

Université de Montréal

**Étude d'un nouveau facteur impliqué dans la biosynthèse  
de la paroi bactérienne : le facteur ElyC**

par

Agossou Hugues Kousse mou

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
en microbiologie, infectiologie et immunologie

Avril 2015

© Agossou Hugues Kousse mou, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude d'un nouveau facteur impliqué dans la biosynthèse de la paroi  
bactérienne : le facteur ElyC**

Présenté par :

Agossou Hugues Kousse mou

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Drolet  
Président-rapporteur

Catherine Paradis-Bleau  
Directeur de recherche

Patrick C. Hallenbeck  
Membre de jury

## Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques est de nos jours une préoccupation majeure aux acteurs du monde de la santé publique. L'identification de nouvelles cibles bactériennes en vue de développer de nouveaux antibiotiques est donc nécessaire. La paroi bactérienne est une bonne cible car l'inhibition de sa biosynthèse cause la mort des bactéries. De récents travaux de notre laboratoire ont identifié de nombreux nouveaux facteurs importants pour la biosynthèse de la paroi chez *Escherichia coli*. L'un de ces facteurs renommé ElyC a un domaine DUF218 extrêmement conservé à travers les espèces bactériennes. L'absence du gène *elyC* entraîne la lyse bactérienne à température pièce. Des études bioinformatiques indiquent qu'ElyC est une protéine membranaire avec deux domaines transmembranaires et un domaine conservé DUF218 de fonction inconnue. Étant donné que les protéines agissent souvent en complexes, nous avons émis l'hypothèse qu'ElyC interagit avec d'autres protéines afin d'exécuter sa fonction biologique. Le but de mon projet est de déterminer la topologie d'ElyC et d'identifier ses partenaires protéiques. L'étude de la topologie a été faite par l'essai de modification de cystéine sur des souches exprimant individuellement le facteur ElyC avec un résidu cystéine en position N-terminale, dans la boucle ou en position C-terminale. Les partenaires protéiques d'ElyC ont été isolés par immuno-précipitation et identifiés par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont révélé qu'ElyC est une protéine membranaire chez *E. coli* et est impliquée dans l'assemblage de l'enveloppe bactérienne, dans la chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative. Ils ont permis aussi de confirmer l'existence d'un lien entre ElyC et le stress oxydatif. Cependant les résultats pour la détermination de la topologie restent à être clarifiés.

**Mots-clés** : biosynthèse du peptidoglycane, facteur ElyC, génétique bactérienne, topologie, partenaires protéiques.

## Abstract

Bacterial resistance to antibiotics is a major concern for public health. The identification of new bacterial targets for the development of new antibiotics is required. The bacterial cell wall is a good target because the inhibition of its biosynthesis causes the death of bacterial cells. Recent studies from our laboratory have identified many new important factors for cell wall biosynthesis in *Escherichia coli*. One of these factors renamed ElyC has a DUF218 domain highly conserved across bacterial species. The absence of *elyC* leads to bacterial lysis at room temperature. Bioinformatic studies indicate that ElyC is a membrane protein with two transmembrane domains and a conserved domain of unknown function DUF218. Given that proteins often act in complexes, we formulated the hypothesis that ElyC interacts with other proteins to play its biological role. The goal of my project is to determine the topology of ElyC and identify its protein partners. The study of the topology has been done by the cysteine modification assay with strains individually expressing ElyC with a cysteine residue at the N-terminal position, in the loop or at the C-terminal position. ElyC protein partners have been isolated by immuno-precipitation and identified by mass spectrometry. The results obtained revealed that ElyC is a membrane protein in *E. coli* and that it is involved in the bacterial envelope assembling, in the electron transport chain and in the oxidative phosphorylation. They also confirmed the existence of a link between ElyC and oxidative stress. However, the results for the determination of the topology remain to be clarified.

Keywords: peptidoglycan biosynthesis, ElyC factor, bacterial genetics, topology, protein partners.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xv
1. Introduction.....	1
1.1 Revue de la littérature.....	2
1.1.1 Introduction.....	3
1.1.2 Rôle de l'enveloppe bactérienne.....	4
1.1.3 Structure et composition de l'enveloppe bactérienne.....	4
1.1.4. Assemblage de l'enveloppe bactérienne chez les Gram-.....	9
1.1.5 Découverte du facteur ElyC chez <i>E. coli</i> .....	22
1.2 Objectif du projet.....	33
2. Matériels et méthodes.....	35
2.1. Souches et plasmides utilisés dans ce travail.....	36
2.2 Construction des outils moléculaires.....	40
2.2.1 Intégration génomique de <i>P<sub>lac</sub>::elyC-his</i> par plasmide CRIM.....	40
2.2.2 Fusion génomique <i>elyC-his-kan</i> par recombinaison homologue $\lambda$ red.....	56
2.2.2.2 Recombinaison homologue de la séquence CTelyC-his-kan directement dans le génome.....	57
2.2.3 Construction des souches qui expriment DUF218-His cytoplasmique et périplasmique.....	61
2.3. Les essais.....	65
2.3.1. Essai de complémentation en milieu liquide et solide.....	65
2.3.2 Essai de sensibilité de EM9 et des souches construites au chromate de potassium.....	66
2.3.3. Essai de détermination de la topologie d'ElyC.....	67
2.3.4. Essai de l'expression de DUF218-His dans le cytoplasme et le périplasme.....	75
2.3.5 Isolement du ou des complexe(s) ElyC-partenaires protéiques.....	75

2.3.6 Spectrométrie de masse.....	79
3. Résultats.....	83
3.1 Intégration de <i>P<sub>lac</sub>::elyC-his</i> et ses variants dans le génome de EM9 .....	84
3.2. Intégration de <i>P<sub>elyC</sub>::elyC-his</i> dans le génome de EM9 .....	89
3.3. ElyC-his est fonctionnel <i>in vivo</i> dans les souches construites .....	91
3.4. Le mutant $\Delta$ <i>elyC</i> est sensible au chromate de potassium .....	93
3.5. Le facteur ElyC est localisé dans la membrane bactérienne.....	96
3.6. Topologie de ElyC .....	97
3.7. Activité du domaine DUF218 au niveau des différents compartiments cellulaires.....	99
3.8 Le facteur ElyC interagit avec des partenaires protéiques.....	102
3.9 Les partenaires protéiques de ElyC identifiés.....	103
4. Discussion.....	106
4.1. Les outils moléculaires .....	107
4.2. Le mutant $\Delta$ <i>elyC</i> est sensible au chromate de potassium à 22°C.....	108
4.3 La localisation cellulaire du facteur ElyC et sa topologie .....	109
4.4 Plusieurs partenaires protéiques de ElyC sont des protéines membranaires .....	112
5. Conclusion et perspectives.....	115
6. Bibliographie.....	118
7. Annexes.....	126
7.1. Extraction de l'ADN plasmidique ou miniprep.....	127
7.2. Conservation des souches. ....	128

## Liste des tableaux

Tableau 1: Souches d' <i>E. coli</i> utilisées et construites pour ce projet.....	36
Tableau 2 : Plasmides utilisés et construits pour ce travail .....	37
Tableau 3: Milieux de culture et préparations utilisés pour ce travail.....	38
Tableau 4: Les amorces utilisées pour ce travail. ....	39
Tableau 5 : Mesures des DO <sub>600nm</sub> de croissance en fonction du temps. ....	95
Tableau 6 : liste de protéines identifiées par bande .....	128
Tableau 7 : liste non redondante de protéines identifiées pour les 8 bandes. ....	164



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure et composition de l'enveloppe chez les Gram+ et Gram- .....	7
<b>Figure 2</b> : Voies d'assemblage de l'enveloppe bactérienne chez les Gram- .....	10
<b>Figure 3</b> : La machinerie Lol. ....	15
<b>Figure 4</b> : La machinerie Lpt (Tokuda, 2009). ....	17
<b>Figure 5</b> : Étape cytoplasmique de la biosynthèse du PG.....	19
<b>Figure 6</b> : Étape membranaire de la biosynthèse du PG.....	20
<b>Figure 7</b> : Réactions de transglycosylation et transpeptidation. ....	21
<b>Figure 8</b> : Principe de la technique de l'essai phénotypique développé .....	24
<b>Figure 9</b> : Résultats du criblage de la banque Kéio LacZ <sup>+</sup> . (A) : plaque montrant des mutants de phénotype CPRG+. (B) : sélection des potentiels mutants CPRG+ .....	25
<b>Figure 10</b> : Topologie prédite d'ElyC.....	26
<b>Figure 11</b> : Phénotype de croissance et de lyse cellulaire causé par l'inactivation d'ElyC.....	28
<b>Figure 12</b> : Le double mutant $\Delta$ elyC $\Delta$ mrcB et le phénotype synthétiquement léthal .....	29
<b>Figure 13</b> : Défaut de synthèse du PG chez $\Delta$ elyC .....	30
<b>Figure 14</b> : Suppression spécifique des phénotypes du mutant $\Delta$ elyC par la surexpression de l'enzyme UppS.....	32
<b>Figure 15</b> : Illustration des différentes étapes de la construction du plasmide pHK1 .....	45
<b>Figure 16</b> : Illustration de la construction des variantes (pHK2, pHK3 et pHK4) de pHK1 par mutagenèse dirigée.....	50
<b>Figure 17</b> : Construction de pHK1.....	86
<b>Figure 18</b> : Construction de pHK2, pHK3, pHK4 et intégration des pHK.....	88
<b>Figure 19</b> : Construction de la souche HK2 exprimant ElyC-his sous le contrôle de P <sub>elyC</sub> .....	91
<b>Figure 20</b> : Complémentations du phénotype CPRG+ par ElyC-his et ses variants. ....	93
<b>Figure 21</b> : Étude à 22°C de la sensibilité des souches WT, EM9, EM9(attHKHK1) et HK2 au chromate de potassium.....	96
<b>Figure 22</b> : ElyC est une protéine membranaire. ....	97
<b>Figure 23</b> : Essai pour la détermination de la topologie de ElyC. ....	99

**Figure 24:** Les fusions du *duf218-his* et *ssdsbA-duf218-his* sous le promoteur P<sub>lac</sub> ne complémentent pas le défaut de  $\Delta$ *elyC*. ..... 101

**Figure 25:** Partenaires protéiques de ElyC. .... 103

## Liste des abréviations

% : pourcent

μl : Microlitre

μM : Micromolaire

5', 3' : Extrémité 5 prime, extrémité 3 prime

Å : ångström

aa : Acide aminé

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BSA : "Bovin Serum Albumin"

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

CPR : Chlorophénol rouge

CPRG : Chlorophénol rouge-β-D-galactopyranoside

CRIM : « Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval »

Cyto : Cytoplasmique

Da : Dalton

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DDM : n-dodecyl-β-D-maltoside

DO : Densité Optique

DTT : Dithiothréitol

ECL : « enhanced chemiluminescence »

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

For : « Forward »

$\gamma$  : Gama

Gram + : Gram-positif

Gram - : Gram-négatif

g : Gramme

GlcNAc : N-acétylglucosamine

H : Heure

His : histidine

HRP : «horseradish peroxidase»

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

Kan : Kanamycine

KDa : KiloDalton

L : litre

LB : Luria-Bertani

LBamp : Luria-Bertani contenant de l'ampicilline

LBcam : Luria-Bertani contenant du chloramphénicol

LC : Liquid Chromatography

M : Molaire ou molarité

Mg : Magnésium

ME : Membrane Externe

MI : Membrane Interne

MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de Magnésium

Min : Minute

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MurNAc : acide N-acétylmuramique

mPEG : maléimide Polyéthylène glycol

MS : «mass spectrometer»

MTSES : « 2-Sulfonatoethyl methanethiosulfonate sodium salt »

NaCl : Chlorure de sodium

NaDOC : «Sodium Deoxycholate»

NEB : « New England Biolabs »

ng : Nanogramme

nm : Nanomètre

nt : Nucléotides

°C : Degré Celsius

pb : paire de base

PB : «Phosphate Buffer»

PBS : « Phosphate Buffer Saline »

PBST : « Phosphate Buffer Saline Tween »

PCR : « Polymerase chain reaction »

PEG : Polyéthylène glycol

*pElyC* : Promoteur de *elyC*

Péri : Périplasmique

PG : Peptidoglycane

pH : potentiel hydrogène

*pLac* : Promoteur de lactose

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle

Rev : «Reverse»

RBS : «Ribosome Binding Site»

SDS : «Sodium dodecyl sulfate»

SDS-PAGE : « Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis »

Sec : Seconde

Seq : Séquence

TCA : « Trichloroacetic acid »

TEC : Tampon d'échantillon

tr/min : tours par minute

Tris-HCl : Tris Hydrochloryde

U : Unité

Und-P : Undécaprényle-phosphate

Und-PP : Undécaprényle-pyrophosphate

UV : Ultra Violet

V : Volte

WT : « Wilde type »

X : fois

xg : gravitation

$\alpha$  : alpha

$\beta$  : Bêta

$\lambda$  : Lamda

# Remerciements

Je voudrais avant tout adresser mes remerciements :

Au Dr Catherine Paradis-Bleau pour m’avoir donné l’opportunité de poursuivre mes études graduées, en m’acceptant dans son laboratoire et en supervisant mes travaux tout au long de ma formation. Trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Au Dr Marc Drolet pour sa confiance en acceptant de faire partie de mon comité de suivi et en acceptant d'appuyer mes demandes de bourses par ses lettres de recommandations, aussi pour sa disponibilité et ses conseils. Trouvez en l’aboutissement de ce cheminement mes sincères remerciements.

Aux Drs Jacques Thibodeau, Hugo Soudeyins, et France Daigle, pour avoir guidé mes pas lors de mes démarches pour la recherche d’un laboratoire d’accueil.

Au Dr Louis de Repentigny, pour sa disponibilité maintes fois renouvelée à se prêter à mes questions sur le cours. Trouvez dans l’aboutissement ce travail le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A tous les membres du laboratoire avec qui j’ai passé ces moments d’apprentissage : Imène Kouidmi, Karine Dufresne, Matthieu Lemoine, Sean Giacomucci.

A Laura Alexa Angel pour son aide dans la construction des souches.

A tout le corps professoral et administratif du département de microbiologie, infectiologie et immunologie.

A tous les miens.



# **1. Introduction**

## **1.1 Revue de la littérature**

### 1.1.1 Introduction

Depuis l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, le problème de la résistance des bactéries ne cesse d'augmenter (Brisson-Noel *et al.*, 1989). Ces dernières années, un nombre important de bactéries pathogènes à l'homme sont devenues résistantes aux antibiotiques conventionnels (Brinster *et al.*, 2009). C'est le cas de l'émergence des SARM (*Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méricilline) (World Health Organization. *et al.*, 2014) et des entérobactéries telles que *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* résistantes aux carbapénèmes (Nordmann *et al.*, 2011). Les pourcentages très élevés des infections causées par ces bactéries (ex : 60 à 80% des infections à SARM constatées dans le monde) (World Health Organization. *et al.*, 2014) indiquent l'ampleur de la menace réelle que représente cette montée de la résistance bactérienne (World Health Organization & World Health Organization, 2014). Cette menace constitue une préoccupation majeure pour les acteurs du système de santé publique (Silhavy *et al.*, 2010) et rend urgente la recherche de nouveaux composés antibactériens (Barreteau *et al.*, 2008). Il est donc important d'identifier de nouvelles cibles bactériennes qui seront utilisées pour la mise au point de nouveaux agents antibactériens capables de résoudre ce problème de résistance (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Dans cette optique, une meilleure connaissance des structures cellulaires essentielles aux bactéries est un axe de recherche à privilégier. L'une de ces structures essentielles est le peptidoglycane (PG), notamment les enzymes impliquées dans sa biosynthèse (El Zoeiby *et al.*, 2003).

Les bactéries sont entourées d'une structure complexe appelée enveloppe, dont le principal composant, le PG, est essentiel au maintien de l'intégrité de la cellule et à sa viabilité (Paradis-Bleau *et al.*, 2014; Scheffers *et al.*, 2005).

### **1.1.2 Rôle de l'enveloppe bactérienne**

L'enveloppe bactérienne constitue la barrière entre le milieu externe et interne de la cellule bactérienne (Silhavy *et al.*, 2010). Grâce à sa nature multicouche, elle confère aux bactéries la rigidité de leur forme et les protège contre les dommages physiques (Costerton *et al.*, 1974; Silhavy *et al.*, 2010). Elle joue un rôle primordial dans le processus d'échange entre la cellule bactérienne et son environnement (Szalo *et al.*, 2006), en régulant l'échange des ions ou molécules entre la cellule et le milieu externe (Costerton *et al.*, 1974). Elle permet aux bactéries de survivre aux préjudices causés par les variations environnementales, notamment les chocs osmotiques (Costerton *et al.*, 1974). L'enveloppe permet un passage sélectif des nutriments de l'extérieur vers le cytoplasme et des déchets de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule bactérienne (Silhavy *et al.*, 2010). Elle sert de surface d'échanges physiologiques et/ou pathologiques pour la cellule bactérienne et son hôte (Rietschel *et al.*, 1994; Silhavy *et al.*, 2010).

### **1.1.3 Structure et composition de l'enveloppe bactérienne**

La mise au point de la coloration de Gram en 1884, par Christian Gram, lui a permis de classer presque toutes les bactéries en deux grands groupes (Silhavy *et al.*, 2010). Cette classification a été faite suite à l'observation par Gram, lors de ses expériences, d'un groupe de bactéries qui gardait encore un premier colorant dans leur enveloppe après l'étape de décoloration, alors que ce n'est pas le cas avec un autre groupe de bactéries (Bartholomew & Mittwer, 1952). Le groupe de bactéries dont l'enveloppe retient le premier colorant après décoloration est dit de Gram-positif (Gram+) (Bartholomew & Mittwer, 1952). Leur enveloppe renferme une épaisse couche de PG qui entoure leur membrane cytoplasmique

(Szalo *et al.*, 2006). Le deuxième groupe de bactéries dont l'enveloppe ne retient pas le premier colorant après décoloration est dit de Gram-négatif (Gram-) (Bartholomew & Mittwer, 1952). Leur enveloppe renferme une mince couche de PG et une seconde membrane appelée membrane externe (ME) (Szalo *et al.*, 2006). Le PG présent chez les deux groupes de bactéries est de différente épaisseur (10 à 30 couches chez les Gram+ et 1 à 3 couches chez les Gram-) mais de composition chimique similaire (Brennan *et al.*, 1995; Scheffers & Pinho, 2005; Silhavy *et al.*, 2010).

En plus de ces deux groupes de bactéries, différenciés suivant la constitution de leur enveloppe, il en existe un troisième qui appartient au Gram+ mais avec un type différent d'enveloppe. Il s'agit du groupe des mycobactéries dont l'enveloppe est constituée d'une membrane cytoplasmique, d'une couche de PG contenant de l'arabinogalactame qui se substitue à de longues chaînes d'acides mycoliques pour former une autre couche composante de l'enveloppe (Brennan & Nikaido, 1995).

### **1.1.3.1 Enveloppe des bactéries Gram+**

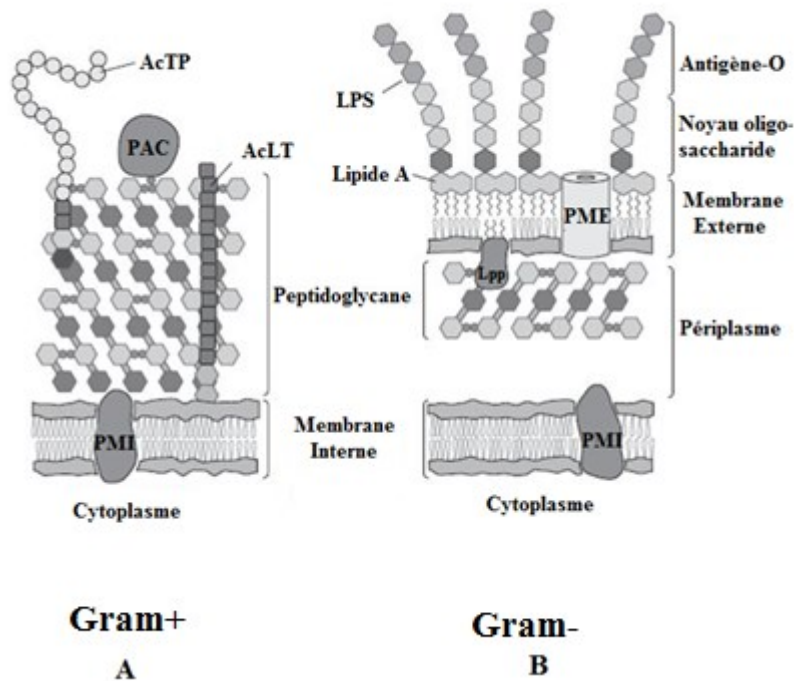
L'enveloppe chez les Gram+ est constituée d'une unique membrane : membrane interne (MI), entourée d'une épaisse paroi (figure 1A) Silhavy *et al.*, 2010). La paroi cellulaire des bactéries Gram+ est composée en grande partie de PG (environ 60% de la masse de la paroi) auquel sont fixés de nombreux autres composés tels que des polysaccharides (acides teichoïques), des acides teichuroniques, des polyphosphates, des carbohydrates ou des protéines (figure1A) (Navarre & Schneewind, 1999; Silhavy *et al.*, 2010).

La MI est la structure de l'enveloppe qui est directement en contact avec le cytoplasme de la cellule bactérienne et qui le sépare de la couche de PG (Ruiz *et al.*, 2006). Elle est

composée de deux couches de phospholipides (principalement phosphatidyléthanolamine et phosphatidylglycérol) disposés de façon symétrique sur sa face interne et externe, puis de protéines (Silhavy *et al.*, 2010). On y distingue deux types de protéines : les protéines intégrales qui sont des protéines membranaires dont les domaines  $\alpha$ -hélicaux forment des enjambements sur les faces de la MI, et les lipoprotéines qui sont attachées par leur extrémité N-terminale à des lipides ancrés dans le feuillet externe de la MI (Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010; van Geest *et al.*, 2000). Elle renferme également, mais en faible quantité, le phosphatidyl serine, la cardiolipine, et le support lipidique undécaprenyl-Phosphate (Und-P) (Silhavy *et al.*, 2010).

Le PG est fait de longues chaînes de disaccharides constituées d'unités de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) reliées entre elles par des ponts glycosidiques de type  $\beta$ -1,4 (Holtje, 1998). Sa longueur varie de 5 à 30 sous unités chez les Gram+ (Navarre & Schneewind, 1999).

Les acides teichoïques sont des polymères anioniques de surface qu'on retrouve chez la plupart des bactéries Gram+ (Silhavy *et al.*, 2010). Ils sont composés majoritairement de phosphates glycérols, de phosphates glucosyls ou encore de phosphates ribitols. Il y a plusieurs classes d'acides teichoïques : les acides teichoïques de la paroi qui sont liés de façon covalente au PG et les acides lipoteichoïques qui sont liés à la membrane (Navarre & Schneewind, 1999).



**Figure 1** : Structure et composition de l'enveloppe chez les Gram+ et Gram- (Silhavy *et al.*, 2010). (A) : enveloppe des bactéries Gram+. (B) : enveloppe des bactéries Gram-. PMI : protéine de la membrane interne. PME : protéine de la membrane externe. PAC : protéine attachée de façon covalente au PG. AcTP : acide teichoïque de la paroi. AcLT : acide lipoteichoïque. LPS : lipopolysaccharide.

### 1.1.3.2 Enveloppe des bactéries Gram-

Contrairement aux bactéries Gram+, l'enveloppe des bactéries Gram- est composée de trois couches qui sont constituées d'une MI et d'une ME séparées par un compartiment aqueux appelé périplasm qui héberge le PG (Costerton *et al.*, 1974; Facey *et al.*, 2010). La minceur du PG et l'existence d'une ME au niveau de l'enveloppe des bactéries Gram- représentent les caractéristiques principales qui les distinguent des Gram+ (voir figure 1B) (Silhavy *et al.*, 2010).

La MI chez les Gram- est aussi une bicouche de phospholipides, tout comme chez les Gram+, dont les pourcentages et la nature des phospholipides varient d'une espèce à une autre (Ruiz *et al.*, 2006). Chez *E. coli* elle est composée de 70 à 80% de phosphatidyléthanolamine, 15 à 20% de phosphatidylglycérol, et 5% de cardiolipine (Silhavy *et al.*, 2010). La MI chez les Gram- renferme aussi les protéines intégrales  $\alpha$ -hélicales, les lipoprotéines et le Und-P (Silhavy *et al.*, 2010).

La ME est la composante de l'enveloppe bactérienne spécifique aux bactéries Gram-. Elle est une bicouche lipidique comme d'autre membrane biologique (Silhavy *et al.*, 2010). Elle a été découverte dans les années 60 au cours des expériences d'observation des préparations de *E. coli* en microscopie électronique (Szalo *et al.*, 2006). Elle est constituée de phospholipides uniquement à sa face interne et de glycolipides, principalement les lipopolysaccharides (LPS) à sa face externe (Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010). De ce fait, elle est dite asymétrique (Silhavy *et al.*, 2010). Les phospholipides du feuillet interne de la ME sont les mêmes que ceux de la MI mais leurs pourcentages diffèrent au niveau des deux membranes. Les LPS sont des constituants de la ME qui sont déterminant pour la pathogénicité (activité endotoxinique de la bactérie) et la spécificité antigénique de la souche (Szalo *et al.*, 2006). Ils sont constitués d'un composé hydrophobe: le lipide A puis du noyau oligosaccharide et de l'antigène O (Wang *et al.*, 2010). Ce dernier composant est absent chez la souche domestiquée *E. coli* K-12 (Huijbregts *et al.*, 2000). Les LPS recouvrent les  $\frac{3}{4}$  de la surface cellulaire chez *E. coli* (Rietschel *et al.*, 1994).

La ME renferme deux classes de protéines : les lipoprotéines et les protéines à barril bêta (Silhavy *et al.*, 2010). Principalement chez les entérobactéries Gram-, la ME est attachée

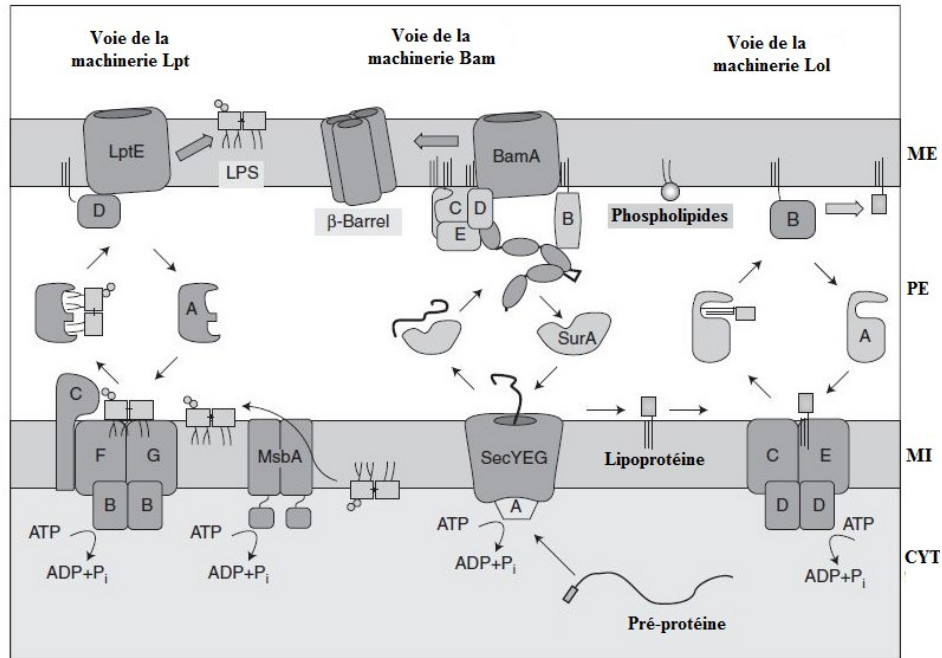


au PG de façon covalente grâce aux lipoprotéines Lpp encore appelées lipoprotéines de Braun (Costerton *et al.*, 1974; Scheffers & Pinho, 2005).

#### **1.1.4. Assemblage de l'enveloppe bactérienne chez les Gram-**

Les composants de l'enveloppe des bactéries Gram-, avant d'être assemblés, sont synthétisés soit dans le cytoplasme et/ou dans le feuillet interne de la MI (Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010). Après leur synthèse, chaque composant est transporté du cytoplasme ou du feuillet interne de la MI pour être assemblé ou incorporé à son emplacement correct dans l'enveloppe (Noinaj *et al.*, 2013; Silhavy *et al.*, 2010). Le laboratoire du Dr Paradis-Bleau est l'un de ceux qui s'intéressent particulièrement à l'assemblage des bactéries Gram-.

Les travaux de ces deux dernières décennies ont permis d'identifier et de comprendre plusieurs machineries impliquées dans l'assemblage de l'enveloppe chez les bactéries Gram- (Ruiz *et al.*, 2006). Chez *E. coli*, les machineries de sécrétion (Sec et Tat), transportent les différentes classes de protéines nouvellement synthétisées du cytoplasme à la MI ou au périplasma (Bos *et al.*, 2004). La machinerie Sec transporte spécifiquement les protéines non repliées dans la MI ou au périplasma et la machinerie Tat transporte les protéines repliées au périplasma (Bos & Tommassen, 2004). Les machineries Lol et Bam transportent les lipoprotéines de la MI à la ME, et assemblent les protéines dans la ME, respectivement (Bos & Tommassen, 2004; Noinaj *et al.*, 2013). La machinerie Lpt est pour le transport des LPS (Tokuda, 2009), puis les protéines liant la pénicilline (PLP) avec leurs co-facteurs Lpo dans la ME sont pour la construction du PG (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).



**Figure 2:** Voies d'assemblage de l'enveloppe bactérienne chez les Gram- (Silhavy *et al.*, 2010).

#### 1.1.4.1 Biosynthèse, transport et assemblage des composants de la (MI) et (ME) et des protéines périplasmiques

Les protéines qui composent la MI, le périplasm et la ME (protéines  $\alpha$ -hélicales, lipoprotéines, protéines barril bêta et les protéines périplasmiques) de l'enveloppe chez les Gram- sont toutes initialement synthétisées dans le cytoplasme avec une séquence signal à leur extrémité N-terminale (figure 2) (Facey & Kuhn, 2010; Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010). La séquence signal des protéines destinées au périplasm et à la ME (pré-protéines) est clivable et leur translocation est post-traductionnelle. Les protéines intégrales de la MI sont reconnues par leur domaine transmembranaire en N-terminal qui est non clivable et leur translocation est co-traductionnelle (Facey & Kuhn, 2010; Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010). Grâce à la séquence signal, chacune de ces protéines est dirigée vers une machinerie de

sécrétion. La machinerie Sec est généralement utilisée pour l'insertion des protéines de la MI et pour la translocation des protéines périplasmiques, des protéines de la ME et des lipoprotéines au travers de la MI (Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010). Les protéines périplasmiques et les lipoprotéines peuvent être transloquées également par la machinerie Tat sous leurs formes repliées (Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010).

La machinerie Sec est composée d'un complexe protéique hétérométrique appelé SecYEG (figure 2), du complexe SecDFYajC, de la chaperonne cytoplasmique SecB et de la protéine périphérique membranaire SecA (Dalbey *et al.*, 2011; Facey & Kuhn, 2010). Le complexe SecYEG est le noyau central de la machinerie Sec et est situé dans la MI de l'enveloppe (Facey & Kuhn, 2010). Elle commence son activité de translocation pour les protéines périplasmiques et de la ME par la liaison de SecB aux pré-protéines synthétisées pour prévenir leur repliement au cours de leur transport du cytoplasme à la face interne de la MI (Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010). SecB transfère ensuite la pré-protéine à la protéine périphérique membranaire SecA, le moteur ATPase qui conduit la réaction de translocation via le canal SecYEG (Dalbey *et al.*, 2011; Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010).

#### **a. Les protéines de la MI**

Les protéines intégrales de la MI possèdent à leur synthèse, des segments transmembranaires hydrophobes dont celui en N-terminal sert de séquence signal et détient l'information nécessaire à leur intégration dans la MI (Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010). Grâce à la nature hydrophobe du segment transmembranaire en N-terminal, la nucléoprotéine SRP (Signal Recognition Particule) se lie à la protéine substrat en cours de

synthèse pour initier sa translocation (Facey & Kuhn, 2010). Le complexe ainsi formé se lie à son tour à la protéine FtsY, le récepteur de SRP attaché aux phospholipides du feuillet interne de la MI (Dalbey *et al.*, 2011; Facey & Kuhn, 2010). Ce dernier transfère la protéine substrat en complexe avec le ribosome vers SecYEG pour l'insertion de la protéine intégrale dans la MI (Dalbey *et al.*, 2011; Facey & Kuhn, 2010). Toutes les protéines intégrales de la MI ne sont pas insérées par la voie de la machinerie Sec (Facey & Kuhn, 2010). Certaines protéines intégrales de petites tailles et possédant de petits domaines périplasmiques hydrophiles sont insérées dans la MI via une autre translocase appelé YidC, indépendante de la machinerie Sec (Dalbey *et al.*, 2011; Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010). YidC interagit parfois avec le complexe SecYEG par le biais du complexe SecDFYajC pour l'insertion des protéines intégrales de grande taille (Silhavy *et al.*, 2010).

### **b. Les protéines périplasmiques**

Les protéines destinées au périplasma entrent en contact avec la machinerie Sec par la liaison, de leurs pré-protéines synthétisées, avec la protéine SecB qui les prévient du repliement au cours de leur transport du cytoplasme à la face interne de la MI (Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010). SecB transfère ensuite les pré-protéines périplasmiques à la protéine périphérique membranaire SecA, le moteur ATPase qui conduit la réaction de translocation via le canal SecYEG qui les transloquent de la face interne de MI à sa face externe où elles sont libérées (Dalbey *et al.*, 2011; Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010).

Une fois libérées à la face externe de la MI via le canal SecYEG, les pré-protéines périplasmiques deviennent matures après le clivage de leur séquence signal par la signal peptidase I aidée par le complexe SecDFYajC (Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010). A

la suite de la maturation, les protéines périplasmiques sont protégées par les chaperonnes périplasmiques qui leur évitent les erreurs de repliement et de formation d'agrégats (Ruiz *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2010).

### **c. Les protéines de la ME**

Les protéines barril bêta de la ME sont transloquées de la même façon que les protéines du périplasma, par la machinerie Sec, du cytoplasme à la face externe de la MI. Une fois à la face externe de la MI, les protéines de la ME sont libérées de la machinerie Sec après clivage de leurs séquences signal par la signal peptidase I aidée par le complexe SecDFYajC (Facey & Kuhn, 2010; Silhavy *et al.*, 2010). Elles entrent ensuite en interaction avec les protéines chaperonnes périplasmiques telles que Skp, SurA et DegP qui les escortent à travers le périplasma jusqu'à la face interne de la ME. A ce niveau, elles sont reconnues par la machinerie Bam qui les récupèrent pour leur assemblage dans la ME (Bos & Tommassen, 2004; Silhavy *et al.*, 2010). La machinerie Bam est composée d'un complexe protéique, constitué d'une protéine intégrale de la ME appelée BamA et de quatre lipoprotéines BamB, BamC, BamD et BamE. La protéine intégrale BamA est le composant central et essentiel de la machinerie Bam. Elle possède un domaine périplasmique constitué de cinq polypeptides associés appelés POTRA (Noinaj *et al.*, 2013). Le mécanisme par lequel la machinerie Bam assemble les protéines barril bêta dans la ME reste encore inconnu (Tokuda, 2009).

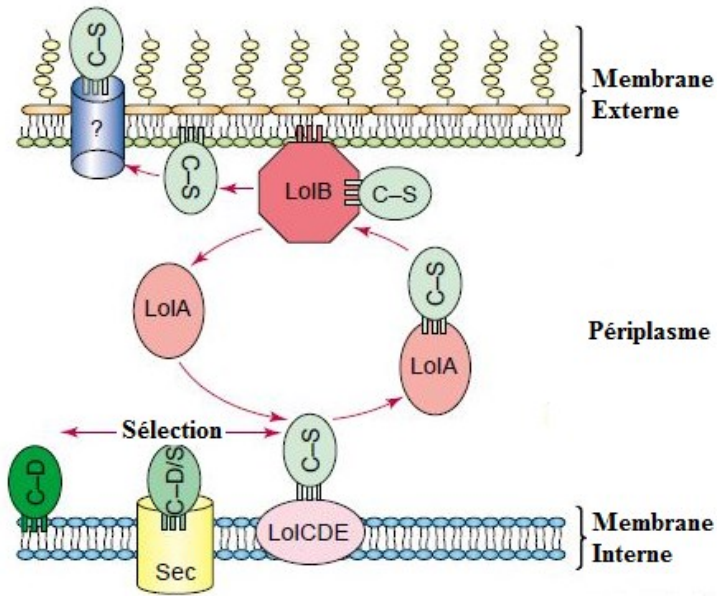
### **d. Les lipoprotéines**

Les lipoprotéines sont aussi transloquées de la même façon que les protéines périplasmiques, du cytoplasme à la face externe de la MI, par la machinerie Sec. A la face

externe de la MI, elles sont libérées de la machinerie Sec et leurs séquences signal sont clivées par la signal peptidase II (Silhavy *et al.*, 2010).

Suite à leur translocation à la face externe de la MI, les lipoprotéines subissent le processus de modification appelé lipidation (Bos & Tommassen, 2004; Ruiz *et al.*, 2006). Ce processus consiste en la fixation de lipides aux protéines par le biais du résidu cystéine qui devient le premier résidu en N-terminale suite au clivage de la séquence signal et conduit à la formation d'un lien covalent entre les protéines et les lipides de la MI (Bos & Tommassen, 2004; Sankaran *et al.*, 1994). La nature de l'acide aminé en position 2 de l'extrémité N-terminale est déterminante pour la localisation des lipoprotéines et constitue un élément de sélection pour la machinerie Lol (Bos & Tommassen, 2004; Sankaran & Wu, 1994; Silhavy *et al.*, 2010; Tokuda, 2009). Ainsi les lipoprotéines qui ont l'aspartate en position 2 constituent les lipoprotéines de la MI et restent attachées à la face externe de cette dernière. Celles qui ont un acide aminé autre que l'aspartate en position 2 entrent en interaction avec la machinerie Lol pour leur transport vers la ME (Bos & Tommassen, 2004; Ruiz *et al.*, 2006; Tokuda, 2009). L'aspartate en position 2 des lipoprotéines est ainsi appelé "Lol avoidance signal" (Bos & Tommassen, 2004; Sankaran & Wu, 1994; Silhavy *et al.*, 2010).

Le composant LolCDE de la machinerie Lol transporte ces lipoprotéines au périplasme où elles sont liées à LolA, une protéine charperonne. LolA les transporte à son tour à travers le périplasme jusqu'à LolB situé dans la ME. LolB se substitue à LolA grâce à sa forte affinité pour les lipoprotéines et les intègre au feuillet interne ou externe de la ME (figure3) (Bos & Tommassen, 2004). Le mécanisme par lequel l'insertion des lipoprotéines se fait dans le feuillet externe de la ME reste encore inconnu (Bos & Tommassen, 2004; Ruiz *et al.*, 2006).



**Figure 3 :** La machinerie Lol. Le motif (C–D) correspond à l’aspartate en position 2 suite à la cystéine conduisant à la rétention des lipoprotéines dans la membrane interne. Le motif (C–S) correspond à la serine en position 2 conduisant à la localisation des lipoprotéines dans la membrane externe (Bos & Tommassen, 2004).

