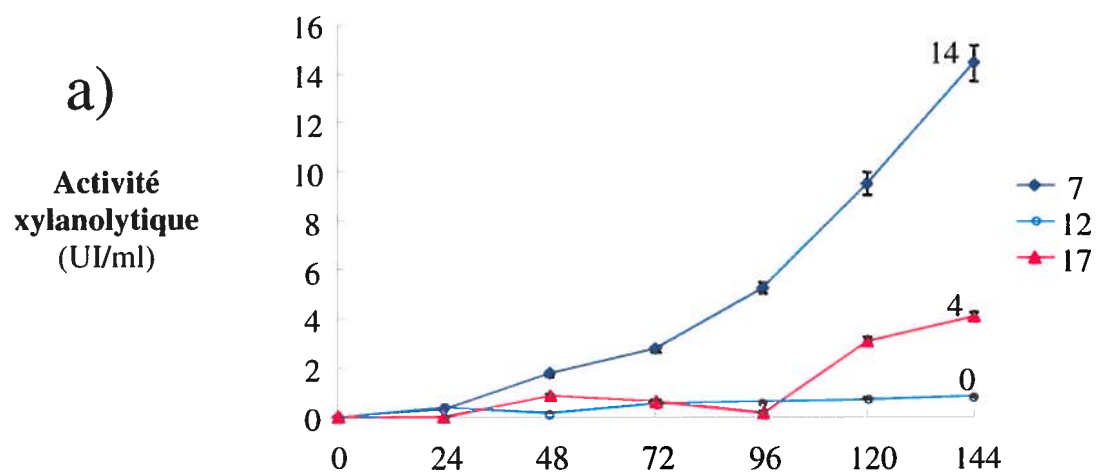
Nous pouvons remarquer que l'activité xylanolytique chez le mutant 7 est la plus importante de toutes, 14 UI/ml à 144 heures, lorsqu'il est cultivé en présence de xylane. Cette activité enzymatique est très similaire à celle de la souche sauvage *S. lividans* 1326 (Kluepfel *et al.* , 1986). Le mutant 17 ne présente qu'une activité de 4 UI/ml pour la même période, tandis que l'activité mesurée chez le mutant 12 est résiduelle (0.8 UI/ml) (figure 4a).

Contrairement à l'activité xylanolytique, la croissance cellulaire va en diminuant et dans l'ordre pour les mutants 12, 17 et 7 (figure 4b).

Afin de tenir compte du facteur de croissance dans la production d'enzyme, nous avons fait le rapport de l'activité enzymatique sur la croissance des souches (figure 4c). Cela ne change pas de manière significative notre appréciation des résultats précédents.

Figure 4. Activité enzymatique et croissance des souches protéase négatives de *S. lividans*

- a. Dosage xylanolytique
- b. Croissance cellulaire
- c. Ratio activité xylanolytique/croissance



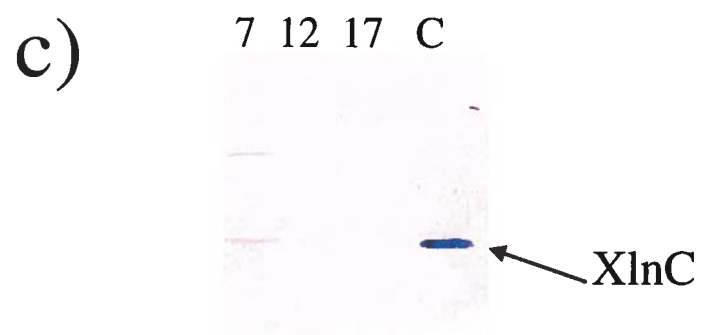
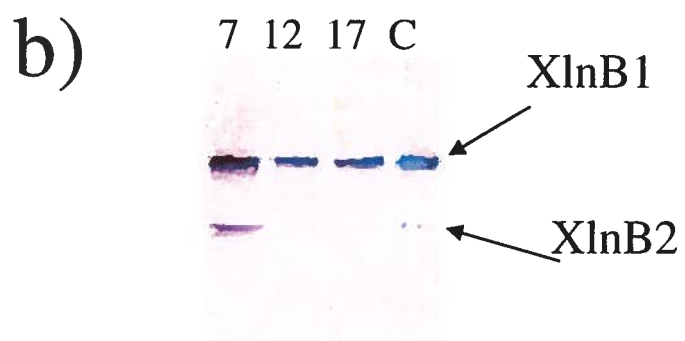
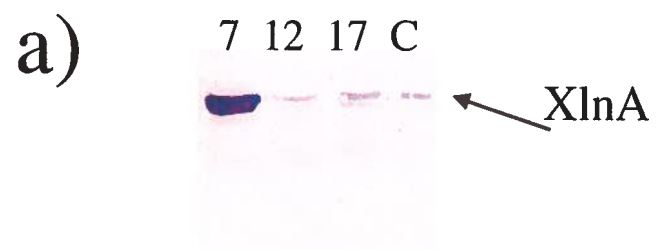
Il se pouvait que la différence d'activité observée soit due à la diminution générale de sécrétion ou bien encore à l'absence d'une xylanase en particulier. En effet, comme les xylanases A, B et C agissent en synergie pour dégrader le xylane, l'absence de l'une ou l'autre d'entre elles aurait pu être la cause de l'effet observé. Afin d'identifier les xylanases sécrétées par les mutants, nous avons effectué des expériences de « Western Blotting » avec le surnageant de culture de chacune des souches qui ont poussé sur xylane.

Les protéines présentes dans les surnageants de culture après 120 heures d'incubation, ont été séparées par électrophorèse et transférées sur membrane de nitrocellulose. Par la suite, les membranes ont été incubées respectivement avec des anticorps spécifiques anti-XlnA, anti-XlnB et anti-XlnC. Les résultats de « Western Blotting » présentés à la figure 5 révèlent la présence de XlnA et B chez tous les mutants. La XlnC est détectable dans le surnageant du mutant 7 tandis qu'elle semble absente dans les deux autres mutants. Toutefois l'absence de XlnC est peut-être à mettre en relation avec le faible niveau d'activité des mutants 12 et 17.

**Figure 5. Mise en évidence des xylanases sécrétées par les souches 7, 12 et 17 par
« Western Blotting »**

- a. Anticorps anti-XlnA
- b. Anticorps anti-XlnB
- c. Anticorps anti-XlnC

C = contrôle de XlnA, XlnB ou XlnC.



Bien que les cultures ayant le xylose comme source de carbone atteignent une croissance similaire à celle observée avec le xylane, comme le prédisaient des résultats antérieurs obtenus avec la souche sauvage, aucune activité xylanolytique a été détectée dans le surnageant de culture des mutants (résultats non montrés). Cette source de carbone va donc pouvoir être utilisée chez les mutants transformés avec un plasmide à copies multiples contenant les gènes de xylanase, sans qu'il y ait d'interférence puisque les gènes chromosomiques de xylanase ne sont pas induits.

L'effet des mutations de protéases sur les systèmes de sécrétion Sec et Tat chez *S. lividans* va donc pouvoir être étudié plus aisément.

5.1.2 Caractéristiques des souches chaperonnes négatives de *S. albus*

Chez les Gram négatifs, la chaperonne SecB intervient activement dans la sécrétion de protéines par le système Sec, par contre, chez les Gram positifs, aucun homologue de SecB n'a été répertorié bien que plusieurs protéines induites suite à un choc thermique semblent intervenir dans la sécrétion de protéines. Par ailleurs, il est reconnu maintenant que les protéines sécrétées par le système Tat sont repliées au moins partiellement dans le cytoplasme, ce qui suggère l'intervention éventuelle de chaperonnes.

Nous disposons de deux mutants de *Streptomyces albus*, dont les gènes de deux chaperonnes avaient été interrompus. Ces gènes, *groEL1* et *hsp18* produisent les protéines de choc thermique, GroEL1 et HSP18, respectivement.

Les souches *S. albus* GroEL1 et *S. albus* HSP18 ont été utilisées pour déterminer l'effet des mutations des gènes *groEL1* et *hsp18* sur les systèmes de sécrétion Sec et Tat. La souche sauvage *S. albus* WT a servi de référence.

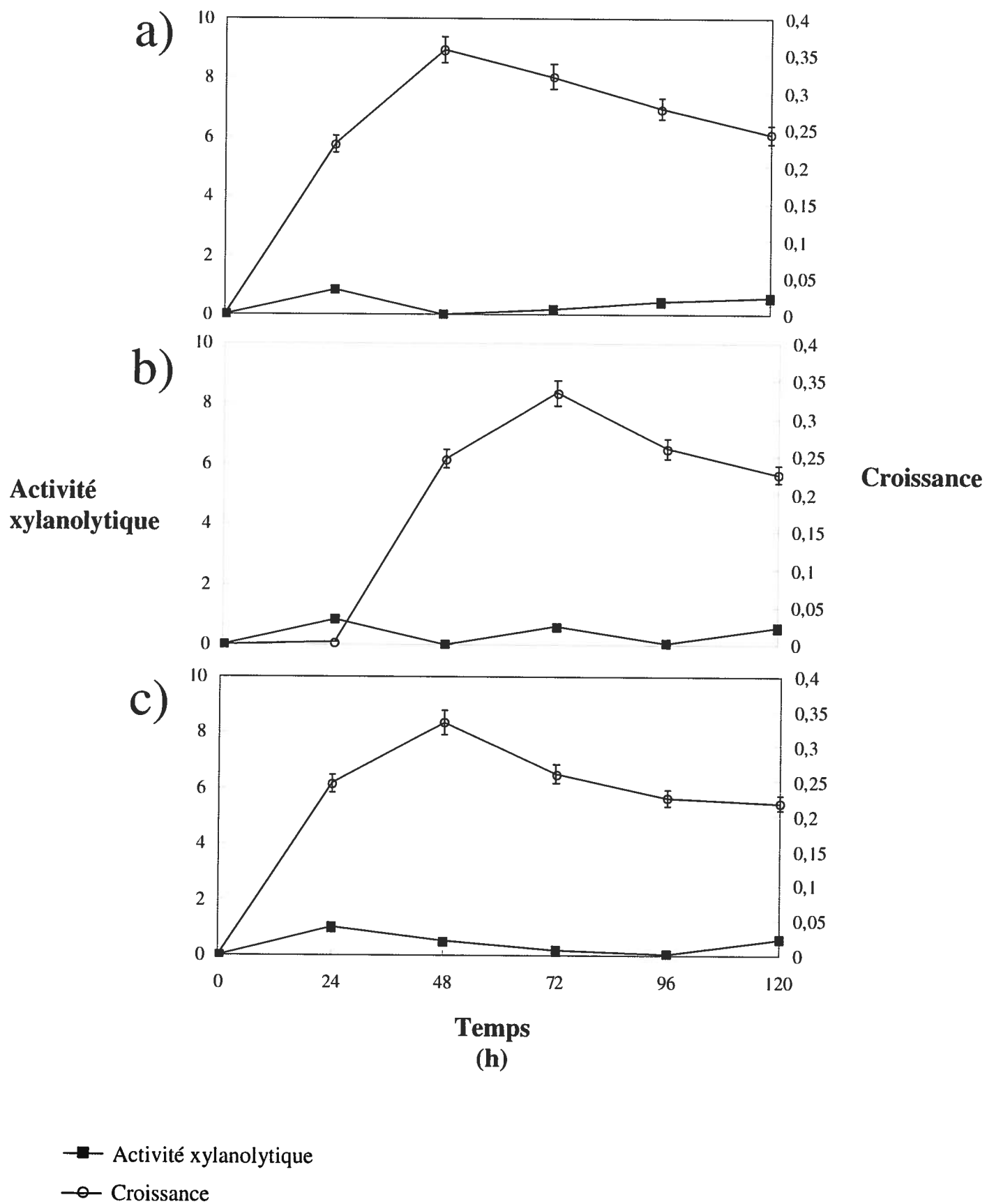
Afin de déterminer la production naturelle de xylanase par *S. albus*, nous avons incubé les spores de toutes les souches dans des flacons individuels de M14, contenant du xylose ou du xylane comme inducteur, pour en mesurer l'activité xylanolytique.

Des essais préliminaires de croissance ont montré que *S. albus* a beaucoup de difficulté à pousser dans le milieu M14. Pour cette raison nous avons utilisé le milieu M13 (milieu M14 additionné d'extraits de levure et de protéose peptone) pour les expériences subséquentes. Ainsi, des nouvelles cultures ont été préparées ayant comme source de carbone le xylane ou le xylose et des échantillons ont été prélevés toutes les 24 heures pour mesurer l'activité xylanolytique et la croissance du mycélium.

Dans la figure 6 nous pouvons constater que bien que la croissance des mutants et du contrôle *S. albus* WT soit semblable, l'activité xylanolytique est presque nulle dans les trois cas.

Figure 6. Activité xylanolytique et croissance de *S. albus*. Le xylane a été utilisé comme source de carbone.

- a. *S. albus* WT
- b. *S. albus* *hsp18*
- c. *S. albus* *groEL*



Étant donné que l'activité xylanase était faible nous avons néanmoins testé si elle pouvait provenir de xylanases plus ou moins homologues aux xylanases de *S. lividans*. Les protéines contenues dans les surnageants de culture ont donc été séparées sur gel et transférées sur des membranes. Les anticorps anti-XlnA, anti-XlnB et anti-XlnC ont été utilisés, mais aucune réaction n'a été détectée avec les surnageants de *S. albus* WT et de ses deux mutants (figure 7). Les résultats démontrent l'absence de molécules homologues aux xylanases de *S. lividans* ce qui ne veut cependant pas dire que *S. albus* ne produit pas de xylanase. Cette souche sécrète peut-être mais en très faible quantité des xylanases qui ne réagissent pas avec les anticorps utilisés dans cette étude.

La faible activité xylanolytique endogène de *S. albus* ainsi que l'absence de molécules homologues aux xylanases de *S. lividans*, nous permettent de poursuivre le projet. Nous avons procédé à la transformation de *S. albus* avec des plasmides à copies multiples contenant les gènes de xylanases de *S. lividans*.

Figure 7. « Western Blotting » du surnageant de culture de *S. albus* WT et les mutants GroEL1 et HSP18.

La source de carbone utilisé est le xylane, sucre inducteur des genes de xylanase.

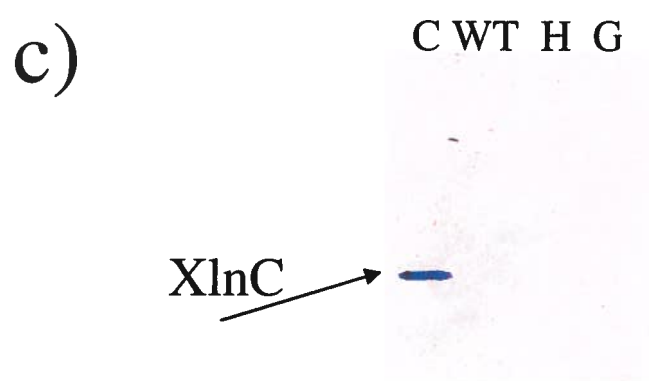
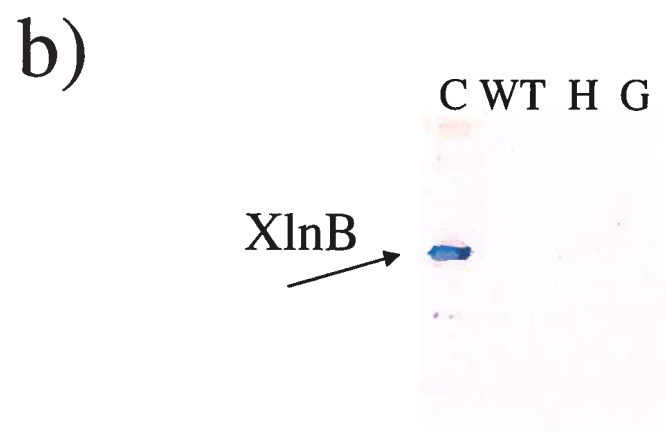
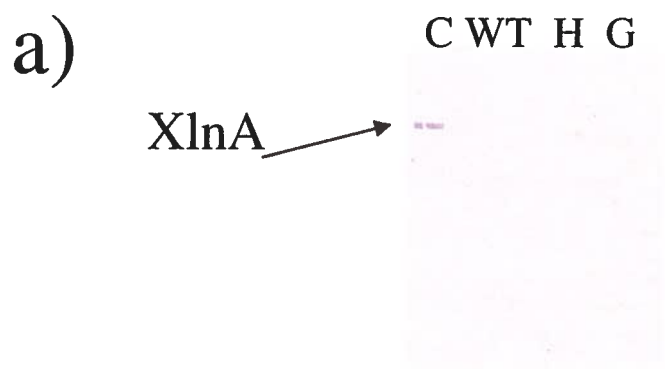
- a. Anticorps anti-XlnA
- b. Anticorps anti-XlnB
- c. Anticorps anti-XlnC

C = contrôle de XlnA, XlnB ou XlnC.

WT = *S. albus* WT, référence

H = *S. albus hsp18*

G = *S. albus groEL1*



5.2 Construction des plasmides pour l'étude de la sécrétion des protéines par le système Sec

Il a été démontré que la XlnA et la XlnB de *Streptomyces lividans* sont sécrétées exclusivement par le système Sec (Pagé *et al.*, 1996). Pour déterminer l'effet des mutations protéases et chaperonnes négatives sur la voie Sec de sécrétion des protéines, nous avons utilisé ces deux enzymes comme modèles. Pour l'expression de *xlnA* pIAF906H et pIAF906 A3H, et pour la sécrétion de XlnB, pIAF SB1 H, on été construits.

5.2.1 Vecteurs d'expression de la XlnA

Le plasmide multicopies pIAF906, résistant au thiostrepton, avait déjà été construit pour l'expression de la XlnA. pIAF906 contient le gène de structure de la XlnA sous le contrôle de son promoteur. Lors de la construction de pIAF906, le site de restriction *HindIII* a été introduit en amont du gène tandis que le site de restriction *SacI* a été situé en 3' du gène, au milieu de la région codant pour le domaine d'attachement au xylane. Ainsi la XlnA produite par ce gène tronqué est de 41-kDa au lieu de 46-kDa. Cependant, au cours du temps, ce qui reste du domaine d'attachement au xylane est progressivement dégradé dans le milieu de culture pour générer la XlnA2 de 31-kDa qui représente uniquement le domaine catalytique. Les principales caractéristiques des plasmides utilisés dans cette étude sont résumées dans l'Annexe B.

Le plasmide pIAF906 contient le gène de résistance au thiostrepton comme marqueur de sélection. Or, les souches mutantes de protéases sont déjà résistantes à cet antibiotique parce qu'elles sont le résultat d'interruptions géniques comportant cette résistance. Pour cette raison, le gène qui confère la résistance au thiostrepton (*tsr*) a été remplacé par le gène de résistance à l'hygromycine (*hyg*) dans tous les vecteurs utilisés dans cette étude construits à partir de pIAF906.

5.2.1.1 Remplacement du gène de résistance au thiostrepton (*tsr*) par celui de l'hygromycine (*hyg*) dans le vecteur pIAF906

Le gène *hyg* avait déjà été amplifié par PCR, donnant un fragment d'approximativement 1200 bp qui a été traité à l'enzyme Klenow pour générer des extrémités franches.

Le vecteur pIAF906 contient trois sites de restriction *NruI* situés dans le gène *tsr* ce qui permet de se débarrasser de ce dernier. Le produit de la digestion *NruI* de pIAF906 a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans chaque cas, la bande du gel correspondante au vecteur a été isolée et purifiée. Le vecteur a été déphosphorylé, pour être ensuite ligué avec le gène *hyg* préparé précédemment et obtenir pIAF906-H.

Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer des protoplastes de *S. lividans* 10-164. Les cellules transformées ont été étalées sur trois plaques de Pétri avec 20 ml de milieu R5 (voir Annexe C). La sélection a été effectuée avec 250 µg d'hygromycine par ml de milieu de culture. Des colonies résistantes à l'hygromycine sont apparues indiquant la présence des plasmides.

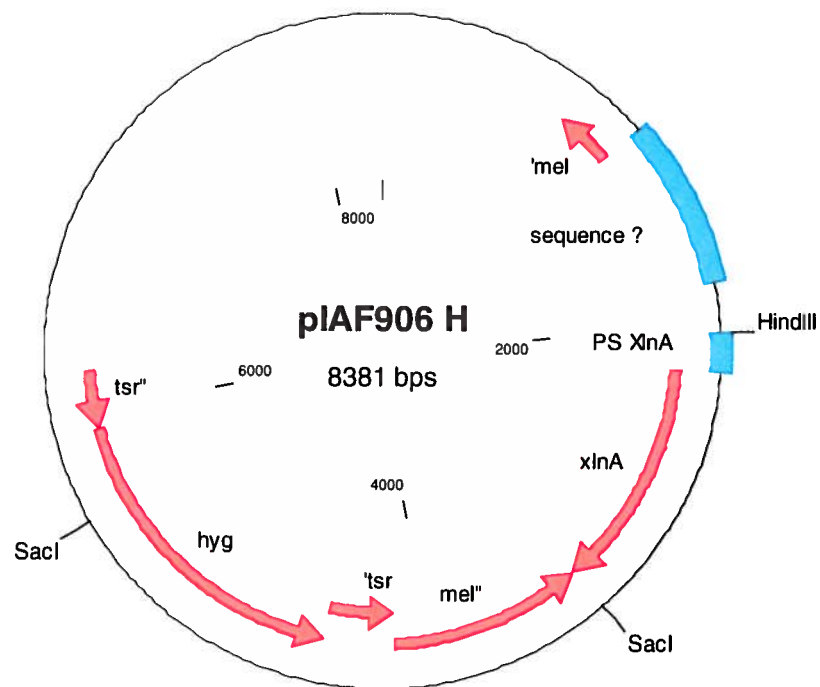
5.2.1.2 Vérification de la présence du plasmide pIAF906-H chez *S. lividans* 10-164

Les colonies ont étéensemencées dans du milieu TSB (Annexe C) et incubées pendant 36 heures. L'ADN plasmidique a été préparé pour être ensuite digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI*. Cette digestion génère trois fragments : un fragment de 1210 pb qui correspond au gène *xlnA* ; le vecteur 4828 pb et une partie du gène *hyg* de 2343 pb. La carte de restriction de pIAF906-H est présentée à la figure 8.

