

2m11.2949.8

Université de Montréal

Étude des interactions protéine –ADN entre les facteurs accessoires, ArgR
et PepA, du système de recombinaison spécifique de sites de type Xer

par

Nadine Héroux

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en microbiologie et immunologie

Septembre 2001

©Nadine Héroux, 2001



W
4
U58
2002
V.049

2005 MAR 2

LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude des interactions protéine –ADN entre les facteurs accessoires, ArgR
et PepA, du système de recombinaison spécifique de sites de type Xer

présenté par
Nadine Héroux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. George Szatmari
Dr. Patrick Hallenbeck
Dr. Pierre Belhumeur

Mémoire accepté le

Sommaire

La division cellulaire bactérienne nécessite une très grande coordination de plusieurs systèmes cellulaires. Parmi ceux-ci, il existe le système de recombinaison spécifique de sites de type Xer, système ayant pour fonction d'assurer la séparation du dimère chromosomique produit à la suite de la réplication du chromosome. Le système Xer est également un des moyens utilisés par la cellule afin d'éviter le curage plasmidique causé par la multimérisation des plasmides. Plusieurs protéines sont impliquées dans cette fonction. Les recombinases XerC et XerD sont les protéines clés du système. Elles sont responsables de l'échange des brins d'ADN. Au niveau plasmidique, des facteurs dits accessoires ont pour rôle de contrôler la direction de la réaction. Ces facteurs accessoires sont les protéines PepA et ArgR.

Parmi toutes les protéines impliquées dans la recombinaison de type Xer, une seule demeure mystérieuse, PepA. Son niveau d'implication dans le système n'est pas connu. Il serait donc intéressant de déterminer le type d'interaction que possède cette protéine avec les autres éléments du système Xer, tant au point de vue des interactions protéiques qu'ADN.

L'aminopeptidase A possède la capacité de liaison à l'ADN. Il serait important de déterminer si cette action utilise des fonctions similaires pour la répression du promoteur *carA* et pour ses fonctions de recombinaison. De plus, il nous est permis de croire qu'il existe une certaine activité de coopération entre les deux facteurs accessoires puisque la formation d'un complexe pré-synaptique par celles-ci est primordiale avant de permettre aux recombinases d'entreprendre leur travail. La mutagenèse dirigée sera l'outil de choix dans cette étude pour tenter de trouver les régions impliquées dans les fonctions de liaison à l'ADN de la protéine PepA. Cette action de liaison à l'ADN sera déterminée par des dosages β -galactosidases. De plus, nous tenterons par des essais de retardement sur gel d'observer une activité de coopération entre les deux facteurs accessoires, ArgR et PepA, au niveau des sites de recombinaison.

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent une séparation des différentes fonctions de PepA. L'activité exopeptidase est fortement concentrée dans la région C-terminale de la protéine. L'activité de liaison au site *carA* et *cer* semble faire partie de fonctions différentes. Il est même probable que PepA ne possède pas de véritable séquence de liaison à l'ADN lors de la recombinaison au site *cer*. Dans cette optique, deux possibilités peuvent se présenter; PepA lie cette séquence d'ADN de façon secondaire par l'intermédiaire de ArgR ou bien, il possède des interactions avec l'une ou l'autre des recombinases. Quoi qu'il en soit PepA demeure la protéine la moins bien comprise du système de recombinaison spécifique de sites de type Xer.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABBRÉVIATION	xi
1. INTRODUCTION	2
1.1 Généralités	2
1.1.1 Ségrégation de l'ADN plasmidique	3
1.1.2 Stabilité plasmidique	5
1.2 La Recombinaison	7
1.2.1 Recombinaison spécifique de sites	7
1.3 La recombinaison spécifique de sites de type Xer	10
1.4 Le système Xer au niveau chromosomique	10
1.4.1 Généralités	10
1.4.2 Les Recombinases	13
1.4.3 La Protéine FtsK	14
1.5 Le système Xer au niveau plasmidique	15
1.5.1 Le site <i>cer</i> du plasmide ColE1	15
1.5.2 Les protéines accessoires	16
1.5.2.1 Le répresseur d'arginine, ArgR	16
1.5.2.2 L'aminopeptidase A, PepA	18
1.5.3 La formation du complexe pré-synaptique	21
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	25
2.1 Souches et milieux de culture	26
2.2 Transduction	26
2.2.1 Préparation du lysat phagique	27

2.2.2	Protocole de transduction	28
2.3	Hybridatin de type «Southern blot»	30
2.3.1	Sonde du promoteur <i>carA</i>	30
2.3.2	Sonde <i>lacZ</i>	30
2.3.3	Marquage aléatoire des sondes avec de la digoxigenine dUTP alkaline labile	31
2.3.4	Préparation de l'ADN génomique	31
2.3.5	Transfert sur membrane de nylon	32
2.3.6	Hybridation de la sonde	32
2.3.7	Détection de l'hybridation	33
2.4	Plasmides	34
2.5	Extraction de l'ADN	40
2.5.1	Extraction de l'ADN plasmidique	40
2.5.2	Extraction génomique	40
2.6	Préparation de cellules chimiocompétentes	41
2.6.1	Transformation des cellules	41
2.7	Mutagenèse	42
2.7.1	Mutagenèse aléatoire	42
2.7.2	Mutagenèse ponctuelle par PCR	42
2.8	Expression et purification protéique	47
2.8.1	L'amonipeptidase A	47
2.8.2	Le répresseur d'arginine	48
2.8.3	Quantification protéique	49
2.9	Retardement sur gel	50
2.9.1	En gel polyacrylamide	50
2.9.2	En gel d'agarose	50
2.9.3	Préparation de l'ADN marqué à la digoxigenine dUTP alkaline labile	50
2.9.4	Réaction protéine-ADN	51
2.9.5	Transfert et Détection	52

2.10	Dosage de l'activité de l'aminopeptidase A sur la leucine- ρ -nitroalanine	53
2.11	Test de toxicité sur valine-leucine	53
2.12	Dosage β -galactosidase	54
2.13	Tests de complémentation	55
3.	RÉSULTATS	56
3.1	Les constructions génomiques	57
3.2	Les constructions plasmidiques	60
3.3	Les dosages β -galactosidase	64
3.4	Tests de toxicité sur la valine-leucine	69
3.5	Dosage de l'activité de l'aminopeptidase A	70
3.6	Tests de recombinaison	72
3.7	Retardement sur gel	74
4.	DISCUSSION	80
5.	CONCLUSION	92
6.	BIBLIOGRAPHIE	93
7.	ANNEXES	100
	REMERCIEMENTS	xiii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau.I	Alignement des sites d'échanges homologues de recombinaison de type Xer	12
Tableau.II	Liste des souches de <i>E.coli</i> utilisées	27
Tableau.III	Liste des plasmides ³⁵	
Tableau.IV	Activité de recombinaison	58
Tableau.V	Activité aminopeptidase de PepA <i>in vivo</i> sur milieu minimal A solide lors de la croissance de la souche DS957	69
Tableau.VI	Essai <i>in vitro</i> de l'activité aminopeptidase sur des extraits bruts	71
Tableau.VII	Étude de recombinaison sur la souche DS957(<i>pepA</i> ⁻) à l'aide du vecteur de recombinaison pCS210	72

LISTE DES FIGURES

Figure.1	Effet de l'orientation des sites	7
Figure.2	Recombinaison chez la famille des résolvases/invertases	8
Figure.3	Étapes de la recombinaison de type Xer	9
Figure.4	Représentation des trois domaines conservés chez les recombinases	13
Figure.5	Structure en ruban de ArgR monomérique de <i>B. stearothermophilus</i>	16
Figure.6	Structure de la boîte d'arginine et du site <i>cer</i> du plasmide ColE1	17
Figure.7	Représentation en ruban d'un monomère de PepA	19
Figure.8	Site <i>carAB</i> et alignement de séquence	20
Figure.9	Structure pré-synaptique	21
Figure.10	Modèle de la structure du complexe synaptique aux sites <i>cer</i>	24
Figure.11	Vérification de transduction par Southern	59
Figure.12	Mutagenèse ponctuelle par PCR inverse	61
Figure.13	Vérification par digestion enzymatique des mutants obtenus après PCR	63
Figure.14	Observation des niveaux de répression sur le promoteur <i>carA</i> par les protéines PepA et/ou ArgR qui sont exprimées dans les souches bactériennes C600B, C955B et RFM655, tout en comparant l'effet des milieux de croissance utilisés.	65
Figure.15	Comparaison de dosage β -galactosidase entre les souches C600B, C955B et RFM655 en milieu pauvre	67
Figure.16	Étude comparative en dosage β -galactosidase entre les souches d' <i>E.coli</i> C600B, C955B et RFM655 fait en milieu LB (riche)	68
Figure.17	Extraction plasmidique après recombinaison	73
Figure.18	Retardement causé par la protéine ArgR sur les sites <i>cer</i> , <i>cer-cer</i> , <i>cer-nmr</i> et <i>carA</i>	75
Figure.19	Retardement de la protéine PepA sur gel polyacrylamide des sites <i>pcarA</i> et <i>cer-nmr</i>	76
Figure.20	Retardements de PepA, et ArgR sur le site <i>pcarA</i> sur gel d'agarose	77
Figure.21	Retardement de PepA sur les sites <i>cer</i> et un contrôle <i>dif</i> en gel d'agarose	78

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

a.a :	acide aminé
ac :	anticorps
a.n :	acide nucléique
ADN :	acide désoxiribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
β -gal :	Béta-galactosidase
BSA :	sérum albumine bovin
CTAB :	bromure de cétyltriméthylammonium
DIDC :	poly(dI-dC).poly(dI-dC)
Dig :	digoxigenin-11-dUPT
dNTP :	désoxynucléotides
EDTA :	acide éthylène diamine tétraacétique
IHF :	« Intgration Host Factor »
IPTG :	isopropylthio- β -galactoside
Kd :	kilobase
kDa :	kilodalton
KoAc :	acétate de potassium
LB :	Luria Broth
MgOAc:	acétate de magnésium
NEB :	New England Biolabs
ONPG :	o-nitrophényl β -D-galacto-pyranoside
-p- :	para-
pb :	paires de bases
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PMSF :	phényl méthyl sulfonyl floride
RD :	Roches Diagnostiques Inc.
SAP :	shrimp alkaline phosphatase
U.V. :	rayon ultra-violet

Pour toi, Gyslain,

«Quand deux cœurs en s'aimant ont doucement vieilli
Oh ! quel bonheur profond, intime, recueilli !
Amour, hymen d'en haut ! O pur bien des âmes !
Il garde ses rayons même en perdant ses flammes.
Ces deux cœurs qu'il a pris jadis n'en font plus qu'un
Il fait des souvenirs de leur passé commun.
L'impossibilité de vivre l'un sans l'autre
Chérie, n'est-ce-pas, cette vie est la nôtre !
Il a la paix du soir avec l'éclat du jour,
Et devient l'amitié tout en restant l'amour»
(Victor Hugo, tire du Lyre)

À mes parents et ma soeur,

«Lorsque l'enfant paraît, le cercle de famille
Applaudit à grands cris.
Son doux regard qui brille
Fait briller tous les yeux,
Et les plus tristes fronts, les plus souillés peut-être,
Se dérident soudain à voir l'enfant paraître,
Innocent et joyeux....»
(Victor Hugo, Tiré du recueil des feuilles d'automne)

Revue de littérature

1. Introduction

1.1 Généralités

La division cellulaire bactérienne est un processus complexe qui nécessite la coordination de plusieurs facteurs dont la réplication, la ségrégation des chromosomes répliqués et la division cellulaire. D'autres éléments sont également impliqués dans ce processus qui assurent la stabilité de l'organisme dans ses fonctions de survie et de résistance. La stabilité plasmidique doit être assurée d'une génération à l'autre afin de permettre à chacune d'elle le maintien des caractéristiques qui leurs sont particulières et qui souvent leurs accordent une meilleure sélection vitale.

Tous les éléments qui constituent cette orchestration ne peuvent être étudiés individuellement. Il est important de se rappeler qu'un procédé doit nécessairement en affecter un autre. En effet, dans une cellule procaryote l'absence de noyau entraîne la mise en marche de la réplication et la ségrégation chromosomique dans un même processus continu dans lequel le chromosome est séparé à même la réplication (Gordon et Wright, 2000). Cependant, pour qu'une bonne ségrégation ait lieu, les deux copies répliquées du chromosome doivent être libres l'une de l'autre. Lors de la terminaison de la réplication, deux phénomènes peuvent se produire : la formation de caténane ou de dimère chromosomique. Ces structures doivent être supprimées par des procédés différents. La structure en caténane est résolue par l'action de la topoisomérase IV (Adams *et al.*, 1992 ; Peng et Mariani, 1993) et celle du dimère chromosomique, qui a été engendré par la protéine de recombinaison homologue RecA, est résolue par le système de recombinaison spécifique de site Xer (Blakely, 1993 et 1994).

La recombinaison spécifique de site de type Xer est un système hautement répandu tant chez les bactéries gram-positives que négatives. Elle assure la monomérisation des dimères chromosomiques engendrés par le nombre impair de recombinaison homologue. Cette formation de dimère a lieu dans 14% des cellules en croissance (Steiner et Kuempel, 1998a). Ce même système s'applique également au niveau plasmidique pour permettre la monomérisation des dimères ou multimères

plasmidiques encore là créés par la recombinaison homologue. Ce système est donc essentiel pour une bonne division cellulaire et une stabilité plasmidique. Au point de vue phénotypique, une souche bactérienne déficiente dans la monomérisation de son chromosome voit apparaître dans sa population cellulaire des cellules filamenteuses; un signe direct d'un problème de division cellulaire. Dans ces conditions, nous pouvons constater qu'il est important d'étudier le système de recombinaison spécifique de sites de type Xer afin d'en comprendre davantage le fonctionnement, les différentes relations qu'il peut y avoir avec les autres processus cellulaires et les conséquences du travail effectué par la recombinaison spécifique de site.

Avant de décrire en détail les composantes du système de recombinaison spécifique de sites de type Xer, des notions importantes qui touchent ce processus de près ou de loin doivent être considérées pour bien en saisir la problématique.

1.1.1 Ségrégation de l'ADN plasmidique

Les plasmides sont des éléments d'ADN circulaire se retrouvant dans le cytoplasme. Le nombre de copies plasmidiques présentes dans une cellule bactérienne varie en fonction de l'origine de répllication. Ce nombre peut aller d'un seul exemplaire par cellule jusqu'à des dizaines de copies (voir section 1.1.3). Cependant, peu importe le nombre de copies présent, l'essentiel lors de la division cellulaire consiste à ce que les plasmides soient répliqués et acheminés de façon équitable dans les deux cellules filles. Les plasmides se sont donc prémunis de moyens leur permettant d'assurer une stabilité plasmidique et ainsi éviter le curage plasmidique.

Dans la plupart des cas, les plasmides à haut nombre de copies sont en nombre suffisamment élevé dans la cellule pour assurer une répartition équitable sans nécessiter la présence de mécanisme actif ou particulier. Cependant, la formation de dimères plasmidiques, soit par recombinaison ou suite à la répllication du plasmide, constitue un problème important qui a pour conséquence de réduire physiquement le nombre de copie dans cellule. Cette réduction met en péril la stabilité plasmidique. Afin de neutraliser cette production de dimères, un système de monomérisation plasmidique est utilisé. Ce

système est le même, à quelques exceptions près (voir le système Xer au niveau plasmidique, section 1.4), que celui qui est utilisé au niveau chromosomique, c'est-à-dire le système de recombinaison spécifique de site de type Xer. Le système assure la résolution des dimères et multimères en monomère restaurant ainsi l'équilibre nécessaire à la bonne répartition plasmidique.

L'«addiction» plasmidique (ou mort des cellules qui ont perdu leur plasmide) est un autre moyen utilisé pour le maintien des plasmides dans une population cellulaire (ex : plasmide F, R1 et le prophage P1). Cette technique consiste davantage à donner l'apparence de stabilité puisqu'il n'assure pas une bonne ségrégation des plasmides, mais plutôt qu'il déclenche le programme de mort cellulaire lorsque la cellule le perd (Yarmolinsky, 2000). Ce système comprend une paire de gènes portée sur le plasmide, la toxine et l'antidote. La toxine est une protéine stable qui sera tenue inactive temps et aussi longtemps que l'antidote produit par le plasmide sera présent. Selon les différentes familles, l'antidote peut bloquer la synthèse de la toxine, bloquer son fonctionnement ou empêcher l'accès à son site d'action (Engelberg-Kulka, 1999). Une fois le plasmide perdu, l'antidote, une protéine plus instable que la toxine, sera perdue et la toxine qui perdure plus longtemps dans la cellule enclenchera le programme de mort cellulaire (Snyder et Champness, 1997).

Le dernier moyen utilisé pour assurer une bonne ségrégation plasmidique, surtout pour les plasmides à faible nombre de copies, est la partition. Ce phénomène actif de positionnement des plasmides garantit la bonne répartition de ceux-ci dans les futures cellules filles. Les systèmes les plus connus sont ceux de plasmides à faible nombre de copies (P1, F et R1). Généralement, le positionnement des plasmides F et P1, ou plus précisément des foci, avant répllication est situé au niveau central de la cellule pour être relocalisé au $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule après la répllication, et qui correspond au futur centre des futures cellules filles (Gordon, 1997 et Niki, 1997). Les foci, avant répllication, du vecteur R1 sont retrouvés soit au centre cellulaire soit au pôle cellulaire (Jensen, 1999). Cette différence peut être attribuable au fonctionnement variable des différents systèmes de partition. Quoi qu'il en soit, la partition est un déplacement direct et plus rapide que

la croissance cellulaire, ce qui constitue un mécanisme actif de ségrégation plasmidique. De toute évidence, ces plasmides possèdent un semblant de centromère à laquelle une protéine peut s'y lier (ParB pour P1, ParR pour R1 et SopB pour F) (Gordon, 2000). Chacun possède également une protéine ATPase et autorégulatrice. La présence de l'ensemble des éléments est nécessaire pour permettre une bonne partition.

1.1.2 Stabilité plasmidique

La stabilité plasmidique des plasmides à haut nombre de copies est assurée au niveau cellulaire grâce à trois éléments : la résolution des multimères, le contrôle du nombre de copie dans la cellule et le contrôle de la division cellulaire. Les multimères occasionnent plusieurs stress pour l'hôte cellulaire. Ils nécessitent un apport plus élevé en métabolites, ce qui entraîne un ralentissement de 10% de la vitesse de la croissance cellulaire (Summers *et al.*, 1993). Les multimères posent problème à la stabilité plasmidique puisqu'ils diminuent le nombre de copie de plasmide, ce qui entraîne une probabilité plus grande de curage plasmidique. Un autre problème engendré par la multimérisation est l'accumulation de ceux-ci par rapport au nombre de monomères présents dans la cellule. Cela s'explique par une meilleure efficacité et une probabilité plus grande de réplication par la présence de deux origines de réplication (Summers *et al.*, 1993).

La répartition des plasmides dans la cellule est normalement aléatoire. Cette répartition permet d'assurer une plus grande probabilité que chaque cellule fille recevra au moins une copie du plasmide. Le contrôle du nombre de copie est donc essentiel pour maintenir le nombre adéquat de plasmides. Différents systèmes peuvent être utilisés selon l'origine de réplication du vecteur impliqué : le contrôle par un ARN (ex : ColE1), par une protéine (ex : pSC101, F, P1, etc.) ou par un ARN et une protéine (ex : R1). Un exemple des plus étudié concerne le plasmide ColE1. Ce vecteur à haut nombre de copies est régulé par la synthèse d'un petit fragment d'ARN instable nommé ARN I et encodé par le plasmide lui-même. Cet ARN I vient inhiber la réplication du plasmide en interférant avec la formation de l'amorce d'initiation qui est formée par le clivage de l'ARN II par l'ARNase H (Itoh et Tomizawa, 1980; Tomizawa, 1986). Lorsque la

quantité de copie plasmidique est insuffisante, le nombre d'inhibiteur est trop faible pour bloquer la réplication du plasmide. Cependant, lorsque la quantité nombre devient suffisante, le taux de production de cet ARN II est suffisamment élevé pour empêcher l'initiation de la réplication donc la réplication en elle-même. Le contrôle du nombre de copies plasmidiques est important puisqu'il est inutile de gaspiller les métabolites cellulaires et de surcroît de ralentir la croissance cellulaire inutilement. Aussi une trop grande charge plasmidique pourrait engendrer des cellules sans plasmide, car au rythme des divisions cellulaires la cellule hôte ne pourrait suffire au besoin d'une telle charge de réplication (Snyder et Champness, 1997).

La synchronisation de la division cellulaire et de la résolution des multimères plasmidiques fait partie d'un autre moyen pour éviter l'instabilité plasmidique. La multimérisation est considérée comme une diminution du nombre de copies cellulaires. Il est donc important de les résoudre avant la division cellulaire au risque de voir apparaître des cellules sans plasmide. À elle seule, la résolution des multimères n'est pas suffisante pour assurer le maintien plasmidique. La réaction de recombinaison doit être assez rapide pour allouer une bonne résolution avant la division cellulaire. Une étude démontre que cette résolution n'est pas aussi rapide que prévue (Parker et Halford, 1991). Bien que le complexe synaptique se forme en quelques millièmes de seconde, il semblerait que les étapes subséquentes du processus de recombinaison, c'est-à-dire l'échange des brins et la formation du produit résolu, nécessiteraient un temps de l'ordre de la minute (pour les étapes de la recombinaison, voir la section 1.2). Les études *in vitro* sur le plasmide ColE1 n'ont pu démontrer jusqu'à présent la résolution complète du dimère en monomère (Collums *et al.*, 1996). Elles semblent démontrer un blocage de la réaction qui empêche l'action de la recombinase XerD sur la jonction qui permettrait la résolution complète des vecteurs. *In vivo*, nous savons que la réaction complète est possible et que la monomérisation a bien lieu. Si nous supposons que ce blocage soit perceptible *in vivo*, ceci entraîne nécessairement un ralentissement de la résolution des dimères plasmidiques, qui peut créer un retard sur la division cellulaire. Pour contrecarrer ce phénomène, un court ARN non-traduit de 90 nucléotides nommé Rcd (pour « regulator of cell division ») est transcrit à partir du promoteur *P_{cer}* qui se situe à

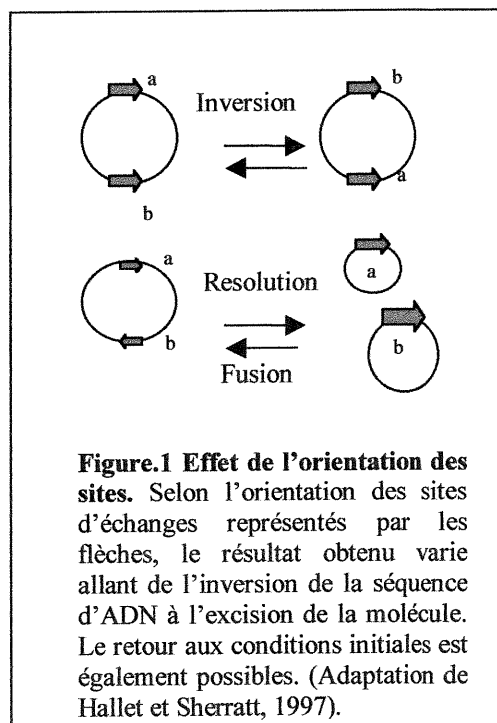
même le site *cer* de recombinaison (Summers et Sherratt, 1988). Le mécanisme d'action de ce transcrit n'est pas connu, mais certaines études démontrent que le Rcd est produit et actif lors de la présence des multimères de ColEI et que sa surexpression ralentit la croissance cellulaire, bloquant directement la division cellulaire et ceci sans affecter le métabolisme cellulaire (Patient et Summers, 1993). Cet enchaînement d'action alloue le temps nécessaire à la résolution des dimères. L'absence des dimères entraîne la diminution de production du transcrit Rcd et permet de rétablir la croissance cellulaire à son rythme normal (Patient et Summers, 1993).

La stabilité plasmidique est donc possible par la coordination des trois procédés, soit le contrôle du nombre de copies, la résolution des multimères et le contrôle de la division cellulaire. C'est l'ensemble de ces éléments qui permet le bon fonctionnement de la stabilité plasmidique puisqu'individuellement, chaque procédé serait insuffisant et ne pourrait pas assurer la bonne répartition plasmidique.

1.2 La Recombinaison

1.2.1 Recombinaisons spécifiques de sites

La recombinaison site spécifique comme son nom l'indique est un système qui agit sur des séquences d'acides nucléiques précises. Les recombinases impliquées sont responsables d'une grande variété de réarrangements cellulaires comprenant le contrôle de la stabilité plasmidique, l'intégration et l'excision des bactériophages dans l'ADN bactérien et le contrôle de l'expression génique à l'aide d'« interrupteur » génétique par inversion des segments promoteurs. L'idée générale du fonctionnement qui ressort de ce système consiste en la présence de deux

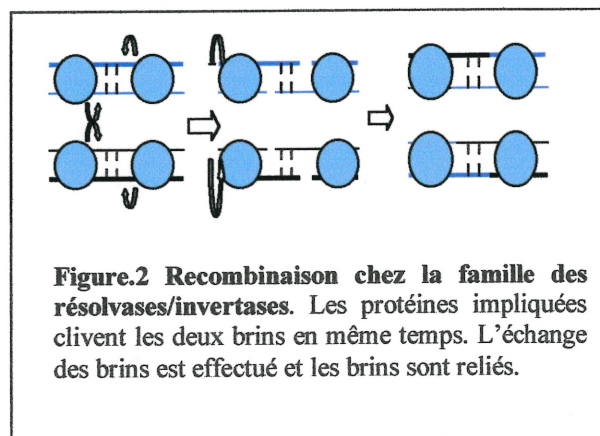


sites essentiels, dont les quatre brins seront éventuellement impliqués dans des étapes de clivages, d'échanges et de fermetures des brins. Le produit final qui résulte de cette action dépend de l'arrangement des sites de recombinaison les uns par rapport aux autres (Hallet et Sherratt, 1997). Lorsque les deux sites sont orientés en sens inverse sur le vecteur d'ADN, le produit final obtenu consistera en une inversion du segment situé entre ces deux sites (figure.1). Ce type de système est souvent observé dans les cas de contrôle d'expression génique afin de passer du stade non-transcrit à un stade transcrit, comme pour l'expression du gène *fimA* chez *Escherichia coli* (Dove et Dorman, 1994). Si par contre les sites sont orientés dans la même orientation, la production par excision ou résolution de deux produits distincts comprenant chacun un site de recombinaison sera observée (figure.1), un procédé important pour la monomérisation plasmidique.

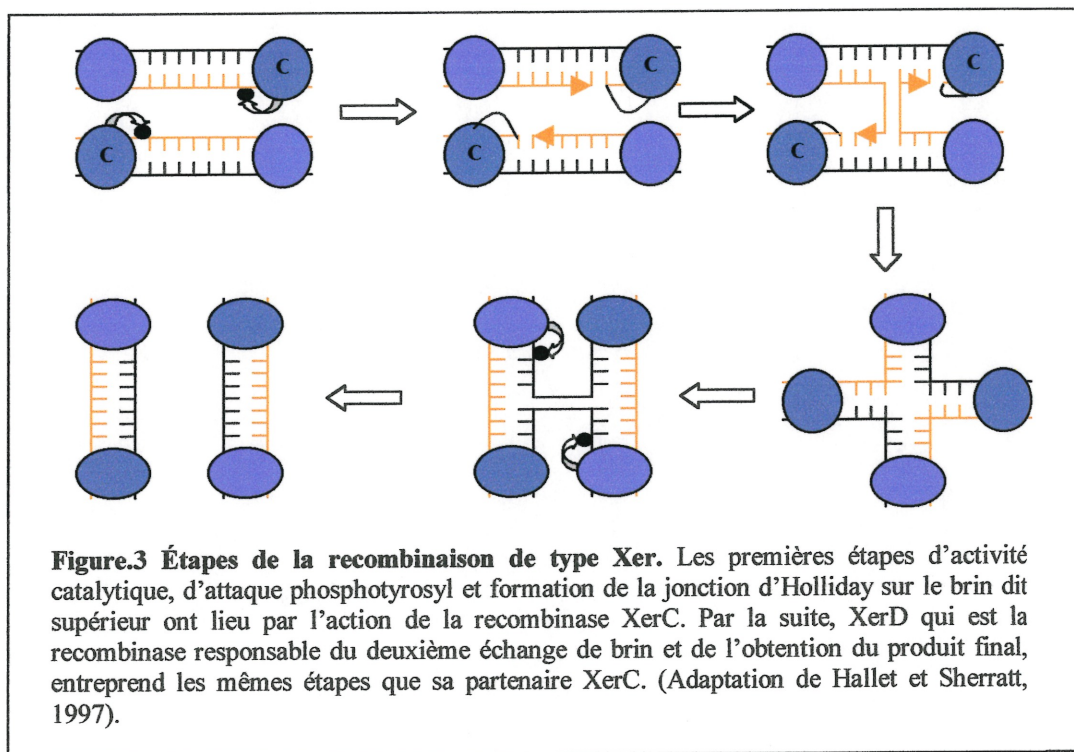
Ce type de recombinaison est un système dit conservateur puisque aucune dégradation, ni synthèse n'est nécessaire au bon fonctionnement de celui-ci. Ceci confère un avantage, car le système permet le retour aux conditions initiales, donc une ré-inversion du segment d'ADN ou de permettre une fusion plasmidique. De plus, le mécanisme d'action où deux étapes de transestérifications sont nécessaires ne demandent aucun co-facteur tel l'ATP (Hallet et Sherratt, 1997).

Les protéines nécessaires à la recombinaison spécifique de site sont classées en deux grandes familles qui diffèrent par leurs agents catalytiques, le groupement phosphate libéré par l'attaque et le nombre de brins impliqués dans l'échange (Hallet et Sherratt, 1997). La famille des

résolvases/invertases, qui comprend une quarantaine de membres, utilise une sérine comme agent catalytique et clivera les deux brins de chaque site dans une même étape pour procéder à la recombinaison (figure.2). Dans cette famille, l'attaque du nucléophile



libère un groupement 3'OH. L'autre famille qui comprend environ soixante membres (voir annexe II), celle des λ intégrases, possède une tyrosine catalytique au sein d'une tétrade nommée RHYR, pour laquelle les groupements R et Y sont requis pour l'activité de clivage et le résidu H pour la fermeture des brins (Argos, 1986; Abremski et Hoess, 1992). Un seul brin à la fois est clivé sur chacun des sites ce qui nécessite donc deux étapes de clivage et ligation (figure.3). De plus, contrairement à la famille des résolvases/invertases, les λ intégrases libèrent un groupement 5'OH lors de l'attaque nucléophile.



