

Université du Québec

INRS-Institut Armand-Frappier

ÉTUDE DES SYSTÈMES DE SÉCRÉTION  
SEC & TAT  
CHEZ *STREPTOMYCES LIVIDANS*

Par

JULIEN GUIMOND

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

Jury d'évaluation

Examineur interne

LALIBERTÉ, Jean-François  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

GILBERT, Michel  
CNRC Ottawa

Directeur de recherche

MOROSOLI, Rolf  
INRS-Institut Armand-Frappier

## 1. Résumé

La voie de sécrétion Tat nouvellement étudiée, permet la sécrétion de précurseurs déjà repliés dans le cytoplasme. Les précurseurs Tat se distinguent par la présence d'une séquence consensus de 7 résidus d'acide aminé dans leur peptide signal. En recherchant ce motif consensus, le programme informatique TatScan prédit 129 substrats Tat chez *Streptomyces coelicolor*. Les sécrétomes de *Streptomyces lividans* sauvage, une proche parente de *S. coelicolor*, et de son mutant du système Tat ont été étudiés pour vérifier la justesse de ces prédictions informatiques. Comme le sécrétome dépend des sources de carbone du milieu de culture, les bactéries ont été cultivées dans quatre milieux liquides avec une source de carbone différente, soit le xylose, le glucose, la chitine et un extrait de terre. Les protéines sécrétées ont été recueillies et séparées par électrophorèse sur gel en deux dimensions. Les protéines sécrétées par la bactérie sauvage mais absentes chez le mutant étaient vraisemblablement Tat et ont été analysées au spectre de masse. Les milieux xylose, glucose, chitine et terre ont permis d'identifier respectivement 13, 14, 27 et 19 protéines candidates à la sécrétion par le système Tat pour un total de 63 protéines différentes. Parmi celles-ci, les produits des gènes SCO0677, SCO1639, SCO2068, SCO2780, SCO2828, SCO6005 et SCO6131, prédits par TatScan, sont confirmés pour la sécrétion Tat. Sept autres protéines, codées par les gènes SCO1230, SCO1860, SCO2591, SCO5260, SCO6109, SCO6199 et SCO6590, sont probablement Tat-dépendantes, mais possèdent un peptide signal qui échappe à l'analyse de tous les outils de prédictions informatiques. Les protéines codées par les gènes SCO0494, SCO0638, SCO3967, SCO5113, SCO5420, SCO5646, SCO5776, SCO6963 et SCO7501 sont localisées dans la membrane et possèdent toutes un peptide signal ne correspondant pas à un peptide signal Tat. Les trois protéines codées par les gènes SCO4622, SCO2149 et SCO5843 ne présentent aucun peptide signal et sont proposées comme candidates à la sécrétion par un mécanisme non conventionnel. Les 37 autres protéines sont cytoplasmiques, membranaires ou de localisation inconnue et ne comportent pas de peptide signal.

Les protéines destinées à la sécrétion sont synthétisées sous la forme d'un précurseur qui possède à son extrémité N-terminale une séquence appelée peptide signal qui est clivé lors de la sécrétion pour libérer la protéine mature. La majorité des précurseurs sont sécrétés par

le système Sec, qui requiert que les précurseurs conservent une forme linéaire. Chez les bactéries à gram négatif, la chaperonne dédiée SecB permet à plusieurs précurseurs de conserver leur forme « dépliée » propre à la sécrétion Sec. Chez les bactéries à gram positif, aucun homologue fonctionnel de cette chaperonne n'a été découvert jusqu'ici. En purifiant le précurseur de la xylanase A2 de *S. lividans*, une protéine Sec-dépendante, nous avons tenté de co-purifier une chaperonne homologue à SecB. Pour ce faire, une étiquette d'histidines a été ajoutée à la xylanase A2, ce qui a permis la purification du précurseur de la xylanase A2 contenu dans la fraction cytoplasmique par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel. Une quinzaine de protéines accompagnaient le précurseur de la xylanase A2 et après analyse au spectre de masse, aucune ne présentait les caractéristiques d'une chaperonne éventuelle. Nous avons ensuite tenté de lier le précurseur à la chaperonne en utilisant des *cross-linkers*. La formation de liaisons réticulaires avec le DSP, le DSS et le GMBS suivi d'une chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel n'a pas permis de récupérer un complexe formé du précurseur de la xylanase A2 et d'une chaperonne. Parallèlement, la fraction membranaire a été testée pour la présence de complexes, mais sans succès. Finalement, nous émettons l'hypothèse que la xylanase A2 puisse être sécrétée de façon co-translationnelle, sans l'aide d'une chaperonne.

Comme les protéines sécrétées par le système Tat doivent être tout au moins partiellement repliées dans le cytoplasme, nous avons tenté de démontrer la présence d'une chaperonne qui favoriserait le repliement de la xylanase C de *S. lividans*, une protéine spécifiquement sécrétée par ce système. Comme pour la xylanase A2, la xylanase C a été munie d'une queue d'histidine permettant sa récupération sur colonne de sépharose-nickel. Les *cross-linkers* DSP, DSS, GMBS et EDC ont été utilisés pour créer des liaisons réticulaires entre le précurseur de la xylanase C et sa chaperonne et ces complexes ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel, sans pouvoir identifier la chaperonne. Une colonne d'immuno-affinité a été préparée pour tenter de récupérer ces complexes mais aucun des complexes récupérés ne contenait de xylanase C. Des complexes formés de la pré-xylanase C et de sa chaperonne ont été cherchés dans la fraction membranaire mais seul le précurseur a été retrouvé. Finalement, des expériences préliminaires de liaison avec le formaldéhyde, qui forme des liens covalents avec les

protéines, semblent faire apparaître des complexes dont les composantes n'ont pas été analysées pour le moment.

Handwritten signature of Julien Guimard in blue ink, written over a horizontal line.

Étudiant

Handwritten signature of the research director in blue ink, written over a horizontal line.

Directeur de recherche

## **2. Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Rolf Morosoli. Merci pour les discussions animées, les nombreux conseils et les encouragements devant les obstacles tout au long de ma maîtrise. Je remercie également Johanne Lemay et Marie-Christine Groleau pour leur aide dans le développement et la réalisation de ce projet.

Merci également à mes collègues étudiants pour une expérience de laboratoire enrichissante, les partages d'idées et une vie hors campus bien remplie.

Un merci spécial aux personnes qui ont partagé ma vie pendant ces deux années, particulièrement Gilles, France, Dominique, Jocelyn et Chantal, pour le support et bien plus.

### 3. Table des matières

<b>1. RÉSUMÉ</b> .....	<b>II</b>
<b>2. REMERCIEMENTS</b> .....	<b>V</b>
<b>3. TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>6</b>
<b>4. LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>5. LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>10</b>
<b>6. LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>11</b>
<b>7. LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>12</b>
<b>8. INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>9. REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>15</b>
9.1 LA FAMILLE DES STREPTOMYCÈTES .....	15
9.2 SÉCRÉTION CHEZ LES BACTÉRIES.....	15
9.2.1 <i>Système de sécrétion Sec</i> .....	16
9.2.1.1 Peptide signal Sec.....	17
9.2.1.1.1 Région N .....	18
9.2.1.1.2 Région H .....	18
9.2.1.1.3 Région C .....	18
9.2.1.2 Sécrétion post-traductionnelle : chaperonne SecB.....	19
9.2.1.3 SecA .....	19
9.2.1.4 SecYEG.....	20
9.2.1.5 SecD, SecF et YajC .....	21
9.2.2 <i>Sécrétion co-traductionnelle</i> .....	21
9.2.3 <i>Système de sécrétion Tat</i> .....	23
9.2.3.1 Peptide signal Tat .....	24
9.2.3.1.1 Région N .....	25
9.2.3.1.2 Région H .....	26
9.2.3.1.3 Région C .....	26
9.2.3.2 Prédictions bioinformatiques de protéines Tat-dépendantes.....	26
9.2.3.3 Translocase Tat.....	27
9.2.3.3.1 TatC.....	28
9.2.3.3.2 TatB.....	28
9.2.3.3.3 TatA .....	29
9.2.3.4 TatD.....	30
9.2.3.5 TatE .....	31
9.3 SIGNAL PEPTIDASES.....	31
9.3.1 <i>Signal peptidases des bactéries à gram positif</i> .....	32
9.4 PRINCIPALES CHAPERONNES IMPLIQUÉES DANS LA SÉCRÉTION DES PROTÉINES.....	32
9.4.1 <i>SecB</i> .....	33
9.4.2 <i>Protéines de choc thermique (HSP)</i> .....	35
9.4.2.1 HSP60 et HSP10.....	35
9.4.2.2 HSP70 et HSP40.....	37
9.4.2.3 HSP100.....	38
9.4.3 <i>Catalyseurs du repliement</i> .....	39
9.4.3.1 Peptidyl disulfide isomérase .....	39
9.4.3.2 Peptidyl prolyl <i>cis/trans</i> isomérase .....	40
<b>10. MATÉRIELS &amp; MÉTHODES</b> .....	<b>42</b>
10.1 SOUCHES BACTÉRIENNES.....	42
10.2 MILIEUX DE CULTURE.....	42
10.3 RÉCUPÉRATION ET CONCENTRATION DES PROTÉINES SÉCRÉTÉES .....	44
10.4 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION PROTÉIQUE PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD .....	44
10.5 ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE .....	45

10.5.1	Étapes de la première dimension.....	45
10.5.2	Étapes de la deuxième dimension.....	47
10.6	COLORATION À L' ARGENT.....	48
10.7	ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE DIFFÉRENTIELLE À FLUORESCENCE.....	49
10.7.1	Marquage des échantillons.....	49
10.7.2	Révélation de la fluorescence.....	50
10.8	CHROMATOGRAPHIE D' AFFINITÉ.....	50
10.8.1	Préparation des colonnes de chromatographie.....	51
10.8.1.1	Colonne de sépharose-nickel.....	51
10.8.1.2	Colonne d' immuno-affinité.....	51
10.8.1.2.1	Préparation d' un gel de CNBr-sépharose avec xylanase C fixée.....	51
10.8.1.2.2	Immuno-purification des anticorps anti-xylanase C.....	52
10.8.1.2.3	Préparation d' un gel de CNBr-sépharose avec anticorps anti-xylanase C fixés.....	52
10.8.2	Préparation des cellules.....	53
10.8.2.1	Formation de liaisons réticulaires.....	53
10.8.2.2	Inhibition du système de sécrétion Sec.....	55
10.8.3	Préparation de l' extrait protéique.....	55
10.8.4	Chromatographie d' affinité sur colonne de sépharose-nickel.....	56
10.8.5	Chromatographie d' affinité sur colonne d' immuno-affinité.....	56
10.9	SDS-PAGE.....	57
10.10	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE.....	57
10.10.1	Transfert semi-humide sur membrane de nitrocellulose.....	57
10.10.2	Immunobuvardage de type Western.....	57
10.11	ANALYSE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	58
<b>11.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>60</b>
11.1	PROTÉINES SÉCRÉTÉES PAR LE SYSTÈME TAT CHEZ STREPTOMYCES LIVIDANS.....	60
11.1.1	Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez Streptomyces lividans en milieu xylose par électrophorèse bidimensionnelle.....	62
11.1.2	Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez Streptomyces lividans en milieu glucose par électrophorèse bidimensionnelle.....	65
11.1.3	Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez Streptomyces lividans en milieu chitine par électrophorèse bidimensionnelle.....	68
11.1.4	Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez Streptomyces lividans en milieu terre par électrophorèse bidimensionnelle.....	72
11.1.5	Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez Streptomyces lividans en milieu xylose par électrophorèse bidimensionnelle différentielle à fluorescence.....	76
11.2	RECHERCHE DE PROTÉINES CHAPERONNES IMPLIQUÉES DANS LA SÉCRÉTION DE LA XYLANASE A2 PAR LE SYSTÈME SEC CHEZ STREPTOMYCES LIVIDANS.....	80
11.2.1	Recherche de chaperonnes impliquées dans la sécrétion de la xylanase A2 par le système Sec chez Streptomyces lividans par chromatographie d' affinité sur colonne de sépharose-nickel.....	81
11.2.2	Utilisation de cross-linkers pour lier la chaperonne à la xylanase A2 de Streptomyces lividans in vivo.....	85
11.2.3	Utilisation de DSS pour créer des liaisons réticulaires stables en présence de $\beta$ -mercaptoéthanol entre la xylanase A2 et sa chaperonne.....	89
11.2.4	Utilisation d' inhibiteurs du système Sec pour augmenter la concentration du précurseur de la xylanase A2 de Streptomyces lividans.....	93
11.2.5	Utilisation d' un autre cross-linker pour lier la chaperonne à la xylanase A2 de Streptomyces lividans.....	95
11.2.6	Recherche de chaperonnes membranaires impliquées dans la sécrétion de la xylanase A2 de Streptomyces lividans.....	98
11.3	RECHERCHE DE PROTÉINES CHAPERONNES IMPLIQUÉES DANS LA SÉCRÉTION PAR LE SYSTÈME TAT DE LA XYLANASE C CHEZ STREPTOMYCES LIVIDANS.....	100
11.3.1	Utilisation de cross-linkers pour lier la chaperonne à la xylanase C de Streptomyces lividans et purification sur colonne de sépharose-nickel.....	101
11.3.2	Chromatographie sur colonne d' immuno-affinité pour purifier des complexes entre le précurseur de la xylanase C et sa chaperonne chez Streptomyces lividans.....	106

<i>Utilisation de multiples cross-linkers pour lier la chaperonne à la xylanase C de Streptomyces lividans</i>	109
<i>11.3.3 Recherche de chaperonnes membranaires impliquées dans la sécrétion de la xylanase C de Streptomyces lividans</i>	114
<i>11.3.4 Utilisation du formaldéhyde pour créer des liaisons réticulaires clivables entre la xylanase C et sa chaperonne chez Streptomyces lividans</i>	115
<b>12. DISCUSSION</b>	<b>118</b>
12.1 PROTÉINES SÉCRÉTÉES PAR LE SYSTÈME TAT CHEZ <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i>	118
12.1.1 Substrats possiblement Tat sans être dans la liste de TatScan	120
12.1.2 Protéines non sécrétées	122
12.1.3 2-DIGE	124
12.2 RECHERCHE DE PROTÉINES CHAPERONNES IMPLIQUÉES DANS LA SÉCRÉTION DE LA XYLANASE A2 PAR LE SYSTÈME SEC CHEZ <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i>	125
12.2.1 Utilisation du DSP pour lier la chaperonne à la xylanase A2	126
12.2.2 Utilisation du DSS pour lier la chaperonne à la xylanase A2	128
12.2.3 Concentration de la xylanase A2 dans le cytoplasme	128
12.2.4 Utilisation du GMBS pour lier la chaperonne à la xylanase A2	129
12.2.5 Recherche d'une chaperonne de la xylanase A2 dans la fraction membranaire	130
12.3 RECHERCHE DE PROTÉINES CHAPERONNES IMPLIQUÉES DANS LA SÉCRÉTION DE LA XYLANASE C PAR LE SYSTÈME TAT CHEZ <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i>	131
12.3.1 Identification de la xylanase C par spectrométrie de masse	131
12.3.2 Utilisation du DSS pour lier la chaperonne à la xylanase C	132
12.3.3 Colonne d'immuno-affinité	133
12.3.4 Multiples cross-linkers	133
12.3.5 Recherche d'une chaperonne Tat membranaire	135
12.3.6 Formation de liaisons réticulaires avec le formaldéhyde	135
12.4 PERSPECTIVES	136
<b>13. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>150</b>

## 4. Liste des figures

FIGURE 1 : SCHÉMA DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION SEC.....	17
FIGURE 2 : SCHÉMA D'UN PEPTIDE SIGNAL DE TYPE SEC.....	18
FIGURE 3 : SCHÉMA DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION SRP CHEZ LES PROCARYOTES.....	23
FIGURE 4 : SCHÉMA DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION TAT.....	24
FIGURE 5 : SCHÉMA D'UN PEPTIDE SIGNAL DE TYPE TAT.....	25
FIGURE 6. CROSS-LINKERS UTILISÉS LORS DES EXPÉRIENCES DE LIAISON RÉTICULAIRE.....	55
FIGURE 7 : PROTÉINES SÉCRÉTÉES EN MILIEU XYLOSE 1% SUR GEL 2-DE.....	62
FIGURE 8 : « CARTE » DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU XYLOSE 1%.....	63
FIGURE 9 : PROTÉINES SÉCRÉTÉES EN MILIEU GLUCOSE 1% SUR GEL 2-DE.....	65
FIGURE 10 : « CARTE » DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU GLUCOSE 1%.....	66
FIGURE 11 : PROTÉINES SÉCRÉTÉES EN MILIEU CHITINE 1% SUR GEL 2-DE.....	68
FIGURE 12 : « CARTE » DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU CHITINE 1%.....	69
FIGURE 13 : PROTÉINES SÉCRÉTÉES EN MILIEU TERRE 1% SUR GEL 2-DE.....	72
FIGURE 14 : « CARTE » DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU TERRE 1%.....	73
FIGURE 15 : DÉTECTION DES PROTÉINES MARQUÉES AVEC DES FLUOROCHROMES.....	77
FIGURE 16 : SUPERPOSITION DES PATRONS DE FLUORESCENCE.....	78
FIGURE 17 : COMPARAISON DES « CARTES » DES PROTÉINES CANDIDATES TAT.....	79
FIGURE 18 : OPTIMISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR COLONNE DE SÉPHAROSE-NICKEL.....	82
FIGURE 19 : CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR COLONNE DE SÉPHAROSE-NICKEL.....	83
FIGURE 20: UTILISATION DU DSP POUR CRÉER UNE LIAISON RÉTICULAIRE ENTRE LE PRÉCURSEUR DE LA XYLANASE A2 ET SA CHAPERONNE.....	86
FIGURE 21 : UTILISATION DU DSS POUR FORMER DES LIAISONS RÉTICULAIRES STABLES EN PRÉSENCE DE B-MERCAPTOÉTHANOL.....	90
FIGURE 22 : UTILISATION D'INHIBITEURS DU SYSTÈME SEC.....	94
FIGURE 23 : UTILISATION DU DSS ET DU GMBS POUR CRÉER DES LIAISONS RÉTICULAIRES CHEZ IAF906A2HIS.....	96
FIGURE 24 : RECHERCHE DE PROTÉINES CHAPERONNES DU SYSTÈME SEC DANS LA MEMBRANE.....	99
FIGURE 25 : UTILISATION DU DSP ET DU DSS POUR FORMER DES LIAISONS RÉTICULAIRES ENTRE LA XYLANASE C ET SA CHAPERONNE.....	102
FIGURE 26 : UTILISATION DE LA COLONNE D'IMMUNO-AFFINITÉ AVEC ANTICORPS IMMOBILISÉS POUR PURIFIER LE PRÉCURSEUR DE LA XYLANASE C LIÉE À SA CHAPERONNE.....	107
FIGURE 27 : UTILISATION DE MULTIPLE <i>CROSS-LINKERS</i> POUR PROMOUVOIR LA FORMATION D'UNE LIAISON COVALENTE DU PRÉCURSEUR DE LA XYLANASE C AVEC SA CHAPERONNE.....	110
FIGURE 28 : RECHERCHE DE PROTÉINES CHAPERONNES DU SYSTÈME TAT DANS LA MEMBRANE.....	114
FIGURE 29 : UTILISATION DU FORMALDÉHYDE POUR FORMER DES LIAISONS CLIVABLES ENTRE LES PROTÉINES.....	116
FIGURE 30. PEPTIDES GÉNÉRÉS PAR LA DIGESTION À LA TRYPSINE DE LA XYLANASE C.....	131

## 5. Liste des tableaux

TABLEAU 1 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU XYLOSE 1%.....	64
TABLEAU 2 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU GLUCOSE 1%.....	67
TABLEAU 3 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU CHITINE 1%.....	70
TABLEAU 4 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES CANDIDATES TAT EN MILIEU TERRE 1%.....	74
TABLEAU 5 : IDENTIFICATION DES BANDES DE LA FIGURE 19.....	83
TABLEAU 6 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES CONTENUES DANS LES DIFFÉRENTES BANDES RÉVÉLÉES PAR LES ANTICORPS ANTI-XYLANASE A2 (FIGURE 20).....	87
TABLEAU 7 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES CONTENUES DANS LES DIFFÉRENTES BANDES RÉVÉLÉES PAR LES ANTICORPS ANTI-XYLANASE A2 (FIGURE 21).....	91
TABLEAU 8 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES DE LA FIGURE 23.....	97
TABLEAU 9 : IDENTIFICATION DES PROTÉINES DE LA FIGURE 25.....	103
TABLEAU 10 : IDENTIFICATION DES BANDES DE LA FIGURE 26.....	108
TABLEAU 11 : IDENTIFICATION DES BANDES DE LA FIGURE 27.....	111
TABLEAU 12 : PEPTIDES SIGNAUX DES SEPT PROTÉINES TAT CONFIRMÉES EXPÉRIMENTALEMENT.....	119
TABLEAU 13 : PEPTIDES SIGNAUX DE SEPT PROTÉINES SÉCRÉTÉES.....	121
TABLEAU 14 : PEPTIDES SIGNAUX DE NEUF PROTÉINES LOCALISÉES À LA MEMBRANE.....	123

## 6. Liste des annexes

ANNEXE A - LISTE DES 129 GÈNES DE <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> CODANT POUR DES PROTÉINES POSSIBLEMENT SÉCRÉTÉES PAR LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION TAT, TELLE QUE GÉNÉRÉE PAR TATSCAN. ....	138
ANNEXE B – LISTE DES 145 GÈNES DE <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> CODANT POUR DES PROTÉINES POSSIBLEMENT SÉCRÉTÉES PAR LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION TAT, TELLE QUE GÉNÉRÉE PAR TATFIND. ....	139
ANNEXE C – LISTE PARTIELLE (109 SEULEMENT) DES 230 GÈNES DE <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> CODANT POUR DES PROTÉINES POSSIBLEMENT SÉCRÉTÉES PAR LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION TAT, TELLE QUE GÉNÉRÉE PAR UNE VERSION MODIFIÉE DE TATFIND. ....	140
ANNEXE D - COMPOSITION DES MILIEUX ET TAMPONS UTILISÉS .....	141
ANNEXE E – PLASMIDES UTILISÉS.....	149

## 7. Liste des abréviations

2-DE : Électrophorèse bidimensionnelle  
2-DIGE : Électrophorèse bidimensionnelle différentielle à fluorescence  
Å : Angstrom,  $1 \times 10^{-10}$  mètres  
ADP : Adénosine diphosphate  
ATP : Adénosine triphosphate  
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine  
Clp : Caseinolytic protease  
CNBr : Bromure de cyanogène  
DMF : Diméthyleformamide  
DmsA : Diméthylsulphoxyde réductase A  
D.O. : Densité optique  
DSP : Dithiobis[succinimidylpropionate]  
DSS : Disuccinimidyl suberate  
DTT : Dithiothréitol  
EDC : 1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride  
GFP : Green fluorescent protein  
GMBS : N-[g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester  
GTP : Guanosine triphosphate  
HPLC : High performance liquid chromatography  
HSP : Heat shock protein  
kDa : kilodalton  
NBS : nucleotide-binding site  
NBT : Nitro-blue tetrazolium  
OML : Outer membrane lipoprotein  
Omp : Outer membrane protein  
PBS : Phosphate buffered saline  
psi : Pound per square inch  
rpm : révolution par minute  
SBP : Streptavidin-binding peptide  
SDS : Sodium dodécyl sulfate  
Sec : General secretory (Sec) pathway  
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SRP : Signal recognition particule  
Tat : Twin-arginine translocation  
TCA : Acide trichloroacétique  
TorA : Triméthylamine n-oxyde réductase A

## 8. Introduction

Les protéines destinées à la sécrétion sont synthétisées sous la forme d'un précurseur qui possède à son extrémité N-terminale une séquence appelée peptide signal. Le peptide signal permet de diriger le précurseur vers le système de sécrétion approprié, après quoi il est clivé par une signal peptidase, libérant ainsi la protéine mature.

Plusieurs systèmes de sécrétion permettent aux précurseurs de traverser la membrane cytoplasmique des bactéries. Le système de sécrétion Tat permet de sécréter des précurseurs ayant déjà un certain niveau de repliement dans le cytoplasme. Les peptides signaux des précurseurs Tat présentent la séquence consensus S/T-R-R-X-Φ-Φ-K où X est un résidu d'acide aminé quelconque et Φ est un résidu d'acide aminé à chaîne latérale hydrophobe, généralement une phénylalanine suivie d'une leucine. En cherchant la séquence consensus à travers la séquence génomique d'un organisme, il est possible de déterminer quels gènes codent pour des protéines sécrétées par le système Tat. Plusieurs programmes informatiques ont été créés à cet effet. *Streptomyces coelicolor* est la bactérie qui contient potentiellement le plus de substrats Tat, avec 129 protéines selon le programme TatScan et entre 145 et 230 selon deux versions du programme TatFind. Ces divergences résultent des paramètres de recherche propres à chaque programme. Le secrétome Tat-dépendant de *Streptomyces lividans*, une proche parente de *S. coelicolor*, a été étudié pour vérifier la justesse de ces prédictions informatiques *in vivo*. Il ressort de ces expériences que les outils d'analyse génomique sont tous limités quant à l'efficacité de leur détection et que les paramètres de recherche doivent être précisés afin de créer un outil plus efficace pour cette tâche.

La majorité des précurseurs transitent par le système de sécrétion Sec. La sécrétion par ce système nécessite que les précurseurs soient maintenus dans une conformation « dépliée » dans le cytoplasme. Chez les bactéries à gram négatif, le maintien dans une conformation « dépliée » propre à la sécrétion par le système Sec est assuré par la chaperonne dédiée SecB pour plusieurs précurseurs. Aucun homologue de cette chaperonne n'a été répertorié jusqu'à maintenant chez les bactéries à gram positif. La sécrétion de protéines hétérologues chez les bactéries à gram positif présente un intérêt commercial certain. La membrane simple de ces bactéries est plus facile à traverser que la double membrane des bactéries à

gram négatif. Les Streptomycètes, des bactéries à gram positif avec un fort potentiel de sécrétion, sont depuis longtemps utilisés avec succès pour la sécrétion de protéines hétérologues eucaryotes et procaryotes. Il serait intéressant de connaître les protéines chaperonnes du système de sécrétion majeur de ces bactéries. Dans cette optique, nous avons tenté de trouver une chaperonne de *S. lividans* qui serait un homologue fonctionnel de SecB. En utilisant la xylanase A2 de cette bactérie à laquelle une étiquette d'histidine a été ajoutée, nous avons purifié sur une colonne de sépharose-nickel cette protéine Sec-dépendante en espérant co-purifier une chaperonne du système Sec. Pour tenter de stabiliser cette association momentanée, des *cross-linkers*, des molécules permettant la liaison covalente de deux substrats, ont été utilisés. Les complexes ainsi formés sont facilement retrouvés à l'aide d'anticorps dirigés contre le précurseur.

Le système Tat permet la sécrétion de protéines déjà repliées dans le cytoplasme. La xylanase C de *S. lividans* est une protéine sécrétée exclusivement par le système Tat. Des démonstrations expérimentales prouvent que cette protéine ne peut pas se replier elle-même à l'extérieur du cytoplasme. Un facteur cytoplasmique, probablement une chaperonne, entre donc en jeu dans son repliement. Jusqu'ici, cette chaperonne n'a pas été identifiée. Une chaperonne du système Tat serait particulièrement intéressante à connaître pour assurer le repliement de certaines protéines hétérologues qui sont sécrétées mais n'arrivent pas à se replier correctement dans le milieu. Pour tenter de trouver une chaperonne du système Tat, une démarche similaire à celle employée précédemment a été entreprise. Une étiquette d'histidine a été ajoutée à la xylanase C et la protéine a été purifiée sur colonne de sépharose-nickel en tentant de co-purifier la chaperonne. Quatre *cross-linkers* différents ont été utilisés pour tenter de stabiliser l'association momentanée entre les deux protéines. Une seconde technique de chromatographie basée sur l'immuno-affinité a aussi été tentée.

## **9. Revue de littérature**

### **9.1 La famille des Streptomycètes**

Les Streptomycètes sont des bactéries à gram positif saprophytes du sol. Ils décomposent la matière organique en sécrétant un grand nombre d'enzymes hydrolytiques telles que les xylanases, cellulases, protéases, etc. Ils possèdent un cycle de vie complexe où se succèdent des étapes de croissance végétative et reproductive. Après la germination d'une spore, la croissance végétative entraîne la formation d'un mycélium qui envahit le milieu grâce à son réseau d'hyphes. Lors de la croissance reproductive, il y a formation d'hyphes aériens qui se différencient en chaînes de spores pour compléter le cycle (McGregor, 1954).

Les Streptomycètes produisent plus de 50% des antibiotiques utilisés en médecine clinique et vétérinaire (notamment la néomycine et le chloramphénicol), ainsi que plusieurs protéines et molécules (métabolites secondaires, enzymes, antifongiques, immunosuppresseurs, etc.) d'intérêt commercial et industriel. Pour ces raisons, ils forment le genre le plus étudié de l'ordre des Actinomycètes. La séquence génomique complète de la souche *Streptomyces coelicolor* A3(2) a été publiée en 2002 (Bentley *et al.*, 2002) et celle de la souche de production industrielle *Streptomyces avermitilis* a été publiée l'année suivante (Ikeda *et al.*, 2003). Les deux génomes sont constitués d'un seul chromosome linéaire avec un pourcentage en G + C supérieur à 70%. La séquence génomique de *Streptomyces scabies* souche 87.22 a été récemment déterminée par un groupe de l'Institut Sanger (Institut Sanger, [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

Les Streptomycètes ont souvent été utilisés avec succès pour la sécrétion de protéines hétérologues d'origine eucaryote et procaryote (Hong *et al.*, 2003; Sianidis *et al.*, 2006). Sa nature non pathogène, sa membrane simple de bactérie à gram positif et son potentiel élevé de sécrétion en font une candidate idéale pour ce type d'expériences.

### **9.2 Sécrétion chez les bactéries**

La membrane d'une bactérie lui permet de conserver une composition interne unique d'ions et de protons qui diffère de celle de son milieu externe. Les protéines dont la fonction est effectuée à l'extérieur de la cellule sont synthétisées dans le cytoplasme et doivent traverser

cette membrane. Pour y parvenir, certains mécanismes existent qui permettent la translocation des protéines à l'extérieur de la cellule sans affecter l'intégrité de la membrane ou l'équilibre ionique interne. Parmi les systèmes de transport des protéines, seuls les systèmes de sécrétion Sec et Tat seront traités.

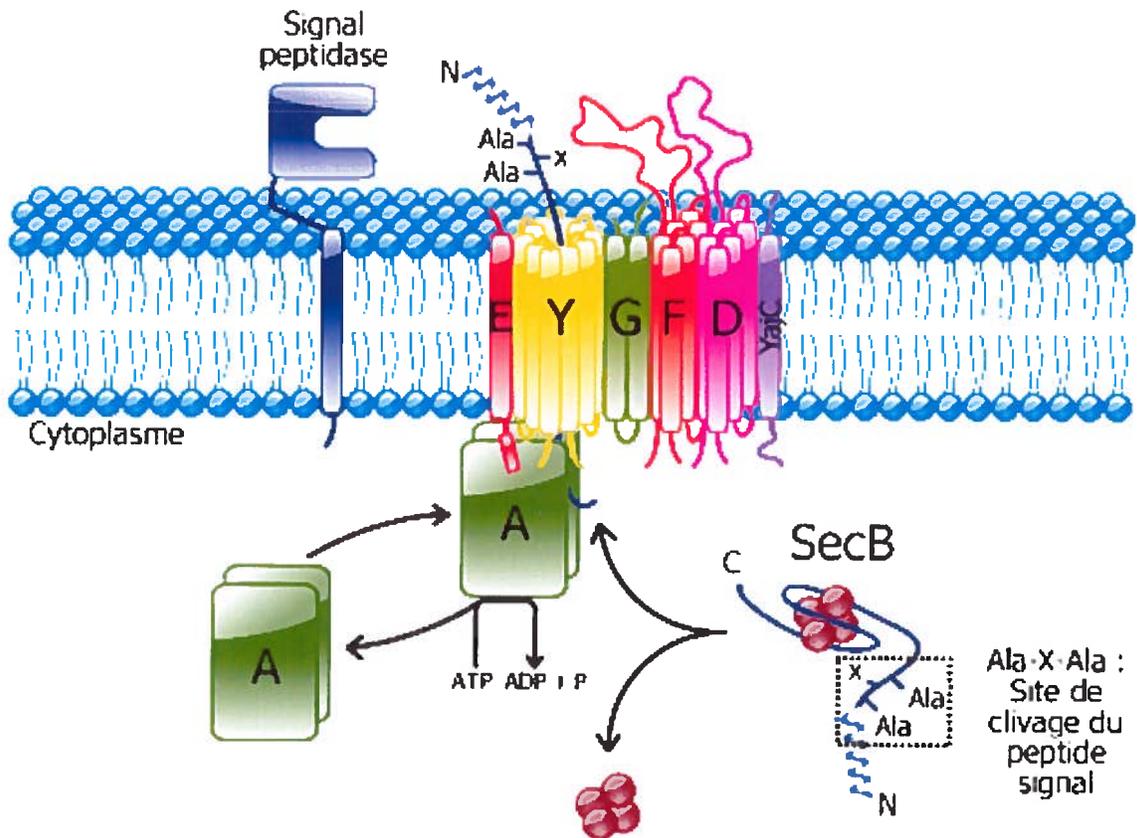
### 9.2.1 Système de sécrétion Sec

Le système Sec (*General Secretory (Sec) Pathway*) est le système de sécrétion le plus étudié chez les bactéries. La majorité des protéines retrouvées dans le périplasme ou le milieu de culture sont sécrétées par ce système. Une des particularités de ce système de sécrétion réside dans le fait que les protéines sont sécrétées sous leur forme linéaire et qu'elles acquièrent leur conformation finale après leur passage à travers la membrane cellulaire. Ce système de sécrétion est essentiel à la survie des bactéries (Pugsley, 1993).

Les protéines destinées à la sécrétion par le système Sec sont synthétisées dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur, ou préprotéine, comportant à son extrémité N-terminale une courte séquence nommée peptide signal qui sera clivée lors de la sécrétion, libérant la protéine mature. Une protéine chaperonne cytoplasmique maintient le précurseur dans une conformation « dépliée » propre à la sécrétion Sec.

Suite à la reconnaissance de leur peptide signal, les précurseurs sont dirigés dans un complexe hétérotrimérique membranaire formé par les protéines SecY, SecE et SecG appelé translocase. Sous l'action ATPasique d'un homodimère de SecA et grâce à la force proton-motrice, le précurseur traverse la membrane. Sur la face externe de la membrane se trouve une signal peptidase qui coupe le peptide signal et libère la protéine mature.

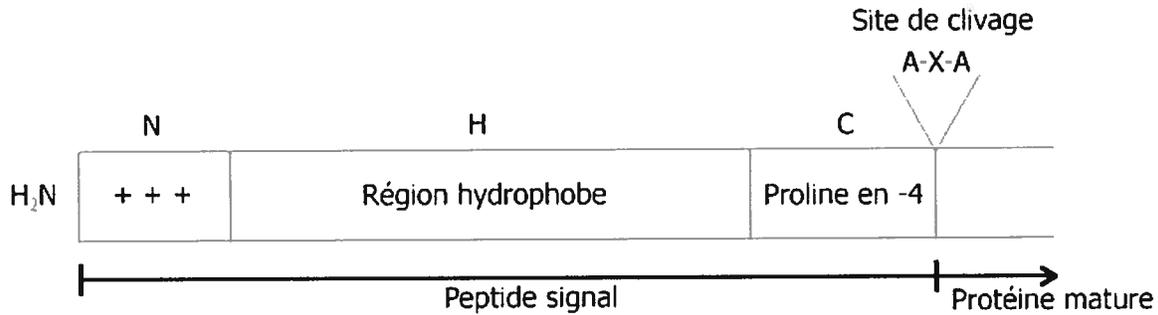
La translocation par le système de sécrétion Sec nécessite huit protéines principales agissant de concert ou de façon successive pour permettre la translocation du précurseur. Un schéma du mécanisme de sécrétion Sec est présenté à la figure 1.



**Figure 1 : Schéma du système de sécrétion Sec.**

### 9.2.1.1 Peptide signal Sec

Le peptide signal d'une protéine destinée à la sécrétion par le système Sec d'une bactérie à gram négatif possède une séquence d'une longueur approximative de 24 résidus d'acides aminés (Izard et Kendall, 1994), tandis que celui d'une bactérie à gram positif est en moyenne plus long de 5 à 7 résidus d'acides aminés (von Heijne et Abrahmsen, 1989). Les peptides signaux des Streptomycètes sont encore plus longs avec une moyenne de 35 acides aminés (Gilbert *et al.*, 1995). Les peptides signaux sont composés de trois régions (figure 2). La région N du côté N-terminal est chargée positivement, la région H centrale est caractérisée par la présence de résidus d'acides aminés à chaîne latérale hydrophobe et la région C qui possède le site de clivage du peptide signal reconnu par la signal peptidase située sur la face externe de la membrane (Figure 1).



**Figure 2 : Schéma d'un peptide signal de type Sec.**

#### 9.2.1.1.1 Région N

La région N-terminale du peptide signal comporte 5 ou 6 résidus d'acides aminés dont quelques uns sont chargés positivement (von Heijne, 1990). Leur remplacement par des résidus neutres ou chargés négativement diminue l'efficacité de la translocation sans toutefois l'abolir. La région N des bactéries à gram positif est généralement plus longue que celle des bactéries à gram négatif. La région N des Streptomycètes est particulièrement longue avec 12 résidus en moyenne (von Heijne et Abrahmsen, 1989). Elle est également plus riche en résidus d'arginine et plus pauvre en résidus de lysine que la moyenne, ce qui s'explique probablement par son haut pourcentage génomique en G + C. La charge positive de la région N interagit avec la protéine SecA (Akita *et al.*, 1990), ce qui est considéré comme la première étape dans le processus de translocation par le système de sécrétion Sec.

#### 9.2.1.1.2 Région H

La région médiane du peptide signal est caractérisée par la présence de résidus d'acides aminés à chaîne latérale hydrophobe. D'une longueur moyenne de 10 à 15 résidus, la région H a tendance à former une hélice  $\alpha$  (von Heijne, 1985). La diminution de l'hydrophobicité de cette région diminue l'efficacité de la translocation (Pugsley, 1993), alors que son augmentation l'améliore (Chou et Kendall, 1990).

#### 9.2.1.1.3 Région C

La portion C-terminale du peptide signal, la région C, contient un résidu de proline ou de glycine en position -4 qui brise l'hélice  $\alpha$  formée par la région H. La région C contient aussi le site de clivage reconnu par la signal peptidase, composé d'un résidu d'alanine, suivi d'un résidu quelconque puis d'un autre résidu d'alanine (A-X-A). La région C adopte une

conformation en feuillet  $\beta$  qui permet sa reconnaissance par la signal peptidase. Le clivage du peptide signal s'effectue pendant ou après la translocation à travers la membrane par une signal peptidase de type I situé du côté externe de la membrane (van Roosmalen *et al.*, 2004).

### 9.2.1.2 Sécrétion post-traductionnelle : chaperonne SecB

Le précurseur peut être pris en charge pour la sécrétion par le système Sec pendant ou après sa synthèse. Lorsque le précurseur est complètement traduit dans le cytoplasme, une chaperonne le maintient dans un état « déplié » propre à la sécrétion Sec. La seule chaperonne dédiée à la sécrétion Sec est SecB, qui peut lier plusieurs précurseurs, mais pas tous. Sous forme active, SecB est constituée de quatre monomères de 16,6 kDa (Watanabe et Blobel, 1989). Le tétramère de SecB lie le précurseur dans sa portion mature dès sa sortie du ribosome.

Lié à SecB, le précurseur conserve sa forme dépliée compétente à la translocation Sec-dépendante. Le complexe SecB – préprotéine est reconnu par SecA, qui lie le peptide signal du précurseur ainsi que le feuillet  $\beta$  et l'hélice  $\alpha$  située à l'extrémité C-terminale de SecB (Randall *et al.*, 2004). L'activité de SecB est détaillée à la section des chaperonnes.

### 9.2.1.3 SecA

Le complexe formé entre le précurseur et la chaperonne SecB se lie à SecA, le « moteur » de sécrétion du système Sec. Grâce à sa fonction ATPasique, cette protéine de 102 kDa permet la translocation du précurseur à travers le pore formé par SecYEG. SecA fonctionne sous la forme d'un homodimère dont chaque monomère contient deux sites de liaison aux nucléotides (NBS, *nucleotide-binding site*). NBS-1 permet la fixation de l'ATP, alors que NBS-2 est un domaine de régulation de l'hydrolyse de l'ATP par NBS-1 (Mitchell et Oliver, 1993). SecA lie le complexe SecB - préprotéine à son extrémité C-terminale et interagit directement avec le peptide signal du précurseur via un site adjacent à NBS-1. La liaison d'une molécule d'ATP par SecA modifie sa structure tridimensionnelle qui pénètre alors partiellement dans la membrane en entraînant une portion du précurseur dans le complexe SecYEG, ce qui permet d'enclencher le processus de translocation tout en

relâchant SecB dans le cytoplasme (Fekkes *et al.*, 1997). En hydrolysant l'ATP, SecA reprend sa conformation initiale et ressort de la membrane, sans entraîner la portion du précurseur qu'elle y avait précédemment inséré. La force proton-motrice intervient alors en empêchant le précurseur de retourner dans le cytoplasme (Schiebel *et al.*, 1991; Driessen, 1992). Si la force proton-motrice est absente ou inversée, le précurseur retourne vers le cytoplasme. SecA lie à nouveau le précurseur et le cycle recommence jusqu'à ce que le précurseur ait traversé le pore de sécrétion. À chaque cycle, un segment de 2 à 2,5 kDa est engagé dans le pore de sécrétion (van der Wolk *et al.*, 1997).