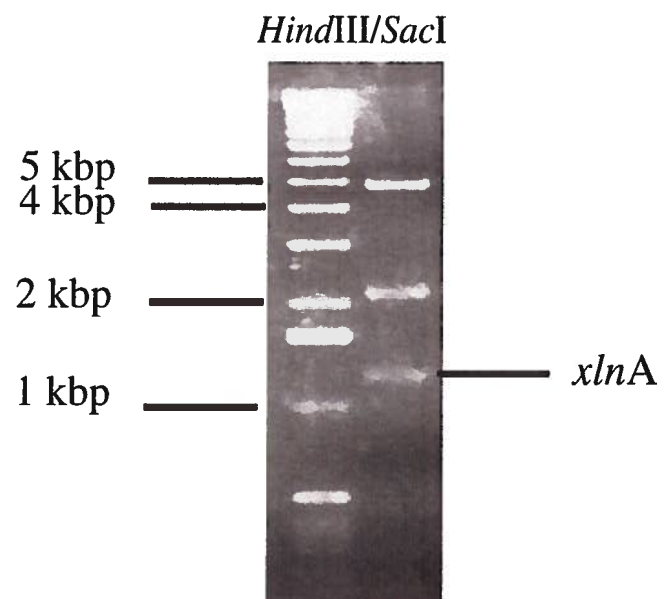
Figure 8. pIAF906H pour l'expression de la XlnA

- a) Carte de restriction de pIAF906H. Ce plasmide comporte le gène de structure de la XlnA (*xlnA*) entouré par les sites *Hind*III et *Sac*I ; le gène *hyg* est représenté avec son propre site *Sac*I.
- b) Séparation sur gel d'agarose du produit de la digestion *Hind*III/*Sac*I de pIAF906H. Le fragment de 1210 pb correspond à *xlnA*.

a)



b)



La présence du plasmide pIAF906-H chez *S. lividans* 10-164 a ainsi été confirmée par digestion enzymatique. Le vecteur contient le gène *hyg* et n'a pas subi de changement pour le reste de la séquence. Ce plasmide a ensuite servi à la transformation des protoplastes de tous les mutants protéases et chaperonnes négatifs.

Construction de pIAF906 A3-H

Chez la XlnA2, le domaine d'attachement au xylane « XBD » est dégradé dans le surnageant de culture. Nous avons voulu vérifier si le domaine catalytique seul, était lui aussi susceptible d'une dégradation protéolytique. Le plasmide pIAF906A3 a été construit, sa particularité est de contenir seulement la partie codante pour le domaine catalytique de l'enzyme. Nous avons appelé la xylanase produite par ce gène XlnA3.

La séquence correspondant à la région catalytique de la XlnA a été amplifiée par PCR avec les amorces CD101 5'-ata tag agc tct cag ccg ttg agt gc et NP20 Bis 5'-cgg agg ttt cga atc acc agt g en utilisant pIAF906 comme matrice. Ces amorces introduisent les sites de restriction *HindIII* et *SacI* en amont et en aval de la séquence du gène.

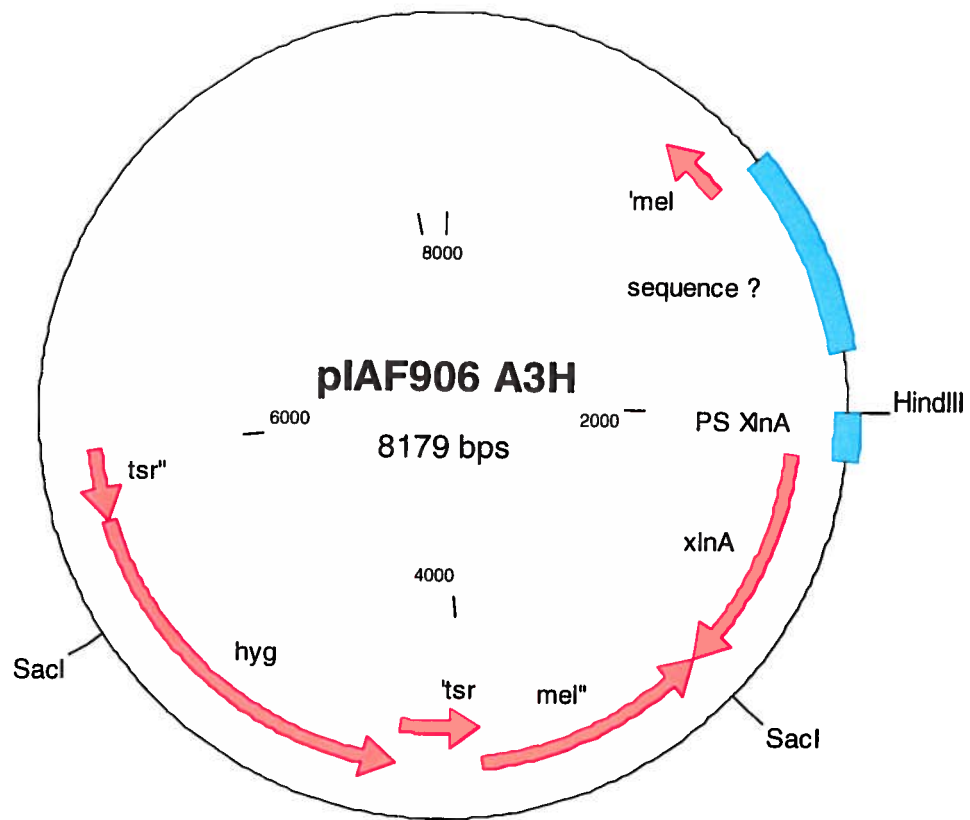
Un fragment d'approximativement 1000 bp a été amplifié et digéré ensuite par les enzymes *HindIII/SacI* avant d'être ligué au vecteur pIAF906 préalablement digéré avec les mêmes enzymes. Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer des protoplastes de *S. lividans* 10-164. Les clones ont été sélectionnés au thiostrepton et le nouveau plasmide pIAF906 A3 a été isolé.

Pour être en mesure d'utiliser pIAF906 A3 avec les souches mutantes, nous avons procédé comme précédemment au remplacement du gène *tsr* par *hyg*. L'élimination du gène *tsr* par digestion *NruI* et la ligation subséquente du vecteur avec le gène *hyg* a donné le plasmide pIAF906 A3-H.

pIAF906 A3-H a servi à transformer les protoplastes de chaque souche protéase négative de *S. lividans*, les transformants ont été sélectionnés à l'hygromycine et la présence du vecteur a été encore une fois vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique. La carte de restriction de pIAF906 A3-H est représentée dans la figure 9. La digestion *HindIII/SacI* de pIAF906 A3-H produit trois fragments : le gène *xlnA* de 1000 bp, le plasmide de 4836 bp et un fragment du gène *hyg*.

Figure 9. pIAF906 A3-H pour l'expression de la XlnA3

Carte de restriction de pIAF906 A3-H. *xlnA* est entouré des sites de restriction *HindIII/SacI*. Le gène de résistance à l'hygromycine *hyg* est aussi représenté.



5.2.2 Vecteurs d'expression de la XlnB

Comme la XlnA, la XlnB de *Streptomyces lividans* est dépendante du système Sec pour sa sécrétion. *S. lividans* produit deux formes de XlnB : la XlnB1 de 32-kDa, qui comporte la région catalytique et le domaine d'attachement au xylane, et la XlnB2 de 21-kDa, dépourvue de ce dernier. Ce phénomène se produit spontanément chez la souche sauvage.

5.2.2.1 Construction de pIAF SB1 mut3-H

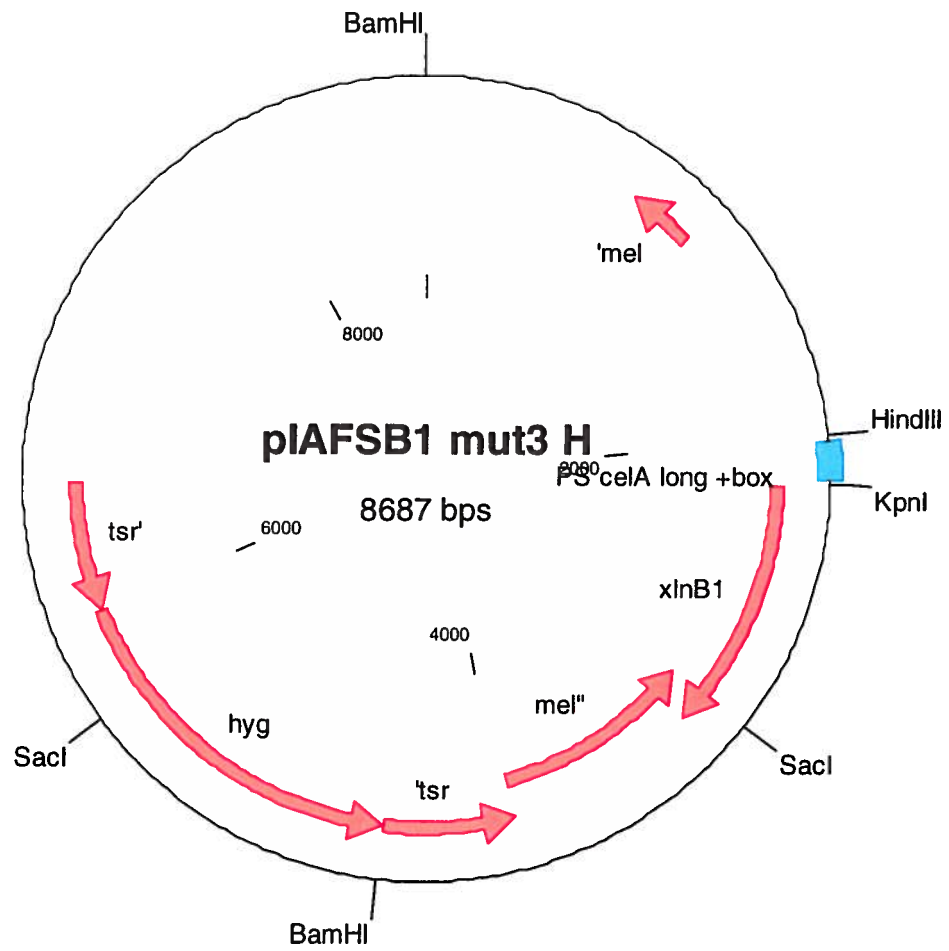
Afin de déterminer si les protéases mutées étaient responsables du clivage du « XBD » de la XlnB1 chez *S. lividans*, nous avons ajouté la résistance à l'hygromycine dans un vecteur d'expression de la XlnB1 déjà existant.

pIAF SB1 mut3 arbore le gène *xlnB*, mais la présence d'un site *NruI* dans la séquence de *xlnB* nous a obligé à utiliser une nouvelle stratégie pour le clonage de *hyg*.

pIAF SB1 mut3 possède un seul site *EcoRV* dans sa séquence, ce qui permettait de linéariser le plasmide ; après digestion *EcoRV*, le vecteur a été déphosphorylé pour être ensuite ligué avec le gène *hyg* traité avec l'enzyme Klenow. Le plasmide résultant est pIAF SB1 mut3-H. Le mélange de ligation a servi à transformer les protoplastes de *S. lividans* 10-164. La digestion *HindIII/SacI* de pIAF SB1 mut3-H produit trois fragments dont le gène *xlnB* de 1100. La carte de restriction de pIAF SB1-H est présentée dans la figure 10. Une fois que la présence de pIAF SB1-H a été confirmée chez la souche contrôle *S. lividans* 10-164 par digestion *HindIII/SacI*, le plasmide a servi à transformer les souches protéase négatives.

Figure 10. Carte de restriction de pIAF SB1 H pour l'expression de la XlnB

Les gènes *xlnB* et *hyg* sont représentés.



5.3 Résultats de la sécrétion par le système Sec chez *Streptomyces lividans*

Le système de sécrétion de protéines Sec, se caractérise par sa capacité de transloquer à travers la membrane des précurseurs linéaires. Ce le cas des XlnA et XlnB de *S. lividans* qui sont sécrétées exclusivement par cette voie et qui servent de modèle pour son étude.

Afin de déterminer les effets des mutations de protéases et chaperonnes sur le système Sec, nous avons construit et utilisé des plasmides multicopies avec les mutants de protéases et chaperonnes. La construction de ces vecteurs arborant les gènes *xlnA* et *xlnB* a été décrite dans le sous-chapitre précédent, maintenant, nous allons présenter les résultats obtenus suite à l'expression de ces vecteurs par les souches protéase et chaperonne négatives.

5.3.1 Sécrétion de la XlnA2 par les mutants protéase négatifs

Le plasmide pIAF906H a été utilisé pour transformer les souches mutantes 7, 12 et 17. Les souches poussent donc en présence d'hygromycine mais il était nécessaire de vérifier l'intégrité du plasmide pour poursuivre les expériences. Après transformation, le plasmide s'est retrouvé intact dans chaque souche mutante.

5.3.1.1 Détermination de l'activité enzymatique

Pour savoir si les mutations affectent la production d'enzyme nous avons en premier lieu mesuré l'activité enzymatique retrouvée dans le surnageant de culture au cours de la croissance. Cette estimation peut déjà nous donner une idée du niveau de production des souches.

Les souches ont été cultivées et l'activité xylanolytique du surnageant de culture a été déterminée. Comme nous pouvons observer dans la figure 11, l'activité enzymatique est

inférieure chez les mutants protéases négatifs de *S. lividans* comparée à la souche contrôle *S. lividans* pIAF906H. À 120 heures d'incubation, lorsque toutes les souches ont atteint leur croissance maximale, l'activité xylanolytique de *S. lividans* pIAF906H est de 67 UI/ml tandis que celle des mutants 7, 12 et 17, n'est que de 17.54, 7.86 et 12.00 UI/ml, respectivement (figure 11).

Plus en détail, à 120h l'activité xylanolytique chez le mutant 7 équivaut au 26% de celle du contrôle (figure 12a), il représente le pourcentage le plus élevé de tous les mutants ; par contre, sa croissance de 85% par rapport au contrôle, est légèrement inférieure au contrôle au même intervalle de temps (figure 12b).

Chez le mutant 12 c'est le cas contraire (figures 12a et 12b). L'activité xylanolytique est la moins importante de toutes, 12% à 120 heures, bien que son développement dépasse de 29% celui du contrôle à la même période.

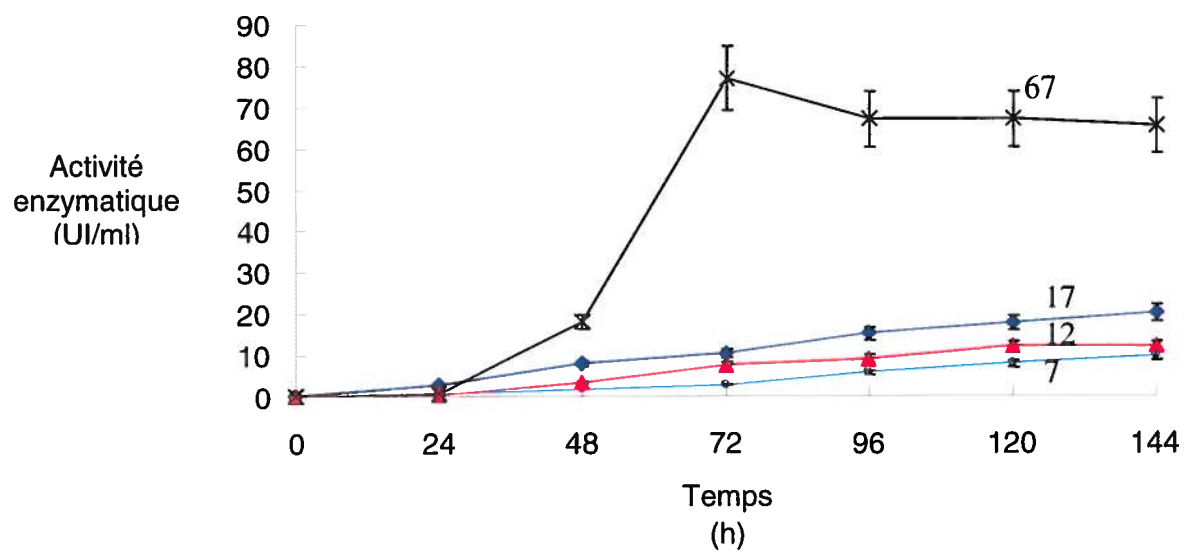
À 120h d'incubation, l'activité xylanolytique et la croissance chez le mutant 17 représentent le 18% et le 124% de celles du contrôle, respectivement (figures 12a et 12b). Cependant il faut considérer que le dosage enzymatique et la croissance ont pu être influencés à cause du milieu de culture M13 utilisé au lieu de M14. En effet, ce mutant ne poussait pas bien dans le milieu M14.

Figure 11. Dosage enzymatique et croissance des souches transformées avec pIAF906H.

Les résultats obtenus avec le contrôle 10-164 et les mutants protéases négatifs 7, 12 et 17 de *S. lividans* transformés avec pIAF906H pour la production de la XlnA, sont représentés.

- a. Dosage enzymatique. L'activité xylanolytique est exprimée en UI/ml.
- b. Courbe de croissance. La croissance du mycélium a été déterminée par la méthode colorimétrique de la diphénylamine.

a)



b)

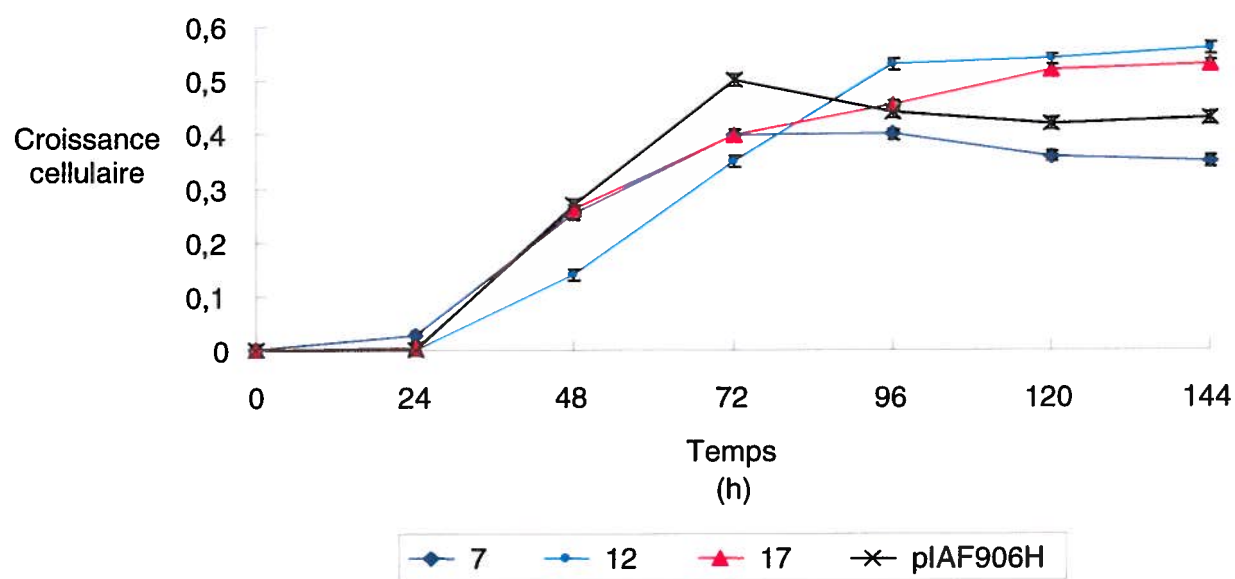
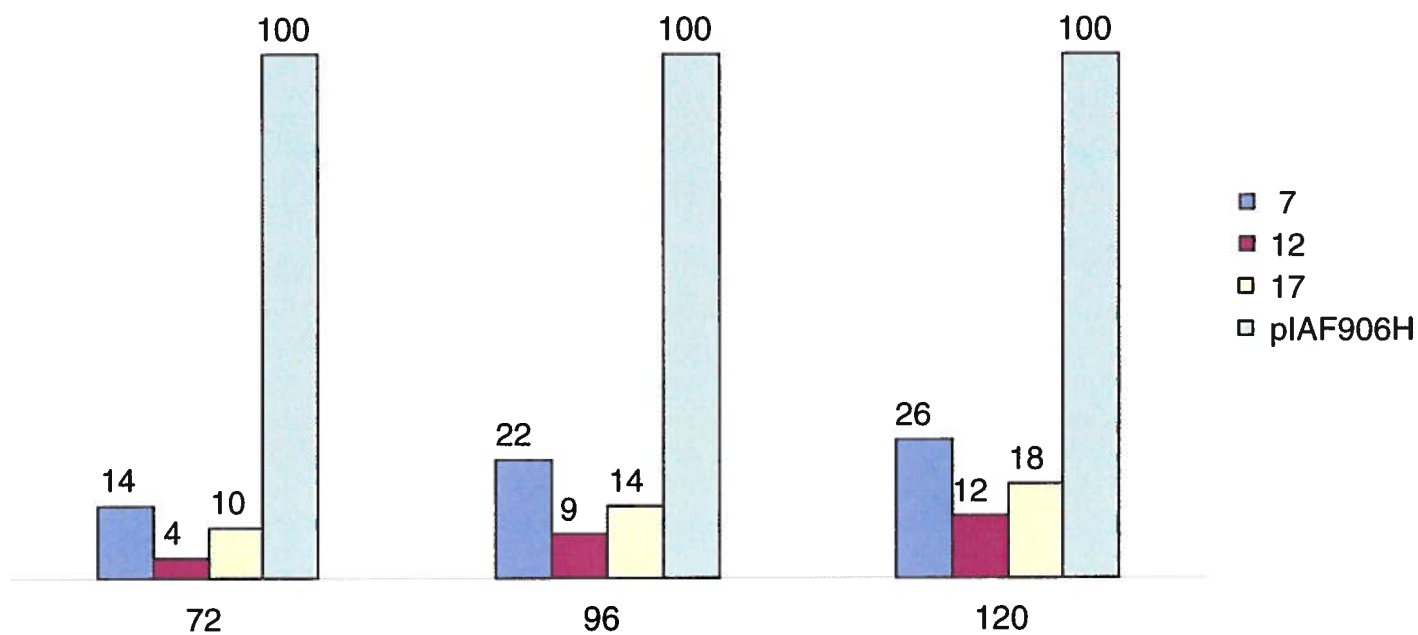


Figure 12. Calcul de la proportion de l'activité enzymatique des souches

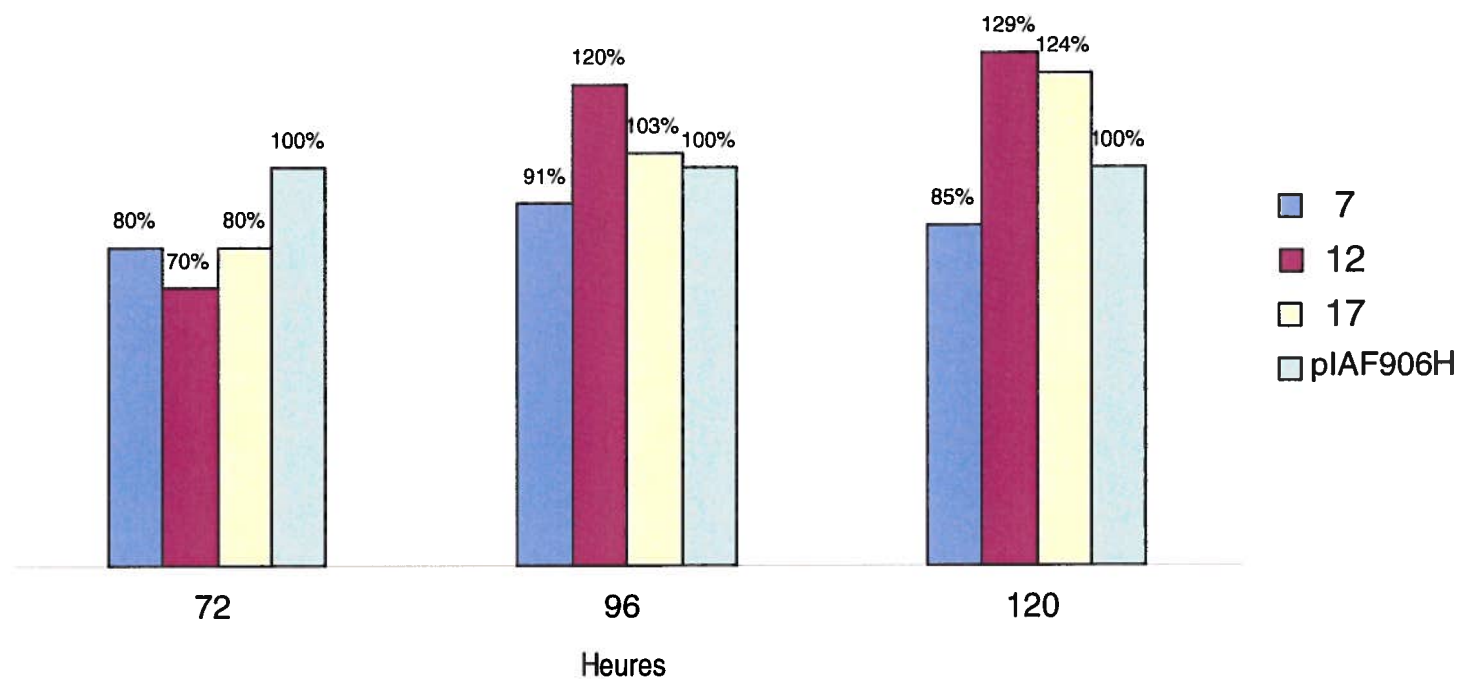
L'activité xylanolytique chez les mutants 7, 12 et 17 de *S. lividans* transformés avec pIAF906H a été comparée à celle de *S. lividans* pIAF906H. Cette dernière a été considérée arbitrairement comme le 100%.

