

Université du Québec

INRS - Institut ARMAND-FRAPPIER

**SECRETION DE LA XYLANASE C PAR LE SYSTEME
TAT CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS***

Par

DAMIEN FAURY

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

LALIBERTE Jean-François
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

BEAULIEU Carole
Département de Biologie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

MOROSOLI Rolf
Institut Armand-Frappier

© droits réservés de Faury Damien, 2003

« Et quand on ne peut revenir en arrière, on ne doit se préoccuper que de la meilleure manière d'aller de l'avant. »

Et il conclut en prononçant le mot mystérieux : « Mektoub ! »

Paulo Coelho, L'Alchimiste (1988)

Résumé

Les Streptomycètes sont des bactéries Gram positives produisant de nombreuses protéines extracellulaires en grande quantité. Les travaux antérieurs menés sur la sécrétion des protéines chez *Streptomyces lividans* ont uniquement porté sur le système de sécrétion général ou GSP (*General Secretory Pathway*) qui sécrète des protéines non repliées. La protéine qui est exportée par ce système est synthétisée sous la forme d'un précurseur formé de la protéine mature allongée à son extrémité N-terminale d'une séquence plus ou moins longue appelée peptide signal. Ce dernier est clivé lors du processus de maturation du précurseur et permet de libérer dans le milieu extracellulaire la protéine mature. Récemment, un nouveau système de sécrétion a été mis en évidence chez les bactéries. Le précurseur des protéines qui emprunte ce système contient un peptide signal caractéristique contenant la séquence signature consensus **S/T-R-R-X-F-L-K**. Du fait de la présence d'un doublet d'arginine, cette nouvelle voie de sécrétion porte le nom de système TAT pour « *Twin Arginine Translocation* ». Le système TAT se différencie du système GSP par sa capacité à sécréter des protéines déjà repliées.

Le peptide signal de la xylanase C (XlnC) de *S. lividans* contient la séquence **S-R-R-G-F-L-G** qui ressemble à la séquence consensus TAT, ce qui laisse supposer que la XlnC est probablement sécrétée par le système TAT.

Comme *S. lividans* produit de très faibles quantités de XlnC comparativement aux xylanases A et B, la production de XlnC devait être améliorée avant de pouvoir étudier en détails sa sécrétion. Ainsi, le remplacement du promoteur du gène *xlnC* par celui du gène *xlnA* augmente de 3 fois la production de XlnC. Cette construction servira de base pour la présente étude.

L'étude de la sécrétion de la XlnC se fait par la technique du « pulse-chase » qui permet de suivre la maturation du précurseur en protéine mature. Le précurseur de la XlnC a une demi-vie d'environ 15 min et sa maturation semble sensible au carbonyl cyanamide *m*-chlorophénylhydrazone (CCCP) mais pas à l'azoture de sodium (NaN₃) ce qui est typique

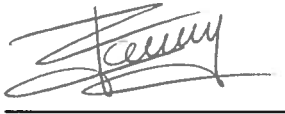
du système de sécrétion TAT. L'introduction de mutations au niveau du doublet d'arginine spécifique du système TAT n'abolit pas complètement la sécrétion de la XlnC mais s'accompagne d'une forte dégradation cytoplasmique du précurseur. La présence du doublet d'arginine est donc importante pour la sécrétion de la XlnC. La fusion de la XlnC avec un peptide signal de type GSP comme celui de la XlnA ne permet pas la sécrétion de la XlnC ce qui démontre que cette dernière est exclusivement sécrétée par le système TAT.

Généralement, l'extrémité N-terminale des peptides signaux de type TAT est plus longue que celle des peptides signaux de type GSP. Afin de mieux comprendre le rôle de cette région, des délétions ont été effectuées dans la région-n du peptide signal de la XlnC. La délétion des 15 premiers acides aminés du peptide signal affecte faiblement la production d'enzyme. Par contre, la délétion des 20 premiers a.a. abolit la sécrétion de la XlnC. Il faut au moins 5 a.a. précédant la signature TAT pour permettre au peptide signal d'être encore fonctionnel. La région-n possède 4 a.a. chargés qui ont été remplacés par des a.a. non chargés afin d'en évaluer l'importance. L'annulation des charges permet d'augmenter la production de XlnC. Une production record de l'ordre de 100 UI.ml^{-1} est atteinte lorsque les deux charges négatives sont supprimées. Cependant, le rôle des charges de la région-n reste encore obscur.

La région-c d'un peptide signal de type GSP contient une séquence A-X-A relativement bien conservée reconnue spécifiquement par une signal peptidase membranaire. Le peptide signal de la XlnC contient la séquence AHA. La modification du site de clivage n'entraîne qu'une légère baisse de production alors qu'elle inhibe la sécrétion des protéines dépendant du système GSP. Ceci suggère que la signal peptidase du système TAT ait une moins grande spécificité que celle du système GSP.

Comme la XlnB2 possède 75 % d'identité avec la XlnC, il était intéressant de voir si cette protéine normalement sécrétée par le système GSP pouvait l'être par le système TAT. Effectivement, lorsque le peptide signal de la XlnB2 est remplacé par celui de la XlnC, la XlnB2 se comporte comme la XlnC. De plus, les mutations introduites au niveau des

charges du peptide signal de la XlnC ont le même effet sur la production de XlnB2 que sur celle de la XlnC. Cependant, lorsque le peptide signal de la XlnC est délété de ses 20 premiers a.a., la XlnB2 semble à nouveau se rediriger vers le système GSP.



Etudiant



Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Rolf Morosoli pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Je le remercie également pour ses nombreux conseils, ses encouragements répétés (« Courage, on lâche pas ») et sa grande disponibilité tout au long de mon passage dans son équipe.

Je voudrais également remercier chaleureusement mes deux partenaires de laboratoire qui sont devenus de bons amis. Merci, Johanne pour ta grande gentillesse et ton aide précieuse tout au long de mon projet de recherche. Je me rappellerai longtemps des phrases du style « radioactivité dans A dans 2 min ». Cette complicité amicale me fera certainement regretter les parties de « pulse-chase »... Merci enfin, au jeune retraité Serge. Grâce à toi, j'ai été mis sur les bons rails dès mon arrivée au laboratoire. Je suis content d'avoir été ton dernier « étudiant ».

De ces deux années passées
à l'Institut Armand-Frappier,
je me souviens...

Table des Matières

RESUME	iii
REMERCIEMENTS	vi
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES APPENDICES.....	xiv
ABRÉVIATIONS	xv
INTRODUCTION	1
PARTIE I : REVUE DE LITTERATURE	6
1- LE SYSTÈME GÉNÉRAL DE SÉCRÉTION DES PROTÉINES	7
1-1- LE PEPTIDE SIGNAL	7
1-1-1- <i>Longueur du peptide signal</i>	7
1-1-2- <i>Organisation du peptide signal</i>	9
1-1-3- <i>Rôles du peptide signal</i>	10
1-2- LES COMPOSANTES DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION GÉNÉRAL	13
1-2-1- <i>SecB</i>	13
1-2-2- <i>SecA</i>	14
1-2-3- <i>La translocase membranaire SecYEG</i>	15
1-2-4- <i>SecD et SecE</i>	16
1-3- ENERGIE ET TRANSLOCATION	19
1-4- LES SIGNAL PEPTIDASES.....	22
2- LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION SRP CHEZ LES BACTÉRIES	22
3- LE REPLIEMENT DES PROTÉINES	24
4- LE SYSTÈME TWIN-ARGININE.....	25
4-1- LE PEPTIDE SIGNAL DE TYPE TAT	26
4-1-1- <i>La région-n</i>	26
4-1-2- <i>La séquence signature conservée</i>	27
4-1-2-1- Le doublet d'arginine.....	27
4-1-2-2- Les autres résidus	28
4-1-2-3- Rôle de la séquence conservée	31
4-1-3- <i>La région-h</i>	31
4-1-4- <i>La région-c</i>	32
4-2- INSERTION DES COFACTEURS ET REPLIEMENT DES PROTÉINES.....	32
4-2-1- <i>Insertion des cofacteurs</i>	33
4-2-2- <i>Des protéines sans cofacteur</i>	34

4-2-3-	<i>Cas des protéines oligomériques</i>	34
4-2-4-	<i>Des précurseurs déjà sous leur forme actives</i>	35
4-3-	COMPOSANTES DU SYSTÈME TAT.....	35
4-3-1-	<i>Organisation des gènes tat</i>	35
4-3-2-	<i>Les homologues TatA/B/E</i>	36
4-3-3-	<i>La protéine TatC</i>	36
4-3-4-	<i>La translocase membranaire TAT</i>	37
4-3-5-	<i>Système de contrôle du repliement des protéines</i>	38
4-4-	ÉNERGIE.....	41
4-5-	INTERSPÉCIFICITÉ DU SYSTÈME TAT ENTRE LES ESPÈCES.....	41
4-6-	COMPARAISON ENTRE LES SYSTÈMES TAT ET ΔPH-DÉPENDANT.....	42
4-7-	COMPARAISON ENTRE LES SYSTÈMES TAT ET GSP.....	43
4-8-	LE SYSTÈME TAT CHEZ LES <i>STREPTOMYCÈTES</i>	45

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.....47

1-	DESCRIPTION DES SOUCHES BACTÉRIENNES ET DES VECTEURS UTILISÉS.....	48
1-1-	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	48
1-2-	<i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i>	50
2-	MILIEUX DE CULTURE.....	50
2-1-	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	50
2-2-	<i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i>	51
2-2-1.	<i>Milieux liquides</i>	51
2-2-2-	<i>Milieux solides</i>	51
3-	MANIPULATIONS DE L'ADN.....	52
3-1-	RÉACTION DE PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	52
3-2-	DIGESTION ENZYMATIQUE ET CONTRÔLE PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE.....	55
3-3-	EXTRACTION D'UN FRAGMENT D'ADN SÉPARÉ SUR GEL D'AGAROSE.....	55
3-4-	LIGATION.....	55
3-5-	TRANSFORMATION DES CELLULES.....	56
3-5-1-	<i>Escherichia coli</i>	56
3-5-2-	<i>Streptomyces lividans</i>	56
3-6-	PURIFICATION DE L'ADN PLASMIDIQUE.....	57
3-6-1-	<i>Escherichia coli</i>	57
3-6-2-	<i>Streptomyces lividans</i>	58
3-7-	MUTAGENÈSE DIRIGÉE SELON KUNKEL.....	58
3-8-	HYBRIDATION DES COLONIES PAR SONDAS RADIOACTIVES.....	62
4-	VÉRIFICATION DES SÉQUENCES.....	63
5-	DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES XYLANASES.....	63
5-1-	CONDITIONS DE CULTURE DES SOUCHES.....	63
5-2-	DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	63
5-3-	TEST DE L'ACTIVITÉ XYLANASIQUE SUR GEL DE RBB-XYLANE.....	66
5-4-	DOSAGE DE L'ADN.....	66
6-	WESTERN BLOT.....	67
7-	PULSE-CHASE.....	68

PARTIE III : RESULTATS.....	70
1- LE PEPTIDE SIGNAL DE LA XYLANASE C.....	71
2- AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION DE XYLANASE C	74
2-1- REMPLACEMENT DU PROMOTEUR DU GÈNE DE LA <i>XLNC</i>	77
2-2- MODIFICATION DU GÈNE DE STRUCTURE DE LA <i>XLNC</i>	79
2-3- REMPLACEMENT DU GÈNE <i>XLNC</i> PAR CELUI DU GÈNE <i>XLNB2</i>	90
2-4- CHOIX DU CLONE DE RÉFÉRENCE	94
3- SÉCRÉTION DE LA XYLANASE C PAR LE SYSTÈME TAT	94
3-1- MATURATION DU PRÉCURSEUR DE LA <i>XLNC</i>	94
3-2- MUTATIONS DU DOUBLET D'ARGININE DU SITE TAT.....	101
3-3- UNE PROTÉINE INDÉPENDANTE DU SYSTÈME GSP.....	112
4- ÉTUDE DE LA RÉGION-N DU PEPTIDE SIGNAL DE LA <i>XLNC</i>	120
4-1- DÉLÉTIONS AU SEIN DE LA RÉGION-N.....	120
4-2- MODIFICATIONS DES A.A. CHARGÉS DE LA RÉGION-N DU PEPTIDE SIGNAL DE LA <i>XLNC</i>	128
5- MODIFICATION DU SITE DE CLIVAGE DE LA SIGNAL PEPTIDASE	138
6- MODIFICATIONS DU PEPTIDE SIGNAL DE LA XYLANASE C ET SÉCRÉTION DE LA <i>XLNB2</i>	144
PARTIE IV : DISCUSSION	157
1- LA PRODUCTION DE XYLANASE C PEUT ÊTRE AMÉLIORÉE	158
2- LA XYLANASE C DÉPEND EXCLUSIVEMENT DU SYSTÈME TAT POUR SA SÉCRÉTION.....	158
2-1- LA <i>XLNC</i> EST SÉCRÉTÉE PAR LE SYSTÈME TAT.....	158
2-2- LA SÉQUENCE SIGNATURE TAT EST IMPORTANTE	161
2-3- LA <i>XLNC</i> NE PEUT PAS ÊTRE SÉCRÉTÉE PAR LA VOIE GSP	163
3- LA RÉGION-N A ENCORE UN RÔLE OBSCUR	165
4- LE SITE DE CLIVAGE DE LA SIGNAL PEPTIDASE EST PEU SPÉCIFIQUE .	168
5- LA XYLANASE B2 PEUT ÊTRE SÉCRÉTÉE PAR LE SYSTÈME TAT	169
CONCLUSION.....	171
APPENDICES	174
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	197

Liste des figures

Figure 1 :	Cycle de vie de <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2).....	5
Figure 2 :	Organisation tripartie des peptides signaux de type GSP et TAT.....	12
Figure 3 :	Les voies de sécrétion GSP et SRP.....	18
Figure 4 :	Cycle d'insertion / désinsertion de SecA au niveau de la tranlocase GSP.....	21
Figure 5 :	Distribution des a.a. les plus fréquemment rencontrés dans la séquence consensus du site TAT.....	30
Figure 6 :	La voie de sécrétion TAT.....	40
Figure 7 :	Mutagenèse dirigée par la méthode de la PCR recombinante ou "emboîtée".....	54
Figure 8 :	Mutagenèse dirigée selon la méthode décrite par Kunkel.....	61
Figure 9 :	Séquence des peptides signaux des XlnC et XlnA.....	73
Figure 10 :	Activité xylanasiq ue des clones IAF20 et IAF916C.....	76
Figure 11 :	Structures secondaires retrouvées au niveau de l'ARNm de la XlnC.....	81
Figure 12 :	Activité xylanasiq ue des clones dont le gène de structure de la XlnC a été modifié dans le but de supprimer les structures secondaires de l'ARNm...	85

Figure 13 :	Tailles des protéines synthétisées si des glissements de cadre de lecture se produisent au niveau de l'ARNm de la XlnC.....	88
Figure 14 :	Activité xylanasiqne obtenue suite au remplacement de la partie mature de la XlnC par la XlnB2.....	93
Figure 15 :	Maturation du précurseur de la XlnC et sensibilité du processus à l'azote de sodium.....	97
Figure 16 :	Effet du CCCP sur la maturation du précurseur de la XlnC du clone IAF916C.....	100
Figure 17 :	Effet de la modification du doublet d'arginine du peptide signal de la XlnC sur la production de l'enzyme.....	104
Figure 18 :	Maturation du précurseur de la XlnC dont la première arginine du site TAT a été remplacée par une lysine.....	109
Figure 19 :	Western-blot des surnageant de culture des clones IAF916C(R-27K) et IAF916C(R-27K.R-26K).....	111
Figure 20 :	Western Blot des surnageants de culture des clones IAF916C, IAF906C et IAF917C.....	114
Figure 21 :	Maturation du précurseur de la XlnC contenant le peptide signal de type GSP de la XlnA.....	117
Figure 22 :	Recherche d'activité xylanasiqne sur gel de RBB-xylane.....	119
Figure 23 :	Influence des délétions de la région-n du peptide signal de la XlnC sur la production de l'enzyme.....	124

Figure 24 :	Maturation du précurseur de la XlnC dont le peptide signal a été délété de ses 20 premiers a.a. et effet de l'azoture de sodium sur ce processus.....	127
Figure 25 :	Influence de la l'annulation individuelle des charges de la région-n du peptide signal sur la production de XlnC.....	131
Figure 26 :	Maturation du précurseur de la XlnC dont la seconde charge négative a été annulée.....	134
Figure 27 :	Influence de l'annulation des charges de la région-n du peptide signal sur la production de XlnC.....	137
Figure 28 :	Influence de la modification du site de clivage de la signal peptidase sur la production de XlnC et XlnB2.....	141
Figure 29 :	Maturation du précurseur de la XlnC dont le site de clivage de la signal peptidase a été modifié.....	143
Figure 30 :	Maturation du précurseur de la XlnB2 contenant le peptide signal normal de la XlnC ou sa version mutée au niveau de la première arginine.....	146
Figure 31 :	Influence de la modification des charges du peptide signal de la XlnC sur la production de XlnB2.....	149
Figure 32 :	Influence de la délétion des 20 premiers a.a. du peptide signal de la XlnC sur la production de XlnB2.....	152
Figure 33 :	Maturation du précurseur de XlnB2 contenant le peptide signal de la XlnC délété de ses 20 premiers a.a.	154

Liste des tableaux

Tableau I :	Charges et longueurs moyennes de peptides signaux de différentes bactéries.....	8
Tableau II :	Principaux points de comparaison possibles entre les systèmes GSP et TAT.....	44
Tableau III :	Souches de <i>Escherichia coli</i> utilisées au cours du projet de recherche.....	49
Tableau IV :	Dosage de l'activité xylanase des surnageants de culture. Composition de la gamme étalon en xylose et des tubes "essai" et "témoin" des échantillons.	65
Tableau V :	Amorces utilisées pour amplifier la séquence correspondant au peptide signal et à la partie mature de la XlnC.	78
Tableau VI :	Amorces utilisées pour modifier le gène de structure de la XlnC par PCR recombinante.	83
Tableau VII :	Amorces utilisées pour muter le peptide signal de la XlnC.....	102
Tableau VIII :	Amorces utilisées pour déléter par PCR l'extrémité N-terminale du peptide signal de la XlnC.....	121
Tableau IX :	Récapitulatif de toutes les modifications apportées à la séquence du peptide signal de la XlnC	156

Listes des appendices

Appendice A :	Séquence nucléotidique du gène de la XInC et sa traduction en a.a.	176
Appendice B :	Symbole des a.a.....	178
Appendice C :	Code génétique et fréquence de l'emploi des codons chez <i>Streptomyces</i>	180
Appendice D :	Carte du phagemide pTZ19U.....	182
Appendice E :	Caractéristiques des plasmides utilisés chez <i>E. coli</i> et construits à partir du pTZ19U.....	184
Appendice F :	Carte du plasmide pIJ702.....	186
Appendice G :	Caractéristiques des plasmides utilisés chez <i>S. lividans</i> et construits à partir du pIJ702.....	188
Appendice H :	Compositions des milieux de culture solides et liquides utilisés..	190
Appendice I :	Compositions des tampons d'électrophorèse.....	194
Appendice J :	Composition des tampons pour les expériences de « pulse-chase ».	196

Liste des abréviations

Å : Angström
a.a. : acide aminé
ADN : Acide DesoxyriboNucléique
ADP : Adénosine Di-Phosphate
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
° C : degré Celsius
CCCP : Carbonyl Cyanamide *m*-ChloroPhenylhydrazone
Ci : Curie
DO : Densité Optique
DNS : acide dinitrosalicylique
EDTA : Acide (EthyleneDinitrilo)Tetraacétique
g : gramme et ses subdivisions **mg** (milligramme), **µg** (microgramme)
GFOR : Glucose-Fructose Oxydo-Reductase de *Zymomonas mobilis*
GFP : Green Fluorescent Protein
GSP : General Secretory Pathway
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
h : heure
kb : kilobase
kcal : kilocalorie
kDa : kiloDalton
min : minute
ml : millilitre
mol : mole et ses subdivisions **mmol** (millimole), **µmol** (micromole), **nmol** (nanomole), **pmol** (picomole)
nm : nanomètre
qsp : quantité suffisante pour
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PhoD : PhosphoDiesterase de *Bacillus subtilis*
RBB : Remazol Brilliant Blue
rpm : rotation par minute
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
sec : seconde
TAT : Twin-Arginine Translocation
TCA : Acide TriChloroacétique
TorA : Triméthylamine N-Oxyde Reductase de *Escherichia coli*
UI : unité enzymatique internationale
UTP : Uracil Tri-Phosphate
XlnA : Xylanase A
XlnB : Xylanase B
XlnB2 : Xylanase B dépourvue de son domaine de liaison au xylane
XlnC : Xylanase C

INTRODUCTION

Le genre *Streptomyces* appartient à la famille des Actinomycètes. Les membres de cette famille sont des bactéries Gram positives dont le génome est riche en GC. Le génome de l'espèce *Streptomyces coelicolor* A3(2) dont le séquençage a été récemment terminé, est composé de 8 667 507 pb dont 72 % de GC (Bentley *et al.*, 2002). Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses, ubiquitaires dans la nature mais surtout saprophytes du sol car leur croissance sous forme d'hyphe leur confère un avantage pour la colonisation de cet habitat. Le cycle de vie des *Streptomyces* est l'une des caractéristiques du genre (voir fig.1). En conditions favorables, un ou deux tubes germinaux émergent de la spore. La croissance apicale et axillaire de ces tubes permet la formation d'un mycélium qui après 2-3 jours donne un hyphe aérien. L'extrémité de chaque hyphe forme un syncytium en forme de spirale qui contient plusieurs dizaines de génomes. A la fin de cette phase de croissance aérienne, l'hyphe se divise en compartiments qui pourront donner à nouveau des spores.

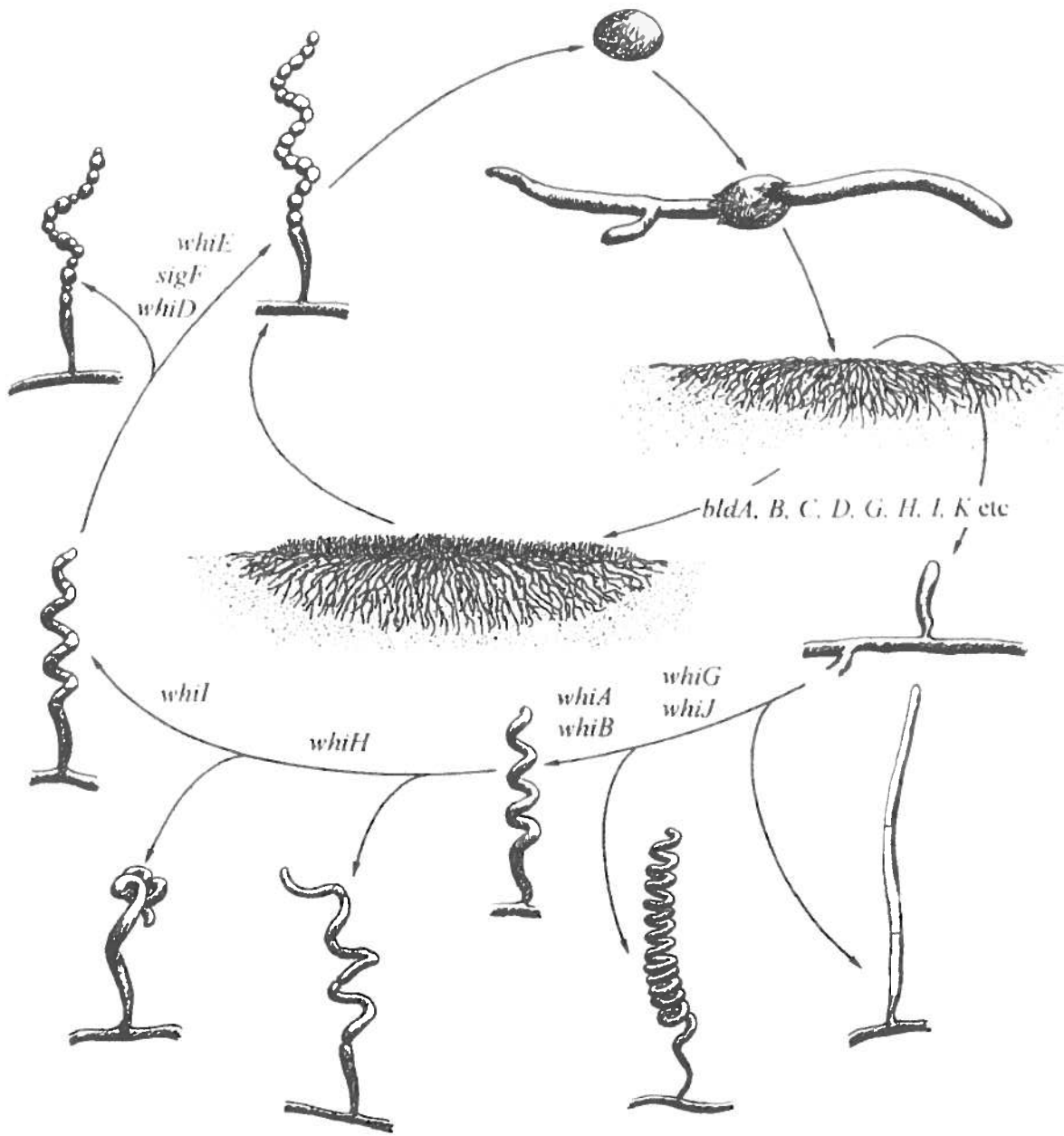
Les *Streptomyces* possèdent un important potentiel industriel grâce à la diversité et aux quantités de composés produits. Ainsi, les *Streptomyces* produisent plus de 50 % des antibiotiques de la pharmacopée disponible actuellement. Ils sont également réputés pour leur système de sécrétion des protéines qui est très efficace. Ces protéines sont souvent des enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de nombreux biopolymères. De nombreux gènes d'intérêt ont pu être surexprimés chez *S. lividans* permettant la production d'importantes quantités de protéines homologues et hétérologues (Gilbert *et al.*, 1995). L'efficacité accrue de la machinerie de sécrétion des *Streptomyces* comparativement à celle des bactéries comme *Escherichia coli* peut s'expliquer par l'absence d'espace périplasmique dans le cas des bactéries Gram positives (Gilbert *et al.*, 1995). Les protéines produites par les *Streptomyces* traversent la membrane plasmique et se retrouvent directement dans le milieu extracellulaire, ce qui facilite leur récupération. Les protéines produites par les bactéries Gram négatives doivent traverser la membrane interne, le périplasma puis la membrane externe avant de se retrouver dans le milieu extracellulaire. L'efficacité de production est donc diminuée car les protéines peuvent rester prisonnières dans le périplasma ou dans le cytoplasme sous forme de corps d'inclusion dont la récupération n'est pas toujours facile.

Notre équipe s'intéresse particulièrement à *S.lividans* pour sa capacité à produire de nombreuses enzymes extracellulaires comme les cellulases et les hémicellulases impliquées dans la dégradation de la lignocellulose. Certaines enzymes comme les xylanases ont la capacité de dégrader spécifiquement l'hémicellulose du bois. Ces enzymes sont à la base d'un procédé biotechnologique mis au point pour le bio-blanchiment des pâtes à papier en remplacement de produits polluants à base de chlore (Viikari et al., 1991). L'étude de la sécrétion des protéines chez *S. lividans* revêt donc un grand intérêt. Tous les travaux antérieurs de notre équipe ont porté sur le système de sécrétion général (GSP). Récemment, un nouveau système de sécrétion, le système TAT, a été mis en évidence chez les bactéries. Cette voie de sécrétion des protéines présente des caractéristiques relativement différentes du système classique ce qui ouvre de nouvelles perspectives très intéressantes. Le peptide signal de la XlnC de *S. lividans* possède des éléments qui laissent supposer que cette protéine est sécrétée par le système TAT. Au cours de nos recherches, nous nous sommes surtout intéressés à la XlnC et à son peptide signal. Le projet présenté dans les pages suivantes ouvre le chapitre des recherches sur la sécrétion des protéines via le système TAT chez *S. lividans*.

Figure 1 : Cycle de vie de *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Les gènes *bld* (*bldA, B, C, D, G, H, I, K, ...*) sont responsables de la croissance aérienne de l'hyphe. Les gènes *whi* (*whiA, B, G, H, I et J*) régulent la septation de l'hyphe et la sporulation. Les gènes *sigF* et *whiD* sont impliqués dans la formation de la membrane de la spore. Le gène *whiE* est responsable du pigment gris qui recouvre les spores. Les phénotypes de quatre mutants bloqués à différentes étapes du cycle de vie sont représentés dans le bas de la figure (flèches sortant du cycle).

(d'après *Kieser et al., 2000*)



PARTIE I

REVUE DE LITTERATURE

Le thème de la sécrétion des protéines étant un sujet très vaste, la revue de littérature suivante se limite volontairement à la sécrétion des protéines chez les bactéries. Seuls les deux systèmes de sécrétion les plus connus à savoir les voies GSP, SRP ainsi que le système TAT sur lequel est centré la présente étude seront considérés.

1- Le système général de sécrétion des protéines

Le système GSP est la voie générale de sécrétion des protéines extracytoplasmiques chez les bactéries. Les protéines extracytoplasmiques regroupent les protéines membranaires, périplasmiques et extracellulaires. Les protéines sécrétées par cette voie sont généralement non repliées au moment de leur sécrétion et acquièrent leur structure finale à leur lieu de localisation. Les protéines extracytoplasmiques sont synthétisées sous forme de précurseurs protéiques ou préprotéines qui contiennent une extrémité N-terminale appelée peptide signal. Ce peptide signal assure l'adressage des protéines en direction de la machinerie sécrétoire insérée dans la membrane cytoplasmique. Au cours du processus de sécrétion, le peptide signal interagit avec les composants du système de sécrétion puis est ensuite clivé par une signal peptidase membranaire libérant ainsi la forme mature de la protéine.

1-1- Le peptide signal

1-1-1- Longueur du peptide signal

La longueur du peptide signal peut varier d'une préprotéine à l'autre (voir tableau I). Chez *E. coli*, la longueur moyenne du peptide signal est de 25 a.a. (Berks et al., 2000). Les peptides signaux des bactéries Gram + sont légèrement plus grands puisque leur longueur moyenne est comprise entre 29 et 31 a.a. (von Heijne and Abrahmsen, 1989). Chez *S. lividans*, la longueur moyenne des peptides signaux est de 35 a.a. (Gilbert et al., 1995). On retrouve même chez *Streptomyces* des peptides signaux "géants" : 56 a.a. pour la β -galactosidase de *S. lividans* (Eckhardt et al., 1987) et 70 a.a. pour la CMCCase de *S.sp.KSM-9* (Nakai et al., 1988).

	Charge nette totale	Longueur (en nombre d'a.a.)			
		Total	région-n	région-h	région-c
<i>Escherichia coli</i>	+ 2.0	25	5-6	12	6
<i>Bacillus subtilis</i>	+ 3.0	29-31	7-8	≥ 15	nd
<i>Streptomyces. ssp</i>	+ 3.5	35	12	≥ 15	nd

Tableau I : Charges et longueurs moyennes de peptides signaux de différentes bactéries. nd, donnée non disponible (tableau inspiré de *Simonen et Palva, 1993* et *Gilbert et al., 1995*).

1-1-2- Organisation du peptide signal

Les peptides signaux des protéines sécrétées par le système GSP ne possèdent pas de séquences peptidiques particulières ou conservées (Izard *et al.*, 1994). Même s'il existe une grande hétérogénéité au niveau de la longueur et de la séquence des peptides signaux, on peut diviser un peptide signal en trois zones (von Heijne, 1985), comme illustré sur la figure 2a.

- L'extrémité N-terminale du peptide signal, ou région-n est une région courte et hydrophile (Pugsley, 1993). Elle peut contenir des résidus chargés positivement tels que Lys et Arg (Fekkes et Driessen, 1999) qui améliorent l'efficacité de translocation sans pour autant se révéler indispensables puisque l'introduction de résidus neutres ou chargés négativement n'annihile pas complètement la sécrétion (Gennity, 1990). La zone *n* des peptides signaux des bactéries Gram + est généralement plus riche en a.a. basiques que ceux de leurs homologues des bactéries Gram - (Simonen et Palva, 1993). De Vrije *et al.* (1990) ont suggéré que cette zone positivement chargée pouvait interagir avec les groupements négatifs de la double couche lipidique de la membrane cytoplasmique. Le rapport unité de charge sur unité de longueur de cette zone varie cependant peu d'un peptide signal à l'autre (von Heijne, 1985).

- Le domaine central du peptide signal ou région-h est la partie la plus importante du peptide signal (Fekkes et Driessen, 1999). Chez *E. coli*, elle comprend de 7 à 15 a.a.. L'augmentation de la taille et de l'hydrophobicité de cette région améliore l'efficacité de translocation (Chou *et al.*, 1990) et dans certains cas suffit à contrebalancer l'effet de certaines mutations situées au sein des régions *n* et *c* terminales du peptide signal (Puglsey, 1993; Fekkes et Driessen, 1999). Inversement, la diminution de la taille et/ou de l'hydrophobicité du domaine *h*, en introduisant des résidus chargés ou polaires notamment, diminue l'efficacité de la sécrétion (Pugsley, 1993). Ce domaine forme une structure en hélice α , riche en résidus hydrophobes (von Heijne, 1985). La présence d'un résidu proline au milieu du domaine *h* brise la conformation en hélice α . Cette rupture permettrait au peptide signal d'adopter une structure en épingle à

cheveux qui faciliterait l'insertion de la préprotéine au niveau de la membrane cytoplasmique (*Fekkes et Driessen, 1999*).

- L'extrémité C-terminale du peptide signal ou région-c contient le site de clivage de la signal peptidase. Au cours de la sécrétion, cette dernière va scinder la préprotéine en deux entités : le peptide signal qui est dégradé par plusieurs peptidases (*von Heijne et al., 1990*) et la protéine mature qui est relarguée dans le milieu extérieur. Alors que les régions n et h ne présentent aucune séquence signature particulière, la zone de clivage exige souvent une courte séquence spécifique généralement du type Ala-X-Ala (*Fekkes et Driessen, 1999*).

1-1-3- Rôles du peptide signal

Le peptide signal permet d'augmenter les interactions spécifiques d'une préprotéine avec les différentes composantes du système GSP. Il possède deux fonctions principales. Premièrement, il permet d'identifier une protéine comme destinée à l'exportation (*Müller et al., 2001; Schatz et Dobberstein, 1996*). Il agirait donc comme un signal de reconnaissance pour la machinerie GSP. Deuxièmement, le peptide signal retarde le repliement de la partie mature de la protéine (*Park et al., 1988; Hardy et Randall, 1991*) permettant aux premières composantes de la voie GSP d'interagir avec la partie mature de la protéine à sécréter.

Figure 2 : Organisation tripartite des peptides signaux de type GSP et TAT.

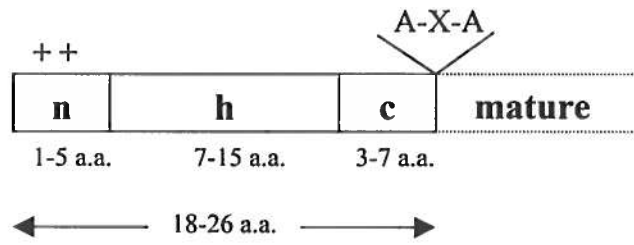
n, région-n; h, région-h hydrophobe; c, région-c avec son site de clivage A-X-A. Les charges de la région-n sont identifiées par + ou -.

a) peptide signal de type GSP.

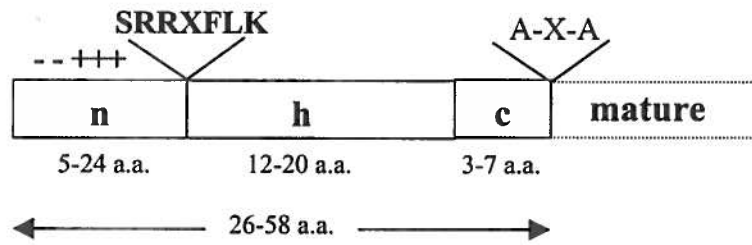
b) peptide signal de type TAT, la séquence consensus est en caractère gras.

(figure inspirée de *Fekkes et Driessen, 1999*).

a)



b)



1-2- Les composantes du système de sécrétion général

Pour étudier et comprendre le système GSP, de nombreuses souches mutantes d'*E. coli* ont été construites. Ces souches déficientes, appelées souches *Prl* (*Protein Localization*), ont contribué à préciser la nature et le rôle des composantes du système GSP. Les délétions occasionnées ont permis d'identifier les gènes *prlD* (*secA*), *prlA* (*secY*), *prlE* ou *G* (*secE*) et *prlH* (*secG*) (*Fikes et Bassford, 1989; Ito et al., 1983; Riggs et al., 1988; Stader et al., 1989, Brundage et al., 1990; Bieker et al., 1990a*). Le gène *secB* ainsi que l'opéron *secDFYajC* sont également impliqués dans le système GSP (*Kumamoto et Beckwith, 1983; Gardel et al., 1990; Pogliano et Beckwith, 1994*). Au total, le système GSP comprend donc huit protéines qui interviennent successivement ou de manière conjointe pour permettre la sécrétion des protéines : SecB, SecA, SecY, SecE, SecG, SecD, SecF et YajC.

1-2-1- SecB

SecB est la première protéine à interagir avec la préprotéine. C'est une protéine oligomérique composée de quatre sous-unités de 17 kDa chacune (*Watanabe et Blobel, 1989a; Kumamoto et Nault, 1989*). SecB est exclusivement retrouvée dans le cytoplasme des bactéries Gram - (*Wickner et al., 1991*) mais semble absente de celui des bactéries Gram + (*Fekkes et Driessen, 1999; Müller et al., 2001*). Chaque cellule contient en moyenne 1200 copies du tétramère (*Shimidzu et al., 1997*). SecB est capable de se lier à la plupart des préprotéines extramembranaires (*Kumamoto 1989 et 1991*) mais également aussi à quelques rares protéines cytosoliques (*Mac Intyre et al., 1991*). Certaines préprotéines dont le peptide signal a été altéré ou supprimé nécessitent absolument SecB pour leur sécrétion (*Flower et al., 1994; Prinz et al., 1996*). SecB se lierait à la partie mature de la préprotéine (*Randall et Hardy, 1995*) bien que certains résultats aient montré une possible interaction entre SecB et le peptide signal (*Watanabe et Blobel, 1989b et 1995; Altman et al., 1990*).

SecB joue deux rôles dans la sécrétion des protéines. La fonction principale de SecB est de diriger la préprotéine vers la translocase membranaire. En effet, SecB est capable

d'interagir avec une autre protéine de la voie GSP, la protéine SecA qui constitue la porte d'entrée de la translocase membranaire (Müller *et al.*, 2001; Driessen *et al.*, 1998). La seconde fonction de SecB est de jouer le rôle de protéine chaperonne (Collier *et al.*, 1988, Weiss *et al.*, 1988; Lecker *et al.*, 1990). La voie GSP sécrète uniquement des protéines non repliées. Or, les protéines destinées à l'exportation peuvent contenir des domaines hydrophobes ou hydrophiles occasionnant des repliements incompatibles avec la translocation membranaire. Les protéines chaperonnes vont maintenir les préprotéines dans un état déplié compatible avec la sécrétion par le système GSP. SecB est considérée comme la protéine chaperonne majeure impliquée dans la voie GSP. D'autres chaperonnes sont impliquées dans la sécrétion des protéines comme DnaK, DnaJ, GroES, GroEL, GrpE et le "trigger factor" (Fekkes *et Driessen*, 1999; Danese *et Silhavy*, 1998; Shatz *et Dobberstein*, 1996, Pugsley, 1993, Altman *et al.*, 1991). Même si ces chaperonnes secondaires maintiennent la protéine dans un état déplié, elles ne peuvent se substituer à SecB puisqu'elles sont incapables d'adresser la préprotéine vers SecA (Pugsley, 1993; Fekkes *et Driessen*, 1999).

1-2-2- SecA

SecA est une protéine homodimérique de 102 kDa, retrouvée chez toutes les bactéries, exceptées chez les *Archaeobacteries* (Müller *et al.*, 2001). En moyenne, une cellule comprend 1250 à 2500 copies de SecA (Matsuyama *et al.*, 1990). Indispensable à la sécrétion des protéines par la voie GSP, SecA est considérée à juste titre comme la protéine clé de ce mode de sécrétion. Elle fixe puis hydrolyse l'ATP (Lill *et al.*, 1990), ce qui en fait "le moteur de la translocation" (Schatz *et Dobberstein*, 1996). SecA est présente sous plusieurs formes dans la cellule. On la retrouve dans le cytoplasme associée soit aux ribosomes (Liebke *et al.*, 1987), soit aux précurseurs protéiques (Akita *et al.*, 1990) soit à SecB (Hartl *et al.*, 1990). La forme cytosolique de SecA participe à la régulation de sa propre expression en se fixant sur son propre ARNm afin d'en empêcher la traduction (Schmidt *et Oliver*, 1989; Dolan *et Oliver*, 1991). SecA est également retrouvée à la surface interne de la membrane cytoplasmique ou enchâssée dans la

membrane. La forme enchâssée de la membrane correspond à la forme dynamique de SecA qui permet la translocation des préprotéines au travers de la membrane.

L'initiation de la translocation commence avec l'étape de transfert de la préprotéine depuis SecB vers SecA. SecB, liée à la préprotéine interagit avec SecA. La liaison d'une molécule d'ATP au niveau de SecA, modifie la conformation de cette dernière qui à son tour modifie la conformation de SecB et plus précisément son site de fixation à la partie mature de la préprotéine (*Fekkes et al., 1998*). SecB libère alors la préprotéine. La forme membranaire de SecA s'associe à la préprotéine grâce à l'affinité de SecA pour les a.a. chargés positivement de la région-n du peptide signal (*Akita et al., 1990*). La préprotéine, entraînée par des cycles répétés d'insertion / désinsertion de SecA, pénètre ensuite dans la translocase membranaire. SecB, redevenue libre dans le cytoplasme, est à nouveau capable de fixer une nouvelle préprotéine.

1-2-3- La translocase membranaire SecYEG

Le pore de sécrétion membranaire est un complexe hétéro-oligomérique, constitué des protéines SecY, E et G (voir fig.3). Il constitue un canal de sécrétion par lequel transitent les protéines extracytoplasmiques. La forme active de SecYEG est en fait une forme tétramérique des trois protéines. SecA recruterait de manière indépendante deux dimères de SecYEG pour ensuite les assembler afin de former le pore de sécrétion (*Manting et al., 2000*). Les protéines SecY et E sont indispensables à la sécrétion des protéines (*Brundage et al., 1990*).

SecY comprend dix domaines transmembranaires, six domaines cytoplasmiques et cinq boucles périplasmiques (*Akiyama et Ito, 1987*). L'étude en microscopie électronique de Sec61 α , la protéine eucaryote homologue de SecY, a révélé une structure cylindrique avec un pore central de 20 Å (*Hanein et al., 1996*). Ceci laisse supposer que SecY est la protéine majeure constituant le canal de sécrétion membranaire et qu'elle engloberait la protéine afin de l'isoler de l'environnement hydrophobique membranaire (*Müller et al., 2001; Danese et Silhavy, 1998*).

