

2m11. 310 5.5

Université de Montréal

Un système bactérien de détection des interactions protéine-protéine

par

Edlie St-Hilaire

Département de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.)  
en biologie moléculaire



Décembre 2002

© Edlie St-Hilaire, 2002



QH

506

U54

2003

v.014

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Un système bactérien de détection des interactions protéine-protéine

Présenté par :  
Edlie St-Hilaire

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Isabelle Royal, président-rapporteur  
D<sup>r</sup> Edward Bradley, directeur  
D<sup>r</sup> France Daigle, membre du jury

Mémoire accepté le .....

## Résumé

Nous avons conçu un système de double hybride chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) dans l'optique de développer un outil qui permettrait de découvrir des molécules inhibant des interactions protéine-protéine existantes. La protéine membranaire TolA a servi de matrice. Le principe de mise au point que nous avons utilisé est basé sur la nature modulaire de cette protéine et sur la reconstitution de son activité après une interaction entre des protéines interagissant.

L'enveloppe de la bactérie de *E. coli* agit comme une barrière sélective, empêchant l'entrée de composés toxiques environnementaux dans le cytoplasme. TolA est une des protéines responsables du maintien de l'intégrité de cette enveloppe. Cette protéine possède trois modules : le domaine I sert à ancrer la protéine dans la membrane interne; le domaine II agit comme tige rigide qui s'étend au travers de l'espace périplasmique; et le domaine III interagit avec un récepteur inconnu se trouvant dans la membrane externe. Lorsque la protéine est inactivée par mutation, la bactérie devient hypersensible aux détergents et à certains antibiotiques, mais acquiert une résistance à l'agent bactéricide colicine E1.

Les domaines I et II de TolA ont été fusionnés avec une molécule connue et le domaine III a été fusionné avec une protéine qui lie cette molécule connue. Les trois combinaisons de partenaires ainsi utilisés pour valider la faisabilité de cette approche étaient : (1) le *leucine zipper* de Jun et Fos; (2) le « pocket domain » du supresseur de tumeur Rb1 et son domaine de liaison dans la protéine adénovirale E1A, le peptide LXCXE; et (3) le domaine SH3 de la protéine de signalisation Src et une séquence riche en proline, Ppeps.

Nous avons vérifié si l'expression des ces partenaires dans une bactérie mutante TolA-permettait une reconstitution de l'activité de la protéine. Seuls les partenaires SH3-Ppeps ont permis un regain des phénotypes perdus par la bactérie mutante TolA.

Ce projet représente la première étape vers un outil de haut rendement pouvant identifier des molécules inhibitrices d'interactions de type protéine-protéine.

Mots clés : *Escherichia coli*, double hybride, TolA, interaction protéine-protéine.

## Summary

We created a two-hybrid system in the bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) in order to develop a tool to identify molecules inhibiting protein-protein interactions. This system was based on the modular nature of a protein and the ability to reconstitute an activity following interaction between partners. The protein TolA was used as the template.

The cell envelope of *E. coli* acts as a selective barrier to prevent toxic compounds from entering the cytoplasm. TolA is one of the important proteins which contribute to the integrity of the envelope. This protein is composed of three domains: domain I, which serves to anchor the protein in the inner membrane; domain II, acts as a rigid tether extending across the periplasmic space; and domain III interacts with a receptor present in the outer membrane. When TolA is inactivated by mutation, the bacteria become hypersensitive to detergents, to certain antibiotics and they become resistant to the bactericidal protein colicin E1.

Domains I and II of TolA were fused to a known protein domain and the binding partner of this domain was fused with the domain III of TolA. Three combinations of binding partners were used to validate this approach: (1) the leucine zipper Jun and Fos; (2) the pocket domain of the tumor suppressor Rb and his binding domain in adenoviral protein E1A, the peptid LXCXE; and (3) the SH3 domain of the Src tyrosine kinase signaling protein and his partner, a proline-rich sequence named Ppeps. We tested whether the expression of interacting partners would reconstitute TolA function in *tolA* mutants. Only the partners SH3-Ppeps showed a reacquisition of TolA activity.

This project is the first step in the development of a high throughput tool capable of identifying molecules capable of inhibiting known protein-protein interactions.

Keywords: *Escherichia coli*, two-hybrid, TolA, protein-protein interaction.

## TABLES DES MATIÈRES

1. Revue de littérature .....	1
1.1 Les interactions de type protéine-protéine .....	2
1.2 Méthodes d'études des interactions de type protéine-protéine .....	2
1.2.2 La coimmunoprécipitation .....	2
1.2.3 Le système de double hybride chez la levure.....	3
1.3 Le système de double hybride bactérien .....	6
1.4 La bactérie <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.4.1 L'enveloppe de la bactérie Gram-négative .....	7
1.4.1.1 Le rôle mécanique de l'enveloppe .....	9
1.4.1.2 Le transport des nutriments.....	9
1.5 Les colicines.....	10
1.6 Protéines de l'enveloppe impliquées dans le transport .....	11
1.6.1 Les porines .....	11
1.6.2 Le complexe Ton.....	12
1.6.3 Le complexe Tol-Pal.....	14
1.6.4 Rôle du complexe Tol-Pal.....	19
1.6.5 Les similitudes des systèmes TonB et Tol-Pal.....	20
1.7 Objectifs .....	21
1.8 Aperçu du projet.....	23
2. Matériel et méthodes .....	24
2.1 Les souches bactériennes et leurs milieux de croissance .....	25
2.2 Préparation de bactéries compétentes .....	25
2.3 Transformation des bactéries compétentes .....	27
2.4 Congélation des bactéries.....	27
2.5 Minipréparation de plasmides (Maniatis <i>et al.</i> , 1989) .....	27
2.6 Les diverses constructions de TolA .....	28
2.6.1 pESH-TolA .....	28
2.6.2 pESH-TolA-2G .....	32
2.6.3 pESH-TolAEGGGS .....	33
2.6.4 pESH-TolA I-III.....	33

2.6.5 Partenaires de fusion .....	34
2.6.5.1 pESHjf (pBRTolA I-II Fos-rbs-Jun-TolA III) .....	34
2.6.5.2 pBRTolAI-II-EGGGS-Rb (pTER) et pBRrbs-LXCXE-TolAIII (prLIII) .....	35
2.6.5.3 pTolA I II-3 EGGGS-SH3 et pTolA III-SP-3 EGGGS-Ppeps ; pTolA III-SP-3 EGGGS-PpepN .....	36
2.7 Purification du produit de PCR.....	40
2.8 Réplique de bactéries .....	40
2.8.1 Transfert d'ADN .....	40
2.8.2 Hybridation des membranes.....	41
2.9 Séquençage d'ADN.....	42
2.10 Préparation de la colicine.....	42
2.10.1 Test de sensibilité à la colicine.....	42
2.11 Sensibilité au détergent desoxycholate (DOC) .....	43
2.12 Relâche de RNase dans le milieu extracellulaire .....	44
2.13 Bactéries mutantes TolA <sup>-</sup> , DH5m #2 et 13 .....	46
3. Résultats .....	47
3.1 La protéine TolA rétablit les propriétés de la bactérie DH5 $\alpha$ dans la bactérie mutante A592 TolA <sup>-</sup> .....	48
3.2 Modifications de la protéine TolA .....	51
3.3 Mise en place du système de double hybride bactérien .....	53
3.3.1 Étude de l'intégrité de la membrane de la bactérie mutante A592 en présence des protéines TolA modifiées.....	53
3.3.2 L'absence du domaine II de TolA n'inhibe pas l'entrée aux colicines.....	54
3.3.3 Le domaine III de TolA confère peu de sensibilité à la colicine. ....	57
3.4 Partenaires de fusion .....	58
3.4.1 Le <i>leucine zipper</i> Jun-Fos .....	58
3.4.2 Rb et LXCXE.....	59
3.4.3 SH3-Ppeps.....	62
3.5 Récapitulation .....	64
3.6 Recherche d'un meilleur hôte pour le système de détection bactérien. ....	65

3.7. Mutation du peptide Ppeps.....	68
4. Discussion .....	73
4.1 La protéine matrice TolA.....	74
4.2 Le rôle du domaine III dans la fonction de la protéine TolA.....	75
4.3 Les protéines partenaires et les phénotypes résultant de nos tests d'interaction .....	76
4.4 Les bactéries mutantes DH5m éliminent la sensibilité résiduelle causée par la présence du domaine III. ....	78
4.5 L'importance des prolines du consensus Ppeps, dans la sensibilité à la colicine observée en présence de SH3-Ppeps.....	78
5. Conclusion .....	80
6. Références .....	83

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation graphique du système de détection des interactions protéine-protéine par la technique de double hybride. ....	4
Figure 2 : Microscopie électronique de la bactérie Gram-négative <i>Escherichia coli</i> ...	8
Figure 3 : Complexe Ton et Tol. ....	13
Figure 4 : Représentation schématique de la protéine TolA .....	17
Figure 5 : La protéine TolA (421 acides aminés) .....	18
Figure 6: Représentation schématique du système de double hybride basé sur TolA	22
Figure 7: Carte de restriction de <b>pBR322</b> . ....	29
Figure 8: Carte de restriction de <b>pESH-TolA</b> . ....	30
Figure 9 : Insertions des séquences GGGG par PCR.....	33
Figure 10: Carte de restriction de <b>pBAD24</b> . ....	37
Figure 11: Relâche de la RNase I dans le milieu extracellulaire .....	45
Figure 12: Courbe de croissance de la souche bactérienne mutante A592 TolA <sup>-</sup> abritant les différentes constructions de TolA en présence de diverses concentrations de desoxycholate. ....	50
Figure 13: Représentation schématique de la protéine TolA et des différentes modifications qui lui sont apportées.....	52
Figure 14: Vérification de la présence des 2 plasmides (SH3 et Ppeps) dans les colonies obtenues après la cotransformation.....	63
Figure 15: La taille du gène TolA endogène des bactéries mutantes.....	67
Figure 16 : Quelques peptides obtenus par la mutagenèse de la séquence consensus RPLPPLP.....	69

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Les souches de <i>E. coli</i> K12 utilisées et leur génotype.....	26
Tableau II : Oligonucléotides utilisés durant ce projet .....	31
Tableau III: Sommaires des constructions .....	39
Tableau IV : Liste des souches hôtes de DH5 $\alpha$ et A592 des différentes constructions de TolA et de leur phénotype de relâche de protéines périplasmiques (RNases) dans le milieu extracellulaire.....	49
Tableau V : La toxicité de la colicine vis-à-vis des bactéries mutantes A592 exprimant les différentes constructions de TolA.....	56
Tableau VI : La toxicité de la colicine E1 vis-à-vis des bactéries mutantes A592 contenant les partenaires de fusion.....	61
Tableau VII : Bactéries mutantes éliminant la sensibilité résiduelle à la colicine E1 causée par TolA III.....	66
Tableau VIII : La toxicité de la colicine vis-à-vis de bactéries mutantes abritant les différents partenaires SH3-PpepN.....	70

## LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

$\lambda$	longueur d'onde
°C	degré Celsius
$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{l}$	microlitre
$^{32}\text{P}$	phosphore 32
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
amp <sup>r</sup>	gène de résistance à l'ampicilline
D.O.	densité optique
DOC	desoxycholate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1A	Adenovirus early region 1A
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
fd	phage
Kb	kilobase
LB	Luria-Bertani
M	molarité
mM	millimolaire
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxide de sodium
nm	nanomètre
Oligo	oligonucléotides
pb	paire de base
PCR	Polymerisation chain reaction
pKsrIII	pKS rbs-LXCXE-TolAIII
pTER	pBR TolAI II-EGGGS-Rb
Rb	rétinoblastome
RNase	ribonucléase

SDS	sodium dodecyl sulfate
SH3	Src homology 3
TAE	Tris-acetate EDTA
tet <sup>r</sup>	gène de résistance à la tétracycline
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminomethane
Tris-HCl	Tris (hydroxyméthyl) aminomethane hydrochlorure
TSB	transformation and storage buffer
UV	ultraviolet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont encouragé, soutenu tout au long de ce parcours qui mène à la rédaction de ce mémoire. Un merci spécial à mon directeur, le Dr Edward Bradley, qui m'a accueilli dans son laboratoire, m'a initié à la recherche, m'a encouragé et soutenu tout au long de ma maîtrise.

À tous les membres du laboratoire et de l'Institut du cancer de Montréal qui ont croisé mon chemin, merci. Je remercie aussi Johane Morin, Hélène Lévesque, Jane Pappas, Diane St-Louis ainsi que Bruno Paquin pour leur amitié et leurs conseils précieux. Je tiens à remercier Canderel pour son support financier.

Je tiens également à remercier chaleureusement mon mari Louis Sabbat, qui m'a épaulé, encouragé, supporté, je te lève mon chapeau. Merci à mes enfants Louisa, Prisca-Rachel et Eddy; à mes parents Antoine et Marie Carmel St-Hilaire pour l'éducation prodiguée, à mes sœurs Jaël et Esther ainsi qu'à Anna et Magalie Sabbat pour leur support par la prière.

Mon Dieu, sans toi je n'aurais pu arriver jusqu'à ce point ci, MERCI.

## 1. REVUE DE LITTÉRATURE

## 1.1 Les interactions de type protéine-protéine

La très grande majorité des processus biologiques, tel que la réplication, la transcription, la traduction, la morphogénèse, etc., nécessitent des interactions de type protéine-protéine qui sont typiquement spécifiques. Une altération de ces liens spécifiques pourrait occasionner un dysfonctionnement de la cellule et contribuer à l'étiologie d'une maladie. Étant donné leur grande importance, beaucoup d'effort ont été déployés afin d'identifier les interactions protéine-protéine.

## 1.2 Méthodes d'études des interactions de type protéine-protéine

### 1.2.2 La coimmunoprécipitation

La coimmunoprécipitation est une méthode simple qui consiste à utiliser des anticorps pour isoler des protéines qui s'associent. Les anticorps sont couplés à des billes de Sépharose ou d'agarose et sont incubés en présence de lysats cellulaires contenant l'antigène reconnu par l'anticorps. L'antigène, ainsi que toutes les protéines qui y sont associées, sont coprécipitées et isolées du lysat. On visualise les protéines ainsi précipitées par immunobuvardage (Western blot), que l'on sonde avec un anticorps pouvant reconnaître la ou les protéines potentiellement associées.

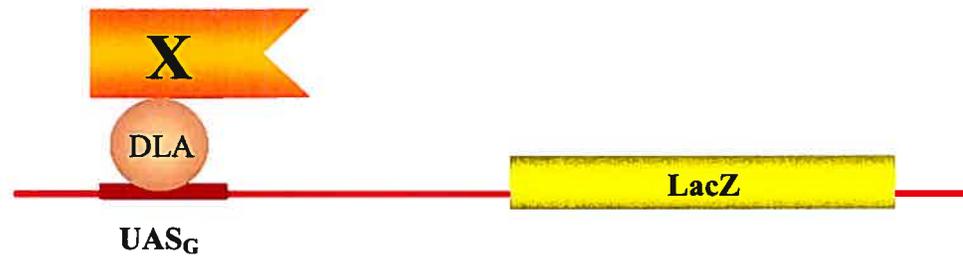
Cette technique *in vitro* ne représente pas l'environnement *in vivo* exact. De plus, l'utilisation d'anticorps peut également mener à de faux-négatifs, l'absence de signal lorsque l'anticorps ne détecte pas l'antigène pour des raisons expérimentales. Finalement, cette approche ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une interaction directe ou indirecte.

### 1.2.3 Le système de double hybride chez la levure

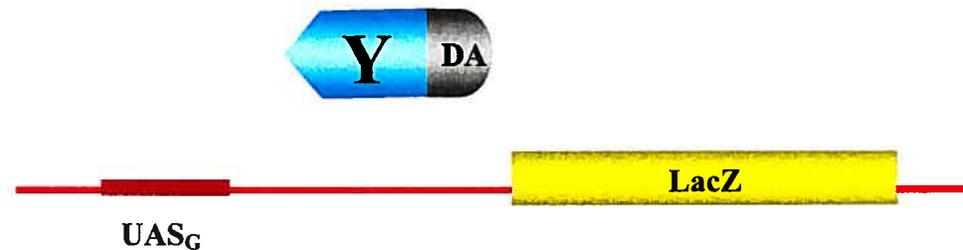
D'autres méthodes ont été mises au point afin de pouvoir contourner les obstacles mentionnés ci-haut. Entre autres, nous retrouvons le système de double hybride chez la levure (Fig. 1). Se basant sur la nature modulaire des facteurs de transcription, deux protéines (X et Y) sont séparément fusionnées, soit avec le domaine de liaison à l'ADN, ou avec le domaine d'activation du facteur de transcription. La reconstitution de l'activité de ce dernier seul est permise lors d'une interaction entre les protéines (X et Y; Fields et Song, 1989; Chien *et al.*, 1991).

La technique du système de double hybride chez la levure peut aussi se servir d'une banque de séquences d'ADNc exprimées. D'une part, l'appât est fusionné à un domaine d'un facteur de transcription qui lie spécifiquement une séquence d'ADN (le domaine de liaison à l'ADN). Le facteur de transcription en question est GAL4 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Gal4 active la transcription des gènes GAL1 et GAL10 nécessaires à l'utilisation du galactose par la levure (Johnston, 1987). D'autre part, la banque de séquences d'ADNc est fusionnée au domaine d'activation transcriptionnelle de GAL4. Ces deux constructions sont alors introduites à l'intérieur de la levure. Seule une interaction entre la protéine connue et son partenaire conduit à la reconstitution d'un GAL4 fonctionnel. Ceci permet une activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur, généralement *LacZ*, qui est facilement détectable. Ce dernier code pour l'enzyme,  $\beta$ -galactosidase, dont l'activité peut être mesurée par dosage colorimétrique. Suite à une transformation sur un milieu contenant du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), les colonies positives sont repérées par leur coloration bleue. Ce signal positif permet de repêcher les protéines liées et ainsi caractériser la protéine inconnue.

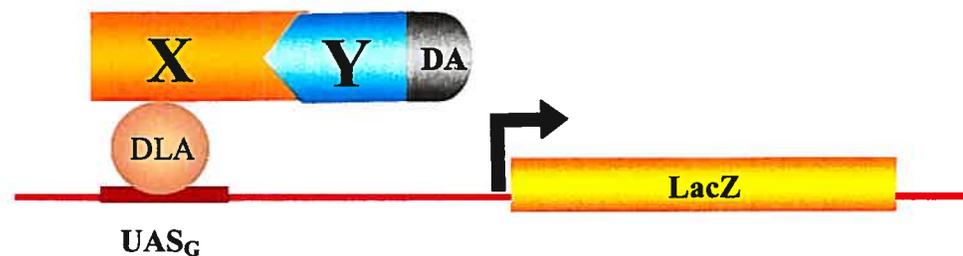
Figure 1: Représentation graphique du système de détection des interactions protéine-protéine par la technique de double hybride.



A) La protéine X (appât) est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DLA) de GAL4



B) La protéine Y (produit d'une séquence de la banque d'ADN<sub>c</sub>) est fusionnée au domaine d'activation (DA) de GAL4



C) L'interaction entre la protéine X et Y entraîne la transcription du gène reporteur LacZ

DLA : domaine de liaison à l'ADN de GAL4;

DA : domaine d'activation de GAL4;

LacZ : gène reporteur;

UAS<sub>G</sub> : séquence spécifique d'ADN que lie GAL4 (Upstream Activated Sequences for the yeast Gal gene).

Le système de double hybride chez la levure est un outil de choix pour la détection des interactions protéine-protéine *in vitro*. Depuis sa création, beaucoup de développements ont eu lieu afin de rendre le système plus utile et plus accessible (SenGupta *et al.*, 1996; Vidal et Legrain, 1999), et d'autres rapporteurs que le GAL4 ont vu le jour, tel LexA. Ce système utilise un domaine d'activation VP16 de la protéine du virus herpès simplex, HSV, en partenariat avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine LexA de *E. coli*. L'interaction (un phénomène positif) est détectée par l'activation de gènes rapporteurs avec les promoteurs contenant les séquences de l'opérateur LexA.