#### 9.2.1.4 SecYEG

Le complexe de translocation SecYEG est hautement conservé chez les eucaryotes, eubactéries et archées (Veenendaal *et al.*, 2004). La plus grosse sous-unité est SecY. Cette protéine très hydrophobe de 48 kDa possède 10 domaines transmembranaires avec ses extrémités C- et N-terminales orientées du côté cytoplasmique (Akiyama et Ito, 1987). SecY, avec ses cinquième et sixième domaines cytoplasmiques, interagit avec SecA pour permettre son insertion dans la membrane (Matsumoto *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 2000). Cette insertion entraîne le précurseur dans le complexe SecYEG. À ce moment, le peptide signal est suffisamment engagé dans le pore pour que la signal peptidase reconnaisse le site de clivage du peptide signal (Schiebel *et al.*, 1991)

SecE est une petite protéine présentant 3 domaines transmembranaires chez *E. coli*. Cependant, chez la plupart des autres bactéries, elle ne conserve que le deuxième domaine cytoplasmique et le troisième domaine transmembranaire de SecE de *E. coli* (Murphy et Beckwith, 1994). Son association avec SecY protège cette dernière de la protéase FtsH, impliquée dans la dégradation des complexes protéiques membranaires non assemblés (Schatz *et al.*, 1991).

La protéine SecG est constituée de deux domaines transmembranaires reliés par une boucle cytoplasmique faiblement hydrophobe. Cette protéine n'est pas essentielle à la translocation par le système de sécrétion Sec. Sa fonction exacte n'a pas encore été déterminée. Il a été proposé que SecG stimulerait la sécrétion à basse température (Nishiyama *et al.*, 1994), ce

qui a été démenti par la suite (Bost et Belin, 1995; Flower, 2001). D'autres études suggèrent que SecG coopère avec SecA pour faciliter le déplacement du précurseur à travers la translocase SecYEG (Matsumoto *et al.*, 1998).

#### **9.2.1.5 SecD, SecF et YajC**

Les fonctions des trois protéines codées par l'opéron *secD*, soit SecD, SecF et YajC, restent à déterminer. Dans un mutant  $\Delta$ SecD et/ou  $\Delta$ SecF, la sécrétion des protéines Sec-dépendantes est diminuée sans être abolie (Pogliano et Beckwith, 1994). D'autre part, le mutant  $\Delta$ SecDFYajC ne parvient pas à maintenir sa force proton-motrice (Arkowitz et Wickner, 1994). Puisque les étapes tardives de la translocation Sec-dépendante sont tributaires de la force proton-motrice, la baisse de la sécrétion du mutant  $\Delta$ SecDFYajC est attribuable au manque de force proton-motrice plutôt qu'à l'absence de composantes essentielles de la translocase. Les boucles de SecD et SecF du côté externe de la membrane pourraient possiblement former une cavité comme la protéine AcrB appartenant à la même superfamille (Murakami *et al.*, 2002). Ce type de structure pourrait servir de havre pour le repliement des protéines, avec un largage contrôlé (Matsuyama *et al.*, 1993). Finalement, il a été suggéré que le complexe SecDFYajC stimule la pénétration partielle de SecA dans la membrane (Duong et Wickner, 1997) et inhibe sa sortie (Economou *et al.*, 1995).

#### **9.2.2 Sécrétion co-traductionnelle**

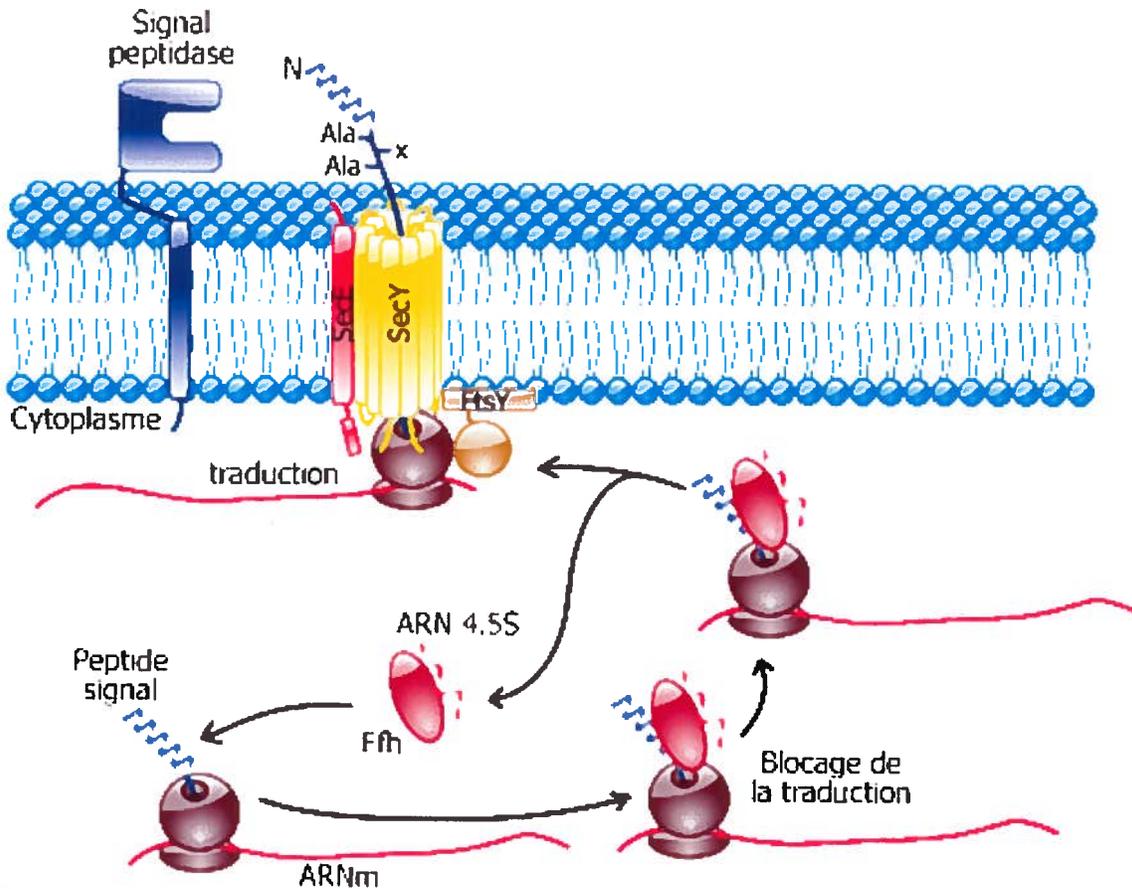
Mise en évidence tout d'abord chez les eucaryotes (Lutcke, 1995), la sécrétion par l'entremise d'un complexe ribonucléoprotéique nommé SRP (*Signal Recognition Particule*) a ensuite été identifiée chez les procaryotes. Ce type de sécrétion se déroule en trois étapes. Premièrement, lorsque le peptide signal du précurseur émerge du ribosome, SRP lie le peptide signal et arrête la traduction. Ensuite, ce complexe SRP-peptide-ribosome est dirigé jusqu'au récepteur de SRP à la membrane. Le complexe est reconnu par le récepteur et SRP est relâchée du ribosome et du peptide signal. Finalement, le ribosome se lie à la translocase Sec et la traduction peut reprendre pour achever la synthèse du précurseur qui est simultanément sécrété (Fekkes et Driessen, 1999). Ce processus a été nommé sécrétion co-traductionnelle.

Chez *E. coli*, les protéines Ffh (*Fifty-four homolog*) et FtsY ainsi que l'ARN 4.5S forment une version simplifiée de la voie SRP eucaryote (Romisch *et al.*, 1989; Gill et Salmond, 1990; Poritz *et al.*, 1990). Un système de sécrétion SRP simplifié a aussi été décelé chez *S. lividans*, formé des protéines Ffh, FtsY et d'un ARN de 82 nucléotides (Palacin *et al.*, 2003).

La protéine Ffh est constituée de 3 domaines. Le domaine N est situé à l'extrémité N-terminale, le domaine G possède une activité GTPase et le domaine M est riche en résidus de méthionine. Son homologue eucaryote SRP54 (54 kDa) est la sous-unité de la SRP qui interagit avec le peptide signal du précurseur (Kurzchalia *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 2002). Le domaine M permet de lier le ribosome et le domaine G permet la libération de la SRP lors de la liaison du complexe avec la translocase Sec (Romisch *et al.*, 1990; Zopf *et al.*, 1993).

FtsY est le récepteur du complexe SRP-peptide-ribosome (Luirink *et al.*, 1994; Powers et Walter, 1997). Elle s'associe à la membrane par liaison à SecY de la translocase Sec et par des interactions avec les lipides (Angelini *et al.*, 2006). FtsY contient un domaine de liaison du GTP et possède une activité GTPasique. La liaison du GTP et son hydrolyse sont deux évènements qui conditionnent l'interaction avec la SRP (Kusters *et al.*, 1995).

La sécrétion par la voie SRP procaryote est représentée à la figure 3. Lorsque le peptide signal sort du ribosome, la SRP s'y lie grâce au domaine M de Ffh, bloquant la traduction. Ce complexe est dirigé au récepteur FtsY, plus ou moins lié à la membrane. L'interaction entre la SRP et son récepteur catalyse l'hydrolyse du GTP par Ffh et FtsY. Ceci permet le transfert du peptide signal à la translocase Sec et la libération de la SRP. La traduction peut alors se poursuivre et la chaîne du précurseur traverse la translocase durant son élongation (Fekkes et Driessen, 1999). Le système de sécrétion Sec et SRP utilisent la même translocase, à l'exception de la protéine SecG qui n'est pas présente dans la voie SRP (Koch et Muller, 2000).



**Figure 3 : Schéma du système de sécrétion SRP chez les procaryotes.**

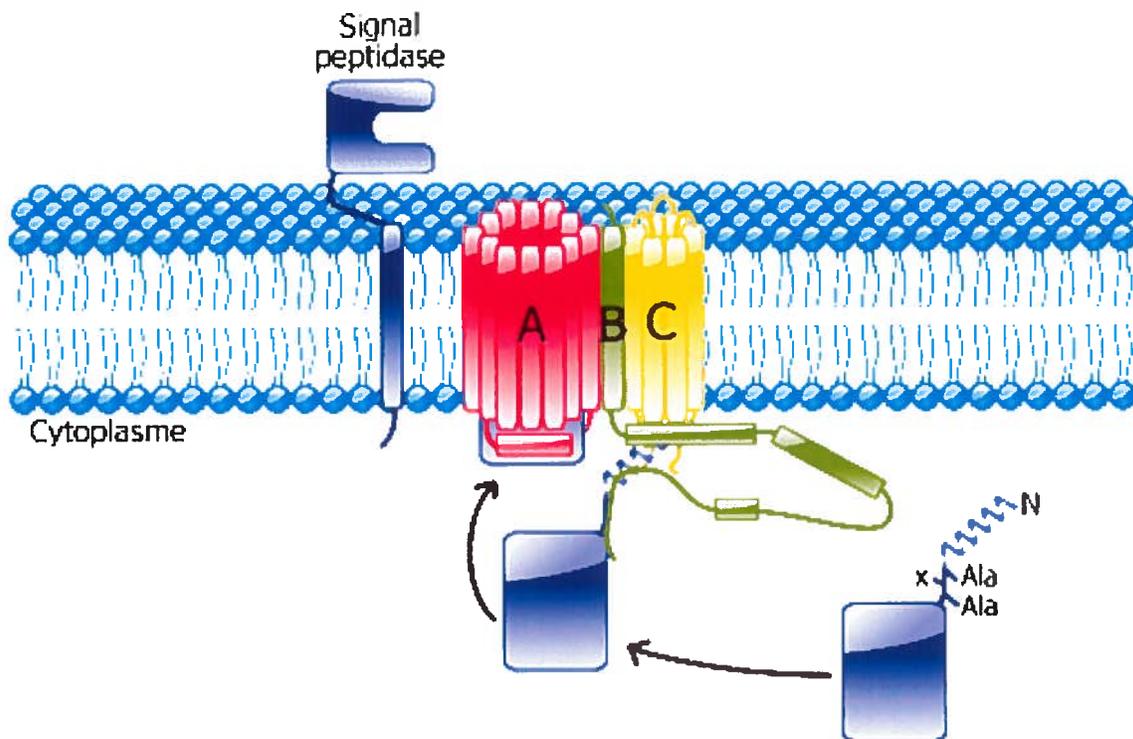
### 9.2.3 Système de sécrétion Tat

Contrairement au système Sec, le système de sécrétion Tat a comme caractéristique de sécréter à travers les membranes des protéines sous leur forme repliée. Des homologues des gènes qui codent pour les protéines de ce système ont été retrouvés chez les archées, les bactéries, les chloroplastes et les mitochondries des plantes (Yen *et al.*, 2002). Chez les bactéries, le système de sécrétion Tat permet la sécrétion d'enzymes redox contenant un co-facteur, de certaines protéines membranaires, de protéines devant former un complexe avant la sécrétion et de protéines dont le repliement dans le cytoplasme est incompatible avec la sécrétion par le système Sec (Lee *et al.*, 2006). Contrairement au système de sécrétion Sec, le système Tat n'est pas essentiel à la survie des bactéries (Schaerlaekens *et al.*, 2001).

Les protéines destinées à la sécrétion par le système Tat sont synthétisées sous la forme d'un précurseur possédant un peptide signal à son extrémité N-terminale. Ce peptide signal

est similaire au peptide signal Sec au niveau de sa structure, mais possède des propriétés différentes permettant la discrimination entre les deux systèmes de sécrétion.

Chez *E. coli*, la translocase Tat est constituée de 3 protéines, TatA, TatB et TatC. La séquence exacte des évènements menant à la sécrétion et le rôle de chacune des protéines de la translocase restent à déterminer. Plusieurs observations nous permettent de dresser un portrait sommaire du mécanisme de translocation sans toutefois être définitif. La figure 4 représente un modèle possible du processus de sécrétion par le système Tat.

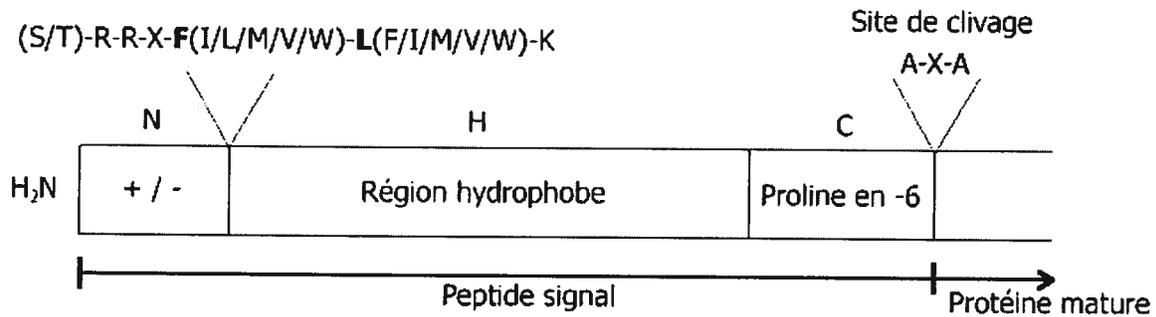


**Figure 4 : Schéma du système de sécrétion Tat.** Le système de sécrétion est représenté avec de multiples copies de TatA et une seule copie de TatB et TatC pour simplifier.

### 9.2.3.1 Peptide signal Tat

Le peptide signal Tat est composé en moyenne de 38 résidus d'acides aminés, comparativement à 24 pour le peptide signal Sec (Cristobal *et al.*, 1999). Comme son homologue Sec, le peptide signal Tat comporte trois régions, la région N en position N-terminale, la région H centrale et la région C à l'extrémité C-terminale. À l'interface des

régions N et H se trouve un motif consensus S/T-R-R-X-Φ-Φ-K, où X est normalement un résidu polaire et Φ est un résidu d'acide aminé hydrophobe (généralement une phénylalanine suivi d'une leucine). Le doublet de résidus d'arginine donne son nom au système de sécrétion Tat, pour *Twin-Arginine Translocation* (Chaddock *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 1998). Le peptide signal Tat est représenté à la figure 5.



**Figure 5 : Schéma d'un peptide signal de type Tat.**

#### 9.2.3.1.1 Région N

La région N des peptides signaux Tat contient quelques résidus d'acides aminés chargés. La charge nette positive de cette région est cependant moindre que celle de la région N du peptide signal Sec. Chez *E. coli*, la substitution d'un résidu d'arginine du doublet d'arginine dans le motif consensus par un résidu de lysine retarde la sécrétion, alors que le remplacement des résidus d'arginine par deux résidus de lysine abolit la sécrétion (Stanley *et al.*, 2000). Cependant, la protéine hétérologue colicine V (colV) fusionnée avec un peptide signal dont les deux résidus d'arginine ont été remplacés par des résidus de lysine est sécrétée malgré cette mutation (Ize *et al.*, 2002). Au moins deux protéines sont sécrétées par le système de sécrétion Tat sans présenter le doublet d'arginine dans leur motif consensus. La pré-pro-pénicilline amidase de *E. coli* possède la séquence R-N-R et transite par le système de sécrétion Tat grâce à l'action combinée des régions N et H du peptide signal qui compensent le changement de séquence par leur charge et hydrophobicité respectives (Ignatova *et al.*, 2002). De même, une sous-unité de la réductase de tétrathionate de *Salmonella enterica* (TtrB) possède la séquence K-R de façon naturelle tout en étant sécrétée via le système Tat (Hinsley *et al.*, 2001). Le motif consensus du peptide signal n'est donc pas le seul déterminant dans la sélection du système de sécrétion par la bactérie.

#### **9.2.3.1.2 Région H**

La région H du peptide signal Tat est de longueur semblable à la région H des peptides signaux Sec, mais elle est significativement moins hydrophobe. Cette faible hydrophobicité s'explique par la présence plus fréquente de résidus de glycine et de thréonine et une quantité moindre de résidus de leucine. L'hydrophobicité conférée par la région H permet de discriminer entre le système de sécrétion Sec et Tat, indépendamment de la présence du motif consensus. En augmentant l'hydrophobicité de la région H du peptide signal de la protéine Tat-dépendante TorA de *E. coli*, Cristobal et ses collaborateurs ont démontré que la protéine devenait Sec-dépendante (Cristobal *et al.*, 1999).

#### **9.2.3.1.3 Région C**

La région C du peptide signal Tat contient significativement plus de résidus de lysine et d'arginine que les peptides signaux Sec, deux acides aminés à chaîne latérale basique (Cristobal *et al.*, 1999). La présence d'acides aminés chargés positivement à proximité du site de clivage inhibe la sécrétion par le système Sec (von Heijne, 1986). La présence de ces résidus dans les peptides signaux Tat constitue donc une méthode supplémentaire de discrimination entre les systèmes de sécrétion. La position -6 par rapport au site de clivage est souvent occupée par un résidu de proline (Cristobal *et al.*, 1999), qui permet de briser l'hélice  $\alpha$  formée par la région H. Finalement, le site de clivage des peptides signaux Tat est typiquement A-X-A, bien qu'il puisse être muté sans engendrer de défaut de maturation de la protéine (Li *et al.*, 2006).

#### **9.2.3.2 Prédictions bioinformatiques de protéines Tat-dépendantes**

En recherchant le motif consensus à travers la séquence génomique d'un organisme, il est possible de déterminer quels gènes codent pour des protéines sécrétées par le système Tat. À cet effet, deux programmes informatiques ont été créés pour automatiser la recherche.

Le premier programme développé pour entreprendre ce type d'étude est TatFind. Après avoir observé la présence d'un peptide signal Tat chez une grande quantité de protéines sécrétées par l'archée halophile *Halobacterium sp.* NRC-1, Rose et ses collaborateurs ont développé le programme TatFind (Rose *et al.*, 2002). Ce programme codé en Perl se base

sur la position et la séquence du peptide signal et sur la position, la longueur et l'hydrophobicité de la région H suivant le doublet d'arginines. Parmi les 84 génomes bactériens analysés par ce programme, *S. coelicolor* A3(2) possède le plus grand nombre de protéines candidates à la sécrétion Tat avec 145 protéines, loin devant *Halobacterium spp.* (68), *E. coli* (34) et *Bacillus subtilis* (7) (Dilks *et al.*, 2003). En utilisant une version modifiée de ce programme pour analyser le génome de *S. coelicolor*, une liste de 230 gènes codant probablement pour des protéines Tat a été générée (Schaerlaekens *et al.*, 2004).

Un second programme nommé TatScan a été conçu pour la prédiction des substrats Tat. Ce programme codé en C++ recherche le motif consensus S/T-R-R-X-Φ-Φ-K dans les 70 premiers résidus d'acides aminés d'une séquence génomique codante en admettant un maximum de 2 erreurs, à la première et la dernière position du motif consensus seulement. Le génome de *S. coelicolor* A3(2) de souche M145 a d'abord été criblé par TatScan, puis les résultats ont été triés par le programme SignalP pour éliminer les protéines présentant leur séquence signal dans ou après un site de clivage par une signal peptidase. Cette liste épurée présente 129 gènes codant pour des protéines probablement sécrétées par le système Tat (Li *et al.*, 2005). Cette liste figure en annexe de ce document.

La première partie du travail de maîtrise sera de confirmer par des expériences *in vivo* la fiabilité des prédictions informatiques.

### 9.2.3.3 Translocase Tat

Les différents gènes codant pour les constituants du système de sécrétion Tat sont regroupés dans l'opéron *tatABCD*, à l'exception de *tatE*. Les protéines TatABCE possèdent toutes au moins un domaine transmembranaire alors que TatD est une désoxyribonucléase cytoplasmique qui, pour le moment, ne semble pas jouer de rôle dans la sécrétion. Chez *E. coli*, la translocase Tat est minimalement constituée des protéines TatA, TatB et TatC. TatE présente des homologies de séquence avec TatA et peut s'y substituer (Sargent *et al.*, 1998). Plusieurs bactéries à gram positif ne possèdent que TatC en plus d'une protéine présentant des caractéristiques de TatA et de TatB (Dilks *et al.*, 2003). Cependant, *S. lividans* présente une translocase formée de TatABC comme *E. coli* (Schaerlaekens *et al.*, 2001).

#### 9.2.3.3.1 TatC

TatC est la composante de la translocase Tat la plus conservée, particulièrement au niveau de la séquence de ses 6 domaines transmembranaires (Bogsch *et al.*, 1998). Plusieurs résidus d'acides aminés présents dans les boucles cytoplasmiques sont importants ou essentiels pour le fonctionnement de TatC et sont conservés à la fois chez les bactéries et les chloroplastes. TatC est essentielle à la sécrétion par le système Tat.

Lors de la translocation par le système Tat, le peptide signal Tat de la préprotéine est d'abord reconnu par TatC seul ou en combinaison avec TatB. TatC reconnaît une courte séquence autour des 2 arginines du motif consensus du peptide signal (Alami *et al.*, 2003). Cette reconnaissance s'effectue probablement à l'extrémité N-terminale et à la première boucle cytoplasmique de TatC, qui contiennent les résidus d'acides aminés essentiels au fonctionnement de la translocase Tat (Allen *et al.*, 2002).

Chez *B. subtilis*, deux formes de TatC existent, soit TatCd et TatCy. Chaque forme permet la reconnaissance et la sécrétion de substrats spécifiques et la fonction de l'un ne peut pas se substituer à l'autre (Jongbloed *et al.*, 2000). L'existence de ces paralogues substrat-spécifiques pour cette protéine suggère que TatC permet la discrimination entre les précurseurs pour la sécrétion Tat-dépendante.

#### 9.2.3.3.2 TatB

TatB est une protéine possédant une courte extrémité N-terminale située du côté extracytoplasmique, suivie d'un domaine transmembranaire, d'une courte région charnière, d'une hélice  $\alpha$  polaire qui longerait la face cytoplasmique de la membrane et finalement d'une extrémité C-terminale cytoplasmique non structurée (De Leeuw *et al.*, 2001). Les 70 résidus d'acides aminés C-terminaux ne sont pas nécessaires à la fonction de TatB. Cependant, la sécrétion Tat-dépendante est inhibée lorsque TatB est tronqué dans l'hélice  $\alpha$  (Lee *et al.*, 2002). Un mutant de *E. coli* doté d'une protéine TatB ne possédant pas de domaine transmembranaire ne peut pas sécréter de protéines Tat-dépendantes, bien que la protéine tronquée soit localisée à la membrane (De Leeuw *et al.*, 2001). Cette observation

suggère que le rôle du domaine transmembranaire est plus important qu'un simple point d'attache à la membrane.

TatB lie la région hydrophobe du peptide signal de la préprotéine ainsi que des portions adjacentes de la partie mature, situées jusqu'à 20 résidus en aval du site de clivage du peptide signal. La reconnaissance de la portion hydrophobe du peptide signal par TatB est toutefois impossible sans la présence de TatC (Alami *et al.*, 2003).

Un mutant de *E. coli*  $\Delta$ *tatABCDE* (Blaudeck *et al.*, 2003) a été complété avec un plasmide portant les gènes *tatA* et *tatC*. Ce mutant ne peut effectuer la translocation de la protéine TorA, qui nécessite la présence de la protéine TatB pour être sécrétée (Sargent *et al.*, 1999). Suite à la mutagenèse des gènes *tatAC* portés par le plasmide de complémentation, des mutants du gène *tatA* pouvant compenser pour l'absence de TatB et permettre la sécrétion de TorA ont été isolés. Ces gènes *tatA* mutants étaient tous le résultat d'une mutation située dans les 6 premiers résidus d'acide aminé. Une substitution d'acide aminé dans cette région de TatA qui lui donne une séquence similaire à la région N-terminale de TatB permet de restaurer la sécrétion de TorA (Blaudeck *et al.*, 2005). Ceci suggère que la courte région N-terminale de TatB, bien que située du côté extracytoplasmique de la membrane, joue un rôle essentiel pour une des fonctions de TatB.

#### **9.2.3.3.3 TatA**

TatA est 20 fois plus abondante que TatB et TatC, qui se trouvent dans un rapport 2 : 1 dans la translocase (Sargent *et al.*, 2001). TatA possède une structure similaire à TatB avec un domaine transmembranaire à son extrémité N-terminale, suivi d'une région charnière, d'une hélice  $\alpha$  et d'une queue C-terminale non structurée. Le domaine transmembranaire est nécessaire à la sécrétion Tat-dépendante et aux interactions avec TatB (Barrett et Robinson, 2005). La région charnière et l'hélice  $\alpha$  sont aussi importantes pour la fonction de TatA. La majeure partie des variants non fonctionnels d'une banque de mutants de *tatA* criblée par Hicks et ses collaborateurs possède une mutation dans l'une de ces deux régions (Hicks *et al.*, 2005). Les 30 derniers résidus d'acides aminés formant la portion non structurée ne sont pas essentiels à la fonction de TatA (Lee *et al.*, 2002).

Son abondance relative fait de TatA la candidate la plus probable pour former le pore de translocation. Chez *E. coli*, un complexe formé par TatABC composé majoritairement de TatA peut être purifié (de Leeuw *et al.*, 2002). En absence de TatBC, TatA forme des complexes oligomériques de 100 à 650 kDa (De Leeuw *et al.*, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002; Porcelli *et al.*, 2002). Ces observations ont mené au développement du modèle présenté à la figure 4, où des complexes de TatA de différentes tailles sont recrutés par le complexe TatBC en fonction de la taille de la préprotéine à sécréter, qui se trouve déjà sous forme repliée. Ce phénomène d'adaptation permet de minimiser l'espace non utilisé dans le pore de translocation, limitant ainsi la fuite possible d'ions à travers le pore durant la sécrétion (Mori et Cline, 2002). Le recrutement de TatA est dépendant de la présence de la préprotéine et de la force proton-motrice (Alami *et al.*, 2003). La façon dont la force proton-motrice intervient dans le processus de translocation Tat-dépendant reste à déterminer.

#### 9.2.3.4 TatD

Les gènes codant pour les sous-unités de la translocase Tat sont regroupés en un opéron incluant un quatrième gène, *tatD*, dont le produit est une désoxyribonucléase cytoplasmique. La région du génome entre les gènes *tatC* et *tatD* peut former une structure en boucle pouvant réduire la transcription du gène *tatD*, ce qui suggère que TatD est moins produite que les trois autres protéines codées par l'opéron. Chez *E. coli*, deux homologues ayant respectivement 29% et 24% d'identité de séquence avec TatD sont produits par les gènes *ycfH* et *yjjV*. Un triple mutant  $\Delta tatD \Delta ycfH \Delta yjjV$  ne présente pas de défaut de sécrétion pour la réductase de TMAO (TorA) ni pour la sous-unité A de la réductase de DMSO (DmsA), deux protéines Tat-dépendantes (Wexler *et al.*, 2000). L'implication de la protéine TatD dans la sécrétion par le système Tat, s'il en existe une, reste donc à démontrer.

### 9.2.3.5 TatE

La protéine TatE possède un domaine transmembranaire et une région charnière de longueur comparable à TatA et TatB. L'hélice  $\alpha$  qui suit est plus courte que celle de TatB et le reste de la chaîne est non structuré. Cette ressemblance est facilement explicable lorsqu'on considère le gène *tatE*, qui code pour une protéine ayant plus de 50% d'identité avec le produit du gène *tatA*. Le gène *tatE* proviendrait possiblement d'une duplication de gène cryptique à partir de *tatA* (Jack *et al.*, 2001). La fonction de TatE est interchangeable avec celle de TatA pour permettre la sécrétion Tat-dépendante. L'effet de la mutation  $\Delta$ TatE sur la sécrétion par le système Tat est toutefois très faible, alors qu'un double mutant  $\Delta$ TatAE peut bloquer la sécrétion Tat-dépendante (Sargent *et al.*, 1998). Le gène *tatE* a été trouvé jusqu'à maintenant dans le génome d'une seule bactérie à gram positif, *Corynebacterium glutamicum* (Kikuchi *et al.*, 2006).

### 9.3 Signal peptidases

Pendant ou peu après la sécrétion d'un précurseur par le système de sécrétion Sec ou Tat, une signal peptidase sépare le peptide signal de la protéine mature par clivage. Le site de reconnaissance des signal peptidases est situé à l'extrémité C-terminale du peptide signal. Sa séquence est généralement A-X-A où X est un résidu d'acide aminé quelconque. Ce site est hautement conservé (Perlman et Halvorson, 1983; Fikes *et al.*, 1990), bien que des mutations peuvent éliminer le site de clivage des peptides signaux Tat sans créer de défaut de maturation (Li *et al.*, 2006).

Les signal peptidases procaryotes de type I prennent en charge la majorité des précurseurs. Les signal peptidases des bactéries à gram positif possèdent un domaine transmembranaire à leur extrémité N-terminale servant de point d'ancrage et un domaine enzymatique du côté C-terminal (Tjalsma *et al.*, 1997). Une seconde classe de signal peptidase de type I possède deux domaines transmembranaires. Ces enzymes sont retrouvées exclusivement chez les bactéries à gram négatif. Des programmes informatiques comme SignalP et TatP permettent de reconnaître les séquences codant pour un peptide signal à travers un génome complet et peuvent prédire les sites de clivage de ces peptides signaux (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2005).

### 9.3.1 Signal peptidases des bactéries à gram positif

La plupart des organismes possèdent une seule signal peptidase de type I, comme *E. coli* (Zwizinski et Wickner, 1980). Le nombre de signal peptidases varie pour certains microorganismes, jusqu'à l'exceptionnel *B. subtilis* avec 7 signal peptidases, dont 5 chromosomiques (Tjalsma *et al.*, 1998) et 2 d'origine plasmidique (Meijer *et al.*, 1995).

La présence de multiple signal peptidases dans un même organisme reste un mystère. Chez *B. subtilis*, il a été démontré que la vitesse de translocation des précurseurs excède celle du clivage du peptide signal (van Dijl *et al.*, 1992). Une plus grande disponibilité des signal peptidases via leur plus grand nombre pourrait conférer un avantage compétitif à la bactérie.

Quatre gènes contigus du génome de *S. lividans* codent pour des signal peptidases de type I. Les gènes *sipW*, *sipX* et *sipY* forment un opéron alors que *sipZ* est le premier gène de l'opéron adjacent, qui contient 3 autres gènes sans incidence sur les peptides signaux (Parro *et al.*, 1999). En exprimant les quatre gènes indépendamment chez un mutant de *E. coli* exempt de signal peptidase, les mutants produisant SipW ou SipX sont très peu actifs, tandis que ceux produisant SipY ou SipZ clivent efficacement le peptide signal de la chitosanase utilisée comme protéine témoin (Geukens *et al.*, 2001). Un mutant de *S. lividans* pour chacun des gènes *sip* a été créé pour déterminer l'importance relative de chaque enzyme. Seul le mutant  $\Delta sipY$  présente des défauts de sécrétion, suggérant un rôle majeur de SipY dans la sécrétion des protéines (Palacin *et al.*, 2002). Une analyse comparative de sécrétomes suggère cependant que SipW, SipX ou SipZ peuvent partiellement compenser pour la perte de SipY (Escutia *et al.*, 2006).

### 9.4 Principales chaperonnes impliquées dans la sécrétion des protéines

Les chaperonnes moléculaires forment un groupe de protéines aux fonctions multiples. Les chaperonnes interagissent avec des protéines ou leur précurseur pour les aider à atteindre leur conformation finale (Lund, 1995). Elles peuvent favoriser le repliement de certaines chaînes polypeptidiques afin qu'elles adoptent leur conformation tridimensionnelle finale. Au contraire, elles peuvent empêcher le repliement d'une chaîne polypeptidique afin qu'elle conserve sa forme compétente à la translocation Sec-dépendante, ou encore pour prévenir

certains repliements hâtifs incompatibles avec la structure de la protéine mature. Les protéines chaperonnes peuvent prévenir l'agrégation et la dégradation de protéines mal repliées en corrigeant le repliement à la faveur de la forme active de la protéine. Elles entrent dans la réponse cellulaire à certains stress, notamment thermique, oxydatif et salin, ainsi qu'à la présence de certains éléments potentiellement létaux comme des antibiotiques ou des rayons ultraviolets. Finalement, les protéines chaperonnes jouent aussi un rôle dans l'assemblage de certains complexes multiprotéiques (Fink, 1999; Ben-Zvi et Goloubinoff, 2001).

#### **9.4.1 SecB**

La protéine chaperonne SecB est la seule protéine chaperonne dédiée au système de sécrétion Sec. Elle permet de maintenir certains précurseurs comme OmpA, TolB et MalE de *E. coli* dans une conformation dépliée compétente à la sécrétion Sec lors de la sécrétion post-traductionnelle (Watanabe *et al.*, 1988; Baars *et al.*, 2006).

Chez *E. coli*, SecB peut interagir avec de courtes chaînes protéiques destinées à la sécrétion ou à localisation cytoplasmique, durant ou suite à leur traduction (Ullers *et al.*, 2004). SecB lie certains peptides signaux de protéines sécrétées par le système Sec avec une forte affinité, par exemple MalE. D'autres peptides signaux Sec comme celui de OmpF n'ont qu'une faible affinité pour SecB. Des peptides signaux Tat comme celui de la phosphatase alcaline possèdent une affinité pour SecB, alors que d'autres, incluant celui de la lipoprotéine de la membrane externe (OML, *Outer Membrane Lipoprotein*) de *E. coli*, n'ont pas d'affinité pour SecB (Knoblauch *et al.*, 1999). Ces résultats démontrent que la sélection des substrats par SecB n'est pas fonction des différences entre les peptides signaux.

SecB interagirait plutôt avec la portion mature du précurseur (Randall *et al.*, 1990), durant ou après la traduction (Kumamoto et Francetic, 1993; Randall *et al.*, 1997). Aucun motif exact de liaison n'a été identifié (Kim et Kendall, 1998). Plusieurs études suggèrent que SecB lie les précurseurs dans leur portion mature à de multiples sites avec une faible affinité, mais que l'ensemble de ces liaisons résulte en une interaction assez forte (Topping et Randall, 1994; Khisty *et al.*, 1995). Les caractéristiques des sites de liaison possibles

entre SecB et son substrat ont été définies. Ces sites contiennent au moins 3 résidus d'acides aminés basiques ou aromatiques. La présence de chaque résidu d'acide aminé à chaîne latérale acide doit être compensée par un autre résidu basique. S'il n'y a pas de résidus aromatiques, il doit y avoir au moins 4 charges positives nettes présentes. Finalement, la position des résidus chargés et aromatiques n'a pas d'importance. Notons que 2 résidus aromatiques côte à côte ne contribuent pas plus à l'affinité avec SecB qu'un résidu aromatique seul à la même position. Des motifs répondant à ces caractéristiques sont retrouvés à tous les 20 à 30 résidus d'acides aminés de la séquence des substrats Sec connus de *E. coli* (Knoblauch *et al.*, 1999).

De tels motifs ont aussi été retrouvés chez des protéines du cytosol, indiquant que SecB ne peut discriminer les précurseurs devant être sécrétés des protéines cytoplasmiques sur la base de l'interaction seulement. Il a été proposé que la vitesse de repliement du précurseur régit sa possibilité d'association avec SecB (Hardy et Randall, 1991). Selon ce modèle, la présence d'un peptide signal ralenti le repliement, favorisant la liaison avec SecB et la sécrétion par le système Sec. Ce modèle est cependant remis en question puisque SecB peut aussi lier des protéines repliées (Zahn *et al.*, 1996).

Deux mutations dans le peptide signal de PhoA, une protéine Sec sans interaction avec SecB, permettent de rendre PhoA dépendant de SecB pour sa sécrétion, bien que SecB n'interagisse pas avec le peptide signal (Kim *et al.*, 2000). Cette observation a mené à l'hypothèse que tous les précurseurs transitant par le système Sec sont capables de se lier à SecB. La perte de SecB pour les protéines interagissant bien avec la translocase n'aurait aucun effet. De tels précurseurs peuvent interagir avec la translocase seuls ou avec d'autres chaperonnes. Ce modèle permet aussi de penser que certaines protéines classées indépendantes de SecB pourraient quand même s'y lier selon certaines conditions.

Kumamoto et Beckwith ont démontré qu'un mutant de *E. coli* où le gène *secB* est éliminé n'est viable que sur milieu minimal et non-viable sur milieu riche (Kumamoto et Beckwith, 1985). Des études subséquentes ont proposé qu'une surproduction de  $\sigma^{32}$ , le facteur de transcription de la réponse au choc thermique, puisse rétablir la croissance en milieu riche

sans que DnaK, GroEL ni GroES ne soient impliquées (Altman *et al.*, 1991). Cependant, l'incapacité du mutant à croître en milieu riche s'expliquerait par la perte d'expression du gène *gpsA* par le mutant  $\Delta SecB$ . Ce gène code pour une sn-glycérol-3-phosphate déshydrogénase impliquée dans la synthèse des phospholipides. La région codante de ce gène commence dans le codon de terminaison de *secB*. La délétion du gène *secB* entraîne donc l'inactivation de *gpsA*, ce qui cause le phénotype de croissance interrompue sur milieu riche (Shimizu *et al.*, 1997). La protéine SecB n'est pas essentielle à la survie des bactéries (Baars *et al.*, 2006).

Aucun homologue de cette protéine n'a été retrouvé chez une bactérie à gram positif, malgré la présence d'un système de sécrétion Sec fonctionnel (Fekkes et Driessen, 1999). Dans le cadre de cette étude, une partie des expériences visait à mettre en évidence une chaperonne homologue à SecB dans le système de sécrétion Sec chez *S. lividans*.

#### **9.4.2 Protéines de choc thermique (HSP)**

En réponse à une élévation subite de la température, les bactéries surproduisent des protéines (*Heat Shock Protein*, HSP) dont certaines agissent comme chaperonnes. Les HSP sont classées selon leur poids moléculaire. Elles sont impliquées dans le repliement de protéines nouvellement synthétisées ou dénaturées. Certaines HSP possèdent une activité protéolytique. Elles peuvent aussi entrer dans l'assemblage et le transport de certaines protéines (Georgopoulos et Welch, 1993).

##### **9.4.2.1 HSP60 et HSP10**

La HSP60 GroEL et la HSP10 GroES sont parmi les protéines les plus abondantes dans le cytoplasme de *E. coli* en conditions normales de culture. GroEL est un oligomère de 14 sous-unités d'un poids moléculaire d'environ 57 kDa. GroES contient de 6 à 8 sous-unités d'un poids moléculaire d'environ 10 kDa chacun (Walter, 2002). Codées par l'opéron *groE*, ces deux protéines sont essentielles à la croissance de *E. coli* (Fayet *et al.*, 1989).

Des études *in vivo* démontrent que GroEL parvient à former un complexe stable avec des précurseurs sécrétés par le système Sec (Lecker *et al.*, 1989) et en stimule la sécrétion

(Kusukawa *et al.*, 1989). La chaperonne parvient aussi à se lier à la membrane cytoplasmique de *E. coli*, ainsi qu'à la protéine SecA associée à la membrane (Bochkareva *et al.*, 1998). La  $\beta$ -galactosidase, une protéine cytoplasmique, fusionnée à un peptide signal Sec, peut être sécrétée lorsque GroEL est surexprimé (Phillips et Silhavy, 1990). Le complexe GroEL/GroES permet de désassembler et de diriger des agrégats formés de la protéine virale VP1 vers la machinerie de dégradation cellulaire (Wrobel *et al.*, 2000). Ces observations démontrent que les protéines GroEL et GroES agissent comme des chaperonnes générales sur un ensemble de protéines.

Le mécanisme par lequel ces deux chaperonnes assistent au repliement de certains précurseurs tient de leur structure tridimensionnelle. GroEL forme une structure cylindrique d'un diamètre de 137 Å sur 146 Å de hauteur (Braig *et al.*, 1994). Ses 14 sous-unités s'assemblent pour former deux anneaux empilés l'un sur l'autre. Chaque anneau comprend une cavité d'environ 45 Å de diamètre qui permet de ségréguer un substrat du cytoplasme. La structure cylindrique peut être divisée en 3 régions. Le domaine équatorial est constitué principalement d'hélices  $\alpha$  qui servent de fondations à l'oligomère et forment des sites de liaison de l'ATP. Le domaine intermédiaire sert de charnière moléculaire pour faire la liaison entre les domaines équatorial et apical. Finalement, le domaine apical, situé à l'ouverture de chaque cavité, contient des sites de liaison aux substrats et à GroES (Buckle *et al.*, 1997; Chen et Sigler, 1999).

GroES forme une structure en forme de dôme d'un diamètre de 75 Å constitué presque exclusivement de feuillets  $\beta$  (Hunt *et al.*, 1996). Ce dôme se lie au domaine apical de GroEL pour chapeauter sa cavité. Cette liaison nécessite la présence d'ATP ou d'ADP aux sites de liaison du domaine équatorial de GroEL (Jackson *et al.*, 1993).