SecE est constituée de trois domaines transmembranaires. Elle augmenterait la stabilité du complexe SecYEG en établissant de nombreuses interactions avec SecY (*Bieker et Silhavy, 1990b*) et agirait de manière précoce avec le complexe SecA-préprotéine (*Bieker-Brady et al., 1992*).

SecG est constituée de deux domaines transmembranaires. Elle stimule la sécrétion sans être cependant indispensable (*Brundage et al., 1990*) puisque son absence n'est préjudiciable que dans certaines conditions de culture, comme les basses températures et l'absence de force proton-motrice (*Nishiyama et al., 1994; Hanada et al., 1996*). Même si certains auteurs suspectent l'existence d'une influence de SecG sur le cycle d'insertion / désinsertion de SecA dans la membrane (*Müller et al., 2001; Driessen et al., 1998*), aucune interaction directe entre SecG et SecA n'a pu être mise en évidence à ce jour.

Driessen et al. (1998) ont proposé un possible second rôle pour la translocase. Selon eux, les protéines SecA, Y, E et G seraient chargées de repérer les préprotéines jugées impropres à l'exportation. Certaines mutations affectant ces quatre protéines empêchent la translocase d'expulser les préprotéines anormales déjà engagées dans le pore de sécrétion (*Danese et Silhavy, 1998*).

1-2-4- SecD et SecF

L'opéron *secDFYajC* code pour les protéines SecD, SecF et YajC qui peuvent s'associer en un complexe (*Duong et Wickner, 1997*). Ce complexe peut également se retrouver associé à la translocase membranaire SecYEG (*Duong et Wickner, 1997*). SecD et SecF contiennent toutes les deux, six domaines transmembranaires ainsi qu'un large domaine périplasmique (*Pogliano et Beckwith, 1994*). Leurs rôles ne sont pas encore clairement définis. Il semblerait, néanmoins, que ces deux protéines stabilisent la forme membranaire de SecA (*Economou et al., 1995*) et contrôlent les cycles d'insertion / désinsertion de SecA (*Duong et Wickner, 1997*). YajC est une petite protéine indispensable seulement en absence de SecG (*Duong et Wickner, 1997*) mais dont le rôle est inconnu.

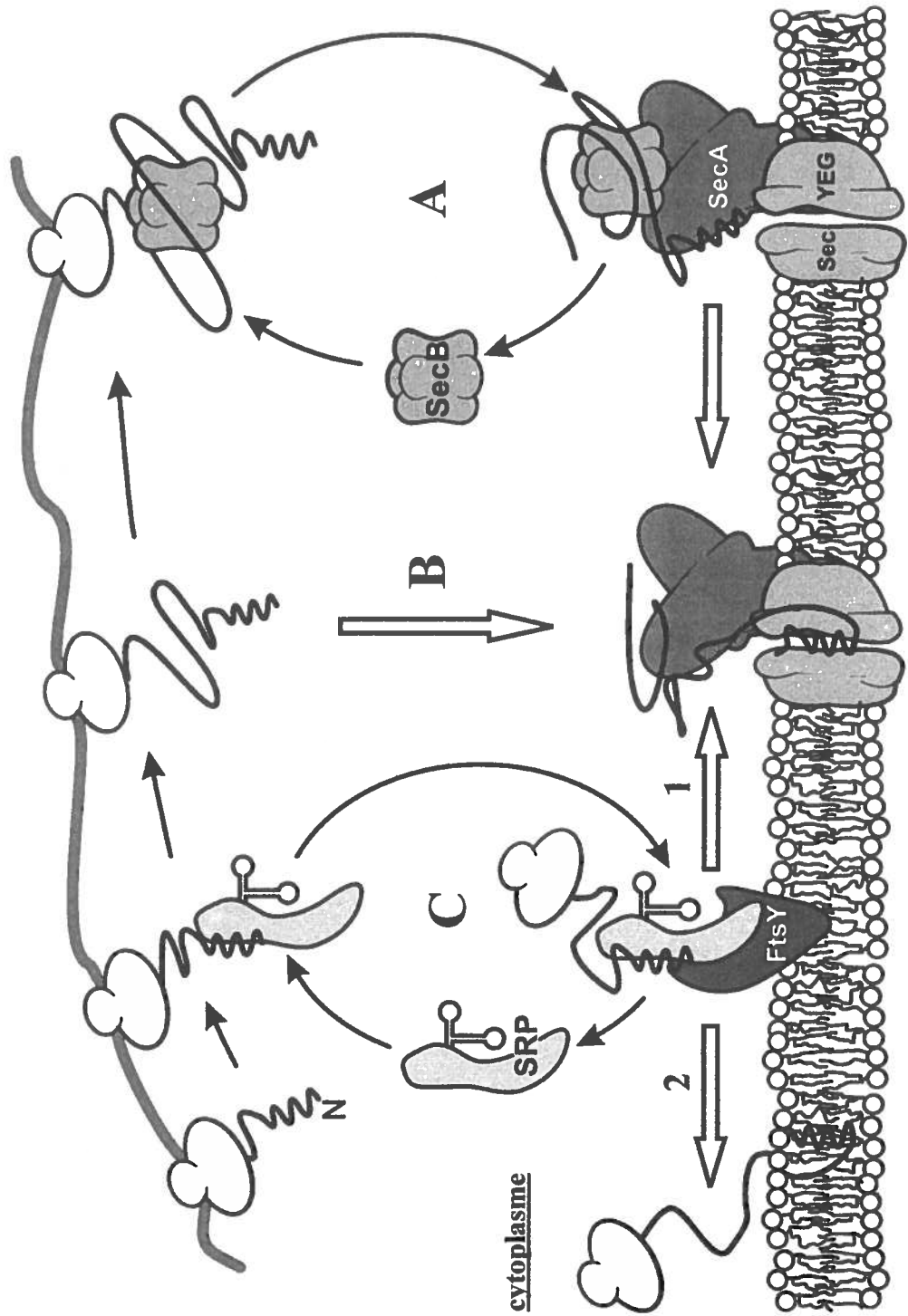
Figure 3 : Les voies de sécrétion GSP et SRP.

(A) Sécrétion d'une protéine par la voie générale GSP. SecB, protéine SecB; SecA, protéine SecA; SecYEG, translocase du système GSP impliquant les protéines SecY, E et G. Les protéines SecD, SecF et YajC ne sont pas représentées.

(B) Sécrétion d'une protéine par la voie générale GSP sans intervention de la protéine SecB (cas des bactéries Gram +).

(C) Sécrétion d'une protéine par la voie impliquant le complexe ribonucléoprotéique SRP. La protéine est soit sécrétée via la translocase SecYEG (1) soit s'il s'agit d'une protéine membranaire, elle s'insère dans la membrane (2). SRP, Signal Recognition Particle; FtsY, récepteur membranaire du complexe SRP.

(d'après *Fekkes et Driessen, 1999*).



1-3- Energie et translocation

Les besoins énergétiques de la cellule pour assurer la translocation des protéines au travers de la membrane cytoplasmique sont couverts par deux sources d'énergie : l'hydrolyse de l'ATP par SecA et la force proton motrice.

Lorsque la forme membranaire de SecA fixe une molécule d'ATP (voir fig.4), ceci entraîne une modification de conformation non seulement de SecA mais aussi du complexe SecYEG (*Driessen et al., 1998*). Cette modification entraîne la pénétration des 20-30 premiers a.a. de la préprotéine dans le pore de sécrétion. Cette première étape ne nécessite pas l'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée mais permet l'accès au site de clivage du peptide signal par la signal peptidase (*Schiebel et al., 1991; van der Wolk et al., 1997*). Après hydrolyse de l'ATP, SecA se désengage du complexe SecYEG-protéine. La protéine serait retenue dans le canal de translocation grâce à ses interactions avec SecYEG (*Danese et Silhavy, 1998*). La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur une nouvelle molécule de SecA provoque une nouvelle insertion de SecA au niveau du complexe SecYEG-protéine (*Schiebel et al., 1991*). Les cycles répétés d'insertion / désinsertion de SecA associés à l'hydrolyse de molécules d'ATP permettent ainsi le passage progressif de la protéine au travers du tunnel de sécrétion.

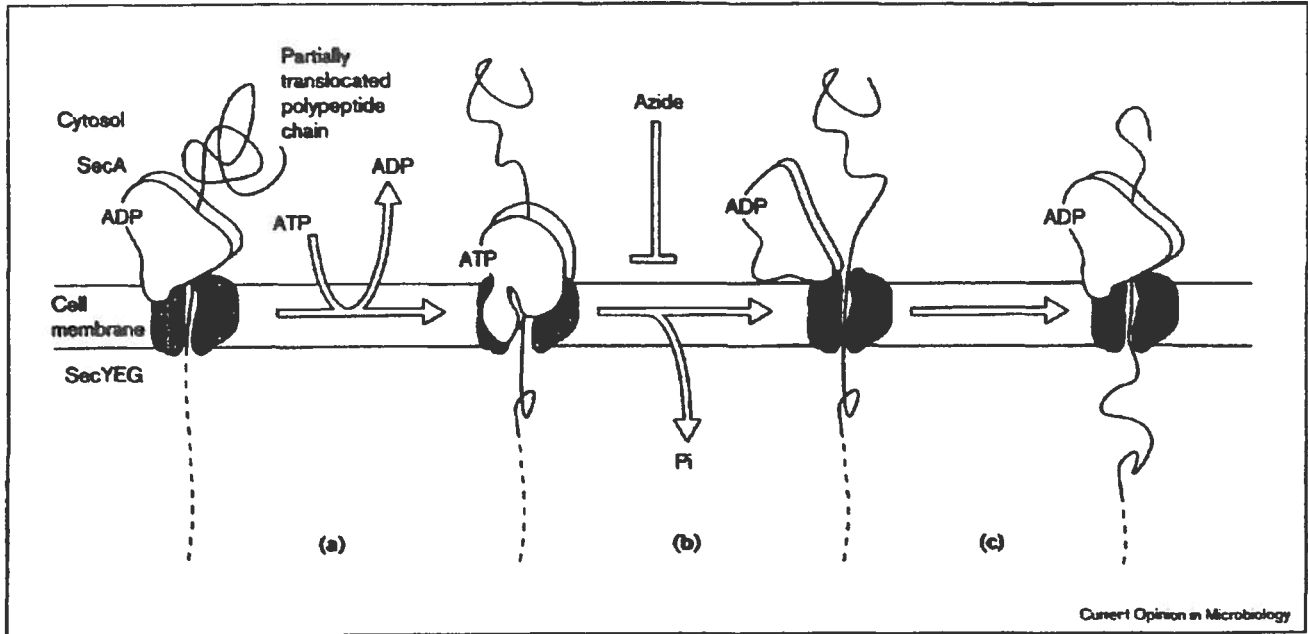
La force proton motrice (PMF ou $\Delta\mu_{H^+}$) apparaît plutôt comme une source d'énergie complémentaire. Elle n'est pas indispensable puisque la sécrétion des protéines peut avoir lieu en présence d'ATP seul (*Schiebel et al., 1991*). Son rôle et son influence ne sont pas encore bien connus. Elle stimule cependant fortement la translocation (*Geller et al., 1986; Yamane et al., 1987*). La PMF aurait pour cible SecY (*Nouween et al., 1996*). Son action entraînerait une modification de conformation qui favoriserait la désinsertion de SecA (*Nishiyama et al., 1999*). Elle est capable de couvrir les besoins énergétiques des dernières étapes de la translocation (*Schiebel et al., 1991*). De plus, elle permet de diminuer la quantité d'ATP nécessaire pour une opération de translocation donnée (*Shiozuka et al., 1990; Driessen et al., 1992*).

Figure 4 : Cycle d'insertion / désinsertion de SecA au niveau de la translocase GSP.

- a) Lorsque SecA fixe un ATP, elle change de conformation et s'insère dans la membrane entraînant avec elle la préprotéine. Le site de clivage devient accessible à la signal peptidase.
- b) L'hydrolyse de l'ATP permet la désinsertion de SecA de la translocase. Cette étape est bloquée par l'azoture de sodium.
- c) SecA peut ensuite à nouveau s'insérer dans la membrane et poursuivre la translocation de la préprotéine.

Cytosol, cytoplasme; Cell membrane, membrane plasmique; ATP, Adénosine Tri-Phosphate; ADP, Adénosine Di-Phosphate; Pi, Phosphate inorganique; SecA, protéine SecA; SecYEG, translocase membranaire impliquant les protéines SecY, E et G; Azide, azoture de sodium

(d'après *Driessen et al., 1998*)



1-4- Les signal peptidases

Les signal peptidases (Spases) sont des enzymes chargées de couper le peptide signal des protéines au cours des premières étapes de la translocation. Plusieurs familles de signal peptidase existent (*Pugsley, 1993*). Chez les bactéries, la majeure partie des protéines extracytoplasmiques sont clivées par des signal peptidases de type I (SPases I), Lep étant la plus connue d'entre elles. Chez les bactéries Gram-, ces enzymes contiennent deux segments transmembranaires et ont leur site actif à leur extrémité C-terminale sur la face périplasmique de la membrane (*Dalbey et von Heijne, 1992*). Chez les bactéries Gram +, elles sont plus petites et sont ancrées dans la membrane par leur seule extrémité N-terminale (*Meijer et al., 1995; Hoang et Hofemeister, 1995*). Récemment, quatre Spases I ont été mises en évidence chez *S. lividans* (*Parro et al., 1999*). Ces enzymes sont regroupées au sein de deux opérons : le premier contient les gènes *sipW*, *sipX* et *sipY* quand au second il contient le gène *sipZ* suivi de trois gènes sans lien avec les signal peptidases. Seule l'espèce *B.subtilis* possèdent un plus grand nombre de signal peptidases de type I, soit sept (*Tjalsma et al, 1998*). Contrairement aux SpasesI des Gram +, SipY, SipX et SipZ possèdent une extrémité C-terminal ancrée dans la membrane (*Geukens et al., 2001a et b*). SipW présente une topologie similaire aux autres Spases I des bactéries Gram + (*Geukens et al., 2001a et b*).

2- Le système de sécrétion SRP chez les bactéries

Chez les mammifères, les protéines membranaires ou extracytoplasmiques doivent traverser la membrane du réticulum endoplasmique. Ce système de sécrétion fait intervenir le complexe ribonucléoprotéique SRP (*Signal Recognition Particle*) comprenant six protéines (SRP54, 19, 9/14 et 68/22), le récepteur membranaire du complexe SRP et une molécule d'ARN 7SL (*Walter et Blobel, 1982; Walter et Johnson, 1994*). Chez *E. coli*, plusieurs homologues de la voie SRP ont été retrouvés et constituent une version bactérienne simplifiée de ce système de sécrétion. Ainsi l'ARN 4.5S de *E. coli* est homologue au domaine IV de l'ARN 7SL (*Struck et al., 1988*). De même, la protéine P58 ou Ffh (*fifty-four homolog*) est l'équivalent de SRP54 (*Römisch et al., 1989*).

Enfin, la protéine FtsY de *E. coli*, remplit le même rôle que la sous-unité α du récepteur SRP des mammifères (Gill et Salmond, 1990).

Au cours de la sécrétion chez *E. coli*, le complexe SRP s'associe au ribosome et à la préprotéine dès la sortie du peptide signal du ribosome (voir fig.4). Cette association a pour conséquence d'arrêter la traduction de l'ARNm. Le complexe "SRP-chaîne naissante-ribosome" est ensuite dirigé vers le récepteur membranaire SRP-spécifique : FtsY. L'interaction entre SRP et son récepteur entraîne l'hydrolyse de molécules de GTP fixées au niveau de Ffh et FtsY. Par un mécanisme inconnu, le peptide signal est transféré dans la translocase puis SRP se détache du ribosome permettant la reprise et la fin de la synthèse protéique. La protéine néosynthétisée est directement injectée au travers de la translocase (Fekkes et Driessen, 1999). Les voies GSP et SRP utilisent la même translocase SecYE, SecG ne semblant pas être impliquée dans la voie SRP (Koch et Müller, 2000). Certaines protéines SRP-dépendantes comme Lep nécessitent la présence de SecA pour leur insertion (Traxler et Murphy, 1996; Wolfe et al., 1985) alors que d'autres comme LacY n'en ont pas besoin (Mac Farlane et Müller, 1995).

Dans la voie de sécrétion SRP, synthèse protéique et sécrétion ont donc lieu simultanément. Le blocage précoce de la synthèse protéique par le complexe SRP permet d'éviter l'agrégation cytoplasmique des protéines hydrophobes comme les protéines membranaires (Müller et al., 2001). Cette caractéristique permet d'envisager la voie SRP comme le mode privilégié de sécrétion des protéines membranaires. En effet, de nombreuses protéines membranaires sont dépendantes de la voie SRP pour leur insertion membranaire (Mac Farlane et Müller, 1995; de Gier et al., 1996; Ulbrandt et al., 1997). De plus, il n'a jamais été démontré d'interaction entre SecB et des protéines membranaires (Fekkes et Driessen, 1999). Pour agir avec le complexe SRP, les préprotéines doivent posséder des zones suffisamment longues et hydrophobes (de Gier et al., 1998). Or, le peptide signal des protéines membranaires contient une séquence hydrophobe "d'arrêt de transfert" longue d'une vingtaine d'a.a.. Au cours du processus de translocation, cette séquence particulière permet l'interaction avec SRP mais aussi provoque l'ouverture latérale de la translocase et la sortie de la protéine du canal de sécrétion (Schatz et

Dobberstein, 1996). La séquence "d'arrêt de transfert" permettrait ensuite l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique (*Schatz et Dobberstein, 1996*). Néanmoins, toutes les protéines membranaires ne sont pas SRP-dépendantes pour leur insertion. En effet, certaines s'intègrent de manière spontanée dans la membrane (*MacFarlane et Müller, 1995*, voir fig.4).

La discrimination entre les protéines SRP-dépendantes et GSP-dépendantes intervient au niveau du ribosome (*Müller et al., 2001*). Lorsqu'une protéine à destination membranaire émerge du ribosome, elle est prise en charge par le complexe SRP. Mais lorsqu'il s'agit d'une protéine extracellulaire, elle serait reconnue par le "trigger factor", une protéine chaperonne qui se fixe sur le ribosome et empêche le SRP d'agir. Le "trigger factor" se détacherait après relargage de la protéine par le ribosome pour laisser la place à SecB (*Beck et al., 2000*).

3- Le repliement des protéines

Le système de sécrétion GSP permet à des protéines non repliées de traverser la membrane cytoplasmique. Les protéines se replient ensuite dans le périplasme afin d'atteindre leur structure finale. Elles sont aidées dans ce processus par de très nombreuses protéines chaperonnes mais dont le rôle précis n'est pas clairement établi. Le nombre élevé de protéines chaperonnes périplasmiques laisse supposer que chaque chaperonne est spécialisée dans un type de repliement particulier (*Müller et al., 2001*). Ces protéines peuvent être les mêmes que celles retrouvées dans le cytoplasme comme GroEL et GroES (*Danese et Silhavy, 1998*). Elles forment des cages dans lesquelles les protéines viennent se replier à l'abri du milieu extérieur et des autres protéines. La cage change de structure et progressivement replie la protéine. Ce processus par étapes permet d'éventuels retours en arrière afin d'aboutir au repliement final correct (*Morange, 1998*). Lorsque les protéines ont du mal à se replier, les chaperonnes auraient le temps de s'associer à des protéases chargées de dégrader les protéines récalcitrantes (*Morange, 1998*).

On retrouve chez les bactéries deux grands groupes de protéines chaperonnes. La première comprend les protéines Dsb qui sont impliquées dans la formation de ponts disulfures. Cette réaction est possible dans le périplasme alors qu'elle était impossible dans l'environnement trop réducteur du cytoplasme (*Rietsch et Beckwith, 1999*). Les protéines Dsb sont également chargées de réarranger les mauvais appariements de ces ponts disulfures (*Missiakas et Raina, 1997*). La seconde famille regroupe les peptidyl-prolyl isomérasés ou rotamases qui catalysent les réactions de *cis-trans* isomérisation au niveau des résidus Proline (*Müller et al., 2001*). La protéine DegP est une protéine un peu particulière. En effet à température élevée, elle a une activité protéase qui permet la dégradation des protéines mal repliées. Par contre à température plus basse, elle joue le rôle de chaperonne en dépliant et repliant les protéines mal repliées (*Spiess et al., 1999*).

Après avoir traversé la membrane interne, les protéines extracellulaires des bactéries Gram - doivent encore traverser la membrane externe. Ce processus n'est pas très bien documenté, néanmoins certaines branches terminales de la voie GSP sont connues (*Pugsley, 1993; Danese et Silhavy, 1998*).

4- Le système Twin-Arginine

Depuis environ une dizaine d'années, une nouvelle voie de sécrétion des protéines indépendante du système général GSP et de la voie SRP a été mise en évidence chez la plupart des bactéries. Cette voie a été nommée TAT pour "*Twin Arginine Translocation*" en raison de la présence d'un doublet d'arginine hautement conservé dans le peptide signal des protéines dépendant de ce système de sécrétion. Elle est plus rarement appelée système MTT pour *Membrane Targeting and Translocation*. Le système de translocation bactérien TAT apparaît comme un proche parent de celui rencontré dans la membrane thylakoïdale des chloroplastes. La principale caractéristique du système TAT est sa capacité à sécréter des protéines sous leur forme repliée contrairement au système GSP qui transporte exclusivement des protéines non repliées. Le système de sécrétion TAT est

retrouvé chez presque toutes les bactéries. Comparativement au système GSP, ce système TAT reste cependant peu connu. Beaucoup d'interrogations subsistent notamment quant à l'identité et au fonctionnement de la translocase membranaire.

4-1- Le peptide signal de type TAT

Le peptide signal des protéines sécrétées par le système TAT comporte, comme son homologue GSP, trois zones distinctes à savoir un domaine N-terminal (région-n) pouvant comporter des résidus chargés (positivement en général), un domaine central hydrophobe (région-h) et un domaine contenant le site de clivage de la signal peptidase (région-c) (voir fig.2b).

4-1-1- La région-n

Les peptides signaux de type TAT présentent plusieurs caractéristiques qui les différencient des peptides signaux GSP. Tout d'abord, ils sont beaucoup plus longs. *Christobal et al. (1999)* ont comparé la longueur de 72 séquences de type TAT versus 320 séquences de type GSP. En moyenne, les peptides signaux de type TAT possèdent 14 résidus de plus que les peptides signaux GSP (38 a.a. contre 24 respectivement). Le peptide signal de la méthylamine deshydrogénase MauA de *Methylobacterium extorquens* est, avec ses 57 a.a., le plus long peptide signal TAT connu à ce jour (*Berks, 1996*). Cette différence de longueur est due à la présence d'une région-n plus longue qui est composée en moyenne de 17 résidus pour les précurseurs de type TAT contre seulement 6 pour leurs homologues GSP (*Christobal et al., 1999*). La charge nette des peptides signaux de type TAT est de +2.8 en moyenne (*Berks, 1996*) contre seulement +1.7 pour les peptides signaux de type GSP (*von Heijne, 1985*). Cette différence de charge est en partie due à la présence du doublet d'arginine de la séquence signature TAT. De plus contrairement à la région-n des peptides signaux de type GSP, celle des peptides signaux de type TAT peut contenir des a.a. chargés négativement (*Berks, 1996*).

4-1-2- La séquence signature conservée

A la différence des précurseurs de type GSP, les précurseurs de type TAT possèdent une séquence signature hautement conservée qui les caractérise. Cette séquence est retrouvée à la frontière des régions n et h et se compose des sept résidus conservés suivants : **S/T-R-R-X-F-L-K** où X représente un a.a. quelconque (*Berks, 1996*).

4-1-2-1- Le doublet d'arginine

Berks (1996) a montré l'invariance du doublet d'arginine et l'incidence des autres résidus dans plus de 50 % des peptides signaux analysés (voir fig.5). Par la suite, les premières expériences ont montré que la présence d'un doublet d'arginine intact était une condition *sine qua non* à la sécrétion par le système TAT. Ainsi le remplacement de l'une ou des deux arginines du peptide signal de la glucose-fructose oxydoréductase (GFOR) de *Zymomonas mobilis* par une ou deux lysine abolit la sécrétion même si ces substitutions conservent les charges (*Halbig et al., 1999*). Le même constat a été réalisé pour la nitrique oxyde réductase (N₂OR) de *Pseudomonas stutzeri* (*Dreush et al., 1997*), la Ni-hydrogénase de *Wolinella succinogenes* (*Gross et al., 1999*), la [Ni-Fe] hydrogénase de *Desulfovibrio vulgaris* (*Nivière et al., 1992*) et la diméthyl sulfoxyde (Me₂So) réductase de *E. coli* (*Sambasivarao et al., 2000*). La présence d'un doublet d'arginine intact n'est cependant pas nécessaire dans tous les cas. Le remplacement d'une arginine par une lysine dans le précurseur de la protéine SufI de *E. coli* n'occasionne qu'un ralentissement de la sécrétion (*Stanley et al., 2000*). En utilisant le peptide signal de la triméthylamine N-oxide réductase (TorA), fusionné à la protéine fluorescente verte (GFP), *Ize et al. (2002)* ont démontré que l'efficacité de la sécrétion diminuait en fonction de la composition du doublet. Le doublet d'arginine (RR) sauvage permettait une meilleure sécrétion que le doublet lysine-argine (KR), qui lui-même était plus efficace que la paire arginine-lysine (RK) alors que le doublet de lysine (KK) ne permettait pas la sécrétion de la GFP. Ces précédents auteurs ont également réalisé la même étude avec la colicine V de *E. coli*. Le doublet RR et la paire KR permettaient une efficacité de sécrétion équivalente mais supérieure à la paire RK alors que le doublet KK diminuait considérablement l'efficacité de sécrétion.

Jusqu'à présent, seules deux protéines sont sécrétées par le système TAT alors que leur peptide signal ne possède pas le doublet d'arginine. Le premier cas est celui du précurseur de la sous-unité TtrB de la tetrahionate réductase de *Salmonella enterica* qui possède, au sein de sa séquence TAT non pas un doublet d'arginine mais une paire lysine-arginine : **S-K-R-Q-F-L-Q** (Hinsley et al., 2001). Cependant, les auteurs ont constaté que la sécrétion était plus efficace lorsque le doublet d'arginine était reconstitué. Le second cas est celui de la pre-pro-pénicilline amidase (ppPA) de *E. coli* qui possède un peptide signal où les deux résidus arginines sont séparés par un résidu asparagine et où le reste de la séquence TAT est différente de la séquence consensus : **N-R-N-R-M-I-V** (Ignatova et al., 2002). Ces deux cas isolés démontrent que le doublet d'arginine n'est pas une caractéristique universelle des précurseurs de type TAT.

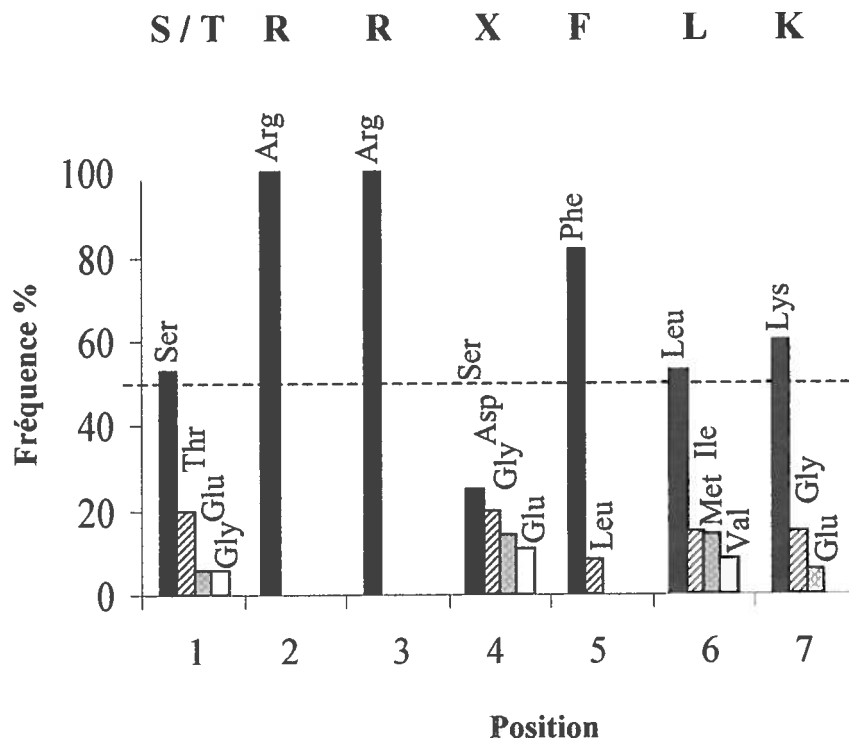
4-1-2-2- Les autres résidus

Excepté le doublet d'arginine, l'importance des cinq autres résidus constituant la séquence consensus a été peu étudié. Cependant une étude de ces résidus pour la séquence **S-R-R-Q-F-I-Q** du peptide signal de la protéine SufI a été réalisée par Stanley et al. (2000). Le résidu phénylalanine, retrouvé dans 80 % des séquences signatures, est après les deux arginines, le résidu le plus conservé (voir fig.5). Les auteurs ont effectué plusieurs substitutions (tyrosine, alanine, leucine) à cette position et ont conclu que ce n'était pas le noyau aromatique qui était important mais bien l'hydrophobicité de la chaîne latérale. Ils ont également conclu que la position suivante devait être occupée également par un résidu hydrophobe afin de conserver une bonne efficacité de sécrétion. Ainsi, la séquence consensus TAT est parfois écrite sous la forme : **S/T-R-R-X-Φ-Φ** où Φ désigne un a.a. hydrophobe. Enfin, Stanley et al. (2000) ont été surpris de constater que le remplacement du résidu glutamine par la lysine qui est le plus souvent retrouvée dans la séquence conservée ralentissait de la sécrétion de SufI. Il reste donc encore beaucoup à faire pour élucider le rôle de chacun des a.a. composant cette séquence consensus.

Figure 5 : Distribution des acides aminés les plus fréquemment rencontrés dans la séquence consensus TAT.

La position "1" est attribuée au premier résidu de la séquence TAT. Les résultats correspondent à l'analyse des séquences de 72 peptides signaux de protéines fixant des cofacteurs redox. Pour chaque position, seuls les quatre a.a. les plus fréquents retrouvés dans plus de 5 % des peptides signaux sont représentés.

(figure tirée de *Berks, 1996*)



4-1-2-3- Rôle de la séquence conservée

Mis à part le fait que la présence d'un doublet d'arginine est (presque toujours) obligatoire pour une bonne efficacité de sécrétion, le rôle précis de la séquence conservée reste inconnu. On est cependant en droit de penser que cette séquence est impliquée dans la spécificité de la reconnaissance avec la translocase membranaire (*Berks et al., 2000*).

Brüser et al. (1998) ont fusionné le peptide signal GSP-dépendant de PelB de *Erwinia carotovora* avec la partie mature de la protéine TAT-dépendante HiPIP de *Chromatium vinosum*. La chimère formée s'est trouvée être dépendante du système GSP pour sa sécrétion. Les auteurs ont voulu ensuite voir si l'introduction de la séquence TAT de HiPIP à savoir **S-R-R-D-A-V-K**, au début du peptide signal GSP de PelB ne permettait pas la redirection de la chimère vers le système TAT. La chimère "**RR-PelB-HiPIP**" formée a, malgré tout, conservé sa spécificité de translocation GSP. Cela démontre que la séquence signature n'est pas capable à elle seule d'expliquer la spécificité TAT. Le peptide signal des protéines TAT doit donc posséder d'autres éléments qui permettent aux précurseurs TAT de se diriger vers la bonne translocase.

4-1-3- La région-h

La séquence signature TAT est suivie par une zone centrale hydrophobe. La région-h des peptides signaux TAT contient en majorité des résidus glycine et thréonine et peu de leucine alors que la région-h des peptides signaux GSP contient plus de résidus leucine et alanine (*Christobal et al., 1999*). Les peptides signaux TAT sont donc moins hydrophobes que les peptides signaux GSP. Cette plus faible hydrophobicité relative est une autre caractéristique des peptides signaux TAT. Il est possible de rediriger un précurseur TAT-dépendant comme TorA:P2 (peptide signal de triméthylamine N-oxide réductase suivi du domaine périplasmique P2 de la leader peptidase) vers le système GSP en augmentant simplement l'hydrophobicité de la région-h de TorA (*Christobal et al., 1999*). L'hydrophobicité de ce domaine apparaît alors comme un élément déterminant permettant à la translocase membranaire de faire la différence entre un précurseur de type TAT et un autre de type GSP. Dans le cas de la chimère "**RR-PelB-HiPIP**" construite par

Brüser et al. (1998), l'hydrophobicité du peptide signal GSP de PelB prend probablement le dessus sur la spécificité de la séquence TAT introduite. L'hydrophobicité de la région-h apparaît donc comme le critère majeur de distinction entre les voies GSP et TAT. Ainsi, un peptide signal fortement hydrophobe sera plutôt de type GSP alors qu'un peptide signal moins hydrophobe et comportant un doublet d'arginine sera plutôt de type TAT.

4-1-4- La région-c

La région-c des peptides signaux de type TAT apparaît comme un autre élément de discrimination entre les voies TAT et GSP. Les précurseurs de type TAT contiennent souvent à proximité du site de clivage des a.a. basiques (*Brüser et al., 1998; Cristobal et al., 1999*) alors que la présence de résidus chargés positivement peut être néfaste dans l'environnement du site de clivage des précurseurs de type GSP (*von Heijne, 1986*). Ainsi, la présence de résidus chargés dans la région-c représenterait pour les précurseurs un second moyen, après la faible hydrophobicité de la région-h, pour échapper au système GSP (*Berks et al., 2000*). La position -6 par rapport au site de clivage est par ailleurs souvent occupée par un résidu proline dans les précurseurs de type TAT (*Cristobal et al., 1999*).

Le séquençage de l'extrémité N-terminale de plusieurs protéines TAT-dépendantes a confirmé que la machinerie TAT reconnaissait les mêmes sites de coupure que la machinerie GSP (*Nivière et al., 1992; Berks, 1996; Brüser et al., 1998; Sambasivarao et al., 2000; Stanley et al., 2000*). Les positions -3 et -1 par rapport au site de clivage des peptides signaux de type TAT sont souvent occupées par des alanines. Les sites de clivage des peptides signaux de type TAT et GSP sont donc très semblables et sont formés de la séquence A-X-A.

4-2- Insertion des cofacteurs et repliement des protéines

Il était connu depuis plusieurs années que le système Δ -pH dépendant des chloroplastes était capable de sécréter des protéines repliées au travers de la membrane des thylakoïdes.

En effet, *Clark et Theg (1997)* ont démontré *in vitro* qu'une chimère comprenant un précurseur Δ -pH dépendant et l'inhibiteur de la trypsine bovine pouvait être sécrétée avec succès même après création irréversible de ponts disulfures. La même chose a été observée pour une construction comportant un précurseur Δ -pH dépendant et la dihydrofolate réductase (DHFR). En présence de méthodextrate qui entraîne le repliement compact de la DHFR, le système Δ -pH dépendant reste capable de transporter cette réductase (*Hynds et al., 1997*). Comme le système TAT présente de nombreuses analogies avec le système Δ -pH dépendant, tout laissait supposer qu'il était lui aussi capable de sécréter des protéines déjà repliées, ce qu'est strictement incapable de faire le système GSP. Plusieurs études ont montré de manière indirecte que les protéines sécrétées par le système TAT l'étaient sous une forme repliée. Ces études ont porté sur l'insertion des cofacteurs, le phénomène de *co-translation* des protéines oligomériques et sur la présence de précurseurs déjà actifs dans le cytoplasme.

4-2-1- Insertion des cofacteurs

Un certain nombre d'observations ont étayé l'hypothèse que le système TAT était capable de sécréter des protéines sous une forme repliée. Tout d'abord, il a été constaté que les séquences TAT se retrouvaient souvent dans les peptides signaux de protéines capables de fixer un cofacteur redox (*Berks, 1996*). Ainsi, les protéines dépendant du système TAT sont souvent des enzymes comme les ferrédoxines, les hydrogénases, les réductases ou les oxydases, impliquées dans le transfert d'électrons. Pour être actives, ces enzymes doivent fixer différents cofacteurs comme le fer, le soufre, le molybdène, le cuivre ou le FAD (*Berks, 1996*). L'insertion des cofacteurs serait assistée par des effecteurs cytoplasmiques qui reconnaîtraient le précurseur protéique puis fixeraient sur ce dernier le cofacteur (*Berks et al., 2000*). Comme cette reconnaissance est de type protéine-protéine, le précurseur doit déjà avoir atteint un certain stade de repliement. La mutation de la séquence signature TAT ou la suppression du peptide signal bloque généralement la sécrétion mais n'affecte pas la fixation du cofacteur (*Santini et al., 1998; Gross et al., 1999; Rodrigue et al., 1999*). De plus, chez les mutants du système TAT de *E. coli*, les précurseurs s'accumulent dans le cytoplasme mais sont déjà munis de leur cofacteur

(Bogsch et al., 1998; Sargent et al., 1998; Weiner et al., 1998). Lorsque la fixation du cofacteur est inhibée, les molécules de précurseur s'accumulent car sous cette forme elles sont difficilement maturées (Berks, 1996; Bernhard et al., 1996; Santini et al., 1998). La fixation du cofacteur est donc indépendante de la séquence signature TAT et doit impérativement avoir lieu avant la sécrétion. Berks et al. (2000) ont proposé un modèle dans lequel la protéine serait partiellement repliée et où le peptide signal serait séquestré à l'intérieur de cette structure. L'insertion du cofacteur modifierait la structure du précurseur et libérerait le peptide signal qui serait ensuite libre d'interagir avec la translocase TAT.

4-2-2- Des protéines sans cofacteur

Les protéines sécrétées par le système TAT ne sont pas toutes des enzymes fixant des cofacteurs. En effet, certaines protéines sont néanmoins TAT-dépendantes alors qu'elles ne nécessitent aucune fixation de cofacteur (Berks, 1996; Brüser et al., 1998; Pop et al., 2002, Stanley et al., 2000). Ces protéines comme la phosphodiesterase PhoD de *Bacillus subtilis* se replieraient trop rapidement ou de manière trop compacte pour être acceptées par le système GSP (Santini et al., 2001, Berks et al., 2000). Ces protéines seraient assistées dans leur repliement par des facteurs cytoplasmiques non identifiés (Berks et al., 2000).

4-2-3- Cas des protéines oligomériques

Certaines protéines oligomériques utilisent un système de sécrétion particulier surnommée "co-translocation sur le pouce" ("hitchhiker co-translocation", Rodrigue et al., 1999) impliquant un repliement des protéines avant leur sécrétion. C'est le cas de l'hydrogénase-2 (HYD2) et de la diméthyl sulfoxyde réductase (DMS) de *E. coli*. Ces enzymes sont composées de plusieurs sous-unités : HybO et HybC pour HYD2, DmsA, DmsB et DmsC pour DMS. Les sous-unités HybO et DmsA sont porteuses d'une séquence TAT qui dirige les complexes vers la translocase TAT. Les sous-unités HybC et DmsB sont dépourvues de peptide signal et dépendent respectivement de HybC et DmsB pour leur sécrétion. HybC et DmsB fixent néanmoins le cofacteur sans quoi la sécrétion du complexe n'est pas possible (Rodrigue et al., 1999; Sambasivarao et al., 2000). La

sécrétion de ces complexes nécessite une interaction entre les deux sous-unités et l'insertion préalable du cofacteur. Ces interactions protéines-protéines supposent donc un repliement des sous-unités avant la sécrétion par le système TAT (*Berks et al., 2000*).

4-2-4- Des précurseurs déjà sous leur forme actives

Plusieurs auteurs ont montré que les précurseurs des protéines sécrétées par le système TAT pouvaient être présents dans le cytoplasme des cellules sous une forme déjà active (*Angelini et al., 2001; Loos et al., 1993; Wiegert et al., 1996*). Cela signifie que ces précurseurs sont donc déjà repliés avant leur sécrétion.

4-3- Composantes du système TAT

4-3-1- Organisation des gènes *tat*

Les gènes codant pour les composantes du système TAT de *E. coli* sont regroupés au sein de l'opéron *tatABCD* et du gène *tatE* (*Sargent et al., 1998*). Les gènes *tatA*, *tatB* et *tatC* sont plus rarement désignés comme étant respectivement les gènes *mttA1*, *mttA2* et *mttB* (*Weiner et al., 1998*). Les gènes *tatA*, *tatB*, *tatC* et *tatE* codent tous pour des protéines membranaires. Le gène *tatD* code pour une desoxyribonucléase cytoplasmique qui ne semble pour le moment pas impliquée dans le fonctionnement du système TAT (*Wexler et al., 2000*). Les gènes TAT sont très largement retrouvés parmi les génomes procaryotes connus mais sont absents des bactéries possédant un seul type de métabolisme fermentaire, des *Archae* méthanogènes, des *Mycoplasmae*, des levures et des mammifères (*Berks et al., 2000; Yen et al., 2002*). Le génome des organismes pourvu d'un système TAT code en général pour une copie de TatC et deux copies des homologues TatA/B/E. Le génome de *Rickettsia prowazekii* code seulement pour une copie de TatA/B/E alors que d'autres génomes comme celui de *B. subtilis* codent pour deux copies de TatC et trois copies de TatA (*Berks et al., 2000; Jongbloed et al., 2000*). Par ailleurs, certains génomes mitochondriaux codent pour des homologues de TatC, laissant supposer l'existence

éventuelle d'un tel système de sécrétion dans les mitochondries des algues et des plantes supérieures (*Bogsch et al., 1998; Weiner et al., 1998*).

4-3-2- Les homologues TatA/B/E

Les protéines TatA, TatB et Tat E présentent toutes des homologies avec la composante HCF106 du système Δ pH-dépendant du maïs (*Settles et al., 1997; Sargent et al., 1998; Weiner et al., 1998*). Les protéines TatA et TatE possèdent 60% d'identité entre elles au niveau de leurs séquences alors que TatB ne partage que 25% d'identité avec ces deux protéines (*Berks et al., 2000*). Les protéines TatA, TatB et TatE contiennent une hélice N-terminale transmembranaire suivie d'un domaine amphiphatique orienté vers le cytoplasme (voir fig.6). Ce domaine central est en général riche en résidus basiques supposés interagir avec les charges négatives des phospholipides de la membrane. Entre ces deux premiers domaines, on trouve une glycine hautement conservée souvent suivie par une proline. La partie C-terminale des homologues TatA/E/B est soluble, non conservée et de taille variable (*Berks et al., 2000*).