Voyons plus en détail les étapes de recombinaison de la famille des λ intégrases, plus précisément du groupe des recombinaisons Xer (figure.3). La première étape est catalysée par la tyrosine de la recombinaison XerC qui attaque le brin supérieur (défini par l'asymétrie des sites de recombinaison) (Blakely, 1997). Les actions sont faites sur les deux sites en même temps, ce qui signifie que les deux recombinaisons XerC agiront en concert. Cette attaque crée un lien 3'phosphotyrosyl, entre le site d'échange et la recombinaison, et libère un groupement 5'OH. Les sites d'échanges sont placés à proximité l'un de l'autre grâce à la formation du complexe présynaptique et ceci permet

à la deuxième étape d'avoir lieu. Le groupement 5'OH libéré lors de la première étape attaque le groupement 3'phosphotyrosyl de l'autre site d'échange afin de générer par isomérisation la jonction d'Holliday, la structure intermédiaire de la recombinaison. Par la suite, les seconds brins dits brins inférieurs seront traités de la même façon, mais cette fois avec la recombinase XerD, pour donner le produit final recombiné (Blakely, 1997).

1.3 La recombinaison spécifique de sites de type Xer

La recombinaison spécifique de site de type Xer est le système étudié dans ce travail. Il fonctionne tant au niveau chromosomique qu'au niveau plasmidique. Dans les deux cas, deux recombinases, XerC et XerD, sont nécessaires (Colloms *et al.*, 1990; Blakely *et al.*, 1993). Il existe certains points qui différencient la recombinaison chromosomique et la recombinaison plasmidique. Au niveau plasmidique, la présence des protéines accessoires, le répresseur d'arginine, ArgR et l'aminopeptidase A, PepA, est essentielle (Stirling *et al.*, 1988 et 1989). Ces facteurs accessoires ne sont pas utilisés lors de la recombinaison au chromosome, mais la présence de la protéine FtsK s'avère très importante à ce niveau. Le site d'échange est également différent, au niveau chromosomique car aucune séquence accessoire n'est nécessaire et se limite à environ 28pb, comparativement à la séquence plasmidique qui demande la présence de 160pb supplémentaires en amont du site d'échange pour les facteurs accessoires. Les détails de chacun des deux niveaux de recombinaison sont expliqués ici-bas.

1.4 Le système Xer au niveau chromosomique

1.4.1 Généralités

Le système de recombinaison Xer fait partie de la grande famille des λ intégrases. Les recombinases de cet ensemble sont retrouvées partout dans le règne bactérien, tant chez les bactéries gram-négatives telles *E.coli*, *Proteus vulgaris* et *Haemophilus influenza* que les gram-positives telles *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et les *Lactococcus*. Le système Xer s'applique à deux fonctions principales : la monomérisation des chromosomes rendus dimériques suite à un nombre impair de

recombinaisons homologues et la monomérisation des plasmides multimériques afin d'en assurer la stabilité plasmidique.

Au niveau chromosomique, la recombinaison spécifique de site de type Xer agit sur le site *dif* qui est situé dans la région terminale de réplication du chromosome. Ce site d'échange est constitué d'une séquence de 28pb, dont deux séquences de 11pb séparées par 6pb qui correspondent aux sites de fixation des recombinases XerC (bras gauches) et XerD (bras droits) (Tableau.I). Le site *dif* est unique sur le chromosome. Cependant, deux sites seront présents sur un dimère chromosomique formé après la réplication du chromosome et la recombinaison homologue. La présence des deux sites d'échanges *dif* permet la recombinaison intramoléculaire qui résultera de la production de deux chromosomes monomériques qui pourront être distribués lors de la division cellulaire. La monomérisation du dimère chromosomique n'a toutefois pas lieu immédiatement après la création du dimère (Steiner et Kuempel, 1998a). Elle ne s'effectue que lors de la division cellulaire, lorsque le septum sera correctement entamé et que la protéine FtsK, une protéine associée au septum, sera complète (Steiner, 1999).

Le système Xer au niveau chromosomique possède la capacité de procéder à des recombinaisons intra et intermoléculaires. Cependant, les observations faites tendent à démontrer que seule la recombinaison intramoléculaire a lieu *in vivo*, puisque le but du phénomène est de préserver les chromosomes répliqués sous forme monomérique (Pérals *et al.*, 2001). L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la monomérisation chromosomique n'a lieu que lors de la division cellulaire, par la suite les sites *dif* sont physiquement éloignés dans le processus de la ségrégation chromosomique ce qui distancie les sites et les empêchent de recombiner ensemble (Pérals *et al.*, 2001).

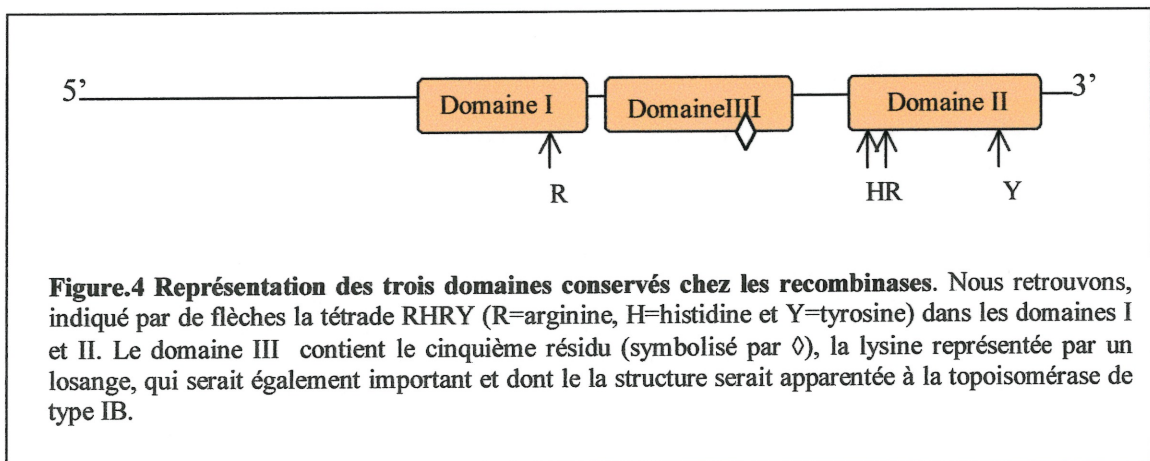
Tableau.I Alignement des sites d'échanges homologues de recombinaison de type Xer. (inspiré de Sherrat et al., 1993 et de Sciochetti, 2001)

Origine	Site d'échange	Bras gauches	Espacements	Bras droits
ColEI	<i>cer</i>	GGTGC GTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
ColA	<i>car</i>	GGTACCGTTAA	__CGGATG	TTATGGTAAAT
ColK	<i>crk</i>	GGTGC GTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
ColN		GGTGC GTACAA	_TAAGGGA	TTATGGTAAAT
CloDF13	<i>parB</i>	GGTACCGATAA	__GGGATG	TTATGGTAAAT
pHS-2	<i>hmr</i>	GGTGC GCGCAA	_TAAAATG	TTATGTTAAAT
pMB1		GGTGC GTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
PNTP16	<i>nmr</i>	GGTGC GCGTAA	_TGAGACG	TTATGGTAAAT
pSC101	<i>psi</i>	GGTGC GCGCAA	__GATCCA	TTATGTTAAAT
pPvu1		GGTTC CGATAA	__GACCCA	TTATGTTAAAC
plasmide R1		GGTGC GCATAA	__TGTATA	TTATGTTAAAT
Chromosome E.coli	<i>dif</i>	GGTGC GCATAA	__TGTATA	TTATGTTAAAT
Chromosome B.subtilis	<i>Bsdif</i>	ACTTCCTAGAA	__TATATA	TTATGTAAACT
Chromosome H.influenza	<i>Hidif</i>	ATTTCGCATAA	__TATAAA	TTATGTTAAAT

La recombinaison Xer agit et fonctionne en présence de dimère chromosomique seulement. Ce phénomène a été prouvé en comparant le taux de recombinaison au site *dif* en présence et en absence de recombinaison homologue (Pérals *et al.*, 2001). Dans une souche bactérienne *recA*⁻ d'*E.coli*, la fréquence de recombinaison diminuerait de 20 fois par rapport au taux normal dans une souche sauvage. De plus, deux voies de recombinaisons homologues existent. La voie RecBC est impliquée dans les cas de cassures doubles brins d'ADN et la voie RecF est requise au niveau du « single-strand gap ». L'inactivation d'une des deux voies donne des résultats similaires à un mutant *RecA*⁻, mais lorsque les deux voies sont bloquées, il y a absence totale de recombinaison site spécifique au site *dif*. La conclusion qui peut être tirée est que la recombinaison spécifique de site de type Xer au niveau chromosomique dépend de RecA et de la recombinaison homologue, et plus probablement de l'absence ou de la présence de dimère chromosomique (Pérals *et al.*, 2001).

1.4.2 Les recombinases

Les deux recombinases, XerC et XerD, sont les facteurs enzymatiques essentiels au processus de la recombinaison. Elles sont homologues à 37% et certaines des régions sont particulièrement conservées (Blakely *et al.*, 1993). Parmi celles-ci, on retrouve les domaines I et II qui sont très importants dans la classification des λ intégrases, dans lesquels on retrouve la tétrade RHRV (figure.4). L'arginine et la tyrosine sont importantes pour le clivage des brins et l'histidine est requise pour la ligation des brins. Un autre domaine, le domaine III est également important dans la classification. À l'intérieur de celui-ci, nous retrouvons une lysine (K) qui semblerait importante dans l'activité de clivage ou d'échange des brins. Ce résidu se trouverait dans un contexte qui l'apparente fortement à la topoisomérase de type IB (Cao et Hayes, 1999). XerC et XerD sont toutes les deux des protéines de 298 acides aminés et d'un poids moléculaire de 33.8kDa.



Le rôle de ces protéines est de catalyser les étapes de clivage, d'échange et de ligation des brins lors de la recombinaison. Il est probable que la présence de deux recombinases distinctes favorise un contrôle additionnel et permet une meilleure coordination catalytique (Blakely *et al.*, 2000). Les études *in vitro* ont démontré qu'au niveau du site *dif* d'*E.coli*, seule la présence des deux recombinases est nécessaire. XerC est la protéine qui initie les échanges de brins et permet la formation de la jonction d'Holliday. C'est suite à une conformation de la jonction que la protéine XerD entre en action et termine la recombinaison en effectuant le deuxième échange (Blakely

et al., 2000). La liaison au site *dif* par les deux protéines peut être effectuée indépendamment l'une de l'autre. Ensemble cependant, les protéines démontrent une coopérativité, surtout au niveau du site *cer* de ColE1 où la liaison de XerD doit être effectuée en premier afin d'aider et permettre la liaison de XerC (Blakely, 1993).

1.4.3 La protéine FtsK

La protéine FtsK est une protéine membranaire localisée au septum lors de la division cellulaire. Elle est constituée de 1329 acides aminés (~147kDa) et est divisée en trois régions. La région N-terminale possède une hélice trans-membranaire qui localise la protéine au septum, la région centrale riche en proline et glutamine n'a pas de fonction connue et la région C-terminale est la partie impliquée dans la ségrégation des chromosomes (Begg *et al.*, 1995).

Les connaissances actuelles sur l'implication de cette protéine au niveau de la recombinaison Xer chromosomique tentent à démontrer que FtsK serait la protéine responsable de la détection de la présence des dimères chromosomiques et permettrait par son interaction au site *dif* de diriger la recombinaison de ce site au moment de la division cellulaire (Gavin *et al.*, 1999; Barre *et al.*, 2000; Hendricks *et al.*, 2000).

Lorsque les chromosomes nouvellement répliqués demeurent sous la forme monomérique, la protéine FtsK n'a pas lieu d'agir, car chaque chromosome est rapidement ségrégué de chaque côté du septum avant sa fermeture. Cependant, lorsqu'un dimère chromosomique est formé la ségrégation est impossible. La forme dimérique est alors détectée au niveau du septum et la recombinaison peut avoir lieu (Recchia *et al.*, 1999; Barre *et al.*, 2000). On peut donc croire que ce phénomène permet de contrôler l'instant où doit avoir lieu la recombinaison (Barre *et al.*, 2000). Après la création du dimère chromosomique, la recombinase XerC effectuerait son travail comme prévu peu importe que la division cellulaire soit commencée ou non. XerC permettrait la création de la jonction d'Holliday, mais cette jonction serait instable et comme la jonction n'a pas la bonne conformation pour permettre aux étapes subséquentes de la recombinaison d'avoir lieu, nous retrouvons inévitablement les substrats de départ (Barre *et al.*, 2000).

Lors du commencement de la division cellulaire, la ségrégation chromosomique débute. Cependant, la présence du dimère empêche cette étape de bien fonctionner et les sites *dif* se retrouvent alors au bord du septum, donc en lien avec la protéine FtsK. Comme cette protéine agit après la formation de la jonction d'Holliday (Barre *et al.*, 2000), il est proposé que la protéine FtsK soit responsable du changement nécessaire de la conformation de cette jonction; ceci dans le but de permettre à XerD d'agir et de résoudre les dimères allouant ainsi la bonne ségrégation des chromosomes juste avant la fermeture du septum (Recchia *et al.*, 1999; Barre *et al.*, 2000).

1.5 Le système Xer au niveau plasmidique

La recombinaison Xer plasmidique a lieu essentiellement sur les plasmides multicopies, comme ColE1, ColK, CloD13 et pSC101. Ici, contrairement à ce qui est observé au niveau chromosomique, la présence des recombinases XerC et XerD n'est pas suffisante, car la présence de facteurs accessoires est essentielle. La majorité d'entre eux utilise les mêmes protéines, soit les protéines accessoires ArgR et PepA, sauf pour le plasmide pSC101 qui demande la présence de PepA seulement. Le plasmide le plus étudié est le ColE1. Ce dernier possède un site d'échange nommé *cer*, de 260pb, et qui s'apparente au site *dif* chromosomique (tableau.I).

1.5.1 Le site *cer* du plasmide ColE1

Le site d'échange *cer* (280pb) demeure, comme tous les sites de recombinaison Xer, très conservé (Summers et Sherratt, 1984). Il possède les deux séquences de 11pb de liaison des recombinases, mais elles sont espacées de 8pb au lieu de 6pb. De plus, une séquence accessoire à gauche du site de liaison de XerC est essentielle pour la liaison des facteurs accessoires. Environ 100pb à gauche de XerC, on retrouve une demi-boîte d'arginine (figure.6). Normalement, la séquence de reconnaissance de la protéine ArgR est constituée de deux séquences répétées de 18pb, donc une demi-boîte correspond à une seule séquence de 18pb. De part et d'autre de cette demi-boîte d'arginine, des séquences consensus de liaison possible de PepA ont également été trouvées. Bien qu'aucune preuve de retardement ne démontre une interaction de PepA au site *cer*, des études de «DNAI footprint» ont montré une protection de l'ADN causée par la présence

de l'aminopeptidase A, qui pourrait être un indice de l'interaction de cette protéine (voir section 1.5.2.2).

1.5.2 Les protéines accessoires

L'implication des protéines accessoires au niveau de la recombinaison est connue. Elles assurent l'activation du complexe synaptique pour enclencher le processus de recombinaison dans le cadre d'une réaction intramoléculaire et elles empêchent la recombinaison intermoléculaire. Cependant, la manière dont elles s'y prennent demeure au stade hypothétique, surtout en ce qui concerne les interactions protéine-protéine et protéine-ADN. La formation du complexe synaptique et l'emplacement d'une protéine versus les autres sont également au niveau de la supposition.

1.5.2.1 Le répresseur d'arginine, ArgR

ArgR, comme son nom l'indique, est le répresseur de la biosynthèse d'arginine. Il est responsable de la répression des 9 unités transcriptionnelles qui encodent pour les 12 gènes de cette voie chez *E.coli* (Cunin *et al.*, 1986). La voie de la biosynthèse d'arginine est une voie importante et cette importance est visible par le niveau de conservation que l'on retrouve chez cette protéine au cours de l'évolution bactérienne, tant chez les gram-positives que les gram-négatives (annexe I). ArgR de *E.coli* est un homo-hexamère de 16,5kDa et chaque monomère est composé de 156 acides aminés (figure.5). La formation de la protéine débute par la formation d'un trimère pour ensuite passer à la dimérisation de deux trimères (Lim, 1987). Une comparaison d'homologie entre ArgR d'*E.coli* et de *B.subtilis* montre que la partie N-terminale de la protéine, responsable de la liaison à l'ADN, possède 19% d'homologie et la région C-terminale, responsable de

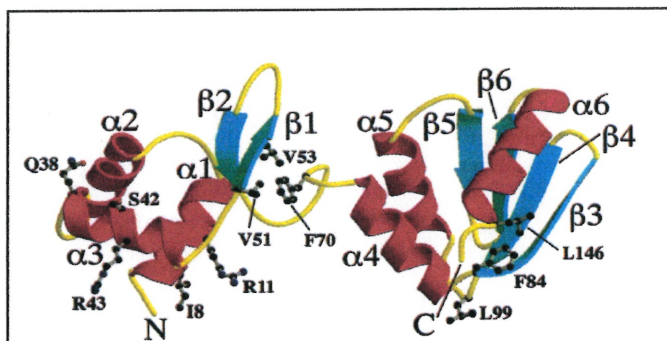
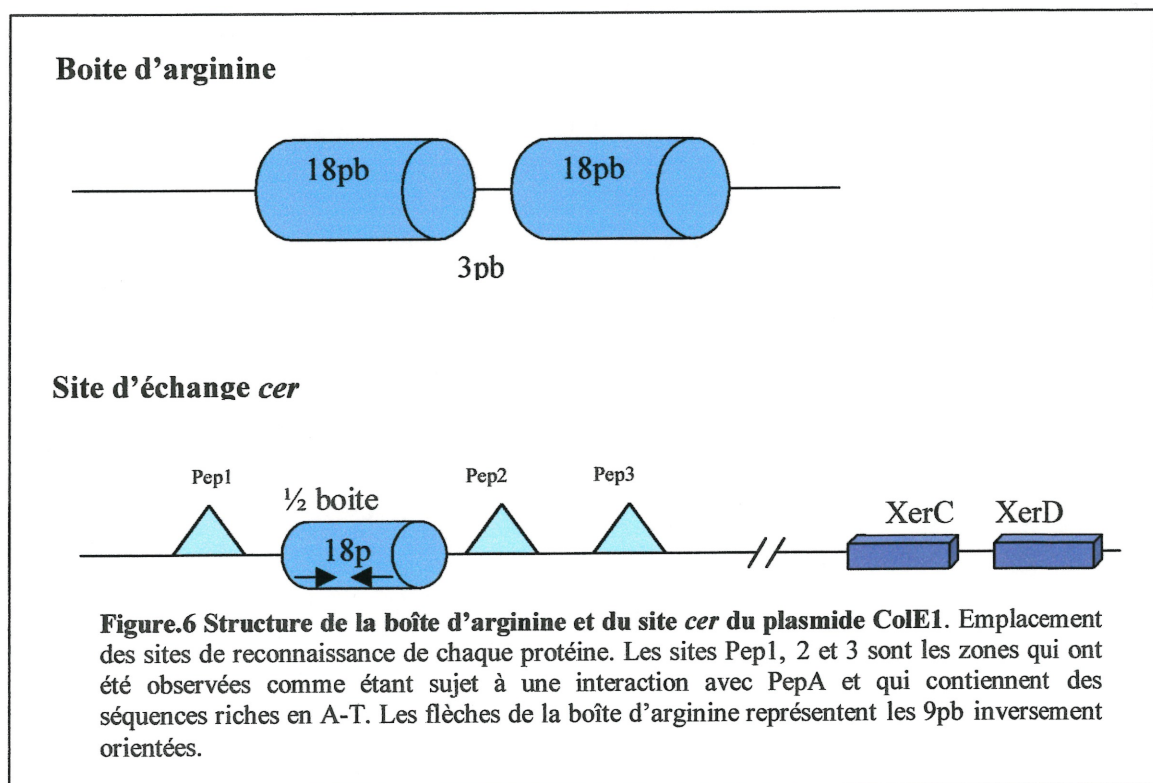


Figure.5 Structure en ruban d'un monomère du répresseur d'arginine de *B.stearothermophilus*. Par la conservation génomique à travers les espèces, il est possible de croire que la structure de *E.coli* est sensiblement la même. Une structure de la protéine de *E.coli* existe, mais elle comporte des oublis importants. (Tiré de Ni *et al.*, 1999).

la liaison à la L-arginine et de l'oligomérisation, a 35% d'homologie, pour un grand total de 27% (Burke *et al.*, 1994; Tian et Maas, 1994). Malgré ce faible niveau d'homologie, AhrV de *B.subtilis* peut compléter une souche d'*E.coli* mutée pour ArgR (Strirling *et al.*, 1988b; Smith *et al.*, 1989). Ceci peut s'expliquer par la séquence de liaison à l'ADN.

Normalement, ArgR est une protéine qui reconnaît une séquence d'ADN spécifique nommée la boîte d'arginine, « ARG box ». Chez *E.coli*, cette boîte est constituée de deux séquences de 18pb. Ces deux séquences sont séparées par 3pb. À l'intérieur des 18pb, deux séquences inversement orientées sont retrouvées (figure.6) (Lim *et al.*, 1987). Dans la plupart des cas, la boîte d'arginine chevauche l'opérateur de chacune des unités transcriptionnelles et aussi de son propre promoteur. Les boîtes d'arginine que nous retrouvons au sein des différents génomes et même au sein d'un même génome ne sont que faiblement conservées (annexe III) (Makarova et al., 2001). La présence de site en tandem (les deux séquences de 18pb) permet une meilleure spécificité de site, malgré la faible conservation, par la coopérativité des interactions entre les deux séquences. Chez *E.coli*, la séquence consensus des 9 unités transcriptionnelles est TNTGAATWWWATTTCANW (Makarova et al., 2001).



La plupart des séquences recherchées chez d'autres espèces bactériennes ont été faites en comparaison avec la séquence d'*E.coli*. Chez *B.subtilis*, la séquence serait CATGAATAAAAATKCAAK.

Les premières études portant sur la recombinaison au site *cer* ont montré l'implication d'un gène à ce moment nommé *xerA*. Après comparaison de séquence, il s'est avéré que le gène *xerA* était en fait *argR* (Stirling *et al*, 1988). ArgR n'a pas de fonction enzymatique pour la recombinaison. Il est plutôt impliqué dans la formation du complexe pré-synaptique en permettant le rapprochement des deux sites *cer* qui devront être recombinés. Son rôle peut facilement être interprété par la manière dont est construit le site *cer*. Dans le cas du site *cer*, nous retrouvons qu'une demi-boîte d'arginine (figure.6). La liaison à cette demi-boîte est possible, mais son affinité pour la séquence est 100 fois plus faible. Il est donc possible de croire que la présence de deux demi-boîtes permet la reconstitution du site et donc d'une bonne liaison. La L-arginine est un co-répresseur de ArgR et doit être présent lors la répression de la biosynthèse d'arginine et pour la recombinaison au site *cer*. Le rôle de ce co-répresseur est de stabiliser l'hexamère de ArgR, ce qui permet de passer à un niveau de liaison faible à une liaison stable (Van Duyne *et al.*, 1996). En fait, la forme hexamérique est très importante pour les fonctions de ArgR, car des études ont démontré que des mutants ArgR qui ne pouvaient qu'être retrouvés sous forme de trimère conservent la capacité de lier la boîte d'arginine, mais ils sont incapables de réprimer les gènes de la biosynthèse d'arginine et incapables de compléter la recombinaison spécifique de site de type Xer (Chen *et al*, 1997).

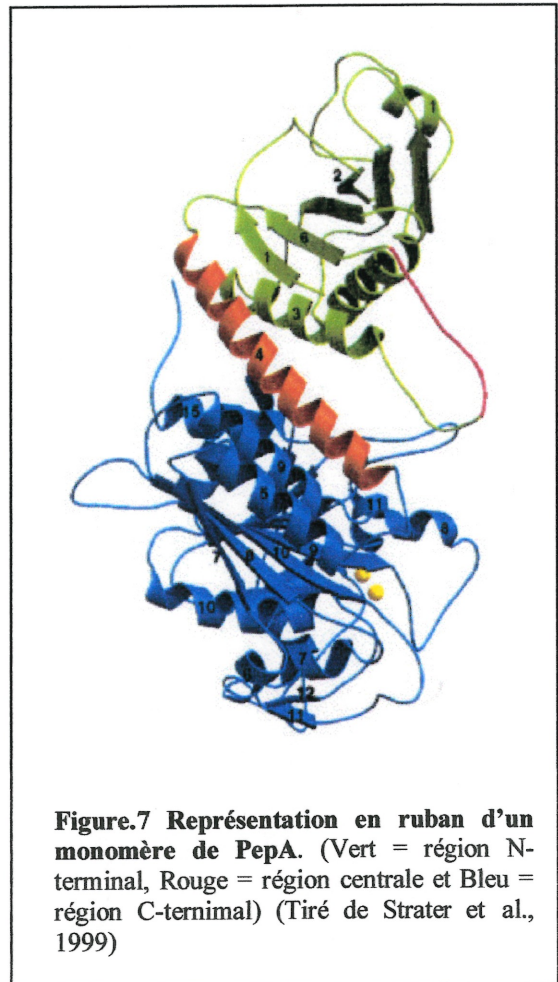
1.5.2.2 L'aminopeptidase A, PepA

L'aminopeptidase A d'*E.coli* est une exopeptidase cytoplasmique de la famille des métallopeptidases. Elle est responsable du clivage de la partie N-terminale des peptides endogéniques et exogéniques (Gonzales, 1996). Elle se spécialise dans le clivage au niveau des leucines et méthionines.

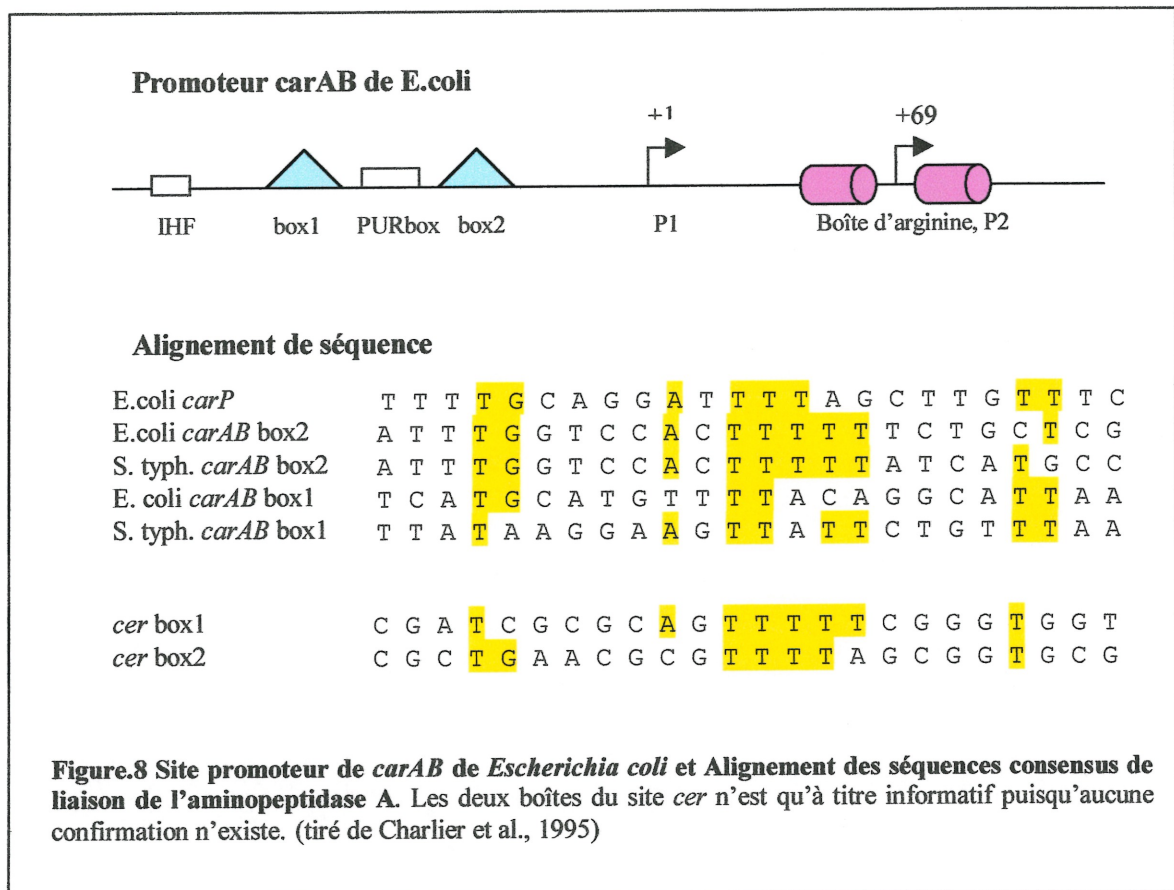
Cette protéine de 330kDa est constituée de 6 monomères de 503 acides aminés (55.3kDa) (figure.7) (Vogt, 1970). Elle forme un hexamère en solution et elle est fortement apparentée à la leucine-bovine peptidase avec 31% d'homologie, dont 52% d'identité dans la région C-terminale (Stirling *et al.*, 1989).

Lors des premières études sur la recombinaison au site *cer*, il avait été remarqué que la présence du gène *xerB* était essentielle. Suite à des analyses, *xerB* s'est révélé être l'aminopeptidase A (Stirling *et al.*, 1989), un événement surprenant pour une aminopeptidase de pouvoir interagir avec l'ADN. En fait, il a été démontré que PepA jouait le rôle de répresseur au niveau du promoteur *carAB* qui contrôle la

synthèse de la carbomoylphosphate synthétase également impliquée dans la biosynthèse d'arginine (Charlier *et al.*, 1995a et 1995b). La régulation de la synthèse de la carbomoylphosphate synthétase est faite grâce à la présence de deux promoteurs, P1 et P2. Le contrôle du promoteur P1 est régulé par la présence de PepA et de IHF (« integration host factor »). La présence de pyrimidines dans le milieu augmente la répression au promoteur en agissant sur l'action de IHF. En fait, ces deux protéines induiraient la topologie nécessaire à l'ADN pour moduler l'activité du promoteur. En ce qui concerne PepA, le site de liaison de PepA chevauche le promoteur pyrimidique de cette voie (figure.8). Au niveau du promoteur P2, on retrouve une boîte d'arginine qui démontre la répression de ArgR à ce site, mais qui possède une activité de régulation secondaire au promoteur P2. PepA se lie aussi à son propre promoteur *carP*. Les sites de liaison de PepA ont été comparés et l'observation qui en ressort est que la séquence de



liaison est riche en A-T et qu'elle est constituée de deux séquences de 25-30pb espacées d'environ 60-65pb (Charlier *et al.*, 1995a).



Au site d'échange *cer*, la séquence de liaison n'a pu être défini avec certitude. Des régions similaires, riche en A-T, ont été identifiées en amont du site *cer* et une étude de « DNA footprint » montre trois régions protégées sensiblement similaires au site *carAB* (Alèn, 1997). Un site de protection se retrouve en amont de la demi-boîte d'arginine et les deux autres sont entre la demi-boîte et le site de liaison de XerC (figure.8).