### e. Les LPS

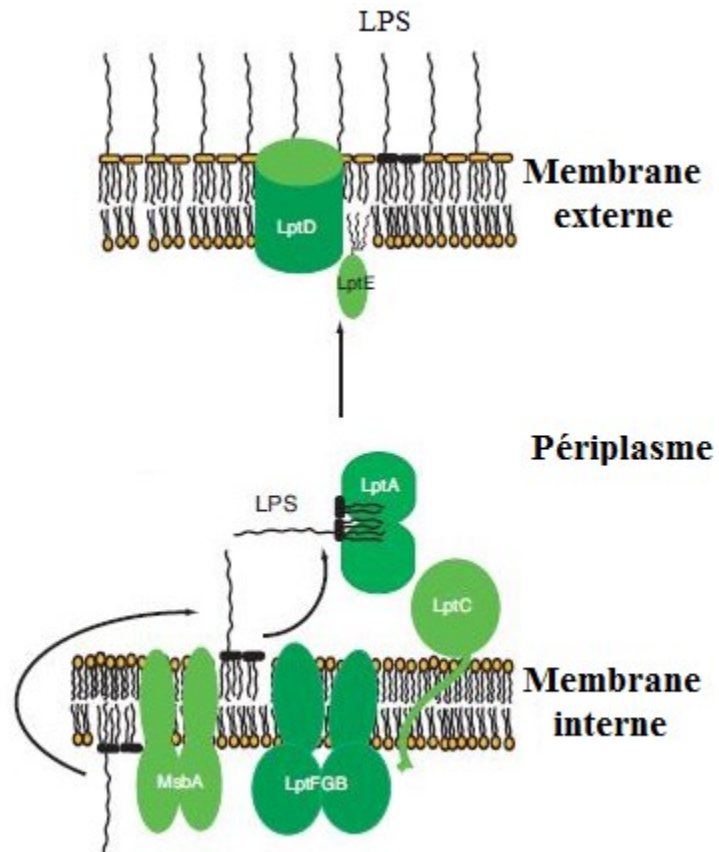
Les composants lipide A lié au noyau oligosaccharide et l’antigène O du LPS, après leur synthèse à la face cytoplasmique de la MI, sont transportés séparément à la face périplasmique de MI. La protéine MsbA formant un transporteur de type ABC transloque le lipide A-noyau oligosaccharide. Chez *E. coli* il existe deux systèmes de transport et d'assemblage de l'antigène O. Le système le plus utilisé implique le transport des unités d'antigène O par Wzx (Bos & Tommassen, 2004; Silhavy *et al.*, 2010; Tokuda, 2009; Wang & Quinn, 2010). Une fois à la face périplasmique de la MI, les protéines Wzy et Wzz polymérisent l’antigène O, conduisant à la formation d’une chaîne de sa répétition. Cette

chaîne formée est ensuite liée au noyau oligosaccharide par la protéine ligase WaaL pour conduire à l'assemblage du LPS qui sera transporté à la face externe de la ME par la machinerie Lpt (Bos & Tommassen, 2004; Wang & Quinn, 2010). La machinerie Lpt est composée du complexe LptFGB et de la protéine LptC localisés dans la MI, de la protéine périplasmique LptA, et des protéines LptE et LptD de la ME (figure 4) (Tokuda, 2009; Wang & Quinn, 2010). Ainsi dès l'assemblage du LPS, le complexe LptFGB s'associe aux protéines LptC et LptA pour le transporter de la face périplasmique de la MI à la face interne de la ME (Wang & Quinn, 2010). A ce stade, le complexe LptFGB et les protéines LptC et LptA sont relayés par les protéines LptE et LptD qui transportent le LPS à la face externe de la ME (Wang & Quinn, 2010).

#### **f. Les phospholipides**

Les phospholipides sont aussi synthétisés à la face cytoplasmique de la MI puis flippés à sa face périplasmique par un mécanisme encore méconnu (Bos & Tommassen, 2004). Ils sont ensuite transportés à travers le périplasme pour être insérés à face interne de la ME. Cependant le mécanisme de ce transfert reste inconnu (Bos & Tommassen, 2004; Silhavy *et al.*, 2010).





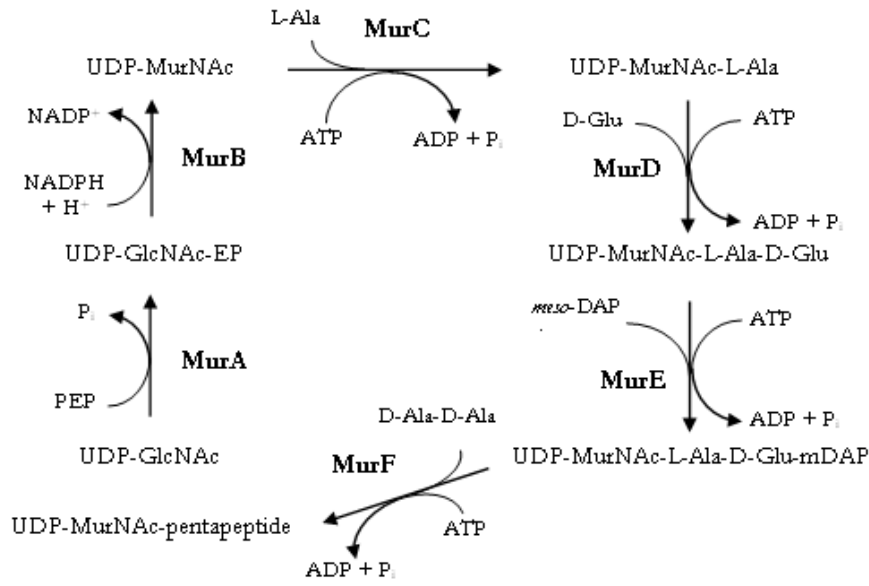
**Figure 4 :** La machinerie Lpt (Tokuda, 2009).

#### 1.1.4.2 Biosynthèse de la paroi bactérienne (le peptidoglycane)

Le PG est le principal élément structural de l'enveloppe chez la majorité des bactéries (Vollmer, Blanot, *et al.*, 2008). Il est fait de longues chaînes de disaccharides constituées d'unités de GlcNAc et de MurNAc reliées entre elles par des ponts glycosidiques de type  $\beta$ -1,4 et par de courts liens peptidiques covalents (Holtje, 1998; Vollmer, Blanot, *et al.*, 2008). Sa biosynthèse est un processus complexe qui se déroule en trois étapes : la synthèse des précurseurs nucléotidiques dans le cytoplasme, la synthèse des précurseurs lipidiques dans la MI et la polymérisation dans le périplasm. Elle implique plusieurs réactions enzymatiques (Barreteau *et al.*, 2008; Holtje, 1998).

#### 1.1.4.2.1 Étape de la synthèse des précurseurs nucléotidiques

L'étape cytoplasmique conduit à la formation du monomère UDP-MurNAc-pentapeptide (Barreteau *et al.*, 2008; Holtje, 1998). Tout commence avec la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc à partir du fructose-6-phosphate suite aux activités successives des enzymes glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS), phosphoglucosamine mutase (GlmM), glucosamine-1-phosphate acétyltransférase et N-acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase (GlmU enzyme bifonctionnelle) (Barreteau *et al.*, 2008). L'UDP-GlcNAc ainsi synthétisé constitue le premier sucre dont la conversion avec le phosphoénolpyruvate en UDP-MurNAc marque le départ de la biosynthèse du PG (Navarre & Schneewind, 1999). Au cours de la conversion, la transférase MurA transfère un résidu énoypyruvate du phosphoénolpyruvate à la position 3 de l'UDP-GlcNAc pour former le UDP-GlcNAc-EP. Le groupement énoypyruvate transféré est ensuite réduit par la réductase MurB en D-lactate, conduisant ainsi à la formation de l'UDP-MurNAc (figure 5) (El Zoeiby *et al.*, 2003). Suite à la production de UDP-MurNAc par MurA et MurB à partir de UDP-GlcNAc, une série de réactions enzymatiques conduites par les enzymes cytoplasmiques appelées Mur ligases attachent le pentapeptide au groupement D-lactyl de l'UDP-MurNAc. Ainsi, de façon respective et progressive, MurC, MurD, MurE et MurF ajoutent le résidu L-Alanine (L-Ala), l'acide D-Glutamique (D-Glu), l'acide meso-diaminopimélique (mDAP) dans le cas des bactéries à Gram-, les bacilles à Gram+ et les mycobactéries ou la L-lysine (L-Lys) chez les autres bactéries Gram+ (Kouidmi *et al.*, 2014) puis finalement le dipeptide D-Alanine-D-Alanine (D-Ala-D-Ala) (figure 5) (Vollmer & Bertsche, 2008). Le produit final de cette étape cytoplasmique est donc le monomère UDP-MurNAc-pentapeptide (El Zoeiby *et al.*, 2003).

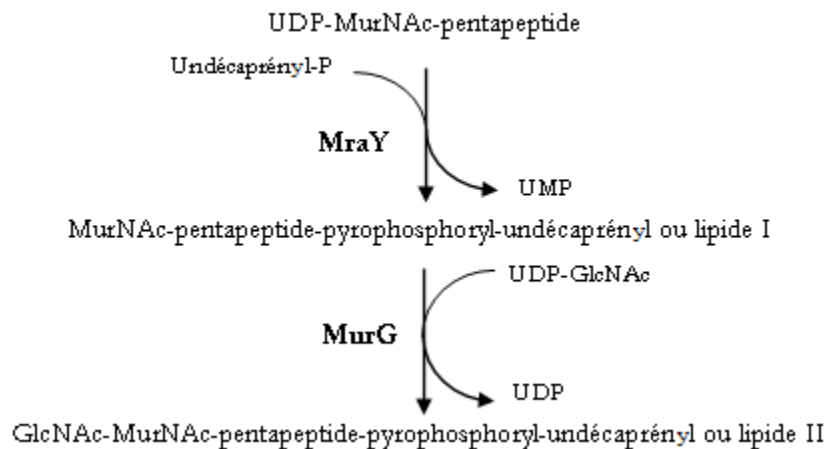


**Figure 5:** Étape cytoplasmique de la biosynthèse du PG (Paquet-Bouchard, 2006).

#### 1.1.4.2.2 Étape membranaire : synthèse des intermédiaires lipidiques

Elle débute à la face interne de la MI et conduit à la synthèse des intermédiaires lipidiques (lipide I et lipide II) puis à la translocation du lipide II à la face externe de la MI (Barreteau *et al.*, 2008; van Heijenoort, 2001). Elle implique les enzymes membranaires *MraY* et *MurG*, une flippase, et le transporteur lipidique *Und-P* synthétisé par l'enzyme *UppS* (Manat *et al.*, 2014; van Heijenoort, 2001). Au cours de cette étape, la translocase *MraY* transfère le groupement phospho-MurNAc-pentapeptide du monomère UDP-MurNAc-pentapeptide au transporteur lipidique *Und-P* situé dans la MI, conduisant à la formation du MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprényl appelé lipide I (figure 6) (Scheffers & Pinho, 2005). Au lipide I ainsi formé, la transférase *MurG* ajoute un résidu GlcNAc provenant du sucre activé UDP-GlcNAc pour former le lipide II : GlcNAc-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprényl (figure 6) (Scheffers & Pinho, 2005; van Heijenoort, 2001). Le lipide II est par la suite transloqué à la face externe de la MI où il constitue l'unité de base

pour l'assemblage du PG (Scheffers & Pinho, 2005; Vollmer & Bertsche, 2008). Le mécanisme par lequel se fait cette translocation reste encore mitigé mais semble être gouverné par la flippase MurJ (Sham *et al.*, 2014).



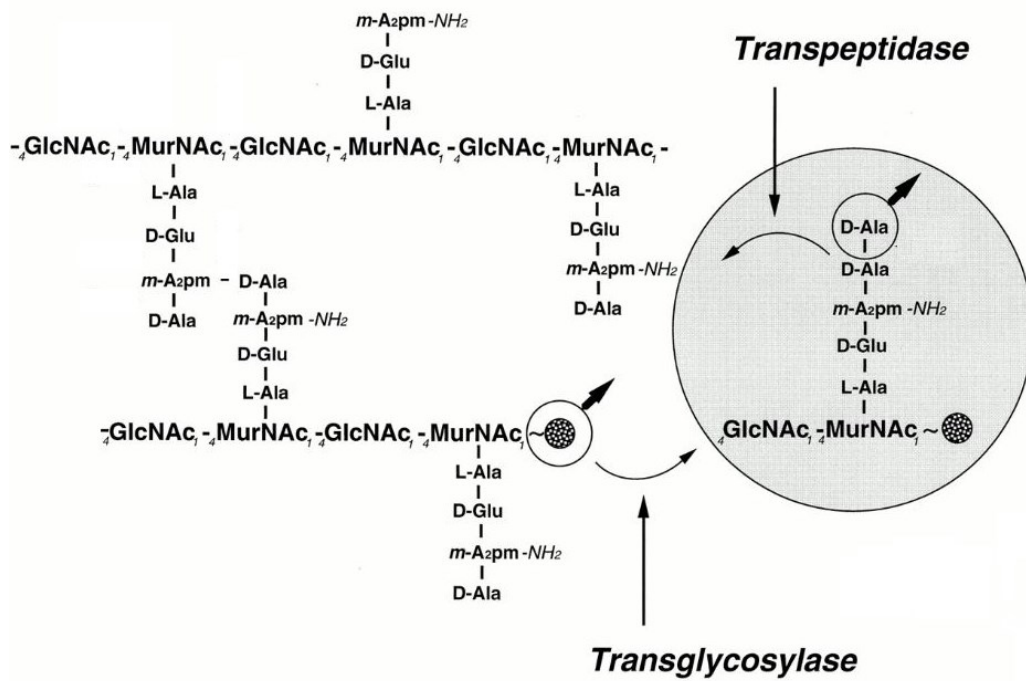
**Figure 6:** Étape membranaire de la biosynthèse du PG : synthèse des lipides I et lipides II (Paquet-Bouchard, 2006)

#### 1.1.4.2.3 Étape périplasmique : polymérisation du PG

Elle se déroule à la face externe de la MI et consiste en la polymérisation des nouvelles unités de lipide II synthétisées et à leur incorporation au PG en cours de synthèse (Scheffers & Pinho, 2005). Elle est effectuée par des réactions de transglycosylation et de transpeptidation catalysées par des protéines membranaires de grand poids moléculaire appelées PLP (Protéine Liant Pénicilline). Il existe deux classes de PLP de grand poids moléculaire, la classe A et la classe B qui sont toutes deux impliquées dans les réactions de la polymérisation (Navarre & Schneewind, 1999; Vollmer & Bertsche, 2008).

Au cours de la réaction de transglycosylation, le pont phosphodiester-MurNAc d'un lipide II est clivé pour engendrer la formation d'un pont glycosidique entre l'extrémité réduite

MurNAc de ce dernier et le C-4 du résidu GlcNAc d'un autre lipide II nouvellement synthétisé (figure 7) (Scheffers & Pinho, 2005; Typas *et al.*, 2012). Cette formation du pont glycosidique est couplée à la libération de Und-PP suite au clivage du pont phosphodiester-MurNAc. Par la suite, l'Und-PP est déphosphorylé pour donner le support lipidique Und-P, disponible pour un autre cycle de synthèse (Scheffers & Pinho, 2005). C'est la réaction de transglycosylation qui assure l'élongation de la chaîne glycanique. Cependant, il reste à déterminer comment et à quel moment la chaîne est libérée de l'enzyme et ce qui détermine sa longueur (Scheffers & Pinho, 2005).



**Figure 7 :** Réactions de transglycosylation et transpeptidation (Holtje, 1998).

Les longues chaînes de glycanes formées par transglycosylation sont liées entre elles par des liens peptidiques. Au cours de la réaction de transpeptidation, il se forme une liaison entre

le groupe carboxyl du résidu D-Ala en position 4 du pentapeptide donneur d'une chaîne de glycane et l'extrémité N-terminale de l'acide aminé acide meso-diaminopimelic (mDAP) du pentapeptide receveur sur une autre chaîne de glycane (figure 7) (Barreteau *et al.*, 2008; Vollmer & Bertsche, 2008). La réaction de transpeptidation est accompagnée du clivage du lien D-Ala-D-Ala du pentapeptide donneur, ce qui conduit à la formation d'un térapeptide (Navarre & Schneewind, 1999). La forme finale du polymère du PG comporte une chaîne térapeptidique (Scheffers & Pinho, 2005) car le lien D-Ala-D-Ala des pentapeptides donneurs est clivé par les PLPs lors de la réaction de transpeptidation et le lien D-Ala-D-Ala des autres pentapeptides est clivé par des enzymes de type carboxypeptidase (Sauvage *et al.*, 2008). Chez les bactéries Gram-, l'activité des PLP est régulées par des lipoprotéines LpoA et LpoB de la ME (Paradis-Bleau *et al.*, 2010).

### **1.1.5 Découverte du facteur ElyC chez *E. coli***

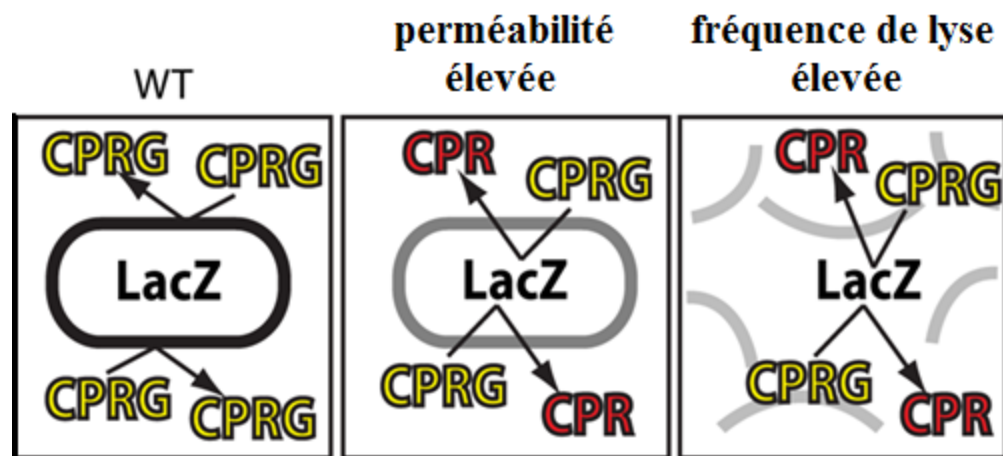
Afin de comprendre comment les différents processus impliqués dans l'assemblage de l'enveloppe sont régulés pour conduire à une synthèse uniforme de l'enveloppe qui garantit le maintien de son intégrité, le Dr Paradis-Bleau et son équipe ont mené des travaux de recherches.

Étant donné que les gènes codant pour les protéines d'enveloppe constituent environ un quart du génome de *E. coli*, et que le tiers de ces protéines sont de fonctions inconnues ou peu connues (Hu *et al.*, 2009), le Dr Paradis-Bleau et son équipe ont mis au point une technique de criblage génétique à haut débit basé sur un nouvel essai phénotypique pour pouvoir identifier parmi ces protéines celles qui sont importantes à la régulation de l'assemblage de l'enveloppe (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

Cette technique a été inspirée de la technique classique basée sur la détection de l'ARNase périplasmique libérée chez les mutants présentant des défauts de biogénèse de l'enveloppe, en utilisant des milieux contenant de l'ARN (Lopes *et al.*, 1979; Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

### 1.1.5.1 Principe de l'essai phénotypique développé

La technique de l'essai phénotypique développé consiste à utiliser l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (LacZ) de *E. coli* et le CPRG, un substrat de LacZ de couleur jaune qui ne pénètre pas l'enveloppe bactérienne saine et dont le produit de dégradation est le CPR de couleur rose. Chez des cellules bactériennes avec une enveloppe saine, LacZ cytoplasmique n'entre pas en contact avec le CPRG extracytoplasmique, il n'y a donc pas de dégradation en CPR et les cellules ne sont donc pas colorées (figure 8). Pour un mutant présentant un défaut au niveau de son enveloppe, l'enzyme LacZ cytoplasmique va entrer en contact avec le CPRG extracytoplasmique qui va être dégradé en CPR. Cela va colorer le mutant en rose (figure 8) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).



**Figure 8 :** Principe de la technique de l'essai phénotypique développé (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

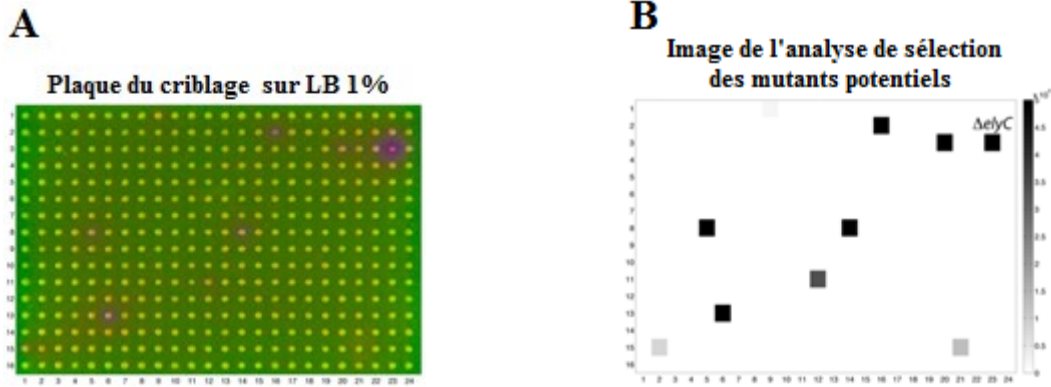
#### 1.1.5.2 Criblage génétique de la banque Kéio

L'essai développé a été utilisé pour cribler la banque Kéio qui est une banque d'environ 4000 mutants de *E. coli* comportant chacun une délétion monogénique pour une couverture presque complète de l'ensemble des gènes non essentiels de *E. coli* (Baba *et al.*, 2006). Cette banque qui était à la base LacZ<sup>-</sup>, a été convertie en LacZ<sup>+</sup> par une technique de conjugaison en masse avant le criblage (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

Le criblage a été effectué sur le milieu LB contenant 0, et 1% de NaCl à 22°C et 30°C afin de maximiser le nombre de facteurs de biogénèse de l'enveloppe identifiés (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Les plaques de criblage ont été lues et analysées à l'aide de l'application Iris (une application permettant de quantifier différentes caractéristiques des colonies y compris leur couleur) afin de ne sélectionner que de potentiels mutants qui présentent des défauts d'enveloppe (figure 9B) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Les conditions 0 et 1% de NaCl puis 22°C et 30°C ont été choisies sur la base des résultats préliminaires du criblage effectué à 22°C et 30°C sur des milieux LB contenant 0, 0.5 et 1% NaCl, avec une banque de mutants obtenus par transposon.

Le criblage de la banque Kéio a permis d'identifier de nombreux mutants de phénotype CPRG<sup>+</sup>, donc présentant des défauts au niveau de leur enveloppe (figure 9A) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).





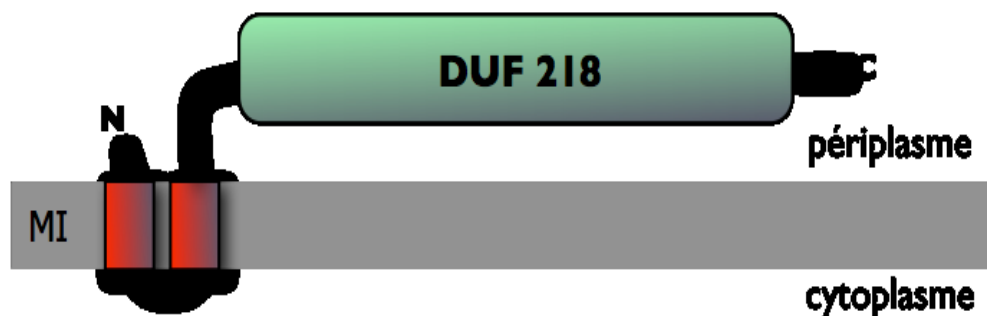
**Figure 9:** Résultats du criblage de la banque Kéio LacZ<sup>+</sup>. (A) : plaqué montrant des mutants de phénotype CPRG<sup>+</sup>. (B) : sélection des potentiels mutants CPRG<sup>+</sup> (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

Ce criblage a permis d'identifier 102 gènes de fonction inconnue, en plus de plusieurs gènes déjà impliqués dans l'enveloppe comme *tolA*, *pal*, *mrcB*.

### 1.1.5.3 Le facteur ElyC

Parmi les mutants CPRG<sup>+</sup> identifiés, il y'a celui portant la délétion du gène de fonction inconnue *ycbC* qui présentait un phénotype CPRG<sup>+</sup> très prononcé. Ce gène a été renommé *elyC* pour Elevated Lysis factor C (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

Les analyses bioinformatiques ont révélé que le gène *elyC* code pour une protéine membranaire qui possède 2 domaines transmembranaires avec un domaine très conservé de fonction inconnue (DUF218) qui serait dans le périplasme (figure 10) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).



**Figure 10** : Topologie prédite d'ElyC (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

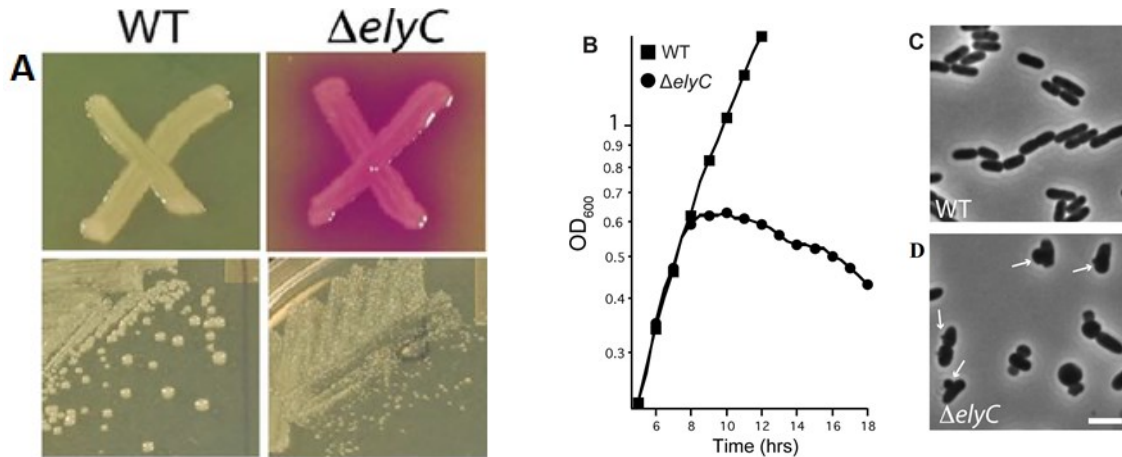
#### 1.1.5.4 Phénotype du mutant $\Delta elyC$ à température pièce

Pour confirmer le phénotype CPRG+ observé chez le mutant  $\Delta elyC$  identifié après le criblage de la banque Kéio, l'essai phénotypique développé a été réalisé sur deux nouvelles souches d'*E. coli*, une sauvage (WT) MG1655 contenant LacZ et de son dérivé chez qui le gène *elyC* a été inactivé ( $\Delta elyC$ ). Chacune de ces deux souches a été inoculée sur un milieu LB 1% NaCl et LB 1% NaCl contenant 20 $\mu$ g/ml de CPRG et 50 $\mu$ M d'IPTG, puis incubées à 22°C pendant toute une nuit. La souche WT apparaît blanche sur le milieu contenant CPRG alors que le mutant  $\Delta elyC$  apparaît rose (figure 11 A). Ce qui suggère un défaut d'enveloppe pour le mutant  $\Delta elyC$  comparativement au WT chez qui l'enveloppe est saine et confirme le phénotype du mutant  $\Delta elyC$ . La croissance du WT sur le milieu LB 1% NaCl montre de grosses colonies contrairement à celle du mutant  $\Delta elyC$  qui montre de petites colonies. Ce résultat suggère un défaut de croissance chez le mutant  $\Delta elyC$ .

Dans l'optique de rechercher d'autres conséquences liées à l'inactivation du gène *elyC*, la croissance du mutant  $\Delta elyC$  a été suivie en milieu LB liquide contenant 1% NaCl à 22°C, celle du WT aussi. Il a été observé une croissance rapide jusqu'à un peu avant la fin de la

phase exponentielle ( $DO_{600nm}$  de 0.6) pour les deux souches, et une décroissance brusque pour le mutant  $\Delta elyC$  juste après cette phase alors que le WT continuait de croître (figure 11B). Pour démontrer que cette décroissance brusque des DO du mutant  $\Delta elyC$  n'est pas liée à un effet de quorum, mais plutôt à son phénotype de lyse, d'autres essais ont été effectués. En effet deux échantillons de cultures du mutant  $\Delta elyC$ , un dans l'intervalle de temps [6h,8h] et l'autre dans l'intervalle [8h,18h], ont été prélevés et centrifugés. Les culots cellulaires de l'échantillon prélevé dans l'intervalle [8h,18h] ont remis en suspension dans le surnageant de l'échantillon de l'intervalle [6h,8h]. Cette suspension a été remise en culture à 22°C ses DO ont été mesurées. Les valeurs des DO obtenus n'ont pas été différentes de celles de l'intervalle [6h,8h]. Ces résultats indiquent l'absence des molécules du quorum de sensing dans le surnageant de l'échantillon prélevé entre [8h,18h]. Ils suggèrent que la décroissance des DO de la culture du mutant  $\Delta elyC$  entre [8h,18h] (figure 11B) est peut-être liée à son phénotype de lyse.

De plus l'analyse microscopique n'a montré aucune différence cellulaire pour les cultures de deux souches prélevées avant la fin de la phase exponentielle. Par contre, pour les cultures prélevées à dans l'intervalle de temps (entre 8h et 18h) où il y a eu de décroissance des DO du mutant  $\Delta elyC$ , on observe pour le WT de nombreuses cellules intactes (figure 11C) et pour le mutant  $\Delta elyC$  des cellules moins nombreuses qui sont en cours de lyse (figure 11D). Ces résultats indiquent que le mutant présente un phénotype de lyse.

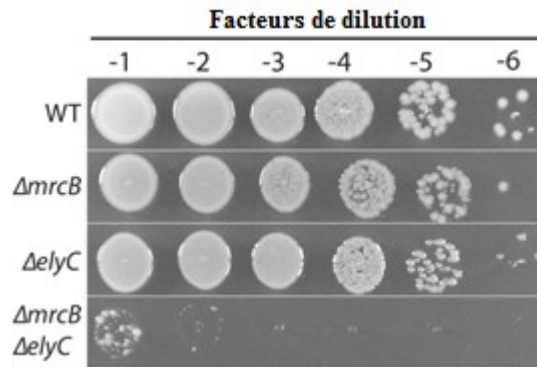


**Figure 11:** Phénotype de croissance et de lyse cellulaire causé par l'inactivation d'ElyC (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

### 1.1.5.5 Implication du facteur ElyC dans la biosynthèse de l'enveloppe chez *E. coli*

Le phénotype de lyse observé chez le mutant  $\Delta\text{elyC}$  indique probablement un défaut au niveau du PG. Les PLPs de classe A PLP1a et PLP1b codés respectivement par les gènes *mrcA* et *mrcB* (Typas *et al.*, 2012) sont deux synthases qui possèdent des activités transglycosylase et transpeptidase. L'inactivation de l'un ou l'autre de ces deux facteurs n'empêche pas les souches mutantes obtenues de vivre. Par contre une souche inactivée pour ces 2 facteurs lyse (Paradis-Bleau *et al.*, 2010).

En faisant des essais d'inactivation du gène *elyC* chez les mutants  $\Delta\text{mrcA}$  et  $\Delta\text{mrcB}$ , le Dr Paradis-Bleau et son équipe ont observé que le double mutant  $\Delta\text{elyC} \Delta\text{mrcB}$  est non viable à 22°C (figure 12), alors que le double mutant  $\Delta\text{elyC} \Delta\text{mrcA}$  est malade à 22°C. Ces résultats indiquent qu'ElyC est important dans l'assemblage du PG (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

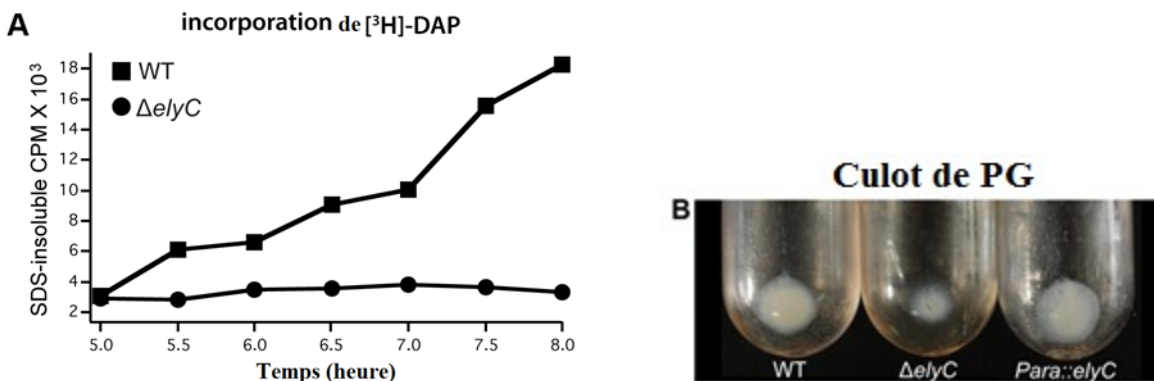


**Figure 12:** Le double mutant  $\Delta elyC \Delta mrcB$  et le phénotype synthétiquement léthal (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

Pour confirmer cette hypothèse, des essais de mesure de biosynthèse du PG ont été réalisés chez le WT et le mutant  $\Delta elyC$ , en utilisant le mDAP marqué radioactivement par le tritium [ $^3\text{H}$ ]. Le mDAP est unique au PG. Chez la bactérie, il est directement impliqué dans la biosynthèse du PG et constitue également le précurseur pour la synthèse de la lysine. Pour réaliser l'expérience de marquage, les deux souches ont été rendues auxotrophes pour la lysine en inactivant le gène *lysA* requis pour la conversion du mDAP en lysine avant l'essai de marquage et ceci afin de s'assurer que le mDAP disponible dans la bactérie irait uniquement pour la biosynthèse du PG. Le PG est la seule structure de la cellule bactérienne insoluble dans une solution détergente de SDS 4% bouillie à 100°C (Wientjes *et al.*, 1985). L'essai a consisté à faire pousser à 22°C les souches traitées au mDAP radioactif dans du LB liquide supplémenté de lysine. Plusieurs aliquots de chaque culture ont été prélevés à différents temps, bouillis dans du SDS 4% et filtrés. La radioactivité a été ensuite dosée dans le PG récolté dans chaque aliquot. Les résultats des dosages ont révélé de faibles quantités de  $^3\text{H}$ -DAP pour le mutant  $\Delta elyC$  comparativement au WT (figure 13A).

Pour quantifier le PG synthétisé, le même essai a été repris sans le marquage au  $[^3\text{H}]$  sur les souches WT,  $\Delta\text{elyC}$  et  $\Delta\text{elyC}(\text{P}_{\text{ara}}::\text{elyC})$ . Les souches ont été cultivées dans du LB liquide 1% NaCl à 22°C et 37°C jusqu'à  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.5. Pour la souche  $\Delta\text{elyC}(\text{P}_{\text{ara}}::\text{elyC})$  0.2% d'arabinose a été ajouté à son milieu pour induire l'expression du gène *elyC* et permettre une complémentation. Les culots cellulaires ont été suspendus dans du PBS puis bouillis dans du SDS 4% sous agitation. Ils ont été ensuite refroidis à l'air ambiant et les culots de PG ont été récoltés par ultracentrifugation. Les résultats des cultures à 37°C n'ont révélé aucune différence entre les quantités de PG récolté pour chaque souche. En revanche les résultats à 22°C ont révélé de faible quantité de PG pour le mutant  $\Delta\text{elyC}$  comparativement au WT et  $\Delta\text{elyC}(\text{P}_{\text{ara}}::\text{elyC})$  (figure 13B). L'obtention d'un même résultat pour les souches WT et  $\Delta\text{elyC}(\text{P}_{\text{ara}}::\text{elyC})$  indiquent que la faible quantité du PG à 22°C est spécifiquement liée à l'inactivation du gène *elyC*.

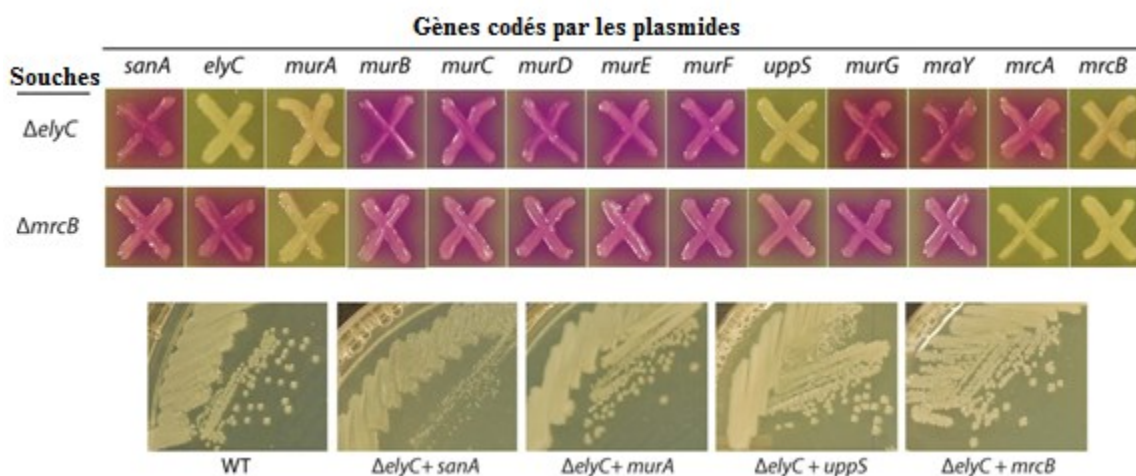
Ces résultats ont suggéré que la synthèse du PG est bloquée chez le mutant  $\Delta\text{elyC}$  comparativement au WT, et indiquent qu'ElyC est requis pour la biogénèse du PG à 22°C (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).



**Figure 13 :** Défaut de synthèse du PG chez  $\Delta\text{elyC}$  (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

### 1.1.5.6 Étapes de la biogénèse du PG affectées par l'inactivation de ElyC

Il a été démontré que la surexpression de MurA, UppS ou PLP1b, trois enzymes capitales dans la voie de synthèse du PG, supprime totalement le phénotype CPRG+ du mutant  $\Delta elyC$  et restaure une croissance normale à 22°C (figure 14) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Afin de vérifier la spécificité de ces résultats, des plasmides codant pour MurA, UppS ou PLP1b ont été introduits dans le mutant  $\Delta mrcB$  qui présente aussi le phénotype CPRG+ dû à l'inactivation du gène *mrcB*. Les résultats obtenus ont révélé la suppression complète du défaut chez le mutant  $\Delta mrcB$  par la surexpression de MurA, PLP1b et de PLP1a qui ne supprimait pas le défaut chez le mutant  $\Delta elyC$  (figure 14) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). De plus l'enzyme UppS a été la seule des trois enzymes ayant supprimé le défaut chez le mutant  $\Delta elyC$  à ne pas supprimer le défaut du mutant  $\Delta mrcB$  (figure 14). Ce qui signifie que la suppression du phénotype CPRG+ chez le mutant  $\Delta elyC$  par la surexpression de l'enzyme UppS est spécifique. Cette spécificité a suggéré que le défaut engendré par l'inactivation de ElyC est probablement au niveau du métabolisme du support lipidique Und-P étant donné que UppS est directement impliqué dans la synthèse de Und-P (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).



**Figure 14** : Suppression spécifique des phénotypes du mutant  $\Delta elyC$  par la surexpression de l'enzyme UppS (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

Il en résulte que ElyC est un facteur nouvellement découvert et important dans le processus de biogénèse du PG à 22°C.



## 1.2 Objectif du projet

L'objectif général de mon projet de maîtrise est l'étude du facteur ElyC. Selon les analyses bioinformatiques, ElyC serait une protéine membranaire avec deux domaines transmembranaires et un domaine conservé de fonction inconnu situé dans le périplasme (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Mon premier objectif spécifique est donc de déterminer la topologie d'ElyC. Pour y parvenir j'ai utilisé la technique de modification de cystéine (Yu *et al.*, 2000). J'ai cloné la fusion *elyC-his* dans un plasmide sous le contrôle du promoteur  $P_{Lac}$  et construit des variants de  $P_{Lac}::elyC-his$  en substituant individuellement des codons de sérine par des codons cystéines en position N-terminale, dans la boucle ou en position C-terminale par mutagenèse dirigée. Les plasmides obtenus ont été intégrés dans le génome de *E. coli* par le système CRIM (Haldimann *et al.*, 2001) et transférés dans une souche  $\Delta elyC$  par transduction. Les cultures bactériennes exprimant les différents variants d'ElyC-his ont été traitées avec le « 2-Sulfonatoethyl methanethiosulfonate sodium salt » (MTSES) et la biotine maléimide. Les protéines membranaires de chaque variant ont été extraites par solubilisation, purifiées et analysées par western à la streptavidine.

Mon deuxième objectif spécifique est d'identifier les partenaires protéiques d'ElyC à 22°C. Étant donné que les protéines impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne agissent majoritairement sous forme de complexes multiprotéiques (Danese *et al.*, 1998), j'ai émis l'hypothèse que ElyC aurait des partenaires protéiques avec lesquels il interagirait dans la biosynthèse du PG. Pour ce faire, j'ai construit une souche qui exprime physiologiquement ElyC-His en fusionnant une étiquette histidine directement en 3' du gène *elyC* par le système de recombinaison  $\lambda$  red afin d'obtenir *elyC-his* sous le contrôle du promoteur naturel de *elyC* (Yu *et al.*, 2000). J'ai ensuite utilisé cette souche pour purifier ElyC présent en quantité

physiologique et ses partenaires protéiques par immuno-précipitation en utilisant l'anticorps anti-his et des billes couplées à la protéine G. Les protéines des complexes isolés ont été séparées par SDS-PAGE et identifiées par spectrométrie de masse.