Le système de double hybride chez la levure présente certains avantages. Puisque la levure est un organisme phlogénétiquement rapproché des eucaryotes, et que les interactions décelées se font *in vivo*, les conditions sont alors similaires à l'environnement naturel des interactions de type protéine-protéine qui se manifestent chez la cellule eucaryote humaine. De plus, nous avons aussi immédiatement accès aux gènes clonés correspondants aux protéines partenaires. Finalement, cette technique permet de révéler des interactions de faible affinité, impossibles sinon très difficiles à identifier par des méthodes biochimiques. Seule la construction des plasmides est requise pour l'utilisation de cette méthode, il n'est ni nécessaire de préparer des protéines purifiées, ni nécessaire de produire des anticorps, qui est souvent la tâche la plus ardue. Malheureusement, puisque la méthode repose sur l'interaction de deux protéines nucléaires, elle ne peut pas être utilisée pour des certaines protéines telles que les protéines membranaires. De plus, puisqu'un événement de transcription est requis pour déceler des partenaires, les protéines partenaires elles-mêmes ne doivent pas être capable d'initier la transcription. Par ailleurs, la fusion pourrait changer la conformation de l'appât et par conséquent altérer ses fonctions. Cette mauvaise conformation peut résulter en une activité limitée ou encore en une inaccessibilité des sites de liaison. Aussi, à cause de cette proximité de *S. cerevisiae* aux eucaryotes, certaines protéines

exprimées pourraient être toxiques à la cellule. Finalement, certaines interactions dépendent de modifications post-traductionnelles, un processus absent chez la levure. Ces modifications sont fréquentes et incluent la phosphorylation, la formation de ponts disulfures et la glycosylation. Certains nouveaux systèmes de double hybride chez la levure veulent contourner ce problème en coexprimant l'enzyme responsable pour la modification post-traductionnelle.

### 1.3 Le système de double hybride bactérien

Dans ce projet nous avons mis au point un système double hybride chez la bactérie *E. coli* en utilisant une protéine impliquée dans le maintien de l'intégrité de sa membrane, TolA. Ce système aura pour mandat de mettre en évidence les différentes molécules capables de briser des interactions préexistantes. Cette technique peut s'avérer intéressante sur le plan pharmacologique.

Des interactions déjà connues de diverses protéines, ont été utilisées pour valider le système. Des éléments font de ce système un outil intéressant: la technique est plus simple et plus rapide que celle existant dans la levure, la croissance de l'hôte est rapide; l'interaction entre les protéines peut être vérifiée par une activité détectable et on sait que l'espace périplasmique où se déroulent les interactions est accessible. Ce n'est que le début de la mise en place d'un système bactérien de détection des interactions protéine-protéine.

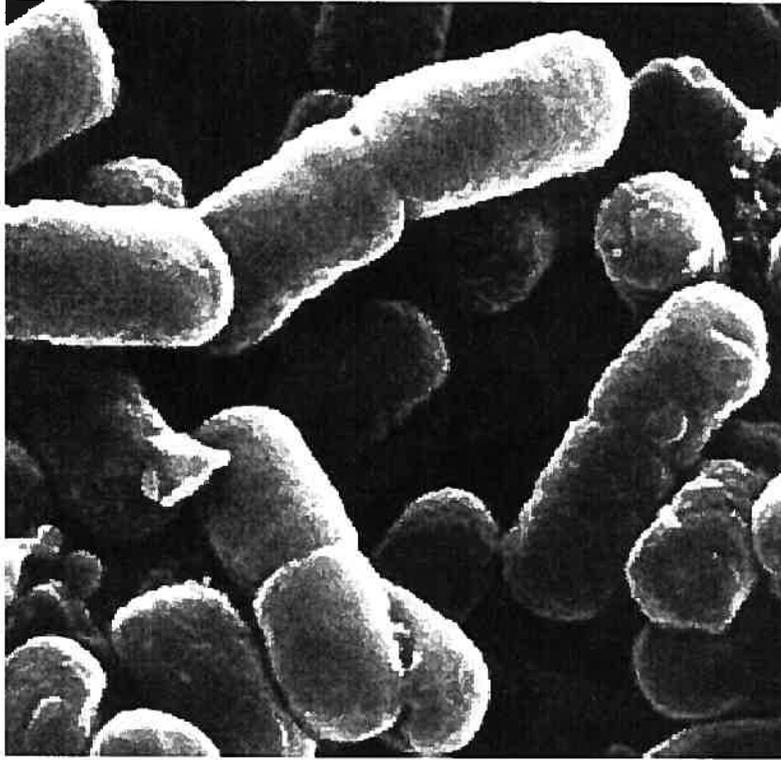
## 1.4 La bactérie *Escherichia coli*

La bactérie *E. coli*, représentée à la figure 2, est la bactérie la plus étudiée et dont le génome a été complètement séquencé (Blattner *et al.*, 1997). Elle possède une paroi cellulaire qui lui permet de survivre dans son environnement préférentiel, le tractus intestinal de l'homme et de la plupart des vertébrés. *E. coli* est une bactérie Gram-négative qui se différencie des bactéries Gram-positives justement par la composition de son enveloppe.

### 1.4.1 L'enveloppe de la bactérie Gram-négative

L'enveloppe de *E. coli* est constituée de deux membranes (interne et externe) séparées par un espace périplasmique. La membrane externe est constituée de lipopolysaccharide (LPS), de lipoprotéines et de polysaccharides associés. Les LPS préviennent la diffusion de composés toxiques à travers la membrane externe. La portion de la membrane externe formée de LPS contient une substance toxique appelée lipide A. Cette dernière est responsable des effets pathogéniques associés aux bactéries Gram-négatives. L'espace périplasmique est très visqueux, il a des compositions salines et enzymatiques qui constituent un microenvironnement intéressant pour la bactérie. Des protéines additionnelles détruisent les corps étrangers possiblement dangereux qui se présenteraient dans cet espace.

Figure 2 : Microscopie électronique de la bactérie Gram-négative *Escherichia coli*



#### 1.4.1.1 Le rôle mécanique de l'enveloppe

La paroi de la bactérie *E. coli*, constituée de 15-20% de peptidoglycanes (composés de N-acétylglucosamine et le N-acétylmuraminique), confère à l'enveloppe sa rigidité et la protège contre la lyse osmotique et le stress mécanique.

Dans la membrane externe on retrouve une lipoprotéine majeure, le Lpp, dont la trimérisation a été rapportée (Choi *et al.*, 1986). Un tiers de cette lipoprotéine est associée de façon covalente au réseau de peptidoglycanes (Braun, 1975), alors que les deux autres tiers y sont liés de façon non-covalente, ainsi que les protéines Pal, OmpA et les porines.

#### 1.4.1.2 Le transport des nutriments

L'enveloppe de *E. coli* permet à la bactérie de survivre dans l'intestin, le protégeant contre l'action létale des bactériocines, des enzymes digestifs, des antibiotiques et des sels biliaries. Cette membrane fonctionne comme une barrière sélective, permettant seulement aux petits nutriments hydrophiles de traverser via des pores de diffusion passive ou via des canaux spécifiques.

La taille des nutriments qui diffusent au travers des pores de la membrane se limite à approximativement 700 Da. Les macromolécules essentielles à la bactérie requièrent donc des systèmes de transport spécifiques. Ils s'effectuent à l'aide de récepteurs localisés à la surface externe de l'enveloppe de la bactérie vers le milieu intracellulaire. Deux systèmes analogues, le système Ton et le système Tol-Pal, sont impliqués dans ce transport de macromolécules (Fig. 3, Webster, 1991; Benedetti *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 1991). Même si elles ne

sont pas essentielles, certaines macromolécules telles que les colicines (décrites à la section suivante), utilisent ces systèmes afin de franchir cette barrière.

## 1.5 Les colicines

Les colicines sont des antibiotiques codés par des plasmides et produits par *E. coli*. Ces gènes sont habituellement réprimés et sont liés avec un gène d'immunité dont le produit confère une immunité spécifique à cette colicine. La production de colicine résulte en la mort des cellules avoisinantes qui ne sont pas immunisées ou résistantes à la colicine. La plupart des souches de *E. coli* sont résistantes à la majorité des colicines (Riley et Gordon, 1992).

Les colicines sont divisées en deux groupes, A et B (Davies et Reeves, 1975). Le groupe A, incluant A, E1, E2, E3, K, L et N, est dépendant des protéines du système Tol (TolA, B, Q et R). Les protéines TolA et TolQ sont les seules protéines requises par tous. Les colicines du groupes B, incluant B, D, Ia, Ib, M et V, ne dépendent pas des protéines Tol, mais des protéines du complexe Ton (TonB, ExbB et ExbD) afin d'être transloquées (Fisher *et al.*, 1989). Quand ces protéines sont mutées, les bactéries ne montrent aucun changement dans les propriétés de leur membrane (Davies et Reeves, 1975). Les colicines du groupe A tuent les cellules sensibles en formant des canaux ioniques dans leur membrane cytoplasmique (Bourdineaud *et al.*, 1990; Cramer *et al.*, 1990; Pattus *et al.*, 1990).

L'infection par les colicines se fait en trois étapes et chacune est liée à un domaine spécifique (Benedetti *et al.*, 1991; Webster, 1991; Lazdunski *et al.*, 1998). Le domaine N-terminal est impliqué dans la translocation, le domaine central dans la liaison au récepteur spécifique, et le domaine C-terminal dans l'action létale. Dans un premier temps, la colicine se lie à un récepteur

spécifique situé dans la membrane externe. Pour être transloqué au travers de l'enveloppe de la bactérie, le système Tol (pour les colicines du groupe A) ou le système Ton (pour les colicines du groupe B) est requis. Pour terminer, les colicines se rendent à leur site d'action où ils accomplissent leur activité létale.

## 1.6 Protéines de l'enveloppe impliquées dans le transport

Parmi les protéines associées à l'enveloppe nous retrouvons les porines et les complexes Ton et Tol-Pal (Llobès *et al.*, 2001; Lazdunski *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1999). Ces complexes protéiniques présentent une similitude marquée. D'autres protéines, telles que le Lpp, l'OmpA et l'OmpF, sont aussi présentes dans l'enveloppe (Llamas *et al.*, 2000; Lazdunski *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1999).

### 1.6.1 Les porines

Les porines sont des trimères protéiques formant des pores dans la membrane de la bactérie (Derouiche *et al.* 1996; Rigal *et al.*, 1997). Ainsi, la membrane devient perméable aux substances de faible poids moléculaire, mais les substances de plus hauts poids moléculaires ont de la difficulté à passer. Les porines interagissent avec la protéine TolA par le biais du domaine central de cette dernière (Derouiche *et al.* 1996).

### 1.6.2 Le complexe Ton

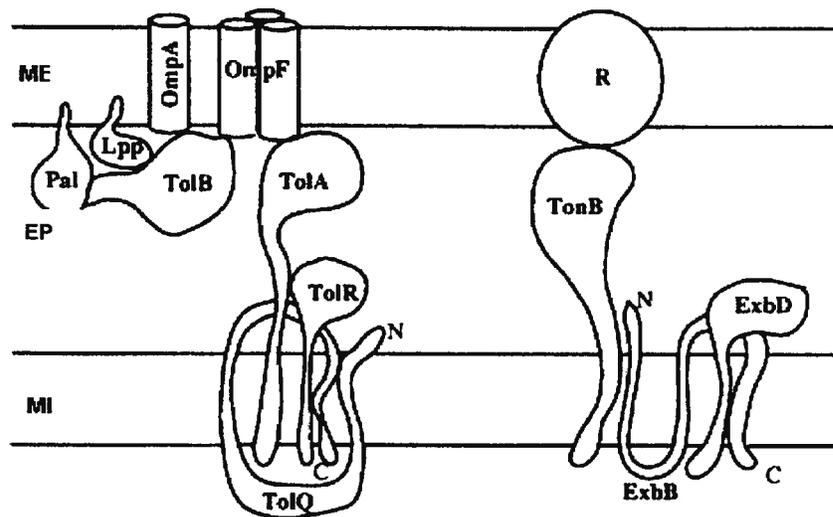
Le complexe Ton (Fig. 3) est composé de TonB et de ses auxiliaires ExbB et ExbD (Braun *et al.*, 1991). Composé de 239 acides aminés, TonB a une grande majorité de sa chaîne polypeptidique située dans l'espace périplasmique. Son ancrage dans la membrane interne se fait grâce au segment transmembranaire N-terminal (Postle et Skare, 1988; Karlsson *et al.*, 1993). Environ 17% de sa composition est constituée de prolines. Une répétition de la séquence d'acide aminé X-Pro se situe entre les positions 70 à 102 pb et procure la rigidité de la protéine (Brewer *et al.*, 1990). L'interaction de TonB avec les récepteurs de la membrane externe requiert sa région C-terminale (Larsen *et al.*, 1997; Letain et Postle, 1997). TonB interagit avec ExbB et ExbD dans la membrane interne (Letain et Postle, 1997).

ExbB est une protéine de 244 acides aminés qui traverse la membrane interne de la bactérie (Kampfenkel et Braun-2, 1992). Cette protéine contient trois domaines transmembranaires.

ExbD (141 a.a.), est une protéine de la membrane interne ancrée par son domaine transmembranaire N-terminal (Kampfenkel et Braun-1, 1992).

Le système de TonB est impliqué dans l'importation de l'ADN de phages (tels T1 et  $\phi 80$ ; Postle, 1990), de colicines et des toxines bactériennes. Plus particulièrement, le système de TonB importe les colicines du groupe B (col B, D, I et M). Le complexe des trois protéines, TonB, ExbB et ExbD, est requis pour le transport de la vitamine B12 et du complexe fer-sidérophore par le biais de la membrane externe (Braun *et al.*, 1991; Postle 1990). Le transport au travers de la membrane externe dépend de la force motive de protons, tandis que le transport au travers de la membrane interne est ATP-dépendant. Ces deux mécanismes de transport sont donc indépendants.

Figure 3 : Complexe Ton et Tol.



ME: Membrane externe, EP: espace périplasmique,

MI: membrane interne, R : récepteur dépendant de TonB

N : N-terminal, C : C-terminal

(Lazdunski *et al.*, 1998).

### 1.6.3 Le complexe Tol-Pal

Le système Tol-Pal est hautement conservé parmi les bactéries Gram-négatives (Sturgis, 2001). On le retrouve chez *Escherichia coli* (Vianney *et al.*, 1996; Lloubes *et al.*, 2001), *Haemophilus influenzae* (Deich *et al.*, 1988; Sen *et al.*, 1996), *Brucella abortus* (Tibor *et al.*, 1994), *Pseudomonas putida* (Llamas *et al.*, 2000), *Salmonella enterica* (Prouty *et al.*, 2002) et *Pseudomonas aeruginosa* (Dennis *et al.*, 1996). Ceci suggère donc que le rôle physiologique du complexe Tol-Pal est important.

Le système Tol-Pal chez *E. coli* consiste en sept protéines : trois protéines de la membrane interne (TolQ, TolR et TolA), deux protéines périplasmiques (TolB et Orf2), une lipoprotéine de la membrane externe (PAL) et une protéine cytoplasmique (Orf1). Les gènes correspondants sont situés sur deux opérons adjacents (Vianney *et al.*, 1996). Un des opérons est composé des gènes *orf1*, *tolQ*, *tolR* et *tolA*, et l'autre contient *tolB*, *pal* et *orf2* (Sun et Webster, 1987).

Les protéines TolQ, TolR et TolA forment un complexe dans la membrane interne, et interagissent via leurs domaines transmembranaires (Fig. 3) (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998 ; Journet *et al.*, 1999). Le domaine transmembranaire de TolA interagit avec le premier domaine transmembranaire de TolQ (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998 ) et avec TolR (Derouiche *et al.*, 1995), alors que le troisième domaine de TolQ interagit avec le domaine transmembranaire de TolR (Lazaroni *et al.*, 1995). Les protéines TolB et Pal forment un complexe dans la membrane externe (Bouveret *et al.*, 1995; Fig. 3). Selon Cascales et ses collaborateurs TolA interagit avec la lipoprotéine Pal formant ainsi un lien entre les membranes interne et externe (Cascales *et al.*, 2000, ceci n'est pas inclus dans les figures présentées dans ce mémoire).

TolQ (230 a.a.) comprend une extrémité N-terminale périplasmique suivie par trois segments transmembranaires (a.a. 20 à 38, 136 à 156, 175 à 191 Vianney *et al.*, 1994) et une extrémité C-terminale exposée dans le cytoplasme (Sun et Webster, 1987; Kamfengel et Braun, 1993; Vianney *et al.*, 1994).

TolR (142 a.a.) a un ancre transmembranaire N-terminal (Kamfengel et Braun, 1993), et son domaine périplasmique est d'environ 100 a.a. Ses acides aminés de l'extrémité C-terminale peuvent former une hélice amphipatique pouvant interagir avec la membrane interne (Lazzaroni *et al.*, 1995). TolR forme des dimères et son domaine central périplasmique semble être impliqué dans la dimérisation. Chacun de ses trois domaines est requis pour son activité. Des études ont montré que TolR interagit avec le domaine transmembranaire de TolA (Derouiche *et al.*, 1995) et avec le troisième domaine transmembranaire de TolQ (Lazzaroni *et al.*, 1995).

TolB (408 a.a.) est une protéine périplasmique (Levengood et Webster, 1989; Bouveret *et al.*, 1995) résultant de son clivage de ses 21 acides aminés de la séquence signal. TolB interagit directement avec Pal, la protéine associée aux peptidoglycanes (Bouveret *et al.*, 1995).

Pal (*peptidoglycan-associated lipoprotein*, 152 a.a.), est une lipoprotéine ancrée à la membrane externe. Pal est associée aux peptidoglycanes de façon non-covalente et lie TolB (Bouveret *et al.*, 1995). Il interagit avec le domaine C-terminal de TolA (Cascales *et al.*, 2000).

Orf1 est un gène se trouvant sur le même opéron que *TolQR* et *A*. Il est localisé dans le cytoplasme. Orf2 est une protéine périplasmique. Les fonctions de ces 2 protéines ne sont pas connues (Llamas *et al.*, 2000; Lazdunski *et al.*, 1998; Bernadac *et al.*, 1998).

TolA (Fig. 4) est une protéine de la membrane interne. Ses 421 acides aminés se subdivisent en trois domaines distincts (Levengood et Webster, 1989; Levengood *et al.*, 1991). L'extrémité N-terminale, soit le domaine I (a.a. 1 à 47), contient 21 acides aminés hydrophobes (a.a. 14 à 34) qui forment un segment transmembranaire ancrant la protéine dans la membrane cytoplasmique (Levengood et Webster, 1989; Levengood *et al.*, 1991).

Le domaine central (Figs. 4 et 5), soit le domaine II (a.a. 48 à 310), contient une séquence de 263 acides aminés. Entre les acides aminés 79 à 301, on retrouve un très grand pourcentage d'alanines, de lysines, d'acides glutamiques et d'acides aspartiques. La séquence [Lys<sub>1-2</sub>-Ala<sub>3-4</sub> (Glu/Asp)]<sub>10</sub> (Levengood et Webster, 1989) résulte en la formation d'une hélice stable (Marqusee *et al.*, 1987; Levengood *et al.*, 1991). On pense que cette longue région hélicoïdale agit comme tige, permettant au domaine III d'interagir avec les composants de la membrane externe (Levengood *et al.*, 1991).

Cinq glycines (a.a. 43-47) se retrouvent entre le domaine I ancrant la protéine dans la membrane et la région hélicoïdale du domaine II, alors que trois autres glycines (a.a. 311-313) sont situées entre les domaines II et III. La présence de ces glycines confère un peu de flexibilité entre les différents domaines de la protéine (Levengood *et al.*, 1991).

