

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**SÉCRÉTION DE LA XYLANASE B PAR LES SYSTÈMES SEC ET TAT CHEZ
*STREPTOMYCES LIVIDANS***

Par
CÉLINE GAUTHIER

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Richard Villemur INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Michaël Mourez Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire
Directeur de recherche	Rolf Morosoli, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses et saprophytes du sol qui produisent plusieurs enzymes extracellulaires telles les xylanases qui dégradent le xylane, un constituant de l'hémicellulose, afin de générer des oligoxylosides de petite taille qui servent de source de carbone pour leur croissance. Chez les bactéries, les protéines sont sécrétées, entre autres, par le système Sec (General Secretory Pathway) qui exporte des protéines non repliées et par le système Tat (Twin Arginine Translocation) qui transporte des protéines déjà repliées. Une des différences entre les systèmes de sécrétion, se situe au niveau du peptide signal.

La xylanase B1 (XlnB1) de *Streptomyces lividans* est une protéine composée d'un domaine catalytique n-terminal et d'un domaine d'attachement au xylan c-terminal. La bactérie sécrète la XlnB1 et également la XlnB2 qui correspond au domaine catalytique de la XlnB1 privé du domaine d'attachement au xylan. Ces deux formes de la xylanase ont la même activité sur le xylan. L'enzyme est sécrétée via le système Sec et la XlnB1 est mieux sécrétée que la XlnB2. Il a été constaté que la XlnB2 possède 80% d'identité avec la XlnC laquelle est sécrétée exclusivement via le système de sécrétion Tat. Afin d'examiner si la XlnB1 et la XlnB2 pouvaient aussi être sécrétées par le système Tat, la séquence signal de la XlnC a été fusionnée respectivement à *xlnB1* et *xlnB2*. La XlnB1 et la XlnB2 ont été sécrétées par le système Tat mais la XlnB2 a été davantage sécrétée que la XlnB1. Puisque la XlnB1 et la XlnB2 pouvaient être mieux sécrétées via les systèmes Sec et Tat respectivement, une copie de *xlnB1* fusionnée à une séquence signal de type Sec et une copie de *xlnB2* fusionnée à une séquence signal de type Tat ont été insérées sur un même plasmide sous le contrôle du promoteur de *xlnA*. Le transformant a produit une activité xylanase correspondant approximativement à la somme des activités des souches individuelles produisant la xylanase par le système Sec ou par le système Tat. Ceci indique que dans cette souche recombinante, les deux systèmes de sécrétion sont fonctionnels et qu'ils n'interfèrent pas entre eux. En assumant que la protéine à être sécrétée peut être repliée correctement par les deux systèmes de sécrétion, l'usage simultané des systèmes Sec et Tat procure un moyen efficace d'augmenter la production d'une protéine donnée.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Céline Gauthier". The signature is fluid and cursive, with a horizontal line drawn underneath it.

Étudiante

A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Hume". The signature is fluid and cursive, with a horizontal line drawn underneath it.

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de recherche, Rolf Morosoli PhD., de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir soutenue, conseillée et motivée tout au long des mes travaux.

Je tiens aussi à remercier les étudiants du laboratoire, particulièrement Haiming Li et Damien Faury pour leurs précieux conseils et de m'avoir enseigné quelques techniques des plus utiles. Je remercie très chaleureusement Johanne Lemay, technicienne de laboratoire, pour ses conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur! À cause de ces personnes, mon passage au laboratoire de Rolf fut très enrichissant et agréable.

Éric, je te remercie du fond du cœur de m'avoir encouragée et soutenue, tout au long de cette démarche.

En terminant, je dédie ce mémoire à ma mère qui est un exemple de courage devant l'épreuve et je lui souhaite de voir son état s'améliorer de jour en jour!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
INTRODUCTION	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 La sécrétion des protéines chez les bactéries	6
1.1.1 Généralités	6
1.2 Un aperçu du système Sec	8
1.2.1 SecB	11
1.2.2 Le complexe membranaire SecYEG	13
1.2.3 SecA, le moteur moléculaire	15
1.2.4 SecA chez les bactéries à Gram positif	19
1.2.5 Le complexe SecDFYajC	20
1.3 La voie SRP (Signal Recognition Particule)	21
1.3.1 SRP chez les bactéries à Gram positif	23
1.4 Coexistence des voies SRP et SecB	25
1.5 Introduction au système Tat	26
1.5.1 Le système Tat transporte des protéines repliées avec ou sans cofacteurs	26
1.5.2 Composition et organisation de l'appareil de transport Tat : les protéines TatA, TatB et TatC	28
1.5.3 Le pore de translocation Tat	31
1.5.4 Caractéristiques des peptides signaux Tat	31
1.5.5 L'importance du motif consensus et du doublet d'arginine	34
1.5.6 Le système Tat chez <i>S. lividans</i>	35
1.6 Les xylanases de <i>S. lividans</i>	39
1.7 Facteurs et éléments impliqués dans la production et la sécrétion des protéines par les streptomycètes	41
1.7.1 Souche et vecteur	42
1.7.2 Promoteur	42
1.7.3 Peptide signal	43
1.7.4 Présence d'un codon d'initiation de la traduction additionnel dans le domaine n.	43
2. MÉTHODOLOGIE	48
2.1 Souches et vecteurs utilisées	49
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> DH11S	49
2.1.2 <i>Streptomyces lividans</i> 10-164	49
2.1.3 <i>Streptomyces lividans</i> 10-164 Δ <i>tatC</i>	50
2.2 Sous-clonage dans <i>E. coli</i>	50
2.2.1 Transformation dans <i>E. coli</i>	50
2.2.2 Mini-préparation chez <i>E. coli</i>	51
2.2.3 Vérification de la présence d'un insert par PCR	51
2.2.4 Purification de plasmide chez <i>E. coli</i>	52

2.3 Clonage dans <i>S. lividans</i>	53
2.3.1 Préparation de protoplastes de <i>S. lividans</i>	53
2.3.2 Transformation des protoplastes de <i>S. lividans</i>	55
2.3.3 Mini-préparation de plasmide chez <i>S. lividans</i>	55
2.3.3.1 Vérification de la présence de l'insert par PCR	56
2.3.4 Maxi-préparation de plasmides de <i>S. lividans</i>	57
2.3.5 Préparation de spores de <i>S. lividans</i>	59
2.3.6 Croissance des clones de <i>S. lividans</i>	60
2.4 Dosage de l'activité xylanase dans le surnageant de culture	60
2.5 Mesure de la croissance du mycélium par estimation de la concentration de l'ADN par la réaction colorimétrique à la diphénylamine	64
2.6 Manipulations et amplification de l'ADN	65
2.6.1 Digestion des plasmides avec enzymes de restriction	65
2.6.1.1 Plasmides purifiés	65
2.6.1.2 Digestion de mini-préparation de plasmides	65
2.6.2 Précipitation à l'éthanol	65
2.6.3 Extraction de l'ADN au phénol chloroforme	66
2.6.4 Ligation du vecteur plasmidique avec un fragment d'ADN	66
2.6.5 Déphosphorylation de vecteurs	66
2.6.6 Technique du PCR	67
2.6.7 Extraction de l'ADN du gel d'agarose	68
2.7 Expérience de marquage métabolique « pulse-chase » chez <i>S. lividans</i>	69
2.8 Immunobuvardage de type western	72
2.9 Quantification des ARNm des différents clones	74
2.9.1 Extraction de l'ARN total des clones	74
2.9.2 Électrophorèse de l'ARN préalablement dénaturé au glyoxal	75
2.9.3 Hybridation des ARNm	76
2.9.4 Préparation de sonde d'ADN plasmidique marquée au ³² P (Nick Translation)	77
2.9.5 Hybridation des membranes avec la sonde radioactive	78
2.10 Construction des plasmides utilisés au cours de l'étude	78
3. RÉSULTATS	88
3.1 Sécrétion de la XlnB1 et de la XlnB2 par le système Sec	89
3.2 Sécrétion de la XlnB1 et de la XlnB2 par le système Tat	89
3.3 Surproduction de la XlnB1 par le système Sec	91
3.4 Surproduction de la XlnB2 par le système Tat	91
3.5 Production des XlnB1 et XlnB2 simultanément par une souche possédant un plasmide portant à la fois les séquences signal Sec et Tat	92
3.6 Limites de sécrétion du système Tat	92
3.7 Importance de la sécrétion Tat	98
3.8 Maturation des précurseurs des XlnB1 et XlnB2 dans les souches recombinantes	100
3.9 Mesure des ARNm	106
4. DISCUSSION	110
5. CONCLUSION	115
6. BIBLIOGRAPHIE	118
APPENDICE A	127
APPENDICE B	134
APPENDICE C	138

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Composantes du complexe de translocation.....	10
Figure 2. Caractéristiques de la molécule SecA.	17
Figure 3. Modèle pour la translocation des précurseurs à travers la membrane à l'aide de SecA.	18
Figure 4. Représentation schématique et comparaison des SRP chez les eucaryotes et les bactéries soit <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	24
Figure 5. Coexistence des voies SRP et SecB.	25
Figure 6. Topologie prédite des produits des gènes <i>tatA</i> , <i>tatB</i> , <i>tatC</i> et <i>tatE</i> chez <i>E. coli</i>	30
Figure 7. Modèle de fonctionnement du système de transport Tat chez <i>E. coli</i>	30
Figure 8. Comparaison des peptides signaux Sec et Tat.....	32
Figure 9. Schéma de la cassette d'expression sécrétion qui contient le promoteur du gène <i>xlnA</i> et la longue séquence signal de <i>celA</i>	47
Figure 10. Plasmides de <i>S. lividans</i> utilisés au cours de l'étude.	86
Figure 11. Plasmides de <i>S. lividans</i> utilisés au cours de l'étude (suite).....	87
Figure 12. Constructions Sec, Tat, Sec et Tat en tandem avec un ou deux promoteurs <i>xlnA</i>	94
Figure 13. Activité xylanasiqne et croissance du mycélium des transformants IAF907-SB1, IAF907-TB2 et IAF907-SB1TB2.....	95
Figure 14. Activité xylanasiqne et croissance du mycélium des transformants bicistroniques Sec et Tat dépendants.....	96
Figure 15. Activité xylanasiqne et croissance du mycélium des transformants IAF907-TB2pATB2 et IAF907-TB2.	97
Figure 16. Activité xylanasiqne et croissance du mycélium de tous les plasmides recombinants introduits dans le mutant <i>S. lividans</i> 10-164 Δ <i>tatC</i>	99
Figure 17. Maturation des précurseurs des XlnB1 et XlnB2 dans <i>S. lividans</i>	103
Figure 18. Analyse par immunobuvardage de type western des xylanases dans le surnageant de culture des clones.	104
Figure 19. Maturation des précurseurs des XlnB1 et XlnB2 dans <i>S. lividans</i> Δ <i>tatC</i>	105
Figure 20. Transfert d'ARN en puits « Slot blot » des transformants de <i>S. lividans</i>	107
Figure 21. Analyse comparative des proportions d'ARNm de chaque clone	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison des peptides signaux Sec et Tat.	33
Tableau 2. Les 230 peptides signaux Tat putatifs.	38
Tableau 3. Caractéristiques des XlnA, XlnB et XlnC de <i>S. lividans</i>	40
Tableau 4. Séquence en acides aminés de certains peptides signaux de Streptomyces.	46
Tableau 5. Effet de la modification de la longue séquence signal de <i>celA</i> sur la production de XlnA.	47
Tableau 6. Dosage de la xylanase.	63
Tableau 7. Amorces utilisées dans cette étude.	82
Tableau 8. Plasmides de <i>S. lividans</i> utilisés dans cette étude.	83
Tableau 9. Plasmides de <i>S. lividans</i> utilisés dans cette étude (suite).	84
Tableau 10. Plasmides de <i>E. coli</i> utilisés dans cette étude.	85
Tableau 11. Activité xylanasiqne dans les surnageants de culture de <i>S. lividans</i> 10-164 transformée avec les plasmides pIAF915B1, pIAF915B2, pIAF916B1 et pIAF916B2.	90
Tableau 12. Récapitulatif de l'activité xylanasiqne dans le surnageant de culture de <i>S. lividans</i> 10-164 et de <i>S. lividans</i> 10-164 Δ <i>tatC</i> transformés avec différents plasmides.	109

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

°C : degré Celsius
Å : Amstrong
a.a. : acide aminé
ADN : Acide Desoxyribo Nucléique
ADP : Adénosine Di-Phosphate
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
Ci : Curie
c-terminal : carboxy-terminal
D.O. : Densité Optique
FPM : Force Proton Motrice
g : gramme; mg : milligramme; µg : microgramme; ng : nanogramme
GSP : General Secretory Pathway
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
h : heure
kDa : kiloDalton
L : litre; ml : millilitre; µl : microlitre
M : molaire
mA : milliAmpère
min : minute
mol : mole; mmol : millimole; µmol : micromole; nmol : nanomole; pmol : picomole
N : normal
NBS : Nucleotide Binding Site
nm : nanomètre
nt : nucléotide
n-terminal : amino-terminal
ORF : Open Reading Frame
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pb : paire de bases
PCR : Polymérase Chain Reaction
ps : peptide signal
rpm : rotation par minute
SD : Shine-Dalgarno
Sec : General secretory pathway
sec : seconde
SRP : Signal Recognition Particule
T° : température
Tat : Twin Arginine Translocation
TF : trigger factor
u.v. : ultra-violet
UI : Unité Enzymatique Internationale
V : volt
Vol : volume

XBD : Xylan Binding Domain

XlnA : Xylanase A; XlnB : Xylanase B; XlnC : Xylanase C

INTRODUCTION

Les Streptomycètes sont des bactéries à Gram positif vivant dans le sol et connues pour leur capacité à sécréter une grande quantité de protéines (Gilbert *et al.*, 1995). La majorité de ces protéines sécrétées sont des enzymes qui sont adaptées à l'hydrolyse de matériel organique complexe, ce qui permet à la bactérie de survivre dans son environnement. Des études précédentes mentionnent le clonage homologue de trois gènes de xylanase (Shareck *et al.*, 1991) et la purification des trois enzymes correspondantes soit la XlnA, la XlnB et la XlnC de *Streptomyces lividans* (*S. lividans*) (Morosoli *et al.*, 1986; Kluepfel *et al.*, 1990).

À partir du gène de la XlnB, *S. lividans* sécrète naturellement via le système Sec deux formes de la protéine. La XlnB1 de 294 a.a. qui est composée d'un domaine catalytique en portion n-terminale et d'un domaine d'attachement au xylan (XBD) en portion c-terminale et la XlnB2 de 191 a.a. composée exclusivement du domaine catalytique. La XlnB2 partage donc la même séquence n-terminale avec la XlnB1. Ces deux formes ont la même activité enzymatique sur le xylan.

Les xylanases dégradent le xylan, une des composantes majeures de l'hémicellulose qui est un polymère de xylose β -1,4 substitué d'acide uronique, d'hexoses et de chaînes latérales d'autres pentoses. Ces enzymes sont d'un intérêt considérable pour leur usage potentiel comme agents de blanchiment dans l'industrie des pâtes et papiers, l'utilisation de l'énergie de la biomasse et l'industrie chimique (Viikari *et al.*, 1994; Jeffries *et al.*, 1992)

La vaste majorité des protéines bactériennes sont exportées à travers la membrane cytoplasmique par le système de sécrétion Sec. Ce système bien connu, agit sur les polypeptides non repliés (Danese *et al.*, 1998). Un nouveau système de translocation alternatif a été découvert récemment chez les bactéries. Il s'agit du système Tat (Twin Arginine Translocation) qui, la plupart du temps, transporte des précurseurs attachés à des cofacteurs et qui semblent se replier ou s'oligomériser avant la translocation à travers la membrane (Müller, 2005).

Quelques protéines sans cofacteurs peuvent aussi être transportées par le système Tat probablement parce qu'elles requièrent des facteurs cytosoliques pour leur repliement ou qu'elles se replient trop rapidement ou de façon trop compacte pour être transportées par le système Sec (Berks *et al.*, 2000). Les précurseurs protéiques qui sont exportés par le système Tat possèdent dans la portion amino-terminale, un peptide signal qui contient un motif consensus S/T-R-R-X-F-L-K dans lequel deux résidus d'arginine consécutifs sont invariables, tandis que les autres résidus sont présents à une haute fréquence (Palmer *et al.*, 2005). La XlnA et la XlnB sont exportées par le système Sec (Pagé *et al.*, 1996b) tandis que la XlnC est exportée via le système Tat (Faury *et al.*, 2004).

L'objectif principal de ce travail était d'augmenter la sécrétion de la xylanase B et aussi de vérifier si les XlnB1 et XlnB2 pouvaient être sécrétées via le système Tat. En effet, comme la XlnB2 possède 80% d'identité avec la XlnC (Shareck *et al.*, 1991) qui est sécrétée exclusivement via le système Tat, nous nous sommes demandés si les XlnB1 et XlnB2 pouvaient être sécrétées efficacement par ce système. La XlnA n'est pas vraiment bien sécrétée par le système Tat. La fusion de la séquence signal du gène *xlnC* au gène structural *xlnA* présente seulement 10% de la production obtenue avec la séquence signal sauvage (Pagé *et al.*, 1996b). La séquence signal du gène *xlnC* a donc été fusionnée respectivement aux gènes de structure *xlnB1* et *xlnB2*. Il s'est avéré que les deux formes enzymatiques peuvent être sécrétées via Tat mais la XlnB2 est mieux produite que la XlnB1.

Comme les XlnB1 et XlnB2 peuvent être mieux sécrétées dans les systèmes Sec et Tat respectivement, et avec l'objectif de maximiser la production de xylanase, une copie du gène structural *xlnB1* fusionnée à une séquence signal Sec et une copie du gène structural *xlnB2* fusionnée à une séquence signal de type Tat ont été insérées dans le même plasmide sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*.

Nous démontrons ici que la souche recombinante portant cette construction sécrète davantage de xylanase. Ceci représente une façon additionnelle en combinaison avec les méthodes déjà existantes, d'augmenter la production d'une protéine par le remplacement

des peptides signaux, des promoteurs, des codons et des sites d'attachement aux ribosomes additionnels (Pagé *et al.*, 1996a; Te'o *et al.*, 2000; Binnie *et al.*, 1997). Le présent travail a fait l'objet d'un article présenté à l'appendice C.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La sécrétion des protéines chez les bactéries

1.1.1 Généralités

À la différence des cellules eucaryotes, les cellules procaryotes ne contiennent pas de structures membranaires intracellulaires. Dès lors, la transcription et la traduction des protéines s'y déroulent simultanément. Chez les bactéries à Gram négatif telle *Escherichia coli*, certaines des protéines produites dans le cytoplasme sont dirigées vers un complexe de translocation situé dans la membrane cytoplasmique. Le devenir de ces protéines est alors : d'être intégrées dans cette même membrane, d'être transportées dans le périplasme, d'être intégrées dans la membrane externe ou d'être sécrétées à l'extérieur de la cellule (Austen et Westwood, 1991). Les bactéries à Gram positif sont, quant à elles, dépourvues de membrane externe. Les protéines exportées à travers leur membrane cytoplasmique sont alors relâchées directement dans l'environnement extérieur (van Wely *et al.*, 2001), bien que plusieurs d'entre elles restent associées à la paroi (Tjalsma *et al.*, 2004).

Qu'elle soit à Gram négatif ou positif, la cellule dispose d'un moyen lui permettant de distinguer les protéines qui doivent être sécrétées de celles qui résideront dans le cytoplasme. Les protéines sécrétées sont en effet synthétisées sous la forme d'un précurseur qui possède une étiquette d'adressage soit une extension amino-terminale nommée peptide signal. Celui-ci est reconnu par les mécanismes de triage et de translocation de la cellule. Après que la protéine a été dirigée vers le compartiment cellulaire voulu, le peptide signal est clivé par une signal peptidase spécialisée (van Wely *et al.*, 2001; Tjalsma *et al.*, 2000), afin de générer une protéine mature (Austen et Westwood, 1991).

Chez les bactéries, il existe plusieurs systèmes non-homologues de sécrétion des protéines qu'on appelle complexes de translocation (Economou, 2000). Les bactéries à Gram positif possèdent entre autres, trois types de système de transport des protéines soit les systèmes Sec, Tat, et Oxa1/YidC (biogénèse des cytochrome oxydases). Ce dernier

système servirait davantage à l'insertion des protéines dans la membrane qu'à la sécrétion au sens strict (van der Laan *et al.*, 2005). En plus des systèmes mentionnés précédemment, les bactéries à Gram négatif possèdent entre autres, les systèmes de sécrétion de protéines à travers la membrane cytoplasmique suivants : ABC (Type I), pathogénèse/flagellaire (Type III) et conjugaison/virulence (Type IV) (Ma *et al.*, 2003). Dans le cadre de ce travail, deux de ces systèmes nous intéressent particulièrement et seront décrits plus en détail: le système général de sécrétion GSP pour « general secretory pathway » aussi dénommé Sec et le système Tat pour « twin arginine translocation pathway ». Alors que le système Tat prend en charge des précurseurs déjà repliés et potentiellement associés à un cofacteur, le système Sec ne peut transférer que des précurseurs non repliés (Berks *et al.*, 2000). Un seul des six systèmes, soit le système Sec, est essentiel pour la viabilité de la cellule. Ce système, qui existe également chez les archaebactéries et les eucaryotes (Economou, 1999) possède des composantes qui sont largement conservées parmi les êtres vivants (Economou, 2000).

La sécrétion des protéines chez les bactéries et notamment le système Sec a été particulièrement bien étudiée chez les microorganismes à Gram négatif tel qu'*E. coli* (van Wely *et al.*, 2001). Les caractéristiques essentielles du système Sec et les gènes impliqués décrits chez *E. coli* ont été retrouvés avec un fort degré de conservation dans tous les génomes bactériens connus (Economou, 2000). Récemment, *Bacillus subtilis* est devenu l'organisme modèle de l'étude de la sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram positif (van Wely *et al.*, 2001). *Streptomyces lividans* et *B. subtilis* partagent plusieurs similarités intéressantes. Ce sont deux bactéries à Gram positif qui synthétisent et sécrètent une grande quantité de protéines qui sont utilisées industriellement. Au niveau des mécanismes de sécrétion, toutes les deux possèdent plus d'un gène pour les signal peptidases de type I et ne possèdent pas le gène *secB*. Nous introduisons donc ici un résumé des connaissances sur les systèmes Sec et Tat par le biais de leur étude chez *E. coli* et *B. subtilis* en incluant les homologues, analogues et les différences présentes chez les streptomycètes particulièrement *S. lividans*.

1.2 Un aperçu du système Sec

Le fonctionnement du système Sec qui procède à la translocation des protéines dans une conformation non repliée (van Wely *et al.*, 2001), peut être divisé en trois stades distincts mais séquentiels et interdépendants à savoir le ciblage du précurseur protéique vers les sites de sortie de la membrane, son passage à travers la bicouche lipidique vraisemblablement à travers un complexe de translocation et son relâchement à l'extérieur de la cellule. À ce stade, le polypeptide peut acquérir sa conformation native en se repliant (Economou, 1999). Généralement, le précurseur est reconnu en premier par des facteurs solubles pour être transporté vers la membrane où il s'associe avec le mécanisme de translocation. Par la suite, le polypeptide est transporté à travers un pore aqueux composé d'un ensemble de protéines faisant partie intégrante de la membrane. Ce pore procure un site d'attachement pour les composantes cytoplasmiques qui assurent le ciblage et la translocation du précurseur (van Wely *et al.*, 2001).

Plusieurs composantes sont nécessaires au fonctionnement du système Sec (Figure 1) soit la chaperone cytosolique SecB, le moteur moléculaire de translocation SecA qui s'attache au complexe de translocation et hydrolyse l'ATP, les composantes du canal de translocation soit SecYEG et SecDFYajC, les signal peptidases et finalement les facteurs de repliement qui fonctionnent du côté externe de la membrane cytoplasmique (Tjalsma *et al.*, 2000). En plus de l'ATP, une source biochimique essentielle, une autre source d'énergie électrochimique est nécessaire au mécanisme résumé précédemment. Il s'agit de la force proton motrice (FPM) qui augmente le taux de translocation (Economou, 1999).

Après que le précurseur soit sorti du ribosome, il peut être dirigé vers le complexe de translocation via deux voies distinctes qui utilisent soit la chaperone SecB, soit le SRP et son récepteur membranaire FtsY. Le trigger factor (TF) entre en compétition avec le SRP pour l'attachement du précurseur en formation (Keyzer *et al.*, 2003). Lorsque le précurseur n'est pas reconnu par SecB, la séquence signal peut le diriger directement sur SecA attachée à la membrane (Fekkes et Driessen, 1999). Le précurseur est par la suite dirigé à travers le canal de translocation.

Même si les effets de la FPM semblent indépendants de SecA, les deux modes énergétiques sont reliés puisque la FPM accélère les changements de conformation de SecA durant la translocation. Par ailleurs, la FPM modulerait l'ouverture et même la formation du canal de translocation (de Keyzer *et al.*, 2003) et affecterait la conformation de SecY (Economou, 2000). Une fois que la translocation de la protéine a été initiée, la FPM peut favoriser la réaction dans les stades ultérieurs. En effet, quand le précurseur est à moitié inséré dans le complexe de translocation, la FPM seule peut compléter la translocation si SecA est retirée ou inactivée (Economou, 2000).

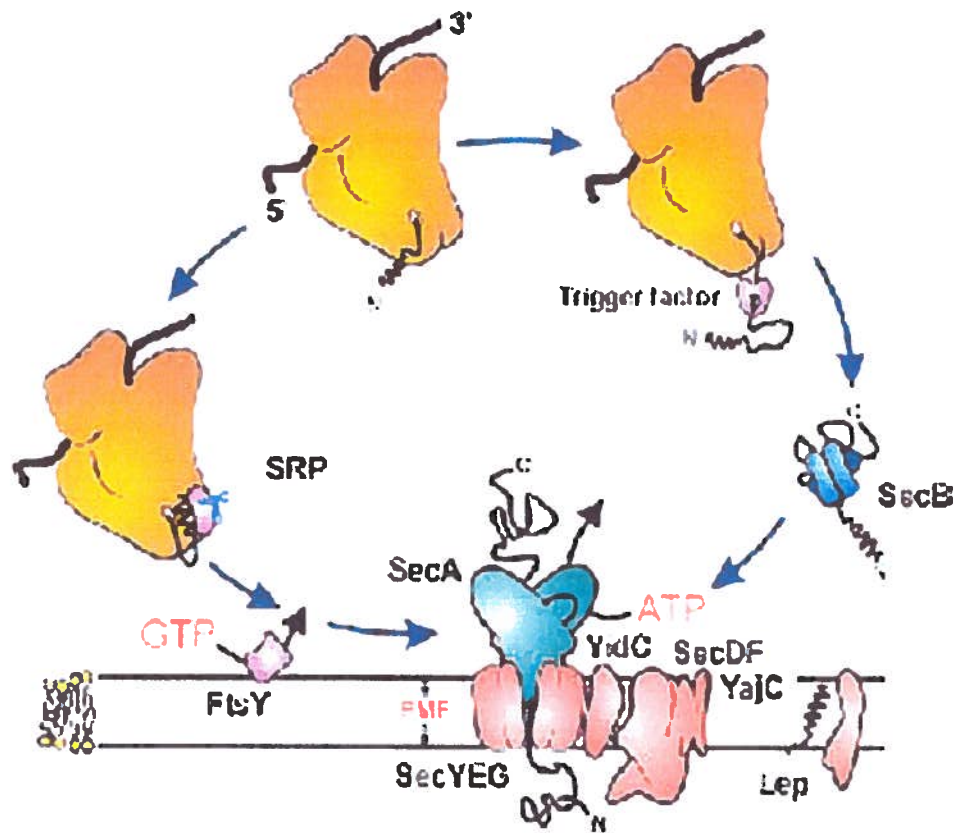


Figure 1. Composantes du complexe de translocation.

Après que le précurseur soit sorti du ribosome, il peut être dirigé vers le complexe de translocation via deux voies distinctes qui utilisent soit le chaperon SecB soit le SRP et son récepteur membranaire FtsY. Le trigger factor (TF) entre en compétition avec le SRP pour l'attachement du précurseur en formation. Le précurseur est transloqué à travers un pore aqueux formé par le complexe de protéines membranaires SecYEG. La translocation du précurseur est favorisée par l'hydrolyse de l'ATP, par le moteur moléculaire SecA et la force proton motrice (FPM). Durant la translocation, le peptide signal peut être retiré par une signal peptidase (Lep). Le complexe SecDFYajC et la protéine YidC sont d'autres composantes impliquées dans la translocation dont la fonction exacte reste inconnue. Adapté de de Keyzer *et al.*, (2003).

1.2.1 SecB

La translocation d'une protéine implique un facteur cytosolique intermédiaire. Chez *E. coli*, c'est SecB, une protéine homotétramérique, organisée en dimère de dimères, formée de sous-unités de 17 kDa (de Keyzer *et al.*, 2003) qui fait office de guide du précurseur vers la membrane cytoplasmique (van Wely *et al.*, 2001; Fekkes et Driessen, 1999). De chaque côté du tétramère, on retrouve des canaux exposés à la surface qui ont toutes les caractéristiques d'un site d'attachement aux peptides (Driessen, 2001). SecB maintient le précurseur dans une conformation non-repliée ce qui le rend compétent pour sa translocation via le système Sec (Fekkes et Driessen, 1999). SecB n'est pas une ATPase comme les autres chaperones et n'est pas essentielle à la viabilité de *E. coli* (van Wely *et al.*, 2001), puisque la délétion du gène *secB* n'a qu'un faible effet déficitaire sur la translocation de seulement un sous-ensemble de précurseurs (Fekkes et Driessen, 1999).

SecB s'attache rapidement aux précurseurs et le complexe SecB-précurseur se dirige ensuite vers SecA et se lie à la portion carboxy-terminale de celle-ci avec une haute affinité. L'attachement subséquent du peptide signal à SecA provoque le transfert du précurseur de SecB vers SecA. Après l'initiation de la translocation, SecB est relâchée et prend en charge un autre précurseur dans le cytosol (de Keyzer *et al.*, 2003).

Le mécanisme par lequel SecB peut différencier les protéines destinées à être sécrétées de celles qui résident dans le cytosol est encore peu compris. On croit généralement que le peptide signal ne contribue pas directement à l'interaction du précurseur avec SecB et que c'est plutôt la portion mature de celui-ci qui est reconnue (Fekkes et Driessen, 1999; Tjalsma *et al.*, 2000; de Kyzer *et al.*, 2003). Le peptide signal pourrait cependant de façon indirecte retarder le repliement de la portion mature du précurseur et favoriser ainsi la liaison de SecB. Toutefois, d'autres études démontrent que la présence du peptide signal et le repliement différé du précurseur ne seraient pas nécessaires pour l'interaction avec SecB. En effet, le taux d'association de SecB avec un polypeptide est beaucoup plus rapide que le repliement de celui-ci. L'interaction de SecB avec le précurseur qui émerge du ribosome pourrait donc être limitée par la vitesse d'élongation du polypeptide plutôt que par le niveau de repliement (de Keyzer *et al.*, 2003).

Des différences entre les séquences primaires des protéines sécrétées et cytoplasmiques semblent exclues pour expliquer la sélectivité de SecB. Ceci suggère que SecB serait une chaperone générale qui permet la translocation des protéines par son attachement spécifique à SecA et son association au précurseur (Tjalsma *et al.*, 2000; de Keyzer *et al.*, 2003). Cependant le motif d'attachement de SecB serait de neuf acides aminés riches en résidus aromatiques et basiques (Knoblauch *et al.*, 1999).

SecB n'est requise que pour la sécrétion d'un sous-ensemble de protéines, la plupart de celles-ci appartenant au périplasme et à la membrane externe. Ces protéines sont évidemment absentes des bactéries à Gram positif. Il est aussi suggéré que SecB agit en particulier sur les protéines qui ont tendance à se replier rapidement. Ces faits expliquent peut-être l'absence de SecB chez les bactéries à Gram positif. En effet, les homologues de SecB sont retrouvés uniquement chez les bactéries à Gram négatif bien que la région carboxy-terminale de SecA, qui est le site d'attachement à SecB soit hautement conservée chez plusieurs bactéries à Gram négatif et à Gram positif à l'exception de *Streptomyces*, *Mycoplasma* et *Mycobacterium* (van Wely *et al.*, 2001).

Un candidat pour un analogue de SecB chez *B. subtilis* est la protéine cytoplasmique CsaA (van Wely *et al.*, 2001). CsaA possède une activité semblable à celle d'une chaperone et démontre une affinité pour SecA et les précurseurs, suggérant ainsi qu'elle a une fonction reliée à la sécrétion chez *B. subtilis*. Cependant CsaA ne semble pas s'attacher à la région carboxy-terminale de SecA. La mutation de CsaA a un effet modéré sur la sécrétion, provoquant la perte d'un nombre limité de protéines dans le surnageant de culture. Cependant la délétion du gène *csaA* est létale suggérant ainsi que CsaA est impliquée dans la translocation de protéines essentielles ou joue un rôle vital dans un processus autre que la translocation des protéines (van Wely *et al.*, 2001). Le rôle précis de CsaA dans la sécrétion des protéines chez *B. subtilis* reste donc à élucider (Tjalsma *et al.*, 2000). On peut ajouter que SecB n'est pas essentielle alors que CsaA l'est donc les deux protéines agissent différemment.

1.2.2 Le complexe membranaire SecYEG

Chez *E. coli*, trois protéines membranaires soit SecY, SecE et SecG constituent le complexe SecYEG qui forment le pore aqueux par lequel les protéines vont être sécrétées (van Wely *et al.*, 2001, Economou, 2000; de Keyzer *et al.*, 2003). Cette organisation hétérotrimérique du pore de translocation peut être comparée au complexe de translocation de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) chez les eucaryotes soit le complexe Sec61p qui consiste en trois sous-unités i.e. Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ . Sec61 α et Sec61 β sont des homologues de SecY et SecE respectivement. Bien que Sec61 γ n'ait pas de similarité de séquence avec SecG (de Keyzer *et al.*, 2003), ces deux protéines pourraient être des analogues fonctionnels (Tjalsma *et al.*, 2000)

SecY, la plus grosse sous-unité du complexe, est une protéine de 48 kDa composée de dix segments transmembranaires. Elle interagit avec SecA, SecG et SecE et forme un complexe particulièrement stable avec cette dernière (de Keyzer *et al.*, 2003). SecE est une protéine de 14 kDa formée de trois segments transmembranaires considérée comme essentielle pour la translocation des précurseurs et la viabilité cellulaire (de Keyzer *et al.*, 2003; van Wely *et al.*, 2001). Contrairement à SecY et SecE, SecG n'est pas essentielle à la translocation des protéines (van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer *et al.*, 2003), mais elle la stimule *in vitro* en particulier à basse température et quand la FPM est faible ou absente. SecG est une protéine de 12 kDa avec deux segments transmembranaires. Des études de co-immunoprécipitation suggèrent que SecG interagit seulement avec la sous-unité SecY. Bien que SecG ne soit pas essentielle à l'attachement initial de SecA au complexe SecYE, (de Kyzer *et al.*, 2003) ses deux domaines transmembranaires subissent une inversion de topologie lorsque SecA s'insère dans la membrane; ceci suggère que SecA et SecG interagissent à un stade ultérieur de la réaction de translocation (Economou, 1999). En l'absence de SecG, deux autres unités de régulation du complexe de translocation soit SecD et SecF deviennent importantes (Economou, 1999).

Des analyses biochimiques et structurales récentes de SecYEG et du complexe Sec61p chez les eucaryotes, démontrent que ces protéines formeraient un pore de translocation.

Cependant, le nombre exact de copies de SecYEG dans le complexe de translocation est incertain. Chez *E. coli*, SecYEG existerait sous la forme d'un dimère qui représente l'état de repos non-assemblé du complexe de translocation (van Wely *et al.*, 2001). La formation du pore demanderait l'activation de SecA par un précurseur et l'ATP. Sous ces conditions SecA recruterait quatre trimères SecYEG s'assemblant pour former une structure en anneau dont l'intérieur constitue le pore de sécrétion qui aurait 1,5 à 5 nm (Economou, 2000) cette taille correspondant aux valeurs déterminées pour celles du pore eucaryote (de Kyzer *et al.*, 2003).

Chez *B. subtilis*, la déplétion de SecY affecte grandement la croissance et la sécrétion d'un certain nombre de protéines. C'est un polypeptide de 423 a.a. qui comme toutes les protéines SecY connues traverserait la membrane cytoplasmique dix fois (van Wely *et al.*, 2001; Tjalsma *et al.*, 2000). Formée d'un seul segment transmembranaire, la protéine SecE des bactéries à Gram positif est beaucoup plus petite que celle de *E. coli* soit 60 résidus d'acides aminés comparativement à 127 pour *E. coli* (van Wely *et al.*, 2001; Tjalsma *et al.*, 2000).

Le gène *yvaL* de *B. subtilis* code pour un homologue de SecG. La SecG des bactéries à Gram positif, est plus courte que celle des bactéries à Gram négatif et contient deux segments transmembranaires (van Wely *et al.*, 2001; Tjalsma *et al.*, 2000).

Le complexe SecYE purifié chez *B. subtilis*, adopte une structure en forme d'anneau après reconstitution dans les membranes. Cette structure correspond à un dimère SecYEG chez *E. coli*. Le complexe SecYEG de *B. subtilis* fonctionnerait d'une façon similaire (van Wely *et al.*, 2001).

Un homologue de SecY a été identifié chez *S. lividans* 1326. On y déduit une séquence de 437 a.a. qui est à 42% et 40,7% identique à ses homologues d'*E. coli* et de *B. subtilis* respectivement (Ostiguy *et al.*, 1996). Un homologue du gène *secE* a aussi été identifié chez les Streptomycètes (Miyake *et al.*, 1994). Cependant aucun gène *secG* ne semble avoir été identifié chez ceux-ci.

1.2.3 SecA, le moteur moléculaire

Bien que le mécanisme moléculaire exact par lequel SecA agit comme une protéine motrice soit encore peu compris, celle-ci est considérée comme le moteur moléculaire qui permet la translocation des précurseurs. SecA est en réalité une ATPase qui joue un rôle fondamental dans la sécrétion des protéines chez les bactéries (van Wely *et al.*, 2001). Elle procure l'énergie pour la réaction de translocation des précurseurs par l'intermédiaire de cycles répétés d'attachement à l'ATP et de son hydrolyse. De plus SecA pourrait jouer le rôle d'un chaperon qui ciblerait de façon analogue à SecB, les précurseurs qui ne sont pas reconnus par SecB (Fekkes et Driessen, 1999; Economou, 1999; van Wely *et al.*, 2001).