- a. Activité enzymatique
- b. Croissance du mycélium

a) Activité enzymatique (%)



b) Croissance (%)



5.3.1.2 Estimation de la quantité de XlnA2 sécrétée

Il se pouvait que la quantité de XlnA produite soit identique dans tous les clones mais que pour une raison ou une autre, la XlnA sécrétée par les mutants soit mal repliée et donc inactive dans une certaine proportion.

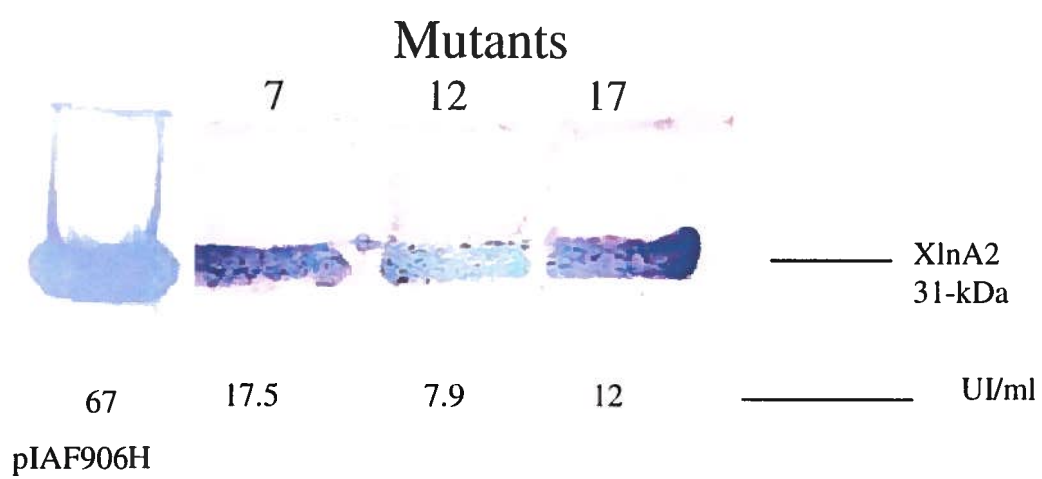
Afin de comparer la quantité de XlnA2 sécrétée par le clone de référence *S. lividans* pIAF906H, avec les mutants protéase négatifs, des expériences de « Western Blotting » ont été effectuées. Nous avons utilisé le surnageant de culture de chacune des souches après 120h d'incubation dans le milieu M14.

Les protéines de 20 µl de surnageant ont été séparées par SDS-PAGE et transférées par la suite sur membrane de nitrocellulose. Des anticorps anti-XlnA ont servis à mettre en évidence la XlnA. Les résultats de « Western Blotting » révèlent de façon qualitative, que la quantité de XlnA sécrétée par les mutants est inférieure à celle du contrôle (figure 13). Ces résultats corroborent ceux de l'expérience précédente à savoir qu'il y a réellement moins de XlnA produite par les mutants.

Figure 13. Résultats de « Western Blotting » mettant en évidence la XlnA2.

Pour cette expérience, le surnageant de culture des souches 7, 12 et 17 de *S. lividans* et le clone de référence *S. lividans* après transformation avec le plasmide pIAF906H, ont été utilisés. Les échantillons prélevés à 120h d'incubation sont représentés.

Les anticorps anti-XlnA révèlent la présence de la XlnA2 de 31-kDa, résultante de la dégradation C-terminale de la XlnA1.



5.3.1.3 Suivi de la maturation du précurseur de la XlnA2

Une fois que la diminution d'activité xylanolytique a été expliquée par la diminution de la quantité d'enzyme sécrétée, il fallait déterminer si le processus de sécrétion lui-même n'était tout simplement pas ralenti. Il était nécessaire de comparer la demi-vie du précurseur de la XlnA2 qui est de 1.5 min, avec celle des mutants (Morosoli et Dupont, 1999).

Pour ce faire, des expériences de « Pulse-Chase » ont été effectuées. Des échantillons de cultures marquées brièvement à la ^{35}S -méthionine suivi d'une « Chasse » à la méthionine non marquée, ont été pris au cours du temps afin de déterminer la vitesse de maturation du précurseur. Dans la figure 14, nous pouvons observer clairement que malgré que le précurseur était marqué moins intensément chez les mutants, il est mûri à la même vitesse que dans le contrôle. Après 5 min de « Chasse » le précurseur est entièrement converti en protéine mature, ainsi, le processus de sécrétion ne semble pas avoir été affecté par les mutations de protéases.

5.3.1.4 Mesure de la traduction du gène *xlnA2*

Malgré la diminution dans la quantité d'enzyme sécrétée par les mutants, le processus de sécrétion semblait normal. Cependant certaines protéases sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires indépendamment de la protéolyse, pour cette raison, nous avons considéré que les mutations de protéases pouvaient influencer la traduction de la XlnA. Afin de vérifier cette possibilité, nous avons effectué des expériences de « Pulse-Chase » sur des cultures contenant la même quantité de mycélium.

Des cultures de chaque souche mutante ont été préparées dans du milieu M13. Afin d'obtenir la même concentration de cellules au départ, la mesure de la quantité totale de protéines a été déterminée et les cultures ont été diluées en conséquence. Finalement,

après le marquage, des échantillons ont été pris en quadruplicata, pour mesurer le niveau de marquage du précurseur. Le mutant *S. lividans* pIAF906H a servi de référence.

Figure 14. Résultats de « Pulse-Chase » avec la XlnA sécrétée par les mutants 7, 12 et 17 de *S. lividans*

Cette figure représente le marquage radioactif du précurseur de la XlnA et sa maturation dans le temps par les différentes souches. Les résultats obtenus avec la souche de référence *S. lividans* pIAF906 ont déjà été publiés (Pagé *et al.*, 1996)

p = précurseur
m = mature
sng = surnageant

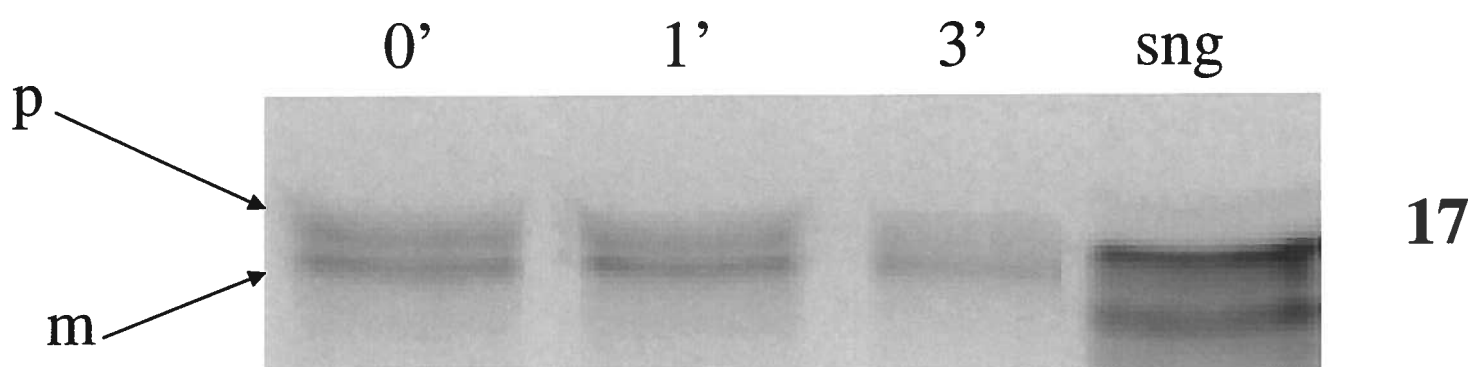
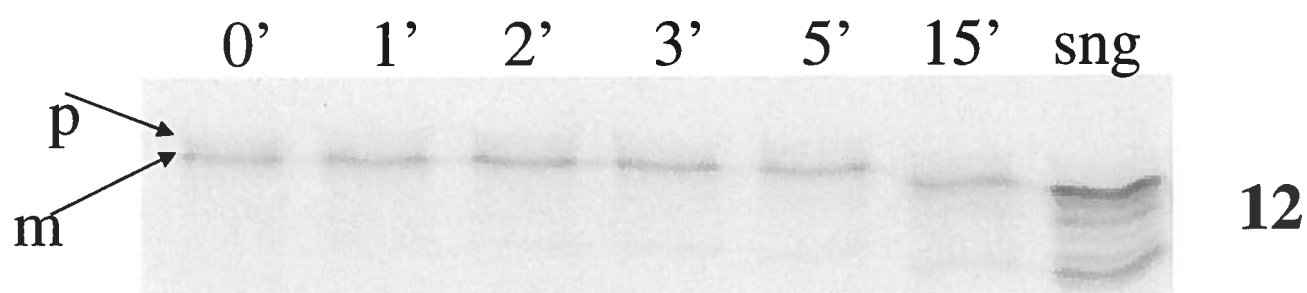
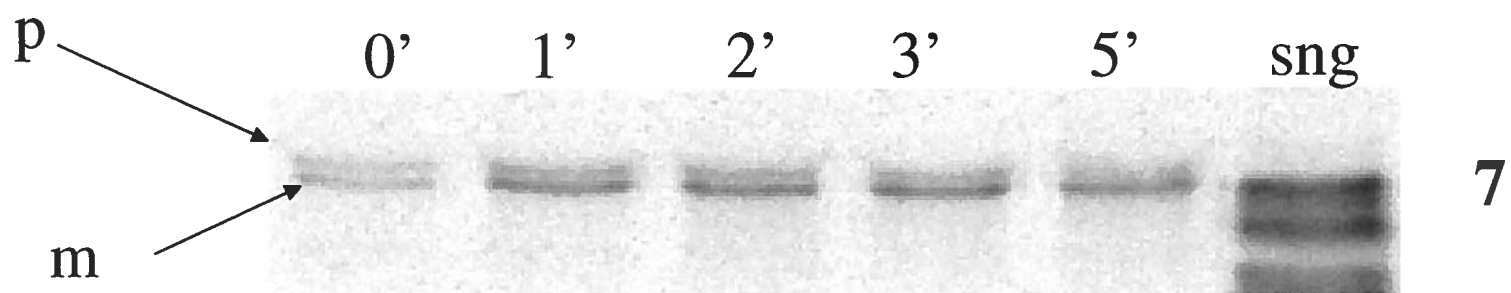
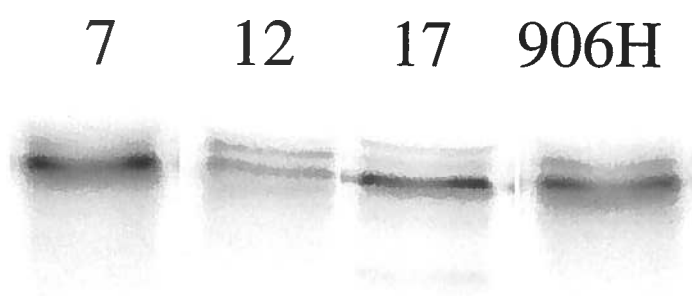


Figure 15. Traduction de la XlnA par les mutants 7, 12 et 17 de *S. lividans*

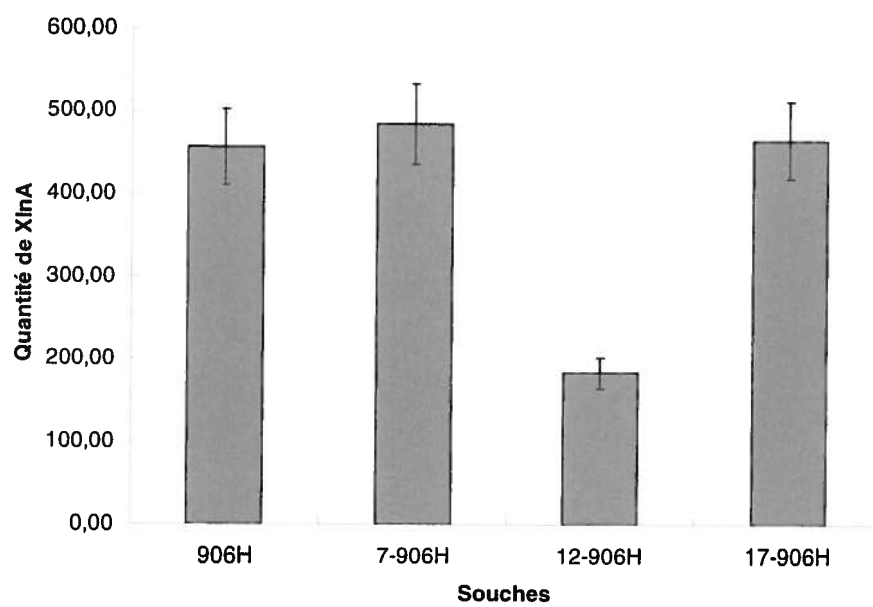
Cette figure montre les résultats du marquage radioactif du précurseur de la XlnA par les souches mutantes et la souche de référence, lorsque des cultures ayant la même quantité de mycélium ont été utilisées.

- a. Résultats de « Pulse-Chase »
- b. Quantification de l'enzyme sécrétée

a)



b)



La figure 15 montre que le précurseur dans le mutant 12 semble moins marqué que celui du contrôle ce qui suggère une diminution de la traduction chez le mutant 12 pIAF906H.

5.3.1.5 Dégradation extracellulaire de la XlnA2

Naturellement la souche sauvage de *S. lividans* produit de la xylanase A de 46-kDa et de la xylanase A2 de 31-kDa. La xylanase A2 contient exclusivement le domaine catalytique parce qu'elle a perdu son domaine de fixation au xylane situé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Cette situation particulière est certainement le fait de protéases qui agissent soit pendant le processus de sécrétion soit dans le surnageant de culture bien que le rapport entre la quantité de XlnA et de XlnA2 ne varie pas au cours du temps (Paradis *et al*, 1996).

Dans nos expériences, le gène de la xylanase A cloné dans le plasmide pIAF906H est délété à son extrémité 3'. Il produit une xylanase d'un poids moléculaire de 41-kDa qui est dégradée très rapidement en XlnA2 de 31-kDa. Ce phénomène est l'oeuvre de protéases extracellulaires.

Pour déterminer l'implication des protéases sur la dégradation du « XBD » de la XlnA, nous avons effectué des expériences de "Pulse-Chase" avec les mutants protéases négatifs 7, 12 et 17 de *S. lividans* transformés avec pIAF906H. Nous avons suivi la dégradation dans le milieu extracellulaire de la XlnA de 41-kDa en XlnA2 au cours du temps, les résultats des expériences sont montrés dans les figures 17, 18 et 19.

La figure 16 montre le patron de dégradation suivi par la XlnA sécrétée par les mutants 7, 12 et 17, ainsi que par le contrôle 906H. Chez les mutants, on remarque un ralentissement dans la dégradation de la XlnA1 de 41-kDa par rapport à la souche de référence *S. lividans* pIAF906H. On observe aussi chez les mutants, l'apparition de molécules intermédiaires qui persistent après 4 heures d'échantillonnage.

La quantification du signal radioactif avec le logiciel Quantum™ 5.0 de Molecular Dynamics, permet d'estimer la quantité d'enzyme sécrétée. Nous avons quantifié les bandes correspondantes à la XlnA1, la XlnA2 ainsi que les bandes de taille intermédiaire. L'addition des valeurs de toutes les bandes représente le 100%. Nous avons alors suivi la transformation de XlnA1 en XlnA2 dans le surnageant de culture. Dans la figure 17, la quantité de chaque enzyme est représentée et le croisement des lignes indique la demi-vie de la XlnA1.

La demi-vie de la XlnA1 dans le surnageant du contrôle est de 6 minutes, par contre, chez les mutants 7, 12 et 17 elle est de 60, 60 et 28 minutes respectivement, indiquant qu'effectivement les protéases absentes seraient partiellement responsables de la transformation de la XlnA1 de 41-kDa en XlnA2 de 31-kDa.

Dans la figure 18, la quantité de XlnA1 et de XlnA2 est exprimée en pourcentage. Afin d'obtenir 100% dans nos calculs, l'estimation des molécules de taille intermédiaire a été partagée également entre la proportion de XlnA1 et de XlnA2.

Chez le contrôle, 95% de l'enzyme qu'on retrouve correspond à la XlnA2 ; par contre chez le mutant 7, uniquement 80% de la XlnA1 s'est transformé en XlnA2, après 4 heures de « Chase », il reste toujours 20% qui correspond à la XlnA1 ou à des molécules intermédiaires.

Chez le mutant 12, on observe uniquement 65% de XlnA2 après 4 heures, tandis que seulement le 50% de l'enzyme se transforme en XlnA2 après 4 heures chez le mutant 17 (figure 18).

Les expériences de « Pulse-Chase » avec les mutants 7, 12 et 17 transformés avec pIAF906 A3-H, possédant uniquement la région catalytique de la XlnA, confirment que cette région n'est pas affectée par la protéolyse extracellulaire (figure 19).

Figure 16. Patron de transformation dans le surnageant de la XlnA1 en XlnA2.

La figure 16 montre la dégradation extracellulaire dans le temps, de la XlnA1 pour donner la XlnA2 qui comporte uniquement la région catalytique de l'enzyme.

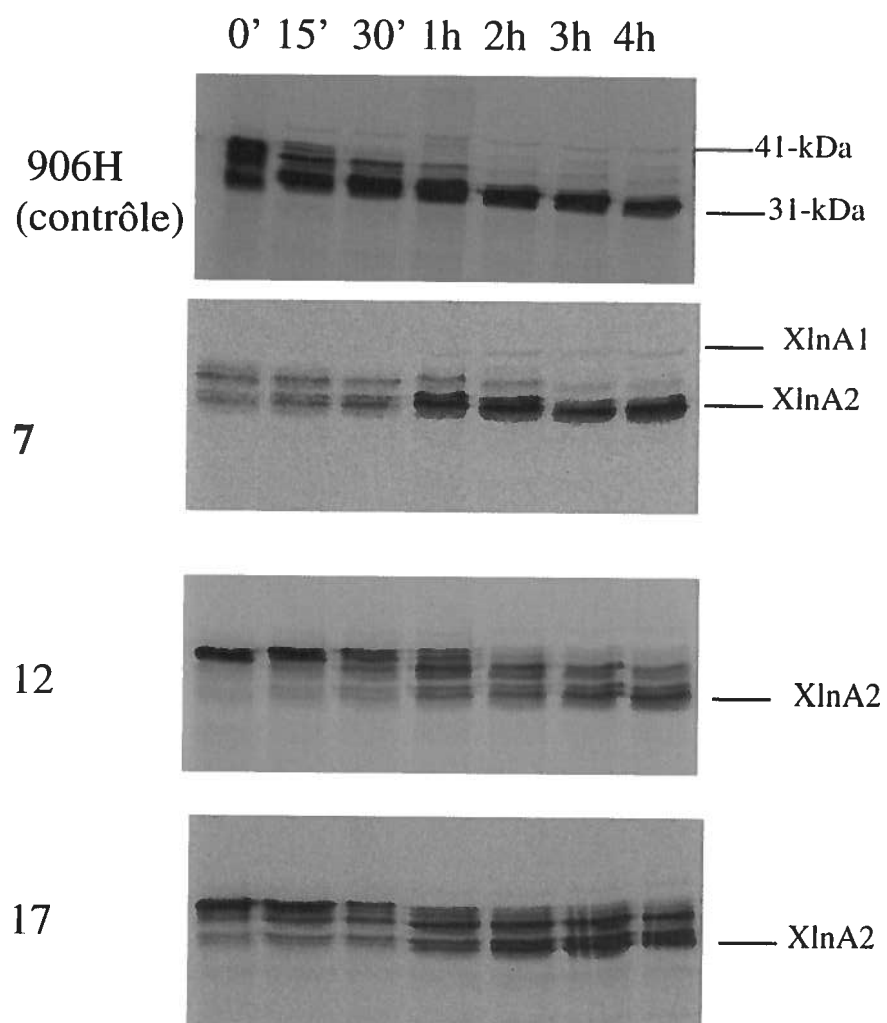


Figure 17. Calcul de la demi-vie de la XlnA1 dans le surnageant de culture

Les bandes laissées par la radioactivité ont été numérisées et quantifiées. On peut observer que la quantité de précurseur diminue dans le temps, conformément à l'augmentation de la protéine mature. L'endroit où les lignes se croisent indique la demi-vie du précurseur