De récents travaux de notre laboratoire ont révélé l'existence d'un lien entre le phénotype de lyse observé chez le mutant  $\Delta elyC$  à 22°C et le stress oxydatif. Mon troisième objectif spécifique est de vérifier ce lien. Pour cela, j'ai étudié la croissance de la souche mutante  $\Delta elyC$  sur plusieurs heures en présence des concentrations 0 et 0.12µM du chromate de potassium à 22°C.

L'identification d'un lien entre ElyC et le stress oxydatif constituerait de plus une évidence de l'importance de la place du facteur ElyC dans la vie de la cellule bactérienne chez *E. coli* à 22°C. La détermination de sa topologie et l'identification de ses partenaires protéiques vont permettre de mieux comprendre sa fonction et son implication précise dans la biosynthèse du PG. Une plus grande compréhension de la biogénèse de l'enveloppe permettra certainement l'identification de nouvelles cibles pour le développement de nouvelles thérapies contre les bactéries résistantes.

## **2. Matériels et méthodes**

## 2.1. Souches et plasmides utilisés dans ce travail

Tableau 1: Souches d'*E. coli* utilisées et construites pour ce projet

Souches	Génotypes	Sources
DH5( $\alpha$ pir)	<i>F- hsdR17 deoR recA1 endA1 phoA</i> <i>supE44 thi-1gyrA96 relA1Δ (lacZYA-argF)</i> <i>U169 Ø80dlacZΔM15</i>	Gibco BRL
MG1655	<i>rph1 ilvG rfb-50</i>	(Guyer <i>et al.</i> , 1981)
TB28	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frt</i>	(Bernhardt and de Boer, 2004)
TB28(attHKTB98)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frt</i> <i>P<sub>lac</sub>::ZipA-gfp</i>	Banque de souches du laboratoire
TB10	<i>rph1 ilvG rfb-50 λΔcro-bio nad::Tn10</i>	(Johnson <i>et al.</i> , 2004)
EM9	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt</i>	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2014)
EM9(attHKLA1)	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt pLac::duf218-his10</i>	ce travail
EM9(attHKLA2)	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt</i> <i>P<sub>lac</sub>::ssdsbA- duf218-his10</i>	ce travail
EM9(attHKHK1)	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt P<sub>lac</sub>::elyC-his10</i>	ce travail
EM9(attHKHK2)	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt P<sub>lac</sub>::elyC(S4C)-his10</i>	ce travail
EM9(attHKHK3)	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt P<sub>lac</sub>::elyC(S33C)-his10</i>	ce travail
EM9(attHKHK4)	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt P<sub>lac</sub>::elyC(S253C)-his10</i>	ce travail
HK1	<i>rph1 ilvG rfb-50 λΔcro-bio nad::Tn10</i> <i>P<sub>elyC</sub>::elyC-his</i>	ce travail
HK2	<i>rph1 ilvG rfb-50 elyC::frt P<sub>elyC</sub>::elyC-his</i>	ce travail

TB28(attHKHK1)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frrt P<sub>lac</sub>::elyC-his10</i>	ce travail
TB28(attHKHK2)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frrt P<sub>lac</sub>::elyC(S4C)-his10</i>	ce travail
TB28(attHKHK3)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frrt P<sub>lac</sub>::elyC(S33C)-his10</i>	ce travail
TB28(attHKHK4)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frrt P<sub>lac</sub>::elyC(S253C)-his10</i>	ce travail
TB28(attHKLA1)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frrt P<sub>lac</sub>::duf218-his10</i>	ce travail
TB28(attHKLA2)	<i>rph1 ilvG rfb-50 lacIZYA::frrt P<sub>lac</sub>::ssdsbA-duf218-his10</i>	ce travail

Tableau 2 : Plasmides utilisés et construits pour ce travail

Plasmides	Origine de répllication	Résistance	Génotypes	Sources
pCB118	R6K	Amp50	<i>attL P<sub>ara</sub>::elyC</i>	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2014)
pCB70	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::mrcB</i>	Banque de souches du labo
pTB102		Cam10	<i>cI857 <math>\lambda</math>PR::intHK022</i>	(Bernhardt and de Boer, 2005)
pKD13	R6K	Kan20	<i>DE(lacZYA)514::cat.</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pHK1	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::elyC-his10</i>	ce travail
pHK2	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::elyC(S4C)-his10</i>	ce travail
pHK3	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::elyC(S33C)-his10</i>	ce travail
pHK4	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::elyC(S253C)-his10</i>	ce travail
pLA1	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::duf218-His10</i>	ce travail
pLA2	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::ssdsbA-duf218-His10</i>	ce travail
pTB305	R6K	Amp50	<i>P<sub>lac</sub>::ssdsbA-duf218-sfGFP</i>	Banque de souches du labo

Tableau 3: Milieux de culture et préparations utilisés pour ce travail

<b>Milieux</b>	<b>Compositions</b>	
LB agar (pour 1L)	agar poudre	15g
	peptone	10g
	extrait de levure	5g
	NaCl	5g
LB liquide (pour 1L)	peptone	10g
	extrait de levure	5g
	NaCl	5g
LB-5mM CaCl <sub>2</sub> (100mL)	LB liquide	99.5mL
	CaCl <sub>2</sub> , 1M	0.5mL
LB-50mM Na Citrate (100mL)	LB liquide	95mL
	Na Citrate, 1M	5mL
MC Buffer	CaCl <sub>2</sub> , 1M	0.5mL
	MgCl <sub>2</sub> , 1M	10mL
SOB (pour 1L)	tryptone	20g
	extrait de levure	5g
	NaCl	0.5g
SOC (pour 100mL)	SOB	100mL
	MgCl <sub>2</sub> , 1M	1mL
	glucose 20%	1mL
Agar-TOP (pour 1L)	tryptone	10g
	NaCl	8g
	agar	8g

Tableau 4: Les amorces utilisées pour ce travail (les sites de restriction sont soulignés et les fusions ou les mutations sont en gras).

utilisation	Nom des amorces	Séquences 5'-3'
Fusion <i>elyC-his</i>	XbaI-RBS-ycbC (Forward)	5' <u>GTCATCTAGAAAATAAGGAGATATACATATGCTTT</u> TTACTGAAAAAGTGATTGGCAA3'
	YcbCHis10-HindIII (Reverse)	5'GCGTA <u>AAGCTTTTAATGGTGATGGTGATGGTGATG</u> <b>GTGATGGTGCTCTTGCCGTGGCTCGC3'</b>
HK2/ Mutagenèse dirigée 4 <sup>ème</sup> aa	ForwardNT	5'CTTTTTT <u>GTCTGAAAAAAGTGATTGGCAATATG</u> TTG3'
	ReverseNT	5' <u>CATATGTATATCTCCTTATTTTCTAGAGGGGAATTG</u> TTATC3'
HK3/ Mutagenèse dirigée 33 <sup>ème</sup> aa	ForwardLoop	5'TGGTTTT <u>TGCCGTTTTCAAAAAACCGGGAAGATT</u> TTT3'
	ReverseLoop	5'CAGCAGCGCCAGGCCAG3'
HK4/ Mutagenèse dirigée 253 <sup>ème</sup> aa	ForwardCT	5'GTT <u>CGTGTGGCGAGCCACGG3'</u>
	ReverseCT	5'CTTTTAGCCACTGCCAGATACGGCCAAG3'
Vérification de l'intégration	P1attHK, P2, P3, P4attHK	5' GGC ATC AAC AGC ACA TTC 3' 5' ACG AGT ATC GAG ATG GCA 3' 5' ACTTAACGGCTGACATGG 3' 5' GGAATCAATGCCTGAGTG 3'
Séquençage de pHK1-2-3 et 4	ForwardSeqCRIM	5' ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA 3'
	ReverseSeqCRIM	5' CCGCTGTGCTTTCAGTGGATTTCG 3'
Fusion de <i>CTelyC-His-</i> <i>Kan</i>	CTelyC-H10For (forward)	5'GCAGTGGCTAAAAGGTTTCGTCAGGCGAGCCACGGC AAGAGCACCATCACCATCACCATCACCATCACCAT TGATATGGACAGCAAGCGAACC 3'
	CTelyC-HisR (reverse)	5'ACTTCGATCTGGCATCAA AATTAGAAGA AACTCGTCA AGAAGGCG 3'
Vérification de l'intégration <i>His10-Kan</i> dans TB10	TB10SEQelyCHisF (forward)	5' CTGGCGATCCCTTGCTATATGGTT 3'
	TB10SEQelyCHisR (reverse)	5' GCGTGCAATCCATCTTGTTC AATCAT3'
Construction Duf218 cyto (pLA1)	Forward-XbaI-RBS- Start-Duf218 (forward)	5'GGGGTCTAGAAAATAAGGAGATATACATATGATC GAAAGCACCTATCCGACATGG3'
	YcbCHis10-HindIII (reverse)	5'GCGTA <u>AAGCTTTTAATGGTGATGGTGATGGTGATGGT</u> GATGGTGCTCTTGCCGTGGCTCGC3'
Construction Duf218 péri (pLA2)	Forward-BamHI- Duf218 (forward)	5'GGGGGGATCCATCGAAAGCACCTATCCGACAT GGG3'

	YcbCHis10-HindIII (reverse)	5'GCGTAAGCTTTTAATGGTGATGGTGATGGTGATGGT GATGGTGCTCTTGCCGTGGCTCGC3'
Reprise PCR de Contrôle sur <i>ΔelyC::his-kan</i>	ForSeqelyC-his-kan (forward) RevSeqelyC-his-kan (reverse)	5'GTATAAATTGCATGTTGTCGCTCACACCTT3' 5'CAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACCG3'

## 2.2 Construction des outils moléculaires

### 2.2.1 Intégration génomique de *P<sub>lac</sub>::elyC-his* par plasmide CRIM

#### 2.2.1.1 Construction du plasmide pHK1

##### a. Construction de la fusion *elyC-his* par PCR

La fusion *elyC-his* a été obtenue en amplifiant le gène *elyC* contenu dans le plasmide pCB118 avec les amorces XbaI-RBS-YcbC et YcbC-His10-HindIII. L'amorce XbaI-RBS-YcbC est une extension de 60 bases correspondant de 5'→3' à 4 bases quelconques, à la séquence du site de restriction de l'enzyme XbaI, à la séquence RBS et à la séquence codant pour le début de ElyC. Elle représente l'amorce « forward » qui s'hybride au début du gène *elyC*. L'amorce YcbC-His10-HindIII est aussi une extension de 60 bases correspondant de 5'→3' au complément inversé de : la séquence codant pour la fin de ElyC excluant le codon stop, une séquence de dix codons d'histidine, le codon stop du gène *elyC*, la séquence du site de restriction de l'enzyme HindIII et de 4 bases quelconques. Elle représente l'amorce « reverse » qui s'hybride à la fin du gène *elyC*. Dans un tube à PCR, on a introduit 37μl d'eau distillée, 1.5μl de XbaI-RBS-YcbC à 10μM, 1.5μl de YcbC-His10-HindIII à 10μM, 1.5μl du plasmide pCB118 à 89.1ng/μl dilué au 1/10, 1 μl du mélange déoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP, à 10 mM chacun), 5μl du tampon PCR 10X et 2.5μl de l'ADN polymérase RedTaq de la compagnie "Sigma-Aldrich". La réaction a été amplifiée avec le thermocycleur



"Biometra" de la compagnie "Biotech Montréal" suivant le programme ci-après : une phase de dénaturation de 98°C pendant 180 secondes; 30 cycles de 98°C pendant 30secondes, 55°C pendant 20 secondes, 72°C pendant 100 secondes et une phase d'extension finale de 72°C pendant 120 secondes. Pour vérifier l'amplification, 5ul du produit PCR obtenu, additionné de 1µl du tampon d'échantillon TEC (2.5% Ficoll-400, 11mM EDTA, 3.3mM Tris-HCl, 0.017% SDS, 0.015% bleu de bromophénol, pH 8.0) a été migré sur gel d'agarose 1% à 120V pendant 1H. Le gel a été ensuite visualisé avec le transilluminateur # 981651 de la compagnie "Alpha Innotech". Une fois confirmé, le produit PCR a été purifié avec le kit "GeneJET PCR Purification #K0702" de la compagnie "Fermentas". La fusion *elyC-his* ainsi purifiée a été ensuite clonée dans le plasmide CRIM pCB70 sous le promoteur  $P_{lac}$ . Ce plasmide CRIM a l'origine de répllication R6K, un site d'attachement phagique "attHK", une cassette de résistance à l'ampicilline et le promoteur  $P_{lac}$ .

#### **b. Digestion du vecteur pCB70 et de l'insert *elyC-his***

Le vecteur pCB70 et l'insert *elyC-his* ont été chacun digéré avec les enzymes de restriction XbaI et HindIII de la compagnie "New England Biolabs". On a réalisé une double digestion parce que les deux enzymes coupent efficacement dans un même tampon (le tampon NEB2). Dans un tube eppendorf, nous avons transféré 2µl du BSA 10X, 2µl du tampon NEB2 10X, 15µl du pCB70 à 106.5ng/µl ou 5µl du produit PCR purifié *elyC-his*, 0.5µl de l'enzyme HindIII et 0.5µl de l'enzyme XbaI. Au tube contenant l'insert, nous avons rajouté 10µl d'eau distillée. Les réactions ont été incubées à 37°C au bain-marie pendant 3H et les produits obtenus ont été purifiés.

### **c. Purification des produits de digestion sur gel d'agarose "low melt" 0.7%**

La purification des produits de digestion permet d'isoler les fragments d'intérêt de tout autre fragment (non digéré ou non désiré). Elle consiste à faire migrer les produits de digestion sur gel d'agarose "low melt" sous une tension de 100V. Le gel a été préparé en fondant 0.7g de la poudre de gel "low melt" dans 100 mL de TBE1X (Tris-base 10.8g, Acide Boric 5.5g, 0.5M EDTA 4mL et Eau distillée pour 1L), additionné de 3.7µl de bromure d'éthidium # E1510 de la compagnie "Sigma-Aldrich" après qu'il soit attiédi. Pour notre expérience, le gel préalablement coulé a été refroidit à 4°C et immergé dans du TBE1X froid. Ceci pour éviter qu'il s'échauffe et se fonde sous l'effet de la tension électrique au cours de la migration. La totalité (20µl) du produit de digestion de chaque échantillon (plasmide ou insert) additionnée de 3.3µl du TEC a été déposée dans de différents puits du gel d'agarose "low melt". 5µl du marqueur de poids moléculaire 10Kb de la compagnie "Biobasic" additionné de 1µl du TEC a été déposé dans un autre puits du gel. Un courant électrique de 100V a été ensuite appliqué au système d'électrophorèse pendant environ 50min. A la fin de la migration, le gel a été visualisé à la lumière UV, et les bandes représentant les fragments d'intérêt (plasmide digéré ou insert digéré) ont été rapidement et finement coupées à l'aide d'un exacto. Ces bandes ont été ensuite conservées séparément, additionnées chacune de 200µl de Tris-HCl pH8.0, 20mM dans des tubes eppendorf puis gardées à 4°C jusqu'à utilisation.

### **d. Ligation du vecteur digéré (pCB70) avec l'insert digéré (*elyC-his*).**

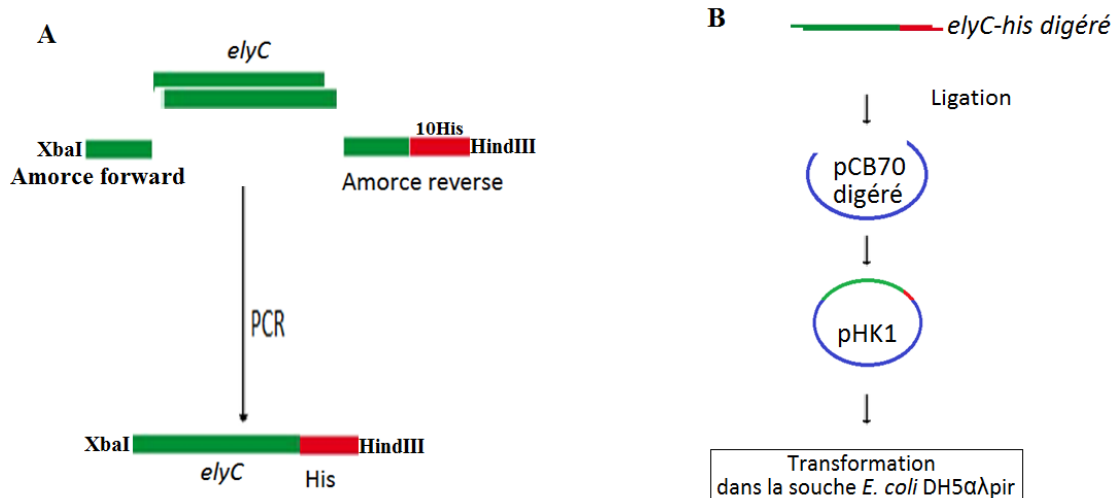
C'est le procédé par lequel on colle l'insert (un gène ou un fragment d'ADN d'intérêt) dans un vecteur compatible digéré. Les bandes purifiées ont été sorties du 4°C et incubées à 60°C au bain-marie afin d'obtenir la liquéfaction complète de l'agarose.

Habituellement c'est le ratio 4:1 (insert : vecteur) qui est utilisé pour la réaction de ligation. Mais dans le cas de notre expérience, l'échantillon d'insert digéré était nettement plus concentré que celui du vecteur digéré. Nous avons plutôt utilisé le ratio 1: 2.3 qui correspondait suivant les concentrations de nos échantillons à 15µl de l'insert contre 35µl du vecteur pour la réaction de ligation. Nous avons ensuite ajouté à ce mélange 39µl d'eau distillée, 10µl du tampon de ligase 10X et 1µl de ligase T4 (le tampon et l'enzyme de ligation ont été achetés chez "New England Biolabs"). Pour le témoin négatif, on a préparé la même réaction en substituant l'insert au Tris-HCl pH8, 20mM. Les réactions ont été incubées à la température pièce pendant 24H. Les produits de ligation ont par la suite été utilisés pour transformer des cellules DH5α(λpir) compétentes.

#### **e. Transformation par choc thermique du produit de ligation dans les cellules compétentes DH5α(λpir)**

La transformation est une technique utilisée en génétique bactérienne pour introduire de l'ADN à l'intérieur d'une cellule bactérienne. Pour transformer les produits de la ligation, nous avons d'abord rendu les cellules DH5α(λpir) compétentes par la technique utilisant le CaCl<sub>2</sub>. Nous avons préparé une culture liquide en suspendant une colonie de *E. coli* DH5α(λpir) dans 5mL que nous avons incubée à 37°C sous rotation à 250tr/min pendant toute la nuit. Cette culture a été ensuite diluée au 1:200 (0.5mL de culture dans 99.5mL LB 0.5% NaCl) et incubée à 37°C sous agitation à 250tr/min jusqu'à DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0.3 et 0.6. La culture a été par la suite centrifugée à 4°C à 2451xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 10min. Le culot cellulaire recueilli a été suspendu dans 50mL d'une solution froide de CaCl<sub>2</sub> 0.1M et incubé sur glace pendant 3H. La suspension a été ensuite centrifugée à 4°C à 2451xg

pendant 10min à 4°C et le culot recueilli a été remis en suspension dans 3mL d'une solution froide de CaCl<sub>2</sub> 0.1M, 15% glycérol. Les cellules sont ainsi prêtes pour être transformées. A 40µl de cellules compétentes, nous avons ajouté 100µl du produit de la ligation (vecteur + insert ou vecteur seul), ou 1µl de l'ADN plasmidique pCB70 purifié pour contrôle d'efficacité des cellules compétentes. Le mélange (cellules + produit de ligation) a été ensuite incubé sur glace pendant 30min, puis à 40°C pendant 5min pour le choc thermique. Après le choc thermique, les mélanges ont été à nouveau incubés sur glace pendant 2min. On a ajouté par la suite 1mL du milieu SOC à chaque mélange, puis ils ont été incubés à 37°C pendant 1H sous rotation à 250tr/min. 100µl du total de chaque culture ont été d'abord étalés sur le milieu LBamp50 (LB agar contenant 50µg/mL d'ampicilline) à l'aide des billes en verre stériles. Le reste de chaque mélange a été centrifugé à 14825xg avec la centrifugeuse Biofuge de "Heraeus" pendant 2min et le culot obtenu a été remis en suspension dans 100µl du surnageant puis étalé de la même façon sur le milieu LBamp50. Les milieux ont été ensuite incubés à 37°C pendant 24H.



**Figure 15:** Illustration des différentes étapes de la construction du plasmide pHK1. (A) : construction de la fusion *elyC-his*. (B) : clonage d'*elyC-his* dans le plasmide pCB70.

#### f. Purification sur LBamp50 des clones ou des transformants obtenus

Cette étape de purification a été importante et a permis d'éliminer les faux transformants, c'est-à-dire les souches bactériennes qui ne comportent pas le plasmide cloné donc pas la cassette de résistance à l'ampicilline, mais qui ont poussé sur le milieu LBamp50 de sélection. Ainsi, au lendemain de la transformation, deux des transformants de la culture (Vecteur + insert) obtenus ont été sélectionnés, repiqués sur le milieu LBamp50 puis incubés à 37°C pendant 24H. La croissance normale de ces derniers, 24H après leur repiquage les confirme pour de vrais transformants, phénotypiquement.

#### g. Vérification des transformants ou des clones

Afin de vérifier si l'insertion de notre fusion *elyC-his* a été bien faite dans le vecteur pCB70, nous avons extrait et digéré les plasmides contenus dans les transformants. On a ainsi sélectionné au hasard deux transformants purifiés et les plasmides qu'ils contiennent ont été extraits avec le kit GeneJET#K0503 de la compagnie

"Fermentas" et observés sur gel d'agarose. Chaque transformant a été inoculé dans 5mL de LBamp50 et incubé à 37°C sous rotation à 250tr/min pendant toute une nuit. Les cultures ont été centrifugées à 14825xg avec la centrifugeuse Biofuge de "Heraeus" pendant 2min. Chaque culot a été suspendu dans 250µl de la solution de resuspension et bien mélangé. On a ajouté à chaque suspension 250µl de la solution de lyse, qu'on a mélangé délicatement par retournement 4 à 6 fois puis incubé à température pièce pendant 5min. On a ajouté ensuite à chaque suspension 350µl de la solution de neutralisation, qu'on a mélangé immédiatement par retournement 4 à 6 fois. Les mélanges ont été ensuite centrifugés à 14825xg pendant 5min et chaque surnageant a été transféré sur colonne puis centrifugé à nouveau pendant 1min. Chaque colonne a été lavée deux fois avec 500µl de solution de lavage à chaque lavage. Une dernière centrifugation de 1min a été faite et les plasmides de chaque colonne ont été élués avec 30µl d'eau distillée.

Les plasmides extraits ont été digérés avec les mêmes enzymes XbaI et HindIII. Les produits de digestion ont été ensuite observés sur gel d'agarose 1% (poudre d'agarose 1g, TBE1X 100mL). La taille du vecteur parental est de 6090pb et les tailles attendues sont 3487pb, 1567pb, 915pb pour pCB70 digéré puis de 3487pb et 815pb pour ma construction qui a été nommée pHK1 (p pour plasmide, HK pour les initiales de Hugues Kousse mou et 1 pour désigner le premier plasmide construit).

#### **h. Séquençage de pHK1 et conservation de DH5α(λpir)/pHK1**

Le séquençage est la technique qui permet de déterminer l'ordre de succession des nucléotides d'un ADN. Il est utilisé pour détecter d'éventuelles erreurs de succession de nucléotides introduites (mutations) dans un fragment d'ADN lors de sa construction

par PCR. Dans le cas de notre projet, le plasmide pHK1 construit a été extrait suivant la même procédure qu'en section "vérification des transformants" et envoyés à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (IRCM) pour le séquençage. Après confirmation d'absence de mutation dans pHK1, une colonie de la souche DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir)/pHK1 a été inoculée dans 4mL de LBamp50 et incubée à 37°C sous rotation à 250tr/min pendant toute une nuit. On a ensuite ajouté du glycérol stérile à raison de 15% à la culture soit 1.2mL de glycérol 40% pour 2mL de culture. A l'aide de micropipette et des embouts stériles avec filtre, on a transféré 1mL x 2 du mélange culture-glycérol dans deux tubes à congélation préalablement bien étiquetés. Les tubes ont été mis à -80°C pour conservation.

### **2.2.1.2 Construction des plasmides pHK2, 3 et 4, par mutagenèse dirigée**

#### **a. Création des mutants par PCR**

Des variants du plasmide pHK1 ont été construits en substituant individuellement les codons codant pour la sérine en position 4, 33, et 253 de la protéine ElyC par un codon cystéine par mutagenèse dirigée par PCR. Nous avons utilisé le kit "direct mutagenesis" de la compagnie "New England Biolabs". Pour chaque mutant, nous avons désigné sa paire d'amorces en introduisant la mutation désirée dans l'amorce « forward » (tableau 4). La réaction de PCR pour chaque mutation a été préparée, en transférant dans un tube à PCR, 4 $\mu$ l d'eau déionisée, 1 $\mu$ l de template (pHK1 à 47.1ng/ $\mu$ l dilué au 1/10), 0.625 $\mu$ l de la « forward » à 10 $\mu$ M, 0.625 $\mu$ l de la « reverse » à 10 $\mu$ M et 6.25 $\mu$ l de la polymérase « Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix ». La réaction a été amplifiée avec le thermocycleur "Biometra" de la compagnie "Biotech Montréal Inc" suivant le programme ci-après : une phase de dénaturation de 98°C pendant 30 secondes; 25 cycles

de 98°C pendant 10 secondes, 58°C pendant 20 secondes, 72°C pendant 100 secondes et une phase d'extension finale de 72°C pendant 120 secondes. Les ADN linéaires obtenus après la PCR et portant la mutation individuelle au niveau du 4<sup>ième</sup>, 33<sup>ième</sup> et 253<sup>ième</sup> codon, ont été désignés respectivement par NT, B et CT pour pHK2, pHK3 et pHK4. Ils ont été ensuite rendus circulaires et introduits dans la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir) compétente. Les dénominations NT, B et CT désignent respectivement la mutation en N-terminal, dans la boucle et en C-terminal de ElyC.

#### **b. Circularisation et purification des plasmides obtenus**

Cette étape est importante et permet de rendre circulaires les différents produits de PCR qui comportent les mutations. C'est l'enzyme KLD et son tampon inclus dans le kit "direct mutagenesis" de la compagnie "New England Biolabs" qui ont été utilisés. Dans un tube eppendorf, on a introduit 1.5 $\mu$ l d'eau déionisée, 0.5 $\mu$ l de produit PCR (NT ou B ou CT), 2.5 $\mu$ l du tampon de réaction 2X KLD et 0.5 $\mu$ l du mélange d'enzyme KLD. Le tout a été incubé à la température pièce pendant 10min. A la fin de la réaction, chaque produit de circularisation a été purifié afin d'éliminer toute trace d'enzyme, de produit linéaire et de sel qui resterait et qui pourrait affecter l'étape de la transformation. Pour ce faire, on a ajouté 100 $\mu$ l d'eau distillée au volume total de chaque produit de circularisation, qu'on a purifié avec le kit GeneJET#K0503 de la compagnie "Fermentas" à partir de l'étape de lavage du protocole. Chaque ADN plasmidique (produit circularisé) a été ensuite élué avec 30 $\mu$ l d'eau.

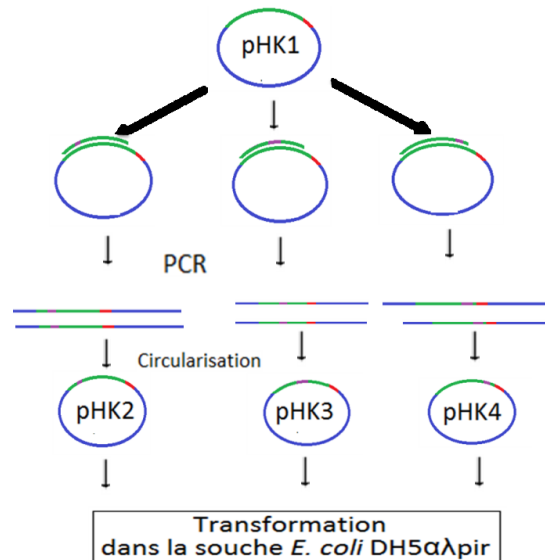


### **c. Transformation des plasmides pHK2, 3 et 4 dans les cellules DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir) électro-compétentes**

Les plasmides pHK2, 3 et 4 tout comme pHK1 possèdent l'origine de réplication  $\gamma$  de R6K qui nécessite la présence de la protéine trans-actin II, codée par le gène *pir*, pour leur réplication. C'est pour cette raison que nous avons choisi de les transformer dans les cellules DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir).

A cause des difficultés d'efficacité de transformation et de croissance rencontrées avec les cellules DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir) compétentes préparées au laboratoire et celles fournies dans le kit de mutagenèse dirigée, nous avons dû préparer des cellules DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir) électrocompétentes dans lesquelles nous avons électroporé les plasmides pHK2, pHK2 et pHK4. Pour ce faire, une colonie de *E. coli* DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir) a été suspendue dans 5mL de LB et incubée à 37°C sous rotation à 250tr/min pendant toute la nuit. La culture obtenue a été ensuite diluée au 1:300 dans du LB stérile et incubée à 37°C sous agitation à 250tr/min jusqu'à DO<sub>600nm</sub> de 0.4. La culture a été ensuite incubée sur glace pendant 1H et centrifugée à 3829xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" à 4°C pendant 15min. Le culot cellulaire recueilli a été suspendu dans 70mL de glycérol 10% froid et incubé sur glace pendant 30min. Cette suspension a été à nouveau centrifugée à 3829xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" à 4°C pendant 15min et le culot recueilli a été remis en suspension dans 10mL de glycérol 10% froid. La nouvelle suspension obtenue a été à nouveau incubée sur glace pendant 30min et centrifugée par la suite à 3829xg à 4°C pendant 15min. Le culot obtenu après cette dernière centrifugation a été suspendu pour une dernière fois délicatement dans 1mL de glycérol 10% froid. Les cellules sont ainsi prêtes pour l'électroporation.

Dans un tube eppendorf déposé sur glace, on a transféré 25µl du plasmide circularisé (pHK2 ou pHK3 ou pHK4), 40µl de cellules d'*E. coli* DH5α(λpir) électrocompétentes et le tout incubé sur glace pendant 5min. Le mélange a été ensuite transféré délicatement dans une cuvette à électroporation froide et soumis à une tension électrique de 1.8KV à l'aide du Micropulser (N° série : 411BR2712) de la compagnie "Bio Rad". Pour vérifier l'efficacité des cellules compétentes, un témoin a été réalisé en électroporant 40µl de cellules additionnées de 1µl de pHK1 à 47ng/µl. Un témoin négatif a été également réalisé en électroporant 40µl de cellules seules. 1mL du milieu SOC préalablement incubé à 37°C a été ajouté à chaque mélange immédiatement après son électroporation, puis les mélanges sont incubés à 37°C pendant 1H sous rotation à 250tr/min. 100µl du total de chaque culture ont été directement inoculés sur le milieu LBamp50 et incubés à 37°C pendant toute la nuit.



**Figure 16:** Illustration de la construction des variantes (pHK2, pHK3 et pHK4) de pHK1 par mutagenèse dirigée. La couleur verte représente le gène d'*elyC*, la couleur rouge

représente l'étiquette histidine, la couleur violette représente la mutation introduite et le bleu le squelette du plasmide ayant servi pour la construction de pHK1.

### **2.2.1.3 Intégration des pHK dans le génome de la souche TB28**

Les plasmides pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4 ont été intégrés dans le génome de la souche TB28 avec la technique du système CRIM (Haldimann & Wanner, 2001) après avoir été transformés dans la souche TB28/pTB102 par la technique de transformation de "Chung" (Chung *et al.*, 1989).

Le système CRIM est une technique de génétique bactérienne qui permet d'intégrer ou de retirer un plasmide dans le génome d'une cellule bactérienne de *E. coli*. Il consiste à utiliser deux plasmides, dont le premier appelé CRIM est le plasmide à intégrer et le second appelé auxiliaire ou "helper" facilite l'intégration, puis une souche hôte *pir*<sup>-</sup>. Le plasmide CRIM doit être un plasmide qui a une origine de répllication R6K, un site d'attachement phagique, un site multiclonage et une cassette de résistance. Le plasmide auxiliaire est un plasmide thermolabile qui a une cassette de résistance et qui porte sous le contrôle d'un répresseur thermosensible, le gène qui code pour l'intégrase. La souche hôte *pir*<sup>-</sup> est une souche qui ne permet pas la répllication du plasmide CRIM R6K et qui doit avoir un site d'attachement bactérien compatible au site d'attachement du plasmide CRIM. Dans le cas de notre travail, les plasmides CRIM sont pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4, le plasmide auxiliaire est pCB102 qui porte une résistance au chloramphénicol et la souche *pir*<sup>-</sup> est la souche TB28.

#### **a. Préparation des cellules TB28/pTB102 compétentes**

Pour la préparation de TB28/pTB102 compétente, nous avons utilisé TB28 qui avait déjà été rendue compétente et transformée avec pTB102 par la technique de

"Chung" (Chung *et al.*, 1989). Ainsi une colonie de TB28/pTB102 a été suspendue dans 5mL de LBcam10 (LB contenant 10µg/mL de chloramphénicol pour le maintien du plasmide pTB102) et incubée à 30°C sous rotation à 250tr/min pendant toute la nuit. La culture obtenue a été ensuite diluée au 1:100 dans du LBcam10 stérile et incubée à 30°C sous agitation à 250tr/min avec l'incubateur "innova 4230" de la compagnie "New Brunswick Scientific" jusqu'à DO<sub>600nm</sub> de 0.25 puis incubée à 42°C pendant 15min pour inactiver le répresseur ce qui va induire l'expression de l'intégrase. La culture a été par la suite incubée sur glace pendant 1H. Le culot cellulaire a été recueilli par centrifugation à 2451xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" à 4°C pendant 15min et suspendu dans 5mL du milieu TBS (LB 90mL, 1M MgCl<sub>2</sub> 5mL, DMSO 5mL, PEG 10g) stérile et froid. Les cellules de la suspension ainsi obtenue sont prêtes pour la transformation. Des aliquots de 100µl ont été conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

#### **b. Transformation des pHK dans TB28/pTB102 compétentes**

Dans un tube eppendorf froid, nous avons transféré 100µl de cellules TB28/pTB102 compétentes et 2µl du plasmide (pHK1, pHK2, pHK3 ou pHK4) qu'on a incubé sur glace pendant 30min. les mélanges (cellules + plasmide) ont été ensuite incubés à 37°C pendant 5min puis sur glace pendant 2min. A chaque mélange (cellules + plasmide), nous avons ajouté 1mL de SOC et tous les mélanges ont été incubés à 30°C pendant 1H sous rotation à 250tr/min. Un volume de 100µl du total de chaque culture a été étalé sur le milieu LBamp15camp10 à l'aide des billes en verre stériles et incubé à 30°C pendant une nuit. L'ampicilline et le chloramphénicol contenus dans le LB sont pour la sélection des transformants qui contiennent à la fois les plasmides pHK et

pTB102 puis la température de 30°C se justifie par rapport au plasmide pTB102 qui est thermolabile pendant une longue période d'incubation.

Les transformants obtenus ont été ensuite débarrassés du plasmide pTB102 en les repiquant sur LB à 37°C pendant 24H. Ils ont ensuite été chacun repiqués à la fois sur LBamp15 à 37°C et sur LBcam10 à 30°C. La présence de colonies sur LBamp15 à 37°C, et leur absence sur LBcam10 à 30°C confirment la perte totale du plasmide pTB102 et l'intégration des pHK. Le milieu LBamp15 a été utilisé pour faciliter la sélection de tous les intégrants y compris ceux comportant une intégration mono copie. Les intégrants confirmés ont été désignés par TB28(attHKHK1), TB28(attHKHK2), TB28(attHKHK3) et TB28(attHKHK4) respectivement pour pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4.

### **c. Vérification de l'intégration mono copie des pHK**

Les intégrations ont été vérifiées par PCR tel que décrit par Haldimann et Wanner (Haldimann & Wanner, 2001). Dans un tube à PCR, on a introduit 17.35µl d'eau distillée, 0.75µl de P1attHK à 10µM, 0.75µl de P2 à 10µM, 0.75µl de P3 à 10µM, 0.75µl de P4attHK à 10µM, 0.5µl du mélange déoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP, à 10mM chacun), 2.5µl du tampon PCR 10X, 1.25µl de l'ADN polymérase REDTaq de la compagnie "Sigma-Aldrich" et 0.4µl de suspension bactérienne (une colonie d'intégrants suspendue dans 100µl d'eau déionisée) pour chaque intégrant. Les souches TB28 (attHKTB98) et le WT ont été respectivement utilisées comme témoin positif et négatif. La réaction a été amplifiée avec le thermocycleur "Biometra" de la compagnie "Biotech Montréal" suivant le programme ci-après : une phase de dénaturation de 98°C pendant 180 secondes; 30 cycles de 94°C pendant 60secondes, 59°C pendant 120 secondes, 72°C pendant 180 secondes et une phase d'extension finale de 72°C pendant

120 secondes. Pour vérifier l'amplification, 5µl du produit PCR obtenu, additionné de 1µl du tampon d'échantillon TEC a été migré sur gel d'agarose 1% à 120V pendant 1H. Le gel a été ensuite visualisé avec le transilluminateur#981651 de la compagnie "Alpha Innotech". Pour une intégration mono copie, les tailles attendues sont 824pb et 289pb pour chaque intégrant et le témoin positif, puis de 740pb pour le témoin négatif sans intégration (Haldimann & Wanner, 2001).

Une fois l'intégration mono copie confirmée, les plasmides ont été transférés du génome des intégrants au génome de la souche EM9( $\Delta$ elyC) par transduction en utilisant le phage P1<sub>vir</sub> et en faisant la sélection sur le milieu LBamp15 à 37°C.

#### **2.2.1.4 Transfert des pHK dans le génome de la souche EM9**

Les plasmides pHK intégrés dans le génome de TB28 ont été transférés dans la souche EM9 par transduction et les transductants obtenus ont été sélectionnés sur LBamp15. Pour la transduction, nous avons d'abord infecté chacune des souches donneuses TB28(attHKHK1), TB28(attHKHK2), TB28(attHKHK3), TB28(attHKHK4) avec le phage P1<sub>vir</sub>. Pour ce faire, nous avons préparé une suspension bactérienne pour chaque souche donneuse en suspendant quelques colonies dans 1mL de LB-5mM $\text{CaCl}_2$ . Une série de dilutions de lysat du phage, allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  a été également préparée avec du LB-5mM $\text{CaCl}_2$ . Nous avons ensuite mélangé pour chaque souche, 100µl de sa suspension bactérienne à 100µl de chaque dilution phagique. Les mélanges obtenus ont été par la suite incubés à 37°C au bain marie pendant 20min. Chaque mélange a été ajouté à 4mL du milieu Agar-TOP 5mM $\text{CaCl}_2$ , le tout vortexé rapidement et inoculé sur LB en pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, la couche d'agar-TOP de la plus grande dilution phagique pour chaque souche présentant

une surface de lyse confluyente a été raclée et transférée dans 15mL de LB stérile contenu dans un tube conique. On y a ajouté 10 gouttes de chloroforme et homogénéisé à l'aide du vortex pendant 30sec. Le mélange a été ensuite incubé à 37°C pendant 1H et centrifugé à 7728xg avec le rotor JA-20 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 15min à 4°C. Le surnageant recueilli représente pour chaque souche donneuse TB28(attHKHK1) ou TB28(attHKHK2) ou TB28(attHKHK3) ou TB28(attHKHK4) son lysat phagique et a été gardé à 4°C.

Chaque lysat infecté a été utilisé pour infecter la souche receveuse EM9. Une suspension bactérienne de la souche receveuse a été préparée en suspendant quelques colonies de EM9 dans 1mL du tampon MC stérile. Le lysat phagique de chaque souche donneuse a été dilué à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , et  $10^{-4}$  avec du LB-5mM $\text{CaCl}_2$  stérile. Un volume de 100 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne de EM9 a été mélangé avec 100 $\mu\text{l}$  de chaque dilution du lysat phagique des souches donneuses à partir de la dilution  $10^{-2}$ . Les mélanges obtenus ont été incubés à 37°C au bain marie sans agitation pendant 20min. A chaque mélange, 1mL de LB-50mMNaCitrates a été ajouté et le tout incubé à 37°C pendant 1H sous rotation à 250tr/min. Après la centrifugation de chaque mélange à 14825xg avec la centrifugeuse Biofuge de "Heraeus" pendant 3min, le culot a été remis en suspension dans 100 $\mu\text{l}$  du surnageant et inoculé sur LBamp15. Les milieux ont été placés à 37°C pour incubation pendant 24H. Les transductants obtenus ont été purifiés et vérifiés phénotypiquement par leur croissance sur LBamp15 à 37°C. Les souches ainsi construites sont désignées par EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3) et EM9(attHKHK4).

