



HAL
open science

Caractérisation d'une protéine de fonction inconnue, YdiB de *Bacillus subtilis*, membre d'une nouvelle famille d'ATPases exclusivement bactériennes

Johanna Karst

► **To cite this version:**

Johanna Karst. Caractérisation d'une protéine de fonction inconnue, YdiB de *Bacillus subtilis*, membre d'une nouvelle famille d'ATPases exclusivement bactériennes. *Biochimie [q-bio.BM]*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00203404

HAL Id: tel-00203404

<https://theses.hal.science/tel-00203404>

Submitted on 10 Jan 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2007

Université Joseph Fourier - Grenoble 1
UFR de Biologie

THESE

Pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement

par

Johanna KARST

**Caractérisation d'une protéine de fonction inconnue, YdiB de *Bacillus subtilis*,
membre d'une nouvelle famille d'ATPases exclusivement bactériennes.**

Composition du jury :

Dr Anne Galinier	Rapporteur
Dr Christophe Grangeasse	Rapporteur
Dr Alain Dupuis	Examineur
Pr Eric Brown	Examineur
Dr Jean-Michel Jault	Directeur de thèse

Thèse préparée au CEA de Grenoble et à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier vivement mon directeur de thèse, Jean-Michel Jault, de l'attention et du soutien qu'il a portés à mon travail de doctorant. Je tiens également à le remercier pour la confiance et la sympathie qu'il m'a témoignées au cours de ces trois années de thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : le docteur Alain Dupuis, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et les docteurs Anne Galinier et Christophe Grangeasse pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Leurs remarques et suggestions lors de la lecture de mon rapport m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de ce dernier. Merci également au professeur Eric Brown, venu de très loin, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier aussi Anne-Emmanuelle Foucher, dont l'aide sur le plan technique et les grandes qualités humaines ont permis de mener à bout cette thèse. Son soutien et son amitié auront été un réconfort quotidien.

Un grand merci à toute l'équipe des "TPases !", où encore les "Jean-Michel's girls !" pour leur bonne humeur et leur aide : Anne-Emmanuelle, Carmen, Anne, Catherine... mais aussi les personnes qui sont parties (trop vite...) : Audrey, qui est devenue une amie précieuse, Cristina, Jennifer, Lulu... Ce fut un plaisir de travailler avec vous toutes. Merci au peu de garçons qui ont eu le courage de travailler dans une équipe principalement féminine, dont David qui a pris le temps de m'initier à la technique d'ultracentrifugation analytique.

Merci à Eric Brown de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pendant 6 mois au Canada, ainsi qu'au programme ExploraDoc de la région Rhône Alpes et au centre Jacques Cartier qui ont financé ce séjour. C'était une expérience formidable. Merci surtout à Mike et Tracey pour leurs précieux conseils de biologistes moléculaires et pour leur amitié. Merci également à Laura, Lain, John, Mark, Ange, Amit, Jeff, Paulina... Je ne vous oublierai jamais.

Merci à tous les membres de « ex-BMC », le laboratoire où j'ai effectué la majeure partie de ma thèse : Caro, Béa, Juju, Sandrine, Heidi, JulMic, Martine, Vincent, Florent, Elie, Roger, Momo, Francesca, Michèle, Serge, Michel V., Michel F., Toff,

Estelle... Merci pour les bons moments passés ensemble, que ce soit autour d'un café, d'un gros gâteau ou pour des discussions scientifiques.

Merci également à tous les membres du LPM, mon nouveau laboratoire dirigé par Eva Pebay-Peroula, que je n'ai malheureusement pas eu beaucoup le temps de bien connaître.

Un merci tout particulier à Aurel sans qui je n'aurais jamais réussi à rendre mon manuscrit de thèse à temps ! Merci d'être resté avec moi tard le soir pour m'aider à imprimer et à relier tous mes exemplaires... On s'en souviendra !

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille, qui m'a encouragée et soutenue tout au long de cette thèse : Maman et Beau pap' (chez qui je me réfugiais le week end pour décompresser !), Papa, les deux Mimis (bientôt trois !), Loulou...

De même mes amis toujours là pour me soutenir.