Le rôle de PepA au niveau de la recombinaison n'est pas très bien compris. Toutefois, certains indices portent à croire que cette protéine joue d'avantage un rôle structural qu'enzymatique. En fait, il est connu que l'activité de clivage de l'aminopeptidase n'est pas nécessaire pour son travail au sein du complexe synaptique (McCulloch, 1994). La structure tridimensionnelle de PepA a été déterminée et à la

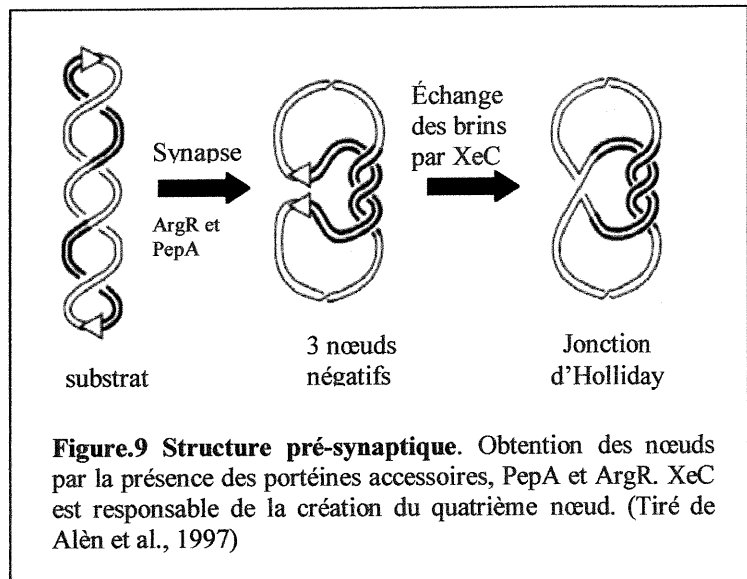
surface de celle-ci, il est possible d'observer trois sillons qui seraient le lieu d'interaction entre la protéine et l'ADN (Sträter, 1999). En fin de compte, il est possible de croire que PepA serait le facteur clé dans la détermination de la structure du complexe pré-synaptique (Alèn, 1997). En effet, cette même protéine est requise pour la résolution du plasmide pSC101 à partir du site *psi* et contrairement au site *cer*, le site *psi* n'a besoin que de la présence du facteur accessoire PepA pour assurer la recombinaison intramoléculaire, cela sans la présence de ArgR (Colloms, 1998). Pour remplacer en quelque sorte ArgR, la protéine ArcA, alors phosphorylée, qui est une protéine impliquée dans la médiation des conditions de croissance anaérobique, semble aider l'action de PepA à ce niveau en lui conférant une meilleure efficacité (Colloms, 1998).

Une étude de mutagenèse aléatoire sur l'aminopeptidase A a récemment été publiée (Charlier *et al.*, 2000). Cette étude comprend des données partielles sur un groupe de mutants possédant soit une mutation unique ou des mutations multiples au sein de la même séquence. Selon l'auteur, certains indices indiqueraient que PepA posséderait des fonctions de liaison à l'ADN en majorité dans sa région N-terminale, mais également à l'extrémité C-terminale et ceci pour la liaison au site *carA*. Dans la majorité des mutants étudiés, les effets sur le système Xer n'ont pas été démontrés. Il reste donc beaucoup de travail pour réussir à caractériser cette protéine.

1.5.3 La formation du complexe pré-synaptique

Le mécanisme d'échange des brins doit avoir une géométrie fixe. Il est donc nécessaire que le complexe soit formé de la bonne manière pour permettre aux deux sites d'échanges (ex : *cer*) d'être alignés parallèlement. Il existe deux théories concernant la manière dont les sites viennent en contact (Hogmans, 1998). La première consiste à la collision aléatoire entre les sites. Comme son nom l'indique, elle réfère à un mouvement aléatoire du plasmide qui éventuellement entraîne la rencontre entre les deux sites d'échange. La seconde est le modèle du glissement « slithering model ». Ce dernier veut qu'un plasmide surenroulé glisse sur lui-même créant une rotation qui entraîne éventuellement la rencontre entre les sites. Mais, peu importe lequel des mécanismes est le bon, le résultat final est qu'il y a formation du complexe pré-synaptique. Le complexe

pré-synaptique est la structure qui doit être formé avant l'action des recombinaisons XerC et XerD. Le rôle des protéines accessoires est très important à ce niveau. ArgR entraîne le rapprochement des deux sites *cer* qui rappelons-le, possèdent chacun une demi-boîte d'arginine. Cette protéine est connue pour sa capacité de courber l'ADN dans un angle de 65° (Alén, 1997). Le rôle joué par PepA n'est pas déterminé, mais il est fort probable qu'une action structurale expliquerait son implication dans le système. En fait, PepA serait le facteur clé dans la définition de la structure du complexe, car une étude démontre que le surenroulement du vecteur ne serait requis qu'après la formation de la structure, contrairement à ce qui était pensé auparavant (Alén, 1997). Une suggestion a été faite selon laquelle



l'interaction de PepA au promoteur *carAB* impliquerait un enroulement de l'ADN autour de l'aminopeptidase A (Charlier, 1995). De plus, la structure de PepA démontre la présence de trois sillons qui seraient des sites présumés de liaison de l'ADN et pourraient contenir entre 40-50pb (Sträter, 1999). Si ce même principe s'applique à la formation du complexe pré-synaptique, cela expliquerait la formation des 3 nœuds qui emprisonnent 3 supertours négatifs d'ADN lors de la présence de ArgR et PepA (figure.9) (Alén, 1997). La présence des deux protéines en même temps est très importante puisque seule n'entraîne que 0.5 supertours (Alén, 1997).

Ensemble, les deux protéines accessoires assurent l'activation du complexe synaptique tout en imposant une contrainte dans l'orientation de la réaction, empêchant la recombinaison intermoléculaire (multimérisation). Pour des raisons stériques, s'il existe une interaction entre les protéines accessoires, elle devrait avoir lieu par leur région C-terminale (Hogmans *et al*, 1998). Le meilleur modèle existant actuellement sur

la formation du complexe au niveau du site *cer* implique la présence d'un seul ArgR pris entre deux PepA (figure.10). Ce modèle est amplement flexible pour permettre l'ajustement des positions des protéines les unes par rapport aux autres et tient compte de divers facteurs toujours ambigus tels les sites de liaisons exacts de PepA, l'existence d'interactions protéiques entre les facteurs accessoires et les recombinases et la possibilité d'un changement de conformation de la part de l'aminopeptidase A une fois liée à l'ADN (Sträter, 1999). De plus, le modèle tient compte du nombre de nœuds engendrés par le complexe synaptique.

Plusieurs questions sont sans réponse qui une fois répondues pourront infirmer ou non les notions supposées sur le rôle joué par l'aminopeptidase A dans la recombinaison spécifique de sites de type Xer. PepA reconnaît-il une séquence spécifique ou bien reconnaît-il plutôt une structure, courbature de l'ADN tout comme le fait la protéine IHF? Existe-t-il vraiment des interactions entre PepA et les autres protéines du système Xer? C'est pour essayer de répondre à ces questions que les expériences de ce travail ont été faites. Tenter de caractériser davantage l'aminopeptidase A dans cet environnement, qui semble à prime abord étrange pour une aminopeptidase, mais qui par sa structure hexamérique peut être compréhensible. La mutagénèse sera l'outil privilégié afin de trouver des secteurs protéiques, des acides aminés essentiels au bon fonctionnement de PepA dans le contexte de la recombinaison.

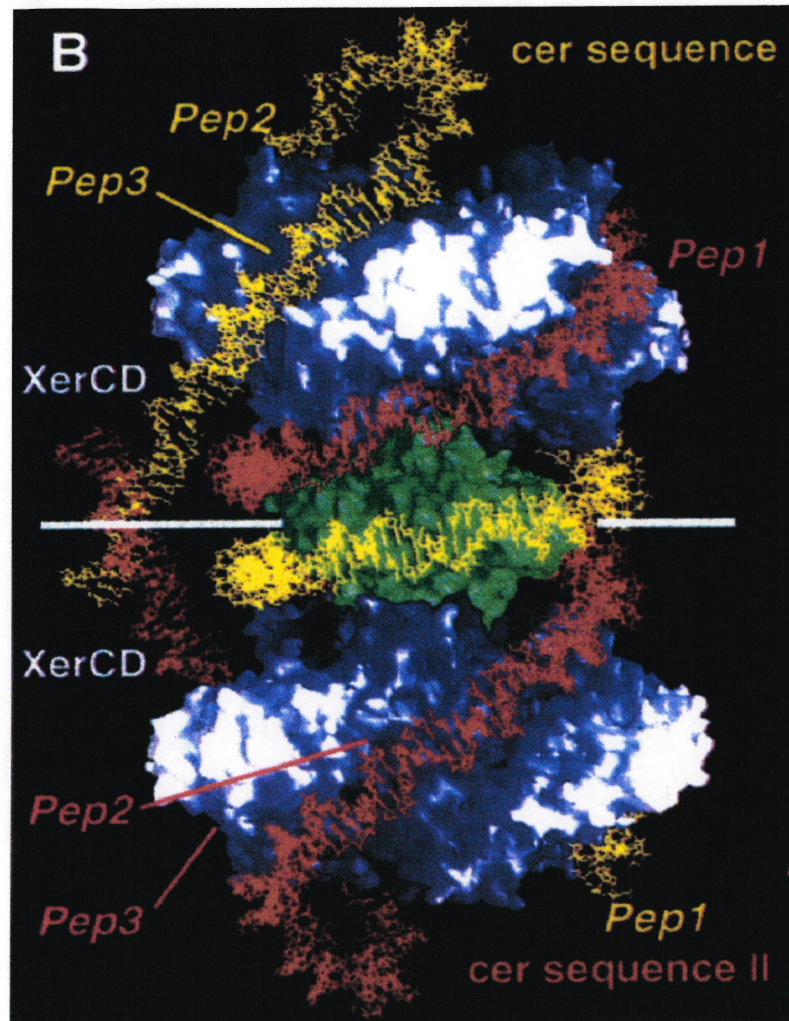


Figure.10 Modèle de la structure du complexe synaptique aux sites *cer*. Une protéine de ArgR (vert) est placée entre deux PepA (bleu). L'ADN est enroulé autour des ces dernières et les zones de contact possibles entre PepA et l'ADN est indiqué. (tiré de Strater et al., 1999)

Matériels et Méthodes

2. Matériels et Méthodes

2.1 Souches bactériennes et milieux de croissance

Les souches bactériennes utilisées sont énumérées dans le tableau II. La croissance a été faite dans le milieu Luria Broth soit en milieu liquide selon les recommandations du fabricant, soit en milieu solide en ajoutant 1.5% d'agar. L'utilisation du milieu minimal A est nécessaire pour les expériences de dosage β -galactosidase et pour les tests de toxicité à la valine-leucine. Le milieu minimal A est composé de 1.05g de K_2HPO_4 , 0.45g de KH_2PO_4 , 0.1g de $(NH_4)_2SO_4$ et de 0.05g de citrate de sodium dans un volume de 100ml et il est additionné de 20 μ g/ml de thiamine hydrochloride, 1mM de $MgSO_4$, de 0.4% de glucose, 1.5g/100ml de casamino acids et 50 μ g/ml de cytidine, ceci pour les dosages de β -galactosidase. Les tests de toxicité ont également été faits en milieu minimal A solide, mais cette fois-ci additionnée 0.5mM de $MgSO_4$, 0.5mM de thiamine hydrochloride, 0.2% de glucose, 40 μ g/ml du mélange en acides aminés Mix941 (qui contient de la leucine, de l'histidine, de la thréonine, de la proline et de l'arginine), de 1.5% d'agar et de 75 μ g/ml de valine-leucine. Les antibiotiques ont été utilisés selon nécessité comme suit : 100 μ g/ml d'ampicilline, 6.25 μ g/ml de tétracycline, 25 μ g/ml de kanamycine, 34 μ g/ml de chloramphénicol et de 25 μ g/ml de Trimethoprim.

2.2 Transduction

Les transductions ont été utilisées dans le but de créer une souche *pepA⁻*, *argR⁻* et *pcarA-lacZ* afin de procéder à des dosages β -galactosidases sur le promoteur *carA*. La transduction nécessite deux étapes : la préparation du lysat phagique et de la transduction proprement dite.

Tableau .II Liste des souches de *E.coli* utilisées

Souches d' <i>E.coli</i>	Génotype	Références
DH5- α	<i>EndAI hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA(nalR) relA1, \Delta(lacZYA.argF) U169 deoR</i> ($\phi 80dlac\Delta(lacZ)M15$)	Raleigh <i>et al.</i> (1989)
DS941	<i>lacI^q lacZ\Delta M15 recF</i> dans AB1157	Summers and Sherrat (1988)
DS947	Idem à DS941, mais Δlac H ₂₂₀ (donc <i>lacI⁻</i> et <i>lacZ⁻</i>) et <i>sup^o</i>	Burke <i>et al.</i> (1994)
DS951	<i>XerA5</i> dans DS947	Non publié
DS956	<i>ArgR</i> : :Tp ^f dans DS941	Flinn <i>et al.</i> (1989)
DS957	<i>PepA</i> : :Tn5 Km ^r dans DS941	Striling <i>et al.</i> (1988)
DS955	<i>ArgR</i> : :Tp ^f dans DS941, <i>xerB</i> : :Tn5 Km ^r	Non publié
RFM443	<i>LacZ\Delta 74</i>	Don de Sherrat, non publié
RFM956	<i>ArgR</i> : :Tp ^f (de DS956) dans RFM443	Ce travail
RFM600	<i>PcarA-lacZ-Ap^f</i> (de C-600B) dans RFM956	Ce travail
RFM655	<i>PepA</i> : :Km ^r (de DS957) dans RFM600	Ce travail
C-600B	Δ (<i>prolac</i>) <i>carP6</i> , portant <i>carA-lacZ</i> 14 :40, Ap ^f , gène <i>pepA⁻</i> et <i>argR⁺</i>	Charlier <i>et al.</i> (1995b)
C-955B	<i>ArgR</i> : :Km ^r (de DS951) dans C-600B	Ce travail

2.2.1 Préparation du lysat phagique, P1vir

Des lysats à partir de souches bactériennes DS951, DS956, DS957 et C600B ont dû être faits pour faire toutes les constructions voulues (Millet, 1972).

Une culture de 18 heures de 5ml de LB de la souche nécessaire (DS951, DS956, DS957 ou C600B) avec l'antibiotique approprié est requise pour débiter l'expérience. De cette culture, des sous-cultures sont produites toujours dans un volume de 5ml avec l'antibiotique à laquelle nous ajoutons 5mM de CaCl₂ et 0.2% de glucose. L'ensemencement de ce milieu est réalisé en 6 exemplaires : trois des tubes seront ensemencés avec une dilution de cellules bactériennes 1/50 (i.e. 100 μ l dans le 5ml) et les trois autres avec une dilution 1/100 (i.e. 50 μ l dans le 5ml). Ces six tubes doivent être incubés à 37°C pendant 2 heures, sans agitation. Une fois l'incubation terminée, on ajoute le phage P1vir selon le rapport de dilution suivant : 1^{er} tube = 100 μ l de phage non dilué, 2^{ième} tube = 100 μ l de phage dilué 1/20 et le 3^{ième} tube = 50 μ l de phage dilué 1/20,

ceci pour les deux dilutions de sous-cultures préparées à l'étape précédente. La dilution du phage est faite dans le tampon MC stérile (100mM de MgSO₄ et 5mM de CaCl₂). Toutes les cultures sont alors incubées à 37°C de 2h00 à 2h30, avec agitation. Il est à noter qu'une incubation de cette durée est amplement suffisante pour l'obtention d'un bon lysat phagique. Par la suite, les cultures sont transférées dans des éprouvettes jetables allant dans une centrifugeuse (Damom/IED Division). Nous ajoutons 300µl de chloroforme à chacun des tubes et mélangeons vigoureusement au vortex pendant un minimum de 30 secondes. Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 4°C, 1500rpm. Les surnageants sont récoltés et déposés dans de nouvelles éprouvettes. Il faut ensuite ajouter 2-3 gouttes de chloroforme, puis mélanger et centrifuger. Les produits obtenus sont conservés au réfrigérateur (4°C) en gardant le chloroforme résiduel.

2.2.1.1 Titration du lysat phagique P1_{vir} en gélose molle

Pour titrer un lysat, il est nécessaire de partir d'une culture fraîche (18 heures de croissance en milieu LB) de souches DH5-α (par exemple) et de faire une dilution 1 :1 dans un milieu frais. Incuber cette culture 1 heure à 37°C sans agitation. Pendant ce temps, préparer les dilutions suivantes du ou des lysats à tester: 1/2, 1/4, 1/8 dans le tampon MC. Prendre 300µl de chaque dilution et l'ajouter aux cultures après l'heure d'incubation de ces dernières. Un contact entre cellules et phages de 5 minutes à 37°C est nécessaire. Par la suite, ajouter 4.5ml de gélose LB molle (0.6%)liquéfiée, qui a été refroidi à 55°C, et le tout est légèrement mélangé et coulé sur une boîte de pétri LB à 1.2% d'agar. L'utilisation d'antibiotique n'est pas nécessaire, car nous recherchons à savoir l'efficacité d'infection du lysat par l'observation de plage de lyse.

2.2.2 Protocole de transduction

Plusieurs transductions différentes ont été faites pour obtenir les souches bactériennes voulues, par exemple la construction de la souche RFM956 à partir de RFM443 (utilisation du lysat de DS956), RFM600 à partir de RFM956 (utilisation du lysat C600B), RFM655 à partir de RFM600 (utilisation du lysat DS957) et de C955B à partir de C600B (utilisation du lysat de DS951). Toutes ces constructions ont nécessité le même protocole sans aucune modification.

Le protocole de la transduction (Millier, 1972) débute par la récolte d'un culot de 1,5ml de cellules de la souche bactérienne que l'on désire modifier et qui a poussé 18 heures dans un milieu LB avec antibiotique. Le culot est suspendu dans 450µl de tampon MC stérile (100mM de MgSO₄ et 5mM CaCl₂). Avant de mettre en contact les phages et les cellules bactériennes, il faut préparer les dilutions du phage P1_{vir} suivantes : 1/3 (soit 33µl de phages dans 67µl de tampon MC) et 1/10 (soit 10µl de phage dans 90µl de tampon MC). Ajouter à ces 100µl de dilutions phagiques, 100µl de cellules. Il faut également préparer un témoin négatif de transduction qui consiste simplement à remplacer les dilutions de phages par 100µl du tampon MC. Tous les tubes eppendorfs sont mélangés délicatement et incubés à 37°C pendant 20 minutes, sans agitation. Après ce délai, ajouter 200µl de tampon citrate stérile (9,6g d'acide citrique, 4,4g de NaOH pour un volume de 500ml, pH à 5.5) pour arrêter l'infection cellulaire. Centrifuger le tout à 13000rpm pendant 1 minute et resuspendre le culot dans 1ml de LB avec 400µl de tampon citrate. Incuber les tubes pendant 1 heure à 37°C avec agitation. Pour terminer, centrifuger les tubes et vider partiellement le contenu en liquide afin de permettre l'étalement de 100 à 150µl de cellules sur les pétris LB avec l'antibiotique approprié.

Comme toutes les transductions effectuées consistaient à transférer des gènes interrompus par une cassette d'antibiotique, toutes les sélections ont été faites en ciblant cette dernière. Par exemple, la construction de RFM956 a nécessité l'étalement sur milieu MH avec trymethroprim, RFM600 sur milieu LB avec ampicilline, RFM655 et C955B sur milieu LB avec kanamycine. Donc, normalement lorsque la transduction a fonctionné nous observons la croissance de colonies sur le milieu de sélection. Il faut vérifier que l'insertion dans le chromosome est allée au bon endroit.

2.3 Hybridation de type «Southern blot»

Le Southern blot est la technique utilisée pour vérifier l'intégrité des mutants génomiques (RFM956, RFM600, RFM655 et C955B) faites par transduction (Ausubel *et al.*, 1994). Deux éléments ont été vérifiés par Southern blot; le promoteur *carA* et la construction *lacZ*. Donc, la première étape consistait à préparer les sondes contre ces deux éléments.

2.3.1 Sonde du promoteur *carA*

La sonde contre le promoteur *carA* a d'abord été amplifiée par PCR puis marquée à la digoxigénine dUTP alcaline labile. Le produit de PCR a été obtenu comme suit; à partir de l'ADN génomique de *E.coli* DH5- α , les amorces ont été synthétisées (carAB-F = 5'AGGGCTTTAATTTTGGCCC3' et carAB-argbox = 5'GGCCCGACCGTGAAACTG3'). Donc, 200ng d'ADN, 8 μ mole de chacune des amorces carAB-F et carAB-argbox, 200 μ M de dNTP, 1x du tampon de réaction de Qiagen, 1x du tampon Q de Qiagen, ainsi que 2.5 unités de la Taq polymérase sont nécessaires. Le cycle utilisé fut le suivant ; 95°C pour 1 minute, puis une répétition de 30 cycles avec les températures et temps suivantes, 95°C pour 15 secondes, 54°C pour 30 secondes, 72°C pour 20 secondes. Après ces 30 cycles, une extension finale a lieu à 72°C pendant 5 minutes (appareil CyclePro personnel thermal cycler No.CP-40, Bio/Can Scientific). Le fragment que l'on obtient est de 458pb. Il est purifié sur gel d'agarose 0.8% avec le kit 20021 de Qiagen QIAEXII, qui permet une extraction du segment d'ADN à partir d'un gel d'agarose à l'aide d'une résine. Comme ce produit de purification d'ADN sur agarose permet une récupération d'ADN dans un volume de 20 μ l, 2 μ l de ce volume est utilisé pour vérification sur gel d'agarose 0.8%, et les 18 μ l restant servent de sonde.

2.3.2 Sonde *lacZ*

Cette sonde a été obtenue en procédant à la digestion du vecteur pUC18 (NEB) avec les enzymes *Hind*III et *Nde*I de la compagnie New England Biolabs et 1x de leur tampon no.2 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH7.9). La digestion a été faite à 37°C pendant 2 heures. Le fragment de 300pb obtenu est purifié à partir d'un gel d'agarose par le kit de Qiagen QIAEXII.

2.3.3 Marquage aléatoire des sondes avec de la digoxigénine dUTP alcaline labile

Les 18 μ l restant des deux sondes, *carA* et *lacZ*, sont utilisés pour ce marquage. Donc, nous ajoutons 1 μ l de klenow (NEB), 2 μ l d'hexanucleotidemix de Boehringer Mannheim et 2 μ l du mélange Dig. Ce mélange Dig est composé de 1mM de dATP, dCTP, dGTP, 0.65mM de dTTP et 0.35mM de Dig-11-dUTP (Roche Diagnostique). Le tout est incubé dans un bain à 37°C pendant un minimum de 18 heures. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 μ l d'EDTA (0,5M) et incubée à 65°C pendant 25 minutes puis placée sur glace. Une sonde peut être conservée à -20°C.

2.3.4 Préparation de l'ADN génomique

Les ADN génomiques utilisés dans cette expérience sont ceux des souches bactériennes RFM600, RFM655 et C955B (voir section 2.5.2, extraction de l'ADN génomique). Il est à noter que la construction de la souche RFM956 n'a pas été vérifiée par Southern, car la meilleure façon de vérifier la bonne transduction de ce mutant est par le système de complémentation (voir section 2.13). Les contrôles utilisés sont les souches C600B et RFM443, qui sont les souches d'origine.

Selon la vérification qui devait être faite, l'ADN a été digéré par une enzyme différente. Pour l'expérience avec la sonde *lacZ*, l'ADN génomique a été digéré avec 10 unités de l'enzyme *SmaI* (NEB). Cette digestion de 50 μ l comprend 35 μ l d'ADN génomique et 5 μ l de tampon no.4 (50mM acétate de potassium, 20mM Tris-acétate, 10mM acétate de magnésium et 1mM DTT, pH 7.9) (NEB). Elle a été faite à une température de 25°C durant 5 heures. Pour la sonde *carA*, l'ADN génomique a nécessité l'utilisation de 10 unités de l'enzyme *HindIII* (NEB), mais cette fois avec le tampon no.2 et une incubation à 37°C pendant 5 heures. L'ADN ainsi obtenu a alors migré sur gel d'agarose 0.8% à 25volts pendant 16 heures environ.

2.3.5 Transfert sur membrane de nylon

Il faut avant tout préparer l'ADN qui a migré pour le transfert sur membrane de nylon. Une première étape de dépurination doit être faite en baignant le gel, avec agitation, dans la solution de dépurination (0,249M de HCL) pendant 15 minutes. Ensuite, vient l'étape de dénaturation en trempant le gel, cette fois-ci, dans la solution de dénaturation (1,5M de NaCl et 0,5M de NaOH) à deux reprises pendant 15 minutes, avec agitation. Le dernier lavage consiste à tremper le gel dans la solution de neutralisation (0,5M Tris, pH 7.0 et 1,5M de NaCl) pour un autre 15 minutes. Le gel est maintenant prêt au transfert de l'ADN sur la membrane de nylon «Genescreen plus» (NEN life technology) selon la technique indiquée par Maniatis (1982). Il faut noter que contrairement à l'indication de Maniatis, nous remplaçons le tampon 20XSSC par le tampon 10XSSC dans le bain de transfert, qui est tout aussi efficace. Après un transfert de 16 heures, il est maintenant possible de préparer la membrane pour l'hybridation de la sonde, sans oublier de fixer l'ADN à la membrane par les U.V. (U.V. Stratalinker 1800, Stratagene).

2.3.6 Hybridation de la sonde

L'étape de l'hybridation commence en submergeant la membrane avec 10ml de solution de préhybridation (5XSSC, 1% de blocking reagent de Roche Diagnostiques, 1% de N-lauryl-sarcosine et 0.4% de SDS) pré-chauffée à 65°C et d'incuber le tout à 65°C durant 3 à 4 heures. Le surplus du liquide est jeté. La sonde (*pcarA* ou *lacZ*) est préparée pour l'hybridation en incubant cette dernière à 100°C pour 10 minutes et mise sur glace immédiatement après. La sonde est alors ajoutée au 20ml de solution de préhybridation pré-chauffée à 65°C et versée sur la membrane. L'hybridation doit se faire pendant environ 18 heures. Une fois l'hybridation terminée, il faut laver la membrane pour enlever le surplus de sondes non-hybridées en procédant à deux lavages toujours à 65°C. Le premier lavage est fait avec 2XSSC, 0,2%SDS pendant 15 minutes. Le deuxième lavage se fait dans un tampon de 1XSSC, 0,1%SDS toujours pour 15 minutes.

2.3.7 Détection de l'hybridation

La membrane est maintenant prête pour la détection de l'hybridation. Un premier lavage d'une minute est fait dans une solution nommée tampon 1 (100mM d'acide maléique et 150mM de NaCl à pH de 7,5). Le prochain lavage de 20 minutes est fait dans le tampon 2 qui contient 1% de blocking reagent (RD) dissous dans le tampon 1. Le troisième lavage est fait avec 30ml de cette même solution à laquelle nous ajoutons 6 μ l d'anticorps anti-DIG (RD). Ce lavage est fait durant 30 minutes. Le surplus d'anticorps anti-Dig est alors éliminé par deux lavages successifs de 15 minutes dans le tampon 1. Par la suite, un dernier lavage de 2 minutes est fait dans le tampon 3 (100mM Tris-Cl pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂). La membrane ainsi préparée est placée entre deux acétates. La révélation de l'hybridation est possible en utilisant 5 μ l du CDP-star substrat (NEB, N7001S) dilué dans 100 μ l du diluant et 1,4ml d'eau distillée. Le tout est versé sur la membrane et bien étendu sur toute sa surface. Nous laissons réagir pendant 5 minutes. Le produit est alors éliminé par deux lavages successifs de la membrane dans 1ml d'eau distillée. Le surplus d'eau est évacué et la membrane peut maintenant être exposée au film Kodak à la noirceur pour une durée de 10 minutes. Le film est alors développé (Développeur AFP-imaging). Si l'exposition est trop faible, il est toujours possible de réexposer un autre film à la membrane pendant une durée plus longue (environ 2 heures maximum).

2.4 Plasmides

Les plasmides utilisés dans cette étude sont énumérés dans le tableau.III. Les étapes de construction de certains des plasmides énumérés sont décrites plus bas.

Préparation de la cassette chloramphénicol au clonage

La cassette est obtenue par PCR sur le vecteur pCat19. Le PCR a nécessité 200ng du vecteur pCat19, 1x du tampon de réaction (Qiagen Inc.), 1x du tampon Q (Qiagen Inc.) 8pmole des amorces M13-Reverse (5'AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA3') et Forward (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'), 200µM de dNTP et 2.5 unités de Taq (Qiagen Inc.). Le cycle utilisé est le suivant : 30x(95°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 45 secondes). L'élongation finale de 5 minutes à 72°C est nécessaire. Le produit de PCR de 1053pb est digéré par l'enzyme *SmaI* (NEB) avant d'être purifié sur gel d'agarose 0.8%. La digestion avec l'enzyme *SmaI* est faite en utilisant 10µl du produit de PCR, 1x du tampon 2 (NEB) et 10 unités de *SmaI*. Le tout est incubé à 25°C pendant 2 heures 30 minutes, puis purifié avec le kit QIAEXII.

La cassette ainsi préparée est prête au clonage dans tous les vecteurs nécessitant un changement de résistance.

pNad

La construction du vecteur pNad qui est en réalité le vecteur pCS126 dans lequel une délétion des 175pb derniers acides nucléiques du gène *pepA* (1.9Kb) et l'insertion d'un codon stop à la place de l'acide aminé 446.