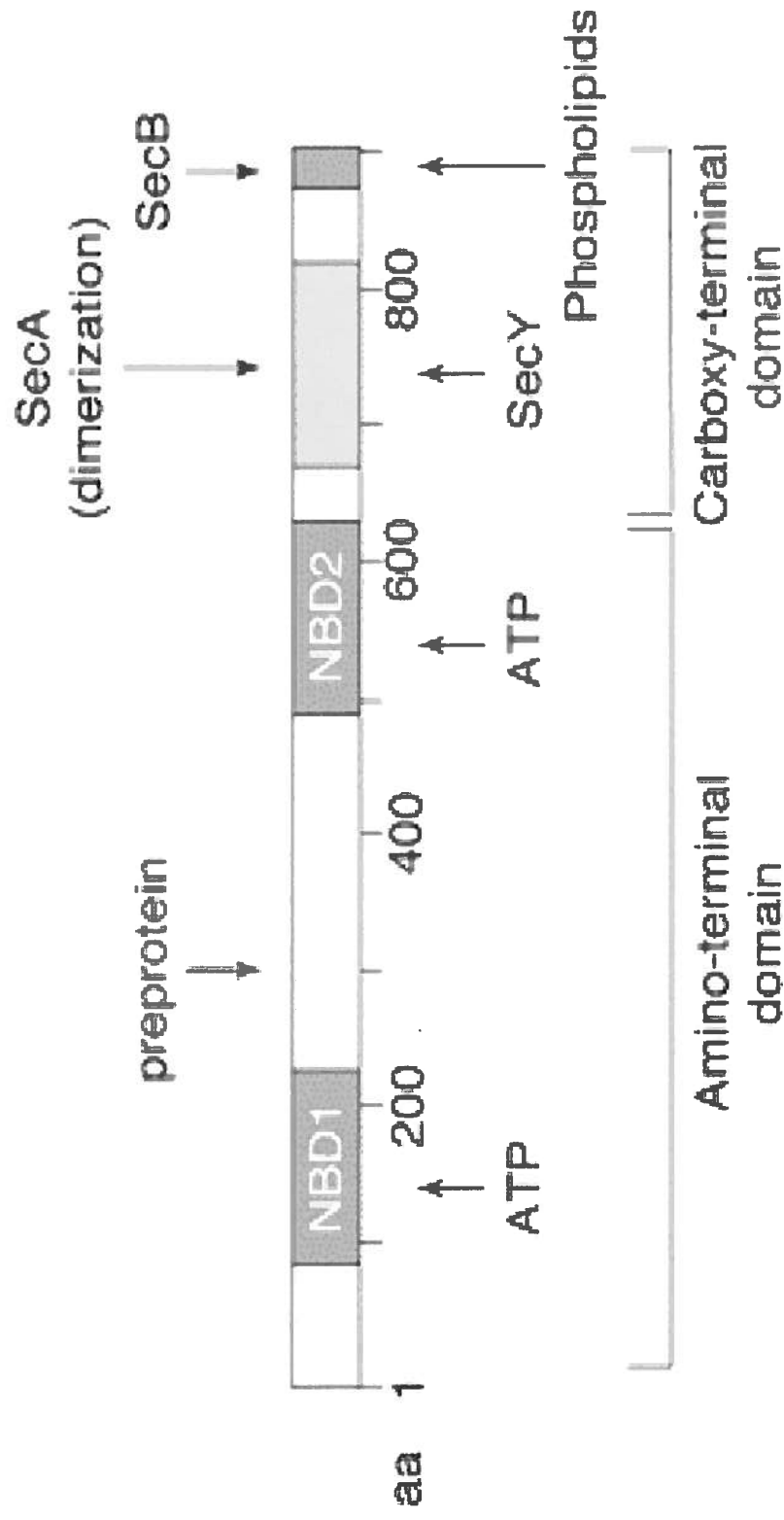
SecA, qui est essentielle et unique aux bactéries, existe sous la forme d'un dimère (Economou, 1999) dont chacun des monomères de 102 kDa contient deux domaines qui se replient indépendamment (de Keyzer *et al.*, 2003). Le premier domaine situé dans la portion amino-terminale, fait office d'ATPase alors que la portion carboxy-terminale permet à SecA de s'attacher à SecYEG ce qui amène l'assemblage du cœur fonctionnel du complexe de translocation. La portion carboxy-terminale contient également le site d'attachement à SecB (Economou, 1999) (Figure 2). On retrouve SecA à la fois dans le cytosol et liée à la membrane cytoplasmique. L'association avec la membrane se produit par le biais d'une faible affinité pour les phospholipides chargés négativement et d'une haute affinité avec le complexe SecYEG (De Keyzer *et al.*, 2003).

Bien que SecA existe dans un état d'équilibre entre les états dimères et monomères, il est suggéré que la forme active de SecA serait monomérique. En effet, en comparaison avec la forme de dimère, la structure monomérique démontre un changement de conformation drastique qui correspond probablement à l'ouverture d'un sillon d'attachement aux peptides (Osborne *et al.*, 2004 ; Or *et al.*, 2005)

La portion ATPase contient deux sites d'attachement aux nucléotides (« NBSs : nucleotide binding sites »). Le premier site, NBS-I, est présent dans le domaine n-terminal et possède une haute affinité pour l'ATP. Le second site, NBS-II, à basse affinité

pour l'ATP est situé dans une position plus centrale que NBS-I. Des évidences biochimiques indiquent que quoique NBS-I et NBS-II soient nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP et la translocation du précurseur (de Keyzer *et al.*, 2003), le site NBS-II n'est pas un site d'attachement aux nucléotides indépendant mais plutôt un régulateur de l'hydrolyse de l'ATP au site NBS-I (van Wely *et al.*, 2001). En fait, le site NBS-II est essentiel pour la translocation des protéines mais son rôle précis reste indéterminé (Economou, 1999).

Au stade de l'initiation de la translocation du précurseur, SecA probablement liée à un ADP (de Keyzer *et al.*, 2003) est associée à SecYEG (van Wely *et al.*, 2001). SecA reconnaît alors le complexe SecB-précurseur (Fekkes et Driessen, 1999), et s'attache au peptide signal et au domaine mature du polypeptide à être sécrété (van Wely *et al.*, 2001). Cet attachement stimule SecA à échanger l'ADP pour un ATP. L'énergie générée par l'attachement de la molécule d'ATP permet alors l'insertion membranaire d'une portion de SecA plus une boucle du peptide signal et de la région amino-terminale du précurseur à travers la membrane, pour un total d'environ 2.5 kDa (de Keyzer *et al.*, 2003). L'hydrolyse subséquente de l'ATP provoque la dissociation du précurseur de SecA celle-ci pouvant à son tour se libérer de la membrane (plus de 50% des protéines SecA sont cytosoliques) (Economou, 1999) ou s'associer de nouveau au précurseur partiellement transloqué. Cette réassociation provoque le passage de 2 à 2.5 kDa supplémentaires et permet un nouveau cycle d'attachement et d'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, des cycles multiples d'insertion-désinsertion de SecA semblent provoquer la translocation de tout le précurseur (Economou, 1999) chaque cycle catalytique permettant la translocation d'environ 5 kDa en deux étapes consécutives (de Keyzer *et al.*, 2003). Ce cycle de réaction utilise l'interaction de l'ATP au site NBS-I (Economou, 1999) (Figure 3).



trends in Microbiology

Figure 2. Caractéristiques de la molécule SecA.

Représentation schématique d'un protomère SecA. a.a., acide aminé; NBD1, high-affinity nucleotide-binding site; NBD2, low-affinity nucleotide-binding site. D'après Economou (1999).

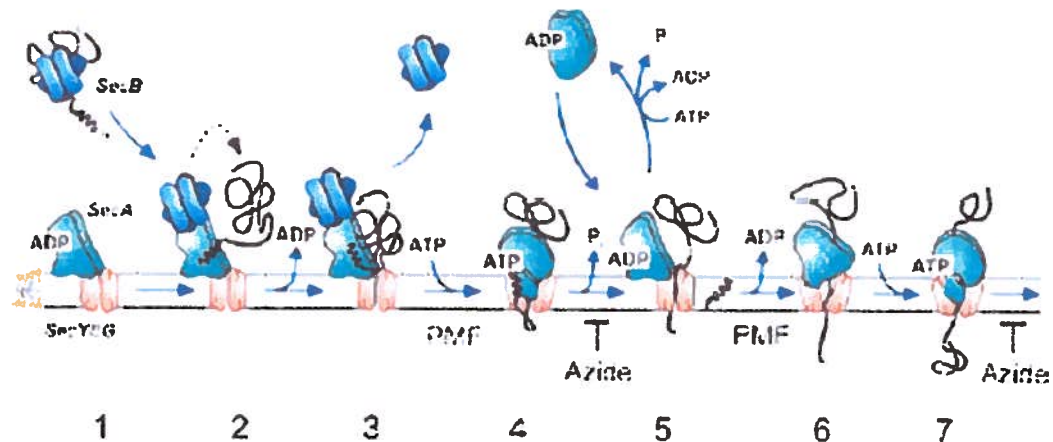


Figure 3. Modèle pour la translocation des précurseurs à travers la membrane à l'aide de SecA.

- 1) Initialement, SecA est attachée à un ADP et est liée à SecYEG.
- 2) Le précurseur est véhiculé jusqu'à la translocase via SecB qui s'attache à SecA. L'attachement de SecB à SecA provoque le transfert du précurseur vers SecA.
- 3) L'attachement du précurseur à SecA provoque l'échange de l'ADP pour un ATP. Ceci provoque le retrait de SecB.
- 4) L'énergie générée par l'attachement de la molécule d'ATP permet alors l'insertion membranaire d'une portion de SecA plus une boucle du peptide signal et de la région amino-terminale du précurseur à travers la membrane pour un total d'environ 2.5 kDa.
- 5) L'hydrolyse de l'ATP provoque la libération du précurseur auparavant lié à SecA, cette étape étant inhibée par l'azide. Subséquentement, SecA peut soit se dissocier de la membrane,
- 6) ou se réassocier au précurseur partiellement transloqué, provoquant ainsi le passage de 2 à 2.5 kDa supplémentaires.
- 7) Des cycles répétés d'association de SecA avec le précurseur, d'attachement et d'hydrolyse de l'ATP et de dissociation de SecA avec le précurseur, permettent la translocation complète de ce dernier. D'après de Keyzer *et al.*, (2003).

1.2.4 SecA chez les bactéries à Gram positif

Le gène *divA* code pour la SecA de *B. subtilis*. En utilisant un mutant *div*, il a été démontré qu'environ 90% de toutes les protéines dans le surnageant de culture de *B. subtilis* dépendent de SecA pour leur sécrétion. Des gènes qui codent pour des homologues de SecA chez plusieurs autres microorganismes à Gram positif ont aussi été identifiés (van Wely *et al.*, 2001). Certaines bactéries à Gram positif ont plus d'une protéine SecA, comme c'est le cas pour *Listeria monocytogenes* par exemple (Lenz *et al.*, 2003). Le gène *secA* de *S. lividans* 1326 a été cloné en utilisant des séquences conservées du gène *secA* de *E. coli* et du gène *div* de *B. subtilis* (Gilbert *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1996). Le séquençage de ce gène propose une protéine de 947 a.a. et la surexpression du gène chez *S. lividans* 1326 et *E. coli* MM52 produit dans les deux cas, une protéine d'une masse moléculaire apparente de 117.4 kDa. La protéine SecA de *S. lividans* partage 44% d'identité avec son homologue chez *B. subtilis* et *E. coli* (Gilbert *et al.*, 1996).

La protéine SecA de *S. lividans* démontre des propriétés biochimiques similaires à la SecA de *E. coli* et de *B. subtilis*. Le NBS-I possède une affinité pour l'ATP comparable à celle du NBS-I chez *E. coli* et *B. subtilis*. Par ailleurs la SecA de *S. lividans* s'attache avec une haute affinité à des vésicules membranaires du même microorganisme lavées à l'urée. Ceci suggère que le complexe d'attachement SecYEG est préservé (Blanco *et al.*, 1998).

La SecA de *S. lividans* ne s'attache pas à la SecB de *E. coli* avec une grande affinité. Il est à noter que chez *Streptomyces*, la portion carboxy-terminale qui est le site d'attachement de SecB chez *E. coli* n'est pas conservée, une preuve supplémentaire que *S. lividans* ne possède pas d'homologue de SecB. Ceci n'exclut toutefois pas la possibilité que *S. lividans* possède une protéine ayant des propriétés fonctionnelles similaires à SecB. Les streptomycètes diffèrent donc des bactéries à Gram négatif dans le ciblage des précurseurs pour l'interaction avec SecA. Cependant le mécanisme général de sécrétion semble similaire. Des chaperones non spécifiques tels que GroEL pourraient jouer le rôle de SecB chez les bactéries à Gram positif. Récemment il a été démontré que la protéine GroEL de *E. coli* interagit avec SecA quand celle-ci est liée à la membrane cytoplasmique (Blanco *et al.*, 1998).

1.2.5 Le complexe SecDFYajC

Contrairement aux autres gènes Sec qui sont dispersés à travers le chromosome, les gènes *secD*, *secF* et *yajC* de *E. coli* font partie d'un opéron, (van Wely *et al.*; 2001) et codent pour autant de protéines membranaires. En effet, SecD et SecF possèdent chacune six segments transmembranaires et un domaine périplasmique. YajC est constituée d'un seul segment transmembranaire et d'un domaine cytosolique. Ces trois protéines forment le complexe hétérotrimérique SecDFYajC qui peut s'associer avec le complexe SecYE (de Keyzer *et al.*, 2003).

La fonction du complexe SecDF est difficile à définir à cause de sa faible concentration. En effet, pendant que l'on retrouve de 100 à 300 copies de SecYEG par cellule, il n'y a que 10 à 30 copies par cellule du complexe SecDF. (Schmidt et Kiser, 1999). Cependant, les cellules privées de SecD et SecF ont une croissance sensible au froid et démontrent des déficits importants de la translocation des protéines. Quant à YajC elle n'est pas essentielle à la translocation des précurseurs ni à la viabilité de la cellule (de Keyzer *et al.*, 2003).

La fonction exacte du complexe SecDFYajC demeure inconnue. La régulation du cycle catalytique de SecA est une des hypothèses retenues (Economou 2000; de Keyzer *et al.*, 2003). SecF stabiliserait SecD et SecY dans la membrane et le complexe SecDF stabiliserait SecA sous sa forme insérée dans la membrane (Schmidt et Kiser, 1999). Le complexe pourrait aussi être impliqué dans les stades ultérieurs de la translocation. SecD serait en effet impliquée dans le relâchement de la protéine une fois sa translocation complétée à travers la membrane cytoplasmique. Le retrait du peptide signal ou des phospholipides du pore aqueux ou la régulation de la formation de ce même pore sont d'autres fonctions envisagées (de Keyzer *et al.*, 2003).

Chez *B. subtilis* et d'autres bactéries, SecD et SecF sont fusionnées en un seul polypeptide membranaire SecDF de 571 a.a. possédant douze domaines transmembranaires putatifs (van Wely *et al.*, 2001; de Keyzer *et al.*, 2003). L'homologue YajC de *B. subtilis* est codé par le gène *yrbF* et séparé de *secDF* par deux paires de gènes.

Comme chez *E. coli*, la déplétion de SecDF chez *B. subtilis* résulte en une sensibilité au froid de la croissance et une réduction de la sécrétion des protéines (van Wely *et al*, 2001). La SecDF de *B. subtilis* qui n'est pas essentielle à la viabilité de la cellule, est purement requise pour maintenir une haute capacité de sécrétion des protéines (Tjalsma *et al*, 2000).

Contrairement à SecD chez *E. coli*, SecDF de *B. subtilis* ne semble pas être requise pour le relâchement d'une protéine mature de la membrane. Toutefois SecDF pourrait être impliqué dans le nettoyage du pore de translocation notamment par l'enlèvement des peptides signaux (Tjalsma *et al.*, 2000). On retrouve des homologues de SecD et SecF chez *S. lividans* (Genbank X85969) (Morosoli *et al.*, 1999a)

1.3 La voie SRP (Signal Recognition Particule)

Chez les eucaryotes, la translocation des précurseurs à travers le réticulum endoplasmique (RE) dépend de la voie SRP (signal recognition particule pathway). Les protéines solubles qui doivent traverser la membrane du RE ou les protéines membranaires qui doivent s'y intégrer sont ciblées par le SRP et envoyées au récepteur membranaire de celui-ci (Fekkes et Driessen, 1999). En fait, une fois que le peptide signal et environ quarante résidus d'acides aminés du domaine mature du précurseur émergent du ribosome, le peptide signal est reconnu par le SRP (Eichler, 2003). Le ciblage du précurseur encore attaché au ribosome se réalise donc de façon cotraductionnelle et le SRP reconnaît le précurseur par la présence d'un peptide signal hydrophobe (Fekkes et Driessen, 1999). L'attachement au précurseur et l'interaction subséquente du SRP et du ribosome provoque le ralentissement ou l'arrêt de la traduction. Par la suite, le complexe formé du ribosome, du SRP et du précurseur se dirige vers la membrane du RE via l'affinité du SRP pour son récepteur membranaire (Fekkes et Driessen, 1999; Eichler, 2003) et du ribosome pour le complexe de translocation Sec61 $\alpha\beta\gamma$. Une série d'hydrolyse de GTP provoque le relâchement du SRP et le transfert du peptide signal à la sous-unité Sec61 α . La traduction et la translocation du précurseur peuvent ensuite reprendre et

continuer directement dans le pore de translocation. Le peptide signal est éventuellement clivé par une signal peptidase (Eichler, 2003).

Le SRP des eucaryotes est un complexe ribonucléoprotéique formé de l'assemblage d'une molécule d'ARN 7S plus six polypeptides distincts, de taille différente qui lui sont attachés. (Fekkes et Driessen, 1999; Eichler, 2003). On retrouve notamment les protéines SRP9 et SRP14 qui forment l'hétérodimère SRP9/14 impliqué dans l'arrêt de la translocation (Eichler, 2003) et SRP54 (54 kDa) responsable de la reconnaissance du peptide signal, de la fonction GTPase et de l'attachement au récepteur membranaire du SRP. (Eichler, 2003 ; Fekkes et Driessen, 1999). L'ARN 7S est divisé en deux domaines soit le domaine *Alu* qui contient le complexe SRP9/14 et le domaine S qui contient notamment SRP54. Le domaine *Alu* arrête la traduction par le biais de SRP9/14, de l'ARN ou des deux (Eichler, 2003) (Figure 4). Quant au récepteur membranaire du SRP, il est composé de deux protéines soit la sous-unité périphérique SR α et la sous-unité intégrale SR β (Fekkes et Driessen, 1999; Eichler, 2003) qui possèdent toutes deux une activité GTPase (Eichler, 2003).

La voie SRP des eucaryotes supérieurs demeure la version la mieux comprise de ce système bien que le SRP se retrouve aussi chez les archaeobactéries et les bactéries (Eichler, 2003). Les homologues de SRP54 et de l'ARN 7S chez *E. coli* sont respectivement la protéine Ffh (« fifty-four homologue ») et l'ARN 4.5S (Figure 4). À l'instar de SRP54, Ffh est également une GTPase qui lie le peptide signal et l'ARN. Ffh s'attache au précurseur quand celui-ci est d'une longueur de 70 à 150 a.a. et qu'il est encore attaché au ribosome (Fekkes et Driessen, 1999). La GTPase FtsY avec son domaine carboxy-terminal de 300 résidus (Palacin *et al.*, 2003) est la contrepartie procaryote du récepteur SR α et est attaché de façon périphérique à la membrane (Fekkes et Driessen, 1999). On ne connaît pas d'homologue à la sous-unité SR β chez les procaryotes (Eichler, 2003). Le système SRP est donc simplifié et il est impliqué dans l'insertion d'un groupe de protéines dans la membrane plasmique (Eichler, 2003). Certaines lipoprotéines et protéines solubles périplasmiques utilisent aussi cette voie (Schierle *et al.*, 2003). En fait, l'interaction de Ffh avec le peptide signal augmente avec

l'hydrophobicité de celui-ci. Ffh s'attache aussi au signaux internes comme les segments transmembranaires des protéines membranaires (Fekkes et Driessen, 1999).

1.3.1 SRP chez les bactéries à Gram positif

Le petit ARN cytoplasmique de *B. subtilis* est formé de 271 nucléotides et il est fonctionnellement apparenté à l'ARN 7S des eucaryotes et à l'ARN 4.5S de *E. coli* (Tjalsma *et al.*, 2000) (Figure 4). Chez *E. coli* la région correspondante au domaine *Alu* est absente, alors qu'elle est présente chez *B. subtilis* et contient la protéine Hbsu (histone-like). Hbsu ne partage pas de similarité de séquence significative avec SRP9 ou SRP14 mais partage une homologie de structure avec SRP9/14. Malgré cette ressemblance, on ignore si la voie SRP de *B. subtilis* possède l'étape de l'arrêt de la traduction observée chez les eucaryotes (Eichler, 2003).

Le système SRP chez *B. subtilis* semble capable de se substituer à la déficience de SecB pour le ciblage des protéines sécrétées et membranaires. De plus, les peptides signaux des précurseurs chez ce microorganisme semblent plus hydrophobes et plus long que ceux de *E. coli*. Le système SRP chez *B. subtilis* pourrait donc être responsable du ciblage à la fois des protéines membranaires et sécrétées (Palacin *et al.*, 2003).

Le séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (GenBank no. d'accession AL645882) n'a pas révélé la présence du gène *secB* chez cet organisme tout comme chez *B. subtilis*. Le génome de *S. coelicolor* étant à peu près identique à celui de *S. lividans* on assume que *secB* fait aussi défaut chez ce dernier (Palacin *et al.*, 2003). Pour toutes ces raisons, l'identification des composantes du SRP chez *S. lividans* et la possibilité qu'elles soient impliquées dans la sécrétion des protéines (Palacin *et al.*, 2003) nous interpellent particulièrement dans le cadre de ce travail.

Le système SRP de *S. lividans* contient les éléments suivants : un complexe ribonucléoprotéique composé de Ffh, d'un petit ARN cytoplasmique de 82 nucléotides ainsi que FtsY (Palacin *et al.*, 2003). Toutes les tentatives effectuées par Palacin et ses collègues (2003) pour obtenir des mutants dans chacun des trois gènes correspondants se

sont soldées par un échec, indiquant probablement la nature essentielle des composantes du système SRP chez *S. lividans*. Bien que de composition minimale, le SRP de *S. lividans* semble impliqué dans la sécrétion des protéines. En effet, Palacin et ses collègues (2003) ont observé que le précurseur de l'agarase co-précipitait avec Ffh ce qui tendrait à dire que le SRP serait impliqué dans la sécrétion.

La longueur et l'hydrophobicité des peptides signaux des protéines sécrétées de *S. lividans* ressemblent davantage à celles de *B. subtilis* que d'*E. coli*. Ces caractéristiques permettent peut-être au système SRP de *B. subtilis* de cibler à la fois les protéines sécrétées et les protéines membranaires. Il semble donc raisonnable d'assumer que les SRP de *B. subtilis* et *S. lividans* partagent le même fonctionnement (Palacin *et al.*, 2003).

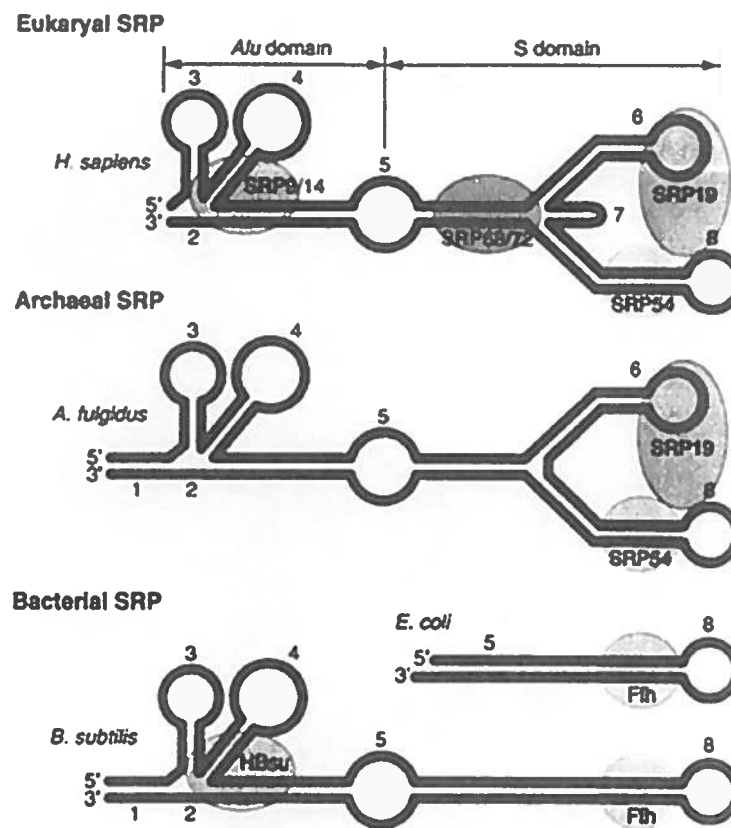


Figure 4. Représentation schématique et comparaison des SRP chez les eucaryotes et les bactéries soit *E. coli* et *B. subtilis*.

Tiré et adapté de Eichler, (2003).

1.4 Coexistence des voies SRP et SecB

Chez *E. coli*, la route SRP converge avec la voie SecB au niveau du complexe de translocation (Figure 5). Tel que mentionné précédemment le choix entre les deux routes semble dépendre largement de l'hydrophobicité du peptide signal. La route SRP est impliquée dans le ciblage de protéines de la membrane alors que la route SecA-SecB est impliquée dans le ciblage de protéines du périplasma et de la membrane externe. Le SRP entrerait en compétition avec le trigger factor (TF), une cis-trans proline isomérase, pour l'attachement au peptide signal. Le TF préviendrait les protéines de sécrétion d'entrer dans la voie SRP (de Keyzer *et al.*, 2003)

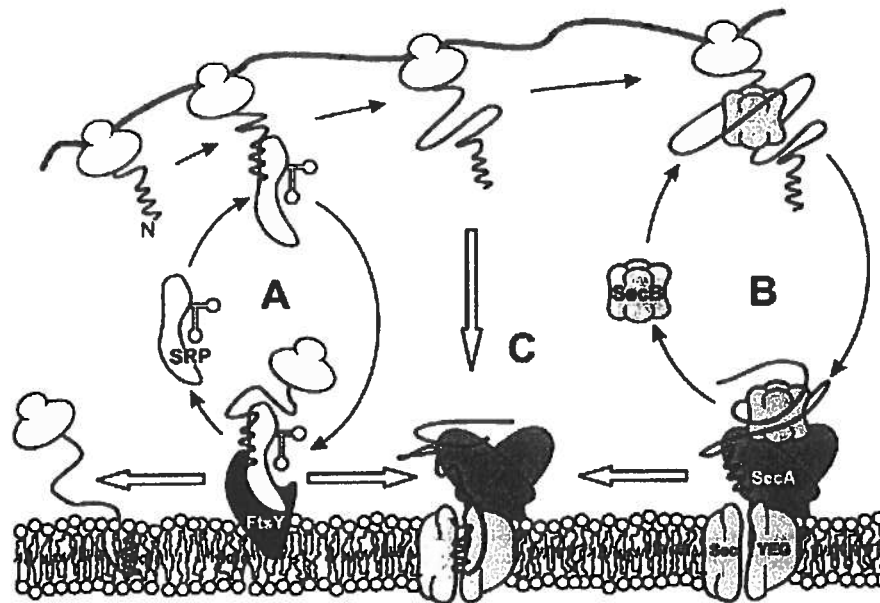


Figure 5. Coexistence des voies SRP et SecB.

Quand un précurseur ou une protéine membranaire émerge du ribosome, le peptide signal est exposé en premier A) Quand ce peptide signal est hautement hydrophobe il s'attache au SRP et le complexe SRP-précurseur va être envoyé au récepteur membranaire FtsY. Le SRP est alors dissocié du précurseur. Le précurseur ou la protéine membranaire intégrale est subséquemment transféré 1) au complexe de translocation constitué de SecYEG et de SecA ou 2) s'insère dans la membrane par un mécanisme différent. B) Quand le peptide signal échappe au SRP et que le domaine mature du précurseur possède les caractéristiques qui conviennent à SecB, le complexe SecB-précurseur s'associe à SecA. C) Quand le précurseur n'est pas reconnu par SecB, le peptide signal peut le diriger directement vers SecA. Tiré de Fekkes et Driessen, (1999).

1.5 Introduction au système Tat

Un nouveau mécanisme de sécrétion distinct des systèmes Sec et SRP a été découvert récemment. Alors que ces systèmes transportent des précurseurs non repliés, le nouveau système est en mesure de procéder à la translocation de précurseurs déjà repliés et potentiellement liés à un cofacteur avant leur sécrétion (Berks *et al.*, 2003). Ce système est appelé Tat pour Twin Arginine Translocation car les précurseurs possèdent un peptide signal arborant une signature constituée de deux résidus d'arginine consécutifs et invariablement présents (Sargent *et al.*, 1998). Par ailleurs, le système Tat transporte activement les protéines au moyen d'un gradient électrochimique transmembranaire de protons Δp , la translocation s'effectuant par le transport en sens inverse des protons et du substrat (Berks *et al.*, 2003).

On retrouve le système Tat non seulement chez les procaryotes mais aussi chez les plantes. En effet, le système Tat est apparenté à la voie ΔpH dépendante des membranes des thylakoides chez les chloroplastes. (Mori et Cline, 2001 ; Berks *et al.*, 2000)

1.5.1 Le système Tat transporte des protéines repliées avec ou sans cofacteurs

L'insertion stable d'un cofacteur dans une protéine, dont la destinée est le périplasma, requiert le repliement au moins partiel de celle-ci, avant son transport. Pour ce faire, des protéines chaperons cytoplasmiques sont requises pour l'insertion du cofacteur dans certains précurseurs Tat. De plus, certaines protéines sans peptide signal sont transportées via Tat sous la forme d'un complexe avec une autre protéine qui porte elle-même un peptide signal. Le système Tat est aussi en mesure de transloquer des protéines hétérologues qui sont connues pour être repliés avant leur transport notamment la GFP (green fluorescent protein) qui provient de la méduse (Berks *et al.*, 2003). Certains substrats Tat-dépendants ne sont pas des protéines solubles, mais restent ancrés à la membrane cytoplasmique des bactéries par la séquence signal non clivée ou une hélice alpha c-terminale hydrophobe (Müller, 2005).

Certains précurseurs Tat ne possèdent pas de cofacteurs. Ces protéines sont probablement transloquées par le système Tat parce que leur repliement est trop rapide, ou trop stable ou qu'elles nécessitent des chaperons cytoplasmiques pour leur repliement, pour qu'elles puissent être transportées via Sec (Berks *et al.*, 2003; Robinson et Bolhuis, 2001). Par exemple, il est estimé que *E. coli* K-12 contient vingt-six protéines portant un peptide signal putatif Tat. De celles-ci, neuf ne contiendraient pas de cofacteurs (Berks *et al.*, 2000 ; Stanley *et al.*, 2000). Des études plus récentes effectuées à l'aide de TATFIND 1.2 suggèrent plutôt que *E. coli* K-12 posséderait 34 substrats Tat (Dilks *et al.*, 2003). Chez les bactéries à Gram positif, *B. subtilis* et *S. coelicolor* possèdent plusieurs protéines extracellulaires sans cofacteurs qui sont synthétisées avec des peptides signaux Tat putatifs (Bentley *et al.*, 2002 ; Jongbloed *et al.*, 2002).

Il est proposé que certains peptides signaux Tat, opèrent en tandem avec des chaperons afin d'orchestrer l'assemblage et le transport d'enzymes complexes. Par exemple TorD reconnaîtrait le peptide signal Tat-dépendant de TorA et aurait des contacts protéine-protéine extensifs lors de l'insertion du cofacteur. Un autre exemple est celui du dimère HybOC. HybE une protéine accessoire jouerait un rôle essentiel garantissant l'assemblage ordonné des sous-unités et du cofacteur de HybOC (Jack *et al.*, 2004). DmsD escorte les protéines qui contiennent un peptide signal Tat-dépendant. Cette protéine interagit avec DmsA, la sous-unité catalytique de la DMSO réductase (Oresnik *et al.*, 2001). La présence de protéines capables de reconnaître les séquences signal Tat-dépendante pourrait avoir comme conséquence que les séquences signal Tat-dépendante ne sont pas toujours interchangeables. Ainsi chez *E. coli*, la séquence Tat de DmsA ne permet pas l'export de TorA (Sambasivarao *et al.*, 2000), même si la séquence de TorA permet l'export Tat-dépendant de protéines hétérologues comme la GFP (Santini *et al.*, 2001).

1.5.2 Composition et organisation de l'appareil de transport Tat : les protéines TatA, TatB et TatC

Des études génétiques chez *E. coli* suggèrent que les composantes minimales de la voie de translocation Tat sont les protéines membranaires TatA, TatB et TatC et qu'elles formeraient le complexe de translocation Tat situé dans la membrane cytoplasmique (Berks *et al.*, 2003). L'opéron *tatABCD* porte les gènes qui codent pour TatA, TatB et TatC. Le gène restant de cet opéron soit *tatD* code pour une Dnase qui n'est pas impliquée dans le fonctionnement du système Tat (Wexler *et al.*, 2000). *tatE* situé sur un autre opéron monocistronique code pour TatE. Celle-ci partage presque 60% d'identité de séquence en acide aminés avec TatA et ces deux protéines sont fonctionnellement interchangeables (Sargent *et al.*, 1998, 1999). Cependant, le taux d'expression de TatA est environ cent fois plus élevé que celui de TatE (Jack *et al.*, 2001) ce qui porte à croire que *tatE* est une duplication génique cryptique de *tatA* (Berks *et al.*, 2003)

L'interruption de *tatA* et de *tatE* simultanément ou de *tatB* ou *tatC* seulement amène un blocage complet de la sécrétion d'une sous-classe de protéines périplasmiques. (Robinson et Bolhuis, 2001). Les protéines TatA et TatB font partie d'une famille de protéines dont la structure prédite est une hélice membranaire en position amino-terminale suivie d'une hélice amphipatique et d'une queue carboxy-terminale. L'hélice amphipathique serait située du côté cytoplasmique de la membrane (Figure 6). Les protéines TatB possèdent de 89 à 246 a.a. et sont donc plus longues que les protéines TatA qui possèdent 57 à 89 a.a. (Berks *et al.*, 2003). TatC est la plus grosse des protéines Tat avec ses 258 a.a. (Gouffi *et al.*, 2002). Des analyses de séquence suggèrent qu'elle possède six hélices membranaires dont les portions amino et carboxy-terminales seraient situées du côté cytoplasmique (Figure 6) (Sargent *et al.*, 1998). Cependant Gouffi et ses collègues (2002) suggèrent que TatC ne possède que quatre hélices membranaires.

La concentration de TatA par rapport aux autres protéines Tat est beaucoup plus importante. Des études de stoéchiométrie suggèrent que TatA, TatB, TatC se retrouvent dans les proportions de 35 : 1 : 0.3 (Berks *et al.*, 2003). TatA et TatB formeraient respectivement et au minimum, des homotétramères et des homodimères dans leur

environnement membranaire natif (de Leeuw *et al.*, 2001). TatC serait aussi présente sous une forme oligomérique. Il y aurait en effet au moins deux molécules de TatC dans le complexe fonctionnel de translocation Tat. Le complexe de translocation Tat n'a pas encore été isolé dans un état fonctionnel, mais dans le complexe au repos, les protéines Tat formeraient deux complexes soit Tat(A)BC et TatA(B). Tat(A)BC contient toutes les molécules TatC et la majorité des molécules TatB présentes dans la membrane, mais seulement une faible proportion de TatA. La majorité des protéines TatA et une petite proportion des protéines TatB se retrouvent dans le complexe TatA(B) (Berks *et al.*, 2003). Bien que les complexes Tat(A)BC et TatA(B) soient prédominants chez *E. coli*, un complexe mineur TatABC contenant TatA en excès, a été isolé (de Leeuw *et al.*, 2002). Ce troisième complexe pourrait correspondre au complexe de translocation Tat dans sa forme assemblée. (Berks *et al.*, 2003).

Le modèle de fonctionnement du système de transport Tat est illustré à la figure 7. En premier lieu, l'attachement du précurseur causerait un changement de conformation du complexe TatBC, TatC contenant probablement le site d'attachement au peptide signal. De plus, les complexes bactériens qui ne contiennent que TatB ne montrent pas d'interaction avec le peptide signal (de Leeuw *et al.*, 2002). Avec l'énergie provenant de Δp le complexe TatA s'assemble sur le complexe récepteur TatBC afin de former le complexe de translocation fonctionnel. Par la suite, le substrat traverse la membrane et se dirige vers le périplasme. Après le passage du substrat, la complexe récepteur TatBC reprend sa forme initiale et le site de translocation se désassemble (Berks *et al.*, 2003).

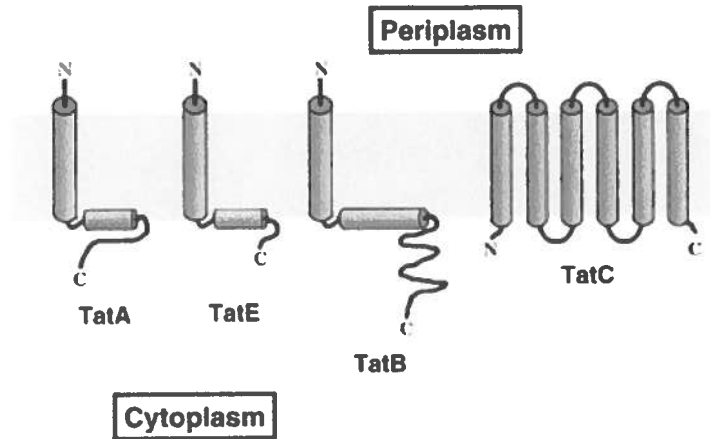


Figure 6. Topologie prédite des produits des gènes *tatA*, *tatB*, *tatC* et *tatE* chez *E. coli*.

Tiré et adapté de Berks *et al.*, (2000).

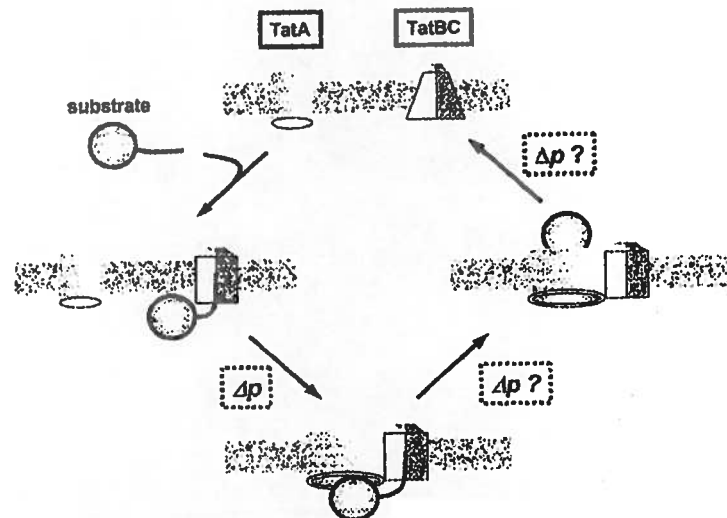


Figure 7. Modèle de fonctionnement du système de transport Tat chez *E. coli*.

- 1) À l'état de repos, TatA et TatBC forment des complexes séparés.
- 2) Le peptide signal du précurseur s'attache au complexe TatBC provoquant un changement de conformation de ce même complexe.
- 3) Ceci permet à TatA de s'assembler au complexe TatBC. L'énergie requise provient du gradient électrochimique transmembranaire de proton Δp .
- 4) Le complexe TatA-TatBC se dissocie suivant le transport du précurseur. Il n'est cependant pas certain que l'étape de la translocation de la protéine ou de la dissociation du complexe requiert à nouveau l'énergie du Δp . Tiré de Berks *et al.*, (2003).

1.5.3 Le pore de translocation Tat

Il est vraisemblable que le système Tat possède un pore qui permet le passage des protéines à travers la bicouche phospholipidique (Berks *et al.*, 2000), tout en préservant l'intégrité ionique de la membrane lors du transport (Berks *et al.*, 2003). Afin de préserver cette intégrité, deux types de pores ont été proposés soit un pore statique avec des barrières à chaque extrémité ou un pore dynamique qui change de conformation afin d'enserrer étroitement la protéine durant son transport. Le pore statique serait formé du complexe TatA(B) qui semble adopter une structure en anneau en solution détergente. Ce pore doit être assez large pour permettre le passage des précurseurs les plus gros. Il devrait posséder un diamètre de 60Å et une longueur de 90Å. Le pore doit donc avoir une longueur d'au moins 90Å ce qui est environ le double de la largeur de la bicouche membranaire soit environ 50Å. Cela est peut-être possible car la purification du complexe TatA(B) démontre qu'il possède une dimension minimale d'environ 90Å quelle que soit son orientation (Berks *et al.*, 2003).

1.5.4 Caractéristiques des peptides signaux Tat

Les peptides signaux Sec chez les bactéries à Gram négatif possèdent en moyenne 24 a.a. et comprennent trois régions distinctes soit une région n chargée positivement, une région h constituée d'une hélice α hydrophobe et une région c qui contient le site de clivage par la signal peptidase (Berks *et al.*, 2000 ; Cristobal *et al.*, 1999). Cependant, certains peptides signaux Sec-dépendants, notamment ceux des substrats sécrétés par le système de type V, sont bien plus grands et peuvent être constitués de 50 a.a. Les peptides signaux Tat possèdent une organisation tripartite similaire à celle des peptides signaux Sec et certains des peptides signaux des précurseurs SRP. Cependant, les peptides signaux Tat se distinguent par la présence d'un motif conservé et situé à la frontière des régions n et h. Dans cette séquence S/T-R-R-x-F-L-K les deux arginines sont pratiquement invariables et les autres acides aminés surviennent à une fréquence de plus de 50% où x est un acide aminé polaire (Berks, 1996 ; Stanley *et al.*, 2000). De plus, une proline est souvent présente à la fin de la région h. Elle est située en position -6 par rapport au site de clivage

par la signal peptidase (Cristobal *et al.*, 1999). La région c des peptides signaux Tat contient des acides aminés basiques. Les peptides signaux Tat ont en moyenne 14 a.a. de plus que les Sec, ce surplus étant majoritairement situé dans la région n. La région h des peptides signaux Tat est beaucoup moins hydrophobe que celle des peptides signaux Sec à cause de la présence accrue de glycines et thréonines et moins de leucines (Berks *et al.*, 2000) (Figure 8 et Tableau 1).