Et je remercie particulièrement mon mari, d'avoir su me supporter dans les moments d'euphorie mais surtout dans les moments de doute et tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Sans toi mon Yo, la fin de ma thèse n'aurait pas été aussi douce...

Merci à tous !

Sommaire

<i>ABREVIATIONS</i>	15
<i>INTRODUCTION</i>	21
<i>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</i>	25
I. LES PROTEINES LIANT LES NUCLEOTIDES	27
I-A. Introduction	27
I-B. Les NTPases à P-loop	31
I-B-1. Généralités	31
I-B-2. Classification	32
I-B-2-a. Les différentes familles	32
I-B-2-b. Les groupes KG et ASCE	41
I-B-3. Evolution et hypothèse d'un ancêtre commun	43
II-OLIGOMERISATION	45
II-A. Les interactions mises en jeu à l'interface dimérique	46
II-B. Définition d'une interface d'interaction	47
II-C. Les NTPases qui s'oligomérisent	49
II-C-1. Les protéines du groupe ASCE	49
II-C-1-a. Les ATPases à P-loop actives sous forme "d'anneau hexamérique"	49
II-C-1.b. Les transporteurs ABC	52
II-C-2. Les protéines du groupe KG	53
II-C-2-a. Les GTPases du groupe SIMIBI	53
II-C-2-b. L'HPr kinase/phosphatase (HprK/P)	55
II-D. Les facteurs agissant sur l'oligomérisation :	56
II-D-1. La composition saline	56
II-D-2. Le pH	56
II-D-3. La température	56
II-D-4. La concentration protéique	57
II-D-5. Les substrats	57
II-D-6. Les agents réducteurs	57
III. VERS DE NOUVELLES CIBLES POUR LA RECHERCHE D'ANTIBIOTIQUES	58
III-A. La résistance aux antibiotiques, un problème de santé publique	58
III-A-1. Présentation du problème	58
III-A-2. Caractéristiques des antibiotiques préexistants	58

III-A-3. Comment lutter contre l'émergence des souches multirésistantes	59
III-A-4. Définition de la cible idéale d'un nouvel inhibiteur	60
III-B. Choix de la cible	61
III-B-1. Pourquoi une protéine de <i>B. subtilis</i> ?	61
III-B-2. La protéine YdiB est-elle une cible idéale ?	62
III-C. Caractéristiques et classification de YdiB	63
III-C-1. Caractéristiques	63
III-C-1-a. Au niveau de la structure	63
III-C-1-b. Au niveau de la séquence	64
III-C-1-c. Au niveau du génome	66
III-C-2. Classification et points communs avec les autres NTPases à P-loop	67
MATERIELS ET METHODES	69
I. BIOLOGIE MOLECULAIRE	71
I-A. Conditions de culture	71
I-A-1. Souches bactériennes	71
I-A-2. Vecteurs plasmidiques	72
I-A-3. Milieux de culture	74
I-B. Techniques de biologie moléculaire	75
I-B-1. Préparation de l'ADN génomique bactérien	75
I-B-2. Amplification par PCR	76
I-B-3. Electrophorèse des fragments d'ADN	77
I-B-4. Extraction de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose	78
I-B-5. Préparation des ADN plasmidiques	78
I-B-6. Restriction de fragments d'ADN	79
I-B-7. Ligature des fragments d'ADN	79
I-B-8. Transformation de bactéries compétentes	80
I-B-8-a. Perméabilisation de la membrane chez <i>E. coli</i>	80
I-B-8-b. Electroporation chez <i>E. coli</i>	80
I-B-8-c. Transformation de <i>B. subtilis</i>	81
I-B-9. Mutagenèse dirigée	82
II. PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES	84
II-A. Surproduction des protéines	84
II-A-1. Surproduction analytique	84
II-A-2. Solubilisation des protéines	84
II-A-3. Surproduction préparative de YdiB-(his) ₆ et des mutants	84
II-A-3-a. YdiB-(his) ₆	84
II-A-3-b. Les mutants	85
II-B. Purification de YdiB-(his)₆ et des mutants	85
II-B-1. Chromatographie échangeuse d'anions	85
II-B-2. Chromatographie sur gel de nickel agarose	86
II-B-3. Précipitation de la protéine par le sulfate d'ammonium	87
II-C. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	88