## **2.2.2 Fusion génomique *elyC-his-kan* par recombinaison homologue $\lambda$ red**

Afin d'avoir une souche exprimant ElyC-His comme seule source d'ElyC sous le contrôle du promoteur natif du gène *elyC*, nous avons construit la fusion *CTelyC-his-kan* par PCR, que nous avons par la suite intégrée directement dans le génome de la souche TB10 en 3' du gène *elyC* par la technique de recombinaison homologue appelée  $\lambda$  red (Yu *et al.*, 2000). La technique de recombinaison homologue du système  $\lambda$  red consiste à intégrer de l'ADN linéaire dans le génome de *E. coli*. Elle utilise une souche qui porte dans son génome les trois gènes phagiques *exo*, *bêta* et *gam* qui fonctionnent ensemble pour intégrer dans le génome le fragment électroporé. Les gènes sont sous le contrôle d'un répresseur thermosensible. Après vérification de l'intégration par PCR et par séquençage, la région *P<sub>elyC</sub>::elyC-his-kan* du génome de la souche TB10 ayant reçu la fusion *CTelyC-his-kan*, a été transférée dans la souche EM9 par transduction avec le phage P1<sub>vir</sub>. Cette souche construite a été nommée HK1, conservée à -80°C et utilisée pour les essais de complémentation, d'isolement des partenaires protéiques de ElyC et d'étude de sensibilité au chromate de potassium.

### **2.2.2.1 Construction de la séquence *CTelyC-his-Kan* par PCR**

La fusion *CTelyC-his-Kan* a été construite en amplifiant le gène codant pour la cassette de résistance à la kanamycine contenu dans le plasmide pKD13 avec les amorces CTelyC-His10For et CTelyC-His10Rev. L'amorce CTelyC-His10For comporte 73 bases correspondant à de 5'→3' 40nt du gène *elyC*, 10 codons de histidine, le codon stop du gène *elyC* et 19nt en 5' du promoteur du gène de résistance à la kanamycine sur le plasmide pKD13. Les 40nt du gène *elyC* ont été pris avant son codon stop. L'amorce



CTelyC-HisRev comporte 44 bases correspondant à l'inversée de 5'→3' à 24nt de la fin du gène codant pour la résistance à la kanamycine y compris le codon stop, et 20 nt après le codon stop du gène *elyC*. Nous avons inclus le gène codant pour la résistance à la kanamycine pour permettre la sélection de la souche à construire sur un milieu contenant la kanamycine. Dans un tube à PCR, on a introduit 36.9µl d'eau distillée, 1.5µl de l'amorce CTelyC-H10For à 10µM, 1.5µl de l'amorce CTelyC-HisRev à 10µM, 1.6µl du plasmide pKD13 à 62.1ng/µl dilué au 1/10, 1µl du mélange de deoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP, à 10 mM chacun), 5µl du tampon PCR 10X et 2.5µl de l'ADN polymérase RedTaq. La réaction a été amplifiée avec le thermocycleur "Biometra" de la compagnie Montréal Biotech Inc, suivant le programme ci-après: une phase de dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes, 30 cycles de 94°C pendant 60 secondes, 50°C pendant 60 secondes, 72°C pendant 120 secondes et une phase d'extension finale à 72°C pendant 120 secondes. Une migration sur gel d'agarose a été réalisée pour vérifier l'amplification (5µl du produit PCR obtenu, additionné de 1µl du TEC a été migré sur gel d'agarose 1% à 120V pendant 1H, l'ADN a été observé avec le transilluminateur). Après confirmation, le produit PCR a été purifié avec le kit "GeneJET PCR Purification #K0702" de la compagnie "Fermentas".

#### **2.2.2.2 Recombinaison homologue de la séquence CTelyC-his-kan directement dans le génome**

Pour fusionner l'étiquette histidine en 3'du gène *elyC* dans le génome par la technique de recombinaison homologue du système  $\lambda$  red (Yu *et al.*, 2000), nous avons électroporé le produit PCR *CTelyC-his-Kan* purifié dans la souche TB10. TB10 est une souche d'*E. coli* contenant dans son génome les trois gènes *exo*, *bêta* et *gam* du prophage

$\lambda$  qui sont sous le contrôle d'un répresseur thermosensible. Les cellules de la souche TB10 ont été d'abord rendues électrocompétentes. Pour ce faire, une colonie de la souche TB10 a été suspendue dans 5mL de LB et incubée à 30°C sous rotation à 250tr/min pendant toute la nuit. La culture obtenue a été ensuite diluée au 1:300 dans du LB stérile et incubée à 30°C sous rotation à 250tr/min jusqu'à  $DO_{600nm}$  de 0.25. Elle a été ensuite incubée à 42°C au bain marie sans agitation pendant 15min. Cette phase d'incubation à 42°C permet d'inactiver le répresseur et par conséquent induit l'expression des gènes *exo*, *bêta* et *gam* qui vont réaliser la recombinaison. La culture a été ensuite incubée sur glace pendant 1H et centrifugée à 2451xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" à 4°C pendant 15min. Le culot cellulaire recueilli a été suspendu délicatement dans 70mL de glycérol 10% froid et incubé sur glace pendant 30min. Cette suspension a été à nouveau centrifugée à 2451xg à 4°C pendant 15min et le culot recueilli a été remis en suspension dans 10mL de glycérol 10% froid. La nouvelle suspension obtenue a été incubée de nouveau sur glace pendant 30min et centrifugée par la suite à 2451xg à 4°C pendant 15min. Le nouveau culot a été remis en suspension pour une dernière fois délicatement dans 1mL de glycérol 10% froid. Les cellules sont ainsi prêtes pour l'électroporation.

#### **a. La réaction de l'électroporation**

Pour la réaction de l'électroporation, 25 $\mu$ l de produit PCR purifié et 40 $\mu$ l de cellules TB10 électrocompétentes ont été transférés dans un tube eppendorf froid. Le mélange a été incubé sur glace pendant 5min. Il a été ensuite transféré délicatement sans formation de bulle dans une cuvette à électroporation froide et soumis à une tension électrique de 1.8KV à l'aide du micropulser (N° série : 411BR2712) de la compagnie

"Bio Rad". Un témoin négatif a été également réalisé en électroporant 40µl des cellules TB10 électrocompétente seules. A chaque produit électroporé, nous avons ajouté immédiatement 1mL du milieu SOC préalablement incubé à 37°C. Le tout a été ensuite incubé à 30°C pendant 1H sous agitation à 250tr/min. Sur des boîtes de pétri LBkan10, 100µl du total de chaque culture a été inoculé et incubé à 30°C pendant 2 jours. Cette incubation des cultures à 30°C après l'électroporation est due au fait que l'induction des gènes phagiques *exo*, *bêta* et *gam* exposés à une température de 37°C ou plus pour un temps prolongé est toxique aux cellules bactériennes qui les hébergent (Yu *et al.*, 2000).

#### **b. Purification des transformants obtenus et vérification de la fusion**

Les transformants obtenus ont été purifiés par leur repiquage sur LBkan10 à 30°C pendant 24H, deux fois successives. La région *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* du génome des transformants purifiés a été amplifiée avec les amorces ForSeqelyC-his-kan (30 nucléotides) et RevSeqelyC-his-kan (26 nucléotides). L'amorce ForSeqelyC-his-kan hybride dans le génome de la souche TB10 *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* à 400nt en amont du gène *elyC* et l'amorce RevSeqelyC-his-kan hybride à 100nt en aval de *elyC* donc dans le gène qui code pour la résistance à la kanamycine. Le produit PCR obtenu a été purifié et envoyé au séquençage à l'IRCM pour la vérification de la construction. La souche transformante ainsi obtenue est nommée HK1 (HK pour mes initiales et 1 pour désigner la première souche construite).

#### **2.2.2.3. Construction de la souche HK2 ( $\Delta$ *elyC P<sub>elyC</sub>::elyC-his*)**

La région *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* du génome de HK1 a été transférée dans la souche EM9 par transduction et les transductants ont été sélectionnés sur LBkan10. Pour la transduction, nous avons d'abord infecté la souche donneuse HK1 avec le phage P1<sub>vir</sub>.

Pour ce faire, nous avons préparé une suspension bactérienne en suspendant quelques colonies de la souche HK1 dans 1mL de LB-5mM $\text{CaCl}_2$ . Une série de dilutions de lysat du phagique, allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  a été également préparée dans du LB-5mM $\text{CaCl}_2$ . Nous avons ensuite ajouté 100 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne à 100 $\mu\text{l}$  de chaque dilution phagique. Les mélanges obtenus ont été incubés à 37°C au bain marie pendant 20min. Chaque mélange a été ensuite ajouté à 4mL du milieu Agar-TOP 5mM $\text{CaCl}_2$ , le tout vortexé rapidement et inoculé sur LB en pétri. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant toute la nuit. Le lendemain, la couche d'agar-TOP de la plus grande dilution présentant une surface de lyse confluyente a été raclée et transférée dans 15mL de LB stérile contenu dans un tube conique. On y a ajouté 10 gouttes de chloroforme et homogénéisé à l'aide du vortex pendant 30sec. Le mélange a été ensuite incubé à 37°C pendant 1H et centrifugé à 7728xg avec le rotor JA-20 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 15min à 4°C. Le surnageant séparé du culot représente le lysat de la souche HK1 infectée par le phage P1<sub>vir</sub> et a été gardé à 4°C.

Ce lysat de HK1 a été utilisé pour infecter la souche receveuse EM9. Une suspension bactérienne de la souche receveuse a été préparée par suspension de quelques colonies de EM9 dans 1mL du tampon MC stérile. Le lysat de HK1 a été d'abord dilué à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , et  $10^{-4}$  avec du LB5mM $\text{CaCl}_2$  stérile. Nous avons ensuite ajouté 100 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne à 100 $\mu\text{l}$  de chaque dilution du lysat de HK1 à partir de la dilution  $10^{-2}$ . Les mélanges obtenus ont été incubés à 37°C au bain marie sans agitation pendant 20min. A chaque mélange, 1mL de LB-50mMNaCitrates a été ajouté et le tout incubé à 37°C pendant 1H sous agitation à 250tr/min. Après la centrifugation de chaque mélange à 14825xg avec la centrifugeuse Biofuge de "Heraeus" pendant 3min, le culot a

été remis en suspension dans 100µl du surnageant et inoculé sur LBkan10. Les milieux ont été incubés à 37°C pendant 24H. La souche ainsi construite a été nommée HK2 (*ΔelyC P<sub>elyC</sub>::elyC-his*).

### **2.2.3 Construction des souches qui expriment DUF218-His cytoplasmique et périplasmique**

Pour disposer de deux souches, l'une exprimant le domaine DUF218 en C-terminal de ElyC dans le cytoplasme et l'autre dans le périplasma, nous avons construit respectivement les fusions *duf218-his* et *ssdsbA-duf218-his* sous le contrôle du promoteur *P<sub>lac</sub>*. La séquence signal de DsbA codée par *ssdsbA* va diriger le domaine DUF218 au périplasma par la machinerie Sec. Les plasmides construits ont été intégrés dans le génome de la souche TB28 par le système CRIM puis transférés dans le génome de la souche EM9 par transduction avec le phage P1<sub>vir</sub>.

#### **2.2.3.1 Construction des plasmides pLA1 et pLA2**

##### **a. Amplification des fusions *duf218-his* avec et sans codon Start**

Les fusions *duf218-his* avec et sans codon Start ont été obtenues en amplifiant la séquence codant pour le domaine DUF218 de ElyC fusionné à une étiquette histidine contenue dans le plasmide pHK1 avec respectivement les couples d'amorces (XbaI-RBS-Start-Duf218 et YcbC-His10-HindIII) et (BamHI-Duf218 et YcbC-His10-HindIII). L'amorce XbaI-RBS-Start-Duf218 est une extension de 55 bases correspondant de 5'→3' à 4 bases quelconques, à la séquence du site de restriction de l'enzyme XbaI, à la séquence RBS, au codon Start de *elyC* et aux 24 bases du début de *duf218*. L'amorce BamHI-Duf218 est une extension de 34 bases correspondant de 5'→3' à 4 bases

quelconques, à la séquence du site de restriction de l'enzyme BamHI et aux 24 bases du début de *duf218* sans codon Start. Elles représentent les amorces « forward » et s'hybrident au début du domaine *duf218* du gène *elyC* en ajoutant, ou non, un codon Start. L'amorce YcbC-His10-HindIII s'apparie à la fin du gène *elyC* et aux codons histidine en ajoutant un site de restriction HindIII. Cette amorce a été utilisée pour la construction de pHK1 (voir section 2.2.1.1).

Dans un tube à PCR, on a introduit 37.5µl d'eau distillée, 1.5µl de XbaI-RBS-Start-Duf218 ou de BamHI-Duf218 à 10µM, 1.5µl de YcbC-His10-HindIII à 10µM, 1µl du plasmide pHK1 à 95.9ng/µl dilué au 1/10, 1 µl du mélange de déoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP, à 10mM chacun), 5µl du tampon PCR 10X et 2.5µl de l'ADN polymérase RedTaq de la compagnie "Sigma-Aldrich". La réaction a été amplifiée avec le thermocycleur "Biometra" de la compagnie " Biotech Montréal" suivant le programme ci-après : une phase de dénaturation de 94°C pendant 180 secondes; 30 cycles de 94°C pendant 60secondes, 54°C pendant 120 secondes, 72°C pendant 180 secondes et une phase d'extension finale de 72°C pendant 120 secondes. Pour vérifier l'amplification, 10µl du produit PCR de chaque fusion, additionné de 4µl du tampon d'échantillon TEC a été migré sur gel d'agarose 1% à 115V pendant 1H. Le gel a été ensuite visualisé avec le transilluminateur # 981651 de la compagnie "Alpha Innotech". Une fois l'amplification confirmée, les produits PCR ont été purifiés avec le kit "GeneJET PCR Purification #K0702" de la compagnie "Fermentas". Les fusions *duf218-his* avec et sans codon Start ainsi purifiées ont été clonées respectivement dans les plasmides CRIM pCB70 et pTB305 sous le promoteur P<sub>lac</sub>. Ces plasmides CRIM ont l'origine de répllication R6K, un site d'attachement phagique "attHK", une cassette de

résistance à l'ampicilline et le promoteur  $P_{lac}$ . En clonant la fusion *duf218-his* avec un codon Start dans pCB70, le DUF218-HIS pourra être produit dans le cytoplasme. En clonant *duf218-his* sans codon Start dans pTB305 contenant déjà la séquence *ssdsbA* sous le promoteur  $P_{lac}$ , la fusion  $P_{lac}::ssdsbA-duf218-his$  sera générée et DUF218-his sera exporté dans le périplasme.

#### **b. Digestion des vecteurs pCB70, pTB35 et des inserts *duf218-his* avec et sans codon Start**

Le vecteur pCB70 et l'insert *duf218-his* avec RBS et codon Start ont été chacun digéré avec les enzymes de restriction XbaI et HindIII de la compagnie "New England Biolabs". Le vecteur pTB305 et l'insert *duf218-his* sans codon Start ont été chacun digéré avec les enzymes de restriction BamHI et HindIII de la compagnie "New England Biolabs". C'est une double digestion qui a été réalisée parce que chacun des couples d'enzymes coupe efficacement dans un même tampon (NEB2 pour XbaI et HindIII, puis CutSmart pour BamHI et HindIII).

Les réactions de digestion du vecteur XbaI-HindIII ont été réalisées en transférant dans un tube eppendorf 2 $\mu$ l du BSA, 2 $\mu$ l du tampon NEB2, 15 $\mu$ l du pCB70 à 106.5ng/ $\mu$ l ou 5 $\mu$ l du produit PCR purifié *duf218-his* avec codon Start, 0.5 $\mu$ l de l'enzyme HindIII et 0.5 $\mu$ l de l'enzyme XbaI. Au tube contenant l'insert, nous avons rajouté 10 $\mu$ l d'eau distillée. Les réactions de digestion BamHI-HindIII ont été réalisées en transférant dans un tube eppendorf 5 $\mu$ l d'eau distillée, 2 $\mu$ l du BSA, 2 $\mu$ l du tampon cutsmart, 10 $\mu$ l du pTB305 à 98.1ng/ $\mu$ l ou 5 $\mu$ l du produit PCR purifié *duf218-his* sans codon Start, 0.65 $\mu$ l de l'enzyme HindIII et 0.35 $\mu$ l de l'enzyme BamHI. Au tube contenant l'insert, nous avons rajouté 5 $\mu$ l d'eau distillée. Les quatre réactions ont été incubées à 37°C au bain-

marie pendant 3H et les produits obtenus ont été purifiés (voir section 2.2.1.1.c. Purification des produits de digestion sur gel d'agarose low melt 0.7%).

### **c. Ligation des vecteurs pCB70 et pTB305 digérés avec leurs inserts respectifs**

Les bandes purifiées ont été sorties du 4°C et incubées à 60°C au bain-marie afin d'obtenir leur liquéfaction complète. La réaction de ligation a été réalisée en transférant dans un tube eppendorf 17µl du vecteur digéré pCB70 ou pTB305, 33µl de l'insert digéré *duf218-his* avec ou sans codon Start, 39µl d'eau distillée, 10µl du tampon de ligase 10X et 1µl de ligaseT4 (le tampon et l'enzyme de ligation ont été achetés chez New England Biolabs). Pour le témoin négatif, on a préparé la même réaction en substituant l'insert au Tris-HCl pH8, 20mM. Les réactions ont été incubées à température pièce pendant 24H. Les produits de ligation ont par la suite été utilisés pour transformer des cellules DH5( $\alpha$ pir) compétentes. La ligation de pCB70 + *duf218-his* avec le codon Start est pour l'expression de DUF218-his cytoplasmique. Celle de pTB305 + *duf218-his* sans codon Start est pour l'expression de DUF218-his périplasmique.

### **d. Transformation par choc thermique des produits de ligation dans les cellules compétentes DH5 $\alpha$ pir**

Les produits de ligation ont été transformés dans les cellules compétentes DH5( $\alpha$ pir) (voir section 2.2.1.1.e. Transformation par choc thermique du produit de ligation dans les cellules compétentes DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir)). Les transformants obtenus ont été ensuite purifiés et les plasmides ont été extraits puis vérifiés et confirmés par séquençage. Les plasmides qui codent pour *duf218-his* avec codon Start et pour *duf218-his* sans codon Start (*ssdsbA-duf218-his*) sont respectivement nommés pLA1 et pLA2.



### **2.2.3.2 Intégration des plasmides pLA dans le génome de la souche TB28**

Les plasmides pLA1 et pLA2, après la confirmation de leur construction, ont été intégrés dans le génome de la souche TB28 par la technique du système CRIM (voir section 2.2.1.3 Intégration des pHK dans le génome de la souche TB28). Les souches obtenues ont été désignées par TB28(attHKLA1) et TB28(attHKLA2).

### **2.2.3.3 Transfert des pHK dans le génome de la souche EM9**

Les plasmides pLA1 et pLA2 ont été ensuite transférés du génome des souches TB28(attHKLA1) et TB28(attHKLA2) dans le génome de la souche EM9 par la technique de transduction avec le phage P<sub>1</sub><sub>vir</sub> (voir section 2.2.1.4 Transfert des pHK dans le génome de la souche EM9). Les souches obtenues ont été nommées EM9(attHKLA1) et EM9(attHKLA2).

## **2.3. Les essais**

### **2.3.1. Essai de complémentation en milieu liquide et solide**

Afin de s'assurer de la stabilité et du fonctionnement des variants *P<sub>lac</sub>::elyC-his* dans les souches construites et de déterminer la concentration d'IPTG, l'inducteur de *P<sub>lac</sub>*, nécessaire et suffisante pour obtenir une suppression complète du phénotype CPRG+ observé chez le mutant EM9 à 22°C, nous avons fait des tests de complémentation en milieu solide et liquide (voir section 1.1.5.1 : principe de l'essai phénotypique développé).

Dans des puits d'une plaque stérile, nous avons distribué 200µl de LB 0.5% NaCl contenant 20µg/mL de CPRG et différentes concentrations d'IPTG en µM (0, 25, 50, 100, 250, 300, 350, 400, 450 et 500). Nous avons ensuite déposé 10µl de suspension

bactérienne (une colonie suspendue dans 1mL de LB stérile) de chacune des souches EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3), EM9(attHKHK4) et nous les avons incubées à 22°C sous faible agitation pendant 24H. Les souches EM9 et MG1655 ont été respectivement utilisées comme témoin positif et négatif. Le même essai a été fait sur milieu solide mais seulement avec les concentrations suivantes d'IPTG en  $\mu\text{M}$ : 0, 25, 50, 100, 250 et 500.

L'essai de complémentation a été également fait sur la souche HK2. 10 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne (une colonie de HK2 suspendue dans 1mL de LB stérile) a été déposée dans 200 $\mu\text{l}$  de LB contenant 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPRG et incubée à 22°C sous faible agitation pendant 24H. Une boîte de LB agar contenant 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPRG a été également inoculée et incubée à 22°C pendant 24H.

### **2.3.2 Essai de sensibilité de EM9 et des souches construites au chromate de potassium**

Deux cultures de 20mL de LB 0.5% NaCl, contenant pour l'une 0 $\mu\text{M}$  et pour l'autre 0.12 $\mu\text{M}$  de chromate de potassium ont été préparées pour chacune des souches MG1655, EM9, EM9(attHKHK1) et HK2 avec une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de départ de 0.02. Elles ont été ensuite incubées à 22°C sous agitation de 250tr/min et les  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  ont été mesurées à chaque 2H pendant 10H. Les courbes de croissance ont été ensuite tracées afin d'observer la sensibilité des souches par rapport au chromate de potassium et l'effet de complémentation.

### **2.3.3. Essai de détermination de la topologie d'ElyC**

#### **2.3.3.1. Localisation cellulaire de ElyC-his**

##### **a. Préparation des extraits protéiques**

Une colonie de EM9(attHKHK1) prélevée sur milieu solide a été inoculée dans 5mL de LB liquide et incubée à 37°C sous rotation à 250tr/min pendant toute la nuit. La souche WT (MG1655) a été aussi inoculée comme témoin pour l'essai. A partir de ces cultures, de nouvelles cultures de grand volume (1L) avec une DO<sub>600nm</sub> de départ de 0.1 ont été préparées. A la culture de EM9(attHKHK1), on a ajouté de l'IPTG à concentration finale de 50µM pour induire l'expression d'ElyC-his. Les cultures ont été ensuite incubées à 22°C et la croissance a été arrêtée à une DO<sub>600nm</sub> de 0.5. Les cultures ont été mises sur glace pour arrêter la croissance cellulaire et ont été centrifugées à 7505xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 5min à 4°C. Le culot cellulaire de chaque culture a été lavé une fois avec 100mL de "PBS" pH7.4, et suspendu dans 1mL du tampon de lyse (50mM Tris pH8, 1mM PMSF, 1mM EDTA) additionné de lysozyme frais à raison de 100µg/mL. Les suspensions ont été incubées sur glace pendant 30min puis soniquées 5 à 6 cycles de 10sec à l'aide du sonicateur de la compagnie "Sonics & Materials". Un mélange de DNaseI 3U + MgCl<sub>2</sub> à 2mM de concentration finale a été ajouté au lysat protéique obtenu, suivi d'une incubation sur glace pendant 15min. 200µl du lysat total nommé fraction totale (F<sub>to</sub>) a été gardé à -20°C et le reste a été centrifugé à 18000xg à 4°C pendant 1H. Après la centrifugation, le surnageant obtenu représente la fraction des protéines cytoplasmiques et périplasmiques et a été nommé fraction soluble (F<sub>so</sub>) puis conservé rapidement à -20°C. Le culot qui représente la portion des membranes et des débris cellulaires a été suspendu dans 150µl de solution de

solubilisation A (PBS pH7.4, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1M NaCl) et incubé à 4°C sous agitation pendant toute la nuit pour la solubilisation des protéines membranaires. Le lendemain, la suspension a été centrifugée à 10000xg à 4°C pendant 15min. Le surnageant obtenu représente l'extrait solubilisé des protéines membranaires et a été nommé fraction membranaire solubilisée ( $F_{ms}$ ), puis le culot de débris membranaire nommé fraction insoluble ( $F_{ins}$ ). La quantité de protéines contenue dans chaque fraction ( $F_{to}$ ,  $F_{so}$ ,  $F_{ms}$ ,  $F_{ins}$ ) a été dosée par la méthode de Bradford avec le réactif "Coomasie Plus" de la compagnie "Thermo Scientific". Un SDS-PAGE suivi de western anti-his ont été réalisés sur 100µg de protéines de chaque fraction.

#### **b. SDS-PAGE et western anti-his sur les fractions protéiques**

Pour le SDS-PAGE, les échantillons protéiques de chaque fraction ( $F_{to}$ ,  $F_{so}$ ,  $F_{ms}$  ou  $F_{ins}$ ) ont été préparés en transférant dans un tube le volume correspondant à 100µg de protéines totales. On a ensuite ajouté dans chaque tube un volume du TEC3X (187.5mM Tris-HCl pH6.8, 6% SDS, 30% glycérol, 150mM DTT, 0.03% bleu de bromophénol, 2% β-mercaptoéthanol) correspondant au 1/2 du volume d'échantillon protéique contenu dans le tube. Les échantillons protéiques trop concentrés ont été dilués avec de l'eau déionisée avant l'ajout du TEC3X. Les mélanges ainsi préparés ont été ensuite chauffés à 95°C pendant 5min. Ils ont été déposés dans des puits d'un gel polyacrylamide composé de 4% d'acrylamide pour le compactage et 12% acrylamide pour la séparation. Un volume de 10µl du marqueur de poids moléculaire de 175 kDa de la compagnie "New England Biolabs" a été aussi déposé dans un puits du gel. Le système d'électrophorèse a été par la suite soumis à un courant de 150V pendant 15min et ensuite de 200V pendant 45min.

Les protéines séparées par le gel ont été transférées sur une membrane de PVDF sous une tension électrique de 100V pendant 1H30min. La membrane a été incubée dans du TBST-lait 10% (TBST 100mL, lait en poudre 10g) pendant 2H. Ceci pour bloquer les sites de la membrane qui sont restés libres après le transfert des protéines. Elle a été ensuite incubée dans une solution d'anticorps de souris anti-his # 04905318001 de la compagnie "Roche", diluée au 1/10000 dans du TBST-BSA 1%, pendant toute une nuit sous faible agitation à 4°C. La membrane a été lavée 4 fois avec du TBST et incubée dans une solution d'anticorps secondaire d'HRP-chèvre-anti-souris de la compagnie "Jackson Immuno Research Laboratory" #115035068, diluée au 1/40000, à la température pièce pendant 1H sous faible agitation. Elle a été de nouveau lavée 4 fois avec du TBST, incubée dans 1.5mL de "enhanced chemiluminescence" (ECL) "Luminata forte" de la compagnie "Pierce" et exposée au film pendant 1H. Le film a été ensuite développé par un développeur.

### **2.3.3.2 Essai de modification de cystéine**

Cet essai est basé sur la technique de marquage de résidu cystéine introduit en position cytoplasmique ou extra cytoplasmique (périplasmique) chez une protéine membranaire en utilisant deux réactifs sulfhydriles, l'un pouvant traverser la MI et l'autre ne pouvant pas la traverser. Il consiste à traiter dans un premier temps les cellules exprimant la protéine qui contient le résidu cystéine cytoplasmique ou périplasmique, avec le MTSES( réactif sulfhydrile qui ne traverse pas la MI) puis après avec le mPEG ou avec la biotine maléimide (le réactif sulfhydrile qui traverse la MI). L'essai est également réalisé sur des cellules qui expriment la même protéine sans résidu cystéine, comme témoin négatif. Les protéines exprimées par les cellules traitées, sont ensuite extraites,

purifiées et mises en évidence ou révélées par western anti-his ou western à la HRP-streptavidine. Pour le protocole utilisant le MTSES et le mPEG (Pang *et al.*, 2009), le marquage des résidus cystéine est révélé après western anti-his par la présence de signal (bande) à la taille correspondant à la somme de poids de la protéine contenant le résidu cystéine et du poids du mPEG. L'absence du marquage est révélé par la présence de signal (bande) à la taille de la protéine sans résidu cystéine. Pour le protocole utilisant le MTSES et la biotine maléimide (Lehrer *et al.*, 2007), le marquage des résidus cystéine est révélé après western à la streptavidine par la présence de signal (bande) à la taille correspondant au poids de la protéine d'intérêt. L'absence du marquage de résidu cystéine est révélée après western à la streptavidine par l'absence totale de signal ou de bande à la taille de la protéine d'intérêt. Ainsi le marquage du résidu cystéine par le réactif qui traverse la MI (mPEG ou biotine maléimide) après le prétraitement par le MTSES, indique une position cytoplasmique pour le résidu cystéine. En revanche l'absence du marquage du résidu cystéine par le réactif qui traverse la MI (mPEG ou biotine maléimide) après le prétraitement par le MTSES, indique une position périplasmique pour le résidu cystéine.

Dans le cas de notre projet nous avons utilisé les deux protocoles et l'essai a été réalisé sur les variants d'ElyC exprimés par les cellules des souches EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3) et EM9(attHKHK4). La souche EM9(attHKHK1) a été utilisée comme témoin négatif car ElyC natif ne contient pas de cystéine, mais on n'a pas pu avoir un témoin positif.

## **Protocole utilisant le MTSES et le mPEG**

Une culture de 250mL avec une  $DO_{600nm}$  de départ de 0.1 a été préparée pour chaque souche à partir des cultures liquides incubées à 37°C toute une nuit. Nous avons ajouté la solution d'IPTG à une concentration finale de 50 $\mu$ M à chaque culture avant de les incuber à 22°C jusqu'à  $DO_{600nm}$  de 0.5. Chaque culture a été centrifugée à 3.300xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 15min à 4°C. Le culot cellulaire obtenu pour chaque souche a été ensuite lavé 2 fois , avec 2ml de PB frais (Buffer of Phosphate 50mM pH7) à chaque lavage et suspendu dans 500 $\mu$ l du PB frais. Le volume final de la suspension de chaque souche est d'environ 1000 $\mu$ l et est divisé ensuite en deux sous volumes de 500 $\mu$ l pour chaque souche. A chaque premier sous volume, nous avons ajouté 125  $\mu$ l du MTSES à concentration de 10mM et une quantité équivalente d'eau (125 $\mu$ l) au deuxième sous volume. Tous les sous volumes (traités au MTSES ou non) des quatre souches ont été ensuite incubés à température pièce pendant 30min. Nous avons par la suite ajouté 69.44 $\mu$ l d'une solution de L-cystéine pour une concentration finale de 500mM à chaque sous volume ayant reçu le MTSES et les incubé à la température pièce pendant 10min. Ceci est pour la saturation d'éventuel MTSES restant dans le milieu réactionnel. Les sous volumes qui n'avaient pas reçu de MTSES, ont été complétés chacun avec un volume d'eau égal à 69.44 $\mu$ l. Un volume de 3mL de PB frais a été ajouté à chacun des sous volumes. Ils ont été ensuite centrifugés à 3.300xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 15min à 4°C. Les culots obtenus ont été lavés à 4°C avec 4mL du PB frais une première fois et une deuxième fois, puis ont été suspendu chacun dans 400 $\mu$ l de PB contenant 1mM de PMSF. Les suspensions obtenues ont été soniquées 5 à 6 fois pendant 15 sec avec une amplitude

de 32% avec le sonicateur de la compagnie "Sonic & Materials". Chacune des suspensions soniquées a été ensuite traitée par 3mL du chloroforme:méthanol:eau (1:4:1). Elles ont été incubées sur glace pendant 30min puis centrifugées à 13.000xg à 4 °C pendant 5min. Chaque culot obtenu a été lavé avec 1.6 mL de méthanol à 95% et re-suspendu dans 400µl du tampon de PEGylation (Urea 10mM; SDS1%; EDTA 1mM; Tris 0.6M, pH7). Chaque sous volume a été divisé en deux fractions de 200µl chacune. Dans chacune des fractions, on a transféré 4.10µl de mPEGmaléimide (préparation extemporanée) pour concentration finale de 0.2mM. Toutes les fractions ont incubées à la température pièce pendant 10min. Un volume de 3.8mL d'éthanol frais a été ensuite ajouté à chaque réaction et le tout est mélangé par retournement du tube 5 fois puis incubé à 20°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les échantillons ont été sortis du -20 °C et centrifugés à 13.000xg pendant 15min à 4 °C. Les culots ont été séchés à l'air sous la hotte pendant 24 heures. Ils ont été ensuite dissous chacun dans 220µl du tampon d'échantillon. Un SDS- PAGE suivi d'un western anti-his ont été réalisés sur 45µl de chaque fraction.

### **Protocole utilisant le MTSES et la biotine maléimide**

Une culture de 500mL avec une  $DO_{600nm}$  de départ de 0.1 a été préparée pour chaque souche à partir des cultures liquides incubées à 37°C toute une nuit. Nous avons ajouté la solution d'IPTG à une concentration finale de 50µM à chaque culture avant de les incuber à 22°C jusqu'à  $DO_{600nm}$  de 0.5. La culture de chaque souche a été ensuite divisée en deux et centrifugée à 3.300xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 15min à 4°C. Chaque culot a été lavé deux fois avec du 0.1M tampon phosphate (PB) pH 7.4 et suspendu dans 25mL du même tampon. Pour chaque



souche, nous disposons donc de deux suspensions de 25mL. Une suspension de 25mL de chaque souche a été traitée avec le MTSES, de la compagnie "Biotium" et de numéro catalogue est 91020, à une concentration finale de 0.5mM pendant 10min à température pièce et la seconde suspension est restée sans traitement. Après ce traitement, les deux suspensions (traitée au MTSES et non traitée) de chaque souche ont ensuite été traitées avec de la biotine maléimide, de la compagnie "Sigma Aldrich" et dont le numéro catalogue est 21882200, à une concentration finale de 0.5mM pendant 10min. La réaction a été arrêtée par ajout à chaque suspension de 500µl du 2% (v/v) de 2-mercapto-éthanol dans du PBS 0.1M, pH 7.5. Chaque suspension a été lavée deux fois avec 20mL de 0.1M PB pH7.4 et son culot a été suspendu dans 250µl du tampon de lyse froid (50mM Tris pH8.0, 1mM PMSF, 1mM EDTA) additionné de lysozyme frais à raison de 100µg/mL. Les suspensions ont été par la suite incubées sur glace pendant 30min et soniquées 5 à 6 fois pendant 15 sec avec une amplitude de 32% avec le sonicateur de la compagnie "Sonic & Materials". Les lysats obtenus ont été additionnés du mélange DNaseI 3U + MgCl<sub>2</sub> à 2mM de concentration finale et ont été incubés sur glace pendant 15min. Ils ont été ensuite centrifugés à 18000xg avec la centrifugeuse Sigma 1-15K de la compagnie "Montreal Biotech" pendant 1H et chaque culot a été suspendu dans 50µl de solution de solubilisation A (PBS pH7.4, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1M NaCl) puis incubé à 4°C sous agitation pendant toute la nuit. Les suspensions ont été centrifugées à 10000xg avec la centrifugeuse Sigma 1-15K de "Montreal Biotech" pendant 15min. Les variants de ElyC-his ont été purifiés des extraits solubilisés par immuno-précipitation avec l'anticorps anti-his de souris et les billes de protéine G.

### **a. Purification d'ElyC-his contenu dans les extraits solubilisés de chaque souche**

Pour purifier ElyC-his contenu dans chaque extrait solubilisé, nous avons préparé un complexe anticorps (Ac)-bille en pré-incubant 10 µl de billes magnétiques couplées aux protéines G avec 2µl (1µg) d'anticorps anti-his de souris (Réf #04905318001 de la compagnie Roche) précédemment dilué dans 250µl d'eau sigma. Les billes magnétiques couplées aux protéines G avaient préalablement été lavées 3 fois avec 200µl de PBST 0.1% (PBS pH 7.4, 0.1%Tween 20) avant d'être mises en contact avec l'anticorps anti-his de souris. Le complexe Ac-billes ainsi préparé a été lavé une fois avec 200µl de PBST 0.1% et mis en contact avec le volume total de chaque échantillon (environ 50µl d'extrait solubilisé) additionné de 150µl de PBS pH 7.4. Les mélanges Ac-billes +lysate de chaque échantillon ont été incubés à 4°C sous agitation pendant toute la nuit. Les billes ont été lavées 3 fois avec 200µl de PBST 0.1%. La protéine ElyC-his contenue dans chaque échantillon a été éluée pendant 5min à température pièce avec 4x20µl de glycine 20mM pH 2. Chaque 20µl d'éluat obtenu est rapidement neutralisé avec 2µl de PB 1M, pH7.4. Un SDS-PAGE suivi d'un western à la HRP-Streptavidine ont été réalisés sur les éluats (produits purifiés) de la 1<sup>ère</sup> élution de chaque souche. Les autres éluats ont été gardés pour des reprises de l'essai.

### **b. SDS-PAGE et western à la HRP-streptavidine**

Pour le SDS-PAGE, les échantillons protéiques ont été préparés en ajoutant à chaque premier éluat purifié, 10µl du TE3X. Les échantillons ainsi préparés ont été chauffés à 95°C pendant 5min. Ils ont été ensuite déposés dans des puits d'un gel de polyacrylamide composé de 4% d'acrylamide pour le compactage et 12% d'acrylamide pour la séparation. Un volume de 10µl du marqueur de poids moléculaire de 175 kDa de

la compagnie "New England Biolabs" a été aussi déposé dans un puits du gel. Le système d'électrophorèse a été par la suite soumis à un courant de 150V pendant 15min et 200V pendant 45min.

Les protéines séparées par le gel ont été transférées sur une membrane de PVDF sous une tension électrique de 100V pendant 1H30min. La membrane a été incubée dans du TBST-lait 10% pendant toute une nuit. Elle a été lavée 4 fois avec du TBST, incubée dans une solution de HRP-streptavidine de la compagnie "Roche" diluée au 1/45000 dans du TBST-BSA 1%, pendant 1H sous faible agitation à température pièce. La membrane a été lavée de nouveau 4 fois avec du TBST et incubée pendant 5min dans 1.5mL de ECL "Luminata forte" de la compagnie "Pierce". Elle a été exposée pendant 1H au film qui a été ensuite développé.

#### **2.3.4. Essai de l'expression de DUF218-His dans le cytoplasme et le périplasme**

Pour déterminer l'implication du domaine DUF218 dans la fonction de ElyC, vérifier la stabilité des fusions *duf218-his* et *dsbA-duf218-his* dans les souches EM9(attHKLA1), EM9(attHKLA2), puis déduire la localisation de DUF218 au niveau cellulaire, nous avons réalisé un test de complémentation (voir section : 2.3.1. Essai de complémentation en milieu liquide et solide) et un western anti-his pour la localisation cellulaire (voir section : 2.3.3.1. Localisation cellulaire de ElyC-his) sur les deux souches.

#### **2.3.5 Isolement du ou des complexe(s) ElyC-partenaires protéiques**

Une culture de 1L avec une  $DO_{600nm}$  de départ de 0.1 a été préparée pour chacune des souches EM9(attHKHK1) et MG1655 à partir des cultures incubées à 37°C toute la

nuit. Après avoir ajouté l'IPTG à une concentration finale de 50 $\mu$ M à la culture de EM9(attHKHK1), les deux cultures ont été incubées à 22°C jusqu'à DO<sub>600nm</sub> de 0.5. A une DO<sub>600nm</sub> de 0.5, les cultures ont été déposées sur glace pour arrêter la croissance cellulaire. Elles ont été par la suite centrifugées à 12074xg avec le rotor JA-14 de la centrifugeuse "Beckman J2-MI" pendant 10min à 4°C et les culots ont été lavés avec 100mL de PBS pH 7.4. Le culot de chaque culture a été suspendu dans 1mL du tampon de lyse (50mM Tris pH 8, 1mM PMSF, 1mM EDTA) additionné de lysozyme frais à raison de 100 $\mu$ g/mL. Les suspensions obtenues ont été incubées sur glace pendant 30min et soniquées 5 à 6 cycles de 10 à 15 sec d'amplitude 32% avec le sonicateur de la compagnie "Sonics & Materials". Les lysats obtenus additionnés du mélange DNaseI 3U + MgCl<sub>2</sub> à 2mM de concentration finale, ont été incubés sur glace pendant 15min. Ils ont été ensuite centrifugés à 18000xg pendant 1H et chaque culot (représentant la fraction membranaire et débris cellulaire) a été remis en suspension dans 200 $\mu$ l de solution de solubilisation B (PBS pH7.4; 1% DDM; 1mM PMSF; 1M NaCl) puis incubé à 4°C sous agitation pendant toute la nuit. Les suspensions ont été centrifugées à 10000xg pendant 15min et les complexe(s) ElyC-partenaires contenus dans les extraits solubilisés ont été isolés par immuno-précipitation avec l'anticorps anti-his de souris (Réf #04905318001 de la compagnie Roche) et les billes magnétiques couplées aux protéines G de la compagnie "Bio Rad" puis élués avec de la glycine 20mM pH 2. Les éluats obtenus après l'immuno-précipitation ont été précipités au TCA, migrés sur gel de polyacrylamide (4% pour le compactage et 12% pour la séparation). Le gel a été coloré au nitrate d'argent. Les bandes des protéines du complexe ont été coupées et envoyées pour l'analyse en spectrométrie de masse à l'IRCM.