4-3-3- La protéine TatC

La protéine TatC comprend six segments transmembranaires (voir fig.6). Ses extrémités N et C terminales sont retrouvées du côté cytoplasmique. La comparaison de plusieurs protéines TatC a permis de mettre en évidence une zone de quinze a.a. totalement conservée (*Berks et al., 2000*). De ce fait, TatC apparaît comme la meilleure candidate pour être la zone de reconnaissance de la séquence consensus TAT, les protéines TatA/B/E ne présentant pas assez d'a.a. hautement conservés et polaires capables d'interagir avec le doublet d'arginine (*Berks et al., 2000*). Comme la substitution du doublet d'arginine sans modification de la charge (R par K) peut permettre la sécrétion, il est possible que des interactions électrostatiques soient à la base de la reconnaissance entre le peptide signal et son récepteur membranaire qui pourrait donc être la protéine TatC (*Berks et al., 2000*).

4-3-4- La translocase membranaire TAT

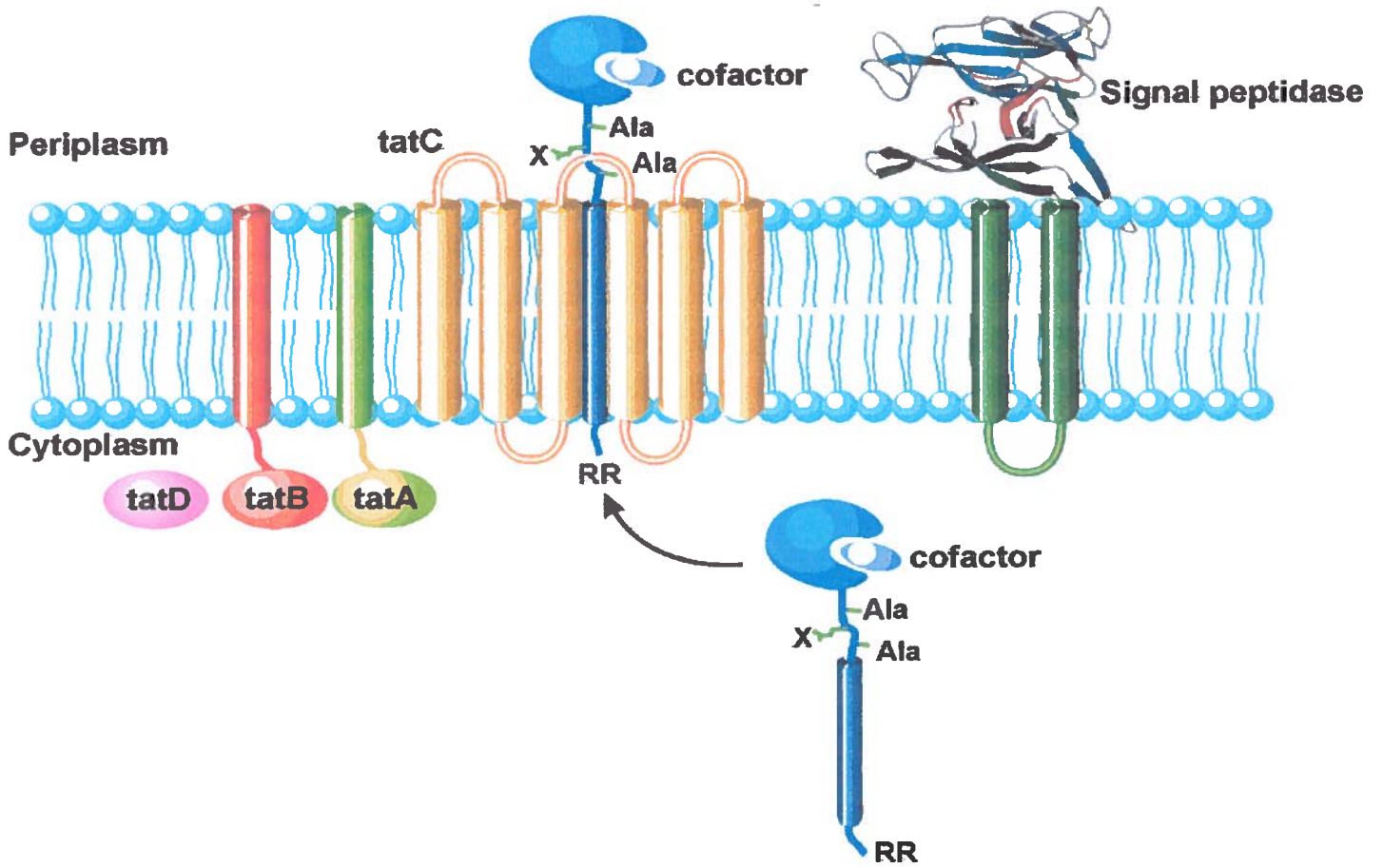
Les rôles et les interactions des différentes protéines Tat entre elles sont très peu connus. Des constructions mutantes ont été obtenues chez *E. coli* et ont permis de démontrer que les gènes *tatB* et *tatC* étaient indispensables au bon fonctionnement du système TAT (Bogsch et al., 1997, Weiner et al., 1998, Sargent et al., 1999). Les mutants Δ *tatA* et Δ *tatE* n'inhibent que faiblement la sécrétion (Sargent et al., 1998). Comme les deux protéines TatA et TatE ont une forte homologie, elles peuvent se substituer l'une à l'autre. En effet, seul le double mutant Δ *tatA* Δ *tatE* bloque le système de sécrétion (Sargent et al., 1998).

Pour certains auteurs, les homologues TatA/B/E sont peut-être des récepteurs membranaires pour les précurseurs (Settles et al., 1997; Wu et al., 2000) alors que pour d'autres il pourrait s'agir de la translocase (Berks et al., 2000). La protéine TatC pourrait remplir les deux rôles (Berks et al., 2000, Wu et al., 2000, Musser et al., 2000, Jongbloed et al., 2000). Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de purifier un complexe de 600 kDa composé de plusieurs exemplaires des protéines TatA, TatB et/ou TacC (Bohluis et al., 2000; Bolhuis et al., 2001; Sargent et al., 2001; De Leeuw et al., 2001). Les protéines TatB et TatC seraient présentes dans des proportions équivalentes laissant supposer une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines (Bolhuis et al., 2001). Parallèlement, Sargent et al. (2001) ont démontré que ce complexe présentait une structure cylindrique avec une cavité centrale. Les dimensions extérieures seraient de 155-160 Å alors que la cavité centrale mesurerait environ 65 Å. Or, la structure tridimensionnelle et la taille estimée des protéines TAT dépendantes concorderaient avec les dimensions de cette cavité centrale. En effet, la plupart des précurseurs TAT dont la structure est connue présentent un diamètre moyen de l'ordre de 50 Å (Berks et al., 2000). Le plus gros complexe transporté par le système TAT est la sous-unité FdnGH de la formate N-hydrogénase de *E. coli* qui peut atteindre un diamètre de 70 Å (Berg et al., 1991) alors que la plus petite entité TAT-dépendante est la protéine HiPIP de *Chromatium vinosum* qui atteint 25 Å de diamètre (Carter et al., 1974, Brüser et al., 1998). Le complexe TatABC pourrait donc bien être la translocase du système TAT.

Comme la largeur de la membrane cytoplasmique est de l'ordre de 50 Å, il est possible que certains précurseurs en cours de translocation puissent déborder de la membrane. Or la membrane devant rester imperméable aux ions, la translocase doit englober le précurseur de manière étanche pendant toute la durée de la sécrétion. Pour ce faire, la translocase doit contenir des structures jouant le rôle de porte d'entrée et de sortie. De plus, le repliement de certaines protéines suppose que la translocase TAT s'adapte à des sections protéiques de diamètres différents tout en maintenant l'imperméabilité membranaire. *Berks et al. (2000)* ont supposé que les différentes sous-unités de la translocase glissaient les unes par rapport aux autres afin d'épouser au mieux la structure de la protéine à sécréter.

4-3-5- Système de contrôle du repliement des protéines

Hynds et al. (1998) ont montré que le système ΔpH -dépendant de la membrane des thylakoïdes était capable de sécréter des protéines mal repliées. *Berks et al. (2000)* se sont alors demandés si le système TAT possédait un mécanisme de contrôle du repliement des précurseurs. Comme la sécrétion des enzymes redox dépendant du système TAT n'a lieu qu'après la fixation du cofacteur, il doit donc exister un mécanisme contrôlant la bonne insertion du cofacteur et donc indirectement le repliement de la protéine. Le système TAT pourrait reconnaître les zones hydrophiles exposées sur la face extérieure des protéines lorsque celles-ci sont sous une forme repliée. Par contre, les protéines dépliées empruntant la voie GSP exposent probablement à leur surface des zones hydrophobes et sont accompagnées de protéines chaperonnes. Le système TAT serait incapable de reconnaître ces zones hydrophobes ainsi que ces chaperonnes et refuserait l'entrée de la translocase TAT aux protéines possédant de telles caractéristiques. Le cas des complexes homo-oligomériques ou chaque sous-unité est porteuse d'une séquence TAT tend également à montrer que le système TAT contrôle l'état de repliement des protéines avant leur sécrétion (*Coyle et al., 1985; Godden et al., 1991; Kingstom et al., 1996*). Comme chaque sous-unité doit probablement être maturée de manière séparée et que l'association finale doit avoir lieu dans le périplasme, le système TAT doit s'assurer que les sous-unités ne s'oligomérisent pas dans le cytoplasme (*Berks et al., 2000*).



4-4- Energie

Des expériences ont montré que la sécrétion des protéines par le système TAT chez *E. coli* et *Z. mobilis* n'était pas perturbée par la présence d'azote de sodium à la grande différence du système GSP (Brüser et al., 1998; Santini et al., 1998; Halbig et al., 1999; Blaudeck et al., 2001). Le système de sécrétion TAT nécessite donc une autre source d'énergie que celle fournie par l'hydrolyse de l'ATP par SecA.

Par contre la sécrétion des protéines par le système TAT est affectée par la présence de protonophores. Or ces agents, comme le carbonyl cyanamide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), empêchent la formation du gradient de proton au travers de la membrane plasmique (Santini et al., 1998; Christobal et al., 1999; Blaudeck et al., 2001). Il semblerait donc que le système TAT utilise la force proton-motrice $\Delta\mu_{H^+}$ comme cela a été démontré pour le système ΔpH -dépendant des thylakoïdes (Mould et Robinson, 1991). Néanmoins, on ignore encore comment la force proton motrice est couplée à la sécrétion des protéines.

4-5- Interspécificité du système TAT entre les espèces

Alors que les peptides signaux de type GSP sont interchangeables (Izard et al., 1994; von Heijne, 1990), la situation semble moins évidente pour les peptides signaux de type TAT. Le peptide signal de l'hydrogénase [Ni-Fe] de *D. vulgaris*, de HiPIP de *C. vinosum* et de la phosphatase alcaline de *T. thermophilus* sont capables de diriger la sécrétion des protéines chez *E. coli* via le système TAT (Angelini et al., 2001; Nivière et al., 1992; Brüser et al., 1998). Ces premiers résultats laissaient supposer une certaine conservation du système TAT entre les espèces. Mais d'autres auteurs ont prouvé qu'il pouvait exister une reconnaissance spécifique et nécessaire entre un peptide signal et le système TAT de la même espèce. Ainsi la GFOR de *Z. mobilis* ne peut être sécrétée chez *E. coli* que si son peptide signal est remplacé par le peptide signal TorA de *E. coli* (Blaudeck et al., 2001). De la même manière, la chimère composée du peptide signal PhoD de *B. subtilis* fusionné

à la partie mature de LacZ n'est pas sécrétée chez *E. coli*. Cependant la sécrétion a lieu si la chimère est coexprimée avec les gènes *tatAd* et *tatCd* de *B. subtilis* (Pop et al., 2002)

4-6- Comparaison entre les systèmes TAT et Δ pH-dépendant

Les systèmes de sécrétion TAT bactérien et Δ pH-dépendant de la membrane thylakoïdale des chloroplastes partagent certains points communs. La voie Δ pH-dépendant ne sera pas détaillée dans la présente revue de littérature. Plusieurs auteurs ont rendu compte de leurs travaux sur cette voie (Robinson et al., 1998; Settles et Martiensen, 1998; Dalbey et Robinson, 1999; Keegstra et Cline, 1999).

Tout d'abord les deux systèmes sont capables de transporter des protéines sous leur forme repliée. Ensuite ils semblent utiliser pour la sécrétion des protéines la même source d'énergie à savoir la force proton motrice. Les translocases TAT et Δ pH-dépendante nécessitent des composantes similaires (Settles et al., 1997, Mori et al., 1999). Les deux types de peptides signaux ont également une organisation en trois parties (Chaddock et al., 1995). Enfin, certains peptides signaux TAT sont aussi efficaces pour diriger la sécrétion des protéines au travers de la membrane des thylakoïdes que les peptides signaux Δ pH-dépendants (Mori et Cline, 1998; Wexler et al., 1998, Halbig et al., 1999).

Néanmoins, la séquence consensus S/T-R-R-X-F-L-K ne semblent pas exactement convenir aux séquences signatures Δ pH-dépendant. En effet, ces dernières ne contiennent jamais de résidu phénylalanine en position n°5 ni de résidu chargé en position n°7 (Stanley et al., 2000). Mais, la principale différence entre les deux systèmes concerne la nature des protéines transportées. Le système TAT sécrète de très nombreuses protéines qui se lient à des cofacteurs avant leur sécrétion. A ce jour, seule la polyphénol oxydase cuivre dépendante est connue pour emprunter le système Δ pH-dépendant des chloroplastes après liaison de son cofacteur (Berks, 1996).

4-7- Comparaison entre les systèmes TAT et GSP

Le tableau II récapitule les différents points de comparaison possibles entre les systèmes TAT et GSP que nous avons discuté précédemment.

	Système GSP	Système TAT
Peptide signal	<input type="checkbox"/> taille moyenne : 24 a.a. <input type="checkbox"/> région-n : a.a. chargés + uniquement <input type="checkbox"/> région-h : hydrophobe <input type="checkbox"/> région-c : site de clivage A-X-A	<input type="checkbox"/> taille moyenne : 38 a.a. <input type="checkbox"/> région-n : a.a. chargés + ou - <input type="checkbox"/> séquence consensus TAT : S/T-R-R-X-F-L-K <input type="checkbox"/> région-h : peu hydrophobe <input type="checkbox"/> région-c : présence éventuelle d'a.a. chargés -
Conformation de la protéine avant sa sécrétion	maintenue dépliée par des chaperonnes cytoplasmiques	repliée avec très souvent fixation d'un cofacteur
Maturation du précurseur	1 à 2 minutes	plusieurs minutes
Source d'énergie	<input type="checkbox"/> hydrolyse de l'ATP par SecA <input type="checkbox"/> force proton-motrice	<input type="checkbox"/> force proton-motrice uniquement

Tableau II : Principaux points de comparaison possibles entre les systèmes GSP et TAT (d'après *Christobal et al., 1999; Berks et al., 2000*)

4-8- Le système TAT chez les *Streptomycètes*

Comme nous venons de le voir, le système TAT est beaucoup étudié chez les bactéries Gram négatives comme *E. coli*. Peu d'informations concernent les bactéries Gram positives comme *Bacillus* et *Streptomyces*. Etant donné, les formidables potentialités de sécrétion de ces deux espèces, il devenait très intéressant de savoir si par exemple *B.subtilis* et *S. lividans* possédaient un système de sécrétion TAT.

Le génome de *B.subtilis* contient deux copies du gène *tatC* à savoir *tatCd* et *tatCy* et trois copies du gène *tatA* à savoir *tatAd*, *tatAy* et *tatAc* (Jongbloed et al., 2000). Les gènes *tatCd* et *tatCy* sont respectivement précédés des gènes *tatAd* et *tatAy*. Les trois protéines TatA de *B.subtilis* présentent des homologies de séquence avec les protéines TatA/B/E de *E. coli* (Jongbloed et al., 2000). Des expériences d'interruption de gènes ont permis de créer plusieurs souches de *B.subtilis* Δ *tatC* (Jongbloed et al., 2000). Une récente étude menée sur le sécrétome de *B.subtilis* a permis d'identifier 69 protéines susceptibles d'être sécrétées par le système TAT. Sur ces 69 protéines comportant un doublet RR ou une paire KR, seule la phosphodiesterase PhoD s'est révélé TAT dépendante (Jongbloed et al., 2002). Des homologues de PhoD contenant une séquence signature TAT ont pu être mis en évidence chez *S.coelicolor* à savoir SP1, SP2 et SP3 et *Streptomyces tendae* à savoir SP4 (Jongbloed et al., 2000). S'il est confirmé que SP1 emprunte la voie TAT alors le peptide signal de SP1 avec ses 62 a.a. sera le plus long peptide signal de type TAT connu à ce jour.

Un système de sécrétion TAT est également retrouvé chez *S. lividans*. Comme pour le génome de *E. coli*., celui de *S. lividans* contient une copie du gène *tatC* et deux copies des homologues *tatA/E/B* (Shaerleckens et al., 2001). Un mutant *S. lividans* Δ *tatC* a été créé dans lequel la sécrétion de la tyrosinase de *S.antibiocus* est bloquée (Shaerleckens et al., 2001). Cette enzyme est composé de deux sous unités : le transactivateur (MelC1) et l'apotyrosinase (MelC2). La sécrétion du complexe correspond au mécanisme de "co-translation sur le pouce" détaillé précédemment. MelC1 qui possède un peptide signal de type TAT, peut former un complexe avec MelC2 (Lee et al., 1988; Chen et al., 1992, Leu

et al., 1992). Une fois le complexe formé, MelC2 peut fixer un atome de cuivre et la sécrétion peut avoir lieu. MelC1 se sépare ensuite de MelC2 dès la fin du transport (*Chen et al.*, 1992, *Tsai et Lee*, 1998). Le peptide signal TorA de *E. coli* est capable de diriger la sécrétion vers le système TAT chez *S. lividans* bien que les composantes du système entre les deux espèces présentent peu d'homologie (*Shaerleckens et al.*, 2001).

De plus, un logiciel de recherche des peptides signaux TAT mis au point par l'équipe du professeur Brezinski (université de Sherbrooke, Québec) a permis de sonder le génome de *S. coelicolor* (un proche parent de *S. lividans*). Parmi le protéome, 138 séquences peuvent correspondre à des peptides signaux de type TAT (résultats non publiés).

Parmi les nombreuses enzymes extracellulaires que sécrète *S. lividans*, trois types de xylanases sont retrouvés : XlnA, B et C (*Kluepfel et al.*, 1990; *Kluepfel et al.*, 1992; *Morosoli et al.*, 1986; *Sharek et al.*, 1991). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le xylane, l'un des composants majeurs de l'hémicellulose du bois. Le xylane est un polymère de xyloses liés en β -1-4 et substitué d'acide uronique, d'hexoses et pentoses. Les xylanases B et C dégradent le xylane en xylo-oligosaccharides de 5 à 20 résidus de long alors que la XlnA libère plutôt du xylobiose ou des xylotrioses (*Biely et al.*, 1993). La souche sauvage produit de très faibles quantités de XlnC comparées à celles des XlnA et B (*Kluepfel et al.*, 1992).

La XlnA est sécrétée par le système GSP (*Pagé et al.*, 1996). Le remplacement de son peptide signal par celui de la XlnB produit sensiblement la même quantité d'enzyme, laissant supposer que les XlnA et B sont des protéines dépendant du système GSP pour leur sécrétion. Par contre, le remplacement du peptide signal de la XlnA par le peptide signal de la XlnC diminue la production enzymatique d'un facteur dix (*Pagé et al.*, 1996). Ce peptide signal particulier ne semblait donc pas convenir à la sécrétion de la XlnA. Or, parmi les 49 a.a. du peptide signal de la XlnC, on retrouve la séquence **S-R-R-G-F-L-G** relativement proche du motif consensus TAT. Il semblait donc que le peptide signal de la XlnC était un peptide signal de type TAT. L'objectif du projet de recherche consistait à démontrer que la XlnC était sécrétée par le système TAT chez *S. lividans*.

PARTIE II

MATERIEL & METHODES

1- Description des souches bactériennes et des vecteurs utilisés

1-1- *Escherichia coli*

Les sous-clonage du gène *xlnC* et de ses versions modifiées ont été effectués dans la souche DH11S. Les opérations de mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel nécessitent l'utilisation des deux souches CJ236 et MV1190. Les caractéristiques de chacune des trois souches d'*E. coli* sont répertoriées dans le tableau III.

Tous les plasmides utilisés pour transformer *E. coli* lors de cette étude dérivent du phagemide pTZ19U (2860 pb). Le pTZ19U contient l'origine de réplication double brin d'origine bactérienne *colE1* ainsi que l'origine de réplication simple brin du phage f1, activable après une co-infection par le phage auxiliaire M13K07. Il contient également le gène de résistance à l'ampicilline, l'opérateur et le promoteur du gène *lac*, le promoteur de l'ARN polymérase T7 et le fragment *lacZ'* (codant pour les 145 premiers a.a. de la β -galactosidase) au sein duquel on retrouve un site multiple de clonage (voir Appendice D).

Souche	Génotype	Fournisseur (réf catalogue)
DH11S	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS mrcBC</i>) Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>recA1398</i>) <i>deoR supE rpsL srl thi</i> /F' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15	GIBCO BRL® (18307-017)
CJ236	<i>Dut-1, ung-1, thi-1, relA1</i> ; pCJ105 (Cm')	BIO-RAD (170-3114)
MV1190	Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>thi, supE</i> , Δ (<i>srl-recA</i>)306:: <i>Tn10</i> (<i>tet</i> ^r) [F': <i>traD36, proAB, lacI</i> ^q Z Δ M15]	BIO-RAD (170-3115)

Tableau III : Souches de *Escherichia coli* utilisées au cours du projet de recherche

1-2- *Streptomyces lividans*

Le gène de la xylanase C a été isolé à partir d'une banque génomique de *S. lividans* 66. Le gène complet de la XlnC se trouve dans le plasmide pIAF20 (Mondou et al., 1986)

La souche utilisée pour les transformations chez *S. lividans* est la souche 10-164. Cette dernière est un mutant de la souche sauvage 1326 dans laquelle le système de transport du cellobiose et du xylobiose est inhibé. Or le cellobiose et le xylobiose sont connus pour être des effecteurs positifs de l'expression des gènes codant respectivement pour les cellulases et les xylanases de *S. lividans*. Ainsi, la souche 10-164 est un mutant cellulase/xylanase négatif (Hurtubise et al., 1995).

Les plasmides utilisés pour transformer *S. lividans* 10-164 sont tous dérivés du plasmide multicopies pIJ702 (40 à 300 copies par cellule). Ce plasmide de 5.8 kb (voir Appendice F) contient plusieurs sites uniques de restriction ainsi que le gène de résistance au thiostrepton, un antibiotique utilisé comme crible de sélection.

2- Milieux de culture

Les compositions des milieux de culture utilisés au cours du projet sont données en Appendice H.

2-1- *Escherichia coli*

Les milieux de culture solides pour *E. coli* sont le LB ou préférentiellement le 2xTY. Pour obtenir des milieux solides, 15 g d'agar par litre de milieu sont ajoutés. Après autoclavage, ces milieux sont additionnés de 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'ampicilline afin de permettre la sélection des clones bactériens transformés par pTZ19U et/ou de 15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de

chloramphénicol pour maintenir une pression de sélection pour le maintien de l'épisome F' de la souche CJ236.

Le milieu de culture liquide TB (Terrific Broth) est utilisé pour la préparation d'ADN plasmidique de *E. coli*.

2-2- *Streptomyces lividans*

2-2-1. Milieux liquides

- M14 xylose 1% : ce milieu minimum est additionné d'une source de carbone, en l'occurrence le xylose. Il est utilisé pour suivre la production de xylanase par les transformants.
- TSB (Tryptic Soy Broth) : ce milieu est utilisé principalement pour la culture des transformants afin de préparer de l'ADN plasmidique. Il contient 5mg de thiostrepton par litre de milieu.

2-2-2- Milieux solides

- R5 : ce milieu est utilisé pour la régénération des protoplastes suite à une transformation. Il contient tous les éléments qui permettent à *S. lividans* de se reconstituer une paroi membranaire.
- Soya Flour Mannitol (SFM) : ce milieu sert à la sporulation des clones. Il contient 50 mg de thiotrepton par litre de milieu.
- RBB Xylane : ce milieu permet de visualiser de manière rapide l'activité xylanasiqye éventuelle des transformants. Le substrat, du xylane de l'épeautre d'avoine, est lié de manière covalente au colorant Remazol Brilliant Blue formant ainsi le complexe RBB-Xylane (Sigma, # M-5019). La présence d'activité xylanasiqye se traduit par

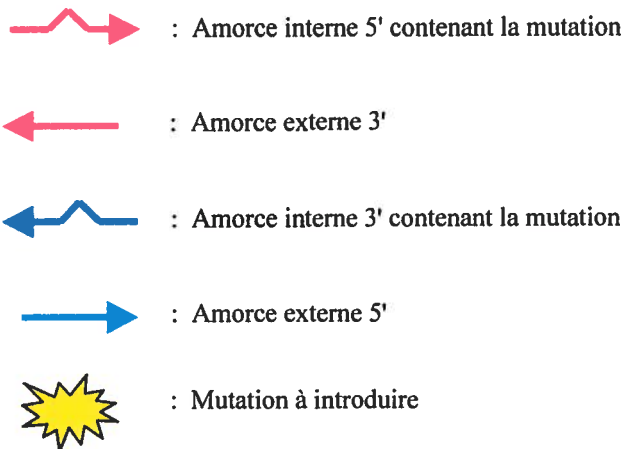
l'apparition d'une zone d'éclaircissement autour de la colonie suite à l'hydrolyse enzymatique du substrat alors que le reste de la boîte demeure bleu.

3- Manipulations de l'ADN

3-1- Réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Dans tube Eppendorf de 0.2 ml, on place 32.5 μ l d'eau stérile, 4 μ l d'un mélange contenant 2.5 mM de chaque dNTP, 5 μ l de tampon *Pfu* 10X, 4 μ l de propionamide 50 %, 0.5 μ l de Tween 20 5%, 1.5 μ l de chacune des deux amorces à une concentration de 25 pmol. μ l⁻¹ (soit 37.5 pmol au total), 0.5 μ l d'ADN matrice à une concentration de 0.1 μ g. μ l⁻¹ (soit 50 ng), 0.5 μ l de *Pfu Turbo*® (*Stratagene*, # 600252) à 2.5 U. μ l⁻¹ (soit 1.25 U). Le thermocycleur employé est le *Techne Genius*. Le programme utilisé pour amplifier le gène de la *xlnC* se déroule dans les conditions suivantes : 5 min à 95°C, 5 min à 55°C, 3 min à 72°C puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 3 min à 72°C. Une variante de ce programme, comportant moins de cycles, a été utilisée pour les opérations de PCR recombinantes ou PCR emboîtées (*Higuchi, 1990*). Le principe de cette méthode est expliqué à la figure 7. Avant de procéder aux cycles d'amplification, la matrice est chauffée pendant 5 min à 100°C. L'amplification est ensuite réalisée dans les conditions suivantes : 5 min à 95°C, 5 min à 55°C, 3 min à 72°C avant d'enchaîner par 15 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 3 min à 72°C.

Figure 7 : Mutagenèse dirigée par la méthode de la PCR recombinante ou "emboîtée".



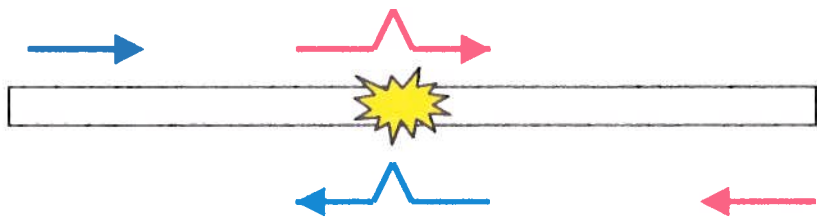
PCR 1a : première ronde d'amplification permettant d'amplifier la partie 5' du gène et d'introduire la mutation.

PCR 1b : première ronde d'amplification permettant d'amplifier la partie 3' du gène et d'introduire la mutation.

Extension 3' : les deux produits issus des réactions 1a et 1b peuvent se réarranger entre eux de deux manières différentes. L'association générant des extrémités 3'OH libres permet l'amplification complète du gène.

PCR 2 : seconde ronde d'amplification seulement à l'aide des amorces externes.

(Figure tirée de *Higuchi, 1990* publié dans PCR Protocols, a guide to methods and applications).



PCR 1A



PCR 1B



- Purification des fragments sur gel d'agarose
- Dénaturation des 2 réactions de PCR (5min-100°C)
- Renaturation



} Réarrangement non productif, absence d'extrémités 3'OH libres

+



Extension 3'



PCR 2



3-2- Digestion enzymatique et contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose

On admet qu'une unité d'enzyme de restriction est suffisante pour digérer un μg d'ADN. La réaction de digestion est réalisée pendant 1h minimum à 37°C dans du tampon "One for all" 1X final (Pharmacia). Le volume final est en général de 20 μl . Les enzymes de modification de l'ADN proviennent toutes de la compagnie *Amhersam Biosciences*. A la fin de la digestion, on ajoute 4 μl de tampon de charge 4X (voir Appendice I) puis on dépose les échantillons sur gel d'agarose 0.7 % (Bio-Rad, # CAS 9012-36-6), le tampon TAE 1X (voir Appendice I) constituant le tampon d'électrophorèse. Dans l'un des puits, on dépose un standard d'ADN (1kb Ladder, Life Technologies, # 15615). Le gel d'agarose contient en plus 0.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de bromure d'éthidium (Sigma, # E-8751). Ce dernier est un agent qui s'intercale entre les bases complémentaires de l'ADN et qui lorsqu'il est excité par les ultraviolets (U.V.) émet de la fluorescence. Les gels sont illuminés par les UV afin de visualiser les bandes d'ADN puis une photo est prise avec un *Gel Doc 1000* (Bio-Rad).

3-3- Extraction d'un fragment d'ADN séparé sur gel d'agarose

Après digestion enzymatique et migration sur gel, il est possible de découper le gel d'agarose afin de récupérer un fragment d'intérêt. Ce dernier peut être ensuite extrait de l'agarose à l'aide du kit QIAEX[®]II de Qiagen. Après solubilisation de l'agarose et en présence de fortes concentrations de sels, le fragment d'ADN est adsorbé de manière sélective sur des billes de silica-gel. L'élution de l'ADN est réalisée en employant une solution faiblement concentrée en sels.

3-4- Ligation

Vecteur et insert d'intérêt sont digérés par les mêmes enzymes de restriction (ou par des enzymes compatibles) puis récupérés par la méthode précédente. Il est très important de respecter le ratio vecteur/insert. En règle générale, il est souhaitable de digérer trois fois

plus d'insert que de vecteur. La quantité de vecteur utilisée est de 25-30 ng dans le cas d'une transformation dans *E. coli* et de 100-200 ng dans le cas d'une transformation dans *S. lividans*.

La réaction de ligation se fait pendant 4 à 16 h à 14 °C dans un volume final de 10 µl contenant 1µl de tampon "one for all" 10X, 1µl d'ATP 10 mM et 2.5 unités d'ADN Ligase de phage T4 (USB, # E70042X). Au cours de l'avancement du projet, le kit *Rapid DNA Ligation Kit* (#K1422) de *Fermentas* a été utilisé préférentiellement. Grâce à ce kit et en suivant les instructions du fournisseur, cinq minutes suffisent pour la réaction de ligation.

3-5- Transformation des cellules

3-5-1- Escherichia coli

La transformation de *E. coli* nécessite la préparation de cellules compétentes. La préparation des cellules et leur transformation sont deux étapes réalisées d'après la méthode de *Hanahan (1983)*. Les cellules sont, tout d'abord rendues compétentes par un traitement au CaCl₂, ce qui rend perméable la membrane des bactéries. Par la suite, ces bactéries peuvent être conservées à -80°C dans une solution de glycérol 15 %. En règle générale, 10 µl de mélange de ligation servent à transformer 100 µl de bactéries compétentes. L'entrée d'ADN exogène est déclenchée par un choc thermique de 2 min à 42°C. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 1h à 37°C sous une agitation de 250 rpm afin de permettre l'expression phénotypique de la résistance à l'ampicilline. La sélection des bactéries recombinantes se fait sur un milieu contenant de l'ampicilline comme le 2xTY ou LB. Les bactéries transformées apparaissent après environ 16h à 37°C.

3-5-2- Streptomyces lividans

La transformation de *S. lividans* se fait au moyen de protoplastes de la souche 10-164, préparés d'après la technique de *Kieser et al. (2000)*. 10 ul de mélange de ligation servent

à transformer 50 µl de protoplastes (10^8 à 10^9 protoplastes.ml⁻¹). Les protoplastes sont étalés sur un milieu R5. Après 16h de régénération à 30°C, la sélection des transformants est effectuée en recouvrant le milieu R5 par 1.5 ml d'une solution de thiostrepton à 0.33 mg/ml (Sigma, # T-8902). Incubés à 30°C, les transformants apparaissent 2-3 jours après l'addition de l'antibiotique.

3-6- Purification de l'ADN plasmidique

3-6-1- Escherichia coli

L'ADN plasmidique d'*E. coli* peut être extrait selon deux techniques. La première est la lyse par ébullition (*Holmes et Quigley, 1981*). Elle consiste à lyser la paroi des cellules par l'emploi de Triton X-100 et de lysozyme puis à dénaturer les protéines et l'ADN chromosomique par ébullition. L'ADN plasmidique, de par sa conformation super-enroulée, est résistant à ce traitement. Cette méthode rapide est utilisée lorsque l'on souhaite purifier rapidement l'ADN de plusieurs dizaines de clones à la fois.

La seconde technique est la lyse alcaline en présence de SDS (*Birnboim et Doly, 1979*). Ce dernier lyse la paroi des cellules libérant dans le milieu alcalin les protéines et l'ADN chromosomique qui sont immédiatement dénaturés. Comme dans la technique précédente, la structure super-enroulée de l'ADN plasmidique n'est pas dénaturée. Cette méthode sera employée préférentiellement dans le cas d'un nombre limité d'échantillons pour lesquels on désire une très bonne qualité de préparation. Tous les produits nécessaires pour cette méthode sont fournis dans le kit *Flexiprep (Amersham Pharmacia Biotech, # 27-9281-01)*. Progressivement le kit *Flexiprep* a été remplacé par le kit *QIAprep Spin Miniprep (#27104)* de *Quiagen*. Le principe et les rendements obtenus avec les deux kits sont semblables mais la technologie de *Quiagen* est beaucoup plus rapide.

3-6-2- *Streptomyces lividans*

La méthode employée pour purifier l'ADN plasmidique de *S. lividans* est une variante de la méthode de lyse alcaline en présence de SDS (Birnboim et Doly, 1979). Elle a été modifiée dans le but de l'appliquer aux *Streptomyces* (Kieser et al, 2000). La principale différence avec le kit est que la purification de l'ADN se fait par une extraction phénol / chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol.

3-7- Mutagenèse dirigée selon Kunkel

Cette méthode a été mise au point par Kunkel (1985), elle est également appelée méthode du simple brin (voir fig.8). Le fragment d'intérêt que l'on souhaite muter est tout d'abord cloné dans un vecteur pouvant à la fois exister sous une forme simple brin ou sous une forme double brin. Le vecteur utilisé est le phagemide pTZ19U dans notre cas. Cette construction sert à transformer la souche d'*E. coli* CJ236 qui présente la double mutation *dut ung*. La mutation *dut* inactive la dUTPase entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de dUTP. L'ADN néosynthétisé incorpore ainsi des uraciles à la place des thymines. La mutation *ung* inhibe l'uracil-N-glycosylase, ce qui permet aux uraciles de se maintenir dans l'ADN. Le phagemide se réplique de manière classique comme un plasmide circulaire double brin jusqu'à l'infection de son hôte par un phage auxiliaire comme le phage M13K07. Ce dernier produit des protéines qui stimulent l'origine de répllication simple brin du phagemide. Le phagemide se réplique, est empaqueté puis libéré dans le surnageant de culture comme s'il s'agissait d'un phage simple brin. L'ADN simple brin uracilé est ensuite extrait du phage puis purifié. *In vitro*, une amorce complémentaire, contenant une mutation, est hybridée à l'ADN simple brin. A partir de cette amorce, l'ADN Polymérase T7 synthétise le second brin qui est circularisé par l'ADN ligase T4. Le vecteur comporte maintenant un brin parental uracilé mais non porteur de la mutation et un brin néosynthétisé contenant la mutation mais non uracilé. Ce plasmide double brin sert ensuite à transformer la souche d'*E. coli* MV1190

qui possède une uracil-N-glycosylase active. Cette enzyme détruit le brin uracilé et favorise la multiplication du brin non uracilé porteur de la mutation.

La société Bio-Rad fournissait jusqu'à dernièrement un kit comportant tous les réactifs et les enzymes afin de réaliser les opérations de mutagenèse dirigée selon Kunkel (MutaGene® Phagemid *In Vitro* Mutagenesis, # 170-3581). Les différentes étapes de cette technique sont effectuées conformément au manuel d'instruction (version 2) fourni avec le kit.

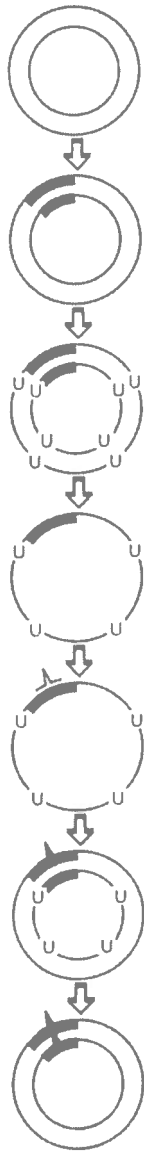
Figure 8 : Mutagenèse dirigée selon la méthode décrite par Kunkel (1985)

Le paragraphe 3-7 du texte reprend en détails cette technique.

U : uracil

■ : gène d'intérêt

—∧— : amorce portant la mutation



- Insertion du gène d'intérêt dans le pTZ19U.
- Transformation de la souche *E.coli* CJ236 *dut ung*.
- Infection avec le phage auxiliaire puis purification du phagemide sous sa forme simple brin.
- Hybridation de l'amorce contenant la mutation souhaitée.
- Synthèse *in vitro* du second brin d'ADN à partir de l'amorce puis ligation du brin *néo-synthétisé*.
- Transformation de la souche de *E.coli* MV1190, destruction du brin parental, seul le brin mutant se réplique.

3-8- Hybridation de colonies par des sondes radioactives

Dans certains cas, la détection des mutations doit être effectuée par hybridation à l'aide de sondes marquées au ^{32}P . Les sondes sont constituées par l'amorce ayant servi à la réaction de mutagenèse mais que l'on a marquée. La réaction de marquage est réalisée en présence de $1\ \mu\text{l}$ d'amorce à une concentration de $100\text{-}200\ \text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $10\ \mu\text{l}$ de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP à $4500\ \text{Ci}\cdot\text{mmole}^{-1}$ (ICN, # 35001X), 5 unités de polynucléotide kinase (USB, # 27073601) et $5\ \mu\text{l}$ de tampon kinase 10X (Tris-HCl $0.5\ \text{M}$ pH 7.6, MgCl_2 $0.1\ \text{M}$, DTT $50\ \text{mM}$, spermidine HCl $1\ \text{mM}$, EDTA $1\ \text{mM}$ pH 8.0) pour un volume final de $50\ \mu\text{l}$. Le marquage se déroule pendant 1h à 37°C . La sonde est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Dans un tube Eppendorf, on place $2\ \mu\text{l}$ de miniprep plasmidique avec $2\ \mu\text{l}$ de solution dénaturante (EDTA $20\ \text{mM}$, NaOH $0.8\ \text{M}$). On incube 10 min à température ambiante puis on dépose $2\ \mu\text{l}$ sur une membrane de Nylon (Boehringer-Mannheim, # 1209272). L'ADN est ensuite fixé sur la membrane par un traitement aux U.V. à l'aide du GS Gene Linker UV Chamber de Bio-Rad (programme C-L, $125\ \text{mJ}$). La membrane est préhybridée pendant 1h à 42°C dans le tampon d'hybridation contenant du SSC 6X, du Na_2HPO_4 $50\ \text{mM}$ pH 7.0, SDS $0.1\ \%$, Denhardt 5X et $0.1\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ADN de sperme de saumon. La membrane est ensuite hybridée avec $10\ \text{pmol}$ de sonde radioactive en présence de tampon d'hybridation et pendant 16h à 42°C . La membrane est ensuite lavée 3 fois 20 min à température ambiante dans une solution de SSC6X ($0.9\ \text{M}$ NaCl, A&C # S-240; $0.09\ \text{M}$ citrate de sodium, Fisher # S-279-500), SDS $0.1\ \%$. Elle est ensuite rincée par une solution de chlorure de tetraméthylammonium (Me_4NCl $3\ \text{M}$, Tris-HCl $50\ \text{mM}$ pH 8.0, EDTA $2\ \text{mM}$, SDS $0.1\ \%$) puis lavée une dernière fois dans du Me_4NCl $3\ \text{M}$ seul à une température inférieure de 2 à 4 degrés à la température de dénaturation de la sonde. Cette technique d'hybridation repose sur les propriétés du Me_4NCl qui permet une hybridation indépendante de la composition en bases de l'amorce, cela signifie que la température de lavage dépend exclusivement de la longueur de l'amorce et non pas de sa composition en G+C (*Wood et al., 1985*). La membrane est séchée puis placée dans une cassette sensible à la radioactivité (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Après 24h d'exposition à température ambiante, l'écran est scanné (Phospho Imager™ SI, Molecular Dynamics) et analysé par le logiciel Image Quant®5.0 (Molecular Dynamics).

4- Vérification des séquences

Les séquences des différentes constructions ont été vérifiées par la méthode de terminaison de chaînes aux didesoxynucléotides (*Sanger et al., 1977*) en présence de 4% de propionamide pour éviter les compressions dues à la forte proportion de GC du génome de *S. lividans*. Les réactions de séquençage ont été traitées à l'aide du séquenceur automatique *ABI PRISM 3700 DNA Analyser* par la société DNA LandMarks Inc.

5- Dosage de l'activité enzymatique des xylanases

5-1- Conditions de culture des souches

Les spores des clones de *S. lividans* sont inoculées dans des erlenmeyers contenant 20 ml de milieu M14 xylose 1% à raison de $2 \cdot 10^6$ spores.ml⁻¹. Les cultures sont incubées à 34°C sous agitation à 240 rpm.

5-2- Dosage de l'activité enzymatique

Des échantillons de culture de 1 ml sont prélevés au cours du temps. Ils sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 13000 rpm. Le surnageant est prélevé et conservé à -20°C jusqu'au dosage de l'activité enzymatique. Les culots, contenant le mycélium, sont conservés pour mesurer la croissance bactérienne. L'activité enzymatique des surnageants de culture est mesurée par la méthode des sucres réducteurs (*Miller, 1959*), en utilisant comme substrat le xylane de boulot. Les xylanases de *S. lividans* dégradent le xylane en oligoxylosides de tailles variables dont les extrémités réductrices réagissent avec l'acide dinitrosalicylique (acide hydroxy-2-dinitro 3,5-benzoïque ou DNS) pour donner une coloration brune directement proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm.