GroEL lie donc un polypeptide dans une de ses cavités, le protégeant de l'agrégation avec les autres protéines cytoplasmiques. Des molécules d'ATP sont liées, puis GroES se lie sur GroEL et ferme la cavité, où le polypeptide peut assumer une conformation repliée ou dépliée. Après l'hydrolyse de l'ATP, GroES se retire et le polypeptide sort de la cavité de

GroEL dans une conformation compétente à la translocation ou prête à effectuer sa fonction (Walter, 2002).

#### 9.4.2.2 HSP70 et HSP40

Les chaperonnes d'environ 70 kDa forment le groupe principal des protéines de choc thermique, les HSP70. Leur expression est à la fois constitutive et inductible suite à un stress cellulaire (Nicoll *et al.*, 2006). Parmi celles-ci, la protéine de *E. coli* DnaK est la chaperonne la plus étudiée. Elle possède une faible activité ATPasique modulable par DnaJ et GrpE. Lorsque DnaK est liée à une molécule d'ATP, elle présente une faible affinité pour son substrat. L'hydrolyse de l'ATP en ADP permet une haute affinité de liaison avec des protéines (Mayer *et al.*, 2000).

Les HSP40 possèdent un domaine J d'environ 70 acides aminés qui est nécessaire pour les interactions avec les HSP70. Chez *E. coli*, la HSP40 DnaJ possède un domaine J de 73 résidus d'acides aminés à son extrémité N-terminale (Bardwell *et al.*, 1986). Les HSP40 sont importantes comme co-chaperonnes lors du recrutement d'une HSP70 pour accélérer l'hydrolyse de l'ATP, normalement très faible pour une HSP70 seule (Kelley, 1998). D'autres HSP40, comme GrpE et Hip chez *E. coli*, facilitent ou empêchent le largage du substrat par HSP70 (Liberek *et al.*, 1991; Hohfeld *et al.*, 1995).

Deux études récentes ont démontré l'implication de la chaperonne DnaK dans la sécrétion par le système Tat chez *E. coli*. Une mutation éliminant DnaK abolit la sécrétion de la protéine Tat-dépendante CueO, mais pas de DmsA, YcdB ni HiPIP. Comme le HiPIP sauvage, le HiPIP fusionné au peptide signal de CueO est sécrété sans la présence de DnaK. Ceci indique que le peptide signal de CueO n'est pas en cause dans la sécrétion de CueO, mais que le domaine mature de la protéine crée la dépendance à DnaK (Graubner *et al.*, 2007). En créant une substitution du doublet d'arginine par un doublet de lysine dans un peptide signal Tat fusionné à la GFP, Pérez-Rodríguez et ses collaborateurs ont démontré que la stabilité conférée par la liaison avec DnaK n'était pas due à la présence du motif consensus dans le peptide signal (Perez-Rodríguez *et al.*, 2007). Il semble donc que DnaK

joue le rôle de chaperonne générale du système de sécrétion Tat, mais que son activité soit restreinte à un sous-ensemble de précurseurs en fonction de leur portion mature.

Chez *E. coli*, l'élimination de DnaK, DnaJ et GrpE n'affecte pas la sécrétion des protéines SecB-dépendantes. Cependant, dans une souche sans SecB, une surproduction de ces chaperonnes compense pour la mutation (Wild *et al.*, 1993), ce qui suggère une possible implication de ces chaperonnes dans la sécrétion par le système Sec.

#### **9.4.2.3 HSP100**

Les HSP100 sont des enzymes qui catalysent directement des changements structuraux sur leurs substrats via une activité ATPasique. Ce sont des « dépliases » qui agissent sur des complexes protéiques repliés et assemblés, ainsi que sur des protéines agrégées ou incorrectement repliées (Burton et Baker, 2005).

La première HSP100 à être identifiée est la Clp (*Caseinolytic Protease*) de *E. coli*, une protéase à deux composantes, ClpA et ClpP, qui dégrade la caséine (Katayama-Fujimura *et al.*, 1987). En se basant sur cette protéine, un mécanisme de fonctionnement a été suggéré, bien que certains points restent obscurs. Le processus de dégradation est enclenché lorsque ClpA lie une protéine par une courte séquence peptidique située à une extrémité du substrat (Kenniston *et al.*, 2004). Par un mécanisme encore inconnu nécessitant plusieurs cycles d'hydrolyse d'ATP, la protéine est dénaturée. Le substrat est alors dirigé à ClpP, la seconde composante de l'enzyme possédant une activité de peptidase, pour la dégradation (Burton et Baker, 2005).

La fonction de ClpA serait similaire à celle de DnaK. Tout comme DnaK et DnaJ, ClpA permet d'activer RepA, une protéine impliquée dans la réplication du plasmide P1 de *E. coli*. ClpA protège aussi la luciférase d'une inactivation par la chaleur de façon ATP-dépendante, une fonction partagée par DnaK (Wickner *et al.*, 1994).

Les protéines non repliées sont sensibles aux protéases, alors que les formes correctement repliées sont résistantes à la dégradation. À haute concentration, des protéines non repliées

peuvent former des agrégats qui sont résistants à la protéolyse. La protéine ClpB désassemble ces agrégats pour rendre les protéines mal repliées disponibles pour la dégradation. Cependant, ClpB ne s'associe pas à la peptidase ClpP comme le fait ClpA (Schirmer *et al.*, 1996). L'activité de cette HSP100 est donc un simple remodelage protéique, qui permet subséquemment un réassemblage ou une protéolyse. Ce remodelage fonctionne avec la machinerie DnaK pour dégrader des protéines de haut poids moléculaire dénaturées par la chaleur (Mogk *et al.*, 1999).

Bien qu'aucune démonstration de l'implication de ces chaperonnes dans la sécrétion n'ait été faite jusqu'à maintenant, leur interaction avec la machinerie DnaK et leur fonction de « dépliase » sont compatibles avec des étapes de la sécrétion de précurseurs.

#### **9.4.3 Catalyseurs du repliement**

Les chaperonnes favorisent le repliement et l'assemblage des précurseurs en protéines matures sans former ou briser de liens covalents (Georgopoulos, 1992). Deux classes d'enzymes sont des catalyseurs du repliement qui permettent des changements covalents nécessaires pour le repliement efficace de certains précurseurs. Les peptidyl disulfide isomérasés et les peptidyl prolyl *cis/trans* isomérasés sont des enzymes qui catalysent de tels repliements sans briser ou former de nouveaux liens covalents, avec une faible spécificité de substrat, à l'image des chaperonnes.

##### **9.4.3.1 Peptidyl disulfide isomérasés**

Les ponts disulfures se formant entre les groupements sulfhydryles de la chaîne latérale des résidus de cystéine sont importants pour le repliement correct de plusieurs protéines. Un agent oxydant est nécessaire à la formation de ces ponts (Noiva, 1994). La protéine périplasmique DsbA de *E. coli* permet la formation de ponts disulfures grâce à son action oxydante. Un mutant  $\Delta$ DsbA de *E. coli* présente un niveau de sécrétion inférieur pour plusieurs protéines, incluant OmpA et la phosphatase alcaline (Bardwell *et al.*, 1991).

#### 9.4.3.2 Peptidyl prolyl *cis/trans* isomérases

La nature du groupement aminé cyclique secondaire de la proline permet l'adoption d'une conformation *cis* ou *trans*. Généralement, une seule conformation permet le repliement correct de la protéine, bien que certaines protéines présentent une hétérogénéité de la conformation d'un ou de quelques liens peptidyl-prolyl (Andreotti, 2003). Les peptidyl prolyl *cis/trans* isomérases catalysent l'isomérisation des liens peptidyl-prolyl pour permettre le repliement efficace des protéines (Gothel et Marahiel, 1999). Le *trigger factor* est une protéine d'environ 60 kDa (Crooke et Wickner, 1987) possédant un site enzymatique peptidyl prolyl *cis/trans* isomérase ainsi qu'un site de liaison à la sous-unité 50S des ribosomes (Stoller *et al.*, 1995). Son site de liaison à la sous-unité ribosomale 50S lui permet d'interagir avec les polypeptides à leur sortie du ribosome.

Chez *E. coli*, la délétion du gène *tig* codant pour le *trigger factor* n'est pas létale (Guthrie et Wickner, 1990). Cependant, l'élimination du *trigger factor* fait doubler la quantité de polypeptides qui interagissent avec la chaperonne DnaK. Un double mutant n'exprimant pas de *trigger factor* ni de DnaK n'est pas viable en conditions normales de culture (Teter *et al.*, 1999). Ces observations indiquent des fonctions similaires sur un même groupe de protéines pour les deux chaperonnes.

Chez *E. coli*, le précurseur de OmpA, une protéine Sec-dépendante (Sugai et Wu, 1992), forme un complexe stable et compétent pour la translocation avec SecB, GroEL ou le *trigger factor* (Lecker *et al.*, 1989). Des études sur les sites de liaisons des différentes protéines chaperonnes SecB, DnaK, DnaJ, GroEL, GroES et du *trigger factor* démontrent que ces chaperonnes lient les précurseurs à des régions similaires disséminées tout le long de leur séquence. Ces séquences sont composées de résidus d'acides aminés hydrophobes et basiques, mais rarement de résidus acides (Rudiger *et al.*, 1997; Patzelt *et al.*, 2001; Deuerling *et al.*, 2003). La complémentarité fonctionnelle et la similarité des sites de liaison des chaperonnes GroEL, GroES, SecB, DnaK, DnaJ et du *trigger factor* suggère une compétition pour le même ensemble de précurseurs (Ullers *et al.*, 2007).

La maturation d'un précurseur en une protéine correctement repliée et localisée nécessite donc l'intervention d'une ou de plusieurs chaperonnes. Les précurseurs Tat, déjà repliés dans le cytoplasme, nécessitent vraisemblablement la présence de chaperonnes pour leur repliement, leur maintien dans une conformation propre à la translocation Tat et leur signalisation jusqu'à la translocase Tat. Dans le cadre de cette maîtrise, une partie des expériences a consisté à mettre en évidence une chaperonne impliquée dans le système de sécrétion Tat chez *S. lividans*.

## 10. Matériels & méthodes

Chacun des milieux de culture, des solutions spéciales et des plasmides utilisés dans le cadre de cette étude est détaillé en annexe.

### 10.1 Souches bactériennes

La souche bactérienne utilisée pour la découverte de protéines sécrétées par le système Tat est *Streptomyces lividans* 10-164. Cette souche est un mutant de la souche sauvage 1326 dans laquelle le système de transport de la cellobiose et du xylobiose, les inducteurs de l'expression des gènes codant pour les cellulases et les xylanases, est aboli. *S. lividans* 10-164 est donc un mutant cellulases et xylanases négatif (Hurtubise *et al.*, 1995). Son mutant *S. lividans* 10-164  $\Delta$ tatC possède une mutation au niveau du gène *tatC* qui inhibe la translocation des précurseurs de protéines Tat à travers la membrane cytoplasmique par le système de sécrétion Tat (Faury *et al.*, 2004).

Les souches IAF906A2his et IAF916Chis utilisées pour la recherche de chaperonnes des systèmes de sécrétion Sec et Tat sont des clones de *S. lividans* 10-164 contenant respectivement les plasmides pIAF906A2his et pIAF916Chis. Chaque plasmide code pour une xylanase modifiée contenant une étiquette de 6 histidines (*his-tag*) à son extrémité C-terminale, soit la xylanase A2 (pIAF906A2his) ou la xylanase C (pIAF916Chis) (Voir l'annexe E pour les cartes des plasmides).

### 10.2 Milieux de culture

Afin d'obtenir la plus grande diversité de protéines sécrétées possible, plusieurs milieux de culture liquides contenant différentes sources de carbone ont été utilisés. Tous les milieux sont préparés à partir du milieu minimum M14 à pH 7,4 auquel on ajoute du xylose, du glucose, de la chitine ou un extrait de terre à une concentration finale de 1% (Page *et al.*, 1996).

Les milieux avec chitine ont été préparés avec de la chitine colloïdale, obtenue à partir de chitine de grade de laboratoire (*Practical Grade from Crab Shells, Sigma*) selon la méthode de Hsu et Lockwood (Hsu et Lockwood, 1975). Quarante grammes de chitine broyée sont

dissous dans 400 mL de HCl 12N et incubés pendant 1h30. La chitine colloïdale formée est précipitée dans l'eau milli-Q, lavée jusqu'à pH 3 et lyophilisée. La chitine colloïdale lyophilisée est prête à l'usage.

La terre utilisée pour la préparation de l'extrait de terre a été prélevée dans un sous-bois sur les rives du lac Saint-Louis dans les Laurentides. La location a été choisie pour sa diversité d'essences d'arbres et l'odeur caractéristique révélant la présence abondante de Streptomycètes. Les débris recouvrant une zone d'environ 1 m<sup>2</sup> ont été retirés et 4 L de terre de surface (jusqu'à une profondeur d'environ 10 cm) ont été récupérés. L'extrait a été préparé selon le protocole proposé par l'université du Texas. La terre est séchée puis 40 g de terre sont suspendus dans un volume final de 100 mL d'eau milli-Q. La suspension est stérilisée à l'autoclave, 1 heure à 121°C. On incube cette suspension 24 heures à température pièce, puis elle est stérilisée à l'autoclave de nouveau.

### **10.3 Récupération et concentration des protéines sécrétées**

Les bactéries sont cultivées dans des erlenmeyers de 150 mL contenant 20 mL de milieu pendant 48 heures à 34°C. La culture est alors centrifugée 10 minutes à 2500 rpm et le surnageant est décanté. Les cellules sont lavées trois fois en les suspendant dans du milieu de culture frais. Les cellules sont incubées dans du milieu frais pendant 24 heures à 34°C. Les bactéries sont éliminées de la culture par centrifugation à 10000 rpm pendant 5 minutes puis par filtration du surnageant sur un filtre de 0,45 µm. Les protéines contenues dans ce filtrat sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à une concentration finale de 10%. Après une heure d'incubation sur glace, les protéines sont récupérées par centrifugation à 10000 rpm pendant 30 minutes. Le culot est séché sur glace pendant une heure, puis lavé 3 fois à l'acétone froide pour enlever le TCA. Chaque étape de lavage est suivie d'une centrifugation de 30 minutes à 15000 rpm. Les protéines du culot sont solubilisées dans un tampon de réhydratation. La quantité de protéines est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

### **10.4 Détermination de la concentration protéique par la méthode de Bradford**

Le volume de l'échantillon est ajusté à 800 µL par de l'eau milli-Q. Deux cents microlitres de réactif de Bradford (*Bio-rad*) sont ensuite ajoutés et la solution est incubée 15 minutes à la température de la pièce. Une courbe standard est établie à partir d'échantillons contenant de 10 à 50 µg par mL de  $\gamma$ -globuline. La densité optique (D.O.) de chaque échantillon est lue à 595 nm (*Pharmacia LKB Ultrospec III*). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée en rapportant sa densité optique sur la courbe étalon en tenant compte du facteur de dilution.

## 10.5 Électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (*Two Dimensional Electrophoresis*, 2-DE) permet de séparer successivement les protéines d'un échantillon selon leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. La première dimension, nommée focalisation isoélectrique, est réalisée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide portant des ampholines qui permettent d'établir un gradient linéaire de pH. Ce gel est fourni commercialement sous forme de bandelettes pré-préparées. Puisque la charge nette des protéines varie selon le pH, les protéines migreront dans le gel jusqu'à ce qu'elles atteignent leur point isoélectrique, soit le pH auquel leur charge nette est nulle. La deuxième dimension procède d'une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) qui permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Les protéines sont finalement localisées grâce à une coloration à l'argent.

### 10.5.1 Étapes de la première dimension

L'échantillon de protéines à séparer est dilué dans un tampon de réhydratation/lyse pour obtenir la quantité de protéine et le volume de solution recommandés par le fabricant des *Immobiline™ DryStrip* (GE Healthcare) selon le gradient de pH et la longueur des bandelettes utilisées. Une quantité de 50 µg de protéines dans 250 µL de tampon par bandelette est suffisante pour permettre une bonne résolution.

La solution contenant les protéines est alors déposée au fond d'un puit du support de réhydratation (*Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare) sur environ un centimètre de moins que la longueur de la bandelette utilisée. On retire le plastique protecteur de la bandelette portant le gel déshydraté à l'aide d'une pince préalablement lavée à l'éthanol 70% pour éliminer les risques de contamination de l'échantillon. La bandelette est déposée sur la solution contenant les protéines, le gel faisant face à l'échantillon, pour la réhydratation. L'ensemble est recouvert d'huile minérale (*Sigma*) pour éviter l'évaporation. L'hydratation s'effectue toute la nuit, ou pour une durée de 10 à 20 heures.

Après l'hydratation, la bandelette est retirée du support et l'excès d'huile est éliminé par buvardage du côté plastifié sur papier Kimwipe (*Kimtech*). On place la bandelette, le côté

du gel vers le haut, dans le support général à bandelettes (*Ettan IPGphor strip holder, GE Healthcare*). Des papiers semi-humides mesurant environ 15 mm sur 7 mm sont déposés à 5 mm de chaque extrémité de la bandelette. Les électrodes sont ensuite disposées sur ces papiers. Ce montage est installé sur la plaque de l'IPGphor (*GE Healthcare*), rempli d'huile minérale et recouvert du couvercle.

La focalisation isoélectrique des bandelettes de 7 cm se fait selon le programme suivant :

500 V	30 minutes	250 Vhr
1000 V	30 minutes	500 Vhr
2000 V	1 heure	2000 Vhr
3000 V	1 heure	3000 Vhr
4000 V	Environ 50 minutes	3250 Vhr
Total	Environ 4 heures	9000 Vhr

La focalisation isoélectrique des bandelettes de 13 cm se fait selon le programme suivant :

500 V	30 minutes	250 Vhr
1000 V	45 minutes	750 Vhr
2000 V	1 heure	2000 Vhr
3000 V	1 heure	3000 Vhr
4000 V	1 heure	4000 Vhr
5000 V	1 heure	5000 Vhr
6000 V	45 minutes	4500 Vhr
Total	6 heures	19500 Vhr

### 10.5.2 Étapes de la deuxième dimension

Une fois la focalisation isoélectrique terminée, on élimine l'excès huile de la bandelette par buvardage du côté plastifié sur un papier Kimwipe. Les protéines sont dénaturées et leurs ponts disulfures sont réduits en baignant la bandelette 15 minutes avec agitation dans la solution d'équilibration A (DTT 1% (*GE Healthcare*), 6 M urée, 2% SDS, 30% glycérol et 4,5 mM Tris pH 8,8).

La bandelette est ensuite incubée 15 minutes avec agitation dans la solution d'équilibration B (2,5% iodoacétamide (*Sigma*), 6 M urée, 2% SDS, 30% glycérol et 4,5 mM Tris pH 8,8) pour prévenir la reformation des ponts disulfures lors des étapes subséquentes.

Sur un gel de polyacrylamide de 12% contenant du SDS et de 1,5 mm d'épaisseur, on coule 1 mL d'une solution liquéfiée d'agarose 1%, bleu de bromophénol 0,005%. En maintenant le côté plastifié de la bandelette collé sur la vitre, on la fait glisser dans l'agarose. On forme ensuite un puits dans l'agarose de chaque côté de la bandelette en insérant un peigne (*Bio-Rad 165-1873 Protean II xi Comb*) modifié comportant une seule dent à chaque extrémité. Une fois que l'agarose est gélifié, le peigne est retiré. Le gel est fixé à son support (*Bio-Rad 165-1806 Protean II xi central cooling core*) et déposé dans la cuve à électrophorèse (*Bio-Rad 165-1807 Protean II xi buffer tank*). Avec 2,5 L de tampon Tris-glycine 1X pH 8,3, on remplit le réservoir supérieur, puis le réservoir inférieur avec l'excédant de tampon. Les deux puits sont chargés avec 10 µL d'une solution de marqueur de poids moléculaire *Broad Range* (*BioRad*) diluée 1 : 20 dans du tampon Laemmli 1X. On procède à l'électrophorèse à 30 V pour 30 minutes, puis 75 V jusqu'à la sortie du front de migration repéré par le bleu de bromophénol (environ 18 heures).

## 10.6 Coloration à l'argent

La coloration à l'argent offre plusieurs avantages comparativement à celle au bleu de Coomassie. Entre autres, il suffit d'environ une heure pour colorer un gel de polyacrylamide à l'argent, alors qu'il faut compter plusieurs heures (8 et plus) pour les étapes de coloration et décoloration nécessaires au bleu de Coomassie. Le seuil de détection est aussi beaucoup plus bas ; alors que le bleu de Coomassie permet de détecter de 50 à 100 ng de protéines, l'argent permet de visualiser des protéines présentes entre 1 et 10 ng seulement. Le protocole de coloration à l'argent a été optimisé à partir du protocole proposé par Shevchenko (Shevchenko *et al.*, 1996).

Après l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide est fixé dans une solution éthanol 50%, acide acétique 5% pendant 30 minutes avec agitation. Le gel est ensuite lavé 3 fois à l'eau milli-Q durant 5 minutes pour éliminer l'acide. On sensibilise le gel en le baignant 5 minutes dans une solution de sodium thiosulfate 0,02% avec agitation, suivi de 2 rinçages de 5 minutes à l'eau milli-Q . Le gel est alors incubé dans une solution de nitrate d'argent 0,1% durant 20 minutes avec agitation, à l'abri de la lumière. Après l'incubation, la solution de nitrate d'argent est éliminée et le gel est rincé à l'eau milli-Q durant une minute, puis développé dans une solution de formaldéhyde 0,04% et de carbonate de sodium 2% avec une forte agitation. On renouvelle le développeur lorsqu'il devient jaunâtre. Une fois qu'on atteint l'intensité de coloration voulue, on élimine le développeur, on rince brièvement à l'eau milli-Q puis on arrête le développement en immergeant le gel dans une solution d'acide acétique 5% pendant 5 minutes avec agitation. Le gel peut ensuite être conservé dans une solution de stockage (éthanol 30% et glycérol 4%) à 4°C à l'abri de la lumière.

## 10.7 Électrophorèse bidimensionnelle différentielle à fluorescence

Le principe de l'électrophorèse bidimensionnelle différentielle à fluorescence (Fluorescence 2D Differential Gel Electrophoresis, 2-DIGE) est de séparer dans un même gel des protéines provenant de deux échantillons différents afin de les comparer. Les protéines de chaque échantillon sont marquées à l'aide de fluorochromes distincts, ce qui permet de les différencier après électrophorèse. Les fluorochromes Cy3 et Cy5 possèdent un groupement NHS-ester qui permet leur attachement de façon covalente au groupement amine  $\epsilon$  des lysines contenues dans les protéines. Ces fluorochromes possèdent une charge positive qui remplace celle de la lysine abolie lors du marquage ainsi qu'un poids moléculaire spécifique, ce qui élimine la variation possible du point isoélectrique et du poids moléculaire des protéines marquées. Le traitement des deux échantillons simultanément et dans les mêmes conditions facilite leur comparaison. Précédemment, pour faire les mêmes analyses, il fallait traiter chaque échantillon individuellement et superposer les patrons d'électrophorèse, ce qui pouvait fausser l'analyse dû à des variations inhérentes à la technique. Le 2-DIGE n'est limité que par le nombre de fluorochromes différents disponibles. On peut ainsi analyser en une seule expérience plusieurs échantillons à la fois.

### 10.7.1 Marquage des échantillons

Comme les fluorochromes sont sensibles à la lumière, toutes les manipulations sont effectuées à l'obscurité. Les marqueurs fluorescents déshydratés Cy3 et Cy5 (*CyDye DIGE Fluors for Ettan DIGE, GE Healthcare*) sont reconstitués dans du diméthyleformamide (DMF) anhydre (*USB corporation*) à une concentration finale de 1 mM chacun, conformément aux directives du fabricant.

Les protéines de chaque échantillon sont suspendues dans une solution de réhydratation / lyse sans DTT à raison de 50  $\mu\text{g}$  de protéines dans un volume de 45  $\mu\text{L}$ . Une solution fraîche de 400 pmol de chaque fluorochrome dans un volume de 4  $\mu\text{L}$  est ajoutée à chaque échantillon. Dans nos expériences, le Cy3 marque les protéines sécrétées par la souche sauvage, tandis que le Cy5 marque les protéines sécrétées par la souche mutante. Les solutions sont vortexées, centrifugées brièvement et incubées sur glace 30 minutes. Le marquage est arrêté en ajoutant 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de lysine 10 mM suivi d'une incubation

de 10 minutes. On ajoute 50  $\mu$ L de tampon d'échantillon 2X à chaque échantillon et on incube pendant 10 minutes sur la glace. Les deux échantillons marqués sont ensuite combinés pour procéder à l'électrophorèse bidimensionnelle telle que décrite précédemment, toujours à l'abri de la lumière.

#### **10.7.2 Révélation de la fluorescence**

Le gel est visionné à l'aide d'un *Typhoon™ Variable Mode Imager* (GE Healthcare) équipé du logiciel *ImageQuant 5,2* (Molecular Dynamics). Les marqueurs peuvent être révélés individuellement ou en même temps en les excitant à une longueur d'onde de 550 nm pour Cy3 et 649 nm pour Cy5, pour ensuite effectuer la lecture à 570 nm pour Cy3 et 670 nm pour Cy5.

#### **10.8 Chromatographie d'affinité**

La chromatographie d'affinité permet de purifier une protéine à partir d'un mélange complexe. Un des systèmes employés dans cette étude est l'utilisation d'une colonne de sépharose-nickel capable de retenir des protéines contenant une queue d'histidine (*his-tag*). Ces protéines sont ensuite éluées par des concentrations croissantes d'imidazole.

La seconde méthode employée dans cette étude est l'utilisation d'une colonne d'immuno-affinité sur laquelle des anticorps sont immobilisés. Les protéines retenues par les anticorps sont éluées à l'aide d'une solution acide.

En recueillant le précurseur de xylanase A2 ou C par chromatographie d'affinité, on tente de récupérer en même temps la ou les protéines qui leur seraient éventuellement associées.

## **10.8.1 Préparation des colonnes de chromatographie**

### **10.8.1.1 Colonne de sépharose-nickel**

Une matrice de sépharose sur laquelle des ions nickel sont immobilisés permet de récupérer les protéines dont la séquence possède une affinité pour les ions nickel. L'addition d'un *his-tag* à une protéine lui confère une affinité aux ions nickel supérieure à celle des autres protéines. Des colonnes HisTrap™ (*GE Healthcare*) prêtes à l'usage ont été utilisées pour toutes les expériences de chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel.

### **10.8.1.2 Colonne d'immuno-affinité**

Une matrice de sépharose traitée au bromure de cyanogène (*CNBr-sépharose*) permet d'immobiliser une ou plusieurs protéines de son choix de manière covalente, créant ainsi une colonne d'affinité très spécifique pour des expériences de chromatographie. La colonne d'immuno-affinité utilisée est constituée d'anticorps anti-xylanase C qui ont eux-mêmes été purifiés au préalable sur une colonne d'affinité contenant de la xylanase C. Les protocoles de la préparation de gel de CNBr-sépharose, la fixation des protéines et l'élution des protéines retenues par affinité sont adaptés des protocoles proposés par le fabricant (*Amersham Bioscience*).

#### **10.8.1.2.1 Préparation d'un gel de CNBr-sépharose avec xylanase C fixée**

Un gramme de CNBr-sépharose lyophilisé est gonflé 30 minutes à 4°C dans 20 mL de HCl 1 mM froid. Le gel gonflé est lavé 20 fois avec 10 mL de HCl 1 mM froid, puis 2 fois avec 10 mL de tampon de couplage froid. Le gel est ensuite incubé 16 heures à 4°C en présence d'une solution de 1,26 mg de xylanase C par mL dans un tube de 15 mL avec rotation. Le surnageant est ensuite éliminé avant d'ajouter 5 mL de tampon de blocage et d'incuber 4 heures à la température de la pièce avec rotation. Le gel est ensuite lavé 8 fois en alternance avec 10 mL de tampon de lavage I et 10 mL de tampon de lavage II, puis 10 fois avec 10 mL de PBS. Finalement, le gel est conservé à 4°C dans une solution de PBS et azoture de sodium 0,1% jusqu'à utilisation.

#### **10.8.1.2.2 Immuno-purification des anticorps anti-xylanase C**

Quarante mL de sérum de lapin contenant des anticorps polyclonaux dirigés contre la xylanase C sont centrifugés 10 minutes à 13000 rpm pour enlever les particules. Avec une agitation délicate, 32 mL de solution saturée de sulfate d'ammonium sont ajoutés goutte à goutte au surnageant, puis brassés une heure pour précipiter les anticorps. La solution est centrifugée 15 minutes à 4000 rpm et le surnageant est décanté. Le précipité contenant les anticorps est solubilisé dans 10 mL de PBS et les anticorps sont précipités de nouveau en ajoutant 8 mL de solution saturée de sulfate d'ammonium goutte à goutte avec agitation délicate. On laisse précipiter pendant une heure, puis la solution est centrifugée 15 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est décanté et le précipité est dissout dans 5 mL de PBS. Cette solution d'anticorps est dialysée 16 heures contre du PBS à 4°C.

Suite à la dialyse, les anticorps anti-xylanase C sont purifiés au contact de 2 mL d'un gel de CNBr avec xylanase C fixée. Cette mixture est agitée par rotation pendant 16 heures à 4°C. Ce gel est ensuite lavé avec du PBS dans une mini-colonne jusqu'à ce que la D.O.<sub>280</sub> soit stable. Les anticorps retenus sur la colonne sont élués avec 10 mL de tampon d'éluion Glycine-HCl 0,1 M et NaCl 0,15 M à pH 2,8. Pour neutraliser le pH de l'éluât, chaque mL est récupéré individuellement dans des tubes eppendorfs contenant chacun 60 µL de Tris-HCl 1 M à pH 8,5. Suite à une lecture de la D.O.<sub>280</sub> de chaque tube d'éluât, les 4 tubes formant le pic d'éluion des anticorps sont combinés et dialysés 16 heures à 4°C contre un tampon de couplage.

#### **10.8.1.2.3 Préparation d'un gel de CNBr-sépharose avec anticorps anti-xylanase C fixés**

On gonfle 1 g de gel lyophilisé de CNBr-sépharose dans 20 mL de HCl 1 mM froid pendant 30 minutes à 4°C. Le gel est lavé 20 fois avec 10 mL de HCl 1 mM froid, puis 2 fois avec 10 mL de tampon de couplage froid. Le gel et la solution d'anticorps sont introduits dans un tube de 15 mL stérile et incubés 16 heures à 4°C avec rotation.

Le gel de CNBr avec les anticorps fixés est centrifugé brièvement et le surnageant est décanté. On ajoute 5 mL de tampon de blocage au gel et on incube 4 heures à la température

de la pièce avec rotation. Le gel est ensuite lavé 8 fois en alternance avec 10 mL de tampon de lavage I et 10 mL de tampon de lavage II. Finalement, le gel est lavé 10 fois avec 10 mL de PBS. Le gel de CNBr avec les anticorps anti-xylanase C est conservé dans une solution de PBS et azoture de sodium 0,1% jusqu'à utilisation.

### **10.8.2 Préparation des cellules**

L'extrait cellulaire est préparé à partir d'une culture de 400 mL d'un clone sur-exprimant la xylanase A2 ou C munie d'une queue d'histidine. Après 72 heures d'incubation à 34°C, les cellules sont récupérées par centrifugation à 5000 rpm durant 10 minutes. On lave le culot de cellules une fois avec du tampon phosphate de sodium 20 mM et NaCl 0,5 M à pH 7,4, puis on centrifuge à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est décanté. Pour la chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel, le culot de cellules est suspendu à nouveau dans 30 mL d'un tampon 40 ou 100 mM imidazole, 20 mM phosphate de sodium et 0,5 M NaCl à pH 7,4. Pour la chromatographie d'affinité sur colonne d'immuno-affinité, le culot de cellules est suspendu dans 30 mL de PBS.

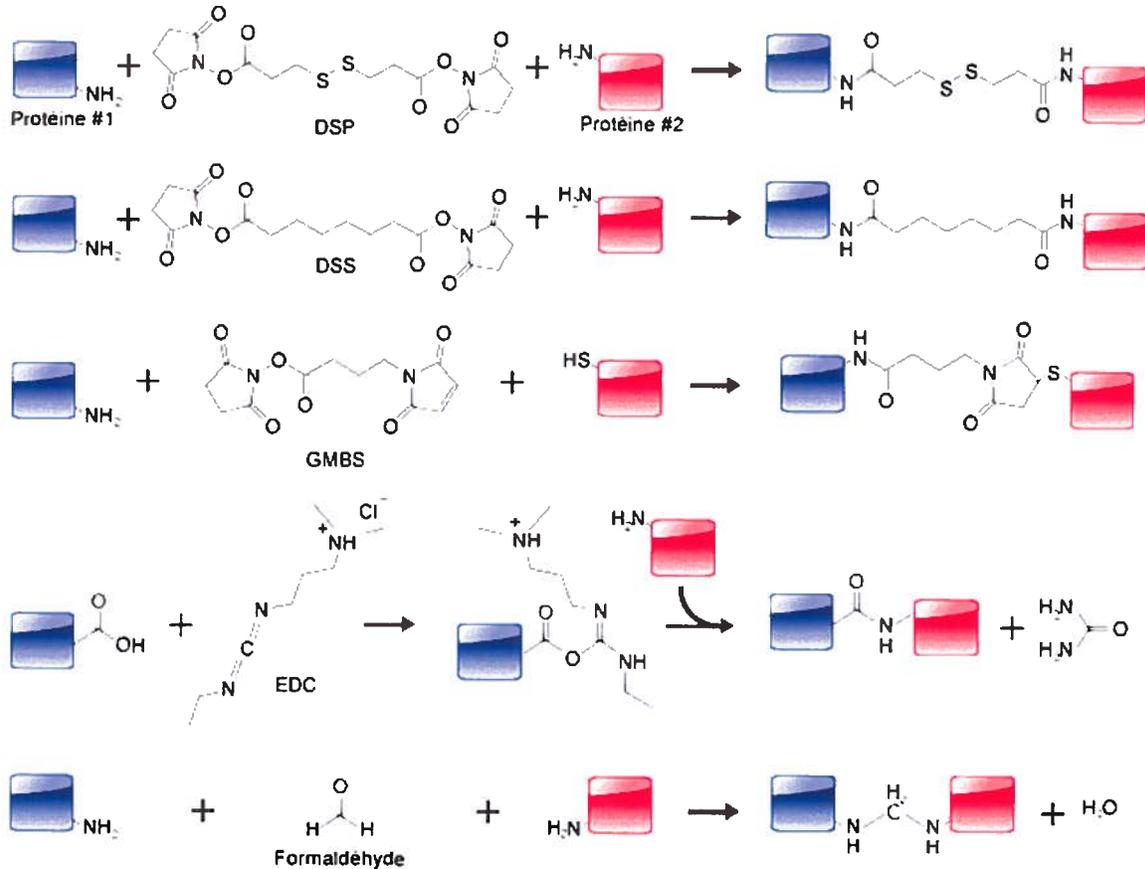
#### **10.8.2.1 Formation de liaisons réticulaires**

Des essais d'association protéique ont été tentés à cette étape avec différentes molécules nommées *cross-linkers* pour fixer par un lien covalent l'association momentanée d'une éventuelle chaperonne avec le précurseur. La figure 6 présente le mode d'action de chacun de ces *cross-linkers*. Le dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP), le disuccinimidyl suberate (DSS) et le n-[g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS) (*Sigma*) sont des *cross-linkers* qui traversent librement les membranes. Ils sont solubilisés dans le diméthyle sulfoxyde (Dimethyl sulfoxide, DMSO, *Laboratoire MAT*) puis ajoutés directement aux cellules intactes à une concentration finale de 1 mM. La réaction de liaison dure 30 minutes à la température de la pièce. Il n'est pas nécessaire d'arrêter la réaction du GMBS, mais il faut terminer celles par le DSP et le DSS par l'ajout de Tris-HCl 1 M pH 7,5 à une concentration finale de 20 mM, suivit d'une incubation de 15 minutes.

Parce que le 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) (*Pierce*) est soluble dans l'eau, ce *cross-linker* est introduit dans la solution de protéines après la lyse

des cellules. On ajoute de l'EDC et du sulfo-NHS (*Pierce*) à des concentrations finales respectives de 2 mM et 5 mM. Après 15 minutes d'incubation, la réaction initiale est arrêtée en ajoutant du  $\beta$ -mercaptoéthanol jusqu'à une concentration de 20 mM. On incube cette solution 2 heures à la température de la pièce pour la réaction de liaison secondaire. Finalement, cette réaction secondaire est terminée en ajoutant du Tris-HCl 1 M pH 7,5 jusqu'à une concentration finale de 20 mM.

Le formaldéhyde permet de lier des protéines en formant des ponts méthylènes entre les amines primaires. Le formaldéhyde est ajouté aux cellules à une concentration finale de 0,6% et cette suspension est incubée 30 minutes à la température de la pièce. La réaction est arrêtée en ajoutant du Tris à une concentration finale de 125 mM et cette solution est incubée 15 minutes à la température de la pièce. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes puis suspendues dans 30 mL de PBS. Les liaisons créées par cette technique peuvent être clivées en chauffant les échantillons au bain-marie à 65°C pendant un minimum de 4 heures.



**Figure 6. Cross-linkers utilisés lors des expériences de liaison réticulaire.** Le DSP et le DSS possèdent chacun deux extrémités NHS-ester pouvant lier les amines primaires ( $-\text{NH}_2$ ) retrouvées chez les lysines dans leur chaîne latérale ainsi qu'à l'extrémité N-terminale de chaque polypeptide. Le GMBS possède une extrémité NHS-ester et une extrémité maleimide, qui elle réagit avec les groupements sulfhydryles retrouvés dans la chaîne latérale des résidus cystéines. L'EDC peut lier les amines primaires avec les groupes carboxyles dans une réaction en deux étapes qui génère un sous-produit isourée. Finalement, le formaldéhyde lie les amines primaires en formant un pont méthylène.

### 10.8.2.2 Inhibition du système de sécrétion Sec

L'inhibition du système de sécrétion Sec est effectuée en ajoutant 10 mM d'azoture de sodium (*J.T. Baker Chemical Co.*) ou 1 mM de carbonyl cyanamide m-chlorophenylhydrazone (CCCP, *Sigma*), 10 minutes avant de casser les cellules.

### 10.8.3 Préparation de l'extrait protéique

Les cellules sont cassées à la presse de French à 10000 psi par 3 passages ou plus de l'échantillon pour libérer les protéines intracellulaires. Le lysat cellulaire est centrifugé 10 minutes à 10000 rpm pour éliminer les cellules intactes et les parois cellulaires. Pour se

débarrasser des membranes, le surnageant est ultracentrifugé à 40000 rpm pendant 30 minutes (160000 g dans un rotor *Beckman Coulter* 80-Ti), puis filtré sur un filtre de 0,45 µm. Le surnageant est ensuite passé à travers la colonne d'affinité.

#### **10.8.4 Chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel**

Une colonne de sépharose-nickel HisTrap™ (*GE Healthcare*) de 1 mL ou de 5 mL est équilibrée avec 10 volumes de colonne d'un tampon 40 ( pour la xylanase A2) ou 100 mM imidazole (pour la xylanase C), 20 mM phosphate de sodium et 0,5 M NaCl à pH 7,4. L'échantillon est adsorbé à la matrice de la colonne par trois passages successifs à faible débit (environ 2,5 mL / minute) à l'aide d'une pompe péristaltique (*LKB Broma 2132 microperpex peristaltic pump*). La colonne est ensuite lavée avec 150 volumes de colonne de tampon d'équilibration. On élue les protéines adsorbées avec 5 volumes de colonne de tampon d'élution contenant 100, 250 ou 500 mM imidazole, dans un tampon 20 mM phosphate de sodium et 0,5 M NaCl à pH 7,4. L'éluât est dialysé contre l'eau milli-Q pendant 20 heures, puis lyophilisé (*VirTis Freezemobile 12 EL*) toute la nuit. Les protéines lyophilisées sont solubilisées dans 100 µL d'eau milli-Q. La concentration en protéine des échantillons est déterminée par la technique de Bradford avant l'électrophorèse.

#### **10.8.5 Chromatographie d'affinité sur colonne d'immuno-affinité**

Le gel de CNBr-sépharose avec anticorps anti-xylanase C est introduit dans une mini-colonne. Après avoir éliminé la solution de conservation, le gel est équilibré avec 30 mL de PBS à pH 7,4. L'échantillon protéique à purifier est ensuite chargé sur la colonne par 3 passages successifs à faible débit au moyen d'une pompe péristaltique. Le gel est alors lavé avec 200 mL de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (ou plus) jusqu'à ce que la D.O.<sub>280</sub> soit stable pour éliminer les protéines non-spécifiques aux anticorps anti-xylanase C. Les protéines spécifiquement adsorbées aux anticorps du gel sont éluées avec 10 mL de tampon d'élution à pH 2,8 dans un tube stérile contenant 600 µL de tampon Tris-HCl 1 M à pH 8,5 pour neutraliser l'acidité du tampon d'élution. L'éluât est alors dialysé 20 heures contre de l'eau milli-Q, puis lyophilisé toute la nuit. Les protéines sont récupérées dans 100 µL d'eau milli-Q et la concentration en protéine de cette solution est déterminée par la méthode de Bradford avant l'électrophorèse.

## **10.9 SDS-PAGE**

Chaque échantillon de concentration connue est suspendu dans le tampon de Laemmli avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le gel de séparation est formé de polyacrylamide 12%, surmonté d'un gel de regroupement de polyacrylamide 4%. Les réservoirs supérieur et inférieur sont remplis de tampon Tris-glycine 1X à raison de 500 mL pour les mini-gels et de 2,5 L pour les gels de 17 cm. Les échantillons sont incubés à 100°C pendant 5 minutes et ensuite chargés dans les puits du gel. On procède à la migration des protéines comme suit : pour les mini-gels, 30 V pendant 10 minutes et 200 V jusqu'à la sortie du front de migration; pour les gels de 17 cm, 30 V pendant 30 minutes et 70 V jusqu'à la sortie du front de migration.