Cette délétion a été faite par PCR inverse. 200ng du vecteur pCS126 a été utilisé avec 1x tampon de réaction (Qiagen Inc.), 1x du tampon Q (Qiagen Inc.), 3mM MgSO₄, 2pmole des amorces Ac3-inv. (5'GGTAATCGCTCACCAGGA3') et cpepA-inv. (5'CAAGGCTGTTATTGCCGG3'), 0.2mM de dNTP et 2.5 unités de Vent (NEB). Le cycle utilisé fut le suivant : 30 répétitions de passages de 95°C pendant 15 secondes, 49°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 4 minutes 30 secondes. Puis une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

Tableau .III Listes des plasmides

Vecteurs	Caractéristiques	Références
CD34	Fragment <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de <i>cer</i> de pKS492, klenow et cloné dans <i>Bam</i> HI- <i>Sma</i> I de pKS493	Non publié
pAC3C	Mutation pCS126 <i>pepA</i> (α 14) changement de cadre de lecture à partir a.a 446	Ce travail
pBad	Dérivé de PKK223-3 Δ Tc, polyclonage pUC8, promoteur inducible à l'IPTG	Non publié
pBadcm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pBad	Ce travail
pCat19	Fragment de 952pb de pBR325 (<i>Tn9</i> CAT) dans pUC19	Borges <i>et al.</i> (1992)
pChlo126	Insertion de 1053pb du fragment <i>Sma</i> I de pCat19 dans le site <i>Stu</i> I de pCS126	Ce travail
pCN2	<i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI pUCnmr dans pKS493, <i>cer-nmr</i> tandem	Zakova et Szatmari, (1995)
pCS126	Insertion du fragment <i>Hind</i> III de <i>pepA</i> de 1.9KB de <i>E.coli</i> dans pBad, promoteur Tac	Stirling <i>et al.</i> (1989)
pCS210	Vecteur de base PACYC avec insertion de <i>cer-lac-cer</i>	Stirling <i>et al.</i> , (1989)
pCS446	pCS126 GGG→GCG position 1338 <i>pepA</i>	Ce travail
PCSs446cm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pCS446	Ce travail
pCS449	pCS126 ACC→GCC position 1347 <i>pepA</i>	Ce travail
pCS449cm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pCS449	Ce travail
pCS452	pCS126 TGC→GCC position 1356 <i>pepA</i>	Ce travail
pCS452cm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pCS452	Ce travail
pCS455	pCS126 TCA→GCA position 1365 <i>pepA</i>	Ce travail
pCS455cm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pCS455	Ce travail
pDB169	<i>argR</i> ⁺ , <i>Sph</i> I- <i>Sal</i> I dans pUC19, clone donnant l'absence de la boîte d'arginine (élimination de l'autorégulation) (<i>ArgR</i> ⁺)	Lim <i>et al.</i> , (1987)
pDB169cm	Fragment <i>Sma</i> I de CM (pCat19), dans pDB169 au site <i>Pvu</i> I. (<i>ArgR</i> ⁺)	Ce travail
pGS38	<i>argR</i> , 0.9Kb, cloné dans <i>Sph</i> I- <i>Acc</i> I de pUC19	Non publié
pKS492	280pb de <i>ColE1 cer Hpa</i> II- <i>taq</i> I inséré dans <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I de pUC18	Summers <i>et al.</i> (1988)
pKS493	280pb de <i>ColE1 cer Hpa</i> II- <i>taq</i> I inséré dans <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I de pUC18, orientation inverse de pKS492	Summers <i>et al.</i> (1988)
pNad	Δ (1347-1522) <i>pepA</i> et codon stop à la position 1338 (a.a 446) sur pCS126	Ce travail
pNadcm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pNad	Ce travail
pPar	pNad <i>Stu</i> I+ 0.9KB <i>argR Hind</i> III- <i>Eco</i> RI franc de pGS38	Ce travail
pParcm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pPar	Ce travail
pUC19	Ap ^f , <i>lacZ</i> , vecteur de clonage	Vieira <i>et al.</i> (1982)
pXAB21	0.9Kb <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III fragment de pGS38, klenow et inséré dans <i>Stu</i> I de pCS126. (<i>PepA</i> ⁺ , <i>ArgR</i> ⁺)	Non publié
pXAB21cm	Cm- <i>Sma</i> I dans <i>Pvu</i> I Ap ^R de pXAB21. (<i>PepA</i> ⁺ , <i>ArgR</i> ⁺)	Ce travail

Le produit de PCR (~4.275KB) obtenu a été purifié à l'aide du kit QIAEXII. Afin de circulariser le vecteur, il est nécessaire d'ajouter les groupements phosphates à l'aide d'une kinase. Donc au vecteur linéaire, nous ajoutons 1x du tampon de la ligase de NEB (50mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 25ng/ml BSA, pH7.8), et 10 unités de T4 polynucléotide kinase (NEB). Le tout est placé dans un eppendoff et est incubé à 37°C pendant 45 minutes. Par la suite, la réaction est inactivée en plaçant le tube à 65°C pendant 20 minutes. Le tout est ensuite refroidit sur glace durant 30 minutes.

Une fois ceci fait, il est possible de faire l'auto-ligation du produit de PCR kinasé en utilisant les produits de ligation rapide de Roche Diagnostiques Inc. Donc, le vecteur linéaire est dilué dans 1x du tampon de dilution (RD), puis 1x de tampon de ligation est nécessaire (RD) et le tout est bien mélangé. 10 unités de la T4 DNA ligase sont ensuite ajoutées. Une incubation de 5 minutes à 25°C est suffisante et peut être directement transformée sans inactivation, dans les cellules DH5- α chimiocompétentes et sélectionné pour la résistance à l'ampicilline. Le vecteur obtenu est alors nommé pNad. Les vérifications de ce clone ont été faites par différentes digestions : *EcoRV*, *HindIII* (NEB). 10 unités de *HindIII* avec 1x du tampon 2 (NEB) et pNad sont incubé à 37°C pendant 1 heures 30 minutes. Aussi la digestion avec *EcoRV* est la même sauf pour le tampon qui est changé pour le tampon 3 (NEB) et est additionné de 1 μ g/ml de BSA. Les deux digestions sont visualisées sur gel d'agarose 0.8%. La digestion obtenue avec l'enzyme *HindIII*, si elle est bonne, donne deux fragments, un de 1775pb (1.9Kb-0.175Kb) et l'autre de 2.5Kb. La digestion avec l'enzyme *EcoRV* ne devrait pas avoir lieu, car *EcoRV* est un site unique dans le site de 175pb enlevé par le PCR.

pNadcm

Le vecteur pNadcm est le vecteur pNad dans lequel la cassette de chloramphénicol de pCat19 a été ajoutée. La cassette est insérée au site de ligation après l'obtention du produit de PCR linéaire, soit après le gène *pepA* tronqué. Après le traitement à la kinase, la ligation a été faite en présence de la cassette et la sélection de la transformation est faite sur milieu LB avec 34 μ g/ml de chloramphénicol. Cette ligation est faite avec 2 μ l de vecteur linéaire et 6 μ l de la cassette Cm (voir préparation ici-bas),

toutes les deux dilués dans 1X du tampon de dilution (RD), et la ligation a été faite avec 1x du tampon de ligation (RD) et 10 unités de la T4 DNA ligase (RD). Incuber à la température pièce pendant 5 minutes et transformer dans les cellules DH5- α . La vérification de ce clone et de l'orientation est faite à l'aide des enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* séparément. La digestion *HindIII* (effectuée de la même façon que d'écrit avec pNad) permet la vérification de l'insertion de la cassette dans le fragment 1.725 KB, en augmentant le fragment à 2.778pb. La digestion avec *EcoRI* permet de vérifier l'orientation de la cassette. La digestion avec 5 unités de cette enzyme (NEB), 1x du tampon *EcoRI* (NEB) et de l'ADN. Une digestion à 37°C pendant 2 heures a été faite. Le résultat visualisé sur gel d'agarose a permis de déterminer que la cassette est orientée dans le même sens du gène *pepA*. Les fragments obtenus étant de 275pb, 1338pb et 2662pb.

PPar

Le vecteur pPar est le vecteur pNad auquel le gène *argR* (*xerA*) a été placé à la suite du gène *pepA* délété de ses 175pb.

L'insert du gène *argR* (0.9Kb) a été fait par clivage du vecteur pGS38 par les enzymes *HindIII* et *EcoRI* (NEB). La digestion nécessite 100ng du vecteur pGS38, 1x du tampon *EcoRI* (NEB), et 10 unités de chacune des enzymes *EcoRI* et *HindIII*. La digestion à 37°C dure 2 heures et est par la suite inactivée à 65°C pendant 20 minutes. Le produit est alors placé sur glace 30 minutes. Avant la purification, l'ADN est traité à la klenow pour créer des bouts francs, en ajoutant directement au tube 1mM de dNTP et 15 unités de l'enzyme klenow (NEB). Le tout est incubé 15 minutes à 25°C. Le produit ainsi préparé peut être purifié par le QIAEXII et il est prêt au clonage.

La préparation du vecteur pNad à recevoir le gène *argR* est la suivante; une digestion du vecteur par l'enzyme *StuI* (NEB), site situé dans le fragment de 1,725pb mais placé après le cadre de lecture du gène *pepA*. La digestion qui a lieu dans le tampon 2 (NEB) doit durer 2 heures à 37°C. Le vecteur digéré est purifié avec le QIAEXII. Par la suite, il est traité à la phosphatase alcaline (RD Inc) dans 1x du tampon de

déphosphorylation (RD Inc.) et 10 unités de la SAP. Le tout doit agir 60 minutes à 37°C et être inactivé à 65°C pendant 15 minutes.

Le vecteur et son insert sont prêts à être cloné à l'aide de la ligase (RD). 2µl de vecteur linéaire, 6µl d'insert sont dilués dans le tampon de dilution (RD Inc.), et le tout est placé dans 1x du tampon de ligation et 10 unités de T4 DNA ligase. Une incubation de 5 minutes à la température pièce est suffisante. Une transformation dans DH5-α chimiocompétente est ensuite faite et la sélection sur 100µg/ml d'ampicilline.

La vérification de l'orientation de la construction est réalisée à l'aide de la digestion du vecteur produit, pPar, par *SmaI*. La digestion demande la présence du tampon 2 (NEB) et 10 unités de l'enzyme *SmaI*. Une réaction de 2 heures à 25°C est suffisante. Les fragments obtenus seront de 2,625Kb (1,725Kb + 0,9Kb) et de 2,250Kb.

pChlo126

Le vecteur pChlo126 est le vecteur pCS126 dans lequel une cassette de chloramphénicol a été insérée dans le site de *StuI*. La préparation de la cassette Cm a été expliquée ci-haut. Le vecteur a été digéré par 15 unités de l'enzyme *StuI* (NEB) dans le tampon 2 (NEB) à 37°C pendant 2 heures. Le vecteur linéarisé est purifié par gel d'agarose et est traité à la SAP (voir pPar). La ligation du vecteur et de la cassette est faite avec les mêmes conditions que celles expliquées dans le clonage de pNadcm.

La vérification de la construction et de l'orientation de l'insert est la suivante; une digestion, avec 10 unités de l'enzyme *SmaI* (NEB) dans son tampon 2 (NEB), d'une durée de 2 heures à 25°C doit avoir lieu. Les bandes obtenues sont de 275pb, 1967pb et 3311pb qui indiquent que la cassette est orientée dans le sens inverse de l'expression du gène *pepA*.

pCS446cm, pCS449cm, pCS452cm, pCS455cm, pParcm, pXAB21cm, pDB169cm et pBadcm

Les plasmides ont subi le même traitement, soit d'inactiver le gène de résistance à l'ampicilline par insertion de la cassette chloramphénicol dans le site *PvuI* (site unique) qui est situé dans le gène.

Tous les vecteurs ont été digérés par 20 unités de *PvuI* (Pharmacia), et 2x du tampon one-phor-all (Pharmacia). Une digestion à 37°C de 2 heures est faite, puis l'enzyme est inactivée à 85°C pendant 20 minutes. Les bouts cohésifs sont traités avec 5 unités de T4 DNA polymérase (Fermentas), 1x du tampon de cette enzyme et 2mM dNTP. Incuber 20 minutes à 11°C et inactivé à 75°C pendant 10 minutes. Tous les vecteurs ont été ensuite purifiés avec le QIAEXII.

Par la suite, la ligation a été effectuée avec la cassette de chloramphénicol à l'aide des produits de ligation rapide de Roche Diagnostiques Inc., comme il a été mentionné dans les autres clonages avec cette cassette. La transformation chimique et la sélection sur chloramphénicol est également la même chose.

La vérification des vecteurs obtenus a été faite par digestion avec l'enzyme *EcoRI* (NEB), toujours de la même manière que décrite plus haut.

2.5 Extraction de l'ADN

2.5.1 Extraction de l'ADN plasmidique

Le protocole d'extraction utilisé est celui de Birnboim et Doly (1979) avec quelques modifications.

Récolter les cellules d'une culture bactérienne de 5ml qui a été incubée pendant 16-18 heures. Ce culot de cellules est suspendu dans 200 μ l de solution de TEG (25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0 et 50mM glucose) avec 5mg/ml de lysosyme et est mis sur glace pour 15 minutes. Nous lysons les cellules avec 400 μ l de solution de lyse (NaOH 0.2N-SDS 1%), ceci est mis sur glace 5 minutes. Par la suite, nous utilisons la solution de neutralisation, soit 300 μ l de Koac 3M à pH 4.8. L'ensemble est agité par inversion et est placé à -20°C pendant 10 minutes. Nous laissons dégeler sur glace quelques minutes, puis les eppendorfs sont centrifugés à 13000rpm durant 15 minutes. Le surnageant est alors prélevé et 600 μ l de phénol/chloroforme/isoamyle (25 :24 :1) sont ajoutés. Les tubes sont alors vortexés et centrifugés 10 minutes. La phase hydrophile est récupérée. À cette phase, nous ajoutons 600 μ l d'isopropanol (refroidit à -20°C), mélangeons par plusieurs inversions et incubons à -20°C pendant 15 minutes. Le tout est centrifugé 15 minutes à 13000rpm. Le culot qui est alors formé est lavé avec 100 μ l d'éthanol 70%, centrifugé 2 minutes et séché. Pour terminer, le culot sec est resuspendu dans 50 μ l de TE (10mM Tris-cl pH7.5 et 1mM EDTA pH8.0) ou d'eau distillée stérile et 2 μ l d'ARNase ajouté et incubé à la température pièce pendant 5 minutes et conservé ensuite à -20°C .

2.5.2 Extraction génomique (Ausubel *et al.*, 1994)

Un culot de 3ml de culture bactérienne dans le LB après 18 heures est récupéré par centrifugation à 13000rpm de 2 minutes. Celui-ci est resuspendu dans 567 μ l de TE (10mM Tris-cl pH7.5 et 1mM EDTA pH8.0) que l'on mélange à la pipette et nous y ajoutons 30 μ l de SDS10% et 3 μ l de protéinase K (20mg/ml). Il y a alors une incubation à 37°C pendant 1 heure. 100 μ l de NaCl 5M sont ajoutés et mélangés. Ensuite, 80 μ l de CTAB/NaCl (10%CTAB dans 0,7M NaCl) sont ajoutés et incubés à 65°C durant 10 minutes. L'étape suivante consiste à mettre 0,7ml de phénol/chloroforme/isoamyle

(25 :24 :1) dans le produit obtenu et de centrifuger 6 minutes à 13000rpm. La phase hydrophile est récupérée et cette dernière étape est répétée. Par la suite, 600µl d'isopropanol sont ajoutés et les tubes sont inversés plusieurs fois et ceci jusqu'à l'apparition d'un précipité blanchâtre. Il y a alors une centrifugation de 10 minutes et le surnageant est enlevé. Le culot est resuspendu dans l'éthanol 70%, puis une centrifugation est faite. Le surnageant est alors éliminé. Le culot est séché sous vide. Il faut dissoudre ce culot séché dans 100µl de TE. Nous ajoutons 2µl d'ARNase. Le tout est incubé pendant 10 minutes à température pièce. Le produit obtenu est conservé à -20°C.

2.6 Préparation de cellules chimiocompétentes (Ausubel, 1994)

Les étapes de ce protocole sont les suivantes : 1.5ml de culture de *E.coli* qui a poussé 18 heures, est ajoutée à 150ml de LB avec l'antibiotique requis. Une incubation à 37°C avec agitation est nécessaire jusqu'à obtention de la densité cellulaire de 0.380-0.385 (D.O.₆₀₀). Récolter les cellules par centrifugation (5000rpm) à 4°C pendant 15 minutes. Laver le culot dans 30ml de tampon CaCl₂ froid (60mM CaCl₂, 10mM Hépes, 15% glycérol). Laisser sur glace 10 minutes. Centrifuger 15 minutes à 4°C (4500rpm). Resuspendre le culot dans 30ml de tampon CaCl₂ froid et laisser sur glace 20 minutes. Centrifuger 10 minutes à 4°C (4500rpm). Resuspendre le culot dans 3 ml du même tampon et aliquoter par 100µl et conserver à -70°C jusqu'à utilisation.

2.6.1 Transformation des cellules chimiocompétentes

Pour introduire un vecteur, laisser dégeler sur glace les cellules chimiocompétentes 15 minutes. Introduire 2µl du vecteur à transformer dans les 100µl de cellules chimiocompétentes, et laisser en contact sur glace pendant 30 minutes. Faire un choc thermique en submergeant le tube dans un bain-marie à 42°C pendant 30 secondes. Mettre le tube de cellules sur glace immédiatement après et attendre 1 minute. Ajouter 400µl de SOC (28g/L de SOB + glucose 0.4%). Incuber 60 minutes à 37°C. Puis étaler 150µl de cellules sur le pétri avec l'antibiotique de sélection approprié. Faire incuber ce pétri à 37°C durant 16 heures.

2.7 Mutagenèse

2.7.1 Mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire permet de procéder à un criblage rapide de mutants potentiel en recombinaison spécifique de sites. Cette technique tire profit de certaines souches bactériennes déficientes au niveau de leur système de réparation méthyl-dépendant («methyl-directed mismatch repair system») (ex :ES1481, ES1484). Nous introduisons le vecteur d'intérêt, pCS126, dans l'un de ces souches chiomiocompétentes et laissons croître pendant 16 heures. Lors de la réplication plasmidique plusieurs erreurs seront produites sans être corrigées par le système de réparation bactérien. Les colonies sont alors récoltées pour en extraire les plasmides par lyse alcaline (voir section 2.5.1). Les vecteurs obtenus sont ensuite criblés dans le système de recombinaison *in vivo* (section 2.13). Tous vecteurs déficients sont davantage étudiés.

Avec cette technique, le vecteur pAC3C a été obtenu. Suite à une analyse par séquençage, le gène *pepA* possédait un changement de cadre de lecture au début de l'hélice α -14.

2.7.2 Mutagenèse ponctuelle par PCR

Un acide aminé précis peut être modifié sur la protéine PepA en procédant à une mutagenèse dirigée par PCR (Nelson et McClelland, 1992). Dans ce travail, quatre acides aminés (446, 449, 452 et 455) ont été changés, tous situés dans l'hélice α -14 de l'aminopeptidase A; ils ont tous été changés pour une alanine.

Construction de pCS446 (acide aminé 446 = acides nucléiques 1338-1340)

Afin d'obtenir une alanine en position 446 de la protéine PepA, il faut changer la glycine qui est encodé par les acides nucléiques GGG par GCG qui code pour une alanine. Pour ce faire, des amorces ont été synthétisées avec les séquences suivantes : mpepA G446A (5'GGTCGTCCTGGTGC GGCGATTACCGCA3') et mpepA inv.G446A (5'TGCGGTAATCGCCGCACCAGGAGCACCG3'). Il est à noter que les amorces sont complémentaires. La complémentarité favorise une bonne circularisation du vecteur total après amplification. Le PCR qui a été fait correspond à des

amplifications inverses selon les données suivantes; 200ng d'ADN du plasmide pCS126, 8 pmoles des amorces mpepA G446A et mpepAinv.G446A, 200µM de dNTP, 1x du tampon thermopol (NEB, 1.5mM MgSO₄), 1x du tampon Q (Qiagen) et 2.5 unités de Vent (NEB). Le cycle d'amplification utilisé débutait avec un temps de dénaturation à 95°C pendant 1 minute, puis 25 répétitions des étapes suivantes; une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, une deuxième étape d'hybridation des amorces à 80°C pendant 30 secondes et l'étape d'élongation à 72°C pendant 4 minutes 30 secondes. Une fois cette répétition terminée, une dernière étape d'élongation de 5 minutes à 72°C est faite. Des témoins d'amplification ont été faits afin de s'assurer de la spécificité des produits d'amplification obtenue, c'est-à-dire que nous voulions que le fragment d'ADN obtenu soit le produit des deux amorces ensemble. Donc, des PCR de vérification dans lesquels une seule amorce était ajoutée à la réaction, et soumise aux mêmes conditions de la réaction principale décrite ci-haut nous montre que le produit recherché était bien unique à la présence des deux amorces ensemble.

Une fois le produit de PCR amplifié, il est possible de transformer celui-ci dans la souche d'*E.coli* DH5-α, car le produit obtenu devrait être un plasmide circulaire (par la partie complémentaire des amorces) possédant la mutation ponctuelle voulue. Mais avant de faire cette transformation, il est préférable d'éliminer le plus de vecteur original possible (pCS126) qui a été introduit dans la réaction d'amplification. Ceci pour optimiser les chances de trouver les mutants recherchés après la transformation. Pour ce faire, nous avons tiré profit de l'activité de l'enzyme *DpnI* (NEB) qui a comme caractéristique de ne digérer que les ADN méthylés. Comme un produit de PCR ne l'est pas, celui-ci demeurera intact, donc circulaire, et sera alors le seul produit transformable. Cette digestion a été faite à une température de 37°C pendant 2 heures et comprenait 16µl du produit PCR non purifié, 1x du tampon 4 (NEB) et 15 unités de l'enzyme *DpnI* (NEB). Une fois la digestion terminée, la transformation dans les cellules DH5-α chimiocompétentes selon le protocole de transformation expliqué dans la section 2.6. Des colonies obtenues, nous pouvons extraire (voir section 2.5.1) les plasmides de chaque colonie pour ensuite faire les vérifications nécessaires pour déterminer si la mutagenèse a bien fonctionné.

Vérification de la mutation

Lors de la mutagenèse où nous avons modifié la séquence en acides nucléiques de l'hélice α -14, nous avons par le fait même modifié le patron de digestion. Pour la mutation des acides nucléiques 1338-1340, nous avons créé un site de restriction (GC/NGC) pour l'enzyme *Fnu4HI* (NEB). Cette enzyme peut couper plusieurs fois dans le vecteur pCS126 muté, mais en utilisant le PCR, il est possible d'amplifier une région voulue et de vérifier dans cette région s'il y a eu la modification recherchée. Pour cela, des amorces ont été synthétisées dans le but de produire un fragment de 702pb, dans lequel nous retrouvons la région de la mutation voulue. Au niveau de la séquence originale, 4 sites *Fnu4HI* sont retrouvés (69pb, 76pb, 79pb, 157pb et 321pb) et lorsque la mutation est présente un autre site est créé (69pb, 76pb, 79pb, 114pb, 157pb et 207pb). Ces fragments sont alors facilement visibles sur gel de polyacrylamide. Donc, en premier lieu, une amplification par PCR a lieu avec 200ng d'ADN du mutant testé, 2mM des amorces pepA997-1014 (5'CGTCCGGGCGATGT3') et pepA-T (5'CAGAAGCTTGAACGTCGC3'), 2mM de dNTP, 1x du tampon thermopol (NEB), 1x du tampon Q (Qiagen), 2.5 unités de Vent (NEB). Le cycle utilisé est 1 minute à 95°C, puis 30 cycles de 95°C pendant 15 secondes, 54°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 40 secondes. Une élongation finale de 5 minutes à 72°C a lieu à la toute fin du PCR.

Une fois le PCR terminé, un produit unique de 703pb est obtenu et peut être digéré directement sans avoir à purifier celui-ci à préalable. La digestion du produit est faite avec 5 unités de l'enzyme *Fnu4HI* (NEB), 16 μ l du produit de PCR et 1x du tampon 4 (NEB). Le tout est incubé à 37°C pendant 2 heures. Le produit de digestion est alors vérifié en gel de polyacrylamide de 5% non dénaturant (1 x TBE, polyacrylamide 5%/bis 0.125%).

Construction de pCS449 (acide aminé 449 =acides nucléiques 1347-1449)

Les mêmes principes sont appliqués à la mutation 449. Cette mutation veut le changement d'une thréonine par une alanine. Pour ce faire, il a fallu modifier la séquence ACC qui code pour la thréonine par GCC qui code pour l'alanine. Les amorces utilisées pour ceci ont été mpepA449 (5'GCGATTGCCCGCAGGTTG3') et mpepAinv449 (5'CGGCAATCGCCCCACCA3'). Les amorces synthétisées ne sont complémentaires que pour 10 nucléotides sur 17 afin de diminuer le risque d'auto-hybridation et favoriser l'hybridation à l'ADN matrice. La complémentarité de 3pb est suffisant pour une circularisation. Les mêmes quantités d'ADN du vecteur pCS126, d'amorces, de dNTP, de tampon thermopol et tampon Q et de polymérase Vent ont été utilisées que pour la construction du vecteur pcs446. Le cycle d'amplification utilisé a été d'une première étape de dénaturation de 1 minute à 95°C, puis 25 cycles de la séquence suivante, une dénaturation de 15 secondes à 95°C, une hybridation à 51°C, une élongation de 4 minutes 30 secondes à 72°C. Pour terminer, une dernière élongation de 5 minutes à 72°C est requise.

Le PCR ainsi obtenu était digéré avec l'enzyme *DpnI* (NEB), transformé et les clones ont été extraits selon les mêmes conditions mentionnées sur la construction de pCS446.

Vérification de la mutation 449

La vérification de cette mutation se fait de la même façon que précédemment, c'est-à-dire qu'il y a d'abord amplification d'un fragment de 702pb à l'aide des amorces pepA997-1014 et pepA-T et que ce produit est digéré avec l'enzyme approprié. Dans ce cas, l'enzyme *Fnu4HI* devait être utilisé. La digestion a eu lieu dans un volume de 20µl, d'où 16µl de produit de PCR était nécessaire, 5 unités d'enzyme *Fnu4HI* (NEB) et 1x du tampon 4 (NEB). Une incubation de 2 heures à 37°C est nécessaire puis le tout est migré sur gel de polyacrylamide 5%. Les fragments qui étaient attendus dans le cas de la séquence originale était 67pb, 69pb, 79pb, 157pb et 330pb et dans le cas où il y aurait la mutation, nous nous attendions à des fragments de 67pb, 69pb, 79pb, 120pb, 157pb et 210pb.

Construction du vecteur pCS452 (acide aminé 452= acides nucléiques 1356-1358)

Cette construction demandait le changement de la cystéine (TGC) par une alanine (GCC). Pour ce faire, les amorces pepAC452A (5'TTCCTGGCACGCTTTACCCGT3') et pepAinvC452A (5'GCGTGCCAGGAAGCAACCTGC3') ont été synthétisées. Pour connaître les proportions d'ADN matrice pCS126, nucléotides, amorces, tampon et polymérase, il faut se référer à la description de la construction pcs446. Le cycle utilisé pour cette mutagenèse fut en premier lieu une dénaturation de 95°C de 1 minute, puis 25 cycles des trois températures et temps suivant : 95°C pendant 15 secondes, 69°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 4 minutes 30 secondes. Une dernière élongation de 5 minutes à 72°C a été faite. Le produit ainsi obtenu était traité à la *DpnI*, transformé et les clones extraits (voir explication dans la section construction de pCS446).

Vérification de pCS452

Pour vérifier cette mutation, nous devions dans un premier temps amplifier le fragment de 702pb tout comme les deux mutations précédentes. La différence dans cette vérification fut l'utilisation de l'enzyme *NlaIV* (NEB). La digestion avait lieu dans un volume de 20µl soit 16µl du produit de PCR, 1x du tampon4 (NEB), 1x BSA et 5 unités de *NlaIV*, une digestion de 1 heure à 37°C avait été faite. Le produit digéré était migré sur gel de polyacrylamide 5% et nous recherchions les fragments les plus importants, soit 145pb, 252pb et 262pb. Le fragment de 262pb est perdu par la mutation pour donner les fragments de 202pb et 60pb.

Construction de pCS455 (acide aminé 455 = acides nucléiques 1365-1367)

La mutagenèse, de la sérine (TCA) pour une alanine (GCA), a été faite selon le même principe que les trois autres mutations. D'abord la mutagenèse a été faite avec les amorces mpepAS455ApepA (5'TTCCTGGCACGCTTTACCCGT3') et mutS455ApepAinv (5'GCGTGCCAGGAAGCAACCTGC3'). Les conditions de PCR étaient les mêmes que pour les autres. Pour ce qui est du cycle, les étapes suivantes ont

été utilisées, une première élongation de 1 minute à 95°C, puis 25 répétitions de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 67°C et 4 minutes 30 secondes à 72°C. Finalement une extension finale de 5 minutes à 72°C. Ce produit a été digéré avec l'enzyme *DpnI*, transformé et les clones extraits comme mentionné préalablement.

Vérification de pCS455

Cette vérification a été faite avec la digestion du produit de 702pb par l'enzyme *Tsp45I* (NEB). Contrairement aux vérifications des autres mutagenèses, nous vérifions la perte d'un site de restriction de *Tsp45I*. Les quantités requises pour cette digestion ont été 16µl de produit PCR, 1x tampon 1 (NEB), 1x BSA et 5 unités de l'enzyme *Tsp45I* le tout dans un volume de 20µl. Ceci fut migré sur gel de polyacrylamide 5%. Donc, la recherche des fragments 340pb, 244bp, 30 et 88pb pour la séquence originale. S'il y avait mutagenèse, les sites 340pb et 88pb disparaissent pour former un fragment de 428pb.

2.8 Expression et purification protéique

2.8.1 L'aminopeptidase A

L'expression et la purification de l'aminopeptidase A (Striling, 1989) a pu être faite grâce au vecteur pCS126 qui est porteur de ce gène et est munie d'un promoteur Tac inductible à l'IPTG, et également de la souche bactérienne *E.coli* DS955 qui est mutée pour le gène *pepA* et *argR* (voir tableau II). Donc pour cette expérience, une culture DS955/pCS126 de 5ml LB et ampicilline (100µg/ml) de 18 heures à 37°C est faite pour ensuite réensemencer celle-ci dans un milieu frais LB de 500ml avec 100µg/ml d'ampicilline. Cette culture doit croître, toujours à 37°C sous agitation, jusqu'à l'obtention d'une densité optique (600nm) de 0.500. Une fois cette densité cellulaire atteinte, nous induisons l'expression de la protéine en ajoutant l'inducteur à 0,5mM. Cette induction dure 2 heures à 37°C sous agitation. Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 4°C à 5000rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé dans 25ml de tampon TM (10mM Tris-Cl pH 8 et 10mM MgCl₂). Le tout est centrifugé 15 minutes à 4°C. Le culot est alors récupéré et il est

resuspendu dans le tampon « low salt » (50mM Tris-Cl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 0,1mM EDTA et 0.1mM DTT). On procède à une série de 5 répétitions gel/dégel en plaçant le tube à -70°C puis à 37°C. Par la suite, nous procédons à la sonification, ceci pour des répétitions de 10 secondes puis laissons reposer sur glace pendant 1 minute. Cette étape est répétée 12 fois. Après, le produit est aliquoté en volume de 1.6ml dans les eppendoffs de 2ml. On ajoute 40µl de PMSF (phényl méthyl sulfonyl fluoride) qui a été préparé à 1mg/ml dans l'isopropanol. Les eppendoffs sont centrifugés 30 minutes à 4°C à 13000rpm. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans le tampon « high salt » (20mM Tris-Cl pH8.2, 200mM KCl, 1mM MgOAc, 0.1mM EDTA et 50% glycérol). Ceci est centrifugé à 4°C durant 20 minutes à 13000rpm. Le surnageant est récupéré. Il peut être conservé à -70°C pour une longue période de temps, mais il peut aussi être conservé à -20°C. L'extraction obtenue est vérifiée sur SDS-PAGE.