### **a. La réaction d'immuno-précipitation**

Pour isoler le complexe ElyC-partenaires contenu dans l'extrait solubilisé de la souche EM9(attHKHK1), nous avons préparé un complexe Ac-billes en transférant 20µl de billes magnétiques couplées aux protéines G lavées 3 fois avec 200µl du PBST 0.1% dans 500µl d'eau sigma contenant 4µl (2µg) d'anticorps anti-his de souris (Réf #04905318001 de la compagnie "Roche") que nous avons ensuite pré-incubé à 4°C pendant 1H sous agitation. L'essai d'immuno-précipitation a été aussi réalisé sur l'extrait solubilisé de la souche WT. Nous avons pré-incubé deux fois l'extrait solubilisé de chaque souche avec 20µl de billes lavées pendant 1H à 4°C sous faible agitation à chaque pré-incubation. Le complexe Ac-billes préparé a été lavé une fois avec 200µl de PBST 0.1% et mis en contact avec le volume total de chaque échantillon (environ 200µl de lysat pré-incubé). Les mélanges Ac-billes-lysate des échantillons ont été incubés à 4°C sous agitation pendant toute la nuit. Les mélanges Ac-billes-lysate ont été lavés 3 fois avec 200µl du PBST 0.1% puis traités avec 4 x 20µl de glycine 20mM pH 2 pour l'éluat. Chaque 20µl d'éluat obtenu est rapidement neutralisé avec 2µl PB 1M, pH7.4. A la fin de l'éluat, tous les éluats d'un même échantillon ont été combinés puis précipités au TCA.

### **b. Précipitation des éluats au TCA**

Pour la précipitation au TCA, nous avons transféré l'éluat de chaque échantillon dans un tube eppendorf. On a ensuite ajouté à chaque éluat et dans l'ordre, 80µl du Tris-EDTA 10X, 80µl de NaDOC 0.3% et 80µl de TCA 72%. Les mélanges ont été incubés sur glace pendant 1H et centrifugés à 18000xg à 4°C pendant 20min. Le culot de chaque échantillon a été suspendu dans 80µl de méthanol à 90% conservé à température ambiante. Les suspensions ont été ensuite congelées à -20°C pendant toute une nuit et

centrifugées à 18000xg pendant 20min à 4°C. les surnageants ont été délicatement rejetés et les culots (précipités protéiques) ont été séchés à l'air sous la hotte. L'ouverture de chaque tube qui contient le précipité protéique a été recouverte lors du séchage par du papier essui "kimwips" propre pour empêcher la poussière de contaminer les échantillons. Un SDS-PAGE suivi de la coloration au nitrate d'argent ont été réalisés sur les précipités protéiques de chaque souche.

### **c. SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent**

Pour le SDS-PAGE, les échantillons protéiques ont été préparés en ajoutant à chaque précipité protéique 20µl de PBS pH7.4 et 10µl du TEC3X. Les mélanges ainsi obtenus ont été chauffés à 95°C pendant 5min. Ils ont été ensuite déposés dans des puits d'un gel de polyacrylamide composé de 4% d'acrylamide pour le compactage et 12% d'acrylamide pour la séparation. Un volume de 10µl du marqueur de poids moléculaire de 175 kDa de la compagnie "New England Biolabs" a été aussi déposé dans un puits du gel. Le système d'électrophorèse a été par la suite soumis à un courant de 150V pendant 15min et de 200V pendant 45min. le gel a été ensuite coloré au nitrate d'argent.

Tout juste après la séparation des protéines par SDS-PAGE, le gel a été directement transféré dans un bocal propre contenant 250mL d'une solution de méthanol et d'acide acétique (50% méthanol, 10% acide acétique) pour être fixé pendant 30min sous rotation à température pièce. Il a été ensuite rincé avec 250mL d'éthanol 20% pendant 20min puis dans 250mL d'eau distillée pendant 20min. Après le lavage, le gel a été incubé dans 250mL d'une solution de thiosulfate de sodium à  $1,26 \cdot 10^{-3}M$  (0.05g thiosulfate de sodium, 250mL de H<sub>2</sub>O distillée) pendant 2min puis rincé avec 250mL d'eau distillée pendant 20sec. Nous l'avons ensuite incubé dans 250mL d'une solution de

nitrate d'argent à  $10,53 \cdot 10^{-3} \text{M}$  (0.5g de nitrate d'argent, 250mL de H<sub>2</sub>O distillée) pendant 30min et nous l'avons rincé à nouveau avec de l'eau pendant 2min. Il a été rapidement rincé avec 200mL de la solution de développement contenant du carbonate de sodium  $283,07 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ,  $0,063 \cdot 10^{-3} \text{M}$  et de formaldéhyde à 37% (carbonate de sodium 15g, 0.2g/L thiosulfate de sodium 25mL, formaldéhyde 700µl, eau 475mL) et incubé dans 250mL de la solution de développement. Le développement a été arrêté lors de l'apparition des bandes pour un maximum de 3min d'incubation, en remplaçant rapidement la solution de développement par la solution d'acide acétique 1% (acide acétique 2.5mL, eau distillée 250mL).

#### **d. Coupure des bandes**

Une fois le développement arrêté, le gel a été rincé avec de l'eau pure pendant 20 à 30 min. Les bandes représentant les protéines révélées, ont été excisées à l'aide d'un scalpel sur un espace propre situé dans un coin à l'abri de mouvements. Chaque bande a été excisée suivant une dimension de 1 à 3mm. Entre deux bandes excisées, le scalpel est rincé avec de l'eau pure. Chaque bande excisée a été ensuite mise dans un tube bien identifié et contenant 10µl d'eau pure. Les tubes ont été conservés à -20°C pendant une semaine puis transportés sur glace sèche jusqu'à l'IRCM.

### **2.3.6 Spectrométrie de masse**

L'analyse de spectrométrie de masse a été réalisée par le laboratoire de IRCM suivant les étapes et méthodes qui suivent.

### 2.3.6.1 Digestion des protéines avec la trypsine

Le protocole de digestion des protéines utilisé est celui de digestion dans le gel, basé sur les résultats obtenus par Havlis *et al* (Havlis *et al.*, 2003). Ce protocole permet d'effectuer l'étape de digestion des protéines en 6h de temps, sans affecter le rendement du peptide comparativement aux protocoles classiques de digestion par la trypsine.

Pour les étapes suivantes, tous les volumes ont été ajustés en fonction du volume de morceau de gel représentant chaque bande. Chaque morceau de gel a été d'abord lavé avec de l'eau pendant 5min et décoloré deux fois avec le tampon de décoloration (thiosulfate de sodium 100mM, 30mM de ferricyanure de potassium) pendant 15min. Un lavage supplémentaire de 5min a été effectué juste après décoloration avec un tampon de bicarbonate d'ammonium (50mM). Les morceaux de gel ont été ensuite déshydratés avec de l'acétonitrile. Les protéines contenues dans chaque bande de gel ont été réduites par l'addition du tampon de réduction (10mM DTT, 100mM de bicarbonate d'ammonium) pendant 30min à 40°C, puis alkylées par l'ajout du tampon d'alkylation (55mM d'iodoacétamide, 100mM de bicarbonate d'ammonium) pendant 20min à 40°C. Les morceaux de gel ont été déshydratés et lavés avec acétonitrile à 40°C pendant 5min. Les morceaux de gel ont été ensuite séchés à 40°C pendant 5min et réhydratés pendant 40 min toujours à 4°C avec la solution de trypsine (6ng/μl de trypsine de qualité pour séquençage Promega, 25mM bicarbonate d'ammonium). La concentration de la trypsine a été maintenue faible pour réduire les effets de suppression des signaux et de bruit de fond provenant de produits d'autolyse lorsqu'on effectue une analyse LC-MS/MS.

La digestion des protéines a été effectuée à 58°C pendant 1h et arrêtée avec 15μl de 1% d'acide formique/2% acétonitrile. Le surnageant a été transféré dans une plaque à 96



puits et l'extraction des peptides a été effectué en deux étapes d'extraction de 30min à température ambiante en utilisant du tampon d'extraction (1% acide formique/50% acétonitrile). Tous les peptides extraits ont été recueillis dans la plaque à 96 puits et ont été complètement séchés dans la centrifugeuse sous vide. La plaque a été scellée et conservée à -20°C jusqu'à l'analyse LC-MS/MS.

### **2.3.6.2 Analyse LC-MS/MS**

Avant l'analyse LC-MS/MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse), les protéines digérées ont été re-solubilisées sous agitation pendant 15min dans 10µl de 2% d'acide formique/1% d'acétonitrile. La colonne HPLC utilisée a été remplie d'une résine à phase inversée C18 à l'aide d'une cellule à haute pression. Un "Self-Pack PicoFrit" de 75µm de diamètre intérieur, fusionné à la colonne capillaire de silice (New Objectif, Woburn, MA) de 15cm de long a été emballé avec la C18 Jupiter 5µm 300Å du matériel en phase inverse (Phenomenex, Torrance, CA). Cette colonne a été installée sur le système Easy-nLC II (Proxeon Biosystems, Odense, Danemark) et couplée à la LTQ Velos Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Bremen, Allemagne) équipé d'une source d'ions "nanoélectrospray Proxeon". Les tampons utilisés pour la Chromatographie étaient de 0,2% d'acide formique (tampon A) et 100% d'acétonitrile/0,2% d'acide formique (tampon B). Au cours des 12 premières min, 5µl d'échantillon ont été déposés sur la colonne à un débit de 600nL/min et, par la suite, le gradient est allé de 2 à 35% du tampon B en 18min, puis de 35 à 80% du tampon B en 4min à un débit de 600nL/min. L'acquisition des données LC-MS/MS a été réalisée en utilisant un cycle de 11 événements de balayage composés d'une analyse complète MS pour l'événement de balayage 1 acquise dans le Orbitrap. La résolution de masse pour MS a été fixé à 60000

(à  $m/z$  400) et utilisée pour déclencher les dix événements MS/MS supplémentaires acquis en parallèle dans le piège à ions linéaire pour les dix premiers ions les plus intenses. La masse sur la plage de rapport de charge était de 360 à 2000 pour la numérisation MS avec une valeur cible de 1000000 charges et de  $\sim 1/3$  rapport  $m/z$  de départ à 2000 pour la numérisation avec une valeur cible de 10000 charges MS/MS. Les événements de balayage dépendant des données ont utilisé un temps de remplissage d'ion maximum entre 100ms et 1 microscan. Les ions cibles déjà sélectionnés pour la MSMS ont été dynamiquement exclus pour 15sec. Les voltage du nanospray et du S-lens ont été fixés à 1.5kV et 50V, respectivement. La température capillaire était fixée à 225°C. les conditions MS/MS étaient: énergie de collision normalisée, 35V; activation  $q$ , 0.25; temps d'activation, 10ms.

### **2.3.6.3 Identification des protéines**

Les recherches pour l'identification des protéines ont été effectuées dans la banque de données de protéines Uniprot pour la souche *E. coli* K-12 avec le logiciel Mascot 2.3 (Matrice Science). Les masses de tolérance pour les précurseurs et les fragments d'ions ont été fixées à 10 ppm et 0,6 Da, respectivement. L'enzyme spécifiée était la trypsine avec acceptation deux clivages manqués. La carbamidomethylation de cystéine a été spécifiée comme la modification fixée et l'oxydation de la méthionine comme la modification variable.

### **3. Résultats**

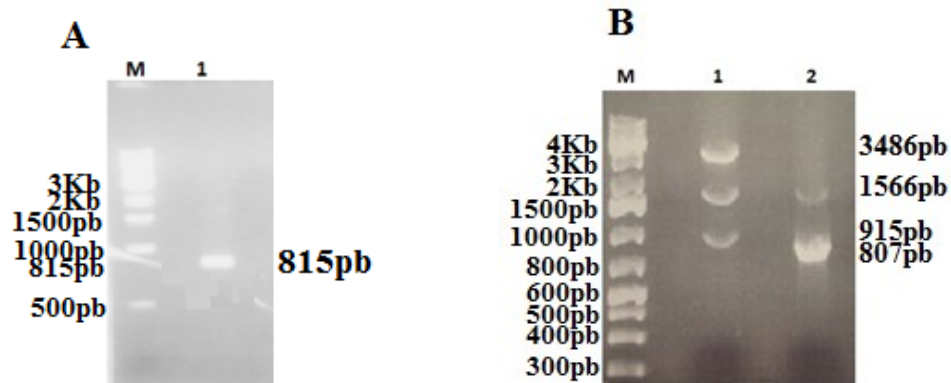
### 3.1 Intégration de *P<sub>lac</sub>::elyC-his* et ses variants dans le génome de EM9

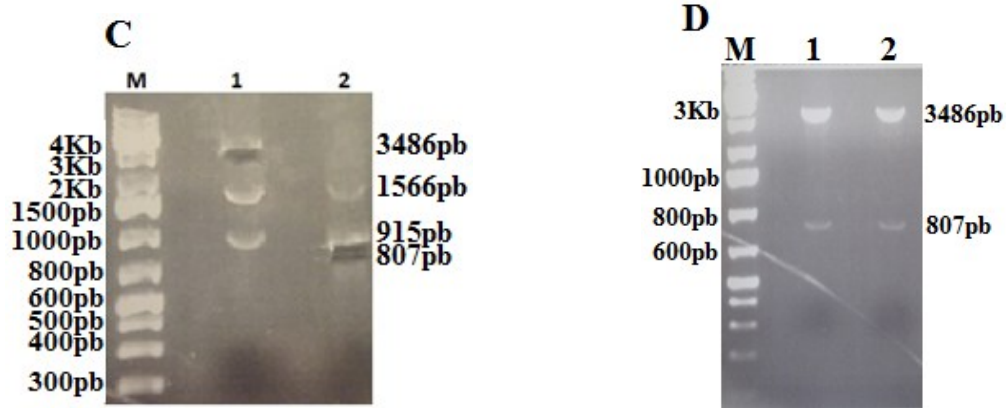
Afin d'étudier la topologie du facteur ElyC, nous avons construit les plasmides pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4 qui codent respectivement pour ElyC-his avec aucun résidu cystéine, avec un résidu cystéine en N-terminal, avec un résidu cystéine dans la boucle et avec un résidu cystéine en C-terminal (voir figure 10 pour topologie prédite). Le plasmide pHK1 a été construit en clonant la fusion *elyC-his* obtenue par PCR dans le plasmide CRIM pCB70 sous le promoteur  $P_{lac}$ . Les plasmides pHK2, pHK3 et pHK4 ont été construits respectivement en substituant individuellement le codon codant pour la sérine en position 4, 33, et 253 de la protéine ElyC par un codon cystéine par mutagenèse dirigée. Les quatre plasmides ont été ensuite intégrés dans le génome de la souche TB28 par le système d'intégration des plasmides CRIM (Haldimann & Wanner, 2001). Ils ont été par la suite transférés dans le génome de la souche EM9 par transduction.

La migration du produit PCR de la fusion *elyC-his* sur gel d'agarose 1% nous a montré deux fragments d'ADN, un très abondant de taille 815pb correspond à la taille attendue pour la fusion et le second en traces de taille d'environ 1500pb n'était pas attendu (figure 17A, puits#1). Ce deuxième fragment serait le produit d'une amplification non spécifique. La purification des produits de digestion du vecteur pCB70 et de l'insert *elyC-his* a donné respectivement 3 et 2 fragments d'ADN sur gel d'agarose 1% (figure 17B). Les 3 fragments obtenus pour le vecteur pCB70 étaient prévisibles du fait qu'il était coupé deux fois par l'enzyme HindIII et une fois par l'enzyme XbaI. De plus, ces fragments sont respectivement de 915pb, 1566pb et 3486pb (figure 17B, puits#1) et correspondent aux tailles attendues. Le fragment de taille égale à 3486pb est celui

d'intérêt c'est-à-dire celui qui sera utilisé pour la ligation. Par contre pour l'insert on s'attendait uniquement à un fragment, celui de taille proche de 815pb (figure 17B, puits#2). Le deuxième fragment observé serait certainement le produit de digestion du produit d'amplification non spécifique observé sur la figure 17A, puits#1. La figure 17C nous montre la coupure des produits de digestion utilisés pour la ligation. La transformation du produit de ligation obtenu dans les cellules DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir) compétentes, nous a permis d'obtenir environ 46 transformants (clones).

Pour vérifier la construction du plasmide pHK1, nous avons sélectionné parmi les 46 transformants, deux dont nous avons extrait les plasmides. Nous avons ensuite digéré chacun des deux plasmides avec les enzymes HindIII et XbaI puis observé leur produit de digestion sur gel d'agarose 1%. La figure 17D nous montre pour chaque plasmide digéré un fragment de taille 3486pb et un d'environ 807pb qui correspondent respectivement aux tailles du fragment du vecteur pCB70 digéré ayant servi à la ligation et celui de l'insert *elyC-his* digéré. Ces résultats confirment de la bonne construction du plasmide pHK1.





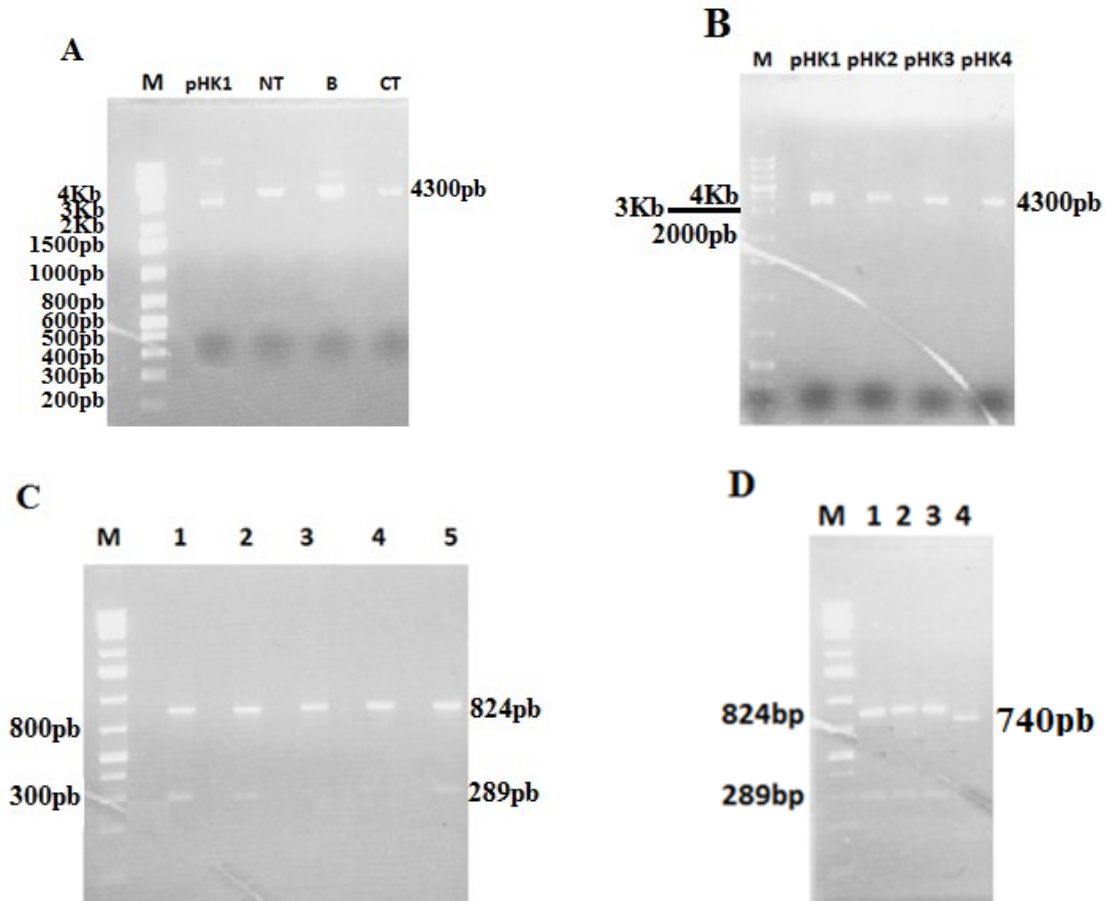
**Figure 17:** Construction de pHK1. (A) : fusion *elyC-his* par PCR (M est le marqueur de poids moléculaire 1Kb de la compagnie Biobasic, puits#1 est le produit PCR *elyC-his*). (B) : purification des produits de digestion de pCB70 et de l'insert *elyC-his* par les enzymes HindIII et XbaI (M est le marqueur de poids moléculaire 10 Kb de la compagnie Biobasic, puits#1 est le produit de digestion de pCB70, puits#2 est le produit de digestion de *elyC-his*). (C) : coupure des bandes d'intérêt de pCB70 (puits#1) et *elyC-his* (puits#2) pour la ligation. (D) : produits de digestion de pHK1 extrait de deux transformants (M est le marqueur de poids moléculaire 10Kb de la compagnie Biobasic, puits#1 et puits#2 sont les produits de digestion de pHK1 des transformants 1 et 2).

Les produits PCR NT, B et CT de la mutagenèse dirigée ayant conduit respectivement au remplacement du codon de la sérine par celui de la cystéine en position 4, 33 et 253 des acides aminés d'ElyC, ont été vérifiés sur gel d'agarose 1%. La figure 18A montre que chacun de ces variants a migré à la taille 4300pbs qui correspond à la taille du pHK1 ayant servi comme source d'ADN pour la PCR. Ces produits PCR semblent ne pas migrer exactement à la même taille que le pHK1 sur la figure 18A. Ceci est peut-être dû au fait qu'ils sont encore linéaires par rapport au pHK1 qui est circulaire. Ces plasmides linéaires ont été ensuite circularisés, purifiés et transformés dans la souche

DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir). Ils ont été extraits et visualisés sur gel d'agarose 1%. La figure 18B nous montre pHK2, pHK3 et pHK4 qui sont les formes circulaires de NT, B et CT, migrés à la bonne et même taille que pHK1. De plus, les résultats de leur séquençage ont révélé la présence de résidu cystéine en position 4, 33 et 253 respectivement pour pHK2, pHK3 et pHK4. Ces résultats indiquent la bonne construction des variants de pHK1.

Les plasmides pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4, après la confirmation de leur construction, ont été intégrés dans le génome de la souche TB28. Pour une intégration monocopie, la PCR sur le génome de chaque intégrant TB28(attHKHK) avec les amorces P1attHK, P2, P3 et P4attHK doit amplifier deux régions de taille 824pb et 289pb alors qu'une seule bande de 740pb est obtenue en absence d'intégration (Haldimann & Wanner, 2001). Les puits #1, #2, #3, #4 et #5 de la figure 18C montrent respectivement les résultats de la PCR de vérification de l'intégration des plasmides pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4 dans le génome de la souche TB28 et du TB28(attHKTB98) utilisé comme contrôle positif de l'intégration monocopie. Dans chacun des puits #1 et #2 nous avons deux fragments d'ADN, un de 824pb et un de 289pb, tout comme dans le puits #5 correspondant au contrôle positif, ce qui indique que pHK1 et pHK2 sont intégrés en monocopie. Par contre dans les puits #3 et #4 nous n'observons que le fragment de 824pb, ce qui peut être dû à une mauvaise intégration. Ce résultat nous a amené à reprendre l'intégration des pHK3 et pHK4 dans la souche TB28 et la vérification par PCR. La figure 18D montre les résultats de la PCR de vérification sur les intégrants de pHK3 et pHK4 repris. Les puits #1, #2, #3 et #4 de la figure 18D correspondent respectivement aux résultats de la PCR de vérification de l'intégration des plasmides pHK3, pHK4, du contrôle positif TB28(attHKTB98) et du contrôle négatif MG1655.

L'obtention des fragments de 824pb et de 289pb dans les puits #1, #2, #3 et du fragment de 740pb dans le puits#4 suggèrent que pHK3, pHK4 ont été aussi intégrés en monocopie.



**Figure 18:** Construction de pHK2, pHK3, pHK4 et intégration des pHK. (A): migration sur gel de pHK1 circulaire et les produits PCR NT, B et CT de la mutagenèse dirigée, (M est le marqueur de poids moléculaire 1Kb de la compagnie Biobasic). (B): migration des pHK1, pHK2, pHK3 et pHK4 circulaires, (M est le marqueur de poids moléculaire 10Kb de la compagnie Biobasic). (C): vérification de l'intégration de pHK (M est le marqueur de poids moléculaire 100pb de la compagnie Biobasic, puits#1 = TB28(attHKHK1), puits#2 = TB28(attHKHK2), puits#3 = TB28(attHKHK3), puits#4 = TB28(attHKHK4) et puits#5 = TB28(attHKTB98)). (D): vérification de la reprise de l'intégration de pHK3 et pHK4 (M est le marqueur de poids moléculaire 100pb de la compagnie Biobasic, puits#1 = TB28(attHKHK3), puits#2 = TB28(attHKHK4), puits#3 = TB28(attHKTB98) et puits#4 = MG1655).

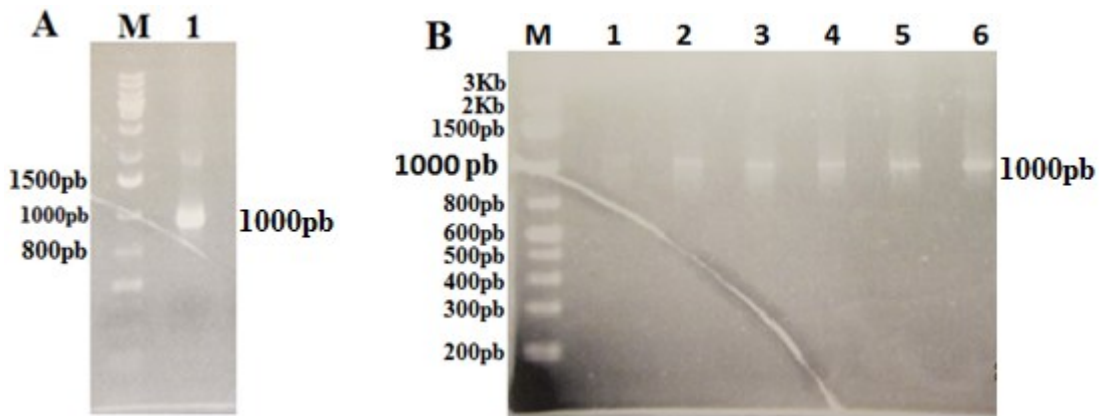


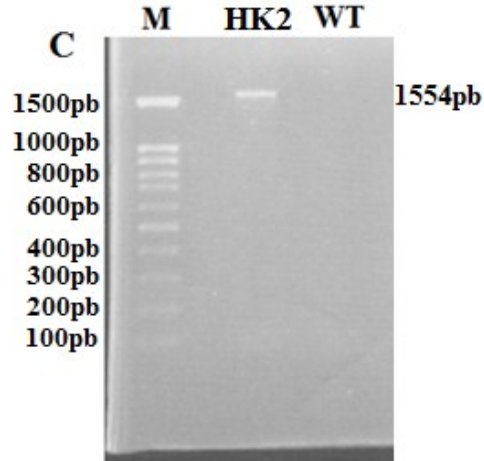
### 3.2. Intégration de *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* dans le génome de EM9

Afin de pouvoir isoler les complexes ElyC et partenaires protéiques dans les conditions physiologiques et par immuno-précipitation, nous avons construit une souche exprimant ElyC-his sous le contrôle du promoteur natif du gène *elyC*. Pour y parvenir, nous avons d'abord construit la fusion *CTelyC-his-kan* par PCR, que nous avons par la suite intégrée directement dans le génome de la souche TB10 en 3' du gène *elyC* par la technique de recombinaison homologue appelée  $\lambda$  red (Yu *et al.*, 2000). Après vérification de l'intégration par PCR et par séquençage, la région *P<sub>elyC</sub>::elyC-his-kan* du génome de la souche HK1 a été transférée dans la souche EM9 par transduction avec le phage P1<sub>vir</sub>. La souche obtenue a été nommée HK2.

La migration du produit PCR de la fusion *CTelyC-his-kan* sur gel d'agarose 1% nous montre un fragment d'ADN de taille 1000pb (figure 19A). Cette taille correspond à celle de la séquence *CTelyC-his-kan* et indique une bonne construction de la fusion. La fusion a été purifiée et électroporée dans la souche TB10 compétente. Les cellules ont été inoculées sur LBkan10 puis incubées à 30°C pendant 48H pour l'intégration de la séquence *CTelyC-his-kan* en 3' du gène *elyC* dans le génome. Après les 48H d'incubation, nous avons obtenu six recombinants sur lesquelles nous avons réalisé des PCR pour vérifier si l'intégration a été complétée. La figure 19B montre les résultats de PCR sur le génome de ces six recombinants obtenus. On observe que sur les six produits PCR, cinq (puits#2, #3, #4, #5 et #6) contiennent des fragments d'ADN de 1000pb qui correspond à la taille de *CTelyC-his-kan* et qui est la taille attendue. Dans le puits#1, on observe une absence de fragment d'ADN. Ces résultats indiquent que l'intégration de *CTelyC-his-kan* a été complétée chez cinq recombinants sur les six. Le produit PCR du

recombinant 2 (figure 19B, puits#2) a été ensuite confirmé par séquençage et la région *P<sub>elyC</sub>::elyC-his-kan* de son génome a été transférée dans la souche EM9 par transduction par le phage P1<sub>vir</sub> pour donner la souche HK2. Nous avons obtenu trois transductants parmi lesquels nous avons choisi un pour vérification du transfert par PCR. L'amplification du génome du transductant choisi (HK2) et de MG1655 (WT) avec des amorces qui hybrident à 400 nucléotides en amont et à 100 nucléotides en aval de *elyC* donc dans le gène de résistance à la kanamycine, nous donne un fragment d'ADN de taille de 1554pb qui est la taille attendue pour HK2 et aucun fragment pour WT (figure 19C). Ce résultat indique que la région *P<sub>elyC</sub>::elyC-his-kan* a été bien transférée dans le génome de EM9 pour ce transductant choisi. Il a été ensuite confirmé par le séquençage du produit PCR.





**Figure 19** : Construction de la souche HK2 exprimant ElyC-his sous le contrôle de  $P_{elyC}$ . (A) : PCR de vérification de la construction de *elyC-his-kan*. (B) : PCR de confirmation de la fusion de *his* en 3' d'*elyC* dans HK1. (C) : PCR de confirmation de l'intégration de  $P_{elyC}::elyC-his$  dans le génome de HK2.

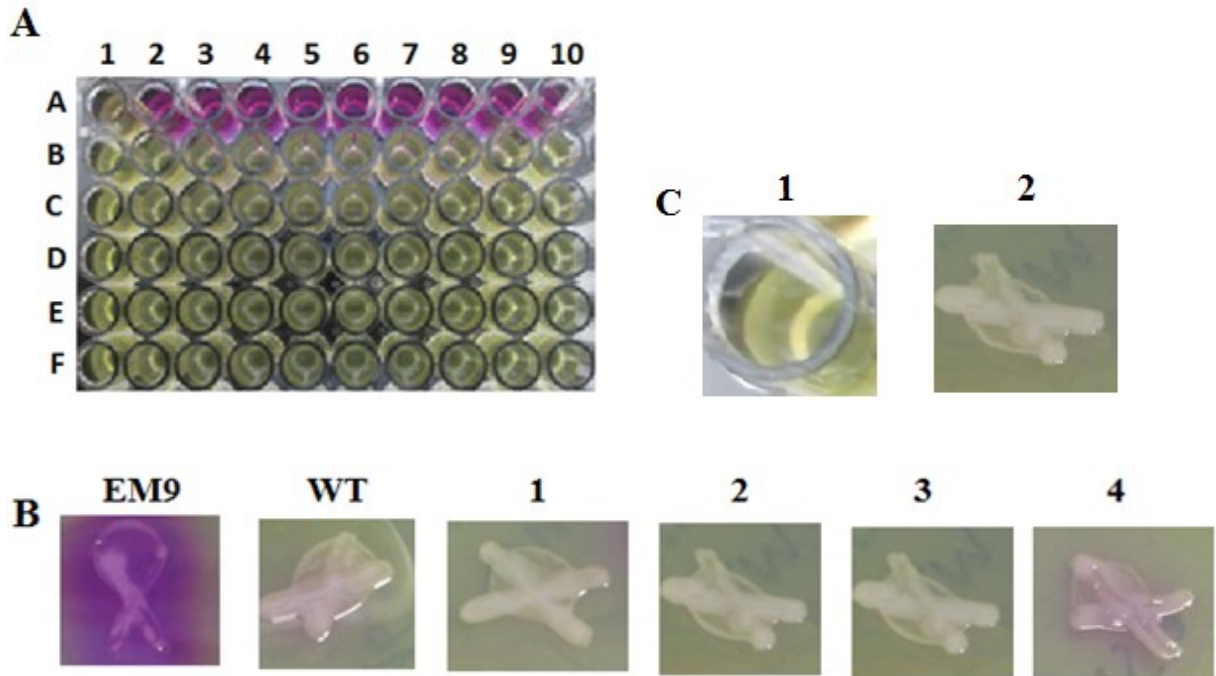
### 3.3. ElyC-his est fonctionnel *in vivo* dans les souches construites

Pour vérifier si l'intégration de  $P_{elyC}::elyC-his$  et de  $P_{lac}::elyC-his$  avec ses variants fonctionne *in vivo* et déterminer la concentration d'IPTG nécessaire et suffisante à l'induction de  $P_{lac}$  pour obtenir une complémentation du phénotype CPRG<sup>+</sup> observé chez EM9, nous avons fait des tests de complémentation en milieu liquide et solide. Ces cultures en milieux liquide et solide contenant du CPRG et différentes concentrations d'IPTG ont été réalisées sur les souches EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3) et EM9(attHKHK4) à 22°C. La même culture a été réalisée sur la souche HK2 sans IPTG.

La figure 20A nous présente les résultats du test en milieu liquide où nous avons les colonnes de 1 à 10 qui correspondent aux concentrations en  $\mu\text{M}$  d'IPTG de 0, 25, 50, 100, 250, 300, 350, 400, 450 et 500 et les lignes de A à F correspondent aux souches EM9, MG1655, EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3) et

EM9(attHKHK4). Sur cette figure, on observe que les contenus de tous les puits ayant reçu la souche EM9 (puits#A2, #A3, #A4, #A5, #A6, #A7, #A8, #A9 et #A10) ont viré en rose, excepté celui du puits de 0 $\mu$ M d'IPTG (puits#A1). Par contre, dans les puits ayant reçu la souche WT (puits#B1, #B2, #B3, #B4, #B5, #B6, #B7, #B8, #B9 et #B10), la couleur du contenu est restée inchangée donc jaune (figure 20A). Le constat a été le même dans les puits des souches EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3) et EM9(attHKHK4) que pour le WT pour toutes les concentrations d'IPTG. Le changement de couleur observé dans les puits de EM9 signifie la dégradation du CPRG en CPR par le LacZ exprimé par la souche suite à l'induction du promoteur P<sub>lac</sub> par l'IPTG. Ceci indique que le CPRG et le LacZ ont été en contact, puis confirme l'existence d'un défaut au niveau de l'enveloppe de la souche EM9. L'absence totale de cette coloration rose au niveau des souches EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3) et EM9(attHKHK4) indique que la fusion *elyC-his* et ses variants avec cystéines fonctionnent bien *in vivo* et complètent le défaut du phénotype CPRG<sup>+</sup>. La figure 20B présente les résultats obtenus en milieu solide. Ces résultats concordent avec ceux obtenus en milieu liquide, à l'exception du bruit de fond observé sur le milieu solide pour le WT et EM9(attHKHK4). Ces résultats suggèrent la concentration de 50 $\mu$ M comme la concentration d'IPTG suffisante pour obtenir une complémentation complète du phénotype CPRG<sup>+</sup>. Les résultats du test sur HK2 sont montrés par la figure 20C. La couleur du milieu liquide est restée inchangée (couleur jaune) (figure 20C-1) et la colonie de HK2 est blanchâtre sur le milieu solide (figure 20C-2). Ces résultats indiquent aussi la complémentation du phénotype CPRG<sup>+</sup> de EM9 par la fusion *elyC-his* dans la souche

HK2. Ces résultats suggèrent que la fusion *elyC-his* est fonctionnelle *in vivo* dans les souches construites.



**Figure 20** : Complémentations du phénotype CPRG+ par ElyC-his et ses variants.

(A) : essai de CPRG en milieu liquide sur A = EM9, B = WT, C = EM9(attHKHK1), D = EM9(attHKHK2), E = EM9(attHKHK3) et F = EM9(attHKHK4); les puits#1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 correspondent respectivement à 0, 25, 50, 100, 250, 300, 350, 400, 450 et 500 $\mu$ M d'IPTG. (B) : essai de CPRG avec 50 $\mu$ M d'IPTG en milieu solide sur EM9, WT, 1 = EM9(attHKHK1), 2 = EM9(attHKHK2), 3 = EM9(attHKHK3) et 4 = EM9(attHKHK4). (C) : essai de CPRG avec 50 $\mu$ M d'IPTG sur HK2; 1 est en milieu liquide, 2 est en milieu solide.

### 3.4. Le mutant $\Delta$ *elyC* est sensible au chromate de potassium

Des travaux en cours dans notre laboratoire ont révélé l'existence d'un lien entre le phénotype de lyse observé chez le mutant  $\Delta$ *elyC* et le stress oxydatif. Pour vérifier ce lien nous avons étudié la croissance des souches MG1655, EM9, EM9(attHKHK1) et HK2 à

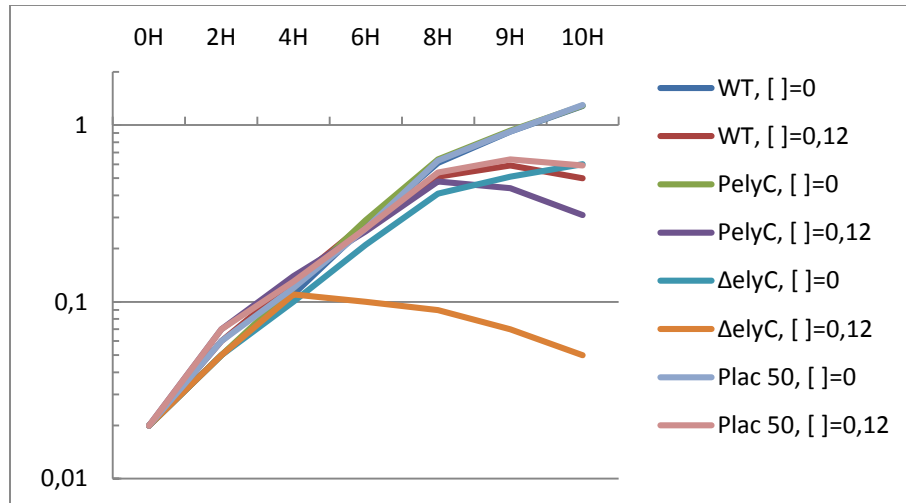
22°C en présence de 0µM et 0.12µM du chromate de potassium. Cet essai a aussi servi à vérifier la complémentation par *P<sub>lac</sub>::elyC-his* et *P<sub>elyC</sub>::elyC-his*. Le chromate de potassium en présence d'oxygène provoque la formation de radicaux hydroxyyles causant un stress oxydatif dans le milieu.