II-D. Concentration des protéines	88
II-E. Clivage des protéines à la thrombine	88
II-F. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes	89
II-G. Détection des protéines par immuno-révélation	90
II-G-1. Transfert	90
II-G-2. Immuno-révélation des protéines	90
II-G-2-a. Anticorps anti-6-histidines	90
II-G-2-b. Anticorps polyclonaux de lapin anti-YdiB ou anti-YjeE	91
III. MESURE DE L'ACTIVITE ATPASE	92
IV. ETUDE DE LA MULTIMERISATION	93
IV-A. Etude de la multimérisation <i>in vitro</i>	93
IV-A-1. Ultracentrifugation analytique	93
IV-A-2. Chromatographie d'exclusion	96
IV-A-3. Electrophorèse des protéines en conditions natives	97
IV-B. Etude de la multimérisation <i>in vivo</i>	97
V. MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION ENDOGENE DE YDIB	99
VI. RECHERCHE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE YDIB PAR LA TECHNIQUE DE « PULL-DOWN »	99
<i>RESULTATS</i>	103
I- YDIB EST-ELLE ESSENTIELLE ?	105
II- CLONAGE ET PURIFICATION	109
III- YDIB FORME DES MULTIMERES <i>IN VITRO</i>	110
III-A. Equilibre dynamique entre les différentes formes	110
III-B. Effet d'agents réducteurs	112
III-C. Effet des sels sur l'oligomérisation de YdiB	113
IV- YJEE, L'HOMOLOGUE DE YDIB CHEZ <i>E. COLI</i>, FORME EGALEMENT DES MULTIMERES <i>IN VITRO</i>	119
V- MULTIMERISATION <i>IN VIVO</i>	120

VI- ACTIVITES ATPASE DE LA SOUCHE SAUVAGE	122
VI-A. Caractérisation de l'activité ATPase des espèces monomériques et multimériques	122
VI-B. Effet des sels sur l'activité enzymatique	124
VI-C. Dépendance de la concentration en protéine	125
VI-D. Dépendance de la concentration en ATP	126
VII- ETUDES DES MUTANTS	129
VII-A. Le choix des mutations	129
VII-B. Clonage, expression et purification des mutants	130
VII-C. Oligomérisation des mutants	132
VII-D. Activité enzymatique des mutants	134
VII-E. Complémentation	136
VII-E-1. Description des souches	136
VII-E-2. Construction des souches	136
VII-E-3. Croissance des souches sauvage et mutantes	139
VIII. RECHERCHE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE YDIB PAR LA TECHNIQUE DE « PULL-DOWN »	141
<i>DISCUSSION</i>	151
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	159
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	163
<i>PUBLICATIONS</i>	175
<i>COMMUNICATIONS A DES CONGRES SCIENTIFIQUES</i>	219

Liste des illustrations

Figure 1. Schéma représentant les différentes superfamilles et familles d'hélicases (Gorbalenya and Koonin, 1993).....	23
Figure 2. Cycle de l'hydrolyse du nucléotide triphosphate chez les GTPases.....	26
Figure 3. Schéma représentant le mécanisme universel des interrupteurs moléculaires (Vetter and Wittinghofer, 2001).....	27
Figure 4. Représentation structurale, sous forme de diagrammes topologiques, de quelques familles de NTPases à P-loop (Leipe et al., 2002).....	31
Figure 5. Caractéristiques du cœur structural des protéines des groupes KG et ASCE.....	32
Figure 6. Modèle proposé du mécanisme catalytique de la protéine RecA (Story and Steitz, 1992).....	33
Figure 7. Les différents types d'interactions entre protéines.....	37
Figure 8. Schéma simplifié illustrant le mécanisme d'action de protéines AAA (Ogura and Wilkinson, 2001).....	39
Figure 9. Structure du domaine N-terminal et du premier domaine ATPase de la protéine p97 (Lupas and Martin, 2002).....	40
Figure 10. Structure hexamérique hypothétique de la protéine codée par le gène 4 du phage T7 (Waksman et al., 2000).....	41
Figure 11. Modèle du transport dépendant de l'ATP des transporteurs ABC(Higgins and Linton, 2004).....	42
Figure 12. Site actif de l'homodimère Soj (Gasper et al., 2006).....	44
Figure 13. Mode d'action des antibiotiques sur une bactérie.....	49
Figure 14. Découverte des antibiotiques durant ces 60 dernières années (Walsh, 2003).....	50