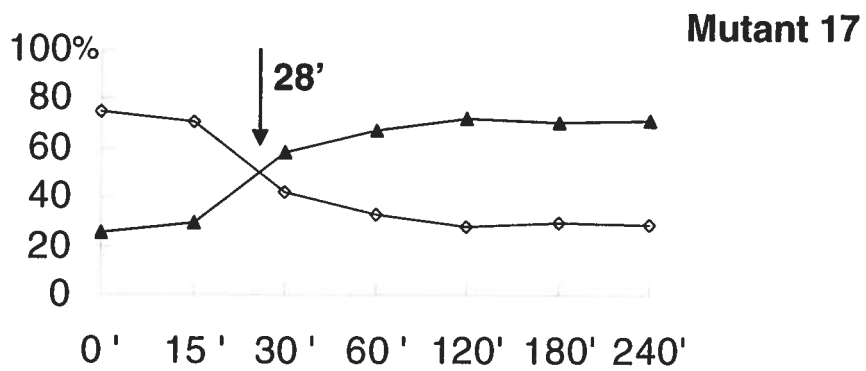
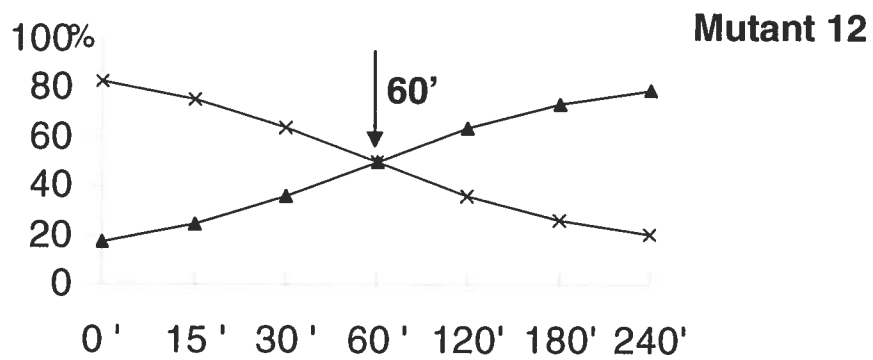
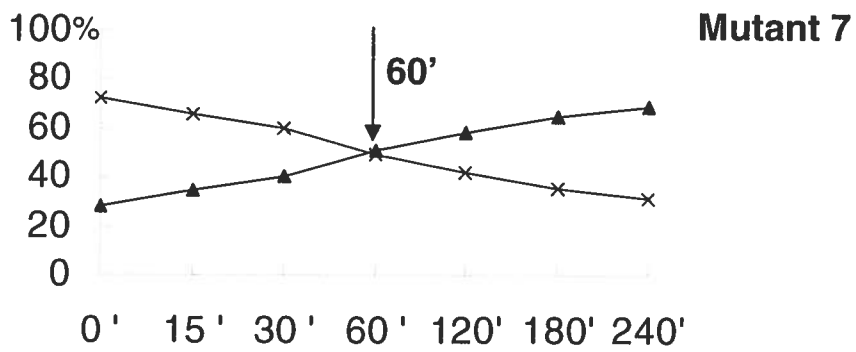
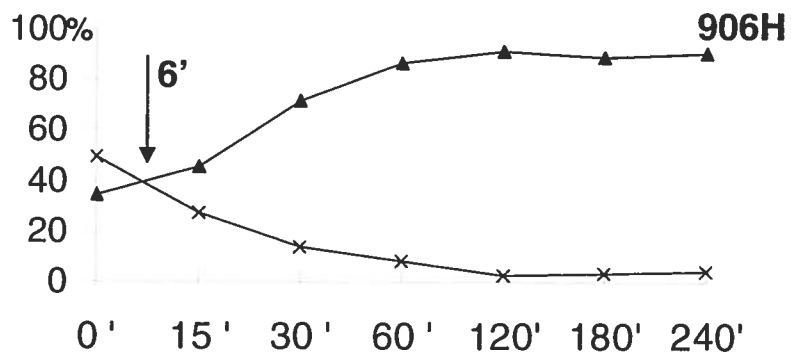


Figure 18. Proportion de XlnA1 et XlnA2 dans le surnageant de culture

Cette figure montre la formation de XlnA2. On observe que ce phénomène ne prends pas le même temps chez les différents mutants.

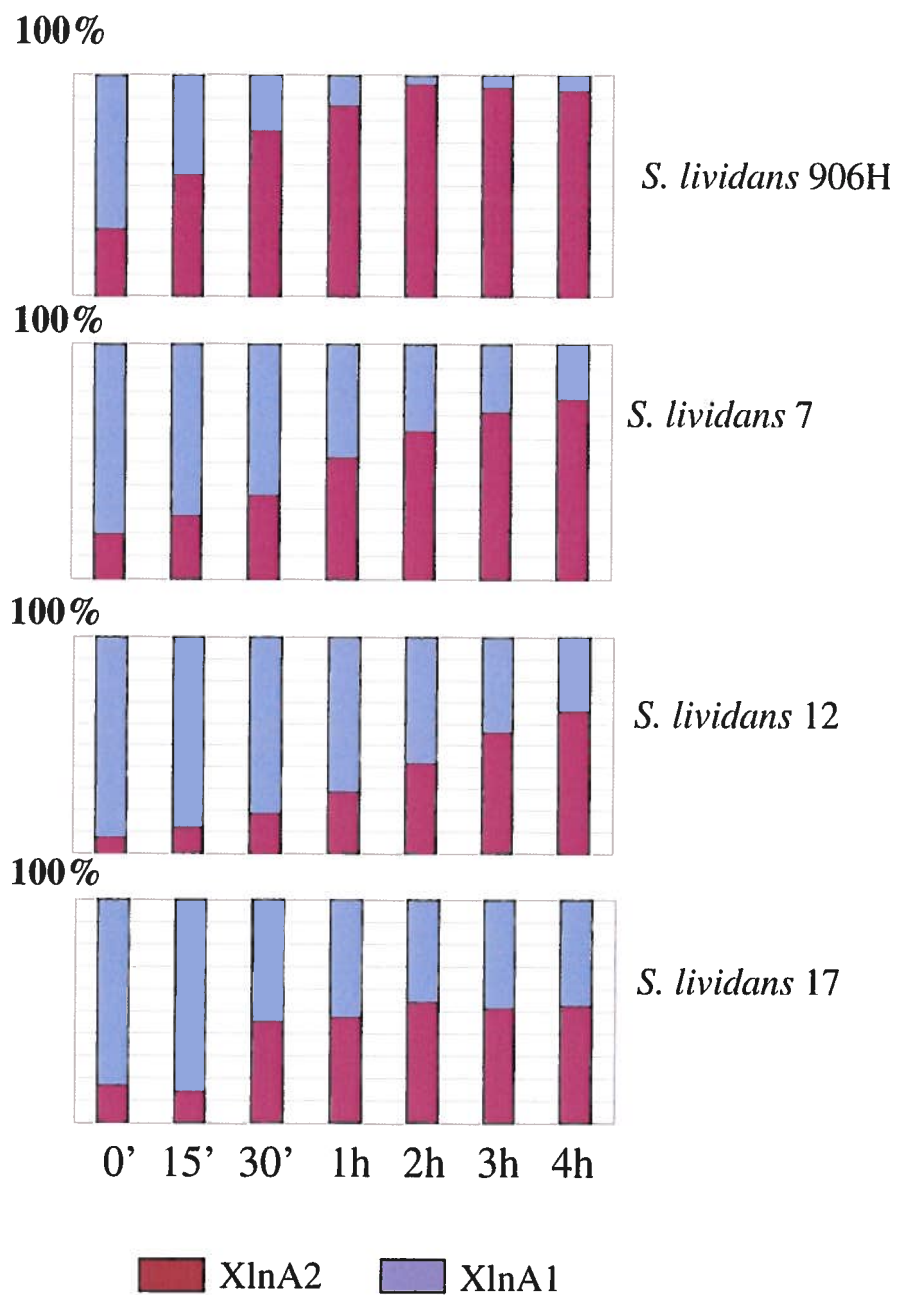


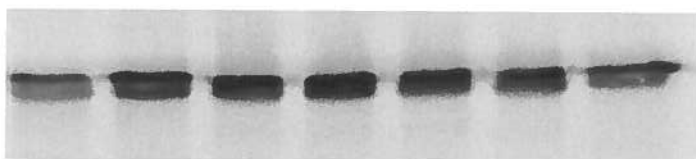
Figure 19. Suivi de la dégradation de la XlnA3-H dans le surnageant des mutants protéase négatifs de *S. lividans*.

La XlnA3-H comporte la région catalytique de l'enzyme obtenue par clonage. Cette région est très stable dans le milieu extracellulaire.

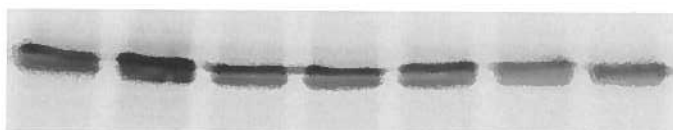
0' 15' 30' 60' 120' 180' 240'



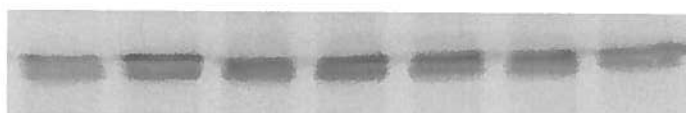
IAF906 A3 H



Mutant 7



Mutant 12



Mutant 17

5.3.2 Genèse de la XlnB2

La XlnB de *S. lividans* est considérée comme étant sécrétée exclusivement par le système Sec. L'analyse du surnageant de culture, montre comme pour la XlnA, la présence de deux formes de XlnB, la première ou B1 de 31-kDa porte deux domaines, le domaine catalytique et le domaine d'attachement au xylane « XBD » ; la deuxième, la B2 de 21-kDa, est dépourvue de son « XBD ». Afin de déterminer si une ou plusieurs des mutations présentes étaient responsables de la séparation du domaine catalytique de la XlnB de son « XBD », nous avons transformé les mutants de *S. lividans* protéases négatifs avec le plasmide pIAF907SB1-H, arborant le gène *xlnB*.

Une fois la présence du plasmide confirmée, nous avons utilisé ces souches pour des expériences de marquage. La figure 20 montre clairement la présence de XlnB1 et B2 dans le surnageant de culture, autant chez les mutants que chez le contrôle *S. lividans* SB1 H. Ces résultats indiquent qu'aucune de ces mutations n'est responsable de la genèse de la XlnB2 à partir de la B1 par le clivage spécifique du « XBD ».

Figure 20. Suivi de la dégradation de la XlnB dans le surnageant de culture des souches 7, 12 et 17 de *S. lividans* et du contrôle IAF-SB1-H.

La production de XlnB1 et XlnB2 est normale chez la souche sauvage de *S. lividans*.

B1 = XlnB1 de 41-kDa

B2 = XlnB2 de 31-kDa

0' 15' 30' 60' 2h 3h 4h

B1 →

B2 →

IAF SB1-H

B1 →

B2 →

7-SB1-H

B1 →

B2 →

12-SB1-H

B1 →

B2 →

17-SB1-H

5.4 Résultats de la sécrétion par le système Sec chez *Streptomyces albus*

Puisque nous avons à notre disposition les mutants de ces deux gènes, l'influence des chaperonnes GroEL1 et HSP18 sur le système de sécrétion Sec a été étudiée chez *Streptomyces albus*.

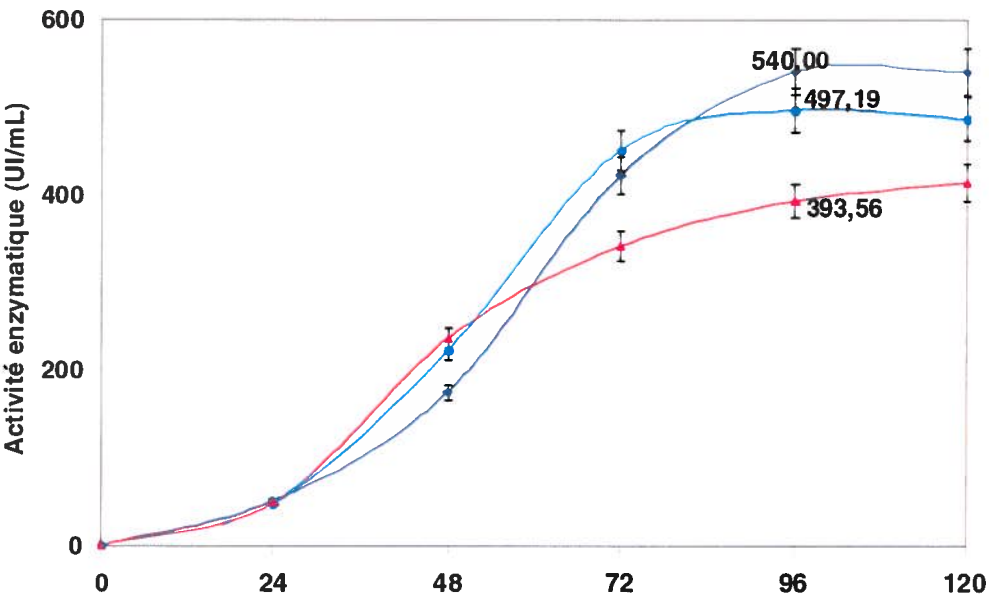
S. albus WT ainsi que les mutants GroEL1 et HSP18 négatifs ont été transformés avec le plasmide pIAF906H qui possède le gène *xlnA* de *S. lividans* et l'intégrité du plasmide a été vérifiée.

La figure 21 représente l'activité enzymatique du surnageant de culture et la croissance des trois souches de *S. albus*. Les résultats obtenus montrent que les mutations GroEL1 et HSP18 n'ont aucun effet sur la sécrétion de la XlnA, malgré le léger retard dans la croissance observé chez les souches mutantes par rapport au type sauvage. Ces observations ont été corroborées par celles obtenues par « Pulse-Chase ». La figure 22 montre les résultats du suivi de la maturation du précurseur ; on y trouve le précurseur et la protéine mature. La demi-vie du précurseur dans le cytoplasme a été estimée à 1.5 minutes pour les mutants comme pour la souche sauvage.

Figure 21. Activité enzymatique et croissance de *S. albus* WT, HSP18 et GroEL1, transformés avec pIAF906H.

- a. Activité enzymatique
- b. Croissance

a)



b)

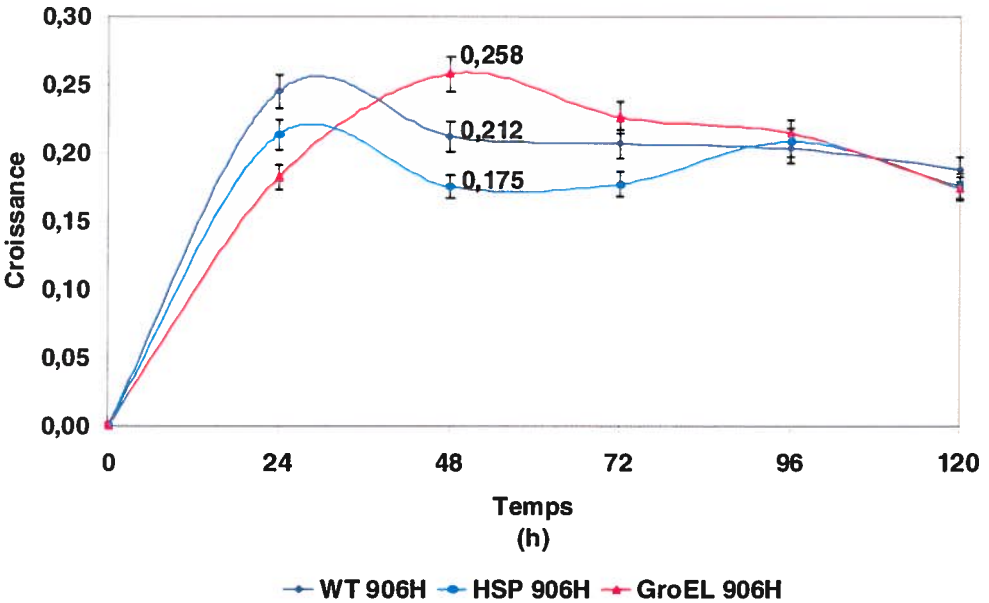


Figure 22. Maturation du précurseur de la XlnA par *S. albus*.

Cette figure montre les résultats du marquage radioactif et la maturation du précurseur de XlnA par les souches de *S. albus*.

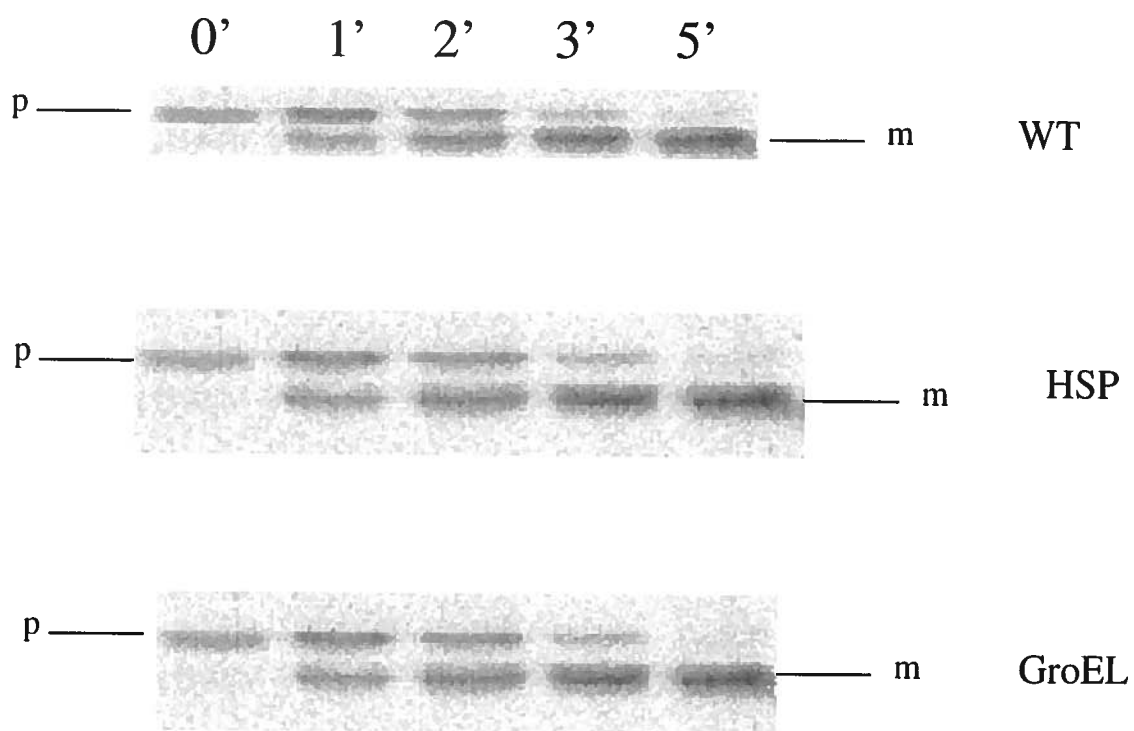
WT = *S. albus* souche sauvage

HSP= mutant *hsp18*

GroEL=mutant *groEL1*

p=précurseur

m=protéine mature



5.5 Sécrétion de protéines par le système Tat

Il a été démontré récemment que la xylanase C de *Streptomyces lividans* est sécrétée exclusivement par le système Tat (Faury *et al.*, 2004). Pour cette raison, afin d'étudier l'effet des mutations protéases et chaperonnes négatives sur cette voie, nous avons utilisé la XlnC de *S. lividans* comme modèle.

5.6 Construction du plasmide pour l'étude de la sécrétion des protéines par le système Tat

Le plasmide multicopies pIAF916C avait été construit pour l'expression de la XlnC. Les principales caractéristiques des plasmides utilisés dans cette étude sont résumées dans l'Annexe B.

Le plasmide pIAF916C présente le gène de la XlnC précédé de la séquence qui code pour son propre peptide signal. Lors de son clonage, les sites de restriction *HindIII* et *SacI* ont été introduits en amont et en aval du gène. Par ailleurs, afin d'assurer une production suffisante de XlnC, le gène *xlnC* a été placé sous le contrôle du promoteur de *xlnA* de *S. lividans*. L'activité enzymatique de la XlnC produite par ce clone atteint 34 UI/ml après 96h de croissance au lieu de 10 UI/ml avec le *xlnC* sauvage (Faury *et al.*, 2004).

Cependant pIAF916C porte le gène *tsr* comme marqueur de sélection, ce qui occasionne un problème technique puisque les souches mutantes de chaperonnes et de protéases ont été construites par interruption des gènes en utilisant le *tsr* qui confère la résistance au thiostrepton.

Afin de contourner ce problème, pIAF916C-H a été construit (figure 23). Il comporte les mêmes caractéristiques que pIAF916C mais le gène *tsr* a été remplacé par le gène de résistance à l'hygromycine *hyg*.

5.6.1 Remplacement du gène de résistance au thiostrepton (*tsr*) par celui de l'hygromycine (*hyg*) dans le vecteur pIAF916C

Le gène *hyg* avait été amplifié par PCR comme indiqué précédemment et traité ensuite avec l'enzyme Klenow pour générer des extrémités franches.

Le vecteur pIAF916C présente dans sa séquence trois sites de restriction *Nru*I, tous situés dans le gène *tsr*. Le produit de la digestion *Nru*I de pIAF916C a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande du gel correspondante au vecteur a été isolée et purifiée. Le vecteur a été déphosphorylé, pour être ensuite ligué avec le gène *hyg* préparé précédemment.

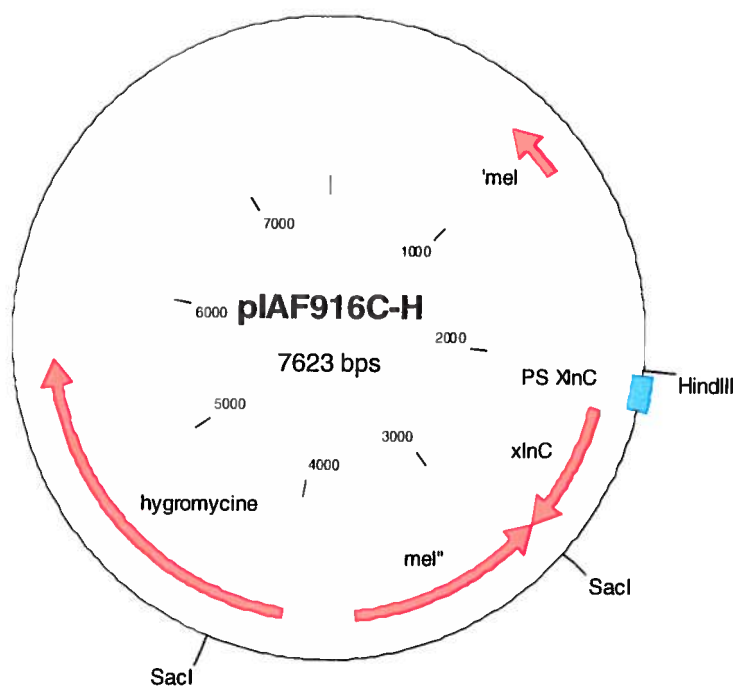
Les mélanges de ligation ont été utilisés pour transformer des protoplastes de *S. lividans* 10-164. Les cellules transformées ont été étalées sur trois plaques de Petri avec 20 ml de milieu R5 (voir Annexe C). La sélection a été effectuée avec 250µg d'hygromycine par ml de milieu de culture. Des colonies résistantes à l'hygromycine sont apparues indiquant la présence du plasmide.