Le tableau 5 présente les mesures des DO<sub>600nm</sub> obtenues et la figure 21 présente la croissance de chaque souche pendant 10H d'incubation. On observe que les souches EM9(attHKHK1) en présence d'IPTG 50µM, MG1655 et HK2 ont poussé normalement en absence du chromate de potassium avec un dédoublement de génération à chaque 2H durant les 10H. Par contre, chez la souche EM9 on note une difficulté de croissance à partir de la 6<sup>ième</sup> heure. Pour la croissance en présence de chromate de potassium, les souches MG1655, EM9(attHKHK1) en présence d'IPTG et HK2 ont poussé normalement jusqu'à la 8<sup>ième</sup> heure et contrairement à leur croissance en absence de chromate de potassium, elles présentent une difficulté marquée par la diminution de leur DO pour la suite du temps de croissance (tableau 5 : voir les DO à la 8<sup>ième</sup> heure en présence ou non du chromate de potassium). La souche EM9 quant à elle présente une difficulté de croissance qui apparaît plus tôt et plus marquée en présence de chromate de potassium qu'en son absence. Cette difficulté est marquée par la décroissance des DO<sub>600nm</sub> après la 4<sup>ième</sup> heure de croissance (tableau 5 : 6<sup>ième</sup> heure : DO de 0.21 en absence chromate de potassium et de 0.1 en présence du chromate de potassium). Ces observations indiquent donc que l'inactivation du gène *elyC* dans une souche la rend sensible au chromate de potassium à la concentration de 0.12µM et sa restauration ou sa présence lui confère une résistance par rapport à ce dernier pendant une certaine durée. Elles confirment également la complémentation par *P<sub>lac</sub>::elyC-his* et *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* du

phénotype de EM9 à 22°C, et révèlent que cette complémentation est totale pour  $P_{lac}::elyC-his$  ( $DO_{600nm}$  0.59 pour EM9(attHKHK1) contre 0.5 le WT) et partielle pour  $P_{elyC}::elyC-his$  ( $DO_{600nm}$  0.31 pour HK2 contre 0.5 pour le WT) (tableau 5). Ces essais repris 4 fois dans les mêmes conditions, ont donné les mêmes résultats.

Tableau 5 : Mesures des  $DO_{600nm}$  de croissance en fonction du temps.

	MG1655 (WT)		HK2 ( $P_{elyC}::elyC-his$ )		EM9 ( $\Delta elyC$ )		EM9 (attHKHK1) ( $P_{lac}::elyC-his$ ) avec 50µM d'IPTG	
	Chromate de potassium		Chromate de potassium		Chromate de potassium		Chromate de potassium	
TEMPS (H)	[ ]=0	[ ]=0,12	[ ]=0	[ ]=0,12	[ ]=0	[ ]=0,12	[ ]=0	[ ]=0,12
0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
2	0,05	0,06	0,05	0,07	0,05	0,05	0,06	0,07
4	0,11	0,13	0,12	0,14	0,1	0,11	0,12	0,13
6	0,27	0,28	0,29	0,25	0,21	0,1	0,26	0,26
8	0,61	0,51	0,64	0,48	0,41	0,09	0,63	0,54
9	0,92	0,59	0,93	0,44	0,51	0,07	0,92	0,64
10	1,28	0,5	1,29	0,31	0,6	0,05	1,3	0,59



**Figure 21** : Étude à 22°C de la sensibilité des souches WT, EM9, EM9(attHKHK1) et HK2 au chromate de potassium.

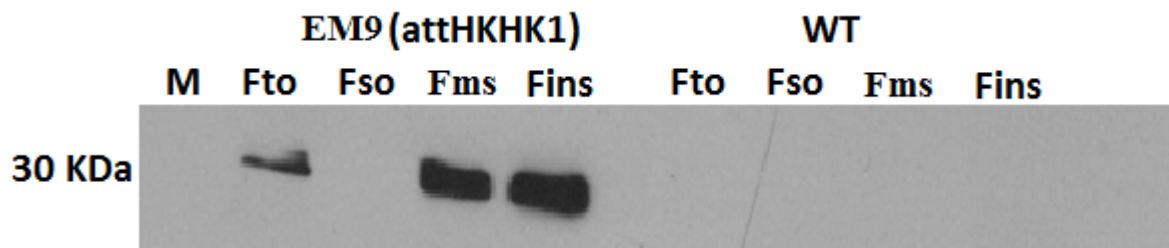
### 3.5. Le facteur ElyC est localisé dans la membrane bactérienne

Afin de vérifier la stabilité de la fusion ElyC-his *in vivo* et la localisation de la protéine ElyC-his au niveau cellulaire, nous avons exprimé ElyC-his en induisant le promoteur  $P_{lac}$  avec 50μM d'IPTG dans EM9(attHKHK1), extrait les fractions protéiques cellulaires puis fait un western anti-his.

La figure 22 présente les résultats du western ant-his sur les extraits protéiques des différentes fractions de la souche EM9(attHKHK1). La souche WT a été utilisée comme témoin négatif de notre expérience (souche contenant ElyC sans l'étiquette his). Les fractions  $F_{to}$  et  $F_{so}$  représentent respectivement l'ensemble de toutes les protéines de la cellule et les protéines solubles cytoplasmiques et périplasmiques. Les fractions  $F_{ms}$  et  $F_{ins}$  représentent respectivement les protéines membranaires solubilisées et les protéines membranaires insolubles. On observe sur la figure 22 la présence de bande de taille 30kDa dans les fractions  $F_{to}$ ,  $F_{ms}$  et  $F_{ins}$  de la souche EM9(attHKHK1) et rien dans la  $F_{so}$ . La valeur 30kDa correspond exactement à la taille de la protéine ElyC fusionnée à dix



histidines. Cette observation montre la présence d'ElyC-his dans les fractions  $F_{to}$ ,  $F_{ms}$  et  $F_{ins}$  et son absence dans  $F_{so}$ . L'absence totale de signal dans les fractions de la souche WT signale la spécificité des résultats de EM9(attHKHK1). Ces résultats nous indiquent d'une part que la fusion ElyC-his est stable dans la souche EM9(attHKHK1) parce que l'étiquette histidine reste fusionnée à ElyC et d'autre part que la protéine ElyC est localisée dans la portion membranaire de l'enveloppe.



**Figure 22:** ElyC est une protéine membranaire.

Résultats du western anti-his sur les extraits protéiques des souches EM9(attHKHK1) et MG1655 (WT). M : marqueur de poids moléculaire de 175 KDa de la compagnie "New England Biolabs".

### 3.6. Topologie de ElyC

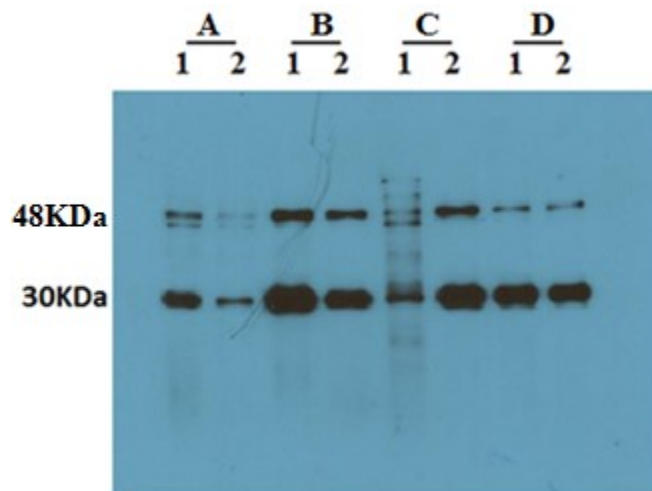
Afin de pouvoir déterminer la topologie de ElyC après avoir identifié sa localisation au niveau cellulaire, nous avons fait des essais de modification de cystéine sur les souches EM9(attHKHK1), EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3), et EM9(attHKHK4). Nous avons commencé nos essais avec le protocole utilisant le MTSES et le mPEG, deux réactifs sulfhydriles ayant une réactivité pour le résidu cystéine (voir section 2.3.3.2). Après avoir préparés deux échantillons (un traité au MTSES et un non traité au MTSES) cellulaires pour chacune des souches, nous les avons éclatées par sonication. Les deux lysats obtenus par souche ont été traités avec le mPEG. Un western anti-his a été ensuite

réalisé sur les lysats traités. Les résultats obtenus pour le premier essai ont montré des signaux de même taille pour tous les échantillons (traités au MTSES + mPEG et traités uniquement au mPEG) y compris ceux du témoin négatif. De plus ils étaient difficilement observables à cause de la qualité du développement du film qui a été pour le western. L'essai a été repris plusieurs fois après mais sans succès à cause des problèmes de difficulté de dissolution des échantillons dans le tampon d'échantillon et de migration des échantillons à travers le gel de polyacrylamide qui étaient survenus. Étant donné que l'analyse des résultats avec ce protocole est basée sur l'observation de différences entre les tailles des échantillons traités au MTSES + mPEG et ceux traités au mPEG uniquement, nous n'avons pas pu analyser les résultats obtenus.

Pour contourner ces problèmes, nous avons changé de protocole. Nous avons choisi un protocole qui utilise les réactifs MTSES, Biotine maléimide et la streptavidine couplée avec la HRP. Le principe de l'analyse des résultats de ce protocole n'est pas basé sur la différence de taille, mais simplement sur la présence ou non de signaux à la taille de ElyC (30kDa) (voir section 2.3.3.2). Après avoir préparé deux échantillons (un traité au MTSES et un non traité au MTSES) pour chaque souche, nous les avons traités à la biotine maléimide. Les deux échantillons de chaque souche ont été ensuite soniqués et les lysats obtenus ont été purifiés par immuno-précipitation. Un western à la streptavidine couplée à la HRP a été réalisé sur les échantillons purifiés.

La figure 23 nous montre les résultats de l'essai avec le nouveau protocole. Nous avons des signaux à la taille de 30KDa aussi bien pour l'échantillon traité au MTSES que celui non traité pour chacune des quatre souches. Ce qui ne devrait pas être le cas, surtout pour la souche EM9(attHKHK1) dont la protéine ElyC-his ne contient pas

de résidu cystéine. De plus nous observons d'autres signaux à une taille plus grande (environ 48kDa) et auxquels nous ne nous attendions pas. La taille attendue est celle de ElyC-his et est 30kDa. Ces résultats sont difficiles d'interprétation et ne permettent donc pas de déterminer la topologie de ElyC. Ils indiquent des problèmes de spécificités et de pureté. Ces résultats obtenus sont ceux du seul essai que nous avons fait compte tenu du fait que nous tenons à résoudre d'abord ces problèmes de pureté et de spécificité.



**Figure 23** : Essai pour la détermination de la topologie de ElyC.

1: échantillon traité au MTSES et à la Biotine maléimide, 2: échantillon traité uniquement à la Biotine maléimide. A: EM9(attHKHK1), B: EM9(attHKHK2), C: EM9(attHKHK3), et D: EM9(attHKHK4).

### **3.7. Activité du domaine DUF218 au niveau des différents compartiments cellulaires**

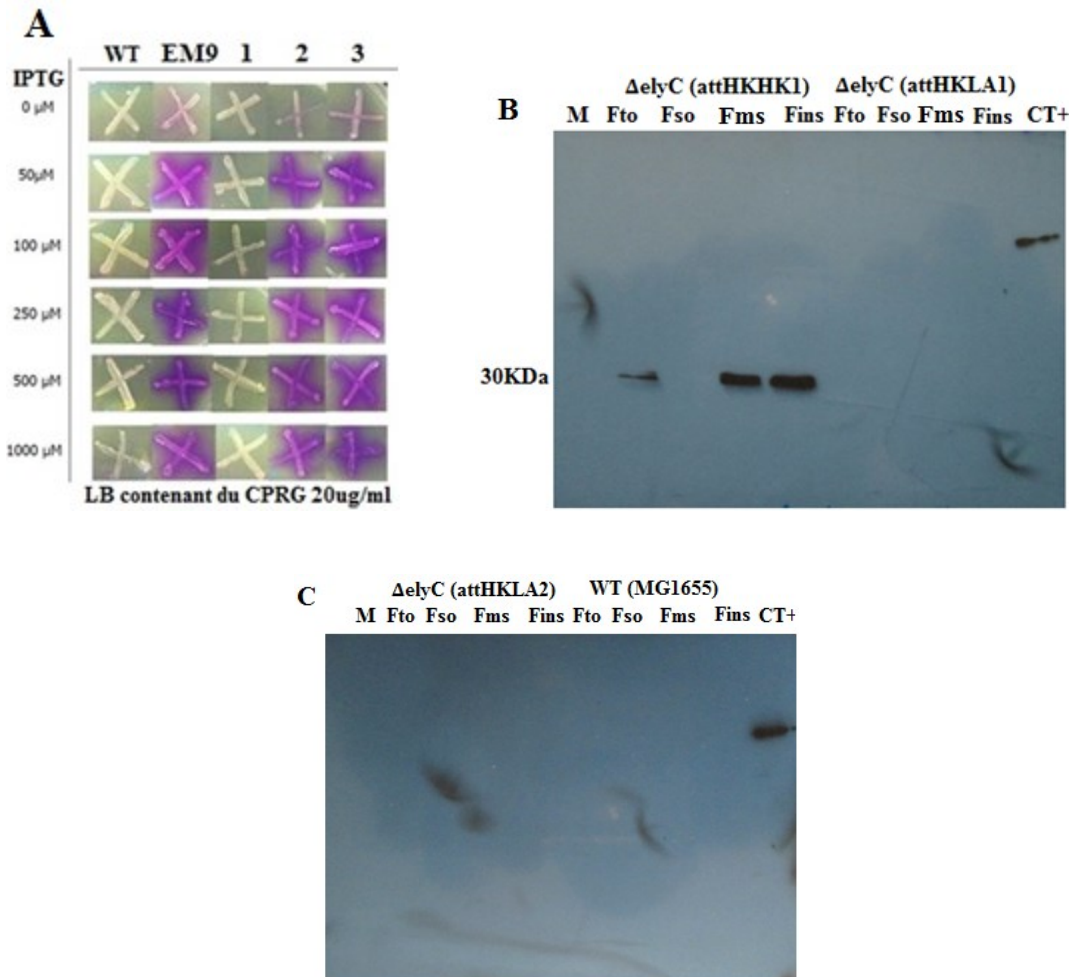
En vue de déterminer dans quel compartiment cellulaire est localisé le domaine DUF218 de ElyC pour en déduire la topologie et étudier son activité, nous avons construit deux souches EM9(attHKLA1) et EM9(attHKLA2) exprimant respectivement DUF218 cytoplasmique et préplasmique. Nous avons d'abord construit les fusions

*duf218-his* et *ssdsbA-duf218-his* sous le promoteur P<sub>lac</sub> pour l'obtention des plasmides pLA1 et pLA2, respectivement. Les plasmides obtenus ont été vérifiés par séquençage, intégrés dans le génome de la souche TB28 par la technique d'intégration du système CRIM et transférés dans le génome de la souche EM9 par transduction avec le phage P<sub>1vir</sub>. Nous avons ensuite réalisé un essai de complémentation sur les deux souches construites à plusieurs concentrations d'IPTG, avec l'essai CPRG.

La figure 24 montre les résultats de l'essai de complémentation réalisé. Ces résultats révèlent que les fusions *duf218-his* et *ssdsbA-duf218-his* contenues dans les souches EM9(attHKLA1) et EM9(attHKLA2), respectivement, (échantillons#2 et #3 de la figure 24-A) ne complémentent pas le phénotype CPRG<sup>+</sup> contrairement à l'échantillon#1 correspondant à la fusion *elyC-his* contenue dans la souche EM9(attHKHK1). Ces résultats suggèrent que les fusions *duf218-his* et *ssdsbA-duf218-his* ne sont pas fonctionnelles *in vivo*, que les séquences protéiques DUF218-his n'ont pas été exprimées, ont été exprimées et dégradées ou encore que le domaine DUF218 seul ne peut pas jouer le rôle de la protéine ElyC toute entière.

Afin de vérifier ces différentes suggestions, nous avons réalisé un western anti-his sur des lysats protéiques extraits des différents compartiments des trois souches EM9(attHKLA1), EM9(attHKLA2) et EM9(attHKHK1) puis de la souche (MG1655) utilisée comme témoin négatif de l'essai. Nous avons utilisé comme témoin positif du western, un échantillon de LpoA-his. Les résultats du western n'ont rien révélé pour les deux souches EM9(attHKLA1), EM9(attHKLA2) par rapport à la souche EM9(attHKHK1), pour laquelle on a observé un signal à la bonne taille (30KDa). Le témoin positif LpoA-his du western a également apparu à la bonne taille et le témoin

négatif (MG1655) de l'essai n'a rien donné comme attendu (voir figure 24 B-C). Ces résultats indiquent un clivage de l'étiquette histidine, une non expression des DUF218-his ou leur dégradation. Les résultats ne sont pas suffisants pour conclure au non fonctionnement des fusions *in vivo*.



**Figure 24:** Les fusions du *duf218-his* et *ssdsbA-duf218-his* sous le promoteur  $P_{lac}$  ne complètent pas le défaut de  $\Delta$ elyC. A : résultats de l'essai de complémentation 1 = EM9(attHKHK1), 2 = EM9(attHKLA1), 3 = EM9(attHKLA2). B-C : résultats de l'essai de western anti-his. CT+ = LpoA-his.

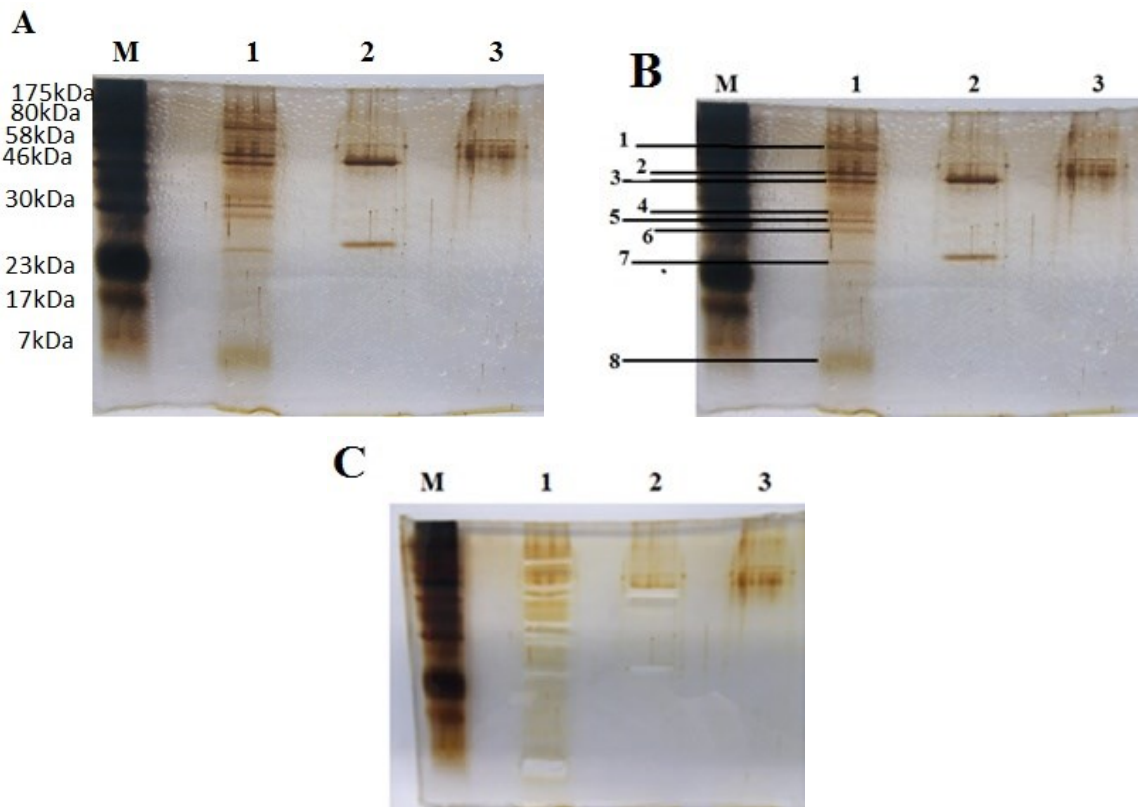
### 3.8 Le facteur ElyC interagit avec des partenaires protéiques

Pour identifier les partenaires protéiques de ElyC, nous avons fait l'essai d'isolement de complexes protéiques par immuno-précipitation sur les extraits membranaires solubilisés de la souche HK2. Mais malheureusement, les résultats de cet essai maintes fois repris, ne nous ont pas permis d'observer la présence d'ElyC-his dans nos échantillons et pas plus ses partenaires protéiques. Ces résultats sont certainement dus à la très faible quantité d'ElyC-his exprimée dans les conditions physiologiques dans la souche HK2 et qui avait déjà été révélée par la complémentation partielle observée lors de l'étude de la sensibilité au chromate de potassium (voir section 3.4).

Comme alternative, nous avons procédé avec la souche EM9(attHKHK1) chez qui la complémentation a été révélée complète en présence d'IPTG à concentration finale de 50 $\mu$ M et chez qui la fusion de l'étiquette histidine a été montrée stable (voir section 3.3, figure 20A-B et section 3.5, figure22). Ainsi, après avoir fait la culture de EM9(attHKHK1) avec de l'IPTG 50 $\mu$ M à 22°C jusqu'à DO<sub>600nm</sub> de 0.5, nous avons extrait et solubilisé les protéines membranaires que nous avons purifiées par immuno-précipitation et précipitées au TCA 72%. Après migration sur gel de polyacrylamide 12%, les protéines du complexe isolé ont été colorées au nitrate d'argent. La souche MG1655 a été utilisée comme témoin négatif.

La figure 25A montre le gel coloré au nitrate d'agent qui révèle la présence de huit bandes dans le puits#1 représentant l'échantillon de la souche EM9(attHKHK1) et de deux bandes dans le puits#2 pour la souche MG1655. Le puits#3 est celui du LpoA-his qui représente le contrôle positif du SDS-PAGE. La figure 25B montre les bandes du puits#1 numérotées. Les poids moléculaires des huit bandes numérotées 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

et 8 du puits#1 sont respectivement 78, 50, 46, 32, 30, 28, 25 et 7kDa. Les deux bandes de la souche MG1655 semblent être de même taille que les bandes de taille 46 et 25 kDa de la souche EM9(attHKHK1). Ces résultats indiquent que les six autres bandes sont spécifiques. Ils suggèrent que le facteur ElyC a des partenaires protéiques. La figure 25C montre le gel après coupure des bandes pour envoi en spectrométrie de masse.



**Figure 25:** Partenaires protéiques de ElyC. (A): gel de polyacrylamide avant la coupure des bandes (1: EM9(attHKHK1), 2: MG1655, 3: LpoA-his 0.1ug). (B): gel montrant les positions des bandes. (C): gel après coupure des bandes.

### 3.9 Les partenaires protéiques de ElyC identifiés

En vue de déterminer les protéines isolées représentant les partenaires de ElyC et d'identifier leurs rôles afin d'en déduire l'implication de ElyC, nous avons extrait chacune

des 8 bandes obtenues suite à l'immuno-précipitation de ElyC-his de l'échantillon EM9(attHKHK1). Nous les avons par la suite envoyées à l'IRCM pour l'analyse en MS et visualisées sur le gel coloré au nitrate d'argent (figure 25). Une fois à l'IRCM, les bandes ont été digérées avec la trypsine et analysées en LC-MS/MS. Les protéines détectées ont été identifiées à partir de la base de données Uniprot de la banque des protéines de *E. coli* K-12.

Le tableau 6 (voir en annexe, page 126) nous présente les différentes protéines identifiées pour chaque bande après l'analyse en MS, à partir de la banque Uniprot de protéines de la souche *E. coli* K-12. Pour chaque bande, on observe un grand nombre de protéines identifiées qui sont de différentes tailles moléculaires. Parmi ces protéines, nous retrouvons notre protéine d'intérêt ElyC avec sa taille moléculaire de 29kDa (30kDa avec étiquette histidine). Plusieurs protéines y compris ElyC se retrouvent dans plusieurs bandes rendant redondante la liste du tableau 6 (voir en annexe). Le tableau 7 en annexe présente la liste non redondante de toutes les protéines identifiées dans les 8 bandes. Pour analyser cette liste nous avons recherché des informations sur la localisation et la fonction de chacune des protéines sur le site EcoCyc (<http://ecocyc.org/>) et dans la base de données de la banque Uniprot. Nous avons ensuite défini des codes de couleur pour les regrouper. La couleur rose désigne les protéines membranaires impliquées dans la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative, et la couleur bleu pâle désigne les protéines membranaires impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne. La couleur vert pâle désigne les protéines membranaires impliquées dans le transport des molécules et ions à travers les membranes. Les couleurs vert foncée et grise désignent respectivement les protéines de la membrane externe et celles de la membrane interne, qui ne sont ni



impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe ni dans la chaîne respiratoire, ou pas directement. Les couleurs jaune et bleu foncée désignent respectivement notre protéine d'intérêt ElyC et les protéines cytoplasmiques.

L'analyse des 100 premiers candidats du tableau 7 (tableau en annexe, page 162) nous indique que les partenaires de ElyC sont constitués à 72% de protéines membranaires (couleurs rose, bleu pâle, vert pâle, vert foncé et gris), à 27% de protéines cytoplasmiques (couleur bleu foncée). Cette analyse nous indique également que près de la moitié des candidats membranaires, soient 26.38% (la couleur bleu pâle) et 20.83% (la couleur rose) des 72% de protéines membranaires, sont respectivement impliqués dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne puis dans la chaîne du transport d'électrons et dans la phosphorylation oxydative. Le restant constitué de 25% (couleur vert pâle) et 27.78% (couleurs vert foncé et gris) des 72% des protéines membranaires sont impliqués respectivement dans le transport des molécules et ions à travers les membranes puis dans d'autres processus biologiques. L'interprétation de ces résultats reste cependant complexe du fait du grand nombre de protéines identifiées par MS et de la présence des protéines cytoplasmiques dans la liste. Néanmoins, ils suggèrent qu'un nombre important des partenaires de ElyC sont des protéines membranaires impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne, dans la chaîne de transport d'électrons et dans la phosphorylation oxydative.

## **4. Discussion**

La problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue de nos jours une préoccupation majeure aux acteurs du système de la santé publique et du monde scientifique. La recherche de nouvelles cibles bactériennes en vue du développement de nouvelles molécules capables de remédier à cette situation est pour l'heure un besoin impérieux. L'enveloppe bactérienne constitue une bonne source de cibles, notamment la paroi cellulaire à cause de son importance pour la survie de la bactérie. La paroi cellulaire assure à la bactérie le maintien de sa forme et de son intégrité. De nombreux travaux en vue de mieux comprendre sa biosynthèse ont été réalisés au cours de ces dernières années. Récemment, les travaux du Dr Catherine Paradis-Bleau et son équipe sur l'enveloppe bactérienne ont conduit à la découverte du facteur ElyC important pour la biosynthèse de la paroi chez *E. coli* à 22°C.

Afin de mieux comprendre le degré d'implication et le mode d'action du facteur ElyC dans ce processus de biologie cellulaire, nous avons fait des essais en vue de déterminer sa topologie. Nous avons isolé ces partenaires protéiques que nous avons identifiés par la spectrométrie de masse.

#### **4.1. Les outils moléculaires**

La restauration de l'intégrité cellulaire et la croissance normale des souches EM9(attHKHK) avec 50µM d'IPTG au même titre que le WT, démontre que la fusion *elyC-his* est fonctionnelle *in vivo* et que l'introduction du gène *elyC* supprime le phénotype de lyse observé chez la souche EM9. La détection du facteur ElyC-his par le western anti-his dans les protéines extraites de la culture de la souche EM9(attHKHK1) avec 50µM d'IPTG démontre que la fusion ElyC-his est stable *in vivo*. Ces résultats d'une part indiquent que ElyC-his fonctionne bien sous le contrôle du promoteur P<sub>lac</sub>

induit avec 50 $\mu$ M d'IPTG et d'autre part concordent avec le lien établi et confirmé entre le gène *elyC* et le phénotype de  $\Delta$ *elyC* par le Dr Paradis-Bleau (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Ils indiquent également que la souche EM9(attHKHK1) et ses variants EM9(attHKHK2), EM9(attHKHK3), et EM9(attHKHK4) qui expriment ElyC-his avec des résidus cystéine, sont bien fonctionnels.

Le variant *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* de la souche HK2 complémente également le phénotype CPRG+ observé dans la souche  $\Delta$ *elyC*. Ce résultat indique que la fusion *elyC-his* fonctionne aussi bien sous le promoteur natif  $P_{elyC}$  et confirme que *elyC-his* est fonctionnel *in vivo*. Les résultats du western anti-his réalisés sur les extraits protéiques de la souche HK2 n'ont pas révélé la présence du facteur ElyC-his dont la présence du gène codant *elyC-his* a été pourtant mise en évidence par séquençage. Ces résultats peuvent être dus à la présence d'une quantité de ElyC-his non détectable par le western du fait d'un faible niveau de fonctionnement de  $P_{elyC}$  transféré dans le génome de EM9. Ceci semble d'ailleurs être confirmé par les résultats de l'étude de la sensibilité au chromate de potassium qui montrent une complémentation partielle du phénotype de la souche EM9 par *P<sub>elyC</sub>::elyC-his* contrairement à *P<sub>lac</sub>::elyC-his* et au WT. Les résultats du séquençage ainsi que ceux des essais de complémentation confirment néanmoins la réussite de l'intégration de *elyC-his-kan* en 3' du gène *elyC* ayant conduit à la construction de HK2.

## **4.2. Le mutant $\Delta$ *elyC* est sensible au chromate de potassium à 22°C**

L'étude de la croissance des souches EM9, HK2, EM9(attHKHK1) et MG1655 en présence du chromate de potassium à 0.12 $\mu$ M à 22°C, démontre que l'inactivation du gène *elyC* dans une souche la rend vulnérable au chromate de potassium et que sa

restauration lui confère une résistance. Ces résultats indiquent l'existence d'un lien entre le gène *elyC* et le stress oxydatif. Ils suggèrent un rôle d'inhibiteur ou de réducteur de l'effet du stress oxydatif au gène *elyC* à 22°C. Cette suggestion semble être vérifiée lorsque on observe que plus il y'a de ElyC exprimé dans une souche, plus cette souche développe une résistance au stress oxydatif. C'est ce qui justifie peut-être le fait que la souche HK2 soit moins résistante et la souche EM9(attHKHK1) plus résistante au chromate de potassium par rapport au WT.

### **4.3 La localisation cellulaire du facteur ElyC et sa topologie**

Les résultats du western anti-his sur les extraits protéiques des fractions cellulaires de la souche EM9(attHKHK1) ont démontré que ElyC est une protéine membranaire. Ces résultats confirment l'hypothèse des analyses bioinformatiques qui avaient indiqué que ElyC est une protéine membranaire possédant deux domaines transmembranaires et un domaine de fonction inconnue DUF218 (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Ils suggèrent donc que ElyC est une protéine de l'enveloppe bactérienne. Le gène *elyC* pourrait peut-être avoir un rôle dans son assemblage car la majorité des protéines qui jouent un rôle dans l'assemblage de l'enveloppe se retrouvent dans la membrane. Étant donné que le phénotype de lyse observé chez la souche EM9 à 22°C est caractéristique de la déstabilisation de l'intégrité de la forme des bactéries, ceci va dans le même sens que l'implication de ElyC dans la biosynthèse du PG déjà démontrée par le Dr Paradis-Bleau. Aussi, comme les protéines impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne agissent majoritairement sous forme de complexes multiprotéiques (Danese & Silhavy, 1998), ElyC pourrait appartenir à un complexe de protéines membranaires pour jouer son rôle.

Les résultats des essais de marquage de cystéine réalisés en vue de déterminer la topologie de ElyC n'ont pas été concluants. Nous avons eu des problèmes avec notre protocole qui utilisait le MTSES et mPEG. Ces problèmes se résument à des difficultés de dissolution de nos échantillons dans du TEC, et à des difficultés de migration de nos échantillons à travers le gel de polyacrylamide. Les difficultés de dissolution sont liées à nos échantillons qui deviennent quelques fois trop sec après l'étape de séchage à l'air libre ou sous la hotte. Les difficultés de migration qui ont été d'ailleurs les plus sérieuses et sont liées au complexe formé par mPEG et les variants ElyC exprimant le résidu cystéine. Ce complexe aurait de la difficulté à migrer à cause du mPEG qui serait un produit qui traverse difficilement les mailles d'un gel de polyacrylamide. Pour remédier à ces difficultés notamment à celles de migration, nous avons essayé plusieurs gels de différents pourcentages d'acrylamide devant permettre le passage de notre complexe à travers des mailles plus grosses. Mais il n'y a pas eu de changement.

Comme alternative, nous avons changé le protocole pour un autre qui utilise les réactifs MTSES, la biotine-maléimide et la HRP couplée à la streptavidine. Le principe de ce protocole n'est pas basé sur une modification du poids moléculaire pour la mise en évidence des variants de ElyC-his qui portent un résidu cystéine, mais sur la formation ou non du complexe Biotine-ElyC détecté par la streptavidine-HRP et révélée par exposition sur film après la mise en contact avec l'ECL. Les essais réalisés suivant ce nouveau protocole n'ont malheureusement pas donné des résultats concluants. Pour ces résultats de western, en plus d'avoir des signaux à la bonne taille de ElyC (30KDa), nous en avons également eu à une taille plus grande (environ 48KDa) que celle de ElyC et ceci pour les trois souches qui contiennent ElyC avec résidu cystéine et même pour la souche

qui contient ElyC sans cystéine. Cela signifie qu'il y'a un problème de spécificité d'une part et de pureté d'autre part, rendant ainsi les résultats difficiles à interpréter. Problème de spécificité parce que pour la souche exprimant ElyC sans résidu cystéine, il n'y aura pas formation du complexe Biotine-ElyC et donc pas de fixation de streptavidine-HRP et, par conséquent, pas de production de lumière lors de l'incubation dans du ECL qui va conduire à l'observation de signaux à la taille de ElyC (30KDa). Il y a problème de pureté à cause de la présence des signaux à une taille 48KDa différente de la taille de ElyC. Ceci indique la présence dans nos échantillons purifiés, d'une autre protéine qui porte de résidu cystéine et dont la taille est peut-être de 48KDa. Nous avons pensé que ces problèmes peuvent être liés à notre technique de purification par immuno-précipitation qui utilise les billes de protéine G et l'anticorps anti-his.

Pour y remédier, nous avons commencé par régler le problème de pureté en changeant notre technique de purification par immuno-précipitation par celle qui utilise la colonne de nickel. Mais là encore les essais en vue d'optimiser la technique avant de l'utiliser pour notre expérience de marquage, ont posé d'autres difficultés : celles de l'élution. En effet pour les colonnes de nickel Ni NTA de la compagnie "Qiagen" que nous avons utilisée, les différentes concentrations d'imidazole en mM (50, 100, 250, 500, 750) essayées n'ont pas permis de résoudre le problème. Nous continuons de travailler là-dessus.

Les essais réalisés avec les souches EM9(attHKLA1) et EM9(attHKLA2) exprimant respectivement DUF218 cytoplasmique et prériplasmique, en vue de déterminer l'activité du domaine DUF218 dans la fonction d'ElyC et en déduire sa localisation cellulaire, n'ont pas été aussi concluants. Les résultats des essais de

complémentation réalisés sur les deux souches EM9(attHKLA1) et EM9(attHKLA2) ont révélé que la fusion *duf218-his* n'est pas fonctionnelle *in vivo* ou que le DUF218 ne peut seul accomplir la fonction de ElyC. Par ailleurs, le western anti-his réalisé sur les fractions protéiques cellulaires extraites chez les deux souches, n'a rien révélé. Ces résultats du western anti-his analysés ensemble avec ceux des essais de complémentation indiquent plutôt une non expression de DUF218-his ou sa dégradation. Ils ne pourront donc pas nous permettre de justifier une activité ou non du DUF218 dans la fonction de ElyC, ni de déterminer sa localisation cellulaire.

#### **4.4 Plusieurs partenaires protéiques de ElyC sont des protéines membranaires**

Les résultats de l'analyse MS ont révélé que le facteur ElyC possède de potentiels partenaires protéiques en majorité des protéines membranaires impliquées dans l'assemblage de l'enveloppe bactérienne, dans la chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative. Ces résultats suggèrent donc que ElyC est impliqué dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne, dans la chaîne de transport d'électrons et dans la phosphorylation oxydative. Ceci est en parfaite corrélation avec les résultats de la localisation cellulaire de ElyC qui avaient indiqué que le facteur ElyC est une protéine membranaire qui jouerait un rôle dans l'assemblage de l'enveloppe et dont les partenaires seront aussi des protéines membranaires. Ils sont également en concordance avec les résultats de l'étude de la sensibilité du mutant  $\Delta$ *elyC* en présence du chromate de potassium qui avaient établi l'existence d'un lien entre le facteur ElyC et le stress oxydatif, un processus lié au transport d'électrons.



L'identification des partenaires potentiels de ElyC à partir de la liste du tableau 7 (en annexe) reste cependant complexe à cause du grand nombre de partenaires obtenus par bande coupée du gel avec des poids moléculaires très variés et différents de celui de la bande sur gel. Reprendre en réalisant plus de contrôles négatifs pour notre technique d'isolement des complexes ElyC et partenaires, par exemple en ajoutant un contrôle négatif pour l'étape d'immuno-précipitation permettrait sûrement de réduire la liste. Inclure l'analyse de MS sur les bandes de l'échantillon du WT permettrait aussi d'éliminer les protéines qui se retrouvent à la fois dans le contrôle négatif et dans notre échantillon de la souche EM9(attHKHK1).

Les résultats de la spectrométrie ont également révélé la présence des protéines cytoplasmiques parmi la liste des partenaires de ElyC. La présence de ces protéines constitue un facteur qui rend complexe l'analyse de ces résultats. En effet, nous ne devrions pas avoir des protéines cytoplasmiques (ex: protéine ribosomale) dans la liste des partenaires étant donné que l'isolement des complexes ElyC-partenaires a été fait à partir de la fraction protéique membranaire de la souche EM9(attHKHK1). Cette présence est peut-être due à notre technique de centrifugation lors de l'étape de séparation des fractions protéiques cellulaires.

Comme stratégie en vue de l'amélioration des résultats qui seront obtenus à la reprise de l'expérience, nous avons apporté des changements à notre protocole. Nous avons ainsi inclus en plus du contrôle négatif constitué par le WT (souche exprimant ElyC sans l'étiquette histidine), un contrôle négatif d'immuno-précipitation qui sera réalisé sans l'anticorps anti-his sur un échantillon EM9(attHKHK1) (souche qui exprime ElyC avec l'étiquette histidine). Nous avons aussi inclus une première centrifugation de

15min à faible vitesse (450xg) du lysat protéique après l'étape d'ajout du mélange (ADNase + MgCl<sub>2</sub>) et d'incubation sur glace. Cette centrifugation va permettre d'éliminer en majorité les gros débris cellulaires notamment les ribosomes cytoplasmiques, ce qui devrait éliminer la présence des protéines cytoplasmiques de la liste des partenaires qui seront isolés. Après cette première centrifugation, va suivre celle à grande vitesse sur le surnageant obtenu. Ce changement a été déjà essayé et nous a permis de constater par western une augmentation de ElyC dans les extraits membranaires solubilisés. Aussi lors de la reprise de l'expérience, l'analyse de MS sera réalisée en "gel free" et au même moment sur les trois échantillons (échantillon contenant ElyC-his, contrôles négatifs : WT, contrôle négatif d'immuno-précipitation). Ceci permettra de réduire la liste des partenaires de ElyC.

## **5. Conclusion et perspectives**

Les résultats de ces travaux nous ont permis de démontrer que le facteur ElyC est localisé dans la portion membranaire chez *E. coli*. Ils ont également permis de confirmer que le mutant  $\Delta elyC$  est sensible au chromate de potassium. Aussi ils nous ont démontré que le facteur ElyC possède de très nombreux candidats de partenaires protéiques qui sont des protéines membranaires impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne, dans la chaîne de transport d'électrons et dans la phosphorylation oxydative, des processus essentiels dans la vie des cellules bactériennes. Malheureusement les essais en vue de déterminer la topologie d'ElyC n'ont pas été concluants. Les difficultés de dissolution dans le TEC des échantillons préparés par le MTSES et le mPEG et celles de leur migration à travers le gel de polyacrylamides sont en partie les raisons qui justifient ces résultats non concluants. Les problèmes de pureté observés avec les échantillons préparés à partir du nouveau protocole constituent également des raisons ayant conduit à ces résultats. Mais ce deuxième protocole semble meilleur par rapport au premier parce que ayant permis d'observer des signaux facilement et clairement contrairement au premier avec lequel les signaux étaient difficilement observable. Une amélioration donc de ce protocole à travers l'optimisation de son étape de purification serait une solution possible pour l'atteinte de cet objectif.