Figure 15. Structure tridimensionnelle de YjeE	53
Figure 16. Diagramme topologique des éléments de la structure secondaire de YjeE (Teplyakov et al., 2002).....	53
Figure 17. Site actif détaillé de YjeE.....	54
Figure 18. Alignements des séquences de YdiB et de ses homologues chez différents micro-organismes.....	55
Figure 19. Gènes présents aux alentours de YdiB dans le génome de B. subtilis.....	56
Figure 20. Diagramme topologique des éléments de la structure secondaire de YjeE et d'autres protéines à P-loop (Teplyakov et al., 2002).....	57
Figure 21. Représentation schématique du vecteur pET-15b.....	60
Figure 22. Représentation schématique du vecteur pET-28a.....	61
Figure 23. Représentation schématique du vecteur pBluescript II SK (+).....	62
Figure 24. Principe de la méthode de Mutagénèse par PCR.....	70
Figure 26. Formule du diéthyl amino éthyl, un échangeur d'anion très utilisé.....	74
Figure 27. Principe du kit HisProbe™-HRP.....	78
Figure 28. Mesure d'une activité ATPase couplée à la disparition de NADH.....	80
Figure 29. Exemple d'expérience de vitesse de sédimentation.....	83
Figure 30. Description d'une cellule d'ultracentrifugation analytique et mécanisme de fonctionnement.....	84
Figure 31. Mécanisme d'action du formaldéhyde.....	86
Figure 32. Courbes de croissance de la souche sauvage et du mutant conditionnel.....	92
Figure 33. Construction du knock-out de ydiB chez B. subtilis.....	93

Figure 34. Courbes de croissance de la souche sauvage, de la souche délétée et du mutant conditionnel en absence d'inducteur et expression basale de YdiB dans les souches sauvage et délétée.....	94
Figure 35. Analyse sur gel SDS/PAGE des fractions obtenues à différentes étapes de la purification de YdiB.....	95
Figure 36. Oligomérisation de YdiB.....	97
Figure 37. YdiB existe sous forme d'équilibre entre monomères et oligomères en solution.....	98
Figure 38. Effet d'agent réducteur sur YdiB.....	98
Figure 39. Effet du NaCl sur l'équilibre entre monomères et oligomères.....	99
Figure 40. Expériences de sédimentation de YdiB par ultracentrifugation analytique.....	101
Figure 41. Effet de la force ionique sur la structure quaternaire de YdiB.....	103
Figure 42. Effet des sels sur l'oligomérisation de YdiB sans étiquette polyhistidines.....	104
Figure 43. YjeE, l'homologue de YdiB chez E. coli forme également des oligomères in vitro.....	105
Figure 44. Détection de YjeE dans la souche EB 437 traitée par 1 % de formaldéhyde.....	107
Figure 45. Comparaison de l'activité ATPase des fractions monomériques et multimériques de YdiB.....	108
Figure 46. L'activité ATPase mesurée est spécifique de YdiB.....	110
Figure 47. Effet du NaCl sur l'activité enzymatique de YdiB.....	111
Figure 48. Activité ATPase en fonction de la concentration en protéine.....	112
Figure 49. Activité ATPase en fonction de la concentration en ATP.....	114
Figure 50. Essai de solubilité du mutant E106A.....	118
Figure 51. Oligomérisation des mutants D80A et E106A.....	119
Figure 52. Construction des mutants du site actif de YdiB dans B. subtilis.....	123

Figure 53. Croissance des souches sauvage et mutantes de <i>B. subtilis</i>	126
Figure 54. Expression basale de la protéine <i>YdiB</i> sauvage ou mutée.....	126
Figure 55. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide 12%.....	127
Figure 56. Co-purification de la protéine recombinante <i>GST-YdiB-(His)₆</i> avec ses partenaires potentiels de <i>B. subtilis</i>	128
Figure 57. Réseau d'interactions de <i>YjeE</i> et ses partenaires potentiels chez <i>E. coli</i>	133
Figure 58. Conservation des résidus dans la séquence et dans la structure 3-D de <i>YjeE</i>	138