Figure 4 : Représentation schématique de la protéine TolA

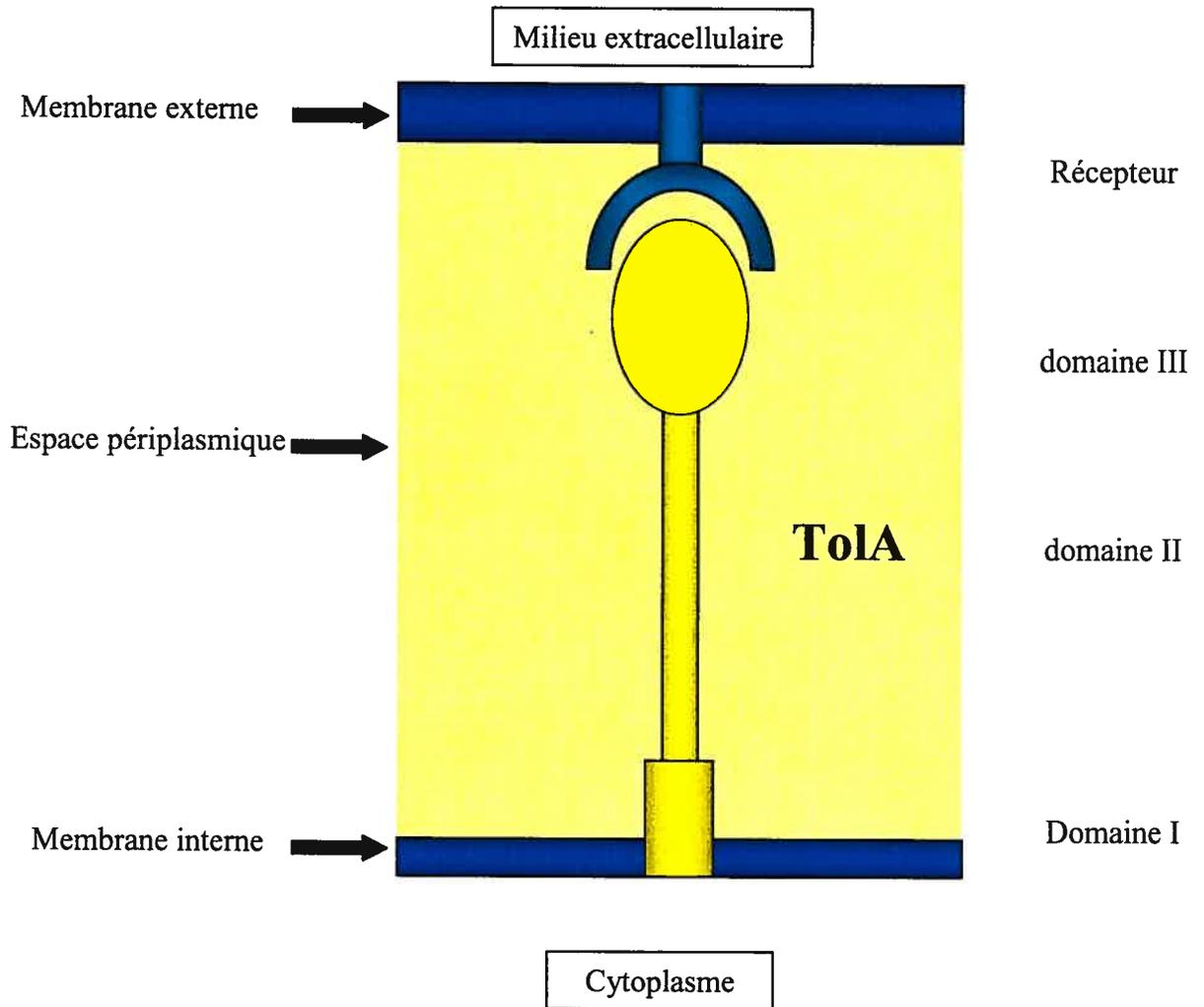


Figure 5 : La protéine TolA (421 acides aminés)

Domaine I  
 Région ancrée  
 dans la membrane  
 (aa 1-47)

MSKATEQNDKLKR**AIISAVLHVILFAALIWSSFDE**  
 NIEASA**GGGGG**

SSIDAVMVDSGAVVEQYKRMQSQESSAKR  
 SDEQRKMKEQQAAEELREKQAAEQERLK  
 QLEKERLAAQEQQKQAEAAKQAEKQK  
 QAEAAAKAAADAKAKAEADAKAAEEA  
 AKKAAADAKKKAEAEAAKAAAEQKKA  
 EAAAAALKKKAEAAEAAAAEARKKAATE  
 AA EKAKAEAEKKA AEKAAADKKAAAE  
 KAAADKKAAEKAAAEKAAADKKAAAEK  
 AAADKKAAAKAAAEKAAAKAAAEAD  
 DIFGELSSGKNAPKT

Domaine III  
 Région  
 globulaire  
 (aa 311-421)

**GGG**AKGNNASPAGSGNTKNNGASGADIN  
 NYAGQIKSAIESKFDASSYAGKTCTLRIK  
 LAPDGMLLDIKPEGGDPALCQAALAAAKL  
 AKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKP

Le domaine C-terminal de TolA (domaine III), contient 111 acides aminés et comprend un segment de 27 acides aminés qui est de forme globulaire (Figs. 4 et 5). Il semble interagir avec les molécules présentes à la surface interne de la membrane externe (Levengood *et al.*, 1991). Ce domaine joue un rôle important dans le transport de la colicine (Benedetti *et al.*, 1991) et lie la protéine g3p des phages filamenteux (Riechmann et Holliger, 1997). L'interaction de ce domaine avec la lipoprotéine Pal, ancrée dans la membrane externe, semble avoir un effet de stabilisation sur la membrane de la bactérie (Cascales *et al.*, 2000; Cascales *et al.*, 2002). La présence du domaine III dans TolQRA sous forme libre dans l'espace périplasmique entraîne la relâche de composants périplasmiques dans le milieu extracellulaire, ainsi qu'une augmentation de la tolérance aux colicines du groupe A (Levengood-Freyermuth *et al.*, 1993). On lui attribue le rôle de domaine fonctionnel de la protéine (Levengood *et al.*, 1991; Levengood-Freyermuth *et al.*, 1993).

#### 1.6.4 Rôle du complexe Tol-Pal

Les protéines TolQRA sont requises pour la translocation de l'ADN des bactériophages M13, fd et f1 dans le cytoplasme durant le processus infectieux. Ces protéines sont aussi utilisées par les colicines du groupe A (col A, E et K) afin d'être transportées à travers la membrane externe. Les protéines du complexe Tol-Pal sont aussi impliquées dans le maintien de la stabilité de la membrane externe, car une mutation portée dans une de ces protéines entraîne une perturbation de l'intégrité de la membrane. Ceci est mis en évidence par l'apparition des phénotypes suivants : le contenu de l'espace périplasmique de la bactérie est relâché dans le milieu extracellulaire; la bactérie devient extrêmement sensible aux détergents, aux sels biliaires (Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Webster, 1991) et des cloques se forment à la surface de la cellule dans la membrane externe (Bernadac *et al.*, 1998).

### 1.6.5 Les similitudes des systèmes TonB et Tol-Pal

Les protéines qui composent le système Ton ressemblent aux protéines du système Tol (Fig. 3), autant au niveau de la structure qu'au niveau de la fonction. De plus, les complexes formés par les protéines des deux systèmes sont très similaires. Les protéines TolQ et TolR du complexe Tol sont homologues à ExbB et ExbD appartenant au complexe Ton (Eick-Helmerich *et al.*, 1989). Les protéines TolA et TonB sont toutes deux ancrées dans la membrane interne. Leur domaine transmembranaire contient un motif hautement conservé (Germon *et al.*, 1998; Karlsson *et al.*, 1993). Cependant, aucune séquence homologue n'a été rapportée au niveau leur domaine périplasmique; le domaine central de TolA a une structure  $\alpha$ -hélice (Levengood *et al.*, 1991), tandis que celui de TonB a une séquence répétée de X-Pro (Postle et Good, 1983).

Les deux systèmes sont requis pour l'importation des macromolécules tel que les colicines et l'ADN de phage au travers de l'enveloppe de la cellule (Webster, 1991; Lazdunski *et al.*, 1998). Le complexe Ton est impliqué dans l'importation des colicines du groupe B, tandis que le complexe Tol dans l'importation des colicines du groupe A.

## 1.7 Objectifs

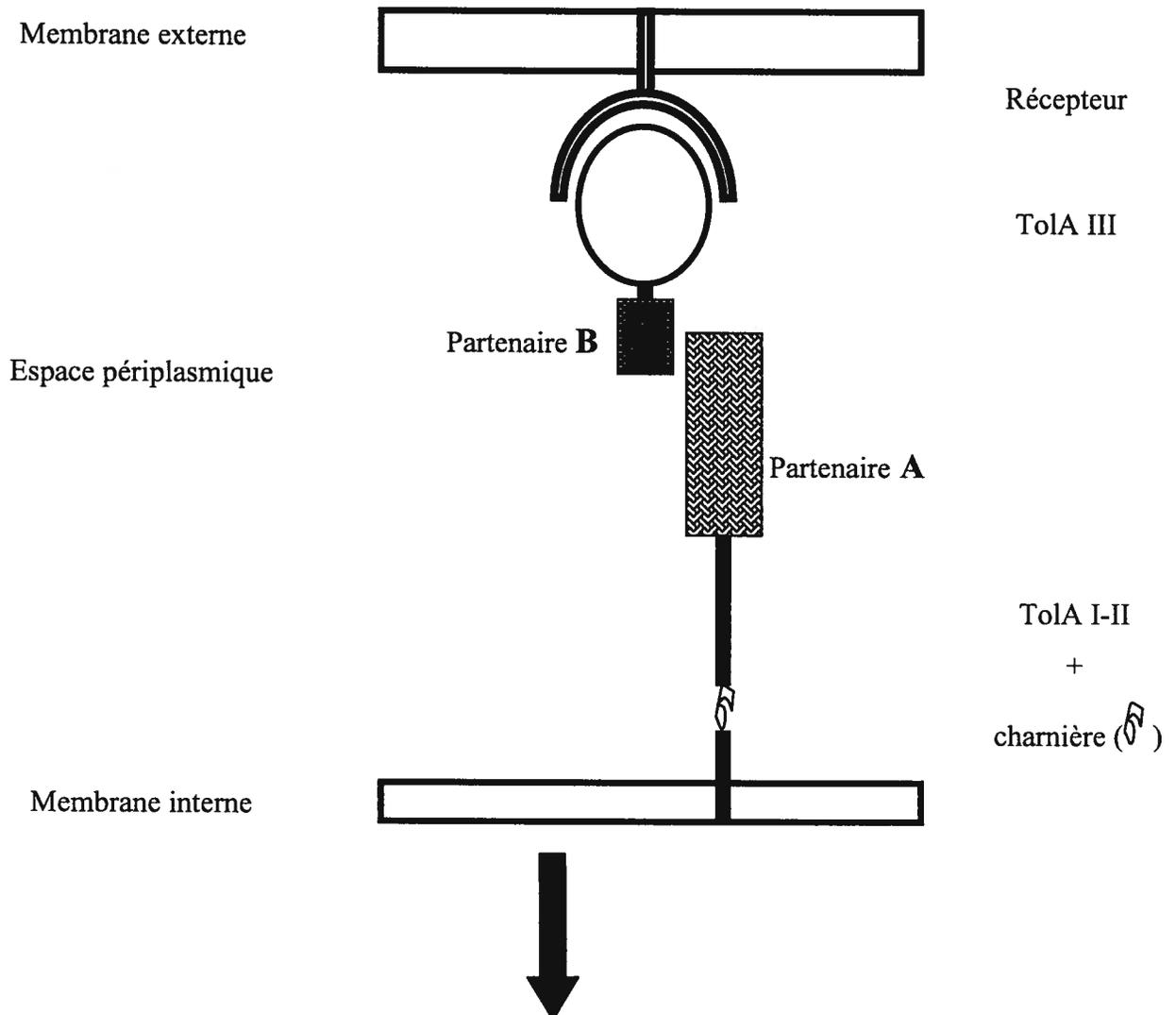
Le but de ce projet était de développer un système de double hybride chez la bactérie *E. coli* en utilisant la protéine TolA comme matrice. J'ai divisé la protéine TolA en deux fragments, et j'ai fusionné chacun avec des protéines partenaires connues afin de vérifier si la liaison entre les partenaires permettrait une reconstitution de l'activité TolA (Fig. 6).

La combinaison de constructions envisagées comportaient d'une part, les domaines I et II de TolA fusionnés avec un partenaire A connu, et d'autre part, le partenaire B connu fusionné avec le domaine III de TolA. Mais à cette dernière construction, j'ai ajouté une séquence signalétique afin de diriger la protéine hybride dans l'espace périplasmique de la bactérie, car c'est à cet endroit que se déroule l'interaction voulue.

Plusieurs caractéristiques de TolA nous mènent à choisir ce système pour fins de double hybride. TolA a une activité facilement détectable : chez la bactérie dont la protéine est fonctionnelle, les colicines pénètrent la bactérie et accomplissent leur action létale (phénotype de sensibilité), mais dans la bactérie ayant un TolA mutant déficient, les colicines ne pénètrent pas, et la bactérie demeure in affectée (phénotype de résistance). Cette activité létale se traduit par la présence de plaques visibles dans le tapis de croissance bactérien. C'est un essai simple, rapide et non dispendieux.

L'utilisation de la protéine TonB, hautement homologue à TolA, qui est responsable du transport de la vitamine B12, serait impossible, puisque la bactérie est auxotrophe pour la vitamine B12 (Bassford *et al.*, 1976). En revanche, les mutants *tolA* ne requièrent rien de plus pour avoir une croissance normale.

Figure 6: Représentation schématique du système de double hybride basé sur TolA



Rétablissement des propriétés de TolA

Phénotypes associés :

- Résistance aux détergents (e.g. DOC)
- Pas de relâche de protéines périplasmiques (e.g. RNAses) dans le milieu extracellulaire
- Sensibilité aux colicines

## 1.8 Aperçu du projet

Nous avons voulu mettre au point différentes constructions visant à rétablir l'activité de TolA dans la bactérie TolA<sup>-</sup>. Nous avons vérifié la tolérance de la protéine à recevoir des modifications, et nous avons ajouté des joints de flexibilité à la protéine à des endroits stratégiques, tel qu'aux extrémités de la tige rigide formée par le domaine II.

Les partenaires connus que nous utilisons sont la *leucine zipper* Jun-fos, le 'pocket domain' du suppresseur de tumeur Rb, avec le peptide LXCXE dérivé de son partenaire E1A (Adenovirus early region 1A; Barbeau *et al.*, 1994), ainsi que le domaine SH3 (Src homology 3) de la protéine de signalisation Src avec son partenaire, une séquence riche en prolines qui se retrouve dans plusieurs protéines, que nous avons nommé "Ppeps".

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Les souches bactériennes et leurs milieux de croissance

Les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude (Tableau I) sont : DH5 $\alpha$  (*tolA*<sup>+</sup> sensible aux colicines), A592 (*tolA*<sup>-</sup>, résistante aux colicines). Deux autres souches obtenues par des mutations spontanées ont aussi été créées: DH5m#2 et DH5m#13, elles sont *tolA*<sup>-</sup>, et donc résistantes aux colicines. Pour une description plus détaillée voir la section 2.13. La bactérie SAS1136 (fournie par le Dr. Sassarman, Université de Montréal), est coligénique : elle a servi à la production de colicine E1 (voir section 2.10).

Les bactéries croissent soit sur des pétris en milieu solide Luria-Bertani (LB)-agar ou en milieu LB liquide (pH 6.1). De façon régulière, les cultures croissent en milieu aérobique à 37°C avec ou sans agitation dépendant de l'état du milieu (liquide ou solide, respectivement). Les antibiotiques appropriés y ont été ajoutés aux concentrations suivantes : 100 $\mu$ g/ml d'ampicilline, 12.5 $\mu$ g/ml de tétracycline, 50 $\mu$ g/ml de kanamycine ou 30 $\mu$ g/ml de chloramphénicol.

## 2.2 Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries ont poussé jusqu'à atteindre une densité optique (D.O.) d'environ 0.3-0.4, à 600 nm (début de la phase exponentielle). Recueillies après une centrifugation de 10 minutes (1000 g) à 4°C, les bactéries ont été resuspendues dans 1/10 du volume de tampon de Transformation and Storage Buffer (TSB). Le TSB contient 10% de polyéthylène glycol (PEG), 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 20mM de Mg<sup>++</sup> (dont 10mM de MgCl<sub>2</sub> et 10mM de MgSO<sub>4</sub>). Les bactéries resuspendues dans le TSB ont été aliquotées (100 $\mu$ l dans des tubes eppendorf) et congelées dans l'azote liquide pendant 10 minutes avant d'être placées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau I : Les souches de *E. coli* K12 utilisées et leur génotype.

Souches bactériennes	Génotype	Référence ou source
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1 recA1</i> <i>hsdR17 deoR thi-1 phoA SupE44</i> $\lambda^-$ <i>gyrA96 relA1</i>	LifeTechnologies
A592	<i>Thr-1 leuB1 tonA21 lacY1</i> <i>supE44 tolA1 <math>\lambda</math>-1 thi-1</i>	(Nagel de Zwaig et Luria, 1967; Levengood et Webster, 1989)
DH5m#2	DH5 $\alpha$ <i>tolA</i>	Ce projet
DH5m#13	DH5 $\alpha$ <i>tolA</i>	Ce projet
SAS1136	F $^-$ , <i>thr^-</i> , <i>leu^-</i> , <i>thi-1</i> /ColE1	A. Sassarman

### 2.3 Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries compétentes ont été mises en présence d'un produit de ligation ou d'un plasmide pendant 30 minutes sur glace. Suite à cette incubation, elles ont subi un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes afin de permettre l'entrée des plasmides dans la bactérie, puis ont été remises rapidement sur glace pendant au moins 2 minutes. Les bactéries ont été incubées dans 500 µl LB pendant une heure à 37°C. Par la suite, les cellules ont été étalées sur un pétri LB-agar contenant l'antibiotique de sélection approprié.

### 2.4 Congélation des bactéries

Une culture du clone d'intérêt est incubée à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, les bactéries sont centrifugées pendant 5 minutes à 3000 rpm, et resuspendues dans 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM et 2 ml de glycérol stérile (80%) et conservées à -80°C.

### 2.5 Minipréparation de plasmides (Maniatis *et al.*, 1989)

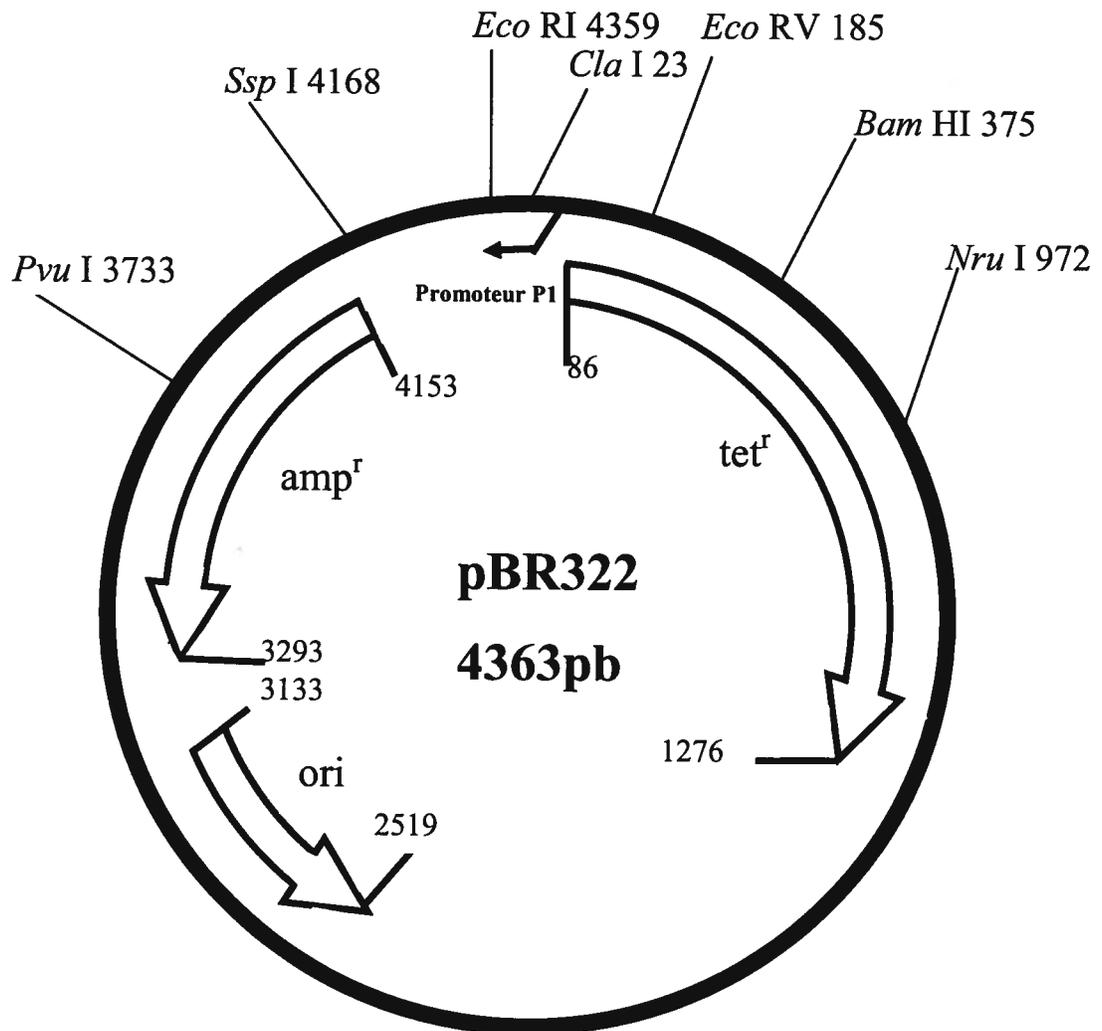
Une colonie dont on veut extraire l'ADN plasmidique est piquée, mise dans un bouillon LB contenant l'antibiotique approprié et incubée 16 heures à 37°C avec agitation. La culture résultante est centrifugée à 10 000 g pendant une minute. Le culot est resuspendu dans 100 µl de TEG (25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA et 50 mM glucose). Après 5 minutes à la température de la pièce, 200 µl d'une solution fraîchement préparée contenant 0.2N NaOH et 1% SDS est ajoutée. Après avoir mélangé par inversion et gardé à la température de

la pièce pendant 5 minutes, 150µl d'acétate de potassium froid (pH 4.8) est ajouté. La solution est mélangée par inversion, et incubée pendant 5 minutes sur glace. Après une centrifugation de 5 minutes, 225 µl de phénol et 225 µl de chloroforme- alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés au surnageant. La solution est vortéxée puis centrifugée à 10 000 g pendant 2 minutes. La phase aqueuse claire supérieure est recueillie dans un nouveau tube, auquel on ajoute 2.5 volumes d'éthanol. La solution est vortéxée puis incubée sur glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 25 minutes à 10 000 g, le surnageant est enlevé et le culot est séché à la température de la pièce. L'ADN est resuspendu dans 50 µl d'eau.