## **10.10 Immunobuvardage de type Western sur membrane de nitrocellulose**

### **10.10.1 Transfert semi-humide sur membrane de nitrocellulose**

Trois papiers filtres épais imbibés de tampon de transfert (*Whatman 3MM Chr*) de la taille du gel de polyacrylamide contenant les protéines à transférer sont empilés les uns sur les autres sur la plaque positive humidifiée à l'eau milli-Q d'une chambre d'électrophorèse horizontale (*Pharmacia LKB Multiphor II*). On y dépose ensuite une membrane de nitrocellulose (*Bio-Rad pure cellulose membrane 0,45  $\mu$ m*) de la taille exacte du gel de polyacrylamide et humidifié de tampon de transfert, puis le gel de polyacrylamide. Les bulles d'air sont chassées en roulant une tige de verre à la surface du gel. On complète le montage en déposant sur le gel 3 autres papiers filtres imbibés de tampon de transfert. La plaque négative est humidifiée à l'eau milli-Q et installée sur le montage de transfert. Un courant de 0,8 mA / cm<sup>2</sup> de surface de gel est appliqué pendant 60 minutes. Une fois le transfert complété, le gel est éliminé et la membrane est mise à sécher à l'air ambiant.

### **10.10.2 Immunobuvardage de type Western**

L'immunobuvardage se fait selon les directives du manufacturier de la trousse *Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen)*. La membrane est d'abord trempée dans une solution de blocage pour 30 minutes avec agitation, puis rincée 2 fois à l'eau milli-Q pendant 5 minutes. On incube la membrane avec une solution de 5  $\mu$ L de sérum contenant les anticorps primaires de lapin dirigés contre la protéine à détecter dans 10

mL de solution de blocage pendant une heure avec agitation. La membrane est lavée 4 fois 5 minutes avec une solution de lavage, puis on l'incube avec la solution d'anticorps secondaires anti-lapins couplés à la phosphatase alcaline pendant 30 minutes avec agitation. La membrane est rincée 4 fois avec la solution de lavage, puis 3 fois avec de l'eau milli-Q. Cinq mL d'un substrat chromogénique incolore contenant du chlorure de Nitro-blue tetrazolium (NBT) et du sel de 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine (BCIP) sont ajoutés. La peroxydase couplée aux anticorps secondaires hydrolyse le lien phosphodiester du substrat chromogénique, qui est alors oxydé pour former un produit violet insoluble qui précipite autour de l'enzyme, colorant la membrane (entre 1 minute et 1 heure), ce qui indique la présence d'une protéine reconnue par l'anticorps primaire. La membrane est rincée 3 fois à l'eau milli-Q pour arrêter la réaction, puis séchée à l'air.

#### **10.11 Analyse en spectrométrie de masse**

Les bandes d'intérêt séparées sur gel de polyacrylamide sont découpées et envoyées pour identification au service de spectrométrie de masse de l'INRS-Institut Armand-Frappier dirigé par le Pr. François Lépine. Les bandes y sont lavées pendant 10 minutes dans des tubes eppendorfs avec 500  $\mu$ L d'un tampon de carbonate d'ammonium 100 mM sous agitation. On ajoute 500  $\mu$ L d'acétonitrile 100% de grade HPLC (*Sigma*) et les tubes sont agités pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et on ajoute 50  $\mu$ L d'acétonitrile. Après 15 minutes d'incubation à la température de la pièce, le liquide est éliminé et les échantillons sont séchés grâce à un évaporateur à vide *Speed-Vac* (SVC 100H, *Savant Instruments Inc.*) relié à une trappe de condensation réfrigérée (*Savant Instruments Inc.*) et à une pompe à vide (Cenco-Megavac Vacuum Pump, *Central Scientific Co.*). On réduit les protéines avec 160  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / DTT pendant 30 minutes à 60°C. Les échantillons sont ensuite refroidis jusqu'à la température de la pièce, puis les protéines sont alkylées à l'abri de la lumière avec 10  $\mu$ L d'iodoacétamide 100 mM pendant 30 minutes. Après l'incubation, le liquide est éliminé et 500  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM sont ajoutés aux échantillons, qu'on agite 10 minutes. On ajoute ensuite 500  $\mu$ L d'acétonitrile 100%, puis on agite 15 minutes. Le liquide est éliminé et 50  $\mu$ L d'acétonitrile sont ajoutés pour une incubation à la température de la pièce de 15 minutes. Le solvant est éliminé et les échantillons sont séchés au *Speed-Vac*. On digère les protéines durant 15 minutes à la

température de la pièce avec une solution de 0,2 µg de trypsine suspendue dans du tampon NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM. On ajoute du tampon de façon à recouvrir le gel, puis on incube toute la nuit à 37°C.

Les peptides générés par la digestion des protéines à la trypsine sont ensuite extraits du gel. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C avec 50 µL d'une solution d'acétonitrile 60% et acide trifluoroacétique 0,1%. Les tubes sont agités pendant 5 minutes et les liquides contenant les peptides sont récupérés. L'extraction est répétée et les extraits d'une même protéine sont combinés. Les résidus sont éliminés par une centrifugation d'une minute et les surnageants sont récupérés dans des tubes eppendorf propres. Les échantillons sont asséchés au *Speed-Vac* et suspendus dans 20 µL d'acide trifluoroacétique 1% pour l'analyse en spectrométrie de masse.

L'appareil utilisé pour l'analyse en spectrométrie de masse est équipé d'une colonne de chromatographie C18 de 75 µm qui sépare les peptides avant leur entrée selon leur hydrophobicité. Les sels pouvant nuire à l'analyse sont éliminés grâce à une trappe C18. L'appareil (Q-Trap LC/MS/MS, *Applied Biosystems / MDS SCIEX*) détecte les ions et sélectionne les trois plus intenses. Ils sont fractionnés en fonction de leur charge et de leur rapport m/z respectifs et des patrons de fragmentation sont générés. Le logiciel d'analyse Mascot Server 2,0 (*Matrix Science, London, U.K.*) recherche quelles protéines peuvent engendrer les peptides présentant de tels patrons de fragmentation dans des banques de données. Le logiciel crée une liste de ces protéines en partant de la plus probable en fonction de la qualité des patrons de fragmentation et du nombre de peptides assignés.

## 11. Résultats

### 11.1 Protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans*

Contrairement aux protéines sécrétées par le système Sec, les protéines sécrétées par le système Tat sont repliées dans le cytoplasme de la bactérie avant leur sécrétion. Une des particularités du système de transport Tat est que les protéines qui vont être sécrétées par ce système possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale qui comporte une signature dont le consensus est S/T-R-R-X-Φ-Φ-K, où X est un résidu quelconque et Φ est un résidu d'acide aminé hydrophobe. À partir de ce motif particulier, un programme informatique nommé TatFind a été créé pour analyser les génomes bactériens connus pour déterminer, parmi les protéines potentiellement sécrétées, celles qui pourraient l'être par le système Tat. Parmi les quelques 80 génomes bactériens étudiés, *Streptomyces coelicolor* possède hypothétiquement 145 protéines Tat, ce qui en fait le microorganisme qui en contient potentiellement le plus (Dilks *et al.*, 2003). Une version modifiée de ce programme prédit 230 substrats sécrétés par le système Tat chez *S. coelicolor* (Schaerlaekens *et al.*, 2004). Un second programme basé sur d'autres critères, TatScan, prédit que 129 protéines pourraient être sécrétées par le système Tat chez *S. coelicolor* (Li *et al.*, 2005). Dans le but de relier, tout au moins partiellement, les prédictions informatiques avec ce qui se passe *in vivo*, les protéines sécrétées par les bactéries seront analysées.

Pour réaliser ces expériences, nous disposons d'un mutant  $\Delta$ tatC de *S. lividans* qui abolit la sécrétion des protéines par le système Tat. Pour diverses conditions de croissance, les protéines du surnageant de culture seront séparées par électrophorèse sur gel bidimensionnel. Les protéines absentes chez le mutant seront vraisemblablement des protéines sécrétées par le système Tat. Ces protéines seront analysées au spectre de masse puis recherchées dans la liste établie par le programme informatique TatScan. Bien que la séquence génomique complète de *S. lividans* ne soit pas connue, la comparaison des séquences d'un grand nombre de gènes communs avec *S. coelicolor* ne montre que peu ou pas de différence entre les deux souches. La liste des protéines potentiellement sécrétées par le système Tat générée par TatScan pour le génome de *S. coelicolor* est donc utilisable pour celui de *S. lividans*.

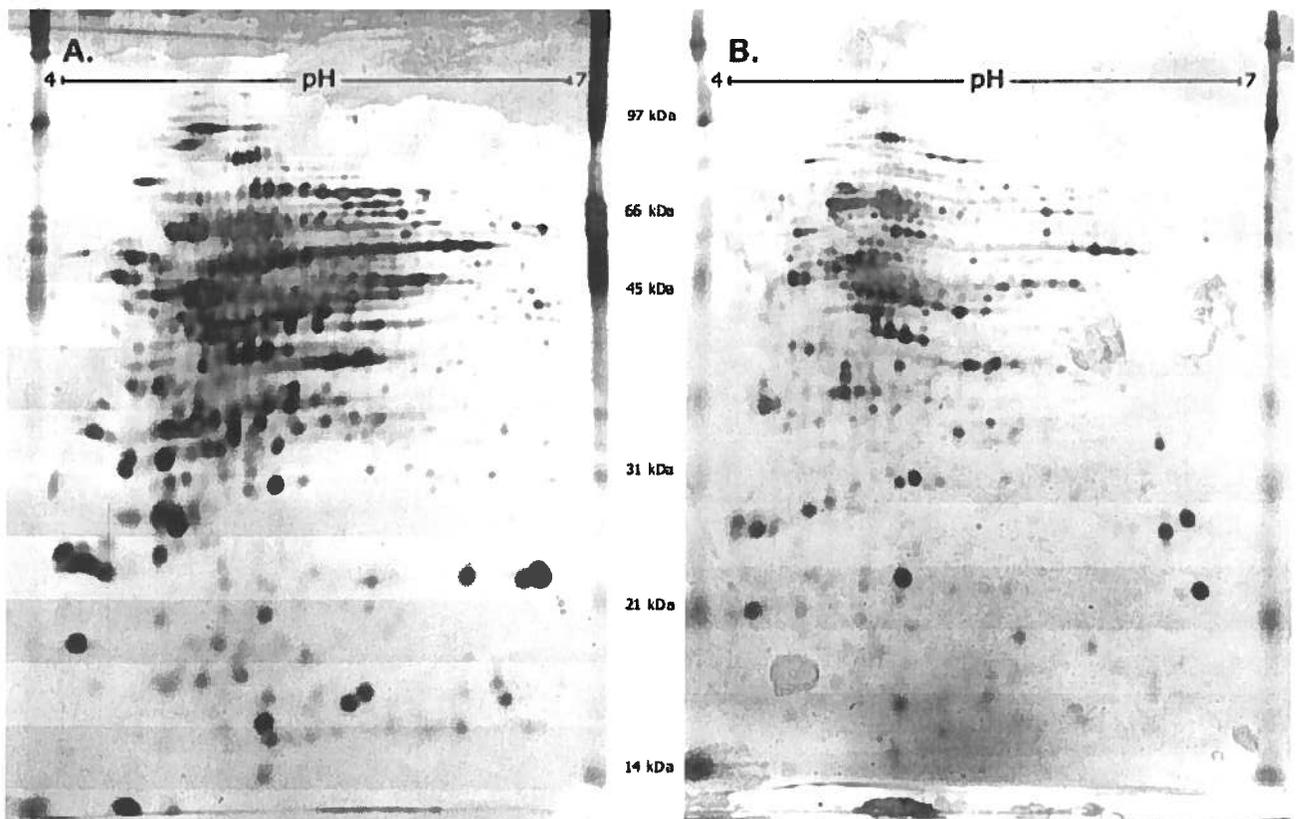
La diversité des protéines sécrétées dans le milieu de culture dépend de la source de carbone utilisée pour la croissance bactérienne. Idéalement, il faudrait utiliser une infinité de substrats pour révéler la présence de toutes les protéines sécrétées codées par le génome de *S. lividans*. Devant cette impossibilité, nous avons choisi deux substrats simples, le xylose et le glucose, ainsi que deux substrats complexes, la chitine et un extrait de sol, qui représente le milieu de croissance naturel des Streptomycètes.

Les bactéries sont cultivées dans un milieu minimal M14 auquel on ajoute la source de carbone à une concentration finale de 1%. Après 48 heures de croissance, les bactéries sont récupérées et lavées puis incubées 24 heures dans un milieu de culture frais. Cette procédure permet d'éliminer les protéines provenant du largage cytoplasmique consécutif à des bris cellulaires, qui peuvent rendre plus complexe l'interprétation des profils de protéines obtenus par électrophorèse en deux dimensions. Les protéines sécrétées sont récupérées et séparées selon leur point isoélectrique et leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel bidimensionnel.

### 11.1.1 Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans* en milieu xylose par électrophorèse bidimensionnelle

Le xylose est le constituant majeur du xylan, un polysaccharide retrouvé dans la fibre du bois. Il entre dans la voie métabolique des pentoses (Prade, 1996). Il permet la sécrétion d'une grande diversité de protéines chez *S. lividans* (Gauthier *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

La figure 7 présente la séparation sur gels bidimensionnels des protéines sécrétées par *S. lividans* 10-164 et son mutant du système Tat en milieu xylose 1%.

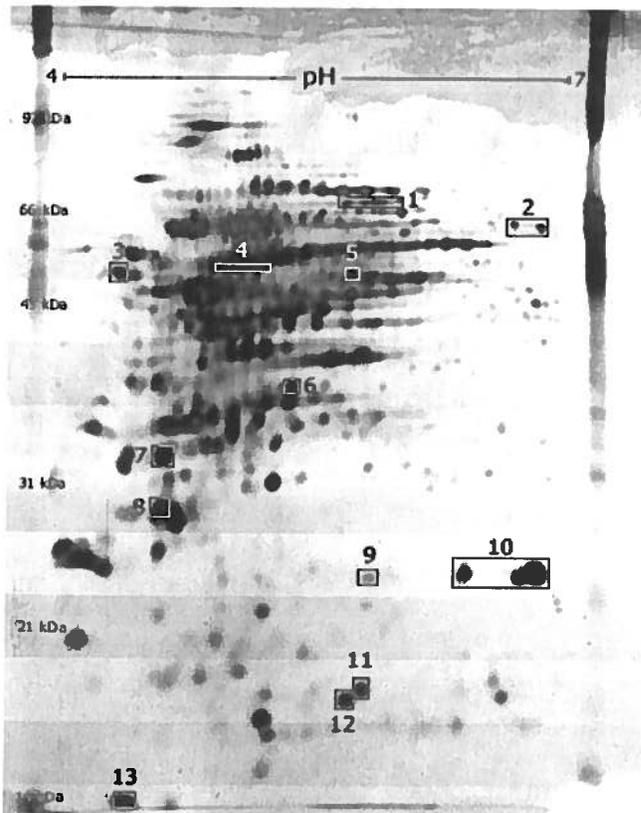


**Figure 7 : Protéines sécrétées en milieu xylose 1% sur gel 2-DE.** Les protéines sécrétées par la bactérie sauvage et son mutant du système Tat en milieu xylose 1% ont été séparées par 2-DE et colorées à l'argent.

A. 100 µg de protéines du sécrétome de la bactérie sauvage.

B. 100 µg de protéines du sécrétome de la bactérie mutante.

Une « carte » de 13 protéines candidates Tat a été créée en superposant électroniquement les gels 2-DE. Les protéines sécrétées par la souche sauvage mais absente chez la souche  $\Delta tatC$  ont été encadrées à la figure 8 et sont les protéines candidates à la sécrétion par le système Tat en milieu xylose.



**Figure 8 :** « Carte » des protéines candidates Tat en milieu xylose 1%. Vingt-trois spots comptant pour 13 protéines différentes ont été découpés et analysés au spectromètre de masse.

Les spots de protéines candidates Tat ont été découpés et identifiés par digestion tryptique et analyse des peptides au spectromètre de masse. Les protéines identifiées sont ensuite recherchées dans la liste des 129 protéines possiblement sécrétées par le système Tat générée par TatScan, disponible en annexe.

Protéine #	Gène correspondant	Poids (Da)	Fonction	Dans la liste de TatScan
1	SCO2068	59523	Phosphatase alcaline sécrétée probable	oui
2	SCO1230	58516	Tripeptidylaminopeptidase sécrétée putative	non
3	SCO3096	45482	Enolase	non
4	SCO6005	50610	Lipoprotéine putative	oui
5	SCO7451	43111	Protéine hypothétique	non
6	SCO1097	32126	Hydrolase putative	non
7	SCO6590	72587	Estérase putative	non
8	SCO1860	33456	Protéine sécrétée putative	non
9	SCO1828	8351	Protéine hypothétique	non
10	SCO5420	22317	Cholestérol estérase	non
11	SCO2612	15110	Nucléoside diphosphate kinase	non
12	SCO6650	14382	Protéine hypothétique	non
13	SCO4622	17781	Protéine membranaire putative	non

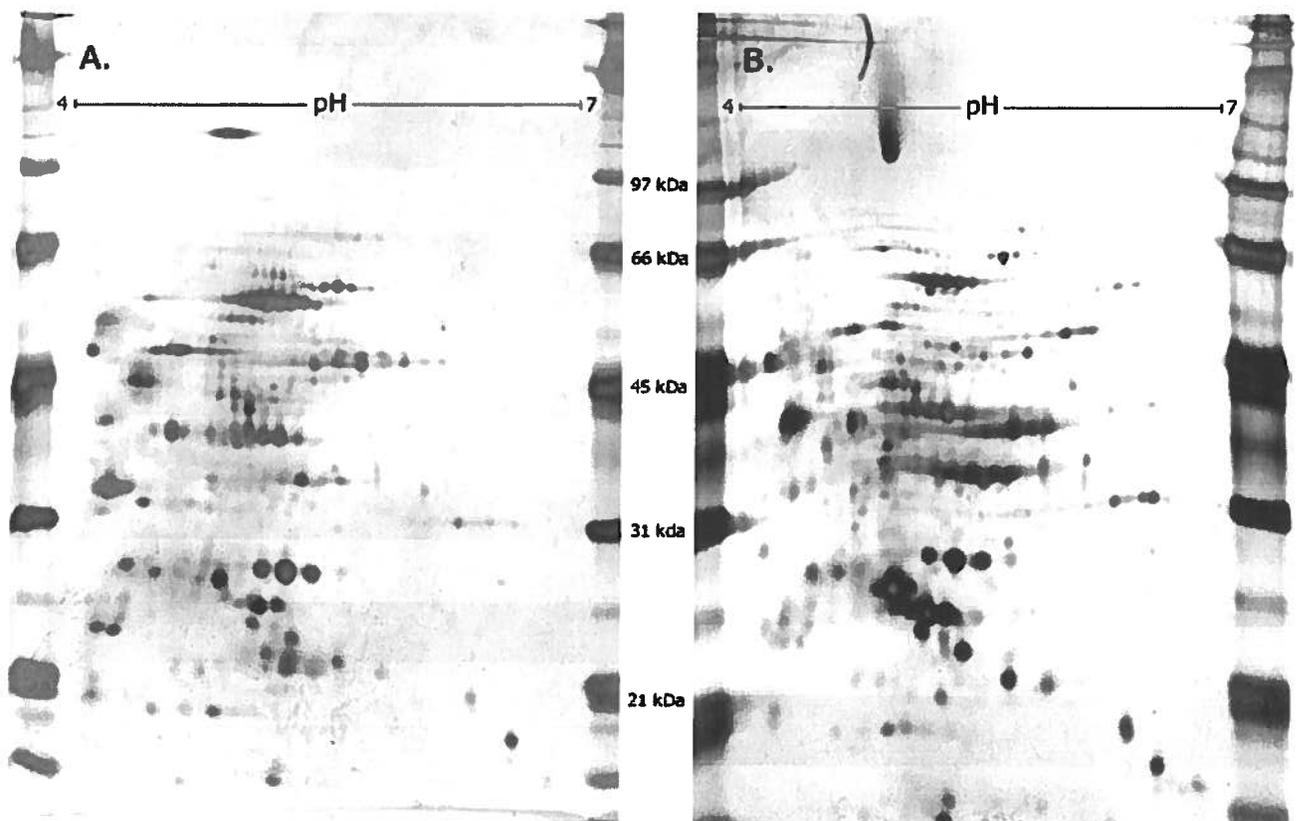
**Tableau 1 : Identification des protéines candidates Tat en milieu xylose 1%.** Les protéines analysées au spectromètre de masse sont recherchées dans la liste générée par le programme TatScan.

De cette liste, deux protéines, codées par les gènes SCO2068 et SCO6005, figurent sur la liste des protéines Tat prédites par le programme informatique TatScan. Les protéines codées par les gènes SCO1230, SCO6590 et SCO1860 sont sécrétées mais ne présentent pas de peptides signaux reconnus par TatScan. L'enolase (SCO3096), l'hydrolase (SCO1097) et la nucléoside diphosphate kinase (SCO2612) sont des protéines retrouvées dans le cytoplasme des bactéries tandis que celles codées par les gènes SCO5420 et SCO4622 sont enchâssées dans la membrane. Finalement, les protéines codées par les gènes SCO7451, SCO1828 et SCO6650 ne possèdent pas de fonction connue et ne semblent pas contenir de peptide signal.

### 11.1.2 Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans* en milieu glucose par électrophorèse bidimensionnelle

La deuxième source de carbone utilisée pour diversifier les sécrétomes est le glucose. Il est utilisé de façon ubiquitaire chez les êtres vivants et s'avère un choix naturel pour une étude comme celle-ci. Comme ce sucre est probablement la source de carbone la plus facilement métabolisée et qu'il exerce une répression catabolique sur un bon nombre de gènes (Hodgson, 2000), la diversité de sécrétion devrait en être réduite lors de la croissance des bactéries dans un milieu glucose.

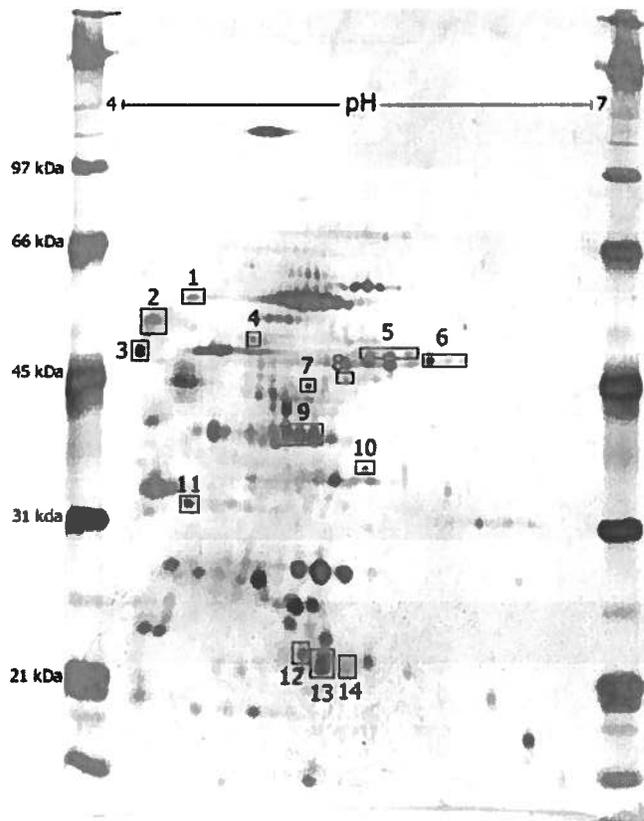
La figure 9 présente la séparation sur gels bidimensionnels des protéines sécrétées par *S. lividans* 10-164 et son mutant du système tat en milieu glucose 1%.



**Figure 9 : Protéines sécrétées en milieu glucose 1% sur gel 2-DE.** Les protéines sécrétées par la bactérie sauvage et son mutant du système Tat en milieu glucose 1% ont été séparées par 2-DE et colorées à l'argent.

**A.** 100  $\mu$ g de protéines du sécrétome de la bactérie sauvage.

**B.** 100  $\mu$ g de protéines du sécrétome de la bactérie mutante.



**Figure 10 : « Carte » des protéines candidates Tat en milieu glucose 1%. Vingt spots comptant pour 14 protéines différentes ont été découpés et analysés au spectromètre de masse.**

Les spots ont été découpés, puis digérés à la trypsine. Les peptides générés ont été analysés à la spectrométrie de masse telle que décrit précédemment.

Protéine #	Gène correspondant	Poids (Da)	Fonction	Dans la liste de TatScan
1	SCO6109	52475	Hydrolase sécrétée putative	non
2	SCO6131	46823	Carboxypeptidase	oui
3	SCO4584	42384	Protéine membranaire putative	non
4	SCO1936	40587	Transaldolase putative	non
5	SCO0805	47562	Prolyl aminopeptidase putative	non
6	SCO4958	40754	Cystathionine gamma-synthase	non
7	SCO5646	40036	Lipoprotéine de liaison probable	non
8	SCO5523	39232	Transaminase d'acides aminés à chaîne latérale non linéaire (Leu, Ile & Val)	non
9	SCO2780	36641	Protéine sécrétée putative	oui
10	SCO2828	33078	Composante de liaison probable d'un système de transport ABC pour acides aminés	oui
11	SCO6590	72587	Estérase putative	non
12	SCO3967	25842	Protéine membranaire hypothétique	non
13	SCO2149	38573	Protéine à complexe Rieske fer-soufre	non
14	SCO2627	17184	Isomérase de sucre-phosphate putative	non

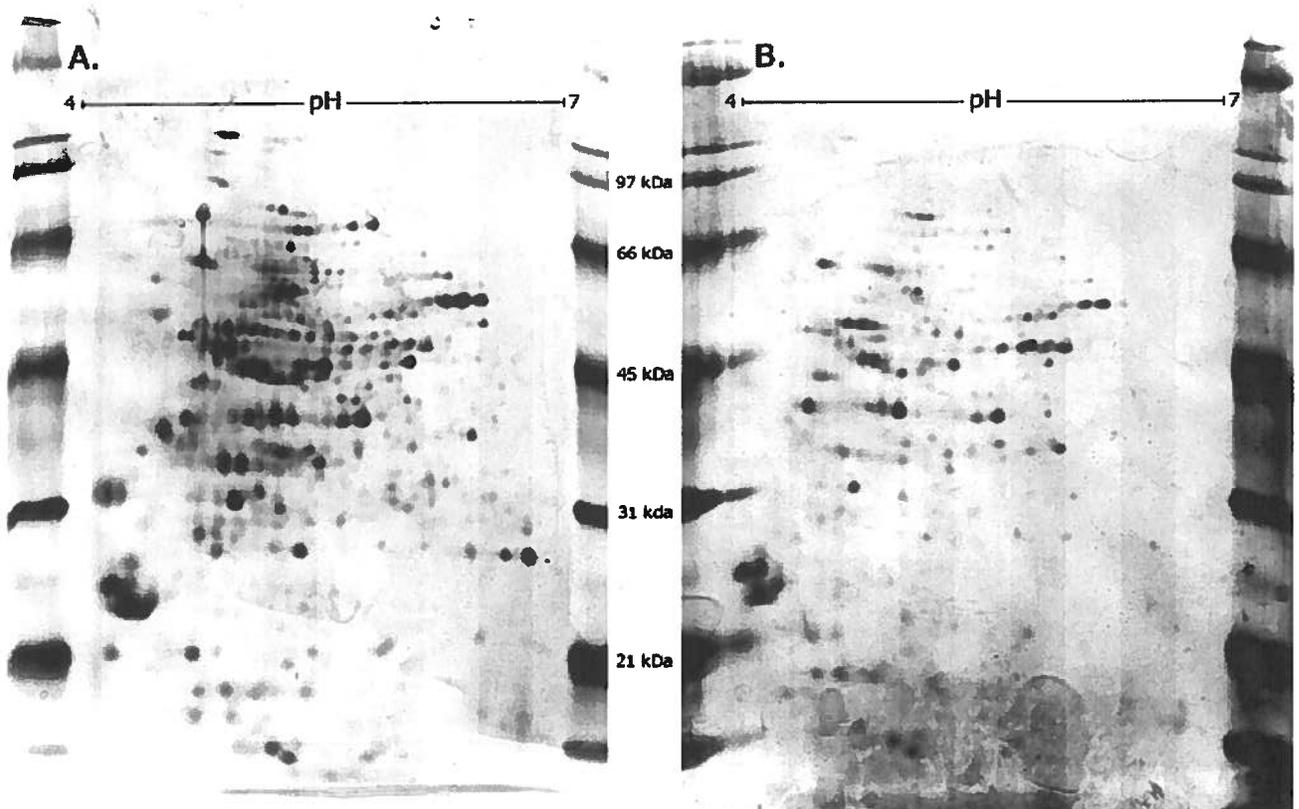
**Tableau 2 : Identification des protéines candidates Tat en milieu glucose 1%.** Les protéines analysées au spectromètre de masse sont recherchées dans la liste générée par le programme TatScan.

Trois protéines, codées par les gènes SCO6131, SCO2780 et SCO2828, se retrouvent sur la liste des 129 protéines sécrétées par le système Tat prédites par le programme TatScan. Notons qu'il s'agit de 3 protéines différentes de celles retrouvées précédemment dans le sécrétome de la même bactérie cultivée en milieu xylose. Deux protéines, codées par les gènes SCO6109 et SCO6590, sont des protéines sécrétées dont le peptide signal n'a pas été reconnu par TatScan. Cinq autres protéines, codées par les gènes SCO1936, SCO0805, SCO4958, SCO5523 et SCO2627, sont des protéines cytoplasmiques et 4 sont des protéines membranaires, codées par les gènes SCO4584, SCO5646, SCO3967 et SCO2149. Les protéines codées par les gènes SCO5646 et SCO3967 semblent posséder un peptide signal. Les autres protéines semblent en être dépourvues.

### 11.1.3 Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans* en milieu chitine par électrophorèse bidimensionnelle

La chitine est une des composantes principales de l'exosquelette des insectes et de la paroi des mycètes. Ce polysaccharide ressemble beaucoup au chitosane, un dérivé de la chitine avec une plus grande solubilité. La liste des 129 protéines candidates Tat de *S. lividans* contient 2 enzymes fortement susceptibles d'être sécrétées par le système Tat dans un milieu enrichi de chitine, soit une chitosanase et une chitinase respectivement codées par les gènes SCO0677 et SCO5673. La troisième source de carbone utilisée dans cette étude est donc la chitine colloïdale, qui semble donner de meilleurs résultats que la chitine non purifiée pour la croissance des Actinomycètes (Hsu et Lockwood, 1975).

La figure 11 présente la séparation sur gels bidimensionnels des protéines sécrétées par *S. lividans* 10-164 et son mutant du système tat en milieu chitine 1%.

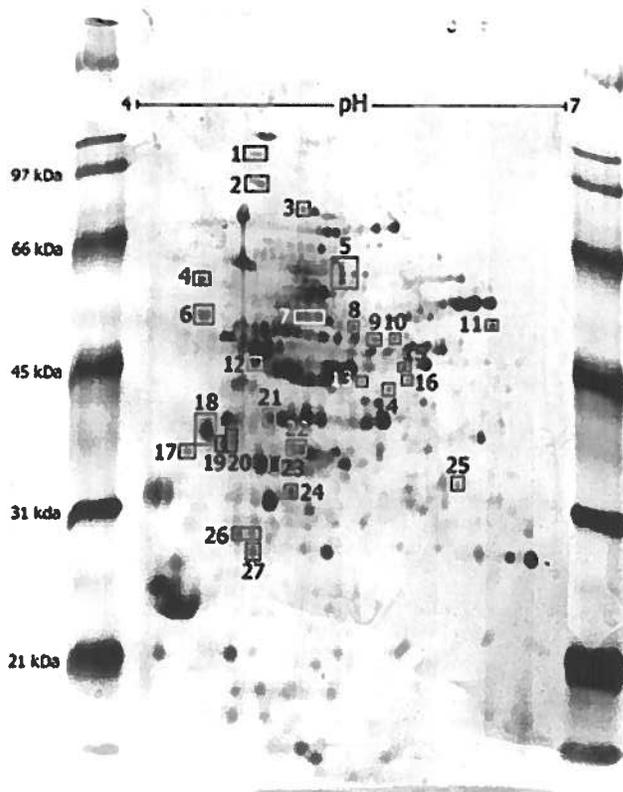


**Figure 11 : Protéines sécrétées en milieu chitine 1% sur gel 2-DE.** Les protéines sécrétées par la bactérie sauvage et son mutant du système tat en milieu chitine 1% ont été séparées par 2-DE et colorées à l'argent.

**A.** 100 µg de protéines du sécrétome de la bactérie sauvage.

**B.** 100 µg de protéines du sécrétome de la bactérie mutante.

La superposition des gels 2-DE permet d'identifier 35 spots protéiques présents chez la souche sauvage mais absents chez la souche mutante *ΔtatC* (figure 12). Le nombre de spots est plus élevé que ceux retrouvés dans les cultures en milieu xylose (23 spots) et glucose (20 spots). Cette diversité protéique reflète bien la complexité inhérente à l'utilisation de la chitine comme unique source de carbone vis-à-vis les sucres simples utilisés dans les deux expériences précédentes.



**Figure 12 :** « Carte » des protéines candidates Tat en milieu chitine 1%. Trente-cinq spots comptant pour 27 protéines différentes ont été découpés et analysés au spectromètre de masse.

Plusieurs protéines se présentent en de multiples spots sur le gel. Notons sur la « carte » précédente le cas des spots #5, #7 et #26. Ces spots représentent des isoformes d'une même protéine, issus d'une modification post-traductionnelle comme une glycosylation ou une phosphorylation. Ces modifications peuvent changer à la fois le poids moléculaire et le point isoélectrique d'une protéine, ce qui explique la distribution d'une même protéine sur plusieurs spots. Comme il est impossible de savoir si deux spots près l'un de l'autre sont

deux isoformes de la même protéine ou deux protéines différentes, chaque spot est découpé individuellement et analysé indépendamment par spectrométrie de masse. L'analyse de ces résultats indique par la suite s'il s'agit de protéines différentes ou d'isoformes d'une même protéine.

Protéine #	Gène correspondant	Poids (Da)	Fonction	Dans la liste de TatScan
1	SCO4654	128474	Sous-unité $\beta$ d'ARN polymerase	non
2	SCO0560	80815	Catalase / peroxydase	non
3	SCO5113	65532	BldKB, lipoprotéine de système de transport ABC	non
4	SCO2591	61566	Protéine sécrétée putative	non
5	SCO5249	52192	Protéine de liaison aux nucléotides	non
6	SCO3096	45482	Enolase	non
7	SCO6005	50610	Lipoprotéine putative	oui
8	SCO3622	48413	Aminotransférase probable	non
9	SCO4186	46403	Protéine hypothétique	non
10	SCO2198	52567	Glutamine synthétase	non
11	SCO3801	45970	Aminopeptidase probable	non
12	SCO1639	34935	Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase sécrétée putative	oui
13	SCO2847	38103	Oxydoréductase putative	non
14	SCO7511	34966	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	non
15	SCO4771	40114	Inositol-5-monophosphate déshydrogénase	non
16	SCO5426	36433	6-phosphofructokinase	non
17	SCO2529	38244	Métalloprotéase	non
18	SCO0494	37374	Iron-siderophore binding lipoprotein	non
19	SCO3941	39598	Sérine / thréonine kinase	non
20	SCO5260	33387	Protéine sécrétée	non
21	SCO1643	27882	Sous-unité $\alpha$ du protéasome 20S	non
22	SCO5236	27445	Glucosamine phosphate isomérase	non
23	SCO5776	29554	Protéine de liaison au glutamate	non
24	SCO0804	26998	Protéine hypothétique	non
25	SCO4930	28120	Enoyl-CoA hydratase putative	non
26	SCO5843	20707	Protéine hypothétique	non
27	SCO2113	19219	Bactérioferritine	non

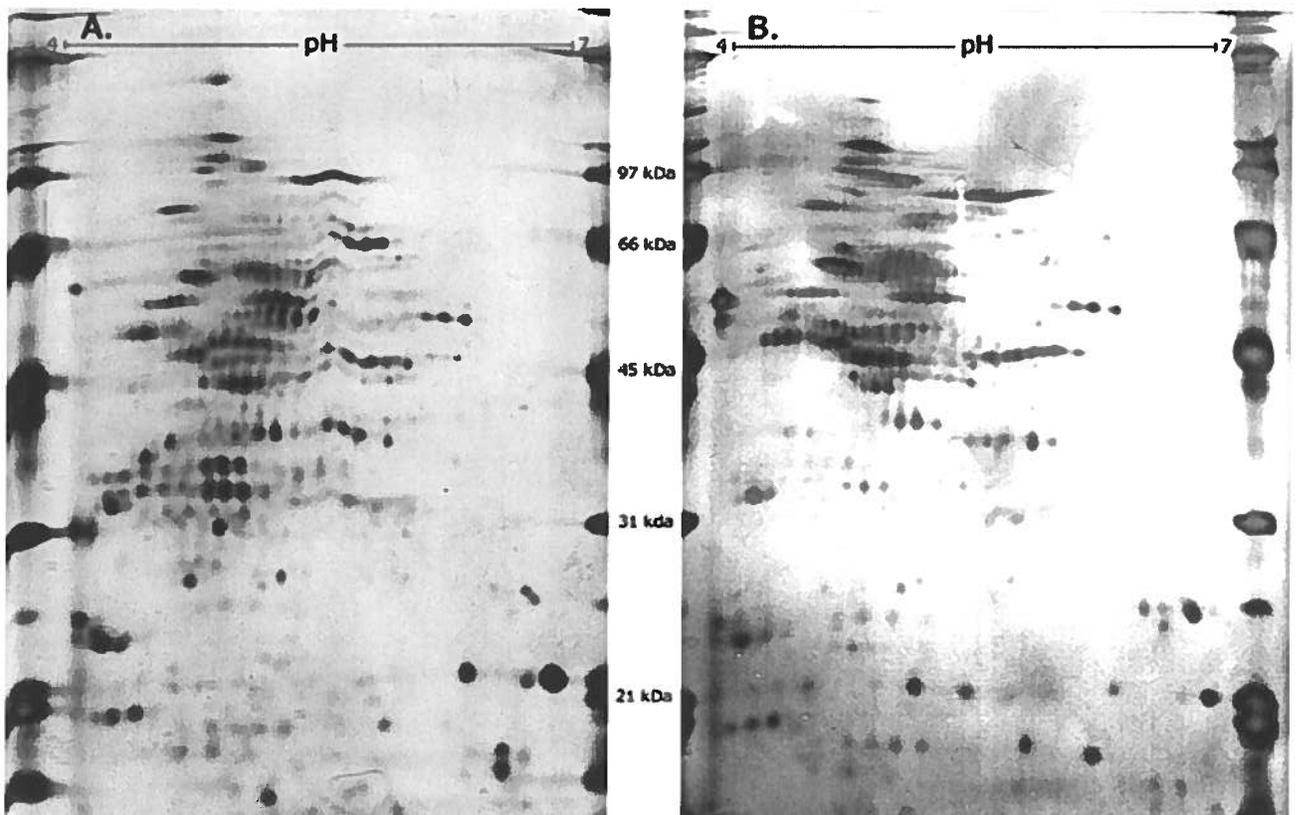
**Tableau 3 : Identification des protéines candidates Tat en milieu chitine 1%.** Les protéines analysées au spectromètre de masse sont recherchées dans la liste générée par le programme TatScan.

Deux protéines de ce tableau se retrouvent sur la liste des protéines Tat prédites par le programme informatique TatScan, soit les protéines codées par les gènes SCO6005 et SCO1639. La première est une lipoprotéine qui a déjà été retrouvée en milieu xylose. Encore ici, plusieurs protéines qui ne possèdent pas un peptide signal reconnu par TatScan, codées par les gènes SCO2591, SCO5260 et SCO2529 sont sécrétées par la bactérie sauvage mais pas par le mutant du système Tat. Onze protéines, codées par les gènes SCO4654, SCO5113, SCO5843, SCO5249, SCO3096, SCO2198, SCO5426, SCO0494, SCO1643, SCO2113, et SCO5776, sont soit cytoplasmiques ou membranaires. Finalement, 11 protéines, codées par les gènes SCO0560, SCO3622, SCO4186, SCO3801, SCO2847, SCO7511, SCO4771, SCO3941, SCO5236, SCO0804 et SCO4930, ont des localisations inconnues et ne semblent pas munies d'un peptide signal.

#### 11.1.4 Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans* en milieu terre par électrophorèse bidimensionnelle

La dernière source de carbone utilisée dans cette étude est un extrait de sol. La terre prélevée est traitée selon un protocole reconnu pour en éliminer toute trace de vie, tout en conservant l'ensemble de la matière organique et inorganique. La préparation obtenue contient de multiples sources de carbone et le milieu préparé à partir de l'extrait de terre représente probablement le mieux le milieu de vie naturel des Streptomycètes.

La figure 13 présente la séparation sur gels bidimensionnels des protéines sécrétées par *S. lividans* 10-164 et son mutant du système Tat en milieu terre 1%.



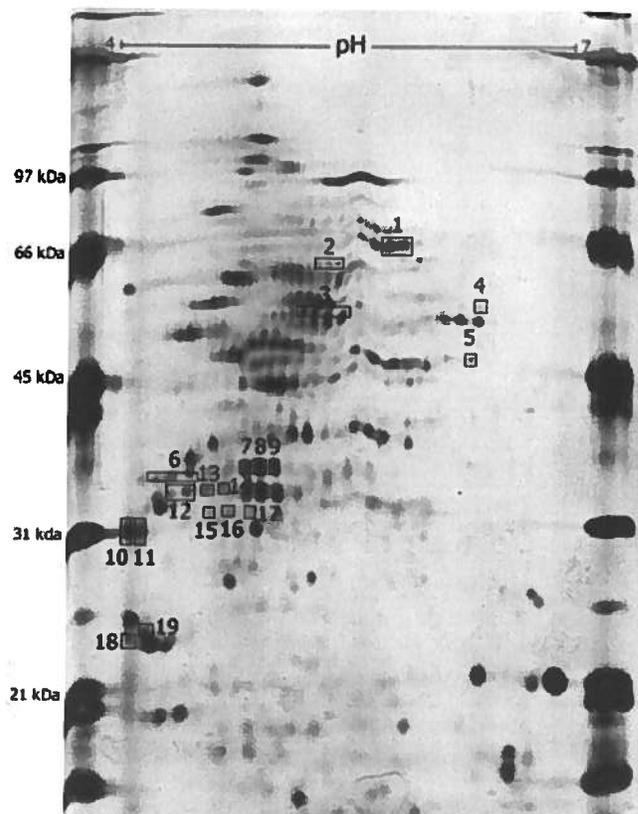
**Figure 13 : Protéines sécrétées en milieu terre 1% sur gel 2-DE.** Les protéines sécrétées par la bactérie sauvage et son mutant du système Tat en milieu terre 1%, séparées par 2-DE et colorées à l'argent.