Figure 23. Carte de restriction de pIAF916C-H.

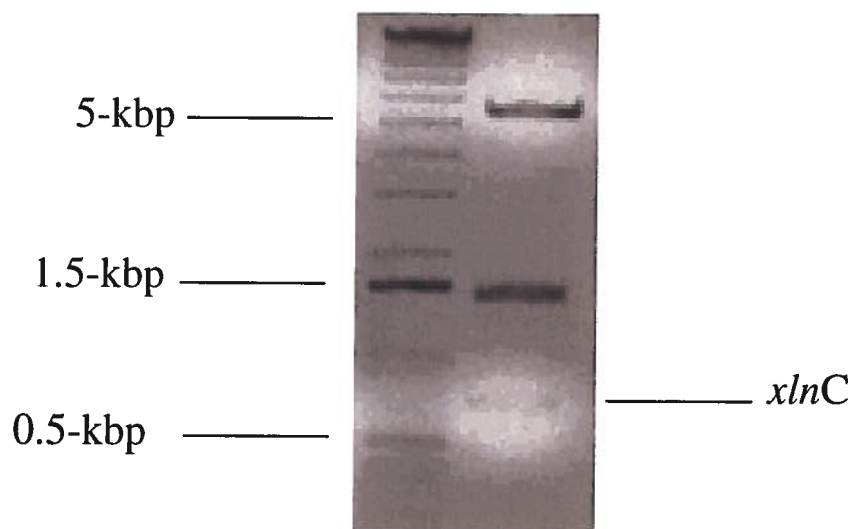
Les gènes *hyg* et *xlnC* y sont représentés. Le gène *xlnC* est entouré des sites de restriction *HindIII/SacI*.

- a. Carte de restriction
- b. Digestion enzymatique *HindIII/SacI*

a)



b)



5.6.2 Vérification de la présence du plasmide pIAF916C-H chez *S. lividans* 10-164 par digestion enzymatique

Plusieurs colonies ont été ensemencées individuellement dans du milieu TSB (Annexe C) et incubées pendant 36 heures. Le mycélium contenu dans 1.5ml de culture a été récolté et l'ADN plasmidique a été extrait par la méthode de la lyse alcaline.

Le plasmide ainsi préparé a été digéré par les enzymes *Hind*III et *Sac*I. Cette digestion génère trois fragments : un fragment de 760 pb qui correspond au gène *xlnC*, le vecteur de 5368 pb et une partie du gène *hyg* de 1492 pb (voir figure 23b).

Le produit de la digestion séparé sur gel d'agarose montre dans chaque cas trois bandes d'ADN.

La présence de pIAF916C-H chez *S. lividans* 10-164 a ainsi été confirmée par digestion enzymatique. Le plasmide contiennent le gène *hyg* et n'a pas subi de changements pour le reste de la séquence. Ce plasmide a ensuite servi à la transformation des protoplastes de tous les mutants protéases et chaperonnes négatifs.

5.7 Résultats de la sécrétion par le système Tat chez *S. lividans*

Une fois que les mutants de protéases ont été transformés avec pIAF916C-H qui contient le gène de la *XlnC*, enzyme exclusivement Tat-dépendante, nous avons vérifié l'intégrité des plasmides dans chacun des transformants. Après extraction de l'ADN plasmidique suivi de la digestion *Hind*III/*Sac*I, la migration sur gel d'agarose montre la présence du plasmide intacte dans toutes les souches mutantes.

5.7.1 Activité xylanasique et courbes de croissance des mutants de protéases

Tel que nous l'avons fait pour le système Sec, après confirmation de l'intégrité du plasmide pIAF916C-H chez chacune des souches mutantes, nous avons dosé l'activité enzymatique et déterminé la croissance cellulaire au cours du temps afin d'avoir une première appréciation de l'effet des mutations sur la sécrétion Tat-dépendante de la XlnC.

Les figures 24a et 24b montrent les résultats du dosage enzymatique et de la croissance enregistrés pour les mutants de protéases 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H, comparés au contrôle IAF916C-H.

En général, l'activité enzymatique des mutants est inférieure au contrôle IAF916C-H, qui est de 32 UI/ml. Après 144 heures d'incubation, le mutant 7-916C-H présente la plus faible activité soit 3.15 UI/ml (figure 24a) qui équivaut à 10% du contrôle (figure 25a). Il est à noter que la croissance de 7-916C-H est inférieure de 44% au contrôle IAF916C-H.

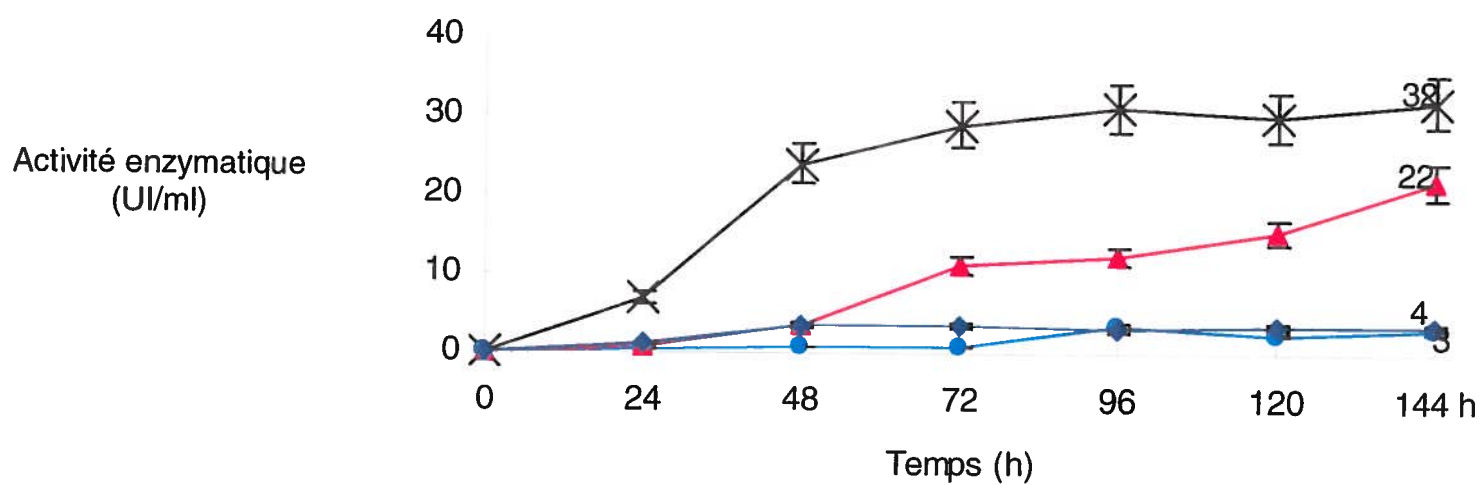
Bien que sa croissance soit équivalente à celle du contrôle, (figure 24b) le mutant 12-916C-H ne produit que 23 UI/ml (figure 24a). Cette activité représente 69% de celle du contrôle (figure 25a).

Dans la figure 24a nous pouvons aussi remarquer qu'après 144 heures d'incubation, le mutant 17-916C-H ne produit que 3.57 UI/ml, ce qui représente 11% de celle du contrôle. Par ailleurs, le mutant 17-916C-H pousse moins bien et sa croissance est inférieure de 33% à celle du contrôle (fig.25b).

Figure 24. Activité enzymatique et croissance des mutants de protéases 7-916C-H, 12-916C-H, 17-916C-H et du contrôle IAF916C-H

- a. Activité enzymatique
- b. Croissance

a)



b)

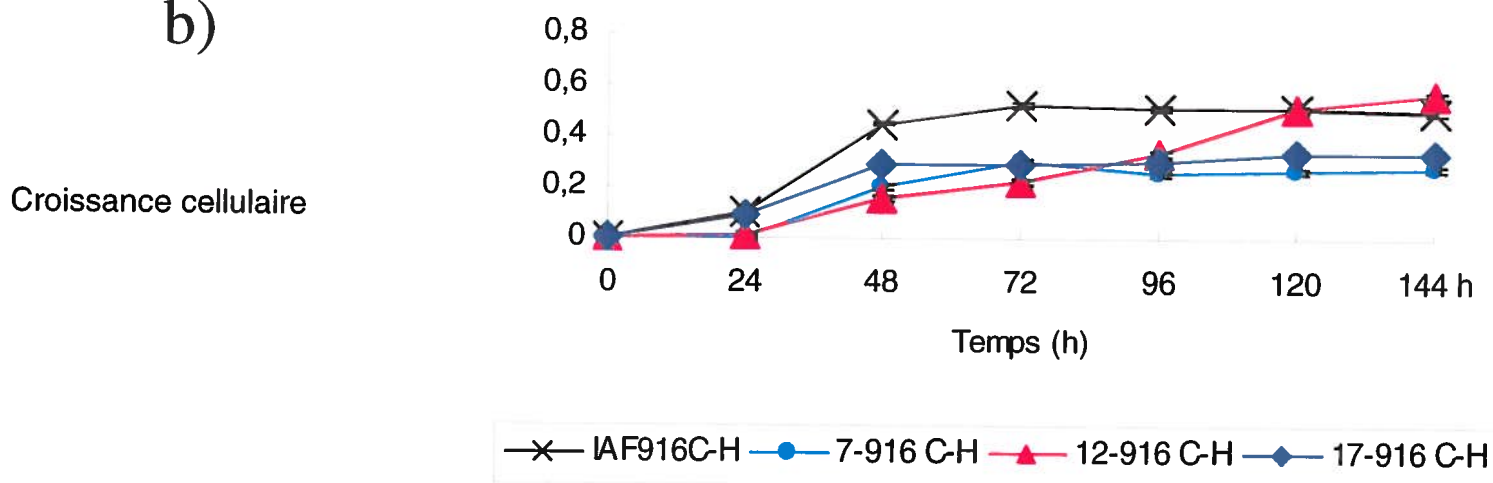
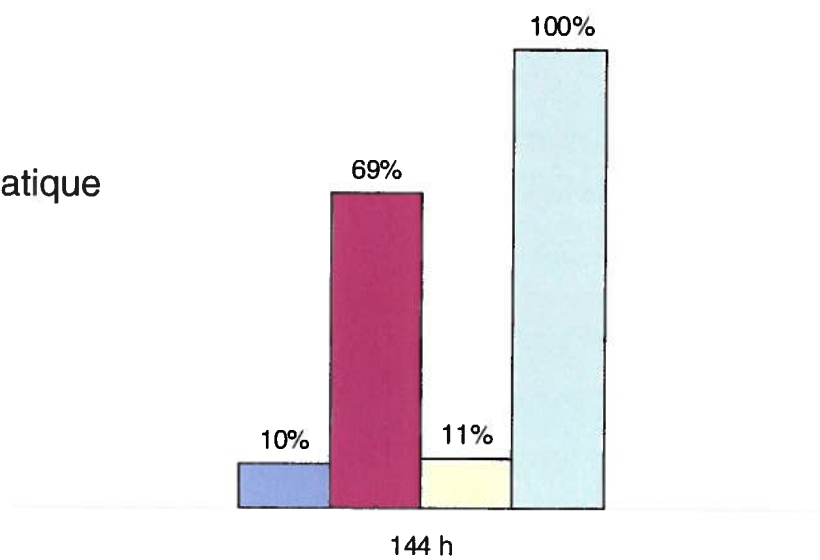


Figure 25. Pourcentage de l'activité et de la croissance des mutants 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H par rapport au contrôle IAF916C-H arbitrairement fixé à 100 %

- a. Activité enzymatique
- b. Croissance

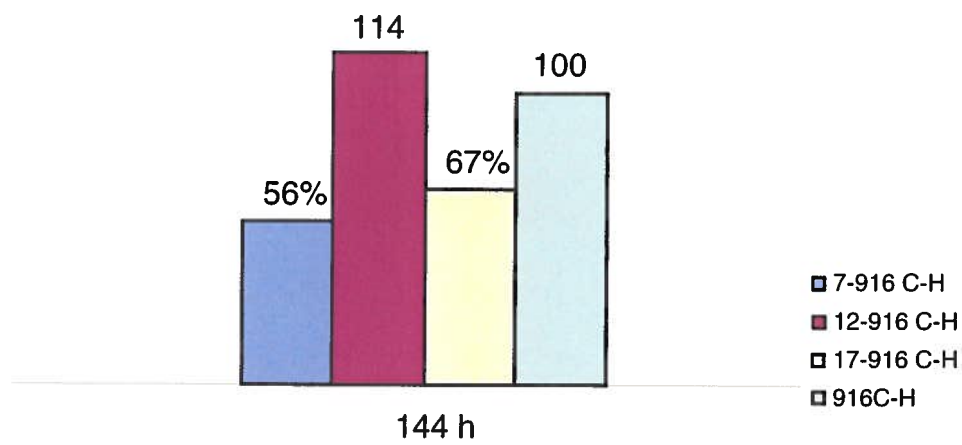
a)

Activité enzymatique



b)

Croissance cellulaire



5.7.2 Xylanases présentes dans le surnageant de culture des mutants de protéases

Les mutants de protéases ne sont pas xylanase négatif comme la souche *S. lividans* 10-164. Donc il était donc important de vérifier la présence de la XlnC ainsi que celle des autres xylanases (XlnA et XlnB) dans les surnageants de culture au moyen de « Western Blot », en utilisant pour leur identification des anticorps spécifiques à chacune d'elles. Même si en principe le milieu de culture employé contenait du xylose comme source de carbone, qui normalement n'induit pas les gènes de xylanases dans la souche sauvage, il était néanmoins important de s'en assurer.

Dans la figure 26 sont regroupés les résultats de « Western Blotting » réalisés avec le surnageant de culture provenant des mutants 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H. Grâce à ces expériences, nous avons confirmé la présence des xylanases sécrétées ainsi que le comportement du système xylanolytique des différentes souches lorsque leur système Tat est sollicité. Le surnageant du contrôle n'a pas été inclus dans la figure car il est négatif pour les xylanases d'origine chromosomique.

Comme attendu, nous retrouvons de la XlnC d'origine plasmidique dans le surnageant de tous les mutants, tandis que la XlnB d'origine chromosomique y est présente en très faible quantité. Cependant dans le surnageant du mutant 7-916C-H, de la XlnA chromosomique est détectée ce qui diffère des autres mutants 12-916C-H et 17-916C-H. En conclusion on peut affirmer que l'activité enzymatique mesurée dans les surnageants de culture provient essentiellement de la XlnC d'origine plasmidique, mais qu'une participation minime de la XlnB dans le surnageant de toutes les souches, en plus de la XlnA dans le mutant 7-916C-H n'est pas exclue. L'expérience avec les anticorps n'étant pas quantitative, elle ne permet pas vraiment d'évaluer la quantité réelle des enzymes présentes dans les surnageants de culture.

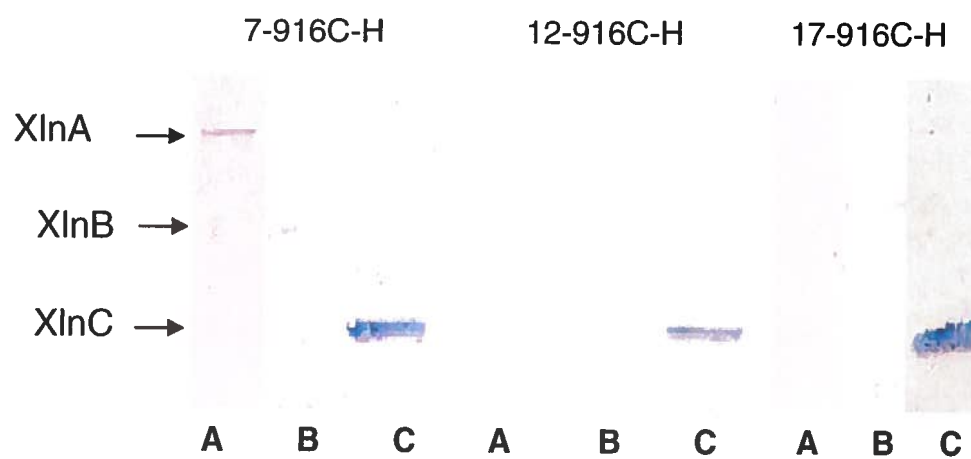
Figure 26. « Western Blotting » anti-XlnA, -XlnB et -XlnC avec le surnageant de culture des mutants de protéases 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H.

Mise en évidence par des anticorps spécifiques, des différentes xylanases sécrétées par les mutants.

A = anti-XlnA

B = anti-XlnB

C = anti-XlnC



5.7.3 Maturation du précurseur de la XlnC

Les mutants produisent des quantités variables de XlnC, une des raisons pourrait être que la sécrétion de l'enzyme soit ralentie dans les mutants. Afin de vérifier que le précurseur de la XlnC est normalement mûré, nous avons suivi ce processus au cours du temps et les résultats de « Pulse-Chase » sont montrés à la figure 27. Même si l'intensité de marquage du précurseur varie d'un mutant à l'autre, la maturation du précurseur chez tous les mutants est semblable à celle du contrôle. L'estimation de la demi-vie du précurseur dans le cytoplasme indique que chez les trois mutants, le précurseur est mûré à la même vitesse que chez le contrôle *S. lividans* pIAF916C, qui présente une demi-vie de 11 minutes selon Faury *et al.*, 2004.

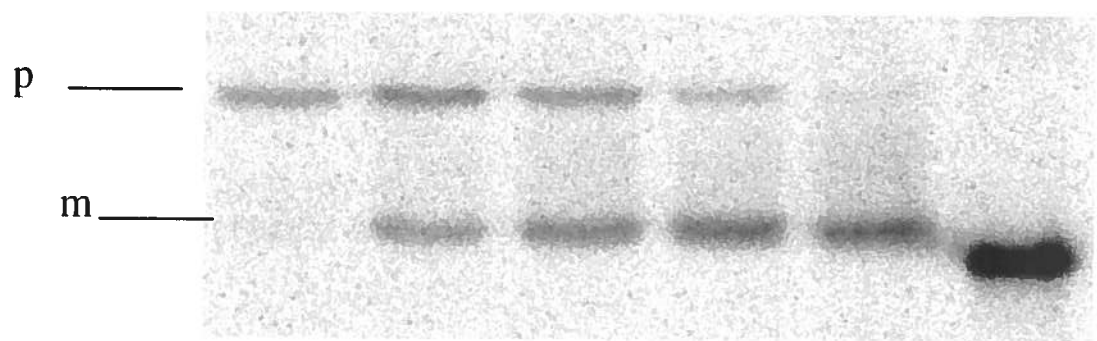
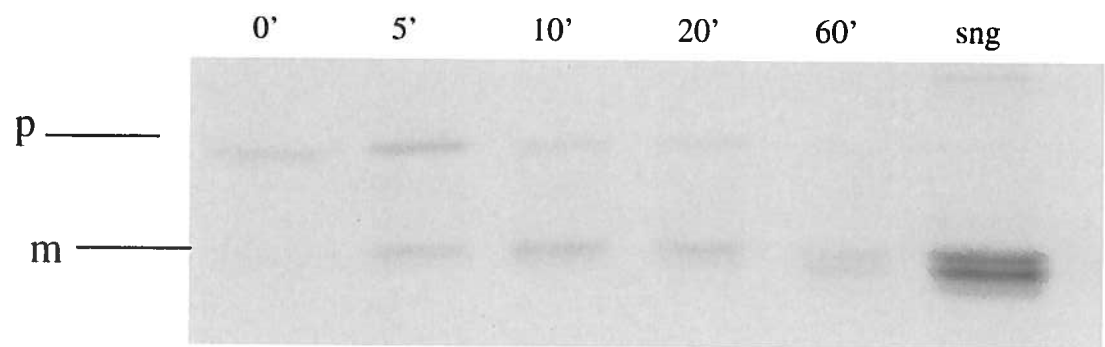
Figure 27. Maturation du précurseur de la XlnC sécrétée par les mutants 7-916C-H, 12-916C-H et 17-916C-H

Marquage radioactif et suivi de la maturation du précurseur de la XlnC par les trois mutants. La même expérience avec la souche de référence pIAF916C a déjà été publiée (Faury *et al.*, 2004).

sng = surnageant

p = précurseur

m = XlnC mature



5.8 Résultats de la sécrétion par le système Tat chez *S. albus*

Le système Tat de sécrétion de protéines a la particularité de transloquer des protéines déjà repliées.

Afin d'évaluer l'effet des mutations GroEL1 et HSP18 sur cette voie de sécrétion, nous avons utilisé la XlnC de *S. lividans*. Le plasmide pIAF916C-H produit la XlnC normale.

L'intégrité de pIAF916C-H chez les mutants GroEL et HSP18 ainsi que chez *S. albus* WT, a été vérifiée par la digestion *HindIII/SacI* de l'ADN plasmidique suivie de la migration sur gel d'agarose.

5.8.1 Activité xylanasiqne et courbes de croissance

La première expérience effectuée afin d'obtenir un portrait de la sécrétion de XlnC par les trois souches de *S. albus*, a été le dosage enzymatique. À des fins de comparaison, nous avons, en même temps, enregistré la croissance cellulaire.

Les figures 28a et 28b présentent les résultats obtenus avec les mutants *S. albus groEL1* et *S. albus hsp18* vis-à-vis de ceux de la souche sauvage *S. albus* WT. Chez *S. albus* WT après 72 heures d'incubation, l'activité xylanolytique détectée de 51.67 UI/ml, est très similaire à celle du mutant GroEL1 de 47.42 UI/ml. L'activité enzymatique moins importante de toutes, 38.73 UI/ml a été mesurée chez *S. albus* HSP18 à la même période (figure 28a). La croissance des trois souches est aussi très semblable comme le montre la figure 28b.

Figure 28. Activité enzymatique et croissance de *S. albus* WT et les mutants *groEL1* et *hsp18* négatifs, transformés avec pIAF916C-H.