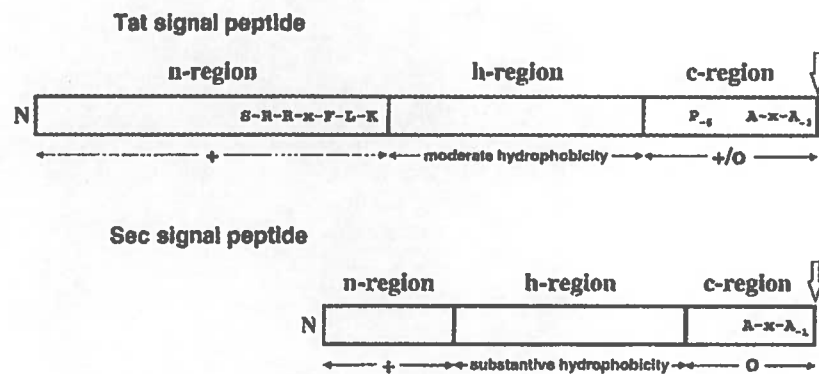


Figure 8. Comparaison des peptides signaux Sec et Tat

Chaque peptide signal contient trois domaines soit une région n, une région h et une région c. La longueur des peptides signaux et des trois régions est illustrée à l'échelle. +, basique ; +/o, souvent basique, parfois neutre, presque jamais acide ; o, rarement chargé ; S-R-R-x-F-L-K, séquence signature Tat ; P₋₆, proline à la position -6 ; A-x-A₁ (A : alanine), site de clivage par la signal peptidase. Tiré de Berk *et al.*, (2003).

Régions	Système Tat			Système Sec		
	Taille (a.a.)	Séquences consensus	Propriétés biochimiques	Taille (a.a.)	Séquence consensus	Propriétés biochimiques
ps	37			24		
n	17	S-R-R-x-F-L-K	basique +2,8	6		basique +1,7
h	12		hydrophobicité modérée plus polaire que ps Sec	11		hydrophobicité importante moins polaire que ps Tat
c	8	A-x-A	basique parfois non chargé jamais acide net charge : +0,5	6	A-x-A	rarement chargée charge : 0,03

Tableau 1. Comparaison des peptides signaux Sec et Tat.

Tiré de Berks *et al.*, (2003).

Les résidus basiques de la région c des peptides signaux Tat serviraient de motif d'évitement du système Sec (Bogsh *et al.*, 1997). Ces résidus chargés positivement sont très rares chez les peptides signaux Sec (von Heijne, 1986). En second lieu, des différences dans le degré d'hydrophobicité de la région h des peptides signaux pourraient expliquer le routage vers le système Tat. En effet, les peptides signaux Tat ont la plus faible hydrophobicité alors que les peptides signaux SRP ont la plus forte (Cristobal *et al.*, 1999). Les précurseurs Tat éviteraient donc les systèmes Sec ou SRP parce que leur peptides signaux ne sont pas suffisamment hydrophobes comme dans l'expérience suivante. Le domaine périplasmique de la leader peptidase (P2) de *E. coli* est sécrété via le système Sec. Cependant lorsque P2 est fusionnée à un peptide signal de type Tat soit celui de la triméthylamine N-oxide réductase (TorA) de *E. coli*, l'export de P2 est redirigé via le système Tat. Cependant, l'augmentation de l'hydrophobicité de la région h de la fusion TorA : P2, a comme conséquence de rediriger la sécrétion de P2 vers le système Sec (Cristobal *et al.*, 1999).

1.5.5 L'importance du motif consensus et du doublet d'arginine

Afin de déterminer l'importance du doublet d'arginine dans le processus de transport Tat chez les bactéries, plusieurs équipes de recherche ont procédé à des études de mutagenèse dirigée. Ces études démontrent que la présence des deux résidus d'arginine est absolument requise afin de diriger la protéine vers le système Tat. Par exemple, Halbig et ses collègues (1999) ont démontré que la substitution d'une des deux arginines ou des deux simultanément avec une lysine bloquait complètement le transport de la glucose-fructose oxidoréductase (GFOR) de *Zymomonas mobilis*. Cependant, d'autres études suggèrent que le remplacement de la première arginine avec une variété d'acides aminés incluant la lysine, n'inhibe que partiellement la sécrétion de certaines protéines de fusion possédant un peptide signal Tat (Berks *et al.*, 2000).

1.5.6 Le système Tat chez *S. lividans*

En utilisant des amorces construites à partir des séquences de *S. coelicolor*, Schaerlaekens et ses collègues (2001) ont amplifié les gènes correspondant à *tatA*, *tatB* et *tatC* chez *S. lividans* TK24. On retrouve la séquence de ces gènes dans la banque EMBL sous les numéros d'accèsion AJ251128, AJ292256 et AJ251149 pour *tatA*, *tatB* et *tatC* respectivement.

TatC est une composante essentielle du système Tat chez *E. coli* (Bogsch *et al.*, 1998). Afin de démontrer la fonctionnalité de ce système chez *S. lividans*, Schaerlaekens et ses collègues (2001) ont interrompu le gène *tatC*. Ils ont démontré que la translocation de deux précurseurs possédant des peptides signaux Tat était bloquée chez le mutant $\Delta tatC$ de *S. lividans* TK24. Ces précurseurs sont pre-TorA-23K et la tyrosinase de *S. antibioticus*. Pre-TorA-23K est une construction chimérique qui possède le peptide signal et les six premiers acides aminés de la portion mature de la triméthylamine *N*-oxyde réductase de *E. coli* fusionnée à la portion mature de la sous-unité de 23 kDa du photosystème II des plantes. Il a auparavant été prouvé que la protéine pre-TorA-23 kDa est transloquée via le système Tat chez *E. coli* et via le système ΔpH dans les membranes des thylakoides (Bogsch *et al.*, 1998). La deuxième protéine est la tyrosinase de *S. antibioticus* qui possède un peptide signal de type Tat. L'efficacité de translocation de ces deux protéines a été comparée chez *S. lividans* TK24 et son mutant $\Delta tatC$. Alors que la sécrétion s'est avérée normale chez la souche sauvage, ni pre-TorA-23K et ni la tyrosinase n'ont été sécrétées par le mutant $\Delta tatC$. Cependant la restauration de la translocation s'effectue lorsque le mutant $\Delta tatC$ est complémenté par l'intégration chromosomique d'une copie du gène *tatC*.

Chez *S. lividans*, les mutants $\Delta tatC$ et $\Delta tatB$ sont phénotypiquement différents de la souche sauvage et la croissance des souches mutantes en milieu liquide est beaucoup moins importante que celle de la souche sauvage. La croissance et la différenciation sont affectées davantage chez $\Delta tatC$ que chez $\Delta tatB$ ce qui suggère un rôle plus important pour TatC que pour TatB dans le processus de translocation (Schaerlaekens *et al.*, 2004a).

La disponibilité de la séquence complète du génome de *S. coelicolor* a permis à Schaerlaekens et ses collègues (2004a), d'établir une liste de précurseurs Tat putatifs. La version 1.2 du logiciel TATFIND (Rose *et al.*, 2002) a permis d'estimer que 145 précurseurs étaient potentiellement de type Tat. Lorsqu'un ratio entre le nombre d'ORF (open reading frames) et les précurseurs Tat putatifs est établi, on trouve que 1,8%, 0,79% et 0,17 % des protéines sont potentiellement Tat chez *S. coelicolor* (145/7825), *E. coli* K-12 (34/4279) et *B. subtilis* (7/4112) respectivement (Schaerlaekens *et al.*, 2004a).

Des 145 précurseurs putatifs Tat prédits, 127 représentent des protéines sécrétées, le reste étant des protéines membranaires. D'après le génome de *S. coelicolor*, il a été déduit que 819 protéines seraient sécrétées soit 10.5% de toutes les protéines (Bentley *et al.*, 2002). Si seulement 127 de ces 819 protéines sont sécrétées par le système Tat, cette voie de sécrétion prendrait en charge 15,5% des protéines sécrétées (Schaerlaekens *et al.*, 2004a).

Lorsqu'une version modifiée du programme TATFIND 1.2 dont les critères de sélection des peptide signaux potentiellement Tat sont mieux adaptés aux Streptomycètes est appliquée à l'analyse du génome de *S. coelicolor*, une liste de 230 précurseurs potentiellement Tat est obtenue (Tableau 2). Les substrats Tat sont répartis en plusieurs classes de protéines (www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor) notamment des protéines membranaires, des lipoprotéines, des protéines de transport et d'attachement, des protéines du métabolisme secondaire et des protéines sécrétées. Bien que le transport de protéines repliées et possédant un cofacteur semble un aspect fondamental du système Tat (Berks *et al.*, 2000), il est intéressant de constater que parmi toutes ces protéines seulement une minorité possèdent un cofacteur. Ceci contraste nettement avec *E. coli* où la présence d'un peptide signal Tat est en corrélation étroite avec l'attachement d'un cofacteur redox (Berks, 1996). Le programme TATFIND peut cependant surestimer le nombre de substrat Tat. Cela semble être particulièrement le cas chez les bactéries à Gram positif telle *B. subtilis* chez qui on prédit un grand nombre de protéines avec des séquences signal Tat-dépendantes; cependant peu d'entre elles sont effectivement sécrétées par ce système (van Dijl *et al.*, 2002). Dès lors, seule la démonstration expérimentale permet de confirmer la dépendance au système Tat.

Jusqu'à maintenant, on a démontré la sécrétion de deux protéines de *Streptomyces* par le système Tat. La MelC1 de *S. antibioticus* est la protéine transactivatrice de la tyrosinase qui dirige la sécrétion du complexe MelC1/apotyrosinase vers le complexe de translocation Tat (Schaerlaekens *et al.*, 2001) et la xylanase C (Faury *et al.*, 2004). La XlnC fait partie de la classe II.B.2 de la classification des substrats Tat putatifs de *S. coelicolor* tels qu'identifiés par la version modifiée du logiciel TATFIND 1.2. C'est une endo-1,4- β -xylanase codée par le gène *xlnC* (SCO0105) dont le peptide signal possède la séquence signature RRGFL. La XlnC n'est pas sécrétée dans le mutant $\Delta tatC$. On peut dès lors conclure que la sécrétion de la XlnC chez *S. lividans* est entièrement dépendante de la présence de la protéine TatC et qu'elle est attribuable au système Tat (Schaerlaekens *et al.*, 2004a).

ps	Taille (a.a.)			Propriétés biochimiques		
	Région n	Région h	Région c	Région n	Région h	Région c
39 (1)(4)	13 (1)	15 (1)	ND	Charge positive : 4,2	Hydrophobicité moyenne : 1,95 (2)	33% des ps contiennent un a.a. chargé
ND : non disponible						

Tableau 2. Les 230 peptides signaux Tat putatifs.

- 1) Analysé à l'aide du programme SIGNALP-HMM qui peut prédire la position et la longueur des trois domaines (n,h,c) et la position du site de clivage par la signal peptidase. (Nielsen *et al.*, 1997).
- 2) Déterminé par l'utilisation de l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982) avec l'utilisation de l'outil PROTPARAM (<http://us.expasy.org/tools/protparam>)
- 3) Pourrait servir de motif d'évitement du système Sec (Cristobal *et al.*, 1999)
- 4) Tous les ps déduits du génome de *S. coelicolor* possèdent en moyenne 42 a.a. en comparaison avec les ps Tat qui en contiennent 39

1.6 Les xylanases de *S. lividans*

Neuf enzymes qui sont impliquées dans la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose chez *S. lividans* ont été clonées et caractérisées. Parmi celles-ci, on retrouve trois xylanases soit la xylanase A (XlnA : NCBI no 322292), la xylanase B (XlnB : NCBI no 322293), et la xylanase C (XlnC : NCBI no 541495).¹ La XlnA et la XlnB possèdent une organisation modulaire consistant en un domaine catalytique et un domaine d'attachement au xylan (XBD). La fonction générale du XBD est d'aligner l'enzyme soluble avec le polysaccharide insoluble ce qui permet l'augmentation de la concentration de l'enzyme au site d'attaque enzymatique. Cependant le XBD n'est pas essentiel pour l'hydrolyse du substrat (Dupont *et al.*, 1998). Les xylanases A et B sont identifiées XlnA1 et XlnB1 pour les distinguer de leur forme tronquée XlnA2 et XlnB2. Ces formes tronquées correspondent au domaine catalytique seulement, le XBD n'étant pas présent. Les XlnA2 et XlnB2 partagent donc la même séquence n-terminale avec XlnA1 et XlnB1 et possèdent la même activité enzymatique sur le xylan.

Les trois xylanases ont été produites en grande quantité par leur clonage homologue dans le mutant cellulase et xylanase négatif *S. lividans* 10-164 au moyen du plasmide pIJ702. Les clones obtenus sont IAF18, IAF42 et IAF20 et codent respectivement pour la XlnA1, la XlnB1 et la XlnC. Ces clones produisent 60 fois plus d'activité que la souche sauvage (Morosoli *et al.*, 1990) (Tableau 3). La souche sauvage produit une certaine quantité des trois enzymes dans des proportions de 70 : 25 : 5 pour les XlnA1, XlnB1 et XlnC respectivement et de petites quantités de XlnA2 et XlnB2. Les clones IAF18 et IAF42 synthétisent respectivement les XlnA1 et XlnA2 et XlnB1 et XlnB2. Les xylanases A2 et B2 représentent environ 10% de la production de A1 et B1 autant dans les clones que dans la souche sauvage (Morosoli *et al.*, 1990).

¹ Les numéros d'accension proviennent de la banque de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Clones	Gènes	ORF (nt)	Xylanase	Masse de la protéine mature (kDa)	Longueur du peptide signal (a.a.)	Homologie avec les autres xylanases	Structure secondaire de la protéine
IAF18	<i>xlnA</i>	1431	A1	43	41	Aucune	Hélices (α/β) ₈
	<i>xlnA</i>		A2	31	41	Aucune	
IAF42	<i>xlnB</i>	999	B1	31	41		Feuillets β
	<i>xlnB</i>		B2	22	41	80% d'identité avec la XlnC*	Feuillets β
IAF20	<i>xlnC</i>	720	C	22	49	80% d'identité avec la XlnB2*	Feuillets β

*La XlnC entière est contenue dans la portion n-terminale de la XlnB

Tableau 3. Caractéristiques des XlnA, XlnB et XlnC de *S. lividans*.

Les données contenues dans ce tableau sont tirées de Shareck *et al.*, (1991) et Morosoli *et al.*, (1990).

Dans la nature, le xylan forme l'interface entre la cellulose et la lignine et est un substrat plutôt insoluble. La dégradation du xylan serait initiée par l'action des XlnB et XlnC ce qui provoquerait le relâchement de xylooligosaccharides solubles qui sont ensuite dégradés par la XlnA en des formes assimilables de sucres tels le xylobiose et le xylose (Morosoli *et al.*, 1990).

La XlnA1 est exportée par le système Sec et le remplacement de son peptide signal par celui de la XlnB1 produit la même quantité d'enzyme (Pagé *et al.*, 1996b). Il est donc vraisemblable que ces deux enzymes soient sécrétés via Sec alors que la XlnC est sécrétée exclusivement via le système Tat. Le peptide signal de la XlnC est formé de 49 a.a. et contient la séquence S-R-R-G-F-L-G qui ressemble au motif conservé Tat soit la séquence S/T-R-R-X-F-L-K. Des délétions de la région n de la séquence signal du gène *xlnC* démontrent qu'un minimum de six résidus d'acides aminés précédant le motif conservé sont requis pour la sécrétion de XlnC (Faury *et al.*, 2004).

1.7 Facteurs et éléments impliqués dans la production et la sécrétion des protéines par les streptomycètes

La production de protéines spécifiques par les streptomycètes, requiert l'expression optimale des gènes clonés, qu'ils soient homologues ou hétérologues, et les conditions optimales de sécrétion du produit de ces gènes. À cet effet, la souche hôte, les vecteurs d'expression, les promoteurs ainsi que les séquences signal sont des éléments importants (Gilbert *et al.*, 1995). Les gènes codant pour des enzymes extracellulaires insérés dans un plasmide multicopie, puis clonés dans *S. lividans* peuvent fournir quelques microgrammes à plusieurs grammes par litre de protéines sécrétées selon le type de protéine, la force du promoteur et le peptide signal utilisés (Morosoli *et al.*, 1997).

1.7.1 Souche et vecteur

S. lividans 66 (souche 1326) est la souche ayant été la plus utilisée pour l'expression de gènes clonés. Le clonage homologue des gènes *xlnA*, *xlnB* et *xlnC* provenant de *S. lividans* 1326, a été réalisé dans le mutant xylanase et cellulase négatif *S. lividans* 10-164 dérivé de 1326. L'avantage d'utiliser ce mutant provient du fait que la xylanase recombinante ne nécessite pas d'étape de purification puisqu'elle est la protéine prédominante dans le milieu de culture qui ne contient pas de cellulases et de xylanases autres que celle clonée. Une des approches ayant le plus de succès pour la production de xylanases est le clonage homologue de leurs gènes en utilisant le vecteur pIJ702. Ce plasmide porte le gène de résistance au thiostrepton (*tsr*) et existe dans la cellule en copies multiples (40 à 300). Les plasmides construits à partir de celui-ci se maintiennent de façon stable dans *S. lividans* en culture prolongée et même en l'absence de pression sélective au thiostrepton (Gilbert *et al.*, 1995)

1.7.2 Promoteur

Des rendements élevés ont été obtenus pour plusieurs gènes de streptomycètes clonés dans *S. lividans*. En comparaison à la production d'enzymes par la souche originale, de biens meilleurs rendements sont obtenus avec les enzymes recombinantes, notamment les XlnA, XlnB et XlnC. Cependant, le promoteur des gènes clonés doit être efficace si l'on désire que le produit de ces gènes soit synthétisé en grande quantité (Gilbert *et al.*, 1995)

Initialement, la production par IAF20 de XlnC était plutôt faible en milieu minimal et le promoteur du gène *xlnC* était suspecté d'en être responsable. Le gène structural de la XlnC a donc été fusionné au promoteur du gène *xlnA* ayant précédemment démontré son efficacité à surproduire la XlnA2 (Kébir *et al.*, 2000). La production de XlnC sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA* est trois fois plus importante à comparer avec le promoteur original du gène *xlnC* en milieu minimal. Ceci laisse suggérer que le faible rendement obtenu avec le gène *xlnC* original était dû à son propre promoteur et non à la

croissance, similaire pour tous les clones (Faury *et al.*, 2004). Dans notre laboratoire, le promoteur du gène *xlnA* est maintenant utilisé dans tous les clonages.

1.7.3 Peptide signal

Afin d'optimiser la sécrétion de protéines et notamment des xylanases par les streptomycètes, deux méthodes ont été testées soit la modification de la structure des séquences signal et la substitution d'une séquence signal native par celle d'un gène homologue codant pour une enzyme sécrétée par *S. lividans*.

1.7.4 Présence d'un codon d'initiation de la traduction additionnel dans le domaine n.

Lorsqu'on examine attentivement la séquence des peptides signaux des protéines sécrétées chez les streptomycètes, on découvre parfois la présence de deux codons d'initiation de la traduction chacun étant précédé d'un SD (« Shine-Dalgarno » ou site d'attachement aux ribosomes) plus ou moins conservé (Pagé *et al.*, 1996a). On trouve cette organisation notamment chez le gène codant pour la cellulase A (CelA). Selon la position des SD potentiels suivis des codons d'initiation présumés, la longueur du peptide signal de la CelA est alternativement de 27 a.a. soit le peptide signal court ou de 46 a.a. soit le peptide signal long, les 19 a.a. supplémentaires étant situés dans la portion n-terminale (Pagé *et al.*, 1996a) (Tableau 4). Deux précurseurs de longueur différente peuvent donc être synthétisés selon l'emplacement de l'initiation de la traduction. Le précurseur court représente un peptide signal typique alors que le long contient en plus plusieurs acides aminés supplémentaires en amont du peptide signal ce qui produit un allongement de la partie n du peptide signal original.

La séquence codant pour le long peptide signal de la CelA a été fusionnée en amont du gène structural de la *XlnA* et en aval du promoteur de la *XlnA* comprenant un SD. La production de *XlnA* pour le clone portant cette construction a été augmentée de 2,5 fois en comparaison au clone portant le peptide signal court de la CelA (Pagé *et al.*, 1996a).

De plus, la synthèse et la maturation de deux précurseurs de différente longueur a été démontrée par des expérience de pulse-chase (Morosoli et Dupont, 1999). Ceci indique que les deux SD sont utilisés par *S. lividans* pour augmenter la production d'enzyme au niveau de la traduction (Kébir *et al.*, 2000). Le peptide signal indépendamment de sa longueur est coupé car le site de clivage par la signal peptidase demeure intact. Il y a donc relâchement d'une xylanase mature et active dans le milieu de culture quelle que soit la longueur du précurseur (Morosoli *et al.*, 1997). Les deux codons d'initiation de la longue séquence signal de *celA* sont séparés par 54 nt. Il est connu qu'un ribosome protège environ 30 à 40 nt sur la molécule d'ARNm ce qui correspond à environ 15 à 20 nt de chaque coté du SD (Gold, 1988). Dans le cas de la longue séquence signal de *celA*, il y a probablement suffisamment d'espace pour l'attachement simultané de deux ribosomes sur une même molécule d'ARNm (Morosoli *et al.*, 1997). Lorsque le codon d'initiation interne TTG (L) est muté pour un ATG (M), on observe une augmentation de 10% de la production de XlnA ce qui suggère une préférence pour l'ATG comme codon d'initiation chez *S. lividans*. Cependant, le fait que la production de XlnA soit augmentée de plus de deux fois lorsque le long peptide signal de la CelA est utilisé, suggère que des éléments additionnels localisés parmi les 57 nt en amont de la courte séquence signal de *celA* doivent stimuler la production d'enzyme.

Une séquence répétée inverse (5'-T GGG AAC GCT CCC ATC GCG) contenant en position 3' une boîte de 5 nt (TCCCA) qui est complémentaire à l'ARNr 16S (AGGGU en positions 1461-1465) de *S. lividans* peuvent jouer ce rôle. Le remplacement de la répétition inversée par une boîte de 8 nt (CAGTCCCA) complémentaires à l'ARNr 16S a permis d'augmenter la production de xylanase A (Kébir *et al.*, 2000). En effet, la présence de deux sites d'initiation de la traduction combinés à la boîte de 8 nt dans la longue séquence signal de *celA* augmente la production d'enzyme de 8 fois à comparer à celle du gène sauvage (Tremblay *et al.*, 2002) (Tableau 5). Cette boîte ainsi que la séquence répétée inverse pourraient moduler la production de xylanase en affectant la taux de traduction de l'ARNm, mais n'a pas eu d'effet sur la transcription du gène de la xylanase qui s'est avérée la même pour tous les clones. L'interaction entre la séquence (downstream box) et la séquence complémentaire sur l'ARNr 16S place le codon

d'initiation en contact étroit avec la région décodante de l'ARNr 16S ce qui facilite l'initiation de la traduction.

Un plasmide a donc été construit qui arbore le promoteur du gène *xlnA* et la longue séquence signal de *celA* qui contient deux codons d'initiation de la traduction précédés d'une séquence SD et qui possèdent entre les deux, une boîte qui augmente la traduction. Ce plasmide multicopie (Figure 9) a été utilisé pour exprimer des gènes étrangers et sécréter leur produit (Tremblay *et al.*, 2002).

Protéine	Séquence	Longueur ps (a.a.)
Xylanase A	MGSYALPRSGVRRSIRVLLLALVGVLTATALIAPPGAHA↑A	41
Xylanase B	MNLLVQPRRRRRGPVTLLVRSAWAVALAALMLPGTAQA↑D	41
Xylanase C	MQQDGTQQDRIKQSPAPLNGMSRRGFLGGAGTLALATASGLLPGTAHA↑A	49
Cellulase A (court ps)	LKRLALLATGVSVGLTALAGPPAQA↑A	27
Cellulase A (long ps)	MGFGNAPIALCRLRTRRNAmKRLALLATGVSVGLTALAGPPAQA↑A	46

Tableau 4. Séquence en acides aminés de certains peptides signaux de Streptomyces.

Le site de clivage par la signal peptidase est indiqué par une flèche. Les mutations sont en lettres minuscules. Les données de ce tableau sont tirées de Gilbert *et al.*, (1995) et Morosoli, (1997).

Séquence	Boîte (nt)	Activité xylanasiq (144 h) UI/ml
Peptide signal original de la XlnA		114
T GGG AAC GCT CCC ATC GCG	5	491
T GGa AAC agT CCC ATC GCG	8	928

Tableau 5. Effet de la modification de la longue séquence signal de *celA* sur la production de XlnA.

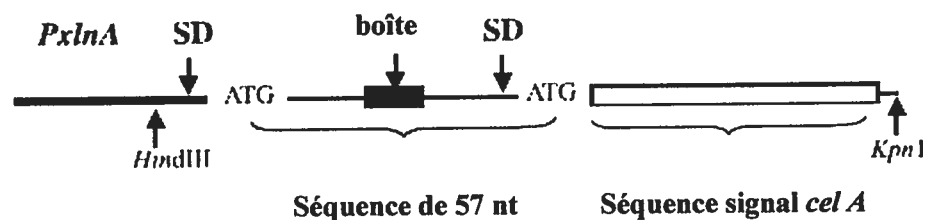


Figure 9. Schéma de la cassette d'expression sécrétion qui contient le promoteur du gène *xlnA* et la longue séquence signal de *celA*.

Courte séquence signal de *celA* plus 57 nt en amont de l'ATG interne. La longue séquence signal de *celA* contient une séquence qui augmente la traduction plus deux codons d'initiation de la traduction précédés par une séquence Shine-Dalgarno. PxlnA, promoteur de *xlnA*; SD, séquence Shine-Dalgarno; ATG, codon d'initiation de la traduction; CAGTCCCA, séquence d'augmentation de la traduction, boîte pleine; séquence signal courte de *celA*, boîte vide. La longue séquence signal de *celA* est bordée par deux sites de restriction, soit *HindIII* et *KpnI*. Tiré de Tremblay *et al.*, (2002).

2. MÉTHODOLOGIE

2.1 Souches et vecteurs utilisés

2.1.1 *Escherichia coli* DH11S

Cette souche est utile pour le sous clonage et possède les caractéristiques génétiques suivantes : *mcrA* Δ (*mrr-hsd* RMS-*mcrBC*) Δ (*lac-proAB*) Δ (*recA1398*) *deoR* *rpsL* *srl-thi-supE*/ F'*proAB+* *lacIqZ* Δ M15 (Lin *et al.*, 1992). Les vecteurs transformés dans cette souche sont tous dérivés du phagemide de 2863 pb pTZ19U (GenBank/EMBL no d'accès Y14836) (Mead *et al.*, 1986). Ce phagemide possède entre autres le gène *bla*, codant pour la bêta-lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline et un site de clonage multiple possédant entre autres les sites de restriction *HindIII*, *KpnI* et *SacI* utilisés pour fabriquer les plasmides recombinants de cette étude.

2.1.2 *Streptomyces lividans* 10-164

La souche *Streptomyces lividans* 10-164 a été utilisée comme hôte pour les plasmides recombinants. Cette souche est un mutant cellulase et xylanase négatif. La mutation est localisée dans le gène *msik* qui code pour MsiK une protéine d'import des sucres de 40 kDa qui appartient à la famille des protéines d'attachement à l'ATP (Hurtubise *et al.*, 1995). La mutation affecte négativement le système de transport du cellobiose et du xylobiose qui sont des inducteurs des gènes chromosomiques de xylanase et de cellulase qui ne peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule. Ce mutant a été obtenu par la mutagenèse de la souche sauvage *Streptomyces lividans* 1326 qui sécrète les trois xylanases A, B et C naturellement (Mondou *et al.*, 1986). Les plasmides recombinants utilisés dans ce travail sont tous dérivés du plasmide pIJ702 (Katz *et al.*, 1983). Ce vecteur de clonage à copies multiples, est dérivé de pIJ101 et contient notamment les gènes *melC1*, *melC2* et *tsr*, un gène de résistance au thiostrepton qui permet la sélection des clones (Hopwood, 1985)

2.1.3 *Streptomyces lividans* 10-164 Δ *tatC*

Cette souche mutante est dérivée de *Streptomyces lividans* 10-164 dont le gène *tatC* a été supprimé (Faury *et al.*, 2004). Les plasmides recombinants ont été transformés à l'intérieur des protoplastes de cette souche.

2.2 Sous-clonage dans *E. coli*

Avant de manipuler *S. lividans*, et pour faciliter le travail, un sous-clonage a été effectué dans *E. coli* DH11S, les gènes de xylanases ainsi que les séquences signal ayant été insérés dans le plasmide pTZ19U. Les séquences codant pour les xylanases matures ont été clonées entre les sites *KpnI* et *SacI* tandis que la séquence signal en amont, s'est retrouvée entre les sites *HindIII* et *KpnI*. De cette façon, il a été aisé par digestion enzymatique et ligation, d'agencer le type de xylanase (B,C) à la séquence signal voulue. Une fois le sous-clonage terminé, le plasmide a été coupé *HindIII/SacI* et l'insert a été cloné dans un vecteur de *S. lividans* aux mêmes sites de restriction.

2.2.1 Transformation dans *E. coli*

Cent μ l de cellules compétentes de *E. coli* DH11S préalablement conservées à -80°C , et dégelées sur la glace ont été ajoutées dans un tube Falcon stérile à l'ADN à transformer. Selon le cas, 10 à 20 ng de plasmide pur ou 10 μ l d'un mélange de ligation (section 2.6.4) ont été nécessaires. Après avoir laissé le mélange d'ADN et de cellules sur la glace pendant 30 min, un choc thermique a été provoqué en incubant le mélange à 42°C pendant 2 min. Ont ensuite été ajoutés 400 μ l de milieu 2XTY (annexe A) sans antibiotique. Une incubation à 37°C s'est déroulée pendant 1 heure. 125 μ l du mélange a été inoculé sur 4 géloses contenant du 2XTY et de l'ampicilline 100 $\mu\text{g/ml}$ qui a favorisé la sélection des transformants. Le mélange a été étalé uniformément à l'aide de 10 billes de verres stériles, agitées à la surface de la gélose. Après une incubation d'une nuit à 37°C , plusieurs colonies sont apparues sur la gélose.

2.2.2 Mini-préparation chez *E. coli*

Dix-huit colonies transformées (section 2.2.1) ont été repiquées sur une nouvelle gélose 2XTY (annexe A) plus 100 µg/ml d'ampicilline, en les alignant de manière à pouvoir les identifier. Parallèlement, 18 microtubes contenant 200 µl de milieu TB (annexe A) et 100 µg d'ampicilline / ml ont été inoculés avec les mêmes colonies, avec l'objectif d'effectuer une mini-préparation de plasmide et de la digérer avec des enzymes de restriction afin de vérifier si le fragment à cloner a été inséré dans le vecteur au cours de la ligation (section 2.6.4). Cette méthode a été tirée de Liu et Mishra (1995). Les microtubes inoculés précédemment ont été incubés à 37 °C de 8 à 18 h à 250 rpm. Les tubes ont ensuite été centrifugés 15 sec et le surnageant a été retiré par aspiration sous vide. Un mg/ml de lysozyme a été ajouté au tampon STT (annexe A). Le culot de cellules a été repris dans 30 µl de la solution précédente. Par la suite, les tubes ont été bouillis 60 sec et centrifugés 5 min à 13 krpm. Le surnageant contenait maintenant l'ADN plasmidique. 5 µl de surnageant a été digéré (section 2.6.1.2) avec les enzymes de restriction correspondant aux sites situés à chaque extrémité de l'insert et la présence de celui-ci a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (généralement 0,9%) contenant du bromure d'éthidium (EtBr). Les bonnes colonies i.e. celles où le clonage était réussi étaient celles où l'on retrouvait la bande du vecteur plasmidique et l'insert à leur position respective. Une bonne colonie a été choisie pour devenir le nouveau sous-clone. Son plasmide a alors été purifié (section 2.2.4). À cette fin, la colonie correspondante ayant poussé sur gélose a été repiquée avec un cure-dent stérile dans 2 ml de milieu LB (annexe A) contenant 100 µg/ml d'ampicilline et incubée à 37 °C avec agitation pour 24 h.

2.2.3 Vérification de la présence d'un insert par PCR

Au lieu d'utiliser la mini-préparation conventionnelle, plusieurs colonies ont été inoculées avec un cure dent stérile dans un microtube contenant 30 µl de saline (0,9% NaCl). Après une centrifugation de 5 min et avoir décanté le surnageant, 30 µl de tampon de lyse (Tampon de PCR1X, 0,1% Triton X-100) a été ajouté au culot. Après une ébullition de 10 min, et une centrifugation de 5 min, 15 µl de surnageant a été utilisé pour réaliser un PCR

(section 2.6.6). Si un des tubes contenait une colonie positive, toutes les colonies associées à ce tube étaient vérifiées individuellement par PCR. Cette technique a surtout été réservée aux clones de *E. coli* dont l'extraction plasmidique était plus laborieuse.

2.2.4 Purification de plasmide chez *E. coli*

Un ml et demi de la culture précédente (section 2.2.2) ont été déposés dans un microtube afin de procéder à la purification de plasmide avec la trousse QIAprep Spin Miniprep selon le protocole contenu dans le QIAprep Miniprep Handbook du 10/2001 aux pages 22 et 23 en procédant aux étapes 1 à 10 à l'exception de l'étape 7. La procédure de la mini-préparation QIAprep est basée sur la lyse alcaline des cellules bactériennes suivie de l'adsorption de l'ADN sur de la silice en présence d'une concentration élevée en sel. Les bactéries ont été lysées en conditions alcalines, et le lysat a été neutralisé et ajusté à des conditions d'attachement en salinité élevée. Le lysat a été déposé dans une petite colonne (QIAprep Spin Columns) qui utilise une membrane de gel de silice pour l'adsorption sélective de l'ADN plasmidique dans un tampon très concentré en sels. Les tampons optimisés dans la procédure de lyse combinés avec la nature unique de la membrane de gel de silice ont assuré que seulement l'ADN était adsorbé tandis que les protéines, l'ARN et les métabolites n'ont pas été retenus sur la membrane mais ont passé à travers lors de la centrifugation de la colonne. L'élution de l'ADN a été fait par le passage d'un tampon faible en sels dans la colonne (QIAprep® Miniprep Handbook). Le dosage de l'ADN plasmidique obtenu après purification a été effectué de la façon suivante : un échantillon d'ADN de 5 µl a été déposé dans 995 µl d'eau dans une cuvette de quartz et lu au spectrophotomètre (Pharmacia LKB, Ultrospec III) à une D.O. de 260 nm. Une D.O. de 1 correspond à 50 µg/ml d'ADN.

La trousse Flexi-prep (Pharmacia Biotech) a aussi été utilisée à quelques reprises afin de purifier les plasmides de *E. coli* selon la procédure A : « Purification of plasmid DNA from 1,5 ml cultures of *E. coli* » (« Miniprep » Procedure) aux p.9 et 10 du livret d'instructions. Les manipulations du protocole de la p.9 ont été effectuées en entier ainsi

que les 2 premières manipulations de la p.10. La suite soit « DNA purification » n'a pas été effectuée. Cette méthode emploie une lyse alcaline standard des cellules bactériennes incluant un traitement à la RNase et une précipitation à l'isopropanol. Les étapes de la trousse ont été les suivantes : 1) les cellules bactériennes ont été mise en suspension dans une solution isotonique contenant de la RNase (solution I) , 2) les cellules ont été lysées par traitement alcalin au NaOH et SDS et l'ADN chromosomique ainsi que les protéines ont été dénaturés (solution II), 3) le pH du lysat a été neutralisé en utilisant une solution d'acétate de potassium (solution III), 4) les protéines, l'ADN chromosomique, et les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation tandis que l'ADN plasmidique est resté en solution, 5) l'ADN plasmidique a été concentré par une précipitation à l'isopropanol. À la dernière étape, le culot d'ADN a été repris dans 50 µl d'eau ou de TE (annexe A).

2.3 Clonage dans *S. lividans*

Les constructions génétiques ont été effectuées dans des vecteurs dérivés du plasmide pIJ702 dans lesquels on a introduit les sites de restriction *HindIII* et *SacI*. La souche de *S. lividans* utilisée était le mutant 10-164 (cellulase et xylanase négatif) et le mutant *S. lividans* 10-164 Δ *tatC* qui contient une mutation dans le gène *tatC*, qui est une composante du système de sécrétion Tat.

2.3.1 Préparation de protoplastes de *S. lividans*

Une pré-culture de 24 h a été réalisée à 240 rpm et 34 °C. Celle-ci contenait les spores de la souche désirée, inoculées dans 20 ml de TSB (annexe A), contenu dans une flasque de 125 ml avec 4 billes. Cent ml de milieu R5 (annexe A), liquide avec glycine 0,5% ont été inoculés avec 5 ou 10 ml de la pré-culture homogénéisée avec un homogénéisateur de verre, le tout dans une flasque de 500 ml sans billes. Après une nouvelle croissance de 24 heures à 240 rpm et 34 °C, la culture a été homogénéisée si nécessaire et distribuée dans 4 tubes à centrifugation Nalgène de 35 ml stériles. Après une centrifugation de 5 krpm 15

min à T° pièce, le surnageant a été décanté. Subséquentement, deux lavages du culot de cellules ont été effectués avec du sucrose 10.3% stérile, le premier avec 20 ml par tube et le second avec 10 ml. Au deuxième lavage, avant de centrifuger, les culots ont été combinés. À 50 ml de tampon P (annexe A), ont été ajoutés 50 mg de lysozyme. Cette solution a été stérilisée par filtration sur un filtre 0,2 micron. Après la décantation du deuxième lavage, 20 ml de tampon P plus lysozyme ont été introduits dans chacun des deux tubes et le culot resuspendu avec une pipette.

Après une incubation de 15 min à 30 °C ou 34 °C, selon la souche, la solution a été mélangée avec une pipette. Après une seconde incubation de 15 min, l'état de la préparation a été examiné au microscope. S'il y avait 95 % et plus de protoplastes, il fallait procéder à l'étape suivante. S'il y avait moins de 95% de protoplastes, il fallait prolonger l'incubation de 15 min et refaire un examen microscopique de la préparation. L'ajout de 15 ml de tampon P sans lysozyme a été suivi d'une incubation de 15 min à 30 °C.

Les protoplastes ont ensuite été filtrés sur laine de verre pour retenir le mycélium résiduel et déposés dans des tubes à centrifugation Nalgene 35 ml. La laine de verre a été préalablement mouillée avec 2 ou 3 ml de tampon P avant la filtration. Un tube de laine de verre a été utilisé par 50 ml de suspension. Les tubes ont été centrifugés 7 min à 5 krpm et le surnageant décanté en laissant un petit volume résiduel. Le culot de protoplastes a été repris dans son volume résiduel par légers tapotements. Trente ml de tampon P ont alors été ajoutés et les protoplastes ont été resuspendus avec une pipette. Suivant une centrifugation de 10 min à 7 krpm le surnageant a été décanté et le culot repris dans le volume résiduel. Un second lavage a été effectué avec le même tampon. Les protoplastes ont été resuspendus dans 5 ml de tampon P.

Une dilution appropriée des protoplastes a été réalisée dans le tampon P et la lecture de la D.O. (Pharmacia LKB, Ultrospec III) à 600 nm a été reportée sur un graphique qui permet d'évaluer le nombre de protoplastes par ml. La régénération des protoplastes a été testée en étalant 50 µl sur une gélose de milieu R5, incubée à 34 °C pendant 16 heures. La

suspension de protoplastes qui contenait de 10^8 à 10^9 protoplastes/ml a été divisée en aliquots de 50 ou 100 μ l dans des microtubes qui ont été congelés rapidement à -80°C .