Tableau 1. Les cinq familles majeures de protéines liant les nucléotides.....	20
Tableau 2. Résidus conservés au sein de la séquence des protéines des groupes KG et ASCE.....	33
Tableau 3. Composition des milieux utilisés pour la préparation de souches de <i>B. subtilis</i> compétentes.....	63
Tableau 4. Oligonucléotides de synthèse utilisés pour la mutagenèse des différents mutants de YdiB.....	71
Tableau 5. Conditions optimales de surproduction utilisées pour chaque mutant de YdiB.....	73
Tableau 6. Quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0 °C.....	75
Tableau 7. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour le clonage dans le vecteur pGEX-4T-1.....	88
Tableau 8. Paramètres nécessaires pour le traitement des données d'ultracentrifugation analytique.....	100
Tableau 9. Viscosité et masse volumique de chaque tampon.....	102
Tableau 10. Choix des mutants du site actif.....	115
Tableau 11. Conditions optimales de surexpression et de solubilité des protéines sauvage et mutantes de YdiB.....	117
Tableau 12. Activités spécifiques de la protéine sauvage et des différents mutants.....	120
Tableau 13. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour la création des mutants.....	124
Tableau 14. Conditions optimales de surexpression et de solubilité de GST-YdiB-(his) ₆	127
Tableau 15. Partenaires potentiels de GST-YdiB-(His) ₆ révélés par co-purification suivie d'une analyse par spectrométrie de masse et d'une recherche bioinformatique.....	129
Tableau 16. Partenaires potentiels de YjeE révélés par deux études différentes.....	131

ABREVIATIONS

AAA	« <u>A</u> TPase <u>A</u> ssociated with cellular <u>A</u> ctivities »
ABC	« <u>A</u> TP- <u>B</u> inding <u>C</u> assette»
ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
Amp	<u>A</u> mpicilline
AMP	<u>A</u> dénosine <u>m</u> onophosphate
ADP	<u>A</u> dénosine <u>d</u> iphosphate
AMPPNP	Adénosine 5'-(β,γ -imido)-triphosphate
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
ARNm	<u>ARN</u> <u>m</u> essenger
ARNr	<u>ARN</u> <u>r</u> ibosomal
ARNt	<u>ARN</u> de <u>t</u> ransfert
ASCE	« <u>A</u> dditional <u>s</u> trand, <u>c</u> atalytic <u>E</u> »
ATP	<u>A</u> denosine <u>t</u> riphosphate
BET	<u>B</u> romure d' <u>é</u> thidium
β ME	β - <u>m</u> ercaptoéthanol
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
Cm	<u>C</u> hloram <u>p</u> hénicol
C(s)	<u>C</u> ontinuous <u>s</u> ize-distribution
CTP	<u>C</u> ytidine <u>t</u> riphosphate
DEAE	<u>D</u> iéthyl <u>a</u> mino <u>é</u> thyl
dNTP	2'- <u>D</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléoside 5'- <u>t</u> riphosphate
D.O.	<u>D</u> ensité <u>o</u> ptique
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hréitol
EDTA	« <u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra- <u>a</u> cetic acid »
GAP	« <u>G</u> TPase- <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein »
GDP	<u>G</u> uanosine <u>d</u> iphosphate
GEF	« <u>G</u> uanine nucleotide- <u>e</u> xchange <u>f</u> actor »
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>t</u> ransférase
HEPES	« N-[2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl]piperazidin-N'-[2- <u>e</u> thanesulfonic acid] »
IPTG	Isopropyl- β -D- <u>t</u> hio- <u>g</u> alactopyranoside
Kan	<u>K</u> anamycine