2.8.2 Le répresseur d'arginine

L'expression de cette protéine est faite à partir du vecteur pDB169, qui lui aussi est sous le contrôle de promoteur taq, et dans la souche de *E.coli* DS955 (Lim *et al.*, 1987). Donc, une culture de 5ml (LB avec 100µg/ml d'ampicilline) de 18 heures est ensemencée dans un nouveau milieu LB (avec 100µg/ml d'ampicilline et 0.5mM d'IPTG) de 250ml et elle est incubée jusqu'à l'obtention d'une densité cellulaire (lu à 550nm au spectrophotomètre, Shimadzu UV-2101PC, UV-vis scanning) de ~1.5. Le tout est centrifugé (4500rpm) à 4°C pendant 20 minutes. Le culot formé est lavé dans 20ml du tampon TM (10mM Tris-Cl pH8.0, 10mM MgCl₂) et il est une fois de plus centrifugé comme la première fois. Le culot est suspendu dans 5ml (pour environ 1g de cellules) dans le même tampon TM. On ajoute également du NaCl pour obtenir une concentration de 1M. La suspension est sonifiée de la même façon que pour la protéine PepA. Après la sonification, la suspension est aliquotée dans des volumes de 1.6ml. Le PMSF est ajouté, soit 40µl d'une préparation de 1mg/ml. Le tout est centrifugé et le surnageant est récupéré. Il est important de mesurer le volume de surnageant récupéré, car la prochaine étape nécessite l'ajout de 291mg d'« enzyme grade » (NH₄)₂SO₄ par millilitre de surnageant. Ce produit doit être ajoutée lentement tout en agitant. Il doit être mélangé de 1-2 heures. Il faut par la suite centrifuger à 13000rpm pendant 20 minutes et récupérer le

culot. Le culot est resuspendu dans le tampon TM. Une dialyse est ensuite nécessaire. Une membrane de dialyse de porosité de 600-800p.m. est utilisée. On place le produit à dialyser à l'intérieur de la membrane et le tampon TM sert de tampon de diffusion. Une première incubation de 3 heures à 4°C (le tout est placé sur une plaque aimantée et un aimant placé dans le tampon TM de diffusion permet un léger mouvement du liquide). Après ces 3 heures, le tampon TM pour la diffusion est changé et la dialyse continue jusqu'à 12 heures. Le produit dialysé est récupéré de la membrane et 100µl de la L-arginine 100mM est ajouté, ceci permet de précipiter ArgR. Une centrifugation à 4°C pendant 20 minutes est nécessaire et le culot est récupéré et resuspendu dans le tampon TM spécial (20mM Tris-Cl pH7.5, 20mM MgCl₂, 200mM NaCl et 50% glycérol). La protéine peut être conservée à -20°C ou pour une plus longue période à -70°C. Le produit obtenu est vérifié sur SDS-PAGE.

2.8.3 Quantification protéique

La quantification protéique a été faite selon les recommandations de Bio-Rad et de leur produit « Bio-Rad protein assay no.500-0006 ». La courbe standard est faite avec la BSA, à des concentrations de 0µg/ml, 4µg/ml, 8µg/ml, 12µg/ml, 16µg/ml, 20µg/ml et 24µg/ml.

2.9 Retardement sur gel

2.9.1 En gel polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la concentration voulue, soit 4% polyacrylamide et 0.1%bis-acrylamide dans TBE 0,5X. L'ajout de 1mM de L-arginine dans un retardement en présence de la protéine ArgR est obligatoire. La polymérisation est faite à l'aide de 0.075% de persulfate d'ammonium (APS) et TEMED et elle doit polymériser pendant 1 heure. Le tampon d'électrophorèse est également du TBE 0,5X et lorsqu'une réaction avec la protéine ArgR doit être faite, il faut aussi ajouter au tampon d'électrophorèse de la L-arginine 1mM. Avant de faire migrer les échantillons de retardement, le gel polymérisé doit être équilibré par une migration à 200 volts pendant 30 minutes à 4°C.

2.9.2 En gel d'agarose

Le gel d'agarose est un gel de 1% qui a été préparé dans 0,5X de TBE. Le tampon d'électrophorèse est également fait de TBE 0,5X. Encore ici, l'ajout de L-arginine est possible lors des réactions avec la protéine ArgR, tant dans le gel d'agarose que dans le tampon d'électrophorèse. Le gel est prêt à être utilisé.

2.9.3 Préparation de l'ADN marqué à la digoxigénine dUTP alkaline labile

Les sites utilisés pour les réactions ADN-protéine ont tous été obtenus par amplification et marquage direct à la dig par PCR.

Site *Cer*

L'amplification du site *cer* unique a été faite à partir d'une amplification du plasmide PKS492. La réaction nécessite 100ng de PKS492, 1X du tampon de Qiagen, 1X du tampon Q de Qiagen, 2pmole des amorces M13-Foward et M13-Reverse, 0.2mM dNTP, 2µM dig, 2.5 unités de Taq. Le cycle consiste à une répétition de 30 fois les étapes suivantes : 95°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes. Une étape finale d'élongation de 5 minutes à 72°C est nécessaire. Le produit amplifié est de 500pb et peut être purifié sur gel d'agarose avec le produit offert par Qiagen, le QIAEXII.

Cer-cer

Le site *cer-cer* est amplifié avec les mêmes facteurs et conditions utilisés pour le site *cer*, mais cette fois sur le plasmide CD34. Le produit de PCR attendu est de 900pb.

Cer-nmr

L'amplification de ce site se fait à partir du vecteur PCN2/Y17. Les différents éléments nécessaires à l'amplification sont les mêmes que ceux du site *cer* puisque les amorces sont les mêmes soient M13-Foward et M13-Reverse . Le cycle est comme suit : 30 répétitions de 95°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes. Nous terminons par une élongation finale de 5 minutes. Le produit est de 1000pb et est purifié avec le kit QIAEXII de Qiagen.

Promoteur carA

Le promoteur *carA* est amplifié à l'aide des amorces synthétiques carAB-F et carAB-argbox (voir section 2.3.1). Le PCR est effectué sur 200ng d'ADN génomique de *E.coli* DH5- α , 8 pmole des amorces carAB-F et carAB-argbox, 200 μ M de dNTP, 2 μ M dig, 1x du tampon thermopol (NEB) et 2.5 unités de Vent polymérase (NEB). Le cycle de 30 répétitions des temps suivants est nécessaire : 95°C pendant 15 secondes, 53°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 10 secondes. L'amplification se termine par l'élongation finale de 5 minutes à 72°C. Le produit de 300pb est purifié par le QIAEXII de Qiagen Inc..

2.9.4 Réaction protéine-ADN (Charlier *et al.*, 1995b; Striling *et al.*,1988)

Durant l'équilibration du gel, les échantillons peuvent être préparés. Les protéines sont diluées par dilution binaire dans le tampon d'échantillon qui peut varier selon la protéine en question. La protéine PepA utilise comme tampon 10mM Tris-Cl pH7.9, 125mM KCL, 10mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 0.1 mM DTT et 5% glycérol. La protéine ArgR utilise le tampon 20mM tris pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA pH8.8 et 5% glycérol, et additionné de 1mM de L-arginine. À chacune des dilutions binaires de protéines, nous ajoutons un mélange du segment d'ADN (2 μ g/ml) à l'étude et de l'ADN

compétiteur DIDC à une concentration de 1mg/ml préparé dans le tampon d'échantillon de la protéine étudiée.

Les protéines et l'ADN sont incubés à 37°C pendant 30 minutes et mis sur glace immédiatement après l'incubation. Les échantillons ainsi préparés peuvent être migrés dans le gel de polyacrylamide équilibré à 12 volts/cm dans une chambre froide de 4°C.

2.9.5 Transfert et Détection

Une fois la migration terminée, nous procédons au transfert sur membrane de nylon. Ce transfert est effectué de la façon suivante; le gel de polyacrylamide est laissé sur sa plaque de silice (enlever la plaque de verre, et ne pas inverser le gel), dans un bocal. La membrane de nylon, qui a été préalablement trempée dans de l'eau déionisée stérile, est placée par-dessus le gel. Au-dessus, nous ajoutons deux épaisseurs de papier 3M. La plaque de verre est remplacée et un poids est ajouté sur le dessus du montage. Un peu de TBE 0.5X est ajouté dans le fond du bocal pour éviter l'assèchement du gel et de la membrane. Nous pouvons laisser ce montage de 3 heures à 18 heures.

Si la migration a eu lieu dans un gel d'agarose, le transfert se fait de la façon suivante : immédiatement après la migration, le gel est transféré selon un transfert de type Southern blot. Cependant, aucune étape préparatoire de l'ADN (i.e. dépurination, dénaturation et neutralisation) n'est nécessaire. Le transfert a donc lieu sans étape préalable. Le montage consiste donc à un papier 3M placé sur un plateau dans un bocal, le gel inversé sur ce papier, la membrane de nylon (trempé dans le 10XSSC au préalable), 2 papiers 3M par-dessus, une épaisseur d'environ 5-10cm de papier à absorber et finalement un poids déposé sur le dessus. Du tampon 10XSSC est placé dans le fond du bocal pour assurer un mouvement du transfert. Le transfert doit être de 18-24 heures.

Une fois le transfert terminé, tant pour le transfert en gel de polyacrylamide que pour le gel d'agarose, la membrane est récupérée et l'ADN transféré est fixé aux U.V. La révélation peut alors avoir lieu. La détection se fait de la même façon que la détection de l'hybridation (voir section 2.3.7)

2.10 Dosage de l'activité de l'aminopeptidase A sur la leucine- ρ -nitroalanine

Cette expérience (McCulloch *et al.*, 1994) est effectuée de la façon suivante : La réaction a lieu dans un volume de 1ml qui contient 380 μ l d'eau distillée, 10 μ l MnCl₂ (100mM), 10 μ l leucine- ρ -nitroalanine (10mM), 10 μ l protéine PepA (ou de l'échantillon) et 500 μ l du tampon 2x d'essai peptidique (40mM Tris-Cl pH8.2, 200mM KCl, 0.2mM EDTA et 2mM MgOAc). Cette réaction est incubée 30 minutes à 37°C sans agitation. Comme témoin négatif (qui servira de blanc au spectrophotomètre), il suffit de remplacer le 10 μ l de protéines par de l'eau distillée. La lecture est faite au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400nm. La formule pour calculer l'activité de la peptidase est :

$$((A_{400}/\text{temps d'incubation}) \times 10^6) / 1.55 \times 10^4 = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de protéines ajoutées.}$$

La valeur de 1.55×10^4 correspond au coefficient de la molarité du 4-nitroalanine produit après réaction.

2.11 Test de toxicité sur valine-leucine

L'aminopeptidase A est une protéine qui clive la valine-leucine et les produits de clivage sont toxiques pour la bactérie *E.coli* (McCulloch *et al.*, 1994).

La première étape consiste à faire croître la souche bactérienne DS957 (*pepA*) contenant le vecteur d'étude en milieu liquide minimal A avec les suppléments de MgSO₄, thiamine hydrochloride, glucose, du mélange en acides aminés Mix941 (voir section 2.1) pendant 18-20 heures à 37°C sous agitation. De cette culture, nous pouvons ensemercer par strie sur le milieu solide minimal A dans lequel nous avons pris soin d'ajouter la valine-leucine et l'antibiotique juste avant de couler le pétri. Le tout est incubé à 37°C pendant 24-36 heures.

2.12 Dosage β -galactosidase

Le dosage (Miller, 1972) qui est fait dans cette expérience a pour but de déterminer le niveau de répression de la protéine PepA et de ses mutants sur le promoteur *carA* (de la carbomoyle phosphatase) fusionné au *lacZ*. Ce type de dosage est effectué dans le milieu minimal A auquel on ajoute 20 μ g/ml de thiamine hydrochloride, 1mM de MgSO₄, de 0.4% de glucose, 1.5% de casamino acids, 50 μ g/ml de cytidine et 34 μ g/ml de chloramphénicol (ceci correspond au milieu de croissance adapté pour les souches C600B, C955B et RFM655). Une première croissance de 18 heures est faite selon les conditions mentionnées ci-haut puis une sous-culture est partie avec les mêmes conditions, mais cette fois la croissance, à 37°C avec agitation, est maintenue jusqu'à l'obtention d'une densité cellulaire allant de 0.200 à 0.700 pour une lecture de 600nm au spectrophotomètre. Les cellules sont ensuite placées sur glace durant 20 minutes pour arrêter (ou ralentir) la croissance cellulaire. Un échantillon de cellules est alors prélevé dans le but de mesurer la densité optique à 600nm.

Le dosage peut maintenant être fait. Du tampon Z (0.06M Na₂HPO₄, 0.04M NaH₂PO₄.H₂O, 0.01M KCl, 0.001M MgSO₄, 0.05M mércapto-éthanol, pH7.0), nous prenons 500 μ l de ce dernier et le plaçons dans un eppendorf de 1,5ml. À ceci nous ajoutons 500 μ l de cellules. La lyse cellulaire est faite par l'ajout de 2 gouttes de chloroforme et une goutte de SDS 0.1% et le tout est mélangé au vortex pendant un minimum de 10 secondes. Le ou les eppendorfs sont ensuite placé(s) dans un bain à 28°C pendant 5 minutes. Nous ajoutons, après cette incubation, 200 μ l d'ONPG (4mg/ml dilué dans 1x milieu minimal A) et remplaçons le ou les tubes à 28°C jusqu'à l'apparition de la coloration jaune, ce temps doit être noté. La réaction est arrêtée par l'ajout de 450 μ l de NaCO₃ (1M). Chacun des tubes est ensuite dosé par spectrophotomètre aux valeurs de 420nm et 550nm.

Les données obtenues permettent de déterminer le nombre d'unités de β -galactosidases produites avec l'aide de la formule suivante :

$$\text{Unités} = 1000 \times (\text{D.O}_{600} - (1.75 \times \text{D.O}_{550})) / (\text{temps} \times 0.500 \times \text{D.O}_{420})$$

2.13 Test de complémentation

Le test de complémentation consiste à montrer la capacité d'une protéine modifiée à combler l'absence d'une protéine sauvage dans le système de recombinaison. Nous utilisons donc la souche DS957 (*pepA⁻*), à laquelle nous introduisons par transformation le vecteur pCS210 (vecteur de recombinaison). Nous sélectionnons cette transformation par l'utilisation d'un pétri LB avec 6.25µg/ml de tétracycline et 40µg/ml de X-gal, après une croissance à 37°C pendant 20 heures. Les colonies obtenues sont alors rendues chimiocompétentes afin de procéder à la deuxième transformation qui permet d'introduire le vecteur d'expression.

Cette deuxième transformation est sélectionnée sur gélose LB avec 6.25µg/ml de tétracycline, 100µg/ml d'ampicilline et 40µg/ml d'X-gal et 0.5mM d'IPTG. La période d'incubation est de 20-24 heures à 37°C. La détermination du résultat dépend de la couleur des colonies obtenues (bleu = sans complémentation, blanc = complémentation).

Résultats

3. Résultats

Avant d'entreprendre des études sur la protéine PepA et des interactions possibles avec ArgR, plusieurs constructions ont dû être préparées. Dans un premier lieu, une souche bactérienne d'*E.coli pepA⁻, argR⁻ et carA-lacZ-Ap^R* devait être construite. Par la suite, une mutagenèse sur le gène *pepA* devait être produite pour tenter de cibler et déterminer des régions importantes de cette protéine qui pourraient nous informer ou nous guider vers une caractérisation plus détaillée de cette dernière. Par la suite, nous pouvions entreprendre les études nous menant à confirmer ou infirmer le rôle joué par certaines régions de PepA dans la recombinaison.

3.1 Les Constructions génomiques

La construction de la souche *pepA⁻, argR⁻ et carA-lacZ-Ap^R* a été entreprise par l'utilisation de deux souches d'origines différentes. La première, C955B, correspond à la souche déjà existante C600B (*pepA⁻ et carA-lacZ-Ap^R*) à laquelle nous avons inactivé le gène *argR* par transduction. La transduction a été faite à l'aide du phage P1*vir*. Nous avons encapsidé le gène *argR* : :*Km^R* de DS951 et l'avons transféré par transduction dans la souche d'*E.coli* C600B. La seconde souche construite, complètement différente, est RFM655. Cette souche à l'origine RFM443 a été modifiée en premier lieu par transduction du gène *argR* : :*Tr^R* de DS956 et ceci a donné lieu à la création de la souche RFM956. Ensuite, nous avons transféré dans RFM956 la construction *carA-lacZ-Ap^R* de C600B. Cette transduction a permis la création de la souche RFM600 (*argR⁻, carA-lacZ-Ap^R*). En dernier lieu, le transfert de *pepA* : :*Km^R* de DS957 a été fait pour donner la souche RFM655.

La vérification de ces souches peut être faite de deux façons. La première est le test de recombinaison et ceci pour la souche RFM956, RFM655 et C955B. Le système de recombinaison tire profil de l'existence d'un vecteur, pCS210, qui contient le gène *lacZ* situé entre deux sites de recombinaison *cer*. Lorsque tous les éléments nécessaires à la recombinaison sont présents, i.e. XerC, XerD, ArgR et PepA, il y a recombinaison entre les deux sites et excision du gène *lacZ*. Mais lorsqu'il manque un de ces facteurs,

la recombinaison ne peut avoir lieu. En utilisant un vecteur portant le gène d'origine, il est possible de voir s'il y a complémentation entre la mutation construite et le gène original.

Tableau . IV Activité de recombinaison

Souches	Incorporation	Résultats
RFM443	pCS210	Recombinaison
RFM956	pCS210	Aucune Recombinaison
RFM956	pCS210+pDB169 (ArgR ⁺)	Recombinaison
RFM655	pCS210+pDB169cm (ArgR ⁺)	Aucune Recombinaison
RFM655	pCS210+pXAB21cm (PepA ⁺ et ArgR ⁺)	Recombinaison
C955B	pCS210+pChlo126 (PepA ⁺)	Aucune Recombinaison
C955B	pCS210+pXAB21cm (PepA ⁺ et ArgR ⁺)	Recombinaison

Légende : RFM443 wt; RFM956 (*argR* : :Tr^R); RFM655 (*argR* : :Tr^R, *pepA* : :Km^R et *carA-lacZ-Ap^R*) et C955B (*argR* : :Km^R, *pepA carP6* et *carA-lacZ-Ap^R*). RFM443/pCS210 est le témoin positif permettant de vérifier l'authenticité de la souche d'origine. RFM956/pCS210, RFM655/pCS210/pDB169cm et C955B/pCS210/pChlo126 sont des témoins démontrant l'absence de système complet de recombinaison.

Les résultats de complémentation viennent indiquer l'inactivation des gènes d'intérêts, *pepA* et *argR*. Ceci permettra l'étude de l'effet de mutations ponctuelles dans un contexte précis, le dosage β -galactosidase.

Un autre moyen de vérifier la construction de ces souches, essentiellement pour le transfert du *carA-lacZ-Ap^R* au promoteur *carA*, est par Southern blot. Une sonde contre le promoteur *carA* nous permet de vérifier l'insertion de la construction au bon endroit et une sonde contre le gène *lacZ* nous permet de montrer le transfert de ce dernier.

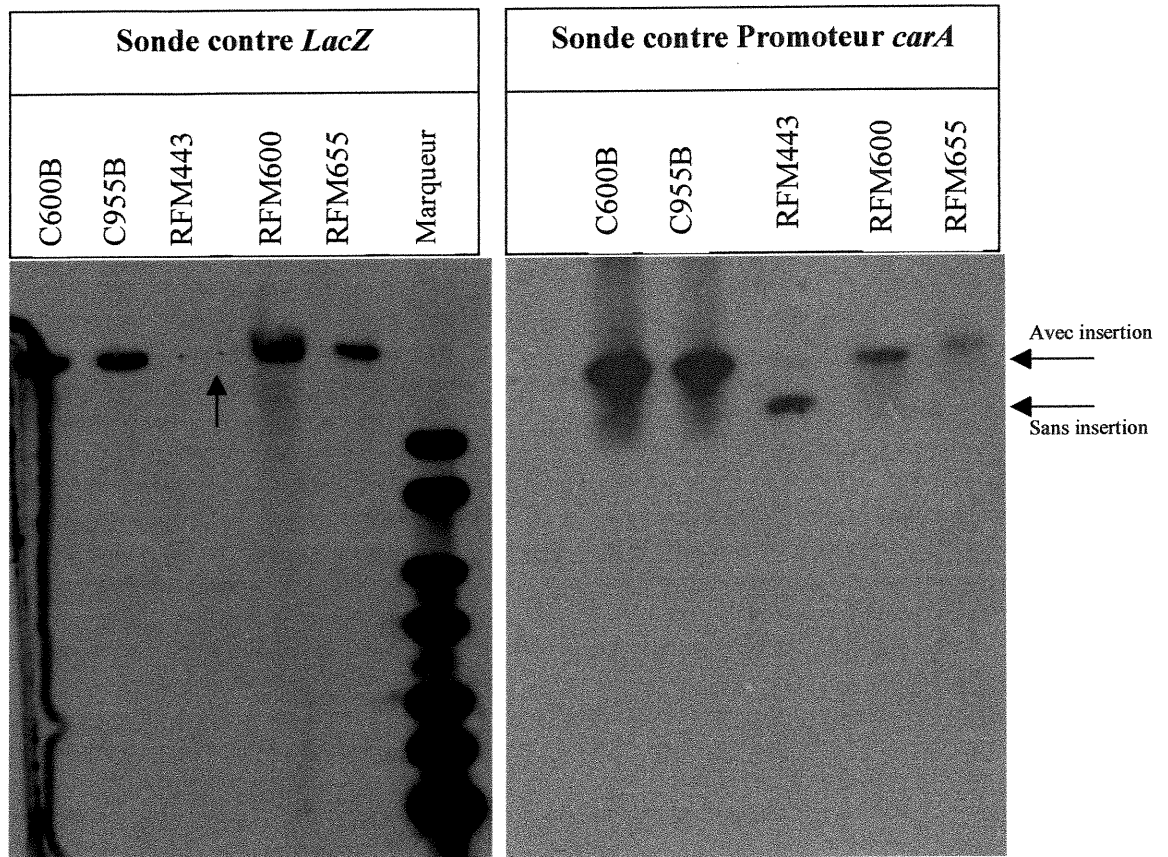


Figure.11 Vérification de transduction par Southern. (1) Sonde contre *lacZ* démontre l'absence de ce gène dans la souche RFM443 avant la transduction. (2) Sonde contre la promoteur *carA* montre l'insertion de la construction *carA-lacZ-Ap^R* au niveau du promoteur dans la souche réceptrice RFM443 (Marqueur 1Kb Fermentas)

La sonde contre le gène *lacZ* a hybridé contre toutes les souches sauf RFM443. Ceci montre que cette dernière ne possédait pas à l'origine le gène en question et qu'il a bien été transféré lors de la transduction. La sonde contre le promoteur *carA* montre l'absence de la construction voulue dans la souche RFM443. Les souches RFM600 et RFM655 démontre la présence de la fusion *carA-lacZ-Ap^R* par la migration plus lente du fragment hybridé.

3.2 Les Constructions plasmidiques

Les constructions ou les mutations faites lors de ce travail ont tous eu pour objectif de préparer les études de toxicité à la valine-leucine, de l'essai peptidique ou du dosage β -galactosidase. Les études de dosages β -galactosidases demandaient un changement dans la résistance des vecteurs d'expression (ampicilline résistant) puisque les souches bactériennes utilisées pour cette expérience possédaient déjà la résistance à l'ampicilline. Donc tous les vecteurs qui devaient être utilisés pour cette expérience, tant pour les contrôles que pour les mutants à l'étude, ont tous changé leurs résistances pour une résistance au chloramphénicol (voir tableau III).

Les modifications les plus importantes sont celles qui ont nécessité des mutations ponctuelles. Les constructions des vecteurs pCS446, pCS449, pCS452 et pCS455 sont celles qui seront exposées ici. Il faut en premier lieu chercher à obtenir par PCR un vecteur circulaire qui possède la mutation voulue. Par la suite, la vérification de ce prétendu mutant peut être faite par digestion enzymatique et visualisée sur gel polyacrylamide.

Dans un premier temps, les PCR doivent produire une amplification complète de vecteur. Nous recherchons donc après ceux-ci, la présence sur gel d'agarose 0,8% un signe de vecteur circulaire de même poids moléculaire que le vecteur d'origine, pCS126.

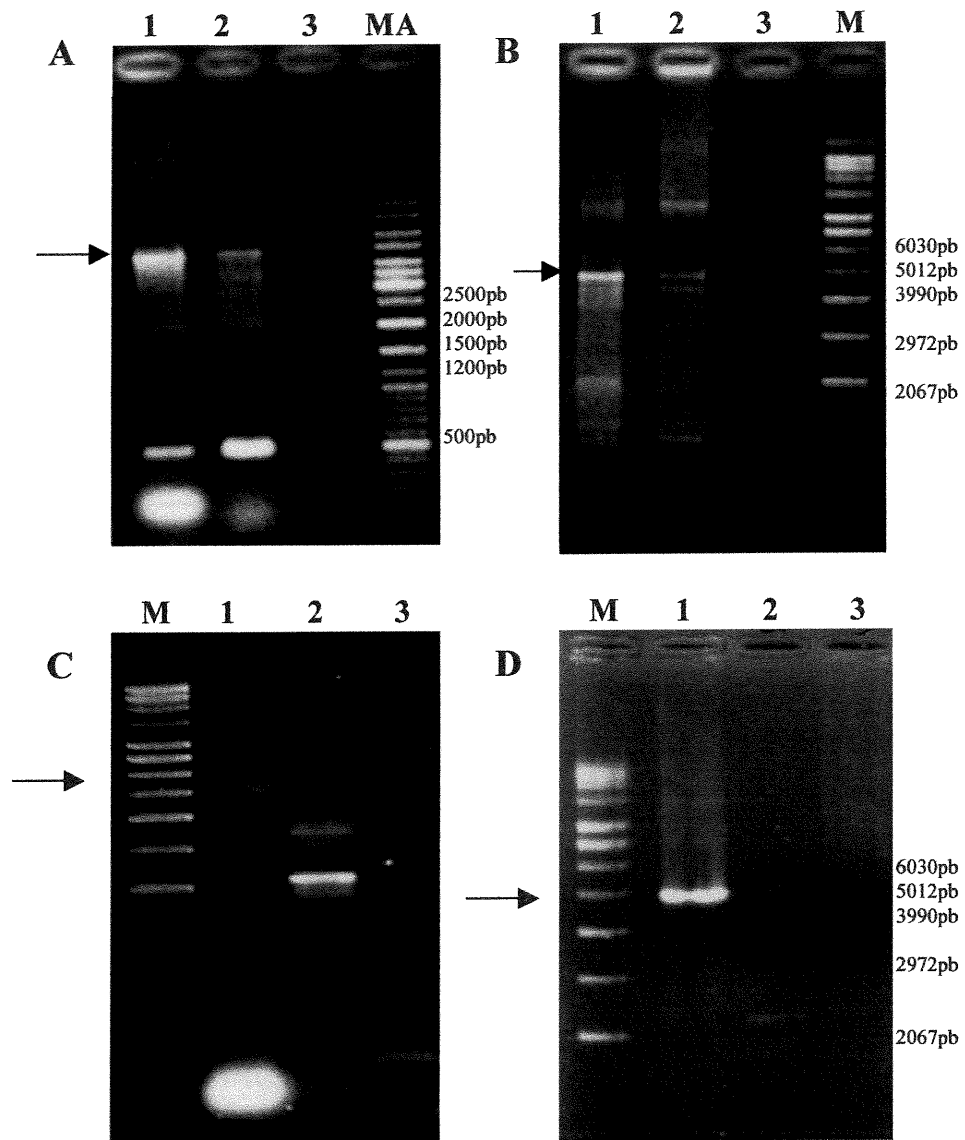


Figure.12 Mutagenèse ponctuelle par PCR inverse sur gel d'agarose 0,8%. (A) Résultats d'amplification de la mutation 446. 1. Produit de PCR final à l'aide des deux amorces mpepAG446A et mpepAinvG446A. 2. Contrôle d'amplification à l'aide d'une seule amorce mpepAG446A. 3. Contrôle d'amplification à l'aide d'une seule amorce mpepAinvG446A. (B) Amplification pour la mutation 449. 1. Amplification avec les deux amorces mpepA449 et mpepAinv449. 2. Contrôle avec amorce mpepA449 seule et 3. Avec amorce mpepAinv449 seule. (C) Amplification de la mutation 452. 1. Avec les deux amorces, pepAC452A et pepAinvC452A. 2. Une seule amorce, pepAC452A et 3. l'autre, pepAinvC452A. (D) Amplification de la mutation 455. 1. Les deux amorces, mpepAS455ApepA et mutS455ApepAinv. 2 et 3 une seule amorce dans l'ordre. (M) Marqueur d'ADN circulaire de Gibco et (MA) Marqueur d'ADN linéaire de Fermentas (ladder mix).

Après avoir obtenu le produit recherché par PCR, le tout est digéré avec l'enzyme de restriction *DpnI* et transformé. Les clones produits sont analysés pour confirmation.

Comme il a été mentionné dans la section 2.7.2, de matériels et méthodes, les modifications ponctuelles par PCR portées au gène *pepA* peuvent être vérifiées par digestion enzymatique. La digestion doit être faite sur un fragment d'ADN amplifié par PCR et le plus petit possible afin de distinguer la mutation voulue. Une des raisons de ceci est que les modifications qui ont été apportées entraînent la création ou l'enlèvement d'un site de restriction qui dans la majorité des cas est loin d'être un site unique. Il est donc essentiel de travailler sur un fragment d'ADN petit et également de travailler sur gel de polyacrylamide puisque les fragments d'ADN obtenus après la digestion enzymatique sont de l'ordre des dizaines de paires de bases. Le gel de polyacrylamide est l'outil par excellence pour voir de petits bouts d'ADN. De plus, l'utilisation du PCR pour amplifier la région à l'étude permet de concentrer l'ADN et de bien visualiser le résultat. Il est important de mentionner que les mutants ainsi créés n'ont pas été vérifiés par séquençage. Il faut donc tenir compte de la présence possible de mutations ailleurs dans la séquence du gène *pepA* qui pourrait affecter les résultats obtenus dans les tests de contrôle.