2.3.2 Transformation des protoplastes de *S. lividans*

Ce protocole a été adapté de Hoopwood *et al.* 1985. 50 μ l d'une suspension de protoplastes d'une concentration de 10^8 ou 10^9 protoplastes/ml ont été disposés dans un microtube stérile. Y ont été ajoutés de 5 à 10 μ l d'un mélange de ligation et 200 μ l de polyéthylène glycol (PEG) 25% préalablement préparé avec du tampon de transformation (T buffer) (annexe A). À cette fin, 4 ml de tampon T ont été ajoutés à une bouteille de 4 ml de PEG 1500 préparé dans du Hepes 75 mM ce qui donne donc une concentration finale de PEG de 50% w/v. Une fois le PEG ajouté, le mélange de transformation a été aspiré refoulé deux à trois fois avec une pipette et laissé au repos 2 min à T° pièce. Le mélange de transformation a été étalé sur des géloses de milieu R5 (annexe A) à raison de 85 μ l par gélose. Après une incubation de 16 h à 34°C pour permettre la régénération des protoplastes, 1,5 ml d'une solution de thiostrepton (30 μ l de 50 mg/ml dans 4,5 ml d'eau stérile) a été étalée sur toute la surface de la gélose pour effectuer la sélection. Une fois les géloses séchées sous la hotte quelques minutes, celles-ci ont été incubées à 30°C quelques jours. Les colonies ayant poussé possédaient le plasmide qui confère la résistance au thiostrepton.

2.3.3 Mini-préparation de plasmide chez *S. lividans*

Le clone ayant poussé sur une gélose de milieu R5 (annexe A) (section 2.3.2) a été repiqué successivement sur une gélose SFM (annexe A), plus thiostrepton 50 $\mu\text{g/ml}$ afin de produire des spores, une gélose RBB-xylane (Rémazol Brilliant Blue-xylan) (annexe A), afin de détecter la présence de l'insert soit le gène de la xylanase B ou C et en milieu liquide. Le RBB-xylane est un substrat chromogénique pour la détection des endo-1,4- β -xylanases sur milieu solide, car après une incubation de quelques jours à 30°C , une zone

d'éclaircissement est apparue autour des colonies qui sécrétaient de la xylanase. En milieu liquide, la colonie a été inoculée dans 20 ml de milieu TSB (annexe A), plus 20 µl de thiostrepton 5 mg/ml contenu dans une flasque de 125 ml contenant 4 billes de verre. Auparavant, la colonie à être inoculée en milieu liquide, a été dispersée dans 500 µl de TSB dans un microtube à l'aide d'un petit homogénéisateur. Cette suspension a été transférée à l'aide d'un embout large dans le milieu TSB liquide et l'incubation s'est poursuivie pendant 36 h à 34 °C et 240 rpm (New Brunswick, G24). La méthode suivante d'extraction a été adaptée de Hopwood, 1985 et provient du site psheldon@molbio.cbs.umn.edu et a été utilisée avec succès pour les plasmides dérivés de pIJ101. Un à 1,5 ml de la culture précédente a été prélevé, déposé dans un microtube et centrifugé. Le culot de cellules a été repris dans 300 µl de solution I soit 50 mM de glucose, 25 mM de Tris-Cl (pH 8) et 10 mM EDTA (pH 8) additionnée de 4 mg/ml de lysozyme. Suite à une incubation de 30 min à 37 °C, 400 µl de solution II préparée au moment de l'utilisation avec 0,2 N NaOH et 1% SDS, ont été ajoutés dans le tube en agitant délicatement et laissé au repos pour 10 min à T° pièce. 400 µl de la solution III (60 ml d'acétate de potassium 5 M, 11,5 ml d'acide acétique glacial et 28,5 ml d'eau) ont été ajoutés et incubés sur la glace pour 10 min. Après une centrifugation de 10-15 min à 14 krpm, le surnageant a été réparti dans 2 microtubes à raison de 500 µl par tube. Ont été ajoutés 2 volumes de EtOH 95% suivi d'une incubation à T° pièce pendant au moins 15 min. Après une centrifugation de 15 min à 14 krpm, le surnageant a été aspiré et le culot qui contenait maintenant l'ADN a été lavé avec de l'éthanol (EtOH) 70%. Après avoir séché le culot pendant environ 5 min celui-ci a été repris dans 50 µl de tampon TE (annexe A). Dépendant de la pureté de la préparation, une étape d'extraction au phénol-chloroforme a pu être ajoutée.

2.3.3.1 Vérification de la présence de l'insert par PCR

Au lieu d'utiliser la mini-préparation afin d'évaluer la présence de l'insert, le quart d'une colonie ayant poussé sur gélose a été inoculé dans un microtube à bouchon vissé contenant 100 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8 et environ 250 mg de billes de verres de 0.1 mm de diamètre. Les cellules ont été brisées avec l'appareil FastPrep (FP120, Thermo

Savant Holbrook N.Y.) à la vitesse 4 pendant 30 sec. Une centrifugation de 10 min à 13 krpm a permis de récupérer le surnageant qui contenait l'ADN. Un à 2 µl de surnageant a alors servi de matrice dans une réaction de PCR (section 2.6.6) qui a permis de déterminer la présence de l'insert par amplification.

2.3.4 Maxi-préparation de plasmides de *S. lividans*

Cette méthode a été adaptée de Hopwood, 1985. Une pré-culture a été préparée dans une flasque de 125 ml où ont été déposés 4 billes de verre, 20 ml de milieu TSB (annexe A), 800 µl de glucose 25% et 20 µl de thiostrepton 5 mg/ml et la culture a été inoculée en prélevant environ ½ cm de gélose SFM (annexe A) sur laquelle un clone avait sporulé ou d'une culture congelée dans le glycérol. Après une incubation de 24 h à 34 °C et 240 rpm, 6 ml de la pré-culture a été dispersé avec un homogénéisateur de verre. De cette suspension, 4 ml ont été prélevés et inoculés dans 100 ml de TSB (annexe A), 4 ml de glucose 25% et 100 µl de thiostrepton 5 mg/ml dans une flasque d'une capacité de 500 ml. L'incubation s'est déroulée à 34 °C pendant 24 à 48 h. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 4 krpm et le surnageant a été décanté. Le volume de cellules ne dépassait pas 3 ml et constituait le volume initial (v.i.). Afin de laver les cellules, le culot a été repris dans 5 fois le v.i. avec la solution I composée des éléments suivants : sucrose 10,3%, Tris 25 mM, EDTA 25 mM, pH 8. Après une nouvelle centrifugation de 2 min le surnageant a été décanté de nouveau et le culot repris délicatement à la pipette dans la solution I additionnée de 2 mg/ml de lysozyme en respectant un volume total de 5 x v.i. Après une incubation de 45 min à 37 °C le tube a été agité doucement et la solution II a été ajoutée à raison de 2,5 x v.i. en agitant au vortex, 10 sec immédiatement. La solution II était composée de NaOH 0,3 M et de SDS 2%. Après une incubation de 20 min à 70 °C et un refroidissement à la T° de la pièce, la solution III soit du phénol-acide a été ajoutée à raison de 1 fois le v.i. La solution III a été préparée à partir de 50 g de phénol, 50 ml de chloroforme, 10 ml d'eau et 50 mg d'hydroxyquinoline. Après une agitation au vortex de 1 min, le tube a été centrifugé de 10 à 20 min afin d'obtenir la séparation des phases aqueuse et phénolique. La phase aqueuse (~ 7 x v.i.) a été transférée dans un nouveau

tube contenant 7 x le v.i. d'isopropanol et 0,7 x le v.i. d'acétate de sodium (NaAc) 3 M. Après un mélange par inversion, les tubes ont été incubés 5 min ou toute la nuit à T° de la pièce. Après une centrifugation de 10 min à 10 krpm le surnageant a été décanté et l'ADN s'est retrouvé dans le culot. Le culot a été repris dans 0,5 X le v.i. de TE et 0,05 X le v.i. de NaAc 3 M. Ce mélange a été réparti dans des microtubes et ½ volume de phénol neutre a été ajouté à chaque tube. Après une agitation de 5 min au vortex et une centrifugation de 3 min, la phase aqueuse a été transférée dans de nouveaux microtubes contenant un volume égal d'isopropanol. Après une incubation de 5 min à T° de la pièce, les tubes ont été centrifugés 3 min à 13 krpm et le surnageant a été décanté. Les culots ont été repris dans du tampon TE et combinés afin d'obtenir un volume final de 1 ml. Cette préparation d'ADN a ensuite été séparée avec un gradient de chlorure de césium (CsCl) afin de purifier les plasmides.

La technique de purification de plasmides au CsCl, provient de Hopwood, 1985. La solution d'ADN (1 ml) a été transférée dans un tube de 15 ml contenant 2,625 g de CsCl dissout dans 0,5 ml d'eau, ce qui correspondait à une concentration de 1,75 g de CsCl/ml (environ 2 ml à une densité d'environ 1,84). Ont ensuite été ajoutés 7,5 µl de EtBr et 1,8 ml d'une solution de CsCl à 65% a été introduite dans le fond d'un tube Quick seal d'une capacité de 3,9 ml à l'aide d'une seringue de 3 ml et d'une aiguille 18G. Environ 2 ml de la solution d'ADN/CsCl/EtBr a été déposée sur le dessus de la solution de CsCl à 65% avec une seringue de 3 ml et une aiguille de 18 G jusqu'à ras bord. Le tube a été équilibré et scellé à chaud.

Après une centrifugation (Beckman L-100) de 3 h à 100 000 rpm et à 20 °C, la bande correspondant au plasmide a été repérée aux U.V. et récupérée avec une seringue de 3 ml et une aiguille 18 G dans un tube de 15 ml. Le EtBr a été extrait avec du butanol saturé d'eau. L'opération a été répétée 4 à 5 fois jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de EtBr. La préparation de plasmide purifiée a été répartie dans plusieurs microtubes à raison de 500 µl/tube et précipitée avec 2 volumes d'EtOH 70% à -20 °C toute une nuit. Suite à une centrifugation de 15 min à 13 krpm, les surnageants ont été décantés et le culot de plasmides repris dans du tampon TE. Les culots ont été combinés et 0,1 volume de NaAC 3 M plus 2 volumes de EtOH 95% ont été ajoutés à la solution. Après une attente de 10

min à -80°C , le tube a été centrifugé à 13 krpm pendant 30 min. Le culot d'ADN plasmidique a été repris dans 50 μl d'eau et 5 μl de cette solution a été ajouté à 995 μl d'eau dans une cuvette de quartz afin de déterminer la concentration de l'ADN au spectrophotomètre. Une D.O. de 1 à 260 nm correspond à 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN.

2.3.5 Préparation de spores de *S. lividans*

La moitié d'une colonie choisie sur le milieu de transformation R5 (annexe A) a été prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile, déposée et étalée avec un fil de platine sur un tiers d'une plaque de milieu de sporulation SFM (annexe A) plus du thiostrepton à raison de 50 $\mu\text{g/ml}$. Après une croissance d'environ une semaine à 30°C , les spores ont été grattées à l'aide d'un fil de platine et étalées en stries serrées sur trois géloses SFM plus thiostrepton. Suivant une nouvelle croissance d'une semaine à 30°C les spores étaient prêtes à être récoltées. Il a alors fallu déposer 10 ml de glycérol 20% stérile sur une première gélose et gratter délicatement la gélose avec une pipette de plastique afin de décoller les spores. Lorsque toute la surface a été grattée, le maximum de volume a été récupéré et déposé sur une seconde gélose de spores. Les spores ont été récupérées et déposées dans un tube à centrifuger en plastique contenant environ le 1/3 de billes de verre. Après une agitation au vortex de 1 à 2 min, un tube troué stérile contenant de la laine de verre a été installé sur un support. La laine de verre a été rincée avec un peu de glycérol et pressée avec une pipette pour laisser sortir un maximum de glycérol. Un tube ouvert a été placé en dessous du tube troué et le mélange de spores a été filtré sur la laine de verre afin de séparer le mycélium résiduel des spores.

Cent μl de la suspension de spores a été diluée à 1 ml avec du glycérol 20%. La D.O. de la solution à 660 nm (Spectrophotomètre Pharmacia LKB, Ultrospec III) a été comparée à une courbe mettant en relation la densité optique à 660 nm en fonction de la concentration de spores. Les spores ont été réparties également dans des tubes de 1,5 ml et conservées à -20°C .

2.3.6 Croissance des clones de *S. lividans*

Dans une flasque stérile de 125 ml contenant 4 billes de verre de 4 mm de diamètre ont été déposés 20 ml de milieu minimal M14 (annexe A), 1 ml de xylose 20%, 120 μ l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5%, 200 μ l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3%, 20 μ l de thiostrepton 5 mg/ml et 2×10^6 spores/ml soit 4×10^7 spores au total dans le milieu de culture. Les spores qui étaient conservées dans le glycérol ont du être lavées afin d'éliminer ce dernier. La quantité de spores nécessaire (section 2.3.5) (conservée à -20°C) a été prélevée et déposée dans un microtube. Après 5 min de centrifugation à 14 krpm, le surnageant qui contenait le glycérol a été décanté. Les spores ont alors été reprises dans 1 ml de milieu M14 et centrifugées de nouveau. Une fois le surnageant décanté, le culot de spores a été repris dans 100 μ l de milieu M14 et le tout a été inoculé dans la flasque. L'incubation s'est déroulée à 34°C à 250 rpm dans un agitateur New Brunswick G24.

Aux temps prédéterminés, les cultures ont été échantillonnées afin de déterminer la croissance et l'activité xylanasiq. Stérilement, a été prélevé 1 ml de culture avec un embout large. Après centrifugation, le surnageant a été transféré dans un microtube stérile et conservé à 4°C jusqu'au jour de l'essai enzymatique (section 2.4). Le culot a été conservé pour effectuer la courbe de croissance (section 2.5). À cet effet, 0,5 ml de SSC1X (annexe A), froid a été ajouté au culot qui a été conservé à 4°C .

2.4 Dosage de l'activité xylanasiq dans le surnageant de culture

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino-5-nitrosalicylique rouge orangé. Cette technique permet de doser les glucides réducteurs -oses ou -osides possédant une fonction pseudo aldéhydique ou cétonique libre. Le dosage de l'activité xylanasiq est effectué en ajoutant du xylane de bouleau au surnageant de culture (section 2.3.6). Le xylane est hydrolysé en xylooligosides qui réagissent avec le DNS. Outre le DNS, le réactif contient du tartrate de sodium potassium, du bisulfite de sodium, du phénol et de l'hydroxide de

sodium (NaOH). Le tartrate de sodium potassium (ou sels de Rochelle) est essentiel à la stabilité de la couleur ainsi que le bisulfite de sodium qui retire l'oxygène dissout et protège les sucres. Le phénol augmente la quantité de couleur produite. L'hydroxyde de sodium (NaOH) est requis pour favoriser l'action réductrice des sucres sur l'acide dinitrosalicylique (Miller, 1959). Une unité internationale (UI) d'activité enzymatique équivaut à 1 μmol de sucres réducteurs produits par minute à 60 °C.

Le matériel et les solutions requises pour le test ainsi que leur préparation sont décrits ci-après: du xylane de bouleau 1% ; celui-ci a été dissout dans l'eau en chauffant au four à micro-ondes 2 fois 30 sec et le volume a été complété une fois la solution à T° pièce; du xylose 10 mM soit 15 mg dans 10 ml d'eau ce qui correspond à 1 μmole par 0,1 ml; du tampon citrate-phosphate 0,5 M pH 6,0 10X soit 17,22 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 3,43 g d'acide citrique dissout dans l'eau, le pH ayant été ramené à 6 en ajoutant au besoin un des deux composés solides; une solution de DNS soit 10 g de NaOH, 10 g d'acide dinitrosalicylique, 2 g de phénol et 200 g de tartrate de sodium potassium dissout dans 1 L d'eau, filtrés sur papier Whatman et conservés à l'obscurité et à T° pièce ainsi que 10 g de sulfite de sodium dans 100 ml d'eau.

Le dosage s'est déroulé de la façon suivante et selon les volumes inscrits dans le tableau 6: le xylane de bouleau, le tampon citrate-phosphate 10X ainsi que de l'eau ont été ajoutés aux éprouvettes contenant les échantillons essai et les témoins. Parallèlement le xylose a servi à préparer la courbe standard de 0 à 2 μmoles . Les échantillons ont été pré-incubés à 60 °C, 3 min. À la fin de la pré-incubation, ont été ajoutés 0,1 ml de surnageant de culture tel quel ou dilué. Avant l'emploi, la solution de sulfite a été ajoutée au DNS à raison de 0,5%. Un ml de cette solution a été ajouté dans les tubes de la courbe standard qui n'ont pas été pré-incubés. À la fin de l'incubation, 1 ml de DNS-sulfite a été ajouté aux échantillons. Tous les tubes ont été mélangés au vortex et gardés dans la glace. Cent μl de surnageant tel quel ou dilué a été ajouté aux tubes témoins qui ont été mélangés à nouveau et remis sur la glace. Tous les tubes ont été portés à ébullition pendant 15 min, refroidis dans la glace et mélangés à nouveau. Trois cent μl ont été prélevés de chaque tube et déposés dans les puits d'une plaque Elisa. La plaque a été lue à 540 nm au

spectrophotomètre (Microplate Auto reader EL 309, Bio-Tek instrument). Les résultats de la courbe standard ont été placés en graphique dans Microsoft Excel. Les résultats ont été analysés en fonction de la courbe standard de xylose.

Solutions (ml)	Standard de xylose (μmoles)					Prélèvements	
	0	0,5	1,0	1,5	2	Échantillons	Témoins
Xylane de bouleau 1%	--	--	--	--	--	0,5	0,5
Tampon citrate-phosphate 10X	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H ₂ O	0,9	0,85	0,8	0,75	0,7	0,3	0,3
Enzyme	--	--	--	--	--	0,1	0,1*
Xylose	--	0,05	0,1	0,15	0,2	--	--
Volume total	1	1	1	1	1	1	1

*introduit après avoir ajouté le DNS

Tableau 6. Dosage de la xylanase.

2.5 Mesure de la croissance du mycélium par estimation de la concentration de l'ADN par la réaction colorimétrique à la diphénylamine

Les réactifs essentiels à ce dosage sont la diphénylamine, l'acide perchlorique et l'acétaldéhyde. Cette procédure demande en premier lieu, l'hydrolyse chimique de l'ADN. Lorsque traité à l'acide perchlorique (HClO_4), les liens glycosidiques reliant la base azotée au desoxyribose et les liens phosphodiester qui relient les nucléotides dans l'ADN, sont hydrolysés. Le desoxyribose peut ainsi réagir avec la diphénylamine, ce qui produit une coloration bleutée. La diphénylamine réagit avec le sucre originellement combiné à une purine. Le desoxyribose 5-phosphate est labile à l'acide et il y a une possibilité que la condensation du groupement aldéhyde avec l'amine augmente cette labilité. L'amine se combine avec l'ADN avant que le phosphate se relâche du sucre. L'acétaldéhyde favoriserait le développement de la couleur par la réaction de deux molécules d'aldéhyde et d'une amine aromatique avec la participation du desoxyribose. La réaction requiert un desoxyribose et elle est donc spécifique à l'ADN (Burton, 1956). Afin de déterminer la croissance de la biomasse mycélienne, des échantillons de 1 ml de culture ont été prélevés stérilement au cours du temps (section 2.3.6). L'échantillon a été centrifugé et le surnageant décanté. Du SSC 1X (0,5 ml) (annexe A) a été ajouté au culot qui a été conservé à 4 °C. Le culot a été défait à l'aide d'un petit pilon de plastique et 0,5 ml de SSC 1X supplémentaire a été ajouté. L'échantillon a été mélangé au vortex et transféré dans une éprouvette de verre. Ont ensuite été ajoutés, 1 ml d'acide perchlorique 20%, 2 ml de diphénylamine 4% préparée avec de l'acide acétique glacial et 0,2 ml d'acétaldéhyde 0,16%. Une éprouvette contenant 1 ml de SSC 1X et les réactifs a servi de témoin. Les tubes fermés ont été incubés à 30 °C pour la nuit sans agitation. Le lendemain et après mélange au vortex, 1 ml de la solution a été transféré dans un microtube et centrifugé 2 min à 14 000 rpm afin de précipiter les débris. Le surnageant a ensuite été transféré dans des cuvettes jetables. La lecture a été effectuée au spectrophotomètre (Pharmacia LKB, Ultrospec III) à 595 et 700 nm. Les résultats ($\Delta\text{D.O. } 595 - \text{D.O. } 700$) ont été calculés en effectuant la différence de densité optique entre les deux longueurs d'ondes.

2.6 Manipulations et amplification de l'ADN

2.6.1 Digestion des plasmides avec enzymes de restriction

2.6.1.1 Plasmides purifiés

Généralement, 1 μ l d'ADN à 1 μ g/ μ l a été additionné à 2 μ l de tampon de digestion concentré 10X plus 1 μ l du premier enzyme (10 ou 15 U/ μ l) et 1 μ l du deuxième enzyme (10 ou 15 U/ μ l) s'il y avait lieu, plus la quantité d'eau nécessaire pour obtenir un volume de 20 μ l. Il a fallu en fait, ajouter suffisamment de tampon 10X à la réaction afin d'obtenir la concentration finale spécifique à ou aux enzymes utilisées. Après une incubation de 1 h à 37 °C, 4 μ l de tampon de chargement ont été ajoutés aux 20 μ l pour un total de 24 μ l. 20 μ l de la digestion a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

2.6.1.2 Digestion de mini-préparation de plasmides

Les échantillons ont été digérés de la même façon que précédemment mais a été ajouté 0,5 μ l d'une solution de 1 mg/ml de RNase bouillie car les échantillons contenaient une grande quantité d'ARN qui aurait pu masquer la présence de bandes d'ADN.

2.6.2 Précipitation à l'éthanol

À la suspension d'ADN ont été ajoutés 0,1 volume de NaAc 3 M et 2,5 volume d'éthanol 95%. Après une incubation de 10 min à -80 °C ou -20 °C toute la nuit, les tubes ont été centrifugés 30 min à 13 krpm et le surnageant a été décanté. Après une nouvelle centrifugation de 2 min toujours à 13 krpm, le liquide résiduel a été aspiré avec un capillaire de verre. Le culot a été séché à l'air environ 5 min et repris dans une quantité d'eau ou de tampon voulue ou laissé à sec (section 2.6.4).

2.6.3 Extraction de l'ADN au phénol chloroforme

Après lyse cellulaire, a été ajouté à la solution d'ADN, ½ volume de phénol suivi d'une agitation au vortex de 1 min. A ensuite été ajouté ½ volume de chloroforme : isoamyl alcool (24 :1) suivi d'une agitation au vortex de 1 min. Après une centrifugation de 3 min à 13 krpm la phase aqueuse du dessus a été récupérée et l'ADN a été précipité à l'éthanol (section 2.6.2).

2.6.4 Ligation du vecteur plasmidique avec un fragment d'ADN

Cette méthode a permis d'insérer un fragment d'ADN quelconque dans un plasmide au moyen de l'ADN ligase. L'ADN du vecteur et du fragment a été, au besoin, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose (section 2.6.7). L'ADN du vecteur a été repris dans 7,5 µl avec l'objectif d'avoir deux fois plus de fragment que de vecteur en quantité. 7,5 µl de la solution de vecteur a été déposée dans un microtube contenant le fragment précipité. Un µl de tampon OPA 10X (100 mM Tris-acétate, 100 mM acétate de magnésium et 500mM acétate de potassium), 1 µl d'ATP 10 mM et 0,5 µl de T4 DNA ligase (5 U/µl) ont été ajoutés pour un total de 10 µl. La ligation s'est opérée à 14 °C toute la nuit (au minimum 4 h).

2.6.5 Déphosphorylation de vecteurs

Ce protocole a été tiré et adapté du catalogue Pharmacia 1993 (Technical notes, p. 202) et a permis d'enlever le phosphate à l'extrémité des brins d'ADN ce qui a empêché la recircularisation ultérieure du plasmide lors de la ligation. En premier lieu, 0,1 à 2 µg du vecteur ont été digérés avec l'enzyme de restriction appropriée. Au volume total de la digestion, soit 20 µl ont été ajoutés 5 µl de tampon OPA10X et 25 µl d'eau de façon à obtenir une concentration finale de OPA 1X. Ce mélange a ensuite été chauffé 20 min à 65 °C ou 30 min à 85 °C afin d'inactiver thermiquement l'enzyme de restriction. Après un refroidissement de 20 min à température de la pièce, 0,1 U de phosphatase alcaline CIP

(calf intestinal phosphatase) a été ajouté. Après une incubation de 30 min à 37 °C, la phosphatase alcaline a été inactivée en chauffant 15 min à 85 °C. Après une extraction au phénol/chloroforme le vecteur a été précipité avec 0,1 vol de NaAc et 2 vol d'éthanol. Après 15 min à -20 °C et une centrifugation de 15 min, le vecteur déphosphorylé a été repris dans 15 µl d'eau et était prêt à la ligation avec un fragment.

2.6.6 Technique du PCR

En général, la méthode employée pour amplifier les fragments d'ADN d'intérêt se décrit comme suit. Dans un microtube de 1,5 ml ont été déposés les éléments suivants : 65 µl d'eau Millipore stérile, 8 µl d'une solution contenant 2,5 mM de chaque dNTP, 10 µl de tampon *Pfu* 10X, 8 µl de propionamide 50%, 1 µl de Tween 20%, 3 µl de chaque amorce à raison de 25 pmole/µl, 1 µl de la matrice d'ADN à amplifier à une concentration de 0,1 µg /µl et 1 µl de la polymérase *PfuTurbo*® 2,5 U/µl. Le volume total de 100 µl a été divisé en deux et déposé dans des tubes de 0,2 ml. Le programme utilisé pour amplifier l'ADN s'est déroulé dans les conditions suivantes : 95 °C 5 min, 50 °C 5 min, 72 °C 3 min, puis les 30 cycles suivants : 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 3 min. Lorsque le programme était terminé, l'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%.

Pour certaines constructions, la technique du PCR emboîté a dû être utilisée. En premier lieu, les deux fragments d'ADN à emboîter ont été amplifiés séparément avec le programme décrit précédemment. Ensuite, les deux produits de PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN a été extrait de l'agarose avec la trousse QIAEX II, précipité à l'éthanol et repris dans 2 µl à 10 µl d'eau. Les deux produits de PCR purifiés ont ensuite été mélangés et la quantité d'eau nécessaire pour le PCR a été ajoutée. Le tube a été chauffé à 100 °C pendant 5 minutes. Dix µl de tampon pour *Pfu* 10X ont été ajoutés immédiatement après l'ébullition et ce mélange a été refroidi lentement à la température de la pièce dans un bécher d'eau pour permettre l'appariement des séquences communes aux deux fragments. Lorsque le mélange était à la T° ambiante les éléments

manquants pour réaliser le PCR ont été ajoutés soit les dNTP, la propionamide, le Tween 20, les oligonucléotides et la polymérase. La nouvelle matrice d'ADN a été amplifiée avec le programme suivant : 72 °C 3 min avant d'enchaîner avec les 30 cycles suivants : 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 3 min. Lorsque le programme était terminé l'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%.

2.6.7 Extraction de l'ADN du gel d'agarose

Afin d'extraire la bande d'ADN correspondant à l'insert ou au plasmide, une électrophorèse sur gel d'agarose de 0,7% a été préparée sans ajout de EtBr. Dans le premier puits, un échantillon de la digestion de 4 µl (24 µl total) a été déposé. Le second puits a été rempli avec 7 µl du marqueur d'ADN, le troisième puits a été laissé vide, le quatrième puits rempli avec le reste de la digestion soit 20 µl, le cinquième puits laissé vacant et le sixième rempli à nouveau avec le marqueur de poids moléculaire. Après une migration à un voltage et un temps déterminés, le gel a été retiré de la cuve à électrophorèse (BioRad) et découpé au scalpel sur toute la longueur au niveau du troisième puits. La portion du gel correspondant au puits 1,2 et 3 a alors été trempée dans une solution de EtBr pendant 10 min, rincée à l'eau et déposée dans un appareil de lecture de gel (Gel Doc 1000 BioRad). Une règle métrique a été disposée contre le gel et une photo a été réalisée. À l'aide de la photo, l'endroit précis où se retrouvait la bande d'ADN d'intérêt sur le gel a été déterminé. Il s'agissait ensuite de déposer la règle contre la partie du gel correspondant au puits 4,5 et 6 et de découper avec précision dans la région du puits 4 correspondant à l'insert ou au vecteur voulu. Le morceau de gel obtenu a été coupé en petits cubes qui ont été déposés dans un microtube. L'extraction des fragments du gel s'est réalisée en utilisant la trousse d'extraction QIAEXII. Le principe de la trousse d'extraction du gel QIAEX II est basé sur la solubilisation de l'agarose et l'adsorption sélective et quantitative des acides nucléiques sur des particules de gel de silice en présence d'une concentration élevée en sels. Le gel d'agarose contenant la bande d'ADN à extraire, a été découpé en morceaux et solubilisé en ajoutant trois volumes du tampon QX1 à un volume de gel et incubé à 50°C pour 10 min. La concentration élevée en sels

dans le tampon QX1 dissout les liens hydrogène entre les sucres dans le polymère d'agarose ce qui permet la solubilisation des morceaux. L'ADN a été éventuellement adsorbé sur les particules de silice (QIAEX II). À la fin de l'extraction 40 µl d'ADN ont été précipités à l'éthanol (section 2.6.2). Le culot d'ADN a été laissé à sec ou dans 15 µl d'eau et éventuellement a servi à la ligation (section 2.6.4).

2.7 Expérience de marquage métabolique « pulse-chase » chez *S. lividans*

Au conditions de culture conventionnelles (section 2.3.6) ont été ajoutés 200 µl d'une solution stock contenant 0,1 g/ml de protéose peptone et 0,05 g/ml d'extrait de levure pour favoriser la croissance. L'incubation s'est déroulée à 34 °C pendant 48 h à 72 h (selon la souche) à 250 rpm. Le mycélium se trouvait alors aux 2/3 de sa phase exponentielle de croissance. Le mycélium a été récolté par centrifugation à 1,5 krpm, 1 min dans un tube de polypropylène de 50 ml. Le surnageant a été décanté délicatement et le culot a été lavé avec 20 ml de milieu M14 (annexe A) sans protéose peptone ni extrait de levure. Après une nouvelle centrifugation de 1 min à 1,5 krpm, le surnageant a été décanté à nouveau et l'étape précédente répétée une fois. Le culot a été ensuite repris dans le milieu M14 toujours sans protéose peptone ni extrait de levure jusqu'à un volume final de 20 ml. De ce volume 6 à 7 ml ont été traités avec un homogénéisateur de verre afin d'homogénéiser le mycélium. 5 ml de cette solution ont alors été transférés dans une flasque de 25 ml dans laquelle a été ajouté 0,5% de xylose (0,125 ml d'une solution à 20%) suivi d'une incubation de 5 min à 34 °C dans un bain-marie agitateur (American Optical) à la vitesse de 100 rpm.

Le marquage court « pulse » a été effectué en ajoutant 90 µl de méthionine radioactive (200 µCi/ml de ³⁵S-méthionine) et en incubant pendant 2 min dans le bain-marie agitateur. Le « chase » a été initié en ajoutant 40 µl d'un mélange de L-méthionine – L-cystéine non radioactif à 10 mg/ml et de 50 µl d'albumine sérique bovine à 5 mg/ml qui agit comme entraîneur de protéine lors de la précipitation à l'acide trichloroacétique

(TCA). Après 5 sec d'agitation, 500 µl ont été prélevés avec un embout large et mélangés avec 500 µl de TCA 10% froid préalablement déposé dans un microtube sur la glace. Ce premier prélèvement correspondait au temps 0. Le nombre de prélèvements nécessaires de 500 µl ont été effectués de la même façon que précédemment, aux différents temps déterminés pour le système Sec ou le système Tat. Les échantillons ont été incubés dans le TCA au moins 30 min à 4 °C. À la fin du marquage, le restant de la culture ou environ 1 ml a été transféré dans un microtube à bouchon vissé, sans ajout de TCA et centrifugé 5 min à 13 krpm. Au surnageant récupéré ont été ajoutés 200 µl de gélatine à 2,5% et du sel (NaCl) jusqu'à une concentration finale de 150 mM, soit 150 µl d'une solution 1 M pour 1 ml de surnageant. Cet échantillon constituait le contrôle de la xylanase B ou C mature. À cette étape, tous les tubes pouvaient être congelés à -20 °C et la première partie de l'immuno-précipitation de la xylanase marquée poursuivie un autre jour.

Afin de procéder à l'immuno-précipitation de la xylanase marquée, 1 ml d'une suspension de protéine A sépharose 10% (soit 0,1 g/ml) a été préparée dans du tampon IPD qui était constitué des éléments suivants : Tris-HCl 50 mM pH 7,4, Triton X100 0,25%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, gélatine 2,5% et de l'eau. La suspension de microbilles a été laissée à gonfler 1 h ou plus. Avant l'utilisation, la suspension a été centrifugée 15 sec à 13 krpm, le surnageant décanté et la suspension complétée à 1 ml avec le tampon IPD. Les échantillons précipités précédemment au TCA ont été centrifugés 2 min à 13 krpm et le surnageant a été décanté par aspiration. Le TCA résiduel a été extrait en ajoutant 0,5 ml d'acétone aux culots qui ont été remis en suspension à l'aide d'un petit homogénéisateur de plastique. Cinq cent µl d'acétone a été ajouté de nouveau. Après une incubation de 15 min à T° ambiante, les échantillons ont été centrifugés 2 min à 13 krpm et l'acétone décanté par aspiration. Un nouveau lavage a été effectué en ajoutant 1 ml d'acétone et en remettant les culots en suspension au vortex. Après une nouvelle incubation, centrifugation et décantation, les culots ont été séchés sous une hotte chimique pendant 15 min. Ont ensuite été ajoutés 40 µl de Tris 1 M, 1 ml de tampon SP (composé de Tris-HCl 50 mM pH 6,8, EDTA 2 mM, β-mercaptoéthanol 1%), 40 µl d'inhibiteur de protéase *Complete* 25X, 10 µl de PMSF 100 mM dans l'isopropanol, 250 mg de billes de verre de 0,1 mm et 100 µl de SDS 10% et les tubes ont

été introduits dans l'appareil FastPrep (FP120, Thermo Savant Holbrook N.Y.) et agités 45 sec à la vitesse de 6,5 afin de casser les cellules. Les tubes ont ensuite été portés à ébullition 5 min, centrifugés 5 min à 13 krpm et le surnageant transféré dans des tubes de polypropylène de 15 ml. Le surnageant a été dilué avec 12 ml de tampon IPD. À partir de cette étape, le contrôle de xylanase mature a été traité comme les autres échantillons. Une préclarification a été effectuée en ajoutant avec un embout large, 30 µl de la suspension de protéine A sépharose 10% et en incubant les tubes 1 h à 4 °C. Après une centrifugation de 5 min à 3 krpm (2 min à 13 krpm pour le contrôle), les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes de polypropylène de 15 ml (microtube pour le contrôle). À tous les tubes ont été ajoutés 5 µl de sérum anti-xylanase B de lapin (Institut Armand-Frappier) suivi d'une incubation de 30 min à 4 °C. Par la suite, 50 µl de protéine A sépharose ont été ajoutés dans tous les tubes suivi d'une incubation à 4 °C pour toute la nuit. Toutes les incubations ont été effectuées avec un agitateur rotatif (LABQUAKE Barnsled).

Le lendemain, les tubes ont été centrifugés 5 min à 3 krpm (15 sec à 13 krpm pour le contrôle) et les surnageants décantés par aspiration en laissant environ 200 µl dans le fond des tubes de 15 ml. Les billes de protéine A sépharose dans le culot ont été ensuite lavées avec 10 ml de tampon IPW (1 ml pour le contrôle) préparé à partir de Tris-HCl 10 mM pH 7,4, Triton X100 0,5%, Na-désoxycholate 0,5%, NaCl 150 mM, suivi d'une centrifugation de 5 min à 3 krpm (2 min à 13 krpm pour le contrôle) et de la décantation du surnageant. Avec une pipette de 200 µl munie d'un embout à ouverture large, les billes de protéine A sépharose ont été transférées dans des microtubes de 1,5 ml en rinçant plusieurs fois le tube de 15 ml avec 150 µl de tampon IPW jusqu'à ce qu'il ne reste plus de billes ni dans le tube de 15 ml et ni dans l'embout. Les microtubes ont été centrifugés 30 sec à 13 krpm et les surnageants ont été décantés par aspiration. Les culots de billes ont été lavés 2 fois avec 1 ml de tampon IPW et centrifugés à chaque reprise 15 sec à 13 krpm. Le culot du tube contrôle a été lavé à 3 reprises avec 1 ml de tampon IPW de la même façon.

Les culots de billes ont été repris dans 35 µl de tampon Laemmli 1X (annexe A) puis portés à ébullition 5 min et centrifugés 2 min à 13 krpm. 30 µl d'échantillon ont été déposés dans les puits d'un mini-gel de polyacrylamide de 12% (annexe A) d'une épaisseur de 0,75 mm avec un gel de regroupement à 4% (annexe A). 10 µl de marqueur de poids moléculaire non radioactif Rainbow high ou low dans 20 µl de tampon Laemmli 1X a été utilisé. Le regroupement a été effectué à 90 V pendant environ 10 min puis le courant a été augmenté à 200 V. La migration s'est poursuivie jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait migré hors du gel. La bande correspondant à l'anhydrase carbonique (30 kDa) de couleur rouge devait se trouver à 0,5 cm du bas du gel. Le tampon de migration utilisé était du Tris-glycine 1X. Une version 5X de ce tampon a été préparée en mélangeant 15,14 g de Tris, 94 g de glycine et 50 ml de SDS 10% à 1L d'eau (BioRad US/EG Bulletin 1156 voir aussi Bio-Rad « Reagent and Gel Preparation for Laemmli SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis »).

Une fois la migration terminée, le gel a été démoulé et la partie correspondant au gel de regroupement a été éliminée. Le gel a été fixé dans un mélange isopropanol :eau : acide acétique (25 :65 :10 v/v) en agitant pendant 20 min. Après avoir retiré le fixateur, la solution AmplifyTM Amersham a été ajoutée pour couvrir le gel en agitant pendant 30 min. Le gel a été ensuite déposé sur un papier filtre épais et séché 1 h dans l'appareil gel dryer de Bio-Rad. Le gel a été ensuite déposé dans une cassette avec écran au phosphore environ 3 jours. L'écran a été ensuite introduit dans un appareil Phosphor imager SI (Molecular Dynamics) et scanné afin de révéler l'image.

2.8 Immunobuvardage de type western

Cette technique a été utilisée afin de mettre en évidence les xylanases dans le surnageant de culture. La procédure de l'immunobuvardage de type western peut être divisée en cinq étapes : la préparation de l'échantillon de protéines, la séparation électrophorétique des protéines, le transfert des protéines du gel à une membrane, le blocage de sites d'attachement non-spécifiques et la détection des protéines transférées. Vingt µl de

surnageant d'une culture de 72 h auquel a été ajouté 10 µl de tampon de charge 3X (annexe A) ont été chauffés à ébullition pendant 5 min. Les échantillons ainsi que la XlnB1 (31 kDa) et la XlnB2 (23 kDa) purifiées et le marqueur (*Protein Molecular Weight Standards*) ont été déposés sur un gel de polyacrylamide-SDS constitué d'un gel de regroupement à 4% (annexe A) et d'un gel de séparation à 12% (annexe A). La migration s'est déroulée à 90 V pendant 10 min puis à 200 V pendant 45 à 60 min ou jusqu'à la fin de l'électrophorèse (contrôlée à l'aide du marqueur de taille) dans un tampon d'électrophorèse Tris-glycine 1X. Une fois la séparation des protéines effectuée sur le gel, celles-ci ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protran® Schleicher & Schuell, #21640) à l'aide de l'appareil NovaBlot-MultiphorII (Pharmacia). Pour ce faire, les éléments suivants qui ont préalablement été imbibés dans le tampon de transfert (39 mM de glycine, 48 mM de Tris, 0.0375% de SDS et 20% de méthanol) ont été empilés dans l'ordre sur la plaque correspondant à la cathode : 3 épaisseurs de papier Whatman no. 3, la membrane de nitrocellulose, le gel de séparation et trois autres épaisseurs de papier Whatman. Le tout a été recouvert de la plaque correspondant à la cathode. Le transfert s'est poursuivi pendant 1 h avec un ampérage constant de 32mA (0.8 mA/cm²). La dernière étape consistait à effectuer la détection chromogénique des anticorps marqués à la phosphatase alcaline sur la membrane. Toute la procédure ainsi que les solutions utilisées à cette fin étaient incluses dans la trousse BM Chromogenic Western Blotting (AP, Mouse/Rabbit) (Roche Molecular Biochemicals, #1647644). Les principales étapes ont été : le blocage de la membrane, la réaction aux anticorps primaires soit des anti-XlnB1 ou anti-XlnB2 de lapin, la réaction aux anticorps secondaires qui sont des anticorps anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline et l'incubation de la membrane avec le substrat chromogène 4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate (NBT/X-phosphate) qui permet de révéler l'activité de la phosphatase alcaline.