- a. Activité enzymatique
- b. Croissance du mycélium

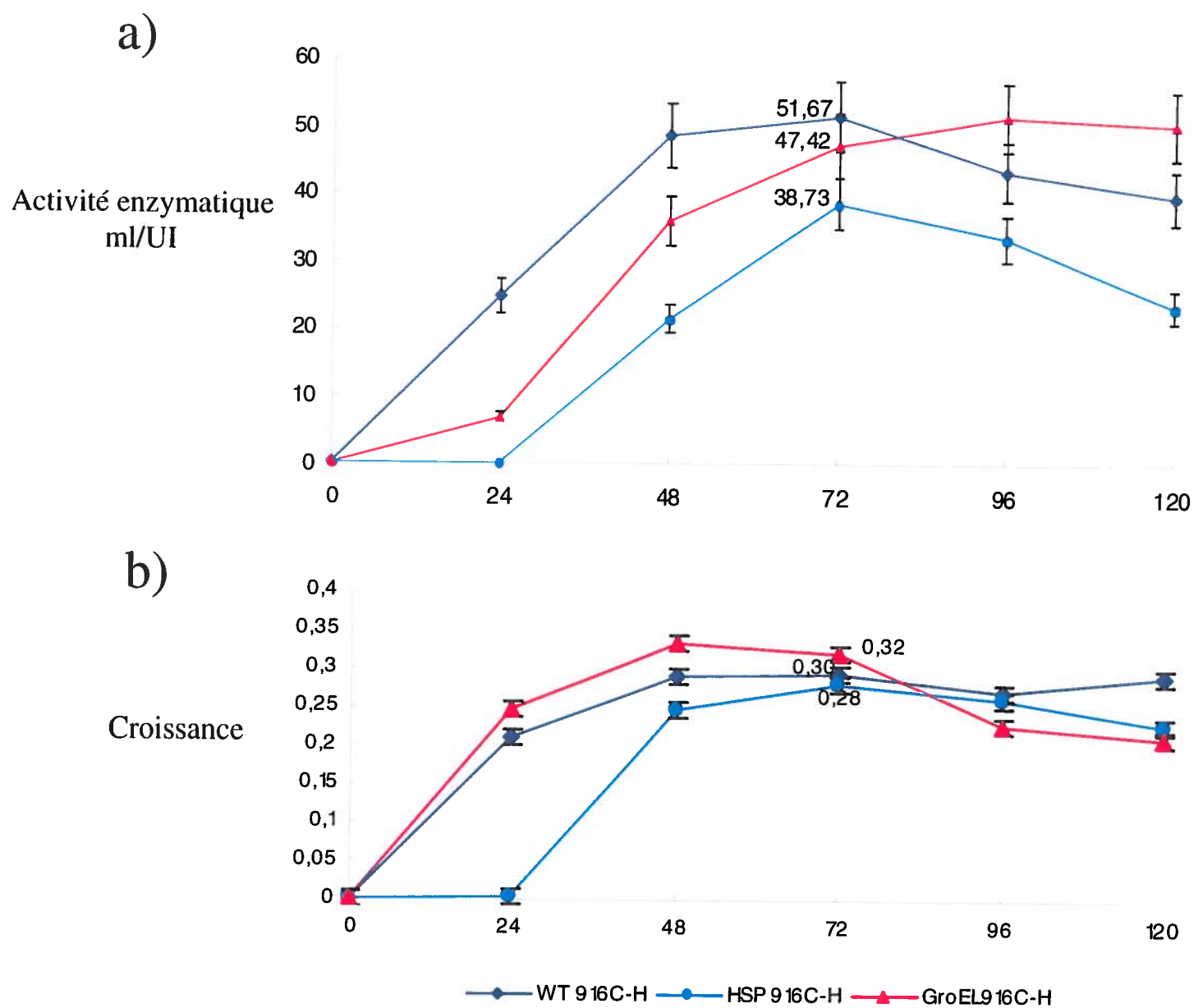
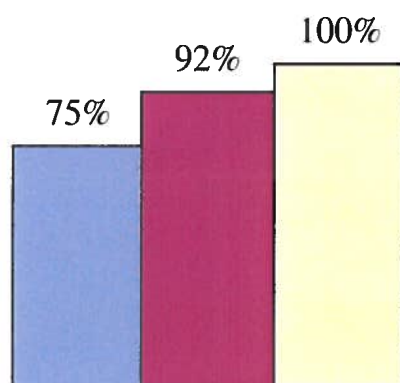


Figure 29. Pourcentage de l'activité enzymatique et la croissance des mutants de *S. albus* par rapport au WT, transformés avec pIAF916C-H.

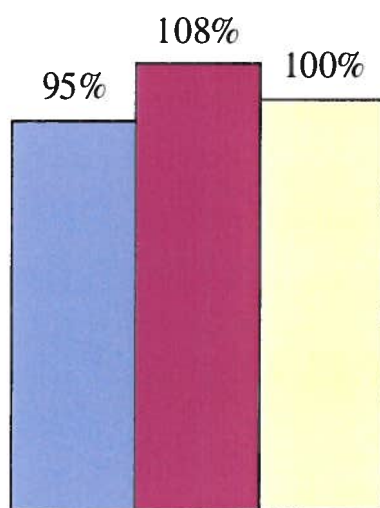
- a. Activité enzymatique
- b. Croissance

a)



72 h

b)



72 h

■ HSP 916C-H ■ GroEL916C-H ■ WT 916C-H

Afin de démontrer jusqu'à quel point ces résultats sont similaires, nous avons calculé et représenté graphiquement en pourcentage, le rapport entre l'activité enzymatique chez le mutant, divisée pour celle de la souche sauvage, à qui nous avons assigné arbitrairement la valeur de 100%. La figure 29a montre qu'à 72 heures de croissance, l'activité enzymatique chez le mutant GroEL, représente le 92% de celle de la souche contrôle, elle montre pourtant une croissance qui dépasse le contrôle de 8% (figure 29b).

L'activité du mutant HSP18 par contre, ne représente que le 75% de celle du contrôle (figure 29a), baisse qui pourrait s'expliquer par sa croissance légèrement moins importante (figure 29b).

5.8.2 Maturation du précurseur

Afin de vérifier si la totalité du précurseur synthétisé était mûré par les trois souches, nous avons effectué des expériences de « Pulse-Chase ».

Le suivi de la maturation du précurseur de la XlnC au cours du temps, est présente dans la figure 30. Nous pouvons observer un processus semblable autant chez les mutants que chez le contrôle. Par ailleurs, l'absence dans le cytoplasme de bandes d'e dégradation indique que tout le précurseur synthétisé est mûré par le système de sécrétion.

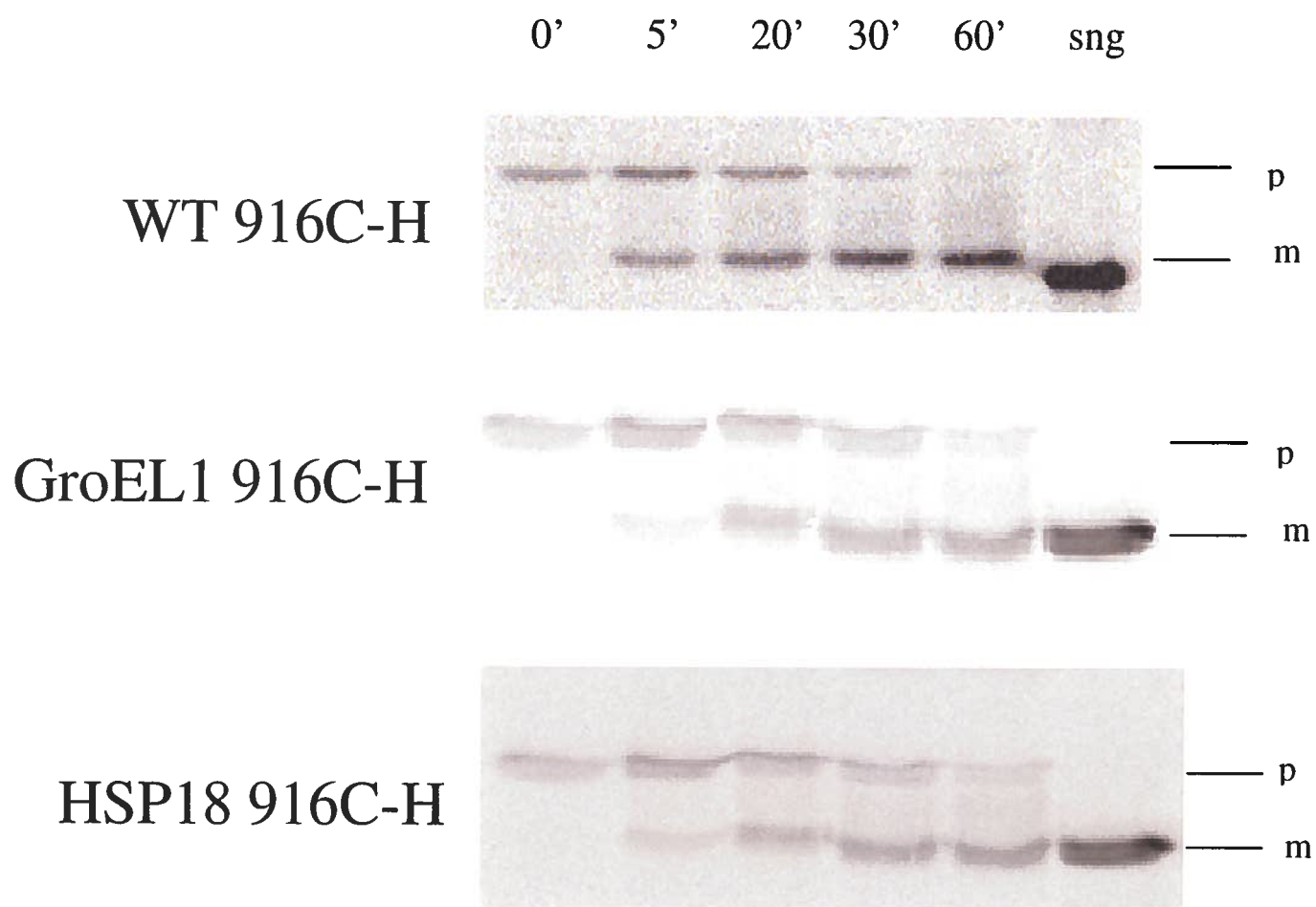
Figure 30. Maturation du précurseur de la XlnC sécrétée par *S. albus* WT et les mutants GroEL1 et HSP18 transformés avec pIAF916C-H

Suivi de la maturation du précurseur de XlnC par les trois souches de *S. albus*.

p = précurseur

m = XlnC mature

sng = surnageant



6 Discussion des résultats

6.1 Effet des mutations de protéases sur le système de sécrétion Sec chez *S. lividans*

L'intervention de protéases dans la translocation de protéines n'est pas un phénomène inconnu. Chez *B. subtilis* la protéase cytosolique TepA, apparentée à ClpX, ainsi que SppA, la peptidase de peptides signaux de localisation membranaire, sont requises pour la dégradation de protéines ou peptides qui inhibent la translocation des protéines (Bolhuis *et al.*, 1999). Il arrive le même phénomène chez *E. coli*, où la protéolyse intracellulaire du précurseur de la pénicilline amidase, « PA », est le principal processus post traductionnel qui limite la production de l'enzyme (Ignatova *et al.*, 2003).

Chez *B. subtilis*, l'action de la protéase ClpXP ne se limite pas à la dégradation mais elle participerait indirectement à la sécrétion de protéines par la régulation d'au moins trois des gènes qui produisent les signal peptidases les plus importantes (Pummi *et al.*, 2002). En termes généraux, les complexes Clp jouent un rôle dans le contrôle du niveau de certaines protéines de régulation (Gottesman et Maurizi, 1992 ; Porankiewicz *et al.*, 1999), ainsi que dans plusieurs autres fonctions biologiques comme la sporulation et le développement (Msadek *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'absence de certaines protéases extracellulaires peut nuire à l'activation de certaines enzymes, comme c'est le cas pour la xylanase Xys1L de *Streptomyces halstedii*, qui est sécrétée sous forme de pro-protéine, activée par la protéolyse d'un segment de sa séquence peptidique (Fernandez-Abalos *et al.*, 2003). Chez *B. subtilis*, il a été démontré que la diminution de la peptidyl-prolyl isomérase extracellulaire PrsA réduit à son tour la sécrétion de l'alpha-amylase au niveau posttranslocationnel (Vitikainen *et al.*, 2001), provoquant l'altération morphologique des cellules et leur mort dans certaines conditions (Wahlstrom *et al.*, 2003).

Nous disposions de trois mutants protéase négatifs de la bactérie *Streptomyces lividans* et nous voulions connaître l'effet des mutations de protéases sur la voie Sec de sécrétion des protéines. Pour ce faire, l'enzyme Sec-dépendante de *S. lividans*, la XlnA a été utilisée : le gène *xlnA* a été cloné dans un vecteur d'expression qui a servi à transformer les souches mutantes.

6.1.1 Influence des mutations de protéases sur le repliement de la XlnA2

L'analyse de la sécrétion de XlnA par les mutants de protéases de *S. lividans* transformées avec pIAF906H, montre que tous les mutants de protéases produisent moins d'enzyme que la souche de référence IAF906H.

La faible activité enzymatique chez les mutants soulevait plusieurs questions, parmi elles, il fallait considérer la possibilité que la XlnA2 soit sécrétée efficacement mais qu'elle ne soit pas active. Ce phénomène a déjà été observé chez *B. subtilis*, où HtrA, une protéase associée à la membrane est indispensable au repliement d'au moins une protéine, Yqxl de fonction indéterminée (Antelman *et al.*, 2003). Chez *E. coli* la protéase périplasmique DegP homologue de HtrA, favorise le repliement de son substrat naturel, l' α -amylase MalS ; par contre, à des températures élevées, DegP protéolyse ce même substrat (Spiess *et al.*, 1999)

Le domaine catalytique de la XlnA2 de *S. lividans*, présente une structure tertiaire en forme de baril (α/β)₈ (Derewenda *et al.*, 1994). Puisqu'elle est sécrétée par le système Sec, la XlnA2 est forcément repliée à l'extérieur du cytoplasme (Pagé *et al.*, 1996), ce qui demanderait le concours d'une ou plusieurs protéases-chaperonnes extracytoplasmiques. L'absence de ces molécules entraînerait la perte d'activité xylanolytique en dépit d'une quantité normale d'enzyme sécrétée ; le cas échéant, la XlnA serait transloquée normalement sans jamais atteindre sa forme active.

Néanmoins, l'analyse qualitatif des résultats de « Western Blotting », confirme que la quantité de XlnA2 sécrétée par les souches mutantes est effectivement inférieure à celle du contrôle et corroborent étroitement les résultats des tests d'activité enzymatique. Cette constatation nous a amené à analyser le processus de sécrétion lui-même.

6.1.2 Le processus de sécrétion de la XlnA1 chez les mutants de protéases

Puisque nous ignorions toujours la localisation des protéases touchées par les mutations, une autre hypothèse était envisageable. Dans le cas où les protéases seraient intracellulaires, leur absence pouvait être responsable d'un éventuel ralentissement du processus de maturation du précurseur et réduire la sécrétion de XlnA1 chez les mutants. Ce phénomène a été observé lors de l'absence des protéases responsables de la dégradation des peptides signaux. Lorsque les peptides signaux ne sont pas dégradés, ils peuvent congestionner les pores de sécrétion et nuire à la translocation (Bolhuis *et al.*, 1999).

Afin de suivre la maturation du précurseur de la XlnA1 chez les souches mutantes, nous avons effectué des expériences de « Pulse-Chase ». Les résultats montrent que la demi-vie du précurseur de la XlnA1 dans le cytoplasme de tous les mutants est comparable à celle du précurseur processé par la souche contrôle IAF906H. Ces résultats montrent aussi que, tout comme pour la souche de référence, la totalité du précurseur synthétisé est pris en charge par le système Sec et mûri dans les cinq minutes suivant le début du « Chase ». Ces observations suggèrent que le système de sécrétion Sec, n'est pas ralenti par les mutations présentes dans les souches 7, 12 et 17 et que leur système Sec n'a pas de difficulté à mûrir normalement le précurseur de la XlnA1. Cependant même s'il y a maturation du précurseur en une protéine de taille attendue, cela ne signifie pas que l'enzyme est bien conformée et active. On peut donc supposer qu'une partie seulement de la xylanase observée est sous sa forme mature active.

6.1.3 Traduction de la XlnA1 chez les mutants de protéases

Comme il a été dit précédemment, la sécrétion de XlnA1 n'est pas ralentie mais l'enzyme est sécrétée faiblement chez les mutants, une troisième hypothèse était alors envisageable. L'action régulatrice connue de certaines protéases ainsi que nos résultats préliminaires, laissaient envisager la possibilité d'une diminution dans la traduction de la XlnA1 provoquée par les mutations.

Pour répondre à cette question nous avons comparé l'intensité du marquage du précurseur de la XlnA1 dans des cultures possédant le même nombre de cellules. L'expérience montre que l'intensité du marquage du précurseur par les mutants 7-906H et 17-906H est similaire à celle du contrôle, par contre, chez 12-906H, on remarque une diminution. Ces résultats suggèrent fortement que les mutations de protéases du mutant 12 affectent la traduction du gène *xlnA*.

6.1.4 Facteurs de régulation chez les mutants de protéases

Afin d'expliquer les résultats obtenus nous avons pensé qu'il était possible qu'indépendamment du système de sécrétion, d'autres fonctions cellulaires soient affectées par ces mutations. Comme il a été indiqué précédemment, certaines protéases ont parfois des fonctions régulatrices de la croissance cellulaire.

Nous avons observé que la croissance maximale du mutant 7-906H était toujours inférieure à celle du contrôle. Par ailleurs, la croissance du mutant 12-906H est atypique. Au lieu de croître de façon exponentielle pour atteindre un plateau après 48h d'incubation, le mutant pousse de façon linéaire pour arriver en phase stationnaire autour de 96h de culture. Le mutant 17-906H par ailleurs, ne pousse pas bien dans un milieu minimal n'atteignant qu'une fraction de la croissance du contrôle.

Basés uniquement sur ces observations on peut supposer que les protéases mutées interviennent activement dans le développement cellulaire chez *S. lividans*. Il est possible

que les résultats d'activité xylanolytique de 17-906H ne soient pas exacts. En effet, des études antérieures ont montré que le milieu de culture utilisé pour ce mutant, le milieu M13, peut provoquer la sous estimation de l'activité enzymatique, le test des sucres réducteurs étant influencé dans une certaine mesure par la présence d'acides aminés dans le milieu de culture. En plus la présence de bactotryptone peut réduire aussi l'expression du gène de la xylanase A.

6.1.5 Dégradation extracellulaire de la XlnA 41-kDa chez les mutants de protéases

Les *Streptomycètes* possèdent un appareil de sécrétion très efficace, ce qui a permis d'utiliser ces bactéries pour la production de nombreuses molécules d'importance médicale et industrielle (Morosoli *et al.*, 1997). *S. lividans* est parmi les plus connues et utilisées, néanmoins cette espèce sécrète des protéases extracellulaires qui représentent un inconvénient pour la production extracellulaire de protéines d'importance industrielle.

Les mutants 7, 12 et 17 de *S. lividans*, ont été construits par la compagnie Cangene afin de diminuer la dégradation amino-terminale de protéines recombinantes dans le surnageant de culture. Les caractéristiques protéolytiques amino-terminales de ces mutants ont été décrites (Butler *et al.*, 1995), cependant, aucune évaluation de leur capacité carboxy-terminale n'avait été évaluée. Nous avons alors suivi le patron de dégradation de la XlnA de 41-kDa, dans le surnageant de culture de chacun des mutants de protéases, afin de déterminer leur capacité résiduelle de protéolyse extracellulaire sur l'extrémité C-terminale de la XlnA1 41-kDa de *S. lividans* sachant que l'extrémité N-terminale de la protéine était protégée de la dégradation puisque le N-terminal de la XlnA et XlnA2 est le même (Kluepfel *et al.*, 1992).

Comme il a été déjà mentionné, la souche IAF906H sécrète d'abord une xylanase de 41-kDa dont le « XBD » a été partiellement tronqué. De façon naturelle, l'extrémité C-terminale correspondant au « XBD » de cette enzyme est rapidement dégradée dans le surnageant de culture pour atteindre un poids moléculaire de 31-kDa qui donne naissance

à la XlnA2 (Paradis *et al.*, 1996). Elle est constituée exclusivement par le domaine catalytique et elle demeure aussi active que la XlnA de 46-kDa. L'activité de la XlnA1 41-kDa n'a pas pu être mesurée car cette enzyme est très instable mais on peut présumer qu'elle est aussi active puisqu'elle possède un domaine catalytique intact. Des études antérieures ont montré que malgré la présence de nombreuses protéases, la XlnA2 reste intacte dans le surnageant de culture parce qu'elle est résistante à l'action protéolytique.

Le mutant 7 est dépourvu de l'enzyme Tap, « Tripeptidyl-amino peptidase ». Cette serine protéase clive des segments formés par trois acides aminés à l'extrémité N-terminale de certaines protéines.

Dans le surnageant de culture de 7-906H, la transformation de XlnA 41-kDa en XlnA2 est visiblement ralentie. Ainsi, nos résultats montrent la présence d'autant de XlnA 41-kDa que de XlnA2, mais la vitesse de transformation a significativement diminué. Par ailleurs, on observe l'apparition de molécules de taille intermédiaire plus ou moins récalcitrantes à la dégradation. Ces résultats suggèrent que bien que décrite comme amino-peptidase, la serine protéase Tap de *S. lividans* serait aussi partiellement responsable de la dégradation C-terminale de la XlnA 41-kDa chez cette bactérie.

En effet, les sérine protéases sont rarement spécifiques, elles réagissent plutôt à un type de substrat présentant des régions hydrophobes non protégées. Chez la XlnA 41-kDa, le XBD tronqué ne peut probablement pas se replier en une structure stable comme chez la XlnA1 intacte, il est donc plus vulnérable à l'action protéolytique. Par ailleurs, la présence de nombreuses protéases extracellulaires chez *S. lividans*, suggère une dégradation en cascade par plusieurs protéases tour à tour sur le même substrat. Ce phénomène pourrait facilement expliquer les résultats obtenus lors du suivi de la dégradation de la XlnA 41-kDa dans le surnageant de culture du mutant 7-906H.

Le mutant 12-906H présente deux mutations. Les gènes *tap* et *ssp* ont été interrompus. Le gène *tap* est le producteur de la tripeptidyl-amino peptidase mentionnée auparavant ; le

gène *sps* produit une serine protéase Ssp "Subtilisin-like secreted protein", apparentée à la subtilisine BPN'.

Les résultats obtenus ont montré que chez 12-906H, la transformation de XlnA1 de 41-kDa en XlnA2 se voit significativement ralentie par l'absence des enzymes Tap et Ssp dans le surnageant de culture. Dans ce cas, l'absence des deux protéases suggère un effet synergique de l'action protéolytique qui génère la XlnA2, influant aussi sur la croissance inhabituelle de cette souche, ce dernier phénomène, par contre, n'a pas été exploré dans le cadre de cette étude.

Chez 17-906H, on observe que la dégradation débute très tôt, mais au moins la moitié de toute la XlnA 41-kDa sécrétée ne devient pas XlnA2 au bout de quatre heures d'incubation. Cette observation suggère que la ou les protéases manquantes dans la souche 17, jouent un rôle qui ne peut être comblé par les protéases toujours présentes. Puisque la compagnie Cangen s'est réservée le droit de communiquer les mutations exactes du mutant 17, nous ne pouvons pas l'analyser plus longuement. Cependant toutes ces souches ont été générées par un programme de mutations successives visant à diminuer l'activité amino-peptidique extracellulaire de *S. lividans*. Selon Buttler *et al.*, 1996, les dernières mutations tentées ne sont pas viables, ce qui permet de penser que le mutant 17, avec ses difficultés de croissance, fait partie des derniers mutants de la série, et qu'il comporterait donc plusieurs mutations de protéases.