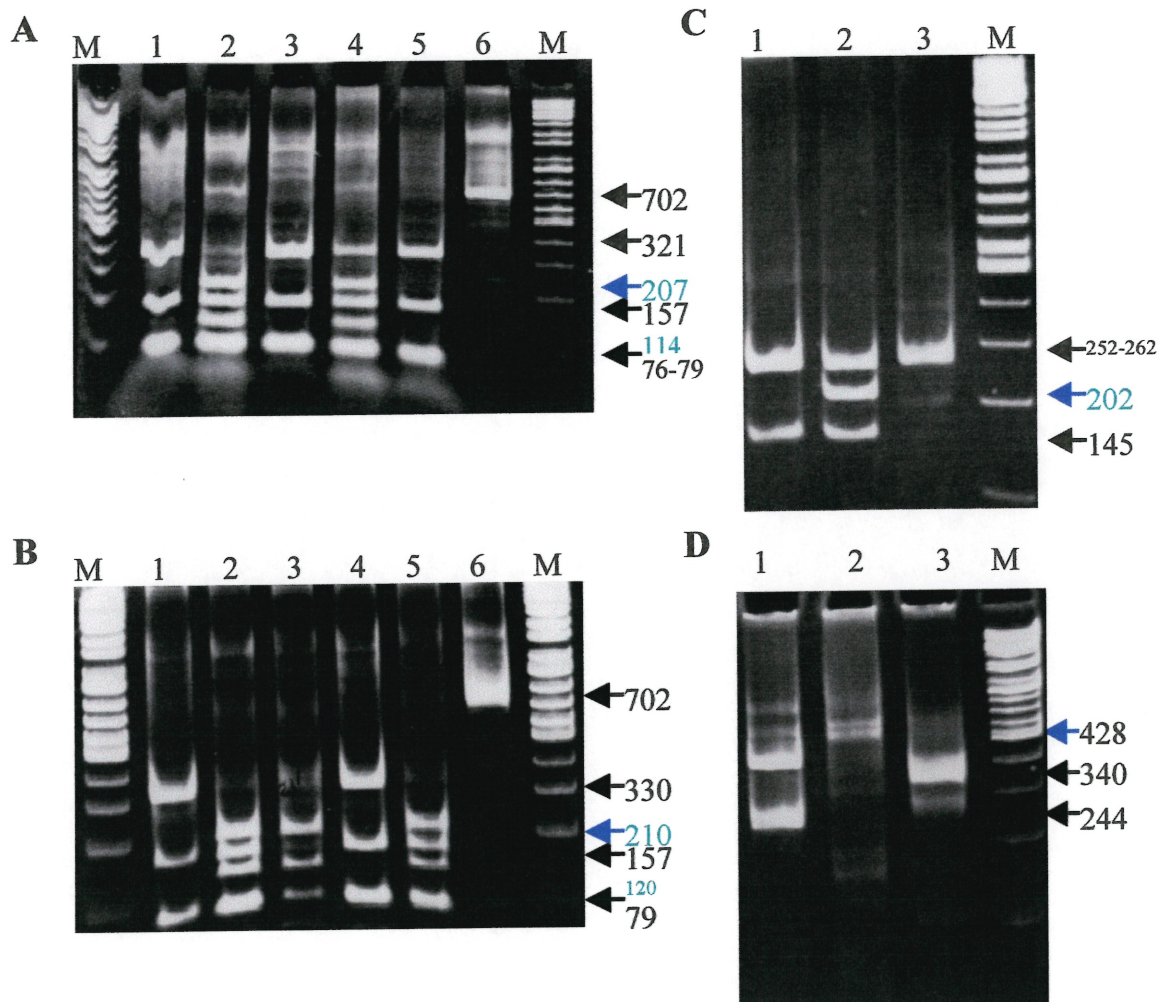


Figure.13 Vérification par digestion enzymatique des mutants obtenus après PCR. traitement à la *Dpn1* et transformation. Dans tous les cas, les mutants potentiels étaient amplifiés par PCR à l'aide des amorces pepA997-1014 et pepA-T. Le produit de 702pb obtenu est alors digéré par l'enzyme de restriction approprié et migré sur gel de polyacrylamide 5%. L'efficacité de la mutagenèse est d'environ 40-50% (A) Mutant 446 digéré par *Fnu4HI*. 1 à 4. Différentes unités clonales obtenues après transformation. 5. Témoin pCS126 digéré. 6. Contrôle d'amplification (702pb) de pCS126 avant digestion. (B) Mutant449 digéré par *Fnu4HI*. 1. Contrôle pCS126 digéré par *Fnu4HI*. 2 à 5. Quatre unités clonales parmi d'autres obtenus suite à la transformation. 6. Contrôle avant digestion. (C) Mutant452 digéré par *NlaIV*. 1. Contrôle pCS126 digéré par *NlaIV*. 2. Mutant digéré conforme. 3. Mutant non conforme. (D) Mutant 455 digéré par *Tsp45I*. 1. Mutant conforme. 2. Mutant non conforme. 3. Contrôle pCS126 digéré.

3.3 Les dosages β -galactosidase

Plusieurs tests peuvent être faits afin de vérifier l'intégrité de la protéine PepA et de ses mutants. Un des tests les plus simples qui ne nécessite aucune extraction protéique est le dosage β -galactosidase. Ce type d'expérience est très important, car il nous renseigne sur des éléments importants des protéine étudiées; la capacité de PepA et de ses mutants à lier le promoteur *carA*, donc de conserver sa fonction de liaison à l'ADN. L'expérience nous permet de doser le niveau de répression sur le promoteur *carA* par l'aminopeptidase A (et aussi de ArgR). Ceci est possible grâce à une fusion entre le promoteur et le gène *lacZ*. Lors de cette étude, nous avons procédé également à une comparaison de l'effet du milieu de croissance sur le taux de répression de la transcription de la β -galactosidase, car le promoteur *carA* est également contrôlé par la présence de pyrimidine par un opérateur placé entre les régions de liaison de la protéine PepA (voir figure.8) .

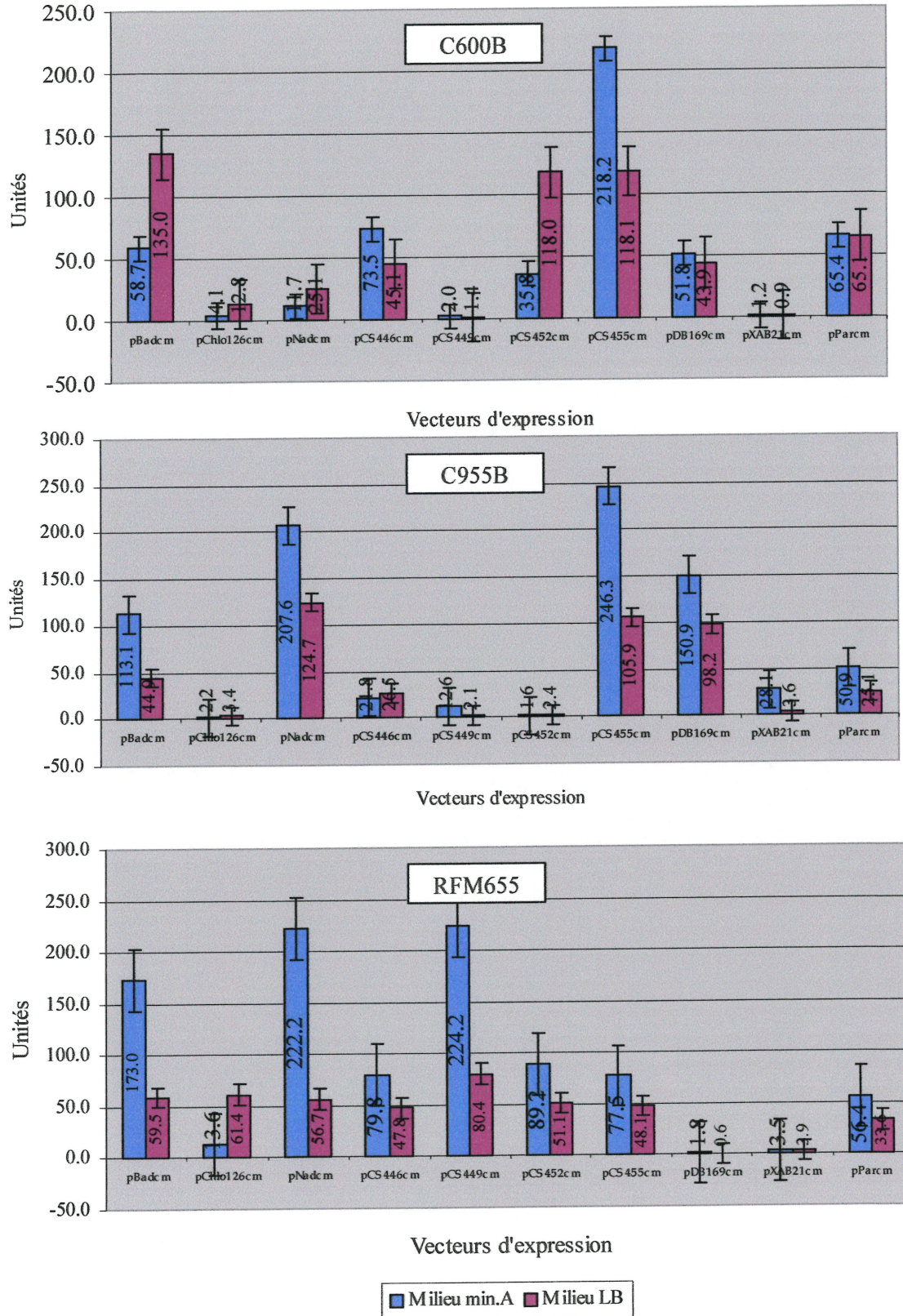


Figure.14 Observation des niveaux de répression sur le promoteur *carA* par les protéines PepA et/ou ArgR qui sont exprimées dans les souches bactériennes C600B, C955B et RFM655, tout en comparant l'effet des milieux de croissance utilisés.

Le contrôle du promoteur *carA* est un procédé complexe qui n'est pas toujours pas compris en détail. Sachant que la présence de pyrimidine jouait sur le contrôle, mais également que d'autres facteurs pouvaient influencer le promoteur *carA*, nous avons décidé d'observer l'influence du milieu de culture lorsqu'en présence des protéines à l'étude, PepA et ArgR.

Le génotype de la souche C600B est *argR*⁺, *pepA*⁻. Nous observons donc ici l'influence de répression en présence du répresseur d'arginine. Les éléments les plus importants à noter sur la souche C600B lors de la comparaison des dosages en milieu pauvre et riche consiste à l'effet peu perceptible de cette variation de conditions pour les vecteurs testés sauf pour le contrôle pBadcm et les mutants de PepA452 et PepA455. Le contrôle pBadcm montre bien l'effet important de la présence de facteurs variables dans le milieu de croissance. La protéine PepA452 semble être affectée par cette variante qui montre une diminution de répression. Le mutant PepA455 semble être activateur en milieu minimal. De plus, le PepA449 donne un résultat semblable à pXAB21cm, c'est-à-dire comme si ArgR était présent en condition de surexpression.

La seule différence que possède la souche C955B versus la souche C600B est l'inactivation du gène *argR*. L'inactivation de ce gène dans cette souche est perceptible dans le contrôle lorsque nous comparons les souches C600b et C955B ensemble. Dans la souche C955B, l'effet du milieu se fait sentir surtout pour les vecteurs pBadcm, pNadcm, pCS455cm, pDB169cm et plus faiblement pour pXAB21cm. Encore ici, nous observons que les données de pCS449cm et pXAB21cm sont semblables.

La souche RFM655 (*argR*⁻ et *pepA*⁻, origine RFM443) est une souche avec des antécédents complètement différents des souches C600B et C955B. Il est donc intéressant de voir l'impact de cette variante sur la répression de *carA*. Les dosages effectués dans le milieu minimal donnent des niveaux beaucoup plus élevés de β -galactosidase comparativement aux cultures en milieu riche. De plus, seul PepA sauvage en milieu pauvre démontre vraiment une répression adéquate, quoique beaucoup moins efficace que la répression exercée dans les souches C600B et C955B. ArgR semble être la seule protéine possédant des capacités de répression dans les deux milieux et elle semble même plus efficace que lorsque exprimée dans la souche C955B.

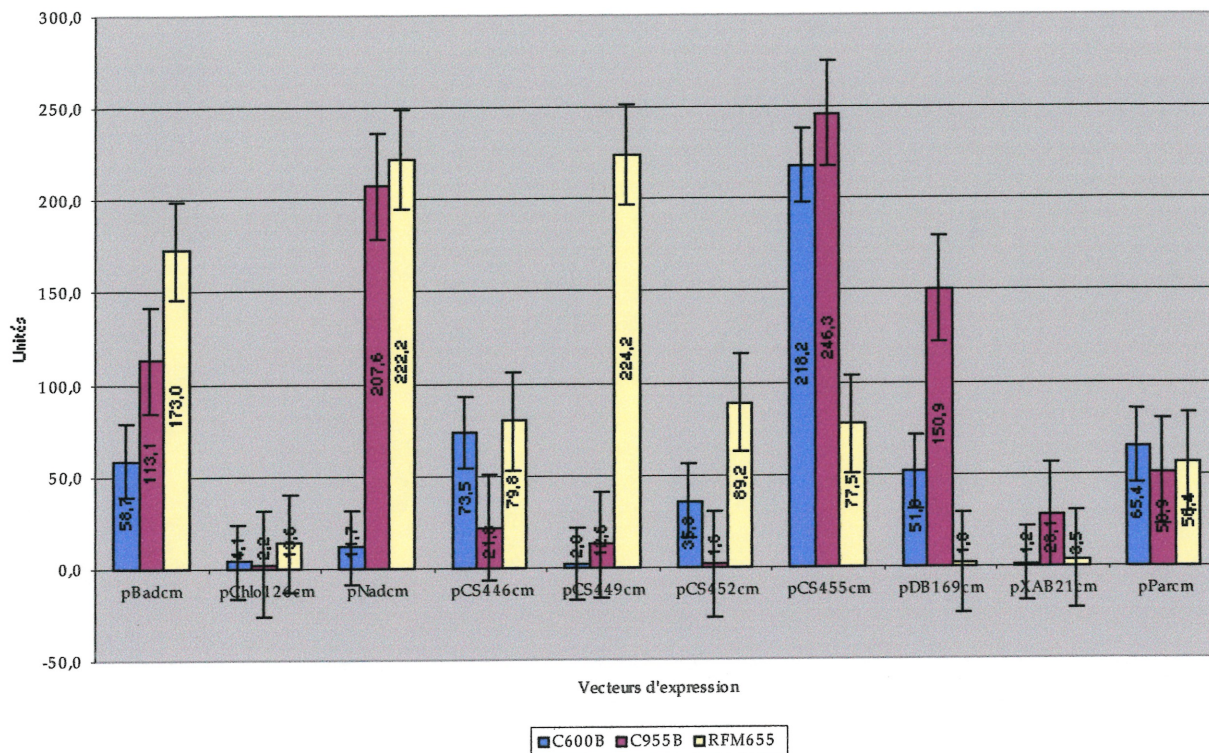


Figure.15 Comparaison de dosage β -galactosidase entre les souches C600B, C955B et RFM655 en milieu minimal A

En utilisant les même données des graphiques précédents, il nous est possible de faire une comparaison des résultats obtenus par chaque souches.

L'effet de l'absence de la protéine ArgR est très important lorsque nous comparons les résultats de C600B et C955B en milieu pauvre. Dans le contrôle pBadcm, le niveau de répression diminue en milieu pauvre. L'effet de la surexpression de PepA sauvage n'est pas affectée par l'absence de ArgR, ce qui confirme que PepA est le répresseur majeur de cette voie. pNadcm est le vecteur le plus affecté par cette absence. Encore ici, nous pouvons toujours observer un résultat comparable entre pCS499cm et pXAB21cm.

La comparaison entre les souches C955B et RFM655 montre que dans les contrôles pBadcm et pChlo126 (aussi pNadcm, pXAB21cm et pParcm), le niveau de β -galactosidase est semblable entre ces deux souches, ceci lors de la croissance en milieu pauvre. Les vecteurs les plus affectés sont les quatre mutants ponctuels et le vecteur pDB169cm, exprimant la protéine ArgR sauvage.

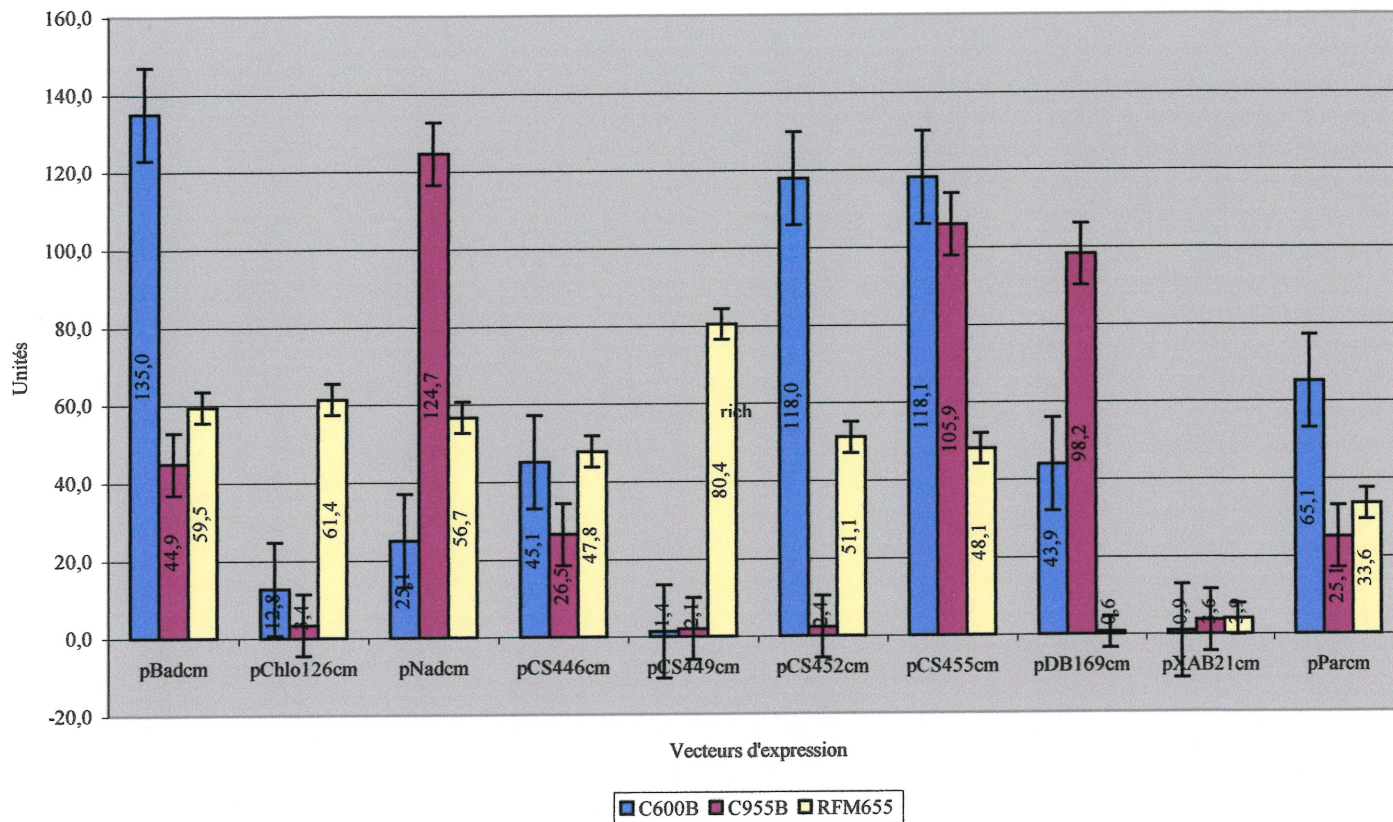


Figure.16 Étude comparative en dosage β -galactosidase entre les souches d'*E.coli* C600B, C955B et RFM655 fait en milieu LB (riche)

Une comparaison entre les deux souches, C600B et C955B, cultivées en milieu riche montre plusieurs divergences, essentiellement pour le témoin pBadcm, pCS452cm et pParcm. Les autres protéines semblent au contraire peu affectées par la présence ou l'absence de la protéine ArgR. Encore ici, pCS455cm produit toujours une très grande quantité de β -galactosidase. La comparaison entre pCS449cm et pXAB21cm donne toujours le même patron que ceux observés lors des dosages précédents.

Cette même comparaison entre C955B et RFM655, mais cette fois lors de la croissance cellulaire en milieu riche est complètement différente pour PepA sauvage. Aussi, les résultats avec le vecteur pCS446cm sont beaucoup moins divergents. L'effet de ArgR est surtout visible sur la souche RFM655 et celle de PepA sur la souche C655B aussi.

3.4 Test de toxicité sur valine-leucine

Le test de toxicité est un moyen *in vivo* pour observer l'activité aminopeptidase de l'aminopeptidase A et ceci sans nécessiter une purification de la protéine à l'étude.

Tableau .V Activité aminopeptidase de PepA *in vivo* sur milieu minimal A solide lors de la croissance de la souche DS957

Protéine induite	Croissance	Interprétation
PepA (pCS126)	—	Activité peptidase normale
pBad	+++	Aucune activité peptidase (Contrôle négatif)
pAC3C	+++	Perte de l'activité peptidase
pNad	+++	Perte de l'activité peptidase
PepA446 (pCS446)	++	Perte de l'activité peptidase
PepA449 (pCS449)	++	Perte de l'activité peptidase
PepA452 (pCS452)	++	Perte de l'activité peptidase
PepA455 (pCS455)	++	Perte de l'activité peptidase

Le test de toxicité est un test qui démontre l'activité de l'aminopeptidase A à cliver la valine-leucine et ainsi produire un facteur toxique à la croissance bactérienne. Nous utilisons pour cela la présence de valine-leucine à une concentration de 75µg/ml. La protéine PepA sert de témoin positif. Elle démontre que lorsque la protéine est toujours active, elle coupe la valine-leucine. Alors, aucune croissance n'est observée puisque le produit de clivage obtenu est toxique. pBad est le témoin négatif démontrant la facilité de croissance lorsque la valine-leucine n'est pas clivé. Ceci montre que la souche de base, DS957, utilisée pour cette expérience, est bien inactive au niveau de l'expression du gène *pepA* et que les résultats observés sont attribuables à l'expression protéique des vecteurs introduits dans la souche DS957. Nous observons que tous les mutants à l'étude sont déficients au niveau de l'activité peptidique. Il est à noter que les souches portant les vecteurs pCS446, pCS449, pCS452 et pCS455 ont nécessité une période plus longue de croissance, environ 6 heures de plus, que le témoin pBad pour atteindre le même niveau de croissance.

3.5 Dosage de l'activité de l'aminopeptidase A

L'essai de l'activité de l'aminopeptidase A est un moyen *in vitro* de déterminer si les mutants de PepA ont conservé leur activité peptidase et de doser cette activité (ceci même si cette action n'est pas requise pour la recombinaison). Cette expérience doit normalement être faite à partir de protéines purifiées. Lors des essais d'induction des mutants PepA, soient pCS446, pCS449, pCS452, pCS455 et pNad, aucune induction n'était visible sur SDS-PAGE. Les essais peptidases ont donc été tentés sur des extraits de protéines bruts (Tableau.VI).

Une première constatation remarquable est de voir l'effet de la présence d'extraits protéiques bruts ou de protéines pures sur l'activité peptidique de PepA. L'activité de PepA brute (pCS126) est d'au moins 26% plus faible que la protéine purifiée. Il existe donc une possibilité de la présence d'inhibiteurs dans l'extrait brut. De plus, le témoin négatif, pBad, démontre un niveau basal de lecture. Ceci peut compliquer l'analyse, mais lorsque nous enlevons le niveau basal à chacun des échantillons (en fonction du tampon de resuspension), nous remarquons que seulement trois extraits bruts démontrent un niveau d'activité peptidique. PepA sauvage (pCS126) est activé en milieu salin avec un niveau de 0.68. Les deux autres mutants qui démontrent une activité peptidase sont les mutants pCS446 et pCS452. Toutes les deux possèdent l'activité en milieu «low salt», ce qui est contraire à la protéine sauvage. Le niveau de PepA455 est comparable à PepA et celui de PepA446 est plus faible.

Tableau .VI Essai *in vitro* de l'activité aminopeptidase sur des extraits bruts

Échantillons	Tampon de resuspension	Activité peptidase (μ moles/min par (mg) de protéine)	Étendue l'activité de l'aminopeptidique A
PepA WT pur ¹	*****	6.30	2.61
pCS126	« Low salt »	2.59	(-0.23)
	« Hight salt »	4.37	0.68
pBad	« Low salt »	2.82	0
	« Hight salt »	3.69	0
pCS446	« Low salt »	3.11	0.29
	« Hight salt »	3.22	(-0.47)
pCS449	« Low salt »	2.55	(-0.27)
	« Hight salt »	2.88	(-0.81)
pCS452	« Low salt »	3.55	0.73
	« Hight salt »	3.04	(-0.65)
pCS455	« Low salt »	2.01	(-0.81)
	« Hight salt »	2.53	(-1.16)
pNad	« Low salt »	2.33	(-0.49)
	« Hight salt »	1.66	(-2.03)
pAC3C	« Low salt »	2.36	0
	« Hight salt »	1.23	0

Note : L'essai peptidase a été fait à partir d'extrait brut de protéines. Pour ce faire, chacune des souches bactériennes étaient soumises à une induction de 2 heures dans la souche DS957. Par la suite les cellules étaient récoltées par centrifugation, resuspendues dans le tampon approprié et sonifiées. Les unités d'activités peptidiques sont μ moles/min par (mg) de protéine ajouté. La comparaison de l'activité aminopeptidase correspond à la différence entre l'activité peptidase mesurée de l'échantillon et du contrôle pBad dans le tampon correspondant (une valeur de 2.82 pour le tampon « low salt » et 3.69 pour le tampon « hight salt »). 1. La protéine PepA pure a été obtenue selon la méthode de purification mentionnée dans la section 2.8.

3.6 Test de recombinaison

Le test de recombinaison est un test *in vivo* permettant de déterminer la capacité de la protéine à l'étude à compléter l'inactivation du gène sauvage de cette protéine dans le rôle joué par cette dernière dans le système de recombinaison spécifique de sites de type Xer.

Tableau .VII Étude de recombinaison sur la souche DS957 (*pepA*) à l'aide du vecteur de recombinaison pCS210.

Vecteurs d'expression	Colonies obtenues	Interprétation
pCS210	Bleues	Sans Recombinaison (Témoin négatif)
pCS210 + pCS126	Blanches	Recombinaison
pCS210 + pCS446	Blanches	Recombinaison
pCS210 + pCS449	Blanches	Recombinaison
pCS210 + pCS452	Blanches	Recombinaison
pCS210 + pCS455	Blanches	Recombinaison
PCS210 + pNad	Bleues	Sans Recombinaison
pCS210 + pAC3C	Bleues	Sans Recombinaison

La recombinaison est un moyen efficace pour déterminer l'intégrité d'une protéine mutée qui est impliquée dans ce système. Le système utilise le vecteur pCS210 qui lorsque soumis au système de recombinaison perd le gène *lacZ*. Ce test nous montre que les quatre mutants PepA446, PepA449, PepA452 et PepA455 ont conservé leur activité essentielle à la recombinaison. Les mutations qu'ils portent sont des mutations ponctuelles dans l'hélice α -14 pour lesquelles les acides aminés sont changés pour une alanine. Les deux autres mutants, pNad et pAC3C, sont des mutants tronqués de PepA à partir de l'hélice α -14 pour pNad et pAC3C possède un changement de cadre de lecture au même endroit.

Il est possible de visualiser cette recombinaison du vecteur pCS210 en pCS211 par migration sur gel d'agarose. Les plasmides sont extraits des colonies bactériennes obtenues et visualisés sur gel. Un exemple est montré ci-bas pour les mutants ponctuels.

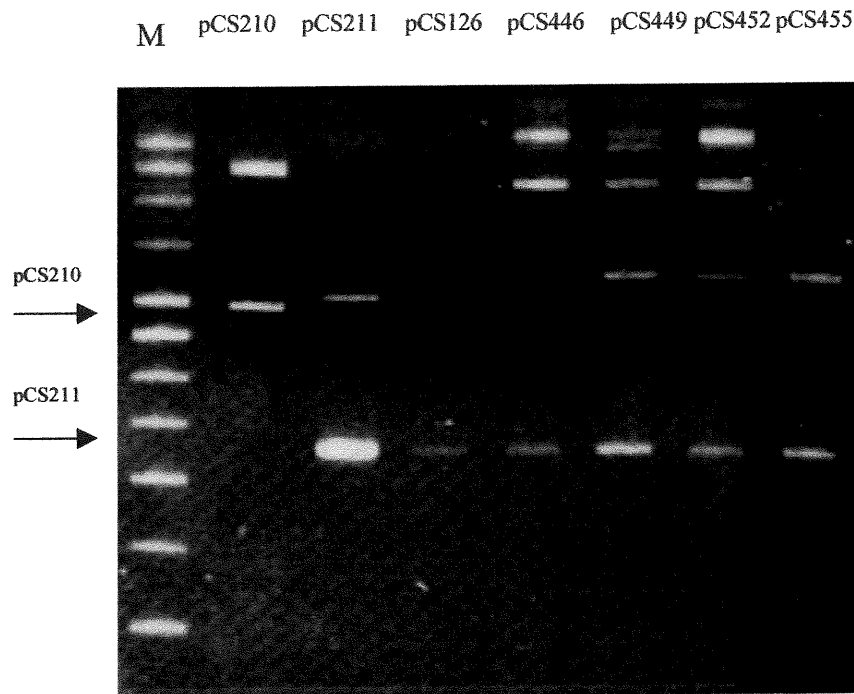


Figure.17 Extraction plasmidique après recombinaison dans la souche DS957. Première flèche indique le niveau du plasmide pCS210 monomérique non-recombiné. La deuxième indique le niveau du vecteur recombiné, pCS211. Les quatre mutants testés donnent les mêmes résultats que le contrôle pCS126

Nous observons la diminution de poids moléculaire du vecteur pCS211 versus le vecteur initial pCS210 lors d'une recombinaison complète. Les bandes supérieures observées sont les formes multimériques des plasmides d'expression qui n'ont pas été monomérisés.

3.7 Retardement sur gel

Dans le contexte de ce travail, les retardements sur gel sont principalement utilisés dans le but d'observer une activité de liaison coopérative à l'ADN entre les facteurs accessoires de la recombinaison, ArgR et PepA. Avant toute chose, il faut tenter de produire un retardement avec la protéine PepA qui soit convenable. Jusqu'à ce jour, le seul retardement observé avec cette protéine est un retardement avec le promoteur *carA* en gel de polyacrylamide (Charlier *et al.*, 1995b). Ce retardement montre un complexe protéine-ADN situé au niveau des puits de migration (ou juste en dessous). Ce retardement, quoique perceptible, ne peut être très utile et pourrait simplement être dû à un encombrement. Il faut donc tenter d'optimiser ce retardement et également d'essayer de produire des retardements sur les sites de recombinaison. Des retardements avec la protéine ArgR sont aussi nécessaires afin de trouver des conditions d'interaction protéine-ADN qui fonctionneront pour les deux protéines lorsque nous tenterons de les faire réagir ensemble dans une même réaction.

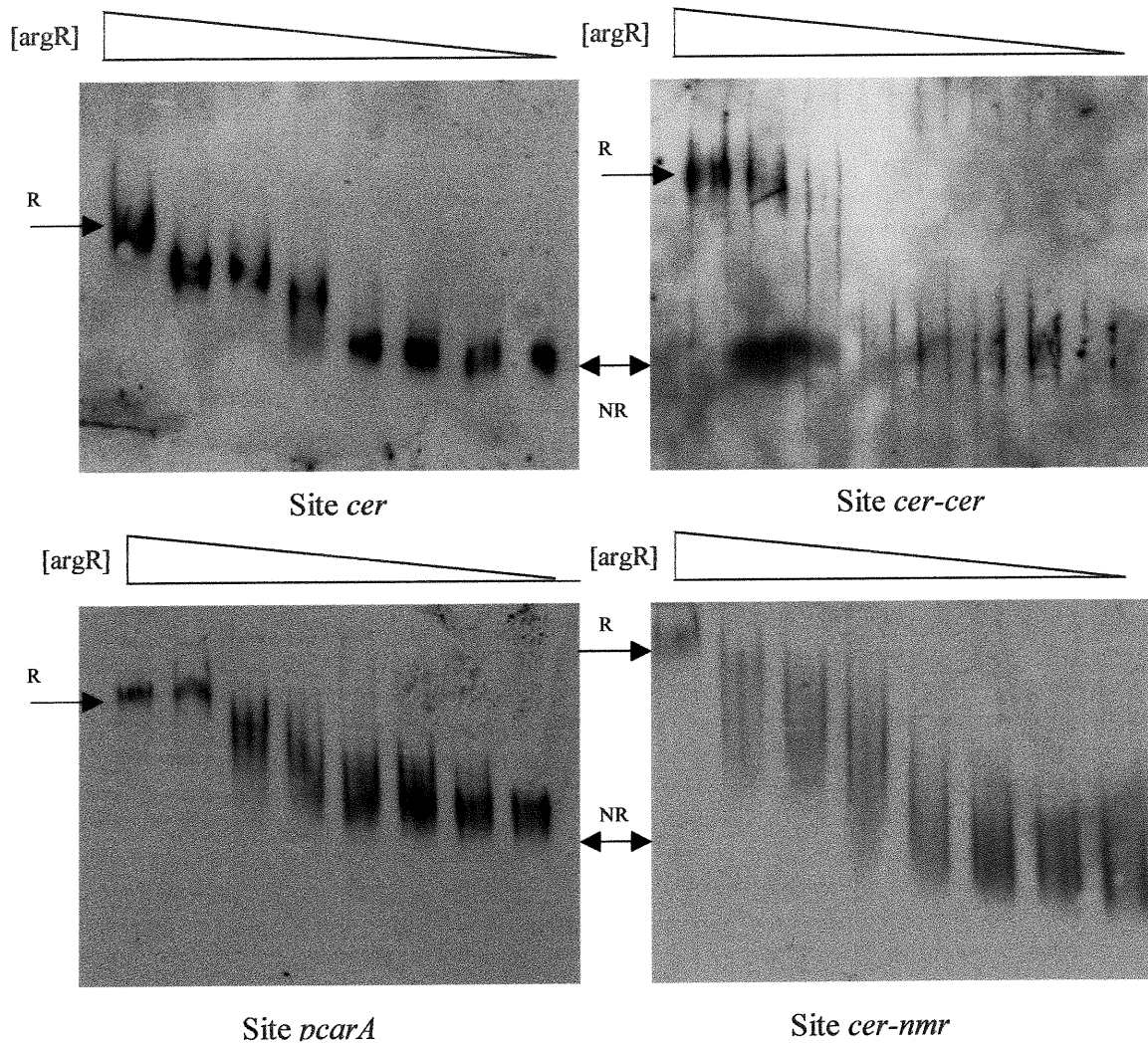


Figure.18 Retardement de la protéine ArgR lors de retardement sur gel de polyacrylamide 5% sur les sites de liaison *cer*, *cer-cer*, *carA* et *cer-nmr*.