## 2.6 Les diverses constructions de TolA

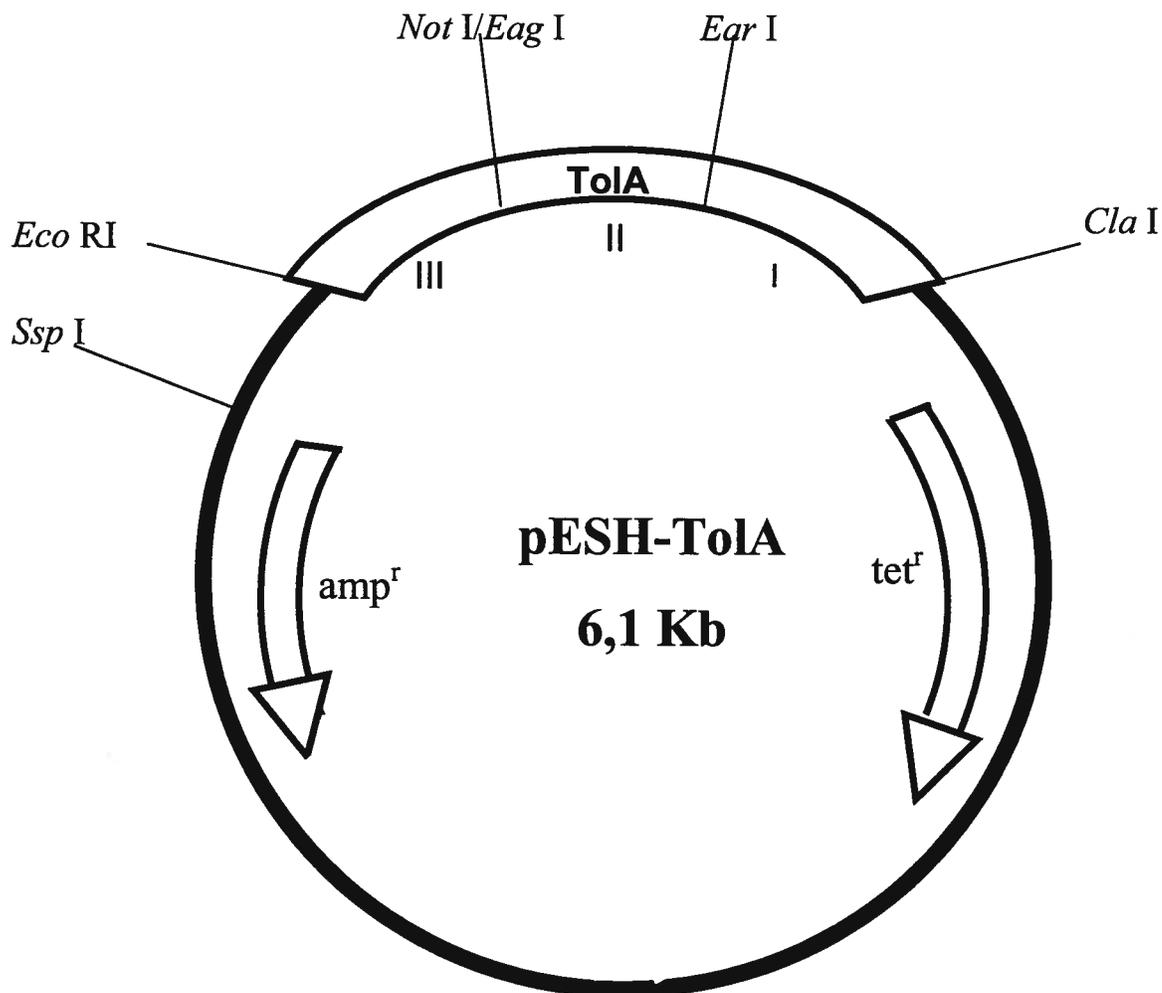
### 2.6.1 pESH-TolA

La protéine TolA a été introduite dans un plasmide afin de servir à la complémentation d'une bactérie dont la protéine TolA est non fonctionnelle ou absente. L'ADN du phage  $\phi$ 177 a été digéré par *Nru* I et le produit de 1.7 Kb été introduit dans le vecteur SK, au site *Eco* RV. Le fragment *Cla* I-*Eco* RI, contenant le produit *Nru* I, a été isolé de ce plasmide pour être inséré dans le vecteur pBR322 (Fig. 7) digéré par les mêmes enzymes. Ce plasmide est nommé pESH-TolA (Tableau III, Fig. 8).

Figure 7: Carte de restriction de **pBR322**.

Le vecteur de clonage pBR322 (4363 pb) contient des gènes de résistance à l'ampicilline (amp<sup>r</sup>) et la tétracycline (tet<sup>r</sup>). Les sites de restriction inscrits sont ceux utilisés dans ce projet.

Figure 8: Carte de restriction de pESH-TolA.



Plasmide contenant le gène TolA. Les trois domaines y sont incrits (TolA I II et III). Des glycines (4) ont été insérées dans les sites *Not I* et *Ear I* pour créer le plasmide pESH-TolA 2G. Une charnière plus longue (EGGGS) a été insérée près du site *Ear I*.

Tableau II : Oligonucléotides utilisés durant ce projet

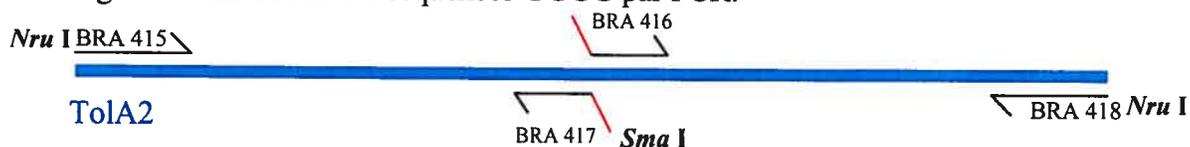
Oligonucléotide	Séquence (5'-3')	Utilisation	Site inséré
BRA 347	Gctctagatttatctccagaagaagaagag	Amplification de Fos	<i>Xba</i> I
BRA 348	Gaattctagatcttgcaggcaggtcg		<i>Xba</i> I
BRA 349	Ccggtagctacaggacatcttgaatatg	Amplification de rbs	<i>Kpn</i> I
BRA 350	Gccggccgtgccatgcattcgactg		<i>Eag</i> I
BRA 382	Cggccggacatggagtctcaggag	Amplification de Jun	<i>Eag</i> I
BRA 383	Tgcgccgagtggtggcaccactgtt		<i>Not</i> I
BRA 394	Ggccggtggtggagg	Insertion de 4 glycines	
BRA 395	Gccccctccaccacc	dans le site <i>Not</i> I	
BRA 415	Ggtcgtcggatctcaa	Amplification de TolA	<i>Nru</i> I
BRA 416	Gggggtggtggccaagctgaagaggc	Insertion de 4 glycines	<i>Bal</i> I
BRA 417	Gccaccaccccggtcttctgtttaactc	près du site <i>Ear</i> I	<i>Sma</i> I
BRA 418	Caacatcggattacggtt	Amplification de TolA	<i>Nru</i> I
BRA 421	Gctctagatatgaacactatcaa	Amplification de Rb	<i>Xba</i> I
BRA 422	Gaattctagataaactgtaagggt		<i>Xba</i> I
BRA 437	Agaagcaagctgaagagggcggtctctggt	Amplification de la	
BRA 438	cgatctcttcagctcaaaatcaccg	charnière EGGGS	
BRA 461	cgccgtagagccccaaatgaa	Amplification de LXCXE	<i>Eag</i> I
BRA 462	gcggccgcttaattgctcgtga		<i>Not</i> I
Ppep-3'	Aggacgtgtagtcggaagcgggtgtaacgtct aggagtagaaggtac	Peptide Ppeps	
Ppep-5'	Cttctactcctagaccgttaccaccgcttccgacta cacgtccttgca		
TolQC	Gctttaccgtagcgagagc		
PpepN-3'	AggacgtgtagtcgNaagcgnTgNtaacgNt ctaggagtagaaggtac	Oligos dégénérés donnant le peptide PpePN	
PpepN-5'	CttctactcctagaNcgtnaNcncgcttNcga ctacacgtccttgca	(N : n'importe quel nucléotide g, c, a ou t)	

## 2.6.2 pESH-TolA-2G

Les glycines sont souvent impliquées dans la formation de charnières (Levengood *et al.*, 1991). Nous avons inséré des séquences de quatre glycines (GGGG) à deux sites de restrictions uniques et stratégiques du plasmide pESH-TolA, *Ear* I et *Not* I (Fig. 8). *Ear* I se trouve entre les séquences codant les domaines I et II, et *Not* I se trouve entre les séquences codant les domaines II et III de TolA. Les oligos BRA 394 et BRA 395 (Tableau II) ont été hybridés et insérés dans le plasmide pESH-TolA qui préalablement est digéré par l'enzyme de restriction *Not* I. Ces oligos ont été construits de sorte que le site *Not* I ne soit pas recréé. Le plasmide contenant le GGGG au site *Not* I est appelé pESH-TolA2.

Afin d'introduire l'autre série de glycines près du site *Ear* I, nous avons dessiné les oligos BRA 415 à BRA 418 (Tableau II, Fig. 9). Nous avons tout d'abord effectué deux séries de réactions de PCR, en utilisant le plasmide nouvellement créé pESH-TolA2, comme matrice : une réaction de PCR est fait avec les oligos BRA 415-BRA 417 et une deuxième réaction de PCR avec les oligos BRA 416-BRA 418 (Fig. 8). L'oligo Bra 417 contient un site *Sma* I (Tableau II), utile lors de la délétion du domaine II. Les extrémités des oligos BRA 416 et BRA 417 sont complémentaires, c'est la section formant les quatre glycines. Ceci a permis l'hybridation des deux produits de PCR (Fig. 8). Suite à cette hybridation, nous nous sommes servi des oligos externes pour faire un PCR.

Figure 9 : Insertions des séquences GGGG par PCR.



—▶ : Orientation des oligos; \ : extrémités contenant la séquence formant les quatre glycines; BRA 415-BRA 418 : nom des oligos.

■ : TolA2 : gène TolA ayant quatre glycines au site de restriction *Not* I

Ce fragment de TolA contenant les deux séries de 4 glycines est inséré dans le vecteur pBR322 (Fig. 7) aux sites *Cla* I-*Eco* RI. Le plasmide résultant est nommé pESH-TolA2G.

### 2.6.3 pESH-TolAEGGGS

Afin d'augmenter la probabilité d'interaction physique entre les partenaires, nous avons introduit une région hautement flexible dans la protéine TolA. Nous avons utilisé la séquence répétée EGGGS de la protéine du phage fd. Les oligos BRA 437 et BRA 438 (Tableau II) ont été utilisés afin d'amplifier la séquence. Flanquée de chaque coté par le site de restriction *Ear* I, la répétition de 4 EGGGS a été insérée dans le site *Ear* I de pESH-TolA.

### 2.6.4 pESH-TolA I-III

La construction de ce plasmide a été faite à partir de pESH-TolA dans lequel quatre glycines ont été insérées près du site *Ear* I (pESH-TolA 1G), à la manière décrite plus haut à l'aide des oligos BRA 415-BRA 418 (Tableau II et III). Dans ce cas-ci, les réactions de PCR ont employé la séquence TolA

exempte de glycines au site *Not* I comme matrice. Ce fragment inséré dans le site *Cla* I-*Eco* RI de pBR322 (Fig. 7) a donné lieu au plasmide pESH-TolA 1G. De ce plasmide, l'extraction du domaine II de TolA a été faite en utilisant le site de restriction *Sma* I créé par l'introduction des glycines près du site *Ear* I et le site *Not* I.

## 2.6.5 Partenaires de fusion

Afin de tester notre système de double hybride fabriqué avec la protéine TolA, nous avons utilisé les trois combinaisons de partenaires suivants: Jun-Fos; Rb-LXCXE et SH3-Ppeps.

### 2.6.5.1 pESHjf (pBRTolA I-II Fos-rbs-Jun-TolA III)

La première construction mise au point pour valider notre système fut pESH-TolAI-II-Fos-rbs-Jun-TolAIII (pESHjf). Pour ce faire, Fos a été amplifié par les oligos BRA 347-BRA 348 (Tableau II) laissant aux deux extrémités le site de restriction *Xba* I. Se servant de ce dernier, le fragment Fos a été inséré dans le vecteur SK. Suite à une digestion avec *Not* I et *Eco* RV, Fos a été isolé du vecteur SK et inséré dans un plasmide pESH-TolA dont le domaine III de TolA a été enlevé en utilisant les sites *Not* I et *Ssp* I. Le plasmide a été nommé pESH-TolAI-II Fos.

Afin de localiser le domaine III de TolA dans l'espace périplasmique, une séquence signal, le ribose-binding-signal (rbs; Levengood-Freyermuth *et al.*, 1993), a été amplifiée par les oligos BRA 349-BRA 350 (Tableau II), laissant les sites de restriction *Kpn* I et *Eag* I aux extrémités. Le produit PCR a été digéré par ces enzymes, et inséré dans le vecteur KS digéré aussi par *Kpn* I et *Eag* I. Le domaine III de TolA a été ajouté en utilisant les sites *Eag* I-*Eco* RI. Ce plasmide a été appelé pKSrbs-TolAIII. Jun a été amplifié par les oligos

BRA 382-BRA 383 (Tableau II). Le fragment résultant a été inséré entre rbs et le domaine III de TolA au site de restriction *Eag* I. Ce plasmide a été appelé pKSrbs-Jun-TolA III. Les sites de restriction *Pvu*II du vecteur KS ont été utilisés pour extraire le fragment rbs-Jun-TolA III. Ce dernier a été inséré dans le site de restriction *Sma* I du plasmide pESH TolAI-II-Fos. Ce faisant, le plasmide résultant est appelé pESH-TolAI-II-Fos-rbs-Jun-TolAIII (pESHjf). Ce plasmide contient les gènes de résistance à l'ampiciline et à la tétracycline.

#### 2.6.5.2 pBRTolAI-II-EGGGS-Rb (pTER) et pBRrbs-LXCXE-TolAIII (prLIII)

La deuxième combinaison de partenaires était Rb et le peptide LXCXE. Pour la première construction, pTER (pBRTolAI-II-EGGGS-Rb), nous avons enlevé le domaine III de TolA du plasmide pESH-TolA-EGGGS *Not* I et *Ssp* I. Le fragment pBRTolAI-II-EGGGS a été isolé sur gel et ligué à la séquence codante de Rb.

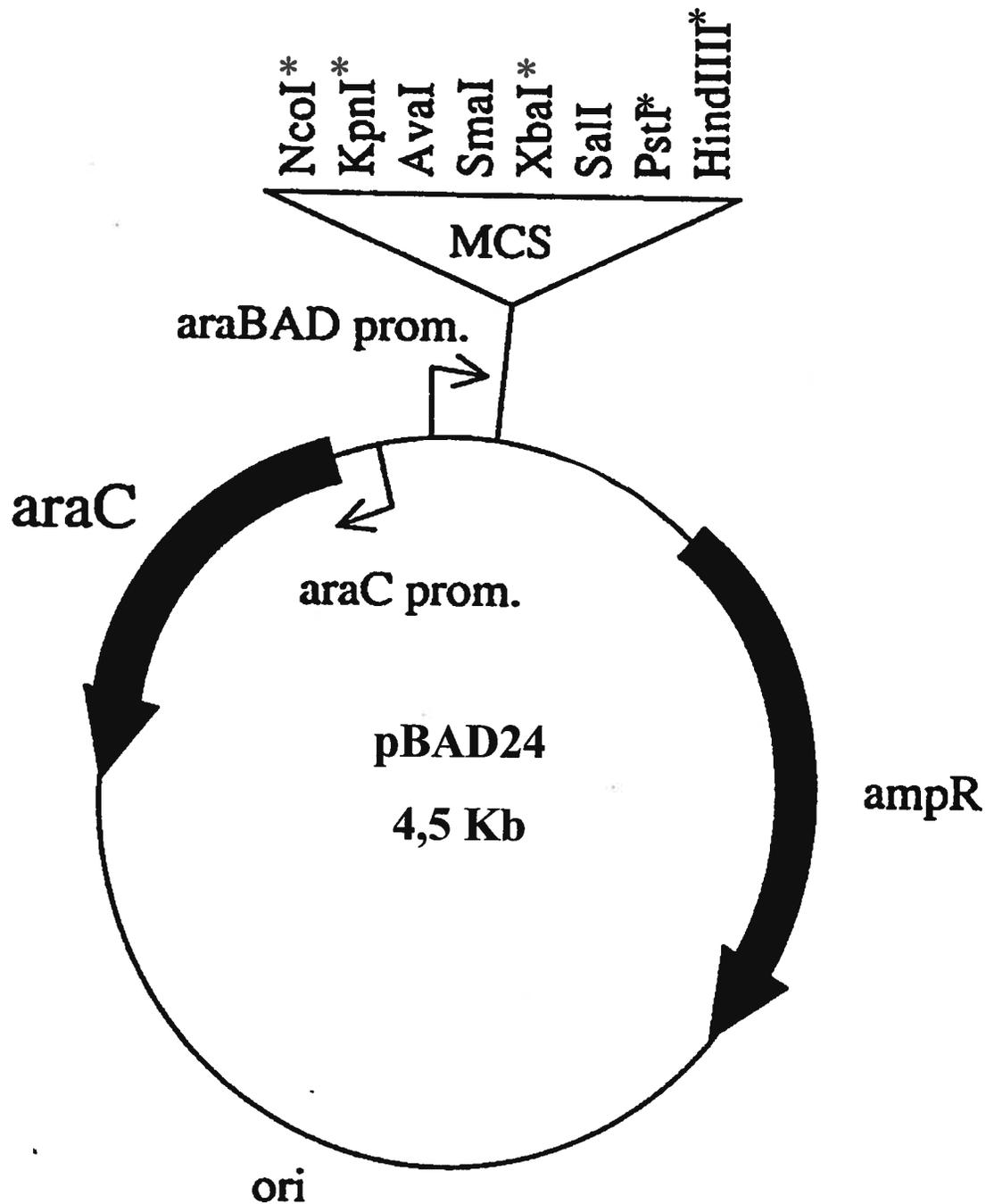
La séquence Rb a été amplifiée avec les oligos BRA 421 et BRA 422 (Tableau II) contenant le site *Xba* I à leur extrémité, servant à l'insertion de Rb dans le site de multiclonaage du vecteur SK. Après avoir vérifié l'orientation de la protéine Rb, nous avons utilisé les sites *Not* I et *Eco* RV afin d'isoler Rb et de l'insérer dans le plasmide pBRTolAI-II-EGGGS (préalablement digéré par *Not* I et *Ssp* I). Le gène de résistance à l'ampiciline de ce vecteur a été retiré en utilisant les enzymes de restriction *Pvu* I et *Eco* RI. Un remplissage des extrémités cohésives après digestion a été fait avec l'enzyme T4 DNA polymérase. Une ligation a suivi afin de refermer le plasmide pTER (pBRTolAI-II-EGGGS-Rb). Ce dernier ne contient que le gène de résistance à la tétracycline.

Les oligos BRA 461-BRA 462 (Tableau II) ont servi à amplifier la séquence LXCXE de la protéine E1A, X pouvant être n'importe quel acide aminé. LXCXE étant suffisant pour lier la poche Rb (Barbeau *et al.*, 1994). Ce peptide a été inséré dans le plasmide pKSrbs-TolAIII au site de restriction *Eag* I, générant le plasmide pKSrbs-LXCXE-TolAIII (pKSrLIII). Nous avons par la suite mis le fragment rbs-LXCXE-TolAIII dans le vecteur pBR322 (Fig. 7) dans lequel la résistance à la tétracycline a été préalablement éliminée en utilisant les sites *Eco* RV et *Nru* I à bouts francs. Le vecteur reliqué a été digéré par *Cla* I et rendu franc par la T4 DNA polymérase, et digéré par *Eco* RI afin d'être prêt à recevoir le fragment rbs-LXCXE-TolA III. Ce fragment a été digéré par l'enzyme *Kpn* I et ses extrémités cohésives ont été rendues franches. Le fragment rLIII, digéré par *Eco* RI, a été introduit dans le vecteur pBR322 (*tet*<sup>S</sup>) préalablement digéré. Le plasmide résultant a été nommé pBR rbs-LXCXE-TolA III (prLIII).