2.9 Quantification des ARNm des différents clones

2.9.1 Extraction de l'ARN total des clones

La méthode d'extraction a été tirée de Sambrook (1989). Afin de détruire les RNAses, toute la verrerie, les instruments de métal et les barreaux magnétiques ont été cuits à 180 °C. Tout le matériel de plastique était soit déjà certifié exempt de RNAses à l'achat, ou traité, en combinaison ou séparément, avec du SDS 1%, de l'éthanol, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 3%, du NaOH 0,1 M, ou de l'EDTA 1 mM et toujours rincé avec de l'eau traitée au diethylpyrocarbonate (DEPC). Toutes les solutions (sauf celles préparées avec du Tris) et l'eau ont été traitées avec du DEPC 0,1% et autoclavées afin de détruire le DEPC.

Une culture inoculée à partir des spores d'un clone a été préparée dans une flasque de 500 ml contenant 10 billes, 100 ml de M14 (annexe A) stérile, 5 ml de xylose 20%, 600 µl de MgSO₄•7H₂O 5%, 1 ml de CaCl₂•H₂O 3%, 100 µl de thiostrepton 5 mg/ml. La culture a été incubée à 240 rpm à 34 °C pour 48 h ou 72 h. À la fin de l'incubation, les 100 ml de culture ont été divisés dans 2 tubes de polypropylène de 50 ml et centrifugés 3 min à 5 krpm, le surnageant a été décanté et le culot de cellules repris jusqu'à 3 ml avec du M14 stérile. Environ 600 µl de la suspension ont été introduits dans 8 microtubes à bouchon vissé et centrifugés 3 min à 13 krpm. Une fois le surnageant décanté, ont été ajoutés 750 µl d'une solution dénaturante de guanidium isothiocyanate. Cette solution a été préparée à partir de guanidium isothiocyanate 4 M, 25 mM de citrate de sodium dihydrate, 0,5% de Sarkosyl, 0,1 M β-mercaptoéthanol et 250 mg de billes de verre de 0,1 mm. Les cellules ont été cassées avec le Fastprep (FP120, Thermo Savant Holbrook N.Y.) 3 fois 30 sec à vitesse 6.5. Les échantillons ont été centrifugés 3 min à 13 krpm et le surnageant de tous les tubes a été combiné dans un tube Falcon auquel a été ajouté 1 g de CsCl pour 2,5 ml d'échantillon. Ensuite 1,2 ml d'une solution de CsCl à 5,7 M dans 0,1 M EDTA pH 7,5 a été déposée dans un tube Pollyallomer de 5 ml; 2,5 ml de l'échantillon (surnageant plus CsCl) a été déposé délicatement avec une pipette de verre, à la surface de la solution de CsCl 5,7 M de manière à former un gradient. Le tube Pollyallomer a été disposé dans un

rotor SW50.1 et centrifugé à 35 krpm environ 15 h ou toute la nuit dans une Ultra Centrifugeuse (Beckman L5-75) à 20 °C. À la fin de la centrifugation, le surnageant a été aspiré et l'ARN s'est retrouvé dans le culot. Avec un scalpel, le fond du tube a été coupé de manière à former une petite soucoupe qui contient le petit culot transparent d'ARN. Le culot a été repris dans 200 µl d'une solution de Tris-HCl 10 mM pH 7,4, 5 mM EDTA et 1% SDS, 50 µl à la fois en aspirant refoulant le liquide avec une pipette pour dissoudre le culot. La solution d'ARN a été ensuite purifiée avec 200 µl d'un mélange de chloroforme : butanol-1 4:1. Après avoir mélangé au vortex, centrifugé 5 min à 13 krpm, le surnageant a été transféré dans un tube et la phase organique ré-extraite avec 200 µl de la solution de Tris-HCl. Les deux solutions aqueuses ont été combinées. Ensuite 0,1 vol de NaAc 3 M pH 5,2 et 2,2 vol d'EtOH 95% ont été ajoutés à la solution et les tubes ont été gardés à -20 °C pendant 3 h. Après une centrifugation de 30 min à 13 krpm, le surnageant a été retiré et le culot d'ARN a été repris dans 100 µl d'eau. La concentration de l'ARN ainsi que sa pureté ont été mesurées au spectrophotomètre à des absorbances de 260 et 280 nm. Une D.O. de 1 à 260 nm équivaut à 40 µg d'ARN/ml. Le ratio 260/280 détermine la pureté de l'ARN. Une préparation d'ARN libre de protéines possède un ratio de 1,90-2,05. Un ratio plus élevé que 2,1 indique une dégradation sévère.

2.9.2 Électrophorèse de l'ARN préalablement dénaturé au glyoxal

Afin de vérifier l'état de l'ARN extrait avec la méthode décrite précédemment, 10 µg d'ARN total de chaque clone ont été repris dans 2 µl d'eau et 10 µl d'une solution de glyoxal (le glyoxal a été traité préalablement en mélangeant 1 ml avec une pincée de résine Bio Rad AG 501-X8 suivi d'une incubation à T° pièce pendant 30 min. La préparation a été centrifugée et le glyoxal congelé à -20 °C) qui contient 6 ml de DMSO, 2 ml de glyoxal 6 M (soit 40%), 1,2 ml de BPTE 10X, 0,6 ml de glycérol 80% et 0,2 ml de EtBr 10 mg/ml. Le tube a été chauffé 1 h à 55 °C, déposé dans la glace 10 min, centrifugé et déposé à nouveau sur la glace. Pendant cette incubation, un gel d'agarose 1,5% a été préparé avec du tampon BPTE 1X. 100 ml de BPTE 10X pH 6,5 ont été préparés à partir de 3 g de PIPES, 6 g de Bis-Tris, 2 ml de EDTA pH 8 0,5 M. Ont été

ajoutés aux échantillons d'ARN 2 µl de tampon de charge préparé comme suit : 500 µl glycérol 100%, 400 µl d'eau, 100 µl de BPTE 1X, 1 pincée de bleu de bromophénol et 1 pincée de xylène cyanol FF. Après une migration à 45 volt pendant environ 4 h ou jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit au $\frac{3}{4}$, le gel a été démoulé, rincé à l'eau et déposé dans un appareil de lecture de gel (GelDoc 1000, BioRad)

2.9.3 Hybridation des ARNm

Ce protocole dérive de Sambrook *et al.*, 1989. Une membrane de nitrocellulose PROTRAN BA85 de 0,45 µm a été mouillée brièvement dans l'eau et trempée dans du SSC 20X (annexe A) pour 1 h à T° de la pièce. Deux feuilles de papier absorbant épais coupé à la taille de l'appareil Slot blot (BioRad) et préalablement mouillées avec du SSC 20X ont été placées sur le dessus de l'appareil à succion. La membrane de nitrocellulose également coupée à la taille de l'appareil a été disposée sur le dessus des feuilles de papier et l'autre partie de l'appareil contenant les puits placée sur la membrane. Les deux parties de l'appareil ont été ensuite vissées ensemble et le tout a été connecté à une pompe à vide (BioRad). Tous les puits ont été remplis avec du SSC 10X et une succion de 5 mm Hg a été appliquée jusqu'à ce que tout le liquide soit passé à travers la membrane de nitrocellulose. Le vide a été cassé et tous les puits ont été à nouveau remplis avec du SSC 10X. L'ARN préalablement dissout dans 10 µl d'eau a été mélangé à 20 µl de formamide 100%, 7 µl de formaldéhyde 37% et 2 µl de SSC 20X (ou une concentration finale de formamide 50%, formaldéhyde 7% et SSC1X). Cette solution a été incubée pour 15 minutes à 68 °C et les échantillons refroidis sur la glace. Deux volumes de SSC 20X ont été ajoutés aux échantillons. Une succion de 5 mm Hg a été appliquée à l'appareil jusqu'à ce que tout le SSC 10X dans les puits soit passé à travers la membrane de nitrocellulose. Les échantillons d'ARN dénaturé de 1 µg, 2 µg et 4 µg ont été ensuite introduits dans les puits et une succion de 5 mm Hg a été appliquée. Après que tous les échantillons soient passés à travers le filtre, les puits ont été rincés deux fois avec 1 ml de SSC 10X. Après que le dernier rinçage a été effectué, la succion a été appliquée encore 5 min afin

d'assécher la membrane. La membrane a été ensuite retirée de l'appareil, séchée complètement à T° pièce et cuite 2 h à 80 °C dans un four à vide (Napco).

2.9.4 Préparation de sonde d'ADN plasmidique marquée au ^{32}P (Nick Translation)

La préparation des sondes d'ADN a été effectuée avec le matériel et selon les directives de la trousse Nick Translation de molecular biology de Boehringer Mannheim. Les plasmides qui ont servi de sonde, ont été dilués dans l'eau afin d'obtenir une concentration de 0,05 µg/µl d'ADN. Deux µl de cette dilution ont été ajoutés à 1 µl de dATP, 1 µl de dGTP et 1 µl de dTTP préparés dans un tampon Tris et ayant une concentration de 0,4 mmol/l, 2 µl de tampon 10X, 2 µl de dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] approx. 20 µCi, 3000 Ci/mmol en solution aqueuse, 2 µl de la solution d'enzyme (ADN polymérase I et Dnase I dans glycérol 50% (v/v)) et 7 µl d'eau pour un total de 20 µl. Après une incubation de 35 min à 15 °C la réaction a été arrêtée par l'addition de 2 µl d'EDTA 0,2 mol/l pH 8 et en chauffant à 65 °C pour 10 min. Ont été ajoutés 80 µl de TE pH 8 afin d'obtenir un volume final de 100 µl et de procéder à l'étape suivante soit l'enlèvement des déoxyribonucléoside triphosphate non incorporés par chromatographie sur une colonne Sephadex G-50 (Spun column procedure).

Une petite quantité de laine de verre préalablement traitée avec du silicone (dichlorodimethylsilane) a été déposée au fond d'une seringue jetable de 1 ml. Une certaine quantité de Sephadex G-50 équilibré dans le TE pH 8 a été déposée dans la seringue. La seringue a été ensuite placée dans un tube Falcon de 10 ml et le tout a été centrifugé pendant 4 min à 3000 rpm dans une centrifugeuse (International IEC HN-SII). L'addition de Sephadex suivi d'une centrifugation de 4 min ont été effectués jusqu'à ce que le volume de la colonne soit de 0,9 ml. La colonne a été rincée 2 fois avec 0,1 ml de tampon TE en centrifugeant exactement 4 min à 1600 g à chaque fois. Le tube Falcon a été vidé et un microtube a été placé sous la seringue pour récolter l'échantillon. Le mélange contenant la sonde d'ADN marquée a été appliqué sur la colonne et celle-ci a été centrifugée à nouveau avec la même force et pendant le même temps que précédemment.

Cent µl de tampon TE a été à nouveau passé dans la colonne. Les dNTP [³²P] non incorporés sont restés dans la seringue tandis que l'effluent contenant la sonde marquée s'est retrouvé dans le microtube. Le volume final soit 0,2 ml a été bouilli 10 min afin de dénaturer la sonde puis refroidi brusquement sur la glace. La sonde était alors prête pour l'hybridation de l'ARN fixé sur la membrane.

2.9.5 Hybridation des membranes avec la sonde radioactive

Premièrement la membrane (section 2.9.3) a été mouillée dans 100 ml du tampon d'hybridation suivant : SSC 3X, phosphate de sodium (Na₂HPO₄) 50 mM, SDS 0,1%, Denhardt 5X, ADN de sperme de saumon 0,01 mg/ml. La membrane a été ensuite enroulée sur elle même et introduite dans un tube de verre à bouchon vissé. Vingt ml de tampon d'hybridation ont été introduits dans le tube et celui-ci a été placé dans un four à hybridation rotatif (Problot hybridization Oven, Labnet) pendant 1 h (période de pré-hybridation) à 68 °C. À la fin de cette incubation, la sonde dénaturée (section 2.9.4) (0,2 ml) a été introduite dans le tube et l'hybridation s'est poursuivie toute la nuit. Le lendemain la solution d'hybridation a été retirée du tube et la membrane (toujours à l'intérieur du tube) a été lavée 2 fois avec 5 ml d'eau. S'ensuivent deux lavages de 30 min (toujours avec la rotation et à 68 °C) avec 20 ml de tampon SSC 0,1X plus 0,1% SDS. La membrane a été retirée du tube et mise à sécher à T° pièce et déposée dans une cassette au phosphore 3 à 4 jours. La cassette a été lue au Phosphor imager SI (Molecular Dynamics) et scannée afin de révéler l'image.

2.10 Construction des plasmides utilisés au cours de l'étude

Les séquences codant pour la XlnB1 et la XlnB2 sans leur séquence signal ont été amplifiées en utilisant comme matrice, le plasmide pIAF42 qui contient le gène *xlnB*. Afin de permettre le clonage des fragments amplifiés, les sites de restriction *KpnI* et *SacI* ont été introduits en portion 5' et 3' respectivement lors de l'amplification avec les amorces XlnB1 sens et XlnB2 anti-sens pour amplifier la XlnB1 et les amorces XlnB1

sens et CD-301 anti-sens pour amplifier la *XlnB2* (Tableau 7). Les fragments purifiés de 885 et 577 pb contenant respectivement la séquence codante de la *XlnB1* et de la *XlnB2* ont été digérés par *KpnI-SacI* et ont été clonés aux mêmes sites dans pIAF815 et pIAF816 générant les plasmides pIAF815B1 et pIAF815B2 qui contiennent la séquence signal Sec de *xlnB1* et pIAF816B1 et pIAF816B2 qui contiennent la séquence signal Tat de *xlnC*. La séquence attendue des clones a été confirmée par la méthode de la dideoxy chain-termination (Sanger *et al.*, 1977). La digestion de ces plasmides par *HindIII-SacI* a généré des fragments qui ont été clonés aux mêmes sites de restriction dans pIAF906 après lui avoir retiré le fragment *HindIII-SacI* correspondant à la séquence *xlnA*. pIAF915B1, pIAF915B2, pIAF916B1 et pIAF916B2 ont été ainsi générés. La transcription de *xlnB1* et *xlnB2* dans ces constructions est sous le contrôle du promoteur de la *xlnA*. Ces plasmides ont été utilisés afin de transformer des protoplastes de *S. lividans* 10-164.

Afin de générer une construction contenant deux sites d'initiation de la traduction impliquant un peptide signal Sec, le plasmide pIAF811-A.8 a été utilisé. Il contient la séquence signal de *CelA* plus 57 nt nucléotides en amont. Ce plasmide a été digéré par *KpnI-SacI* afin d'éliminer la séquence codante de la *XlnA* pour la remplacer par le fragment *KpnI-SacI* codant pour la *XlnB1*. Le plasmide obtenu soit pIAF811-A.8-SB1 a été digéré par *HindIII-SacI* et le fragment résultant a été cloné dans pIAF907 aux mêmes sites générant ainsi le plasmide pIAF907-SB1.

Afin de générer une construction contenant deux sites d'initiation de la traduction impliquant un peptide signal Tat, les 57 nt en amont de la séquence signal de la *CelA* ont été clonés en avant de la séquence signal de la *XlnC*. Cette séquence signal a été préalablement raccourcie de 30 nt dans le plasmide pIAF916C-40 (Faury *et al.*, 2004). Cette séquence signal raccourcie a été utilisée pour réduire la taille du précurseur et permettre ainsi une meilleure maturation de celui-ci. Afin de réaliser cette construction, nous avons procédé à un PCR emboîté i.e. que les fragments générés par deux amplifications séparées ont été mélangés et servent de matrice à une troisième amplification. Une première amplification a été réalisée en utilisant l'amorce sens PTZ-*AfIII* (Tableau 7) localisée dans pTZ19 près du site de restriction *AfIII* pour la portion 5'

et l'amorce PscelA/xlnC 2 anti-sens (Tableau 7) pour la portion 3'. Cette dernière contient les 19 nt de la portion 3' de la séquence des 57 nt de *celA* et 21 nt de la portion 5' de la séquence signal tronquée du gène *xlnC*. Le plasmide pIAF811-A.8 a été utilisé comme matrice et un fragment amplifié de 448 pb a été obtenu. Une autre amplification a été réalisée en utilisant pour la portion 5' l'amorce sens PscelA/xlnC 1 (complémentaire à PscelA/xlnC 2) et l'amorce anti-sens CD-301 (Tableau 7) correspondant à la portion 3' de la *xlnB2*. Le plasmide pIAF816B2 a été utilisé comme matrice et un fragment amplifié de 700 pb a été obtenu. Les deux fragments de 448 et 700 pb respectivement ont été mélangés et amplifiés en utilisant les amorces PTZ-AflIII et CD-301. Le fragment amplifié obtenu de 1148 pb a été digéré par *HindIII/SacI* et le fragment résultant de 750 pb inséré aux mêmes sites dans pIAF907 générant ainsi le plasmide pIAF907-TB2.

Pour la construction du vecteur de sécrétion Sec/Tat, le plasmide pIAF907-SB1 a été digéré avec *SacI* et une copie de *xlnB2* fusionnée à la séquence signal *xlnC* possédant un double site d'initiation de la traduction a été cloné au même site. Ce fragment a été obtenu par PCR avec pIAF907-TB2 comme matrice en utilisant les amorces GAU1 sens et CD-301 anti-sens (Tableau 7) qui correspond à la portion 3' de la *xlnB2*. Ces deux amorces contiennent le site *SacI*. Le fragment amplifié obtenu a été digéré avec *SacI* et inséré dans pIAF907-SB1 au même site. Dans le plasmide résultant pIAF907-SB1TB2, les deux gènes sont arrangés en opéron bicistronique sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*.

Afin que le gène *xlnB2* soit directement sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*, une construction similaire à la précédente a été réalisée. Cependant, le fragment amplifié débute dans la portion 5' avec le promoteur du gène de la *xlnA* localisé à 91 nt du premier codon d'initiation de la traduction. Un fragment de 871 pb a donc été amplifié avec l'amorce GAU2 sens et CD-301 anti-sens (Tableau 7) qui possèdent toutes les deux le site *SacI* avec pIAF907-TB2 comme matrice. Le fragment digéré par *SacI* a été inséré au même site dans pIAF907-SB1. La construction obtenue est pIAF907-SB1pATB2 dans laquelle les gènes *xlnB1* et *xlnB2* sont tous les deux sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*.

Afin de vérifier si la présence de deux gènes *xlnB2* précédés respectivement de la double initiation Tat sur un même plasmide provoquerait une augmentation de la sécrétion de XlnB2, un fragment de 871 pb a été amplifié avec l'amorce GAU2 sens et CD-301 anti-sens (Tableau 7) qui possèdent toutes les deux le site *SacI* avec pIAF907-TB2 comme matrice. Le fragment digéré *SacI* a été inséré au même site dans pIAF907-TB2. La construction obtenue est pIAF907-TB2pATB2 dans laquelle les deux copies du gène *xlnB2* sont toutes les deux sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*. La figure 10 et la figure 11 illustrent les constructions décrites précédemment. Les tableau 8, tableau 9 et tableau 10, détaillent toutes les constructions utilisées au cours de l'étude.

Amorce		Séquence
GAU1	S	5'-GGCCGAGCTCAGCTTGGAGGCACAGTC-3'
GAU2	S	5'-GGCCGAGCTCTTGACCGAGCATCGTCAA-3'
CD-301	AS	5'-CCCGAGCTCTCACCCGCCGACGTTGATGCT-3'
XlnB2	AS	5'-CCGAGCTCTCAGCCCGCGCTGCA-3'
XlnB1	S	5'-CCGGTACCGACACGGTCGTCACGA-3'
PTZ-AfIII	S	5'-TGCTCACATGTTCTTTCCTGCGT-3'
PSceIA/xlnC 1	S	5'-TCGCACGAGGAGGAACGCTATGAAGCAGAGTCCCGCCCT-3'57 ntcIA..... /ssxInC (-30 nt).....
PSceIA/xlnC 2	AS	5'-AGGGCGGGACTCTGCTTCA TAGCGTTCCCTCCTCGTGCGA-3' ssxInC (-30 nt)..... /57 ntcIA.....

Tableau 7. Amorces utilisées dans cette étude.

GAGCTC : *SacI*, GGTACC : *KpnI*, AGCTT : *HindIII*, S : sens, AS : anti-sens, ss : séquence signal

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pIJ702	Vecteur contenant les marqueurs <i>tsr</i> et <i>mel</i> ainsi qu'un site de clonage multiple.	Hopwood <i>et al.</i> , (1985)
pIAF42	Dérivé de pIJ702 contenant <i>xlnB1</i> de <i>S. lividans</i> 1326.	Kluepfel <i>et al.</i> , (1990)
pIAF906	Dérivé de pIJ702 contenant le gène <i>xlnA</i> de <i>S. lividans</i> comme un fragment de 2kb <i>SphI-SacI</i> où les sites de restriction <i>HindIII</i> et <i>KpnI</i> ont été ajoutés de chaque coté de la séquence signal.	Pagé <i>et al.</i> , (1996b)
pIAF907	Dérivé de pIAF906 dans lequel les sites <i>KpnI</i> , <i>PstI</i> , <i>SphI</i> et <i>BglII</i> ont été retirés ainsi que la séquence codante <i>xlnA</i> éliminée au profit d'une cassette de clonage contenant les sites <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i> , <i>SacI</i> .	Tremblay <i>et al.</i> , (2002)
pIAF911A.8	Dérivé de pIAF906 dans lequel la séquence signal de <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence signal de <i>celA</i> plus 57 nt en amont. Ces nt supplémentaires contiennent une séquence complémentaire à l'ARNr16S et deux codons d'initiation.	Kébir <i>et al.</i> , (2000)
pIAF907-SB1	Dérivé de pIAF911A.8 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence codante de <i>xlnB1</i> .	Ce travail
pIAF907-TB2	Dérivé de pIAF916-40 dans lequel la séquence codante de <i>xlnC</i> a été remplacée par celle de la <i>xlnB2</i> et les 57 nt en amont de la séquence signal de <i>celA</i> ajoutés en amont de la séquence signal tronquée de <i>xlnC</i> .	Ce travail
pIAF907-SB1TB2	Dérivé de pIAF907-SB1 dans lequel un fragment contenant la séquence signal et la <i>xlnB2</i> présentes dans pIAF907-TB2 on été insérées en aval de <i>xlnB1</i> .	Ce travail

Tableau 8. Plasmides de *S. lividans* utilisés dans cette étude.

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pIAF907-SB1pATB2	Dérivé de pIAF907-SB1 dans lequel le fragment contenant le promoteur de <i>xlnA</i> , la séquence signal et la <i>xlnB2</i> présentes dans pIAF907-TB2 ont été insérées en aval de <i>xlnB1</i> .	Ce travail
pIAF907-TB2pATB2	Dérivé de pIAF907-TB2 dans lequel le fragment contenant le promoteur de <i>xlnA</i> , la séquence signal et la <i>xlnB2</i> présentes dans pIAF907-TB2 ont été insérées en aval de <i>xlnB2</i> .	Ce travail
pIAF915	Dérivé de pIAF906 contenant la séquence signal de <i>xlnB1</i> .	Pagé <i>et al.</i> , (1996b)
pIAF915B1	Dérivé de pIAF906 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par celle de <i>xlnB1</i> .	Ce travail
pIAF915B2	Dérivé de pIAF906 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par celle de <i>xlnB2</i> .	Ce travail
pIAF916	Dérivé de pIAF906 contenant la séquence signal de <i>xlnC</i> .	Pagé <i>et al.</i> , (1996b)
pIAF916B1	Dérivé de pIAF916 dans lequel la séquence codante <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence codante <i>xlnB1</i> .	Ce travail
pIAF916B2	Dérivé de pIAF916 dans lequel la séquence codante <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence codante <i>xlnB2</i> .	Ce travail
pIAF916C	Dérivé de pIAF906 contenant la séquence signal de <i>xlnC</i> et la séquence codante de <i>xlnC</i> .	Faury <i>et al.</i> , (2004)
pIAF916C-40	Dérivé de pIAF916 dont la séquence signal de <i>xlnC</i> a été déletée de 30 nt à partir de la portion 5'.	Faury <i>et al.</i> , (2004)

Tableau 9. Plasmides de *S. lividans* utilisés dans cette étude (suite).

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pTZ19U	Phagemide qui porte le gène <i>bla</i> et une partie de <i>lacZ</i> .	Pharmacia
pLAF807	Dérivé de pTZ19 contenant le gène de la <i>xlnA</i> sans promoteur avec les sites de restriction <i>HindIII</i> et <i>KpnI</i> de chaque côté de la séquence signal.	Pagé <i>et al.</i> , (1996b)
pLAF811-A.8	Dérivé de pLAF807 dans lequel la séquence signal de <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence signal de <i>celA</i> plus 57 nt en amont. Ces nt supplémentaires contiennent une séquence complémentaire à l'ARNr16S et deux codons d'initiation.	Kébir <i>et al.</i> , (2000)
pLAF815	Dérivé de pLAF807 dans lequel la séquence signal de <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence signal de la <i>xlnB1</i> .	Pagé <i>et al.</i> , (1996b)
pLAF815B1	Dérivé de pLAF815 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence codante de <i>xlnB1</i> .	Ce travail
pLAF815B2	Dérivé de pLAF815 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par la séquence codante de <i>xlnB2</i> .	Ce travail
pLAF816	Dérivé de pLAF807 dans lequel la séquence signal de <i>xlnA</i> a été remplacée par celle de <i>xlnC</i> .	Pagé <i>et al.</i> , (1996b)
pLAF816B1	Dérivé de 816 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par celle de <i>xlnB1</i> .	Ce travail
pLAF816B2	Dérivé de 816 dans lequel la séquence codante de <i>xlnA</i> a été remplacée par celle de <i>xlnB2</i> .	Ce travail

Tableau 10. Plasmides de *E. coli* utilisés dans cette étude.

pIAF906
 -- KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnA KpnI xlnA SacI --

pIAF907
 -- PxlA HindIII EcoRI XbaI SacI --

pIAF907-SB1
 -- PxlA HindIII SD ATG ■ 57nt SD ATG ss celA KpnI xlnB1 SacI --

pIAF907-TB2
 -- PxlA HindIII SD ATG ■ 57nt SD ATG ss xlnC-40 KpnI xlnB2 SacI --

pIAF907-SB1TB2
 -- PxlA HindIII SD ATG ■ 57nt SD ATG ss celA KpnI xlnB1 SacI SD ATG ■ 57nt SD ATG ss xlnC-40 KpnI xlnB2 SacI --

pIAF907-SB1pATB2
 -- PxlA HindIII SD ATG ■ 57nt SD ATG ss celA KpnI xlnB1 SacI PxlA SD ATG ■ 57nt SD ATG ss xlnC-40 KpnI xlnB2 SacI --

pIAF911A.8
 -- PxlA HindIII SD ATG ■ 57nt SD ATG ss celA KpnI xlnA --

Figure 10. Plasmides de *S. lividans* utilisés au cours de l'étude.
 ss : séquence signal

pIAF915

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnB KpnI xlnA SacI* --

pIAF915B1

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnB KpnI xlnB1 SacI* --

pIAF915B2

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnB KpnI xlnB2 SacI* --

pIAF916

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnC KpnI xlnA SacI* --

pIAF916B1

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnC KpnI xlnB1 SacI* --

pIAF916B2

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnC KpnI xlnB2 SacI* --

pIAF916C

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnC KpnI xlnC SacI* --

pIAF916C-40

-- *KpnI PstI SphI BglII PxlA HindIII ss xlnC-40 KpnI xlnC SacI* --

Figure 11. Plasmides de *S. lividans* utilisés au cours de l'étude (suite).

ss : séquence signal

3. RÉSULTATS

3.1 Sécrétion de la XlnB1 et de la XlnB2 par le système Sec

Dans nos expériences, *S. lividans* 10-164 un mutant xylanase et cellulase négatif, a été utilisé comme hôte pour les plasmides recombinants, afin de s'assurer que l'activité xylanase mesurée dans le surnageant de culture des transformants provenait des différentes constructions seulement (Hurtibise *et al.*, 1995). La XlnB1 qui contient à la fois le domaine catalytique et le domaine d'attachement au xylan et la XlnB2 qui possède le domaine catalytique seulement, ont la même activité sur le xylan (résultats non publiés). Puisque l'objectif principal de ce travail était d'augmenter la sécrétion de la xylanase, il était nécessaire de démontrer quelle forme de l'enzyme était la plus efficacement sécrétée via le système Sec chez *S. lividans*. À cette fin, *xlnB1* et *xlnB2* ont été insérés respectivement en aval de la séquence signal de *xlnB* dans le plasmide multicopie pIAF915 en remplacement de *xlnA*. Dans ces constructions, *xlnB1* et *xlnB2* sont sous le contrôle du promoteur de *xlnA* choisi à cause de sa capacité à exprimer les gènes de xylanase et nous permettant de comparer les résultats de ce travail aux études précédentes (Pagé *et al.*, 1996a). L'activité xylanase dans le surnageant de IAF915B1 était de 90 UI/ml comparativement à 76 UI/ml pour IAF915B2. L'activité de IAF915B1 était donc de 20 à 30% plus élevée que celle de IAF915B2 (Tableau 11).

3.2 Sécrétion de la XlnB1 et de la XlnB2 par le système Tat

Puisque la XlnB2 qui représente le site catalytique de la XlnB1, démontre 80% d'identité avec la XlnC une xylanase sécrétée sous forme active exclusivement via le système Tat (Faury *et al.*, 2004), nous nous sommes demandés si XlnB1 et XlnB2 pouvaient être sécrétées via Tat à l'instar de la XlnC à cause de cette homologie. *xlnB1* et *xlnB2* ont été insérés respectivement en aval de la séquence signal de *xlnC* qui est Tat dépendante, dans le plasmide multicopies pIAF916 en remplacement de *xlnA*. Dans ces constructions, *xlnB1* et *xlnB2* étaient également sous le contrôle du promoteur de *xlnA*. L'activité enzymatique dans le surnageant de IAF916B2 était 40% plus élevée que celle de IAF916B1 soit 52 UI/ml comparativement à 32 UI/ml (Tableau 11). On a donc constaté

que la XlnB1 était trois fois moins bien sécrétée par le système Tat que par le système Sec, soit 32 et 90 UI/ml respectivement (Tableau 11).

À la lumière des résultats précédents, et ayant comme objectif la maximisation de la sécrétion de la XlnB, nous avons choisi de faire sécréter la XlnB1 par le système Sec et la XlnB2 par le système Tat en utilisant des séquences signal efficaces.

Transformants	Type de séquence signal	Séquence signal	Gène de la protéine mature	Activité xylanase à 144h (UI/ml)
IAF915B1	Sec	<i>xlnB1</i>	<i>xlnB1</i>	90±6
IAF915B2	Sec	<i>xlnB1</i>	<i>xlnB2</i>	76±5
IAF916B1	Tat	<i>xlnC</i>	<i>xlnB1</i>	32±4
IAF916B2	Tat	<i>xlnC</i>	<i>xlnB2</i>	52±5

Tableau 11. Activité xylanase dans les surnageants de culture de *S. lividans* 10-164 transformée avec les plasmides pIAF915B1, pIAF915B2, pIAF916B1 et pIAF916B2.

L'activité a été mesurée dans le surnageant de culture, après 144 h d'incubation. Les chiffres représentent la moyenne d'activité de 3 cultures indépendantes. La croissance est similaire pour tous les clones.

3.3 Surproduction de la XlnB1 par le système Sec

Pagé et al, (1996a) ont démontré que la présence au niveau de la séquence signal de deux sites d'attachement aux ribosomes et de deux codons d'initiation de la traduction augmentaient la production de XlnA. Ces changements introduits dans la séquence signal, résultent en la synthèse de deux précurseurs de différente longueur. Puisque le site de clivage par la signal peptidase est le même pour les deux précurseurs, la XlnA produite origine de la maturation de ces deux précurseurs. La séquence signal de la cellulase A (CelA) de *S. lividans* précédée de 57 nt supplémentaires en amont a été utilisée. La courte et la longue séquence signal codent pour des peptides signaux de 27 et 46 a.a. respectivement. De plus, une séquence de 8 nt complémentaire à l'ARNr16S a été introduite dans la séquence de 57 nt. Cet ajout a permis d'augmenter la traduction. Toutes ces modifications ont permis de multiplier par 10 la production de XlnA comparativement au gène *xlnA* original (Kébir *et al.*, 2000). Cette construction a été utilisée pour exprimer *xlnB1* (Figure 12a) puisque XlnB1 a été davantage produite par le système Sec que la XlnB2. Le clone IAF907-SB1 a produit 2,5 fois plus d'enzymes que la souche IAF915B1 soit 256 UI/ml (Figure 13a) comparativement à 90 UI/ml (Tableau 11).

3.4 Surproduction de la XlnB2 par le système Tat

Afin d'augmenter la production de XlnB2 par le biais du système Tat, la séquence signal de la XlnC codant pour 49 a.a. a été déléetée de 30 nt, afin de réduire la taille du peptide signal Tat dépendant et ainsi favoriser la maturation du précurseur via le système Tat. Il a été observé qu'une délétion de 10 a.a. du domaine n du peptide signal de la XlnC n'affecte pas la sécrétion de XlnC (Fauray *et al.*, 2004). Cette séquence signal tronquée a donc été fusionnée aux 57 nt qui se trouvent en amont de la séquence signal de CelA (Figure 12b). Les peptides signaux résultants possèdent 39 a.a. et 58 a.a. respectivement. Le clone IAF907-TB2 a généré 173 UI/ml (Figure 13a) d'activité enzymatique comparativement à 76 UI/ml pour la souche sauvage IAF915B2 (Tableau 11) soit 2,5 fois plus d'activité.

3.5 Production des XlnB1 et XlnB2 simultanément par une souche possédant un plasmide portant à la fois les séquences signal Sec et Tat

Il a été démontré précédemment que la production des XlnB1 et XlnB2 pouvait être accrue par l'utilisation de séquences signal Sec et Tat appropriées. Afin de déterminer s'il était possible d'augmenter encore plus la sécrétion de ces enzymes, les constructions Sec et Tat ont été insérées dans le même plasmide. A cette fin, le plasmide pIAF907SB1 contenant la séquence signal Sec a été digéré avec l'enzyme de restriction *SacI* et une copie de la séquence signal Tat fusionnée au gène *xlnB2* a été insérée au même site (Figure 12c). Vingt-quatre nt seulement séparent le codon stop de *xlnB1* du premier codon d'initiation de la traduction de *xlnB2*. De plus, cette région contient un site d'attachement aux ribosomes. Après transformation, la souche IAF907-SB1TB2 a produit 350 UI/ml de xylanase comparativement à 250 UI/ml pour IAF907-SB1 et 173 UI/ml pour IAF907-TB2 (Figure 13a).

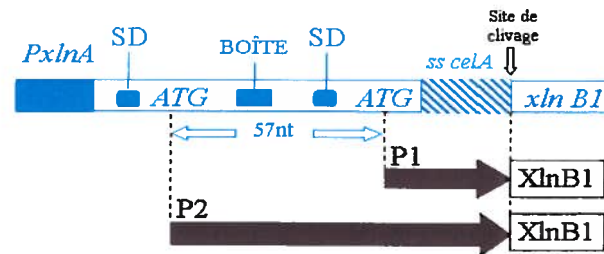
Puisque ce résultat ne représente pas exactement la somme des productions des deux systèmes de sécrétion pris individuellement, cette somme devant être aux environs de 430 UI/ml, un second promoteur du gène *xlnA* a été introduit en amont de la *xlnB2*. Pour ce faire, le plasmide pIAF907-SB1 a été digéré *SacI* et une copie de *xlnB2* fusionnée au promoteur du gène *xlnA* y a été introduite. La souche recombinante résultante soit IAF907-SB1pATB2 a produit 360 UI/ml indépendamment de l'orientation des deux promoteurs (Figure 14a).

3.6 Limites de sécrétion du système Tat

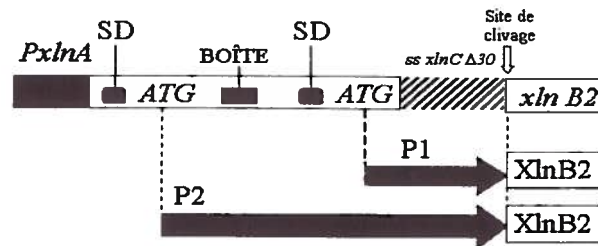
Nous constatons donc que l'activité xylanasiq ue augmente quand les deux systèmes de sécrétion sont utilisés simultanément. Afin d'évaluer la limite de sécrétion des systèmes individuellement, deux copies du gène *xlnB2* précédé de sa séquence signal Tat ont été insérées sur le même plasmide. Pour ce faire, le plasmide pIAF907-TB2 a été digéré avec l'enzyme de restriction *SacI* et une copie de la séquence signal Tat fusionnée au gène *xlnB2* et précédée du promoteur du gène *xlnA* a été insérée au même site. La souche

résultante IAF907-TB2pATB2 produit à 120 h, 250 UI/ml d'enzyme par rapport à 173 UI/ml pour IAF907-TB2 ce qui représente environ 45% de plus de XlnB2 (Figure 15a), mais moins que IAF907-SB1TB2.

a) IAF907-SB1



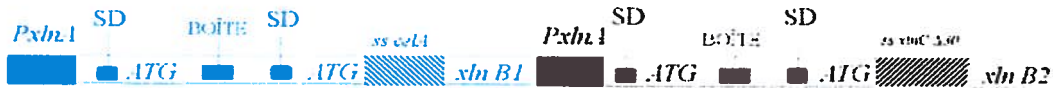
b) IAF907-TB2



c) IAF907-SB1TB2



d) IAF907-SB1pATB2



e) IAF907-TB2pATB2



Figure 12. Constructions Sec, Tat, Sec et Tat en tandem avec un ou deux promoteurs *xlnA*.

a) Construction double initiation Sec. *PxlnA*, promoteur *xlnA*; SD, séquence Shine-Dalgarno; BOÎTE, courte séquence complémentaire à l'ARNr16S; rectangle hachuré, séquence signal *cellulase A*; flèches pleines, P1 et P2 sont les précurseurs synthétisés à partir de deux codons d'initiation de la traduction différents (ATG). b) Construction double initiation Tat. Rectangle hachuré, séquence signal *xlnC* raccourcie de 30 nt; c) construction Sec et Tat en tandem. d) construction Sec et Tat en tandem avec deux promoteurs *xlnA*. e) construction Tat et Tat en tandem avec deux promoteurs *xlnA*.