Le xylane de bouleau (Sigma, # X-0502), est dissous à 1% dans l'eau en chauffant. Le tampon de réaction est du citrate-phosphate 0.5 M pH 6.0 contenant 17.22 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (JT Baker, # 3824-05) et 3.43 g d'acide citrique (A&C, # C-3285). La gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de D(+)-xylose (Sigma, # X-1500). Avant addition des échantillons de surnageant de culture, les tubes à essai sont pré-incubés pendant au moins 3 min dans un bain-marie à 57°C. La réaction enzymatique est déclenchée par addition de 0.1 ml d'une dilution appropriée du surnageant de culture. Après 10 min à 57°C, 1 ml de DNS est ajouté dans tous les tubes, ce qui stoppe la réaction enzymatique. La solution de DNS contient 10 g d'acide dinitrosalicylique (BDH, # 28235 3N), 10 g de NaOH (Fisher Scientific, S-318B), 2 g de phénol (BDH, # B29471) et 200 g de tartrate de sodium et potassium (A&C, # P-480) ainsi que 0.5 ml de métabisulfite de sodium 10 % (JT Baker, # 3552) pour un volume final de 1 litre. Les tubes échantillons contrôles sont traités de la même manière sauf que le surnageant de culture est ajouté après le DNS. La gamme étalon n'est pas incubée à 57°C (voir Tableau IV).

Tous les tubes sont ensuite chauffés au bain Marie bouillant pendant 15 min puis refroidis sur glace et 300 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits d'une plaque Elisa. La plaque est ensuite lue par un spectrophotomètre à 540 nm (*Microplate autoreader EL309, BIO TEK Instruments*). Les valeurs obtenues sont reportées sur la courbe standard afin de déterminer l'activité de chaque échantillon. Une unité enzymatique internationale (UI) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une µmol de substrat (en l'occurrence des oligoxylosides) par min à 57°C.

	Gamme étalon					Echantillon	
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	Essai	Témoin
Xylane 1%	-	-	-	-	-	0.5	0.5
Tampon	0.1						
Eau	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70	0.3	
Surnageant de culture	-	-	-	-	-	0.1	0.1 ^(*)
Xylose 10 mM	-	0.05	0.10	0.15	0.20	-	-
V _{final}	1.0						

(*) ajouté seulement après l'addition de DNS

Tableau IV : Dosage de l'activité xylanase des surnageants de culture. Composition de la gamme étalon en xylose et des tubes "essai" et "témoin" des échantillons.

5-3- Test de l'activité xylanasique sur gel de RBB-xylane

Cette méthode est 1000 fois plus sensible que la méthode précédente au DNS car elle permet la détection de nmol d'enzyme. Le RBB-xylane est tout d'abord dissous par chauffage pendant 1h sous agitation dans du Tris HCl 20 mM pH 6.5 afin d'obtenir une concentration finale de RBB-xylane comprise entre 0.5 et 1 %. Afin d'obtenir un gel, on ajoute 0.7 % d'agarose puis on chauffe quelques secondes au micro-ondes avant de couler le gel. On creuse des puits dans lesquels on dépose 40-50 μ l de surnageant de culture ou d'extrait cellulaire de 72 h. Les extraits cellulaires sont obtenus après traitement aux ultrasons du mycélium récupéré après centrifugation de 1 ml de surnageant de culture. Après quelques heures d'incubation, il est possible d'observer des zones d'éclaircissement. On observe à intervalles de temps réguliers l'évolution des zones d'éclaircissement à 37°C.

5-4- Dosage de l'ADN

Afin de ne pas imputer les différences d'activités enzymatiques des clones à des variations de la biomasse, le dosage de l'ADN est effectué pour chaque échantillon afin d'estimer la croissance bactérienne selon la méthode décrite par *Burton* (1956). Après avoir prélevé et centrifugé 1 ml de culture, le surnageant est décanté puis le culot est repris par 500 μ l de SSC1X (15 mM NaCl, A&C # S-240; 15 mM citrate de sodium, Fisher # S-279-500) puis dispersé avec un potter avant de rajouter 500 μ l supplémentaires de SSC1X. A chaque tube, on ajoute 1.0 ml d'acide perchlorique (Sigma, # 17,674-5), 2.0 ml de diphénylamine à 4% (Sigma, #D3409) et 0.2 ml d'acétaldéhyde à 0.16 % (Sigma, # 408788), puis on mélange à l'aide du vortex. Recouverts de parafilm, les tubes sont incubés 16h à 30°C sans agitation. 1 ml de suspension est centrifugé pendant 2 min à 14000 rpm puis le surnageant est dosé au spectrophotomètre (Ultrospec III, Pharmacia). La différence $DO_{595nm} - DO_{700nm}$ permet de mesurer la quantité d'ADN.

6- Western Blot

Les xylanases sont mises en évidence dans les surnageants de culture par la technique du Western Blot. Généralement, 20 µl de surnageant de culture de 72h additionnés de 10 µl de tampon de charge 3X (voir Appendice I) sont bouillis pendant 5 min. Les échantillons sont déposés sur SDS-PAGE où le gel de regroupement à 4 % est suivi d'un gel de séparation à 12 %. Un voltage de 90V est appliqué pendant 10 min puis porté à 200V jusqu'à la fin de l'électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse est composé de Tris-glycine 1X (voir Appendice I). Les protéines séparées sur le gel sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Protran®, Schleicher & Schuell, # 21640) par transfert semi-sec à l'aide du NovaBlot-MultiphorII (Pharmacia). On empile successivement sur la plaque correspondant à la cathode de l'appareil, 3 épaisseurs de papier Whatman, la membrane de nitrocellulose, le gel de concentration puis à nouveau 3 épaisseurs de papier Whatman que l'on recouvre de la plaque correspondant à l'anode. Les membranes de papier Whatman sont préalablement imbibées de tampon de transfert qui est composé de 39 mM de glycine; 48 mM de Tris; 0.0375 % de SDS et 20% de méthanol. Le transfert se déroule pendant 1h entre les deux électrodes en maintenant un ampérage constant de 0,8 mA.cm⁻² de membrane.

Les étapes de lavage, de réaction aux anticorps primaires et secondaires, de révélation sont réalisées en utilisant les produits et en suivant les indications du fournisseur du kit BM Chromogenic Western Blotting AP Mouse/Rabbit (Roche, # 1 647 644). Les anticorps primaires sont des anticorps anti-XlnC de lapin, les anticorps secondaires sont des anticorps anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline. La révélation de l'activité phosphatase alcaline se fait grâce au substrat chromogène NBT / X-phosphate.

7- Pulse-chase

Les clones de *S. lividans* 10-164 sont cultivés dans des erlenmeyers de 125 ml contenant 20 ml de milieu M14 additionnés de 1ml de xylose 20 % (D(+) xylose, Sigma, # X-1500). Le milieu estensemencé par 2.10^6 spores.ml⁻¹ puis incubé à 34°C pendant 48h sous agitation à 240 rpm. La culture est centrifugée pendant 1 min à 1500 rpm. Le culot est rincé deux fois avec du milieu M14 puis remis en suspension dans un volume final de 20 ml de ce même milieu. Cinq ml de cette suspension sont dispersés à l'aide d'un potter puis transférés dans un erlenmeyer de 25 ml auquel du xylose est ajouté de manière à obtenir une concentration finale de 0.5%. La suspension est incubée pendant 5 min à 34°C dans un bain-marie agité puis les cellules sont marquées avec de la méthionine [³⁵S] à une concentration finale de 180 µCi.ml⁻¹ (Tran³⁵S-Label™, ICN Biomedicals, # 51006). Après 2 min, une compétition est instaurée par addition d'un mélange de L-méthionine / L-cystéine à une concentration finale de 80 µg.ml⁻¹ (Sigma, # M-9625; J.T. Baker, # 5-G121). Le Tran³⁵S-Label™ contient 20 % de cystéine marquée d'où l'importance d'introduire également une compétition pour la cystéine. Ensuite de la sérum albumine de bœuf (BSA) est également ajoutée à une concentration finale de 50 µg.ml⁻¹ pour faciliter la précipitation des protéines. De l'azoture de sodium (NaN₃, JT Baker, # 5VO22) ou du carbonyl cyanamide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, Sigma, # C2759) peut également être ajouté afin d'obtenir respectivement des concentrations finales de 2 mM et 0.01 mM. Ces deux composés chimiques sont des inhibiteurs de la sécrétion des protéines. L'azoture de sodium est additionné en même temps que le xylose alors que le CCCP est ajouté en même temps que le mélange L-méthionine / L-cystéine. Des aliquots de 500 µl sont prélevés à différents temps et immédiatement mélangés avec 500 µl d'acide trichloroacétique 10 % (BDH, # ACS 942) puis incubés sur la glace pendant au moins 30 min. Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 3500 rpm puis les culots sont lavés deux fois avec de l'acétone en dispersant les culots entre chaque lavage. L'acétone résiduel est évaporé pendant 15 min, puis les culots sont repris par 40 µl de Tris-base (Bio-Rad, # 161-0719), 1 ml de tampon SP (voir Appendice J) et 10 µl de Phénylméthylsulfonylfluoride (Sigma, # P7626), un inhibiteur de protéases. Le mycélium est alors traité aux ultrasons (Sonicator® Ultrasonic Processor XL, Heat Systems). Placés

sur la glace, les échantillons sont soumis aux ultrasons 6 fois 30 secondes avec 30 secondes de pause entre chaque opération. Après ajout de 100 µl de SDS 10 % (IBI, # 07062), les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 min puis dilués par 12 ml de tampon IPD (voir Appendice J). Une pré-clarification des échantillons est réalisée à l'aide de 30 µl d'une solution de protéine A Sépharose 10 % (Sigma, # P3391) pendant 1h sous agitation à + 4°C. Après centrifugation de 5 min à 3500 rpm, les surnageants sont prélevés et transférés dans de nouveaux tubes auxquels on ajoute 5 µl d'antisérum approprié de lapin. Après 30 min d'incubation à 4°C, 50µl de protéine A Sépharose 10 % sont ajoutés, suivi d'une incubation d'une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 3000 rpm. Les billes sont récupérées et lavées par 10 ml de tampon IPW (voir Appendice J), centrifugées 5 min à 3000 rpm puis transférées dans des tubes de 1.5 ml afin de réaliser trois autres lavages avec du tampon IPW. Les tubes sont centrifugés 15 sec à 13000 rpm, les surnageants sont ensuite éliminés. Les culots de billes peuvent être stockés à - 20°C pour une utilisation ultérieure. Sinon, les culots sont repris par 35 µl de tampon Laemmli 1X (voir Appendice I), bouillis pendant 5 min à 100°C et centrifugés 2 min à 13000 rpm. Les échantillons sont déposés sur SDS-PAGE. Un voltage de 90V est appliqué pendant 10 min puis porté à 200V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. Le tampon d'électrophorèse est un tampon Tris-glycine 1X (voir Appendice I). Après démoulage, le gel de séparation est fixé dans un mélange isopropanol/eau/acide acétique (25:65:10) pendant 20 min sous agitation. Le fixateur est éliminé puis remplacé par le produit *Amplify* (Amersham Pharmacia Biotech, # NAMP 100) pendant 30 min. Le gel est ensuite déposé sur du papier filtre épais puis séché pendant 1h à 80°C (Bio-Rad, Gel Slab Dryer). Il est ensuite déposé dans une cassette possédant un écran sensible à la radioactivité (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Après 2 jours d'exposition à température ambiante, l'écran est scanné (Phospho Imager™ SI, Molecular Dynamics) et analysé par le logiciel Image Quant®5.0 (Molecular Dynamics). Ce logiciel nous permet également de quantifier les bandes obtenues.

PARTIE III

RESULTATS

1- Le peptide signal de la xylanase C

Le peptide signal de la XlnC est relativement long et comporte 49 a.a. (voir fig.9a). Sa séquence peptidique a été déduite à partir de la séquence nucléotidique du gène *xlnC* et du séquençage N-terminal de la XlnC mature (résultats non publiés). Ce peptide comporte trois parties : une région-n chargée de 24 a.a. contenant deux acides aspartiques, trois arginine et une lysine, une région-h peu hydrophobe de 19 a.a. et une région-c de 6 a.a. comportant le site de clivage AHA de la signal peptidase.

La région-n du peptide signal de la XlnC est plus long que celui de la XlnA (voir fig.9b). Elle comporte à la fois des a.a. basiques et des a.a. acides alors que la région-n du peptide signal de la XlnA ne contient que des a.a basiques.

A 21 a.a. de son extrémité N-terminale, entre les régions-n et h, le peptide signal de la XlnC comporte la séquence **S-R-R-G-F-L-G**. Par rapport à la séquence TAT conservée **S/T-R-R-X-F-L-K**, seule la glycine terminale remplace la lysine consensus. La présence d'une telle signature laisse supposer que la XlnC de *S. lividans* est dépendante du système TAT pour sa sécrétion.

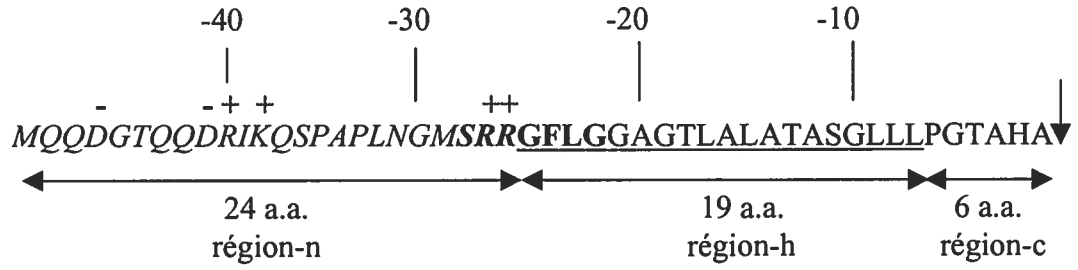
On peut également remarquer que comparativement au peptide signal de la XlnA, celui de la XlnC a une région-h relativement moins hydrophobe. Le peptide signal de la XlnC est riche en a.a. polaires mais non chargés (Gly, Thr et Ser) alors que le peptide signal de la XlnA comporte beaucoup d'a.a. à chaînes hydrophobes (Val, Leu, Ala et Ile). La plus faible hydrophobicité relative du peptide signal de la XlnC serait un nouvel élément en faveur d'un peptide signal de type TAT.

Figure 9 : Séquence des peptides signaux des XlnC et XlnA

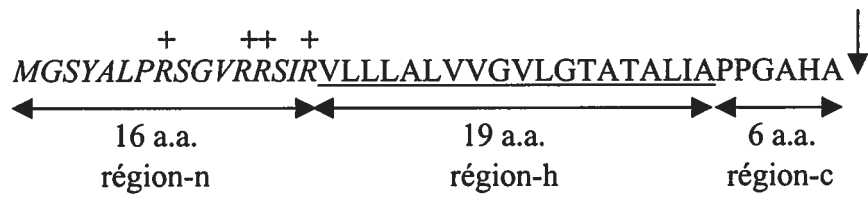
La régions-n est en italique, la région-h est soulignée, la flèche indique le site de clivage de la signal peptidase, les a.a. chargés sont indiqués par + ou -.

- a) peptide signal de la XlnC (49 a.a.) avec sa séquence TAT en caractères gras
- b) peptide signal de la XlnA (41 a.a.)

a)



b)



2- Amélioration de la production de xylanase C

Avant d'étudier plus en détails la sécrétion de la XlnC par le système TAT, il fallait nous assurer qu'il était possible de produire une quantité suffisante de protéine. Il avait en effet été constaté que *S. lividans* produisait de faibles quantités de XlnC comparées à celles des XlnA et XlnB (Kluepfel et al., 1992). Afin d'étudier la sécrétion de la XlnC par le système TAT, nous avons utilisé le clone IAF20 qui contient le plasmide pIAF20. Ce dernier dérive du vecteur d'expression multicopies pIJ702 de *S. lividans* dans lequel un fragment d'ADN de 7.5 kb a été inséré (Kluepfel et al., 1992). Ce fragment contient entre autre le gène complet *xlnC*. Pour évaluer la production de XlnC, le clone IAF20 a été ensemencé dans un milieu M14 contenant du xylose comme source de carbone. Des prélèvements sont effectués à intervalles de temps réguliers pendant 120 h afin de mesurer l'activité xylanase des surnageants de culture. La production de XlnC au cours du temps est représentée à la Fig.10. L'activité xylanase produite par ce clone reste relativement faible, le maximum observé après 120 h de culture n'étant que de 14.5 UI.ml⁻¹.

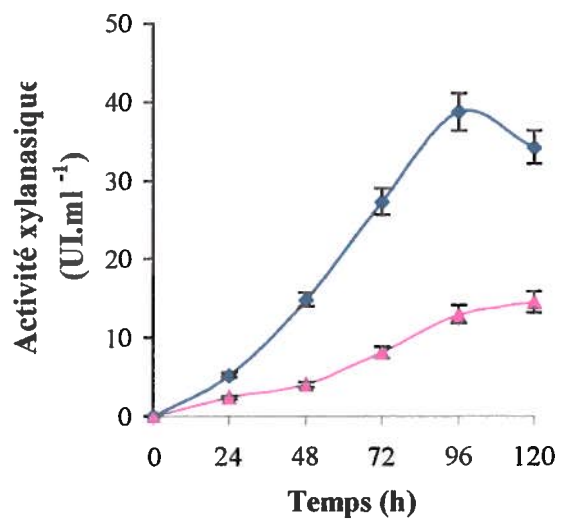
Pour permettre une étude de la sécrétion de la XlnC, il fallait trouver un moyen reproductible d'augmenter de manière significative la production de l'enzyme. Trois avenues de recherche ont été explorées parallèlement. La première visait à remplacer le promoteur du gène *xlnC* que l'on soupçonnait être responsable de la faible production de XlnC (Kluepfel et al., 1992). La seconde consistait à apporter des changements au niveau du gène de structure de la XlnC car l'ARNm dérivé pouvait arborer des structures secondaires en épingle à cheveux relativement stables pouvant ralentir la traduction. La dernière avenue consistait à remplacer le gène de la XlnC par celui de la XlnB2 car les produits des ces deux gènes présentaient de nombreuses similarités. En effet, les protéines XlnC et XlnB2 contiennent toutes les deux, 191 a.a. et partagent 75 % d'identité entre elles.

Figure 10 : Activité xylanasiqne des clones IAF20 et IAF916C

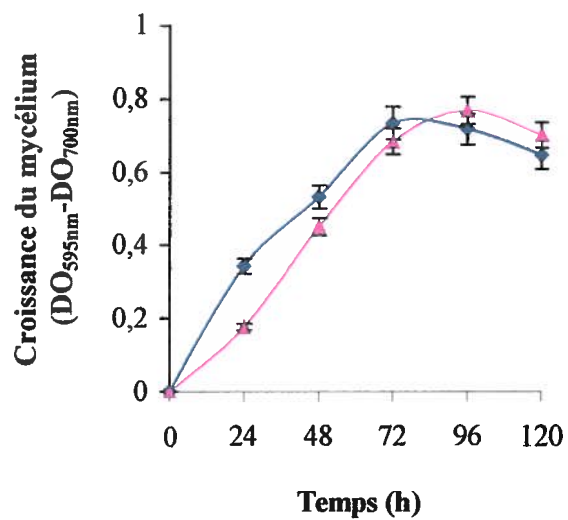
Le clone IAF20 (-▲-) est porteur du plasmide pIAF20 qui contient le gène complet *xlnC*. Le clone IAF916C (-◆-) contient le plasmide pIAF916C dans lequel le gène de structure de la XlnC a été placé sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*. $4 \cdot 10^7$ spores sont ensemencées dans 20 ml de milieu M14 contenant 1% de xylose comme source de carbone puis incubées à 34°C. Des échantillons sont prélevés à intervalles de temps réguliers afin de doser l'activité enzymatique des surnageants de culture par la méthode des sucres réducteurs (Miller, 1959). Le substrat utilisé est le xylane de bouleau. Les résultats sont exprimés en UI.ml⁻¹. Une unité enzymatique internationale (UI) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer un µmol de substrat par min à 57°C. La croissance du mycélium est suivie au cours du temps par dosage de l'ADN selon la méthode de Burton afin de s'assurer que les différences constatées au niveau de l'activité enzymatique ne soient pas imputables à une différence de biomasse. Chaque mesure (activité enzymatique et biomasse) correspond à la moyenne de 3 essais. Les écarts types des mesures sont indiqués.

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹
- b) croissance du mycélium

a)



b)



2-1- Remplacement du promoteur du gène de la *xlnC*

Pour contourner le problème de la faible production de XlnC par le clone IAF20, la première alternative a donc consisté à remplacer le promoteur du gène *xlnC* par celui du gène *xlnA*. Le promoteur *xlnA* présentait l'avantage d'avoir été déjà utilisé avec succès pour la production de grandes quantités de XlnA (Pagé et al., 1995; Kébir et al., 2000).

Le gène *xlnC* a été amplifié par les amorces XC-*KpnI* et CD-401 (voir Tableau V) en utilisant le pIAF20 comme matrice. L'amorce XC-*KpnI* s'hybride à l'extrémité 5' du gène de structure de la XlnC et introduit le site de restriction *KpnI*. L'amorce CD-401 s'hybride à l'extrémité 3' du gène *xlnC*, elle contient un codon stop et introduit le site de restriction *SacI*. Le fragment généré de 576pb a été digéré par les enzymes de restriction *KpnI* et *SacI*, purifié puis inséré dans le plasmide pIAF816 après avoir enlevé le gène de structure de la XlnA. Le pIAF816 dérive du phagemide pTZ19U de *E. coli* et contient la séquence du peptide signal de la XlnC suivie du gène de structure de la XlnA (voir Appendices D et E). Le remplacement du gène de structure de la XlnA par celui de la XlnC entre les sites *KpnI* et *SacI* du pIAF816 a permis d'obtenir le plasmide pIAF816C. Ce dernier a été ensuite digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI* afin de libérer un fragment de 723 pb contenant le gène de structure de la XlnC précédé de la séquence du peptide signal de la XlnC. Afin de permettre le clonage dans *S. lividans*, le fragment précédent a été inséré entre les sites de restriction *HindIII* et *SacI* du pIAF906. Le pIAF906 est un vecteur d'expression dérivé du pIJ702 contenant le promoteur du gène *xlnA* et entre les sites *HindIII* et *SacI*, la séquence du peptide signal de la XlnA ainsi que le gène de structure de la XlnA (voir Appendices F et G). Le remplacement du fragment *HindIII-SacI* du pIAF906 par le fragment *HindIII-SacI* du pIAF816C a permis d'obtenir le plasmide pIAF916C. Ce plasmide contient la séquence du peptide signal de la XlnC suivi du gène de structure de la XlnC placé sous la dépendance du promoteur du gène *xlnA*. Il a servi à transformer la souche 10-164 de *S. lividans*, un mutant cellulase et xylanase négatif. Des spores de IAF916C ont été ensemencées dans un milieu M14 additionné de xylose afin de mesurer l'activité xylanase au cours du temps.

Amorce		Séquence	Commentaires
XC-KpnI	S	5' <u>GGGGTACCATCACCACCAAC</u> 3' <i>KpnI</i>	Extrémité 5' du gène <i>xlnC</i>
CD-401	AS	5' <u>GGGGAGCTCTCAACCGCTGACGGCTGAT</u> 3' <i>SacI</i>	Extrémité 3' du gène <i>xlnC</i> , en gras le codon stop

Tableau V : Amorces utilisées pour amplifier la séquence correspondant au peptide signal et à la partie mature de la XlnC. S, amorce sens; AS, amorce anti-sens.

La production de XlnC du clone IAF916C obtenue est montrée à la figure 10a; elle atteint un maximum après 96h de culture. L'activité enzymatique est alors de 38.7 UI.ml⁻¹ comparativement à seulement 12.9 UI.ml⁻¹ pour le clone sauvage IAF20. Le clone IAF916C produit donc 3 fois plus de XlnC que la souche sauvage IAF20. Comme la croissance du mycélium est similaire pour les deux clones (voir fig.10b), cela montre que le promoteur du gène *xlnC* est sans doute responsable de la faible production de XlnC chez la souche sauvage.

Le remplacement du promoteur du gène *xlnC* par celui du gène *xlnA* ayant donné entière satisfaction, nous avons décidé de le conserver comme base de travail pour la suite du projet. Les plasmides de la série pIAF916 qui comportent tous le promoteur du gène *xlnA* ont donc été exclusivement utilisés au cours du présent projet. Cette série présentait de plus l'avantage d'avoir été bien étudiée par notre équipe et nous permettait des comparaisons avec des résultats antérieurs.

2-2- Modification du gène de structure de la XlnC

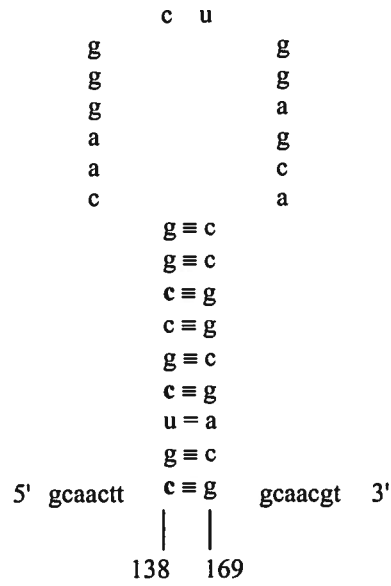
Parallèlement au remplacement du promoteur du gène *xlnC*, nous avons examiné la séquence du gène de structure de la XlnC. Nous avons découvert que cette séquence contenait deux types de domaines qui pouvaient éventuellement ralentir ou dérégler la traduction des ARNm en protéines. Le premier type est constitué d'une séquence pouvant engendrer au niveau de l'ARNm une structure dite en épingle à cheveux ("*hairpin*" en anglais) possédant une énergie de -14 kcal.mol⁻¹ calculée d'après le logiciel *CloneManager 5.0*. Cette structure est retrouvée entre les nucléotides 138 et 169 du gène de structure de la XlnC (voir fig.11a). On peut supposer que les ribosomes sont ralentis à cet endroit et/ou qu'ils n'arrivent pas à franchir cette structure double brin, ce qui pourrait éventuellement expliquer la faible production de XlnC.

Figure 11 : Structures secondaires retrouvées au niveau de l'ARNm de la XlnC.

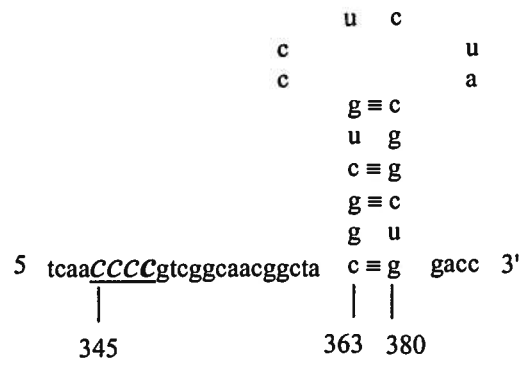
Sur cette figure sont représentés les trois domaines retrouvés au niveau de l'ARNm de la XlnC et pouvant réduire l'efficacité de la traduction.

- a) structure en épingle à cheveux de - 14 kcal; en gras les 3 nucléotides ciblés lors de la mutagenèse dirigée pour réduire l'énergie de la structure secondaire initiale.
- b) zone de glissement de cadre de lecture n°1 (FS1); en majuscules et soulignée, la zone de glissade; en gras et en majuscule, le nucléotide modifié pour supprimer la zone de glissade.
- c) zone de glissement de cadre de lecture n°2 (FS2); en majuscules et soulignée, la zone de glissade; en gras, les trois nucléotide modifiés pour supprimer la zone de glissade et réduire l'énergie de la structure secondaire.

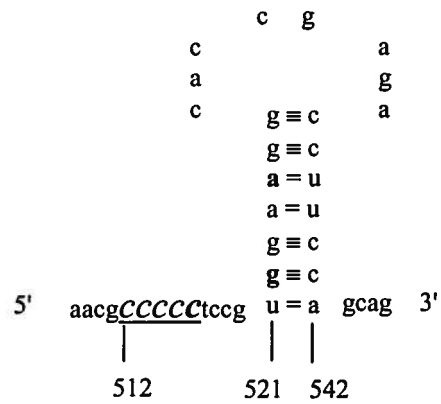
a)



b)



c)



Pour vérifier cette hypothèse, la technique de mutagenèse par PCR recombinante a été utilisée afin de diminuer l'énergie de cette structure secondaire sans changer la séquence de la protéine. Les deux amorces complémentaires XC-36 et XC-37 ont été synthétisées de manière à modifier les nucléotides 138, 141 et 144 (voir fig.11a et Tableau VI). L'amorce XC-36 s'hybride sur le brin anti-sens du gène de structure de la XlnC sur la séquence formant la structure secondaire de $-14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ au niveau de l'ARNm. Utilisée conjointement avec l'amorce CD-401 et en utilisant comme matrice le pIAF20, elle a permis d'amplifier un fragment de 459 pb correspondant à la partie 3' du gène *xlnC*. L'amorce XC-37 s'hybride sur le gène *xlnC* au même niveau que l'amorce XC-36 mais sur le brin sens. L'amplification par les amorces XC-37 et XC-*KpnI* du pIAF20 a permis d'obtenir un fragment de 165 pb qui correspond à la partie 5' du gène de la XlnC. Les deux produits de PCR ont ensuite été purifiés, combinés et à nouveau amplifiés à l'aide des deux amorces externes XC-*KpnI* et CD-401. Le fragment de 576 pb obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *KpnI* et *SacI*, purifié puis inséré dans le plasmide pIAF816. Par la suite, on a procédé exactement de la même manière que pour le plasmide pIAF916C pour obtenir finalement le plasmide pIAF916Ch14. Ce plasmide contient la séquence du peptide signal de la XlnC suivi d'une version modifiée du gène de structure de la XlnC placé sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*. La modification apportée a permis de passer d'une structure secondaire de $-14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à une structure secondaire résiduelle de -2 kcal.mol^{-1} .

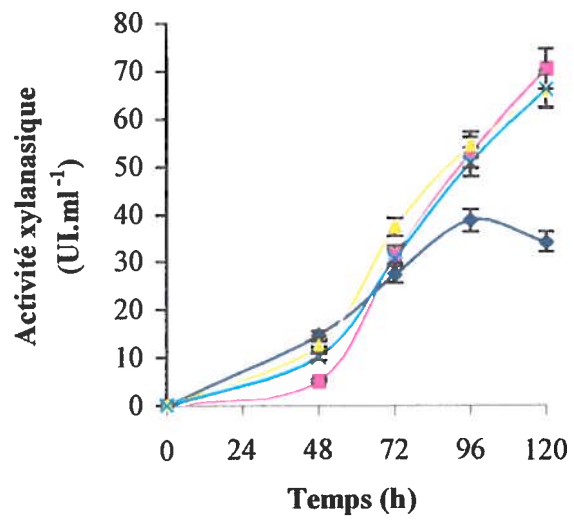
Le clone IAF916Ch14 présente une activité xylanasiqne de 70.4 UI.ml^{-1} après 120 h de culture soit deux fois la production du clone IAF916C pour la même période de temps et pour une croissance similaire du mycélium (voir fig.12). Si l'on compare cette activité avec celle du clone IAF20, on peut constater que le remplacement du promoteur du gène *xlnC* combiné à la suppression de la structure secondaire de $-14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ permet de multiplier par 5 la production de XlnC.

Figure 12 : Activité xylanasiqne des clones dont le gène de structure de la XlnC a été modifié dans le but de supprimer les structures secondaires de l'ARNm .

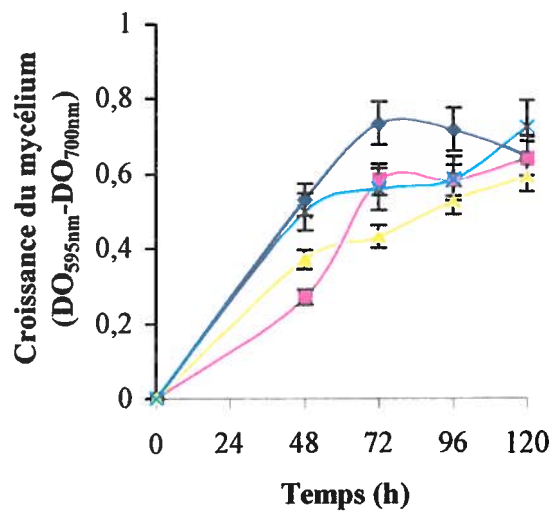
Le clone IAF916Ch14 (-■-) possède le plasmide pIAF916Ch14 qui contient une séquence modifiée de la XlnC de manière à supprimer la structure en épingle à cheveux de -14 kcal.mol⁻¹ retrouvée dans l'ARNm de la XlnC. Le clone IAF916Cfs1 (-▲-) possède le plasmide pIAF916Cfs1 qui contient une séquence modifiée de la XlnC afin de remplacer la première zone de glissement de cadre de lecture de l'ARNm. Le clone IAF916Cfs2 (-*-) possède le plasmide pIAF916Cfs2 qui contient une version modifiée du gène de la XlnC supprimant la seconde zone de glissement de cadre de lecture sur l'ARNm de la XlnC. Le clone IAF916C qui produit la XlnC sauvage (-◆-) sert de référence.

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹
- b) croissance du mycélium

a)



b)



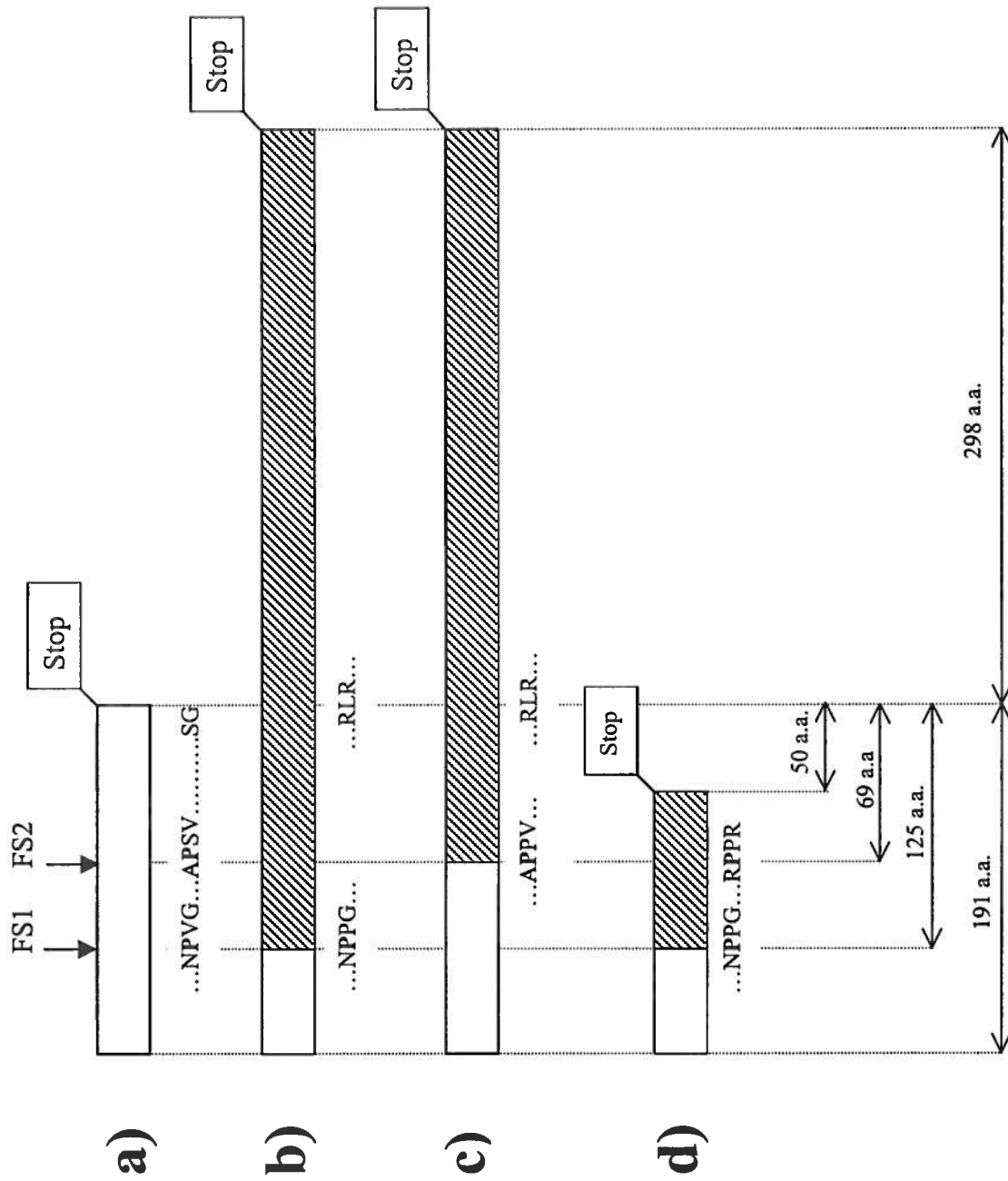
La séquence du gène de structure de la XlnC contient également des zones susceptibles d'occasionner un glissement de cadre de lecture lors de la traduction de l'ARNm ("*frameshift*" en anglais). Ce phénomène est classiquement utilisé par les virus pour diversifier leur protéome à partir d'un génome relativement restreint (*Jacks et al., 1988*). Il nécessite la présence d'une zone de "glissade" composée d'un nucléotide répété un minimum de quatre fois situé à proximité d'une structure secondaire en épingle à cheveux dans l'ARNm (*Larsen et al., 1997*). A l'approche de cette structure secondaire, le complexe ribosome-ARNm serait destabilisé ce qui occasionnerait le recul du ribosome d'un nucléotide à l'endroit de la zone de "glissade" (*Jacks et al., 1988*). La traduction pourrait reprendre mais avec un cadre de lecture décalé d'une position -1. Dans ce nouveau cadre de lecture, la séquence traduite entraînerait la synthèse d'une protéine différente ne possédant peut être plus ses propriétés biochimiques initiales.

L'analyse de la séquence du gène *xlnC* permet de mettre en évidence deux zones probables de glissade suivies chacune d'une structure secondaire potentielle. La première zone de "glissade" ou fs1 (*frameshift 1*) est constituée par la répétitions de quatre cytosines à partir du nucléotide 345 suivie d'une structure secondaire de $-5.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ entre les nucléotides 363 et 380 (fig.11b). La seconde zone de "glissade" ou fs2 (*frameshift 2*) est constituée par la répétitions de cinq cytosines à partir du nucléotide 512 suivie d'une éventuelle structure secondaire relativement proche de $-8.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ entre les nucléotides 521 et 542 (fig.11c).

Chaque glissement occasionnerait donc un changement de cadre de lecture d'une position -1. Ainsi la protéine synthétisée posséderait l'extrémité N-terminale de la XlnC mais une extrémité C-terminale complètement différente. Ainsi le premier glissement de cadre de lecture au nucléotide 348 aboutirait à la synthèse d'une protéine où la séquence correspondant aux 125 derniers a.a. de la XlnC serait différente (voir fig.13b). De plus, le codon stop initialement présent serait supprimé et remplacé par une leucine. Un codon stop serait néanmoins introduit 894 nucléotides en aval du codon stop du gène *xlnC* entraînant la synthèse d'une protéine possédant une extrémité C-terminale rallongée de 298 a.a. .

Figure 13 : Tailles des protéines synthétisées si des glissements de cadre de lecture se produisent au niveau de l'ARNm de la XlnC

- a) XlnC mature (191 a.a.). Les séquences d'a.a. correspondent respectivement aux séquences initiales des zones de glissement de cadre de lecture n°1 (FS1), n°2 (FS2) et du codon STOP.
- b) protéine de 489 a.a. synthétisée si un changement de cadre de lecture a lieu à la première zone de "glissade" (nucléotide 345). Seuls les changements de séquences au niveau de la zone de glissade et du codon STOP sont représentés.
- c) protéine de 489 a.a. synthétisée si un changement de cadre de lecture intervient à la seconde zone de "glissade" (nucléotide 512). Seuls les changements de séquences de la zone de glissade et du codon STOP sont représentés.
- d) protéine de 141 a.a. synthétisée si un double changement de cadre de lecture se produit au niveau des deux zones de "glissade" (nucléotides 345 et 512). Seuls les changements de séquences à l'endroit des deux zones de glissade sont représentés.



Dans le cas du second glissement de cadre de lecture qui se produit plus loin dans la séquence, seuls les 69 derniers a.a. de la XlnC seraient modifiés mais la protéine synthétisée serait également rallongée de 298 a.a. par rapport à la XlnC mature (voir fig.13c).

Maintenant, si l'on suppose que les deux glissements de cadre de lecture se produisent successivement sur le même messenger, le cadre de lecture serait décalé de deux nucléotides par rapport au début du messenger. Ce double glissement entraînerait la présence d'un codon stop 150 nucléotides avant le codon stop du gène *xlnC*. La protéine synthétisée posséderait 50 a.a. de moins que la XlnC mature et les 75 derniers a.a. seraient différents de ceux de la XlnC (voir fig.13d).

Les couples d'amorces XC-32 / XC-33 et XC-34 / XC-35 (voir Tableau VI) ont été synthétisés de manière à supprimer respectivement les zones de "glissade" du premier et du deuxième changement éventuel de cadre de lecture. La méthode utilisée a été celle de la mutagenèse par PCR recombinante en utilisant le pIAF20 comme matrice.

L'amorce XC-32 s'hybride sur le brin anti-sens du gène de structure de la XlnC sur la première zone de glissade. Couplée à l'amorce CD-401, elle a permis d'amplifier un fragment de 226 pb qui correspond à l'extrémité 3' du gène *xlnC*. L'amorce XC-33 s'hybride sur le brin sens du gène de structure de la *XlnC* au même endroit que l'amorce XC-32. En présence de l'amorce XC-*KpnI*, elle a permis d'amplifier un fragment de 391 pb qui correspond à l'extrémité 5' du gène de la XlnC. Après purification des deux fragments, on a procédé exactement de la même manière que pour obtenir le pIAF916Ch14. Le plasmide pIAF916Cfs1 ainsi obtenu contient donc la séquence du peptide signal de la XlnC suivi du gène de structure de la XlnC dépourvue de sa première zone potentielle de glissement de cadre de lecture.

On a procédé exactement de la même manière pour supprimer la seconde zone de glissement de cadre de lecture. Les amorces XC-34 et XC-35 s'hybrident respectivement sur le brin anti-sens et le brin sens du gène de structure de la XlnC au niveau de la zone

de "glissade". Les amorces XC-34 et CD-401 ont permis d'amplifier un premier fragment de 375 pb qui correspond à l'extrémité 3' du gène *xlnC* alors que les amorces XC-35 et XC-*KpnI* ont amplifié un fragment de 249 pb qui correspond à l'extrémité 5' du gène. Les deux fragments ont été traités par la suite de la même manière que pour obtenir le pIAF916Ch14. Le plasmide pIAF916Cfs2 obtenu contient la séquence du peptide signal de la XlnC suivi du gène de structure de la XlnC dépourvu de sa seconde zone potentielle de glissement de cadre de lecture.