**A.** 100 µg de protéines du sécrétome de la bactérie sauvage.

**B.** 100 µg de protéines du sécrétome de la bactérie mutante.

L'extrait de terre est la source de carbone qui permet d'obtenir le plus grand nombre de protéines sur les gels 2-DE dans cette étude. Cependant, le nombre de protéines candidates à

la sécrétion par le système Tat (19 spots) (figure 14) est moindre que pour le milieu chitine (27 spots) et faiblement plus élevé que pour les milieux xylose (13 spots) et glucose (14 spots).



**Figure 14 :** « Carte » des protéines candidates Tat en milieu terre 1%. Vingt-huit spots comptant pour 19 protéines différentes ont été découpés et analysés au spectromètre de masse.

L'extrait de sol utilisé pour créer le milieu terre n'a pas été caractérisé. Les différentes sources de carbone qu'il contient restent donc inconnues tant dans leur nature que dans leur concentrations respectives. Le lieu où la terre a été prélevée peut donner des indices quant au mélange des sources de carbone. Des morceaux de bois putréfiés retrouvés dans la terre lors du séchage en laboratoire indique la présence probable des sucres du bois et d'autres végétaux dans l'extrait de terre, soit la cellulose, le xylan et le xylose. L'ubiquité de la chitine permet de placer cette source de carbone dans l'extrait. Il est donc logique de retrouver des protéines déjà rencontrées dans les expériences précédentes sur ce gel. Cette assomption se confirme particulièrement dans la diversité des protéines de poids

moléculaire supérieur à 45 kDa, avec une distribution très similaire à celles rencontrées sur les gels 2-DE issus des milieux xylose et chitine.

Protéine #	Gène correspondant	Poids (Da)	Fonction	Dans la liste de TatScan
1	SCO2068	59523	Phosphatase alcaline sécrétée putative	oui
2	SCO5249	52192	Protéine de liaison aux nucléotides	non
3	SCO6005	50610	Lipoprotéine putative	oui
4	SCO7501	53301	Hydrolase	non
5	SCO6185	43630	Transférase putative	non
6	SCO6590	72587	Estérase sécrétée putative	non
7	SCO6199	74399	Estérase sécrétée	non
8	SCO1860	33456	Protéine sécrétée putative	non
9	SCO7298	59679	Thiorédoxine réductase putative	non
10	SCO0638	22255	Lipoprotéine putative	non
11	SCO6963	28424	Lipoprotéine putative	non
12	SCO6109	52475	Hydrolase sécrétée putative	non
13	SCO3941	39599	Sérine / thréonine kinase putative	non
14	SCO0677	30810	Chitosanase sécrétée	oui
15	SCO1840	57919	Protéine putative de liaison à l'ATP d'un système de transport ABC	non
16	SCO5167	27321	Protéine hypothétique	non
17	SCO0315	47260	Décarboxylase putative	non
18	SCO2368	20388	Protéine hypothétique	non
19	SCO0641	20180	Protéine de résistance au tellure	non

**Tableau 4 : Identification des protéines candidates Tat en milieu terre 1%.** Les protéines analysées au spectromètre de masse sont recherchées dans la liste générée par le programme TatScan.

Trois protéines recueillies dans le surnageant de culture en milieu terre, codées par les gènes SCO2068, SCO6005 et SCO0677, se retrouvent sur la liste des protéines Tat prédites par TatScan. Les protéines codées par les gènes SCO2068 et SCO6005 ont déjà été récupérées dans le surnageant de culture en milieu xylose. La protéine issue du gène SCO6005 a aussi été sécrétée par les bactéries cultivées en milieu chitine. La protéine du gène SCO0677, une chitosanase, est retrouvée dans le milieu terre alors qu'elle ne semblait pas être présente dans le milieu chitine. Quatre protéines, codées par les gènes SCO6590, SCO6199, SCO1860 et SCO6109, sont des protéines sécrétées dont le peptide signal n'est pas reconnu par le programme informatique TatScan. Les autres protéines sont soit membranaires (codées par les gènes SCO5249, SCO7501, SCO6185, SCO0638, SCO6963 et SCO1840),

cytoplasmiques (SCO7298) où de localisation inconnue (SCO3941, SCO5167, SCO0315, SCO2368 et SCO0641). Les protéines localisées à la membrane codées par les gènes SCO0638, SCO6963 et SCO7501 semblent posséder un peptide signal alors que les autres ne possèdent pas de peptide signal reconnaissable.

### **11.1.5 Recherche de protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans* en milieu xylose par électrophorèse bidimensionnelle différentielle à fluorescence**

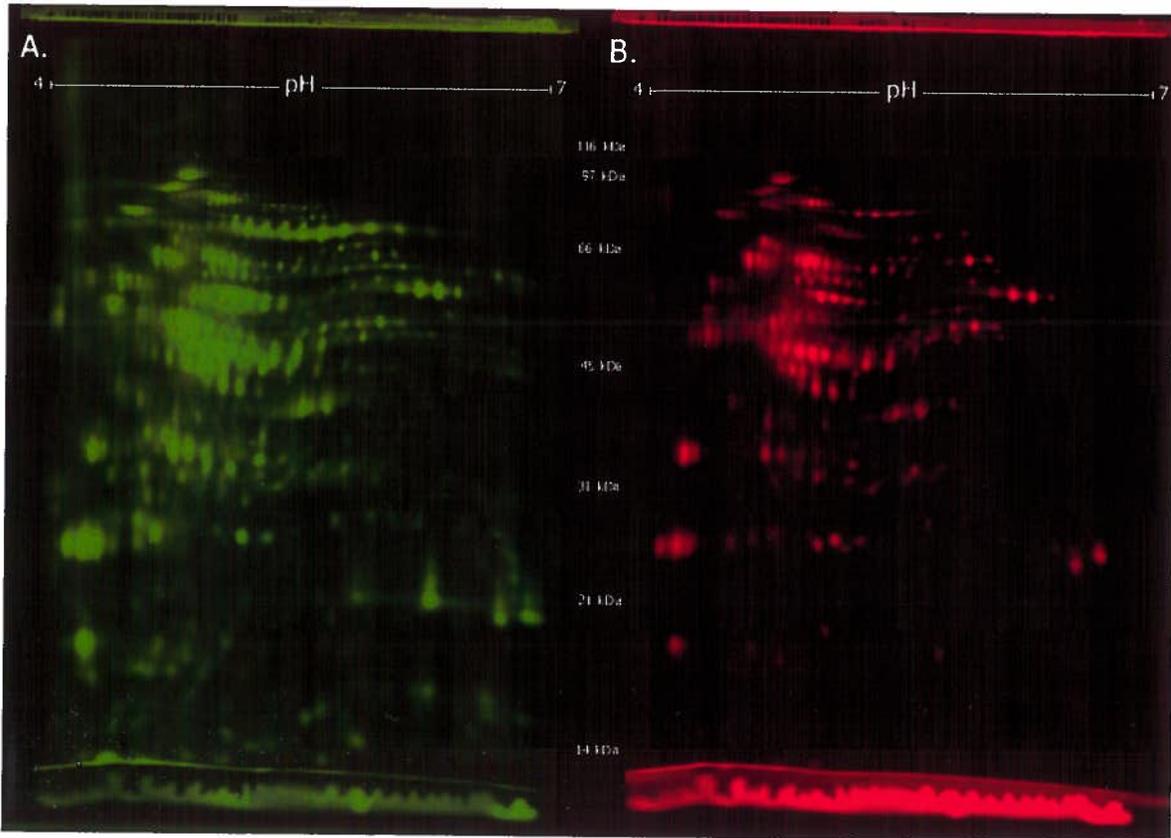
Une technique plus sensible que le 2-DE nommée 2-DIGE a été développée par Unlu et ses collaborateurs (Unlu *et al.*, 1997). Dans cette nouvelle technique, les protéines de chaque échantillon sont marquées d'un fluorochrome différent, puis les échantillons sont mélangés à parts égales et soumis à l'électrophorèse bidimensionnelle sur un même gel. La présence des protéines est révélée en excitant individuellement les fluorochromes et en captant la fluorescence émise. Les fluorochromes attachés aux protéines ont une charge positive qui remplace celle de la lysine abolie lors du marquage et un poids moléculaire spécifique, ce qui donne aux protéines marquées un point isoélectrique et un poids moléculaire identiques aux protéines natives. L'utilisation d'un seul gel permet d'éliminer complètement les variations entre gels observées dans la technique précédente, qui rendaient l'analyse plus délicate.

Nous cherchons ici à comparer les deux techniques pour déterminer laquelle est la plus efficace pour cette étude. Comme les caractéristiques des fluorochromes ne modifient pas la migration des protéines dans les deux dimensions, on comparera un gel 2-DE généré avec les protéines sécrétées en milieu xylose (Figure 8) avec un gel créé par 2-DIGE dans les mêmes conditions.

Pour le 2-DIGE, les bactéries sont cultivées dans un milieu minimal additionné de xylose comme précédemment. Les protéines du surnageant de la souche sauvage sont marquées avec le Cy3 et celles de la souche mutante avec le Cy5. Les échantillons marqués sont mélangés à parts égales et les protéines sont séparées par électrophorèse en deux dimensions.

La présence des protéines est révélée par leur fluorescence à l'aide du *Typhoon™ Variable Mode Imager*. Cet appareil permet d'exciter les fluorochromes et de capter la fluorescence qu'ils émettent à leur longueur d'onde respective. La figure 15 présente deux fois le même gel, soit en mode de révélation du Cy3, qui marque les protéines sécrétées par la bactérie

sauvage, soit en mode de révélation du Cy5, marquant les protéines sécrétées par la bactérie mutante.

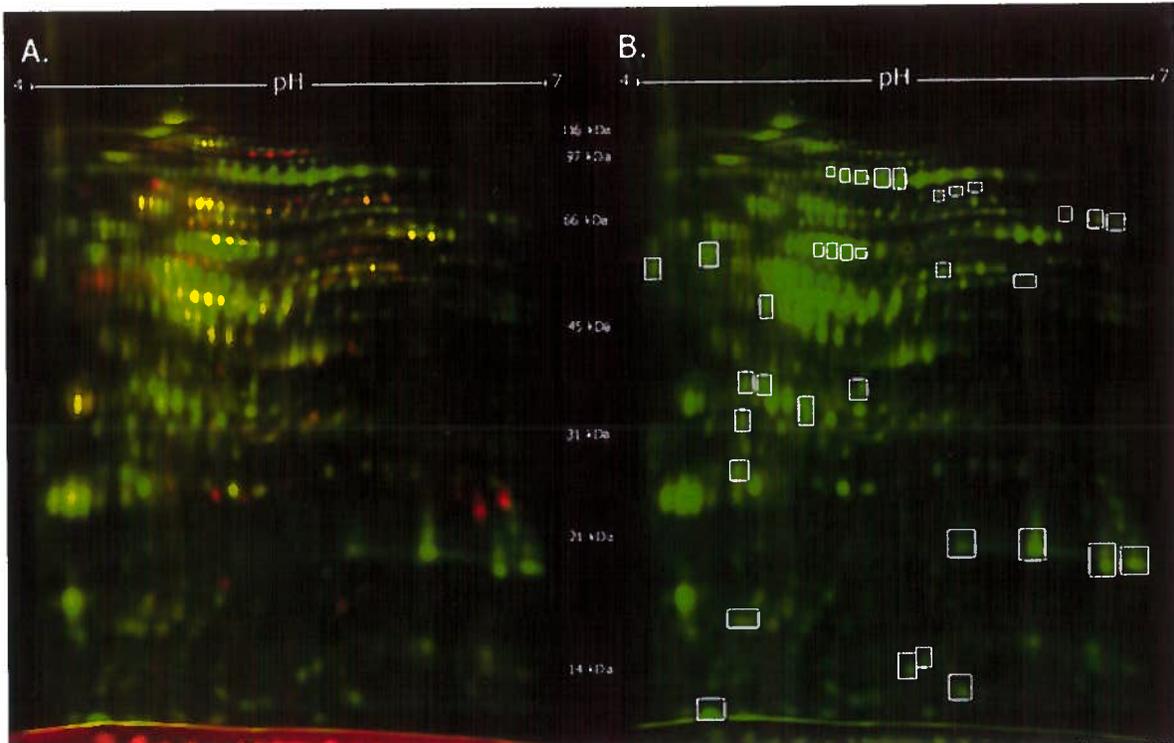


**Figure 15 : Détection des protéines marquées avec des fluorochromes.** Dans cette expérience, Cy3 marque les protéines sécrétées par la souche sauvage et Cy5 marque les protéines sécrétées par la souche mutante dans un milieu xylose 1%.

**A.** Un rayon d'une longueur d'onde de 550 nm excite le Cy3 et la lecture est effectuée à 570 nm, ce qui indique la position des protéines sécrétées par la souche sauvage.

**B.** Sur le même gel, un rayon d'une longueur d'onde de 649 nm excite le Cy5 et est lu à 670 nm, révélant les protéines sécrétées par la souche sans système Tat fonctionnel.

Ces deux patrons peuvent être révélés en même temps avec le logiciel *ImageQuant 5.2*. La sensibilité de la méthode permet de révéler la présence de protéines produites en faibles quantités. Le logiciel peut effectuer l'analyse automatiquement ou celle-ci peut être faite manuellement en superposant électroniquement les images de la figure 15. Comme précédemment, une « carte » est créée pour identifier les protéines candidates Tat révélées par le 2-DIGE.

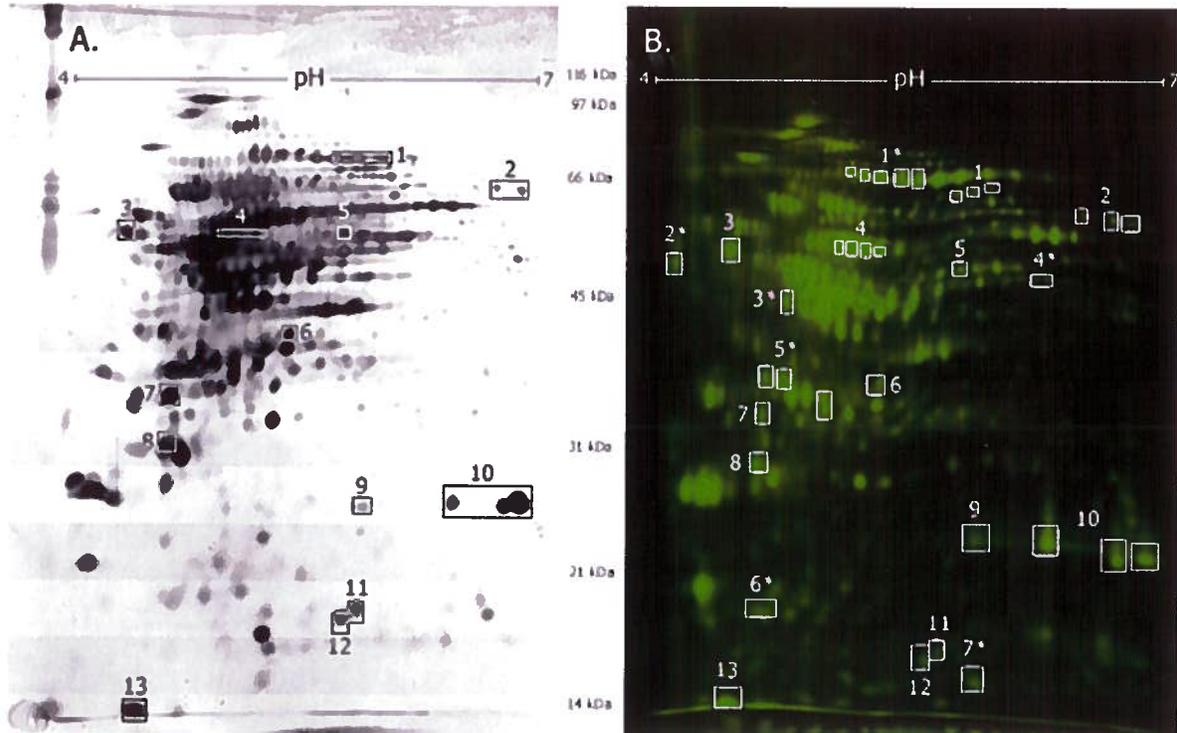


**Figure 16 : Superposition des patrons de fluorescence.** À l'aide du logiciel *ImageQuant* 5,2, les patrons d'excitation du Cy3 et du Cy5 sont superposés.

**A.** Superposition des patrons d'excitation du Cy3 pour les protéines sécrétées par la souche sauvage et du Cy5 pour celles sécrétées par le mutant. Un spot vert indique la présence d'une protéine sécrétée par la souche sauvage, tandis qu'un spot rouge représente une protéine sécrétée par le mutant. Un spot jaune indique que la protéine est également présente dans le surnageant de la souche sauvage et du mutant.

**B.** Révélation des protéines sécrétées par la souche sauvage seulement. Les protéines encadrées sont présentes chez la souche sauvage et absentes chez le mutant.

Finalement, la « carte » générée avec la technique du 2-DIGE (Figure 16 B) est comparée avec la « carte » créée avec les gels 2-DE (Figure 8) pour évaluer l'efficacité relative de chaque technique.



**Figure 17 : Comparaison des « cartes » des protéines candidates Tat.** Les protéines sécrétées en milieu xylose ont été récupérées et séparées sur gels bidimensionnels.  
**A.** « Carte » comptant 13 protéines différentes, générée à partir de gels 2-DE.  
**B.** « Carte » comptant environ 20 protéines différentes, générée à partir d'un gel 2-DIGE. Les chiffres dénotent les mêmes protéines qu'en A. Les chiffres suivis d'un astérisque (\*) marquent des protéines qu'on ne peut déceler qu'avec la technique du 2-DIGE.

On peut voir à la figure 17 que la technique du 2-DIGE est plus sensible que les gels 2-DE. L'utilisation des fluorochromes pour marquer les protéines permet d'identifier 7 spots de plus qu'avec les gels 2-DE. Cependant, l'analyse à la spectrométrie de masse ne permet pas d'identifier ces protéines, probablement parce que leur concentration est insuffisante. Pour cette raison, la technique du 2-DE, quoique moins sensible, est aussi efficace que le 2-DIGE dans nos conditions d'identification.

## **11.2 Recherche de protéines chaperonnes impliquées dans la sécrétion de la xylanase**

### **A2 par le système Sec chez *Streptomyces lividans***

La majorité des protéines sécrétées par les bactéries empruntent le système de sécrétion Sec (Bernstein, 1998). Chez les bactéries à gram négatif, le transport Sec-dépendant permet le transit des protéines jusqu'à l'espace périplasmique, alors que chez les bactéries à gram positif, le système Sec permet de sécréter les protéines directement dans le milieu. Le système Sec est essentiel à la survie des bactéries.

Les protéines transitant par ce système sont synthétisées sous la forme d'un précurseur. Ce précurseur doit être maintenu dans une forme non repliée pour être pris en charge par le système de sécrétion Sec. Chez les bactéries à gram négatif, la chaperonne SecB lie temporairement les précurseurs afin qu'ils conservent leur forme dépliée propre à la sécrétion Sec.

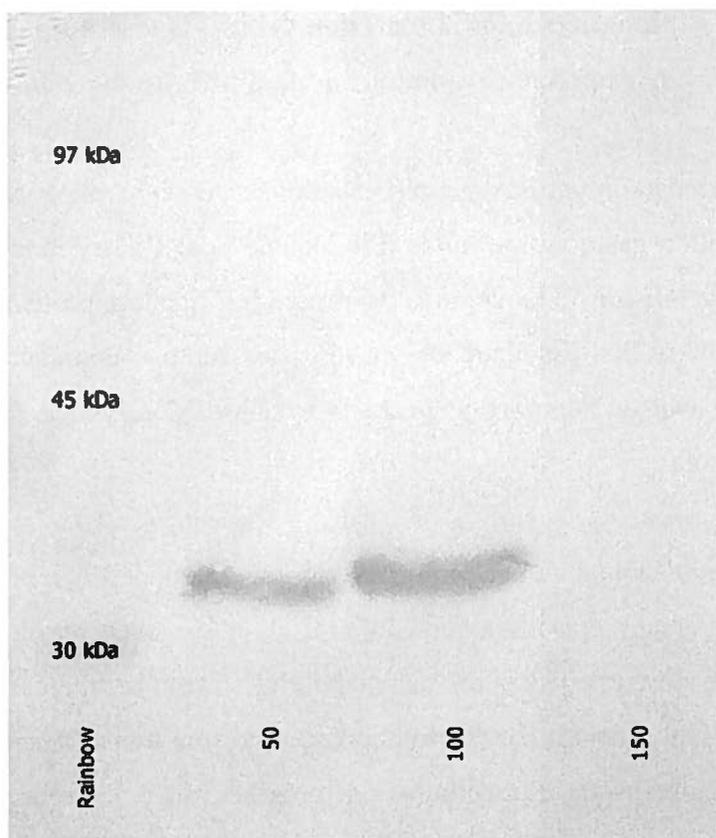
Chez les bactéries à gram positif, on ne retrouve pas d'homologue fonctionnel de la protéine chaperonne SecB. Le but de ce travail est d'identifier une ou plusieurs chaperonnes du système de sécrétion Sec chez une bactérie à gram positif.

Pour tenter de capturer une chaperonne du système de sécrétion Sec, on utilise la xylanase A2 de *S. lividans*, une protéine sécrétée par le système Sec, à laquelle une étiquette de 6 histidines (*his-tag*) a été ajoutée à son extrémité C-terminale. Grâce à cette étiquette, la xylanase A2 modifiée peut être récupérée par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose-nickel. Si une protéine chaperonne est liée au précurseur de la xylanase A2 dans le cytoplasme, elle sera co-purifiée par cette technique. Le protocole de purification a été optimisé à partir des protocoles de base proposés par le manufacturier des colonnes HisTrap™ (*GE Healthcare*).

### **11.2.1 Recherche de chaperonnes impliquées dans la sécrétion de la xylanase A2 par le système Sec chez *Streptomyces lividans* par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel**

Les premières expériences de chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel ont été consacrées à la détermination des concentrations d'imidazole pour l'adsorption et l'élution de la xylanase A2 avec *his-tag* à la colonne HisTrap. La fraction protéique cytoplasmique de la souche IAF906A2his est récupérée et adsorbée sur une colonne de sépharose-nickel. Après un lavage avec du tampon phosphate, la xylanase A2 est éluée avec une solution contenant de l'imidazole.

Des concentrations croissantes d'imidazole dans la solution d'élution permettent d'éluer des protéines retenues par affinité sur la matrice. Dans ce test d'optimisation, des concentrations de 50, 100 et 150 mM d'imidazole ont été testées. Les fractions d'élution sont récupérées et les protéines qu'elles contiennent sont séparées par électrophorèse. Après un transfert semi-humide des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la présence du précurseur de xylanase A2 est révélée par immunobuvardage de type western avec des anticorps primaires dirigés contre la xylanase A2.



**Figure 18 : Optimisation de la chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel.** Immunobuvardage de type Western avec anticorps primaires dirigés contre la xylanase A2. Une concentration de 100 mM d'imidazole permet d'éluer le précurseur de xylanase A2 adsorbé à la colonne.

**50.** Élué à 50 mM d'imidazole.

**100.** Élué à 100 mM d'imidazole.

**150.** Élué à 150 mM d'imidazole.

Ce test d'optimisation démontre qu'une concentration de 100 mM d'imidazole permet d'éluer la totalité du précurseur de xylanase A2 retenue sur la colonne. Une concentration de 50 mM d'imidazole commence à éluer faiblement le précurseur de la xylanase A2. Pour cette raison, les lavages ont été effectués à une concentration de 40 mM d'imidazole.

Les protéines éluées de la colonne HisTrap ont été séparées sur gel de polyacrylamide 12% de 17 cm de longueur pour une meilleure séparation.

200 kDa

116 kDa

97 kDa

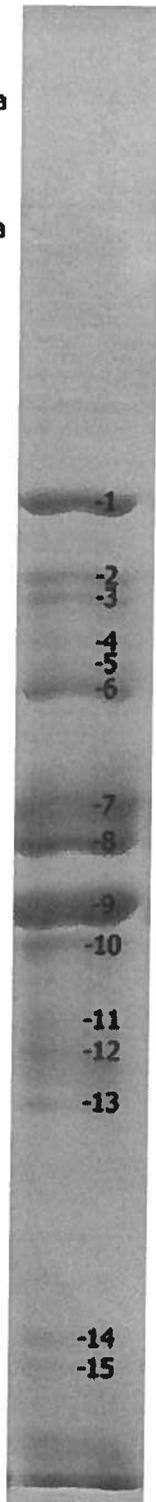
66 kDa

45 kDa

31 kDa

21 kDa

14 kDa



**Figure 19 : Chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel.** Les protéines extraites du clone IAF906A2his, récupérées sur colonne de sépharose-nickel sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes.

Bande #	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO1230	58405	Précurseur de tripeptidylaminopeptidase
2	SCO2761	53551	Tripeptidylaminopeptidase sécrétée putative
3	SCO2761	53551	Tripeptidylaminopeptidase sécrétée putative
4	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
5	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
6	SCO6407	63334	Gamma-glutamyltranspeptidase probable
7	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
8	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
9	<b>SCO5931</b>	<b>33622</b>	<b>Xylanase A2 avec his-tag</b>
10	SCO1651	32978	Protéine hypothétique
11	SCO2532	39122	Protéine similaire à PhoH
12	SCO5552	25016	Régulateur de la transcription probable
13	SCO6407	63334	Gamma-glutamyltranspeptidase probable
14	SCO2532	39122	Protéine similaire à PhoH
15	SCO6960	19601	Protéine hypothétique

**Tableau 5 : Identification des bandes de la figure 19.**

En éluant la colonne de chromatographie d'affinité au sépharose-nickel, on tente de récupérer un complexe formé par le précurseur de xylanase A2 et une protéine chaperonne. L'électrophorèse en conditions dénaturantes défait ce complexe, mais on retrouve le précurseur de xylanase A2 accompagnée d'un certain nombre de protéines contaminantes incluant possiblement la chaperonne. Ces protéines contaminantes ont possiblement une affinité pour la matrice de la colonne grâce à des résidus d'histidines dans leur séquence d'acides aminés, ou encore une affinité pour le précurseur de xylanase A2 sans être la chaperonne. Le précurseur de la tripeptidylaminopeptidase (bande #1) possède 11 résidus d'histidines, incluant plusieurs

résidus d'histidines à proximité l'un de l'autre. La tripeptidylaminopeptidase retrouvée dans les bandes #2 et #3 possède 10 résidus d'histidines, incluant plusieurs résidus d'histidines séparés par 3 résidus d'acide aminé ou moins. La protéine codée par le gène SCO2582, retrouvée en #4 et sous forme dégradée en #5, #7 et #8, possède 15 histidines, dont deux côte à côte et plusieurs histidines à moins de 3 résidus d'acides aminés les uns des autres. La gamma-glutamyltranspeptidase, retrouvée sous forme dégradée dans les bandes #6 et #13, présente 12 résidus d'histidines, dont 2 fois 2 résidus d'histidines consécutifs. La protéine hypothétique SCO1651 possède 9 résidus d'histidines dont 3 à proximité l'un de l'autre. Finalement, le régulateur de transcription probable en #12 possède 7 résidus d'histidines dont deux se suivent.

PhoH est une protéine cytoplasmique chez *E. coli*, inductible en condition de carence en phosphate. Comme pour son homologue de *E. coli*, une fonction d'ATPase est prédite pour cette protéine chez *S. coelicolor*. Son statut de protéine de stress lui confère un intérêt en tant que protéine candidate comme chaperonne.

Finalement, la protéine hypothétique SCO6960 ne possède pas de fonction connue. Sa séquence présente des similitudes avec une protéine régulatrice probable de *Streptomyces fradiae*, ce qui pourrait faire de cette protéine une candidate intéressante comme protéine chaperonne.

### 11.2.2 Utilisation de *cross-linkers* pour lier la chaperonne à la xylanase A2 de *Streptomyces lividans in vivo*

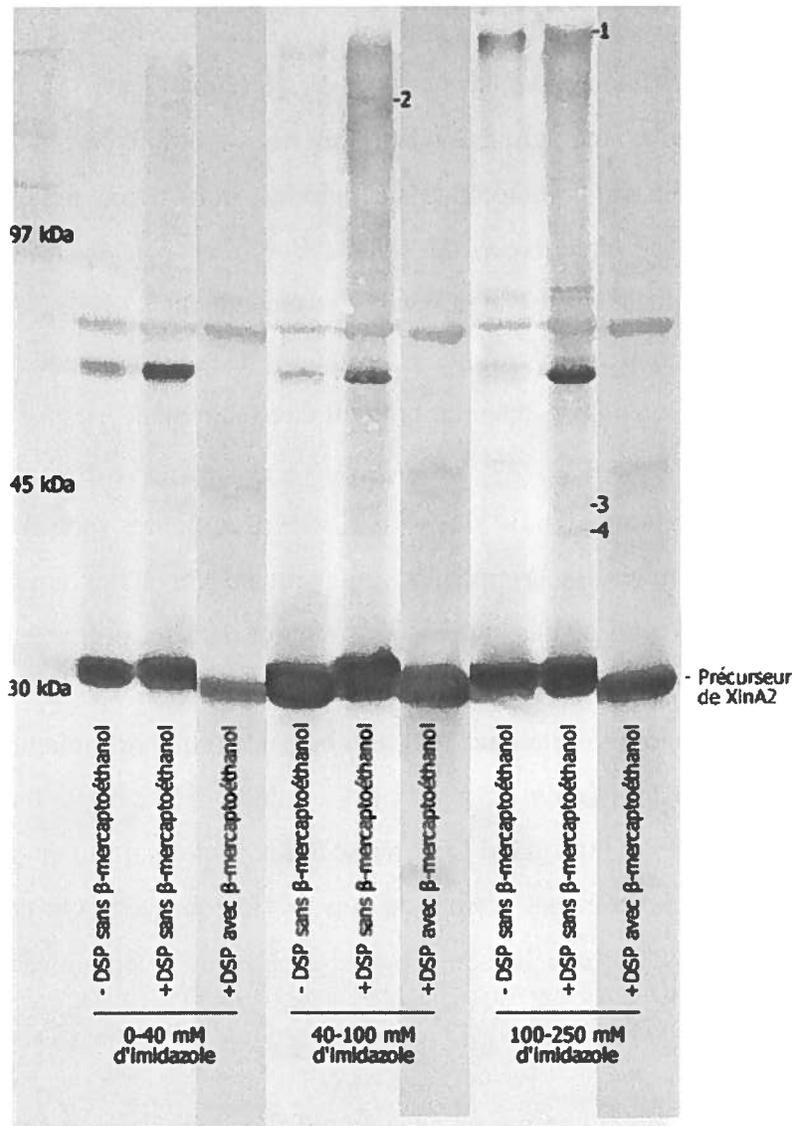
Comme aucune protéine candidate à la fonction de chaperonne n'est clairement ressortie des expériences de chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel, notre approche pour la découverte d'une chaperonne du système de sécrétion Sec a dû être modifiée. Plutôt que de chercher à isoler un complexe intact dont nous ignorons la stabilité dans les conditions utilisées lors de la chromatographie sur colonne, nous avons tenté de créer une liaison réticulaire entre le précurseur de xylanase A2 et son éventuelle chaperonne. Ce type de liaison covalente n'est pas défait par la chaleur ou les détergents utilisés dans l'électrophorèse dénaturante. Un complexe protéique de poids moléculaire supérieur à celui du précurseur de la xylanase A2 devrait pouvoir être facilement retracé.

Le succès de ces expériences repose sur le choix du *cross-linker*. Ces petites molécules possèdent à chacune de leurs extrémités un groupement qui peut se lier à des amines primaires, des sulfhydryles, des carboxyles ou des hydroxyles contenus dans les protéines.

Le choix de *cross-linker* s'est d'abord arrêté sur le dithiobis[succinimidyl]propionate] (DSP). Cette molécule traverse aisément les membranes et peut lier deux protéines par leurs amines primaires et former un complexe. Puisque le DSP possède un pont disulfure en son centre, l'ajout de DTT ou de  $\beta$ -mercaptoéthanol permet de détruire le complexe. On peut donc déterminer quelle bande est issue d'une liaison réticulaire entre deux protéines en comparant les profils de migration.

Les bactéries sont donc cultivées et lavées comme précédemment. Le DSP est ajouté à la suspension bactérienne. Après incubation, du Tris permet d'arrêter la réaction grâce à son extrémité aminée. L'extrait des protéines cytoplasmiques est préparé et chargé sur une colonne d'affinité au nickel. L'extrait est purifié selon les conditions optimales de récupération du précurseur de la xylanase A2. Les protéines contenues dans ces éluats sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-humide,

puis un immunobuvardage de type western est effectué avec des anticorps dirigés contre la xylanase A2 pour identifier les bandes contenant cette protéine.



**Figure 20: Utilisation du DSP pour créer une liaison réticulaire entre le précurseur de la xylanase A2 et sa chaperonne.** Les protéines sont purifiées sur colonne de sépharose-nickel, séparées par électrophorèse et transférées sur membrane de nitrocellulose. Un immunobuvardage de type western avec des anticorps dirigés contre la xylanase A2 révèle les bandes contenant possiblement de la xylanase A2.

**-DSP.** Protéines cytoplasmiques de IAF906A2his sans DSP.

**+DSP.** Protéines cytoplasmiques de IAF906A2his avec DSP.

Bande	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO1640	52463	Protéine hypothétique, possible unité de protéasome
	SCO1648	65248	AAA ATPase
	SCO4662	43811	Facteur d'élongation de la traduction EF-Tu
	SCO5028	48275	Protéine de liaison de l'ATP putative
	SCO3007	44027	Protéine hypothétique
	SCO5281	139292	2-oxoglutarate déshydrogénase putative
	SCO2999	183751	Protéine hypothétique
	SCO5809	31796	Hydrolase probable
	SCO5357	75190	Facteur de terminaison de la transcription rho
	SCO5373	52128	Chaîne $\beta$ de l'ATP synthétase
2	SCO4661	77836	Facteur d'élongation G
	SCO5745	61254	Protéine hypothétique
	SCO2999	183751	Protéine hypothétique
	SCO1640	52463	Protéine hypothétique
	SCO5113	65550	BldKB, lipoprotéine de système de transport ABC
	SCO5373	52128	Chaîne $\beta$ de l'ATP synthétase
	SCO5281	139292	2-oxoglutarate déshydrogénase putative
	SCO5470	44805	Sérine hydroxyméthyltransférase
3	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO2008	43477	Transaminase d'acides aminés à chaîne latérale non linéaire (Leu, Ile & Val)
	SCO0366	39595	Protéine hypothétique
	<b>SCO5931</b>	<b>32530</b>	<b>Xylanase A2</b>
	SCO6988	41112	Oxydoréductase putative
	SCO4662	43811	Facteur d'élongation de la traduction EF-Tu
4	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO2008	43477	Transaminase d'acides aminés à chaîne latérale non linéaire (Leu, Ile & Val)
	SCO4771	40091	Inosine-5'-monophosphate déshydrogénase
	SCO6009	39223	Protéine de liaison périplasmique
	SCO0564	42998	Protéine hypothétique
	SCO6723	36487	Oxydoréductase probable
	SCO1651	32750	Protéine hypothétique

**Tableau 6 : Identification des protéines contenues dans les différentes bandes révélées par les anticorps anti-xylanase A2 (figure 20).**

La réussite de cette expérience reposait sur la possibilité de faire migrer correctement un échantillon traité avec du DSP sans  $\beta$ -mercaptoéthanol. Cependant, l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol cause une dénaturation incomplète des protéines, ce qui entraîne des traînées sur le gel. Le même échantillon avec  $\beta$ -mercaptoéthanol migre sans traînées.

Une bande apparaît clairement dans tous les échantillons à environ 32 kDa. Il s'agit du précurseur de la xylanase A2 avec son *his-tag*. Une bande à environ 65 kDa et deux bandes d'environ 45 kDa sont présentes dans tous les échantillons et ne sont donc que de peu d'intérêt.

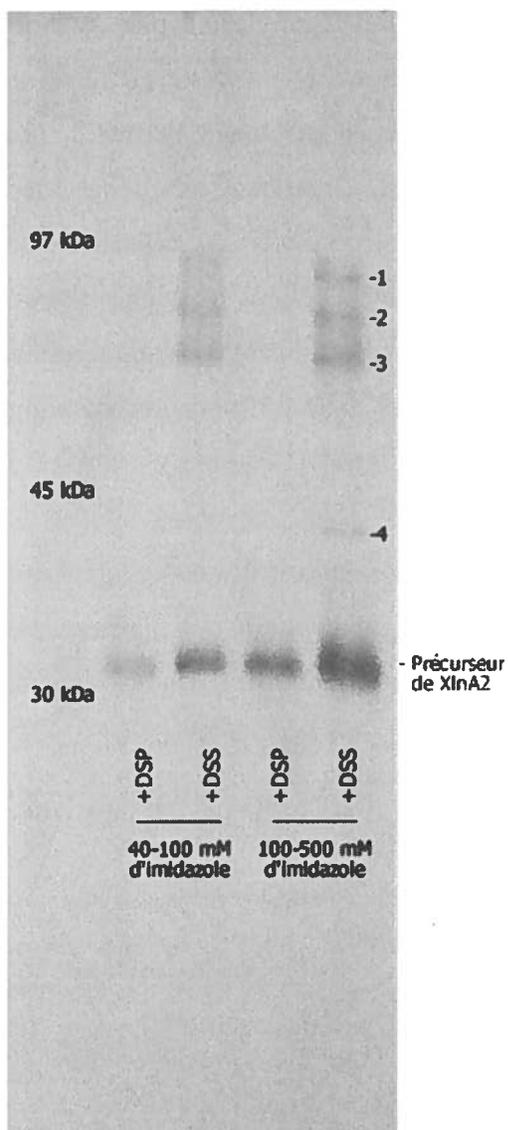
Les protéines contenues dans les quatre bandes présentes lorsque les protéines sont traitées au DSP qui sont absentes lorsqu'on ajoute du  $\beta$ -mercaptoéthanol ont été identifiées (tableau 6). Bien que révélés par les anticorps anti-xylanase A2, les bandes #1, #2 et #4 ne contenaient pas de xylanase A2. Il est possible que certains dimères formés réagissent fortuitement avec les anticorps.

La bande #3 d'environ 44 kDa contient de la xylanase A2 qui devrait normalement se situer à environ 32 kDa. Parmi les autres protéines qui accompagnent la xylanase A2, aucune ne possède un poids moléculaire qui, additionné à celui du précurseur de la xylanase A2, puisse former un complexe de 44 kDa. L'utilisation du DSP n'a donc pas donné les résultats escomptés.

### **11.2.3 Utilisation de DSS pour créer des liaisons réticulaires stables en présence de $\beta$ -mercaptoéthanol entre la xylanase A2 et sa chaperonne**

La découverte de xylanase A2 dans la bande 3 de l'expérience précédente permet de croire que la liaison réticulaire avec le DSP a fonctionné. Cependant, l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans l'échantillon empêche d'affirmer avec certitude que la présence de la xylanase A2 est due à la migration d'un complexe protéique plutôt qu'à une migration aléatoire issue d'une dénaturation incomplète. Pour obtenir des liaisons réticulaires stables en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, un nouveau *cross-linker* a été utilisé, le disuccinimidyl suberate (DSS).

Le DSS possède une structure identique au DSP sans pont disulfure, ce qui permet l'utilisation du  $\beta$ -mercaptoéthanol lors de l'électrophorèse. Les extraits cytoplasmiques ont été préparés après traitement au DSS et DSP respectivement et analysés comme précédemment (figure 21).



**Figure 21 : Utilisation du DSS pour former des liaisons réticulaires stables en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol.**

**+DSP.** Protéines cytoplasmiques de IAF906A2his avec DSP.

**+DSS.** Protéines cytoplasmiques de IAF906A2his avec DSS.

Bande #	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO1858	33234	Protéine hypothétique
2	SCO5113	65493	BldKB, lipoprotéine de système de transport ABC
	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO4152	64395	5'-nucléotidase sécrétée putative
	SCO5440	85397	Enzyme de synthèse du glycogène
3	SCO1651	32750	Protéine hypothétique
	SCO6169	61128	Protéine de régulation probable
	SCO5249	52161	Protéine de liaison aux nucléotides putative
4	SCO2532	39122	Protéine similaire à PhoH
	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO0886	36483	Régulateur transcriptionnel de la famille LacI putatif

**Tableau 7 : Identification des protéines contenues dans les différentes bandes révélées par les anticorps anti-xylanase A2 (figure 21).**

Le précurseur de xylanase A2 n'apparaît dans aucune des bandes résultantes du traitement au DSS.

À la bande #1, une seule protéine de 33 kDa codée par le gène SCO1858 est retrouvée. Un trimère de cette protéine pourrait expliquer la formation d'un complexe à 92 kDa.

Dans la bande #2 à environ 85 kDa, la présence des protéines codées par les gènes SCO5113, SCO2582 et SCO4152 peut s'expliquer par la formation de complexes avec une forme dégradée de la protéine hypothétique SCO2582. Cette protéine d'environ 44 kDa semble facilement dégradée et se retrouve dans des bandes de poids moléculaire inférieur (figure 14). Le produit du gène SCO5440 ne forme pas de complexes puisqu'il a le poids moléculaire attendu de 85 kDa.

Dans la bande #3 à environ 58 kDa, seul le produit du gène SCO1651 d'environ 33 kDa pourrait former un dimère pour expliquer sa présence, les autres protéines ayant le poids moléculaire attendu.

Finalement, les protéines présentes dans la bande #4 à environ 38 kDa peuvent être dégradées pour atteindre ce poids moléculaire lors de la migration. L'utilisation du DSS n'a pas permis, comme le DSP, d'identifier une quelconque protéine associée au précurseur de la xylanase A2.