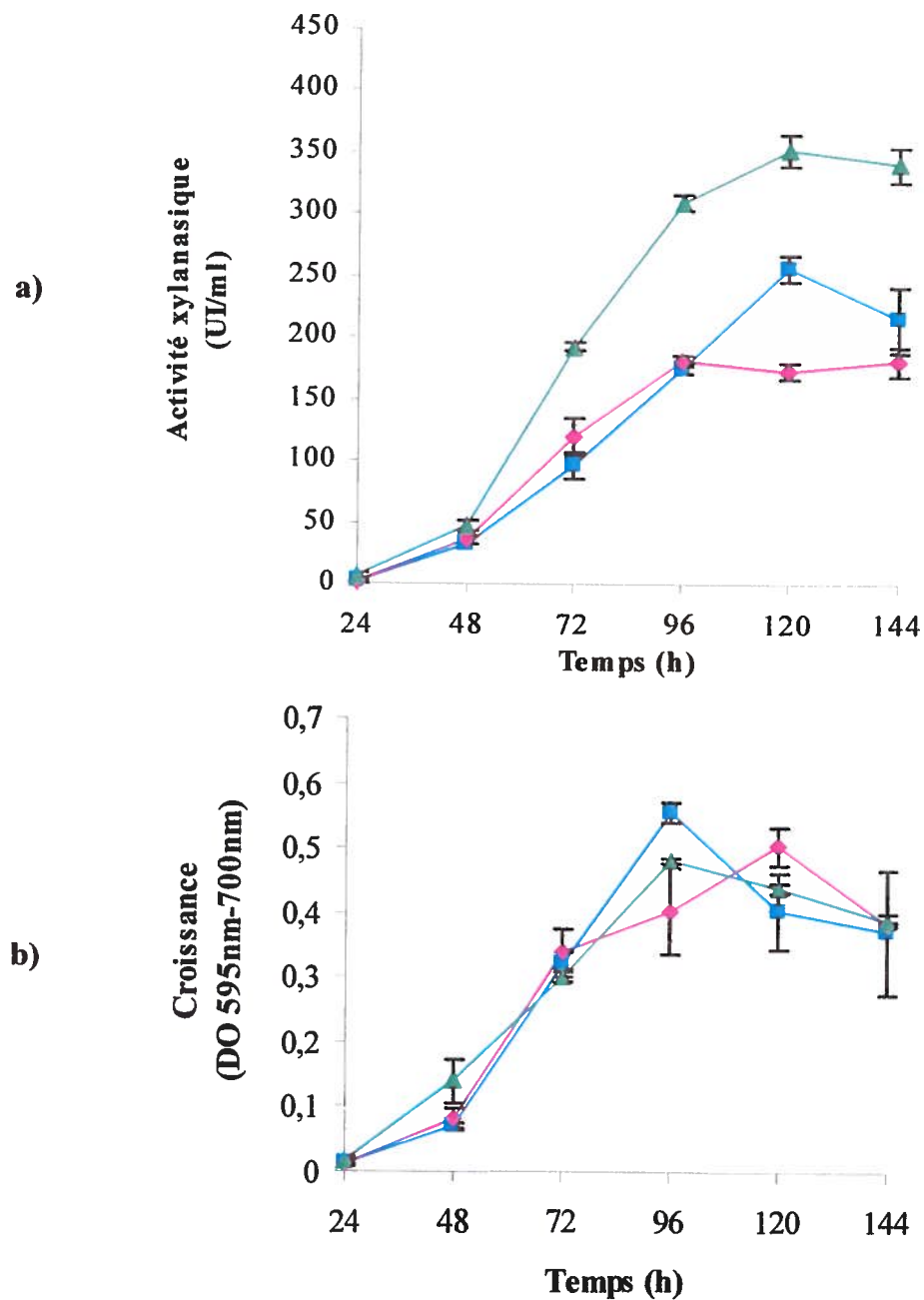


Figure 13. Activité xylanasique et croissance du mycélium des transformants IAF907-SB1, IAF907-TB2 et IAF907-SB1TB2.

IAF907-SB1 (Sec dépendant) (—■—), IAF907-TB2 (Tat dépendant) (—◆—) et IAF907-SB1TB2 (opéron Sec et Tat dépendant) (—▲—). a) activité xylanasique exprimée en UI/ml, b) croissance du mycélium.

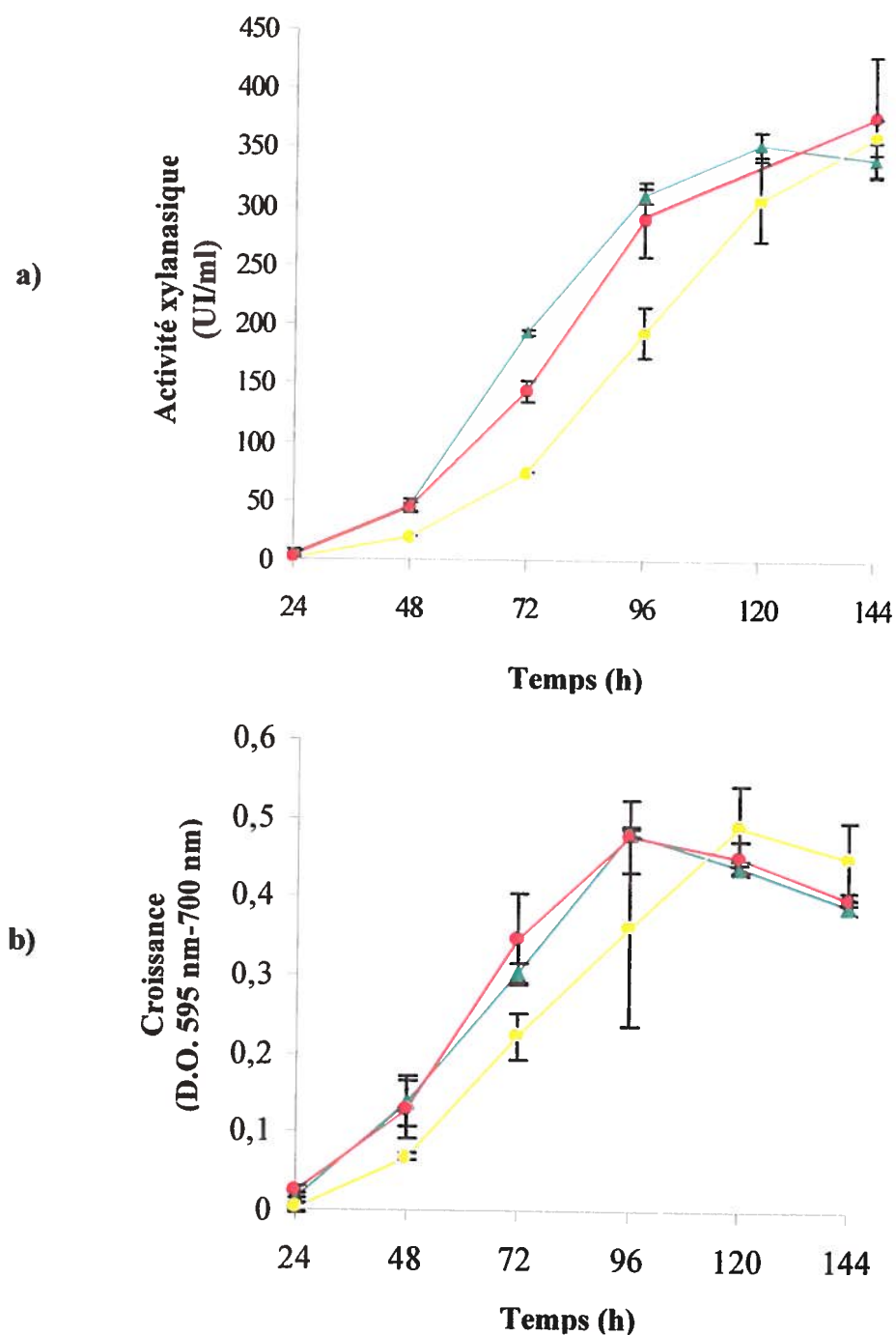


Figure 14. Activité xylanasique et croissance du mycélium des transformants bicistroniques et Sec et Tat dépendants.

IAF907-SB1pATB2 orientation correcte (—●—), IAF907-SB1pATB2 orientation inverse (—●—) et IAF907-SB1TB2 (—▲—). a) activité xylanasique exprimée en UI/ml b) croissance du mycélium.

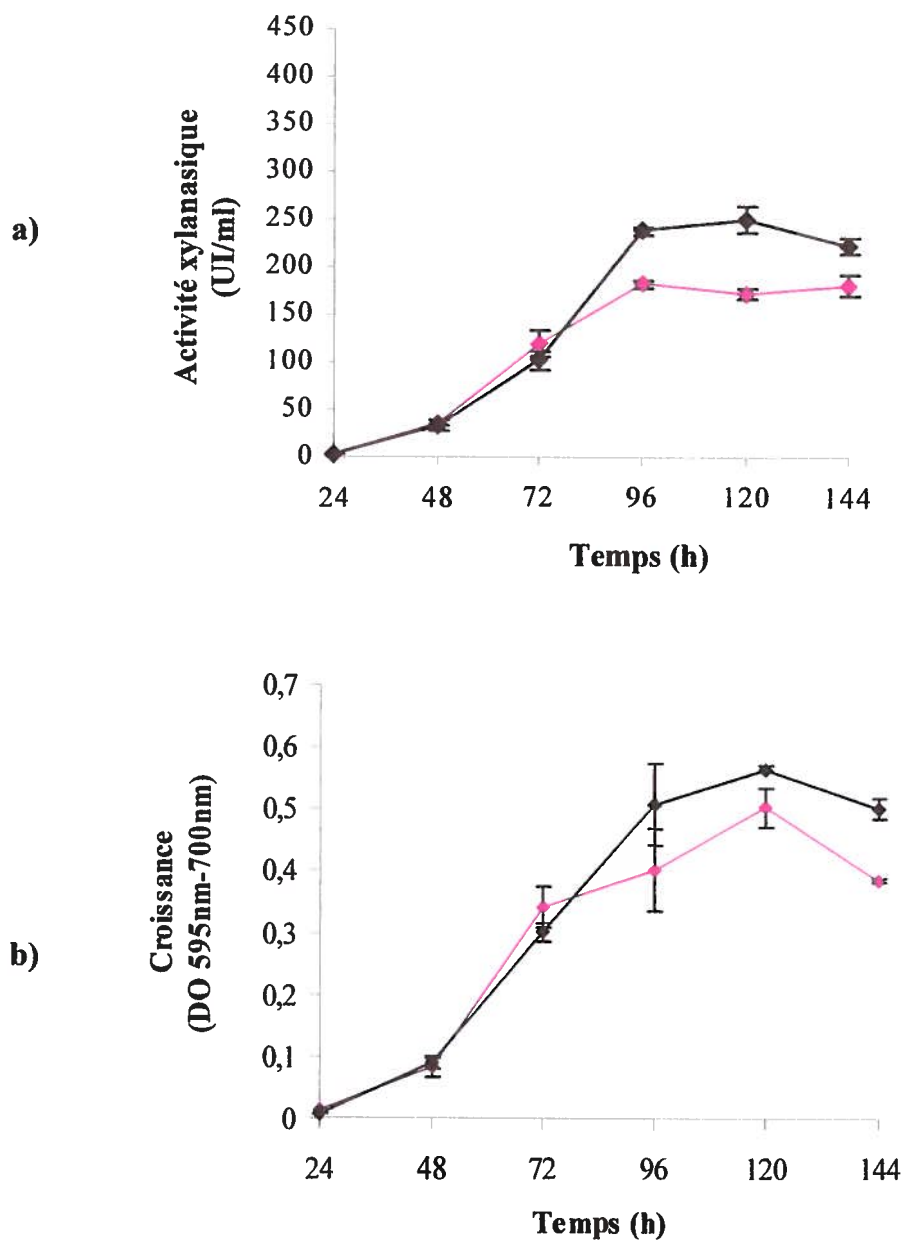


Figure 15. Activité xylanasique et croissance du mycélium des transformants IAF907-TB2pATB2 et IAF907-TB2.

IAF907-TB2pATB2 (bicistronique et Tat dépendant) (—◆—) et IAF907-TB2 (Tat dépendant) (—◆—) a) activité xylanasique exprimée en UI/ml b) croissance du mycélium

3.7 Importance de la sécrétion Tat

Afin d'analyser la contribution du système Tat à la production de xylanase lorsque les systèmes Sec et Tat sont utilisés simultanément, les plasmides recombinants à l'étude ont été utilisés pour transformer les protoplastes du mutant *S. lividans* 10-164 $\Delta tatC$. La mutation $\Delta tatC$ affecte un des principaux composants du système de sécrétion Tat et abolit la sécrétion de la XlnC exclusivement Tat dépendante (Faury *et al.*, 2004). Il a été démontré que dans ce mutant, la sécrétion de XlnC était compromise, celle-ci étant sécrétée exclusivement via le système de sécrétion Tat (Faury *et al.*, 2004). Il est important de noter que dans la phase stationnaire, le mutant $\Delta tatC$ et *S. lividans* 10-164 ont une densité optique moyenne (D.O. 595 nm-700 nm) de 0.35 et 0.5 respectivement selon leur contenu en ADN. Ceci indique que la croissance des souches n'est pas comparable et que la mutation $\Delta tatC$ réduit la croissance de la souche de 30% en milieu minimal. Dès lors, les résultats doivent être analysés de façon qualitative puisqu'une stricte comparaison quantitative est impossible. Dans ce mutant $\Delta tatC$, tous les clones possédant la séquence signal *xlnC* ont démontré une baisse de la production de xylanase correspondant à la contribution du système Tat. (Figure 16a). Le système Sec peut être légèrement affecté dans le mutant $\Delta tatC$ puisque le rendement en xylanase de IAF907-SB1 qui contient une séquence signal de type Sec est de 250 UI/ml comparativement à 207 UI/ml pour IAF907-SB1 $\Delta tatC$ soit une différence de sécrétion de 20% qui pourrait être attribuable à la croissance différente des souches. Cependant IAF907-TB2 $\Delta tatC$ produit seulement 18 UI/ml de xylanase comparativement à 173 UI/ml pour IAF907-TB2 soit une réduction de 90% de la production de xylanase. Le même phénomène se produit lorsque nous introduisons pIAF916B2 dans le mutant $\Delta tatC$. Rappelons ici que ce plasmide porte une copie du gène *xlnB2* précédé de la séquence signal du gène *xlnC*. Alors que IAF916B2 produit 52 UI/ml d'enzyme à 144 h, IAF916B2 $\Delta tatC$ en produit 2,64 UI/ml soit une réduction de près de 97%. Bien que très importante, il n'y a pas abolition totale de la sécrétion de la XlnB2. Chez les souches IAF907-SB1TB2 $\Delta tatC$ et IAF907-SB1pATB2 $\Delta tatC$ (les deux orientations), la production de xylanase est réduite de 50% par rapport à IAF907-SB1TB2 et IAF907-SB1pATB2, ce qui représente approximativement la perte due au système Tat déficient.

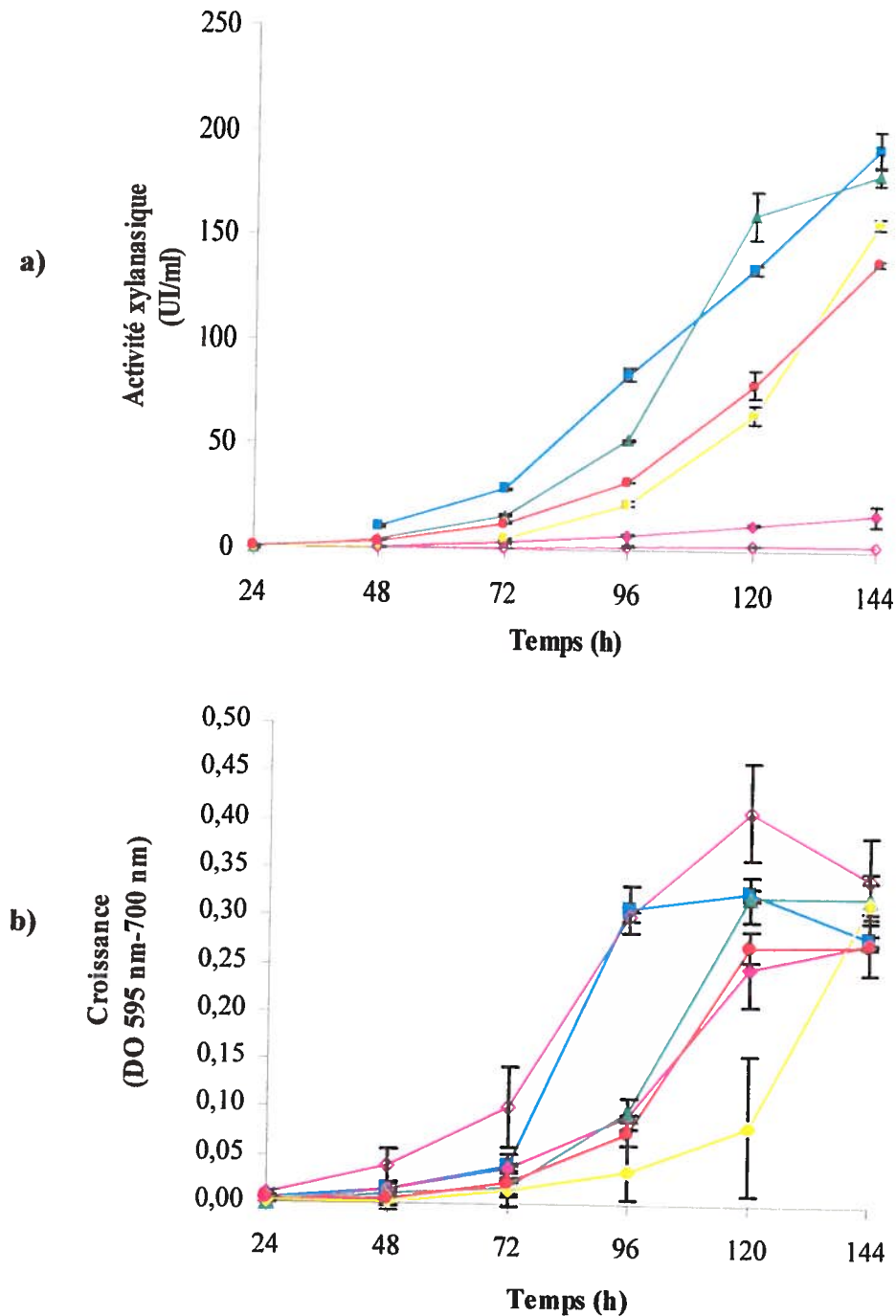


Figure 16. Activité xylanase et croissance du mycélium de tous les plasmides recombinants introduits dans le mutant *S. lividans* 10-164 Δ tatC.

IAF907-SB1 Δ tatC (■), IAF907-TB2 Δ tatC (◆), IAF916B2 Δ tatC (◇) IAF907-SB1TB2 Δ tatC (▲) IAF907-SB1pATB2 Δ tatC orientation correcte (●) et IAF907-SB1pATB2 Δ tatC orientation inverse (●). a) activité xylanase exprimée en UI/ml
b) croissance du mycélium.

3.8 Maturation des précurseurs des XlnB1 et XlnB2 dans les souches recombinantes

Afin de démontrer la présence des différents précurseurs et de suivre leur maturation dans les souches recombinantes, les transformants ont été cultivés dans le milieu minimal M14 contenant du xylose comme source de carbone. Après une croissance de 48 h, le mycélium a été recueilli et soumis au « pulse chase » soit un marquage à la méthionine ^{35}S dans l'étape du « pulse » et addition de méthionine non marquée à l'étape du « chase ». Des échantillons ont été pris à intervalles déterminés, les cellules cassées et les polypeptides de xylanase immunoprécipités avec des anticorps anti-XlnB1. Le résultat de ces pulse-chases sont présentés à la figure 17.

Dans le système Sec représenté par le transformant IAF907-SB1, des précurseurs de 34 kDa (P1) et 36 kDa (P2) ont disparu au cours du temps et ont généré la XlnB1 mature de 31 kDa (B1) avec une demi-vie de 2,5 min. Ce taux de maturation est typique d'un précurseur Sec dans *S. lividans* (Morosoli et Dupont, 1999). Tel que démontré précédemment, il y a eu également sécrétion d'une xylanase de 23 kDa (B2') soit la XlnB2' (Kluepfel *et al.*, 1990). Cette xylanase tronquée possède la même séquence n-terminale que la XlnB1. Ceci indique que la XlnB2' a perdu une portion du site d'attachement au xylan. La XlnB2' résulte probablement de la dégradation des précurseurs de la XlnB1. L'origine de ces précurseurs peut être le résultat d'une fin prématurée de la traduction à cause de la présence d'une structure secondaire relativement importante dans l'ARNm de la XlnB1 juste avant la séquence codante du domaine d'attachement au xylan. La présence de la XlnB2' pourrait aussi être la résultante de la dégradation protéolytique de la XlnB1 dans le milieu de culture (Figure 17a).

Dans le système Tat représenté par le transformant IAF907-TB2, sont apparus des précurseurs de 25 kDa (P1') et 27 kDa (P2'). Le long précurseur était moins abondant ce qui indique que la traduction au premier codon d'initiation était moins efficace que celle du codon interne. La demi-vie du précurseur court était aux environs de 12 min ce qui correspond à celui de la XlnC un substrat typiquement Tat (Faury *et al.*, 2004). Puisque le long précurseur était moins abondant sa demi-vie a été difficile à établir; toutefois celle-ci était similaire au précurseur court. La XlnB2 possède un poids moléculaire calculé de 20

kDa (B2) qui est plus faible que celui de la XlnB2'. Les deux enzymes diffèrent de quelques acides aminés dans la portion c-terminale entre les domaines catalytique et d'attachement au xylan (Figure 17b).

La souche IAF907-SB1TB2, qui porte le plasmide contenant à la fois les séquences signal Sec et Tat a démontré le même profil de maturation des précurseurs. La demi-vie des précurseurs et leur maturation était similaire aux transformants qui possédaient les plasmides portant soit les séquences signal Sec ou Tat uniquement. Dans cette souche, les XlnB1, XlnB2 et XlnB2' ont toutes été produites et sécrétées dans le surnageant de culture comme démontré par les analyses d'immunobuvardage de type western (Figure 17c et Figure 18).

Même si les expériences de clonage ont été réalisées dans *S. lividans* 10-164 qui rappelons-le est un mutant cellulase et xylanase négatif, il était important de démontrer que l'activité xylanase mesurée dans le surnageant de culture était en corrélation avec la présence des XlnB1, XlnB2 et XlnB2'. Pour ce faire, des analyses d'immunobuvardage de type western ont été réalisées avec un sérum anti-XlnB1 sur les protéines sécrétées dans le milieu de culture des différents transformants après une croissance de 72 h (Figure 18). La XlnB1 ainsi qu'une petite quantité de XlnB2' ont été détectées dans le surnageant de tous les transformants qui n'exprimaient que le gène *xlnB1*. Ceci est en accord avec ce qui est retrouvé dans la souche sauvage exprimant le gène chromosomique *xlnB1* (Kluepfel *et al.*, 1990). Dans le transformant IAF907-SB1TB2, en plus de la production de XlnB1 et XlnB2', il y a également eu la production de XlnB2 qui est sécrétée via le système Tat comme dans IAF907-TB2.

Des expériences de « pulse-chase » ont aussi été effectuées avec IAF907-TB2 $\Delta tatC$ et IAF907-SB1TB2 $\Delta tatC$ mais avec une croissance de 72 h au lieu de 48 h. Les résultats de ces « pulses-chases » sont présentés à la figure 19. Dans le système Tat représenté par IAF907-TB2 $\Delta tatC$, nous avons constaté la présence des précurseurs de 25 kDa et de 27 kDa bien que ce dernier ait été très peu visible (Figure 19a). La maturation de ces précurseurs est à peu près absente, en fait tout juste suffisante pour expliquer la présence

des 17 UI/ml d'enzymes sécrétées par cette souche. Nous avons vu en fait apparaître un peu de XlnB2 mature au fil du temps mais les précurseurs étaient toujours présents après 1 h. La souche IAF907-SB1TB2 $\Delta tatC$ a démontré le même profil de maturation des précurseurs que IAF907-SB1TB2 en ce qui concerne la XlnB1 sécrétée par le système Sec mais pas pour la XlnB2 sécrétée via Tat. En effet, nous avons vu disparaître les longs et courts précurseurs de la XlnB1 au fil du temps au profit de la XlnB1 mature. Nous avons aussi remarqué aussi la présence de la XlnB2'. Cependant, les longs et courts précurseurs de la XlnB2 étaient toujours présents au bout d'une heure même s'il y avait suffisamment de maturation pour expliquer la présence de XlnB2 mature (Figure 19b).

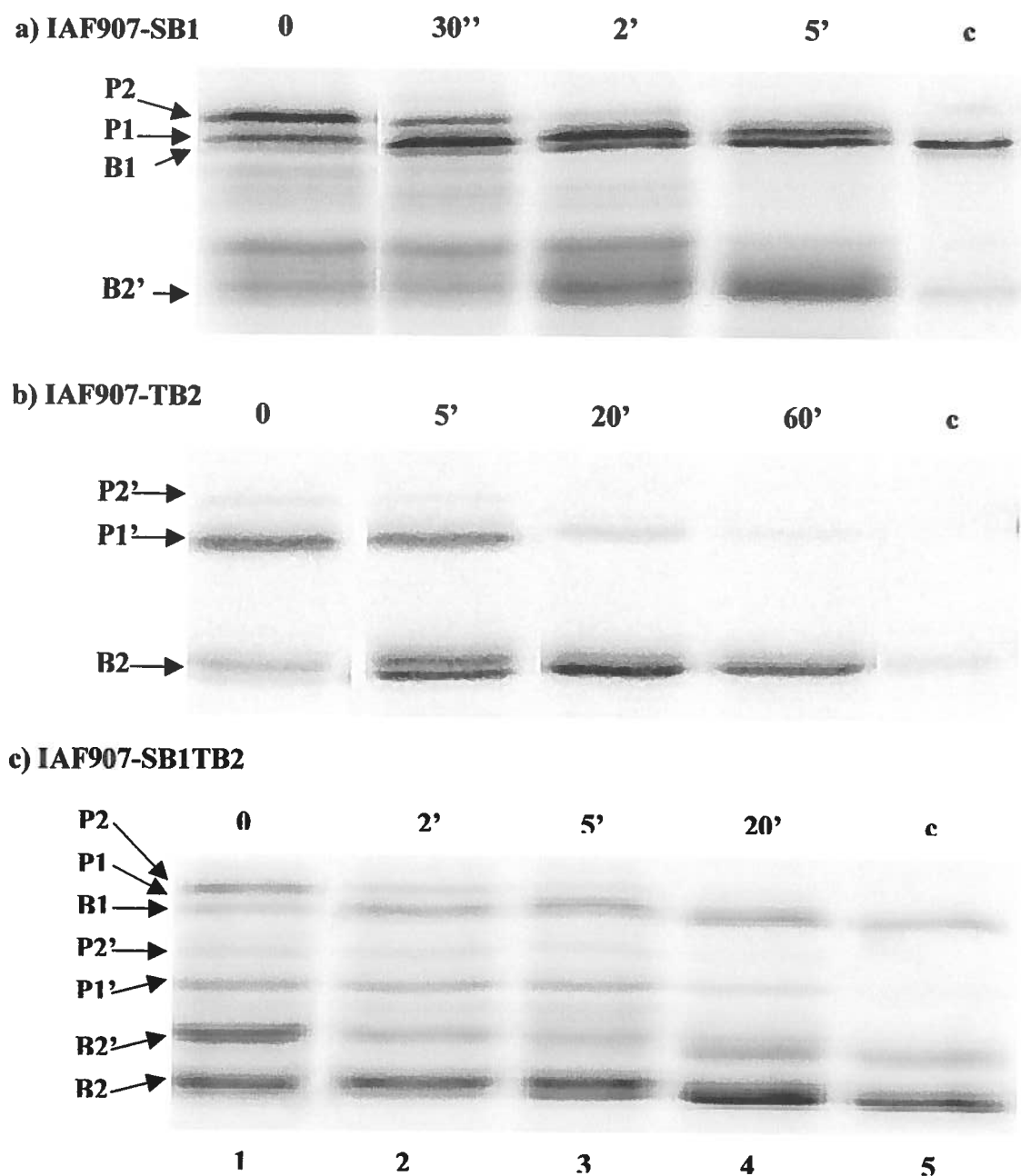


Figure 17. Maturation des précurseurs des XlnB1 et XlnB2 dans *S. lividans*.

Maturation de la xylanase (puits 1 à 4); c, contrôle de xylanase immunoprécipitée à partir du surnageant de culture après l'expérience de marquage (puits 5); P1 et P2, précurseurs de la XlnB1; P1' et P2', précurseurs de la XlnB2; B1, XlnB1; B2, XlnB2; B2', XlnB2'. a) Le clone IAF907-SB1 qui porte le plasmide pIAF907SB1 qui code pour la XlnB1 fusionnée à une séquence signal de type Sec. b) Le clone IAF907-TB2 qui porte le plasmide pIAF907TB2 qui code pour la XlnB2 fusionnée à une séquence signal de type Tat. c) Le clone IAF907-SB1TB2 qui porte le plasmide pIAF907-SB1TB2 un opéron bicistronique avec les séquences codantes de XlnB1 et XlnB2 fusionnée respectivement à une séquence signal de type Sec et Tat.

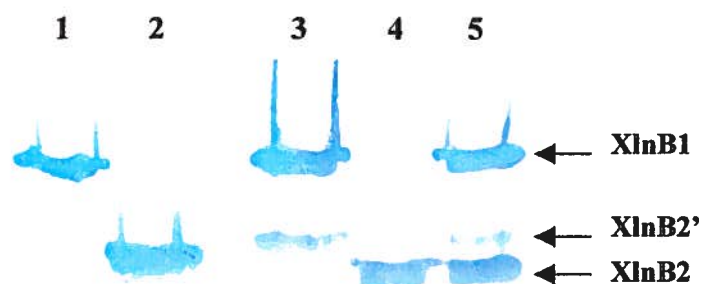
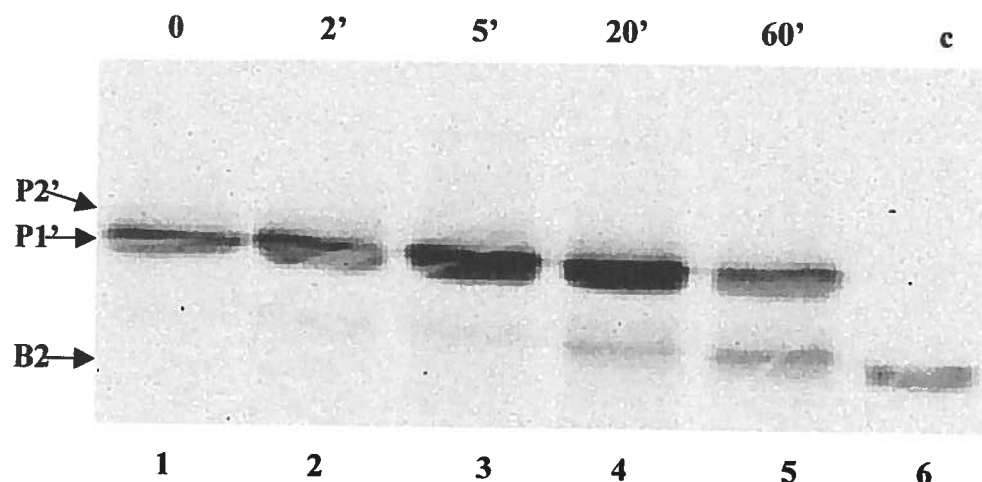


Figure 18. Analyse « Western Blot » des xylanases dans le surnageant de culture des clones.

Dix µl de surnageant de culture de chaque clone après une croissance de 72h, ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur une membrane de nitrocellulose et révélés avec des anti-corps anti-XlnB1 couplés à la phosphatase alcaline marquée d'un anticorps anti-lapin. 1, contrôle de la XlnB1 (protéine pure); 2, contrôle de la XlnB2'(protéine pure); 3, IAF907-SB1; 4, IAF907-TB2; 5, IAF907-SB1TB2

a) IAF907-TB2 Δ tatC



b) IAF907-SB1TB2 Δ tatC

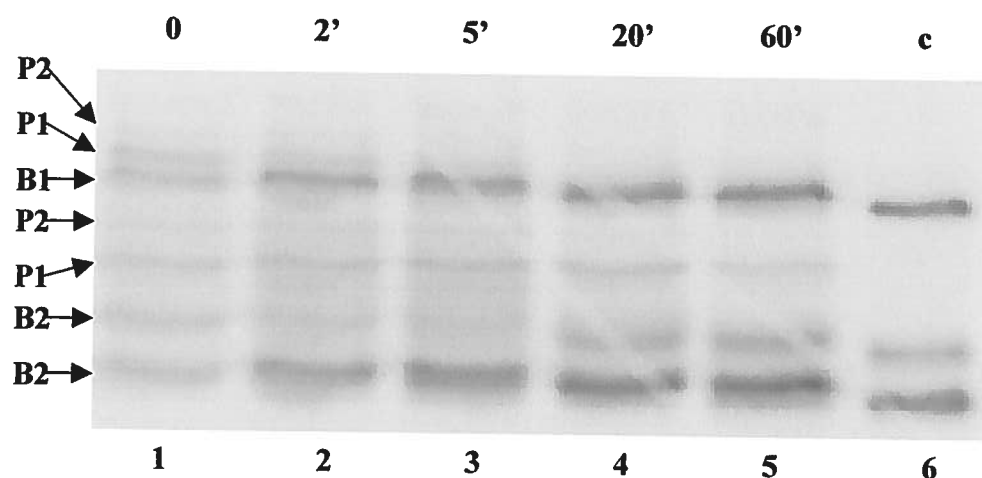


Figure 19. Maturation des précurseurs des XlnB1 et XlnB2 dans *S. lividans* Δ tatC

La croissance des souches recombinantes de *S. lividans*, a été effectuée pendant 72h dans un milieu minimal contenant du xylose comme source de carbone (même légende que la figure 17. Maturation de la xylanase (puits 1 à 5); c, contrôle de xylanase immunoprécipitée à partir du surnageant de culture après l'expérience de marquage (puits 6); P1 et P2, précurseurs de la XlnB1; P1' et P2', précurseurs de la XlnB2; B1, XlnB1; B2, XlnB2; B2', XlnB2'. a) Le clone IAF907-TB2 Δ tatC qui porte le plasmide pIAF907-TB2 qui code pour la XlnB2 fusionnée à une séquence signal de type Tat. b) Le clone IAF907-SB1TB2 Δ tatC qui porte le plasmide pIAF907-SB1TB2 un opéron bicistronique avec les séquences codantes de XlnB1 et XlnB2 fusionnée respectivement à une séquence signal de type Sec et Tat.

3.9 Mesure des ARNm

Il fallait s'assurer que les différences d'activité xylanase entre les transformants étaient uniquement dues à la traduction des ARNm et non pas à des différences d'abondance d'ARNm d'un transformant à un autre. À partir de cultures de 48 h en milieu minimal contenant du xylose comme source de carbone, l'ARN total de IAF907-SB1, IAF907-TB2, IAF907-SB1TB2, IAF907-SB1pATB2, IAF915B2 et IAF915C a donc été extrait. Nous avons introduit comme contrôle la souche IAF915C qui possède le plasmide pIAF915C qui contient la séquence signal de *xlnB1* et la séquence codante de *xlnC*. La quantité d'ARNm a été mesurée par hybridation avec une sonde marquée au ^{32}P soit le plasmide pIAF816B2. La membrane a été exposée 144 h dans une cassette au phosphore, celle-ci étant révélée par l'appareil Phosphorimager.

La figure 20 révèle que les bandes qui correspondent aux transformants qui portent les plasmides qui ne contiennent qu'une seule copie de gène de xylanase sont apparus moins intenses peu importe la quantité d'ARN total soit 1, 2 et 4 μg puisque la sonde ne s'hybride qu'une seule fois sur la molécule. Ceci est vrai pour IAF907-TB2 et IAF915B2, mais pas pour IAF907-SB1 qui apparaît plus intense. Les bandes correspondant à IAF907-SB1TB2 et IAF907-SB1pATB2 se ressemblent et sont plus foncées que celles de IAF907-TB2 et IAF915B2 ce qui s'explique par la présence de deux copies de gène de xylanase sur ces molécules. Aucune bande n'apparaît pour IAF915C ce qui démontre clairement que seuls les clones possédant *XlnB1*, *XlnB2* ou les deux se sont hybridés avec la sonde.

Afin d'effectuer une comparaison de la proportion d'ARNm de chaque clone l'un par rapport à l'autre, la figure 20 a été analysée avec Image Quant (Figure 21). Ce logiciel a permis de tracer une ligne horizontale qui traverse la première colonne (1 μg) de la figure 20 et rapporte les données sous forme de graphique. La figure 21 démontre quantitativement ce qui a été mentionné précédemment.

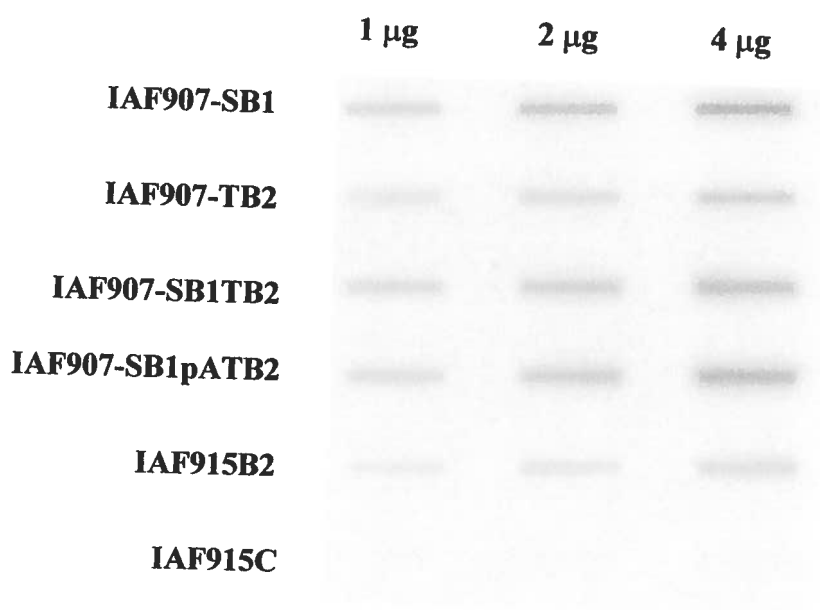


Figure 20. Transfert d'ARN en puits « Slot blot » des transformants de *S. lividans*
 À partir de cultures de 48 h en milieu minimal contenant du xylose comme source de carbone, l'ARN total a été extrait de chaque clone et des quantités précises d'ARN ont été immobilisées sur une membrane de nitrocellulose. Afin de révéler la présence des ARNm, la membrane a été hybridée avec une sonde radioactive soit le plasmide pIAF816B2 marqué au [32 P]. La membrane a été exposée 144 h dans une cassette au phosphore, celle-ci étant révélée par l'appareil Phosphorimager.

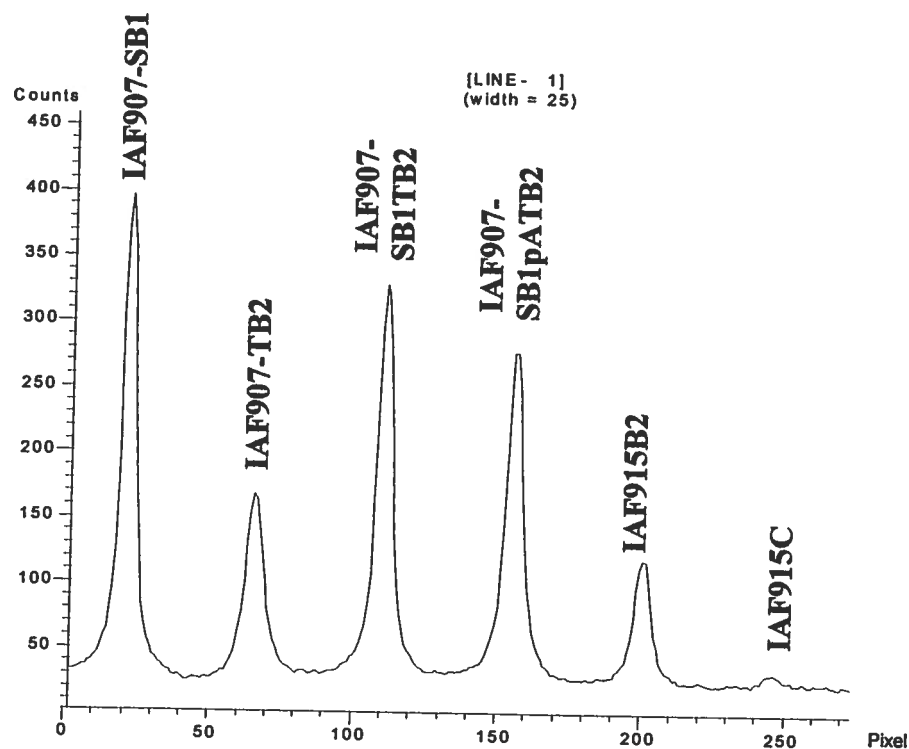


Figure 21. Analyse comparative des proportions d'ARNm de chaque clone.