Chez les trois mutants de protéases, la XlnA2 est toujours plus ou moins rapidement produite, ce qui suggère qu'aucune n'est responsable à elle seule de l'élimination graduelle du XBD. Par contre le fait qu'il y ait un ralentissement assez marqué de la dégradation de la XlnA 41-kDa en XlnA2 indique quand même une certaine participation des ces protéases au processus.

6.1.6 Influence des mutants de protéases sur le clivage de la XlnB1 en XlnB2

La XlnB de *S. lividans* est Sec-dépendante. De façon analogue à XlnA, elle est retrouvée naturellement sous deux formes dans le surnageant de culture de la souche sauvage. La XlnB1 de 31-kDa contient un domaine catalytique et un « XBD » tandis que la XlnB2 comporte seulement le domaine catalytique de 21-kDa.

Le suivi du devenir de la XlnB1 dans le surnageant de culture de chacun des mutants de protéases montre que la XlnB1 et XlnB2 sont présentes au début de l'expérience et que leur relative proportion reste constante au cours du temps. Donc les mutants de protéases ne sont pas impliqués dans la production de XlnB2. Un précurseur de la XlnB2 plus court que celui de la XlnB1 serait donc synthétisé probablement par une traduction incomplète de l'ARNm de la XlnB1. En effet, des expériences « Pulse-Chase » montrent bien la synthèse de deux précurseurs dans la souche IAF906SB1 qui sont maturés respectivement en XlnB1 et XlnB2 (Gauthier *et al.*, *Appi Envir Microbiol.* in press).

6.2 Sécrétion de la XlnA par les mutants chaperonne négatifs de *S. albus*

Chez les Gram négatif, SecB transporte les précurseurs dépliés vers la translocase membranaire. Or, l'absence d'un homologue de SecB chez les Gram positif, laisse une porte ouverte à la recherche de la chaperonne capable d'accomplir la tâche de SecB. Plusieurs voies ont été examinées dans ce sens en privilégiant les complexes GroEL-GroES et DnaK-DnaJ. La plupart de ces expériences montrent que ces complexes peuvent remplacer l'absence de SecB (Altman *et al.*, 1991 ; Lecker *et al.*, 1989).

6.2.1 Analyse de la sécrétion Sec chez le mutant *hsp18*

La XlnA de *S. lividans* est synthétisée sous forme de précurseur qui ne doit pas être replié avant d'atteindre la translocase, comme le réclame le système Sec.

HSP18 appartient aux "Heat Shock Proteins" de petite taille, ces chaperonnes ont comme fonction connue celle d'empêcher les relations illicites entre protéines. Il était alors logique de supposer l'existence d'une relation entre un précurseur Sec-dépendant, comme celui de la XlnA et une chaperonne avec les caractéristiques de HSP18.

Les résultats obtenus dans cette étude ne montrent aucune différence entre l'activité enzymatique chez le mutant *S. albus hsp18* et la souche sauvage sécrétant la XlnA, mais afin de confirmer ces observations nous avons suivi la maturation du précurseur chez chacune des souches.

Encore une fois, les expériences de « Pulse-Chase » montrent que la vitesse de sécrétion de XlnA est la même chez le mutant *hsp18* et la souche sauvage et suggèrent fortement l'indépendance du précurseur de la XlnA de la chaperonne HSP18 chez *S. albus*.

6.2.2 Analyse de la sécrétion Sec chez le mutant *groEL1*

Certaines études décrivent le substrat idéal de la chaperonne GroEL comme ayant entre 20 et 60-kDa et la XlnA avec ses 45-kDa y correspond bien, nous avons essayé alors de déterminer si la mutation GroEL1 affectait la sécrétion de la XlnA chez *S. albus*.

Les résultats du dosage enzymatique et de maturation du précurseur obtenus avec la souche sauvage sont presque identiques à ceux enregistrés avec le mutant GroEL1. Ces faits indiquent *a priori* que la chaperonne GroEL1 n'intervient pas dans le système Sec de sécrétion des protéines.

Comme pour le facteur de croissance CsaA de *B. subtilis*, qui se lie à SecA chez *B. subtilis* et chez *E. coli* (Müller *et al.*, 2000), la participation de GroEL dans le système Sec de sécrétion de protéines va au-delà de sa relation avec le précurseur. En effet, il y a des évidences que GroEL aiderait entre autres, l'ATPase SecA membranaire à s'en libérer après la translocation. GroEL stabiliserait SecA facilitant ainsi indirectement la sécrétion Sec (Bochkareva, Solovieva et Girshovich, 1998). L'indépendance de GroEL du système

Sec, n'est pas du tout établie, il faudra des études complémentaires de surexpression de la chaperonne GroEL afin d'évaluer sa participation dans le système de sécrétion Sec.

6.3 Effet des mutations de protéase sur le système Tat de sécrétion des protéines de *S. lividans*

Récemment décrit, le système de sécrétion Tat est capable de sécréter des protéines repliées. Parmi les enzymes sécrétées par cette voie, on retrouve la XlnC de *S. lividans*, ce qui suggère que le repliement de son précurseur serait assisté éventuellement par des chaperonnes cytoplasmiques.

Bien que les principales protéines Tat soient actuellement connues, le fonctionnement du système Tat l'est moins. Ainsi, tout comme pour le système Sec, il est possible que d'autres protéines interagissent avec le motif double arginine des précurseurs Tat.

Chez *E. coli*, la fusion du peptide signal Tat de la sous unité DmsA de la diméthyl sulphoxide réductase (DMSO) avec l'extrémité N-terminale de la glutathione S-transférase (GST), a permis d'identifier deux protéines qui interagissent avec ce précurseur : il s'agit de la protéine de choc thermique DnaK et du produit du cadre non identifié *ynfI*, baptisé DmsD depuis. *In vitro*, DmsD interagit avec le précurseur DmsA mais pas avec la forme mature. Par ailleurs, DmsD interagit aussi avec le précurseur Tat de la sous unité catalytique de la triméthyl amine N-oxide (TMAO) ce qui suggère que DmsD est une protéine qui se lie aux peptides signaux Tat (Oresnik, Ladner et Turner, 2001).

L'introduction de vecteurs d'expression contenant le gène *xlnC* dans les mutants de protéases, suivie de la mesure de l'activité xylanolytique du surnageant, nous ont permis d'analyser l'effet des mutations sur le système Tat de *S. lividans*.

Nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique chez les mutants 7-916C-H, et 17-916C-H 7, tandis que chez le mutant 12-916C-H cette mesure s'approche beaucoup de celle observée chez la souche de référence IAF916C-H.

6.3.1 Sécrétion de la XlnC par le mutant 12

La XlnC est sécrétée normalement par le mutant 12 ce qui suggère que les mutations présentes n'affectent pas le système de sécrétion Tat.

6.3.2 Sécrétion de la XlnC par les mutants 7 et 17

Le dosage enzymatique effectué sur le surnageant de culture de ces deux mutants montre une diminution de production de XlnC par rapport au contrôle. Cette diminution n'est pas imputable à la vitesse de maturation du précurseur qui est dans les deux cas équivalente au contrôle. Par contre l'intensité de marquage du précurseur est plus faible chez les mutants que chez le contrôle ce qui reviendrait à dire que la traduction est affectée chez les deux mutants.

Le gène de la XlnC étant sous le contrôle du promoteur de *xlnA*, il est raisonnable d'affirmer que la transcription est la même dans toutes souches. Néanmoins la quantité d'ARNm de la XlnC n'ayant pas été mesurée, il est possible que le niveau de transcription soit aussi à mettre en cause chez les mutants.

6.4 Analyse de la sécrétion par le système Tat chez *S. albus*

La XlnC de *S. lividans* est Tat-dépendante et son précurseur est probablement partiellement replié avant d'être sécrété (Faury *et al.*, 2004).

GroEL1 est une chaperonne cytoplasmique dont on connaît une soixantaine de substrats cytoplasmiques allant de 20 à 60-kDa de poids moléculaire. Par ailleurs, il est connu que d'autres protéines cytoplasmiques s'associent aux précurseurs. Les cyclophilines (Cyps) appartiennent à la famille des peptidyl prolyl *cis/trans* isomérases (PPIases). Chez *Streptomyces chrysomallus* deux cyclophilines ont été caractérisées et leur rôle de chaperonnes a été mis en évidence, il s'agit de CypA et CypB (Berger *et al.*, 1999) ; la

détection par des anticorps spécifiques de la présence de CypA dans des fractions protéiques ne présentant pas d'activité PPlasique, montre qu'elles peuvent se lier à plusieurs substrats (Pahl *et al.*, 1997). À cause des besoins spécifiques du système Tat, il était envisageable de considérer la XlnC comme substrat éventuel des chaperonnes cytoplasmiques.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité xylanolytique du surnageant de culture de *S. albus* *groEL1* sécrétant la XlnC pour la comparer à celle de la souche sauvage.

L'équivalence des deux mesures laissait envisager que la chaperonne GroEL1 est indépendante de la sécrétion de la XlnC par le système Tat. Cette supposition s'est vue confirmée par le suivi de la maturation du précurseur de la XlnC chez ces deux souches, où il est montré que la vitesse de sécrétion est similaire dans les deux cas et que toute la XlnC synthétisée est prise en charge par le système Tat. Ces résultats suggèrent fortement que le précurseur de la XlnC ne fasse pas partie des substrats de GroEL1 dans le cytoplasme de *S. albus*. En effet, la soixantaine de substrats de GroEL identifiés, sont des molécules cytoplasmiques et non pas des protéines extracellulaires (Houry, 2001^b).

Les mêmes expériences reprises avec le mutant *hsp18* ont fourni des résultats semblables.

Nous n'avons détecté aucune différence entre la sécrétion de protéines par *S. albus* WT par rapport à ses mutants, autant pour le système Sec que Tat. Il aurait été intéressant d'analyser la sécrétion par des souches super productrices de GroEL1 et HSP18, cette situation de stress artificielle aurait pu nous renseigner d'avantage sur les rôles de ces chaperonnes dans les systèmes de sécrétion Sec et Tat chez les *Streptomycètes*.

6.5 Induction des gènes produisant des xylanases chez *Streptomyces albus*

La seule étude existante sur la production de xylanases natives de *S. albus* n'étant pas concluante, nous avons essayé d'induire la sécrétion de xylanases par les trois souches

dont nous disposions, soit les chaperonnes négatifs *hsp18*, *groEL* ainsi que la souche sauvage WT.

L'induction des gènes consistant simplement à fournir à la bactérie le xylane comme seule source de carbone, nous avons prélevé des échantillons périodiquement pour en mesurer la croissance cellulaire et l'activité enzymatique. Ces expériences ont été complémentées par la détection immunologique par « Western Blotting » des xylanases éventuellement présentes dans le surnageant de culture. Par contre, par leur disponibilité, cette dernière expérience a été menée avec des anticorps spécifiques aux xylanases A, B et C de *S. lividans*, dont on pouvait espérer qu'ils reconnaissent au moins partiellement les enzymes sécrétées par *S. albus*.

Les résultats de dosage enzymatique révèlent l'absence de xylanases dans le surnageant de culture des trois souches, ou tout de moins, la présence en quantités insuffisantes pour être détectées par la méthode du « DNS ». Par ailleurs, le « Western Blotting » révèle l'absence de molécules homologues aux xylanases de *S. lividans*, dans le surnageant de culture des trois souches de *S. albus*.

L'ensemble de ces résultats indiquerait que *S. albus* n'est pas un organisme naturellement producteur de xylanases en quantités significatives, soit qu'il ne possède pas de gènes de xylanase ou qu'ils sont silencieux dans ces souches.

7 Conclusions

Puisque les composantes Sec et Tat ainsi que les mécanismes de sécrétion respectifs sont assez bien connus, à présent l'emphase est mise sur l'étude des mécanismes cellulaires complémentaires à la sécrétion comme le repliement et le clivage du peptide signal ainsi que l'acquisition de transformations posttraductionnelles ou posttranslocationnelles du précurseur. Plusieurs de ces mécanismes impliquent l'intervention de protéases et chaperonnes, soit de molécules chargées de protéger les précurseurs des relations illégitimes, de favoriser le repliement adéquat ou de dégrader les précurseurs récalcitrants.

S. lividans sécrète trois xylanases dont la XlnA et la XlnB sont dépendantes du système Sec tandis que la XlnC est Tat-dépendante pour leur sécrétion. Tout au long du processus, ces enzymes sont susceptibles d'être en relation avec des protéases et des chaperonnes : la XlnA et XlnB nécessitent de conserver leur linéarité avant la translocation tandis qu'au contraire, la XlnC doit être repliée au moins partiellement, avant de traverser la membrane. En plus, le clivage du peptide signal requiert l'action d'une signal peptidase et le repliement extracytoplasmique suggère l'intervention de chaperonnes.

Finalement, l'existence de plusieurs formes de XlnA et XlnB dans le surnageant de culture, suggère l'action d'une protéase pour le clivage et la dégradation du « XBD », sans oublier que dans certains cas les chaperonnes peuvent avoir une activité protéolytique et que les protéases peuvent se comporter comme chaperonnes.

La présente étude visait à déterminer l'effet des mutations de protéases et de chaperonnes dans les processus de sécrétion de protéines Sec et Tat, chez *S. lividans* et *S.albus*, en utilisant comme modèles la XlnA, XlnB et XlnC de *S. lividans* .

Lors de l'analyse du système Sec, les résultats obtenus montrent une diminution de la quantité de XlnA sécrétée par les mutants *S. lividans* protéase négatifs, par rapport au contrôle. À première vue, ce phénomène suggérait un rôle pour ces protéases dans le système Sec, mais, puisque la maturation du précurseur s'est réalisée normalement et que la demi-vie du précurseur dans le cytoplasme était semblable pour les mutants et pour le contrôle, nous avons conclu que les protéases mutées n'affectent aucunement le système Sec chez *S. lividans*.

Par contre, nous avons trouvé que la faible quantité d'enzyme chez le mutant 12 était possiblement le résultat d'un défaut de traduction de la XlnA. Chez les autres mutants ce phénomène demeure obscur, mais on soupçonne que la croissance inégale des mutants pourrait en être au moins partiellement responsable.

Les protéases mutées n'intervenant pas dans le processus de sécrétion, nous avons essayé de comprendre leur rôle dans la dégradation extracellulaire de la XlnA et de la XlnB. Ainsi, nos résultats montrent leur participation dans la transformation de la XlnA1 de 41-kDa en XlnA2 de 31-kDa. Chez la souche sauvage qui produit naturellement de la XlnA2 et XlnB2, elles ne sont pas impliquées dans la production naturelle de XlnB2 débarrassée du « XBD ».

Chez *S. albus*, les résultats de dosage enzymatique, mettaient déjà en évidence une similitude dans la sécrétion de XlnA par les mutants *groEL1*, *hsp18* et *S. albus* WT ; le suivi de la maturation du précurseur montre des processus identiques autant chez le WT que chez les mutants, confirmant que les chaperonnes GroEL1 et HSP18 n'interviennent pas dans le processus de sécrétion par la voie Sec chez *S. albus*.

L'analyse du système de sécrétion Tat chez *S. lividans*, montre que malgré la faible quantité de XlnC sécrétée à partir du plasmide multicopies, le processus Tat n'est pas affecté par la mutation des protéases. Nous n'avons pas essayé d'expliquer cette diminution généralisée dans la sécrétion de la XlnC, mais nous pouvons supposer qu'elle

est provoquée par les mutations elles-mêmes ou bien par la croissance variable des souches.

Chez *S. albus*, autant l'activité enzymatique que la maturation du précurseur sont presque identiques qu'il s'agisse de la souche sauvage ou des mutants *groEL1* et *hsp18*. Malgré que les caractéristiques du système Tat suggèrent fortement l'intervention de chaperonnes intracellulaires, nos résultats montrent que GroEL1 et HSP18 seraient indépendants de la voie Tat de sécrétion de protéines.

Finalement, nous avons démontré que *S. albus*, n'étant pas lui-même un organisme producteur de xylanase, est capable de sécréter efficacement la XlnA et la XlnC de *S. lividans*.

Malgré que les protéases et chaperonnes que nous avons étudié ne semblent pas intervenir dans les systèmes Sec et Tat de sécrétion de protéines, il n'est pas exclu que d'autres molécules y participent. Cette étude ouvre le chemin à d'autres travaux similaires destinés à mieux comprendre les processus complémentaires à la sécrétion, tout en restant d'actualité grâce à l'intérêt existant pour la production de protéines recombinantes.

Annexes

ANNEXE A

Description des principales caractéristiques des souches mutantes utilisées.

SOUCHE	DESCRIPTION	SOURCE
<i>S. lividans</i> mutant 7	<i>S. lividans</i> 66 <i>tap</i> ⁻ fragment <i>Bgl</i> III	Butler et <i>al.</i> (1995) Cangene Corporation, Mississauga, Ont.
<i>S. lividans</i> mutant 12	<i>tap</i> ⁻ fragment <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III, <i>ssp</i> ⁻	Butler et <i>al.</i> (1996) Cangene Corporation, Mississauga, Ont.
<i>S. lividans</i> mutant 17	Mutations non communiquées	Cangene Corporation, Mississauga, Ont.
<i>S. lividans</i> 10-164	Mutant xylanase et cellulase négatif, résultat d'une mutation dans le gène <i>msiK</i> qui fournit de l'énergie aux perméases membranaires de certains disaccharides	Hurtubise et <i>al.</i> (1995) INRS-IAF, Laval, Qué.
<i>S. albus</i> WT	Souche sauvage	Mazodier, Institut Pasteur, Paris- France
<i>S. albus</i> GroEL1	<i>S. albus</i> <i>groEL</i> 1 ⁻	Guglielmi et <i>al.</i> (1991) ; Mazodier et <i>al.</i> (1991). Mazodier, Institut Pasteur, Paris- France
<i>S. albus</i> HSP18	<i>S. albus</i> <i>hsp</i> 18 ⁻	Servant et Mazodier (1994). Mazodier, Institut Pasteur, Paris- France

ANNEXE B

Liste des plasmides utilisés avec leurs principales caractéristiques.

NOM	DESCRIPTION	
pIAF916C	Dérivé de pIAF906. Le peptide signal et le gène de la XlnA ont été remplacés par le peptide signal et le gène <i>xlnC</i> .	Faury <i>et al.</i> , 2004
pIAF916C-H	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>)	Cette étude
pIAF917C	Dérivé de pIAF906. Le peptide signal du gène <i>xlnA</i> a été remplacé par celui du gène <i>xlnC</i> tronqué de 20 a.a. à son extrémité N-terminale.	Faury <i>et al.</i> , 2004
pIAF917C-H	Dérivé de pIAF917C. Le gène de résistance au thiostrepton a été remplacé par celui de la résistance à l'hygromycine (<i>hyg</i>)	Cette étude
pIAF906	Dérivé de pIJ702. Plasmide arborant le gène <i>xlnA</i> , l'extrémité C-terminale de l'enzyme produite par ce clone (41-kDa) est dégradée dans le surnageant de culture pour générer la XlnA2 de 31-kDa	Études antérieures
pIAF906-H	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>)	Cette étude
pIAF906.A3	Dérivé de pIAF906. Le gène de structure de la XlnA a été remplacé par la séquence codant uniquement pour le domaine catalytique de la XlnA.	Cette étude
pIAF906.A3-H	Dérivé de pIAF906.A3 Le gène de résistance au thiostrepton (<i>tsr</i>) a été remplacé par celui de la résistance à l'hygromycine (<i>hyg</i>)	Cette étude
pIAFSB1m3	Dérivé de pIAF906. Le ps de la xylanase A a été remplacé par celui de CelA long avec modification du TTG interne en ATG et ajout d'une boîte complémentaire à l'ARNr 16S <i>cagtecca</i> située à 15 nt du premier codon d'initiation. Le gène <i>xlnA</i> a été remplacé par le gène <i>xlnB</i> . Plasmide produisant la XlnB1 et la XlnB2.	Gauthier <i>et al.</i> , in press.
pIAFSB1m3-H	Dérivé de pIAFSB1m3. Le gène de résistance au thiostrepton (<i>tsr</i>) a été remplacé par celui de la résistance à l'hygromycine (<i>hyg</i>)	Cette étude

ANNEXE C

Composition et préparation des milieux de culture utilisés.

▪ **Préparation du milieu TSB (1 litre)**

Dissoudre 27.5 g de TSB (Difco) sans dextrose dans 1 litre d'eau. Stériliser avant utilisation.

▪ **Préparation du milieu minimal M14 (1 litre)**

Dissoudre dans 700 ml d'eau distillée :

(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1.4 g
K ₂ HPO ₄ :	5 g
KH ₂ PO ₄ :	1 g
Sels Mandels (Mandels <i>et al.</i> , 1974)	1 ml
TWEEN 80	2 ml

Ajuster le volume d'eau à 1 litre et le pH à 7,4.

Si la source de carbone est le xylane d'épeautre d'avoine, peser le substrat directement dans le flacon et ajouter le milieu de culture avant de stériliser. Peser 0.2 g de xylane par 20 ml de milieu. Si la source de carbone est le xylose, préparer une solution stérile de D-xylose 20% et l'ajouter au milieu déjà stérile, 1ml par 20 ml de milieu. Dans les deux cas la concentration finale du substrat est de 1%.

Pour chaque 20 ml de milieu, ajouter 120 µl d'une solution 5% de MgSO₄.7H₂O, et 200µl d'une solution 3% de CaCl₂, toutes les deux stérilisées préalablement par filtration.

▪ **Préparation du milieu M13**

Le milieu M13 est similaire au M14 mais il est enrichi avec 1mg/ml de protéose-peptone et 0.5mg/l d'extrait de levures.

▪ **Préparation du milieu R5 (1litre)**

Dissoudre dans 955 ml d'eau distillée :

Sucrose :	103 g
K ₂ SO ₄ :	0.25 g
MgCl ₂ :	10.12 g
Glucose :	10 g
Acide casamino :	0.1 g
Éléments traces (Hopwood, 1985)	2 ml
Extrait de levure	5 g
TES acide	5.73 g

Ajouter 22 g d'agar avant de stériliser à 120 °C pendant 20 minutes. Laisser refroidir jusqu'à 55 °C. Pour chaque litre stérile de la préparation précédente, ajouter le volume indiqué de chacune de ces solutions :

KH ₂ PO ₄ 0,5% (autoclavée) :	10 ml
CaCl ₂ 5M (autoclavée) :	4 ml
CuSO ₄ 5mg/ml (autoclavée) :	1 ml
L-Proline 20% (filtrée 0,2µm) :	15 ml
L-Méthionine 1% (filtrée) :	10 ml
L-Tyrosine 0.4 gr dans 5 ml de NaOH 1N (filtrée) :	5 ml

Couler 20 ml par Pétri, laisser sécher pendant 5 jours ou jusqu'à la perte de 15% de son poids.

▪ Préparation du milieu SFM (1 litre)

Diluer 20 g de mannitol dans 1 litre d'eau du robinet.