Les clones IAFCfs1 et IAFCfs2 présentent respectivement après 120 h de culture des activités enzymatiques de 65.7 UI.ml⁻¹ et 66.1 UI.ml⁻¹ soit presque deux fois l'activité du clone IAF916C (fig.12). Le remplacement du promoteur du gène *xlnC* combiné à la suppression des zones de glissement de cadre de lecture permet de multiplier par 4.5 la production de XlnC par rapport au clone IAF20.

2-3- Remplacement du gène *xlnC* par celui du gène *xlnB2*

Nous avons également envisagé la possibilité que la partie mature de la XlnC possède des caractéristiques intrinsèques qui l'empêchaient d'être sécrétée efficacement. Dans cette éventualité, le gène de structure de la XlnC a été remplacé par celui de XlnB2. La XlnB2 s'est rapidement imposée comme la meilleure alternative de substitution car elle présente de nombreuses homologues avec la XlnC. La XlnB2 correspond à la XlnB de *S. lividans* déléetée de ses 101 derniers a.a. correspondant au domaine de liaison au xylane. La XlnB2 mature ne comprend donc plus que 191 a.a. soit exactement la même taille que la XlnC mature. De plus, les séquences peptidiques des XlnC et XlnB2 possèdent 75% d'identité entre elles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/>, numéros d'accès respectif gi153531 et gi4713927). Le gène de structure de la XlnB2 a été amplifié en utilisant comme matrice le pIAF42 et les amorces XB-*KpnI* et CD-301. Le pIAF42 dérive du vecteur d'expression pIJ702 dans lequel un fragment de 3.5 kb contenant le gène complet *xlnB* a été inséré (*Vats-Mehta et al., 1990*). L'amorce XB-*KpnI* s'hybride à l'extrémité 5' du gène de structure XlnB et introduit le site de restriction *KpnI*. L'amorce CD-301 s'hybride au milieu du gène de structure de la XlnB de manière à supprimer toute la

séquence correspondant au domaine de liaison au xylane. Elle introduit le site de restriction *SacI*.

Les amorces XB-*KpnI* et CD-301 ont permis d'amplifier un fragment de 576 pb. Ce dernier a été digéré par les enzymes *KpnI* et *SacI*, purifié puis inséré dans le vecteur pIAF816C aux mêmes sites en remplacement du gène de structure de la XlnC. Le plasmide pIAF816B2 obtenu a été ensuite digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI*. Le fragment de 723 pb obtenu comprend la séquence du peptide signal de la XlnC suivi du gène de structure *xlnB2*. Il a été purifié puis inséré dans le pIAF906 entre les sites *HindIII* et *SacI*. Le pIAF916B2 ainsi obtenu contient la séquence du peptide signal de la XlnC suivi du gène *xlnB2* placé sous le contrôle du promoteur du gène *xlnA*.

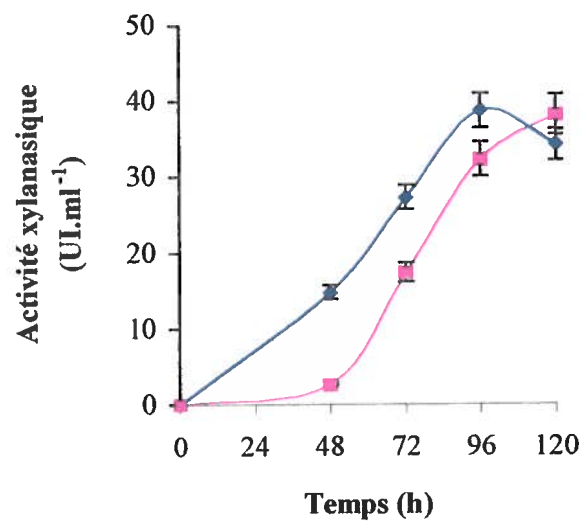
Le clone IAF916B2 a été ensemencé dans le milieu M14 + xylose afin de mesurer l'activité xylanasiq. Il présente une activité enzymatique de 38.2 UI.ml⁻¹ après 120 h de culture (voir fig.14). L'évolution et les valeurs d'activité obtenues avec le clone IAF916B2 sont très similaires avec celles du clone IAF916C. Cependant, ce dernier dépasse 38 UI.ml⁻¹ en seulement 96h. La XlnC ne semble donc pas posséder de caractéristiques particulières susceptibles d'empêcher sa sécrétion. De plus, le peptide signal de la XlnC semble être aussi bien adapté à la sécrétion de la XlnC qu'à la sécrétion de la XlnB2.

Figure 14 : Activité xylanasiqne obtenue suite au remplacement de la partie mature de la XlnC par la XlnB2

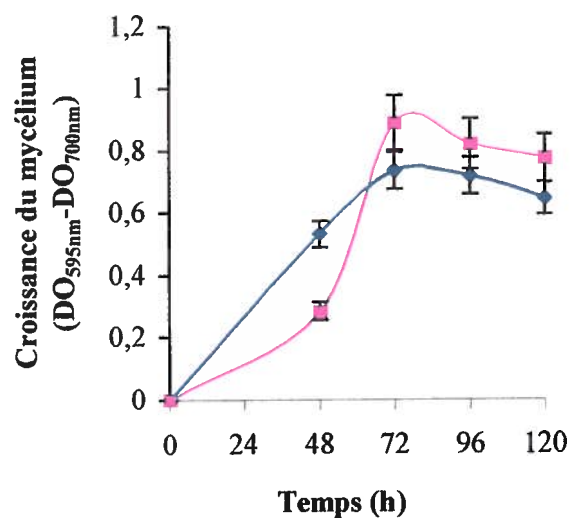
Le clone IAF916B2 (-■-) contient le plasmide pIAF916B2 qui code pour un précurseur contenant le peptide signal de la XlnC fusionné à la partie mature de la XlnB2. contenant produit un précurseur de XlnB2 contenant le peptide signal de la XlnC. Le gène de la XlnB2 est placé sous la dépendance du promoteur du gène *xlnA*. Clone référence IAF916C (-◆-).

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹
- b) croissance du mycélium

a)



b)



2-4- Choix du clone de référence

Pour étudier la sécrétion de la XlnC par *S. lividans*, nous devions avoir à notre disposition un clone de référence produisant de bonnes quantités d'enzyme. Les modifications du gène de structure de la XlnC et de son promoteur ont permis de multiplier la production de XlnC par un facteur compris entre 3 et 5. Comme le remplacement du promoteur du gène *xlnC* par celui du gène *xlnA* a rapidement donné des résultats satisfaisants et que notre objectif était d'étudier spécifiquement le peptide signal de la XlnC, le clone IAF916C a servi de base à la suite de notre projet. Les résultats sur les structures secondaires et les zones de glissements de cadre de lecture, bien qu'encourageants pour la production d'enzyme, ont été obtenus tardivement. C'est pourquoi les modifications n'ont pas pu être apportées dans l'étude du peptide signal dont la mutagenèse dirigée avait déjà été amorcée. Cependant ces travaux seront à considérer si l'on désire augmenter la production de XlnC.

3- Sécrétion de la xylanase C par le système TAT

Nous avons vu précédemment que le peptide signal de la XlnC possédait une séquence signature de type TAT. L'objectif est maintenant de montrer que la XlnC est sécrétée par le système TAT et d'étudier la sécrétion de la XlnC en regard des modifications apportées à son peptide signal.

3-1- Maturation du précurseur de la XlnC

Afin de démontrer que la XlnC est sécrétée par le système TAT, une expérience de « pulse-chase » est réalisée sur le clone IAF916C. Ce dernier a été ensemencé dans le milieu M14 contenant 1% de xylose comme source de carbone et supplémenté de protéose-peptone. Après 48 h de culture, on a introduit de la méthionine [³⁵S] qui allait être incorporée dans les protéines nouvellement synthétisées, on parle alors de l'étape de

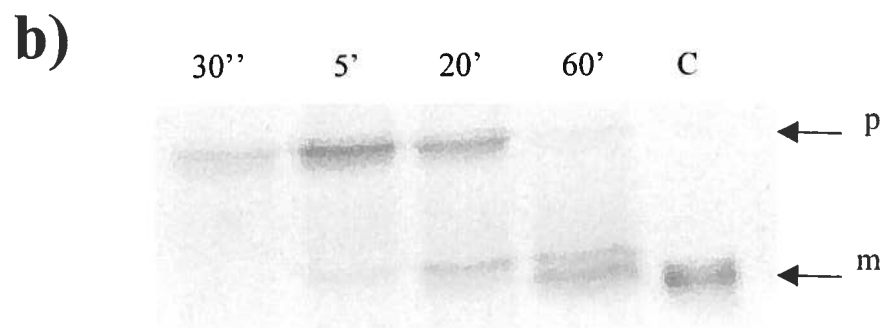
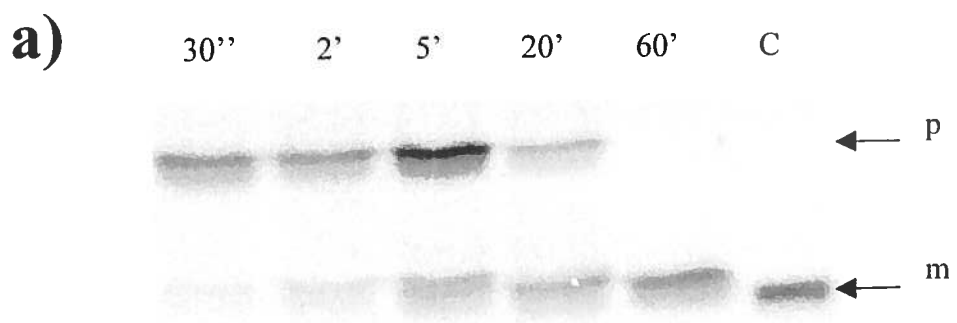
« pulse ». Après 2 min, une compétition a été introduite par addition de méthionine non marquée en excès, c'est l'étape de « chase ». 500 µl de milieu de culture ont été prélevés aux temps 30 sec, 2 min, 5 min, 20 min et 1h. Les cellules contenues dans ces échantillons ont été cassées aux ultrasons puis le sonicat a été traité par du sérum anti-XlnC. Les anticorps anti-XlnC ont précipité deux polypeptides (voir fig.15a), un peptide de 25 kDa représentant le précurseur (p) de XlnC et un peptide de 20 kDa correspondant à la XlnC mature (m). Les tailles théoriques de ces deux peptides calculées à partir de leur séquence nucléotidique sont respectivement de 25.7 et 20.7 kDA (*Shareck et al., 1991*). Après 30 sec. de « chase », le précurseur marqué est apparu alors qu'il a fallu un minimum de 2 min pour voir apparaître la XlnC mature. Progressivement, le précurseur a disparu de manière concomitante avec l'apparition de XlnC mature. Le précurseur disparaît en moins de 60 min. La demi-vie du précurseur a été estimée à 16 min.

Afin de démontrer que la XlnC est indépendante de la voie GSP pour sa sécrétion, une expérience de « pulse-chase » a été réalisée en présence d'azoture de sodium. Ce produit est un puissant inhibiteur de la fonction ATPasique de la protéine SecA, l'une des protéines clés de la voie GSP. Il n'affecte cependant que très peu le système de sécrétion TAT (*Berks et al., 2000*). En effet, il semblerait que le système TAT utilise comme unique source d'énergie la force proton-motrice. De l'azoture de sodium à une concentration finale de 2 mM a été ajouté 5 min avant le marquage radioactif. Dans le cas de *S. lividans*, une telle concentration est suffisante pour inhiber le transport des protéines par le système GSP (*Morosoli et Dupont, 1999*). Le « pulse-chase » en présence d'azoture de sodium présente un profil identique à celui réalisé en absence d'inhibiteur (voir fig.15b). Cependant contrairement à l'expérience sans azoture de sodium, une très faible portion de précurseur marqué est encore présente après 60 min. On constat également que la bande de XlnC mature a tendance à se dédoubler après 20 min de « chase ». Le processus de maturation du précurseur de la XlnC est donc peu sensible à l'azoture de sodium ce qui est une caractéristique des protéines dépendant du système TAT pour leur sécrétion.

Figure 15 : Maturation du précurseur de la XlnC et sensibilité du processus à l'azoture de sodium.

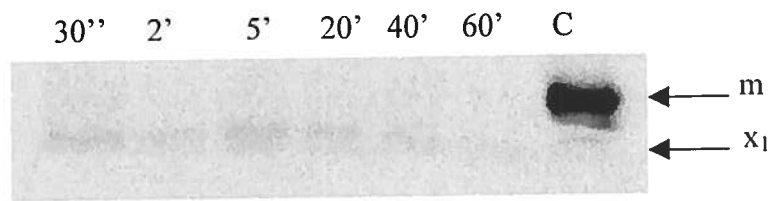
Le clone IAF916C comporte le plasmide pIAF916C qui contient le gène de la XlnC placé sous la dépendance du promoteur du gène *xlnA*. La maturation du précurseur de la XlnC a été suivie par « pulse-chase » sur une période de 60 min. Après 48h de culture dans le milieu M14 additionné de xylose, le mycélium est marqué pendant 2 min à la méthionine [³⁵S] (« pulse ») puis de la méthionine froide est rajoutée en excès (« chase »). Des échantillons sont prélevés 30 sec, 2 min, 5 min, 20 min et 60 min après le « chase » puis immunoprécipités par un sérum anti-XlnC. Après migration sur PAGE-SDS, le gel est séché puis autoradiographié. p, précurseur de la XlnC; m, XlnC mature; C, contrôle XlnC mature.

- a) « pulse-chase » réalisé en conditions normales.
- b) « pulse-chase » réalisé en présence de 2 mM d'azoture de sodium ajouté 7 min avant l'étape de « chase ».

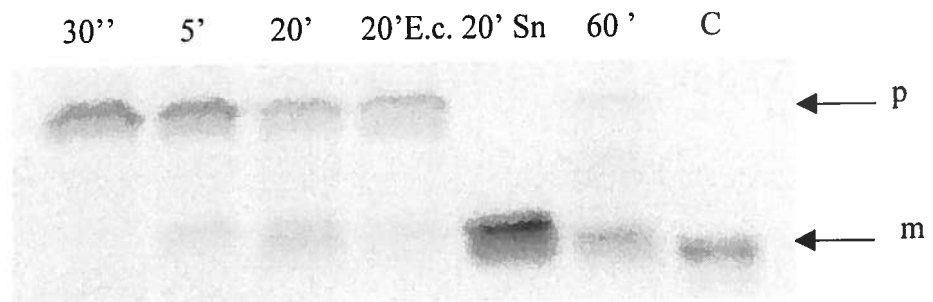


Des expériences de « pulse-chase » en présence de carbonyl cyanamide *m*-chlorophénylhydrazone (CCCP) ont été également menées. Ce composé appartient à la famille des protonophores c'est-à-dire qu'il empêche l'établissement d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane plasmique. Chez *E. coli*, ce composé inhibe les voies de sécrétion TAT et GSP (Blaudeck et al., 2000, Christobal et al., 1999). Aucune expérience de « pulse-chase » en présence de CCCP n'ayant été encore réalisée chez *S. lividans*, trois concentrations de cet inhibiteur ont été testées. Les résultats des « pulse-chase » obtenus avec des concentrations de CCCP finales de 0.1 mM, 0.05 mM et 0.01 mM sont présentés à la figure 16. Pour la première expérience, le CCCP a été ajouté à une concentration finale de 0.1 mM de CCCP, 5 min avant le marquage au ³⁵S. Le précurseur et la protéine mature ne sont pas visibles alors qu'une bande radioactive de taille inférieure à la XlnC mature apparaît comme constante pour tous les prélèvements (voir fig.16a). Il est possible que le CCCP en trop forte concentration nuise à la synthèse protéique. Pour les essais suivants, le CCCP a été ajouté en moins grande quantité et en même temps que la radioactivité. Une concentration finale de 0.01 mM ne modifie pas la maturation du précurseur qui au bout d'une heure d'expérience a quasiment totalement disparu alors que la XlnC mature apparaît au bout de 5 min de « chase » (voir fig.16b). Comme pour le « pulse-chase » du clone IAF916C en présence d'azoture de sodium (voir fig.15b), on constate une double bande pour la XlnC mature après 60 min de « chase ». Pour une concentration finale de 0.05 mM, on constate que la quantité de précurseur marqué ne diminue plus après 20 min de « chase ». En effet, on ne note pas de différence au niveau du rapport de la quantité de précurseur sur la quantité de protéine mature entre les temps 20 min et 60 min (voir fig.16c). Cependant le processus de maturation n'est pas inhibé immédiatement puisqu'on note l'apparition de XlnC mature dès 5 min d'expérience. Seule trois concentrations de CCCP ont été testées. A une concentration finale de 0.05 mM, ce composé est capable d'inhiber partiellement la sécrétion de la XlnC chez *S. lividans* (voir fig.16c). Le but du projet n'était pas de trouver la concentration de CCCP nécessaire pour bloquer complètement le processus de sécrétion, c'est pourquoi nous n'avons pas testé d'autres concentrations du protonophore CCCP. Nous voulions simplement montrer que la sécrétion de la XlnC était sensible à la présence de CCCP.

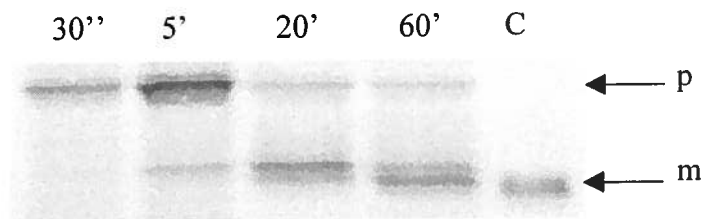
a)



b)



c)



3-2- Mutations du doublet d'arginine du site TAT

Plusieurs auteurs ont démontré l'importance du doublet d'arginine présent dans le peptide signal pour la sécrétion de nombreuses protéines via le système TAT chez plusieurs bactéries (*Halbig et al., 1999; Dreush et al., 1997; Gross et al., 1999; Nivière et al., 1992; Sambasivarao et al., 2000*). Mais aucune étude de ce type n'avait été encore menée chez *S. lividans*.

La sécrétion de la XlnC a été étudiée après mutation du doublet d'arginine de son peptide signal. A cette fin, la méthode de Kunkel a été utilisée à l'aide du simple brin obtenu à partir du pIAF816C. La synthèse du second brin a été réalisée *in vitro* en utilisant l'amorce ASSE-01 (voir Tableau VII). Cette amorce a été synthétisée de manière à remplacer le triplet *cgc* qui code pour la première arginine du site TAT du peptide signal par un triplet *aag* qui code pour une lysine (voir Appendice C). La mutation introduite ne modifie donc pas la charge nette du peptide signal. Après synthèse *in vitro* du brin complémentaire, le plasmide a été utilisé pour transformer des cellules de *E. coli*. Les clones porteurs de la mutation ont ensuite été sélectionnés après digestion enzymatique des plasmides car la mutation introduite supprime un site de restriction *BglI*. Le plasmide pIAF816C porteur de la mutation désirée a été digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *SacI*. Le fragment de 723 pb extrait a été purifié puis inséré dans le plasmide pIAF916 comme décrit pour le plasmide pIAF916C. Le pIAF916C(R-27K) ainsi obtenu contient le promoteur du gène *xlnA*, la séquence du peptide signal de la XlnC mutée au niveau de la première arginine du site TAT et le gène de structure de la XlnC. Pour la numérotation des a.a., nous avons pris comme origine le site de clivage de la signal peptidase. Ainsi la notation R-27K signifie que l'arginine située 27 a.a. avant le site de clivage a été muté en lysine.

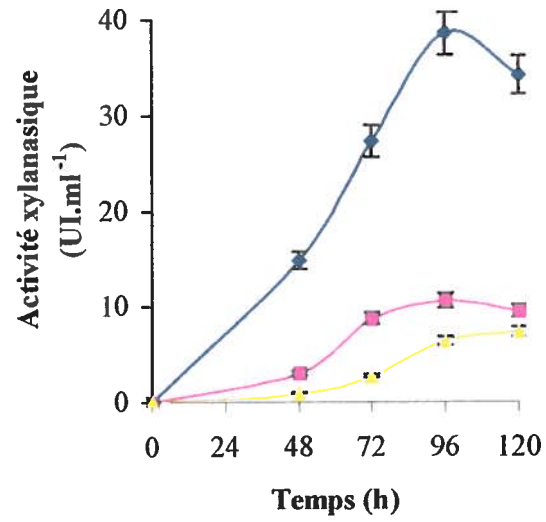
Le clone IAF916C(R-27K) a été ensemencé sur milieu M14 + xylose afin de mesurer la production de XlnC. Le transformant présente une activité xylanase de 9.5 UI.ml⁻¹ après 120 h de culture soit 3.5 fois moins que le clone IAF916C (voir fig.17).

Figure 17 : Effet de la modification du doublet d'arginine du peptide signal de la XlnC sur la production de l'enzyme.

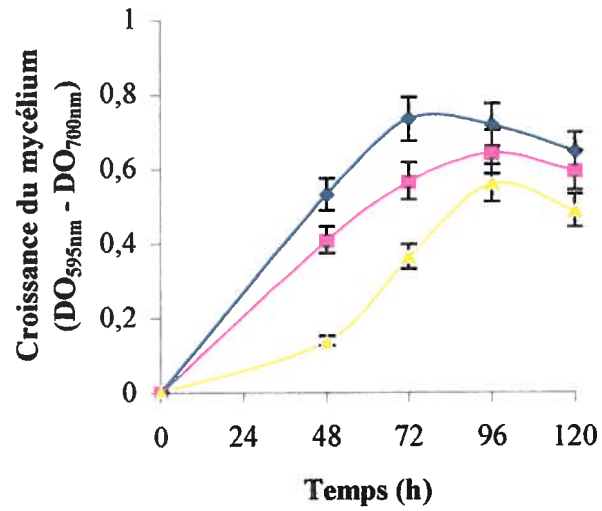
Le clone IAF916C(R-27K) (-■-) produit un précurseur de la XlnC où la première arginine du site TAT a été remplacée par une lysine. Le clone IAF916C(R-27K.R-26K) (-▲-) produit un précurseur de la XlnC où les deux arginines du site TAT ont été remplacées par deux lysines. Clone référence IAF916C (-◆-).

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹.
- b) croissance du mycélium.

a)



b)



La double mutation *R-27K.R-26K* a été obtenue selon la technique de la PCR recombinante en utilisant comme matrice le pIAF816C. La technique de Kunkel a été abandonnée à cause des difficultés rencontrées pour préparer un nouveau stock d'ADN simple brin de pIAF816C. Les amorces ASSE-09 et ASSE-19 ont été synthétisées de manière à remplacer la séquence *cgacga* qui code pour le doublet d'arginine par la séquence *aagaag* qui code pour un doublet de lysine. L'amorce ASSE-19 s'hybride sur le brin anti-sens de la séquence du peptide signal de la XlnC. Couplée à l'amorce CD-401, elle a permis d'amplifier un fragment de 676 pb qui correspond à l'extrémité 3' de la séquence du peptide signal suivie du gène de structure de la XlnC. L'amorce ASSE-09 s'hybride sur le brin sens de la séquence du peptide signal au même niveau que l'amorce ASSE-19 et en présence de l'amorce pTZ2601, elle a permis d'amplifier un fragment de 598 pb qui correspond à une portion du pTZ19U suivie de l'extrémité 5' de la séquence du peptide signal de la XlnC. L'amorce pTZ2601 s'hybride sur le pTZ19U au niveau du nucléotide 2601 lorsque l'on considère le plasmide sans insert. Les deux produits de PCR ont été purifiés, mélangés, dénaturés et amplifiés avec les deux amorces externes pTZ2601 et CD-401. Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *SacI*, purifié puis inséré dans le plasmide pIAF816 qui devient le pIAF816C(*R-27K.R-26K*). De la même manière qu'avec le pIAF816C(*R-27K*), les clones porteurs de la mutation ont été sélectionnés après digestion par *BglI*. Par la suite, on a procédé exactement de la même manière que pour le plasmide pIAF916C pour obtenir finalement le plasmide pIAF916C(*R-27K.R-26K*) qui contient le promoteur du gène *xlnA*, la séquence du peptide signal de la XlnC codant pour un doublet de lysine et le gène de structure de la XlnC. La production de XlnC du clone IAF916C(*R-27K.R-26K*) est montrée à la figure 17. Après 96 h de culture, l'activité xylanasiq est de 6.4 UI.ml⁻¹ soit environ 6 fois moins que celle du clone IAF916C.

La simple mutation *R-27K* comme la double mutation *R-27K.R-26K* de la séquence TAT du peptide signal de la XlnC diminue la production de XlnC sans néanmoins l'anéantir (voir fig.17).

Afin d'étudier le processus de maturation des précurseurs de la XlnC ne possédant pas leur doublet d'arginine intact, un « pulse-chase » a été réalisé avec le clone IAF916C(*R-27K*). L'autoradiogramme obtenu est présenté à la figure 18. Les anticorps anti-XlnC reconnaissent deux peptides de tailles différentes. Le premier correspond au précurseur de la XlnC. Le précurseur apparaît dès le début de l'expérience mais contrairement à ce que l'on a pu observer dans le cas du clone IAF916C (voir fig.15), il ne disparaît pas au cours du temps. Au bout de 60 min d'expérience, la quantité de précurseur marqué est la même que la quantité initialement présente après 30 sec. (voir fig.18a). Le peptide x_2 , dont la taille a été estimée à 17 kDa, est également reconnu par les anticorps anti-XlnC mais il ne correspond pas à la XlnC mature. Il est présent dès le début de l'expérience et de la même manière que le précurseur muté, sa quantité ne varie pas au cours du temps (voir fig.18b). Le précurseur muté *R-27K* ne semble donc pas pouvoir être maturé. Malgré une activité xylanasiqne de l'ordre de 10 UI.ml⁻¹ produite par le clone après 120 h, la présence de XlnC mature n'est pas mise en évidence par l'expérience du « pulse-chase ». Nous avons donc envisagé l'hypothèse que le précurseur muté *R-27K* avait perdu sa spécificité TAT et qu'il devait maintenant emprunter la voie GSP pour être maturé. Un « pulse-chase » en présence de 2 mM d'azote de sodium a donc été réalisé. Le résultat est présenté à la figure 18b. Il n'y a aucune différence notable entre les « pulses-chases » réalisés avec ou sans azote de sodium. On ne constatait toujours pas l'apparition de XlnC mature. Il devenait intéressant d'éclaircir deux points : la provenance des 10 UI.ml⁻¹ que l'on observait pour le clone IAF916C(*R-27K*) et la localisation cellulaire du peptide x_2 .

Pour répondre à ces deux questions, nous avons été amenés à modifier légèrement le protocole initial de « pulse-chase ». Dans le protocole classique les échantillons sont directement précipités au TCA. Dans le protocole modifié, ils ont été d'abord centrifugés 5 min à 1500 rpm dans le but de séparer l'extrait cellulaire (contenu cytoplasmique de la cellule et membranes) du surnageant de culture (milieu de culture et protéines secrétées). Le surnageant de culture a été prélevé dans un autre tube puis directement immunoprécipité par les anticorps anti-XlnC. Le surnageant n'a donc pas été dilué par le tampon IPD contenant entre autres du TCA et du SDS. Le culot, correspondant à la

fraction cellulaire a été repris par 500 μ l de TCA puis traité comme pour le protocole de « pulse-chase » initial. Cette variante a été employée après 20 min de « chase » en présence d'azoture de sodium pour le clone 916C(R-27K) (voir fig.18b). Dans l'extrait cellulaire, les anticorps anti-XlnC précipitent spécifiquement deux peptides à savoir le précurseur de la XlnC et le peptide x_2 . Le surnageant de culture contient également un peptide m', spécifiquement reconnu par les anticorps anti-XlnC. Cependant, ce peptide est de taille légèrement supérieure à celle de la XlnC mature. Le peptide m', malgré une taille différente de la XlnC mature doit cependant être enzymatiquement actif et responsable des 10 UI.ml⁻¹ relevées dans le surnageant de culture du clone IAF916CR-27K.

Pour s'assurer que le peptide m' n'était pas un artéfact dû au « pulse-chase », nous avons réalisé un Western-Blot des surnageants de culture de 72 h des clones IAF916CR-27K et IAF916CR-26K.R-26K. Cette expérience avait également pour but de prouver que l'activité que l'on observait provenait bien de la XlnC et que la souche 10-164 utilisée (xylanase négative) n'avait pas réverté. Les protéines transférées sur membrane ont été révélées soit par un sérum anti-XlnA (fig.19a), soit par un sérum anti-XlnB (fig.19b), soit par un sérum anti-XlnC (fig.19c). Les anticorps anti-XlnA ne réagissent pas avec le surnageant de culture des deux clones. Les anticorps anti-XlnB reconnaissent dans le surnageant de culture des deux clones une faible bande à la hauteur de la XlnC. Ceci s'explique par le degré d'homologie élevé entre les XlnB et XlnC d'où l'existence de réactions croisées entre les anticorps anti-XlnB et la XlnC (*Arhin et al., 1994*). Les anticorps anti-XlnC reconnaissent la XlnC présente dans le surnageant de culture du clone IAF916CR-26K.R-26K. Comme observé en « pulse-chase », le surnageant du clone IAF916CR-27K contient le peptide m' différent de la XlnC mature.

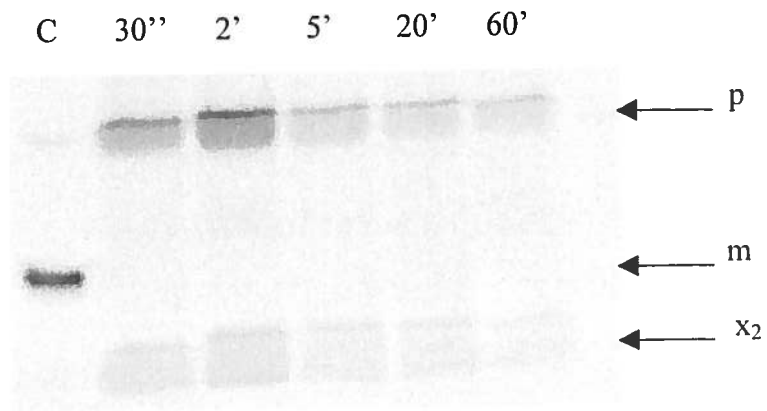
Ainsi, nous venons de montrer que le précurseur de XlnC porteur de la mutation R-27K est néanmoins mûri par le système TAT. Cependant l'efficacité de translocation du précurseur R-27K est très faible comparativement à celle du précurseur non muté du clone IAF916C (voir fig.15a).

Figure 18 : Maturation du précurseur de la XlnC dont la première arginine du site TAT a été remplacée par une lysine.

Le clone IAF916C(R-27K) contient le plasmide pIAF916C(R-27K) qui code pour un précurseur de la XlnC dont la première arginine du site TAT a été remplacée par une lysine. p, précurseur de la XlnC; m, XlnC mature; m', XlnC de taille supérieure à la XlnC mature; x₂, peptide inconnu; C, contrôle XlnC mature; E.c., extrait cellulaire; Sn, surnageant.

- a) « pulse-chase » réalisé en conditions normales.
- b) « pulse-chase » réalisé en présence de 2 mM d'azoture de sodium ajouté 7 min avant l'étape de « chase ».

a)



b)

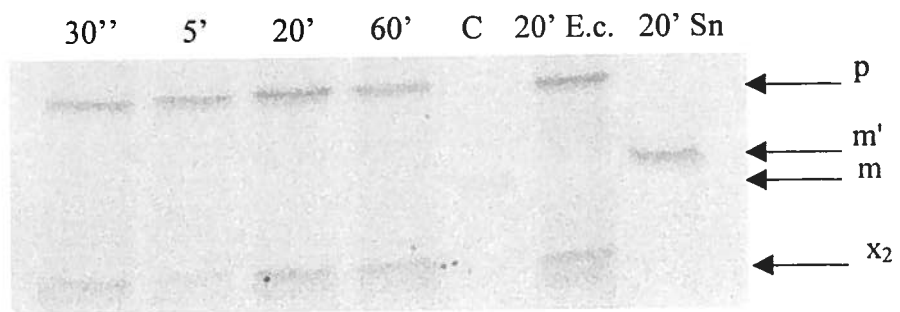


Figure 19 : Western-Blot des surnageants de culture des clones IAF916C(R-27K) et IAF916C(R-27K.R-26K).

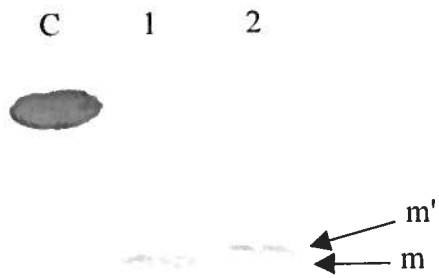
Les clones IAF916C(R-27K) et IAF916C(R-27K.R-26K) produisent un précurseur de XlnC dont la première ou les deux arginines ont été respectivement remplacées par une et deux lysines. Les protéines des surnageants de culture de 72 h en milieu M14 + xylose sont séparées sur PAGE-SDS puis transférées sur membrane de nitrocellulose. La mise en évidence des XlnA, XlnB et XlnC est effectuée respectivement par réaction avec les antisérums de lapin correspondants qui sont ensuite révélés par un anticorps secondaire anti-IgG de lapin, couplé à la phosphatase. (1) surnageant de culture du clone IAF916C(R-27K), (2) surnageant de culture du clone IAF916C(R-27K.R-26K). m, XlnC mature; m', XlnC de taille supérieure à la XlnC mature.

- a) Recherche de la production de XlnA; C, contrôle XlnA mature
- b) Recherche de la production de XlnB; C, contrôle XlnB mature
- c) Recherche de la production de XlnC; C, contrôle XlnC mature

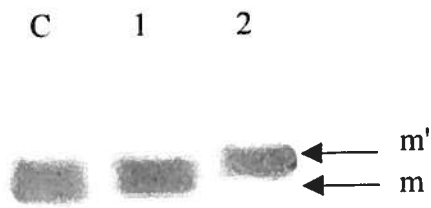
a)



b)



c)



3-3- Une protéine indépendante du système GSP

Nous venons de voir que le peptide signal de la XlnC dirigeait la XlnC exclusivement vers le système TAT. Nous aimerions savoir maintenant s'il est possible de rediriger la XlnC vers la voie GSP lorsque son peptide signal est remplacé par un peptide signal de type GSP. Pour tester cette hypothèse, le gène de structure de la XlnC a été inséré en aval de la séquence du peptide signal de la XlnA qui a été clairement identifié comme un peptide signal de type GSP (*Morosoli et Dupont, 1999*). Ce dernier est représenté à la figure 9b. Il contient 41 a.a. soit 8 a.a. de moins que le peptide signal de la XlnC. La région-n de 16 a.a. contient notamment 4 arginines soit une charge nette de +4 contre +2 pour la région-n du peptide signal de la XlnC. La région-h contient 19 a.a. soit le même nombre que celle du peptide signal de la XlnC. Cependant cette région est beaucoup plus hydrophobe dans le cas du peptide signal de la XlnA du fait de la forte présence d'a.a. non polaires comme l'alanine, la valine et la leucine. La région-c des deux peptides signaux ne comporte pas de différence notable et contient le même site de coupure AHA pour la signal peptidase.

Le gène de structure de la XlnC a été amplifié à l'aide des amorces XC-*KpnI* et CD-401 et en utilisant comme matrice le pIAF20. Le fragment amplifié a été digéré par les enzymes *KpnI* et *SacI*, purifié puis inséré entre les mêmes sites du pIAF807 à la place du gène de structure de la XlnA (voir Annexe E). Le pIAF807C ainsi obtenu a été digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI*. Le fragment libéré a été inséré dans le pIAF906 aux mêmes sites. Le pIAF906C obtenu contient le promoteur du gène *xlnA*, la séquence du peptide signal de la XlnA suivie du gène de structure de la XlnC. Les surnageants de culture du clone IAF906C ne possèdent aucune activité xylanasiq (résultats non montrés). Des expériences de Western Blot à l'aide de sérum anti-XlnC sur des surnageants de culture de 72 h ont confirmé ce résultat (voir fig.20, dépôt 2). En effet, une protéine de 20 kDa correspondant à la XlnC mature est retrouvée dans les surnageants du clone IAF916C mais pas dans le surnageant de culture du clone IAF906C.

Figure 20 : Western Blot des surnageants de culture des clones IAF916C, IAF906C et IAF917C.

Même légende que pour la figure 19. La XlnC mature est mise en évidence à l'aide d'un sérum anti-XlnC et d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. (1) surnageant d'une culture du clone IAF916C; (2) surnageant d'une culture du clone IAF906C; (3) surnageant de culture du clone IAF917C; C, contrôle de XlnC mature; m, XlnC mature.



Les résultats précédents ont montré que la XlnC mature n'était pas produite par le clone IAF906C. Il fallait donc voir ce qui se passait au niveau de l'étape de la maturation du précurseur. Pour cela, une expérience de « pulse-chase » a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 21. On constate l'absence de précurseur. Cependant, un peptide x_3 de 17 kDa est précipité par les anticorps anti-XlnC (voir fig.21a). La quantité de ce peptide reste constante au cours de l'expérience, en conditions normales comme en présence de 2 mM d'azoture de sodium (voir fig.21b). Une expérience complémentaire comme dans le cas du clone IAF916C(*R-27K*) permet de montrer que le peptide x_3 se retrouvait dans l'extrait cellulaire (voir fig.21c). De plus, si on dépose un échantillon d'extrait cellulaire sur un gel de RBB-xylane, on ne relève aucune zone d'éclaircissement prouvant l'absence d'hydrolyse du substrat et donc l'absence d'activité du fragment de 17kDa (voir fig.22, puits 8).

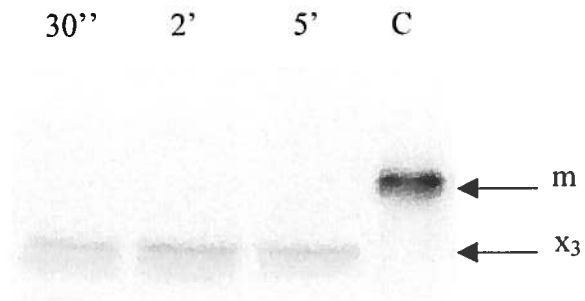
L'ensemble des résultats obtenus avec le clone IAF906C montre que le peptide signal de la XlnA est incapable de diriger la sécrétion de la XlnC par la voie GSP confirmant que la XlnC est une protéine exclusivement dépendante du système TAT pour sa sécrétion.

Figure 21 : Maturation du précurseur de la XlnC contenant le peptide signal de type GSP de la XlnA.

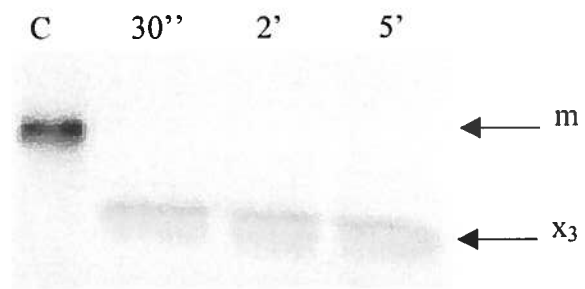
Le clone IAF906C contient le plasmide pIAF906C qui code pour un précurseur de XlnC dont le peptide signal de la XlnC a été remplacé par celui de la XlnA. p, précurseur de la XlnC; m, XlnC mature; x₃, peptide inconnu; C, contrôle XlnC mature.

- a) « pulse-chase » réalisé en conditions normales
- b) « pulse-chase » réalisé en présence de 2mM d'azoture de sodium ajouté 7 min avant l'étape de « chase ».
- c) séparation des fractions cellulaire et extracellulaire après 5 min de « chase ». T, fraction totale; E.c., extrait cellulaire; Sn, surnageant de culture.

a)



b)



c)

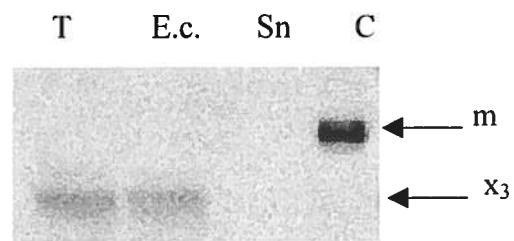
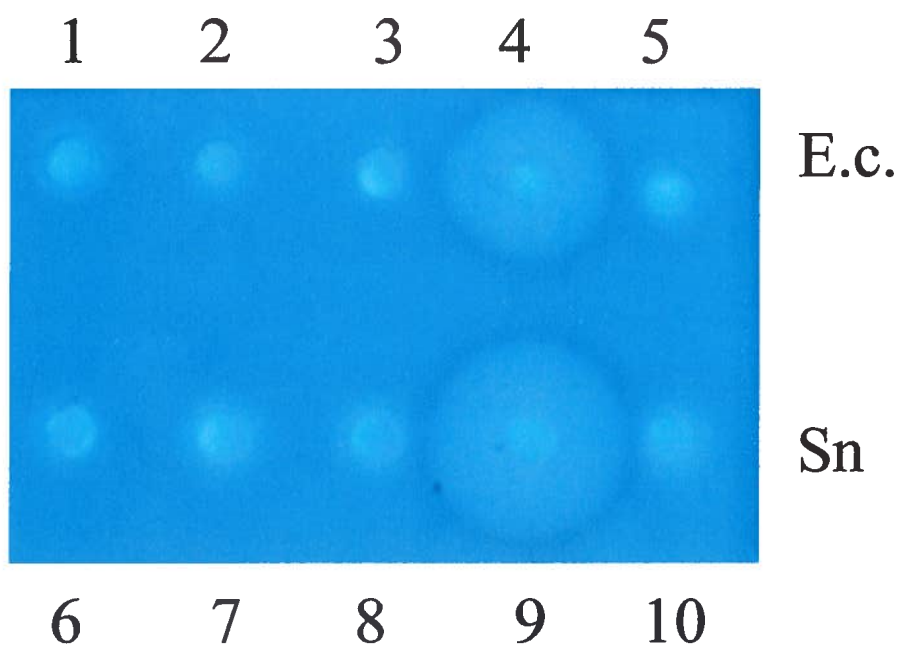


Figure 22 : Recherche d'activité xylanasiqne sur gel de RBB-xylane.

Les extraits cellulaires ou les surnageants de cultures de 72h sont déposés dans des puits creusés dans un gel de RBB-xylane. Les zones d'éclaircissement traduisent la présence d'activité xylanasiqne. La photo a été prise après 4h d'incubation du gel à 37°C. 1, puits contrôle vide; 2, extrait cellulaire de la souche 10-164 non transformée; 3, extrait cellulaire du clone IAF906C; 4, extrait cellulaire du clone IAF916C; 5, extrait cellulaire du clone IAF917C; 6, puits contrôle vide; 7, surnageant de culture de la souche 10-164 non transformée; 8, surnageant de culture du clone IAF906C; 9, surnageant de culture du clone IAF916C; 10, surnageant de culture du clone IAF917C; E.c., extrait cellulaire; Sn, surnageant.