La figure 20 a été analysée avec Image Quant un logiciel permettant d'effectuer une comparaison de la proportion d'ARNm de chaque clone l'un par rapport à l'autre. Le logiciel a permis de tracer une ligne horizontale qui traverse la première colonne (1 µg) de la figure 20 et rapporte les données sous forme de graphique.

Clones	peptide signal	activité xylanase
		(UI/ml) ^a
IAF915B1	Sec	90 ± 6
IAF915B2	Sec	79 ± 5
IAF916B1	Tat	32 ± 4
IAF916B2	Tat	52 ± 5
IAF907-SB1	Sec	256 ± 10
IAF907-SB1 Δ tatC	Sec	207 ± 8
IAF907-TB2	Tat	173 ± 6
IAF907-TB2 Δ tatC	Tat	18 ± 5
IAF907-TB2pATB2	Tat	251 ± 14
IAF907-SB1TB2	Sec et Tat	350 ± 12
IAF907-SB1TB2 Δ tatC	Sec et Tat	172 ± 4
IAF907-SB1pATB2	Sec et Tat	360 ± 15
IAF907-SB1pATB2 Δ tatC	Sec et Tat	167 ± 3

Tableau 12. Récapitulatif de l'activité xylanase dans le surnageant de culture de *S. lividans* 10-164 et de *S. lividans* 10-164 Δ tatC transformés avec différents plasmides.

^a L'activité a été mesurée dans les surnageants de culture au cours de la croissance des transformants, mais seulement les résultats représentant la moyenne de l'activité de trois cultures indépendantes après 144 h d'incubation sont présentés. La croissance est similaire pour tous les clones tel que déterminé par le contenu en ADN des cultures.

4. DISCUSSION

Dans cette étude, l'objectif principal était de maximiser la sécrétion de la xylanase B. Il a été démontré que la XlnB1 était mieux sécrétée via le système Sec que la XlnB2. Il semblerait donc que dans la XlnB1, le domaine d'attachement au xylan contribue à la sécrétion via le système Sec. D'un autre côté, ce même site d'attachement favorable à la sécrétion via Sec, le serait moins pour la sécrétion via le système Tat. En effet la XlnB1 est trois fois moins bien sécrétée par le système Tat que par le système Sec. Ceci indique que les deux domaines indépendants de la XlnB1 ont de la difficulté à être repliés correctement par le système Tat afin de sécréter une enzyme active.

L'utilisation de plasmides contenant une double initiation de la traduction ainsi qu'une boîte complémentaire à l'ARNr16S a permis d'augmenter la sécrétion de XlnB1 et XlnB2 de 2,5 fois comparativement à leur séquence signal originale. Toutefois, ceci contraste avec les résultats obtenus avec la XlnA. Avec une construction similaire, on a pu obtenir 10 fois plus d'activité enzymatique qu'avec la séquence signal originale (Kébir *et al.*, 2000). Nous pouvons donc penser que la XlnB1 est probablement moins stable que la XlnA. En effet, le domaine catalytique de la XlnA se replie en un motif de feuillets β et d'hélices α (Shareck *et al.*, 1991; Morosoli *et al.*, 1990) tandis que la XlnB1 est formée principalement de feuillets β (Shareck *et al.*, 1991; Morosoli *et al.*, 1990) qui sont peut-être davantage susceptible à la dégradation protéolytique. Cependant, dans des surnageants de culture de 96 h contenant la XlnA, la XlnB1 et la XlnB2, il n'y a pas eu de perte d'activité après une incubation de 5 jours à 30°C (notre travail) ce qui exclut la possibilité d'une dégradation protéolytique subséquente à la sécrétion. Puisque les gènes des XlnA, XlnB1 et XlnB2 sont sous le contrôle du même promoteur, la différence n'est probablement pas au niveau de la transcription mais peut-être au niveau de la traduction.

À l'observation du pulse-chase, nous remarquons que dans le cas de IAF907-TB2 le long précurseur est moins apparent et semble donc moins bien traduit que le court précurseur. Afin de déterminer la contribution exacte du long précurseur à la production de XlnB2, il aurait fallu retirer le codon d'initiation interne et vérifier la production de xylanase.

Afin d'évaluer la limite de capacité de sécrétion de XlnB2 par le système Tat, nous avons introduit sur le même plasmide, deux copies du gène *xlnB2* créant ainsi la souche IAF907-TB2pATB2. Celle-ci a produit 45% de plus de XlnB2 que IAF907-TB2. Nous pourrions croire que deux copies du même gène sur le même plasmide produiront deux fois plus de xylanase. Dans cette optique, la souche IAF907-TB2pATB2 aurait du produire environ 346 UI/ml de xylanase soit le double des 173 UI/ml produits par IAF907-TB2, ce qui ne fut pas le cas, puisqu'elle a généré 250 UI/ml de xylanase. Puisque le vecteur qui porte les constructions à l'étude est un plasmide multicopies, les copies du gène sont donc présentes en grande quantité dans la cellule et le système de sécrétion atteint probablement sa limite. Le fait de doubler le gène sur le plasmide augmente la sécrétion de xylanase. Néanmoins, IAF907-TB2pATB2 produit 100 UI/ml de moins que IAF907-SB1TB2 ou IAF907-SB1pATB2 peu importe l'orientation. Il semble donc avantageux d'utiliser la double construction Sec/Tat afin de produire davantage d'enzyme. Poursuivant le même raisonnement pour le plasmide Sec, nous avons essayé d'introduire deux gènes *xlnB1* dans le même plasmide. La construction s'est avérée instable et nous n'avons pas pu déterminer l'activité de cette souche.

Le transformant IAF907-SB1TB2 a produit à 120 h 350 UI/ml de xylanase. Puisque cette construction constitue un opéron bicistronique et que dans ce cas le deuxième gène est généralement moins bien exprimé que le premier, nous avons ajouté un second promoteur afin de générer IAF907-SB1pATB2. Cependant, l'ajout d'un second promoteur, indépendamment de l'orientation de celui-ci, a produit 360 UI/ml de xylanase à 120 h. Ceci indique donc que dans IAF907-SB1TB2 les deux gènes, qui sont sous le contrôle d'un seul promoteur, sont exprimés au même niveau. Dans ces souches recombinantes, les deux systèmes de sécrétion semblent fonctionner simultanément. A preuve, le pulse-chase réalisé avec IAF907-SB1TB2 démontre bien la présence des précurseurs de la XlnB1 et la XlnB2 et leur transformation en protéine mature. L'immunobuvardage de type western montre aussi la présence des protéines matures dans le surnageant de culture. Cependant il existe tout de même une différence de 70 UI/ml de xylanase entre la somme de la production de IAF907-SB1 et IAF907-TB2 qui produisent respectivement 173 et 250 UI/ml et IAF907-SB1TB2 qui produit 350 UI/ml. Ce déficit, dans la

production de xylanase lorsque les deux systèmes de sécrétion sont très sollicités, est difficile à expliquer. Il est difficile de dire si les deux systèmes sont affectés également ou seulement un des deux.

La croissance de tous les clones s'avère comparable et donc l'activité de chacun semble bel et bien reliée aux caractéristiques particulières de chaque plasmide et non pas à des différences de biomasse. Généralement, le maximum de croissance est atteint à 96 h ou 120 h, tandis que le maximum de la sécrétion de xylanase est atteint à 120 h ou 144 h.

Il a été démontré que l'introduction des plasmides transformants dans le mutant *S. lividans* 10-164 Δ tatC, provoquait une baisse de la production de xylanase de 50% pour les plasmides possédant à la fois des séquences signal Sec et Tat et une grande diminution pour les plasmides portant uniquement une séquence Tat. Cependant, puisque dans ce cas l'abolition de la sécrétion n'est pas totale, il est possible que la XlnB2 qui possède une séquence signal de type Tat soit partiellement sécrétée par le système Sec quand le système Tat est défectueux. D'ailleurs il a été démontré chez *E. coli* qu'une protéine fusionnée à un peptide signal de type Tat peut être transloquée par le système Sec (Sanders *et al.*, 2001). Considérant la croissance différente des deux souches, ces résultats démontrent clairement que le système Tat est fonctionnel chez *S. lividans* 10-164 qui porte les plasmides contenant à la fois les séquences signal Sec et Tat fusionnées au gènes de xylanase.

Globalement la quantité d'ARN produite par les divers transformants est similaire sauf pour IAF907-SB1. Ces résultats reflètent assez bien le niveau de transcription attendu. Cependant nous avons remarqué que pour IAF907-SB1 la quantité d'ARN total déterminée au spectrophotomètre, était sous-estimée comparativement à ce que l'on pouvait observer après migration des ARN du gel d'agarose (résultats non montrés). Cette anomalie n'a pas été élucidée.

D'autres groupes de recherche ont voulu démontrer que des protéines pouvaient à la fois être sécrétées par le système Sec et le système Tat. En effet, il a été possible chez *S.*

lividans, de faire sécréter des protéines humaines, soit le facteur de nécrose tumoral (TNF) α et l'interleukine 10, en fusionnant les séquences codantes de la hTNF α mature et de la hIL10 mature, au peptide signal Tat de la XlnC de *S. lividans* et de la tyrosinase de *S. antibioticus*. Les deux protéines (hTNF α et hIL10) ont été sécrétées et cette sécrétion a été bloquée dans des mutants $\Delta tatC$ et $\Delta tatB$. Ceci indique que le transport de hTNF α et hIL10 pouvait être dirigé vers le système Tat. Les niveaux de sécrétion de hTNF α et hIL10 étaient cependant plus faibles par le système Tat que par le système Sec qui utilisait le peptide signal de l'inhibiteur de la subtilisine de *S. venezuelae* (Schaerlaekens *et al.*, 2004b).

Cependant, à notre connaissance, aucun autre groupe de recherche n'a réalisé la transformation d'une bactérie avec un plasmide comparable à pIAF907-SB1TB2 qui favorise l'utilisation simultanée des systèmes Sec et Tat.

5. CONCLUSION

La sécrétion des protéines chez les bactéries est un domaine de grand intérêt. Les xylanases de *S. lividans* sont particulièrement importantes pour plusieurs applications industrielles, notamment le bioblanchiment des pâtes à papier. Il est donc intéressant de pouvoir augmenter la sécrétion de ces enzymes par différents moyens. Les résultats de ce travail présentent un double intérêt : d'une part, il a été possible de démontrer que la xylanase B pouvait être sécrétée à la fois via le système Sec et le système Tat. D'autre part, une construction plasmidique originale a permis de maximiser la sécrétion de cette enzyme.

Bien que sécrétée naturellement par le système Sec, la XlnB l'est aussi via le système Tat de par son homologie importante avec la XlnC qui est sécrétée exclusivement via Tat. En effet, la fusion de la séquence signal du gène *xlnC* aux gènes *xlnB1* et *xlnB2* a eu pour conséquence la sécrétion de XlnB1 et XlnB2 cette dernière étant toutefois produite en plus grande quantité. Nous avons aussi démontré que l'utilisation d'une séquence possédant deux sites d'initiation de la traduction, en plus d'un promoteur efficace, favorisait une augmentation importante de la sécrétion des XlnB1 et XlnB2 par rapport à leur peptide signal original.

Comme les XlnB1 et XlnB2 peuvent être mieux sécrétées dans les systèmes Sec et Tat respectivement, une copie de *xlnB1* fusionnée à une séquence signal Sec possédant deux sites d'initiation de la traduction et une copie de *xlnB2* fusionnée à une séquence signal de type Tat possédant également deux sites d'initiation de la traduction ont été insérées dans le même plasmide.

Cette construction hybride Sec/Tat a généré une activité enzymatique correspondant approximativement à la somme des activités obtenues pour les constructions individuelles. Ce fait démontre clairement que les systèmes de sécrétion Sec et Tat peuvent être utilisés simultanément pour augmenter la production de XlnB. Ceci représente une méthode additionnelle pour augmenter la production de xylanase en conjonction avec les méthodes existantes comme le remplacement des peptides signaux, des promoteurs, des codons et l'ajout de sites d'attachement aux ribosomes additionnels.

Il serait intéressant de vérifier s'il est possible d'utiliser ce vecteur afin de maximiser la production d'autres protéines d'intérêt.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Austen, B. and Westwood, O.M.R. (1991). «Protein targeting and secretion.» In focus Oxford IRL Press 85 p.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'neil, S., Rabbino-witsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. and Hopwood, D.A. (2002). «Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).» *Nature* 417(6885): 141-147.
- Berks, B.C. (1996). «A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?» *Mol Microbiol* 22(3): 393-404.
- Berks, B.C., Sargent, F. and Palmer, T. (2000). «The Tat protein export pathway.» *Mol Microbiol* 35(2): 260-274.
- Berks, B.C., Palmer, T. and Sargent, F. (2003). «The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology.» *Adv Microb Physiol* 47: 187-254.
- Binnie, C., Cossar, J.D. and Stewart, D.I. (1997). «Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*.» *Trends Biotechnol* 15(8): 315-320.
- Blanco, J., Coque, J.J.R. and Martin, J.F. (1996). «Characterization of the *secA* gene of *Streptomyces lividans* encoding a protein translocase which complements and *Escherichia coli* mutant defective in the ATPase activity of SecA.» *Gene* 176(1-2): 61-65.
- Blanco, J., Driessen, A.J.M., Coque, J.J.R. and Martin, J.F. (1998). «Biochemical characterization of the SecA protein of *Streptomyces lividans*--interaction with nucleotides, binding to membrane vesicles and in vitro translocation of proAmy protein.» *Eur J Biochem* 257(2): 472-478.
- Bogsch, E., Brink, S. and Robinson, C. (1997). «Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein.» *Embo J* 16(13): 3851-3859.
- Bogsch, E. G., Sargent, F., Stanley N.R., Berks, B.C., Robinson, C. and Palmer, T. (1998). «An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria.» *J Biol Chem* 273(29): 18003-18006.
- Burton, K. (1956). «A study on the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.» *Biochem. J* (62): 315-323.

- Cristobal, S., de Gier, J.-W., Nielsen, H. and von Heijne, G. (1999). «Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*.» *Embo J* 18(11): 2982-2990.
- Danese, P. N. and Silhavy, T.J. (1998). «Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*.» *Annu Rev Genet* 32: 59-94.
- de Keyzer, J., van der Does, C. and Driessen, A.J.M. (2003). «The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex.» *Cell Mol Life Sci* 60(10): 2034-2052.
- De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. and Berks, B.C. (2001). «Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway.» *FEBS Lett* 506(2): 143-148.
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S.B., Müller, M., Sargent, F., Palmer, T. and Berks, B.C. (2002). «Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes.» *J Mol Biol* 322(5): 1135-1146.
- Dilks, K., Rose, R.W., Hartmann, E. and Pohlschröder, M. (2003). «Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway: a Genomic Survey » *J Bacteriol* 185(4) : 1478-1483.
- Driessen, A.J.M. (2001). «SecB, a molecular chaperone with two faces.» *Trends Microbiol* 9(5) : 193-196.
- Dupont, C., Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., et Kluepfel, D. (1998). «Substrate-binding domains of glycanases from *Streptomyces lividans*: characterization of a new family of xylan-binding domains.» *Biochem J* 330 (Pt 1): 41-45.
- Economou, A. (1999). «Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway.» *Trends Microbiol* 7(8): 315-320.
- Economou, A. (2000). «Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates.» *FEBS Lett* 476(1-2): 18-21.
- Eichler, J. (2003). «Protein targeting across evolution : SRP in the three domains of life.» *ASM News* 69(6) : 277-281.
- Faury, D., Saidane, S., Li, H. and Morosoli, R. (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. and Driessen, A. J. (1999). «Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane.» *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1): 161-173.
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., et Kluepfel, D. (1995). «Production and secretion of proteins by streptomycetes.» *Crit Rev Biotechnol* 15(1): 13-39.

- Gilbert, M., Ostiguy, S., Kluepfel, D., et Morosoli R. (1996). «Cloning of a *secA* homolog from *Streptomyces lividans* 1326 and overexpression in both *S. lividans* and *Escherichia coli*.» *Biochim Biophys Acta* 1296(1): 9-12.
- Gold, L. (1988). «Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*.» *Annu Rev Biochem* 57: 199-233.
- Gouffi, K., Santini, C.-L. and Wu, L.-F. (2002). «Topology determination and functional analysis of the *Escherichia coli* TatC protein.» *FEBS Lett* 525(1-3): 65-70.
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R. and Sprenger, G.A. (1999). «The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding.» *Eur J Biochem* 263(2): 543-551.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Keiser, T., Bruton, C.J., Keiser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. and Morosoli, R. (1995). «A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins.» *Mol Microbiol* 17(2): 367-377.
- Jack, R.L., Sargent, F., Berks, B.C., Sawers, G. and Palmer, T. (2001). «Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth.» *J Bacteriol* 183(5): 1801-1804.
- Jack, R.L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. and Sargent F. (2004). «Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins.» *EMBO J* 23(20):3962-3972.
- Jeffries, T.W. (1992). «Enzymatic treatment of pulp.» In : Rowell R. M., Schultz, T.P., Noryan, R. Editors. *Emerging Technologies for Materials and Chemicals from biomembranes*. ACS Symposium Series 476 ; Washington, DC : ACS : 313-329
- Jongbloed, J.D., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., Airaksinen, U., Pries, F., Quax, W.J., van Dijl, J.M. and Braun, P.G. (2002). «Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*.» *J Biol Chem* 277(46): 44068-44078.
- Katz, E., Thompson, C.J. and Hopwood, D.A. (1983). «Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*.» *J Gen Microbiol* 129(9): 2703-2714.

- Kebir, H., Dupont, C. and Morosoli R. (2000). «Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide: dependence on box and inverted repeat sequence.» *Biochim Biophys Acta* 1491(1-3): 177-184.
- Kluepfel, D., Vats-Mehta, S., Aumont, F., Shareck, F., et Morosoli, R. (1990). «Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66.» *Biochem J* 267(1): 45-50.
- Knoblauch, N.T., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Driessen, A.J., Schneider-Mergener, J. and Bukau, B. (1999). «Substrate specificity of the SecB chaperone.» *J Biol Chem* 274(48):34219-34225.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). «A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.» *J Mol Biol* 157(1): 105-132.
- Lenz, LL., Mohammadi, S., Geissler, A. and Portnoy, D.A. (2003). «SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(21):12432-7.
- Lin, J.J., Smith, M., Jessee, J. and Bloom, F.(1992). «DH11S: an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors.» *Biotechniques* 12(5): 718-721.
- Liu, Z. and Mishra, N.C. (1995). «Single-tube method for plasmid miniprep from large numbers of clones for direct screening by size or restriction digestion.» *Biotechniques* 18(2): 214-217.
- Lvan der aan, M., Nouwen, N.P. and Driessen, A.J. (2005). «YidC--an evolutionary conserved device for the assembly of energy-transducing membrane protein complexes. » *Curr Opin Microbiol* 8(2):182-187.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M. and Saier Jr, M.H. (2003). «Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P fluorescens*.» *Biochim Biophys Acta* 1611(1-2): 223-233.
- Mead, D.A., Szczesna-Skorupa, E. and Kemper, B. (1986). «Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering.» *Protein Eng* (1): 67-74.
- Miller, G.L. (1959). «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.» *Anal Chem* 31 : 426-428.
- Miyake, K., Onaka, H., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994). «Organization and nucleotide sequence of the secE-nusG region of *Streptomyces griseus*.» *Biochim Biophys Acta* 1217(1): 97-100.

- Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R. and Kluepfel, D. (1986). «Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*.» *Gene* 49(3): 323-329.
- Mori, H. and Cline, K. (2001). «Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and DeltapH-dependent pathways.» *Biochim Biophys Acta* 1541(1-2): 80-90.
- Morosoli, R., Bertrand, J.L., Mondou, F., Shareck, F. and Kluepfel, D. (1986). «Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*.» *Biochem J* 239(3): 587-592.
- Morosoli, R., Shareck, F., Moreau, A., et Kluepfel, D. (1990). «Expression of xylanase genes in *Streptomyces lividans*.» *Proc. G.I.M.-V.2* : 935-946.
- Morosoli, R., Shareck, F. and Kluepfel, D. (1997). «Protein secretion in streptomycetes.» *FEMS Microbiol Lett* 146(2): 167-174.
- Morosoli, R., Ostiguy, S. and Dupont C. (1999). «Effect of carbon source, growth and temperature on the expression of the sec genes of *Streptomyces lividans* 1326.» *Can J Microbiol* 45(12): 1043-1049.
- Morosoli, R. and Dupont, C. (1999). «Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans*: dependence on signal peptides length, number and composition.» *FEMS Microbiol Lett* 179(2): 437-445.
- Muller, M. (2005). «Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*.» *Res Microbiol* 156(2):131-136.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). «Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.» *Protein Eng* 10(1): 1-6.
- Or, E., Boyd, D., Gon, S., Beckwith, J. and Rapoport, T. (2005). «The bacterial ATPase SecA functions as a monomer in protein translocation.» *J Biol Chem* 280(10):9097-9105.
- Oresnik, I.J., Ladner, C.L. and Turner, R.J. (2001). «Identification of a twin-arginine leader-binding protein.» *Mol Microbiol* 40(2):323-331.
- Osborne, A.R., Clemons, W.M. Jr. and Rapoport, T.A. (2004). «A large conformational change of the translocation ATPase SecA.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30):10937-10942.
- Ostiguy, S., Gilbert, M., Shareck, F., Kluepfel, D., et Morosoli, R. (1996). «Cloning and sequencing of the secY homolog from *Streptomyces lividans* 1326.» *Gene* 176(1-2): 265-267.

- Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F., et Morosoli R. (1996a). «Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: dependence on number of ribosome-binding sites.» *Nat Biotechnol* 14(6): 756-759.
- Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F. and Morosoli, R. (1996b). «Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*.» *Appl Environ Microbiol* 62(1): 109-114.
- Palacin, A., de la Fuente, R., Valle, I., Rivas, L.A. and Mellado, R.P. (2003). «*Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion.» *Microbiology* 149(Pt 9): 2435-2442.
- Palmer, T., Sargent, F. and Berks, B.C. (2005). «Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway.» *Trends Microbiol* (4):175-180.
- Robinson, C. and Bolhuis, A. (2001). «Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway.» *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(5): 350-356.
- Rose, R.W., Brüser, T., Kissinger, J.C. and Pohlschröder, M. (2002). «Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway.» *Mol Microbiol* 45(4): 943-950.
- Sambasivarao, D., Turner, R.J., Simala-Grant, J.L., Shaw, G., Hu, J. and Weiner, J.H. (2000). «Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*.» *J Biol Chem* 275(29):22526-22531.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanders, C., Wethkamp, N. and Lill, H. (2001). «Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system.» *Mol Microbiol* 41: 241-246.
- Santini, C.L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. and Wu, L.F. (2001). «Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock.» *J Biol Chem* 276(11):8159-8164.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74: 5463-5467.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C. and Palmer, T. (1998). «Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway.» *Embo J* 17(13): 3640-3650.
- Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C. and Palmer T. (1999). «Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein.» *J Biol Chem* 274(51): 36073-36082.

- Schaerlaekens, K., Schierova, M., Lammertyn, E., Geukens, N., Anné, J. and Van Mellaert, L. (2001). «Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*.» *J Bacteriol* 183(23): 6727-6732.
- Schaerlaekens, K., Van Mellaert, L., Lammertyn, E., Geukens, N. and Anné, J. (2004a). «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., Lammertyn, E., Geukens, N., De Keersmaecker, S., Anne, J and Van Mellaert, L. (2004b). «Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*.» *J Biotechnol* 112(3):279-288.
- Schierle, C.F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D. and Beckwith, J. (2003). «The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway.» *J Bacteriol* 185(19):5706-5713.
- Schmidt, M. G. and Kiser, K. B. (1999). «SecA: the ubiquitous component of preprotein translocase in prokaryotes.» *Microbes Infect* 1(12): 993-1004.
- Shareck, F., Roy, C., Yaguchi, M., Morosoli, R., et Kluepfel, D. (1991). «Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*.» *Gene* 107(1): 75-82.
- Stanley, N. R., Palmer, T. and Berks, B.C. (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.
- Te'o, V.S., Cziferszky, A.E., Bergquist, P.L. and Nevalainen, K.M. (2000). «Codon optimization of xylanase gene xynB from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.» *FEMS Microbiol Lett* 190(1): 13-19.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D.H., Bron, S. and van Dijl, J.M. (2000). «Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome.» *Microbiol Mol Biol Rev* 64(3): 515-547.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., Kuipers, O.P., Bron, S., Hecker, M. and van Dijl, J.M. (2004). «Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome.» *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):207-233.

Tremblay, D., Lemay, J., Gilbert, M., Chapdelaine, Y., Dupont, C. and Morosoli R. (2002). «High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*.» *Can J Microbiol* 48(1): 43-48.

van Dijl, J.M., Braun, P.G., Robinson, C., Quax, W.J., Antelmann, H., Hecker, M., Muller, J., Tjalsma, H., Bron, S. and Jongbloed, J.D. (2002). « Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. » *J Biotechnol* 98(2-3):243-254.

van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R. and Driessen, A.J.M. (2001). «Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria.» *FEMS Microbiol Rev* 25(4): 437-454.

Viirari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. (1994). «Xylanases in bleaching from an idea to the industry.» *FEMS Microbiol Rev* 13: 335-350.

von Heijne, G. (1986). «Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria.» *J Mol Biol* 192(2): 287-290.

Wexler, M., Sargent, F., Jack, R.L., Stanley, N.R., Bogsch, E.G., Robinson, C., Berks, B.C and Palmer, T. (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.

APPENDICE A

Liste des solutions, tampons et milieux de culture

Milieux de culture

Milieu LB

NaCl	10 g
Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Eau MilliQ déionisée	1 L
pH ajusté à 7 avec NaOH 5 M	
<u>solide</u>	
Agar	15 g

Avec ampicilline 100 µg/ml : 4 ml d'une solution stock de 25 mg/ml pour 1 L de milieu après stérilisation et lorsque le milieu est refroidi au dessous de 50°C.

SFM (Mannitol Soya flour Medium)

Agar	20 g
Mannitol	20 g
Farine de soya	20 g
Eau du robinet ou	
eau déionisée avec éléments traces	1 L
Autoclave 115 °C, 20 min à 2 reprises	

TSB (Tryptic Soy Broth)

Tryptic Soy Broth w/o dextrose	27.5 g
Eau MilliQ déionisée	1 L

M14 (Milieu minimal)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g
K ₂ HPO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Sels Mandel	1 ml
Tween 80	2 ml
pH final	7,4
Eau déionisée MilliQ	1 L

Sels Mandel pour 100 ml

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.14 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.16 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.2 g

Milieu TB

Bactotryptone	12 g
Extrait de levure	24 g
Glycérol	4 ml
Eau déionisée MilliQ	1 L

Milieux de culture (suite)

Milieu R5 (pour 2L de milieu)

1)

KH ₂ PO ₄ (sln à 0,5%)	10 ml (autoclavé)
CaCl ₂ (5 M)	4 ml (autoclavé)
CuSO ₄ (5 mg/ml)	1 ml (autoclavé)
L-proline (20% filtrée)	15 ml (autoclavé)
Méthionine (1% filtrée)	10 ml (autoclavé)
Tyrosine	0,4 g / 5 ml NaOH 1N; filtrée

2)

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂	10.12 g
Glucose	10 g
Casamino acid	0,2 g
Éléments traces	2 ml
Extrait de levure	5 g
Tampon TES	5.73 g
Eau déionisée MilliQ	955 ml
Agar	11 g/L

La solution 2 est autoclavée 20 min et lorsque tiède, les 6 solutions de 1) y sont ajoutées stérilement avant de couler 20 ml par boîte de Pétri. Les géloses sont séchées pendant 5 jours afin qu'elles perdent 15% de leur poids.

Milieu RBB-xylan (0,15%) avec glucose 15%

1)

RBB Xylan	1 g
Eau MilliQ déionisée	125 ml
Mélanger et bouillir 30 min et réajuster le volume à 125 ml	

2)

Sels Mandel	0,5 ml
(NH ₄)SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.75 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Extrait de levure	0,25 g
KCl	0,25 g
Eau MilliQ déionisée	375 ml
pH ajusté à 7,2	
Agar	8,5 g

Sterilisation 20 min, refroidissement à 55 °C et mélange des solutions 1) et 2).
Ajout de 5 ml de MgSO₄•7H₂O (5%) et 0,5 ml de thiostrepton 50 mg/ml (au besoin).
Dissolution des produits de la solution 2) dans 225 ml d'eau et ajout après stérilisation de 150 ml de glucose 50% préalablement stérilisé par filtration.

Milieux de culture (suite)

Milieu 2XTY

Bactotryptone	16 g
Extrait de levure	10 g
NaCl	5 g
Eau déionisée MilliQ	1 L

Solide

Agar	15 g
------	------

Avec ampicilline 100 µg/ml : 4 ml d'une solution stock 25 mg/ml pour 1 L de milieu après stérilisation et lorsque le milieu est refroidi au dessous de 50 °C.

Milieu R5 liquide pour protoplastes

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂	10.12 g
Glucose	10 g
Casamino acid	0.10 g
Solution éléments traces*	2.0 ml
Yeast extract	5.0 g
TES	5.73 g
Eau MilliQ déionisée	1 L

Après autoclavage, sont ajoutés pour chaque 100 ml de milieu R5:

KH ₂ PO ₄	0.5%	1 ml	Autoclavé
CaCl ₂	5M	0.4 ml	Autoclavé
NaOH	1N	1.4 ml	Stérilisé par filtration
Glycine	20 %	2.5 ml	Stérilisé par filtration
CuSO ₄	5 mg/ml	0.1 ml	Stérilisé par filtration.
L-proline	20%	1.5 ml	Stérilisé par filtration.
Méthionine	1%	1.0 ml	Stérilisé par filtration.

Tampons, solutions et gels

Tampon de transformation (Tampon T)

Sucrose 10,3%	25 ml
Éléments traces	0.2 ml
K ₂ SO ₄ 2.5%	1 ml
Eau MilliQ déionisée	75 ml

Après autoclavage est mélangé stérilement :

Tampon T	9,3 ml
CaCl ₂ 5M	0,2 ml
Tris-maléique 1 M pH 8*	0,5 ml

*une solution de Tris 1M est ajustée à pH 8 en ajoutant de l'acide maléique.

Solution d'éléments traces

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ •6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ •2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ •4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ •10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	10 mg
Eau déionisée MilliQ	1 L

Tampon STT

8% sucrose
50 mM Tris-HCl pH 8
5% Triton x100

Tampon SSC 20X

NaCl	175.32 g
Citrate trisodique	88.23 g
Eau déionisée MilliQ	1 L

Gel d'agarose

Agarose	X g
Tampon TAE 1X	X ml

Dissolution au micro-ondes

Refroidissement avec agitation jusqu'à environ 50 °C et ajout de bromure d'éthidium (EtBr) 10 mg/ml si nécessaire (2,5 µl pour 40 ml, 5 µl pour 100 ml, 7,5 µl pour 150 ml, 10 µl pour 200 ml)

Tampons, solutions et gels (suite)

Marqueur de poids moléculaire d'ADN 1Kb

1 Kb DNA ladder (1 µg/µl)	40 µl
TAE 1X	760 µl
Tampon de chargement	160 µl

Tampon de chargement 4X pour les échantillons d'ADN

Bleu de bromophénol	0,025 g
Xylène cyanol FF	0,025 g
Glycérol	3 ml
Eau déionisée MilliQ	7 ml

Tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 50X

Tris base	242 g
Acide acétique glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8	100 ml
Complété à 1L avec eau déionisée MilliQ	
Dilution 1/50 pour utilisation en électrophorèse	

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

Tris base	15,1 g
Glycine	72 g
SDS 10%	50 ml
Eau déionisée MilliQ	900 ml
pH ajusté à 8,3	
Dilution 1/5 pour utilisation en électrophorèse	

Tampon P

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.02 g
*Solution d'éléments traces (pour R5)	2 ml
Eau déionisée MilliQ	800 ml

80 ml de cette solution sont répartis dans plusieurs bouteilles et le tout autoclavé.

Avant l'utilisation est ajouté stérilement dans chaque bouteille et pour un total de 100 ml:

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

Tampons, solutions et gels (suite)

Gel de séparation SDS-PAGE

Acrylamide/bis (30%T, 2,67%C stock)	4 ml
Eau déionisée MilliQ	3,345 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
ammonium persulfate 10%	50 µl
TEMED	5 µl

pour un total de 10 ml.

3,6 ml de la solution précédente sont utilisés pour préparer le gel de séparation.

Gel de regroupement SDS-PAGE

Acrylamide/bis (30%T, 2,67%C stock)	325 µl
Eau déionisée MilliQ	1,51 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	625 µl
SDS 10%	25 µl
d'ammonium persulfate 10%	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

pour un total de 2,5 ml

1 ml de la solution précédente est utilisé pour couler le gel de regroupement.

Tampon SSPE 20X

NaCl	175,3 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27,6 g
EDTA	7,4 g
Complété à 1 L d'eau déionisée MilliQ traitée au DEPC	
Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH 10N	

Tampon de charge Laemmli 3X

Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8	1.0 ml
Glycérol	4.8 ml
SDS	0.48 g
β-mercaptoéthanol	1.2 ml
bleu de bromophénol 0.5%	0.4 ml
Eau déionisée MilliQ	0.6 ml

APPENDICE B

Matériel et fournisseurs

β -mercaptoéthanol (Amersham Biosciences)
 1Kb Ladder DNA gel markers (BRL Molecular Biology)
 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
 5X Rapid Ligation Buffer (Fermentas)
 Acétaldéhyde (Sigma)
 Acétate de potassium (A&C)
 Acétate de sodium (J.T. Baker)
 Acétone (A&C)
 Acide acétique (Fisher)
 Acide acétique glacial (A&C)
 Acide citrique (J.T. Baker)
 Acide dinitrosalicylique (Avocado research chemicals LTD)
 Acide maléique (Sigma)
 Acide perchlorique (A&C)
 Acide trichloroacétique (BDH)
 Acrylamide (ICN)
 Acrylamide bis (N,N'-méthylène-bis-acrylamide) (Sigma)
 ADN de sperme de saumon (Sigma)
 Agar (Difco)
 Agarose (Roche, Boehringer Mannheim)
 Albumine sérique bovine (Boehringer Mannheim)
 Alcool isoamylique (J.T. Baker)
 Ammonium persulfate (Biorad)
 Ampicilline (Sigma)
 Amplify (Amersham biosciences)
 ATP (Pharmacia)
 Bacto-tryptone (Difco)
 Bis-Tris (Sigma)
 Bisulfite de sodium (J.T. Baker)
 Bleu de bromophénol (Anachemia)
 Bromure d'éthydiu (Sigma)
 Butanol (J.T. Baker)
 Calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) (Pharmacia)
 Casamino acids (Difco)
 Chloroforme (Fisher)
 Chlorure de calcium (Fisher)
 Chlorure de cobalt (Analar)
 Chlorure de cuivre (Fisher)
 Chlorure de magnésium (A&C)
 Chlorure de manganèse (BDH)
 Chlorure de potassium (Fisher)
 Chlorure de zinc (Fisher)
 Chlorure ferrique (Fisher)
 Chlorure de césium (BDH)
 Citrate de sodium (A&C)
 dATP (Pharmacia)
 dCTP (Pharmacia)

dGTP (Pharmacia)
 Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma)
 Diphénylamine (A&C)
 DMSO (Laboratoire Mat)
 dTTP (Pharmacia)
 EDTA dissodium salt (J.T.Baker)
 Éthanol 95%
 Extrait de levure (Difco)
 Formaldéhyde 37% (J.T.Baker)
 Formamide 100% (ICN)
 Gélatine (BDH)
 Glucose (A&C)
 Glycérol (A&C)
 Glyoxal (Sigma)
 Guanidium isothiocyanate (Gibco BRL)
 HindIII (Amersham)
 Hydroxyde de sodium (Fisher)
 Hydroxyquinoline (Sigma)
 Inhibiteur de protéase *Complete* (Boehringer Mannheim)
 Isopropanol (A&C)
 Kpn I (Amersham)
 L-cystéine (Baker)
 L-méthionine (A&C)
 L-proline (ICN)
 Lysozyme (Sigma)
 Mannitol (A&C)
 Membrane de nitrocellulose (Protran® Schleicher & Schuell, #21640)
 Méthionine radioactive ³⁵S (ICN)
 Nick translation (trousse) (Boehringer Mannheim)
 Peroxyde d'hydrogène (commerce)
 PfuTurbo® DNA polymerase Stratagene # 60025
 Phénol (Gibco)
 Phosphate de potassium (KH₂PO₄) et (K₂HPO₄) (J.T.Baker et BDH)
 Phosphate de sodium (J.T.Baker)
 PIPES (Sigma)
 PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) (Sigma)
 Polyéthylène glycol (J.T . Baker)
 Propionamide (Aldrich)
 Protéin Molecular Weight Standards (Amersham)
 Protéine A-sépharose (Sigma)
 Protéose peptone (Difco)
 RBB-xylan (Sigma)
 Résine Bio Rad AG 501-X8 (Bio-Rad)
 RNaseA (Sigma)
 Sac I (Amersham)
 Sarkosyl (IBI)
 Sephadex G-50 (Pharmacia)

Dichlorodimethylsilane (A&C)
Sodium desoxycholate (A&C)
Sodium dodecyl sulfate (Bio-Rad)
Sodium potassium tartrate (A&C)
Sucrose (Fisher)
Sulfate d'ammonium (J.T.Baker)
Sulfate de cuivre (Sigma)
Sulfate de fer (Merck)
Sulfate de magnésium (J.T. Baker)
Sulfate de manganèse (J.T.Baker)
Sulfate de potassium (A&C)
Sulfate de zinc (Sigma)
T4 DNA ligase 5U (Fermentas)
Tampon 10X (Bio-Rad)
Tampon One-Phor-All *PLUS* 10X (Pharmacia)
Tampon pour *Pfu* 10X (Stratagène)
Tampon TES (Sigma)
Tartrate de sodium potassium (A&C)
TEMED (tetramethyl ethylène diamine) (Bio-Rad)
Thiostrepton (Sigma)
Tris-Base(Bio-Rad)
Triton X-100 (A&C)
Tween 80 (A&C)
Tyrosine (Gibco BRL)
Xylane de bouleau (Sigma)
Xylène cyanol (BDH)
Xylose (Sigma)

APPENDICE C

Article

Increase in Xylanase Production by *Streptomyces lividans* through Simultaneous Use of the Sec- and Tat-Dependent Protein Export Systems

Céline Gauthier, Haiming Li, and Rolf Morosoli*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Ville de Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Received 25 August 2004/Accepted 15 December 2004

Xylanase B1 (XlnB1) from *Streptomyces lividans* is a protein consisting of two discrete structural and functional units, an N-terminal catalytic domain and a C-terminal substrate binding domain. In the culture medium, two forms of xylanase B are present, namely, XlnB1 and XlnB2, the latter of which corresponds to the catalytic domain of XlnB1 deprived of the substrate binding domain. Both forms of the xylanase have the same activity on xylan. The enzyme is secreted through the Sec-dependent pathway with a better yield of XlnB1 than XlnB2. Interestingly, XlnB2 exhibits 80% identity with XlnC which is secreted exclusively through the Tat-dependent pathway. To demonstrate whether XlnB1 and XlnB2 could also be secreted through the Tat-dependent pathway, the Tat-targeting *xlnC* signal sequence was fused to the structural genes of *xlnB1* and *xlnB2*. Both XlnB1 and XlnB2 were secreted through the Tat-dependent pathway, but XlnB2 was better produced than XlnB1. As XlnB1 and XlnB2 could be better secreted through the Sec- and Tat-dependent systems, respectively, a copy of the structural gene of *xlnB1* fused to a Sec signal sequence and a copy of the structural gene of *xlnB2* fused to a Tat signal sequence were inserted into the same plasmid under the control of the *xlnA* promoter. The transformant produced xylanase activity which corresponded approximately to the sum of activities of the individual strain producing xylanase by either the Sec- or Tat-dependent secretion system. This indicated that both secretion systems are functional and independent of each other in the recombinant strain. This is the first report on the efficient secretion of a protein using two different secretion systems at the same time. Assuming that the protein to be secreted could be properly folded prior to and after Tat-dependent pathways provides an efficient means to increase the production of a given protein.