### 2.6.5.3 pTolA I II-3 EGGS-SH3 et pTolA III-SP-3 EGGS-Ppeps ; pTolA III-SP-3 EGGS-PpepN

Notre troisième paire de partenaires est formée par les plasmides pTolAI-II-3 EGGS-SH3 et pTolAIII-SP-3 EGGS-Ppeps, qui ont été conçus par une technicienne du laboratoire. Les domaines I et II de la protéine TolA ont été insérés dans le site *Nco* I du site de multiclonaage de pBAD24 (Fig. 10). Le joint flexible EGGGS de la protéine g3p du phage fd (Riechmann et Holliger, 1997) a été amplifié et inséré au site *Not* I à la fin du domaine II de TolA. Les sites de restriction *Kpn* I et *Xba* I (Fig. 10) du site de multiclonaage ont servi à l'insertion du fragment SH3 préalablement amplifié. Le plasmide résultant appelé pTolAI-II-3 EGGS-SH3 contient le site de résistance à l'ampicilline.

Figure 10: Carte de restriction de pBAD24.



Le plasmide pBAD24 contient le gène de résistance à l'ampicilline (ampR).

\* sites de restriction utilisés.

Rbs dans ce cas-ci a été amplifié et nommé SP (signal peptide) afin de le différencier du signal peptide utilisé précédemment (rbs) qui contenait 5 peptides de moins. Il a été inséré dans le site de restriction *Nco* I du plasmide pBAD24 (Fig. 10) dont la cassette de résistance à l'ampicilline a été remplacée par une cassette de résistance à la kanamycine. Le domaine III de TolA a été amplifié et inséré dans le site *Hind* III de multiclonaage. Le joint flexible Eggs a été inséré dans le site *Not* I du domaine III de TolA. Les oligos Ppep-5' et Ppep-3' (Tableau II) par leur hybridation ont donné naissance à l'oligo Ppeps. Ce dernier a été inséré dans le site *Kpn* I-*Pst* I du plasmide pTolAIII-SP-3 EGGS donnant lieu à pTolAIII-SP-3 EGGS-Ppeps.

Les oligos PpepN-5' et 3' (Tableau II) ayant été dessinés sur le même format que Ppeps, les plasmides pTolAIII-SP-3 EGGS-PpepN ont été créés en suivant le parcours emprunté par pTolA III-SP-3 EGGS-Ppeps. Les oligos PpepN-5' et PpepN-3' (tableau II) ont été hybridés pour former la séquence PpepN, qui a été insérée dans le site *Kpn* I-*Pst* I (Fig. 10) du plasmide pTolA III-SP-3 EGGS.

Tableau III: Sommaire des constructions

Vecteur initial	Modifications		Sites impliqués	Vecteur final
	Insertions	Délétions		
pBR322	TolA		<i>Cla</i> I- <i>Eco</i> RI	pESH-TolA
pESH-TolA	4 glycines		<i>Ear</i> I et <i>Not</i> I	pESH-TolA2G
pESH-TolA	4 glycines renfermant un site <i>Sma</i> I		<i>Ear</i> I	pESH-TolA 1G
pESH-TolA	(EGGGS) <sub>4</sub>		<i>Ear</i> I	pESH-TolAEGGGS
pESH-TolA 1G		Domaine II de TolA	<i>Sma</i> I- <i>Not</i> I	pESH-TolA I-III
pESH-TolA		Domaine III de TolA	<i>Not</i> I- <i>Ssp</i> I	pESH-TolA I-II
pESH-TolA I-II	Fos		<i>Not</i> I- <i>Ssp</i> I	pESH-TolA I-II-Fos
pbleuscript KS+	rbs		<i>Kpn</i> I- <i>Eag</i> I	PKSrbs
pKSrbs	domaine III de TolA		<i>Eag</i> I- <i>Eco</i> RI	pKSrbs-TolA III
pKSrbs-TolA III	Jun		<i>Eag</i> I	pKSrbs-Jun-TolA III
pESH-TolA I-II-Fos	rbs-Jun-TolA III (fragment <i>Pvu</i> II de pKSrbs-Jun-TolA III)		<i>Sma</i> I	pBRTolA I-II Fos-rbs-Jun-TolA III (pESH-jf)
pESH-TolAEGGGS	Rb		<i>Not</i> I- <i>Ssp</i> I	pESH-TolA I-II-EGGGS-Rb (pTER)
pKSrbs-TolA III	LXCXE		<i>Eag</i> I	pKSrbs-LXCXE-TolA III
pBR322	rbs-LXCXE-TolA III (fragment <i>Eco</i> RV- <i>Nru</i> I de pKSrbs-LXCXE-TolA III)		<i>Eco</i> RV- <i>Nru</i> I	pBRrbs-LXCXE-TolA III
pBAD24	domaines I et II de TolA		<i>Nco</i> I	pTolA I-II
ptolA I-II	(EGGGS) <sub>3</sub>		<i>Not</i> I	pTolA I-II-3 EGGGS
ptolA I-II-3 EGGGS	SH3		<i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I	pTolA I-II-3 EGGGS-SH3
pBAD24	SP (peptide signal)		<i>Nco</i> I	pBAD-SP
pBAD-SP	TolA III		<i>Hind</i> III	pTolA III-SP
pTolA III-SP	(EGGGS) <sub>3</sub>		<i>Not</i> I	pTolA III-SP-3 EGGGS
pTolA III-SP-3 EGGGS	Ppeps		<i>Kpn</i> I- <i>Pst</i> I	pTolA III-SP-3 EGGGS-Ppeps
PTolA III-SP-3 EGGGS	PpepN		<i>Kpn</i> I- <i>Pst</i> I	pTolA III-SP-3 EGGGS-PpepN

## 2.7 Purification du produit de PCR

Les produits de PCR ont été mis sur gel d'agarose, migrés, la bande d'intérêt a été excisée et hachée finement, et mise dans un volume de phénol équivalent. Cette solution agarose-phénol a été vortexée pendant 5 minutes, congelée dans l'azote liquide, et décongelée à la température de la pièce. La phase aqueuse supérieure a été recueillie après une centrifugation de 5 minutes à 4°C, et l'extraction a été répétée avec une solution de phénol : chloroforme (1 :1). Le produit de PCR a été ensuite précipité par l'ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium 3M (pH 5.2) et 2.5 volumes d'éthanol 100% froid, et mis sur glace pendant 10 minutes. L'ADN a été récupéré après une centrifugation de 15 minutes à 4°C et dissout dans l'eau. Une portion a été mise sur gel d'agarose afin de tester l'efficacité de récupération.

## 2.8 Réplique de bactéries

Il existe plusieurs systèmes permettant la sélection de colonies possédant la construction plasmidique voulue, tel que la coloration blanche ou bleue résultant du vecteur pBS SK. Puisqu'un tel système n'était pas possible utilisant nos vecteurs, et puisque la proportion de colonies ayant incorporé la construction cible était probablement très basse, nous avons procédé au répliquage de colonies.

### 2.8.1 Transfert d'ADN

Des membranes circulaires de nitrocellulose (Genescreen) ont été déposées sur des pétris LB-agar sans antibiotique. Ces membranes ont été transférées sur les

pétris à sélectionner et marquées à trois endroits différents de façon asymétrique avec une aiguille et de l'encre (créant trois motifs différents). Les membranes ont trempé dans une solution de NaOH 0.5N pendant 3 à 4 minutes, suivi d'une solution de Tris 1M (pH 7,5) pendant 3 à 4 minutes (bactéries vers le haut), et séchées soit à la température de la pièce pendant la nuit, ou à 80°C dans un four pendant une heure.

## 2.8.2 Hybridation des membranes

La membrane a été préhybridée pendant quatre heures à 42°C dans une solution contenant 50% de formamide, 5X SSC, 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 5X Denhardt, 1.25 SDS, 250 ng/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé par ébullition.

En général, nous avons utilisé un oligo complémentaire à la séquence de notre insert comme sonde. À 1 µl de l'oligo (10µM) choisi on ajoute 50 µCi de  $\gamma$ -ATP, le tampon kinase et 1 µl de T4 Polynucléotide kinase (1U). Le mélange a été incubé pendant 45 minutes à 37°C. Par la suite, la sonde a été filtrée sur colonne Séphadex-G50 de façon à éliminer les nucléotides non-incorporés. La sonde marquée a été ajoutée à la solution contenant la membrane et l'hybridation a eu lieu pendant environ 12 heures à 42°C sous agitation constante. Après, la membrane a été lavée avec une solution de 2X SSC et 1% SDS à la température de la pièce. La quantité de radioactivité liée à la membrane a été vérifiée, et si c'était nécessaire, nous avons augmenté la stringence. Après les lavages, la membrane a été exposée en présence d'un film, qui par une visualisation aux rayons X, a laissé apparaître les colonies marquées. Les colonies identifiées par rapport aux boîtes de pétri d'origine ont été piquées, cultivées, et leur ADN plasmidique extrait.

## 2.9 Séquençage d'ADN

Nous avons fait appel au service de séquençage de l'Université Laval et de Bio S&T, ou dans une minorité des cas, nous avons déterminé la séquence nous-mêmes par la méthode Maxam et Gilbert (Maniatis *et al.*, 1989). Les quatre échantillons contenant les nucléotides différentiellement marqués (soit au  $^{33}\text{P}$  ou au  $^{35}\text{S}$ ) ont été analysés par électrophorèse en gel, qui a permis la séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille. La séquence nucléotidique a été lue directement du gel (i.e. sans transfert sur membrane).

## 2.10 Préparation de la colicine

Une culture bactérienne SAS1136 (provenant du laboratoire du Dr A. Sassarman, (Université de Montréal) a été diluée (1 :50) et incubée à 37°C pendant 2 heures afin d'obtenir une D.O. de 0.3. Afin d'induire la production de la colicine, la mitomycine C a été ajoutée à une concentration finale de 0.5 µg/ml et la culture a été incubée à 37°C avec agitation pendant 16 heures. La culture a été centrifugée pendant 2 minutes et le surnageant contenant la colicine E1 recueilli. Ce dernier a été filtré et gardé à 4°C pendant moins qu'une semaine avant d'être utilisé.

### 2.10.1 Test de sensibilité à la colicine

Les bactéries contenant le ou les plasmide(s) que nous avons voulu tester ont été mises en culture avec les antibiotiques, inducteurs ou répresseurs appropriés. Le lendemain, l'agar mou a été préparé en diluant du LB-agar réchauffé et en phase de gel liquide avec le même volume de LB. L'agar a été

placé à 45°C afin de le garder liquide. 100 µl de la culture à tester a été ajouté à 3 ml d'agar mou contenant les antibiotiques et inducteurs nécessaires. Pour chaque culture à tester, un pétri contenant l'antibiotique approprié a été préparé. Sur ce dernier, l'agar mou contenant la culture y a été versé de façon à recouvrir complètement la surface du pétri. Une dilution en série de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  a été effectuée sur la préparation de colicine (section 2.10). Lorsque l'agar a figé, un dépôt de 5 µl de chaque concentration de la colicine a été placé sur le tapis de bactéries toujours dans la même position. Les pétris ont été incubés à 37°C pour au moins quatre heures ou pour toute la nuit. Une zone claire indique que les bactéries sont sensibles à la colicine. Les résultats ont été notés en tenant compte de la plus grande dilution de colicine qui empêche la croissance de bactérie.

### 2.11 Sensibilité au détergent desoxycholate (DOC)

Le desoxycholate (DOC), est un détergent qui a été utilisé afin de déstabiliser la membrane de *E. coli*. Les bactéries TolA<sup>-</sup> sont plus sensibles au desoxycholate que les bactéries TolA<sup>+</sup>, et ne peuvent pas croître en sa présence. Par contre, les bactéries TolA<sup>+</sup> telles DH5α entres autres, peuvent croître en présence de desoxycholate. Un intervalle entre 0.2% et 0.08% a été utilisé pour délimiter les bactéries TolA<sup>-</sup> et TolA<sup>+</sup>.

Un stock de 5% desoxycholate a été préparé dans du LB-agar bouillant, filtré, et gardé à 45°C pour empêcher la solidification. Des récipients de chaque concentration de DOC (0.08, 0.12%, 0.16%, 0.2%) ont été préparés et les antibiotiques appropriés ajoutés.

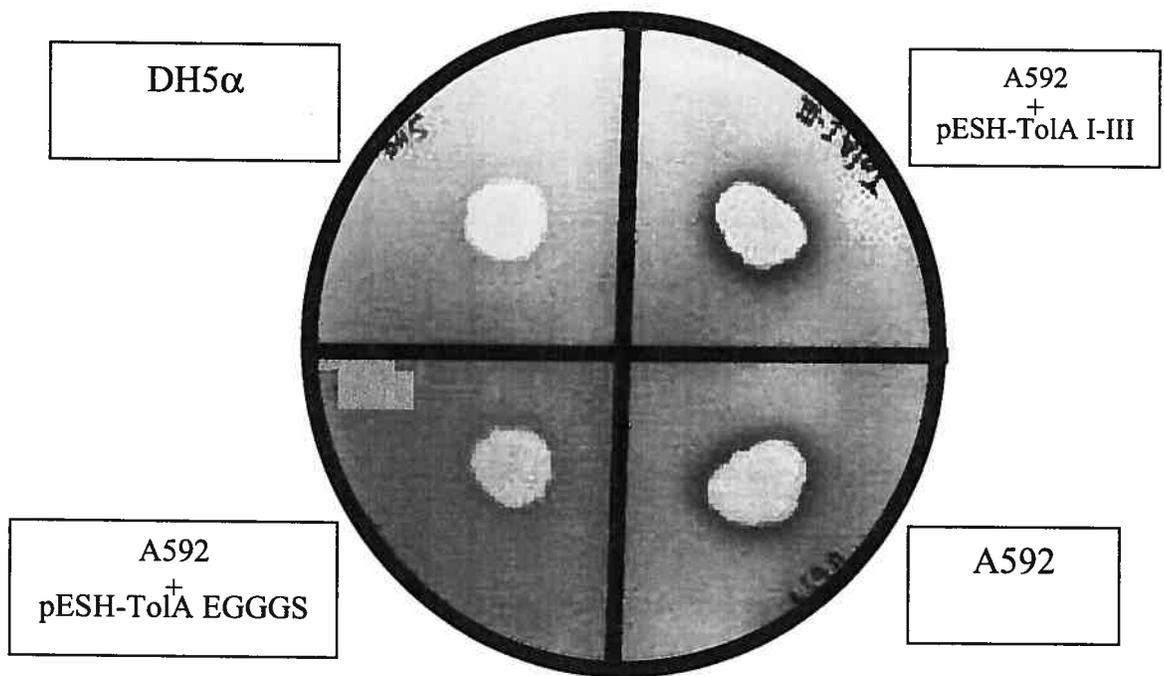
Les bactéries contenant les constructions TolA<sup>-</sup> et TolA<sup>+</sup> à tester et leurs contrôles correspondants, ont été mises en culture, diluées ( $10^5$  bactéries/ml), et étalées sur chaque pétri de différentes concentrations de DOC ( $10^7$

bactéries/pétri). Comme témoin, nous avons étalé  $10^3$  bactéries sur un milieu sans desoxycholate, afin de déterminer si le nombre de colonies obtenu sur le pétri reflète bien la quantité étalée. Ensuite, nous avons incubé les pétris à  $37^\circ\text{C}$  pendant la nuit. Le lendemain, nous avons compté les colonies.

## 2.12 Relâche de RNase dans le milieu extracellulaire

Afin de vérifier si l'intégrité de la membrane est rétablie par la présence et l'interaction de type protéine-protéine des partenaires dans la bactérie, nous avons vérifié si la RNase a été relâchée dans le milieu extracellulaire. Les bactéries contenant les plasmides à tester ont été striées de préférence sous forme circulaire pour mieux visualiser la relâche de la RNase. Les pétris ont été incubés pendant la nuit à  $37^\circ\text{C}$ . L'ARN de levure (45 mg) a été dissout dans 3 ml d'agar mou bouillant, et ce mélange a été versé sur le pétri contenant les stries. On s'est assuré que les stries ont été bien recouvertes par l'agar mou. Suite à une incubation d'au moins une heure, 5 ml d'une solution froide d'acide trichloroacétique 10% a été versé sur chaque pétri afin de précipiter l'ARN. L'hydrolyse de l'ARN laisse apparaître une zone claire autour des colonies, signifiant que la RNase a été relâchée dans le milieu extracellulaire de la bactérie (Fig. 11).

Figure 11: Relâche de la RNase I dans le milieu extracellulaire



Précipitation par l'acide trichloroacétique (TCA) de l'ARN dans l'agar :  
la zone claire apparaissant autour des colonies indique une hydrolyse de  
l'ARN.

### 2.13 Bactéries mutantes TolA<sup>-</sup>, DH5m #2 et 13

Afin d'augmenter l'efficacité du rendement du système nous avons créé des pools de colonies en mélangeant quelques dizaines de colonies indépendantes à 1 ml de LB. Ces pools ont été incubés à 37°C pendant la nuit sous agitation constante. Le lendemain, 100 µl de chaque culture a été mis dans 500 µl de LB. Après une période d'incubation de quatre heures à 37°C, la culture a été mise dans 1 ml d'agar mou contenant une très forte concentration de colicine. Les colonies qui ont poussé dans l'agar mou ont été piquées et transformées avec le plasmide pESH-TolA (section 2.6.1; Tableau III) ou le plasmide pKSrbs-TolAIII (section 2.6.5.1; Tableau III). Quelques unes de ces colonies transformées ont été striées, et 2 µl de la colicine (section 2.10.2) y a été déposée. La résistance ou la sensibilité à la colicine a été notée.

### 3. RÉSULTATS

### 3.1 La protéine TolA rétablit les propriétés de la bactérie DH5 $\alpha$ dans la bactérie mutante A592 TolA $\bar{}$ .

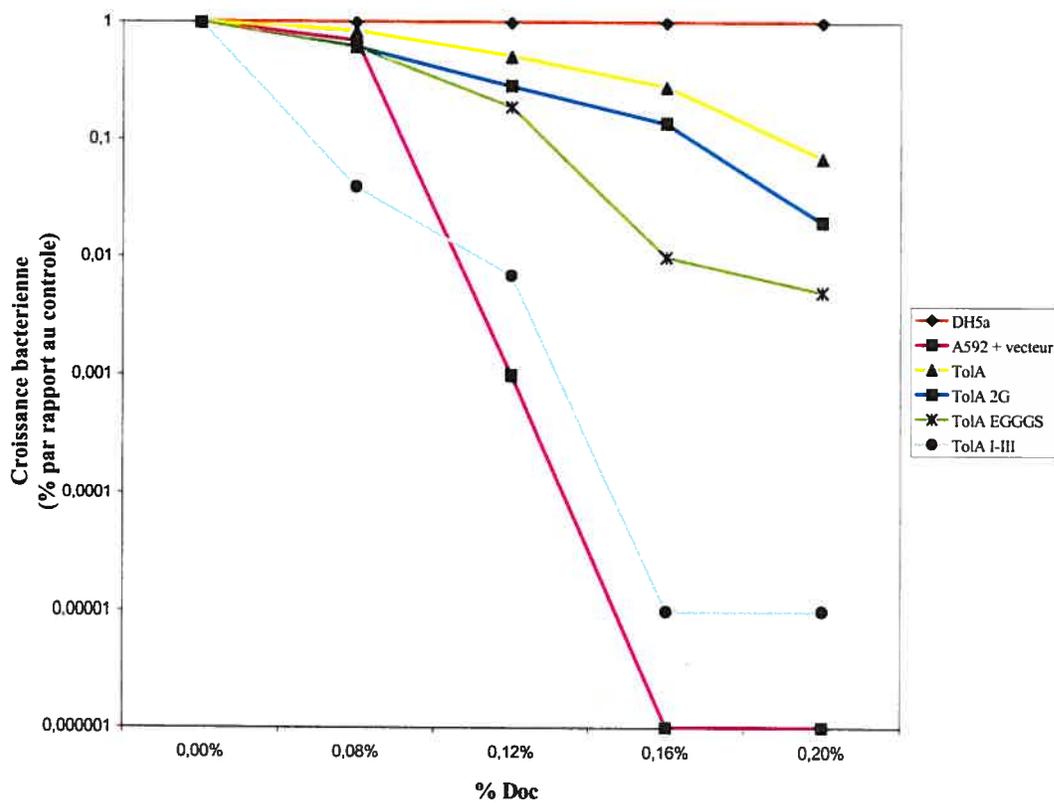
La protéine TolA, tel que décrite dans la section 1.7, est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la membrane d'*E. coli*. Des expériences antérieures ont démontré que des mutations rendant cette protéine non-fonctionnelle contribuaient à la déstabilisation de la membrane (Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Webster, 1991). Cette déstabilisation se traduit par une perméabilité accrue à des composants nocifs pour la bactérie. Pour nos travaux, nous avons décidé d'utiliser la souche A592 de la bactérie *E. coli* dans laquelle la protéine TolA est mutante et non-fonctionnelle (Nagel de Zwaig et Luria, 1967; Levengood et Webster, 1989). Plus spécifiquement, une délétion de 4 pb dans le domaine III de la protéine TolA perturbe le cadre de lecture générant ainsi une protéine plus longue. La bactérie mutée devient alors sensible aux détergents (tel que le desoxycholate) et relâche des protéines périplasmiques (telle que la RNase) dans le milieu extracellulaire. Nous avons postulé qu'un rétablissement des fonctions de TolA pourrait s'effectuer suite à la transformation avec un vecteur encodant TolA de type sauvage (pESH-TolA, Fig. 8). Si tel est le cas, nous pourrions utiliser ces bactéries pour notre système double hybride. Des tests ont donc été effectués afin de voir si la présence et l'expression du plasmide pESH-TolA dans la bactérie mutante A592 récupèrent les phénotypes perdus. En effet, après une précipitation de l'ARN dans l'agar avec la TCA, aucune zone claire (indiquant une relâche de RNase, Fig. 11) n'est apparue autour de la colonie pESH-TolA (Tableau IV). Ceci reflète l'intégrité rétablie de la membrane.