<u>Kilo Dalton</u>	kDa
KG	<u>Kinases/GTPases</u>
K _M	Constante de Michaelis-Menten
KO	<u>Knock-out</u>
LB	Milieu de <u>Luria Bertani</u>
LDH	<u>Lactate déshydrogénase</u>
Mg	<u>Magnésium</u>
Mn	<u>Minute</u>
NAD	<u>Nicotinamide adenine dinucleotide</u>
NTP	<u>Nucléoside triphosphate</u>
PAGE	« <u>Polyacrylamide gel electrophoresis</u> »
pb	<u>Paire de bases</u>
PCR	« <u>Polymerase chain reaction</u> »
PEP	<u>Phosphoénol pyruvate</u>
Pi	<u>Phosphate inorganique</u>
PK	<u>Pyruvate kinase</u>
P-loop	<u>Phosphate binding loop</u>
PMSF	« <u>Phenylmethylsulfonyl fluoride</u> »
PSA	<u>Persulfate d'ammonium</u>
q.s.p.	quantité <u>suffisante pour</u>
SDS	« <u>Sodium dodecyl sulfate</u> »
SIMIBI	« <u>Signal recognition GTPases, MinD, BioD</u> »
Spec	<u>Spectinomycine</u>
TAE	<u>Tris-acétate-EDTA</u>
TB	Milieu <u>Turbo Broth</u>
TBE	<u>Tris-borate-EDTA</u>
TE	<u>Tris-EDTA</u>
TEMED	N,N,N',N' - <u>tetramethyl-ethylene diamine</u>
TRAFAC	« <u>Translation factor-related</u> »
Tris	<u>Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane</u>
UTP	<u>Uridine triphosphate</u>

UV

V_{\max}

WT

Ultra-violet

Vitesse initiale maximale

« Wild type »

INTRODUCTION

Si la découverte des agents thérapeutiques antimicrobiens est l'une des plus grandes avancées médicales du XX^{ème} siècle, l'utilisation trop généralisée des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire depuis 50 ans a malheureusement conduit à de graves phénomènes de résistance chez les bactéries. Ce phénomène naturel est inévitable, conséquence de l'écologie microbienne et illustration de l'extraordinaire capacité d'adaptation du vivant, mais il est largement aggravé par une utilisation inconsidérée des antibiotiques.

La résistance à des drogues multiples est due en grande partie au répertoire limité des agents anti-bactériens qui éradiquent les bactéries en utilisant une gamme restreinte de cibles. Il est maintenant clair que l'arsenal existant d'antibiotiques est insuffisant pour nous protéger à long terme, et par conséquent, il est nécessaire de rechercher de nouvelles cibles non traditionnelles permettant de développer des inhibiteurs qui agissent différemment de ceux classiquement utilisés.

L'avènement du séquençage des génomes bactériens a permis de montrer qu'environ 1/3 des gènes codent des protéines de fonction inconnue, appelées « orphelines », qui sont, pour beaucoup d'entre elles, hautement conservées et indispensables à la croissance des bactéries. Parmi les familles de protéines "orphelines" spécifiquement bactériennes, il en existe qui possèdent dans leur séquence des motifs caractéristiques impliqués dans la fixation et/ou l'hydrolyse des nucléotides, GTP ou ATP, suggérant que leur fonction cellulaire est énergétiquement couplée à une activité NTPase (Saraste et al., 1990). Les NTPases à P-loop sont souvent associées à des processus cellulaires fondamentaux, et la compréhension de leur rôle au sein des bactéries ainsi que de leur mécanisme de fonctionnement pourrait alors déboucher, à plus long terme, sur la découverte de nouveaux inhibiteurs utilisables pour lutter contre la prolifération des germes pathogènes.

Nous avons choisi d'étudier une protéine de *Bacillus subtilis*, bactérie de l'eau et du sol non pathogène, utilisée comme modèle chez les bactéries à Gram positif et dont le génome est totalement séquencé depuis 1997 (Kunst et al., 1997). Cette protéine, annotée YdiB, est une protéine de fonction inconnue, mais qui possède une signature fonctionnelle putative d'ATPases/GTPases. Il a, par ailleurs, été montré que cette nouvelle enzyme était indispensable à la croissance « normale » des bactéries à gram positif (*B. subtilis*) (Hunt et al., 2006; Kobayashi et al., 2003) et à gram négatif (*Escherichia coli*) (Allali-Hassani et al., 2004; Freiberg et al., 2001). C'est une protéine spécifiquement bactérienne, présente chez quasiment toutes les bactéries, et donc chez de très nombreuses souches pathogènes d'intérêt clinique. Pour toutes ces raisons, YdiB constitue une cible de choix pour de nouvelles drogues possédant un spectre d'activité large, et nos objectifs visent d'une part à comprendre le rôle de