Streptomyces species are gram-positive soil-living bacteria known to secrete large quantities of proteins (10). Most of the secreted proteins are enzymes which are well suited to hydrolyze complex organic material, thus permitting the bacteria to survive in their environment. In the past, we reported the homologous cloning of three xylanase genes (30) and purified the corresponding enzymes XlnA, XlnB, and XlnC from *Streptomyces lividans* (16, 17, 19). Xylanases degrade xylan, one of the major components of hemicellulose, which is a β -1,4-linked polymer of xylose substituted with uronic acid, hexoses, and side chains of other pentoses. These enzymes have attracted considerable attention for their potential use as bleaching agents in pulp and paper, biomass energy, and chemical industries (14, 34).

The vast majority of bacterial proteins are exported across the cytoplasmic membrane by the well-known Sec system, which acts on unfolded polypeptide chains (7). On the contrary, a novel alternate translocation system recently identified in bacteria and thylakoids, i.e., the Tat (twin-arginine translocation) pathway in bacteria or Δ pH pathway in thylakoids, functions to transport folded or even oligomerized preproteins (2, 6, 23, 24, 28, 29). The Tat-dependent proteins possess a signal peptide that preserves the tripartite structural organization of Sec signal peptides but contains an S/T-R-R-X-F-L-K consensus motif at the

boundary of its n and h regions (2). In most cases, precursors bind redox cofactors, but some cofactorless precursors may also be transported by the Tat pathway, probably because they either require cytoplasmic factors for folding or fold too rapidly or too tightly to be transported by the Sec system (3).

XlnA and XlnB are exported by the Sec system (21), while XlnC is exported through the Tat-dependent secretion pathway (9). Since the catalytic domains of XlnB1 and XlnC exhibit 80% identity (30), we surmised that XlnB1 and XlnB2 could also be secreted efficiently through the Tat-dependent pathway. XlnA is not very well secreted through the Tat secretion system. Fusion of the *xlnC* signal sequence to the *xlnA* structural gene resulted in a yield that was 10% of that obtained with the wild-type signal sequence (21).

So far, to our knowledge, the simultaneous use of the Tat- and Sec-dependent secretion systems for protein export has not been investigated. Herein, we show for the first time that the Sec-dependent xylanase B can be efficiently translocated by the two secretion systems simultaneously. This represents an additional way, together with the existing methods, to increase the production of a given protein by replacements of signal peptides, promoters, codons, and additional ribosome-binding sites (4, 22, 31).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media. *Streptomyces lividans* 10-164 is a cellulase- and xylanase-negative mutant of *S. lividans* 1326 which was interrupted in the *msiK* gene required for generation of energy to disaccharide transport systems (13).

* Corresponding author. Mailing address: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Blvd. des Prairies, Laval (Québec) H7V 1B7, Canada. Phone: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501. E-mail: rolf.morosoli@inrs-iaf.quebec.ca.

This strain was used as the host for recombinant plasmids. Spores were prepared according to a method described previously by Hopwood et al. (11). The transformants were grown in M14 minimal medium containing xylose as the sole carbon source (21). Thioestrepton was added where required up to a final concentration of 50 µg/ml. Protoplasting and transformation of *S. lividans* were performed as described previously by Hopwood et al. (11).

Phagemid pTZ19U was from Pharmacia. The screening of transformants of *Escherichia coli* was performed on 2× YT broth plates containing ampicillin (100 µg/ml). DNA manipulations were performed according to methods described previously by Sambrook et al. (25).

Plasmid construction. Plasmids used in this study are listed in Table 1. The sequence encoding XlnB1 and XlnB2 without its signal sequence was amplified using pIAF42 which contained *xlnB* as the template (17). To allow further cloning of the amplified fragments, the restriction sites were introduced at the 5' and 3' ends using the oligonucleotide XBfor (5'-CCGGTACCGACACGGTCGTCACGA-3' [the KpnI site is underlined]) in combination with XB1rev (5'-CCGAGCTCTCAGCCCGCGCTGCA-3' [the SacI site is underlined]) for the *xlnB1* coding sequence and XB2rev (5'-CCCGAGCTCTCAGCCCGCGACGTGTATGCT-3' [the SacI site is underlined]) for the *xlnB2* coding sequence. The fragments were amplified by PCRs under the following conditions: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 50°C, and 3 min at 72°C. The reaction mixture was electrophoresed on a 1% agarose gel, and the amplified sequences were isolated with a QIAEX gel extraction kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). The 901-bp and 593-bp purified fragments containing the coding sequence of *xlnB1* and *xlnB2*, respectively, were digested with KpnI-SacI and were then cloned at the same sites in pIAF815 and pIAF816 (21). The insertion of these xylanase sequences generated plasmids pIAF815B1 and pIAF815B2 (Sec signal sequence from *xlnB1*) and pIAF816B1 and pIAF816B2 (Tat signal sequence from *xlnC*). The expected sequences of the clones were confirmed by the dideoxy chain termination method (27). After digestion of the plasmids by HindIII-SacI, the resulting fragments harboring a restriction sequence fused to a xylanase gene were cloned into pIAF906 (21) at the same restriction sites in replacement of the *xlnA* sequence. This generated plasmids pIAF915B1, pIAF915B2, pIAF916B1, and pIAF916B2. The transcription of *xlnB1* and *xlnB2* in these constructs was then under the control of the *xlnA* promoter. These plasmids were used to transform *S. lividans* 10-164 protoplasts.

For the double translation initiation construct involving a Sec-dependent signal peptide, pIAF811-A.8, which contains the *celA* signal sequence plus the 57 nucleotides (nt) upstream of it (15), was used. The KpnI-SacI fragment of the *xlnB1* coding sequence was cloned into pIAF811-A.8 at the same sites after elimination of the *xlnA* coding sequence, generating plasmid pIAF811-A.8-SB1. The plasmid was digested with HindIII-SacI, and the fragment was cloned into pIAF907 at the same sites, generating plasmid pIAF907-SB1.

For the double translation initiation construct involving a Tat-dependent signal peptide, the 57-nt sequence upstream of the *celA* signal sequence was cloned in front of the *xlnC* signal sequence which was deleted of 30 nt in the plasmid pIAF916C-40 (9). The deleted *xlnC* signal sequence was used to reduce the size of the precursor for better processing. The cloning was achieved by using overlap extension PCR (12). The DNA fragment upstream of the joint was amplified using pIAF811-A.8 as the template. The two oligonucleotides used were Afor (5'-TGCTCAGATGTTCTTCTCGCT-3' [the AflIII site is underlined]), located around the AflIII restriction site in pTZ19, and Jrev (5'-AGGGGCGGGACTCTGCTTCATAGCGTTCCTCTCGTCCGA-3'), containing the 19 nt from the 3' end of the 57-nt *celA* sequence and the 21 nt from the 5' end of the truncated *xlnC* signal sequence. A fragment of 488 bp was generated. The DNA fragment downstream of the joint was amplified using pIAF816B2 as the template. The two oligonucleotides used were Jfor (5'-TCGCACGAGGAGGAACGCTATGAAGCAGAGTCCGCCCCCT-3'), which is the complementary sequence of Jrev, and XB2rev, corresponding to the 3' end of *xlnB2*. A 748-bp fragment was obtained. Both amplified fragments were mixed, and a fragment of 1,196 bp was amplified with primers Afor and XB2rev. After digestion with HindIII-SacI (The HindIII site is located just upstream of the ribosome binding site of the 57-nt *celA* sequence), the resulting fragment of 800 bp was inserted at the same sites in pIAF907, resulting in plasmid pIAF907-TB2.

For the construction of the Sec/Tat secretion chimera, the plasmid pIAF907-SB1 was digested with SacI, and a copy of *xlnB2* fused to the *xlnC* signal sequence having a double translation initiation was cloned at the same site. The fragment was obtained by PCR with pIAF907-TB2 as the template using the oligonucleotides GAU1 (5'-GGCCGAGCTCAAGCTTGGAGGCACAGTC-3' [the SacI site is underlined]) and XB2rev. The amplified fragment of 808 bp was digested with SacI and inserted into pIAF907-SB1 at the same site, resulting in plasmid

pIAF907-SB1TB2. Both genes were arranged in a bicistronic operon under the control of the *xlnA* promoter.

To have *xlnB2* directly under the control of the *xlnA* promoter, a similar construct was achieved as described above, except that the amplified *xlnB2* fragment started at the 5' end with the *xlnA* promoter located 91 nt upstream of the first translation initiation codon. An 887-bp fragment was amplified with primers GAU2 (5'-GGCCGAGCTCTTGACCGAGCATCGTCAA-3' [the SacI site is underlined]) and XB2rev while using pIAF907-TB2 as the template. After digestion with SacI, the fragment was inserted at the same site in pIAF907-SB1, yielding plasmid pIAF907-SB1pATB2. In this plasmid, *xlnB1* and *xlnB2* were then each under the control of the *xlnA* promoter.

For the construction of the Sec/Sec and Tat/Tat secretion chimeras, a strategy similar to that for pIAF907-SB1pATB2 was used. Starting from the plasmids pIAF907-SB1 and pIAF907-TB2, plasmids pIAF907-SB1pASB1 and pIAF907-TB2pATB2 were constructed, respectively.

Culture conditions and sampling procedures. Transformants of *S. lividans* 10-164 were grown in shake flasks containing M14 medium supplemented with 1% xylose and 50 µg/ml of thioestrepton. The medium was inoculated with 2×10^6 spores per ml and incubated at 34°C. One-milliliter samples were removed at intervals. Supernatant fractions were recovered after centrifugation of 1 ml of culture for 5 min in a microcentrifuge and used for the measurement of extracellular xylanase activity. Growth was assessed by determining the DNA content of the mycelium pellet (5).

Enzyme assay. Xylanase activity was measured in supernatants by the dinitrosalicylic acid method (17). One international unit (IU) of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmol of reducing sugars (expressed as xylose) in 1 min at 57°C.

Proteins and Western blot analysis. Proteins from the culture supernatants were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (18) followed by Western blotting (33). The identification of xylanase-specific polypeptides was carried out with anti-XlnB antibodies and alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin (Roche).

Pulse-chase experiments. Pulse-chase labeling experiments with *S. lividans*, immunoprecipitations, and SDS-PAGE were performed as described previously (20), but the mycelia were broken for 30 s with a glass bead shaker (FastPrep FP120; Thermo Savant, Holbrook, NY) instead of sonication. The gels were fixed in a solution of methanol-acetic acid and soaked for 30 min in an Amplify fluorographic reagent (Amersham Life Science), dried down on filter paper, exposed to a phosphor screen (Molecular Dynamics), and analyzed with a PhosphorImager SI (Molecular Dynamics).

RESULTS AND DISCUSSION

XlnB1 and XlnB2 production through the Sec-dependent pathway. In these experiments, *S. lividans* 10-164 was used as the host for recombinant plasmids to make sure that the xylanase activity measured in the culture supernatants originated from the different constructs only (13). XlnB1, which contains both the catalytic domain and the xylan binding domain, and XlnB2, which contains the catalytic domain only, have the same specific activity on xylan (unpublished results). As we are interested in increasing xylanase production, it was necessary to show which form of the enzyme is more efficiently secreted through the Sec-dependent pathway in *S. lividans*. Therefore, the structural genes of *xlnB1* and *xlnB2* were inserted, respectively, downstream of the *xlnB* signal sequence in the multicopy plasmid pIAF915 in replacement of the structural gene of *xlnA*. In these constructs, the structural genes of *xlnB1* and *xlnB2* are under the control of the *xlnA* promoter. This promoter was chosen because it was used successfully to express xylanase genes and allowed us to compare the present data to previous results (21). As shown in Table 2, the xylanase activity in the IAF915B1 supernatant was about 20 to 30% higher than that of IAF915B2. This indicated that in XlnB1, the xylan binding domain contributes to secretion.

We have reported previously that the presence of two ribosome-binding sites and two in-frame initiation codons in-

TABLE 1. Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<i>S. lividans</i>		
pIJ702	Vector containing <i>tsr</i> and <i>mel</i> markers	11
pIAF42	pIJ702 derivative containing <i>xlnB1</i> from <i>S. lividans</i>	17
pIAF906	pIJ702 derivative containing <i>xlnA</i> from <i>S. lividans</i> as a 2-kb SphI-SacI fragment where a HindIII and KpnI restriction site were added on each side of the signal sequence	21
pIAF907	pIAF906 derivative in which the KpnI, PstI, SphI, and BglII sites were removed and the <i>xlnA</i> coding sequence was eliminated and replaced by a cloning cassette of HindIII, EcoRI, XbaI, and SacI	21
pIAF911A.8	pIAF906 derivative in which the <i>xlnA</i> signal sequence was replaced by the <i>celA</i> signal sequence plus 57 nt upstream of it, containing a sequence complementary to the 16S rRNA and two translation initiation codons	15
pIAF916C	pIAF906 derivative containing the <i>xlnC</i> signal sequence and the <i>xlnC</i> coding sequence	9
pIAF916C-40	pIAF916C derivative in which the <i>xlnC</i> signal sequence was deleted of 30 nt from its 5' end	9
pIAF907-SB1	pIAF911A.8 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB1</i> coding sequence	This work
pIAF907-TB2	pIAF916C-40 derivative in which the <i>xlnC</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB2</i> coding sequence and the 57 nt upstream of the <i>celA</i> signal sequence was added in front of the truncated <i>xlnC</i> signal sequence	This work
pIAF907-SB1 TB2	pIAF907-SB1 derivative in which a fragment containing the signal sequence and <i>xlnB2</i> present in pIAF907-TB2 was inserted downstream of <i>xlnB1</i>	This work
pIAF907-SB1 pATB2	pIAF907-SB1 derivative in which the fragment containing the <i>xlnA</i> promoter, the signal sequence, and <i>xlnB2</i> present in pIAF907-TB2 was inserted downstream of <i>xlnB1</i>	This work
pIAF907-SB1pASB1	pIAF907-SB1 derivative in which the fragment containing the <i>xlnA</i> promoter, the signal sequence, and <i>xlnB1</i> present in pIAF907-SB1 was inserted downstream of <i>xlnB1</i>	This work
pIAF907-TB2pATB2	pIAF907-TB2 derivative in which the fragment containing the <i>xlnA</i> promoter, the signal sequence, and <i>xlnB2</i> present in pIAF907-TB2 was inserted downstream of <i>xlnB2</i>	This work
pIAF915	pIAF906 derivative containing the <i>xlnB1</i> signal sequence	21
pIAF915B1	pIAF915 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB1</i> coding sequence	This work
pIAF915B2	pIAF915 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB2</i> coding sequence	This work
pIAF916	pIAF906 derivative containing the <i>xlnC</i> signal sequence	21
pIAF916B1	pIAF916 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB1</i> coding sequence	This work
pIAF916B2	pIAF916 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB2</i> coding sequence	This work
<i>E. coli</i>		
pTZ19	Phagemid carrying <i>bla</i> and part of <i>lacZ</i>	Pharmacia
pIAF807	pTZ19 derivative containing promoterless <i>xlnA</i> with a HindIII and KpnI restriction site on each side of the signal sequence	21
pIAF811-A.8	pIAF807 derivative in which the <i>xlnA</i> signal sequence was replaced by the <i>celA</i> signal sequence plus 57 nt upstream of it, containing a sequence complementary to the 16S rRNA and two initiation codons	15
pIAF815	pIAF807 derivative in which the <i>xlnA</i> signal sequence was replaced by the <i>xlnB1</i> signal sequence	21
pIAF815B1	pIAF815 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB1</i> coding sequence	This work
pIAF815B2	pIAF815 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB2</i> coding sequence	This work
pIAF816	pIAF807 derivative in which the <i>xlnA</i> signal sequence was replaced by the <i>xlnC</i> signal sequence	21
pIAF816B1	pIAF816 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB1</i> coding sequence	This work
pIAF816B2	pIAF816 derivative in which the <i>xlnA</i> coding sequence was replaced by the <i>xlnB2</i> coding sequence	This work

creased XlnA production (22). These changes were introduced into the XlnA signal sequence, resulting in the synthesis of two precursors of different lengths. As the signal peptidase cleavage site was the same for both precursors, a mature XlnA that

originated from the maturation of both precursors was produced. The signal sequence of the cellulase A (CelA) gene from *S. lividans* preceded by a 57-nt upstream sequence was used. The short and long signal sequences encode 27-amino-

TABLE 2. Xylanase activity in the extracellular fraction of *S. lividans* 10-164 and Δ tatC mutant transformed with different plasmids

Transformant	Signal peptide	Xylanase activity (IU/ml) ^a
IAF915B1	Sec dependent	90 $\pm$ 6
IAF915B2	Sec dependent	76 $\pm$ 5
IAF916B1	Tat dependent	32 $\pm$ 4
IAF916B2	Tat dependent	52 $\pm$ 5
IAF907-SB1	Sec dependent	256 $\pm$ 10
IAF907-SB1 Δ tatC	Sec dependent	207 $\pm$ 8
IAF907-TB2	Tat dependent	173 $\pm$ 6
IAF907-TB2 Δ tatC	Tat dependent	18 $\pm$ 5
IAF907-SB1TB2	Sec and Tat dependent	350 $\pm$ 12
IAF907-SB1TB2 Δ tatC	Sec and Tat dependent	172 $\pm$ 4
IAF907-SB1pATB2	Sec and Tat dependent	360 $\pm$ 15
IAF907-SB1pATB2 Δ tatC	Sec and Tat dependent	167 $\pm$ 3
IAF907-TB2pATB2	Tat dependent	251 $\pm$ 14

^a The activity was measured in the culture supernatants along the growth of the transformants. The activity after 144 h of incubation is reported. Activity is the average of three independent cultures. Growth was similar for all transformants of *S. lividans* 10-164 and for all transformants of the Δ tatC mutant as determined by the DNA content of the cultures (data not shown). However, in these conditions, the growth of *S. lividans* 10-164 transformants was 30% higher than that of Δ tatC transformants.

acid (aa) and 46-aa residues, respectively. In addition, an 8-nt sequence complementary to the 16S rRNA was introduced into the upstream sequence of *celA*, giving rise to enhanced translation (Fig. 1). Altogether, these modifications stimulated the XlnA production by 10-fold compared to that of wild-type *xlnA* (15). This construction was used to express *xlnB1* since XlnB1 was produced to a higher level than XlnB2 in the Sec-dependent system. The results are shown in Table 2. The

growth and the enzymatic activity of culture supernatants were determined at different times, but only the results after 144 h of cultivation were reported since after this time, no increase of xylanase activity was observed and the growth of all transformants was similar (data not shown). The transformant IAF907-SB1 produced 2.8-fold more enzyme than wild-type IAF915B1. This contrasted to the results obtained with XlnA, where a 10-fold increase was observed for a similar construct. This suggested that XlnB1 is probably less stable than XlnA. It should be noted that the XlnA catalytic domain folds into an $(\alpha\beta)_8$ barrel motif (8), while XlnB1 is formed mostly of β -sheets (32) which might be more susceptible to proteolytic degradation. However, in 96-h culture supernatants containing XlnA, XlnB1, and XlnB2, there was no loss of activity after an incubation of up to 5 days at 30°C, thus ruling out the possibility of proteolytic degradation of these enzymes once secreted (data not shown). As the structural genes of *xlnA*, *xlnB1*, and *xlnB2* are under the control of the same promoter, the difference is probably not at the transcriptional level but more likely at the translational level.

XlnB1 and XlnB2 production through the Tat-dependent pathway. Since XlnB2, which represents the XlnB1 catalytic domain only, exhibits 80% identity with XlnC, a xylanase secreted exclusively through the Tat-dependent pathway (9), we determined whether active XlnB2 could be secreted through the Tat system. The structural genes of *xlnB1* and *xlnB2* were inserted into plasmid pIAF916 (21) downstream of the Tat-targeting *xlnC* signal sequence in replacement of the structural gene of *xlnA*. As shown in Table 2, the activity in the supernatant of IAF916B2 was about 60% higher than that of IAF916B1. A 30% lower yield of XlnB2 was obtained when

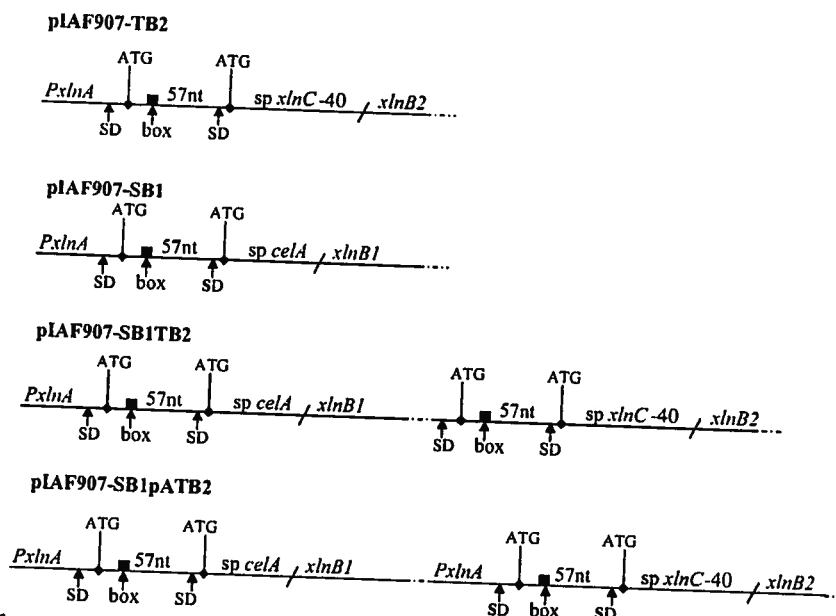


FIG. 1. Scheme of different constructs for the secretion of XlnB1 and XlnB2 through either the Sec- or the Tat-dependent secretion system. For the Sec-targeted signal sequence, the *celA* signal sequence (*sp celA*) plus a 57-nt upstream sequence next to the ATG codon was fused to *xlnB1* (pIAF907-SB1). For the Tat-targeted signal sequence, the *xlnC* signal sequence deleted from the 5' end (*sp xlnC-40*), to which the 57 nt upstream sequence complementary to the 16S rRNA, was added, was fused to *xlnB2* (pIAF907-TB2). *PxlA*, *xlnA* promoter; SD, Shine-Dalgarno sequence; dark box, operon (pIAF907-SB1TB2) under the control of the *xlnA* promoter or separately, each preceded by the *xlnA* promoter (pIAF907-SB1pATB2).

secreted through the Tat-dependent pathway compared to that of the Sec-dependent pathway. This result was surprising if we consider the half-life of a Sec precursor, which is 2 min (15), compared to the 12-min half-life for a Tat precursor (9). When this large difference in the precursor processing rate is taken into account, a lower yield will be expected for XlnB2 secreted through the Tat pathway.

However, the XlnB1 yield was threefold lower when the Tat secretion system was used than when the Sec one was used. This indicated that the Tat machinery has some difficulty in properly folding the two independent domains of XlnB1 to secrete an active enzyme.

To increase XlnB2 production through the Tat pathway as it was done for the Sec-dependent system, the *xlnC* signal sequence encoding 49 aa was reduced in size. Indeed, if 19 aa were added to the XlnC signal peptide, the precursor would probably be too long to be processed efficiently by the Tat machinery (22). It was observed that a 10-aa deletion of the N domain of the XlnC signal peptide did not affect the XlnC secretion (9). Therefore, this truncated *xlnC* signal sequence was fused to the 57 nt upstream of the *celA* signal sequence (Fig. 1). The resulting precursors will have signal peptides of 39 aa and 58 aa, respectively. With this construct, the XlnB2 yield increased 3.3-fold compared with that of IAF916B2 (Table 2). As shown above, comparable results were obtained with IAF907-SB1 containing the Sec signal sequence with a double ribosome binding site, a double translation initiation site, and the complementary sequence to the 16S rRNA.

Xylanase production by a recombinant strain containing a plasmid harboring both the Tat- and Sec-targeting signal sequences. As shown above, the independent use of the modified Sec- and Tat-targeting signal sequences increased xylanase production. We investigated whether a further increase in xylanase yield could be obtained by using both secretion systems simultaneously in the same strain. To do so, plasmid pIAF907-SB1 containing the Sec signal sequence was digested with *SacI*, and a copy of the Tat signal sequence fused with *xlnB2* was inserted at the same site. Only 24 nt separated the stop codon of *xlnB1* from the first translation initiation codon of *xlnB2*. Moreover, this region contained a ribosome binding site. This construct constituted a bicistronic operon under the control of the *xlnA* promoter (Fig. 1). A total of 350 IU/ml of xylanase was produced by strain IAF907-SB1TB2. However, it is well known that in a bicistronic operon, the second gene is generally less expressed than the first one. For this reason, a second *xlnA* promoter was introduced upstream of the *xlnB2* construct by using the plasmid pIAF907-SB1 digested with *SacI*, in which a copy of *xlnB2* fused to the *xlnA* promoter (91 nt) was inserted (Fig. 1). The resulting recombinant strain, IAF907-SB1pATB2, produced around 360 IU/ml, independently of the orientation of the two promoters. This implied that both genes in the construct under the control of a single promoter (IAF907-SB1TB2) were expressed at the same level. This value of 360 IU/ml represented (not exactly) the sum of the production of the two secretion pathways taken individually, which was expected to be around 430 IU/ml. The 70-IU/ml deficit (16% less than expected) in the xylanase production is difficult to explain when both secretion systems function simultaneously. It is not clear if either both secretion systems are equally affected or only is one preferentially affected.

As two copies of the xylanase gene present in pIAF907-SB1pATB2 increased the xylanase yield via the two secretion pathways, it was of interest to investigate whether similar results would be obtained with two copies of the gene containing either the Sec or Tat signal sequence in the same plasmid. To determine this possibility, plasmids pIAF907-SB1pASB1 and pIAF907-TB2pATB2 were constructed and used to transform *S. lividans*. In the Sec-dependent system, the xylanase production could not be measured because plasmid pIAF907-SB1pASB1 was found to be unstable in the strain. Plasmid pIAF907-TB2pATB2 was stable, and XlnB2 production increased by 45% compared with that of IAF907-TB2 containing a single copy of the gene (Table 2). The fact that the XlnB2 yield didn't double but increased only 45% indicated that the Tat translocation machinery might be saturated in this case when the Tat-dependent *xlnB2* gene was overexpressed. Thus, using a plasmid containing two copies of the same gene with a Tat signature was less efficient than a plasmid bearing two copies of the gene, one with a Tat signal sequence and the other with a Sec signal sequence.

Importance of the Tat-dependent secretion pathway in the different recombinant strains. TatC is a key component of the Tat-dependent pathway (3). A Δ *tatC* mutant of *S. lividans* 10-164 was shown to impair secretion of XlnC, which is exclusively secreted through the Tat-dependent pathway (9). To analyze the contribution of the Tat-dependent pathway to xylanase production, plasmids were used to transform protoplasts of the Δ *tatC* mutant. It should be noted that at their stationary phase, the Δ *tatC* mutant strain and *S. lividans* 10-164 showed an average optical density difference ($OD_{595} - OD_{700}$) of 0.35 and 0.5, respectively, according to their DNA content. This indicated that the growth of the strains was not comparable and that the Δ *tatC* mutation reduced the growth of the strain by 30% in the minimal medium. Therefore, the data were analyzed qualitatively, as a strict comparison was impossible. Only the results after 144 h of cultivation are shown, which represented approximately the middle of stationary phase. In the Δ *tatC* mutant, all the transformants having the Tat-targeting *xlnC* signal sequence showed a loss of xylanase production, corresponding to the contribution of the Tat-dependent pathway (Table 2). The xylanase yield of IAF907-SB1 containing a Sec-dependent signal sequence was about 20% higher than that obtained with the Δ *tatC* mutant transformed with the same plasmid. This was likely due to the inferior growth of the Δ *tatC* mutant as shown above, rather than a negative effect on the Sec-dependent pathway. However, with pIAF907-TB2, 18 IU/ml was produced by the Δ *tatC* mutant, representing 10% of the yield of IAF907-TB2 when the Tat-dependent pathway was not affected. This might indicate that XlnB2, even though it possesses a Tat-targeting signal peptide, could be partially secreted through the Sec-dependent pathway when the Tat-dependent pathway is defective. A similar event also occurred in *E. coli*, where a protein fused to a Tat-dependent signal can be translocated through the Sec-dependent pathway (26). For pIAF907-SB1TB2 and pIAF907-SB1pATB2 introduced into the Δ *tatC* mutant, there was a decrease of xylanase production of about 50% which represented approximately the loss due to the defective Tat-dependent secretion system. Considering the differential growth of both strains, the results are consistent and clearly indicate that the Tat pathway

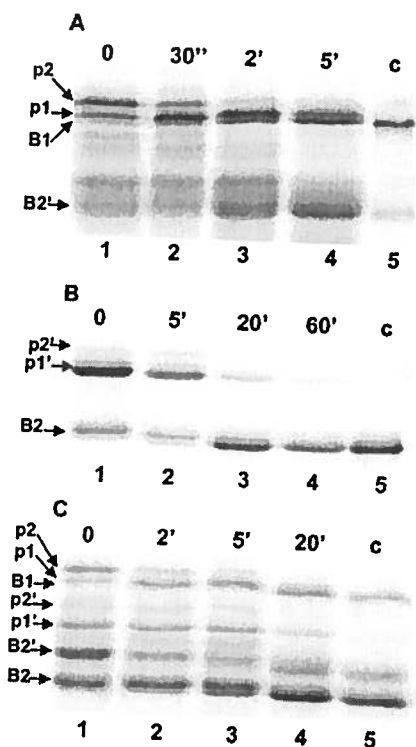


FIG. 2. Processing of pre-XlnB1 and pre-XlnB2 in *S. lividans*. *S. lividans* recombinant strains were grown in a minimal medium containing xylose as carbon source. Mycelia were pulse-labeled for 2 min with [35 S]methionine and chased with nonradioactive methionine for the indicated times. Proteins were precipitated with trichloroacetic acid and recovered with the mycelia by centrifugation. After disrupting the mycelia, xylanase-like polypeptides were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Lanes 1 to 4, xylanase processing; c, control xylanase immunoprecipitated from the culture supernatant after labeling experiment (lane 5); p1 and p2, precursor forms of XlnB1; p1' and p2', precursor forms of XlnB2; B1, XlnB1; B2, XlnB2; B2', XlnB2'. A) IAF907-SB1 transformant carrying the plasmid pIAF907-SB1 encoding XlnB1 fused to a Sec-dependent signal sequence. B) IAF907-TB2 transformant carrying the plasmid pIAF907-TB2 encoding XlnB2 fused to a Tat-dependent signal sequence. C) IAF907-SB1TB2 transformant carrying the plasmid pIAF907-SB1TB2 encoding a bicistronic operon with XlnB1 and XlnB2 coding sequences fused, respectively, to a Sec- and Tat-targeting sequence.

is functional in *S. lividans* 10-164 harboring a plasmid containing both a Sec- and a Tat-targeting signal sequence fused to the structural xylanase genes.

XlnB1 and XlnB2 precursor processing in the recombinant strains. In order to show the presence of the different precursors and follow their processing in the recombinant strains, the transformants were grown in an M14 minimal medium containing xylose as the carbon source. After 48 h of growth, the mycelia were collected and submitted to pulse-chase experiments. The mycelia were labeled with [35 S]methionine and chased. Samples were withdrawn at intervals, cells were broken, and xylanase-specific polypeptides were immunoprecipitated with anti-XlnB1 antibodies. The results of pulse-chase labeling experiments are shown in Fig. 2. In the Sec-dependent pathway with IAF907-SB1, the 34-kDa and 36-kDa precursors were labeled and disappeared during the chase with a half-life

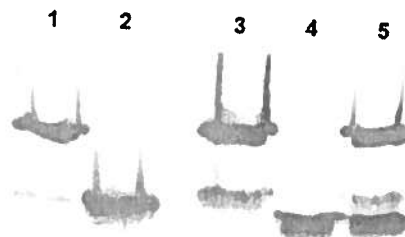


FIG. 3. Western blot analysis of extracellular xylanase produced by *S. lividans* transformants. Samples of culture supernatant (10 μ l) after 72 h of cultivation were separated by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membrane and probed with anti-XlnB1 antibodies coupled with alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin. Lane 1, control XlnB1; lane 2, control XlnB2'; lane 3, IAF907-SB1; lane 4, IAF907-TB2; lane 5, IAF907-SB1TB2.

of 2.5 min, generating the 31-kDa mature XlnB1 (Fig. 2A). This processing rate is typical for a Sec-dependent precursor in *S. lividans* (20). As shown previously (17), there was also secretion of a 23-kDa xylanase called XlnB2'. This truncated xylanase shares the same N-terminal sequence as XlnB1, indicating that XlnB2' has lost a part of the xylan binding domain (unpublished results). XlnB2' probably resulted from the degradation of XlnB1 precursors. The origin of these precursors could be the result of the premature translation termination because there is a relatively strong secondary structure in the XlnB1 mRNA just upstream of the coding sequence of the xylan binding domain. It might be also due to the proteolytic degradation of XlnB1 in the culture medium.

The experiment with IAF907-TB2 showed two XlnB2 precursors of 25 kDa and 27 kDa. The long precursor was less abundant, indicating that translation at the first initiation codon was less efficient than translation at the internal one (Fig. 2B). The half-life of the short precursor was around 12 min, which was the same as what was determined for XlnC, a typical Tat-dependent substrate (9). As the long precursor was present in low amounts, its half-life was difficult to establish, but it was similar to that of the short precursor. XlnB2 has a calculated molecular weight of 20 kDa, which is lower than that of XlnB2'. The two enzymes differ by a few amino acids at the C-terminal end, between the catalytic and the xylan binding domains.

Strain IAF907-SB1TB2, harboring the plasmid containing both the Sec and Tat signal sequences, demonstrated the same pattern and a similar processing rate of different precursors to those observed in the strain harboring plasmids containing either Sec- or Tat-dependent signal sequences alone (Fig. 2C). In this strain, XlnB1, XlnB2, and XlnB2' were produced and were secreted in the culture supernatant as shown by Western blot analysis (Fig. 3).

Although the cloning experiments were carried out in *S. lividans* 10-164 (a cellulase- and xylanase-negative mutant), it was nevertheless important to show that the xylanase activity measured in the supernatants of these transformants correlated with the presence of XlnB1, XlnB2, and XlnB2'. Western blot analyses with anti-XlnB1 serum were performed on proteins secreted in the culture supernatants of the different transformants after 72 h of growth (Fig. 3). XlnB1 and small amounts of XlnB2' were detected in the supernatants of all

transformants expressing only *xlnB1*. It is in agreement with what was found in the supernatant of the wild-type strain expressing chromosomal *xlnB1* (17). In IAF907-SB1TB2, apart from the production of XlnB1 and XlnB2', there was also production of XlnB2, which was secreted through the Tat-dependent system, as in IAF907-TB2.

In the present work, we have shown that XlnB2 of *S. lividans* was secreted efficiently through the Tat-dependent pathway, a recently described export system which transports folded proteins across the cytoplasmic membrane (2, 3). This suggests that XlnB2 folded after synthesis and was translocated as such through the Tat secretion system. XlnB2 was also equally well secreted through the Sec-dependent pathway and folded after secretion. Hence, for this enzyme, folding either prior to or after secretion led to production of an active product. This is in contrast to XlnC, which was active only when secreted through the Tat-dependent pathway (9). The results show that two related enzymes with the same substrate target are secreted by distinct protein export systems in *S. lividans*. Similarly, the alkaline phosphatase of *Thermus thermophilus* cloned in *E. coli* was Tat dependent, while the endogenous enzyme of *E. coli* was dependent on the Sec pathway for secretion (1). The distinct performance of XlnB2 and XlnC precursors in the secretion process might be due to differences in their primary structure. Two cysteine residues forming a disulfide bridge in XlnC are absent in XlnB2 (30). It is possible that the XlnC precursor may require some folding and that these two cysteine residues could form a disulfide bridge during the Tat-dependent maturation process.

In our experiments, different xylanases were produced, namely, XlnB1, XlnB2, and XlnB2', and all of them exhibited activity. In order to obtain a homogenous enzyme preparation, it would have been preferable to fuse the structural gene of *xlnB2* instead of *xlnB1* to the Sec-dependent signal sequence to produce XlnB2 exclusively. However, the difference in the molecular weight of XlnB1 and XlnB2 allowed us to clearly demonstrate the presence of Sec and Tat precursors in vivo. We have shown that the production of xylanase could be increased through the simultaneous use of the Tat- and Sec-dependent secretion pathways in *S. lividans*. These results support the potential use of this system as an efficient method for producing secreted proteins. However, it remains to be determined if this secretion technology will be useful for expression and secretion of other recombinant proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Lemay for technical assistance and C. M. Dozois and D. Cossar for critical reading of the manuscript.

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Cargene Corporation.

REFERENCES

- Angelini, S., R. Moreno, K. Gouff, C.-L. Santini, A. Yamagishi, J. Berenger, and L.-F. Wu. 2001. Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 506:103-107.
- Berks, B. C. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* 22:393-404.
- Berks, B. C., F. Sargent, and T. Palmer. 2000. The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 35:260-274.
- Binnie, C., J. D. Cossar, and D. I. Stewart. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol.* 15:315-320.
- Burton, K. 1956. A study on the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62:315-323.
- Chaddock, A. M., A. Mant, I. Karnachov, S. Brink, R. G. Herrmann, R. B. Klösgen, and 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.* 14:2715-2722.
- Danese, P. N., and T. J. Silhavy. 1998. Targeting and assembly of periplasmic and outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 32:59-94.
- Derewenda, U., L. Swenson, R. Green, Y. Wei, R. Morosoli, F. Shareck, D. Kluepfel, and Z. S. Derewenda. 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.* 269:20811-20814.
- Faury, D., S. Saldane, H. Li, and R. Morosoli. 2004. Secretion of active xylanase C from *Streptomyces lividans* is exclusively mediated by the Tat protein export system. *Biochim. Biophys. Acta* 1699:155-162.
- Gilbert, M., R. Morosoli, F. Shareck, and D. Kluepfel. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:13-39.
- Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kelder, C. J. Bruton, H. M. Keiser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77:61-68.
- Hurtubise, Y., F. Shareck, D. Kluepfel, and R. Morosoli. 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 17:367-377.
- Jeffries, T. W. 1992. Enzymatic treatment of pulp. *ACS Symp. Ser.* 476:313-329.
- Kéblir, H., C. Dupont, and R. Morosoli. 2000. Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide: dependence on box and inverted repeat sequence. *Biochim. Biophys. Acta* 1491:177-184.
- Kluepfel, D., N. Daigneault, R. Morosoli, and F. Shareck. 1992. Purification of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:626-631.
- Kluepfel, D., S. Vats-Mehta, F. Aumont, F. Shareck, and R. Morosoli. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J.* 267:45-50.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Morosoli, R., J. L. Bertrand, F. Mondou, F. Shareck, and D. Kluepfel. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 239:587-592.
- Morosoli, R., and C. Dupont. 1999. Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans*: dependence on signal peptides length, number and composition. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:437-445.
- Pagé, N., D. Kluepfel, F. Shareck, and R. Morosoli. 1996. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:109-114.
- Pagé, N., D. Kluepfel, F. Shareck, and R. Morosoli. 1996. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: dependence on number of ribosome-binding sites. *Nat. Biotechnol.* 14:756-759.
- Robinson, C., and A. Bolhuis. 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:350-356.
- Robinson, C., D. Cal, A. Hulford, I. W. Brock, D. Miel, L. Hazell, I. Schmidt, R. G. Herrmann, and R. B. Klösgen. 1994. The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO J.* 13:279-285.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanders, C., N. Wethkamp, and H. Lill. 2001. Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system. *Mol. Microbiol.* 41:241-246.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Santini, C.-L., B. Ize, A. Chanal, M. Müller, G. Giordano, and L.-F. Wu. 1998. A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 17:101-112.
- Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, and T. Palmer. 1998. Overlapping functions of components of bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17:3640-3650.

30. Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene* 107:75-82.
31. Te'o, V. S., A. E. Cziferszky, P. L. Bergquist, and K. M. Nevalainen. 2000. Codon optimization of xylanase gene *xynB* from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190:13-19.
32. Törrönen, A., and J. Rouvinen. 1995. Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 34:847-856.
33. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
34. Vilkkari, L., A. Kantellinen, J. Sundquist, and M. Linko. 1994. Xylanases in bleaching from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:335-350.