4- Etude de la région-n du peptide signal de la XlnC

4-1- Délétions au sein de la région-n

Le peptide signal de type TAT est généralement plus long que son homologue de type GSP. Ceci est dû à une extension de la région-n du peptide signal TAT qui contient en moyenne 10 a.a. de plus que la région-n du peptide signal de type GSP (*Cristobal et al., 1999*). En comparant la séquence du peptide signal de la XlnA et celui de la XlnC, on remarque que la région-n du peptide signal de la XlnA contient 16 a.a. alors que celle du peptide signal de la XlnC en comporte 24 (voir fig.9). Il semblait donc intéressant d'étudier les propriétés de cette région-n. Le peptide signal de la XlnC a donc été délété jusqu'à la méthionine interne située juste avant la signature TAT. Quatre délétions ont été réalisées de manière à supprimer 5, 10, 15 puis 20 a.a. de la région-n du peptide signal de la XlnC. Les séquences des différents peptides signaux peuvent être consultés dans le tableau récapitulatif IX à la fin de la partie III.

Les trois premières délétions ont été introduites par PCR en utilisant le pIAF816C comme matrice. Les amorces Tat1, Tat2 et Tat3 (voir Tableau VIII) s'hybrident sur le brin anti-sens du côté 5' de la séquence correspondant à la région-n du peptide signal de la XlnC. Ces trois amorces introduisent toutes un site de restriction *HindIII* et permettent de supprimer respectivement 15, 30 et 45 nucléotides. Chacune des amorces a été utilisée en association avec l'amorce CD-401 qui s'hybride du côté 3' du gène de structure de la XlnC et introduit le site de restriction *SacI*. Les fragments amplifiés ont été digérés par les enzymes de restriction *HindIII* et *SacI* puis insérés directement dans le plasmide pIAF906 aux mêmes sites. Les plasmides pIAF916C-45, pIAF916C-40 et pIAF916C-34 sont respectivement obtenus.

Amorce	Séquence	Commentaires
Tat1	5' <u>GGAGCTT</u> TGGAGGCACAGTCATGACACAGCAGGACCGGA 3' <i>HindIII</i>	Suppression des 5 premiers acides aminés du PS de la XlnC. Donne la construction XlnC-45.
Tat2	5' <u>GAA</u> <u>GCTT</u> TGGAGGCACAGTCATGATCAAGCAGAGTCCCGCCCCT 3' <i>HindIII</i>	Suppression des 10 premiers acides aminés du PS de la XlnC. Donne la construction XlnC-40.
Tat3	5' <u>GGAGCTT</u> TGGAGGCACAGTCATGGCCCCCTCTCAACGGCAT 3' <i>HindIII</i>	Suppression des 15 premiers acides aminés du PS de la XlnC. Donne la construction XlnC-34.

Tableau VIII : Amorces utilisées pour déléter par PCR l'extrémité N-terminale du peptide signal de la XlnC, le triplet correspondant à la methionine initiatrice est en caractères gras. S, amorce sens.

Pour déléter les 20 premiers a.a. de la région-n du peptide signal de la XlnC, on a procédé de manière différente. Le gène de structure de la XlnC a été amplifié par PCR à l'aide des amorces XC-*KpnI* et CD-401 en utilisant le pIAF20 comme matrice. Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes *KpnI* et *SacI* puis inséré aux mêmes sites dans le plasmide pIAF817 à la place du gène de structure de la XlnA. Le pIAF817 obtenu antérieurement contient notamment la séquence du peptide signal de la XlnC délété de 60 nucléotides (Pagé et al., 1995, voir Appendice E). Le plasmide pIAF817C a été ensuite digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI*. Le fragment récupéré de 663 pb a été ensuite inséré dans le pIAF906 aux mêmes sites. Le pIAF917C obtenu contient le promoteur du gène *xlnA*, la séquence du peptide signal de la XlnC délétée de 60 nucléotides et le gène de structure de la XlnC.

Les activités xylanasiques des surnageants de culture des clones IAF917C, IAF916C-45, IAF916C-40 et IAF916C Δ -34 sont présentées sur la figure 23. La production de XlnC ne semble pas être affectée par la délétion de 15 a.a et moins. Par contre, lorsque la totalité de la région-n est supprimée comme dans le cas du pIAF917C, l'activité xylanasique est presque nulle. Aucune trace de XlnC mature n'est mise en évidence par Western Blot dans le surnageant de culture du clone IAF917C (voir fig.20, dépôt 3).

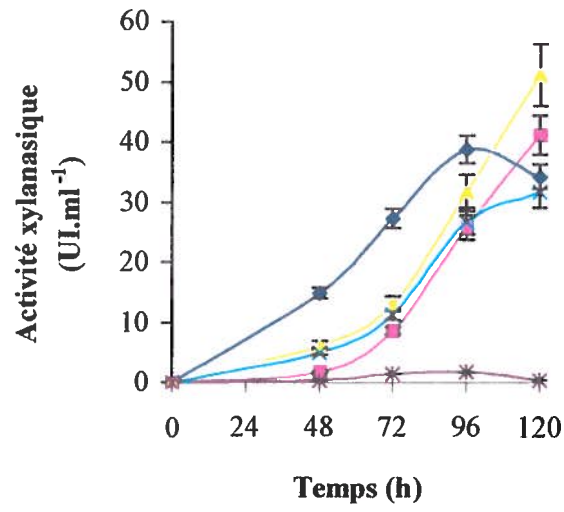
D'autre part, le surnageant de culture du clone IAF917C ne présente aucune activité sur gel de RBB-xylane (voir fig.22, puits 10).

Figure 23 : Influence des délétions de la région-n du peptide signal de la XlnC sur la production de l'enzyme.

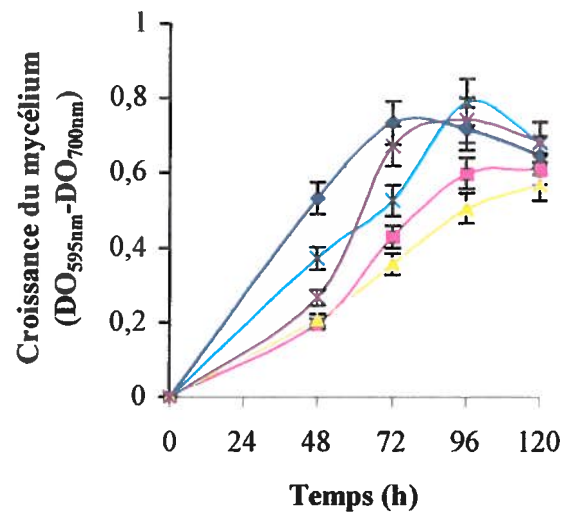
Les clones IAF916C-45 (-■-), IAF916C-40 (-▲-), IAF916C-34 (-x-) et IAF917C (-*-) produisent un précurseur de la XlnC dont le peptide signal a été respectivement délété de 5, 10, 15 et 20 a.a. Clone référence IAF916C (-◆-).

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹
- b) croissance du mycélium

a)



b)



Afin d'étudier la maturation du précurseur de XlnC délété de ces 20 premiers a.a., le clone IAF917C a été soumis à une expérience de « pulse-chase ». L'autoradiogramme obtenu est montré à la figure 24. Le précurseur délété apparaît dès le début de l'expérience mais il disparaît très lentement. Ainsi après une heure de « chase », nous avons estimé que le précurseur délété avait diminué de seulement 25% (voir fig.24a). Néanmoins, le précurseur n'a pas été maturé de manière classique, puisqu'on ne relève pas la présence de XlnC mature, même après 1h de « chase ». Par contre, un peptide α_4 d'environ 17 kDa apparaît au début de l'expérience. La quantité de ce dernier est restée constante pendant 60 min. On observe exactement le même profil en présence d'azoture de sodium (voir fig.24b). De plus comme pour les clones IAF916C(R-27K) et IAF906C, nous avons pu montrer que le peptide de 17 kDa se trouvait dans le compartiment cellulaire (voir fig.24c).

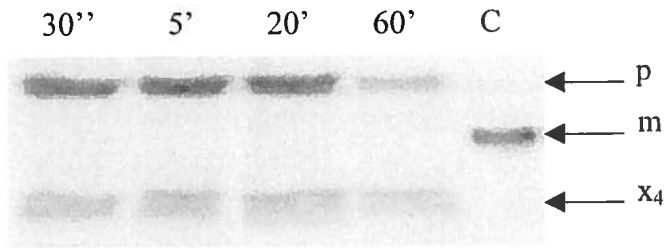
Ainsi la délétion des 20 premiers a.a. du peptide signal de la XlnC ne permet pas la maturation correcte du précurseur délété en XlnC mature. De la même manière que pour le clone IAF906C, on ne détecte ni de XlnC mature dans le surnageant de culture (voir fig.20, dépôt 3 et fig.22, puits 10) ni d'activité xylanasiq ue sur gel de RBB-xylane pour les extraits cellulaires du clone IAF917C (voir fig.22, puits 5). Le précurseur de XlnC délété et le peptide de 17kDa retrouvés dans le cytoplasme ne sont pas dans sous une forme enzymatiquement active.

Figure 24 : Maturation du précurseur de la XlnC dont le peptide signal a été délété de ses 20 premiers a.a. et effet de l'azoture de sodium sur ce processus.

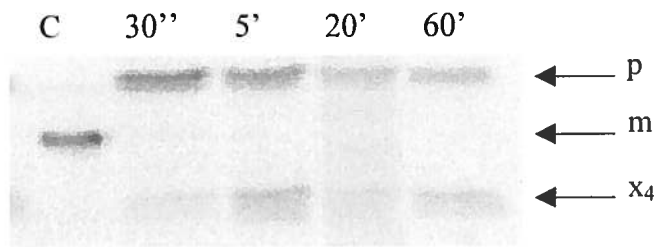
Le clone IAF917C produit un précurseur de XlnC dont le peptide signal a été délété des 20 premiers a.a. de sa région-n. p, précurseur de la XlnC; m, XlnC mature; C, contrôle XlnC mature; x₄, peptide inconnu.

- a) « pulse-chase » réalisé en conditions normales
- b) « pulse-chase » réalisé en présence de 2 mM d'azoture de sodium ajouté 7 min avant l'étape de « chase ».
- c) séparation des fractions cellulaire et extracellulaire après 20 min de « chase ». T, fraction totale; E.c., extrait cellulaire; Sn, surnageant de culture.

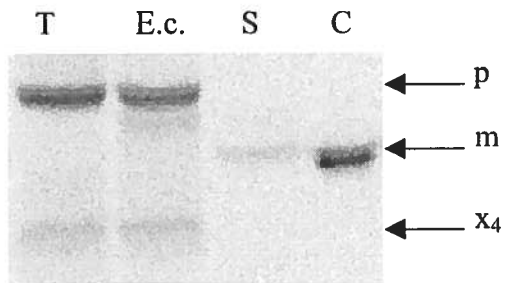
a)



b)



c)



4-2- Modifications des a.a. chargés de la région-n du peptide signal de la XlnC

La région-n des peptide signaux de type TAT est plus longue que celle des peptides signaux de type GSP (*Cristobal et al., 1999* et voir fig.9). De plus, au sein de cette région, la densité de charge est plus importante pour les précurseurs de type TAT. La région-n du peptide signal de la XlnC contient quatre charges positives à savoir une lysine et trois arginines dont deux appartiennent à la séquence signature TAT. Le peptide signal de la XlnC contient également deux charges négatives à savoir deux acides aspartiques. La région-n contient donc six a.a. chargés pour une charge nette de +2. Cette valeur est légèrement en dessous de la moyenne de +2.8 calculée pour les précurseurs de type TAT (*Berks, 1996*).

Le remplacement des deux arginines du site TAT par deux lysines ayant déjà été étudié à l'aide des clones IAF916C(R-27K) et IAF916C(R-27K.R-26K), la présente partie du projet se propose d'étudier l'influence des quatre autres a.a. chargés de la région-n du peptide signal de la XlnC à savoir les acides aspartiques -46 et -41, l'arginine -40 et la lysine -38 (voir fig.9). Dans un premier temps, nous avons étudié de manière individuelle les a.a. -46, -41 et -38. Les amorces ASSE-02, ASSE-03 et ASSE-04 ont été synthétisées de manière à remplacer ces trois charges par mutagenèse dirigée selon Kunkel (voir Tableau VII). Après hybridation sur l'ADN simple brin du pIAF816C, ces amorces ont permis la synthèse *in vitro* d'un brin d'ADN complémentaire. L'amorce ASSE-02 modifie le codon *gac* qui code pour un acide aspartique en un codon *aat* qui code pour une asparagine, la mutation *D-41N* est ainsi introduite. De la même manière, l'amorce ASSE-03 introduit un codon *ata* qui code pour une isoleucine à la place du codon *cgg* qui code pour une arginine, c'est la mutation *R-40I*. Enfin l'amorce ASSE-04 change le codon *aag* qui code pour une lysine par un codon *atc* qui code pour une isoleucine, c'est la mutation *K-38I*. Les mutations introduites par les amorces ASSE-02 et ASSE-03 suppriment un site de restriction *AvaII*. Par simple digestion enzymatique, il a été possible de cribler les clones de *E. coli* porteurs des mutations recherchées. L'opération s'est révélée un peu plus compliquée dans le cas de la mutation introduite à l'aide de l'amorce ASSE-04. En effet, malgré les trois possibilités existantes pour un codon isoleucine (voir Appendice C),

aucune ne permettait de modifier les sites de restriction présents dans l'environnement du triplet à muter. Il faut donc procéder par hybridation en utilisant comme sonde l'amorce ASSE-04 marquée au ^{32}P .

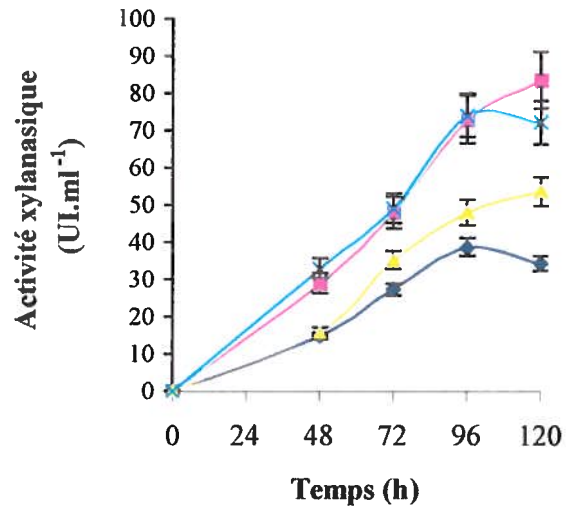
Après avoir sélectionné un clone porteur de la mutation pour chacune des trois mutations, on a procédé exactement de la même manière que pour obtenir le plasmide pIAF916C(*R-27K*). On a donc obtenu respectivement les plasmides pIAF916C(*D-41N*), pIAF916C(*R-40I*) et pIAF916C(*K-38I*). La production de XlnC des trois clones est présentée à la figure 25. Les modifications apportées au sein de la séquence du peptide signal de la XlnC améliorent toutes les trois la production de XlnC d'un facteur compris entre 1.5 pour le clone pIAF916C(*R-40I*) à presque 2.5 pour le clone IAF916C(*D-41N*).

Figure 25 : Influence de la l'annulation individuelle des charges de la région-n du peptide signal sur la production de XlnC.

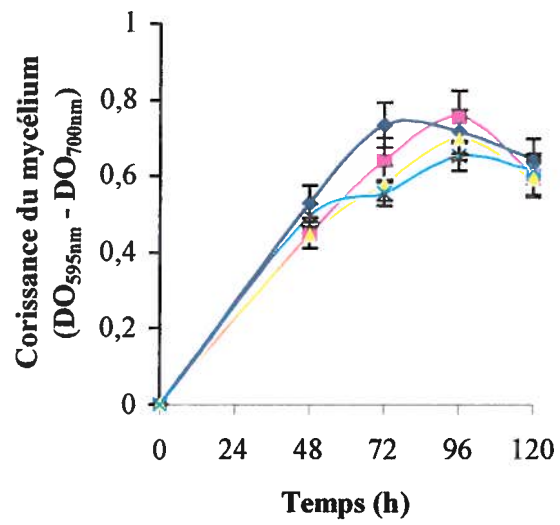
Les clones IAF916C(*D-41N*) (-■-), IAF916C(*R-40I*) (-▲-) et IAF916C(*R-38I*) (-×-) produisent un précurseur de XlnC dans lequel respectivement l'acide aspartique -41 du peptide signal a été remplacé par une asparagine, l'arginine -40 a été mutée en isoleucine et la lysine -38 a été changée en isoleucine. Clone référence IAF916C (-◆-).

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹.
- b) croissance du mycélium.

a)



b)



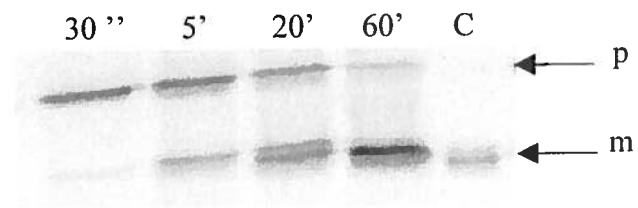
Un expérience de « pulse-chase » a été réalisée avec le clone IAF916C(*D-46N*) afin de voir si l'augmentation de la production de XlnC constatée pouvait être corrélée avec une maturation du précurseur plus rapide. L'autoradiogramme obtenu est présenté à la figure 26. Il présente des similitudes avec le « pulse-chase » du clone IAF916C (voir fig.15). La comparaison de ces deux expériences ne permet pas pour autant de conclure à une maturation plus rapide du précurseur *D-46N* par rapport au précurseur non muté. Le « pulse-chase » en présence d'azoture de sodium présente des différences par rapport au « pulse-chase » en conditions normales. En effet, en présence d'azoture de sodium et après 30 sec. de « chase », la XlnC mature n'est pas encore présente comme c'était le cas en conditions normales (voir fig. 26b). Enfin, après 60 min de « chase », il reste une plus forte proportion de précurseur en présence d'azoture de sodium. Ces remarques laissent supposer que l'azoture de sodium pourrait avoir une légère influence sur la maturation du précurseur muté *D-46N*.

Figure 26 : Maturation du précurseur de la XlnC dont la seconde charge négative a été annulée.

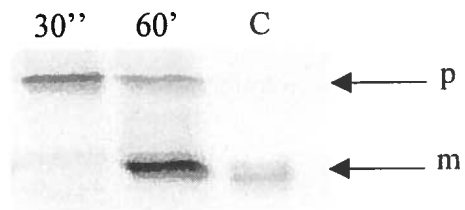
Le clone IAF916C(*D-41N*) produit un précurseur de la XlnC dont l'acide aspartique -41 a été remplacé par l'asparagine. p, précurseur de la XlnC; m, XlnC mature; C, contrôle XlnC mature.

- a) « pulse-chase » réalisé en conditions normales.
- b) « pulse-chase » réalisé en présence de 2 mM d'azoture de sodium ajouté 7 min avant l'étape de « chase ».

a)



b)



Par la suite, nous avons remplacé simultanément les deux acides aspartiques -46 et -41 chargés négativement par deux asparagines. La même chose a également été réalisée pour l'arginine -40 et la lysine -38 qui ont été remplacées chacune par une isoleucine. Ces deux mutations ont été réalisées en employant la technique de la PCR recombinante à cause des difficultés rencontrées pour renouveler notre stock de pIAF816C simple brin. Les amorces ASSE-07, ASSE-08, ASSE-17 et ASSE-18 ont été synthétisées (voir Tableau VII). Le couple d'amorces complémentaires ASSE-07/ASSE-17 a permis d'introduire la double mutation *D-46N.D-41N* et le couple ASSE-08/ASSE-18 la double mutation *R-40I.K-38I*. Les amorces ASSE-17 et ASSE-18 s'hybrident sur le brin anti-sens de la séquence du peptide signal de la XlnC. Couplée à l'amorce CD-401, chacune a permis d'amplifier un fragment qui correspond à l'extrémité 3' de la séquence du peptide signal de la XlnC suivie du gène de structure de la XlnC. Les amorces ASSE-07 et ASSE-08 s'hybrident sur le brin sens du gène de structure de la XlnC au même niveau respectivement que les amorces ASSE-17 et ASSE-18. En présence de l'amorce pTZ2601, chaque amorce a permis d'amplifier un fragment correspondant à une portion du pTZ19U suivi de l'extrémité 5' de la séquence du peptide signal de la XlnC. Comme pour les mutations *D-41N* et *R-40I*, les doubles mutations *D-46N.D-41N* et *R-40I.K-38I* ont été mises en évidence chez *E. coli* par digestion des plasmides par *AvaII*. Par la suite, on a procédé exactement de la même manière que pour le plasmide pIAF916C(*R-27K*). Les plasmides pIAF916C(*D-46N.D-41N*) et pIAF916C(*R-40I.K-38I*) ont ainsi été obtenus. L'activité enzymatique des surnageants de culture de ces deux clones est présentée à la figure 27. L'annulation des deux a.a. chargés positivement par deux isoleucines permet d'augmenter la production de XlnC d'un facteur 1.5 par rapport au clone IAF916C. Le remplacement des deux charges négatives par des asparagines permet de produire 96.7 UI.ml⁻¹ soit presque 3 fois ce que l'on obtient avec le clone IAF916C. Le clone IAF916C(*D-46N.D-41N*) représente ainsi le meilleur clone producteur de XlnC obtenu lors du projet de recherche.

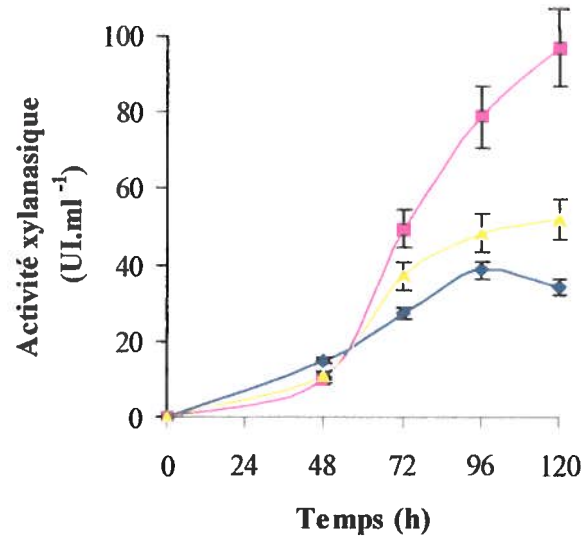
Figure 27 : Influence de l'annulation des charges de la région-n du peptide signal sur la production de XlnC.

Le clone IAF916C(*D-46N.D-41N*) (-■-) produit un précurseur de XlnC dans lequel les deux acides aspartiques -46 et -41, chargés négativement, ont été remplacés par deux asparagines. Le clone IAF916C(*R-40I.K-38I*) (-▲-) produit un précurseur de XlnC au sein duquel les deux a.a. du peptide signal chargés positivement à savoir l'arginine -40 et la lysine -38 ont été remplacées par deux isoleucines. Clone référence IAF916C (-◆-).

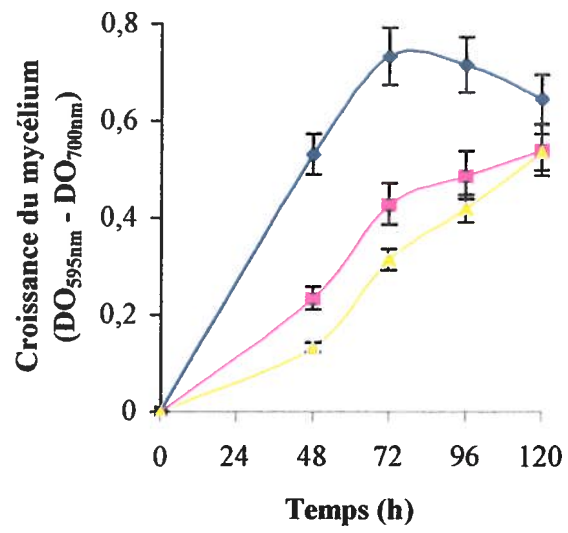
a) activité xylanasiqne en UI.ml⁻¹

b) croissance du mycélium

a)



b)



5- Modification du site de clivage de la signal peptidase

Les peptides signaux de type GSP comportent au sein de leur région-c une séquence consensus A-X-A qui correspond au site de clivage de la signal peptidase. Les recherches menées jusqu'à maintenant sur les peptides signaux de type TAT ne se sont jamais intéressées à la nature ni à la spécificité du site de clivage des précurseurs de type TAT. Le peptide signal de la XlnC contiendrait un site de clivage AHA qui a été confirmé par le séquençage N-terminal de la XlnC mature (résultats non publiés). Nous voulions savoir si la séquence de ce site était hautement spécifique. Pour cela, nous avons réalisé deux mutations ciblées sur le site de clivage AHA. La technique choisie fut celle de Kunkel en utilisant le pIAF816B2 simple brin comme matrice. Le pIAF816C simple brin aurait été plus adapté car la XlnC constituait notre protéine modèle, malheureusement nous avons rencontré des difficultés pour renouveler notre stock de pIAF816C simple brin. Néanmoins, le pIAF816B2 peut servir à la réaction de mutagenèse puis par la suite le gène de structure de la XlnB2 peut être remplacé par celui de la XlnC par une digestion à l'aide des enzymes *KpnI* et *SacI*.

L'amorce ASSE-05 a été synthétisée de manière à remplacer au sein du peptide signal de la XlnC, le site de clivage AHA par le site AHE. Cependant une erreur a été commise lors de la synthèse de cette amorce. La séquence nucléotidique codant pour le site de clivage AHA a bien été remplacée par celle codant pour le site AHE mais cette modification a également entraîné la suppression du site de coupure *KpnI*. Il devenait alors impossible de remplacer le gène de structure de la XlnB2 par celui de la XlnC. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, la XlnB2 et la XlnC se comportent de la même façon lorsqu'elles sont précédées du peptide signal de la XlnC (voir fig.14). Nous avons décidé de continuer l'étude du site de clivage de la signal peptidase en prenant la XlnB2 comme protéine modèle. Après la synthèse du brin complémentaire du pIAF816B2 en utilisant l'amorce ASSE-05, on a obtenu le plasmide pIAF816B2(A-1E). La mutation introduit un site supplémentaire de restriction *EcoRI*, ce qui permet de cribler les clones mutants. Le pIAF816B2 (A-1E) a ensuite été digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI* afin de libérer un fragment de 723 pb. Ce dernier a été inséré dans le pIAF906 entre les mêmes sites pour

donner le pIAF916B2(*A-1E*). La production de XlnB2 par le clone IAF916B2(*A-1E*) est représentée sur la figure 28. Après 120 h de culture, l'activité xylanasiqne de ce dernier atteint 29.2 UI.ml⁻¹.

L'amorce ASSE-06 a ensuite été synthétisée de manière à modifier complètement le site de clivage de la signal peptidase AHA par la séquence RLE tout en conservant le site de restriction *KpnI*. On a procédé ensuite exactement de la même manière que pour le pIAF816B2(*A-1E*). La présence de la mutation a également été contrôlée par une digestion à l'aide de *EcoRI*. Le plasmide obtenu a ensuite été digéré par les enzymes *KpnI* et *SacI*. Le gène de structure de la XlnB2 a été extrait puis remplacé par celui du gène de la XlnC, amplifié à l'aide des amorces XC-*KpnI* et *SacI* et en utilisant le plasmide pIAF20 comme matrice. Le nouveau plasmide a ensuite été digéré par les enzymes *HindIII* et *SacI*. Le fragment récupéré a alors été inséré entre les mêmes sites du plasmide pIAF906. Le plasmide ainsi obtenu est le pIAF916C(*A-3R.H-2L.A-1E*). La production du clone IAF916C(*A-3R.H-2L.A-1E*) est représentée à la figure 28. Après 120h de culture, ce dernier produit 25.6 UI.ml⁻¹. La modification complète du site de clivage de la signal-peptidase ne semble pas trop perturber la production de XlnC mature.

Le clone IAF916C(*A-3R.H-2L.A-1E*) a été soumis à une expérience de « pulse-chase » (voir fig.29). La maturation du précurseur muté s'effectue tout à fait normalement en moins de 60 min. Le processus n'entraîne aucune dégradation protéolytique du précurseur. Ce résultat confirme que la modification complète de l'éventuel site de clivage AHA de la signal peptidase ne perturbe pas la maturation du précurseur de la XlnC.

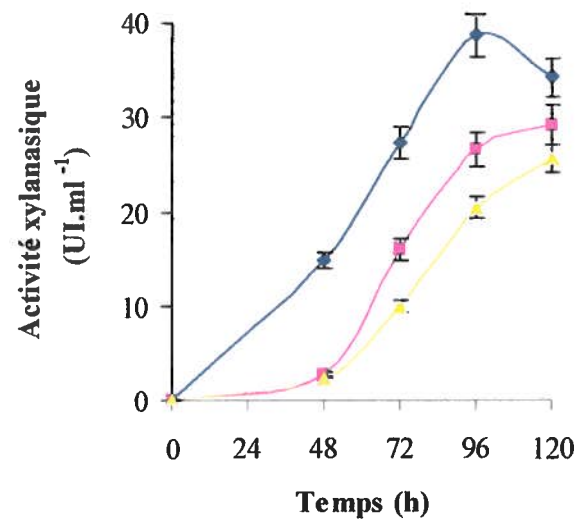
Les résultats obtenus ici sur la modification du site de clivage de la signal peptidase ne constituent qu'un début d'étude. Des investigations complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre la spécificité du site clivage des précurseurs de type TAT.

Figure 28 : Influence de la modification du site de clivage de la signal peptidase sur la production de XlnC et XlnB2.

Le clone IAF916B2(*A-1E*) (-■-) produit un précurseur de XlnB2 contenant le peptide signal de la XlnC dans lequel le site de clivage AHA de la région-c a été remplacé par la séquence AHE. Le clone IAF916C(*A-3R.H-2L.A-1E*) (-▲-) produit un précurseur de XlnC dont le site de clivage a été remplacé par la séquence RLE. Clone référence IAF916C (-◆-).

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹
- b) croissance du mycélium

a)



b)

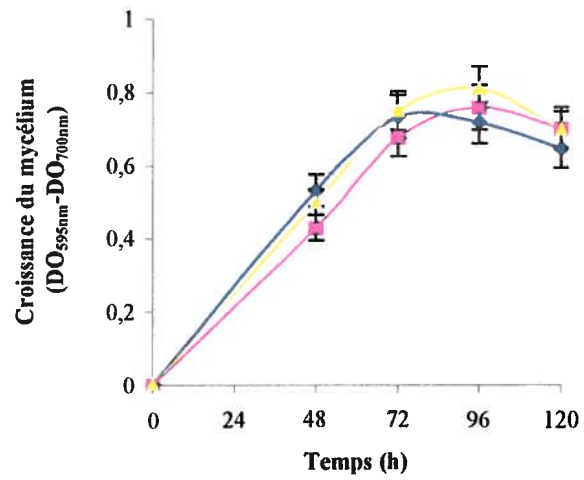
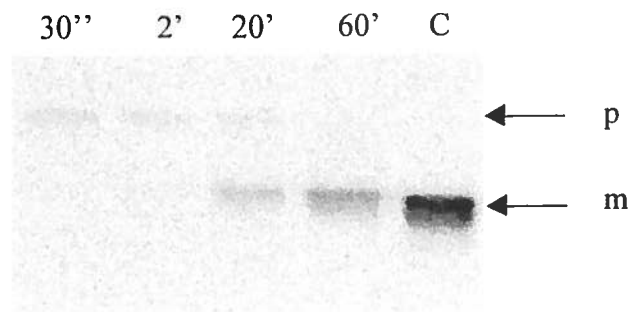


Figure 29 : Maturation du précurseur de la XlnC dont le site de clivage de la signal peptidase a été modifié.

Le clone pIAF916C(*A-3R.H-2L.A-1E*) produit précurseur dont le site de clivage de la signal peptidase AHA a été remplacé par la séquence RLE. p, précurseur; m, XlnC mature; C, contrôle XlnC mature. Le « pulse-chase » a été réalisé en conditions normales.



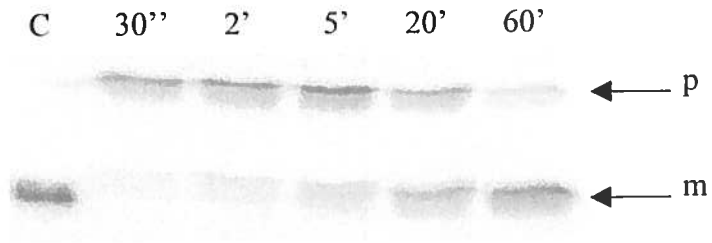
6- Modifications du peptide signal de la xylanase C et sécrétion de la XlnB2

Nous avons vu que le peptide signal de la XlnC était capable de diriger la sécrétion de la XlnB2 vers la voie TAT. Outre une activité xylanasiq ue équivalente pour les clones IAF916C et IAF916B2 (voir fig.14), ces deux clones ont également le même profil en « pulse-chase » (voir fig.15 et 30a). Les anticorps anti-XlnB2 précipitent deux peptides de taille différente. Le peptide de 21 kDa est la XlnB2 mature alors que le peptide de 26.5 kDa correspond au précurseur de la XlnB2 contenant le peptide signal de la XlnC. La taille théorique de ces deux peptides a été calculée à partir de la séquence nucléotidique. La XlnB2 mature est présente en faible quantité dès 30 sec. de « chase ». Le précurseur n'a pas totalement disparu même après 60 min de « chase ». La demi-vie estimée du précurseur comportant le peptide signal de la XlnC suivi de la XlnB2 mature est de 15 min soit une durée équivalente à la demi-vie du précurseur de la XlnC. En présence d'azoture de sodium, le profil obtenu est strictement identique (résultats non montrés). Le précurseur semble donc dépendre de la voie TAT pour sa maturation.

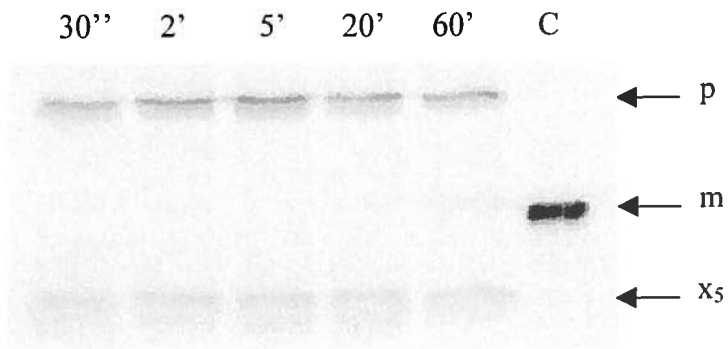
Figure 30 : Maturation du précurseur de la XlnB2 contenant le peptide signal normal de la XlnC ou sa version mutée au niveau de la première arginine.

- a)** Le clone IAF916B2 produit le précurseur de la XlnB2 dont le peptide signal de la XlnB a été remplacé par celui de la XlnC. p, précurseur; m, XlnB2 mature; C, contrôle XlnB2 mature.
- b)** Le clone IAF916B2(*R-27K*) produit le précurseur de la XlnB2 dont le peptide signal de la XlnB a été remplacé par celui de la XlnC muté au niveau de la première arginine du site TAT. p, précurseur; m, XlnB2 mature; x₅, peptide inconnu; C, contrôle XlnB2 mature.

a)



b)



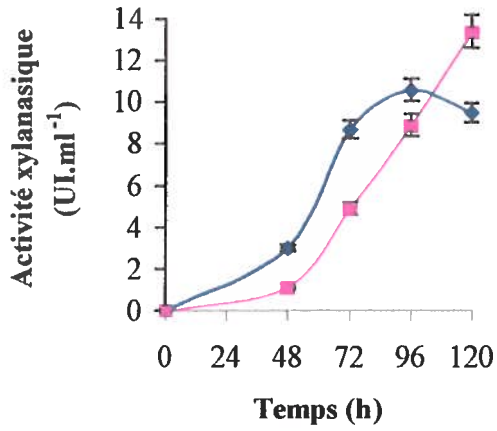
Nous avons voulu ensuite voir si les mutations *R-27K*, *D-41N*, *R-40I* et *K-38I* apportées au peptide signal de la XlnC avaient les mêmes conséquences sur la sécrétion de la XlnB2 que sur celle de la XlnC. La méthode de mutagenèse dirigée selon Kunkel a été utilisée à l'aide des amorces ASSE-01, ASSE-02, ASSE-03 et ASSE-04 et de la matrice simple brin pIAF816B2. Ces amorces ont permis d'introduire respectivement les mutations *R-27K*, *D-41N*, *R-40I* et *K-38I* au niveau du peptide signal de la XlnC. La procédure suivie est exactement la même que pour les plasmides pIAF916C(*R-27K*), pIAF916C(*D-41N*), pIAF916C(*R-40I*) et pIAF916C(*K-38I*). Les clones IAF916B2(*R-27K*), IAF916B2(*D-41N*), IAF916B2(*R-40I*) et IAF916B2(*K-38I*) ont ainsi été obtenus. Sur le figure 31, la production de XlnB2 de chacun des quatre clones précédents est comparée avec la production de XlnC obtenue avec le même peptide signal muté. Comme l'activité spécifique de la XlnB2 est similaire à celle de la XlnC, il est possible de comparer les résultats d'activités enzymatiques obtenus avec les protéines XlnB2 et XlnC (*Kluepfel et al., 1992*). Tous les clones ont des courbes de croissance équivalentes (résultats non montrés). On remarque qu'après 120 h de culture dans le milieu M14 et pour une même mutation du peptide signal, les clones mutants produisent autant de XlnB2 que de XlnC. Cette tendance est visible pour les quatre mutations testées. Comme pour la production de XlnC, la production de XlnB2 est fortement diminuée lorsque la première arginine du peptide signal de la XlnC est remplacée par une lysine. Le clone IAF916B2(*R-27K*) a donc été soumis à une expérience de « pulse-chase ». L'autoradiogramme obtenu présente exactement le même profil que le « pulse-chase » du clone IAF916C(*R-27K*) (voir fig.30b). Les anti-corps anti-XlnB2 reconnaissent deux peptides : le précurseur et un second peptide \times_5 plus petit que la XlnB2 mature. Le « pulse-chase » en présence d'azoture de sodium (résultats non montrés) ne présente aucune différence notable avec le « pulse-chase » précédent. La mutation de la première arginine du peptide signal de la XlnC diminue la production de XlnB2 d'un facteur 3 laissant supposer que la XlnB2 précédée du peptide signal de la XlnC soit dépendante du système TAT pour sa sécrétion.

Figure 31 : Influence de la modification des charges du peptide signal de la XlnC sur la production de XlnB2.

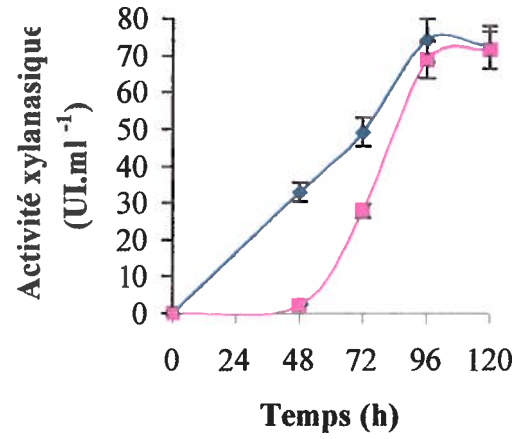
Pour chacune des modifications apportées au niveau des charges du peptide signal de la XlnC, les productions de xylanases C (-♦-) et B2 (-■-) sont comparées.

- a) comparaison de la production d'enzyme du clone IAF916C(*R-27K*) (-♦-) versus le clone IAF916B2(*R-27K*) (-■-).
- b) comparaison de la production d'enzyme du clone IAF916C(*K-38I*) (-♦-) versus le clone IAF916B2(*K-38I*) (-■-).
- c) comparaison de la production d'enzyme du clone IAF916C(*R-40I*) (-♦-) versus le clone IAF916B2(*R-40I*) (-■-).
- d) comparaison de la production d'enzyme du clone IAF916C(*D-41N*) (-♦-) versus le clone IAF916B2(*D-41N*) (-■-).

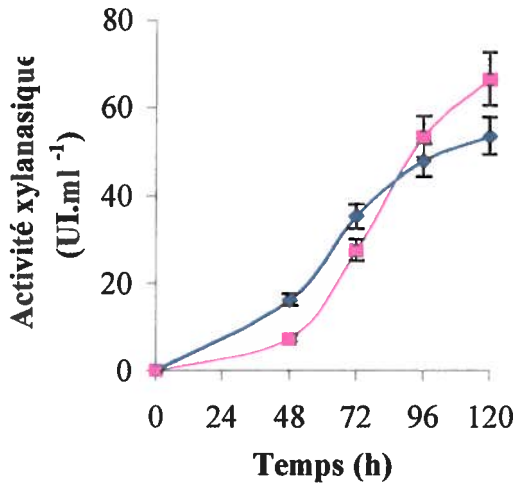
a)



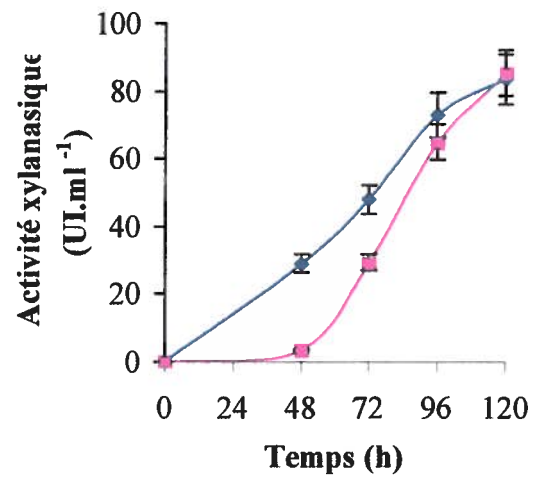
b)



c)



d)



Nous avons également voulu étudier l'importance de la région-n du peptide signal de la XlnC sur la maturation de la XlnB2. Nous avons donc réalisé une construction dans laquelle la XlnB2 était précédée du peptide signal de la XlnC délété de ses 20 premiers a.a.. Le gène de structure de la XlnB2 a été introduit entre les sites *KpnI* et *SacI* du plasmide pIAF817 à la place du gène de structure de la XlnA. Par la suite, on a procédé exactement de la même manière que pour obtenir le plasmide pIAF917C. Le plasmide pIAF917B2 contient le promoteur du gène *xlnA*, la séquence du peptide signal de la XlnC délétée de 60 nucléotides et le gène de structure de la XlnB2. La production de XlnB2 du clone IAF917B2 est représentée sur la figure 32. Après 96 h de culture, l'activité xylanase est de 8.6 UI.ml⁻¹ soit presque 4 fois moins que le clone IAF916B2 comportant le peptide signal intégral de la XlnC. Elle n'est cependant pas nulle comme dans le cas du clone IAF917C.