La quantité de protéine utilisée est de 19.5, 9.8, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6, 0.3 et 0 pmoles respectivement pour chacun des retardements. Le tampon de réaction est composé de 20mM Tris-Cl pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM L-arginine et 5% glycérol. Un retardement total est perceptible à la concentration de 9.8pmoles pour les sites *cer-cer* et *pcarA*. Les retardements avec un seul site *cer* (une demi-boîte d'arginine) et *cer-nmr* montrent un retardement total lorsqu'en présence de 19.5pmoles de protéines. (NR = non-retardé, R = retardé)

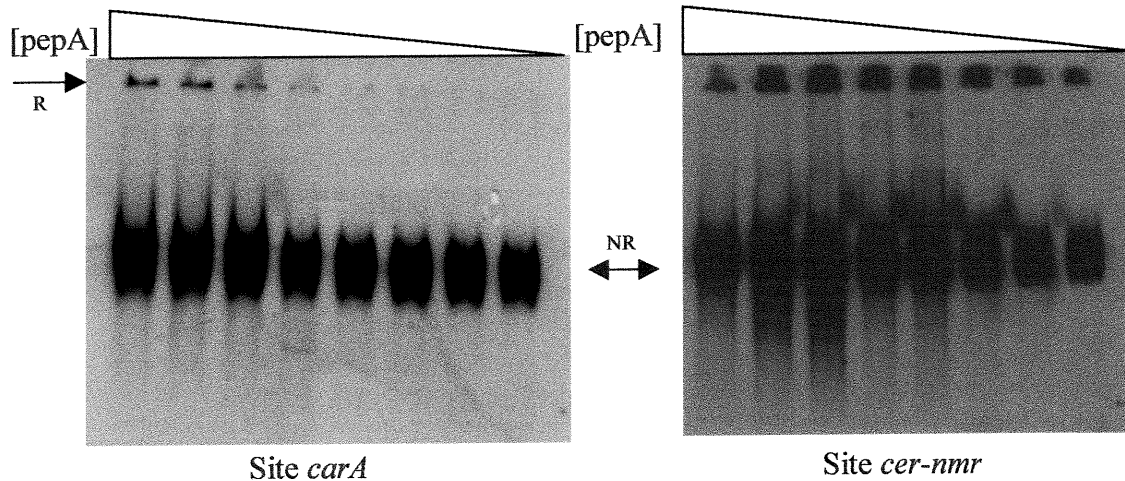


Figure.19 Retardement de la protéine PepA sur gel polyacrylamide de 5% sur les sites *pcarA* et le site de recombinaison *cer-nmr*.

Le retardement est fait avec 45.5, 22.7, 11.4, 5.7, 2.8, 1.4, 0.7 et 0 pmoles de protéines PepA dans les puits respectifs. La réaction a lieu dans le tampon PepA (10mM Tris-Cl pH7.9, 125mM KCL, 10mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 0.1 mM DTT et 5% glycérol). Le pseudo-retardement est situé au niveau des puits de migration. Le complexe ne sort pas des puits ou bien il y a encombrement dans les puits ce qui empêche une bonne migration. (NR = non-retardé, R = retardé).

Le retardement sur *cer-nmr* (et les autres sites, ex :*cer*) ne donne pas le même type de résultats. La présence de précipité dans les puits qui ne peut être attribuée à un retardement, surtout lorsqu'il est perceptible dans le puit témoin sans protéine.

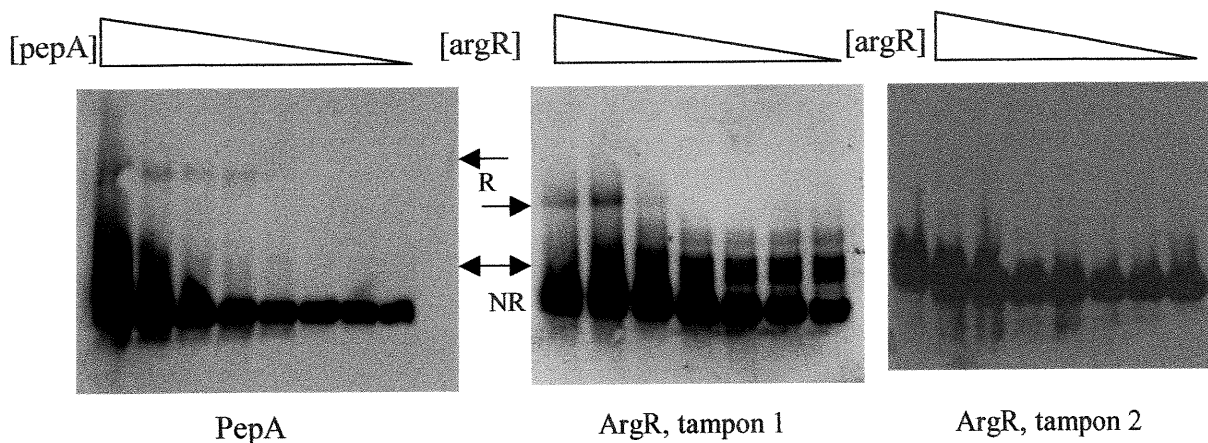


Figure.20 Retardements de PepA ou ArgR sur le site *pcarA* lors d'essai en gel d'agarose 1%

Ici, les retardements effectués en gel d'agarose 1%, 0.5x TBE, ont utilisé les mêmes quantités protéiques que les retardements faits en gel polyacrylamide pour chaque protéine, 19.5, 9.8, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6, 0.3 et 0 pmoles pour ArgR et 45.5, 22.7, 11.4, 5.7, 2.8, 1.4, 0.7 et 0 pmoles pour PepA. Le tampon de PepA utilisé est fait de 10mM Tris-Cl pH7.9, 125mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 0.1 mM DTT et 5% glycérol. Le retardement avec le tampon 1 est composé de 20mM Tris-Cl pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM L-arginine et 5% glycérol. Le tampon 2 du retardement de ArgR est identique à celui de PepA, mais avec 25% de glycérol au lieu de 5% et est additionné de 0.1mM L-arginine. En gel d'agarose, le complexe ADN-PepA n'est pas retenu dans les puits. Le retardement n'est pas total, même avec 45.5pmoles de protéines PepA. Le retardement avec la protéine ArgR est possible en gel d'agarose, mais est beaucoup moins efficace (comparé à la figure.23). De plus, lorsque le retardement avec ArgR est effectué dans le tampon modifié de PepA, le taux de complexe ADN-protéine diminue beaucoup. (NR = non-retardé, R = retardé).

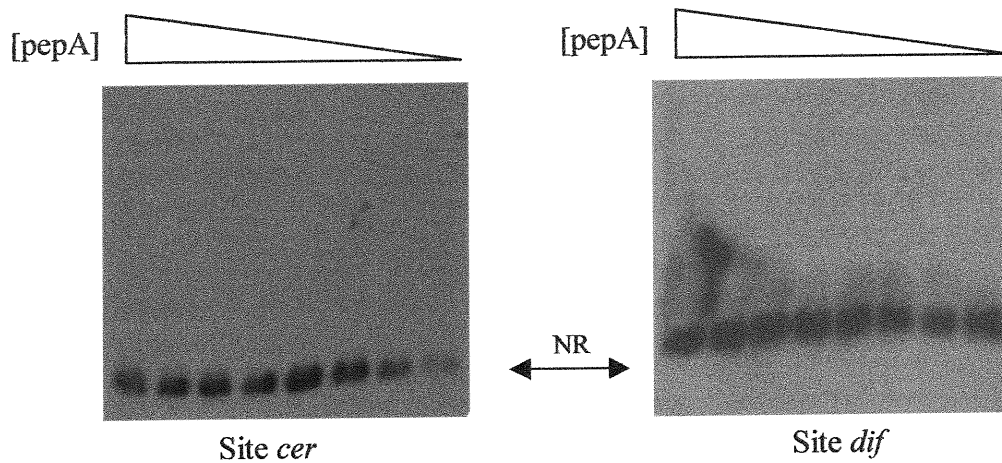


Figure.21 Retardement PepA sur les sites *cer* et un contrôle *dif* sur gel d'agarose 1%

Les retardements ont été faits avec les mêmes conditions (concentrations de protéine et tampon de réaction) que ceux faits dans les pages précédentes. Ici, le site *dif* est un contrôle négatif puisqu'il ne possède pas de sites connus de reconnaissance de PepA. Aussi, un retardement avec le site *cer* se veut un exemple des différents retardements obtenus avec les autres sites (ex :*cer-cer* et *cer-nmr*). Aucun retard n'est perceptible.

En récapitulant les différents retardements obtenus, nous remarquons deux problèmes qui empêchent un retardement simultané de ArgR et PepA. Le premier est le type de gel utilisé lors de la migration des complexes. Le seul gel que nous pouvons utiliser pour un retardement avec PepA est un gel d'agarose. Pour ArgR, le gel d'agarose déstabilise les complexes formés. Mais comme le complexe ADN-protéine est présent, nous pourrions toujours considérer un essai avec les deux protéines. Cependant, voici que l'autre problème vient bloquer cette opportunité c'est-à-dire le tampon de réaction qui doit être utilisé pour les réactions. Dans les deux cas, les tampons optimaux sont différents. Le tampon de PepA et le tampon 2 (PepA modifié) de ArgR sont les tampons les plus similaires, mais lorsque nous voulons changer la concentration de glycérol du tampon de PepA, tout retardement est alors impossible. De même, le retardement avec ce tampon et ArgR est très loin d'être optimal.

Discussion

4. Discussion

L'étude réalisée sur la protéine PepA lors de cette recherche a été entreprise suite à une interrogation sur le rôle que joue cette dernière dans le système de recombinaison spécifique de sites de type Xer. L'aminopeptidase A est une exopeptidase qui, en plus de cette activité, possède des fonctions surprenantes de liaison à l'ADN (Charlier *et al.*, 1995b). Ceci lui permet d'agir à titre de répresseur dans l'une des voies de la biosynthèse d'arginine. De plus, elle est impliquée dans le système Xer comme facteur accessoire lors de la monomérisation des plasmides (Stirling *et al.*, 1989). Son implication dans ce dernier procédé demeure nébuleux. Ainsi, dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de la monomérisation plasmidique par l'entremise du système Xer, il s'avère essentiel de connaître le type d'action joué par PepA. Cette protéine est celle qui a été la moins étudiée parmi tous les facteurs impliqués dans la recombinaison. S'agit-il vraiment d'une interaction spécifique à une séquence d'ADN précise qui permet de conférer la structure de départ de la recombinaison ou bien en est-il tout autrement par des interactions protéiques? Les questions posées ici ont été les éléments déclencheurs de ce projet qui devront permettre de mieux caractériser le système à l'étude et également d'accroître les notions relatives à l'aminopeptidase A.

Dans un premier temps, une étude de mutagenèse aléatoire devait permettre de cibler des régions importantes sur la protéine. Par la suite, ceci entraîna la production de mutagenèses plus spécifiques afin de déterminer quelles étaient les régions ou les acides aminés importants de la protéine dans notre système de recombinaison. À l'aide de cette technique, un mutant pAC3C a été produit. Il comportait un changement de cadre de lecture à partir du nucléotide 1338 (a.a 446) de la protéine. La perte des trois dernières structures hélice α -14, feuillet β et hélice α -15 (donc de 57 acides aminés) entraîne une perte dans la capacité de recombinaison. Ce mutant nous a permis d'entreprendre une mutagenèse ponctuelle au niveau de l'hélice α -14 qui est composée de la séquence suivante : GAITAGCFLS. La majorité des éléments retrouvés dans cette séquence sont de nature non polaires tels G, A, I, C, F et L (Snyder et Champness, 1997). Seuls les acides aminés T et S possèdent des chaînes latérales polaires neutres. Ceux-ci ont été changés pour une alanine (A), un acide aminé non polaire qui ne devrait pas affecter la

structure en hélice. Un autre remplacement a été fait sur la cystéine (C) en position 452 de cette hélice, car ce type d'acides aminés est souvent impliqué dans la formation de ponts disulfures des protéines. Une autre mutation a été faite sur le premier acide aminé de l'hélice, la glycine (G), qui est probablement responsable de la formation de départ de cette hélice. Par ces changements, nous voulons observer l'importance de l'hélice en entier.

La mutagenèse par PCR inverse est la technique utilisée ici. Cette technique possède plusieurs avantages dont la plus importante est la facilité et la rapidité à obtenir les mutants recherchés (Nelson et McClelland, 1992). La technique est très rapide puisqu'elle ne nécessite aucun clonage. La mutation voulue est obtenue sur un vecteur totalement amplifié. De plus, la mutation est facilement confirmée par digestion enzymatique. Un seul élément néfaste à cette technique est le taux élevé d'appariement entre les amorces utilisées. En effet, comme la technique veut que la mutation soit produite à partir des deux amorces, il n'y a d'autres choix que d'avoir une certaine homologie de séquence entre les amorces. Lors des quatre mutagenèses dirigées effectuées, nous avons utilisé des amorces complètement homologues dans certains cas et d'autres avec une homologie moindre. De règle générale, plus l'homologie entre les amorces est grande plus le taux de production du vecteur amplifié diminue. Ceci n'empêche pas la production d'une quantité suffisante de vecteurs amplifiés qui peuvent être traités à la *DpnI* (élimination du vecteur d'origine, pCS126) et transformés. Le taux de transformation est proportionnel à la quantité de vecteurs produits par PCR. Il importe de vérifier la présence de la mutation voulue puisque dans 40-50% des cas, la mutation n'a pas eu lieu. Deux facteurs peuvent être en cause, la première est qu'une digestion par l'enzyme *DpnI* du produit de PCR non purifié n'est pas totale et que certains produits résiduels de pCS126 sont toujours présents lors de la transformation. Dans un deuxième temps, l'efficacité du PCR peut être discutable puisque les amorces sont beaucoup trop apparentées pour permettre une bonne hybridation à la matrice. Quoi qu'il en soit, le taux de succès de cette technique est suffisamment élevé pour obtenir à chaque coup un mutant désiré. Un élément important à mentionner est la possibilité qu'une autre mutation ce soit glissée ailleurs sur la séquence du gène, lors du PCR

inverse. La technique d'amplification par PCR n'est pas parfaite puisqu'il ne comprend pas d'étapes de correction. Mais en utilisant les meilleures enzymes, tel la Vent ou Pfu, les chances d'erreurs sont mieux grandes. Pour éviter un résultat faussé, il est important de vérifier par séquençage de telles manipulations génétiques. Ceci n'a pas été le cas dans ce travail. Il faudrait donc faire ce type de vérification pour confirmer les résultats obtenus.

Les vecteurs pCS446, pCS449, pCS452 et pCS455 (tous des dérivés de pCS126) ont été obtenus par cette technique. Avant d'entreprendre les études de ces mutants, d'autres vecteurs devaient être construits. Dans un premier temps, le vecteur pNad est un vecteur portant le gène *pepA* tronqué à partir de l'acide aminé 446 auquel un codon stop a été introduit. Ce vecteur est plus adapté que pAC3C pour notre étude puisqu'il permet d'observer le véritable effet de l'absence de la partie C-terminale de la protéine, sans la présence d'acides aminés résiduels indésirables. En fait, il est fort possible de la protéine encodée par pAC3C soit instable, ce qui causerait son absence. Donc, par la création du codon stop chez pNad, nous diminuons les risques de trouver une protéine instable. Encore ici, la technique du PCR inverse a été utilisée, mais cette fois avec beaucoup plus de facilité car les amorces n'étaient pas complémentaires puisqu'une seule de celle-ci possédait la mutation. La deuxième amorce positionnée en aval de 175pb engendre une délétion de 175pb dans la partie C-terminale de la protéine, par la présence du codon stop. Plusieurs autres constructions ont été produites dans le cadre de ce travail, afin de permettre les études nécessaires (voir section matériels et méthodes, tableau III). La majorité des changements nécessaires ont été des modifications de résistance aux antibiotiques des plasmides utilisés puisque les études de dosages β -galactosidases devaient être faites dans des souches bactériennes résistantes à l'ampicilline. Comme la majorité des vecteurs possède également cette même résistance, un changement vers une résistante autre, chloramphénicol, devait avoir lieu.

Avant d'entreprendre les études de dosages β -galactosidases, il faut d'abord s'assurer que les protéines mutées (PepA446, PepA449, PepA452 et PepA455) sont fonctionnelles. En fait, il ne servirait à rien de travailler sur des mutants dont la

production protéique est impossible. Un des premiers tests fait a été l'observation du comportement des différents mutants dans le système d'intérêt, le système de recombinaison Xer. Selon les résultats obtenus au tableau VII, nous remarquons que les quatre mutants ponctuels (PepA446, PepA449, PepA452 et PepA455) ont conservé leur fonction de recombinaison. Nous savons que la forme hexamérique est très importante pour qu'un tel système fonctionne (Sträter *et al.*, 1999). Il est raisonnable de croire que l'intégrité des protéines n'est pas affectée, tant au niveau de la formation de la structure secondaire de la protéine (monomère) que pour la forme hexamérique de la protéine. Il est donc possible de dire que les mutations engendrées n'affectent pas la recombinaison, contrairement au mutant de délétion pNad (PepA Δ 175). Toutefois, lors des études *in vivo* (tableau.V) sur l'activité exopeptidique, nous avons constaté que ces mutants (PepA446, PepA449, PepA452, PepA455 et PepA Δ 175) ont tous perdu leur activité peptidique. Ceci vient confirmer les connaissances déjà existantes sur l'activité peptidique selon lesquelles cette activité n'est pas essentielle à la recombinaison spécifique de sites (McCulloch *et al.*, 1994). Par ce résultat, nous remarquons cependant que l'activité peptidique de PepA est fortement reliée à la présence de cette hélice α -14 fort probablement par la structure qu'elle engendre. Le groupe de McCulloch (1994) avait déterminé que l'acide aminé 354 (une glycine), parmi cinq candidats potentiels en comparaison avec BLLAP, comme étant l'agent important de l'activité exopeptidique de PepA. Une mutagenèse avait démontré qu'effectivement l'activité peptidique était bien perdue et que l'activité de recombinaison était conservée. Cependant, en ajoutant les résultats obtenus dans ce travail, l'attribution directe de G354 à l'activité exopeptidique ne semble plus très juste. Il aurait été plus juste de procéder à la modification de chacun des sites potentiels mentionnés par McCulloch afin de conclure au rôle joué par ce seul acide aminé. Il semblerait que toutes modifications touchant le centre d'action exopeptidique entraînent une perte de cette activité. Ainsi, il semble que l'activité exopeptidique de PepA soit très sensible et spécifique. Quoi qu'il en soit tout porte à croire que les activités peptidiques et de recombinaisons consistent en des rôles totalement différents de la protéine et ceci dans des régions complètement différentes (voir discussion plus loin).

Dans le but d'approfondir cette notion d'activité peptidase chez la protéine PepA, nous avons tenté, par des tests *in vitro*, d'observer la présence d'activité peptidase réduite qui ne pourrait être perçue par des tests *in vivo* (tableau.V) (McCulloch *et al.*, 1994). Un premier problème est survenu lors de la purification des protéines mutantes. Les tests d'induction des mutants (PepA446, PepA449, PepA452, PepA455 et PepA Δ 175) ne semblaient montrer aucune production de protéines induites (résultats non montrés). Des essais de purifications ont également été tentés sans succès. Un moyen que nous aurions pu utiliser pour purifier les protéines afin de remédier à cette situation aurait été de produire des inductions auxquelles les mutants auraient été fusionnés à un marqueur tels His-tag ou MBP. Ceci aurait facilité la purification, et nous aurions pu vérifier la présence de ces protéines par Western, si toutefois les protéines demeuraient stables. Ce type de problème d'induction nous porte à croire que les mutants sont probablement instables dans la cellule, ayant un temps de survie très court, mais suffisamment long pour permettre à la formation de l'hexamère qui a été confirmée par les tests de recombinaison. Cependant, ils doivent l'être suffisamment pour permettre à la recombinaison d'avoir lieu. Ceci mène à croire que la présence de PepA dans le système Xer est de courte durée.

Un retour sur les résultats obtenus sur l'activité peptidase *in vitro* (tableau.VI) nous montre que ce type d'expérience nécessite la présence de protéines PepA pures puisqu'il semble y avoir des inhibiteurs en solution lorsque nous comparons le niveau obtenu par la protéine PepA sauvage (de pCS126) purifiée et non purifiée. De plus, le contrôle négatif pBad produit un signal résiduel assez important. Il est donc impossible de déterminer si l'activité aminopeptidase est affectée à partir des résultats bruts. Mais, lorsque nous avons éliminé le bruit de fond en utilisant le niveau de base de pBad, nous constatons que les mutants pCS446 et pCS452 ont conservé un certain niveau d'activité aminopeptidase. Cependant, nous retrouvons cette activité dans les échantillons traités dans un tampon «low salt». PepA sauvage est une protéine qui est normalement activée milieu salin, il est donc possible de croire qu'une mutation dans la région C-terminale de la protéine est très importante pour les caractéristiques biochimiques de la protéine

(Stirling *et al.*, 1989). Ceci pourrait également expliquer notre incapacité de purifier les mutants à l'étude.

Avant de procéder aux dosages β -galactosidases, certaines souches bactériennes devaient être modifiées. Les dosages β -galactosidases tirent avantage de la fusion du promoteur *carA* au gène *lacZ* pour lequel la protéine PepA est répresseur. Cependant, ArgR est également un répresseur de cette voie métabolique, à un niveau plus faible (Charlier *et al.*, 1995a). Comme nous voulons minimiser l'influence des autres répresseurs, essentiellement de ArgR qui est également impliqué dans le système de recombinaison, il est préférable de travailler avec une souche *argR*⁻ et *pepA*⁻. Nous avons déjà en notre possession la souche C600B (*pepA*⁻, *carA-lacZ*). Il suffit alors d'interrompre le gène *argR* par transduction en utilisant l'existence de *argR* ::*Km*^R dans une autre souche d'*E.coli*. Cette construction mena à la création de la souche C955B. La création d'une autre souche portant les mêmes modifications, mais cette fois à partir d'une souche bactérienne d'*E.coli* d'origine différente a aussi été faite. Ceci dans le but d'observer les variations causées par des antécédents différents. Ceci mena à la production de la souche RFM655. Toutes les souches obtenues par transduction ont été vérifiées par Southern blot pour déterminer le bon transfert de la construction *carA-lacZ* (figure.11). L'inactivation des facteurs accessoires ArgR et PepA a été vérifié par les tests de recombinaison *in vivo* (tableau.IV).

Différentes études comparatives de dosages β -galactosidase ont été faites. Dans un premier temps, l'analyse de l'effet du milieu devait être étudié. En temps normal, un dosage de ce genre est fait dans le milieu de culture minimal (Miller, 1972). Cependant, comme le contrôle du promoteur *carA* est influencé par le milieu de croissance bactérien, il est important d'en observer les conséquences. PepA n'est pas la seule protéine responsable du contrôle du promoteur *carA* P1. La protéine IHF est également impliquée (Charlier *et al.*, 1995b) . Cependant, cette protéine possède des effets antagonistes selon le milieu de croissance. En milieu pauvre, elle agit à titre d'activateur, agissant ainsi à l'inverse de PepA, et dans un milieu en présence de pyrimidine IHF augmente la répression. Donc, les premières comparaisons ont été faites sur les milieux

de croissance. En général, lorsque nous comparons les données obtenues pour les souches C600B, C955B (figure.14 et 15) nous remarquons que la présence du répresseur PepA sauvage, ArgR ou des mutants (sauf pour pCS455cm, pCS452cm chez C600B, et pNadcm, pCS455 et pDB169Cm chez C955B) est peu influencée par les conditions de croissance cellulaire. L'absence de PepA dans les contrôles pBadcm montre l'influence du rôle joué par cette protéine. En ce qui concerne la souche RFM655 (figure.16), les résultats obtenus sont contradictoires. La production de β -galactosidase en milieu pauvre semble peu réprimée par la majorité des éléments testés et en milieu riche, tous les niveaux de β -galactosidases produits sont inférieurs et quasi identiques lors de l'implication de PepA et de ses mutants. La présence d'ArgR se fait sentir par des niveaux de répression qui sont nettement supérieurs à ce qui est observé pour les souches C600B et C955B.

Le promoteur *carA* possède deux contrôles, le P1 et P2. Le P2 est régulé de façon secondaire par ArgR (Charlier *et al.*, 1995b). Comme la construction comprend les deux promoteurs, il est donc important d'observer l'effet de cette protéine sur le taux de production de β -galactosidase. En milieu pauvre (figure.17), la présence ou l'absence de la protéine ArgR chez C600B et C955B ne semble pas affecter de façon significative l'action de PepA et de ses mutants, sauf pour pNadcm qui semble être complètement dérégulé par cette absence. De plus, le témoin pDB169cm dans lequel nous surproduisons ArgR semble grandement affecté par le type de souche utilisé. Ce ne devrait pas être le cas puisque tant chez C600B que C955B, nous surproduisons la protéique qui rend le gène hôte *argR* phénotypiquement inactif. Le même phénomène se reproduit lors de la croissance en milieu riche pour pDB169cm. De plus, pCS452 semble jouer un plus grand rôle répresseur lors de l'absence de ArgR. D'autant plus que le témoin pBadcm semble diminuer sa production de β -galactosidase en absence de ArgR, qui devrait être, rappelons-le, un répresseur de cette voie et non un activateur. La comparaison de C955B et RFM655 montre encore là la différence des antécédents bactériens (figue.19 et 20) et de l'influence probable de IHF.

Les résultats observés dans cette étude de dosages β -galactosidases peuvent être très incompréhensibles et déroutants, surtout lorsque nous pensons que les études ont été faites de façon simultanées. Nous pourrions penser que les variations de niveaux de β -galactosidases obtenues peuvent être produites par des variantes de manipulations. Il est cependant à noter que tous les dosages en milieu pauvre pour chacune des souches (C600B, C955B et RFM655) étaient faits lors d'une même étude, et de même pour les cultures en milieu riche. Les niveaux alors atteints, c'est-à-dire le taux de coloration atteint avant l'arrêt de la réaction avec l'ONPG, est alors sensiblement le même. De plus, les calculs d'unités β -galactosidases produites tiennent compte de la densité cellulaire utilisée pour chacun des échantillons, du temps nécessaire par chacun pour atteindre cette coloration. Il corrige également l'erreur de lecture au spectrophotomètre causé par les débris cellulaires. De plus, les taux d'unités sont des moyennes des dosages réalisés à plusieurs reprises. Malgré ceci, il est possible de sortir certaines grandes conclusions concernant les mutants PepA446, PepA449, PepA452, PepA455 et PepA Δ 175. Tout d'abord, les mutants PepA449 et PepA452 sont probablement les deux mutants ayant conservés leur intégrité et leur efficacité de répression et donc de liaison au promoteur *carA*. Nous pouvons même croire que PepA449 possède un niveau de répression plus efficace puisque dans plusieurs cas les niveaux de répression étaient comparables au vecteur pXAB21cm qui produit les deux protéines sauvages, PepA et ArgR. Le mutant PepA446 quant à lui possède toujours cette capacité de liaison à l'ADN, mais à un niveau de répression réduite en comparaison avec un PepA sauvage. Le mutant pepA Δ 175, qui comprend une délétion des 57 derniers acides aminés de PepA par l'introduction d'un codon stop au début de l'hélice α -14, ne semble pas complètement dépourvu de ces capacités de liaison à l'ADN lorsque nous regardons les niveaux réduits de β -galactosidases dans la souche C600B. Ceci pourrait indiquer que la fonction de PepA de liaison au site *carA* n'est pas située dans la région C-terminale de la protéine. Un autre élément étonnant concerne les résultats obtenus avec le mutant PepA455. Ce mutant démontre des niveaux de production de β -galactosidases très élevés. Ce qui pourrait signifier deux choses; d'une part cette protéine a perdu sa capacité de liaison à l'ADN. Cette option est moins favorable lorsque nous constatons que le mutant PepA Δ 175 conserve une certaine capacité de liaison à l'ADN. L'autre

possibilité concerne l'observation de certains cas où le niveau de β -gal produit est nettement au-dessus de la production des contrôles pBadcm, il est possible de penser que ce mutant peut toujours se lier au promoteur *carA*, mais avec une disposition ou une affinité nettement différente, ce qui engendrait une activation du promoteur. Une autre possibilité serait que la liaison effectuée par cette dernière aide ou facilite la liaison des autres facteurs activateurs au promoteur.

L'incapacité de purifier les protéines mutées nous empêche également de procéder à des études protéines-ADN. Les retardements à l'étude ont donc été faits à partir des protéines sauvages PepA et ArgR. Des retardements sur les différents sites de liaisons potentiels de PepA ont déjà été tentés, sans grand succès. Seul un retardement sur le promoteur *carA* fut publié par le groupe de Charlier (1995b). Ce retardement situé juste au-dessous de la zone des puits du gel pourrait être discutable et est peu pratique lorsque nous désirons entreprendre des études d'interactions entre protéines sur une séquence d'ADN. Il était primordial de trouver un retardement de PepA fonctionnel. Tous les efforts pour réaliser un retardement en gel de polyacrylamide se sont avérés sans succès. Un retardement a alors été tenté sur gel d'agarose. Un retardement entre PepA et le promoteur *carA* a été obtenu (figure.24) et ce fut le seul retardement possible entre cette protéine et les sites d'ADN connus.