Tableau IV : Liste des souches hôtes de DH5 $\alpha$  et A592 des différentes constructions de TolA et de leur phénotype de relâche de protéines périplasmiques (RNases) dans le milieu extracellulaire.

<b>Souche hôte</b>	<b>Construction</b>	<b>Relâche de RNase I</b>
DH5 $\alpha$	Aucune	-
A592	Aucune	+
A592	pESH-TolA	-
A592	pESH-TolA2G	-
A592	pESH-TolA EGGGS	-
A592	pESH-TolA I-III	+
A592	pESH-TolA III	+
A592	pESH-TolA I	+
A592	pESH-Jun-Fos	+
A592	pTolA I-II-EGGGS-Rb /prbs-LXCXE-TolAIII	+
A592	pTolA I-II-Eggs-SH3/pTolA III-Eggs-Ppeps	-

+ : présence d'une zone claire autour de la colonie suite à un traitement à la TCA; - : absence de zone claire autour de la colonie.

Figure 12: Courbe de croissance de la souche bactérienne mutante A592 TolA<sup>-</sup> transformées avec les différentes constructions de TolA en présence de diverses concentrations de desoxycholate.



Tel que démontré par cette courbe de croissance (Fig. 12), à une concentration de 0,2% de DOC, les bactéries mutantes A592 TolA<sup>-</sup> contenant le vecteur seul (A592 + vecteur pBR322) demeurent sensibles tandis que celles qui contiennent le vecteur TolA de type sauvage (TolA) sont résistantes et ont donc récupéré leur habileté à survivre sur un milieu ayant une concentration de 0,2% desoxycholate. Ces bactéries ont donc été utilisées pour élaborer notre système double hybride.

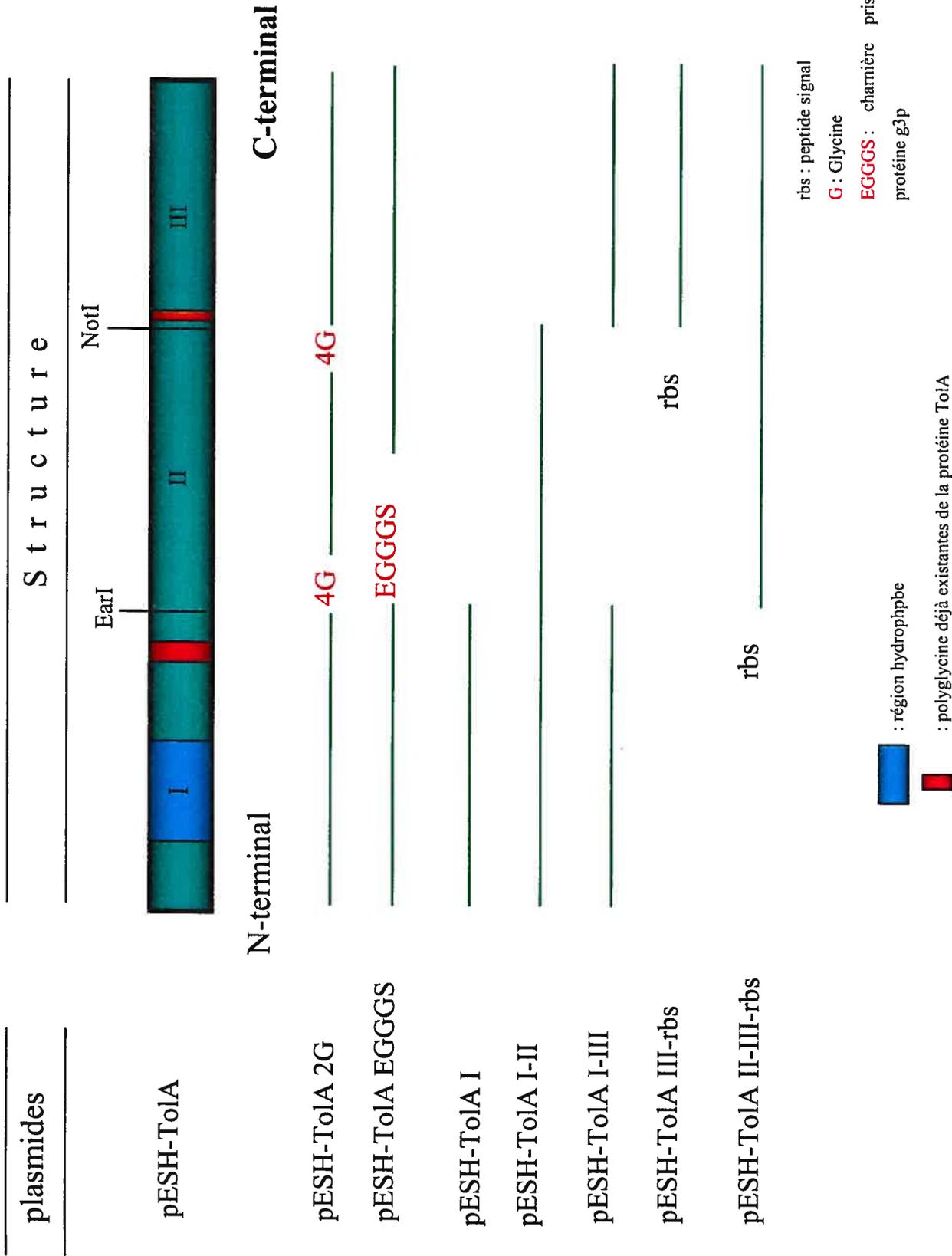
### 3.2 Modifications de la protéine TolA

Dans la séquence de TolA, il existe deux sites de restriction uniques situés à des endroits stratégiques: *Ear* I se situe entre les domaines I et II, *Not* I est situé entre les domaines II et III (Fig. 13). Ces sites encadrent la tige rigide formée par le domaine II, et ont été utilisés lors de la manipulation expérimentale de la protéine.

Nous avons pensé que l'intégration de charnières dans la protéine augmenterait la probabilité d'interaction physique entre les partenaires. À cette fin, nous avons utilisé les sites de restriction mentionnés ci-haut. Les charnières sont des peptides formés de glycines de longueurs variables, c'est-à-dire des polyglycines (Levengood *et al.*, 1991). Deux séries de quatre glycines (GGGG) ont été insérées aux sites *Ear* I et *Not* I créant le vecteur pESH-TolA 2G.

Voulant augmenter davantage la flexibilité de la protéine, une séquence riche en glycine trouvée dans la protéine g3p du phage filamenteux fd (Riechmann et Holliger 1997) a aussi été insérée à proximité du site de restriction *Ear* I. Cette séquence de glycines consiste en une répétition en tandem de 4 EGGGS. Le plasmide résultant a été nommé pESH-TolA EGGGS (Fig. 13).

Figure 13: Représentation schématique de la protéine ToIA et des différentes modifications qui lui sont apportées.



rbs : peptide signal  
**G** : Glycine  
**EGGGS** : charnière prise de la protéine g3p

 : région hydrophobe  
 : polyglycine déjà existantes de la protéine ToIA

Une série de délétions a été exécutée (toujours en utilisant les sites *Not* I et *Ear* I) afin de vérifier l'importance de chacun des domaines de la protéine. Le vecteur pESH-TolA I est le résultat de la délétion des domaines II et III; pESH-TolA I-III est le résultat de la délétion du domaine II; et pESH-TolA I-II est le résultat de la délétion du domaine III. En absence du domaine I (renfermant la région transmembranaire), un peptide signal (rbs) a été rattaché afin de cibler la protéine tronquée dans l'espace périplasmique (Fig. 13, pESH-TolA II-III-rbs et pESH-TolA III-rbs).

### 3.3 Mise en place du système de double hybride bactérien

Pour mettre en place notre système de double hybride, nous avons déterminé quels domaines de la protéine TolA pourraient être utilisés.

#### 3.3.1 Étude de l'intégrité de la membrane de la bactérie mutante A592 en présence des protéines TolA modifiées.

Les diverses constructions décrites plus haut ont été clonées dans la bactérie mutante A592 TolA<sup>-</sup>. Afin de vérifier si ces protéines modifiées rétablissent les propriétés perdues à cause de cette mutation, des tests de sensibilité au détergent désoxycholate et des tests de relâche périplasmique dans le milieu extracellulaire ont été effectués. Ces tests ont montré que la présence des charnières supplémentaires dans la protéine TolA n'a pas nuit pas à la croissance des bactéries mutantes sur un milieu contenant du désoxycholate (voir les courbes de croissance de A592 + pESH-TolA 2G et A592 + pESH-TolA EGGGS à la figure 12). De plus, ces mêmes constructions ont prévenu la relâche de la RNase dans le milieu extracellulaire (Tableau IV).

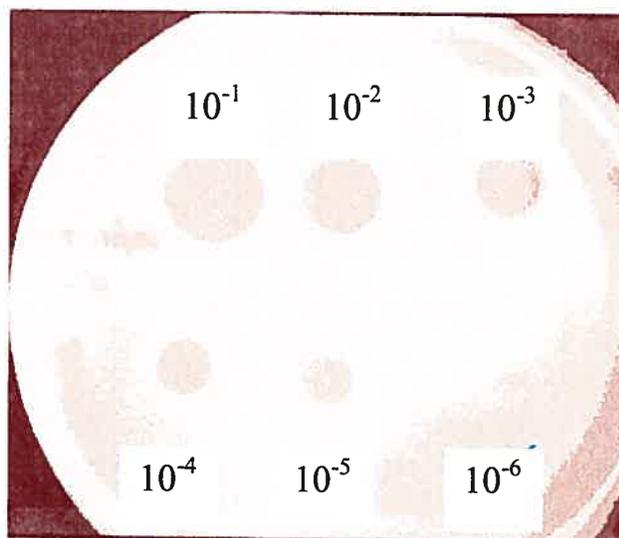
Les bactéries transformées avec les plasmides pESH-TolAI, pESH-TolAIII, pESH-TolAI-III, ont laissé une zone claire autour de la colonie correspondante (Tableau IV, Fig. 11). Les bactéries contenant le plasmide pESH-TolAI-III sont restées sensibles au détergent désoxycholate: le pourcentage de colonies a diminué significativement, de  $10^4$  fois, sur le milieu contenant 0,2% de DOC (Fig. 12). Puisque ces mutants ne contribuent pas par eux-mêmes à rétablir la fonction TolA, ils pourraient potentiellement être utilisés dans le système de double hybride.

### 3.3.2 L'absence du domaine II de TolA n'inhibe pas l'entrée aux colicines.

Les colicines utilisent entre autre, la protéine TolA comme voie d'entrée dans la bactérie (Bénédeti *et al.*, 1991; section 1.5). Par conséquent, si la protéine est non-fonctionnelle, l'accès à l'intérieur de la bactérie est bloqué. Des tests de toxicité ont été performés avec des dilutions variables de colicine E1 ( $10^{-6}$  à  $10^{-1}$ ; Fig. 13).

La présence de TolA ainsi que les constructions contenant les charnières (pESH-TolA2G, pESH-EGGGS) dans la bactérie mutante A592 ont conféré une sensibilité à la colicine jusqu'à la dilution de  $10^{-4}$ . Cependant, les constructions pESH-TolAI et-TolAI-II, n'ont pas sensibilisé les bactéries hôtes à la colicine : aucune plage d'inhibition de croissance n'a été observée (Tableau V). Ces constructions ne peuvent donc pas par elles-mêmes rétablir les fonctions des bactéries mutantes.

Figure 13 : Visualisation des zones d'inhibition de croissance sur un tapis de bactérie *E. coli* de type sauvage après un traitement à la colicine E1.



Dilutions de la colicine E1 de  $10^{-6}$  à  $10^{-1}$  déposées sur un tapis de bactéries DH5 $\alpha$ .

Tableau V : La toxicité de la colicine vis-à-vis des bactéries mutantes A592 contenant les différentes constructions de TolA.

Construction	Dilution seuil de col E1
pESH-TolA III-rbs	$10^{-2}$
pESH-TolA pESH-TolA 2G pESH-TolA EGGGS pESH-TolA I-III	$10^{-4}$
pESH-TolA I pESH-TolA I-II pTolA I-II-Eggs-SH3	n/a

Bactérie	phénotypes <sup>a</sup>	
	TolA	Col E1
DH5 $\alpha$	+	S
A592	-	R

a)Tableau des phénotypes : Rappel des phénotypes des bactéries A592 et DH5 $\alpha$ .

S : sensibles; R : résistantes; n/a : non-applicable

Par ailleurs, les bactéries mutantes contenant les domaines I et III de TolA (pESH-TolAI-III) étaient aussi sensibles que celles où la protéine TolA conserve ses trois domaines, une cytotoxicité jusqu'à  $10^{-4}$ . L'absence du domaine II de la protéine n'a pas perturbé l'entrée de la colicine dans la bactérie. Ceci concorde avec une étude antérieure qui a démontré que le domaine II de TolA n'est pas requis pour l'importation de la colicine E1 (Schlendel *et al.*, 1997).

### 3.3.3 Le domaine III de TolA confère peu de sensibilité à la colicine.

Plusieurs études ont montré que le domaine III de la protéine TolA joue un rôle important dans la fonction de la protéine (Benedetti *et al.*, 1991; Riechmann et Holliger, 1997; Levensgood-Freyermuth *et al.*, 1993). Nous avons construit un vecteur ne comportant que ce domaine. Afin de diriger la protéine résultante dans l'espace périplasmique où elle est requise, nous avons fusionné le peptide signal du Ribose Binding Protein au domaine III (Fig. 13). Nous avons nommé cette nouvelle construction pESH-TolA III-rbs.

Au Tableau V nous voyons que pESH-TolAIII-rbs affiche une cytotoxicité jusqu'à la dilution de  $10^{-2}$ . La présence du domaine III de TolA rend la bactérie mutante sensible à la colicine, mais cette sensibilité est de l'ordre de 100 fois moins grande. Une sensibilité conférée par la présence du domaine III avait déjà été observée dans une bactérie de type sauvage (Levensgood-Freyermuth *et al.*, 1993).

Puisque le test à la colicine nous servait de marqueur visuel de la fonctionnalité des partenaires du système de détection à double hybride, il a fallu s'assurer qu'aucun facteur autre que l'interaction des partenaires rendait la bactérie

sensible. À cette fin nous avons créé des bactéries éliminant la sensibilité résiduelle conférée par le domaine III (voir section 3.6).

### 3.4 Partenaires de fusion

Pour évaluer la faisabilité d'un système double hybride basé sur le système TolA, nous avons choisi trois combinaisons de partenaires : (1) le *leucine zipper* Jun-Fos, (2) le « pocket domain » du supresseur de tumeur Rb et son partenaire le peptide LXCXE dérivé de la protéine adénovirale E1A et (3) le domaine SH3 de la protéine de signalisation Src et une séquence riche en proline, Ppeps. Pour toutes les constructions effectuées, le cadre de lecture a été vérifié.

#### 3.4.1 Le *leucine zipper* Jun-Fos

Jun-Fos fut l'un de nos premiers choix pour le contrôle de la mise en place du système de détection bactérien des interactions protéine-protéine. Nous avons inséré Fos en aval des domaines I et II de TolA, et Jun entre le peptide signal rbs et le domaine III (TolAIII). Ces deux constructions ont été insérées dans un même vecteur (pBR322) pour faire un seul messager bicistronique désigné pESHjf. La bactérie mutante A592 transformée avec pESHjf n'a pas rétabli les fonctions conférées par TolA puisque la bactérie est demeurée sensible au désoxycholate et a relâché la RNase dans le milieu extracellulaire. Nous avons vérifié l'expression de l'ARNm de TolA par une analyse de type Northern, effectuée par une technicienne du laboratoire (Rafaëla Viccaretti, M.Sc.), en utilisant le fragment *Cla I-Eco RI* (fragment TolA, section 2.6.1) de pESH-TolA. Le résultat obtenu indiquait que les ARNm de TolA I-II étaient exprimés tandis que ceux de TolA III ne l'étaient pas. Ce résultat signifiait que des

facteurs qui nous échappent ont empêché l'expression de la deuxième séquence. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'un système d'expression différent basé la cotransformation de deux plasmides dans la bactérie. Les 2 combinaisons de partenaires suivants (Rb-LXCXE et SH3-Ppeps) ont été construites suivant ce principe.

### 3.4.2 Rb et LXCXE

Notre deuxième choix s'est porté sur la combinaison Rb et son partenaire E1A. Sachant que le lieu d'interaction, c'est-à-dire le périplasma, est restreint, et que la taille relativement grande des ces protéines pourrait donc s'avérer être un obstacle, nous nous sommes limités à leur domaine d'interaction. La séquence amplifiée par PCR du gène Rb délimite ce que l'on appelle le «Rb pocket». En ce qui concerne la protéine E1A, la séquence nécessaire à l'interaction avec la protéine Rb ne consiste qu'en un peptide LXCXE (Barbeau *et al.*, 1994).

La protéine Rb a été rattachée aux domaines I et II de la protéine TolA contenant la charnière EGGGS (TolAI-II-EGGGS), toujours en supposant que la présence des charnières permettrait une meilleure présentation de Rb à LXCXE. La construction TolAI-II-EGGGS-Rb a été mise dans le vecteur pBR322, et appelée pBR TolA EGGGS Rb (pTER). Ce plasmide contient deux gènes de résistance à deux antibiotiques différents: l'ampicilline et la tétracycline. Voulant utiliser le même plasmide, soit pBR322, pour la construction de chacun des partenaires, nous avons opté d'éliminer un des deux gènes de résistance présents dans le plasmide. Le gène de résistance à l'ampicilline a été enlevé en digérant le plasmide à deux sites de restriction uniques: *Pvu* I et *Eco* RI. Après une réaction de remplissage le plasmide a été ligué et ensuite testé afin de vérifier que la résistance à l'ampicilline avait été perdue. Sur un pétri contenant de l'ampicilline d'une part, ou un pétri contenant de la tétracycline de l'autre part, un clone contenant le plasmide en question a

été étalé. Comme attendu, aucun clone n'a poussé sur le pétri contenant de l'ampicilline, tandis que la croissance fut normale sur le pétri contenant la tétracycline.

La séquence codante du peptide LXCXE a été conçue en utilisant les oligos BRA 461 et BRA 462 (Tableau II). Après une réaction d'appariement laissant des extrémités cohésives, l'oligo ainsi formé a été inséré entre les séquences de rbs et du domaine III de TolA. La construction « rbs-LXCXE-III » a été ensuite insérée dans le vecteur pBR322 dont le gène de résistance à la tétracycline avait été préalablement inactivé, tel que décrit ci-haut pour le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide obtenu pBRrbs-LXCXE-III ne confère maintenant que la résistance à l'ampicilline.