Par ailleurs, les résultats satisfaisants obtenus confirment l'importance du facteur ElyC dans la vie de la cellule bactérienne. Il serait donc important que ces travaux puissent être continués en vue de déterminer la topologie de ElyC, de confirmer ses partenaires protéiques, de déterminer son mécanisme d'interaction avec ces derniers et enfin son degré d'implication dans l'assemblage de l'enveloppe bactérienne et dans le stress oxydatif. Ce qui va aboutir à long terme à une meilleure compréhension de

l'assemblage de l'enveloppe bactérienne, à l'identification de nouvelles cibles bactériennes qui conduirait à la mise au point de nouveaux agents antibactériens et tout ceci va concourir au bien être de l'humanité.

## **6. Bibliographie**

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., . . . Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2, 2006 0008. doi: 10.1038/msb4100050
- Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., & Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 168-207. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x
- Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. *Bacteriol Rev*, 16(1), 1-29.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in E. coli. *Mol Cell* 18, 555-564.
- Bos, M. P., & Tommassen, J. (2004). Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol*, 7(6), 610-616. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.011
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64, 29-63. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333
- Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., & Poyart, C. (2009). Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature*, 458(7234), 83-86. doi: 10.1038/nature07772
- Brisson-Noel, A., Trieu-Cuot, P., Sougakoff, W., & Courvalin, P. (1989). [Current aspects of bacterial resistance to antibiotics]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 47(2), 98-101.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 86, pp. 2172-2175.

- Costerton, J. W., Ingram, J. M., & Cheng, K. J. (1974). Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev*, 38(1), 87-110.
- Dalbey, R. E., Wang, P., & Kuhn, A. (2011). Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu Rev Biochem*, 80, 161-187. doi: 10.1146/annurev-biochem-060409-092524
- Danese, P. N., & Silhavy, T. J. (1998). Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, 32, 59-94. doi: 10.1146/annurev.genet.32.1.59
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L.(2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(12):6640-5.
- El Zoeiby, A., Sanschagrín, F., & Levesque, R. C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol*, 47(1), 1-12.
- Facey, S. J., & Kuhn, A. (2010). Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 67(14), 2343-2362. doi: 10.1007/s00018-010-0303-0
- Guyer, M.S., Reed, R. E., Steitz, T., Low, K.B.(1981). Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spr.Harb.Symp.Quant.Biol.* 45:135-140
- Haldimann, A., & Wanner, B. L. (2001). Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol*, 183(21), 6384-6393. doi: 10.1128/JB.183.21.6384-6393.2001
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., and Shevchenko, A. (2003). *Anal. Chem* (75)1300–1306



- Holtje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 181-203.
- Hu, P., Janga, S. C., Babu, M., Diaz-Mejia, J. J., Butland, G., Yang, W., . . . Emili, A. (2009). Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol*, 7(4), e96. doi: 10.1371/journal.pbio.1000096
- Huijbregts, R. P., de Kroon, A. I., & de Kruijff, B. (2000). Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1469(1), 43-61.
- Kouidmi, I., Levesque, R. C., & Paradis-Bleau, C. (2014). The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Mol Microbiol*, 94(2), 242-253. doi: 10.1111/mmi.12758
- Lehrer, J., Vigeant, K.A., Tatar, L.D., and Miguel A.(2007). Functional Characterization and Membrane Topology of *Escherichia coli* WecA, a Sugar-Phosphate Transferase Initiating the Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen and O-Antigen Lipopolysaccharide .Valvano *J. Bacteriol.* 2007, 189(7):2618. DOI: 10.1128/JB.01905-06 ")
- Lopes, J., Gottfried, S., Rothfield, L. (1972). Leakage of periplasmic enzymes by mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: isolation of “periplasmic leaky” mutants. *J Bacteriol* 109: 520–525.
- Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreteau, H., Mengin-Lecreulx, D., & Touze, T. (2014). Deciphering the metabolism of undecaprenyl-phosphate: the bacterial cell-wall unit carrier at the membrane frontier. *Microb Drug Resist*, 20(3), 199-214. doi: 10.1089/mdr.2014.0035

- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(1), 174-229.
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Gumbart, J. C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N. C., . . . Buchanan, S. K. (2013). Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, 501(7467), 385-390. doi: 10.1038/nature12521
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R., & Livermore, D. M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*, 19(12), 588-595. doi: 10.1016/j.tim.2011.09.005
- Pang, T., Christos, G., Savvab, C., Flemingd, K.G., Strucka,D.K., and Younga, R.(2009).Structure of the lethal phage pinhole. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(45): p. 18966-18971.
- Paquet-Bouchard, C. (2006). *Caractérisation moléculaire de la protéine antibiotique PI du phage AP205*. Repéré à <http://www.theses.ulaval.ca/2006/24064/>
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T. J., Walker, S., Kahne, D.E., & Bernhardt, T. G. (2010).Lipoprotein Cofactors Located in the Outer Membrane Activate Bacterial Cell Wall Polymerases. 10.1016/j.cell.2010.11.037
- Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A., & Bernhardt, T. G. (2014). A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet*, 10(1), e1004056. doi: 10.1371/journal.pgen.1004056

- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., . . . et al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8(2), 217-225.
- Ruiz, N., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 4(1), 57-66. doi: 10.1038/nrmicro1322
- Sankaran, K., & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem*, 269(31), 19701-19706.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 234-258. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x
- Scheffers, D. J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(4), 585-607. doi: 10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005
- Sham, L. T., Butler, E. K., Lebar, M. D., Kahne, D., Bernhardt, T. G., & Ruiz, N. (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*, 345(6193), 220-222. doi: 10.1126/science.1254522
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Szalo, I. M., Taminiau, B., Mainil, J. (2006). Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Ann Méd Vét*, 150, 108-124.

- Tokuda, H. (2009). Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(3), 465-473. doi: 10.1271/bbb.80778
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, 10(2), 123-136. doi: 10.1038/nrmicro2677
- van Geest, M., & Lolkema, J. S. (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1), 13-33.
- van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 11(3), 25R-36R.
- Vollmer, W., & Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9), 1714-1734. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.06.007
- Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 149-167. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Wang, X., & Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*, 49(2), 97-107. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.002
- Wientjes, F. B., Pas, E., Taschner, P. E., & Woldringh, C. L. (1985). Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol*, 164(1), 331-337.

World Health Organization., & World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance : global report on surveillance.(In IRIS)*. Geneva: World Health Organization.

Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Court, D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), 5978-5983. doi: 10.1073/pnas.100127597

## **7. Annexes**

## **7.1. Extraction de l'ADN plasmidique ou miniprep**

Pour ce travail, nous avons utilisé deux différents kits de miniprep (purification d'ADN) : le premier celui de Biobasic, nous donnait une faible qualité de purification et le second celui de Fermentas, nous donnait une très bonne qualité d'ADN purifié. Nous avons dû continuer avec le kit GeneJET#K0503 de Fermentas. On inocule une colonie de la souche qui contient le plasmide à extraire dans 5mL de LB liquide avec antibiotique et on l'incube à la température appropriée pendant 24H sous agitation à 250tr/mn. Le volume total de la culture est ensuite centrifugé à 12.000tr/mn pendant 2min à la température pièce. Le culot obtenu est suspendu dans 250ul de la solution de resuspension (contient de la ribonucléase) et bien mélangé. On y ajoute 250ul de la solution de lyse (contient de l'hydroxyde de sodium), on mélange délicatement par retournement 4 à 6 fois et incube à température pièce pendant 5min. On y ajoute ensuite 350ul de la solution de neutralisation (contient de l'hydrochloride de guanidine) et on le mélange immédiatement à nouveau par retournement 4 à 6 fois. Le mélange est centrifugé à 12.000tr/mn pendant 5min et le surnageant transféré sur la colonne par pipetage puis centrifugé pendant 1mn. La colonne est ensuite transférée sur un nouveau tube et on y ajoute 500ul de la solution de lavage préalablement diluée avec l'éthanol lors de la première utilisation. On centrifuge pendant 1min puis on reprend le lavage une deuxième fois. On fait une dernière centrifugation de la colonne pendant 1min. Les plasmides destinés à l'électroporation et à l'électrophorèse sont élués avec 30ul d'eau. Ceux qui sont destinés à d'autres utilisations sont élués avec le tampon d'élution (Tris-HCl, pH 8) fourni dans le kit.

## 7.2. Conservation des souches.

La souche à conserver est ensemencée sur le milieu solide avec ou sans antibiotique et incubée à la température adéquate (30°C ou 37°C) pendant 24H. Le lendemain on inocule 4mL de milieu LB liquide avec une colonie bien isolée, puis on l'incube à la température appropriée. Le surlendemain on ajoute du glycérol stérile à raison de 15% à la culture soit 1.2mL de glycérol 40% stérile pour 2mL de culture. A l'aide de micropipètes et des embouts avec filtre stériles, on transfère 1mL x 2 du mélange culture-glycérol de dans deux tubes à congélation préalablement bien étiquetés. Les tubes sont ensuite rangés dans des boîtes réservées à cet effet et gardées à -80°C. Il est important de manipuler à côté de la flamme et de changer d'embout entre deux souches différentes pour éviter les contaminations.

Tableau 6 : liste de protéines identifiées par bande après l'analyse par spectrométrie de masse. (GN : «Gène Name», PE : «Protéine Existence», SV : «Sequence Version»).

N°	Protéines identifiées dans la bande 1	Nombre d'accession	Taille
01	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1	BAMA_ECOLI	91 kDa
02	Quinoprotein glucose dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gcd PE=1 SV=3	DHG_ECOLI	87 kDa
03	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4	NUOG_ECOLI	100 kDa
04	Penicillin-binding protein 1B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrcB PE=1 SV=2	PBPB_ECOLI	94 kDa
05	Penicillin-binding protein 1A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrcA PE=1 SV=1	PBPA_ECOLI	94 kDa
06	LPS-assembly protein LptD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptD PE=1 SV=2	LPTD_ECOLI	90 kDa



07	Formate dehydrogenase-O major subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdoG PE=1 SV=5	FDOG_ECOLI	113 kDa
08	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
09	Elongation factor G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fusA PE=1 SV=2	EFG_ECOLI	78 kDa
10	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceF PE=1 SV=3	ODP2_ECOLI	66 kDa
11	Magnesium-transporting ATPase, P-type 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mgtA PE=1 SV=1	ATMA_ECOLI	99 kDa
12	Protein translocase subunit SecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secA PE=1 SV=2	SECA_ECOLI	102 kDa
13	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
14	Uncharacterized protein YebT OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yebT PE=3 SV=2	YEBT_ECOLI	95 kDa
15	Acyl-coenzyme A dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fadE PE=2 SV=2	FADE_ECOLI	89 kDa
16	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceE PE=1 SV=2	ODP1_ECOLI	100 kDa
17	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
18	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pnp PE=1 SV=3	PNP_ECOLI	77 kDa
19	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
20	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
21	PTS system glucose-specific EIICB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsG PE=1 SV=1	PTGCB_ECOLI	51 kDa

22	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
23	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydA PE=1 SV=1	CYDA_ECOLI	58 kDa
24	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pheT PE=1 SV=2	SYFB_ECOLI	87 kDa
25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpoC PE=1 SV=1	RPOC_ECOLI	155 kDa
26	RNA polymerase-associated protein RapA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rapA PE=1 SV=2	RAPA_ECOLI	110 kDa
27	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mdoH PE=1 SV=1	OPGH_ECOLI	97 kDa
28	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpoB PE=1 SV=1	RPOB_ECOLI	151 kDa
29	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
30	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucA PE=1 SV=1	ODO1_ECOLI	105 kDa
31	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
32	Aconitate hydratase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=acnB PE=1 SV=3	ACON2_ECOLI	94 kDa
33	Alanine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=alaS PE=1 SV=2	SYA_ECOLI	96 kDa
34	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadC PE=1 SV=1	GADC_ECOLI	55 kDa
35	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
36	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
37	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine	METE_ECOLI	85 kDa

	methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=metE PE=1 SV=6		
38	Membrane protein insertase YidC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yidC PE=1 SV=2	YIDC_ECOLI	62 kDa
39	Signal recognition particle receptor FtsY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsY PE=1 SV=1	FTSY_ECOLI	55 kDa
40	NADP-dependent malic enzyme OS=Escherichia coli (strain K12) GN=maeB PE=1 SV=1	MAO2_ECOLI	82 kDa
41	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
42	Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppsA PE=1 SV=5	PPSA_ECOLI	87 kDa
43	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=narG PE=1 SV=4	NARG_ECOLI	140 kDa
44	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoC PE=1 SV=3	NUOCD_ECOLI	68 kDa
45	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nagE PE=3 SV=1	PTW3C_ECOLI	68 kDa
46	Phosphate acetyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pta PE=1 SV=2	PTA_ECOLI	77 kDa
47	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
48	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMPF_ECOLI	39 kDa
49	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
50	NADH-quinone oxidoreductase subunit F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoF PE=1 SV=3	NUOF_ECOLI	49 kDa
51	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fecA PE=1 SV=2	FECA_ECOLI	85 kDa
52	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia	BAMC_ECOLI	37 kDa

	coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1		
53	Aminopeptidase N OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pepN PE=1 SV=2	AMPN_ECOLI	99 kDa
54	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpD PE=1 SV=3	GLPD_ECOLI	57 kDa
55	Lon protease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lon PE=1 SV=1	LON_ECOLI	87 kDa
56	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
57	DNA gyrase subunit A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gyrA PE=1 SV=1	GYRA_ECOLI	97 kDa
58	Multidrug efflux pump subunit AcrB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=acrB PE=1 SV=1	ACRB_ECOLI	114 kDa
59	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
60	Catalase HPII OS=Escherichia coli (strain K12) GN=katE PE=1 SV=1	CATE_ECOLI	84 kDa
61	Uncharacterized lipoprotein YfhM OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfhM PE=3 SV=1	YFHM_ECOLI	182 kDa
62	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pntA PE=1 SV=2	PNTA_ECOLI	55 kDa
63	Protein translocase subunit SecD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secD PE=1 SV=1	SECD_ECOLI	67 kDa
64	Protease 4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sppA PE=1 SV=2	SPPA_ECOLI	67 kDa
65	Penicillin-binding protein activator LpoA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoA PE=1 SV=1	LPOA_ECOLI	73 kDa
66	PTS system trehalose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=treB PE=1 SV=4	PTTBC_ECOLI	51 kDa
67	Inner membrane protein YjiY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjiY PE=1 SV=2	YJIY_ECOLI	77 kDa
68	Cytoskeleton protein RodZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rodZ PE=1 SV=2	RODZ_ECOLI	36 kDa
69	Uncharacterized lipoprotein YgeR OS=Escherichia coli (strain K12)	YGER_ECOLI	27 kDa

	GN=ygeR PE=3 SV=2		
70	Ribonuclease E OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rne PE=1 SV=6	RNE_ECOLI	118 kDa
71	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
72	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
73	Protein YdgA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydgA PE=1 SV=1	YDGA_ECOLI	55 kDa
74	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1	OMPC_ECOLI	40 kDa
75	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
76	Protein translocase subunit SecY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secY PE=1 SV=1	SECY_ECOLI	49 kDa
77	DNA gyrase subunit B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gyrB PE=1 SV=2	GYRB_ECOLI	90 kDa
78	Transcription termination factor Rho OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rho PE=1 SV=1	RHO_ECOLI	47 kDa
79	ATP-dependent RNA helicase DeaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=deaD PE=1 SV=2	DEAD_ECOLI	71 kDa
80	Modulator of FtsH protease HflC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hflC PE=1 SV=1	HFLC_ECOLI	38 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 2</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
02	Protein YdgA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydgA PE=1 SV=1	YDGA_ECOLI	55 kDa
03	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpD PE=1 SV=3	GLPD_ECOLI	57 kDa
04	Membrane protein insertase YidC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yidC PE=1 SV=2	YIDC_ECOLI	62 kDa

05	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpdA PE=1 SV=2	DLDH_ECOLI	51 kDa
06	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
07	Protein translocase subunit SecD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secD PE=1 SV=1	SECD_ECOLI	67 kDa
08	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
09	PTS system mannitol-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mtIA PE=1 SV=1	PTM3C_ECOLI	68 kDa
10	Trigger factor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tig PE=1 SV=1	TIG_ECOLI	48 kDa
11	Glycerol kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpK PE=1 SV=2	GLPK_ECOLI	56 kDa
12	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=msbA PE=1 SV=1	MSBA_ECOLI	64 kDa
13	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsH PE=1 SV=1	FTSH_ECOLI	71 kDa
14	Lactaldehyde dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aldA PE=1 SV=2	ALDA_ECOLI	52 kDa
15	Inner membrane protein YejM OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yejM PE=1 SV=1	YEJM_ECOLI	67 kDa
16	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyladenosine synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=miaB PE=1 SV=1	MIAB_ECOLI	54 kDa
17	Pyruvate kinase I OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pykF PE=1 SV=1	KPYK1_ECOLI	51 kDa
18	Cytoskeleton protein RodZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rodZ PE=1 SV=2	RODZ_ECOLI	36 kDa
19	Outer membrane protein TolC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolC PE=1 SV=3	TOLC_ECOLI	54 kDa
20	Pyruvate kinase II OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pykA PE=1 SV=3	KPYK2_ECOLI	51 kDa
21	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia	BAMA_ECOLI	91 kDa

	coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1		
22	Malate:quinone oxidoreductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mqo PE=1 SV=2	MQO_ECOLI	60 kDa
23	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadC PE=1 SV=1	GADC_ECOLI	55 kDa
24	Penicillin-binding protein activator LpoA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoA PE=1 SV=1	LPOA_ECOLI	73 kDa
25	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
26	Cell division protein DamX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=damX PE=1 SV=2	DAMX_ECOLI	46 kDa
27	Inner membrane protein YjiY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjiY PE=1 SV=2	YJIY_ECOLI	77 kDa
28	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
29	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
30	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
31	PTS system fructose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fruA PE=3 SV=1	PTFBC_ECOLI	58 kDa
32	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
33	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
34	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
35	Aldehyde dehydrogenase B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aldB PE=1 SV=2	ALDB_ECOLI	56 kDa
36	ATP-binding/permease protein CydD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydD PE=1 SV=3	CYDD_ECOLI	65 kDa

37	Ribonuclease E OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rne PE=1 SV=6	RNE_ECOLI	118 kDa
38	Glutamine synthetase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glnA PE=1 SV=2	GLNA_ECOLI	52 kDa
39	ATP-binding/permease protein CydC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydC PE=3 SV=2	CYDC_ECOLI	63 kDa
40	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
41	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydA PE=1 SV=1	CYDA_ECOLI	58 kDa
42	Glutamate decarboxylase alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadA PE=1 SV=1	DCEA_ECOLI (+1)	53 kDa
43	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMPF_ECOLI	39 kDa
44	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pntA PE=1 SV=2	PNTA_ECOLI	55 kDa
45	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
46	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
47	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2	RS2_ECOLI	27 kDa
48	Probable phospholipid ABC transporter-binding protein MlaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mlaD PE=1 SV=1	MLAD_ECOLI	20 kDa
49	Probable transcriptional regulatory protein YebC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yebC PE=1 SV=1	YEBC_ECOLI	26 kDa
50	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
51	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1	BAMC_ECOLI	37 kDa
52	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain	LPP_ECOLI	8 kDa



	K12) GN=lpp PE=1 SV=1		
53	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mdoH PE=1 SV=1	OPGH_ECOLI	97 kDa
54	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
55	PTS system glucose-specific EIICB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsG PE=1 SV=1	PTGCB_ECOLI	51 kDa
56	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4	NUOG_ECOLI	100 kDa
57	Uncharacterized protein YaiW OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yaiW PE=4 SV=1	YAIW_ECOLI	40 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 3</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
02	Outer membrane protein TolC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolC PE=1 SV=3	TOLC_ECOLI	54 kDa
03	PTS system glucose-specific EIICB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsG PE=1 SV=1	PTGCB_ECOLI	51 kDa
04	NADH-quinone oxidoreductase subunit F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoF PE=1 SV=3	NUOF_ECOLI	49 kDa
05	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
06	Apolipoprotein N-acyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=Int PE=1 SV=1	LNT_ECOLI	57 kDa
07	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=potA PE=1 SV=1	POTA_ECOLI	43 kDa
08	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
09	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatZ PE=1 SV=1	GATZ_ECOLI	47 kDa
10	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12)	OMPF_ECOLI	39 kDa

	GN=ompF PE=1 SV=1		
11	Inner membrane protein YbaL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybaL PE=1 SV=2	YBAL_ECOLI	59 kDa
12	Enolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=eno PE=1 SV=2	ENO_ECOLI	46 kDa
13	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsH PE=1 SV=1	FTSH_ECOLI	71 kDa
14	Transcription termination factor Rho OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rho PE=1 SV=1	RHO_ECOLI	47 kDa
15	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydA PE=1 SV=1	CYDA_ECOLI	58 kDa
16	Maltoporin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lambB PE=1 SV=1	LAMB_ECOLI	50 kDa
17	Glycerol kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpK PE=1 SV=2	GLPK_ECOLI	56 kDa
18	ATP-dependent RNA helicase DeaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=deaD PE=1 SV=2	DEAD_ECOLI	71 kDa
19	Adenylosuccinate synthetase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=purA PE=1 SV=2	PURA_ECOLI	47 kDa
20	D-amino acid dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dadA PE=1 SV=1	DADA_ECOLI	48 kDa
21	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1	BAMA_ECOLI	91 kDa
22	Biotin carboxylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accC PE=1 SV=2	ACCC_ECOLI	49 kDa
23	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
24	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=clpX PE=1 SV=2	CLPX_ECOLI	46 kDa
25	Cytoskeleton protein RodZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rodZ PE=1 SV=2	RODZ_ECOLI	36 kDa
26	ATP-dependent RNA helicase RhlB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rhlB PE=1 SV=2	RHLB_ECOLI	47 kDa
27	NAD(P) transhydrogenase subunit beta OS=Escherichia coli (strain	PNTB_ECOLI	49 kDa

	K12) GN=pntB PE=1 SV=1		
28	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gnd PE=1 SV=2	6PGD_ECOLI	51 kDa
29	Metalloprotease PmbA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pmbA PE=1 SV=1	PMBA_ECOLI	48 kDa
30	Isocitrate lyase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceA PE=1 SV=1	ACEA_ECOLI	48 kDa
31	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
32	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
33	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hslU PE=1 SV=1	HSLU_ECOLI	50 kDa
34	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pntA PE=1 SV=2	PNTA_ECOLI	55 kDa
35	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Escherichia coli (strain K12) GN=icd PE=1 SV=1	IDH_ECOLI	46 kDa
36	Asparagine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=asnS PE=1 SV=2	SYN_ECOLI	53 kDa
37	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1	TNAA_ECOLI	53 kDa
38	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
39	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
40	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
41	ATP-dependent RNA helicase RhIE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rhIE PE=1 SV=3	RHLE_ECOLI	50 kDa
42	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2	RS4_ECOLI	23 kDa
43	Serine hydroxymethyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyA PE=1 SV=1	GLYA_ECOLI	45 kDa

44	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
45	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadC PE=1 SV=1	GADC_ECOLI	55 kDa
46	Citrate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glTA PE=1 SV=1	CISY_ECOLI	48 kDa
47	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1	OMPC_ECOLI	40 kDa
48	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
49	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
50	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
51	DNA gyrase subunit B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gyrB PE=1 SV=2	GYRB_ECOLI	90 kDa
52	Cell division protein DamX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=damX PE=1 SV=2	DAMX_ECOLI	46 kDa
53	UPF0053 inner membrane protein YtfL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ytfL PE=1 SV=1	YTFL_ECOLI	50 kDa
54	Periplasmic serine endoprotease DegP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=degP PE=1 SV=1	DEGP_ECOLI	49 kDa
55	Magnesium-transporting ATPase, P-type 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mgtA PE=1 SV=1	ATMA_ECOLI	99 kDa
56	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
57	Bifunctional protein GlmU OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glmU PE=1 SV=1	GLMU_ECOLI	49 kDa
58	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1	RL17_ECOLI	14 kDa
59	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
60	Inner membrane protein YjiY OS=Escherichia coli (strain K12)	YJIY_ECOLI	77 kDa

	GN=yjiY PE=1 SV=2		
61	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
62	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
63	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
64	LPS-assembly protein LptD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptD PE=1 SV=2	LPTD_ECOLI	90 kDa
65	PTS system trehalose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=treB PE=1 SV=4	PTTBC_ECOLI	51 kDa
66	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nagE PE=3 SV=1	PTW3C_ECOLI	68 kDa
67	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolB PE=1 SV=1	TOLB_ECOLI	46 kDa
68	Protein translocase subunit SecY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secY PE=1 SV=1	SECY_ECOLI	49 kDa
69	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
70	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fecA PE=1 SV=2	FECA_ECOLI	85 kDa
71	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoC PE=1 SV=3	NUOCD_ECOLI	68 kDa
72	Low conductance mechanosensitive channel YnaI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ynaI PE=1 SV=1	YNAI_ECOLI	39 kDa
73	Protein translocase subunit SecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secA PE=1 SV=2	SECA_ECOLI	102 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 4</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMPF_ECOLI	39 kDa
02	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12)	OMPC_ECOLI	40 kDa

	GN=ompC PE=1 SV=1		
03	Modulator of FtsH protease HfIC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfIC PE=1 SV=1	HFLC_ECOLI	38 kDa
04	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1	BAMC_ECOLI	37 kDa
05	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
06	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
07	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
08	Protease 7 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompT PE=1 SV=1	OMPT_ECOLI	36 kDa
09	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppD PE=3 SV=2	OPPD_ECOLI	37 kDa
10	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
11	Membrane-bound lytic murein transglycosylase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mltA PE=1 SV=1	MLTA_ECOLI	40 kDa
12	Signal peptidase I OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lepB PE=1 SV=2	LEP_ECOLI	36 kDa
13	Chain length determinant protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=wzzB PE=1 SV=2	WZZB_ECOLI	36 kDa
14	Modulator of FtsH protease HfIK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfIK PE=1 SV=1	HFLK_ECOLI	46 kDa
15	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
16	Uncharacterized protein YaiW OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yaiW PE=4 SV=1	YAIW_ECOLI	40 kDa
17	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
18	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF OS=Escherichia	OPPF_ECOLI	37 kDa

	coli (strain K12) GN=oppF PE=3 SV=1		
19	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1	BAMA_ECOLI	91 kDa
20	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadC PE=1 SV=1	GADC_ECOLI	55 kDa
21	Probable protease SohB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sohB PE=1 SV=1	SOHB_ECOLI	39 kDa
22	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
23	Glycerol-3-phosphate transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpT PE=1 SV=1	GLPT_ECOLI	50 kDa
24	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2	RS4_ECOLI	23 kDa
25	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsH PE=1 SV=1	FTSH_ECOLI	71 kDa
26	Low-affinity putrescine importer PlaP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=plaP PE=1 SV=1	PLAP_ECOLI	50 kDa
27	Rod shape-determining protein MreB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mreB PE=1 SV=1	MREB_ECOLI	37 kDa
28	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdoH PE=1 SV=1	FDOH_ECOLI	33 kDa
29	PTS system glucose-specific EIICB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsG PE=1 SV=1	PTGCB_ECOLI	51 kDa
30	Cell division protein FtsN OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsN PE=1 SV=3	FTSN_ECOLI	36 kDa
31	Magnesium transport protein CorA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=corA PE=1 SV=1	CORA_ECOLI	37 kDa
32	Na(+)/H(+) antiporter NhaB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nhaB PE=1 SV=1	NHAB_ECOLI	57 kDa
33	UPF0194 membrane protein YbhG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybhG PE=3 SV=1	YBHG_ECOLI	36 kDa

34	UPF0755 protein YceG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yceG PE=1 SV=2	YCEG_ECOLI	38 kDa
35	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
36	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=msbA PE=1 SV=1	MSBA_ECOLI	64 kDa
37	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gapA PE=1 SV=2	G3P1_ECOLI	36 kDa
38	Glycine--tRNA ligase alpha subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyQ PE=1 SV=2	SYGA_ECOLI	35 kDa
39	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpkK PE=1 SV=2	LPXK_ECOLI	36 kDa
40	PTS system trehalose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=treB PE=1 SV=4	PTTBC_ECOLI	51 kDa
41	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
42	Nucleoside permease NupC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nupC PE=1 SV=1	NUPC_ECOLI	43 kDa
43	Penicillin-binding protein 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrdA PE=1 SV=1	PBP2_ECOLI	71 kDa
44	High-affinity gluconate transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gntT PE=1 SV=3	GNTT_ECOLI	46 kDa
45	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
46	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=murG PE=1 SV=3	MURG_ECOLI	38 kDa
47	ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pfkA PE=1 SV=1	PFKA_ECOLI	35 kDa
48	Transaldolase B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=talB PE=1 SV=2	TALB_ECOLI	35 kDa
49	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli	CYOA_ECOLI	35 kDa



	(strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1		
50	Uncharacterized oxidoreductase YajO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yajO PE=3 SV=2	YAJO_ECOLI	36 kDa
51	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1	RL17_ECOLI	14 kDa
52	NADH-quinone oxidoreductase subunit M OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoM PE=1 SV=1	NUOM_ECOLI	57 kDa
53	Multidrug export protein EmrA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=emrA PE=1 SV=2	EMRA_ECOLI	43 kDa
54	Dipeptide and tripeptide permease A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ntpA PE=1 SV=1	DTPA_ECOLI	54 kDa
55	ATP-dependent RNA helicase DeaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=deaD PE=1 SV=2	DEAD_ECOLI	71 kDa
56	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hldD PE=1 SV=1	HLDD_ECOLI	35 kDa
57	Lipid A biosynthesis myristoyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpzM PE=1 SV=1	LPXM_ECOLI	37 kDa
58	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nagE PE=3 SV=1	PTW3C_ECOLI	68 kDa
59	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
60	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
61	Aerobic C4-dicarboxylate transport protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dctA PE=1 SV=1	DCTA_ECOLI	45 kDa
62	Glycerol kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpK PE=1 SV=2	GLPK_ECOLI	56 kDa
63	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
64	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
65	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli	NUOG_ECOLI	100

	(strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4		kDa
66	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
67	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
68	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
69	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpoC PE=1 SV=1	RPOC_ECOLI	155 kDa
70	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
71	Lactaldehyde dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aldA PE=1 SV=2	ALDA_ECOLI	52 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 5</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
02	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
03	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
04	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
05	Protein QmcA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=qmcA PE=1 SV=1	QMCA_ECOLI	34 kDa
06	PTS system mannose-specific EIIAB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=manX PE=1 SV=2	PTNAB_ECOLI	35 kDa
07	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdoH PE=1 SV=1	FDOH_ECOLI	33 kDa
08	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucD PE=1 SV=2	SUCD_ECOLI	30 kDa
09	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mdh	MDH_ECOLI	32 kDa

	PE=1 SV=1		
10	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
11	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] FabI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fabI PE=1 SV=2	FABI_ECOLI	28 kDa
12	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
13	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
14	Nucleoside permease NupC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nupC PE=1 SV=1	NUPC_ECOLI	43 kDa
15	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
16	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
17	Lipid A biosynthesis lauroyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpXL PE=1 SV=1	LPXL_ECOLI	35 kDa
18	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1	BAMC_ECOLI	37 kDa
19	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
20	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMPF_ECOLI	39 kDa
21	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1	OMPC_ECOLI	40 kDa
22	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
23	Elongation factor Ts OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tsf PE=1 SV=2	EFTS_ECOLI	30 kDa
24	PTS system mannitol-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mtlA PE=1 SV=1	PTM3C_ECOLI	68 kDa
25	Lipopolysaccharide export system permease protein LptG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptG PE=1 SV=1	LPTG_ECOLI	40 kDa

26	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dppD PE=3 SV=1	DPPD_ECOLI	36 kDa
27	Lipopolysaccharide export system permease protein LptF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptF PE=1 SV=1	LPTF_ECOLI	40 kDa
28	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppD PE=3 SV=2	OPPD_ECOLI	37 kDa
29	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
30	Uncharacterized protein YdhJ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydhJ PE=3 SV=2	YDHJ_ECOLI	31 kDa
31	Aerobic C4-dicarboxylate transport protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dctA PE=1 SV=1	DCTA_ECOLI	45 kDa
32	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accD PE=1 SV=1	ACCD_ECOLI	33 kDa
33	Lipoprotein NlpI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nlpI PE=1 SV=1	NLPI_ECOLI	34 kDa
34	33 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hslo PE=1 SV=1	HSLO_ECOLI	33 kDa
35	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2	RS4_ECOLI	23 kDa
36	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
37	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1	RL17_ECOLI	14 kDa
38	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1	BAMA_ECOLI	91 kDa
39	Methionine aminopeptidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=map PE=1 SV=1	MAP1_ECOLI	29 kDa
40	Bactoprenol glucosyl transferase homolog from prophage CPS-53 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfdH PE=1 SV=1	GTRB_ECOLI	35 kDa
41	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fabH PE=1 SV=1	FABH_ECOLI	34 kDa
42	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli	G3P1_ECOLI	36 kDa

	(strain K12) GN=gapA PE=1 SV=2		
43	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accA PE=1 SV=2	ACCA_ECOLI	35 kDa
44	Beta-1,6-galactofuranosyltransferase WbbI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=wbbI PE=1 SV=1	WBBI_ECOLI	38 kDa
45	Energy-dependent translational throttle protein EttA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ettA PE=1 SV=2	ETTA_ECOLI	62 kDa
46	Protein FdhE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdhE PE=1 SV=2	FDHE_ECOLI	35 kDa
47	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
48	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolB PE=1 SV=1	TOLB_ECOLI	46 kDa
49	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
50	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
51	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=galF PE=1 SV=1	GALF_ECOLI	33 kDa
52	ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pfkA PE=1 SV=1	PFKA_ECOLI	35 kDa
53	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
54	Modulator of FtsH protease HflK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hflK PE=1 SV=1	HFLK_ECOLI	46 kDa
55	PTS system trehalose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=treB PE=1 SV=4	PTTBC_ECOLI	51 kDa
56	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydB PE=1 SV=1	CYDB_ECOLI	42 kDa
57	Protein translocase subunit SecY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secY PE=1 SV=1	SECY_ECOLI	49 kDa
58	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4	NUOG_ECOLI	100 kDa

59	Rod shape-determining protein MreB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mreB PE=1 SV=1	MREB_ECOLI	37 kDa
60	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dcuA PE=1 SV=1	DCUA_ECOLI	46 kDa
61	Membrane protein insertase YidC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yidC PE=1 SV=2	YIDC_ECOLI	62 kDa
62	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
63	Lipoprotein bor homolog from lambdoid prophage DLP12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=borD PE=3 SV=1	BORD_ECOLI	10 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 6</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
02	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
03	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
04	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
05	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
06	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
07	Lipoprotein Nlpl OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nlpl PE=1 SV=1	NLPI_ECOLI	34 kDa
08	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2	RS2_ECOLI	27 kDa
09	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
10	50S ribosomal protein L1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplA	RL1_ECOLI	25 kDa

	PE=1 SV=2		
11	Inositol-1-monophosphatase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=suhB PE=1 SV=1	SUHB_ECOLI	29 kDa
12	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatY PE=1 SV=1	GATY_ECOLI	31 kDa
13	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMP_F_ECOLI	39 kDa
14	Lipopolysaccharide export system permease protein LptG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptG PE=1 SV=1	LPTG_ECOLI	40 kDa
15	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
16	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
17	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydB PE=1 SV=1	CYDB_ECOLI	42 kDa
18	Inner membrane protein YhjD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yhjD PE=1 SV=1	YHJD_ECOLI	38 kDa
19	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rmlA1 PE=1 SV=2	RMLA1_ECOLI	33 kDa
20	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1	OMP_C_ECOLI	40 kDa
21	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
22	Septum site-determining protein MinD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=minD PE=1 SV=2	MIND_ECOLI	30 kDa
23	Fe(3+) dicitrate-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fecB PE=3 SV=3	FECB_ECOLI	33 kDa
24	Probable phospholipid import ATP-binding protein MlaF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mlaF PE=1 SV=1	MLAF_ECOLI	29 kDa
25	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa

26	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppD PE=3 SV=2	OPPD_ECOLI	37 kDa
27	Uncharacterized lipoprotein YbaY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybaY PE=3 SV=1	YBAY_ECOLI	19 kDa
28	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2	RS4_ECOLI	23 kDa
29	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1	BAMC_ECOLI	37 kDa
30	Probable L,D-transpeptidase ErfK/SrfK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=erfK PE=1 SV=2	ERFK_ECOLI	34 kDa
31	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
32	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapD PE=1 SV=1	DAPD_ECOLI	30 kDa
33	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dcuA PE=1 SV=1	DCUA_ECOLI	46 kDa
34	ATP synthase subunit a OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpB PE=1 SV=1	ATP6_ECOLI	30 kDa
35	Probable L,D-transpeptidase YbiS OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybiS PE=1 SV=1	YBIS_ECOLI	33 kDa
36	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=galF PE=1 SV=1	GALF_ECOLI	33 kDa
37	Uncharacterized oxidoreductase YbbO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybbO PE=3 SV=1	YBBO_ECOLI	29 kDa
38	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolB PE=1 SV=1	TOLB_ECOLI	46 kDa
39	Probable transcriptional regulatory protein YebC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yebC PE=1 SV=1	YEBC_ECOLI	26 kDa
40	Uncharacterized deoxyribonuclease YcfH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ycfH PE=1 SV=1	YCFH_ECOLI	30 kDa
41	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1	BAMA_ECOLI	91 kDa



42	Glycine--tRNA ligase alpha subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyQ PE=1 SV=2	SYGA_ECOLI	35 kDa
43	Low conductance mechanosensitive channel YnaI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ynaI PE=1 SV=1	YNAI_ECOLI	39 kDa
44	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kdsA PE=1 SV=1	KDSA_ECOLI	31 kDa
45	Rod shape-determining protein RodA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrdb PE=1 SV=1	RODA_ECOLI	40 kDa
46	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1	RL17_ECOLI	14 kDa
47	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4	NUOG_ECOLI	100 kDa
48	Aerobic C4-dicarboxylate transport protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dctA PE=1 SV=1	DCTA_ECOLI	45 kDa
49	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
50	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
51	Protein translocase subunit SecY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secY PE=1 SV=1	SECY_ECOLI	49 kDa
52	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
53	Serine hydroxymethyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyA PE=1 SV=1	GLYA_ECOLI	45 kDa
54	Alanine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=alaS PE=1 SV=2	SYA_ECOLI	96 kDa
55	PTS system mannitol-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mtIA PE=1 SV=1	PTM3C_ECOLI	68 kDa
56	Energy-dependent translational throttle protein EttA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ettA PE=1 SV=2	ETTA_ECOLI	62 kDa
57	Penicillin-binding protein activator LpoA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoA PE=1 SV=1	LPOA_ECOLI	73 kDa

	K12) GN=lpoA PE=1 SV=1		
58	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
59	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
60	Protease 7 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompT PE=1 SV=1	OMPT_ECOLI	36 kDa
61	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatZ PE=1 SV=1	GATZ_ECOLI	47 kDa
62	Biopolymer transport protein ExbB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=exbB PE=1 SV=1	EXBB_ECOLI	26 kDa
63	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhB PE=1 SV=1	SDHB_ECOLI	27 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 7</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	Uncharacterized lipoprotein YbaY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybaY PE=3 SV=1	YBAY_ECOLI	19 kDa
02	Uncharacterized lipoprotein Ydcl OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydcl PE=3 SV=1	YDCL_ECOLI	24 kDa
03	ATP synthase subunit a OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpB PE=1 SV=1	ATP6_ECOLI	30 kDa
04	Uncharacterized protein YiaF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yiaF PE=4 SV=2	YIAF_ECOLI	26 kDa
05	Biopolymer transport protein ExbB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=exbB PE=1 SV=1	EXBB_ECOLI	26 kDa
06	UPF0441 protein YgiB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygiB PE=3 SV=2	YGIB_ECOLI	23 kDa
07	Penicillin-binding protein activator LpoB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoB PE=1 SV=1	LPOB_ECOLI	23 kDa
08	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
09	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD	RS4_ECOLI	23 kDa

	PE=1 SV=2		
10	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
11	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2	RS2_ECOLI	27 kDa
12	cAMP-activated global transcriptional regulator CRP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=crp PE=1 SV=1	CRP_ECOLI	24 kDa
13	Oligopeptide transport system permease protein OppC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppC PE=1 SV=1	OPPC_ECOLI	33 kDa
14	Uracil phosphoribosyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=upp PE=1 SV=1	UPP_ECOLI	23 kDa
15	FKBP-type 22 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fkIB PE=1 SV=2	FKBB_ECOLI	22 kDa
16	Protein translocase subunit SecY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secY PE=1 SV=1	SECY_ECOLI	49 kDa
17	Protease HtpX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=htpX PE=1 SV=1	HTPX_ECOLI	32 kDa
18	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
19	50S ribosomal protein L4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplD PE=1 SV=1	RL4_ECOLI	22 kDa
20	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
21	Peptidoglycan-associated lipoprotein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pal PE=1 SV=1	PAL_ECOLI	19 kDa
22	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
23	50S ribosomal protein L15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplO PE=1 SV=1	RL15_ECOLI	15 kDa
24	Electron transport complex subunit RxsG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsxG PE=1 SV=1	RSXG_ECOLI	22 kDa
25	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12)	ELYC_ECOLI	29 kDa