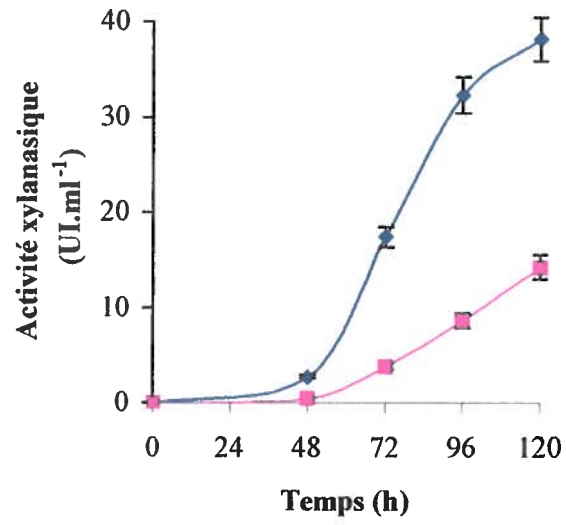
Le clone IAF917B2 a été soumis à une expérience de « pulse-chase ». L'autoradiogramme obtenu est montré à la figure 33. Le précurseur et la XlnB2 mature est présent dès 30 sec. de « chase ». Le précurseur diminue très peu et après 60 min, il est toujours présent en forte quantité. La quantité de XlnB2 mature semble également très stable. Après 20 min de « chase », on observe un dédoublement de la bande de XlnB2. En présence d'azoture de sodium, il semblerait que la quantité de XlnB2 mature soit moins importante après 30 sec de « chase » qu'en conditions normales (voir fig.33b). Après 1h de « chase » en présence de l'inhibiteur de la voie GSP, la quantité de précurseur a faiblement diminué alors que le dédoublement de la XlnB2 mature est plus évident.

Figure 32 : Influence de la délétion des 20 premiers a.a. du peptide signal de la XlnC sur la production de XlnB2

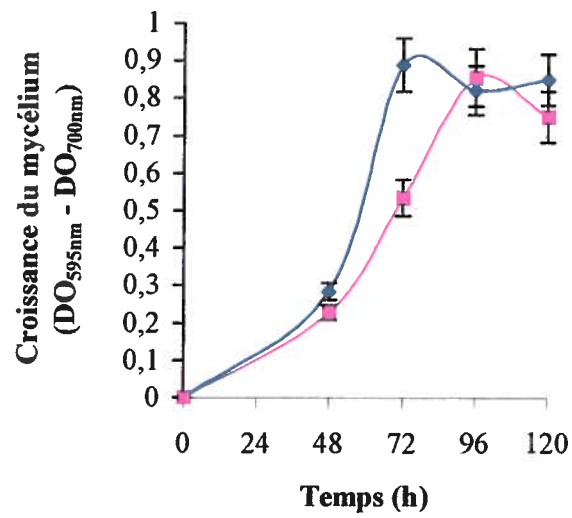
Le clone IAF917B2 (-■-) produit un précurseur contenant la XlnB2 précédé du peptide signal de la XlnC délété de ses 20 premiers a.a.. Le clone IAF916B2 (-◆-) sert de référence.

- a) activité xylanasiqne exprimée en UI.ml⁻¹
- b) croissance du mycélium

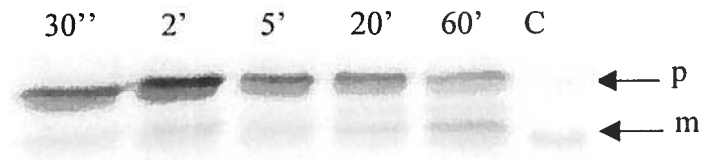
a)



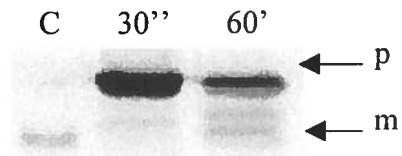
b)



a)



b)



Le tableau IX de la page suivante rassemble tous les clones de *S. lividans* obtenus au cours du projet de recherche. Pour chaque clone, on retrouve la séquence complète du peptide signal de la XlnC avec les modifications apportées (mutation ou délétion) ainsi que l'activité enzymatique obtenue après 120 h de culture en milieu M14 + xylose.

	UI.ml ⁻¹
• IAF916C :	34.2
• IAF916C(R-27K) :	9.5
• IAF916C(R-27K.R-26K) :	7.3
• IAF916C-45 :	41.2
• IAF916C-40:	51.2
• IAF916C-34 :	31.6
• IAF917C :	0.3
• IAF916C(D-41N) :	83.5
• IAF916C(R-40I) :	53.6
• IAF916C(K-38I) :	72.2
• IAF916C (D-46N.D-41N) :	96.7
• IAF916C(R-40I.K-38I) :	51.9
• IAF916C(A-1E) :	29.2
• IAF916C(A-1R.H-2L.A-3E) :	25.6

Tableau IX : Récapitulatif de toutes les modifications apportées au peptide signal de la XlnC. Pour chaque clone, l'activité enzymatique à 120 h est rappelée, les a.a. modifiés sont en gras et soulignés, la séquence TAT est en italique.

PARTIE IV

DISCUSSION

1- La production de xylanase C peut être améliorée

La XlnC est naturellement produite par *S. lividans* en très faible quantité par rapport aux XlnA et XlnB (*Kluepfel et al., 1992*). Afin d'étudier la sécrétion de la XlnC, il fallait donc trouver un moyen d'en augmenter la production. La première avenue employée fut de remplacer le promoteur du gène *xlnC* par celui du gène *xlnA* qui avait été utilisé précédemment avec succès (*Kébir et al., 2000*). Cette approche s'est avérée très positive puisque la production a atteint 38.7 UI.ml^{-1} après 96 h de culture comparativement aux 13 UI.ml^{-1} obtenues avec le promoteur d'origine. Comme cela avait déjà été supposé par *Kluepfel et al. (1992)*, nos résultats confirment que la faible production de XlnC par la souche sauvage est imputable à la faiblesse du promoteur du gène *xlnC*.

2- La xylanase C dépend exclusivement du système TAT pour sa sécrétion

2-1- La XlnC est sécrétée par le système TAT

La présence de la séquence **S-R-R-G-F-L-G** au sein du peptide signal de la XlnC laissait présager que cette enzyme dépendait du système TAT pour sa sécrétion. Les résultats obtenus au cours du projet de recherche ont, en effet, permis de montrer que la XlnC empruntait exclusivement la voie TAT. La littérature publiée sur cette voie fait très souvent référence à des protéines fixant des cofacteurs (*Berks, 1996; Berks et al., 2000; Dreush et al., 1996, Halbig et al., 1999, Rodrigue et al., 1999, Santini et al., 1998, Weiner et al., 1998*). Cependant certaines protéines comme *phoD* de *B.subtilis* et *SufI* de *E. coli* dépendent du système TAT pour leur sécrétion bien qu'elles ne contiennent pas de cofacteur (*Berks, 1996; Brüser et al., 1998; Pop et al., 2002, Stanley et al., 2000*). Comme aucun cofacteur se liant à des xylanases n'a encore été rapporté, la XlnC ferait donc également partie de cette catégorie de protéines. La XlnC se replierait immédiatement après sa synthèse et transiterait via la translocase TAT sous cette forme.

En effet, le repliement rapide de certaines protéines leur empêcherait d'accéder à la voie GSP (*Berks et al., 2000*).

La demi-vie du précurseur de la XInC est de 16 min tandis que celle du précurseur de la XInA est de 1,5 min (*Morosoli et Dupont, 1999*). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui rapportent que le processus de maturation des précurseurs de type TAT est plus lent que celui des précurseurs de type GSP (*Berks et al., 2000*). *Santini et al. (1998)* ont supposé que la lenteur du processus de maturation des précurseurs de type TAT par rapport à ceux de type GSP était imputable à l'étape d'acquisition du cofacteur. Comme la XInC ne fixe pas de cofacteur, cette étape ne représente pas l'unique raison responsable de la lenteur de la maturation des précurseurs de type TAT.

On peut noter également que le processus de maturation du précurseur de la XInC chez *S. lividans* est relativement plus long que pour d'autres précurseurs dépendant également du système TAT. Ainsi après 5 min de « chase », 60 % du précurseur de la TorA a déjà été maturé chez *E. coli* (*Santini et al., 1998*). De même, après 20 min de « chase », il ne reste plus aucune trace de précurseur de la GFOR chez *Z. mobilis* (*Halbig et al., 1999*) alors que pour le même temps le précurseur de la XInC est encore présent (voir fig.15). La vitesse de maturation de la XInC est donc relativement faible par rapport aux autres précurseurs empruntant le système TAT. Cela peut être attribuable à la souche hôte utilisée. Les bactéries Gram négatives posséderaient un système TAT plus rapide que celui des Gram positives. L'état de repliement du précurseur de la XInC pourrait aussi expliquer sa relative lenteur de la maturation. Les précurseurs de type TAT possèdent généralement un cofacteur qui doit probablement contribuer au maintien d'une conformation relativement stable. La conformation du précurseur de la XInC, du fait de l'absence de cofacteur, pourrait être moins stable. On peut ainsi supposer que la structure du précurseur de la XInC se modifie au cours du processus de maturation. Or, la translocase TAT doit s'adapter parfaitement à la conformation du précurseur pris en charge afin de conserver l'imperméabilité de la membrane (*Berks et al., 2000*). Elle devrait donc effectuer des ajustements fréquents lors de la maturation du précurseur de la XInC d'où la lenteur du processus. Suivant cette hypothèse, la XInC serait donc sécrétée sous une forme

partiellement repliée. C'est probablement le cas puisque la XlnC mature contient un pont disulfure entre les cystéines 43 et 74 (résultats non publiés). Or l'environnement réducteur du cytoplasme ne favorise pas la formation d'une telle liaison chimique (*Rietsch and Beckwitt, 1999*), il est donc probable que la XlnC soit sécrétée sous une forme partiellement repliée n'atteignant son repliement final que dans le milieu extracellulaire. Des études ont montré que le système TAT de la membrane des thylakoïdes était capable de sécréter des protéines n'ayant pas encore atteint leur repliement final (*Hynds et al., 1998*). Le repliement final de la partie mature d'une protéine n'est donc pas obligatoire pour sa prise en charge par le système TAT. Comme le système Δ pH-dépendant des thylakoïdes présente de nombreuses homologues avec le système TAT des bactéries (*Settles et al., 1997; Mori et al., 1999*), on peut donc supposer que ce dernier est également capable de prendre en charge des protéines partiellement repliées.

Plusieurs auteurs ont montré que le précurseur des protéines sécrétées par le système TAT étaient déjà actifs (*Angelini et al., 2001; Wiegert et al., 1996; Loos et al., 1993*). Nos expériences ne nous ont pas permis de montrer de manière directe l'activité du précurseur de la XlnC. Bien que l'extrait cellulaire du clone référence IAF916C présente une bonne activité xylanase sur gel de RBB-xylane (voir fig.22, puits 4), il nous est impossible de conclure que l'activité détectée provient du précurseur. En effet, avec cette technique nous ne pouvons différencier l'activité provenant du précurseur de celle provenant de la protéine mature encore associée à la membrane. Mais, nous avons pu montrer que lorsque le peptide signal de la XlnC était délété de ses 20 premiers a.a., l'extrait cellulaire du clone IAF917C ne présentait aucune activité sur gel de RBB-xylane (voir fig.22, puits 5). Or le peptide signal ne participe pas au repliement de la protéine (*Rodrigue et al., 1999*), nous pensons donc que le précurseur produit par le clone IAF916C présente le même repliement que le précurseur du clone IAF917C. Comme ce dernier est inactif, nous avons de bonnes raisons de croire que le précurseur de la XlnC l'est également. De plus, comme la XlnC mature possède un pont disulfure mais que ce dernier ne peut probablement pas se former dans le cytoplasme, il est probable que le précurseur sans cette liaison ne soit pas actif.

Comme l'énergie de la voie TAT est fournie par la force proton-motrice, nous avons essayé de bloquer cette dernière en employant un protonophore comme le CCCP. Aucune expérience en présence de CCCP n'avait été encore réalisée chez *S. lividans*. Une concentration finale de 0.1 mM de CCCP est suffisante pour inhiber la translocation du précurseur de type TAT de la protéine TorA chez *E. coli* (Santini *et al.*, 1999) alors que chez *S. lividans*, la même concentration semble inhiber la synthèse protéique (voir fig.16). Une concentration finale de 0.05 mM semble partiellement inhiber la maturation du précurseur de la XlnC. Les limites du présent projet de recherche ne nous ont pas permis de déterminer avec précision la concentration minimale de CCCP inhibant la voie TAT chez *S. lividans*. Néanmoins, les premiers résultats obtenus nous permettent de penser que cette concentration est comprise entre 0.05 mM et 0.1 mM.

2-2- La séquence signature TAT est importante

La mutation de la première arginine de la séquence consensus TAT du peptide signal de la XlnC diminue la production de l'enzyme sans toutefois l'anéantir (voir fig.17). Ce résultat diffère d'autres études qui ont montré que la présence du doublet d'arginine était essentielle pour la translocation via le système TAT (Dreush *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1999; Halbig *et al.*, 1999; Nivière *et al.*, 1992; Sambasivarao *et al.*, 2000). Nos résultats sont donc plus à rapprocher des travaux de Stanley *et al.* (2000) qui ont montré que le remplacement d'une des deux arginines du peptide signal de SufI de *E. coli* n'inhibait pas la sécrétion de la protéine mais la ralentissait seulement. Il est intéressant de noter que la XlnC et SufI sont dépourvues de cofacteurs. Stanley *et al.* (2000) ont également montré que la protéine YacK qui présente 37 % d'homologie avec SufI mais qui fixe un cofacteur nécessitait absolument la présence du doublet d'arginine. Les protéines ne fixant pas de cofacteur sembleraient donc mieux supporter les substitutions au niveau du doublet d'arginine que les protéines fixant un cofacteur. Par contre, la substitution du doublet d'arginine par un doublet de lysine permet de conserver une faible production de XlnC alors que la production de SufI est abolie. Au niveau de l'efficacité de translocation de la XlnC, le doublet RR est supérieur à la paire KR qui elle-même est supérieure au doublet

KK. Il est également possible que le système TAT de *S. lividans* soit plus permissif que celui retrouvé chez *E. coli*. Ceci serait effectivement possible dans la mesure où le système TAT de *S. lividans* reconnaît les peptides signaux de *E. coli* (Schaerlaeckens et al., 2001) alors que le système TAT de *E. coli* ne reconnaît ni le peptide signal de la GFOR de *Z.mobilis* (Blaudeck et al., 2001) ni celui de la protéine phoD de *B.subtilis* (Pop et al., 2002). La faible spécificité du système TAT de *S. lividans* en ferait donc un bon candidat pour la production de protéines hétérologues.

La maturation du précurseur dont la première arginine du site TAT a été mutée, conduit à la formation d'une protéine m' dont la taille est supérieure à celle de la XlnC mature. Cette protéine est retrouvée dans le surnageant de culture (voir fig.18) et peut être mise en évidence par « western blot » (voir fig.19). On ne retrouve pas de bande correspondante à la taille de la XlnC mature alors que l'on détecte de l'activité dans le surnageant de culture. Ainsi la protéine m' doit correspondre à une protéine enzymatiquement active. Comme cette bande correspond à une protéine de taille supérieure à la XlnC mature, nous supposons que le clivage du peptide signal ne s'est pas fait au site de coupure normalement utilisé. Si nous considérons cette hypothèse, il apparaît difficile d'expliquer pourquoi le précurseur R-27K n'est pas maturé au même site de clivage que le précurseur R-27K.R-26K (voir fig.19). Le séquençage N-terminal de la protéine active m' permettrait de clarifier cette situation. La région-h du peptide signal contient deux séquences du style A-X-A pouvant correspondre à un site de clivage alternatif. Ces deux séquences ALA et ATA sont respectivement situées 13 et 11 a.a. en amont du site de clivage usuel (voir fig.9a). Il est donc possible que l'un de ces deux sites soit utilisé pour le clivage du précurseur muté R-27K.

Le précurseur muté au niveau de la première arginine du site TAT demeure en quantité constante pendant 60 min, il est accompagné d'une protéine qui apparaît immédiatement au début du « chase » et qui elle aussi demeure constante (voir fig.18). La maturation du précurseur semble bloquée et ce dernier resterait prisonnier de la translocase mais à l'abri d'une dégradation protéolytique. Il est donc possible que tous les sites de translocation soient rapidement occupés par des précurseurs qui ne pourraient pas être maturés. En

conséquence, le surplus de précurseurs serait refoulé dans le cytoplasme où il serait dégradé instantanément. La protéolyse débiterait probablement du côté N-terminal du peptide signal de la XInC et conduirait à la formation d'un produit de dégradation d'environ 17 kDa. En effet, à ce jour, seul le précurseur de la GFOR de *Z. mobilis* a été cristallisé. L'étude de sa structure tridimensionnelle a permis de montrer que le peptide signal n'avait pas de conformation précise et semblait flotter par rapport à la partie repliée de la protéine mature (Nurizzo *et al.*, 2001). Si le peptide signal de la XInC est libre de toute structure organisée, il constituerait un excellent substrat pour des protéases. Le reste de la protéine serait résistant à la protéolyse du fait de son repliement. Le produit de dégradation de 17 kDa pourrait donc correspondre à la XInC mature dont les 30 premiers a.a. ont été délétés. Ce peptide ne présenterait probablement pas d'activité enzymatique.

Nous venons de montrer que le peptide signal de la XInC contient un doublet d'arginine dont le remplacement diminue la production de XInC. Cependant même lorsque le doublet d'arginine est absent, la XInC est toujours sécrétée par la voie TAT et non pas par le système GSP (voir fig.18b). Ceci laisse supposer que le doublet d'arginine n'est pas l'unique caractéristique des précurseurs de type TAT. Le reste du peptide signal comme la partie mature de la protéine pourraient contenir des éléments permettant à la translocase d'identifier le précurseur comme étant de type TAT.

2-3- La XInC ne peut pas être sécrétée par la voie GSP

Le remplacement du peptide signal de la XInC par celui de la XInA ne permet pas la production de XInC mature. L'expérience de « pulse-chase » réalisée sur le clone IAF906C ne nous a pas permis de mettre en évidence le précurseur contenant le peptide signal de la XInA suivi de la partie mature de la XInC (voir fig.21). Par contre, on relève la présence d'un peptide provenant probablement de la dégradation protéolytique instantanée du précurseur hybride dans le cytoplasme. Ce précurseur possède à la fois des caractéristiques de la voie GSP par son peptide signal et de la voie TAT par la structure de la partie mature de la XInC. La translocase GSP ne peut probablement pas prendre en

charge le précurseur hybride à cause de son état partiellement replié. Comme le peptide signal ne semble pas impliqué dans le repliement de la partie mature de la protéine (Rodrigue *et al.*, 1999) cela signifie que même en l'absence de son peptide signal, la XlnC peut se replier dans le cytoplasme. De son côté, la translocase TAT ne peut pas reconnaître le peptide signal de la XlnA qui ne contient pas la séquence signature TAT et possède une région-h trop hydrophobe. Ce précurseur serait donc condamné à « errer » dans le cytoplasme où il serait en fait rapidement dégradé en un peptide de 17 kDa (voir fig.21). Si l'on se reporte une nouvelle fois au modèle de la structure tridimensionnelle de la GFOR (Nurizzo *et al.*, 2001), la protéolyse aurait lieu du côté N-terminal du précurseur et éliminerait le peptide signal de la XlnA et les 30 premiers a.a. de la partie mature de la XlnC. Comme l'extrait cellulaire du clone IAF906C ne présente aucune activité sur RBB-xylyane (voir fig.22, puits 33), le fragment de dégradation x_3 observé sur la figure 21 n'est pas enzymatiquement actif. La délétion des 30 premiers a.a. de la XlnC serait donc suffisante pour supprimer l'activité de la XlnC. Il apparaît donc clairement que la XlnC ne peut pas être sécrétée par le système GSP et que la partie mature de la XlnC, comme le peptide signal, contient des éléments caractéristiques de la voie TAT.

Contrairement à nos résultats, certains auteurs ont montré que le remplacement du peptide signal d'un précurseur de type TAT par un peptide signal de type GSP permettait de rediriger une protéine dépendant du système TAT vers le système GSP. C'est le cas notamment de la protéine HiPIP de *C.vinosum* (Brüser *et al.*, 1998) et de la protéine GFOR de *Z.mobilis* (Wiegert *et al.*, 1997). La protéine HiPIP de *C.vinosum* est une protéine de 9 kDa possédant un diamètre de 20-25 Å (Carter *et al.*, 1974). Elle pourrait néanmoins transiter par la translocase GSP car sa petite taille serait compatible avec celle du pore centrale de la translocase GSP qui est de 20 Å (Hanein *et al.*, 1996). Dans le cas de la GFOR, la maturation a lieu mais la protéine mature périplasmique est rapidement dégradée. Le repliement périplasmique de la protéine n'est probablement pas le repliement normal de la GFOR, ce qui laisse supposer que le précurseur protéique pourrait avoir été déplié avant sa translocation par la translocase GSP. Arrivée dans le périplasma, la protéine serait alors dégradée par des chaperonnes contrôlant le bon repliement des protéines.

Par ailleurs, les peptides signaux de type GSP seraient capables de retarder le repliement de la partie mature des protéines afin de permettre notamment l'action de chaperonnes qui maintiennent les protéines dans un état déplié (*Park et al., 1998; Hardy et Randall, 1991*). Le peptide signal de la XlnA serait donc incapable d'empêcher le repliement rapide de la XlnC. Cette remarque confirme que le peptide signal, qu'il soit de type GSP ou TAT, n'influence d'aucune manière le repliement de la protéine.

3- La région-n a encore un rôle obscur

Les peptides signaux de type TAT possèdent une région-n relativement plus longue que celles des peptides signaux de type GSP. La délétion des 20 premiers a.a. du peptide signal de la XlnC empêche la production de l'enzyme (voir fig.23). On observe une faible maturation du précurseur accompagnée de l'apparition immédiate d'un produit de dégradation (voir fig.24). Comme ce dernier est retrouvé dans le cytoplasme, on peut écarter l'hypothèse d'un clivage du peptide signal en aval du site AHA. En effet, bien que les données soient inexistantes sur le sujet, on suppose que comme pour le système GSP, la signal peptidase des précurseurs de type TAT est retrouvée sur le côté extérieur de la membrane (*Pugsley, 1993*). Le produit de l'étape de clivage ne peut donc pas se retrouver à l'intérieur du cytoplasme. Le produit que l'on observe proviendrait de la dégradation du précurseur. La longueur de la région-n ne jouerait probablement pas de rôle dans les premières étapes de reconnaissance entre le précurseur et la translocase TAT. Comme le précurseur présente néanmoins la séquence signature TAT, il peut être reconnu et accepté par la translocase TAT. Par contre, le processus est bloqué par la suite, éventuellement au niveau de l'étape de clivage. La région-n du peptide signal déléetée de ses 20 premiers a.a. serait trop courte pour présenter correctement le site de clivage à la signal peptidase. La coupure du peptide signal n'aurait donc pas lieu. Comme dans le cas du précurseur muté *R-27K*, les sites de translocation TAT seraient rapidement saturés. Le surplus de précurseurs s'accumulerait dans le cytoplasme où il serait rapidement dégradé alors que les précurseurs bloqués dans les translocases seraient protégés des protéases cytoplasmiques. Nous pensons également que comme précédemment la dégradation se

déroule à partir de l'extrémité N-terminale du précurseur. Le peptide signal et les 30 premiers a.a. de la partie mature de la XlnC seraient dégradés. La suppression de cette région de la XlnC mature serait suffisante pour expliquer l'absence d'activité enzymatique du précurseur.

Nous avons montré que les précurseurs des clones IAF916C(R-27K) et IAF917C étaient probablement reconnu par la translocase TAT. Le processus serait par la suite bloqué et ces précurseurs resteraient prisonniers de la translocase. En effet, les précurseurs sont encore intacts même après 60 min de « chase ». Dans le système GSP, les précurseurs bloqués dans la translocase sont dégradés en moins de 5 min (*Morosoli et Dupont, 1999*). Le système TAT ne semble donc pas posséder de système d'élimination des précurseurs non conformes aussi efficace que celui retrouvé dans le système GSP.

Nous supposons que les fragments x_2 , x_3 et x_4 respectivement mis en évidence par le « pulse-chase » des clones IAF916C(R-27K), IAF906C et IAF917C sont identiques (voir fig.18, 21 et 24). La taille de ces trois peptides issus de la dégradation cytoplasmique des précurseurs a été estimée à 17 kDa. La concentration des gels de polyacrylamide ne nous permet pas d'attribuer une taille exacte pour chaque polypeptide. Dans les trois cas, nous pensons que la XlnC présente le même repliement dans lequel le peptide signal et environ une trentaine d'a.a. de la partie mature de la protéine ne seraient pas inclus dans la structure repliée. Si notre hypothèse sur l'accumulation des précurseurs non conformes dans le cytoplasme s'avère vraie, il est probable que les protéases les dégradent à partir de l'extrémité N-terminale. Comme nous avons montré que le fragment de 17 kDa ne présentait pas d'activité dans le cas des clones IAF906C et IAF917C (voir fig.22, puits 3 et 5), nous pensons qu'il en est de même pour le clone IAF916C(R-27K). Cependant seul le séquençage N-terminal des peptides x_2 , x_3 et x_4 nous permettrait de conclure sur l'éventuelle identité commune de ces trois produits de dégradation.

La région-n des précurseurs de type TAT pourrait être impliquée dans la bonne présentation du site de clivage AHA à la signal peptidase. Lorsque le peptide signal de la XlnC est délété de ses 20 premiers a.a., le site de clivage ne serait pas correctement

présenté à la signal peptidase, ce qui empêcherait la maturation du précurseur. Ainsi ce dernier serait resté bloqué dans la translocase. Une recherche dans le génome de *S.coelicolor* a montré que la région-n des précurseurs putatifs de type TAT comprenait entre 4 et 20 a.a. (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/). Ceci est consistant avec le fait que la région-n du peptide signal doit présenter une longueur minimale de 5 a.a. pour conserver une production de XlnC acceptable (voir fig.23).

Les peptides signaux des *Streptomyces* sont connus pour leur extrême longueur et l'abondance de charges positives de leur région-n (Gilbert *et al.*, 1995). De plus, la moyenne des charges nettes des peptides signaux de type TAT est supérieure à celle des peptides signaux de type GSP (Berks, 1996; von Heijne, 1985). Cependant à la différence des peptides signaux de type GSP, la présence de charges négatives est commune dans la région-n des peptides signaux de type TAT (Berks, 1996). La région-n des peptides signaux de type GSP des XlnA et XlnB possède respectivement une charge nette de +4 et +5 comparativement à +2 pour celle de la XlnC. La région-n du peptide signal de la XlnC contient deux résidus chargés négativement à savoir D-46 et D-41 ainsi que deux résidus chargés positivement à savoir R-40 et K-38. Nous avons vu que les charges n'étaient pas indispensables à la sécrétion de la xylanase C puisque la délétion des 15 premiers a.a. incluant les quatre a.a. chargés ne perturbe que légèrement la sécrétion de la XlnC. Nous avons voulu néanmoins connaître l'influence des charges sur l'efficacité de translocation d'un précurseur de type TAT. Tous les changements apportés au niveau de la charge nette de la région-n du peptide signal de la XlnC ont permis d'augmenter la production de l'enzyme (voir fig.25 et 27). A notre connaissance, les modifications apportées au niveau de la séquence nucléotidique n'ont pas introduit d'éléments qui pourraient augmenter la traduction de l'ARNm. Les augmentations de production seraient donc uniquement à relier à l'étape de translocation.

La suppression des deux acides aspartiques fait passer la charge nette du peptide signal de +2 à +4, ce qui permet de tripler la production de XlnC et d'atteindre une activité record proche de 100 UI.ml⁻¹ (voir fig.27). Lorsque le peptide signal de type GSP de l' α -amylase de *S. lividans* est fusionné au TNF (Tumour Necrosis Factor) de souris, la modification de

la charge nette de la région-n du peptide signal de +2 à +4 diminue la production de TNF (*Fass et Engels, 1996*). Lorsque la charge nette du peptide signal de la XlnC est portée à +3 en remplaçant un seul des deux acides aspartiques, la production est multipliée par 2.5. On observe également une augmentation de la production de TNF lorsque la charge nette du peptide signal de l' α -amylase est portée à +3 (*Fass et Engels, 1996*). La suppression d'une charge positive, comme dans le cas des mutations *R-40I* et *K-38I*, réduit la charge nette à +1 et permet d'augmenter la production de XlnC. La suppression des deux charges positives comme dans le cas de la double mutation *R-40I.R-38I* permet d'annuler la charge nette de la région-n tout en augmentant la production de XlnC. Par contre, la réduction de la charge nette à +1 ou 0 diminue la sécrétion des protéines dépendant du système GSP (*Fass et Engels, 1996; Laemmertyn et al., 1998*). Il apparaît donc que l'influence des charges de la région-n des peptides signaux de type TAT sur la sécrétion est beaucoup moins prononcée que dans le cas des peptides signaux de type GSP.

4- Le site de clivage de la signal peptidase est peu spécifique

Le site de clivage des précurseurs de type GSP contient aux positions -3 et -1 par rapport au site de clivage des a.a. à courtes chaînes et non chargés comme l'alanine (*von Heijne, 1987*). Il est souvent constitué par la séquence A-X-A. Les premières études réalisées sur les précurseurs de type TAT se sont peu intéressées au site de clivage du peptide signal. Le séquençage N-terminal des protéines matures dépendantes du système TAT pour leur sécrétion ont permis de montrer que le site de clivage des précurseurs de type TAT était semblable à ceux de type GSP (*Nivière et al., 1992; Berks, 1996; Brüser et al., 1998; Sambasivarao et al., 2000; Stanley et al., 2000*).

Le site de clivage du précurseur de la XlnC correspond à la séquence AHA. *Pagé et al. (1996)* ont montré que le remplacement du site de coupure AHA du peptide signal de la XlnA par la séquence VNS abolissait la production de XlnA2. Une expérience de « pulse-chase » a permis de montrer que le précurseur n'était pas mûré mais rapidement dégradé (*Morosoli et Dupont, 1999*). Lorsque le site de clivage de la XlnC est remplacé par le site

AHE ou RLE, la production de XlnC diminue. Le profil de maturation des précurseurs possédant le site de clivage muté en RLE est normal et ne présente pas de bande de dégradation (voir fig.29). De la même manière, le remplacement du site de clivage AHA de la DmsA de *E. coli* par le site NHA ou NHN n'empêche pas la production de l'enzyme active (*Sambasivarao et al., 2000*). Le site de coupure des précurseurs de type TAT semble beaucoup moins spécifique que celui des précurseurs de type GSP. Il est possible que la signal peptidase coupe à proximité du site de clivage AHA. En effet, la résolution des gels de polyacrylamide ne nous permet pas de faire la différence entre deux sites de clivage relativement rapprochés. Nous n'avons cependant trouvé aucun site de clivage potentiel dans l'environnement immédiat du site initial. Il se peut que la signal peptidase ne soit pas de type I comme la leader peptidase I qui clive les peptides signaux de type GSP (*Pugsley, 1993*), mais une autre signal peptidase encore inconnue et peu spécifique. Cette faible spécificité pourrait permettre d'expliquer la présence de bande dédoublée de XlnC mature lors des expériences de « pulse-chase » (voir fig.15b, 16c, 26 et 23). Le peptide m' mis en évidence avec le clone IAF916C(R-27K) serait également à mettre en relation avec cette faible spécificité (voir fig.18 et 19).

Ces premiers résultats ne constituent qu'un début. Il serait intéressant pour la suite des recherches d'identifier la signal peptidase impliquée dans le clivage des précurseurs de type TAT. On a identifié chez *S. lividans* quatre signal peptidases de type I : SipW, SipX, SipY et SipZ (*Parro et al., 1999*) Des souches de *S. lividans* dépourvues chacune d'une seule de ces signal peptidases constitueraient des outils précieux car elles nous permettraient d'identifier la signal peptidase impliquée dans le clivage des peptides signaux de type TAT.

5- La xylanase B2 peut être sécrétée par le système TAT

Nous avons montré que le peptide signal de la XlnC était capable de diriger une protéine dépendante du système GSP comme la XlnB2 vers le système TAT. Le peptide signal de la XlnC est donc capable de diriger la sécrétion d'autres protéines chez *S. lividans*. Chez

E. coli, le peptide signal de type TAT de la TorA est également capable de diriger le domaine périplasmique P2 de la leader peptidase membranaire qui normalement dépend du système GSP pour son intégration (*Christobal et al., 1999*).

De plus, les modifications apportées au sein du peptide signal de la XlnC ont eu la même influence sur la production de XlnB2 que sur celle de la XlnC (voir fig.31). Cette similarité de comportement peut probablement être reliée à la très forte homologie qui existe entre les deux xylanases. On peut également supposer que le peptide signal de la XlnB2, comme d'autres peptides signaux de type GSP, possède la capacité de retarder le repliement de la partie mature de l'enzyme (*Park et al., 1998; Hardy et Randall, 1991*). Le peptide signal de la XlnB2 pourrait donc retarder le repliement de la XlnB2 et permettrait aux premières composantes de la voie GSP d'interagir avec la partie mature de la XlnB2. En remplaçant, le peptide signal de la XlnB2 par celui de la XlnC, le repliement de la XlnB2 ne serait plus retardé et serait trop rapide pour permettre aux premières composantes de la voie GSP d'interagir avec la partie mature de la XlnB2.

Cependant lorsque le peptide signal de la XlnC est délété de ses 20 premiers a.a., la production de XlnB2 est relativement faible mais n'est pas nulle comme c'est le cas pour la production de XlnC (voir fig.23 et 32). Ces résultats avaient montré l'incapacité de ce peptide signal délété à diriger la sécrétion de la XlnC via la voie TAT. Des expériences de « pulse-chase » ont montré que le précurseur de XlnB2 était mûré de manière correcte mais très lentement (voir fig.33a). De plus, la maturation semble être sensible à l'azoture de sodium (voir fig.33b). Le peptide signal de la XlnC délété de ses 20 premiers a.a. se comporterait donc avec la XlnB2 comme un peptide signal de type GSP. Sa relative hydrophobicité expliquerait sa faible efficacité de translocation.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours du projet de recherche ont permis d'apporter les premiers éléments sur l'étude de la sécrétion des protéines via le système TAT chez *S. lividans*.

Comme le supposait la présence de la séquence **S-R-R-G-F-L-G** dans son peptide signal, la XlnC est une protéine dépendant exclusivement du système TAT pour sa sécrétion. Contrairement à d'autres précurseurs de type TAT, le remplacement du doublet d'arginine n'abolit pas la sécrétion de la XlnC mais s'accompagne d'une forte dégradation du précurseur. Ceci laisse supposer que le système TAT de *S. lividans* est plus permissif vis-à-vis de la séquence consensus que celui des autres bactéries. Des recherches complémentaires sur l'importance des autres a.a. de la séquence signature TAT apparaissent nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de cette séquence conservée.

Nos recherches sur le rôle de la région-n du peptide signal ne nous ont pas permis de comprendre pourquoi cette région était plus longue chez les peptides signaux de type TAT que chez ceux de type GSP. Nous avons néanmoins montré que la suppression d'au moins 15 a.a. du peptide signal de la XlnC permettait encore de maintenir une production d'enzyme acceptable. Il serait donc possible de remplacer les 45 premiers nucléotides correspondant aux 15 premiers a.a. du peptide signal par une séquence nucléotidique augmentant la traduction de l'ARNm. On pense notamment à l'introduction de la séquence TCCCA, complémentaire de l'ARN16S, retrouvée dans le peptide signal de la cellulase A de *S. lividans* (Kébir et al., 2000). Cette modification, non reliée à l'étape de la sécrétion, pourrait néanmoins permettre d'augmenter considérablement la production de la XlnC. Nous avons également montré que l'annulation des charges de cette région-n augmentait toujours la production d'enzyme. Des travaux complémentaires sont cependant nécessaires pour comprendre le rôle de ces charges.

Nous nous sommes également intéressés au site de clivage de la signal peptidase. Les prémices de cette étude ont permis de montrer que la signal peptidase impliquée dans le système TAT était peu spécifique. Les travaux futurs sur ce sujet devront s'intéresser à l'identité de la (des) signal peptidase(s) impliquée(s) dans le processus de clivage. La transformation de souches de *S. lividans* mutées au niveau des gènes *sip* codant pour les

quatre signal peptidases de type I (Parro et al., 1999; Geukens et al., 2001a et b) permettrait éventuellement d'identifier la protéine impliquée.

Les *Streptomyces* sont réputés pour leurs capacités à sécréter de grandes quantités de protéines homologues ou hétérologues dans le milieu extracellulaire (Gilbert et al., 1995). Malgré les nombreux progrès dans le domaine de la sécrétion des protéines tant au niveau des vecteurs que des souches productrices, certaines protéines n'ont jamais pu être produites. On peut supposer que certaines de ces protéines réticentes dépendent du système TAT d'où leur absence de sécrétion par le système classique GSP. Personne n'a encore montré que le système TAT de *S. lividans* pouvait sécréter des protéines hétérologues. Cependant à la différence du système GSP où les peptides signaux sont interchangeables, il semblerait que ce ne soit pas toujours le cas pour le système TAT (Blaudeck et al., 2001; Pop et al., 2002). Si l'on souhaite envisager la production de protéines hétérologues chez *S. lividans*, il est donc nécessaire de disposer d'un peptide signal issu de *S. lividans* et optimisé au niveau de sa composition en a.a. . Le peptide signal de la XInC serait un bon candidat puisque nous avons déjà montré que le remplacement des deux acides aspartiques permettait de tripler la production de la XInC.

APPENDICES

Appendice A

Séquence nucléotidique du gène de la XlnC et sa traduction en a.a.

Molecule: Séquence de la XlnC, 738 bps DNA
 Description: Peptide signal de la XlnC - XlnC mature
 File Name: Séquence Mémoire.cm5, dated 31 Jan 2003
 Printed: 1-738 bps (Full), format Translated, Frame 1

```

1  atgcagcagg acggcacaca gcaggaccgg atcaagcaga gtcccccccc tctcaacgga
   M Q Q D G T Q Q D R I K Q S P A P L N G

61  atgagccgac gaggcttctt cggtggcgcc ggcaccctcg cgctcgctac cgcgtccggg
   M S R R G F L G G A G T L A L A T A S G

121  ctgctgctgc ccggcacagc ccacgccgcc gagagcacgc tcggtaccat caccaccaac
   L L L P G T A H A A E S T L G T I T T N

181  cagaccggca ccgacggcat gtactactcg ttctggaccg acggcggcgg ctccgtctcc
   Q T G T D G M Y Y S F W T D G G G S V S

241  atgacgctca acggtggcgg cagctatagc acccagtgga ccaactgcgg caacttcgtc
   M T L N G G G S Y S T Q W T N C G N F V

301  gccggcaagg gctggagcac cggcggacgc cggacgggtcc gctacaacgg ctacttcaac
   A G K G W S T G G R R T V R Y N G Y F N

361  ccgtcgggca acggctacgg ctgcctctac ggctggacct cgaacccgct ggtggagtac
   P S G N G Y G C L Y G W T S N P L V E Y

421  tacatcgtcg acaactgggg cagttaccgg cccaccggta cgtacaaggg caccgtctcc
   Y I V D N W G S Y R P T G T Y K G T V S

481  agcgacggag gcacctacga catctaccag acgacccggt acaacgcccc ctccgtggaa
   S D G G T Y D I Y Q T T R Y N A P S V E

541  ggcaccaaga ccttccagca gtactggagt gtccggcagt cgaaggtgac cagtggctcc
   G T K T F Q Q Y W S V R Q S K V T S G S

601  ggcaccatca ccaccggcaa ccacttcgac gcctggggcgc gcgcgggcat gaccatgggc
   G T I T T G N H F D A W A R A G M T M G

661  cagttcaggt actacatgat catggccacc gagggctatc agagcagtgg aagctcgaac
   Q F R Y Y M I M A T E G Y Q S S G S S N

721  atcacggtca gcggttga
   I T V S G -

```

Appendice B

Symboles des a.a.