Les bactéries A592 ont été cotransformés avec les partenaires Rb et LXCXE, (pBRTolAI-II-EGGGS-Rb, pBRrbs-LXCXE-TolAIII) et étalés sur des pétris contenant les deux antibiotiques : ampicilline et tetracycline. Les clones qui ont poussé sur de tels pétris sont ceux ayant incorporés les deux plasmides. Par la suite ces bactéries ont été testées afin de vérifier si les propriétés de TolA pourraient être reconstituées. Au tableau IV nous pouvons voir que les bactéries mutantes qui portent ces plasmides relâchent les RNases dans le milieu extracellulaire. Le test de colicine effectué avec les partenaires Rb et LXCXE, n'a montré aucune sensibilité à la colicine. La bactérie est demeurée résistante à la colicine E1 (Tableau VI). La cotransformation des 2 vecteurs pBRTolAI-II-EGGGS-Rb et pBRrbs-LXCXE-TolAIII dans les bactéries A592 n'a donc pu reconstituer une protéine TolA fonctionnelle.

Tableau VI : La toxicité de la colicine E1 vis-à-vis des bactéries mutantes A592 contenant les partenaires de fusion.

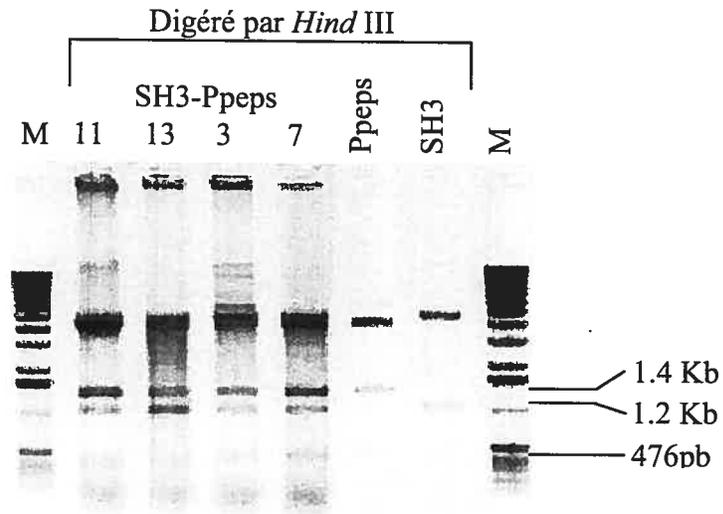
Constructions	Dilution Col E1
TolA I II / TolA III	$10^{-2}$
TolA I-II-Eggs-SH3 / TolA III-Eggs-Ppeps	$10^{-3}$
TolA I-II-Jun-TolA III-Fos	Aucun
TolA I-II-EGGGS-Rb /TolA III-LXCXE	Aucun

### 3.4.3 SH3-Ppeps

Une troisième combinaison de partenaires constituée du domaine SH3 de la tyrosine kinase Src et d'une séquence consensus d'interaction Ppeps a été testée. Ces constructions ont été réalisées dans le système plasmidique pBAD (section 2.6.5.3) par un technicien dans le laboratoire (Pierre Bérubé, M.Sc.). Pour éviter la confusion, le peptide signal inséré dans ces constructions contenait cinq acides aminés de plus. Il a été appelé SP, pour pouvoir le différencier du signal peptide précédant, rbs.

Les constructions (TolA I-II-3 EGGS-SH3 et TolA III-SP-3 EGGS-Ppeps) ont été mises dans deux plasmides séparés. TolA I-II-3 EGGS-SH3 a été placé dans le vecteur pBAD24 contenant une cassette de résistance à l'ampicilline. Cette dernière a été remplacée par une cassette de résistance à la kanamycine dans le vecteur pBAD24 qui a reçu TolA III-SP-3 EGGS-Ppeps. Toujours en étant fusionnées aux différents domaines de la protéine TolA, SH3 et Ppeps (TolA I-II-3 EGGS-SH3 et TolA III-SP-3 EGGS-Ppeps) ont été testés pour la sensibilité à la colicine E1. Avant cette étape, nous avons vérifié si les deux plasmides en question étaient présents dans la bactérie par une extraction plasmidique suivie d'une digestion par l'enzyme de restriction *Hind* III (Fig. 14). Le plasmide pTolA III-SP-3 EGGS-Ppeps, lorsque digéré par *Hind* III génère une bande à 1.4 Kb, tandis que le plasmide pTolA I-II-3 EGGS-SH3 génère une bande à 1.1 Kb et une à 476pb. Les extractions plasmidiques des bactéries ayant incorporé les deux constructions (SH3-Ppeps) nous montrent qu'après une digestion des plasmides par *Hind* III, les bandes à 1.4, 1.2 Kb et 476 pb sont simultanément présentes, ceci confirme donc la présence des deux plasmides dans la bactérie. Le duo SH3-Ppeps permet une sensibilité à la colicine jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$  (Tableau II). Comparativement aux deux premières combinaisons (jun-fos et Rb-LXCXE), les partenaires SH3-Ppeps ont été les seuls qui ont réussi à permettre un regain d'activité de la protéine TolA.

Figure 14: Vérification de la présence des 2 plasmides (portant respectivement les constructions SH3 et Ppeps) dans les colonies obtenues après la cotransformation.



M : marqueur de poids moléculaire

SH3-Ppeps : minipréparation de plasmide provenant des bactéries cotransformées avec les constructions portant les séquences de SH3 et de Ppeps.

### 3.5 Récapitulation

La séquence codante de la protéine TolA insérée dans un vecteur (pESH-TolA) a réussi à rétablir les fonctions perdues d'une souche de bactérie dans laquelle la protéine TolA est mutée et non fonctionnelle, A592 TolA<sup>-</sup>. Cette dernière a servi à la mise en place de notre système de double hybride bactérien.

Des charnières ont été insérées dans la protéine en vue de promouvoir une plus grande flexibilité. Ceci pourrait être profitable lors de la mise en place des partenaires, en entraînant une meilleure présentation physique. D'autres modifications ont été portées à la protéine TolA afin de vérifier les domaines importants à l'activité de la protéine. Suite aux délétions effectuées, les domaines I et II seuls de la protéine n'ont pas pu rétablir les fonctions de celle-ci. Cependant, la présence du domaine III seul affiche un peu de sensibilité à la colicine, ce qui suggère un rétablissement partiel des fonctions de la protéine TolA. Malgré ce fait, nous avons quand même procédé à l'ajout des différents partenaires, en espérant que la sensibilité résiduelle serait fortement augmentée avec l'ajout des partenaires.

La présence des partenaires Jun-Fos (pESH-jf) et Rb-LXCXE (pBRTolA I-II EGGGs-Rb/pBRrbs-LXCXE-TolA III) ne suffisent pas à rétablir les fonctions perdues de la bactérie mutante. Par contre, les partenaires SH3-Ppeps réussissent à rétablir ces fonctions, même si le niveau n'égale pas celui de la protéine intégrale. SH3 et Ppeps représentent donc, la combinaison de choix pour la mise en place de notre système de double hybride bactérien.

### 3.6 Recherche d'un meilleur hôte pour le système de détection bactérien.

Il est bien établi que le domaine III de la protéine TolA est responsable de l'entrée de la colicine dans la bactérie (Lazdunski *et al.*, 1998; Derouiche *et al.* 1995; Benedetti *et al.*, 1991. Puisque l'expression de TolAIII seule dans les cellules A592 a permis l'entrée de la colicine, nous avons émis l'hypothèse que la protéine endogène de notre bactérie mutante A592 contribuait à la présence de sensibilité observée avec la transformation de pESH-TolAIII (Tableau V). Afin d'éliminer le niveau de base de sensibilité, nous avons généré des bactéries complètement sensibles à la colicine même en présence du domaine III de TolA. Pour ce faire, les bactéries de type sauvage DH5 $\alpha$  ont été mises en présence d'une forte concentration de colicine E1, de façon à générer des mutations spontanées. Parmi les bactéries ayant poussé en présence de la colicine, certaines ont été retenues sur la base qu'elles étaient redevenues sensibles à la colicine lorsque transformées avec TolA (Tableau VII). Ces bactéries ont été par la suite transformées avec le plasmide contenant TolA III. Les clones de DH5 $\alpha$ , nommés DH5m#2, 8, 13, 16, 22 et 27, ont gardé leur résistance à la colicine ( $>10^0$ ) même en présence de TolA III.

Voulant vérifier si la mutation ayant rendu les bactéries de type sauvage résistantes aux colicines était portée par le gène TolA, nous avons amplifié et par la suite analysé le gène endogène de TolA des bactéries mutées. Un des oligos utilisés, soit TolQ-C (Tableau II) est complémentaire à une séquence localisée à la fin du gène TolQ, tandis que l'autre oligo BRA 418 (Tableau II), est complémentaire à une séquence située à la fin du gène TolA. La longueur attendue sur une bactérie de type sauvage est de 1.8 Kb. Des produits PCR de trois différentes tailles (1.8, 2.5 et 3.1 Kb; Fig. 15) ont été produits. Les bactéries DH5m #12, 21 et 26 devenues sensibles à la colicine en présence de TolAIII (Tableau VII) ont donné des produits de PCR d'une longueur de 1.8 Kb.

Tableau VII : Bactéries mutantes éliminant la sensibilité résiduelle à la colicine E1 causée par TolA III.

Mutant DH5a pESH-TolA III	Dilution seuil de toxicité de colicine E1
2	10 <sup>0</sup>
8	
13	
16	
22	
27	
12	>100
21	
26	

Figure 15: La taille du gène TolA endogène des bactéries mutantes.



DH5m #x : DH5 $\alpha$  mutant #x

M : marqueur de poids moléculaire

Ceux des bactéries DH5m #2, 5 et 8 atteignent 3.1Kb et les bactéries DH5m #13, 16, 22 et 27 ont généré des produits de 2.5Kb. La mutation par insertion dans le gène TolA (produits de 2.5 et 3.1 Kb, la longueur attendue étant de 1.8 Kb) a éliminé la sensibilité résiduelle causée par la présence du domaine III de TolA. Une recherche sur BLAST nous a révélé que notre insertion correspondait à un transposon, le TN10. Les produits de 3.1 Kb ont incorporé la forme complète, tandis que les produits de 2.5 Kb, une forme tronquée de ce transposon. Ayant à présent des bactéries ne présentant pas de sensibilité résiduelle en présence de TolA III (Tableau VII), nous avons refait des tests d'interactions avec les partenaires en nous servant des nouvelles bactéries mutantes insensibles à la colicine E1 en présence de TolA III.

Afin de comparer nos bactéries mutantes nouvellement créées (DH5m#) et la bactérie mutante déjà établie (A592), nous avons procédé à des tests de sensibilité à la colicine. La sensibilité à la colicine a augmenté d'un facteur de 10 pour les partenaires SH3-Ppeps, lorsque la bactérie hôte est un des mutants créés (Tableau VIII). Une sensibilité jusqu'à  $10^{-2}$  a été pourvue par la bactérie A592 et jusqu'à  $10^{-3}$  pour la bactérie DH5m #2. Cette dernière a été retenue pour la suite des expériences.

### 3.7. Mutation du peptide Ppeps

La séquence du peptide que nous avons nommé Ppeps est une séquence consensus liant les protéines contenant un domaine SH3. Cette interaction est-elle réellement spécifique? La sensibilité observée lors de la présence de SH3 et de Ppeps est-elle réellement due à une interaction entre ces partenaires? Pour vérifier cela nous avons généré des mutations au niveau des prolines de la séquence consensus Ppeps (RPLPPLP) en utilisant un oligo dégénéré. Vingt-

Figure 16 : Quelques peptides obtenus par la mutagenèse de la séquence consensus RPLPPLP

	5' PpnpN-5'	3'
	CT TCT ACT CCT AGA NCG TTA NCA NCG CTT NCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R P L P P L P
1	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA TCA GCG CTT CCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L S A L P
2	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA GCA GCG CTT ACG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L A A L P
3	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA CCA CCG CTT CCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L P P L P
4	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA CCA GCG CTT ACG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L P A L P
5	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA ACA TCG CTT GCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L T S L A
6	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA ACA TCG CTT GCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L T S L A
7	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA CCA CCG CTT CCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L P P L P
8	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA ACA CCG CTT CCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L T P L P
9	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA CCA TCG CTT CCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L P S L P
10	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA GCA ACG CTT TCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L A A L S
11	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA ACA TCG CTT TCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L T S L S
12	CT TCT ACT CCT AGA ACG TTA GCA ACG CTT ACG ACT ACA CGT CCT TGCA	R T L A A L A
13	CT TCT ACT CCT AGA CCG TTA CCA CCG CTT TCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R P L P P L S
14	CT TCT ACT CCT AGA ACG TTA TCA CCG CTT TCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R T L S P L S
15	CT TCT ACT CCT AGA TCG TT-G CAA CCG TTT CGA CTA CAC GTC CTT GCA	R S L Q R F R L H V L A
16	CT TCT ACT CCT AGA CCG TTA CCA GCG CTT NCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R P L P A L P
17	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA ACA ACG CTT GCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R S L T T L A
18	CT TCT ACT CCT AGA CCG TTA ACA CCG CTT CCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R P L T P L P
19	CT TCT ACT CCT AGA CCG TTA GCA GCG CTT ACG ACT ACA CGT CCT TGCA	R P L A A L T
20	CT TCT ACT CCT AGA TCG TTA -CAT CGC TTT CGA CTA CAC GTC CTT GCA	R S L H R F R L H V L A
21	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA GCA ACG CTT ACG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L A T L T
22	CT TCT ACT CCT AGA CCG TTA TCA GCG CTT GCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R P L S A L A
23	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA TCA CCG CTT TCG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L S P L S
24	CT TCT ACT CCT AGA GCG TTA CCA TCG CTT ACG ACT ACA CGT CCT TGCA	R A L P S L T

Tableau VIII : La toxicité de la colicine vis-à-vis de bactéries mutantes contenant les différents partenaires SH3-PpepN.

Constructions	Bactérie hôte		PpepN <sup>b</sup>
	A592	DH5m#2	
	Dilution seuil de toxicité de ColE1 <sup>a</sup>		
SH3-Ppeps	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	RPLPPLP
SH3-PpepN #1	10 <sup>-1</sup>	nd	RALSALP
2	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>0</sup>	RSLAALT
3	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	RALPPLP
4	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RALPALT
5	Aucune	Aucune	RSLTSLA
6	Aucune	Aucune	RSLTSLA
7	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	RALPPLP
8	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	RSLTPLP
9	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	RALPSLP
10	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RSLAALS
11	10 <sup>-2</sup>	nd	RSLTSLS
12	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RTLAALA
13	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	RPLPPLS
14	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RTLSPLS
15	Aucune	Aucune	RSLQRF <sup>c</sup>
16	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	RPLPALP
17	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RSLTTLA
18	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	RPLTPLP
19	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RPLAALT
20	Aucune	Aucune	RSLHRF <sup>c</sup>
21	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RALATLT
22	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RPLSALA
23	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RALSPLS
24	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	RALPSLT

nd : non disponible

a) Dilution de ColE1 : la plus grande dilution de la colicine E1 où apparaît une zone d'inhibition de croissance.

b) PpepN : séquence peptidique des PpepN correspondant.

c) RSLXXXX : X peptide résultant du changement de cadre de lecture

quatre clones ont été retenus et séquencés (Fig. 16). Une variété de possibilité nous est offerte. Deux séries de clones sont identiques : les clones #5 et 6 et les clones #3 et 7; par conséquent, nous avons 22 mutations différentes sur 24. Les séquences peptidiques SH3-PpepN #5 et 6 n'ont aucune proline et les séquences 15 et 20 ont eu un changement dans leur cadre de lecture suite à la délétion d'un nucléotide de la séquence nucléotidique originale (figure 16). Les clones incorporant ces constructions (SH3-PpepN #5, 6, 15 et 20) ont été résistants à la colicine, quel que soit la bactérie hôte (A592 ou DH5m #2). Ces clones n'ont donc pas permis la reconstitution de TolA.

En général, dans environ 87 % des cas, la sensibilité à la colicine des bactéries mutantes DH5m #2 transformées avec les différentes séquences Ppeps mutées a été plus élevée ou égale à celle détectée dans la bactérie A592 (Tableau VIII). Les peptides PpepN #3, 7, 13, 16 et 18 (Fig. 15, Tableau VII) ont conservé trois des quatre prolines (P). Ces clones, à l'exception du numéro 16 (SH3-PpepN #3, 7, 13 et 18), ont présenté autant de sensibilité qu'avec Ppeps dans la bactérie A592 (Tableau VIII). Par contre, lorsque ces constructions sont insérées dans la bactérie DH5m #2, comparés au clone SH3-Ppeps, la sensibilité a diminué d'un facteur de 10 pour la plupart et même de 100 pour le clone #16. Seul le peptide PpepN #13 a présenté autant de sensibilité dans DH5m #2 (Tableau VIII). La bactérie DH5m#2 a augmenté l'écart entre le clone original (SH3-Ppeps) et les clones mutés (SH3-PpepN).

L'interaction SH3-PpepN #9 a également présenté aussi la même sensibilité que SH3-Ppeps, et ce dans les deux clones de bactéries hôtes. PpepN #8 et 9 qui n'ont que deux prolines présentent une sensibilité aussi grande que Ppeps par leur interaction avec SH3. Les peptides ne comportant aucune proline (PpepN #2, 10, 11, 12, 14,17, 21) sauf les #5 et 6 et ceux contenant une délétion (#15 et 20) ont présenté une certaine cytotoxicité bien que moindre que celle qui a été

obtenue avec Ppeps. L'absence de proline ne garantit donc pas une extinction de la sensibilité à la colicine. Ainsi, bien que 86% des mutants confèrent une diminution de la sensibilité à la colicine chez la bactérie mutante DH5m#2, ces résultats ne nous permettent cependant pas de conclure si l'interaction entre SH3 et Ppeps est véritablement spécifique.

## 4. DISCUSSION

## 4.1 La protéine matrice TolA

Par sa nature modulaire et son activité facilement détectable, la protéine TolA a été choisie pour mettre en place un système de double hybride bactérien. Dans une bactérie *E. coli* mutante TolA<sup>-</sup> (A592; Nagel de Zwaig et Luria, 1967; Levengood et Webster, 1989) nous avons reconstitué l'activité de la protéine en introduisant un plasmide contenant *TolA* (pESH-TolA). Trois tests ont été effectués : la sensibilité au DOC, le relâchement des RNases dans le milieu extracellulaire, et la résistance à la colicine. La bactérie mutante, tel qu'attendu, est redevenue résistante au DOC (Fig. 12), les RNases n'ont pas été relâchées dans le milieu extracellulaire (Tableau IV) et les colicines ont accompli leur action bactéricide (Tableau V).

Afin de vérifier la tolérance de la protéine à recevoir des modifications, nous avons dans un premier temps, ajouté des joints de flexibilité aux extrémités de la tige rigide (domaine II) de *tolA* (pESH-TolA-2G). Une plus grande charnière (EGGGS)<sub>4</sub>, de la protéine g3p du phage fd (Riechmann *et al.*, 1997) a été insérée au site de restriction *Ear* I de pESH-TolA (pESH-EGGGS). Puisque les bactéries TolA<sup>-</sup> ayant incorporés les plasmides pESH-TolA 2G et pESH-EGGGS sont aussi sensibles à la colicine que celles ayant pESH-TolA (Tableau V) et que les RNases n'ont pas été relâchées (Tableau IV), alors l'ajout de flexibilité n'a pas affecté les fonctions de TolA. De plus, supposant que ces joints de flexibilité améliorent l'interaction physique des partenaires, nous avons opté de nous servir de la protéine TolA renfermant la charnière EGGGS (pESH-EGGGS).

L'interaction des protéines partenaires doit avoir lieu dans l'espace périplasmique de la bactérie. Étant donné la contrainte de l'espace limitée, l'élimination d'un domaine ou d'une section de la protéine ayant peu ou pas de

répercussion sur les fonctions de la protéine pourrait être bénéfique. Une série de délétions a donc été exécutée (Fig. 13).

Lorsque la tige formée par le domaine II a été enlevée (pESH-TolAI-III vs pESH-TolA), la résistance au désoxycholate a été perdue et les RNases ont été relâchées dans le milieu extracellulaire (Fig. 12, Tableau IV). Par contre, la perte de ce domaine n'a pas perturbé l'activité bactéricide de la colicine : la même cytotoxicité, soit  $10^{-4}$ , a été observée pour la protéine intégrale (codée par pESH-TolA) et pour la protéine tronquée (pESH-TolAI-III; Tableau IV). Ceci confirme ce qu'avait observé Schendel et ses collaborateurs : les cellules dans lesquelles le domaine central de TolA avait été enlevé, avaient présenté une sensibilité au détergent et une fuite de la membrane externe, tandis qu'elles étaient restées sensibles aux colicines E1 (Schendel *et al.*, 1997). Le domaine II de la protéine TolA n'est donc pas requis pour l'importation de la colicine au travers de la bactérie, mais il demeure essentiel pour la résistance aux détergents et l'empêchement d'une fuite des protéines périplasmiques.