cette nouvelle enzyme et d'autre part à caractériser son mécanisme de fonctionnement à l'échelle moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons établi des conditions expérimentales permettant la surexpression de la protéine avec une étiquette polyhistidines à un niveau élevé, et un protocole très efficace de purification a été mis au point. Par différentes techniques, nous avons pu montrer que cette protéine était capable de former des dimères et des oligomères de plus haut poids moléculaire *in vitro*, et probablement *in vivo*, et que l'équilibre entre monomères et multimères était influencé par la force ionique. Nous avons mis en évidence une faible activité ATPase, mais néanmoins significative puisqu'un mutant d'un résidu hautement conservé du site actif est dépourvu d'activité enzymatique. Nous avons également montré un effet négatif de l'oligomérisation sur l'activité ATPase de l'enzyme. Par ailleurs, une souche délétée de *ydiB* a été construite et sa croissance a été étudiée sur un milieu riche. Nous avons également construits, surexprimés et purifiés plusieurs mutants de résidus conservés du site actif, puis nous avons mesuré leur activité enzymatique, et analysé leur capacité à s'oligomériser. La croissance de ces mutants dans *B. subtilis* a également été exploitée. Enfin, nous avons tenté de rechercher des partenaires cellulaires de YdiB afin d'identifier la voie métabolique ou de signalisation dans laquelle la protéine intervient. Des résultats préliminaires suggèrent un rôle lors d'une réponse à un stress, ou une interaction avec le ribosome.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. LES PROTEINES LIANT LES NUCLEOTIDES

I-A. Introduction

Une large partie du protéome de chaque organisme est composé de protéines qui lient les nucléosides triphosphates, et les utilisent soit directement comme substrats dans des réactions variées, soit pour effectuer un changement de conformation couplé à une activité spécifique. Les nucléotides sont des éléments essentiels de la vie. L'énergie de la liaison phosphoanhydride β - γ de l'ATP est utilisée pour permettre le déroulement de réactions chimiques non favorables, pour alimenter des machines biologiques, ou encore pour réguler un vaste nombre de processus via la phosphorylation de protéines. Le GTP, est utilisé principalement pour l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction des protéines mais également pour la régulation de signaux de transduction et des processus de transport. Quant aux autres nucléotides, leur utilisation est plus restreinte. Cependant, l'UTP est impliqué dans la voie de synthèse des sucres, et le CTP dans celles des phospholipides.

Les protéines qui lient et utilisent ces nucléotides sont très diverses. Bien que certaines d'entre elles constituent une large famille de protéines connues, d'autres semblent beaucoup moins conservées. Depuis 1992, des progrès considérables ont été fait à travers l'identification de séquences communes, et la résolution de structures de nombreuses protéines liant les nucléotides ont, à leur tour, aidé à identifier de nouveaux motifs communs. Ces protéines appartiennent à différents groupes selon le repliement de leur chaîne, et à l'heure actuelle, cinq familles majeures de protéines, décrites dans le tableau 1, ont pu être identifiées (Leipe et al., 2002; Schulz, 1992) :

1- Les protéines liant les mononucléotides (NTPases à P-loop) :

Cette famille est caractérisée par la séquence consensus G/A-X₄-G-K-T/S, où X est un acide aminé quelconque. Le cœur structural de ces protéines est généralement composé de cinq brins β formant un feuillet β central le plus souvent parallèle, encadré de part et d'autres par des hélices α .

2- Les protéines liant les dinucléotides (ou « Rossmann fold »):

Cette famille comprend les protéines liant le « Nicotinamide Adénine Dinucléotide » (NAD), et est caractérisée par la séquence consensus G-X-G-X₂-G. Le cœur structural de ces protéines est généralement composé de six brins β parallèles connectés par des hélices α , des brins β , ou des boucles irrégulières.

3- Les protéine kinases

Elles constituent la plus large classe des protéines liant les nucléotides et jouent un rôle décisif dans la régulation de nombreux processus biologiques, tels que la différenciation ou la transduction de signaux.