□ **Acides aminés hydrophobes**

A - Ala - Alanine
F - Phe - Phénylalanine
I - Ile - Isoleucine
L - Leu - Leucine
P - Pro - Proline
M - Met - Méthionine
V - Val - Valine
W - Trp - Tryptophane

□ **Acides aminés polaires mais non chargés**

C - Cys - Cystéine
G - Gly - Glycine
N - Asn - Asparagine
Q - Gln - Glutamine
S - Ser - Serine
T - Thr - Thréonine
Y - Tyr - Tyrosine

□ **Acides aminés chargés négativement**

D - Asp - Acide aspartique
E - Glu - Acide glutamique

□ **Acides aminés chargés positivement**

H - His - Histidine
K - Lys - Lysine
R - Arg - Arginine

Appendice C

Code génétique et fréquence de l'emploi des codons chez *Streptomyces*
(d'après *Kieser et al., 2000*)

a.a.	codon	%	a.a.	codon	%	a.a.	codon	%	a.a.	codon	%
------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---

F	TTT	1.6	S	TCT	1.1	Y	TAT	5.0	C	TGT	12.0
F	TTC	98.4	S	TCC	39.1	Y	TAC	95.0	C	TGC	88.0
L	TTA	0.4	S	TCA	2.4	Stop	TAA	4.0	Stop	TGA	81.0
L	TTG	2.6	S	TCG	27.4	Stop	TAG	15.0	W	TGG	100.0

L	CTT	2.0	P	CCT	2.7	H	CAT	6.5	R	CGT	7.3
L	CTC	38.5	P	CCC	42.4	H	CAC	93.5	R	CGC	45.0
L	CTA	0.3	P	CCA	1.6	Q	CAA	6.1	R	CGA	3.7
L	CTG	56.1	P	CCG	53.3	Q	CAG	93.9	R	CGG	37.7

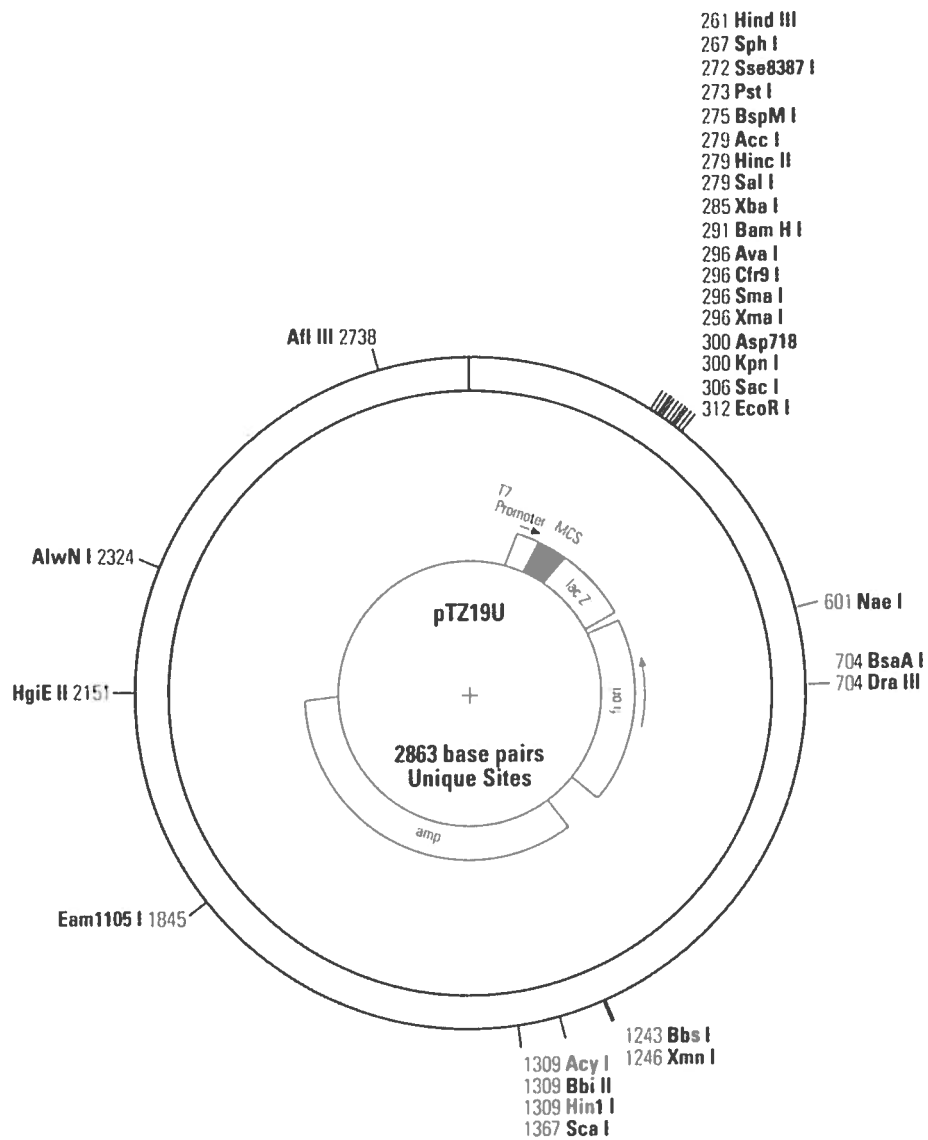
I	ATT	4.4	T	ACT	2.2	N	AAT	4.6	S	AGT	2.9
I	ATC	92.0	T	ACC	65.2	N	AAC	95.4	S	AGC	27.1
I	ATA	3.6	T	ACA	2.4	K	AAA	5.8	R	AGA	1.1
M	ATG	100	T	ACG	30.2	K	AAG	94.2	R	AGG	5.2

V	GTT	2.8	A	GCT	2.3	D	GAT	4.7	G	GGT	8.7
V	GTC	56.0	A	GCC	58.7	D	GAC	95.3	G	GGC	64.2
V	GTA	2.5	A	GCA	4.3	E	GAA	17.7	G	GGA	8.9
V	GTG	38.8	A	GCC	34.7	E	GAG	82.3	G	GGG	18.2

Appendice D

Carte du phagemide pTZ19U (*Yanisch-Perron et al., 1985*)

T7 Promotor, promoteur de l'ARN Polymérase T7; MCS, site de clonage multiple; *lacZ'*, fragment *lacZ'* du gène de la β -galactosidase; f1 ori, origine de réplication simple brin; *amp*, gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline.



Appendice E

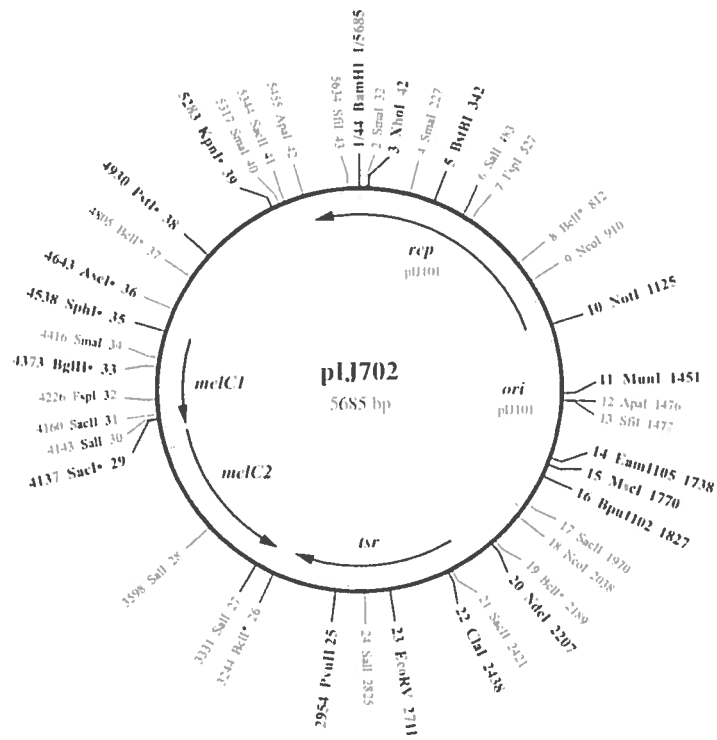
Caractéristiques des plasmides utilisés chez *E.coli* et construits à partir du pTZ19U

Plasmide	Caractéristiques essentielles	Référence
pIAF807	Vecteur dérivé du pTZ19U contenant le gène de structure de la XlnA dépourvu de son promoteur et dans lequel la séquence du peptide signal de la XlnA est entourée des sites de restriction <i>HindIII</i> et <i>KpnI</i>	<i>Pagé et al., 1995</i>
pIAF816	Vecteur dérivé du pIAF807 dans lequel la séquence du peptide signal de la XlnA a été remplacé par celui de la XlnC	<i>Pagé et al., 1996</i>
pIAF816C	Vecteur dérivé du pIAF816 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été remplacé par celui de la XlnC	<i>travaux antérieurs</i>
pIAF817	Vecteur dérivé du pIAF807 dans lequel la séquence du peptide signal de la XlnA a été remplacée par celle du peptide signal de la XlnC déletée de tous ses acides aminés jusqu'à la méthionine interne précédant le site TAT	<i>Pagé et al., 1995</i>
pIAF817C	Vecteur dérivé du pIAF817 dans lequel le gène de structure de la XlnA a été remplacé par celui de la XlnC	<i>travaux antérieurs</i>
pIAF816B2	Vecteur dérivé du pIAF816C dans lequel le gène de la XlnC a été remplacé par celui de la XlnB2	<i>ce travail</i>

Appendice F

Carte du plasmide pIJ702 (*Kendall et Cohen, 1988*)

ori, origine de réplication double-brin du plasmide (cercle roulant sens négatif); *rep*, protéine de réplication; *melC1*, protéine impliquée dans le transfert du cuivre à l'apotyrosinase; *melC2*, tyrosinase; *tsr*, gène conférant la résistance au thiostrepton.



Appendice G

Caractéristiques des plasmides utilisés chez *S.lividans* et construits à partir du pIJ702

Plasmide	Caractéristiques essentielles	Référence
pIJ702	Vecteur contenant les marqueurs <i>mel</i> et <i>tsr</i>	<i>Kendall et Cohen, 1988</i>
pIAF20	Vecteur dérivé du pIJ702 contenant le gène complet <i>xlnC</i> et son promoteur	<i>Kluepfel et al., 1992</i>
pIAF906	Vecteur dérivé du pIJ702 contenant entre ses sites <i>SphI</i> et <i>SacI</i> , la séquence codante de 2 kb correspondant à <i>xlnA</i> . Des sites de restriction <i>HinDIII</i> et <i>SacI</i> ont également été introduit de chaque côté de la séquence du peptide signal	<i>Pagé et al., 1996</i>
pIAF906C	Vecteur dérivé du pIAF906 dans lequel le gène de structure de la <i>XlnA</i> a été remplacé par celui de la <i>XlnC</i>	<i>travaux antérieurs</i>
pIAF916	Vecteur dérivé du pIAF906 contenant la séquence du peptide signal de la <i>XlnC</i>	<i>Pagé et al., 1996</i>
pIAF916C	Vecteur dérivé du pIAF916 dans lequel le gène de structure de la <i>XlnA</i> a été remplacé par celui de la <i>XlnC</i>	<i>travaux antérieurs</i>
pIAF917	Vecteur dérivé du pIAF906 dans lequel la séquence du peptide signal a été déletée des nucléotides correspondant aux 20 premiers a.a. de la région-n du peptide signal, soit juste avant le site TAT	<i>Pagé et al., 1995</i>
pIAF917C	Vecteur dérivé du pIAF917 dans lequel le gène de structure de la <i>XlnA</i> a été remplacé par celui de la <i>XlnC</i>	
pIAF916B2	Vecteur dérivé du pIAF916C dans lequel le gène de structure de la <i>XlnA</i> a été remplacé par celui de la <i>XlnB2</i>	ce travail

Appendice H

Compositions des milieux de culture solides et liquides utilisés

□ **Milieu 2xTY**

- Bactotryptone : 16 g
- Extrait de levure : 10 g
- NaCl : 5 g
- Eau qsp 1 L
- Agar : 15 g
- Ampicilline (solution stock 25 mg/ml) : 4 ml

□ **Milieu LB**

- NaCl : 10 g
- Bactotryptone : 10 g
- Extrait de levure : 5 g
- Eau qsp 1 L
- Agar : 15 g
- Ampicilline (solution stock 25 mg/ml) : 4 ml

□ **TB (Terrific Broth)**

- Bactotryptone : 12 g
- Extrait de levure : 24 g
- Glycérol : 4 ml
- Eau qsp 1 L
- Ampicilline (solution stock 25 mg/ml) : 4 ml

□ **TSB**

- Tryptic Soy Broth w/o dextrose : 27.5 g
- Eau qsp 1 L

□ **Milieu M14 + xylose 1 %**

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1.4 g
- K_2HPO_4 : 5.0 g
- KH_2PO_4 : 1.0 g
- Sels de Mandel : 1 ml
- Tween 80 : 2 ml
- Ajuster le pH à 7.4
- Eau qsp 1L
- CaCl_2 (solution stock 3 %) : 200 μl
- MgSO_4 (solution stock 5%) : 120 μl
- Thiostrepton (solution stock 5 mg.ml^{-1}) : 20 μl
- Xylose (solution stock 20 %) : 1 ml
- Mélange Protéose peptone (solution stock 0.1 g.ml^{-1})
et extrait de levure (0.05 g.ml^{-1}) : 200 μl *

* seulement pour les cultures destinées aux expériences de « pulse-chase »

Sels de Mandel (pour 100 ml) :

- ZnSO₄.7H₂O : 0.14 g
- MnSO₄.H₂O : 0.16 g
- FeSO₄.7H₂O : 0.5 g
- CoCl₂.6H₂O : 0.2 g

□ **Milieu RBB Xylan et RBB Xylan contenant 15 % de glucose**

Solution 1

- RBB xylane : 1.0 g
- Eau : 125 ml
- Brasser et bouillir 30 minutes

Solution 2

- Sels Mandel : 0.5 ml
- (NH₄)₂SO₄g : 1.0 g
- KH₂PO₄ : 0.75 g
- K₂HPO₄ : 2.5 g
- Extrait de levure : 0.25 g
- KCl : 0.25 g
- Eau : 375 ml
- Ajuster le pH à 7.2
- Agar : 8.5 g
- Stériliser 20 minutes
- Refroidir à 55°C
- Mélanger les solutions 1 et 2
- MgSO₄.7H₂O : 5 ml
- Thiostrepton (50 mg.ml⁻¹) : 0.5 ml

□ **SFM**

- Farine de soja : 20 g
- Mannitol : 20 g
- Agar : 20 g
- Eau qsp 1 L

□ **R5 (recette pour 2 L)**

Préparer séparément :

- 10 ml de KH_2PO_4 0.5 % (autoclaver)
- 4 ml de CaCl_2 5M (autoclaver)
- 1 ml de CuSO_4 5 mg.ml⁻¹ (autoclaver)
- 15 ml L-proline 20 % (filtrer)
- 10 ml L-méthionine (filtrer)
- L-tyrosine 0.4 g repris dans 5 ml NaOH 1N (filtrer)

et :

- Sucrose : 103 g
 - K_2HPO_4 : 0.25 g
 - MgCl_2 : 10.12 g
 - Glucose : 10 g
 - Casamino acides : 0.1 g
 - Eléments traces : 2 ml
 - Extrait de levure : 5 g
 - Tampon TES : 5.73 g
 - Ajouter 955 ml d'eau
 - Agar : 11 g
- Autoclaver

Laisser refroidir puis ajouter les 6 solutions préparées individuellement.
Faire sécher les boîtes pendant 5 jours (perte de 15 % de leur poids)

Appendice I

Compositions des tampons d'électrophorèse

- **Tampon de charge 4X pour "échantillon ADN"**
 - bleu de bromophénoles : 25 mg
 - xylène cyanol : 25 mg
 - glycérol : 3 ml
 - eau : 3 ml

- **Tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 50 X pour électrophorèse en gel d'agarose**
 - Tris base : 242 g
 - Acide acétique glacial : 57.1 ml
 - EDTA 0.5M (pH 8.0) : 100 ml
 - Eau qsp 1 L
 - Diluer 1/50 avant utilisation

- **Tampon de charge Laemmli 3X pour "échantillon protéine"**
 - Eau distillée : 0.6 ml
 - Tris-HCl 1.5M, pH 6.8 : 1.0 ml
 - Glycérol : 4.8 ml
 - SDS : 0.48 g
 - β -mercaptoéthanol : 1.2 ml
 - bleu de bromophénoles 0.5 % : 0.4 ml

- **Tampon d'électrophorèse TRIS-glycine 5X pour PAGE-SDS**
 - Tris base : 15.1 g
 - Glycine : 72.0 g
 - Ajouter 900 ml d'eau
 - SDS 10 % : 50 ml
 - Ajuster le pH à 8.3
 - Eau qsp 1 L
 - Diluer 1/5 avant utilisation

Appendice J

Composition des tampons pour les expériences de « pulse-chase »

□ **Tampon SP**

- Tris-HCl 1M, pH 6.8 : 0.5 ml
- EDTA 100 mM : 0.2 ml
- β -mercaptoéthanol 1% : 0.1 ml
- Eau qsp 10 ml

□ **Tampon IPD**

- Tris-HCl 1 M, pH 7.4 : 6 ml
- Triton X-100, 5 % : 12 ml
- EDTA 100 mM : 2.4 ml
- NaCl 1M : 18 ml
- Gélatine 2.5% dans 0.02 % azoture de sodium : 12 ml
- Eau qsp 120 ml

□ **Tampon IPW**

- Tris HCl 1M, pH 7.4 : 1.5 ml
- NaCl 1M : 22.5 ml
- Triton X-100 5 % : 15 ml
- Na-desoxycholate 5 % : 15 ml
- Eau qsp 150 ml

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S. and Mizushima, S. (1990). « SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli* ». J. Biol. Chem., **265**:8164–8169.

Akiyama, Y., and Ito, K. (1987). « SecY, a multispanning integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. », EMBO J., **6**: 3465-3470.

Akiyama, Y., Inada, T., Nakamura, Y. and Ito, K. (1990). « SecY, a multispanning integral membrane protein, contains a potential leader peptidase site ». J. Bacteriol., **172**: 2888-2893.

Altman, E., Emr, S. D. and Kumamoto, C. A. (1990). « The presence of both the signal sequence and a region of mature LamB protein are required for the interaction of LamB with the export factor SecB ». J. Biol. Chem. **265**: 18154–18160.

Angelini, S., Moreno, R., Gouffi, K., Santini, C.L., Yamagishi, A., Berenguer, J., Wu, L-F. (2001). « Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli* », FEBS Lett., **506** : 103-107

Arhin, F.F., Shareck, F., Kluepfel, D., Morosoli, R. (1994). « Effects of disruption of xylanase-encoding gene on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*. », J. Bacteriol., **176**: 4924-4930.

Beck, K., Wu, L.-F., Brunner, J. and Müller, M. (2000). « Discrimination between SRP and SecA/SecB dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor ». EMBO J., **19**: 134-143.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, 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., Rabinowitsch, 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., Hopwood, D.A. (2002) « Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). », Nature, **417**: 141-147.

Berg, B.L., Li, J., Heider, J. and Stewart, V. (1991). « Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the fdnGHI operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. », J. Biol. Chem., **35**: 22380-22385.

Berks, B.C. (1996). « A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors ? » Mol. Microbiol., **22**: 393-404.

Berks, B.C., Sargent, F., Palmer, T. (2000). « The TAT protein export pathway », Mol. Microbiol., **35**: 260-274.

Bieker, K.L., Phillips, G.J. and Silhavy, T.J. (1990a). « The *sec* and *prl* genes of *Escherichia coli* ». J. Bioenerg. Biomembr., **22**:291–310.

Bieker, K.L. and Silhavy, T.J. (1990b). « PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in *E. coli* ». Cell, **61**:833-842.

Bieker-Brady, K., Silhavy, T.J. (1992). « Suppressors analysis suggests a multistep, cyclic mechanism for protein secretion in *Escherichia coli* ». EMBO J., **11**: 3165-3174.

Biely, P., Mislovicova, D. and Toman, R. (1985). « Soluble chromogenic substrates for assay of endo-1-4- β -endoxylanases and endo-1-4- β -glucanases.», Anal. Chem., **44**: 142-146.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). « A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA ». Nucleic Acids Res., **7**: 1513-1523.

Blaudeck, N., Sprenger, G.A., Frendl, R., Wiegert, T. (2001). « Specificity of signal peptide recognition in TAT-dependent bacterial protein translocation », J.Bacteriol., **183**: 604-610.

Bogsch, E., Brink, S., and Robinson, C. (1997). « Pathway specificity for a Δ 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**: 3851-3859.

Bogsch, E., 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**:18003-18006.

Bolhuis, A., Matzen, A., Hyyryläinen, H.L., Kontingen, V.S., Meina, R., Chapuis, J., Venema, G., Bron, S., Frendl, R., van Dijk, J.A. (1999). « Signal peptide peptidase and ClpP like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins », J. Biol. Chem., **274** : 24585-24592.

Bolhuis, A., Bogsch, E.G., Robinson, C. (2000). « Subunit interaction in the twin-arginine translocase complex of *Escherichia coli* », FEBS Lett., **472** : 88-92.

Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. L., and Robinson, C. (2001). « TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli* ». J. Biol. Chem., **276** : 20213–20219.

Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. M. and Wickner, W. (1990). « The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation ». Cell, **62**:649–657.

Brüser, T., Deutsmann, R., and Dahl, C. (1998). « Evidence against the double arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli* ». FEMS Microbiol. Lett., **164**: 329-336.

Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B.C., Palmer T. (2001). « A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif », Arch. Microbiol., **177**: 107-112.

Burton, K. (1956). « A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. », Biochem. J., **62**: 315-323.

Carter, Jr, C.W., Kraut, J., Freer, S.T., Xuong, N.-H., Alden, R.A. and Bartsch, R.G. (1974). « Two-angstrom crystal structure of oxidized Chromatium high potential iron protein.», J. Biol. Chem., **35**: 4214.

Chaddock, A.M., Mant, A., Karanauchov, I., Brink, S., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. and Robinson, C. (1995). « A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Δ pH-dependent thylakoid protein translocase.», EMBO J., **35**: 2715-2722.

Chanal, A., Santini, C.-L., and Wu, L.-F. (1998). « Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli* ». Mol. Microbiol., **30**: 674-676.

Chen, L.-Y., Leu, W.-M., Wang, K.-T., Lee, Y.-H., and W. (1992). « Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1 ». J. Biol. Chem., **267**: 20100-20107.

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

Clark, S.A., and Theg, S.M. (1997). « A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes ». Mol. Biol. Cell., **8**: 923-934.

Collier, D. N., Bankaitis, V. A., Weiss, J. B. and Bassford Jr., P. J. (1988). « The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein ». Cell, **53**: 273–283.

Coyle, C.L., Zumft, W.G., Kroneck, P.M.H., Körner, H. and Jakob, W. (1985). « Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*, purification and properties of a novel multicopper enzyme.», Eur. J. Biochem., **35**: 459-467.

Cristòbal, 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**: 2982-2990.

- Dalbey, R. and von Heijne, G.** (1992). « Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes : a new protease family », Trends Biochem. Sci., **17**: 474-478.
- Dalbey, R.E., and Robinson, C.** (1999). « Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane ». Trends Biochem. Sci., **24**: 17-22.
- 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±64.
- Dolan, K.M. and Oliver, D.B.** (1991). « Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation ». J. Biol. Chem., **266**: 23329-23333.
- Dreusch, A., Bürgisser, D.M., Heizmann, C.W., and Zumft, W.G.** (1997). « Lack of copper insertion into unprocessed cytoplasmic nitrous oxide reductase generated by an R20D substitution in the arginine consensus motif of the signal peptide ». Biochim. Biophys. Acta., **1319**: 311-318.
- Driessen, A.J.M.** (1992). « Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the proton motive force ». EMBO J., **11**: 847-853.
- Driessen, A. J. M., Fekkes, P. and van der Wolk, J. P. W.** (1998). « The Sec system ». Curr. Opin. Microbiol., **1**: 216–222.
- Duong, F., and Wickner, W.** (1997). « Distinct catalytic role of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme ». EMBO J., **16**: 2756–2768
- Eckhardt, T., Strickler, J., Gorniak, L., Burnett, W.V., and Fare, L.R.** (1987). « Characterization of the promoter, signal sequence and amino terminus of secreted β -galactosidase from *Streptomyces lividans* ». J. Bacteriol., **169**: 4249-4256.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J. D., Oliver, B. and W. Wickner** (1995). « SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF ». Cell, **83**:1171-1181.
- Fass, S.H. and Engels, J.W.** (1996). « Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the α -amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. », J. Biol. Chem., **271**: 15244-15252.
- Fekkes, P., de Wit, J. G., van der Wolk, J. P. W., Kimsey, H. H., Kumamoto, C. A. and Driessen, A. J. M.** (1998). « Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the cooperative binding of SecB and the signal sequence to SecA ». Mol. Microbiol., **29**:1179–1190.

- Fekkes, P., and Driessen, A.J.M.** (1999). « Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane ». Microbiol. Mol. Biol. Rev., **63**: 161-173.
- Fikes, J. D., and Bassford Jr., P. J.** (1989). « Novel *secA* alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide ». J. Bacteriol., **171**: 402–409.
- Flower, A. M., Doebele, R. C. and Silhavy, T. J.** (1994). « *PrlA* and *PrlG* suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition ». J. Bacteriol., **176**: 5607–5614.
- Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. and Beckwitt J.** (1990). « The *secD* locus of *Escherichia coli* codes for two membrane proteins required for protein export ». EMBO J., **9**: 3209-3216.
- Geller, B.L., Rao Novva, N., Wickner, W.** (1986). « Both ATP and the electrochemical potential are required for optimal assembly of pro-OmpA in *Escherichia coli* inner membrane vesicles ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 4219-4222.
- Gennity, J., J. Goldstein, and M. Inouye.** (1990). « Signal peptide mutants of *Escherichia coli* ». J. Bioenerg. Biomembr., **22**:233–269.
- Geukens, N., Parro, V., Rivas, L.A., Mellado, R.P., Anné, J.** (2001a). « Functional analysis of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases. », Arch. Microbiol., **176**: 377-380.
- Geukens, N., Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Schacht, S., Schaerlaekens, K., Parro, V., Bron, S., Engelborghs, Y., Mellado, R.P., Anne, J.** (2001b). « Membrane topology of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases », J. Bacteriol., **183**:4752-60.
- de Gier, J.W.L., Mansournia, P., Valent, Q.A., Phillips, G.J., Luirink, J., and von Heijne, G.** (1996). « Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle ». FEBS Lett., **399**: 307-309.
- de Gier, J.W.L., Scotti P.A., Sääf, A., Valent, Q.A., Kuhn A., Luirink, J. and von Heijne, G.** (1998). « Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli* ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 14646-14651.
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D.** (1995). « Production and secretion of proteins by *Streptomyces*. », Crit. Rev. Biotech., **15**: 13-39.
- Gill, D.R. and Salmond, G.P.** (1990). « The identification of the *Escherichia coli ftsY* gene product : an unusual protein ». Mol. Microbiol., **4**: 575-583.

Godden, J.W., Turley, S., Teller, D.C., Adman, E.T., Liu, M.-Y., Payne, W.J., et al. (1991). « The 2.3 angstrom x-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. », Science, **35**: 438-442.

Gross, R., Simon, J., and Kröger, A. (1999). « The role of the twin-arginine motif in the signal peptide encoded by the *hydA* gene of the hydrogenase from *Wolinella succinogenes* ». Arch. Microbiol., **172**: 227-232.

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**: 543-551.

Hanada, M., Nishiyama, K.J., and Tokuda, H. (1996). « SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature ». FEBS Lett., **381**: 25-28.

Hanahan, D. (1983). « Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids ». J. Mol. Biol., **166**: 557-580

Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, P., Kalies, K.U. (1996). « Oligomeric rings of the Sec61 α complex induced by ligands required for protein translocation ». Cell, **87**: 721-732.

Hardy, S. J. S., and Randall, L. L. (1991). « A kinetic partitioning model of selective binding of non-native proteins by the bacterial chaperone SecB ». Science, **251**: 439-443.

Hartl, F.-U., S. Lecker, E. Schiebel, J. P. Hendrick, and Wickner., W. (1990). « The binding of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *Escherichia coli* membrane ». Cell, **63**: 269-279.

von Heijne, G. (1985). « Signal sequences: the limits of variation ». J. Mol. Biol., **184**: 99-105.

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

von Heijne, G. (1990). « The signal peptide », J. Membr. Biol., **115**: 195-201.

von Heijne, G. and Abrahmsen, L. (1989). « Species-specific variation in signal peptide design: implication for protein secretion in foreign hosts. », FEBS Lett., **244**: 439-445.

Higuchi, R. (1990). « Recombinant PCR ». In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (éd), PCR protocols : a guide to methods and applications. San Diego, Californie : Academic Press Inc, 1990, p.177-183.

Hilton, J.C., Temple, C.A., and Rajagopalan, K.V. (1999). « Redesign of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase. Enhancement of adenosine N¹-oxide reductase Activity ». J. Biol. Chem., **274**: 8428-8436.

Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B.C. (2001). « A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the "invariant" arginine residues of the consensus targeting motif », FEBS Lett., **497**: 45-49.

Hoang, V. and Hofemeister, J. (1995). « *Bacillus amyloliquefaciens* possesses a second type I SPase with extensive sequence similarity to other *Bacillus* Spases », Biochim. Biophys. Acta., **1269**: 64-68.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). « A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids ». Anal. Biochem., **114**: 193-197.

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

Hynds, P.J., Robinson, D., Robinson, C. (1998). « The Sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane ». J. Biol. Chem., **273**: 34868-34874.

Ignatova, Z., Hörnle, C., Nurk, A., Kasche, V. (2002). « Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery », Biochem. and Biophys. Research. Com., **291**: 146-149.

Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, K., Miura, A. and Nashimoto, H. (1983). « A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* exhibiting slow processing of exported proteins ». Cell, **32**: 789-97.

Ize, B., Gérard, F., Zhang, M., Chanal, A., Volhous, R., Palmer, T., Fillioux, A., Wu, L.F. (2002), « *In vivo* dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli* », J. Mol. Biol., **317**: 327-335.

Izard, J.W., and Kendall, D.A. (1994). « Signal peptides : exquisitely designed transport promoters ». Mol. Microbiol. **13**: 765-773.

Jacks, T., Madhani, H.D., Masiarz, F.R. and Varmus, H.E. (1988). « Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus *gag-pol* region.», Cell, **55**: 447-458

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

Jongbloed, J.D., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., Airaksinen, U., Pries, F., Quax, W.J., van Dijl, J.M., Braun, P.G. (2002). « Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis* », J. Biol. Chem., **277**: 44068-44078.

Kébir, H., Dupont, C., Morosoli, R. (2000). « Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide : dependence on box and inverted repeat sequence. », Biochem. Biophys. Act., **1491**: 177-184.

Keegstra, K., and Cline, K. (1999). « Protein import and routing systems of chloroplasts », Plant Cell, **11**: 557-570.

Kendall, K.J. and Cohen, S.N. (1988). « Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties.», J. Bacteriol., **170**: 4634-51.

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

Kingston, R.L., Scopes, R.K. and Baker, E.N. (1996). «The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP.», Structure, **35**: 1413-1428.

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

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

Koch, H.G., Müller, M. (2000). « Dissecting the translocase and integrase functions of the *Escherichia coli* SecYEG translocon », J. Cell. Biol., **10**: 2163-2173.

Kumamoto, C. A. (1989). « *Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors *in vivo* ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**:5320–5324.

Kumamoto, C. A. (1991). « Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane ». Mol. Microbiol., **5**:19–22.

Kumamoto, C.A. and Beckwitt, J. (1983). « Mutation in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. », J. Bacteriol., **154**: 253-260.

Kumamoto, C. A., and Nault, A. K. (1989). « Characterization of the *Escherichia coli* protein-export gene *secB* », Gene, **75**:167–175.

- Kunkel, T.A.** (1983). « Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. », Pro. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 488-492.
- Lammertyn, E., Desmyter, S., Schacht, S., Van Mellaert, L., Anné, J.** (1998). « Influence of charge variation in *Streptomyces venezuelae* α -amylase on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. », Appl. Microbiol. Biotechnol., **46**: 424-430.
- Larsen, B., Gesteland, R.F. and Atkins, J.K.** (1997). « Structural probing and mutagenic analysis of the stem-loop required for *Escherichia coli* *dnaX* ribosomal frameshifting. », J. Mol. Biol., **271**: 47-60.
- Lecker, S.H., Driessen, A.J.M., Wickner, W.** (1990). « ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. », EMBO J., **9**: 2309-2314.
- Lee, Y.-H.W., Chen, B.F., Wu, S.Y., Leu, W.M., Lin, J.J., Chen, C.W.** (1988). « A trans-acting gene is required for the phenotypic expression of a tyrosinase gene in *Streptomyces* ». Gene **65**: 71-81.
- de Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T., Berks, B.C.** (2001). « Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway », FEBS Lett., **506**: 143-148.
- Leu, W.M., Chen, L.-Y., Liaw, L.-L., and Lee, Y.-H.W.** (1992). « Secretion of the *Streptomyces tyrosinase* is mediated through its trans-activator protein, MelC1 ». J. Biol. Chem., **267**: 20108-20113.
- Liebke, H.H.** (1987). « Multiple SecA protein isoforms in *Escherichia coli* ». J. Bacteriol., **169**: 1174-1181.
- Lill, R., Dowan, W. and Wickner, W.** (1990). « The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins ». Cell, **60**:271–280.
- de Lisa, M., Samuelson, P., Palmer T., Georgiou G.** (2002). « Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria », J. Biol. Chem., **277**: 29825-29831
- Loos, H., Sahm, H. and Sprenger, G.A.** (1993). « GFOR, a periplasmic enzyme of *Zymomonas mobilis*, is active in its precursor form.», FEMS Lett., **107**: 293-298.
- MacFarlane, J., and Müller, M.** (1995). « The functional integration of a polytopic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the bacterial signal-recognition particle ». Eur. J. Biochem., **233**: 766–771.

MacIntyre, S., Eschbach, M.-L., and Mutschler, B. (1990). « Export incompatibility of N-terminal basic residues in a mature polypeptide of *Escherichia coli* can be alleviated by optimising the signal peptide ». Mol. Gen. Genet., **221**: 466-474.

MacIntyre, S., B. Mutschler, and Henning, U. (1991). « Requirement of the SecB chaperone for export of a non-secretory polypeptide in *Escherichia coli* ». Mol. Gen. Genet., **227**:224–228.

Manting, E.H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A., Driessen, A.J. (2000). « SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel ». EMBO J., **19**:852-61.

Matsuyama, S.I., Kimura, E. and Mitzushima, S. (1990). « Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of *Escherichia coli*, allows ATP binding to its amino-terminal region ». J. Biol. Chem., **265**: 8760-8765.

Meijer, W. J. J., de Jong, A., Wisman, G. B. A., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1995). « The endogenous *Bacillus subtilis* plasmids pTA1015 and pTA1040 contain SPase-encoding genes: identification of a new structural module of cryptic plasmids ». Mol. Microbiol., **17**: 621-631.

Miller, G.L. (1959). « Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.», Anal. Chem., **31**: 426-428.

Missiakas, D. and Raina, S. (1997).« Protein folding in the bacterial periplasm ». J. Bacteriol., **179**: 2465-2471.

Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. (1986). « Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* ». Gene, **49**: 323-329.

Morange M. (1998). « Le contrôle de qualité des protéines. ». In Biofutur, La cellule, une usine à tout faire, Gap, Elsevier éditions, 1998, p. 58-61.

Mori, H., and Cline, K. (1998). « A signal peptide that directs non-Sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid delta-pH pathway ». J. Biol. Chem., **273**:11405-11408.

Mori, H., Summer, E.J., Ma, X., and Cline, K. (1999). « Component specificity for the thylakoid Sec and delta pH-dependent protein transport pathways ». J. Cell. Biol., **146**: 45-55.

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**: 587-592.

- Morosoli, R. et Dupont C.** (1999). « Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans*: dependence on signal peptides length, number and composition. », FEMS Microbiol. Lett., **179**: 437-445.
- Mould, R.M., and Robinson, C.** (1991). « A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane ». J. Biol. Chem., **266**: 12189-12193.
- Müller, M., Koch, H.G., Beck, K. and Schäfer U.** (2001). « Protein traffic in bacteria : multiple routes from the ribosome to and across the membrane ». Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol., **66**:107-57.
- Nakai, R., Horinouchi, S., Beppu, T.** (1988). « Cloning and nucleotide sequence of a cellulase gene, *casA*, from an alkalophilic *Streptomyces* strain ». Gene, **65**: 229-238
- Nishiyama, K.J., Hanada, M. and Tokuda, H.** (1994). « Disruption of the gene encoding the p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature, EMBO J., **13**: 3272-3277.
- Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K., Tokuda, H.** (1999). « Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation ». EMBO J., **18**: 1049-58.
- Nivière, V., Wong, S.-L., and Voordouw, G.** (1992). « Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a b-lactamase fusion protein ». J. Gen. Microbiol., **138**: 2173-2183.
- Nouween, N., de Kruijff, B., Tommassen, J.** (1996). « PrlA suppressors in *Escherichia coli* relieve the proton electrochemical gradient dependency of translocation of wild type precursors ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 5953-5957.
- Nurizzo, D., Halbig, D., Sprenger, G.A., Baker, E.N.** (2001). « Crystal structures of the precursor from the glucose-fructose oxydoreductase from *Zymomonas mobilis* and its complexes with bound ligands », Biochemistry, **40**: 13857-13867.
- Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F., Morosoli, R.** (1995). « Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. », Appl. Environ. Microbiol., **62**: 109-114.
- Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F., Morosoli, R.** (1996). « Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans* : dependence on number of ribosome-binding sites. », Nat. Biotechnol., **14**: 756-759.
- Park, S., G. Liu, T. B. Topping, W. H. Cover, and Randall., L. L.** (1988). « Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence », Science, **239**:1033–1035.

- Parro, V., Schacht, S., Anné, J., Mellado, R.P.** (1999). « Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21, Microbiology, **145**: 2255-2263.
- Pogliano, J. and Beckwith, J.** (1994). « SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli* ». EMBO J., **13**: 54-61.
- Pop, O., Martin, U., Abel, C., Müller, J.P.** (2002). « The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatA_d/C_d proteins of *Bacillus subtilis* from an autonomous Tat translocation system », 2002, J. Biol. Chem., **277**: 3268-3273.
- Prinz, W. A., C. Spiess, M. Ehrmann, C. Schierle, and Beckwith. J.** (1996). « Targeting of signal sequenceless proteins for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase ». EMBO J., **15**: 5209–5217.
- Pugsley, A.P.** (1993). « The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria ». Microbiol. Rev., **57**: 50-108.
- Randall, L. L., and Hardy, S. J. S.** (1995) « High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding ». Trends Biochem.Sci., **20**:65–69
- Rietsch, A. and Beckwith, J.** (1999). « The genetics of disulfide bond metabolism ». Annu. Rev. Genet., **32**: 163-84.
- Riggs, P.D., Derman, A.I. and Beckwith, J.** (1988). « A mutation affecting the regulation of secA-lacZ fusion defines a new gene ». Genetics, **118**: 571-79.
- Robinson, C., Hynds, P.J., Robinson, D., Mant A.** (1998). « Multiple pathway for the targeting thylakoid protein in chloroplasts.», Plant Mol. Biol., **38**: 209-221
- Robinson, C. and Bolhuis, A.** (2001). « Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway », Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **2**: 350-6.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., and Wu, L.-F.** (1999). « Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway ». J. Biol. Chem. **274**: 13223-13228.
- Römisch, K., Webb, J., Lingelbach, K., Gausepohl, H. and Dobberstein, B.** (1990). « The 54-kD protein of signal recognition particle contains a methionine rich RNA binding domain ». J. Cell Biol., **111**: 1793-1802.
- Sambasivarao, D., Turner, R.J., Simala-Grant, J.L., Shaw, G., Hu, J., Weiner, J.H.** (2000). « Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. », J. Biol. Chem., **275**: 22526-22531.
- Sambrook, J. et Russell, D.W.** (2001). « Molecular cloning, a laboratory manual », 3^{ème} édition, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A. R. (1977).** « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**: 5463-5467.
- Santini, C.-L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G. and Wu, L.-F. (1998).** « A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli* ». EMBO J., **17**: 101-112.
- 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**: 8159-8164.
- Sargent, F., Bogsch, E., 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**: 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**: 36073-36082.
- Sargent, F., Golke, U., de Leeuw, E., Stanley, N.R., Palmer T., Saibil, H.R., Berks, B.C. (2001).** « Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system from a double-layered ring structure ». Eur. J. Biochem., **268**: 3361-3367.
- Schaerleckens, K., Schierová, M., Lammertyn, E., Geukens, N., Anné, J., van Mellaert, L. (2001).** « Twin arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*.», J. Bacteriol., **183**: 6727-32.
- Settles, A.M., and Martienssen, R. (1998).** « Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria ». Trends Cell. Biol., **8**: 494-501.
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., and Martienssen, R. (1997).** « Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein ». Science, **278**: 1467-1470.
- Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996).** « Common principles of protein translocation across membranes ». Science, **271**: 1519-1526.
- Schiebel, E., Driessen, A. J. M., Hartl, F.U. and Wickner, W. (1991).** « $\Delta\mu_{H^+}$ and ATP function at different steps in the catalytic cycle of preprotein translocase ». Cell **64**:927–939.
- Schmidt, M.G. and Oliver, D.B. (1989).** « SecA protein autogenously represses its own translation during normal protein secretion in *Escherichia coli* », J. Bacteriol., **171**: 643-649.

Shareck, F., Roy, C., Yaguchi, M., Morosoli, R., Kluepfel, D. (1991). «Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. », Gene, **107**: 75-82.

Shimizu, H., K. Nishiyama, and Tokuda, H. (1997). « Expression of *gpsA* encoding biosynthetic *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase suppresses both the LB 2 phenotype of a *secB* null mutant and the cold-sensitive phenotype of a *secG* null mutant ». Mol. Microbiol., **26**:1013–1021.

Shiozuka, K.K., Tani, S., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1990). « The proton motive force lowers the level of ATP required for *in vitro* translocation of secretory proteins in *Escherichia coli* », J. Biol. Chem., **265**: 18843-18847.

Simonen, M. and Palva, I. (1993). « Protein secretion in *Bacillus* species ». Microbiol. Reviews, **57**: 109-137.

Spieß, C., Beil, A, and Ehrmann (1999). « A temperature-dependant switch from chaperonne to protease in a widely conserved heat shock protein ». Cell, **97**: 339-347.

Stader, J., Gansheroff, L.J., Silhavy, T.J. (1989). « New suppressors of signal-sequences, *prlG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli* ». Genes Dev., **3**: 1045-1052.

Stanley, N.R., Palmer T., Berks, B.C. (2000). « The twin arginine consensus motif of the Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. », J. Biol. Chem., **275**: 11591-11596.

Struck, J.C.R., Toshka, H.Y., Specht, T., Erdmann, V.A. (1988). « Common structural features between eucaryotic 7SL RNAs, eubacterial 4.5S RNA and scRNA and archaeobacterial 7S RNA ». Nucl. Acid. Res., **16**: 7740-45.

Teter, S.A., and Theg, S.M. (1998). « Energy-transducing thylakoid membranes remain highly impermeable to ions during protein translocation ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**:1590-1594.

Tjalsma, H., Bolhuis, M.L., van Roosmalen, T., Wiegert, T., Schumann, W., Broekhuizen, C.P., Quax, W.J., Venema, G., Bron, S., and van Dijl, J. M. (1998). « Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homologue of archaeal and eukaryotic signal peptidases ». Genes Dev., **12**: 2318-2331.

Thomas, J.D., Daniel, R.A., Errington, J., Robinson C. (2001). « Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. », Mol. Microbiol., **39**: 47-53.

Traxler, B. and Murphy, C. (1996). « Insertion of the polytopic membrane protein MalF is dependant on the bacterial secretion machinery ». J. Biol. Chem., **271**: 12394-12400.

- Wexler, M., Bogsch, E., Kloesgen, R.B., Palmer, T., Robinson, C., and Berks, B.C.** (1998). « Targeting signals for a bacterial Sec-independent export system direct plant thylakoid import by the Δ pH-pathway ». FEBS Lett., **431**: 339-342.
- Wickner, W., Driessen, A.J., Hartl, F.U.** (1991). « The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. », Annu. Rev. Biochem., **60**: 101-124.
- Wiegert, T., Sahm, H., Sprenger, G.A.** (1996). « Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* », Arch. Microbiol., **166**: 32-41.
- Wiegert, T., Sahm, H., Sprenger, G.A.** (1997). « Expression of the *Zymomonas mobilis* *gfo* gene for NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*.», Eur. J. Biochem., **244**: 107-112.
- Wolfe, P. B., Rice, M. and Wickner W.** (1985). « Effects of two *sec* genes on protein assembly into the plasma membrane of *Escherichia coli* ». J. Biol.Chem., **260**:1836–1841.
- van der Wolk, J.P., de Wit, J.G., Driessen, A.J.** (1997). « The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events ». EMBO J., **16**: 7297-304.
- Wood, W.L., Gitschier, J., Lasky, L.A. and Lawn R.M.** (1985). « Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 1585-1588.
- Wu, L.-F., Ize, B., Chanal., A., Quentin, Y., and Fichant G.** (2000). « Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism.», J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **2**: 179-189.
- Yamane, K., Ichiara, S. and Mizushima, S.** (1987). « *In vitro* translocation of protein across *Escherichia coli* membrane vesicles requires both the proton motive force and ATP.», J. Biol. Chem., **262**: 2358-2362.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985). « Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.», Gene, **33**:103-19.
- Yen, M.R., Tseng, Y.H., Nguyen, E.H., Wu, L.F. and Saier Jr, H.** (2002). « Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system.», Arch. Microbiol., **177**: 441-450.
- Hermant, B., Faury, D.** (1998). « La reproduction des bono-bonos au Botswana, les années bissextiles en période de mousson sèche », J.Yakoubiz, **100**: 222-223.