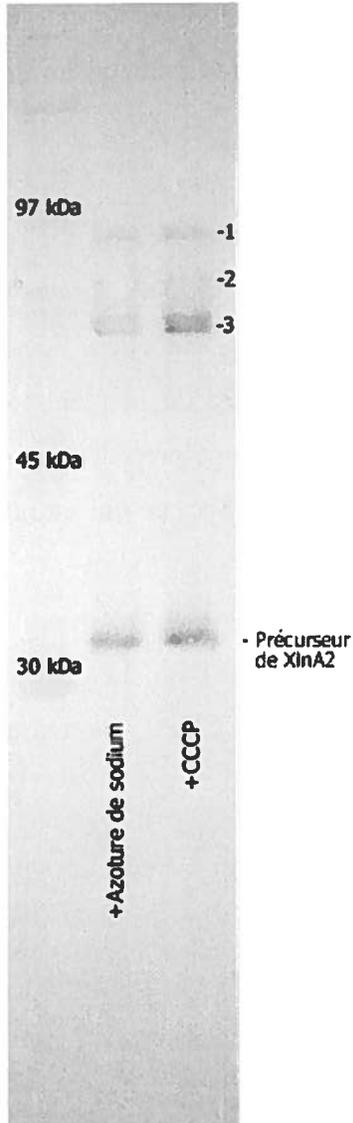
#### **11.2.4 Utilisation d'inhibiteurs du système Sec pour augmenter la concentration du précurseur de la xylanase A2 de *Streptomyces lividans***

Comme les expériences avec le DSS n'ont pas permis de retracer un complexe protéique contenant le précurseur de la xylanase A2, nous avons émis l'hypothèse que le complexe pouvait être en trop faible quantité sur le gel. Pour tenter d'augmenter la concentration de complexes formés entre le précurseur de la xylanase A2 et son éventuelle chaperonne, des inhibiteurs du système de sécrétion Sec qui accumulent momentanément le précurseur dans le cytoplasme ont été utilisés.

L'azoture de sodium inhibe la fonction ATPasique de la protéine SecA, une des composantes essentielles du système de sécrétion Sec (Oliver *et al.*, 1990). Le carbonyl cyanamide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) inhibe le système de sécrétion Sec en empêchant l'établissement d'un gradient de proton de part et d'autre de la membrane cytoplasmique par son action protonophore. L'expérience consiste comme précédemment à utiliser le DSS en plus d'un agent inhibiteur du système de sécrétion Sec, ce qui entraîne l'accumulation des complexes dans le cytoplasme.

Les bactéries sont donc cultivées comme précédemment et traitées au DSS. Les cellules sont ensuite mises en présence de l'azoture de sodium ou du CCCP. Les extraits cytoplasmiques sont ensuite analysés comme précédemment.

La figure 22 présente le résultat de ces manipulations. Les trois mêmes bandes sont retrouvées comme à la figure 21, indiquant qu'il ne semble pas y avoir apparition d'une nouvelle bande suite au traitement par les inhibiteurs, aussi bien pour l'azoture de sodium que le CCCP. Pour cette raison, l'emploi d'inhibiteurs de la sécrétion n'a pas été retenu pour la suite des expériences.

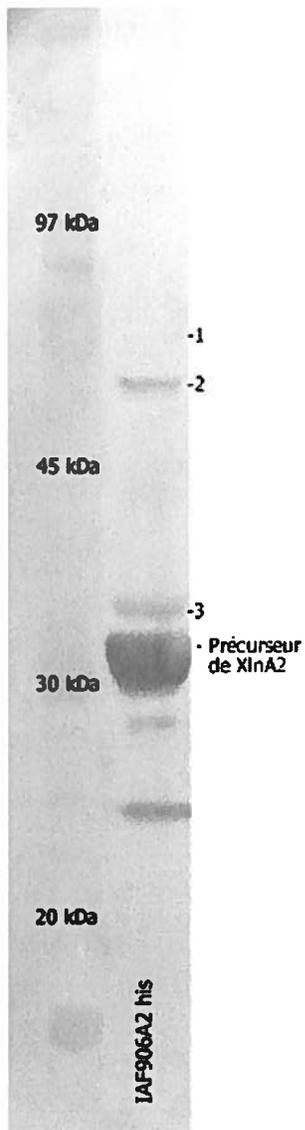


**Figure 22 : Utilisation d'inhibiteurs du système Sec.** L'azoture de sodium et le CCCP sont deux inhibiteurs du système de sécrétion Sec. En utilisant ces produits, on tente d'augmenter le temps de contact entre la xylanase A2 et sa chaperonne.

### 11.2.5 Utilisation d'un autre *cross-linker* pour lier la chaperonne à la xylanase A2 de *Streptomyces lividans*

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le DSS n'arrivait pas à créer une liaison réticulaire entre la xylanase A2 et sa chaperonne. Pour tenter de résoudre ce problème, un second *cross-linker*, le n-[ $\gamma$ -maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS), a été ajouté à la suspension bactérienne pour créer des liaisons réticulaires différentes de celles créées par le DSS. Alors que le DSS possède deux extrémités pouvant lier les amines primaires, le GMBS possède deux extrémités aux propriétés différentes. Une de ses extrémités permet de lier les amines primaires, exactement comme le DSS. Son autre terminaison maleimide reconnaît les groupements sulfhydryles des thiols et les lie en formant un lien thioether stable.

Les bactéries sont donc cultivées comme précédemment et traitées avec un mélange de DSS et GMBS. Les extraits cytoplasmiques sont analysés comme précédemment (figure 23).



**Figure 23 : Utilisation du DSS et du GMBS pour créer des liaisons réticulaires chez IAF906A2his. Les bandes sont révélées par des anticorps anti-xylanase A2. IAF906A2his. Protéines cytoplasmiques de *S. lividans* IAF906A2his.**

Bande	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO6169	61128	Protéine de régulation probable
	SCO6608	57436	Protéine sécrétée probable
	SCO1230	58499	Tripeptidylaminopeptidase sécrétée putative
2	SCO1230	58499	Tripeptidylaminopeptidase sécrétée putative
	SCO7304	60079	Protéine hypothétique
	SCO7699	51715	Protéine de liaison aux nucléotides putative
	SCO4159	28869	GlnR, protéine régulatrice de la transcription
3	SCO6723	36487	Oxydoréductase probable
	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO1858	33234	Protéine hypothétique
	SCO6549	33566	Protéine hypothétique
	<b>SCO5931</b>	<b>32530</b>	<b>Xylanase A2</b>
	SCO6580	44537	Protéine hypothétique

**Tableau 8 : Identification des protéines de la figure 23.**

Trois bandes sont présentes à un poids moléculaire supérieur à celui de la xylanase A2 (32 kDa) dont une contient de la xylanase A2.

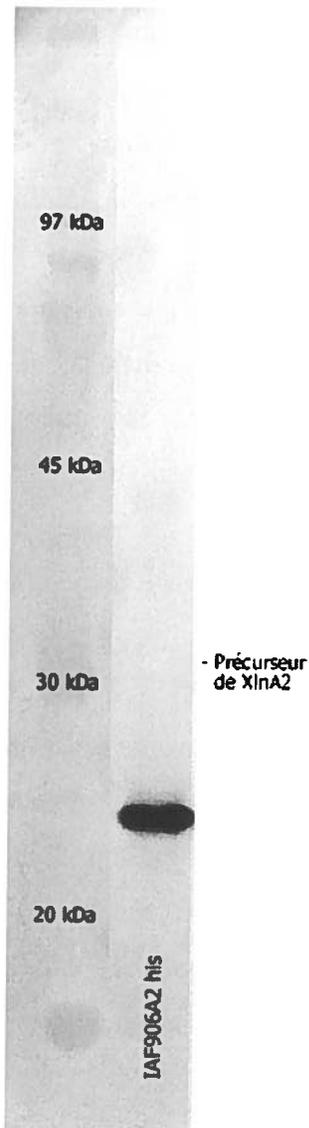
La première bande à environ 60 kDa ne contient pas de xylanase A2. Les trois autres protéines présentes ont un poids moléculaire voisin de 60 kDa et de ce fait ne peuvent pas être impliquées dans la formation d'un complexe. Aucune protéine de faible poids moléculaire n'est présente, donc les liaisons réticulaires n'entrent pas en jeu dans la formation de cette bande.

La bande #2 à environ 56 kDa ne contient pas de xylanase A2. Les produits des gènes SCO1230 et SCO7304 ont un poids moléculaire attendu. Finalement, un dimère de GlnR formé grâce à la présence des *cross-linkers* pourrait expliquer la présence de cette protéine à cette position.

La bande #3 à environ 34 kDa contient de la xylanase A2 à un poids moléculaire légèrement supérieur au poids du précurseur seul. Cependant, aucune des autres protéines identifiées dans cette bande ne peut être complexée au précurseur de la xylanase A2 pour atteindre ce poids moléculaire. L'utilisation du DSS et du GMBS n'a pas été fructueuse dans l'identification d'une chaperonne cytoplasmique se liant à la xylanase A2.

### **11.2.6 Recherche de chaperonnes membranaires impliquées dans la sécrétion de la xylanase A2 de *Streptomyces lividans***

Une autre hypothèse était que la chaperonne de la xylanase A2 puisse être associée à la membrane de *S. lividans*. Dans ce cas, la récupération des protéines cytoplasmiques ne permettrait pas de recouvrer un complexe formé entre le précurseur de la xylanase A2 et sa chaperonne. Pour vérifier cette hypothèse, les bactéries ont été cultivées comme précédemment. Le DSS et le GMBS ont été utilisés pour créer des liaisons réticulaires. Les cellules ont été cassées à la presse de French, puis le lysat a été ultracentrifugé. Le culot contenant les membranes a été solubilisé dans une solution d'urée et de CHAPS. Cet extrait a été filtré et purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel selon les conditions optimales de récupération du précurseur de xylanase A2. Les protéines ont été récupérées et analysées comme précédemment (figure 24).



**Figure 24 : Recherche de protéines chaperonnes du système Sec dans la membrane.** Les bandes sont révélées avec des anticorps dirigés contre la xylanase A2. **IAF906A2his.** Protéines membranaires extraites de la souche IAF906A2his

Une seule bande est détectée à un poids moléculaire d'environ 26 kDa, soit environ 6 kDa de moins que le précurseur de la xylanase A2. Elle est de poids moléculaire similaire à une bande retrouvée dans l'échantillon cytoplasmique traité avec les mêmes *cross-linkers* (figure 23). Le précurseur de la xylanase A2, d'environ 32 kDa, n'a pas été récupéré.

### **11.3 Recherche de protéines chaperonnes impliquées dans la sécrétion par le système Tat de la xylanase C chez *Streptomyces lividans***

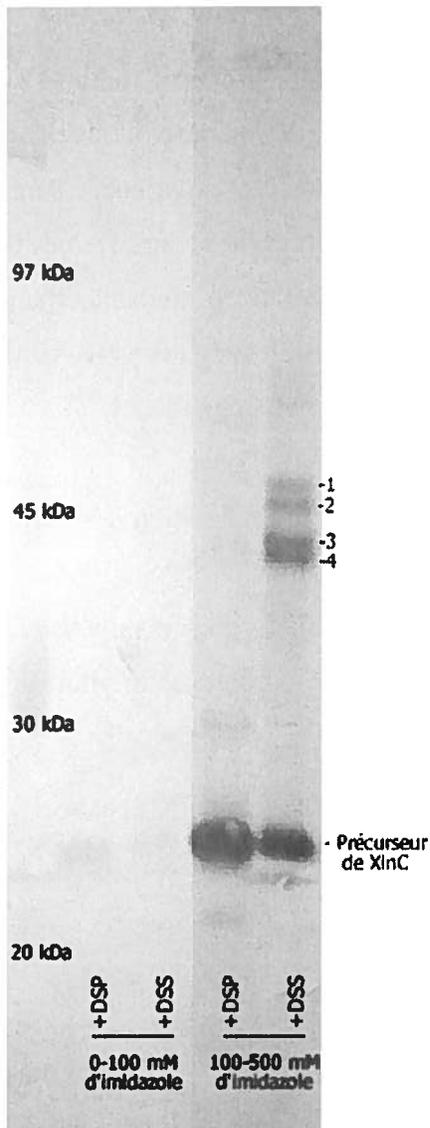
Les protéines, synthétisées dans le cytoplasme, doivent être maintenues dans un état compétent à la translocation pour transiter par une des voies de sécrétion. Pour la voie Sec, la protéine chaperonne SecB ainsi que quelques chaperonnes générales permettent aux précurseurs de maintenir leur forme linéaire compétente pour la sécrétion par ce système. Une voie de sécrétion nouvellement étudiée, le système Tat, permet la translocation de précurseurs déjà repliés dans le cytoplasme. Le repliement des précurseurs, leur maintien dans une conformation compétente à la translocation et la signalisation jusqu'au complexe de sécrétion Tat est vraisemblablement le fait d'une ou plusieurs protéines chaperonnes du système Tat. Le but de cette partie de l'étude est d'identifier une ou plusieurs chaperonnes du système de sécrétion Tat chez *S. lividans*.

Pour l'identification d'une chaperonne du système de sécrétion Tat, un clone de *S. lividans* a été construit pour réaliser des expériences de chromatographie d'affinité. Il s'agit de *S. lividans* la souche IAF916Chis, un clone xylanase négatif dans lequel a été introduit un plasmide à copies multiples codant pour la xylanase C, une protéine sécrétée exclusivement par le système de sécrétion Tat. La xylanase C a été modifiée en introduisant une étiquette de 6 histidines (*his-tag*) à son extrémité C-terminale, ce qui permet de la récupérer par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose-nickel. Encore ici, on tente de récupérer l'association momentanée entre le précurseur de la xylanase C et une chaperonne qui permettrait son repliement correct et le dirigerait vers le système de sécrétion Tat.

### 11.3.1 Utilisation de *cross-linkers* pour lier la chaperonne à la xylanase C de *Streptomyces lividans* et purification sur colonne de sépharose-nickel

Des *cross-linkers* ont été utilisés pour tenter de fixer l'association temporaire du précurseur de xylanase C avec sa chaperonne. Les *cross-linkers* utilisés dans ces expériences sont le DSP et le DSS, qui lient les protéines à leurs amines primaires libres, donc aux lysines et à leur extrémité N-terminale. Comme le DSP est coupé par le  $\beta$ -mercaptoéthanol, l'échantillon traité avec ce *cross-linker* est utilisé comme contrôle négatif vis-à-vis les protéines liées avec le DSS, qui n'est pas altéré en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol.

La récupération des cellules, le traitement avec les *cross-linkers*, la préparation des extraits cellulaires, la chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel, le SDS-PAGE et le transfert sur membrane de nitrocellulose sont réalisés comme précédemment. Des anticorps anti-xylanase C sont utilisés pour révéler la présence de complexes impliquant la xylanase C (figure 25).



**Figure 25 : Utilisation du DSP et du DSS pour former des liaisons réticulaires entre la xylanase C et sa chaperonne. Les protéines sont éluées de la colonne de sépharose-nickel avec 100 et 500 mM d'imidazole.**

**+DSP.** Protéines cytoplasmiques de IAF916Chis avec DSP.

**+DSS.** Protéines cytoplasmiques de IAF916Chis avec DSS.

Bande	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO4662	43754	Facteur d'élongation de la traduction EF-Tu.1
	SCO5373	52014	Chaîne $\beta$ d'ATP synthétase
	SCO5249	52161	Protéine de liaison aux nucléotides putative
	SCO2180	51365	Dihydroliipoamide déshydrogénase probable
	SCO1553	42650	Uroporphyrin-III méthyltransférase putative
	SCO4762	56953	GroEL
2	SCO4662	43754	Facteur d'élongation de la traduction EF-Tu.1
	SCO2008	43477	Transaminase d'acides aminés à chaîne latérale non linéaire (Leu, Ile & Val)
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO5249	52161	Protéine de liaison aux nucléotides putative
	SCO5357	75133	Facteur de terminaison de la transcription rho
	SCO6169	61128	Protéine de régulation probable
3	SCO2008	43477	Transaminase d'acides aminés à chaîne latérale non linéaire (Leu, Ile & Val)
	<b>SCO0105</b>	<b>25657</b>	<b>Xylanase C</b>
	SCO4662	43754	Facteur d'élongation de la traduction EF-Tu.1
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO5624	33545	Protéine ribosomale S2
4	<b>SCO0105</b>	<b>25657</b>	<b>Xylanase C</b>
	SCO1169	42891	Xylose isomérase
	SCO5115	38179	BldKD, ATPase de transporteur ABC putative
	SCO5373	52014	Chaîne $\beta$ d'ATP synthétase
	SCO4752	38962	O-sialoglycoprotéine endopeptidase probable
	SCO1639	34915	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomérase sécrétée putative
	SCO4771	40091	Inosine-5'-monophosphate déshydrogénase putative
	SCO2073	34067	Grande sous-unité ribosomale pseudouridine synthétase probable

**Tableau 9 : Identification des protéines de la figure 25.**

Un lavage à 100 mM d'imidazole élue une petite quantité du précurseur de la xylanase C, tandis que 500 mM permettent d'éluer la totalité de la pré-xylanase C avec les éventuels complexes.

Une bande à environ 26 kDa apparaît clairement lorsqu'on utilise 500 mM d'imidazole. Il s'agit du précurseur de la xylanase C, d'un poids moléculaire supérieur à la xylanase C mature parce qu'il contient encore son peptide signal.

La bande #1 à environ 52 kDa ne contient pas de xylanase C. Les protéines qu'on y retrouve possèdent un poids moléculaire attendu, à l'exception du facteur d'élongation de la traduction EF-Tu.1 qui s'est possiblement lié avec une chaîne peptidique non identifiée, ce qui a fait augmenter son poids. La liaison du *cross-linker* a peut-être aussi été intramoléculaire, ce qui empêche une dénaturation complète et affecte la migration. Cette protéine contient 11 résidus d'histidine, ce qui explique son affinité pour la colonne HisTrap.

Il n'y a pas de xylanase C dans la bande #2, à environ 48 kDa. Le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu.1 est présent, comme à la bande #1. Cette protéine, ainsi que le produit du gène SCO2008, interagissent avec des chaînes peptidiques, qui pourraient s'être liées entre elles ou de façon intramoléculaire, ce qui pourrait expliquer leur présence à ce poids moléculaire. Les gènes SCO5357 et SCO6169 codent pour des protéines de poids moléculaires supérieurs au poids observé et sont possiblement le résultat d'une dégradation.

La bande #3 à environ 43 kDa renferme de la xylanase C. On retrouve encore une fois les protéines codées par les gènes SCO4662 et SCO2008 qui cette fois se retrouvent à une position fidèle à leur poids moléculaire d'environ 43,5 kDa. La protéine hypothétique codée par le gène SCO1640 se retrouve non seulement dans la bande #3, mais aussi dans les bandes #1 et #2, ce qui pourrait indiquer différents degrés de dégradation de cette protéine. Finalement, aucune des protéines identifiées dans la bande #3 n'a un poids moléculaire qui comblerait l'écart entre les 26 kDa du précurseur de la xylanase C et les 43 kDa de cette bande.

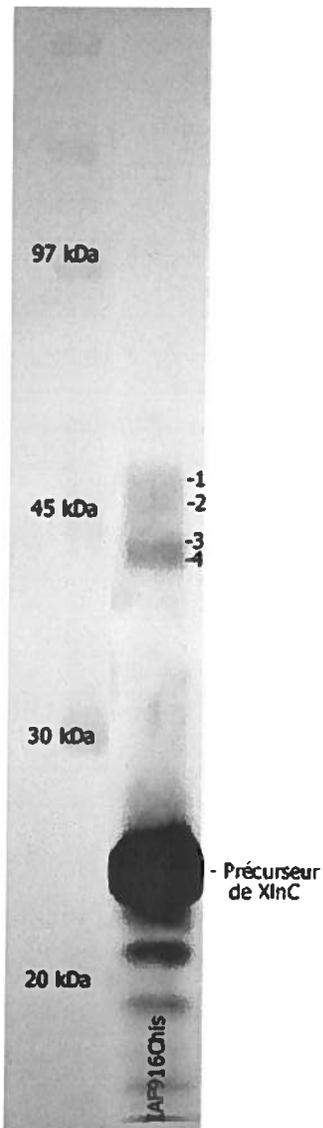
Finalement, la xylanase C est aussi présente dans la bande #4. Bien que la peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase possède une activité de chaperonne, son poids moléculaire renverrait un complexe formé entre le précurseur de la xylanase C et cette protéine à plus de 60 kDa. Les protéines retrouvées dans la bande #4 ont pratiquement toutes un poids moléculaire qui peut expliquer leur présence dans cette bande sans l'action du *cross-linker*. La protéine codée par le gène SCO5373 devrait être plus haute, mais une dégradation est possible et expliquerait sa présence à ce poids moléculaire.

Les 4 bandes issues du traitement au DSP sont éliminées par l'ajout de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Cette observation démontre qu'il y a formation de complexes protéiques grâce au *cross-linker*. Le fait que ces bandes répondent aux anticorps dirigés contre la xylanase C laisse entrevoir qu'il y a un complexe formé entre le précurseur de la xylanase C et sa chaperonne qui migre entre 40 et 45 kDa, mais que la présence d'autres protéines en plus fortes concentrations nuise à son identification par la spectrométrie de masse.

### **11.3.2 Chromatographie sur colonne d'immuno-affinité pour purifier des complexes entre le précurseur de la xylanase C et sa chaperonne chez *Streptomyces lividans***

Pour tenter de purifier le précurseur de la xylanase C complexé avec sa chaperonne en réduisant le nombre de protéines contaminantes, une colonne sur laquelle des anticorps anti-xylanase C ont été immobilisés a été utilisée. Ces anticorps ont eux-mêmes été purifiés à partir du sérum de lapin sur une autre colonne d'affinité contenant de la xylanase C immobilisée.

Pour les expériences de chromatographie d'immuno-affinité, les protéines intracellulaires d'une culture de *S. lividans* IAF916Chis de 72 heures sont traitées au DSS, récupérées comme précédemment et solubilisées dans du tampon PBS. Les protéines sont adsorbées sur la colonne d'immuno-affinité. Après un lavage, les protéines sont éluées avec une solution acide. Les protéines sont dialysées et lyophilisées avant d'être récupérées dans de l'eau milli-Q. Les protéines sont analysées comme précédemment (figure 26).



**Figure 26 :** Utilisation de la colonne d'immuno-affinité avec anticorps immobilisés pour purifier le précurseur de la xylanase C liée à sa chaperonne. Immunobuvardage de type western avec des anticorps primaires dirigés contre la xylanase C.

Bande	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO1651	32978	Protéine hypothétique
	SCO6169	61128	Protéine régulatrice probable
	SCO5737	79481	Polyribonucléotide nucléotidyltransférase
2	SCO1651	32978	Protéine hypothétique
	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
3	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO1651	32978	Protéine hypothétique
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO1858	33234	Protéine hypothétique
	SCO5113	65493	BldKB, lipoprotéine de système de transport ABC putative
4	SCO5477	65313	Lipoprotéine de liaison d'oligopeptides putative
	SCO2582	43900	Protéine hypothétique
	SCO1651	32978	Protéine hypothétique
	SCO5113	65493	BldKB, lipoprotéine de système de transport ABC putative
	SCO6169	61128	Protéine régulatrice probable

**Tableau 10 : Identification des bandes de la figure 26.**

Suite à la purification des protéines de *S. lividans* IAF916Chis sur la colonne d'immuno-affinité avec anticorps immobilisés, 5 bandes réagissent lors de l'immunobuvardage de type western effectué avec des anticorps primaires dirigés contre la xylanase C. La bande la plus forte d'environ 26 kDa est le précurseur de la xylanase C.

Aucune des 4 autres bandes ne contient de xylanase C. Les bandes sont homologues à celles révélées à la figure 20, mais ne contiennent pas les mêmes protéines. Les protéines codées par les gènes SCO2582, SCO1651, SCO6169 et SCO1640 se retrouvent dans plusieurs de ces bandes, suggérant une migration aléatoire causée par une liaison intramoléculaire due au DSS. Outre ces protéines, les produits des gènes SCO5737, SCO5113 et SCO5477 sont tous de poids moléculaire supérieur à celui attendu. Une dégradation de ces protéines pourrait expliquer leur migration ne correspondant pas à leur poids moléculaire.

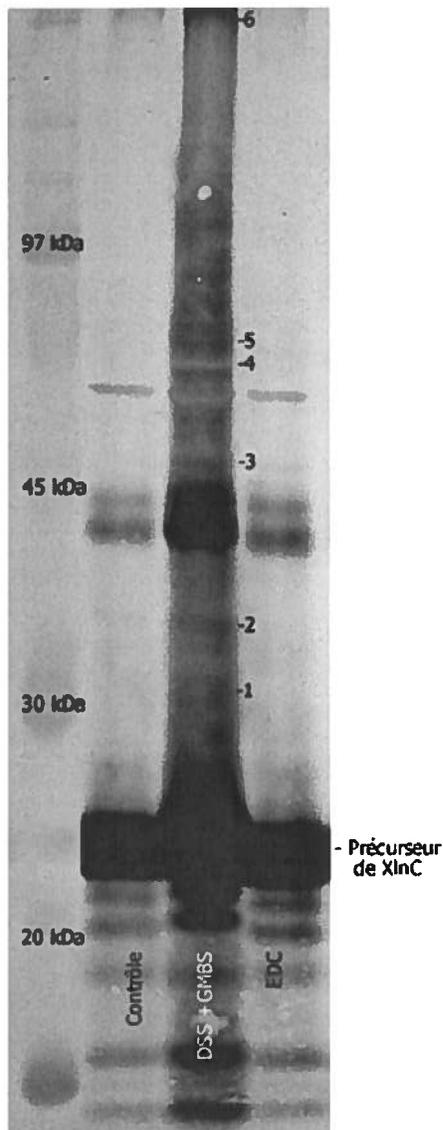
La colonne d'immuno-affinité ne semble pas donner de meilleurs résultats que la colonne HisTrap.

### **Utilisation de multiples *cross-linkers* pour lier la chaperonne à la xylanase C de *Streptomyces lividans***

Tout comme pour la xylanase A2, il se pouvait que le DSS ne puisse pas créer une liaison réticulaire entre la xylanase C et sa chaperonne, ou encore que cette liaison empêche la purification du complexe par chromatographie sur colonne de sépharose-nickel. Deux *cross-linkers* ont été ajoutés avec le DSS pour tenter d'optimiser la création d'une liaison covalente entre la xylanase C et sa chaperonne, soit le n-[g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS) et le 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC). Le GMBS est un *cross-linker* hétérobifonctionnel avec une extrémité NHS-ester et une terminaison maleimide qui permet la liaison des groupes sulfhydryles. L'EDC possède lui aussi une extrémité NHS-ester, couplé à une terminaison pouvant lier les carboxyles. L'utilisation de tous ces *cross-linkers* devrait permettre de créer au moins une liaison réticulaire entre la xylanase C et sa chaperonne.

Les protéines intracellulaires d'une culture de *S. lividans* IAF916Chis de 72 heures sont traitées avec les différents *cross-linkers*, puis récupérées comme précédemment et solubilisées. Les échantillons sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel et analysés comme précédemment.

Parce que la création de liaisons réticulaires avec le GMBS requiert l'usage de tampons différents du traitement avec l'EDC, les protéines ont été traitées séparément.



**Figure 27 : Utilisation de multiple *cross-linkers* pour promouvoir la formation d'une liaison covalente du précurseur de la xylanase C avec sa chaperonne.** Des extraits de protéines cytoplasmiques de *S. lividans* de souche IAF916Chis traités avec les différents *cross-linkers* sont purifiés sur colonne de sépharose-nickel.

**Contrôle :** Échantillon sans *cross-linkers*.

**DSS +GMBS :** Liaisons réticulaires avec du DSS et du GMBS.

**EDC :** Liaisons réticulaires avec l'EDC.

Bande #	Gène	Poids (Da)	Fonction
1	SCO1651	32978	Protéine hypothétique
	SCO4754	38111	Régulateur de la transcription probable
	SCO5817	31586	Hydrolase de l'ADN
	SCO0886	36483	Régulateur transcriptionnel de la famille LacI putatif
	SCO2532	39122	Protéine similaire à PhoH
	SCO5249	52161	Protéine de liaison aux nucléotides
	SCO2045	23598	Protéine hypothétique
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO4762	56953	GroEL
	SCO1254	51731	Adénylo-succino lyase putative
2	SCO6175	34611	Protéine hypothétique
	SCO2394	44308	Protéine sécrétée putative
	SCO6580	44537	Protéine hypothétique
	SCO4952	20812	Régulateur transcriptionnel de la famille tetR putatif
	SCO6723	36487	Oxydoréductase probable
	SCO4152	64395	5'-nucléotidase secrete putative
3	<b>SCO0105</b>	<b>25657</b>	<b>Xylanase C</b>
	SCO2394	44308	Protéine sécrétée putative
	SCO6169	61128	Protéine de régulation probable
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique
	SCO2386	42716	Protéine hypothétique
	SCO2786	58532	Beta-N-acétylhexosaminidase
	SCO6691	75667	Phospholipase C putative
	SCO3827	48259	Protéine de synthèse de cofacteur molybdène probable
	SCO6738	46656	Carboxypeptidase probable
4	SCO6608	57436	Protéine sécrétée
	SCO6169	61128	Protéine de régulation probable
	SCO2758	64443	Beta-N-acétylglucosaminidase
	SCO5745	61045	Hydrolase putative
5	<b>SCO0105</b>	<b>25657</b>	<b>Xylanase C</b>
	SCO6691	75667	Phospholipase C putative
	SCO4152	64395	5'-nucléotidase secrete putative
	SCO5113	65493	BldKB, lipoprotéine de système de transport ABC putative
	SCO1908	64658	Grande protéine sécrétée probable
	SCO1475	75850	Protéine primosomale n' putative
	SCO4856	64748	Sous-unité de succinate déshydrogénase
	SCO3671	66230	DnaK
	SCO4952	20812	Régulateur transcriptionnel de la famille tetR putatif
6	<b>SCO0105</b>	<b>25657</b>	<b>Xylanase C</b>
	SCO4952	20812	Régulateur transcriptionnel de la famille tetR putatif
	SCO1640	52064	Protéine hypothétique

**Tableau 11 : Identification des bandes de la figure 27. Les bandes marquées d'un chiffre ont été découpées et analysées à la spectrométrie de masse pour identification.**

Le DSS et le GMBS nécessitant un traitement identique, ils ont été utilisés en même temps. L'EDC requiert des tampons et un traitement différent et a été utilisé séparément.

La colonne « DSS + GMBS » présente les complexes formés par l'ajout de DSS et de GMBS pour lier la xylanase C à une chaperonne. En comparant cette colonne avec le contrôle négatif, on peut voir 6 bandes qui ne sont pas présentes chez le témoin.

La bande #1 à environ 31 kDa ne contient pas de xylanase C. Elle présente plusieurs protéines dont le poids moléculaire explique leur présence à cette position. D'autres, de poids moléculaire supérieur, comme les protéines codées par les gènes SCO1640 et SCO1254, sont possiblement victime de dégradation.

La bande #2 à environ 35 kDa ne contient pas de xylanase C. Les protéines présentes semblent toutes avoir été partiellement dégradées, à l'exception de la protéine codée par le gène SCO4952. Cette protéine est aussi présente dans la bande #5 à un poids moléculaire beaucoup plus élevé.

La bande #3 à environ 52 kDa contient de la xylanase C, signe qu'il y a probablement liaison réticulaire entre celle-ci et une protéine chaperonne. Aucune des autres protéines retrouvées dans cette bande n'a un poids moléculaire d'environ 25 kDa pouvant combler l'écart entre le poids de la xylanase C et le poids de cette bande.

La bande #4 à environ 61 kDa ne contient pas de xylanase C. Les protéines qu'elle contient ont toutes un poids moléculaire attendu.

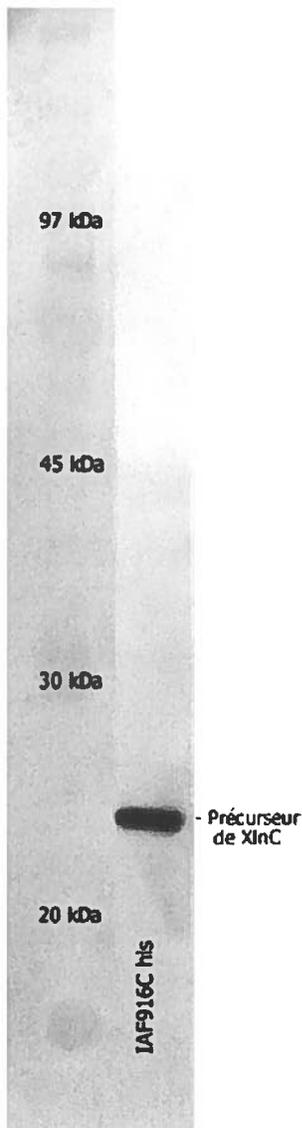
La bande #5 à environ 66 kDa contient de la xylanase C. Elle présente encore une fois le régulateur transcriptionnel de la famille tetR putatif codé par le gène SCO4952. Un dimère de cette protéine, associé à la xylanase C, migrerait à cette position. Les autres protéines retrouvées dans cette bande ont des poids moléculaires attendus. On retrouve particulièrement la chaperonne DnaK (66 kDa), connue comme chaperonne du système Tat, qui n'est manifestement pas liée à la xylanase C ici.

Finalement, la bande #6 à plus de 200 kDa semble renfermer un amas de protéines. La xylanase C est présente, mais peu d'informations ressortent de cette bande.

La dernière colonne « EDC » présente les complexes formés par l'ajout d'EDC pour lier la pré-xylanase C à une chaperonne. En comparant cette colonne avec le contrôle négatif, aucune nouvelle bande n'apparaît. L'ajout d'EDC ne semble pas créer de liaisons entre le précurseur de la xylanase C et une chaperonne.

### 11.3.3 Recherche de chaperonnes membranaires impliquées dans la sécrétion de la xylanase C de *Streptomyces lividans*

Parallèlement à l'utilisation du DSS et du GMBS pour lier des protéines cytoplasmiques, nous avons émis l'hypothèse que la chaperonne de la xylanase C pouvait être associée à la membrane. Pour vérifier cette hypothèse, les fractions membranaires des cellules traitées au DSS et GMBS de l'expérience précédente ont été récupérées dans un tampon urée et CHAPS et purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel. Les protéines ont été séparées et analysées comme précédemment (figure 28).



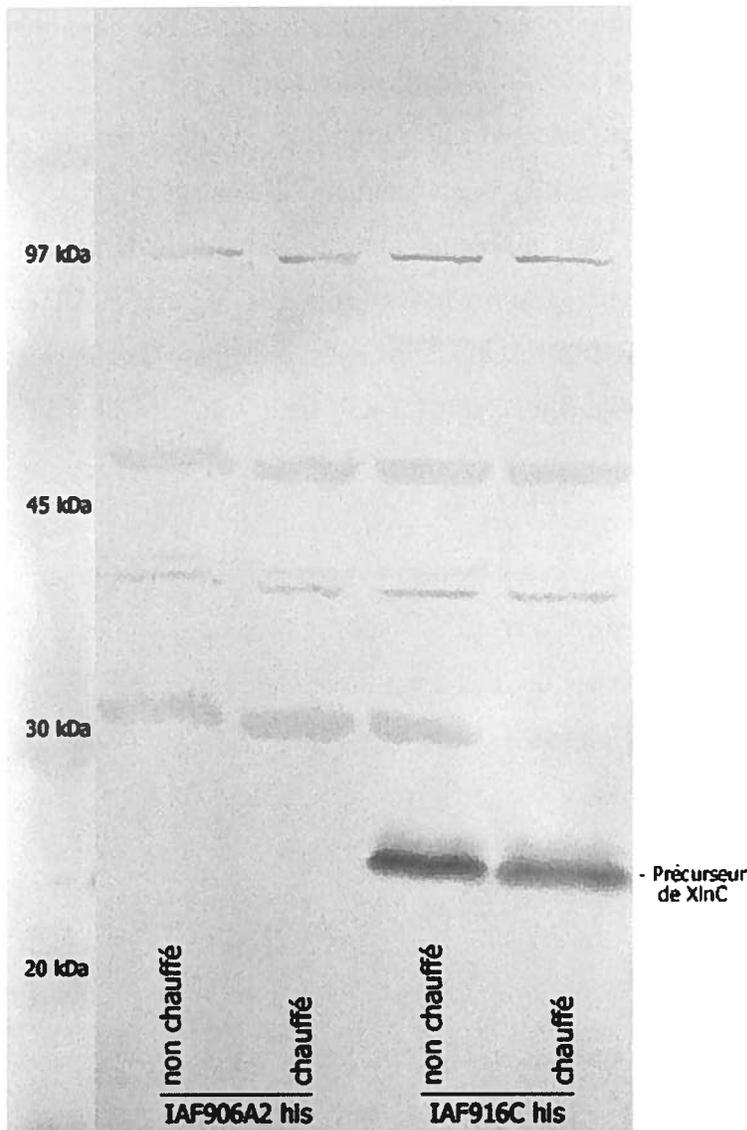
**Figure 28 : Recherche de protéines chaperonnes du système Tat dans la membrane.** Les bandes sont révélées avec des anticorps dirigés contre la xylanase C.

Aucune bande n'apparaît à un poids moléculaire supérieur à 26 kDa, le poids du précurseur de la xylanase C, indiquant l'absence de formation de liaisons réticulaires entre la xylanase C et une éventuelle chaperonne membranaire.

#### **11.3.4 Utilisation du formaldéhyde pour créer des liaisons réticulaires clivables entre la xylanase C et sa chaperonne chez *Streptomyces lividans***

Bien que la combinaison de deux *cross-linkers* dirigés contre les groupes amines et sulfhydryles tend à lier plus de protéines que précédemment, l'identification de la chaperonne éventuelle de la xylanase C reste problématique. Le formaldéhyde est une molécule qui réagit avec les groupes amines et sulfhydryles (Bolt, 1987). Cette molécule est couramment utilisée pour former des liaisons réticulaires entre protéines. Ces liaisons résistent à la dénaturation par le SDS et le  $\beta$ -mercaptoéthanol, mais sont clivables à la chaleur.

Les cellules ont été traitées au formaldéhyde et les extraits cytoplasmiques sont préparés comme précédemment. Les liaisons formées par le formaldéhyde sont détruites à la chaleur pour la moitié de l'échantillon protéique. Les complexes sont ensuite séparés et analysés comme précédemment (figure 29).



**Figure 29 : Utilisation du formaldéhyde pour former des liaisons clivables entre les protéines.** Les complexes sont révélés avec des anticorps anti-xylanase C.

L'échantillon protéique issu de la souche IAF916Chis présente 6 bandes répondant aux anticorps anti-xylanase C avant l'application de la chaleur. Deux de ces bandes ne se retrouvent pas chez IAF906A2his. La xylanase C à environ 26 kDa n'est pas synthétisée par IAF906A2his et est absente. La seconde bande, de plus faible intensité, se situe à environ 67 kDa. Finalement, lorsqu'on détruit les liaisons dues au formaldéhyde par la chaleur, une bande située à environ 30 kDa disparaît.

Il s'agit ici d'un essai préliminaire réalisé sur l'extrait cytoplasmique brut, sans purification préalable.

## 12. Discussion

Les différents outils informatiques de prédiction des gènes codant pour des protéines sécrétées par le système Tat chez *S. coelicolor* donnent des résultats divergeants quant au nombre et à l'identité des substrats. En effet, le programme TatScan qui sert de base à cette étude prédit que 129 protéines sont susceptibles d'être sécrétées de façon Tat-dépendante par *S. coelicolor* (Li *et al.*, 2005). Le programme TatFind version 1,2 élaboré par Rose et ses collaborateurs prédit 145 substrats potentiellement Tat pour la même bactérie (Rose *et al.*, 2002). Finalement, une version modifiée de TatFind prédit 230 substrats potentiellement sécrétés par le système Tat (Schaerlaekens *et al.*, 2004).

### 12.1 Protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans*

L'objectif était de confirmer expérimentalement certaines prédictions informatiques. En comparant le profil obtenu par gel bidimensionnel des protéines sécrétées par la souche sauvage de *S. lividans*, une voisine de *S. coelicolor*, et celui de son mutant  $\Delta$ tatC, 7 protéines ont été définitivement identifiées comme étant des protéines sécrétées par le système Tat (tableau 12). Non seulement sont-elles absentes dans les surnageants de culture du mutant, mais elles figurent aussi dans la liste établie par le programme TatScan. À l'exception des protéines codées par les gènes SCO2068 et SCO6131, elles se retrouvent aussi dans la liste des 145 substrats générée par TatFind. De plus, la diversité protéique obtenue ne figurant pas sur la liste de TatScan soulève plusieurs questions.

Les paramètres de recherche de TatScan sont serrés, seulement 2 dérogations à la séquence consensus S/T-R-R-X- $\Phi$ - $\Phi$ -K ont été acceptées pour chaque gène, seulement à la première (S/T) et la dernière (K) position de la séquence.

Gène	Peptide signal
SCO0677	MRH <sup>gras</sup> PF <sup>gras</sup> RD <sup>gras</sup> PAR <sup>gras</sup> PAG <sup>gras</sup> PS <sup>gras</sup> RR <sup>gras</sup> TV <sup>gras</sup> LAMACASL <sup>gras</sup> ATVPL <sup>gras</sup> FTPSHAAA ↓ ASARATGLDD
SCO1639	MRRRS <sup>gras</sup> LLIAVPTGLVTLAA <sup>gras</sup> CGDSDDSGSSNA <sup>gras</sup> SESPDASATSA ↓ APPPK
SCO2068	MTSRHRA <sup>gras</sup> SENSRTPSR <sup>gras</sup> RTVV <sup>gras</sup> KAAAAGAVLAAPLAAAALPAGAADAA ↓ PAFLH
SCO2780	MSHASATHP <sup>gras</sup> TRRG <sup>gras</sup> ILAAGGALGLGAVLAACG ↓ DGDGKSDGA
SCO2828	MAPP <sup>gras</sup> HRTTPPWGISDQRPRTAGP <sup>gras</sup> TRRS <sup>gras</sup> LLAGVAALGALGAAGCSRVATA ↓ SD
SCO6005	MTIRAGSL <sup>gras</sup> DRRTLLRG <sup>gras</sup> AIATAAMGSFAVA ↓ CSSPSED
SCO6131	MTGTPEETPTNAFAPGGRRRHRRARVSRIGARRALV <sup>gras</sup> LAMAVPVASATLAGTSAFA ↓ ADDS

**Tableau 12 : Peptides signaux des sept protéines Tat confirmées expérimentalement.** La séquence consensus est en gras. La région H hydrophobe est surlignée en gris. Le site de clivage est indiqué par le symbole « ↓ ». La délimitation des régions et le site de clivage du peptide signal ont été déterminés grâce au programme SignalP pour les protéines sécrétées ou LipoP pour les protéines membranaires.