#### 4.2 Le rôle du domaine III dans la fonction de la protéine TolA

Dans la littérature, le domaine III joue un rôle important dans l'attribution de la fonction de TolA. Une surexpression de ce domaine dans une bactérie de type sauvage rend cette dernière semblable à une bactérie TolA<sup>-</sup> (Levengood-Freyermuth *et al.*, 1993). L'étude du mode d'entrée de la colicine dans la bactérie nous montre que la présence de ce domaine est essentielle dans le processus d'infection de la colicine (voir section 1.5.; Benedetti *et al.*, 1991). Nous avons observé que sa présence (pESH-TolAIII) suffit à laisser pénétrer les colicines: toutes les constructions contenant ce domaine ont présenté une certaine cytotoxicité (Tableau V). Cette sensibilité pourrait suggérer qu'une interaction avec la protéine résiduelle endogène de TolA prenait place. Puisque

la bactérie mutante utilisée, A592, n'a qu'une délétion de 4 pb au niveau du domaine III, entraînant ainsi un changement de cadre de lecture dans cette région (Levengood et Webster, 1989), alors les structures des domaines I et II demeurent inchangées. La membrane étant fluide, un déplacement aléatoire pourrait occasionner un rapprochement physique entre le domaine III exogène (pourvue par pESH-TolAIII) et les domaines I et II endogènes. Cette proximité pourrait être suffisante pour permettre à la colicine de pénétrer et de tuer la cellule, d'où le peu de sensibilité observé en présence de TolAIII. Pour cette raison, nous avons généré des bactéries ne présentant aucune sensibilité résiduelle en présence de TolA III seul (Fig.15, Tableau VII et voir section 4.4).

#### 4.3 Les protéines partenaires et les phénotypes résultant de nos tests d'interaction

Une connaissance déjà établie de l'interaction existante entre des protéines partenaires était nécessaire pour la mise en place de ce système et nous permettait de postuler que le regain des phénotypes observé était bien dû à leur présence et à leur interaction.

Les premiers partenaires qui ont été testés furent le *leucine zipper* jun-fos. Les séquences de ces deux protéines ont été insérées dans un seul vecteur de façon bicistronique (pESH-jf, section 2.6.5.1) mais n'ont pas réussi à redonner aux bactéries mutantes les phénotypes perdus (Tableau IV et VI). Puisque la construction était bicistronique (le cistron I consistait des domaines I et II de TolA accompagné de Fos, et le cistron II consistait de rbs, jun et le domaine III), l'expression du cistron II aurait pu être entravée. Une analyse de type Northern a permis de confirmer que rbs-jun-tolAIII n'était pas exprimé.

Les partenaires Rb et LXCXE n'ont pas permis un rétablissement des phénotypes TolA<sup>+</sup> (Tableau IV, relâche de protéines périplasmiques et Tableau VI, résistance à la colicine). Plusieurs raisons pourraient expliquer cette situation. D'une part, comme l'expression des ARN n'a pas été vérifiée, on ne peut savoir si les protéines ont été exprimées. D'autre part, LXCXE et le domaine III de TolA n'ont peut-être pas pu être exportés à cause d'un défaut du peptide signal; la vérification de la localisation de rbs à la membrane reste à faire. Il est également possible que le domaine de la protéine Rb utilisé soit trop gros pour résider dans l'espace périplasmique (domaine pocket de Rb utilisé : 400 a.a., ~ 40 Kd). La protéine se retrouvant dans un espace restreint n'arriverait donc pas à prendre la conformation nécessaire à son interaction avec son partenaire LXCXE. Finalement, une autre raison pourrait être que le peptide LXCXE soit trop court et qu'il nécessite des a.a. supplémentaires pour interagir avec le « domaine pocket » de Rb.

Les partenaires SH3 et Ppeps, en ce qui concerne la sensibilité à la colicine, rétablissent le phénotype TolA<sup>+</sup> de la bactérie mutante (col<sup>S</sup>, Tableau VI). La cytotoxicité des partenaires ne rejoint pas celle de la protéine intégrale ( $10^{-3}$  vs  $10^{-4}$ ). Cependant, la concentration est augmentée d'un facteur de 10 par rapport à celle obtenue en présence du domaine III seul ( $10^{-2}$ ), ainsi qu'en présence de la protéine fractionnée sans insert, dont les fragments sont portés par des plasmides différents (TolAI-II/TolAIII,  $10^{-2}$ , Tableau VI). Cette sensibilité peut être due dans les deux cas (TolA III et TolAI-II/TolAIII), à la présence du domaine III de TolA. L'explication possible serait qu'il y aurait une interaction entre le domaine III exogène de TolA et la protéine TolA résiduelle endogène, comme nous l'avons décrit plus haut. Une autre possibilité expliquant la diminution de sensibilité présente pour TolA I-II et TolAIII versus la protéine fractionnée en présence des partenaires SH3-Ppeps serait que la présence de ces derniers apporterait un peu plus de stabilité à la protéine.

#### 4.4 Les bactéries mutantes DH5m éliminent la sensibilité résiduelle causée par la présence du domaine III.

Afin de contourner le problème de sensibilité causé par la présence de TolA III nous avons créé des bactéries mutantes pour la protéine TolA qui ne présentaient aucune sensibilité en présence de ce domaine. Les mutations obtenues sont des insertions du transposon Tn 10 au complet ou de sa forme tronquée. Ces insertions ne sont pas aléatoires, une séquence qui leur est préférentielle, soit le motif 5' NGCTNAGCN 3' (Murray et Haniford, 1997), est située aux sites où ils se sont insérés. Précédant le domaine III de TolA, ces insertions modifiaient le cadre de lecture rendant ainsi le domaine III non fonctionnel.

Si nous revenons aux partenaires SH3-Ppeps qui augmentent la sensibilité à la colicine d'un facteur de 10, nous remarquons le même phénomène lorsqu'introduit dans la bactérie mutante nouvellement créée DH5m#2. En absence de partenaire (TolAI-II d'une part et TolAIII d'autre part) on observe cependant une sensibilité à la colicine. Ceci pourrait encore s'expliquer par la fluidité de la membrane et par la présence des domaines exogènes de la protéine portée par des vecteurs distincts. L'augmentation par un facteur de 10 par la présence des partenaires indique un rétablissement accru des fonctions de TolA.

#### 4.5 L'importance des prolines du consensus Ppeps, dans la sensibilité à la colicine observée en présence de SH3-Ppeps

Afin de savoir si le regain de sensibilité à la colicine par les partenaires SH3-Ppeps est dû à leur interaction, nous avons introduit des mutations dans le peptide Ppeps. Des oligos dégénérés ont donné lieu à des peptides dans lesquels

les prolines de la séquence consensus RLPPLP du peptide Ppeps ont été remplacées par n'importe quel acide aminé (X). Les séquences sont appelées PpepN et sont introduites dans le plasmide pTolAIII-SP-3 EGGS de la même manière que Ppeps y a été introduit (aux sites *Kpn* I-*Pst* I, section 2.6.5.3). Parmi les clones obtenus, nous avons séquencés 24 dont 11 ne comportaient aucune proline (#2, 5, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 20, 21; Fig. 16), les peptides résultants sont portés au Tableau VII. L'absence de proline dans la séquence consensus PpepN ne garantit pas une extinction de la sensibilité des bactéries à la colicine, puisque 70% des ces mutants affichent une certaine sensibilité ( $10^{-2}$  à  $10^0$ , Tableau VIII). Cependant, cette sensibilité n'égale pas celle du peptide non muté du moins dans l'hôte DH5m#2, qui ne porte pas de *tolA* III endogène qui risque de confondre les résultats (voir section 4.4). Cette sensibilité apparente peut être pourvue non à cause de la liaison des partenaires mais par une proximité des fractions de la protéine (TolAI-II/TolAIII). Ceci serait une réaction qui n'est pas aussi stable qu'avec les partenaires mais quand même présente, telle que nous en avons discuté à la section 4.3. Par ailleurs, il se pourrait que même en absence de proline, les partenaires SH3-PpepN se lient, car la littérature nous rapporte que certains domaines SH3 lient des séquences consensus ne comportant que peu de prolines, sinon aucune (Mongioli *et al.*, 1999; Barnett *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2000). Si c'est le cas ici, nous ne pouvons conclure sur la spécificité de l'interaction SH3-Ppeps. Afin de s'en assurer, un «GST-pull down» nous renseignerait sur la question à savoir si les peptides PpepN n'ayant pas de proline ont malgré tout une certaine capacité à lier le domaine SH3. Ce qui expliquerait les résultats obtenus quant à la sensibilité des bactéries à la colicine. Cependant, il reste que la grande majorité des peptides altérés ne rendent pas les bactéries aussi sensibles à la colicine que la séquence non mutée, Ppeps (Tableau VIII). Cette observation nous incite par conséquent à suggérer l'existence d'une interaction réelle entre les partenaires SH3 et Ppeps.

## 5. CONCLUSION

Les interactions entre protéines sont primordiales à tout aspect de la vie d'une cellule et d'un organisme. Connaître l'identité des protéines interagissant entre elles lors d'un processus biologique en particulier peut donner beaucoup d'informations sur le pourquoi de la réaction qui s'en suit. La connaissance de tous les liens protéiniques qui se produisent dans une cellule nous donnerait un outil de pouvoir immense sur la compréhension de la vie: on pourrait étudier et remédier les liens qui auraient un effet néfaste. Malheureusement, beaucoup de chemin reste encore à parcourir avant d'arriver à ce stade.

L'étude des interactions protéine-protéine est en plein essor mais les outils disponibles pour l'instant ne peuvent satisfaire tous les besoins. La coimmunoprécipitation, technique hautement utilisée et simple, permet de savoir que la protéine étudiée se lie à une ou plusieurs autres protéines par visualisation sur gel, mais la caractérisation ou la nature de la protéine partenaire ne peut être connue par cette méthode. La technique de double hybride, qui de son côté a joué un rôle très substantiel dans la découverte des protéines partenaires ces dernières années (Uetz et Hughes, 2000), contient aussi pour sa part des points faibles. Sans minimiser l'importance de sa capacité de pêcher la protéine partenaire et d'en permettre la caractérisation, cette technique a un nombre de faux positifs élevé et nécessite les translocations au noyau des deux partenaires. La mise en place d'un système de double hybride dans la bactérie éliminerait cette obligation. La simplicité de la technique, la croissance rapide et élevée de l'hôte, la vérification de l'interaction entre les protéines par une activité détectable, et l'accessibilité supposée de l'espace périplasmique où se déroulent les interactions, sont des éléments qui font de ce système un outil intéressant.

Les études entreprises par le biais de ce projet ne représentent que le début de la mise en place du système bactérien de détection des interactions protéine-

protéine basé sur TolA. Cette protéine matrice accepte des modifications sans nuire à la bactérie, par exemple, des ajouts de joints de flexibilité. Ces derniers pourraient augmenter la probabilité d'interaction entre les protéines partenaires. Nous avons testé différentes combinaisons de partenaires (jun-fos, Rb-LXCXE et SH3-Ppeps), mais seul le duo SH3-Ppeps permet un regain des phénotypes perdus par les bactéries mutantes pour la protéine TolA. Cette technique peut s'avérer intéressante sur le plan pharmacologique, afin de rechercher des petites molécules pouvant briser des liens spécifiques existant entre des protéines et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Avant d'arriver à cette étape, beaucoup de mise au point reste encore à être effectuée; entre autres, d'autres partenaires seront testés pour évaluer l'efficacité de la technique pour les fins visées.

## 6. RÉFÉRENCES

Bachmann BJ. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev.* **54**: 130-197.

Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST, Branton PE. (1994) Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* **9**: 359-373.

Barnett P, Bottger G, Klein AT, Tabak HF, Distel B. (2000) The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction. *EMBO J.* **19**: 6382-6391.

Bassford PJ Jr, Bradbeer C, Kadner RJ, Schnaitman CA. (1976) Transport of vitamin B12 in tonB mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **128**: 242-247.

Benedetti H, Lazdunski C, Llobes R. (1991) Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J.* **10**: 1989-1995.

Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S, Llobes R. (1998) *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol.* **180**: 4872-4878.

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.

Bourdineaud JP, Boulanger P, Lazdunski C, Letellier L. (1990). In vivo properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc Natl Acad Sci. USA* **87**: 1037-1041.

Bouveret E, Derouiche R, Rigal A, Lloubes R, Lazdunski C, Benedetti H. (1995) Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **270**: 11071-11077.

Braun V, Gunter K, Hantke K. (1991) Transport of iron across the outer membrane. *Biol. Metals* **4** :14-22.

Braun V, Herrmann C. (1993) Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol Microbiol.* **8**: 261-268.

Braun V. (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **415**: 335-337.

Brewer S, Tolley M, Trayer IP, Barr GC, Dorman CJ, Hannavy K, Higgins CF, Evans JS, Levine BA, Wormald MR. (1990) Structure and fonction of x-pro dipeptide repeats in the TonB proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **216**: 883-895.

Cascales E, Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Lloubes R. (2002) Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol.* **184**: 754-759.

Cascales E, Gavioli M, Sturgis JN, Lloubes R. (2000) Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane Pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **38**: 904-915.

Chevray PM et Nathans D (1992) Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. Proc Natl Acad Sci USA. **89**: 5789-5793.

Chien C, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc Natl Acad Sci USA **88**: 9578-9582.

Cramer WA, Cohen FS, Merrill AR, Song HY. (1990) Structure and dynamics of the colicin E1 channel. Mol Microbiol. **4**: 519-526.

Davies JK et Reeves P. (1975) Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: Cross-resistance among colicins of group B. J Bacteriol. **123**: 96-101.

Davies JK et Reeves P. (1975) Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: Cross-resistance among colicins of group A. J Bacteriol. **123**: 102-117.

Deich RA, Metcalf BNJ, Finn CW, Farley JE, Green BA. (1988) Cloning of genes encoding a 5,000-dalton peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein and an antigenically related 15,000-dalton protein from *Haemophilus influenzae*. J Bacteriol. **170**: 489-498.

Dennis JJ, Lafontaine ER, Sokol PA. (1996) Identification and characterization of the *tolQRA* genes of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. **178**: 7059-7068.

Derouiche R, Benedetti H, Lazzaroni JC, Lazdunski C, Lloubes R. (1995) Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J Biol Chem.* **270**: 11078-11084.

Eick-Helmerich K, Braun V. (1989) Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *J Bacteriol.* **171**: 5117-5126.

Fields S, Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* **340**: 245-246.

Fognini-Lefebvre N, Lazzaroni JC, Portalier R. (1987) *tolA*, *tolB* and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.* **209**: 391-395.

Germon P, Clavel T, Vianney A, Portalier R, Lazzaroni JC. (1998) Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression. *J Bacteriol.* **180**: 6433-6439.

Johnston M. (1987) A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **51**: 458-476.

Journet L, Rigal A, Lazdunski C, Benedetti H. (1999) Role of TolR N-terminal, central, and C-terminal domains in dimerization and interaction with TolA and TolQ. *J Bacteriol.* **181**: 4476-4484.

Kang H, Freund C, Duke-Cohan JS, Musacchio A, Wagner G, Rudd CE. (2000) SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J.* **19**: 2889-2899.

Kampfenkel K, Braun V. (1993) Membrane topologies of the TolQ and TolR proteins of *Escherichia coli*: Inactivation of TolQ by a missense mutation in the proposed first transmembrane segment. *J Bacteriol.* **175**: 4485-4491.

Kampfenkel K, Braun V-1. (1992) Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J Bacteriol.* **174**: 5485-5487.

Kampfenkel K, Braun V-2. (1992) Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **268**: 6050-6057.

Karlsson M, Hannavy K, Higgins CF. (1993) A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Mol Microbiol.* **8**: 379-388.

Larsen RA, Foster-Hartnett D, McIntosh MA, Postle K. (1997). Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. *J Bacteriol.* **179**: 3213-3221.

Lazdunski C, Bouveret E, Rigal A, Journet L, Llobes R, Benedetti H. (2000) Colicin import into *Escherichia coli* cells requires the proximity of the inner and outer membranes and other factors. *Int J Med Microbiol.* **290**: 337-344.

Lazdunski C, Bouveret E, Rigal A, Journet L, Llobes R, Benedetti H. (1998) Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* **180**: 4993-5002.

Lazzaroni JC, Germon P, Ray MC, Vianney A. (1999) The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol Lett.* **177**: 191-197.

Lazzaroni JC, Vianney A, Popot JL, Benedetti H, Samatey F, Lazdunski C, Portalier R, Geli V. (1995) Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J Mol Biol.* **246**: 1-7.

Letain TE, Postle K. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* **24**: 271-283.

Levengood SK, Webster RE. (1989) Nucleotide sequence of the *tolA* and *tolB* genes and localization of their products, components of a multistep translocation system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **171**: 6600-6609.

Levengood SK, Beyer WF Jr, Webster RE. (1991) TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 5939-5943.

Levengood-Freyermuth SK, Click EM, Webster RE. (1993) Role of the carboxyl-terminal domain of TolA in protein import and integrity of the outer membrane. *J Bacteriol.* **175**: 222-228.

Llamas MA, Ramos JL, Rodriguez-Herva JJ. (2000) Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J Bacteriol.* **182**: 4764-4772.

Lloubes R, Cascales E, Walburger A, Bouveret E, Lazdunski C, Bernadac A, Journet L. (2001) The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res Microbiol.* **152**: 523-529.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marqusee S, Baldwin RL. (1987) Helix stabilization by Glu-...Lys<sup>+</sup> salt bridges in short peptides of de novo design. Proc Natl Acad Sci. USA **84** : 8898-8902.

Mongiovi AM, Romano PR, Panni S, Mendoza M, Wong WT, Musacchio A, Cesareni G, Di Fiore PP. (1999) A novel peptide-SH3 interaction. EMBO J. **18**: 5300-5309.

Murray SJ, Haniford DB. (1997) Factors responsible for target site selection in *Tn10* transposition : a role for the DDE motif in target DNA capture. EMBO J. **16**: 2646-2655.

Nagel de Zwaig R et Luria SE. (1967) Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. J Bacteriol. **94**: 1112-1123.

Postle K, Good RF. (1983) DNA sequence of the *Escherichia coli tonB* gene. Proc Natl Acad Sci. USA. **80**: 5235-5239.

Postle K, Skare JT. (1988) *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. J. Biol. Chem. **263**: 11000-11007.

Postle K. (1990) TonB and the Gram-negative dilemma. Mol Microbiol. **4** : 2019-2026.

Prouty AM, Van Velkinburgh JC, Gunn JS. (2002) *Salmonella enterica* serovar typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the *tolQRA* cluster. *J Bacteriol.* **184**: 1270-1276.

Riechmann L, Holliger P. (1997) The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell.* **90**: 351-360.

Rigal A, Bouveret E, Llobes R, Lazdunski C, Benedetti H. (1997). The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**: 7274-9.

Schendel SL, Click EM, Webster RE, Cramer WA. (1997) The TolA protein interacts with colicin E1 differently than with other group A colicins. *J Bacteriol.* **179**: 3683-3690.

Sen K, Sikkema DJ, Murphy TF. (1996) Isolation and characterization of the *Haemophilus influenzae tolQ, tolR, tolA and tolB* genes. *Gene.* **178**: 75-81.

SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8496-8501.

Sparks AB, Quilliam LA, Thorn JM, Der CJ, Kay BK. (1994) Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem.* **269**: 23853-23856.

Sturgis JN. (2001) Organisation and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**: 113-122.

Sun TP, Webster RE. (1986) *fii*, a bacterial locus required for filamentous phage infection and its relation to colicin-tolerant *tolA* and *tolB*. J Bacteriol. **165**: 107-115.

Sun TP, Webster RE. (1987) Nucleotide sequence of a gene cluster involved in entry of E colicins and single-stranded DNA of infecting filamentous bacteriophages into *Escherichia coli*. J Bacteriol. **169**: 2667-2674.

Tibor A, Weynants V, Denoel P, Lichtfouse B, De Bolle X, Saman E, Limet JN, Letesson JJ. (1994) Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5 Kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. Infect. Immun. **62**: 3633-3639.

Vianney A, Lewin TM, Beyer WF, Lazzaroni JC, Portalier R, Webster RE. (1994) Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *Escherichia coli* required for the uptake of macromolecules and cell envelope integrity. J Bacteriol. **176**: 822-829.

Vianney A, Muller MM, Clavel T, Lazzaroni JC, Portalier R, Webster RE. (1996) Characterization of the *tol-pal* region of *Escherichia coli* K-12: translational control of *tolR* expression by TolQ and identification of a new open reading frame downstream of *pal* encoding a periplasmic protein. J Bacteriol. **178**: 4031-4038.

Vidal M, Legrain P. (1999) Yeast forward and reverse 'n'-hybrid system. Nucleic Acids Res. **27**: 919-929.

Webster RE. (1991) The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. Mol Microbiol. **5**: 1005-1011.