Peser et déposer directement dans un Erlenmeyer de 2 litres :

Farine de soya :	20 g
Agar :	20 g

Ajouter la solution de mannitol, stériliser et laisser refroidir à 55°C .

Avant de remplir les plaques de Pétri, on ajoute l'antibiotique à la concentration de 250 µg/ml d'hygromycine.

L'utilisation d'eau du robinet garanti l'incorporation de certains éléments traces absents de l'eau distillée.

▪ Préparation du milieu RBB-xylane

Solution 1

Dissoudre 1 g de RBB dans 125 ml d'eau en faisant bouillir pendant 30 minutes.

Solution 2

Préparer dans 375 ml d'eau distillée :

Sels Mandels :	0.5 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g
KH ₂ PO ₄ :	0.75 g
K ₂ HPO ₄ :	2.5 g
Extrait de levures :	0.25 g
KCl :	0.25 g

Ajuster le pH de la solution 2 à 7.2 et ajouter 8.5 g d'agar. Stériliser pendant 20 minutes à 120 °C et laisser refroidir jusqu'à 55°C avant de combiner avec la solution 1.

Finalement ajouter 5 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et couler 20 ml de ce milieu par boîte de Pétri.

ANNEXE D

Composition et préparation des tampons et des solutions utilisés pour les expériences de dosage enzymatique.

Préparation du tampon citrate-phosphate 0,5 M pH 6,0 (10X) (100ml)

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 6,0 :

NaHPO ₄ ·7H ₂ O	17.22 gr
Acide citrique	3.43 gr

Préparation de la solution d'acide dinitrosalicylique « DNS » (1 litre)

Dissoudre dans 700 ml d'eau distillée :

NaOH :	10 gr
DNS :	10 gr
Phénol :	2 gr
Tartrate sodium potassium :	200 gr

Ajuster le volume à 1 litre. Filtrer sur du papier Wathman #1 et conserver à la température de la pièce dans une bouteille brune à l'abri de la lumière.

Préparation de la solution de sulfite de sodium (100ml)

Dissoudre 10 g de sulfite de sodium (NaSO₃) dans 100 ml d'eau.

Préparation de la solution de xylane 1%

A préparer fraîche avant chaque essai enzymatique.

Pour 50 ml de solution dissoudre au four micro-ondes 0.5 g de xylane de bouleau dans 50 ml d'eau. Laisser refroidir à la température de la pièce et ajuster le volume à 50 ml avec de l'eau distillée.

ANNEXE E

Composition des tampons utilisés pour les expériences de « Pulse-Chase ».

- **Tampon SP (10 ml)**

Tris-HCl 1M, pH 6.8 :	0.5 ml
EDTA 100 mM :	0.2 ml
β-mercaptoéthanol :	0.1 ml
H ₂ O :	9.2 ml

- **Tampon IPD (120 ml)**

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 % :	12 ml
H ₂ O :	69.6 ml

- **Tampon IPW (100 ml)**

Tris-HCl 1M pH 7.4 :	1 ml
NaCl 1 M :	15 ml
Triton X-100 5% :	10 ml
Na-Désoxycholate 5% :	10 ml
H ₂ O :	64 ml

ANNEXE F

Composition des tampons d'électrophorèse.

- **Tampon TAE 50 X pour gels d'agarose**

Tris base :	242 g
Acide acétique glacial :	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0 :	100 ml
H ₂ O :	compléter le volume à 1 litre.

- **Tampon Tris-glycine 5X pour SDS-PAGE**

Diluer dans 900 ml H₂O :

Tris base :	15.1 g
Glycine :	72 g
SDS 10% :	50 ml

Ajuster le pH à 8.3 et le volume à 1 litre. Utiliser ce tampon à concentration 1X.

- **« Continuous Buffer » pour transfert sur membrane**

Glycine	2.93 g
Tris	5.81 g
SDS	0.375 g
Méthanol 20%	200 ml
H ₂ O	ajuster le volume à 1 litre.

ANNEXE G

Composition des tampons pour « Western Blotting ».

- **TBS**

Tris 50mM
NaCl 150mM pH 7.5

- **TBST**

Tween 20 0,1% dans TBS

ANNEXE H

Composition et préparation du tampon P pour la préparation de protoplastes.

Tampon P

Préparer la solution suivante et repartir 80 ml par bouteille avant de stériliser.

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25g
MgCl ₂ .6H ₂ O	2.02g
Solution éléments traces	2.0ml
H ₂ O	800ml

Avant utilisation, ajouter à chaque 80 ml de solution le volume indiqué des solutions stériles suivantes :

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O (3.68%)	10ml
Tampon TES (5.73% pH 7.2)	10ml

ANNEXE I

Composition des solutions utilisées pour la préparation d'ADN plasmidique par la technique de la lyse alcaline.

- **Solution I**

Glucose 50mM
Tris Cl 25mM pH 8.0
EDTA 10mM pH 8.0

- **Solution II**

NaOH 0.2 N
SDS 1%

- **Solution III**

Acétate de potassium 5M
Acide acétique glacial 11.5%

Références

- Agard D.A.** 1993. To fold or not to fold.... *Science* **260**(5116) : 1903-1904
- Akiyama Y., et K. Ito.** 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6** : 3465-3470
- Altman E., Kumamoto C.A. et S. D. Emr.** 1991. Heat-shock proteins can substitute for SecB function during protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **10**(2) : 239-245
- Anfinsen C.B.** 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**(96):223-230
- Antelmann H., Darmon E., Noone D., Veening J. W., Westers H., Bron S., Kuipers O. P., Devine K. M., Hecker M., et J. M. van Dijl.** 2003. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Mol. Microbiol* **49** : 143–156
- Antonopoulos V.T., Hernandez M., Arias M.E., Mavrakos E. et A.S.Ball.** 2001. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**(1-2) : 92-97
- Arhin F.F., Shareck F., Kluepfel D. et R. Morosoli.** 1994. Effects of disruption of xylanase-encoding genes on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **176**(16) : 4924-4930
- Ben-Zvi A.P. et P. Goloubinoff.** 2001. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol.* **135**(2) : 84-93.
- Berger R., Schauwecker F. 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** : 393-404
- Berks B.C., Sargent F. et T. Palmer.** 2000. The TAT protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35** : 260-274
- Berks B.C., Sargent F., De Leeuw E., Hinsley A.P., Stanley N.R., Jack R.L., Buchanan G. et T. Palmer.** 2000. A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochem. Biophys. Acta* **1459** : 325-330
- Bochkareva E.S., Solovieva M.E. et A. S. Girshovich.** 1998. Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(2) : 478-83

Bogyo M., McMaster J.S., Gaczynska M., Tortorella D., Goldberg A.L. et H. Ploegh. 1997. Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(13) : 6629-6634

Bolhuis A., Matzen A., Hyyrylainen H.L., Kontinen V.P., Meima R., Chapuis J., Venema G., Bron S., Freudl R. et J. M. van Dijl. 1999. Signal peptide peptidase- and ClpP-like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins. *J Biol Chem*. **274**(35) : 24585-24592

Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D.C., Joachimiak A., Horwich A.L. et P.B Sigler. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*. **371**(6498) : 578-586

Braig K., Simon M., Furuya F., Hainfeld J. F. et A. L. Horwich. 1993. A polypeptide bound by the chaperonin groEL is localized within a central cavity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(9) : 3978-3982

Buchner J., Schmidt M., Fuchs M., Jaenicke R., Rudolph R., Schmid F. X. et T. Kiefhaber. 1991. GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* **30**(6) : 1586-1591

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

Butler M. J., Aphale J. S., Binnie C., DiZonno M. A., Krygsman P., Soltes G., Walczyk E. et L. T. Malek. 1996. Cloning and analysis of a gene from *Streptomyces lividans* 66 encoding a novel secreted protease exhibiting homology to subtilisin BPN'. *Appl Microbiol Biotechnol*. **45**(1-2) : 141-147

Butler M. J., Binnie C., DiZonno M. A., Krygsman P., Soltes G. A., Soostmeyer G., Walczyk E. et L. T. Malek. 1995. Cloning and characterization of a gene encoding a secreted tripeptidyl aminopeptidase from *Streptomyces lividans* 66. *Appl Environ Microbiol*. **61**(8) : 3145-3150

Butler M. J., Davey C. C. , Krygsman P., Walczyk E. et L. T. Malek. 1992. Cloning of genetic loci involved in endoprotease activity in *Streptomyces lividans* 66: a novel neutral protease gene with an adjacent divergent putative regulatory gene. *Can J Microbiol*. **38**(9) : 912-920

Chaddock A. M., Mant A., Karnauchov I., Brink S., Herrmann R.G., Klosgen R.B. et C. Robinson. 1995. A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J*. **14** (1995) : 2715-2722.

Chou, M. M., et D. A. Kendall. 1990. Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J. Biol. Chem.* **265** : 2873–2880.

Crécy-Lagard V. de, Servant-Moisson P., Viala J., Grandvalet C. et P. Mazodier. 1999. Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* **32** : 555

Cristóbal S., de Gier J.-W., Nielsen, H., et G. von Heijne. 1999. Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* **18** : 2982-2990

Dalbey R. and G.von Heijne. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes: a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* **17** : 474-478

De Leon P., Marco S., Isiegas C., Marina A., Carrascosa J. L. et R.P, Mellado. 1997. *Streptomyces lividans* groES, groEL1 and groEL2 genes. *Microbiology* **143** : 3563-3571

De Vrije T., Batenburg A. M., Killian J. A. et B. de Kruijff. 1990. Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **4** : 143–150.

Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Morosoli R., Shareck F., Kluepfel D., Derewenda Z.S. 1994. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *J Biol Chem.* **269**(33) : 20811-20814

van Dijl J.M., Braun P.G., Robinson C., Quax W.J., Antelmann H., Hecker M., Muller J., Tjalsma H., Bron S. et J.D. Jongbloed. 2002. Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. *J Biotechnol.* **98**(2-3) : 243-54

Driessen A.J., Fekkes P. et J.P. van der Wolk. 1998. The Sec system. *Curr Opin Microbiol.* **1**(2) : 216-22.

Faury D., Saidane S., Li H. 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) : 155-162

Fekkes, P., et A.J.M. Driessen. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**(1) : 161-173

Fekkes P., de Wit J. G., van der Wolk J. P. W., Kimsey H. H., Kumamoto C. A. et A. J. M. Driessen. 1998. Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the cooperative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol. Microbiol.* **29** : 1179–1190

- Fernandez-Abalos J.M., Reviejo V., Diaz M., Rodriguez S., Leal F. et R.I. Santamaria.** 2003. Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases. *Microbiology* **149**(Pt 7) : 1623-1632
- Gauthier C., Li H. 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):3085-3092
- Gervasoni P., Staudenmann W., James P. et A. Pluckthun.** 1998. Identification of the binding surface on beta-lactamase for GroEL by limited proteolysis and MALDI-mass spectrometry. *Biochemistry.* **37**(33) : 11660-11669
- Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Casjens S. R. et Kaiser A. D.** 1973. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J Mol Biol* **76**(1):45-60
- Gilbert M., Morosoli R., Shareck F., et D. Kluepfel.** 1995. Production and secretion of proteins by Streptomyces. *Crit. Rev. Biotech.* **15** : 13-39
- Gottesman S.** 1999. Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr. Op. Microbiol.* **2** : 142-147
- Gottesman S., Maurizi M.R. et S. Wickner.,** 1997. Regulatory subunits of Energy-dependent proteases. *Cell* **9** : 435-438
- Gottesman S. et M. R. Maurizi.** 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev.* **56** : 592-621
- Grandvalet C., Crécy-Lagard V.de. et P. Mazodier.** 1999. The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol. Microbiol.* **31** : 521-532
- Guglielmi G., Mazodier P., Thomson C. J. et J. Davies.** 1991. A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two *groEL*-like genes and three *groEL* like proteins in *Streptomyces albus*. *J. Bacteriol.* **173** : 7374-7381
- Herman, C. et R. D'Ari.** 1998. Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr. Op. Microbiol.* **1** : 204-209
- Horwich A.L., Weber-Ban E.U. et D. Finley.** 1999. Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(20) : 11033-11040
- Houry W.A^a.** 2001. Chaperonne-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci* **2** : 227-244

Houry W.A^b. 2001. Mechanism of substrate recognition by the chaperonin GroEL. *Biochem Cell Biol.* **79**(5) : 569-577

Houry W.A., Frishman D., Eckerskorn C., Lottspeich F. et F. U. Hartl. 1999. Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature.* **402**(6758) : 147-154

Hubbard T.J. et C. Sander. 1991. The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng.* **4**(7) : 711-717

Hurtubise Y., Shareck F., Kluepfel D. 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) : 367-377

Ignatova Z., Mahsunah A., Georgieva M. et V. Kasche. 2003. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* **69**(2) : 1237-1245

Jongbloed J.D., Martin U., Antelmann H., Hecker M., Tjalsma H., Venema G., Bron S., van Dijk J.M. et J. Muller. 2000. TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J Biol Chem.* **275**(52) : 41350-41357

Kessel M., Wu W., Gottesman S., Kocsis E., Steven A.C. 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) : 274-278

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

Kieffer L.J., Thalhammer T. et R.E. Handschumacher. 1992. Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J Biol Chem.* **267**(8) : 5503-5507

Kluepfel D., Vats-Mehta S., Aumont F., Shareck F. et R. Morosoli. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem J.* **267**(1) : 45-50

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

Kluepfel D., Daigneault N., Morosoli R. et F. Shareck. 1992. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl Microbiol Biotechnol* **36** : 626-631

- Knipfer N. et T.E. Shrader.** 1997. Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* **25**(2) : 375-383
- Krukltis R., Welty D.J. et H. Nakai.** 1996. ClpX protein of *Escherichia coli* activates bacteriophage Mu transposase in the strand transfer complex for initiation of Mu DNA synthesis. *EMBO J.* **15**(4) : 935-944
- Kumamoto C.A. et A. K. Nault.** 1989. Characterization of the *Escherichia coli* protein-export gene *secB*. *Gene* **75**(1) : 167-175
- Kumamoto C.A. et J. Beckwith.** 1983. Mutations in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **154**(1) : 253-260
- Kusukawa N., Yura T., Ueguchi C., Akiyama Y. et K. Ito.** 1989. Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**(11) : 3517-3521
- Lecker S., Lill R., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C., Bassford P.J. Jr, Kumamoto C.A. 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) : 2703-2709
- Lee S., Sowa M.E., Choi J.M. et F.T Tsai.** 2004. The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. *J Struct Biol.* **146**(1-2) : 99-105
- Mallik I., Smith M.A. et A. M. Flower AM.** 2002. Recognition of secretory proteins in *Escherichia coli* requires signals in addition to the signal sequence and slow folding. *BMC Microbiol* **2**(1) : 32
- Mandels M., Hontz I. et J. Nystrom.** 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* **16**:1471-1493
- Mazodier P., Guglielmi G., Davies J. et C. J. Thomson.** 1991. Characterization of the *groEL*-like genes in *Streptomyces albus*. *J. Bacteriol.* **173** : 7382-7386
- Miller G. L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* **31**: 426-428
- Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rudiger S., Roder D., Langen H. et B. Bukau.** 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**(24) : 6934-6949
- Mori, H. et K. Ito.** 2001. The Sec protein-translocation pathway. *TRENDS in Microbiol.* **9** : 494-500

- Morosoli R., Shareck F. et D. Kluepfel.** 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* **146**(2) : 167-174
- Morosoli R., Bertrand J.L., Mondou F., Shareck F. et D. Kluepfel.** 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem J.* **239**(3) : 587-592
- Morosoli R. et C. Dupont.** 1999. Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans* : dependance on signal peptides length, number and composition. *FEMS Microbiol. Lett.* **179** : 437-445
- Msadek T., Dartois V., Kunst F., Herbaud M. L., Denizot F. et G. Rapoport.** 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* **27**(5) : 899-914
- Muller J.P., Ozegowski J., Vettermann S., Swaving J., Van Wely K.H. et A. J. Driessen.** 2000. Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem J.* **348** Pt 2 : 367-373
- Naberhaus F.** 2002. α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Rev.* **66** : 64-93
- Nagy I., Banerjee T., Tamura T., Schoofs G., Gils A., Proost P., Tamura N., Baumeister W. et R. De Mot.** 2003. Characterization of a novel intracellular endopeptidase of the alpha/beta hydrolase family from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* **185**(2) : 496-503
- Nagy I., Tamura T., Vanderleyden J., Baumeister W. et R. De Mot.** 1998. The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **180**(20) : 5448-5453
- Nivière V., Wong S.-L. et G.Voordouw.** 1992. Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein. *J. Gen. Microbiol.* **138** : 2173-2183
- Nishiyama K., Mizushima S. et H. Tokuda.** 1993. A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* **12** : 3409-3415
- Oresnik I.J., Ladner C.L. et R.J. Turner.** 2001. Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol.* **40**(2) : 323-331
- Paek K.H. et G.C. Walker.** 1987. *Escherichia coli* dnaK null mutants are inviable at high temperature. *J Bacteriol.* **169**(1) : 283-290

- Pahl A., Gewies A. et U. Keller U.** 1997. ScCypB is a novel second cytosolic cyclophilin from *Streptomyces chrysomallus* which is phylogenetically distant from ScCypA. *Microbiology*. **143** (1):117-126
- Pagé N., Kluepfel D., Shareck F. et R. Morosoli.** 1996. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans* : dependence on number of ribosome-binding sites. *Nat. Biotechnol.* **14** : 756-759
- Paradis F.W., Shareck F., Dupont C., Kluepfel D. et R. Morosoli.** 1996. Expression and secretion of beta-glucuronidase and Pertussis toxin S1 by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **45**(5) : 646-651
- Pogliano J.A et J. Beckwith.** 1994. SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13**(3) : 554-561
- Porankiewicz J., Wang J. et A.K. Clarke.** 1999. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol.* **32**(3) : 449-458
- Pugsley A.P.** 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57** : 50-108
- Pummi T., Leskela S., Wahlstrom E., Gerth U., Tjalsma H., Hecker M., Sarvas M. et V.P. Kontinen.** 2002. ClpXP protease regulates the signal peptide cleavage of secretory preproteins in *Bacillus subtilis* with a mechanism distinct from that of the Ecs ABC transporter. *J Bacteriol.* **184**(4) : 1010-1018
- Randall L.L., Topping T.B., Hardy S.J., Pavlov M.Y., Freistroffer D.V. et M. Ehrenberg.** 1997. Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(3) : 802-807
- Randall L.L. et S. J. Hardy.** 1995. High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends Biochem Sci.* **20**(2) : 65-69
- Randall L.L. et S. J. Hardy.** 1986. Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study *in vivo* of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell* **46**(6) : 921-928
- Sargent F., Stanley N.R., Berks B.C. et T. Palmer.** 1999. Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem.* **274**(51) : 36073-36082
- Schatz P. J., Riggs P. D., Jacq A., Fath M. J., et J. Beckwith.** 1989. The *secE* gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3**(7) : 1035-1044.

- Schaerlaekens K., Van Mellaert L., Lammertyn E., Geukens N. 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
- Schaerlaekens K., Schierova M., Lammertyn E., Geukens N., Anne J. et L. Van Mellaert.** 2001. Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*. **183**(23) : 6727-6732
- Servant P. et P. Mazodier.** 1995. Characterization of *Streptomyces albus* 18-kilodalton Heat Shock-Responsive protein. *J. Bacteriol*. **177** : 2998-3003
- Servant P., Thompson C. J. et P. Mazodier.** 1994. Post-transcriptional regulation of the groEL1 gene of *Streptomyces albus*. *Mol Microbiol*. **12**(3) : 423-432
- Shareck F., Roy C., Yaguchi M., Morosoli R. et D. Kluepfel .** 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene* **107** : 75-82
- Sobczyk A., Bellier A., Viala J.,et P. Mazodier P.** 2002. The lon gene, encoding an ATP-dependent protease, is a novel member of the HAIR/HspR stress-response regulon in actinomycetes. *Microbiol*. **148** : 1931-1937
- Spiess C., Beil A., et M. Ehrmann.** 1999. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heatshock protein. *Cell* **97**: 339–347
- Stanley N.R., Palmer T. 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) : 11591-11596
- Tamura T, Nagy I, Lupas A, Lottspeich F, Cejka Z, Schoofs G, Tanaka K, De Mot R et W Baumeister.** 1995. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of Rhodococcus. *Curr Biol*. **5**(7):766-774
- Tjalsma H., Noback M.A., Bron S., Venema G., Yamane K.et J. M. van Dijl.** 1997. *Bacillus subtilis* Contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities. *J. Biol. Chem*. **272**(10) : 25983-25992
- Tobias J.W., Shrader T.E., Rocap G. et A. Varshavsky.** 1991. The N-end rule in bacteria. *Science* **254** : 1374-1376
- Viala J., Rapoport G. et P. Mazodier .**2000. The clpP multigenic family in *Streptomyces lividans* : conditional expression of the clpP3 clpP4 operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol. Microbiol*. **38** : 602-612

Viala J. et P. Mazodier. 2002. ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* **44** : 633-643

Viitanen P.V., Gatenby A.A. et G.H. Lorimer. 1992. Purified chaperonin 60 (*groEL*) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Protein Sci.* **1**(3) : 363-369.

Vitikainen M., Pummi T., Airaksinen U., Wahlstrom E., Wu H., Sarvas M. et V.P. Kontinen. 2001. Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of alpha-amylase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **183**(6): 1881-1890

Wahlstrom E., Vitikainen M., Kontinen V.P. et M. Sarvas. 2003. The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **149**(Pt 3) : 569-577

Wang J., Hartling J.A. et J.M. Flanagan. 1997. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**(4) : 447-456

Wexler M., Sargent F., Jack R.L., Stanley N.R., Bogsch E.G., Robinson C., Berks B.C. 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) : 16717-16722

Wickner S., Maurizi M.R. et S. Gottesman. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**(5446) : 1888-1893

Wickner S., Gottesman S., Skowrya D., Hoskins J., McKenney K. et M.R. Maurizi. 1994. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25) : 12218-12222

Wolfe P.B., Zwizinski C. et W. Wickner. 1983. Purification and characterization of leader peptidase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **97** : 40-46

Xia D., Esser L., Singh S.K., Guo F. et M.R. Maurizi. 2004. Crystallographic investigation of peptide binding sites in the N-domain of the ClpA chaperone. *J Struct Biol.* **146**(1-2) : 166-179

Yen M.R., Tseng Y.H., Nguyen E.H., Wu L.F. et M. H. Saier Jr. 2002. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol.* **177**(6) : 441-450

Yoo S.J., Kim H.H., Shin D.H., Lee C.S., Seong I.S., Seol J.H., Shimbara N., Tanaka K. et C. H. Chung. 1998. Effects of the *cys* mutations on structure and function of the ATP-dependent HslVU protease in *Escherichia coli*. The Cys287 to Val mutation in

HslU uncouples the ATP-dependent proteolysis by HslvU from ATP hydrolysis. *J Biol Chem.* **273**(36) : 22929-22935