	GN=elyC PE=4 SV=1		
26	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
27	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMPF_ECOLI	39 kDa
28	Spermidine/putrescine transport system permease protein PotC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=potC PE=3 SV=1	POTC_ECOLI	29 kDa
29	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1	RL17_ECOLI	14 kDa
30	Undecaprenyl-diphosphatase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=uppP PE=1 SV=1	UPPP_ECOLI	30 kDa
31	NADH-quinone oxidoreductase subunit E OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoE PE=1 SV=1	NUOE_ECOLI	19 kDa
32	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydA PE=1 SV=1	CYDA_ECOLI	58 kDa
33	NADH-quinone oxidoreductase subunit B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoB PE=1 SV=1	NUOB_ECOLI	25 kDa
34	Probable iron export permease protein FetB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fetB PE=1 SV=2	FETB_ECOLI	28 kDa
35	Uncharacterized protein YciO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yciO PE=1 SV=1	YCIO_ECOLI	23 kDa
36	30S ribosomal protein S7 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsG PE=1 SV=3	RS7_ECOLI	20 kDa
37	Sulfate transporter CysZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cysZ PE=1 SV=1	CYSZ_ECOLI	29 kDa
38	Probable phospholipid-binding lipoprotein MlaA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=m1aA PE=1 SV=1	MLAA_ECOLI	28 kDa
39	Multidrug export protein EmrA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=emrA PE=1 SV=2	EMRA_ECOLI	43 kDa
40	Probable phospholipid ABC transporter-binding protein MlaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=m1aD PE=1 SV=1	MLAD_ECOLI	20 kDa

41	Transcriptional regulatory protein RcsB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rcsB PE=1 SV=1	RCSB_ECOLI	24 kDa
42	Lipid A 1-diphosphate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpdT PE=1 SV=2	LPXT_ECOLI	27 kDa
43	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trmB PE=1 SV=1	TRMB_ECOLI	27 kDa
44	Mannose permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=manY PE=1 SV=1	PTNC_ECOLI	28 kDa
45	Peptide transport system permease protein SapC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sapC PE=1 SV=1	SAPC_ECOLI	32 kDa
46	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhB PE=1 SV=1	SDHB_ECOLI	27 kDa
47	50S ribosomal protein L20 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplT PE=1 SV=2	RL20_ECOLI	13 kDa
48	Lipoprotein NlpE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nlpE PE=1 SV=1	NLPE_ECOLI	26 kDa
49	Fe/S biogenesis protein NfuA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nfuA PE=1 SV=1	NFUA_ECOLI	21 kDa
50	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
51	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
52	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1	OMPC_ECOLI	40 kDa
53	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1	BAMC_ECOLI	37 kDa
54	Glutathione S-transferase GstA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gstA PE=1 SV=1	GSTA_ECOLI	23 kDa
55	Uncharacterized protein YfhG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfhG PE=3 SV=1	YFHG_ECOLI	27 kDa
56	Protein TolQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolQ PE=1 SV=1	TOLQ_ECOLI	26 kDa

57	Protease 4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sppA PE=1 SV=2	SPPA_ECOLI	67 kDa
58	Cell division protein FtsN OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsN PE=1 SV=3	FTSN_ECOLI	36 kDa
59	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
60	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
61	Aerobic C4-dicarboxylate transport protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dctA PE=1 SV=1	DCTA_ECOLI	45 kDa
62	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppiC PE=1 SV=2	PPIC_ECOLI	10 kDa
63	PTS system glucose-specific EIICB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsG PE=1 SV=1	PTGCB_ECOLI	51 kDa
64	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
65	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
66	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
67	Membrane protein insertase YidC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yidC PE=1 SV=2	YIDC_ECOLI	62 kDa
68	Cold shock protein CspA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspA PE=1 SV=2	CSPA_ECOLI	7 kDa
69	Outer membrane protein slp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slp PE=1 SV=1	SLP_ECOLI	21 kDa
70	Putative lipopolysaccharide biosynthesis O-acetyl transferase WbbJ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=wbbJ PE=3 SV=2	WBBJ_ECOLI	22 kDa
71	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
72	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=msbA PE=1 SV=1	MSBA_ECOLI	64 kDa

73	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1	CYOB_ECOLI	74 kDa
74	50S ribosomal protein L5 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplE PE=1 SV=2	RL5_ECOLI	20 kDa
75	Outer membrane protein TolC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolC PE=1 SV=3	TOLC_ECOLI	54 kDa
76	Modulator of FtsH protease HflK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hflK PE=1 SV=1	HFLK_ECOLI	46 kDa
77	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4	NUOG_ECOLI	100 kDa
78	Uncharacterized deoxyribonuclease YcfH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ycfH PE=1 SV=1	YCFH_ECOLI	30 kDa
79	Pyruvate kinase II OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pykA PE=1 SV=3	KPYK2_ECOLI	51 kDa
<b>N°</b>	<b>Protéines identifiées dans la bande 8</b>	<b>Nombre d'accession</b>	<b>Taille</b>
01	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
02	50S ribosomal protein L18 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplR PE=1 SV=1	RL18_ECOLI	13 kDa
03	30S ribosomal protein S11 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsK PE=1 SV=2	RS11_ECOLI	14 kDa
04	Uncharacterized protein YqjD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yqjD PE=1 SV=1	YQJD_ECOLI	11 kDa
05	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
06	30S ribosomal protein S5 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsE PE=1 SV=2	RS5_ECOLI	18 kDa
07	50S ribosomal protein L6 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplF PE=1 SV=2	RL6_ECOLI	19 kDa

08	Uncharacterized protein YjeI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjeI PE=3 SV=1	YJEI_ECOLI	12 kDa
09	30S ribosomal protein S19 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsS PE=1 SV=2	RS19_ECOLI	10 kDa
10	Entericidin B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ecnB PE=3 SV=1	ECNB_ECOLI	5 kDa
11	30S ribosomal protein S10 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsJ PE=1 SV=1	RS10_ECOLI	12 kDa
12	30S ribosomal protein S16 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsP PE=1 SV=1	RS16_ECOLI	9 kDa
13	Cold shock-like protein CspE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspE PE=1 SV=2	CSPE_ECOLI	7 kDa
14	50S ribosomal protein L19 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplS PE=1 SV=2	RL19_ECOLI	13 kDa
15	50S ribosomal protein L25 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplY PE=1 SV=1	RL25_ECOLI	11 kDa
16	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
17	Cold shock protein CspA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspA PE=1 SV=2	CSPA_ECOLI	7 kDa
18	50S ribosomal protein L23 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplW PE=1 SV=1	RL23_ECOLI	11 kDa
19	50S ribosomal protein L21 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplU PE=1 SV=1	RL21_ECOLI	12 kDa
20	50S ribosomal protein L33 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmG PE=1 SV=2	RL33_ECOLI	6 kDa
21	30S ribosomal protein S20 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsT PE=1 SV=2	RS20_ECOLI	10 kDa
22	30S ribosomal protein S9 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsI PE=1 SV=2	RS9_ECOLI	15 kDa
23	50S ribosomal protein L15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplO PE=1 SV=1	RL15_ECOLI	15 kDa



24	Integration host factor subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ihfB PE=1 SV=1	IHFB_ECOLI	11 kDa
25	50S ribosomal protein L30 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmD PE=1 SV=2	RL30_ECOLI	7 kDa
26	Uncharacterized protein YobH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yobH PE=3 SV=1	YOBH_ECOLI	9 kDa
27	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppiC PE=1 SV=2	PPIC_ECOLI	10 kDa
28	50S ribosomal protein L5 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplE PE=1 SV=2	RL5_ECOLI	20 kDa
29	Uncharacterized lipoprotein YgdI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygdI PE=3 SV=1	YGDI_ECOLI	8 kDa
30	50S ribosomal protein L24 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplX PE=1 SV=2	RL24_ECOLI	11 kDa
31	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
32	Lipoprotein bor homolog from lambdoid prophage DLP12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=borD PE=3 SV=1	BORD_ECOLI	10 kDa
33	50S ribosomal protein L11 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplK PE=1 SV=2	RL11_ECOLI	15 kDa
34	50S ribosomal protein L31 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmE PE=1 SV=1	RL31_ECOLI	8 kDa
35	Cold shock-like protein CspC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspC PE=1 SV=2	CSPC_ECOLI	7 kDa
36	Uncharacterized protein YgaU OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygaU PE=1 SV=2	YGAU_ECOLI	16 kDa
37	Lipoprotein BsmA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bsmA PE=2 SV=2	BSMA_ECOLI	12 kDa
38	UPF0145 protein YbjQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybjQ PE=1 SV=1	YBJQ_ECOLI	11 kDa
39	30S ribosomal protein S12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsL	RS12_ECOLI	14 kDa

	PE=1 SV=2		
40	DNA-binding protein HU-alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hupA PE=1 SV=1	DBHA_ECOLI	10 kDa
41	Outer membrane protein assembly factor BamE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamE PE=1 SV=1	BAME_ECOLI	12 kDa
42	30S ribosomal protein S15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsO PE=1 SV=2	RS15_ECOLI	10 kDa
43	Glutaredoxin-4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=grxD PE=1 SV=1	GLRX4_ECOLI	13 kDa
44	50S ribosomal protein L27 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmA PE=1 SV=2	RL27_ECOLI	9 kDa
45	50S ribosomal protein L13 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplM PE=1 SV=1	RL13_ECOLI	16 kDa
46	50S ribosomal protein L14 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplN PE=1 SV=1	RL14_ECOLI	14 kDa
47	Peptidoglycan-associated lipoprotein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pal PE=1 SV=1	PAL_ECOLI	19 kDa
48	Outer membrane protein slp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slp PE=1 SV=1	SLP_ECOLI	21 kDa
49	Putative lipopolysaccharide biosynthesis O-acetyl transferase WbbJ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=wbbJ PE=3 SV=2	WBBJ_ECOLI	22 kDa
50	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
51	Uncharacterized protein YgaM OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygaM PE=1 SV=2	YGAM_ECOLI	12 kDa
52	Uncharacterized lipoprotein YgeR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygeR PE=3 SV=2	YGER_ECOLI	27 kDa
53	ATP-dependent RNA helicase DeaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=deaD PE=1 SV=2	DEAD_ECOLI	71 kDa
54	30S ribosomal protein S17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsQ PE=1 SV=2	RS17_ECOLI	10 kDa
55	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12)	ATPB_ECOLI	50 kDa

	GN=atpD PE=1 SV=2		
56	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
57	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsH PE=1 SV=1	FTSH_ECOLI	71 kDa
58	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
59	50S ribosomal protein L4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplD PE=1 SV=1	RL4_ECOLI	22 kDa
60	Probable phospholipid ABC transporter-binding protein MlaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mlaD PE=1 SV=1	MLAD_ECOLI	20 kDa
61	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdoH PE=1 SV=1	FDOH_ECOLI	33 kDa
62	Cytoskeleton protein RodZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rodZ PE=1 SV=2	RODZ_ECOLI	36 kDa
63	Biopolymer transport protein ExbB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=exbB PE=1 SV=1	EXBB_ECOLI	26 kDa
64	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
65	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
66	Lipid A 1-diphosphate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpxT PE=1 SV=2	LPXT_ECOLI	27 kDa
67	PTS system mannose-specific EIIAB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=manX PE=1 SV=2	PTNAB_ECOLI	35 kDa
68	NADP-dependent malic enzyme OS=Escherichia coli (strain K12) GN=maeB PE=1 SV=1	MAO2_ECOLI	82 kDa
69	Lipopolysaccharide export system permease protein LptG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptG PE=1 SV=1	LPTG_ECOLI	40 kDa

Tableau 7 : liste non redondante de protéines identifiées pour les 8 bandes.

N°	Protéines	Nombre d'accession	Taille
1	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpD PE=1 SV=2	ATPB_ECOLI	50 kDa
2	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpA PE=1 SV=1	ATPA_ECOLI	55 kDa
3	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1	OMPA_ECOLI	37 kDa
4	Outer membrane protein assembly factor BamA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamA PE=1 SV=1	BAMA_ECOLI	91 kDa
5	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1	OMPF_ECOLI	39 kDa
6	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoA PE=1 SV=1	CYOA_ECOLI	35 kDa
7	Quinoprotein glucose dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gcd PE=1 SV=3	DHG_ECOLI	87 kDa
8	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1	EFTU1_ECOLI (+1)	43 kDa
9	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4	NUOG_ECOLI	100 kDa
10	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1	ATPG_ECOLI	32 kDa
11	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompC PE=1 SV=1	OMPC_ECOLI	40 kDa

12	Protein YdgA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydgA PE=1 SV=1	YDGA_ECOLI	55 kDa
13	Envelope biogenesis factor ElyC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elyC PE=4 SV=1	ELYC_ECOLI	29 kDa
14	Outer membrane protein assembly factor BamC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamC PE=1 SV=1	BAMC_ECOLI	37 kDa
15	Modulator of FtsH protease HflC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hflC PE=1 SV=1	HFLC_ECOLI	38 kDa
16	Penicillin-binding protein 1B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrcB PE=1 SV=2	PBPB_ECOLI	94 kDa
17	Penicillin-binding protein 1A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrcA PE=1 SV=1	PBPA_ECOLI	94 kDa
18	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpD PE=1 SV=3	GLPD_ECOLI	57 kDa
19	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamB PE=1 SV=1	BAMB_ECOLI	42 kDa
20	Uncharacterized lipoprotein YbaY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybaY PE=3 SV=1	YBAY_ECOLI	19 kDa
21	Membrane protein insertase YidC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yidC PE=1 SV=2	YIDC_ECOLI	62 kDa
22	LPS-assembly protein LptD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptD PE=1 SV=2	LPTD_ECOLI	90 kDa
23	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1	CYOB_ECOLI	74 kDa

	OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cyoB PE=1 SV=1		
24	Outer membrane protein TolC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolC PE=1 SV=3	TOLC_ECOLI	54 kDa
25	Formate dehydrogenase-O major subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdoG PE=1 SV=5	FDOG_ECOLI	113 kDa
26	PTS system glucose-specific EIICB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsG PE=1 SV=1	PTGCB_ECOLI	51 kDa
27	Uncharacterized lipoprotein YdcL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydcL PE=3 SV=1	YDCL_ECOLI	24 kDa
28	Serine transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaC PE=1 SV=1	SDAC_ECOLI	47 kDa
29	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	RS3_ECOLI	26 kDa
30	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppD PE=3 SV=2	OPPD_ECOLI	37 kDa
31	Alpha-ketoglutarate permease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kgtP PE=1 SV=1	KGTP_ECOLI	47 kDa
32	ATP synthase subunit a OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpB PE=1 SV=1	ATP6_ECOLI	30 kDa
33	Major outer membrane lipoprotein Lpp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpp PE=1 SV=1	LPP_ECOLI	8 kDa
34	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsH PE=1 SV=1	FTSH_ECOLI	71 kDa

35	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpdA PE=1 SV=2	DLDH_ECOLI	51 kDa
36	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2	RS4_ECOLI	23 kDa
37	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	RL2_ECOLI	30 kDa
38	NADH-quinone oxidoreductase subunit F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoF PE=1 SV=3	NUOF_ECOLI	49 kDa
39	Magnesium-transporting ATPase, P-type 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mgtA PE=1 SV=1	ATMA_ECOLI	99 kDa
40	Protease 7 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompT PE=1 SV=1	OMPT_ECOLI	36 kDa
41	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceF PE=1 SV=3	ODP2_ECOLI	66 kDa
42	Elongation factor G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fusA PE=1 SV=2	EFG_ECOLI	78 kDa
43	Protein QmcA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=qmcA PE=1 SV=1	QMCA_ECOLI	34 kDa
44	Protein translocase subunit SecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secA PE=1 SV=2	SECA_ECOLI	102 kDa
45	Uncharacterized protein YiaF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yiaF PE=4 SV=2	YIAF_ECOLI	26 kDa
46	PTS system mannose-specific EIIAB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=manX PE=1 SV=2	PTNAB_ECOLI	35 kDa

47	Galactitol permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatC PE=1 SV=1	PTKC_ECOLI	48 kDa
48	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fdoH PE=1 SV=1	FDOH_ECOLI	33 kDa
49	Signal peptidase I OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lepB PE=1 SV=2	LEP_ECOLI	36 kDa
50	Membrane-bound lytic murein transglycosylase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mltA PE=1 SV=1	MLTA_ECOLI	40 kDa
51	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2	RS2_ECOLI	27 kDa
52	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydA PE=1 SV=1	CYDA_ECOLI	58 kDa
53	Uncharacterized protein YebT OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yebT PE=3 SV=2	YEBT_ECOLI	95 kDa
54	Biopolymer transport protein ExbB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=exbB PE=1 SV=1	EXBB_ECOLI	26 kDa
55	Chain length determinant protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=wzzB PE=1 SV=2	WZZB_ECOLI	36 kDa
56	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	SDHA_ECOLI	64 kDa
57	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadC PE=1 SV=1	GADC_ECOLI	55 kDa



58	Protein translocase subunit SecD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secD PE=1 SV=1	SECD_ECOLI	67 kDa
59	Acyl-coenzyme A dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fadE PE=2 SV=2	FADE_ECOLI	89 kDa
60	Apolipoprotein N-acyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=Int PE=1 SV=1	LNT_ECOLI	57 kDa
61	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceE PE=1 SV=2	ODP1_ECOLI	100 kDa
62	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=potA PE=1 SV=1	POTA_ECOLI	43 kDa
63	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucD PE=1 SV=2	SUCD_ECOLI	30 kDa
64	Glycerol kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpK PE=1 SV=2	GLPK_ECOLI	56 kDa
65	PTS system mannitol-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mtlA PE=1 SV=1	PTM3C_ECOLI	68 kDa
66	Lipoprotein NlpI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nlpI PE=1 SV=1	NLPI_ECOLI	34 kDa
67	Modulator of FtsH protease HflK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hflK PE=1 SV=1	HFLK_ECOLI	46 kDa
68	UPF0441 protein YgiB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygiB PE=3 SV=2	YGIB_ECOLI	23 kDa

69	Penicillin-binding protein activator LpoB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoB PE=1 SV=1	LPOB_ECOLI	23 kDa
70	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mdh PE=1 SV=1	MDH_ECOLI	32 kDa
71	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatZ PE=1 SV=1	GATZ_ECOLI	47 kDa
72	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pnp PE=1 SV=3	PNP_ECOLI	77 kDa
73	Uncharacterized protein YaiW OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yaiW PE=4 SV=1	YAIW_ECOLI	40 kDa
74	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=msbA PE=1 SV=1	MSBA_ECOLI	64 kDa
75	Enolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=eno PE=1 SV=2	ENO_ECOLI	46 kDa
76	Cytoskeleton protein RodZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rodZ PE=1 SV=2	RODZ_ECOLI	36 kDa
77	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppF PE=3 SV=1	OPPF_ECOLI	37 kDa
78	50S ribosomal protein L18 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplR PE=1 SV=1	RL18_ECOLI	13 kDa
79	Uncharacterized protein YqjD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yqjD PE=1 SV=1	YQJD_ECOLI	11 kDa
80	ATP-dependent RNA helicase DeaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=deaD PE=1 SV=2	DEAD_ECOLI	71 kDa

81	50S ribosomal protein L1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplA PE=1 SV=2	RL1_ECOLI	25 kDa
82	Trigger factor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tig PE=1 SV=1	TIG_ECOLI	48 kDa
83	Lipopolysaccharide export system permease protein LptG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptG PE=1 SV=1	LPTG_ECOLI	40 kDa
84	Nucleoside permease NupC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nupC PE=1 SV=1	NUPC_ECOLI	43 kDa
85	Probable protease SohB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sohB PE=1 SV=1	SOHB_ECOLI	39 kDa
86	Inner membrane protein YbaL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybaL PE=1 SV=2	YBAL_ECOLI	59 kDa
87	Glycerol-3-phosphate transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpT PE=1 SV=1	GLPT_ECOLI	50 kDa
88	30S ribosomal protein S11 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsK PE=1 SV=2	RS11_ECOLI	14 kDa
89	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1	RL17_ECOLI	14 kDa
90	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] FabI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fabI PE=1 SV=2	FABI_ECOLI	28 kDa
91	Maltoporin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lamB PE=1 SV=1	LAMB_ECOLI	50 kDa
92	Transcription termination factor Rho OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rho PE=1 SV=1	RHO_ECOLI	47 kDa
93	Inositol-1-monophosphatase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=suhB PE=1 SV=1	SUHB_ECOLI	29 kDa

94	Protein translocase subunit SecY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secY PE=1 SV=1	SECY_ECOLI	49 kDa
95	Adenylosuccinate synthetase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=purA PE=1 SV=2	PURA_ECOLI	47 kDa
96	cAMP-activated global transcriptional regulator CRP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=crp PE=1 SV=1	CRP_ECOLI	24 kDa
97	D-amino acid dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dadA PE=1 SV=1	DADA_ECOLI	48 kDa
98	50S ribosomal protein L6 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplF PE=1 SV=2	RL6_ECOLI	19 kDa
99	30S ribosomal protein S5 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsE PE=1 SV=2	RS5_ECOLI	18 kDa
100	Uncharacterized protein YjeI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjeI PE=3 SV=1	YJEI_ECOLI	12 kDa
101	Protein translocase subunit SecF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=secF PE=1 SV=1	SECF_ECOLI	35 kDa
102	Aerobic C4-dicarboxylate transport protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dctA PE=1 SV=1	DCTA_ECOLI	45 kDa
103	50S ribosomal protein L15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplO PE=1 SV=1	RL15_ECOLI	15 kDa
104	Lactaldehyde dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aldA PE=1 SV=2	ALDA_ECOLI	52 kDa
105	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatY PE=1 SV=1	GATY_ECOLI	31 kDa
106	Lipid A biosynthesis lauroyltransferase	LPXL_ECOLI	35 kDa

	OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpxL PE=1 SV=1		
107	Uracil phosphoribosyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=upp PE=1 SV=1	UPP_ECOLI	23 kDa
108	Oligopeptide transport system permease protein OppC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=oppC PE=1 SV=1	OPPC_ECOLI	33 kDa
109	tRNA-2-methylthio-N(6)- dimethylallyl-adenosine synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=miaB PE=1 SV=1	MIAB_ECOLI	54 kDa
110	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpoB PE=1 SV=1	RPOB_ECOLI	151 kDa
111	Inner membrane protein YejM OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yejM PE=1 SV=1	YEJM_ECOLI	67 kDa
112	Low-affinity putrescine importer PlaP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=plaP PE=1 SV=1	PLAP_ECOLI	50 kDa
113	30S ribosomal protein S19 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsS PE=1 SV=2	RS19_ECOLI	10 kDa
114	Entericidin B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ecnB PE=3 SV=1	ECNB_ECOLI	5 kDa
115	PTS system trehalose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=treB PE=1 SV=4	PTTBC_ECOLI	51 kDa
116	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pntA PE=1 SV=2	PNTA_ECOLI	55 kDa

117	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mdoH PE=1 SV=1	OPGH_ECOLI	97 kDa
118	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydB PE=1 SV=1	CYDB_ECOLI	42 kDa
119	Biotin carboxylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accC PE=1 SV=2	ACCC_ECOLI	49 kDa
120	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=clpX PE=1 SV=2	CLPX_ECOLI	46 kDa
121	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpoC PE=1 SV=1	RPOC_ECOLI	155 kDa
122	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pheT PE=1 SV=2	SYFB_ECOLI	87 kDa
123	Peptidoglycan-associated lipoprotein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pal PE=1 SV=1	PAL_ECOLI	19 kDa
124	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gapA PE=1 SV=2	G3P1_ECOLI	36 kDa
125	50S ribosomal protein L4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplD PE=1 SV=1	RL4_ECOLI	22 kDa
126	Alanine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=alaS PE=1 SV=2	SYA_ECOLI	96 kDa
127	50S ribosomal protein L19 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplS PE=1 SV=2	RL19_ECOLI	13 kDa
128	Isocitrate lyase OS=Escherichia coli (strain K12)	ACEA_ECOLI	48 kDa

	GN=aceA PE=1 SV=1		
129	FKBP-type 22 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fkIB PE=1 SV=2	FKBB_ECOLI	22 kDa
130	Rod shape-determining protein MreB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mreB PE=1 SV=1	MREB_ECOLI	37 kDa
131	RNA polymerase-associated protein RapA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rapA PE=1 SV=2	RAPA_ECOLI	110 kDa
132	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rmlA1 PE=1 SV=2	RMLA1_ECOLI	33 kDa
133	Inner membrane protein YhjD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yhjD PE=1 SV=1	YHJD_ECOLI	38 kDa
134	30S ribosomal protein S10 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsJ PE=1 SV=1	RS10_ECOLI	12 kDa
135	DNA translocase FtsK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsK PE=1 SV=2	FTSK_ECOLI	147 kDa
136	Cold shock protein CspA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspA PE=1 SV=2	CSPA_ECOLI	7 kDa
137	Cell division protein FtsN OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsN PE=1 SV=3	FTSN_ECOLI	36 kDa
138	Glycine--tRNA ligase alpha subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyQ PE=1 SV=2	SYGA_ECOLI	35 kDa
139	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gnd PE=1 SV=2	6PGD_ECOLI	51 kDa
140	Aconitate hydratase 2 OS=Escherichia coli	ACON2_ECOLI	94 kDa

	(strain K12) GN=acnB PE=1 SV=3		
141	Pyruvate kinase I OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pykF PE=1 SV=1	KPYK1_ECOLI	51 kDa
142	Metalloprotease PmbA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pmbA PE=1 SV=1	PMBA_ECOLI	48 kDa
143	NAD(P) transhydrogenase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pntB PE=1 SV=1	PNTB_ECOLI	49 kDa
144	30S ribosomal protein S16 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsP PE=1 SV=1	RS16_ECOLI	9 kDa
145	Cold shock-like protein CspE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspE PE=1 SV=2	CSPE_ECOLI	7 kDa
146	50S ribosomal protein L25 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplY PE=1 SV=1	RL25_ECOLI	11 kDa
147	Protease HtpX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=htpX PE=1 SV=1	HTPX_ECOLI	32 kDa
148	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hslU PE=1 SV=1	HSLU_ECOLI	50 kDa
149	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucA PE=1 SV=1	ODO1_ECOLI	105 kDa
150	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpkK PE=1 SV=2	LPXK_ECOLI	36 kDa
151	50S ribosomal protein L23 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplW PE=1 SV=1	RL23_ECOLI	11 kDa
152	Magnesium transport protein CorA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=corA PE=1 SV=1	CORA_ECOLI	37 kDa
153	Na(+)/H(+) antiporter NhaB OS=Escherichia	NHAB_ECOLI	57 kDa



	coli (strain K12) GN=nhaB PE=1 SV=1		
154	ATP-dependent RNA helicase RhlB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rhlB PE=1 SV=2	RHLB_ECOLI	47 kDa
155	Elongation factor Ts OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tsf PE=1 SV=2	EFTS_ECOLI	30 kDa
156	Integration host factor subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ihfB PE=1 SV=1	IHFB_ECOLI	11 kDa
157	50S ribosomal protein L21 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplU PE=1 SV=1	RL21_ECOLI	12 kDa
158	CTP synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pyrG PE=1 SV=2	PYRG_ECOLI	60 kDa
159	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nagE PE=3 SV=1	PTW3C_ECOLI	68 kDa
160	Cell division protein DamX OS=Escherichia coli (strain K12) GN=damX PE=1 SV=2	DAMX_ECOLI	46 kDa
161	Multidrug export protein EmrA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=emrA PE=1 SV=2	EMRA_ECOLI	43 kDa
162	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppiC PE=1 SV=2	PPIC_ECOLI	10 kDa
163	Uncharacterized protein YdhJ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydhJ PE=3 SV=2	YDHJ_ECOLI	31 kDa
164	Asparagine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=asnS PE=1 SV=2	SYN_ECOLI	53 kDa
165	30S ribosomal protein S9 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsI PE=1 SV=2	RS9_ECOLI	15 kDa
166	Septum site-determining protein MinD	MIND_ECOLI	30 kDa

	OS=Escherichia coli (strain K12) GN=minD PE=1 SV=2		
167	UPF0194 membrane protein YbhG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybhG PE=3 SV=1	YBHG_ECOLI	36 kDa
168	Pyruvate kinase II OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pykA PE=1 SV=3	KPYK2_ECOLI	51 kDa
169	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=metE PE=1 SV=6	METE_ECOLI	85 kDa
170	Probable phospholipid import ATP-binding protein MlaF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mlaF PE=1 SV=1	MLAF_ECOLI	29 kDa
171	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dppD PE=3 SV=1	DPPD_ECOLI	36 kDa
172	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Escherichia coli (strain K12) GN=icd PE=1 SV=1	IDH_ECOLI	46 kDa
173	30S ribosomal protein S20 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsT PE=1 SV=2	RS20_ECOLI	10 kDa
174	Inner membrane protein YjiY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjiY PE=1 SV=2	YJIY_ECOLI	77 kDa
175	Penicillin-binding protein activator LpoA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpoA PE=1 SV=1	LPOA_ECOLI	73 kDa
176	Serine hydroxymethyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyA PE=1 SV=1	GLYA_ECOLI	45 kDa
177	UPF0755 protein YceG OS=Escherichia coli	YCEG_ECOLI	38 kDa

	(strain K12) GN=yceG PE=1 SV=2		
178	Uncharacterized protein YobH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yobH PE=3 SV=1	YOBH_ECOLI	9 kDa
179	Malate:quinone oxidoreductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mqo PE=1 SV=2	MQO_ECOLI	60 kDa
180	50S ribosomal protein L30 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmD PE=1 SV=2	RL30_ECOLI	7 kDa
181	50S ribosomal protein L33 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmG PE=1 SV=2	RL33_ECOLI	6 kDa
182	Electron transport complex subunit RsxG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsxG PE=1 SV=1	RSXG_ECOLI	22 kDa
183	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1	TNAA_ECOLI	53 kDa
184	Penicillin-binding protein 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrdA PE=1 SV=1	PBP2_ECOLI	71 kDa
185	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accD PE=1 SV=1	ACCD_ECOLI	33 kDa
186	Lipopolysaccharide export system permease protein LptF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lptF PE=1 SV=1	LPTF_ECOLI	40 kDa
187	High-affinity gluconate transporter OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gntT PE=1 SV=3	GNTT_ECOLI	46 kDa
188	ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pfkA PE=1 SV=1	PFKA_ECOLI	35 kDa
189	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=galF	GALF_ECOLI	33 kDa

	PE=1 SV=1		
190	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=murG PE=1 SV=3	MURG_ECOLI	38 kDa
191	50S ribosomal protein L24 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplX PE=1 SV=2	RL24_ECOLI	11 kDa
192	50S ribosomal protein L5 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplE PE=1 SV=2	RL5_ECOLI	20 kDa
193	Uncharacterized lipoprotein YgdI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygdI PE=3 SV=1	YGDI_ECOLI	8 kDa
194	Lipoprotein bor homolog from lambdoid prophage DLP12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=borD PE=3 SV=1	BORD_ECOLI	10 kDa
195	Fe(3+) dicitrate-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fecB PE=3 SV=3	FECB_ECOLI	33 kDa
196	Spermidine/putrescine transport system permease protein PotC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=potC PE=3 SV=1	POTC_ECOLI	29 kDa
197	50S ribosomal protein L11 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplK PE=1 SV=2	RL11_ECOLI	15 kDa
198	30S ribosomal protein S15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsO PE=1 SV=2	RS15_ECOLI	10 kDa
199	33 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hslo PE=1 SV=1	HSLO_ECOLI	33 kDa
200	Undecaprenyl-diphosphatase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=uppP PE=1 SV=1	UPPP_ECOLI	30 kDa
201	Protein TolB OS=Escherichia coli (strain K12)	TOLB_ECOLI	46 kDa

	GN=tolB PE=1 SV=1		
202	Probable phospholipid ABC transporter-binding protein MlaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mlaD PE=1 SV=1	MLAD_ECOLI	20 kDa
203	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dcuA PE=1 SV=1	DCUA_ECOLI	46 kDa
204	Uncharacterized protein YgaU OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygaU PE=1 SV=2	YGAU_ECOLI	16 kDa
205	Transaldolase B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=talB PE=1 SV=2	TALB_ECOLI	35 kDa
206	Lipoprotein BsmA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bsmA PE=2 SV=2	BSMA_ECOLI	12 kDa
207	Signal recognition particle receptor FtsY OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsY PE=1 SV=1	FTSY_ECOLI	55 kDa
208	NADP-dependent malic enzyme OS=Escherichia coli (strain K12) GN=maeB PE=1 SV=1	MAO2_ECOLI	82 kDa
209	NADH-quinone oxidoreductase subunit B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoB PE=1 SV=1	NUOB_ECOLI	25 kDa
210	NADH-quinone oxidoreductase subunit E OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoE PE=1 SV=1	NUOE_ECOLI	19 kDa
211	ATP-dependent RNA helicase RhlE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rhlE PE=1 SV=3	RHLE_ECOLI	50 kDa
212	30S ribosomal protein S12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsL PE=1 SV=2	RS12_ECOLI	14 kDa

213	UPF0145 protein YbjQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybjQ PE=1 SV=1	YBJQ_ECOLI	11 kDa
214	DNA-binding protein HU-alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hupA PE=1 SV=1	DBHA_ECOLI	10 kDa
215	Outer membrane protein assembly factor BamE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=bamE PE=1 SV=1	BAME_ECOLI	12 kDa
216	Outer membrane protein slp OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slp PE=1 SV=1	SLP_ECOLI	21 kDa
217	Putative lipopolysaccharide biosynthesis O-acetyl transferase WbbJ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=wbbJ PE=3 SV=2	WBBJ_ECOLI	22 kDa
218	Ribonuclease E OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rne PE=1 SV=6	RNE_ECOLI	118 kDa
219	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhB PE=1 SV=1	SDHB_ECOLI	27 kDa
220	Cold shock-like protein CspC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cspC PE=1 SV=2	CSPC_ECOLI	7 kDa
221	Citrate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gltA PE=1 SV=1	CISY_ECOLI	48 kDa
222	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapD PE=1 SV=1	DAPD_ECOLI	30 kDa
223	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=narG PE=1 SV=4	NARG_ECOLI	140 kDa
224	Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppsA PE=1 SV=5	PPSA_ECOLI	87 kDa
225	Uncharacterized protein YciO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yCiO PE=1 SV=1	YCIO_ECOLI	23 kDa

	coli (strain K12) GN=yjiO PE=1 SV=1		
226	Probable L,D-transpeptidase ErfK/SrfK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=erfK PE=1 SV=2	ERFK_ECOLI	34 kDa
227	Bactoprenol glucosyl transferase homolog from prophage CPS-53 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfdH PE=1 SV=1	GTRB_ECOLI	35 kDa
228	Probable iron export permease protein FetB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fetB PE=1 SV=2	FETB_ECOLI	28 kDa
229	30S ribosomal protein S7 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsG PE=1 SV=3	RS7_ECOLI	20 kDa
230	50S ribosomal protein L27 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmA PE=1 SV=2	RL27_ECOLI	9 kDa
231	Glutaredoxin-4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=grxD PE=1 SV=1	GLRX4_ECOLI	13 kDa
232	Sulfate transporter CysZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cysZ PE=1 SV=1	CYSZ_ECOLI	29 kDa
233	Probable phospholipid-binding lipoprotein MlaA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mlaA PE=1 SV=1	MLAA_ECOLI	28 kDa
234	NADH-quinone oxidoreductase subunit M OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoM PE=1 SV=1	NUOM_ECOLI	57 kDa
235	Phosphate acetyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pta PE=1 SV=2	PTA_ECOLI	77 kDa
236	Uncharacterized oxidoreductase YbbO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybbO PE=3 SV=1	YBBO_ECOLI	29 kDa
237	50S ribosomal protein L31 OS=Escherichia coli	RL31_ECOLI	8 kDa

	(strain K12) GN=rpmE PE=1 SV=1		
238	50S ribosomal protein L14 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplN PE=1 SV=1	RL14_ECOLI	14 kDa
239	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoC PE=1 SV=3	NUOCD_ECOLI	68 kDa
240	Aldehyde dehydrogenase B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aldB PE=1 SV=2	ALDB_ECOLI	56 kDa
241	Aminopeptidase N OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pepN PE=1 SV=2	AMPN_ECOLI	99 kDa
242	ATP-binding/permease protein CydD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydD PE=1 SV=3	CYDD_ECOLI	65 kDa
243	Dipeptide and tripeptide permease A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dtpA PE=1 SV=1	DTPA_ECOLI	54 kDa
244	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fabH PE=1 SV=1	FABH_ECOLI	34 kDa
245	DNA gyrase subunit B OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gyrB PE=1 SV=2	GYRB_ECOLI	90 kDa
246	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hldD PE=1 SV=1	HLDD_ECOLI	35 kDa
247	Lipid A 1-diphosphate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpXT PE=1 SV=2	LPXT_ECOLI	27 kDa
248	PTS system fructose-specific EIIBC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fruA PE=3 SV=1	PTFBC_ECOLI	58 kDa
249	50S ribosomal protein L13 OS=Escherichia coli	RL13_ECOLI	16 kDa



	(strain K12) GN=rplM PE=1 SV=1		
250	50S ribosomal protein L20 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplT PE=1 SV=2	RL20_ECOLI	13 kDa
251	Peptide transport system permease protein SapC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sapC PE=1 SV=1	SAPC_ECOLI	32 kDa
252	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trmB PE=1 SV=1	TRMB_ECOLI	27 kDa
253	Uncharacterized oxidoreductase YajO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yajO PE=3 SV=2	YAJO_ECOLI	36 kDa
254	Probable L,D-transpeptidase YbiS OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ybiS PE=1 SV=1	YBIS_ECOLI	33 kDa
255	Uncharacterized deoxyribonuclease YcfH OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ycfH PE=1 SV=1	YCFH_ECOLI	30 kDa
256	Probable transcriptional regulatory protein YebC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yebC PE=1 SV=1	YEBC_ECOLI	26 kDa
257	Uncharacterized protein YgaM OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygaM PE=1 SV=2	YGAM_ECOLI	12 kDa
258	UPF0053 inner membrane protein YtfL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ytfL PE=1 SV=1	YTFL_ECOLI	50 kDa
259	Glutamine synthetase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glnA PE=1 SV=2	GLNA_ECOLI	52 kDa
260	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha OS=Escherichia coli	ACCA_ECOLI	35 kDa

	(strain K12) GN=accA PE=1 SV=2		
261	Uncharacterized lipoprotein YgeR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ygeR PE=3 SV=2	YGER_ECOLI	27 kDa
262	Catalase HP II OS=Escherichia coli (strain K12) GN=katE PE=1 SV=1	CATE_ECOLI	84 kDa
263	ATP-binding/permease protein CydC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydC PE=3 SV=2	CYDC_ECOLI	63 kDa
264	Glutamate decarboxylase alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gadA PE=1 SV=1	DCEA_ECOLI (+1)	53 kDa
265	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fecA PE=1 SV=2	FECA_ECOLI	85 kDa
266	Glutathione S-transferase GstA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gstA PE=1 SV=1	GSTA_ECOLI	23 kDa
267	Lon protease OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lon PE=1 SV=1	LON_ECOLI	87 kDa
268	Mannose permease IIC component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=manY PE=1 SV=1	PTNC_ECOLI	28 kDa
269	Rod shape-determining protein RodA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mrdB PE=1 SV=1	RODA_ECOLI	40 kDa
270	Uncharacterized protein YfhG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfhG PE=3 SV=1	YFHG_ECOLI	27 kDa
271	Low conductance mechanosensitive channel YnaI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ynaI PE=1 SV=1	YNAI_ECOLI	39 kDa
272	Transcriptional regulatory protein RcsB	RCSB_ECOLI	24 kDa

	OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rscB PE=1 SV=1		
273	Protein TolQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tolQ PE=1 SV=1	TOLQ_ECOLI	26 kDa
274	Uncharacterized lipoprotein YfhM OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfhM PE=3 SV=1	YFHM_ECOLI	182 kDa
275	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kdsA PE=1 SV=1	KDSA_ECOLI	31 kDa
276	Methionine aminopeptidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=map PE=1 SV=1	MAP1_ECOLI	29 kDa