Contrairement à PepA, la protéine ArgR possède des capacités de liaisons à l'ADN remarquables lorsque son site de liaison est présent, la boîte d'arginine. Même lorsque nous ne lui offrons qu'une moitié de celle-ci, une demi-boîte d'arginine, son activité de liaison à l'ADN est toujours présente (figure.22). Comme le retardement de PepA ne fonctionne que dans le cadre du gel d'agarose, nous avons tenté de refaire les retardements de ArgR dans ce même environnement. Nous remarquons alors que l'environnement offert par le gel d'agarose est très déstabilisateur pour le complexe ArgR-ADN (figure.24). Malgré tout, la présence de retardement nous permet d'envisager des études de retardements en présence des deux protéines à la fois, ceci dans le but d'observer un retardement possible de PepA sur les sites de recombinaison tels *cer* et *cer-cer* lorsqu'en présence d'ArgR.

Nous pouvons croire que PepA est incapable de se lier par lui-même aux séquences de recombinaison et que la présence d'une autre protéine tel ArgR pourrait lui venir en aide. La présence de cette dernière pourrait être absolument requise pour une telle activité. Afin d'optimiser les chances de réussite, il faut trouver un tampon de réaction protéique-ADN qui soit compatible pour les deux protéines. Un des tampons de réaction qui diffère le moins est le tampon suivant : 20mM tris pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA pH8.8, pour lequel la concentration de glycérol diffère entre les deux protéines. PepA demande la présence de seulement 5% de glycérol contrairement à ArgR qui nécessite 25% de glycérol (et additionné de L-arginine). Lorsque nous avons tenté de faire des retardements, avec une seule protéine à la fois, sur le promoteur *carA* (témoin d'efficacité de retardement pour PepA) avec des concentrations variables de glycérol, nous avons vite observé la perte d'interaction ADN-protéine et cela pour une augmentation à 10% de glycérol. La même chose s'est produite lorsque le retardement a été tenté avec la protéine ArgR. Une simple diminution de glycérol à 20% entraîne la perte d'un retardement concluant. Les retardements entre ces deux protéines sont donc très peu probable tant et aussi longtemps qu'un tampon de réaction compatible ne sera trouvé.

À la lumière de ces derniers résultats, il est possible de croire que PepA ne possède pas de véritable site de liaison spécifique au niveau des sites de recombinaison tel *cer* et *cer-cer*. En fait, l'étude des régions cibles de PepA à ces endroits a été faite par «DnaseI Footprint» (Sträter *et al.*, 1999). Aucune séquence consensus n'a été trouvée qui serait liée au site observé au niveau du site promoteur *carA* et au site d'autorégulation de PepA. Il est convenable de croire que PepA ne procède pas à une reconnaissance d'une séquence spécifique. Nous pouvons croire que PepA soit capable de distinguer une courbature du brin d'ADN qui est engendrée par la richesse de la séquence d'ADN située à proximité de la région des sites de recombinaison, ce qui dirigerait la protéine vers ce site (tel H-NS) (Altung et Ingmer, 1997). Ceci n'est pas sans fondement puisque les séquences décrites comme étant des sites d'interaction avec PepA sont riches en A-T, donc des régions qui ont un potentiel de distorsions (Sträter *et*

al, 1999). De plus, les régions riches en A-T sont reconnues comme étant susceptible à l'ouverture des brins. Ceci pourrait être favorable dans le rôle de PepA lorsque l'ADN doit s'enrouler autour de cette dernière. Une autre possibilité, qu'il ne faut pas omettre, est que PepA ne possède pas de véritable interaction avec l'ADN et que cette fonction soit secondaire. Sa présence dans le système serait attribuable à des interactions possibles entre cette protéine et une autre. La probabilité veut que cette interaction soit avec ArgR puisque la présence de ces deux protéines est essentielle pour la formation du complexe pré-synaptique, avant l'action des recombinaisons XerC et XerD. Mais, il n'est pas exclu que PepA interagisse avec l'une ou les deux recombinaisons lors de son arrivée dans le système. En fait, il est possible de croire à une interaction protéique avec les recombinaisons lorsque nous regardons les facteurs nécessaires à la recombinaison au site *psi* (Cornet, 1994). En effet, ArgR n'est pas présent dans ce système et il est remplacé par les protéines du système *arcAB*. Il serait fort intéressant d'entreprendre des études d'interactions protéine-protéine telles l'utilisation d'un système double hybride ou une co-immunoprécipitation. Encore là, il ne faut pas oublier que l'existence d'une telle interaction protéique pourrait être fortement influencée ou possible qu'en présence d'une séquence d'ADN appropriée. Il faudrait donc tenir compte d'une telle possibilité lors d'études plus approfondies.

5. Conclusion

L'étude réalisée dans le cadre de ce travail n'a pas permis de conclure à une action de coopération entre les facteurs accessoires. Les moyens utilisés pour cette fin avaient tous comme objectif de démontrer l'aptitude de PepA de se lier tant au site *carA* qu'au site de recombinaison *cer* par le même mode d'action. Après analyse des résultats, il faudrait maintenant penser que PepA est une protéine multifonctionnelle qui possède des fonctions distinctes d'activité exopeptidase, de répresseur et de facteur accessoire à la recombinaison de type Xer. Chaque fonction, essentiellement pour la liaison au site *carA* et de l'activité au site de recombinaison, fait probablement partie de domaines protéiques différents. Il est également possible que l'approche utilisée lors de ce travail et pour toutes les publications actuelles ne soit pas celle qui permettra un jour de produire une interaction *cer*-PepA. Il ne faut donc pas exclure une telle possibilité. Il existe donc encore plusieurs possibilités d'expérimentation pour en arriver à une compréhension du rôle de PepA dans la recombinaison, de comprendre le processus qui cause l'enroulement des sites autour de la protéine. Un facteur essentiel pour comprendre et visualiser le fonctionnement de PepA serait de déterminer le nombre d'hexamère impliqué dans la structure synaptique, car il existe plusieurs modèles hypothétiques sur la formation de ce complexe, mais aucune confirmation. Ainsi, aborder la problématique par cette facette permettrait enfin d'avancer les connaissances à ce sujet.

Bibliographie

6. Bibliographie

Abremski K.E. and Hoess R.H. (1992), Evidence for the second conserved arginine residue in the integrase family of site-specific of recombination proteins. *Protein Eng*, **5** :87-91.

Adams D.E., Shekhtman E.M., Zechiedrich E.L., Schmid M.B. and Cozzareli N.R. (1992), The role of the Topoisomérase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71** :1277-88.

Alèn C., Sherratt D.J. and Colloms S.D. (1997), Direct interaction of the aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* **16**(17) :5188-97.

Altung T and Ingmer h. (1997), H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiology.* **24**(1) : 7-17.

Argos P. and al. (1986), The integrase family of site-specific recombinases :regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5** :433-40.

Ausubel, F.M. *et al.* (1994), *Current protocols in molecular biology*, Current protocols publication, New York, Toronto.

Barre F.X, Aroyo M., Colloms S.D., Cornet F. et Sherratt D.J. (2000), FtsK functions in the processing of a Holiday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes and Dev.* **14** :2976-88.

Begg K.J., Dewar S.J. and Donachie W.D. (1995), A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J. Bacteriol.* **177** :6211-6222.

Birnboim H.C. and Doly J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, **6**(7) :1513-1523.

Blakely G.W., May G., McCulloch R., Arciszewska L.K., Burk M. et al. (1993), Two related recombinases are required for site-specific recombination site *dif* and *cer* in *E.coli* K12. *Cell* **75** :351-61.

Blakely G.W. and Sherratt D.J. (1994), Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site *dif*. *Nucleic Acids res.* **22** :5613-20.

Blakely G.W., Davidson A.O. and Sherratt D.J. (1997), Binding and cleavage of nicked substrates by site-specific recombinases XerC and XerD. *J. Mol.Biol.* **265** :351-61.

- Blakely G.W., Davidson A.O. and Sherratt D.J. (2000), Sequential strand exchange by XerC and XerD during site-specific recombination at *dif*. *J. of Biological Chemistry*. **275**(14) :9930-9936.
- Borges K.M. and Bergquist P.L. (1992), An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques*, **12**(2) :223-224.
- Burke M., Merican A.F. and Sherratt D.J. (1994), Mutant *Escherichia coli* arginine repressor proteins that fail to bind L-arginine, yet retain the ability to bind their normal DNA-binding site. *Mol. Microbiol.* **13**(4) :609-18.
- Cao Y. and Hayes F. (1999), A newly identified, essential catalytic residue in a critical secondary structure element in the integrase family of site-specific recombinases is conserved in a similar element in eucaryotic type IB topoisomerases. *JMB*. **289** :517-527.
- Charlier D., Gigot D., Huysveld N., Roovers M., Piérard A. and Glansdoff N. (1995a), Pyrimidine regulation of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* *carA* operons : CarP and integration host factor (IHF) modulate the methylation status of a GATC present in the control region. *JMB* **250** :383-391.
- Charlier D., Hassanzadeh G., Kholti A., Gigot D., Pérard A and Glansdoff N. (1995b), *carP*, involved in pyrimidine regulation of the *Escherichia coli* carbomoylphosphate synthétase operon encodes a sequence-specific DNA-binding protein identical to XerB and PepA, also required for resolution of ColE1 multimers. *JMB* **250** :392-406.
- Charlier D., Kholti A., Huysveld N., Gigot D., Maes D., Thia-Toong T.L. and Glansdorff N. (2000), Mutational analysis of *Escherichia coli* PepA, a multifunctional DNA-binding aminopeptidase. *J. Mol. Biol.* **302** : 411-420.
- Chen S.H., Merican A.F and Sherratt D.J (1997), Dna binding of *Escherichia coli* arginine repressor mutants altered in oligomeric state. *Mol. Microbiol.* **24**(6) :1143-56.
- Colloms S.D., Sykora P., Szatmari G. and Sherratt D.J. (1990), Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichia coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J. Bacteriol.* **172** :6973-6980.
- Colloms S.D., McCulloch R., Grant K., Neilson L. and Sherratt D.J. (1996), Xer-mediated site-specific recombination in vitro. *EMBO J.* **15** :1172 :1181.
- Colloms S.D., Alèn C. and Sherratt D.J. (1998), The ArcA/ArcB two-component regulator system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at *psi*. *Mol. Microbiol.* **28**(3) :521-530.

Cornet F., Mortier I., Patte J. and Louarn J.M. (1994), Plasmid pSC101 harbours a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. J. Bacteriol. **176** : 3188-3195.

Cunin R., Glansdorff N., Piérard A. and Stalon V. (1986), Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. Microbiological reviews, sept. 50 :314-352.

Dove SL and Dorman CJ (1994), The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling. Mol. Microbiol. **14**(5) :975-88.

Engelberg-Kulka H. and Glaser G. (1999), Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. Annu. Rev. Microbiology **53** :43-70.

Flinn H., Burke M., Stirling C.J. and Sherratt D.J. (1989), Use of gene replacement to construct *Escherichia coli* strains carrying mutations in two genes required for stability of multicopy plasmids. J. Bacteriol. **171** :2241-2243.

Gonzales T. and Robert-Baudouy J. (1996), Bacterial aminopeptidases :Properties and functions. FEMS Microbiol. Reviews. **18** :319-44.

Gordon G.S., Sitnikou D., Webb C.D., Teleman A., Straight A. et al. (1997), Chromosome and low copy plasmid segregation in *E.coli* :visual evidence for distinct mechanisms. Cell **90** :1113-21.

Gordon G.S. and Wright A. (2000), DNA segregation in bacteria. Annu Rev. Microbiol. **54** :681-708

Hallet B. and Sherratt D.J. (1997), Transposition and site-specific recombination :adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. FEMS Micro. Reviews, **21** :157-178.

Hendricks E.C., Szenlong H., Hill T. and Kuempel P. (2000), Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (*dif*, *xerC* and *xerD*) of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **36**(4) :973-981.

Hodman T.C., Griffiths H. and Summers D.K. (1998), Nucleoprotein architecture and *ColEI* dimer resolution : a hypothesis. Mol. Microbiol., **29**(2) :545-558.

Itoh T. and Tomizawa J. (1980), Formation of an RNA primer for the initiation of replication of *ColEI* DNA by ribonuclease H. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. **77** :2450-54.

Jensen R.B. and Gerdes K. (1999), Mechanisms of DNA segregation in prokaryotes :ParM partitioning protein of plasmid R1 colocalize with its replicon during the cell cycle. EMBO J. **18** :4076-84.

Lim D., Oppenheim J.D., Eckhardt T. and Maas W.K. (1987), Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K-12 and isolation of its product, the arginine repressor. *Natl. Acad. Sci. USA.* 84 :6697-6701.

Makarova K.S., Mironov A.A. and Gelfand M.S. (2001), Conservation of the binding site for the arginine repressor in all bacterial lineages. *Genome Biology*, 2(4) :13.1-13.8.

Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. (1982), *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor lab., New York. 454 p.

McCulloch R., Burke M.E. and Sherratt D.J. (1994), Peptidase activity of the *Escherichia coli* aminopeptidase a is not required for its role in Xer site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 12(2) :241-51.

Miller J.H. (1972), *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Lab., New York. 466p.

Nelson M. and McClelland M. (1992), use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosome. *Methods Enzy.* 216 : 279-303

Ni J., Sakanyan V., Charlier D., Glansdorff N. and Van Duyne G.D. (1999), Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature structural biol.* 6(5) :427-432.

Niki H. and Hiraga S. (1999), Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E.coli*. *Cell* 90 :951-57.

Parker C.N. and Halford S.E. (1991), Dynamics of long range interactions on DNA :the speed of synapsis during site-specific recombination by resolvase. *Cell* 66 :781-91.

Patient M.E. and Summers D.K. (1993), ColEI multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division. *Mol. Microbiol.* 9 :1089-95.

Peng H. and Marians K.J. (1993), Decatenation activity of topoisomerase IV during OriC and pBR322 DNA replication in vitro. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90 :8571-75.

Pérols K., Capioux H., Vincourt J.B., Louarn J.M., Sherratt, D.J. and Cornet F. (2001), Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39(4) :904-913.

Raleigh E.A., Lech K. et Brent R. (1989) dans *Current in molecular Biology.* Eds. Ausubel, F.M. *et al.* Publishing Associates and Wiley Intersciences, New York. Unit 1.4.

Recchia G.D., Aroyo M., Wolf D., Blakely G. and Sherratt D.J. (1999), FtsK-dependent and -independent pathway of Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18(20) :5725-34.

Sciochetti S.A., Piggot P. and Blakely G.W. (2001), Identification and characterization of the *dif* site from *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriology*, feb 183(3) :1058-1068.

Sherrat D.J., Blakely G., Burke M., Colloms S., Leslie N., McCulloch R., May G. and Roberts J. (1993), Site-specific recombination and the partition of bacterial chromosome. In *The Chromosome*. Heslop-Harrison J., and Flavell RB., eds. BIOS , Oxford, pp.25-41.

Smith M.C., Czaplewski L., North A.K., Baumberg S. and Stockley P.G. (1989), Sequence required for regulation of arginine biosynthesis promoters are conserved between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3 :23-28.

Snyder L. and Champness (1997), *Plasmids : in Molecular genetics of bacteria*. ASM Press Washington 105-117.

Steiner W.W. and Kuempel P.L. (1998a), Cell division is required for resolution of dimer chromosome at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27 :257-68.

Steiner W.W., Liu G., Donachie W.D. and Kuempel P. (1999), The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of the chromosome dimers. *Mol Microbiol.* 31 :579-83.

Sträter N., Sherrat D.J. and Colloms S.D. (1999), X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18(16) :4513-22.

Striling C.J., Szatmari G., Stewart G., Smith M.C.M. and Sherrat D.J. (1988), The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the *ColE1 cer* locus. *EMBO J.* 13(7) :4395-4389.

Striling C.J., Colloms S.D., Collins J.F., Szatmari G. and Sherrat D.J. (1989), *xerB* an *escherichia coli* gene required for plasmid *ColE1* site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarities to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J.* 8(5) :1623-1627.

Summers D.K. and Sherrat D.J. (1984), Multimerisation of high copy number plasmids causes instability : *ColE1* encodes a determinant essential for plasmid monomerisation and stability. *Cell* 36 :1097-1103.

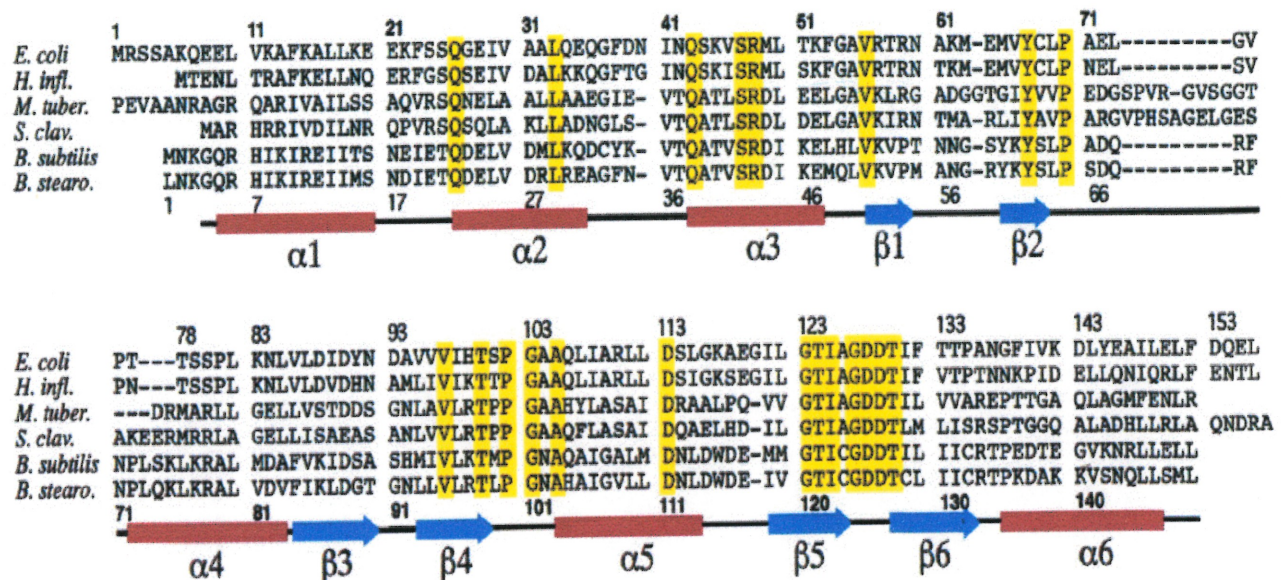
Summers S.D. and Sherrat D.J. (1988), Resolution of *ColE1* dimer requires a DNA sequence implicated in the three dimensional organisation of the *cer* site. *EMBO J.* 7 :851-58.

Summers D.K., Beton C.W.H. and Withers H.L. (1993), Multicopy plasmid instability : the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* 8 :1031-38.

- Summers D.K. (1998), Timing, self-control and a sense of direction are the secret of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* 29(5) :1137-45.
- Tian G. and Maas W.K. (1994), Mutational analysis of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 13(3) :599-608.
- Tomizawa J. (1986), Control of plasmid ColEI replication : binding of RNA I to RNA II and inhibition of primer formation. *Cell* 47 :89-97.
- Van Duyne G.D., Gourisankar G., Maas W.K. and Sigler P.B. (1996), Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 256 :377-91.
- Vieira J. and Messing J. (1982), The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertional mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19 :259-268.
- Vogt V.M. (1970), Purification and properties of an aminopeptidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 245 :4760-4769.
- Yarmolinsky M.B. (2000), A pot-pourri of plasmid paradoxes :effects of a second copy. *Mol. Microbiol.* 38(1) :1-7.
- Zakova N. and Szatmari G. (1995), Site-specific recombination between ColE1 and NTP16 nmr sites in vivo. *Mol. Gen. Genet.* 247 :509-514.

ANNEXES

ANNEXE I



Alignement de séquence des répresseurs d'arginine de différentes espèces bactériennes. En jaune nous retrouvons les acides aminés conservés. Aussi on retrouve une représentation ruban des hélices et feuillets des protéines. (Tiré de Ni et al., 1999)

ANNEXE II

Bactéries chez lesquels les gènes homologues aux recombinases ont été séquencés

Espèce	Nombres d'acides aminés	Protéine
Bacillus subtilis	304	CodV
	296	RipX
<i>Escherichia coli</i>	298	XerC
	298	XerD
<i>Haemophilus influenzae</i>	295	XerC
	297	XerD
<i>Helicobacter pylori</i>	362	XerC
	355	XerD
<i>Lactobacillus. JF</i>		
<i>Lactobacillus leishmannii</i>	295	XerC
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	311	XerC
<i>Mycobacterium leprae</i>	302	XerC
	316	XerD
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	315	XerC
	311	XerD
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	302	Sss (xerC)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	299	Sss (xerC)
<i>Proteus mirabilis</i>	307	XerC
	313	XerD
<i>Serratia marcescens</i>	303	XerC
<i>Salmonella typhimurium</i>	300	XerC
	298	XerD
<i>Staphylococcus aureus</i>	297	XerD

ANNEXE III

Comparaison de séquence de la boîte d'arginine entre différentes espèces bactérienne et opéron au sein d'une même espèce. (tiré de Makarova et al., 2001 et Cunin et al., 1986)

Génome	Opéron	Séquence
E.coli	argF1	aaTGAATAA.ttAcaCAta
	argF2	agTGAATtt.taATtCAat
	argI1	aaTGAATAa.tcATcCAta
	argI2	atTGAATat.taATtCAtt
	argEBCH1	taTcaATtt.tcATgCAgt
	argEBCH2	taTGAATAa.aaATaCAct
	carAB1	tgTGAATta.aaATgCAaa
	carAB2	agTGAgTga.atATtCtct
	argR	ttTGcATAa.aaATtCAag a t a
		Consensus
H.influenza	HI1209	AgTGAATtt.ttATgCAaT
	HI0811	tATGAATAA.AtATgCaca
	HI180-77	tATGcATAA.AAATgtAaT
V. cholerae	VC2316	AaaGAATAA.AAAgTCATT
	VC2390-89	TtTGcAaAA.taATTtATT
	VC2645	AtTGttTtt.ttATTCAcT
	VC2508	TtaaAATAt.ttATTCAcT
	VC2618	AaTaAATgt.AAATaCAaT
	VCA0757-60	TtTtggTtt.ttATaCATT
B.subtilis	argCjBD	ATtAATTT.tTATTcAT
	carABargF1	AgGcATAa.AAATTCAT
	argGH	ATGtATTT.tTATTaAa
C.pneumomi ae	glnPQ	TTGcATAa.ATATgatT
	artJ	TTtAATca.AAATTatT
M.tuberculo sis	Rv1652-59	TTGcATAa.cgATgCAa

ANNEXE IV

Séquence en acides nucléiques de l'amonopeptidase A

1 ATGGAGTTTAGTGTA AAAAGCGGTAGCCCCGGAGAAACAGCGGAGTGCCTG 50
 51 CATCGTCGTGGGCGTCTTCGAACCACGTCGCCCTTCTCCGATTGCAGAAC 100
 101 AGCTCGATAAAATCAGCGATGGGTACATCAGCGCCCTGCTACGTCGGGGC 150
 151 GAACTGGAAGGAAAACCGGGGCAGACATTGTTGCTGCACCATGTTCCGAA 200
 201 TGTACTTTCCGAGCGAATTCTCCTTATTGGTTGCGGCAAAGAACGTGAGC 250
 251 TGGATGAGCGTCAGTACAAGCAGGTTATTCAGAAAACCATTAATACGCTG 300
 301 AATGATACTGGCTCAATGGAAGCGGTCTGCTTTCTGACTGAGCTGCACGT 350
 351 TAAAGGCCGTAACAACACTGGAAGTGCGTCAGGCTGTCGAGACGGCAA 400
 401 AAGAGACGCTCTACAGTTTCGATCAGCTGAAAACGAACAAGAGCGAACCG 450
 451 CGTCGTCCGCTGCGTAAGATGGTGTTCACCGTGCCGACCCGCCGTGAACT 500
 501 GACCAGCGGTGAGCGCGGATCCAGCACGGTCTGGCGATTGCCGCCGGGA 550
 551 TTAAAGCAGCAAAGATCTCGGCAATATGCCGCCGAATATCTGTAACGCC 600
 601 GCTTACCTCGCTTACAAAGCGCGCCAGCTGGCTGACAGCTACAGCAAGAA 650
 651 TGTCAACACCCGCGTTATCGGCGAACAGCAGATGAAAGAGCTGGGGATGC 700
 701 ATTCTATCTGGCGGTCCGGTCAGGGTTCGCAAACGAATCGCTGATGTGCG 750
 751 GTGATTGAGTACAAAGGCAACGCGTCGGAAGATGCACGCCCAATCGTGCT 800
 801 GGTGGGTAAAGGTTTAACCTTCGACTCCGGCGGTATCTCGATCAAGCCTT 850
 851 CAGAAGGCATGGATGAGATGAAGTACGATATGTGCGGTGCGGCAGCGGTT 900
 901 TACGGCGTGATGCGGATGGTCCGCGGAGCTACAACGCGGATTAACGTTAT 950
 951 CGGCGTGTTGGCAGGCTGCGAAAACATGCCTGGCGGACGAGCCTATCGTC 1000
 1001 CGGGCGATGTGTTAACCACCATGTCCGGTCAAACCGTTGAAGTGCTGAAC 1050
 1051 ACCGACGCTGAAGGCCGCTGGTACTGTGCGACGTGTTAACTTACGTTGA 1100
 1101 GCGTTTGAGCCGGAAGCGGTGATTGACGTGGCGACGCTGACCGGTGCCTG 1150
 1151 ACCGGTGCCTGCGTGATCGCGCTGGGTGATCATATTAAGTGGTCTGATGGC 1200
 1201 GAACCATAATCCGCTGGCCCATGAACTGATTGCCGCGTCTGAACAATCCG 1250
 1251 GTGACCGCGCATGGCGCTTACCGCTGGGTGACGAGTATCAGGAACAACCTG 1300
 1301 GAGTCCAATTTGCCGATATGGCGAACATTGGCGGTGCTCCTGGTGGGGC 1350
 1351 GATTACCGCAGGTTGCTTCCCTGTCACGCTTTACCCGTAAGTACAACCTGGG 1400
 1401 CGCACCTGGATATCGCCGGTACCGCCTGGCGTTCTGGTAAAGCAAAAAGGC 1450
 1451 GCCACCGGTGTCGCGGTAGCGTTGCTGGCACAGTTCCTGTTAAACCGCGC 1500
 1501 TGGGTTTAACGGCGAAGAGTAA 1522

ANNEXE V

Séquence en acides aminés de l'aminopeptidase A

1 MEFSVKSGSP EKQRSACIVV GVFEPRRLSP IAEQLDKISD GYISALLRRG
 50
 51 ELEGKPGQTL LLHHVPNVLS ERILLIGCGK ERELDEROYK QVIQKTINTL
 100
 101 NDTGSMEAVC FLTELHVKGR NNYWKVRQAV ETAKETLYSF DQLKTNKSEP
 150
 151 RRPLRKMVFN VPTRRELTSG ERAIQHGLAI AAGIKAADL GNMPPNICNA
 200
 201 AYLASQARQL ADSYSKNVIT RVIGEQQMKE LGMHSYLA VG QGSQNESLMS
 250
 251 VIEYKGNASE DARPIVLV GK GLTFDSSGGIS IKPSEGMDM KYDMCGAAAV
 300
 301 YGVMRMVAEL QLPIN VIGVL AGCENMPGGR AYRPGDVLTT MSGQTVEVLN
 350
 351 TDAEGRLVLC DVLTYVERFE PEAVIDVATL TGACVIALGH HITGLMANHN
 400
 401 PLABELIAAS EQSGDRAWRL PLGDEYQEQL ESNFADMANI GGRPGGAITA
 450
 451 GCFLSRFTRK YNWAHLDIAG TAWRSGKAKG ATGRPVALLA QFLLNRAGFN
 500 501 GEE 503

N.B. Souligné en jaune, nous retrouvons l'hélice α -14 qui a été sujette à la mutagenèse de ce travail.

Remerciements

Je voudrais remercier le Dr George Szatmari de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Vous m'avez permis d'ouvrir mes horizons et d'acquérir une grande estime de soi. Votre disponibilité, vos nombreux encouragements et suggestions ont été pour moi très précieux. Votre ouverture d'esprit et votre compréhension font de vous le directeur de recherche que tout étudiant devrait avoir. Grâce à vous, je me sens confiante de mon avenir et prête à affronter les défis qui se présenteront au cours de ma carrière qui s'amorce à l'instant.

Je voudrais également remercier tous mes collègues de laboratoire avec qui plusieurs discussions et échanges intéressants ont été entamés. Les deux années passées avec vous ont été remplies de rebondissements et de surprises que je ne pourrai jamais oublier. Bonne chance à tous!!!

Depuis maintenant cinq ans, deux personnes ont particulièrement touché ma vie. Mélanie et Martine, vous avez été pour moi source de confiance et d'encouragement. Nos nombreux dîners ensemble, nos échanges, nos nombreuses frustrations, nos joies et nos peines ont été des moments inoubliables. Sans vous, la maîtrise n'aurait jamais été aussi agréable. Votre amitié m'est très précieuse et je vous en remercie.

Pour terminer, j'aimerais remercier les personnes qui me sont les plus chers au monde. Tout d'abord, mes parents et ma sœur ont toujours eu confiance en moi. Ils m'ont toujours encouragé à poursuivre mes objectifs, à aller au-delà de mes rêves et ne jamais renoncer. Votre support et votre amour m'ont permis d'atteindre des buts que je n'aurais jamais crus accessibles. Vous m'avez appris les plus belles leçons de vie. Je vous remercie également de votre patience et de votre soutien pour mes nombreuses crises de panique et de manque de confiance en soi. Je vous adore. Merci de tout mon cœur!

La dernière personne que je veux remercier, est mon compagnon de vie. Gyslain comment pourrais-je te remercier de tout le soutien que tu m'as offert? Tu as fait preuve de tellement de patience avec moi, tu es toujours attentif à mes besoins. Tu m'as toujours encouragé et appuyé dans ma démarche. Tu es toujours là à m'écouter. Je ne peux trouver les mots justes pour te dire à quel point je t'aime et t'adore. Je crois que la meilleure chose à dire est un gros MERCI de tout mon cœur.

P.S.

J'ai pratiquement oublié de faire remercier, non pas à une personne, mais cette chose (l'ordinateur) qui m'a permis d'écrire ce mémoire et avec lequel j'ai passé plusieurs heures en tête-à-tête. Que puis-je dire??? Oui, tu m'en as fait voir de toutes les couleurs. Tu m'as donné des sueurs froides à plus d'une reprise, surtout lorsque tu m'as laissé tomber, en perdant tous mes fichiers et ceci en toute fin de rédaction. Mais, je suis plus maligne que toi! Par miracle, j'avais sauvegardé tout mon travail la veille. Que dire d'autre que nous n'avons jamais été de véritable ami et nous ne le serons probablement jamais. Mais, comme on ne pourra jamais ce passer l'un de l'autre, il faudra bien que nous apprenions à entretenir des relations professionnelles. Il existe un proverbe qui dit : Rira bien, qui rira le dernier! Et bien voici : HA! HA! HA! HA! J'ai surmonté, vaincu et triomphé!!!