Des sept peptides signaux des protéines Tat identifiées dans cette étude, seul celui du précurseur codé par le gène SCO2068 présente exactement la séquence consensus S/T-R-R-X-Φ-Φ-K. Le peptide signal du précurseur codé par le gène SCO0677 ne contient qu'une seule dérogation à la séquence consensus avec un résidu d'alanine final plutôt qu'un résidu lysine. Les cinq autres séquences présentent une différence à la fois au premier et au dernier résidu d'acide aminé de leur séquence consensus.

Les logiciels SignalP et LipoP permettent de déterminer quels résidus d'acide aminé forment chacune des trois sections du peptide signal, ainsi que de prédire le site de clivage du peptide signal. La charge nette des régions N des peptides signaux varie de +3 à +8. La longueur des régions N est supérieure à 12 résidus d'acide aminé pour tous les précurseurs, sauf celui codé par le gène SCO1639 avec seulement 4 résidus. Comme prévu, plusieurs résidus de glycine et de thréonine sont présents dans la région H des précurseurs, faisant baisser l'hydrophobicité globale de cette région. À la région C, la séquence A-X-A est reconnue comme site de clivage du peptide signal de 4 peptides signaux. Chez les gènes SCO1639 et SCO2068, un site A-X-A est retrouvé respectivement 3 et 4 résidus en amont du site de clivage proposé par SignalP. Ces observations sont en accord avec les données recueillies sur la structure des peptides signaux Tat.

Le gène SCO0677 code pour une chitosanase sécrétée. La sécrétion de cette protéine par le système Tat a déjà été prouvée grâce à une autre méthode. Le peptide signal de SCO0677 a été fusionné avec la portion mature de la xylanase C, une protéine strictement sécrétée par le système Tat. La sécrétion de xylanase C dans le milieu démontre que le peptide signal de cette chitosanase permet le transit via le système de sécrétion Tat (Li *et al.*, 2005). En retrouvant cette chitosanase comme candidate Tat par la technique de 2-DE, on confirme la sécrétion Tat-dépendante du produit du gène SCO0677.

Une analyse récente similaire à l'étude proposée ici a été menée chez *S. coelicolor*. Widdick et ses collaborateurs ont comparé les sécrétomes de la souche M145 et de son mutant *ΔtatC* par électrophorèse bidimensionnelle pour trouver des protéines sécrétées par le système Tat sur milieux solides R5 (Thompson *et al.*, 1980), complet (Hopwood, 1967) et mannitol-soja (Hobbs, 1989). Ces expériences ont mené à la découverte de 27 protéines Tat-dépendantes (Widdick *et al.*, 2006). De ces 27, les produits des gènes SCO1639, SCO2068 et SCO2780 sont ici confirmés.

Le système Tat permet la sécrétion de protéine dans le milieu, mais sert aussi à l'insertion de certaines protéines dans la membrane (Li *et al.*, 2005). Le gène SCO6005 code pour une lipoprotéine putative. La présence d'une lipoprotéine dans le milieu peut s'expliquer par des bris cellulaires, malgré les étapes de lavage supplémentaires pour diminuer cette possibilité.

#### **12.1.1 Substrats possiblement Tat sans être dans la liste de TatScan**

Sept autres protéines sont des protéines sécrétées dont les peptides signaux ne rencontrent pas les critères de sélection de TatScan. Ces peptides signaux ont été analysés avec SignalP pour préciser les trois domaines, rechercher le motif consensus et déterminer le site de clivage. Ces peptides signaux sont présentés au tableau 13.

Gène	Peptide signal
SCO1230	MRKSSIRRRATAFGTAGALVTATLIAGAVSAPAASA ↓ APADGHGHGHGHGR
SCO1860	MSLMRAPHACLTGGPTTLNGNTFRMPARRLATVAAATALAAGPATLAGAGSAHA ↓ TGDH
SCO2591	MFTSRARLRTRRSRLTCTALAVAAGMLVTPAVA ↓ ADKPSPGIEVP
SCO5260	MTARSTRRTAAHSRLAAVGAIIVAGALLTGCGDGTENG ↓ DSGGSDTQSAGGA
SCO6109	MFAMPRSARLTALSAALLAGALASSSTPALATAGA ↓ PATEAKLDFAVRLTI
SCO6199	MHRTRPGGHPRSIRFATLAISLTAGSALMTASPAVAVTGPAAA ↓ DSDTTHA
SCO6590	MSSIRRSRSVVLGAVLTAGSLAISTAAA ↓ VAVTGGTPVA

**Tableau 13 : Peptides signaux de sept protéines sécrétées.** La région H hydrophobe est surlignée en gris. Le site de clivage est indiqué par le symbole « ↓ ».

De ces 7 peptides signaux, 5 possèdent un doublet d'arginine dans leur région N, mais aucun ne présente le motif consensus S/T-R-R-X-Φ-Φ-K. Ce motif n'est cependant pas toujours requis pour la sécrétion Tat (Hinsley *et al.*, 2001; Ignatova *et al.*, 2002). Les régions H présentent toutes des résidus de glycines et/ou de thréonine, ce qui fait diminuer leur hydrophobicité, un caractère propre aux peptides signaux Tat. Aucun de ces peptides signaux ne présente de résidus d'acide aminé à chaîne latérale chargée positivement à la région C. Une telle charge permet normalement aux peptides signaux Tat d'inhiber la sécrétion Sec. Finalement, toutes les protéines, sauf celle codée par le gène SCO5260, possèdent un site de clivage du peptide signal A-X-A. Un tel site de clivage n'est pas nécessaire à la maturation de la protéine Tat (Li *et al.*, 2006). Ces observations laissent croire que ces protéines sont sécrétées par le système Tat.

Le programme TatFind version 1.2 développé par Rose et ses collaborateurs sonde la séquence génomique des microorganismes à la recherche de substrats Tat selon des critères de recherche différents de ceux de TatScan. Le programme recherche, entre les résidus 2 et 35 d'une séquence codante, la séquence  $\Phi^1$ -R-R- $\Phi^2$ - $\Phi^3$ -F/I/L/M/V, où  $\Phi^1$ ,  $\Phi^2$  et  $\Phi^3$  sont des résidus d'acide aminé avec des valeurs d'hydrophobicité respectives  $\leq 0,26$ ,  $\leq 0,02$  et  $\geq 0,77$  et où les résidus  $\Phi^2$  et  $\Phi^3$  ne peuvent pas avoir une chaîne latérale chargée positivement. Cette séquence a été déduite de recherches sur *Halobacterium sp.* NRC-1, puis raffinée selon le motif consensus retrouvé chez des substrats Tat putatifs chez d'autres *Halobacteriaceae* (Rose *et al.*, 2002). Ce programme prédit 145 protéines Tat-dépendantes pour *S. coelicolor* (Annexe B). De ces 145 protéines, 65 (~45%) ne se retrouvent pas dans la liste générée par TatScan qui sert de base de comparaison pour ce

travail. De même, 49 protéines (~38%) de la liste de TatScan ne se retrouvent pas dans la liste de TatFind.

Une version modifiée de TatFind a été utilisée par Schaerlaekens et ses collaborateurs. Cette version recherche la séquence R-R-X-F/I/L/M/V-F/I/L/M/V (Schaerlaekens *et al.*, 2004). En criblant le génome de *S. coelicolor*, 230 substrats Tat possibles ont été trouvés. Ces résultats restent à démontrer expérimentalement. Une liste partielle de 109 des 230 gènes est disponible. Des 109, 59 gènes ne se retrouvent pas sur la liste de TatScan. De la même façon, 78 gènes de la liste de TatScan ne se retrouvent pas sur la liste partielle de Schaerlaekens et ses collaborateurs.

Les protéines probablement sécrétées par le système Tat découvertes dans cette étude présentées au tableau 13 possèdent toutes un peptide signal ne répondant pas aux critères de recherche de chacun de ces programmes informatiques. Il est clair que la recherche du motif consensus seulement ne permet pas de trouver tous les substrats Tat d'un microorganisme. De même, la dépendance au système Tat ne peut être déclarée pour une protéine sur la seule présence du motif consensus dans son peptide signal (Li *et al.*, 2005). Ces programmes informatiques d'analyse génomique sont tous limités par leurs paramètres de recherche qui se concentrent sur le motif consensus. À la lumière des résultats présentés ici, on ne peut que noter l'approximation de ces programmes. La découverte d'autres protéines Tat ne répondant pas aux caractéristiques classiques comme celles présentées dans cette étude pourrait permettre d'établir des critères de recherche plus représentatifs basés sur l'ensemble du peptide signal plutôt que seulement sur la séquence consensus.

### **12.1.2 Protéines non sécrétées**

Des protéines cytoplasmiques et membranaires se retrouvent dans les surnageants de culture. La présence de ces protéines indique des bris cellulaires. Une telle contamination provenant des protéines cytoplasmiques a été rapportée lors d'analyses protéomiques de *B. subtilis* (Antelmann *et al.*, 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (Rosenkrands *et al.*, 2000) et *S. coelicolor* (Widdick *et al.*, 2006). Pour contrer ce problème, après 48 heures

de croissance, les cellules ont été lavées et incubées dans un milieu frais pour 16 heures, ce qui a permis de réduire considérablement la contamination.

Une manière d'évaluer les bris cellulaire serait de mesurer l'ADN dans les surnageants de culture (Han *et al.*, 2003). En pratiquant ce dosage au cours du temps, il serait peut-être possible de déterminer la période pendant laquelle il y a le moins de bris cellulaire et de choisir ce moment pour récupérer les surnageants de culture.

Neuf protéines identifiées dans cette étude sont des protéines possédant un domaine transmembranaire ou un domaine de liaison à une lipoprotéine les localisant à la membrane (tableau 14).

Gène	Peptide signal
SCO0494	MLLRTRTKPWRLAAALSAAALGVGLLAGCGSDS ↓ DDPADEAGGGTPAAA
SCO0638	MNARIRRSVAVVAAAVLPLSLAACSDDGDSGSSDSAQA ↓ ASSAPAATDDQ
SCO3967	MKASRIAAVGAVSGIAVLALSAPAFAP ↓ HVSV
SCO5113	MSILRNRTATAAIVAVAAGALTLTACGGGSDSSA ↓ KDNSKKKEDAKSQSK
SCO5420	MESQVRGGTRWKRFAVVMVPSVAATAAIGVALAQGALAA ↓ SFSVSGQSFKV
SCO5646	MSITKRGTTTRKGITKAGVLAVGLGMVGTAAACG ↓ SSDDGGDGGSGGGSRT
SCO5776	MKLRKVSAAASA AVLALAL TATA ↓ CGGDDKDSGSSDGGGKKITIGIKFDQPG
SCO6963	MSRRPSHPVRLLASALAAAGALLTTAACSDGGGSQS ↓ ASDTAAEEAGVARPD
SCO7501	MLPSPSHRPRARLGPLLAALLGLVVGLLPGLTGPTAAAA ↓ AESRAHTLAAG

**Tableau 14 : Peptides signaux de neuf protéines localisées à la membrane.** La région H hydrophobe est surlignée en gris. Le site de clivage est indiqué par le symbole « ↓ ».

De ces neuf protéines localisées à la membrane, 3 possèdent le doublet d'arginine dans la région N de leur peptide signal tel que présenté par LipoP. Sur les trois, deux protéines, codées par les gènes SCO0494 et SCO0638 sont des substrats Tat prédits par la version modifiée de TatFind utilisée par Schaerlaekens et ses collaborateurs. Aucune de ces protéines n'a été prédite comme substrat Tat par TatScan. Outre la séquence du gène SCO5776, tous les peptides signaux contiennent beaucoup de résidus glycine et thréonine, une caractéristique des peptides signaux Tat. Aucun des peptides signaux ne contient de résidus d'acide aminé à chaîne latérale chargé positivement, qui permettent normalement d'éviter le système de sécrétion Sec.

Des protéines typiquement cytoplasmiques et localisées à la membrane ont été rapportées dans le sécrétome de certaines bactéries, sans traces de bris cellulaire. Ces protéines sont manifestement sécrétées de façon non conventionnelle. Les protéines qui sont sécrétées de cette manière ne possèdent pas de signal ou de motif commun. Cependant, ces protéines se distinguent par leur composition en acides aminés, leur structure secondaire et leurs régions non structurées. Les caractéristiques de l'ensemble des protéines sécrétées de façon non conventionnelle connues ont été étudiées pour créer le programme informatique SecretomeP, qui permet de prédire les protéines sujettes à ce nouveau type de sécrétion (Bendtsen *et al.*, 2005).

En confrontant l'ensemble des protéines non sécrétées retrouvées dans cette étude au programme SecretomeP, trois protéines localisées à la membrane, codées par les gènes SCO4622, SCO2149 et SCO5843, ne possèdent pas de peptide signal détectable et sont positives pour la sécrétion non conventionnelle. Étant donné que des bris cellulaires ont été constatés, la sécrétion de ces protéines est pour le moins incertaine. En appliquant la technique de Han et ses collaborateurs (Han *et al.*, 2003), la sécrétion de ces protéines par une voie non conventionnelle pourrait être confirmée. Il s'agirait alors de la première démonstration de sécrétion non conventionnelle chez un Streptomyète.

### **12.1.3 2-DIGE**

L'analyse des gels bidimensionnels est parfois délicate à cause de légères différences dans la migration des protéines d'un gel à l'autre. La technique de l'électrophorèse bidimensionnelle différentielle à fluorescence (2-DIGE) a été développée pour contourner ces difficultés. Dans cette technique, les protéines de chaque échantillon sont marquées d'un fluorochrome différent, puis les échantillons sont mélangés à parts égales et soumis à l'électrophorèse bidimensionnelle sur un même gel. La présence des protéines est révélée en excitant individuellement les fluorochromes et en captant la fluorescence émise. Cette technique a été testée pour les protéines sécrétées en milieu xylose.

Le marquage des échantillons est fait avec une concentration de fluorochromes intentionnellement beaucoup plus faible que la concentration protéique. Ceci permet de marquer chaque protéine par un seul fluorochrome. On évite ainsi la liaison de multiples fluorochromes sur une même protéine, ce qui pourrait se traduire lors de la révélation par une fluorescence intense qui n'est pas corrélée avec une forte présence de cette protéine sur le gel. En utilisant un marquage minimal, on s'assure donc que l'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la concentration protéique. Dans le cadre de notre étude, ce sont les protéines présentes dans le sécrétome de la bactérie sauvage et absentes chez le mutant qui sont recherchées. La fluorescence proportionnelle à la concentration permettrait cependant d'aller plus loin dans l'analyse, permettant par exemple d'identifier des protéines Sec surproduites par le mutant pour compenser l'absence de sécrétion Tat.

La figure 17 présente la comparaison des deux techniques de gels bidimensionnels. Le 2-DIGE permet d'identifier toutes les protéines retrouvées par 2-DE, en plus de 7 autres protéines potentiellement Tat. Ceci confirme que la technique du 2-DIGE est plus sensible que le 2-DE. Les spots supplémentaires découverts par 2-DIGE ne sont toutefois pas identifiables par spectrométrie de masse, probablement parce que leur concentration est insuffisante. Pour contourner ce problème, deux techniques peuvent être employées. Premièrement, la concentration protéique utilisée peut être augmentée. Cependant, pour atteindre une concentration suffisante, il faudrait charger plus de protéines, ce qui dépasserait la limite de résolution des *Immobiline™ DryStrip*. Deuxièmement, plusieurs gels peuvent être faits en parallèle et autant de spots de la même protéine peuvent être combinés. Cette seconde méthode fait cependant perdre beaucoup de résolution à la spectrométrie de masse et l'identification devient plus difficile.

## **12.2 Recherche de protéines chaperonnes impliquées dans la sécrétion de la xylanase A2 par le système Sec chez *Streptomyces lividans***

L'utilisation de la xylanase A2 avec une étiquette de 6 histidines (*his-tag*) permet sa purification par chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel. La purification d'un extrait de protéines cytoplasmiques sur cette colonne permet de

recueillir une quinzaine de protéines, incluant le précurseur de la xylanase A2 avec *his-tag*.

La plupart des protéines récupérées par cette technique ont plusieurs histidines dans leur séquence, ce qui peut expliquer leur co-purification avec le précurseur de la xylanase A2. Comme les protéines passent sur la colonne sous forme native, il se peut que certaines histidines éloignées les unes des autres dans leur séquence primaire soient voisines après repliement et puissent ainsi lier la protéine à la colonne. Certaines de ces protéines contaminantes pourraient possiblement être éliminées en utilisant une concentration d'imidazole plus forte lors du lavage de la colonne avant l'élution. Cependant, comme le précurseur de la xylanase A2 est élué relativement facilement (figure 12), il faudrait augmenter son affinité pour ne pas le perdre du même coup, par exemple en introduisant un *his-tag* de 12 histidines au précurseur de la xylanase A2.

Comme cette technique ne permettait pas de purifier le précurseur de la xylanase A2 et une éventuelle chaperonne sans co-purifier plusieurs autres protéines contaminantes, l'approche a été modifiée. Plutôt que de tenter de discerner quelle protéine pourrait être la chaperonne, on tente de créer un complexe entre le précurseur de la xylanase A2 et une chaperonne, qu'on devrait retrouver dans une même bande.

### **12.2.1 Utilisation du DSP pour lier la chaperonne à la xylanase A2**

Le DSP comme *cross-linker* pour créer une liaison réticulaire stable entre le précurseur de la xylanase A2 et son éventuelle chaperonne a été choisi pour ses différentes propriétés qui semblaient répondre aux besoins de l'expérience. Le DSP traverse librement les membranes, ce qui permet de créer des liaisons sans causer de stress aux cellules. Ceci est particulièrement important parce qu'en période de stress, les précurseurs peuvent être pris en charge par des chaperonnes qui empêchent leur agrégation plutôt que par les chaperonnes permettant la sécrétion. Les deux extrémités NHS-ester du DSP permettent de lier les amines primaires retrouvées dans la chaîne latérale des résidus de lysine ainsi qu'à l'extrémité N-terminale des polypeptides, une liaison relativement simple à établir. Finalement, le DSP possède un pont disulfure en son

centre, ce qui permet de séparer les deux protéines liées en ajoutant du  $\beta$ -mercaptoéthanol à l'échantillon avant l'électrophorèse.

Quatre bandes sont présentes lorsque les protéines sont traitées au DSP et sont absentes lorsqu'on ajoute du  $\beta$ -mercaptoéthanol (figure 20). Les bandes #1 et #2, à plus de 200 kDa, ne contiennent pas de xylanase A2 (tableau 6). Les protéines identifiées dans ces deux bandes contiennent toutes de multiples histidines pouvant expliquer leur affinité pour la matrice de nickel de la colonne. Notons entre autres le produit du gène SCO2999 avec ses 45 résidus d'histidine et le produit de SCO5809 avec une séquence ininterrompue de 3 résidus d'histidines.

Ces 2 bandes ont été révélées par les anticorps anti-xylanase A2, bien qu'aucune de ces bandes ne contienne de xylanase A2. Il est possible que la formation de certains dimères en présence de DSP produise des épitopes qui réagissent fortuitement avec les anticorps.

La bande #3 à environ 44 kDa contient de la xylanase A2. Aucune autre protéine présente dans cette bande ne peut former un complexe avec le précurseur de la xylanase A2 qui migrerait à cette position. La présence du précurseur de la xylanase A2 dans cette bande est possiblement le résultat d'une migration aléatoire due à une dénaturation incomplète. Cette possibilité est appuyée par la présence de traînées tout le long des couloirs de migration. Comme il n'y a pas de  $\beta$ -mercaptoéthanol, les ponts disulfures ne sont pas défaits et certaines protéines, incluant le précurseur de la xylanase A2, peuvent migrer à différentes positions selon leur degré de dénaturation, sans lien avec leur poids moléculaire.

Comme la présence de la xylanase A2 dans la bande à environ 44 kDa était explicable autrement que par la formation d'un complexe avec une chaperonne, l'expérience a été reprise avec un *cross-linker* qui est stable en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol.

### 12.2.2 Utilisation du DSS pour lier la chaperonne à la xylanase A2

Le disuccinimidyl suberate (DSS) est un *cross-linker* possédant une structure identique au DSP à l'exception du pont disulfure. L'absence de ce pont permet d'utiliser du  $\beta$ -mercaptoéthanol sans défaire la liaison entre la xylanase A2 et son éventuelle chaperonne. Tous les échantillons ont été soumis aux mêmes conditions de dénaturation, qui brisent le lien créé par le DSP mais pas celui par le DSS.

Bien que 4 bandes à environ 92 kDa, 85 kDa, 61 kDa et 42 kDa ont pu être identifiées grâce à ces expériences (figure 21), la xylanase A2 n'a pas été retrouvée. Plusieurs protéines ont migré à un poids moléculaire beaucoup plus élevé que le leur. La présence de ces protéines peut s'expliquer par la formation de dimères ou de trimères. Ces complexes étant absents lorsque le *cross-linker* est coupé par le  $\beta$ -mercaptoéthanol, ils sont donc issus de la présence du DSS. La formation de liaisons réticulaires fonctionne, mais l'absence de précurseur de la xylanase A2 est problématique. L'utilisation des *cross-linkers* semble donc efficace pour créer des liaisons réticulaires dans les extraits de protéines cytoplasmiques et un complexe impliquant la xylanase A2 et une chaperonne semble possible. Cependant, ce complexe reste à découvrir.

### 12.2.3 Concentration de la xylanase A2 dans le cytoplasme

L'absence de xylanase A2 dans les bandes observées lors des expériences de liaison réticulaire avec le DSS n'était possiblement due qu'à une trop faible concentration des complexes impliquant le précurseur de la xylanase A2. Deux inhibiteurs du système de sécrétion Sec ont été utilisés pour tenter de concentrer le précurseur de la xylanase A2 dans le cytoplasme de *S. lividans* avant la récupération de la fraction protéique cytoplasmique.

Le premier inhibiteur est l'azoture de sodium, qui inhibe la fonction ATPasique de la protéine SecA (Oliver *et al.*, 1990). Le second inhibiteur testé est le carbonyl cyanamide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), qui empêche l'établissement d'un gradient de proton par son action protonophore. Les inhibiteurs ont été ajoutés au dernier moment pour permettre l'accumulation des complexes tout en évitant l'inhibition de la croissance.

L'utilisation de ces inhibiteurs (figure 22) permet d'observer les 3 bandes de poids moléculaire le plus élevé (à environ 92 kDa, 85 kDa et 61 kDa) parmi les 4 bandes trouvées lors de l'expérience précédente. Aucune nouvelle bande n'est apparue, ce qui suggère deux possibilités. Premièrement, un complexe formé du précurseur de la xylanase A2 et d'une chaperonne peut co-migrer avec l'une de ces trois bandes, dans quel cas son identification est difficile ou impossible parce que le précurseur de la xylanase A2 est masqué par la prévalence de protéines contaminantes. Deuxièmement, la chaperonne pourrait recouvrir partiellement le précurseur de la xylanase A2 en masquant les épitopes reconnus par les anticorps et un complexe formé par ces deux protéines ne serait pas détectable par immunobuvardage de type western.

Comme le but n'a pas été atteint avec les inhibiteurs, ils ont été laissés de côté pour les expériences subséquentes.

#### **12.2.4 Utilisation du GMBS pour lier la chaperonne à la xylanase A2**

Un second *cross-linker* a été utilisé pour tenter de créer des liaisons réticulaires différentes de celles créées par le DSP et le DSS. Le n-[g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS) possède une extrémité NHS-ester permettant la liaison des amines primaires et une extrémité maleimide permet de lier les groupements sulfhydryles.

Trois bandes de poids moléculaire supérieur à celui de la xylanase A2 sont révélées à l'immunobuvardage.

De ces bandes, une seule contient la xylanase A2, à un poids moléculaire légèrement supérieur au poids du précurseur seul. Comme les autres protéines contenues dans cette bande ont le poids moléculaire attendu, cette bande est probablement le résultat d'un repliement intramoléculaire de la xylanase A2.

### **12.2.5 Recherche d'une chaperonne de la xylanase A2 dans la fraction membranaire**

Une autre hypothèse est que la chaperonne peut être associée à la membrane de *S. lividans*. La fraction membranaire d'un échantillon traité au DSS et GMBS a donc été récupérée pour y rechercher des complexes impliquant la xylanase A2. Aucun complexe avec de la xylanase A2 n'a pu être révélé.

Bien que *S. lividans* soit la bactérie idéale pour l'étude de la sécrétion d'une protéine, les expériences de liaisons réalisées dans le cadre de cette étude n'ont pas permis de trouver une protéine chaperonne pour la sécrétion de la xylanase A2. L'hypothèse la plus probable est que cette protéine ne nécessite pas de chaperonne pour sa sécrétion.

La voie de sécrétion co-translationnelle faisant appel à SRP est particulièrement prévalente chez les bactéries à gram positif parce que leurs peptides signaux sont généralement plus longs et moins hydrophobes que ceux des bactéries à gram négatif (Hirose *et al.*, 2000; Yamane *et al.*, 2004). Il est probable que la xylanase A2 est sécrétée de façon co-translationnelle, ce qui expliquerait pourquoi aucune chaperonne n'a pu être retrouvée.

### 12.3 Recherche de protéines chaperonnes impliquées dans la sécrétion de la xylanase C par le système Tat chez *Streptomyces lividans*

La même méthode a été appliquée à la recherche d'une chaperonne de la xylanase C. Cette fois, il est plus évident qu'une chaperonne intervient dans la sécrétion de cette protéine. Une xylanase C couplée à un peptide signal Sec est sécrétée sous forme inactive et rapidement dégradée dans le milieu de culture (Faury *et al.*, 2004). Cette observation démontre que le précurseur de la xylanase C ne parvient pas à se replier correctement s'il n'est pas dans le cytoplasme. Un facteur cytoplasmique tel qu'une chaperonne entre donc en jeu.

#### 12.3.1 Identification de la xylanase C par spectrométrie de masse

La séquence d'acides aminés de la xylanase C présente une difficulté intrinsèque qui s'est manifestée lors de l'identification par spectrométrie de masse. Suite à la digestion par la trypsine, le spectre de masse n'identifiait que deux peptides sur les 15 attendus (figure 30).

```
1  MQQDGTQQDR  IKQSPAPLNG  MSRRGFLGGA  GTLALATASG  LLLPGTAHAA
51  TTITTNQTGT  DGMYYFWTD  GGGSVSMTLN  GGGSYSTQWT  NCGNFVAGKG
101 WSTGDGNVRY  NGYFNPVGNG  YGCLYGWTSN  PLVEYYIVDN  WGSYRPTGTY
151 KGTVSSDGGT  YDIYQTTRYN  APSVEGKTF  QQYWSVRQSK  VTSGSGTITT
201 GNHFDAWARA  GMNMGQFRYY  MIMATEGYQS  SGSSNITVSG
```

**Figure 30. Peptides générés par la digestion à la trypsine de la xylanase C.** En rouge, les deux peptides constamment identifiés par la spectrométrie de masse.

On remarque tout de suite que les cinquième et septième peptides sont particulièrement longs. Une telle longueur rend l'identification de ces peptides très difficile par spectrométrie de masse. Tous les *cross-linkers* utilisés dans cette étude possèdent au moins une extrémité pouvant lier les amines primaires retrouvées dans la chaîne latérale des lysines. Il est probable que la liaison du précurseur de la xylanase C avec l'éventuelle chaperonne par des résidus lysine bloque la digestion tryptique. En admettant que la digestion s'effectue, il est aussi très probable qu'un peptide impliquant une partie de la

xylanase C et de la chaperonne ne puisse pas être identifié comme provenant de l'une ou l'autre des protéines, en plus d'être d'une taille supérieure qui nuirait à leur identification.

Pour contourner ce problème, des digestions à la chymotrypsine ont été réalisées. Cette enzyme clive la séquence peptidique en C-terminal des résidus tyrosine, tryptophane et phénylalanine. Malheureusement, ces tests indiquent un score d'identification très faible avec seulement 2 peptides reconnus. L'utilisation de cette enzyme a donc été abandonnée et la faible disponibilité des peptides pour l'identification de la xylanase C reste donc un obstacle pour cette étude.

### **12.3.2 Utilisation du DSS pour lier la chaperonne à la xylanase C**

En ajoutant un *cross-linker*, on tente de bloquer l'association momentanée entre la protéine et son éventuelle chaperonne. Le premier *cross-linker* testé pour ces expériences est le DSS, avec ses deux extrémités NHS-ester pouvant lier les amines primaires.

Quatre bandes apparaissent suite à l'immunobuvardage (figure 25). Toutes ces bandes disparaissent lorsqu'on ajoute du  $\beta$ -mercaptoéthanol. Cette observation démontre qu'il y a formation de complexes protéiques grâce au *cross-linker*. Le fait que ces bandes répondent aux anticorps dirigés contre la xylanase C laisse entrevoir qu'il y a possiblement un complexe formé entre le précurseur de la xylanase C et sa chaperonne qui migre entre 40 et 45 kDa, mais que la présence d'autres protéines pourrait empêcher l'identification par la spectrométrie de masse.

De ces quatre bandes, deux contiennent de la xylanase C, à environ 40 kDa et 43 kDa. Cependant, les autres protéines présentes dans ces bandes n'ont pas un poids moléculaires qui permettrait de créer un complexe avec la xylanase C de cette taille.

Cette fois, le précurseur de la xylanase C est retrouvé dans une forme complexée à une autre protéine suite aux expériences de liaison réticulaire avec le DSS. L'identification de la protéine chaperonne reste problématique. Pour tenter d'éliminer les protéines

contaminantes, une seconde technique de purification est tentée, la colonne d'immuno-affinité.

### **12.3.3 Colonne d'immuno-affinité**

Comme le sérum contenant les anticorps anti-xylanase C semblaient reconnaître des complexes protéiques n'impliquant pas la xylanase C, nous avons immuno-purifié les anticorps avant de les immobiliser sur une colonne.

Quatre bandes sont détectées par les anticorps anti-xylanase C suite à la purification sur la colonne d'immuno-affinité (figure 26). Ces quatre bandes migrent à des positions homologues à celles retrouvées en purifiant l'échantillon sur colonne de sépharose-nickel. Cependant, les protéines qu'on y retrouve sont différentes. La xylanase C n'est pas présente. L'immuno-purification ne semble donc pas efficace pour purifier des complexes qu'on semble récupérer avec la chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose-nickel.

### **12.3.4 Multiples *cross-linkers***

Comme précédemment, des *cross-linkers* différents ont été utilisés pour tenter de créer des liaisons réticulaires différentes entre le précurseur de la xylanase C et son éventuelle chaperonne. Encore ici, le GMBS a été utilisé, ainsi que l'EDC, un *cross-linker* hétérobifonctionnel pouvant lier les amines primaires ainsi que les groupements carboxyles.

La formation de liaisons avec la combinaison du DSS et du GMBS semble avoir été efficace avec 3 bandes où la xylanase C peut être retrouvée (figure 27). La bande #3 à environ 52 kDa est à la même position qu'une bande retrouvée lors des expériences impliquant seulement le DSS. Cependant, les protéines qu'on y retrouve sont différentes. Cette fois, le précurseur de la xylanase C est présent. Cependant, aucune des autres protéines contenues dans la bande ne peut se fixer au précurseur pour donner un complexe de ce poids moléculaire.

Deux protéines de fonction inconnue, codées par les gènes SCO1640 et SCO2386, doivent être considérées bien que leur poids moléculaire respectif ne permette pas justifier la migration du complexe avec le précurseur de la xylanase C. Malgré cette divergence, il est possible de formuler quelques hypothèses pour expliquer leur présence. L'utilisation des *cross-linkers* cause la formation de complexes protéiques par une liaison entre deux résidus d'acide aminé dans la même protéine, entre deux protéines identiques ou encore entre deux protéines différentes (ou plus). Il se peut qu'un tel complexe migre plus vite dans le gel que la somme des masses des protéines impliquées. Il est aussi possible que la chaperonne soit tronquée avant, pendant ou après sa liaison avec le précurseur de la xylanase C, ce qui créerait un complexe de poids moléculaire inférieur au poids attendu avec la protéine entière. Ces considérations permettent d'expliquer comment ces protéines peuvent se retrouver à un poids moléculaire différent de celui attendu.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la fonction de ces protéines, notamment la création de mutants de chacun de ces gènes. Dans ces mutants, le système Tat de sécrétion devrait être aboli. Une autre approche permettrait de démontrer l'interaction des protéines *in vivo* au moyen du double hybride en utilisant la protéine fluorescente YPD. La partie N-terminale de YPD pourrait être fusionnée au précurseur de la xylanase C tandis que la partie C-terminale serait fusionnée à l'une et l'autre des protéines d'intérêt. L'interaction entre ces protéines devrait reconstituer la protéine YPD et produire de la fluorescence.

Finalement, dans la bande #5, on retrouve la protéine chaperonne DnaK. Son poids moléculaire correspond à sa migration. L'implication de cette protéine dans la sécrétion Tat a récemment été démontrée (Graubner *et al.*, 2007; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). Cependant, il nous a été impossible de récupérer un complexe impliquant le précurseur de la xylanase C et DnaK, qui migrerait à environ 92 kDa. Ces observations suggèrent que DnaK n'est pas impliquée dans la sécrétion Tat de la xylanase C.

### **12.3.5 Recherche d'une chaperonne Tat membranaire**

Comme pour le système Sec, il était possible que la chaperonne puisse être associée à la membrane de *S. lividans*. La fraction membranaire d'un échantillon traité au DSS et GMBS a donc été récupérée pour y rechercher des complexes impliquant la xylanase C.

Aucun complexe avec de la xylanase C n'a pu être révélé. Seule une bande contenant le précurseur de la xylanase C a pu être récupérée, indiquant que l'éventuelle chaperonne n'est pas une protéine membranaire. Néanmoins, ce résultat est un peu surprenant lorsque l'on considère que la protéine TatC localisée dans la membrane semble se lier au peptide signal (Alami *et al.*, 2003).

### **12.3.6 Formation de liaisons réticulaires avec le formaldéhyde**

Bien que la combinaison du DSS et du GMBS semble donner de bons résultats, nous avons tenté de créer des liaisons avec le formaldéhyde. Cette molécule permet de lier des protéines en fixant leurs amines primaires à l'aide d'un pont méthylène. Ces liaisons sont clivables à haute température, mais résistent à la dénaturation par le SDS et le  $\beta$ -mercaptoéthanol.

On utilise le clone IAF906A2his comme contrôle négatif. Comme ce clone ne produit pas de xylanase C, les complexes protéiques reconnus par les anticorps anti-xylanase C chez ce clone indiquent des interactions fortuites des anticorps avec ces protéines.

Suite au traitement au formaldéhyde, on révèle 6 bandes avec les anticorps anti-xylanase C (figure 29). Comme prévu, le précurseur de la xylanase C est récupéré chez le clone IAF916Chis mais pas chez IAF906A2his. Cinq autres bandes sont présentes. Parmi celles-ci, une seule à environ 68 kDa n'est pas présente chez le contrôle. La protéine chaperonne DnaK, reconnue comme chaperonne du système Tat ne peut pas être impliquée dans la formation de ce complexe à cause de son poids moléculaire trop important pour former un complexe de 68 kDa avec le précurseur de la xylanase C. Il s'agirait donc d'une chaperonne d'environ 42 kDa, possiblement une HSP40.

Une autre bande à environ 30 kDa est la seule bande qui disparaît lorsqu'on chauffe l'échantillon. Cette observation démontre qu'une augmentation de la température permet de cliver les liaisons formées par le formaldéhyde. Cependant, comme aucune autre bande n'est disparue, il est probable que la température ou le temps d'incubation n'aient pas été suffisant.

#### 12.4 Perspectives

La formation de liaisons réticulaires avec le formaldéhyde donne de bons résultats préliminaires pour la chaperonne Tat. Les conditions de dissociation des complexes protéiques restent à optimiser en variant le traitement à la chaleur. En combinant ce type de traitement avec la purification par immuno-affinité et colonne de sépharose-nickel, la possibilité de récupérer une chaperonne du système Tat devrait être plus grande. Néanmoins, il reste toujours le problème de protéines contaminantes qui interfèrent probablement avec l'identification des protéines du complexe.

Une autre approche pour identifier les protéines qui ont une affinité pour le précurseur de la xylanase C est d'utiliser une colonne sur laquelle le précurseur de la xylanase est fixé. Un lysat cellulaire passé sur une telle colonne devrait permettre de purifier toutes les protéines ayant une affinité pour le précurseur de la xylanase, dont l'hypothétique chaperonne. Cette approche a été tentée précédemment pour la xylanase C, sans obtenir de résultats probants (Groleau, 2005).

Une autre approche pour éliminer les protéines contaminantes serait d'utiliser la protéase TEV. La séquence reconnue par cette protéase est insérée entre la xylanase et le *his-tag*. Un extrait de protéines cytoplasmiques incluant des complexes formés entre le précurseur de la xylanase et sa chaperonne est purifié sur colonne de sépharose-nickel. L'éluât est soumis à une digestion à la protéase TEV, qui élimine le *his-tag* de la xylanase. Cette solution est de nouveau purifiée sur colonne de sépharose-nickel, mais cette fois seules les protéines contaminantes sont retenues sur la colonne. La fraction qui sort de la colonne contient alors les complexes qu'on peut identifier comme précédemment. Ces manipulations sont en cours pour la xylanase C.

Une étiquette de liaison à la streptavidine pourrait être utilisée en combinaison avec le *his-tag* pour purifier l'échantillon protéique par deux méthodes différentes mais successives. Cette étiquette consiste en un court peptide (WSHPQFEK) ayant une très forte affinité pour la streptavidine (*Streptavidin-binding peptide*, SBP) qui peut être fusionné au précurseur de la xylanase C. Doté du SBP en plus d'un *his-tag*, le précurseur de la xylanase C avec son éventuelle chaperonne peut être purifié sur colonne de sépharose-nickel comme précédemment, puis sur une colonne contenant une matrice de streptavidine immobilisée. Les complexes purifiés sont ensuite élués avec des concentrations croissantes de biotine. La purification avec le SBP seulement permet de récupérer des protéines avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Keefe *et al.*, 2001), ce qui autorise l'emploi de conditions de purification très strictes pour éliminer un maximum de protéines contaminantes.

**Annexe A - Liste des 129 gènes de *Streptomyces coelicolor* codant pour des protéines possiblement sécrétées par le système de sécrétion Tat, telle que générée par TatScan.**

SCO0065	SCO1356	SCO3484	SCO6114
SCO0087	SCO1374	SCO3505	SCO6131
SCO0105	SCO1402	SCO3513	SCO6197
SCO0119	SCO1432	SCO3515	SCO6198
SCO0177	SCO1539	SCO3710	SCO6250
SCO0290	SCO1565	SCO3735	SCO6272
SCO0314	SCO1639	SCO3757	SCO6281
SCO0333	SCO1763	SCO3949	SCO6300
SCO0335	SCO1879	SCO3959	SCO6418
SCO0341	SCO1955	SCO4134	SCO6452
SCO0370	SCO2015	SCO4368	SCO6457
SCO0371	SCO2067	SCO4404	SCO6557
SCO0372	SCO2068	SCO4428	SCO6569
SCO0423	SCO2156	SCO4471	SCO6594
SCO0453	SCO2178	SCO4650	SCO6665
SCO0473	SCO2276	SCO4672	SCO6691
SCO0478	SCO2286	SCO4815	SCO6712
SCO0505	SCO2416	SCO5534	SCO6736
SCO0529	SCO2434	SCO5653	SCO6780
SCO0538	SCO2438	SCO5658	SCO6880
SCO0624	SCO2484	SCO5667	SCO7008
SCO0660	SCO2498	SCO5673	SCO7090
SCO0677	SCO2758	SCO5686	SCO7344
SCO0716	SCO2780	SCO5702	SCO7399
SCO0732	SCO2795	SCO5728	SCO7503
SCO0766	SCO2802	SCO5846	SCO7536
SCO0787	SCO2828	SCO5913	SCO7542
SCO0798	SCO3062	SCO5948	SCO7563
SCO0914	SCO3166	SCO5952	SCO7631
SCO1065	SCO3244	SCO6005	SCO7636
SCO1172	SCO3393	SCO6020	SCO7657
SCO1290	SCO3471	SCO6052	SCO7677

**Annexe B – Liste des 145 gènes de *Streptomyces coelicolor* codant pour des protéines possiblement sécrétées par le système de sécrétion Tat, telle que générée par TatFind.**

SCO0065	SCO1146	SCO3189	SCO5846
SCO0084	SCO1161	SCO3244	SCO5913
SCO0105	SCO1172	SCO3471	SCO5941
SCO0119	SCO1196	SCO3484	SCO5948
SCO0122	SCO1222	SCO3502	SCO5993
SCO0236	SCO1356	SCO3505	SCO6001
SCO0289	SCO1366	SCO3513	SCO6005
SCO0290	SCO1427	SCO3515	SCO6009
SCO0314	SCO1432	SCO3705	SCO6052
SCO0333	SCO1539	SCO3710	SCO6175
SCO0341	SCO1639	SCO3735	SCO6198
SCO0357	SCO1763	SCO3965	SCO6220
SCO0370	SCO1879	SCO4168	SCO6250
SCO0371	SCO1955	SCO4238	SCO6272
SCO0372	SCO2015	SCO4328	SCO6281
SCO0374	SCO2156	SCO4368	SCO6300
SCO0440	SCO2207	SCO4428	SCO6418
SCO0453	SCO2217	SCO4471	SCO6569
SCO0456	SCO2276	SCO4650	SCO6594
SCO0478	SCO2277	SCO4672	SCO6621
SCO0538	SCO2292	SCO4755	SCO6665
SCO0644	SCO2313	SCO4815	SCO6721
SCO0660	SCO2323	SCO4845	SCO6780
SCO0677	SCO2404	SCO5021	SCO6863
SCO0716	SCO2423	SCO5022	SCO6880
SCO0732	SCO2427	SCO5317	SCO7224
SCO0736	SCO2438	SCO5487	SCO7397
SCO0752	SCO2484	SCO5534	SCO7503
SCO0765	SCO2515	SCO5658	SCO7504
SCO0766	SCO2701	SCO5667	SCO7542
SCO0798	SCO2758	SCO5673	SCO7563
SCO0828	SCO2780	SCO5676	SCO7636
SCO0829	SCO2802	SCO5686	SCO7637
SCO0914	SCO2828	SCO5702	SCO7677
SCO1065	SCO3101	SCO5780	SCO7679
SCO1117	SCO3106	SCO5797	SCO7774
			Scol.213c

**Annexe C – Liste partielle (109 seulement) des 230 gènes de *Streptomyces coelicolor* codant pour des protéines possiblement sécrétées par le système de sécrétion Tat, telle que générée par une version modifiée de TatFind.**

SCO0065	SCO1824	SCO5043	SCO7170
SCO0105	SCO1854	SCO5286	SCO7179
SCO0236	SCO1879	SCO5317	SCO7225
SCO0333	SCO1955	SCO5318	SCO7256
SCO0370	SCO2015	SCO5428	SCO7399
SCO0486	SCO2156	SCO5429	SCO7503
SCO0494	SCO2226	SCO5447	SCO7504
SCO0497	SCO2231	SCO5534	SCO7563
SCO0505	SCO2404	SCO5658	SCO7633
SCO0529	SCO2427	SCO5667	SCO7637
SCO0538	SCO2434	SCO5673	
SCO0551	SCO2446	SCO5676	
SCO0677	SCO2587	SCO5799	
SCO0713	SCO2701	SCO5821	
SCO0716	SCO2758	SCO5913	
SCO0732	SCO2766	SCO5941	
SCO0752	SCO2795	SCO5948	
SCO0765	SCO2821	SCO6032	
SCO0766	SCO2828	SCO6114	
SCO0787	SCO2838	SCO6179	
SCO0828	SCO3244	SCO6250	
SCO0829	SCO3416	SCO6272	
SCO1049	SCO3417	SCO6281	
SCO1056	SCO3484	SCO6295	
SCO1065	SCO3502	SCO6300	
SCO1172	SCO3505	SCO6345	
SCO1290	SCO3811	SCO6407	
SCO1356	SCO4024	SCO6621	
SCO1565	SCO4142	SCO6665	
SCO1639	SCO4168	SCO6691	
SCO1734	SCO4368	SCO6712	
SCO1741	SCO4404	SCO6736	
SCO1763	SCO4755	SCO7069	

## **Annexe D - Composition des milieux et tampons utilisés 2-DE & 2-DIGE**

### **Solution de réhydratation / lyse pH 8,5 (pour 10 mL)**

Urée	4,8 g
Thiourée	1,5 g
CHAPS	0,4 g
DTT	0,0625 g *
Tris	0,0250 g
Bleu de bromophénol 0,5%	2 µL**
IPG buffer	10 µL**
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	9,75 mL

\* Omettre le DTT pour la solution de réhydratation / lyse sans DTT.

\*\* Ajouter avant la réhydratation dans chaque échantillon.

### **Solution d'équilibration (pour 30 mL)**

Urée	10,8 g
SDS 10%	6 mL
Glycérol	9 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3 mL
H <sub>2</sub> O	4,8 mL

Séparer en deux (solutions A et B, 15 mL chacune) et ajouter :

Solution A : DTT	0,150 g
Solution B : Iodoacétamide	0,375 g

### **Solution d'agarose 1% (pour 50 mL)**

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	6,25 mL
SDS 10%	0,5 mL
Glycérol	4,52 mL
Agarose	0,5 g
Bleu de bromophénol 0,5%	0,5 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	50 mL

### **Tampon de l'échantillon 2X (pour 10 mL)**

Urée	4,8 g
DTT	0,02 g
CHAPS	0,4 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	10 mL

### **SDS-PAGE**

#### **Tampon Laemmli 3X avec SDS sans $\beta$ -mercaptoéthanol (pour 20 mL)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	7,5 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
Glycérol 50%	4 mL
SDS 10%	4 mL
Bleu de bromophénol 0,5%	2 mL

Diluer 1 : 3 pour obtenir du tampon Laemmli 1X avec SDS.

#### **Tampon Laemmli 3X avec SDS et $\beta$ -mercaptoéthanol (pour 20 mL)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	2,5 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
Glycérol 50%	8,0 mL
SDS 10%	4,0 mL
$\beta$ -mercaptoéthanol	1,0 mL
Bleu de bromophénol 0,5%	2,0 mL

Diluer 1 : 3 pour obtenir du tampon Laemmli 1X avec SDS et  $\beta$ -mercaptoéthanol.

#### **Tampon Tris-glycine 10X pH 8,3 (pour 1 L)**

Tris	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1 L

Diluer 1 : 10 avant utilisation.

#### **Solution de fixation (pour 1 L)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	450 mL
Éthanol	500 mL
Acide acétique	50 mL

### **Gels**

#### **Gel 17 cm de polyacrylamide 12% (45 mL)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	14,85 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	11,25 mL
SDS 10%	450 µL
Bis acrylamide 30%	18 mL
Ammonium persulfate 10%	450 µL
TEMED	105 µL

#### **Gel de concentration 4% (10 mL pour gel 17 cm)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	6 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Bis acrylamide 30%	1,3 mL
Ammonium persulfate 10%	100 µL
TEMED	10 µL

#### **Gel de polyacrylamide 12% pour 2D 17 cm (60 mL)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	19,8 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	15 mL
SDS 10%	600 µL
Bis acrylamide 30%	24 mL
Ammonium persulfate 10%	600 µL
TEMED	140 µL

#### **Mini-gel de polyacrylamide 12% (5 mL)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	1,67 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 mL
SDS 10%	50 µL
Bis acrylamide 30%	2 mL
Ammonium persulfate 10%	25 µL
TEMED	2,5 µL

#### **Mini-gel de concentration 4% (1,25 mL)**

H <sub>2</sub> O milli-Q	755 µL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	312,5 µL
SDS 10%	12,5 µL
Bis acrylamide 30%	162,5 µL
Ammonium persulfate 10%	6,25 µL
TEMED	1,25 µL

## **Milieux**

### **M14 pH 7,4 (pour 1 L)**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Sels Mandel	1 mL
Tween 80	2 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1L

### **Sels Mandel (pour 100 mL)**

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,14 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,16 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	100 mL

### **M14 + xylose 1% (~20 mL)**

M14 pH 7,4	20 mL
Xylose 20%	1 mL
MgSO <sub>4</sub> 5%	120 µL
CaCl <sub>2</sub> 3%	200 µL
Proteose Peptone Yeast Extract	100 µL
Spores	4 x 10 <sup>7</sup>

### **Proteose Peptone Yeast Extract (pour 100 mL)**

Protéose peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	100 mL

### **M14 + xylose 1% (~400 mL)**

M14 pH 7,4	400 mL
Xylose 20%	20 mL
MgSO <sub>4</sub> 5%	2,4 mL
CaCl <sub>2</sub> 3%	4 mL
Proteose Peptone Yeast Extract	1 mL
Culture « 20 mL » M14 + xylose 1% 48 heures	1, homogénéisée au <i>potter</i>

**M14 + glucose 1% (~20 mL)**

M14 pH 7,4	20 mL
Glucose 20%	1 mL
MgSO <sub>4</sub> 5%	120 µL
CaCl <sub>2</sub> 3%	200 µL
Proteose Peptone Yeast Extract	100 µL
Spores	4 x 10 <sup>7</sup>

**M14 + chitine 1% (~20 mL)**

M14 pH 7,4	20 mL
Chitine 2%	10 mL
MgSO <sub>4</sub> 5%	120 µL
CaCl <sub>2</sub> 3%	200 µL
Proteose Peptone Yeast Extract	100 µL
Spores	4 x 10 <sup>7</sup>

**M14 + terre 1% (~20 mL)**

M14 pH 7,4	20 mL
Terre 40%	500 µL
MgSO <sub>4</sub> 5%	120 µL
CaCl <sub>2</sub> 3%	200 µL
Proteose Peptone Yeast Extract	100 µL
Spores	4 x 10 <sup>7</sup>

**Terre 40% (pour 100 mL)**

Terre	40 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	100 mL

Autoclaver 1 heure à 121°C.

Laisser reposer à température ambiante 24 heures.

Autoclaver de nouveau, 1 heure à 121°C.

### ***Coloration à l'argent***

#### **Solution de fixation éthanol 50%, acide acétique 5% (pour 1 L)**

Éthanol 95%	525 mL
Acide acétique 100%	50 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q	425 mL

#### **Solution de sodium thiosulfate 0,02% (pour 250 mL)**

Sodium thiosulfate 5%	1 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q	249 mL

#### **Solution de nitrate d'argent 0,1% (pour 250 mL)**

Nitrate d'argent 2,5%	10 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q	240 mL

#### **Solution de développement formaldéhyde 0,04%, carbonate de sodium 2% (pour 500 mL)**

Formaldéhyde 37%	500 µL
Carbonate de sodium	10 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	500 mL

#### **Solution stop d'acide acétique 5% (pour 1 L)**

Acide acétique 100%	50 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q	950 mL

#### **Solution de stockage éthanol 30%, glycérol 4% (pour 1 L)**

Éthanol 95%	315 mL
Glycérol	40 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q	645 mL

### ***Immunobuvardage de type western***

#### **Tampon de transfert (pour 1L)**

Glycine	2,93 g
Tris	5,81 g
SDS 10%	3,75 mL
Méthanol	200 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1 L

### **Colonne de CNBr**

#### **Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (pour 1 L)**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1 L

#### **Solution de sulfate d'ammonium 80% saturée (pour 100 mL)**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> grade enzymatique	80 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	100 mL

Il est nécessaire de chauffer cette solution au bain-marie pour dissoudre le maximum de sulfate d'ammonium.

#### **Tampon de couplage pH 8,3 (pour 1 L)**

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
NaCl	29,22 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1 L

#### **Tampon d'éluion pH 2,8 (pour 100 mL)**

Glycine	0,7507 g
NaCl	0,8766 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	100 mL

Mettre 70 mL d'eau, la glycine, ajuster le pH à 2,8 avec du HCl, ajouter le NaCl, compléter le volume d'eau.

#### **Tampon de lavage I (pour 1 L)**

Tris-HCl 0,5M pH 8,0	100 mL
NaCl	29,2 g
Glycine	3,754 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1 L

#### **Tampon de lavage II (pour 1 L)**

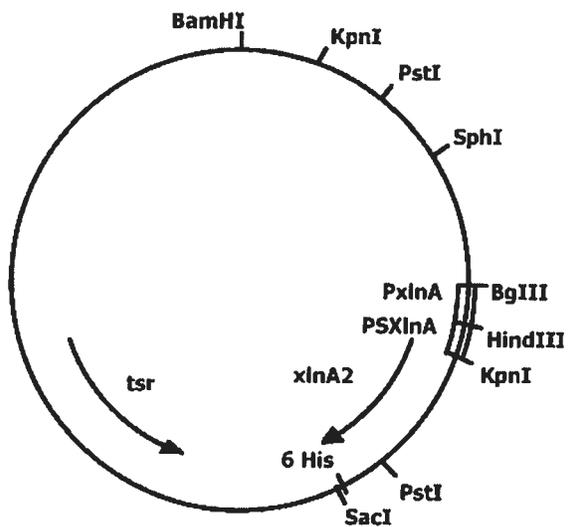
NaCl	29,2 g
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na	4,102 g
H <sub>2</sub> O milli-Q QSP	1 L

**Tampon de blocage pH 8,5 (pour 10 mL)**

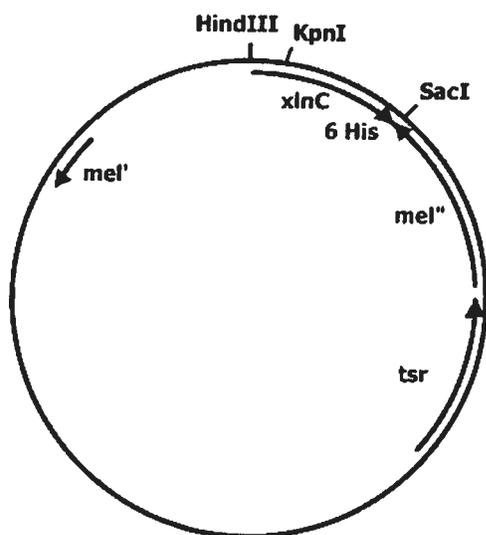
Éthanolamine 600  $\mu$ L

Tampon de couplage 9,4 mL

**Annexe E – Plasmides utilisés**  
pIAF906A2his :



pIAF916Chis :



### 13. Bibliographie

#### Internet :

Institut Sanger : (en date du 28 mai 2007)

Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA

Téléphone (Royaume-Uni) : +44 (0)1223 834244

Page principale :

[www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)

Génome de *S. scabies* 87.22 via le serveur FTP :

<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/ssc/>

#### Articles :

Akita, M., S. Sasaki, S. Matsuyama et S. Mizushima (1990). "SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*." J Biol Chem **265**(14): 8164-9.

Akiyama, Y. et K. Ito (1987). "Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*." Embo J **6**(11): 3465-70.

Alami, M., I. Luke, S. Deitermann, G. Eisner, H. G. Koch, J. Brunner et M. Muller (2003). "Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*." Mol Cell **12**(4): 937-46.

Allen, S. C., C. M. Barrett, N. Ray et C. Robinson (2002). "Essential cytoplasmic domains in the *Escherichia coli* TatC protein." J Biol Chem **277**(12): 10362-6.

Altman, E., C. A. Kumamoto et S. D. Emr (1991). "Heat-shock proteins can substitute for SecB function during protein export in *Escherichia coli*." Embo J **10**(2): 239-45.

Andreotti, A. H. (2003). "Native state proline isomerization: an intrinsic molecular switch." Biochemistry **42**(32): 9515-24.

Angelini, S., D. Boy, E. Schiltz et H. G. Koch (2006). "Membrane binding of the bacterial signal recognition particle receptor involves two distinct binding sites." J Cell Biol **174**(5): 715-24.

Antelmann, H., H. Tjalsma, B. Voigt, S. Ohlmeier, S. Bron, J. M. van Dijl et M. Hecker (2001). "A proteomic view on genome-based signal peptide predictions." Genome Res **11**(9): 1484-502.

- Arkowitz, R. A. et W. Wickner (1994). "SecD and SecF are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation." Embo J **13**(4): 954-63.
- Baars, L., A. J. Ytterberg, D. Drew, S. Wagner, C. Thilo, K. J. van Wijk et J. W. de Gier (2006). "Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics." J Biol Chem **281**(15): 10024-34.
- Bardwell, J. C., K. McGovern et J. Beckwith (1991). "Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo." Cell **67**(3): 581-9.
- Bardwell, J. C., K. Tilly, E. Craig, J. King, M. Zylicz et C. Georgopoulos (1986). "The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 dnaJ+ gene. A gene that encodes a heat shock protein." J Biol Chem **261**(4): 1782-5.
- Barrett, C. M. et C. Robinson (2005). "Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase." Febs J **272**(9): 2261-75.
- Bendtsen, J. D., L. Kiemer, A. Fausboll et S. Brunak (2005). "Non-classical protein secretion in bacteria." BMC Microbiol **5**: 58.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, D. Widdick, T. Palmer et S. Brunak (2005). "Prediction of twin-arginine signal peptides." BMC Bioinformatics **6**: 167.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill et D. A. Hopwood (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Nature **417**(6885): 141-7.
- Ben-Zvi, A. P. et P. Goloubinoff (2001). "Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones." J Struct Biol **135**(2): 84-93.
- Bernstein, H. D. (1998). "Membrane protein biogenesis: the exception explains the rules." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14587-9.
- Blaudeck, N., P. Kreutzenbeck, R. Freudl et G. A. Sprenger (2003). "Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane." J Bacteriol **185**(9): 2811-9.

- Blaudeck, N., P. Kreutzenbeck, M. Muller, G. A. Sprenger et R. Freudl (2005). "Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB." J Biol Chem **280**(5): 3426-32.
- Bochkareva, E. S., M. E. Solovieva et A. S. Girshovich (1998). "Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 478-83.
- Bogsch, E. G., F. Sargent, N. R. Stanley, B. C. Berks, C. Robinson et T. Palmer (1998). "An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria." J Biol Chem **273**(29): 18003-6.
- Bolt, H. M. (1987). "Experimental toxicology of formaldehyde." J Cancer Res Clin Oncol **113**(4): 305-9.
- Bost, S. et D. Belin (1995). "A new genetic selection identifies essential residues in SecE, a component of the *Escherichia coli* protein export machinery." Embo J **14**(18): 4412-21.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich et P. B. Sigler (1994). "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å." Nature **371**(6498): 578-86.
- Buckle, A. M., R. Zahn et A. R. Fersht (1997). "A structural model for GroEL-polypeptide recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3571-5.
- Burton, B. M. et T. A. Baker (2005). "Remodeling protein complexes: insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase." Protein Sci **14**(8): 1945-54.
- Chaddock, A. M., A. Mant, I. Karnauchov, S. Brink, R. G. Herrmann, R. B. Klosgen et C. Robinson (1995). "A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase." Embo J **14**(12): 2715-22.
- Chen, L. et P. B. Sigler (1999). "The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity." Cell **99**(7): 757-68.
- Chou, M. M. et D. A. Kendall (1990). "Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides." J Biol Chem **265**(5): 2873-80.

- Cristobal, S., J. W. de Gier, H. Nielsen et G. von Heijne (1999). "Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*." Embo J **18**(11): 2982-90.
- Crooke, E. et W. Wickner (1987). "Trigger factor: a soluble protein that folds pro-OmpA into a membrane-assembly-competent form." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5216-20.
- de Leeuw, E., T. Granjon, I. Porcelli, M. Alami, S. B. Carr, M. Muller, F. Sargent, T. Palmer et B. C. Berks (2002). "Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes." J Mol Biol **322**(5): 1135-46.
- De Leeuw, E., I. Porcelli, F. Sargent, T. Palmer et B. C. Berks (2001). "Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway." FEBS Lett **506**(2): 143-8.
- Deuerling, E., H. Patzelt, S. Vorderwulbecke, T. Rauch, G. Kramer, E. Schaffitzel, A. Mogk, A. Schulze-Specking, H. Langen et B. Bukau (2003). "Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities." Mol Microbiol **47**(5): 1317-28.
- Dilks, K., R. W. Rose, E. Hartmann et M. Pohlschroder (2003). "Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey." J Bacteriol **185**(4): 1478-83.
- Driessen, A. J. (1992). "Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force." Embo J **11**(3): 847-53.
- Duong, F. et W. Wickner (1997). "Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme." Embo J **16**(10): 2756-68.
- Economou, A., J. A. Pogliano, J. Beckwith, D. B. Oliver et W. Wickner (1995). "SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE." Cell **83**(7): 1171-81.
- Escutia, M. R., G. Val, A. Palacin, N. Geukens, J. Anne et R. P. Mellado (2006). "Compensatory effect of the minor *Streptomyces lividans* type I signal peptidases on the SipY major signal peptidase deficiency as determined by extracellular proteome analysis." Proteomics **6**(14): 4137-46.
- Faury, D., S. Saidane, H. Li et R. Morosoli (2004). "Secretion of active xylanase C from *Streptomyces lividans* is exclusively mediated by the Tat protein export system." Biochim Biophys Acta **1699**(1-2): 155-62.

- Fayet, O., T. Ziegelhoffer et C. Georgopoulos (1989). "The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures." J Bacteriol **171**(3): 1379-85.
- Fekkes, P. et A. J. Driessen (1999). "Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane." Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 161-73.
- Fekkes, P., C. van der Does et A. J. Driessen (1997). "The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation." Embo J **16**(20): 6105-13.
- Fikes, J. D., G. A. Barkocy-Gallagher, D. G. Klapper et P. J. Bassford, Jr. (1990). "Maturation of *Escherichia coli* maltose-binding protein by signal peptidase I in vivo. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site." J Biol Chem **265**(6): 3417-23.
- Fink, A. L. (1999). "Chaperone-mediated protein folding." Physiol Rev **79**(2): 425-49.
- Flower, A. M. (2001). "SecG function and phospholipid metabolism in *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(6): 2006-12.
- Gauthier, C., H. Li et R. Morosoli (2005). "Increase in xylanase production by *Streptomyces lividans* through simultaneous use of the Sec- and Tat-dependent protein export systems." Appl Environ Microbiol **71**(6): 3085-92.
- Georgopoulos, C. (1992). "The emergence of the chaperone machines." Trends Biochem Sci **17**(8): 295-9.
- Georgopoulos, C. et W. J. Welch (1993). "Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones." Annu Rev Cell Biol **9**: 601-34.
- Geukens, N., V. Parro, L. A. Rivas, R. P. Mellado et J. Anne (2001). "Functional analysis of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases." Arch Microbiol **176**(5): 377-80.
- Gilbert, M., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel (1995). "Production and secretion of proteins by streptomycetes." Crit Rev Biotechnol **15**(1): 13-39.
- Gill, D. R. et G. P. Salmond (1990). "The identification of the *Escherichia coli* *ftsY* gene product: an unusual protein." Mol Microbiol **4**(4): 575-83.
- Gothel, S. F. et M. A. Marahiel (1999). "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts." Cell Mol Life Sci **55**(3): 423-36.

- Graubner, W., A. Schierhorn et T. Bruser (2007). "DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone." J Biol Chem **282**(10): 7116-24.
- Groleau, M.-C. (2005). Protéines chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines sécrétées par le système Tat chez *Streptomyces lividans*., INRS-Institut Armand-Frappier.
- Guthrie, B. et W. Wickner (1990). "Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export." J Bacteriol **172**(10): 5555-62.
- Han, L., S. O. Enfors et L. Haggstrom (2003). "*Escherichia coli* high-cell-density culture: carbon mass balances and release of outer membrane components." Bioprocess Biosyst Eng **25**(4): 205-12.
- Hardy, S. J. et L. L. Randall (1991). "A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB." Science **251**(4992): 439-43.
- Hicks, M. G., P. A. Lee, G. Georgiou, B. C. Berks et T. Palmer (2005). "Positive selection for loss-of-function tat mutations identifies critical residues required for TatA activity." J Bacteriol **187**(8): 2920-5.
- Hinsley, A. P., N. R. Stanley, T. Palmer et B. C. Berks (2001). "A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif." FEBS Lett **497**(1): 45-9.
- Hirose, I., K. Sano, I. Shioda, M. Kumano, K. Nakamura et K. Yamane (2000). "Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study." Microbiology **146** ( Pt 1): 65-75.
- Hobbs, F., Gardner, Cullum and Oliver (1989). "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture." Applied Microbiology and Biotechnology **31**(3): 272-277.
- Hodgson, D. A. (2000). "Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria." Adv Microb Physiol **42**: 47-238.
- Hohfeld, J., Y. Minami et F. U. Hartl (1995). "Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle." Cell **83**(4): 589-98.
- Hong, B., B. Wu et Y. Li (2003). "Production of C-terminal amidated recombinant salmon calcitonin in *Streptomyces lividans*." Appl Biochem Biotechnol **110**(2): 113-23.
- Hopwood, D. A. (1967). "Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*." Bacteriol Rev **31**(4): 373-403.

- Hsu, S. C. et J. L. Lockwood (1975). "Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil." Appl Microbiol **29**(3): 422-6.
- Huang, Q., S. Abdulrahman, J. Yin et C. Zwieb (2002). "Systematic site-directed mutagenesis of human protein SRP54: interactions with signal recognition particle RNA and modes of signal peptide recognition." Biochemistry **41**(38): 11362-71.
- Hunt, J. F., A. J. Weaver, S. J. Landry, L. Gierasch et J. Deisenhofer (1996). "The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution." Nature **379**(6560): 37-45.
- Hurtubise, Y., F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli (1995). "A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins." Mol Microbiol **17**(2): 367-77.
- Ignatova, Z., C. Hornle, A. Nurk et V. Kasche (2002). "Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery." Biochem Biophys Res Commun **291**(1): 146-9.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori et S. Omura (2003). "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*." Nat Biotechnol **21**(5): 526-31.
- Izard, J. W. et D. A. Kendall (1994). "Signal peptides: exquisitely designed transport promoters." Mol Microbiol **13**(5): 765-73.
- Ize, B., F. Gerard, M. Zhang, A. Chanal, R. Voulhoux, T. Palmer, A. Filloux et L. F. Wu (2002). "In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*." J Mol Biol **317**(3): 327-35.
- Jack, R. L., F. Sargent, B. C. Berks, G. Sawers et T. Palmer (2001). "Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth." J Bacteriol **183**(5): 1801-4.
- Jackson, G. S., R. A. Staniforth, D. J. Halsall, T. Atkinson, J. J. Holbrook, A. R. Clarke et S. G. Burston (1993). "Binding and hydrolysis of nucleotides in the chaperonin catalytic cycle: implications for the mechanism of assisted protein folding." Biochemistry **32**(10): 2554-63.
- Jongbloed, J. D., U. Martin, H. Antelmann, M. Hecker, H. Tjalsma, G. Venema, S. Bron, J. M. van Dijl et J. Muller (2000). "TatC is a specificity determinant for protein

- secretion via the twin-arginine translocation pathway." J Biol Chem **275**(52): 41350-7.
- Katayama-Fujimura, Y., S. Gottesman et M. R. Maurizi (1987). "A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*." J Biol Chem **262**(10): 4477-85.
- Keefe, A. D., D. S. Wilson, B. Seelig et J. W. Szostak (2001). "One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag." Protein Expr Purif **23**(3): 440-6.
- Kelley, W. L. (1998). "The J-domain family and the recruitment of chaperone power." Trends Biochem Sci **23**(6): 222-7.
- Kenniston, J. A., R. E. Burton, S. M. Siddiqui, T. A. Baker et R. T. Sauer (2004). "Effects of local protein stability and the geometric position of the substrate degradation tag on the efficiency of ClpXP denaturation and degradation." J Struct Biol **146**(1-2): 130-40.
- Khisty, V. J., G. R. Munske et L. L. Randall (1995). "Mapping of the binding frame for the chaperone SecB within a natural ligand, galactose-binding protein." J Biol Chem **270**(43): 25920-7.
- Kikuchi, Y., M. Date, H. Itaya, K. Matsui et L. F. Wu (2006). "Functional analysis of the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869." Appl Environ Microbiol **72**(11): 7183-92.
- Kim, J. et D. A. Kendall (1998). "Identification of a sequence motif that confers SecB dependence on a SecB-independent secretory protein in vivo." J Bacteriol **180**(6): 1396-401.
- Kim, J., J. Luirink et D. A. Kendall (2000). "SecB dependence of an exported protein is a continuum influenced by the characteristics of the signal peptide or early mature region." J Bacteriol **182**(14): 4108-12.
- Knoblauch, N. T., S. Rudiger, H. J. Schonfeld, A. J. Driessen, J. Schneider-Mergener et B. Bukau (1999). "Substrate specificity of the SecB chaperone." J Biol Chem **274**(48): 34219-25.
- Koch, H. G. et M. Muller (2000). "Dissecting the translocase and integrase functions of the *Escherichia coli* SecYEG translocon." J Cell Biol **150**(3): 689-94.
- Kumamoto, C. A. et J. Beckwith (1985). "Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*." J Bacteriol **163**(1): 267-74.

- Kumamoto, C. A. et O. Francetic (1993). "Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein in vivo." J Bacteriol **175**(8): 2184-8.
- Kurzchalia, T. V., M. Wiedmann, A. S. Girshovich, E. S. Bochkareva, H. Bielka et T. A. Rapoport (1986). "The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle." Nature **320**(6063): 634-6.
- Kusters, R., G. Lentzen, E. Eppens, A. van Geel, C. C. van der Weijden, W. Wintermeyer et J. Luirink (1995). "The functioning of the SRP receptor FtsY in protein-targeting in *E. coli* is correlated with its ability to bind and hydrolyse GTP." FEBS Lett **372**(2-3): 253-8.
- Kusukawa, N., T. Yura, C. Ueguchi, Y. Akiyama et K. Ito (1989). "Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in *Escherichia coli*." Embo J **8**(11): 3517-21.
- Lecker, S., R. Lill, T. Ziegelhoffer, C. Georgopoulos, P. J. Bassford, Jr., C. A. Kumamoto et W. Wickner (1989). "Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*--SecB, trigger factor and GroEL--form soluble complexes with precursor proteins in vitro." Embo J **8**(9): 2703-9.
- Lee, P. A., G. Buchanan, N. R. Stanley, B. C. Berks et T. Palmer (2002). "Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation." J Bacteriol **184**(21): 5871-9.
- Lee, P. A., D. Tullman-Ercek et G. Georgiou (2006). "The bacterial twin-arginine translocation pathway." Annu Rev Microbiol **60**: 373-95.
- Li, H., D. Faury et R. Morosoli (2006). "Impact of amino acid changes in the signal peptide on the secretion of the Tat-dependent xylanase C from *Streptomyces lividans*." FEMS Microbiol Lett **255**(2): 268-74.
- Li, H., P. E. Jacques, M. G. Ghinet, R. Brzezinski et R. Morosoli (2005). "Determining the functionality of putative Tat-dependent signal peptides in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by using two different reporter proteins." Microbiology **151**(Pt 7): 2189-98.
- Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos et M. Zylicz (1991). "*Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2874-8.
- Luirink, J., C. M. ten Hagen-Jongman, C. C. van der Weijden, B. Oudega, S. High, B. Dobberstein et R. Kusters (1994). "An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY." Embo J **13**(10): 2289-96.

- Lund, P. A. (1995). "The roles of molecular chaperones in vivo." Essays Biochem **29**: 113-23.
- Lutcke, H. (1995). "Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation." Eur J Biochem **228**(3): 531-50.
- Matsumoto, G., H. Mori et K. Ito (1998). "Roles of SecG in ATP- and SecA-dependent protein translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13567-72.
- Matsumoto, G., H. Nakatogawa, H. Mori et K. Ito (2000). "Genetic dissection of SecA: suppressor mutations against the secY205 translocase defect." Genes Cells **5**(12): 991-9.
- Matsumoto, G., T. Yoshihisa et K. Ito (1997). "SecY and SecA interact to allow SecA insertion and protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane." Embo J **16**(21): 6384-93.
- Matsuyama, S., Y. Fujita et S. Mizushima (1993). "SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*." Embo J **12**(1): 265-70.
- Mayer, M. P., S. Rudiger et B. Bukau (2000). "Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates." Biol Chem **381**(9-10): 877-85.
- McGregor, J. (1954). "Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces sp.*" J Gen Microbiol **11**(1): 52-6.
- Meijer, W. J., A. de Jong, G. Bea, A. Wisman, H. Tjalsma, G. Venema, S. Bron et J. M. van Dijl (1995). "The endogenous *Bacillus subtilis* (natto) plasmids pTA1015 and pTA1040 contain signal peptidase-encoding genes: identification of a new structural module on cryptic plasmids." Mol Microbiol **17**(4): 621-31.
- Mitchell, C. et D. Oliver (1993). "Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase." Mol Microbiol **10**(3): 483-97.
- Mogk, A., T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rudiger, D. Roder, H. Langen et B. Bukau (1999). "Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB." Embo J **18**(24): 6934-49.
- Mori, H. et K. Cline (2002). "A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase." J Cell Biol **157**(2): 205-10.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita et A. Yamaguchi (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-93.

- Murphy, C. K. et J. Beckwith (1994). "Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2557-61.
- Nicoll, W. S., A. Boshoff, M. H. Ludewig, F. Hennessy, M. Jung et G. L. Blatch (2006). "Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones." Protein Expr Purif **46**(1): 1-15.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak et G. von Heijne (1997). "A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Int J Neural Syst **8**(5-6): 581-99.
- Nishiyama, K., M. Hanada et H. Tokuda (1994). "Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature." Embo J **13**(14): 3272-7.
- Noiva, R. (1994). "Enzymatic catalysis of disulfide formation." Protein Expr Purif **5**(1): 1-13.
- Oliver, D. B., R. J. Cabelli, K. M. Dolan et G. P. Jarosik (1990). "Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8227-31.
- Page, N., D. Kluepfel, F. Shareck et R. Morosoli (1996). "Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*." Appl Environ Microbiol **62**(1): 109-14.
- Palacin, A., R. de la Fuente, I. Valle, L. A. Rivas et R. P. Mellado (2003). "*Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion." Microbiology **149**(Pt 9): 2435-42.
- Palacin, A., V. Parro, N. Geukens, J. Anne et R. P. Mellado (2002). "SipY Is the *Streptomyces lividans* type I signal peptidase exerting a major effect on protein secretion." J Bacteriol **184**(17): 4875-80.
- Parro, V., S. Schacht, J. Anne et R. P. Mellado (1999). "Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21." Microbiology **145** ( Pt 9): 2255-63.
- Patzelt, H., S. Rudiger, D. Brehmer, G. Kramer, S. Vorderwulbecke, E. Schaffitzel, A. Waitz, T. Hesterkamp, L. Dong, J. Schneider-Mergener, B. Bukau et E. Deuerling (2001). "Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14244-9.

- Perez-Rodriguez, R., A. C. Fisher, J. D. Perlmutter, M. G. Hicks, A. Chanal, C. L. Santini, L. F. Wu, T. Palmer et M. P. DeLisa (2007). "An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway." J Mol Biol **367**(3): 715-30.
- Perlman, D. et H. O. Halvorson (1983). "A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides." J Mol Biol **167**(2): 391-409.
- Phillips, G. J. et T. J. Silhavy (1990). "Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*." Nature **344**(6269): 882-4.
- Pogliano, J. A. et J. Beckwith (1994). "SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*." Embo J **13**(3): 554-61.
- Porcelli, I., E. de Leeuw, R. Wallis, E. van den Brink-van der Laan, B. de Kruijff, B. A. Wallace, T. Palmer et B. C. Berks (2002). "Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system." Biochemistry **41**(46): 13690-7.
- Poritz, M. A., H. D. Bernstein, K. Strub, D. Zopf, H. Wilhelm et P. Walter (1990). "An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle." Science **250**(4984): 1111-7.
- Powers, T. et P. Walter (1997). "Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor." Embo J **16**(16): 4880-6.
- Prade, R. A. (1996). "Xylanases: from biology to biotechnology." Biotechnol Genet Eng Rev **13**: 101-31.
- Pugsley, A. P. (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." Microbiol Rev **57**(1): 50-108.
- Randall, L. L., J. M. Crane, G. Liu et S. J. Hardy (2004). "Sites of interaction between SecA and the chaperone SecB, two proteins involved in export." Protein Sci **13**(4): 1124-33.
- Randall, L. L., T. B. Topping et S. J. Hardy (1990). "No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export." Science **248**(4957): 860-3.
- Randall, L. L., T. B. Topping, S. J. Hardy, M. Y. Pavlov, D. V. Freistroffer et M. Ehrenberg (1997). "Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 802-7.

- Romisch, K., J. Webb, J. Herz, S. Prehn, R. Frank, M. Vingron et B. Dobberstein (1989). "Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains." Nature **340**(6233): 478-82.
- Romisch, K., J. Webb, K. Lingelbach, H. Gausepohl et B. Dobberstein (1990). "The 54-kD protein of signal recognition particle contains a methionine-rich RNA binding domain." J Cell Biol **111**(5 Pt 1): 1793-802.
- Rose, R. W., T. Bruser, J. C. Kissinger et M. Pohlschroder (2002). "Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway." Mol Microbiol **45**(4): 943-50.
- Rosenkrands, I., K. Weldingh, S. Jacobsen, C. V. Hansen, W. Florio, I. Gianetri et P. Andersen (2000). "Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection." Electrophoresis **21**(5): 935-48.
- Rudiger, S., L. Germeroth, J. Schneider-Mergener et B. Bukau (1997). "Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries." Embo J **16**(7): 1501-7.
- Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks et T. Palmer (1998). "Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway." Embo J **17**(13): 3640-50.
- Sargent, F., U. Gohlke, E. De Leeuw, N. R. Stanley, T. Palmer, H. R. Saibil et B. C. Berks (2001). "Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure." Eur J Biochem **268**(12): 3361-7.
- Sargent, F., N. R. Stanley, B. C. Berks et T. Palmer (1999). "Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein." J Biol Chem **274**(51): 36073-82.
- Schaerlaekens, K., M. Schierova, E. Lammertyn, N. Geukens, J. Anne et L. Van Mellaert (2001). "Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*." J Bacteriol **183**(23): 6727-32.
- Schaerlaekens, K., L. Van Mellaert, E. Lammertyn, N. Geukens et J. Anne (2004). "The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis." Microbiology **150**(Pt 1): 21-31.
- Schatz, P. J., K. L. Bieker, K. M. Ottemann, T. J. Silhavy et J. Beckwith (1991). "One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE

- protein, a membrane component of the *E. coli* secretion machinery." Embo J **10**(7): 1749-57.
- Schiebel, E., A. J. Driessen, F. U. Hartl et W. Wickner (1991). "Delta mu H<sup>+</sup> and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase." Cell **64**(5): 927-39.
- Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer et S. Lindquist (1996). "HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions." Trends Biochem Sci **21**(8): 289-96.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm et M. Mann (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." Anal Chem **68**(5): 850-8.
- Shimizu, H., K. Nishiyama et H. Tokuda (1997). "Expression of *gpsA* encoding biosynthetic sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase suppresses both the LB-phenotype of a *secB* null mutant and the cold-sensitive phenotype of a *secG* null mutant." Mol Microbiol **26**(5): 1013-21.
- Sianidis, G., C. Pozidis, F. Becker, K. Vrancken, C. Sjoeholm, S. Karamanou, M. Takamiya-Wik, L. van Mellaert, T. Schaefer, J. Anne et A. Economou (2006). "Functional large-scale production of a novel *Jonesia sp.* xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*." J Biotechnol **121**(4): 498-507.
- Stanley, N. R., T. Palmer et B. C. Berks (2000). "The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*." J Biol Chem **275**(16): 11591-6.
- Stoller, G., K. P. Rucknagel, K. H. Nierhaus, F. X. Schmid, G. Fischer et J. U. Rahfeld (1995). "A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor." Embo J **14**(20): 4939-48.
- Sugai, M. et H. C. Wu (1992). "Export of the outer membrane lipoprotein is defective in *secD*, *secE*, and *secF* mutants of *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(8): 2511-6.
- Teter, S. A., W. A. Houry, D. Ang, T. Tradler, D. Rockabrand, G. Fischer, P. Blum, C. Georgopoulos et F. U. Hartl (1999). "Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains." Cell **97**(6): 755-65.
- Thompson, C. J., J. M. Ward et D. A. Hopwood (1980). "DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species." Nature **286**(5772): 525-7.
- Tjalsma, H., A. Bolhuis, M. L. van Roosmalen, T. Wiegert, W. Schumann, C. P. Broekhuizen, W. J. Quax, G. Venema, S. Bron et J. M. van Dijl (1998).

- "Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homolog of archaeal and eukaryotic signal peptidases." Genes Dev **12**(15): 2318-31.
- Tjalsma, H., M. A. Noback, S. Bron, G. Venema, K. Yamane et J. M. van Dijl (1997). "*Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities. Constitutive and temporally controlled expression of different sip genes." J Biol Chem **272**(41): 25983-92.
- Topping, T. B. et L. L. Randall (1994). "Determination of the binding frame within a physiological ligand for the chaperone SecB." Protein Sci **3**(5): 730-6.
- Ullers, R. S., D. Ang, F. Schwager, C. Georgopoulos et P. Genevaux (2007). "Trigger Factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3101-6.
- Ullers, R. S., J. Luirink, N. Harms, F. Schwager, C. Georgopoulos et P. Genevaux (2004). "SecB is a bona fide generalized chaperone in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7583-8.
- Unlu, M., M. E. Morgan et J. S. Minden (1997). "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts." Electrophoresis **18**(11): 2071-7.
- van der Wolk, J. P., J. G. de Wit et A. J. Driessen (1997). "The catalytic cycle of the *escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events." Embo J **16**(24): 7297-304.
- van Dijl, J. M., A. de Jong, J. Vehmaanpera, G. Venema et S. Bron (1992). "Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases." Embo J **11**(8): 2819-28.
- van Roosmalen, M. L., N. Geukens, J. D. Jongbloed, H. Tjalsma, J. Y. Dubois, S. Bron, J. M. van Dijl et J. Anne (2004). "Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 279-97.
- Veenendaal, A. K., C. van der Does et A. J. Driessen (2004). "The protein-conducting channel SecYEG." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 81-95.
- von Heijne, G. (1985). "Signal sequences. The limits of variation." J Mol Biol **184**(1): 99-105.
- von Heijne, G. (1986). "Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria." J Mol Biol **192**(2): 287-90.
- von Heijne, G. (1990). "The signal peptide." J Membr Biol **115**(3): 195-201.

- von Heijne, G. et L. Abrahmsen (1989). "Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts." FEBS Lett **244**(2): 439-46.
- Walter, S. (2002). "Structure and function of the GroE chaperone." Cell Mol Life Sci **59**(10): 1589-97.
- Watanabe, M. et G. Blobel (1989). "Cytosolic factor purified from *Escherichia coli* is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2728-32.
- Watanabe, T., S. Hayashi et H. C. Wu (1988). "Synthesis and export of the outer membrane lipoprotein in *Escherichia coli* mutants defective in generalized protein export." J Bacteriol **170**(9): 4001-7.
- Wexler, M., F. Sargent, R. L. Jack, N. R. Stanley, E. G. Bogsch, C. Robinson, B. C. Berks et T. Palmer (2000). "TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export." J Biol Chem **275**(22): 16717-22.
- Wickner, S., S. Gottesman, D. Skowyra, J. Hoskins, K. McKenney et M. R. Maurizi (1994). "A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12218-22.
- Widdick, D. A., K. Dilks, G. Chandra, A. Bottrill, M. Naldrett, M. Pohlschroder et T. Palmer (2006). "The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17927-32.
- Wild, J., W. A. Walter, C. A. Gross et E. Altman (1993). "Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response." J Bacteriol **175**(13): 3992-7.
- Wrobel, B., Y. Yosef, A. B. Oppenheim et A. Oppenheim (2000). "Production and purification of SV40 major capsid protein (VP1) in *Escherichia coli* strains deficient for the GroELS chaperone machine." J Biotechnol **84**(3): 285-9.
- Yamane, K., K. Bunai et H. Kakeshita (2004). "Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*." Biosci Biotechnol Biochem **68**(10): 2007-23.
- Yen, M. R., Y. H. Tseng, E. H. Nguyen, L. F. Wu et M. H. Saier, Jr. (2002). "Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system." Arch Microbiol **177**(6): 441-50.

Zahn, R., S. Perrett et A. R. Fersht (1996). "Conformational states bound by the molecular chaperones GroEL and secB: a hidden unfolding (annealing) activity." J Mol Biol **261**(1): 43-61.

Zopf, D., H. D. Bernstein et P. Walter (1993). "GTPase domain of the 54-kD subunit of the mammalian signal recognition particle is required for protein translocation but not for signal sequence binding." J Cell Biol **120**(5): 1113-21.

Zwizinski, C. et W. Wickner (1980). "Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **255**(16): 7973-7.