Une partie des protéine kinases catalysent le transfert du phosphate γ de l'ATP sur le groupement hydroxyle des chaînes latérales des acides aminés hydrophiles ou aromatiques. La plupart contiennent douze séquences consensus, dont un motif riche en glycines de séquence G-X-G-X₂-G, formant une boucle flexible, et leur classification est donc basée sur leur spécificité (Vetter and Wittinghofer, 1999) :

- Les kinases à sérine et thréonine.
- Les kinases à tyrosine.
- Les kinases doubles qui catalysent le transfert du phosphate sur les deux types d'hydroxyles des chaînes latérales (sérine/thréonine ou tyrosine).

De nombreuses structures de protéine kinases à sérine, thréonine ou tyrosine ont été résolues montrant que toutes possèdent un repliement commun caractérisé par deux lobes. Le premier lobe, principalement constitué de brins β , contient les éléments de séquences impliqués dans la fixation de l'ATP, avec la boucle riche en glycines. Le second lobe, plus large, est composé d'hélices α , et contient une boucle catalytique importante pour le transfert du phosphate et une boucle régulatrice impliquée dans la régulation de l'activité catalytique.

Curieusement, certaines protéine kinases bactériennes, dont le repliement tertiaire est différent des protéine kinases eucaryotes, appartiennent à la famille des NTPases à P-loop car elles possèdent, entre autres, la séquence consensus G/A-X₄-G-K-T/S. C'est le cas, par exemple, de l'HPr kinase/phosphatase qui partage des homologies structurales avec une kinase de petite molécule, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Fieulaine et al., 2001; Galinier et al., 2002), ou encore de tyrosine kinases capables d'autophosphorylation détectées chez plusieurs bactéries et notamment celle de *Staphylococcus aureus* qui serait apparentée à

une protéine du groupe SIMIBI (voir chapitre I-B-2a) (Grangeasse et al., 1997; Soulat et al., 2006), mais aussi de PrkA, une kinase à sérine/thréonine de *B. subtilis* (Fischer et al., 1996).

4- Les Histidine kinases/HSP90/Topoisomérase II

Elles sont caractérisées par un feuillet β contenant huit brins le plus souvent antiparallèles et par une région en hélices α . Cette famille regroupe une autre catégorie de protéine kinases, différentes d'un point de vue structural et fonctionnel de celles décrites ci-dessus. Ces kinases phosphorylent des histidines, et leur cœur structural possède des similarités avec la protéine Hsp90 ou avec des topoisomérases II (Vetter and Wittinghofer, 1999).

5- La famille des Actines/HSP70/RNase H

Elles sont caractérisées par un feuillet β contenant cinq brins, le brin 2 étant antiparallèle au reste du feuillet, et par deux régions en hélices α .

Dans ce manuscrit, nous allons nous intéresser essentiellement aux NTPases à P-loop.


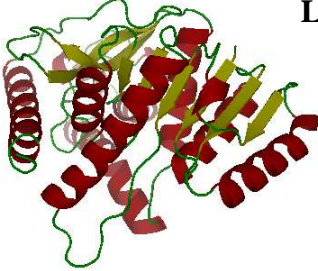
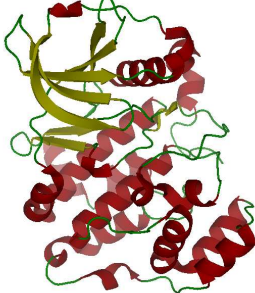
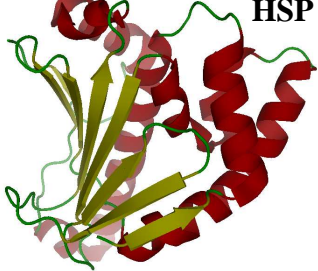
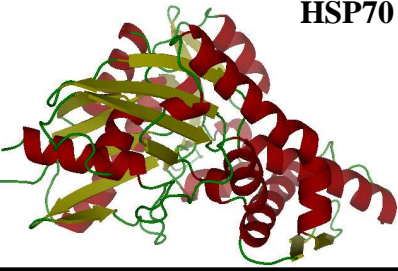
NOM	CARACTERISTIQUES	EXEMPLES DE STRUCTURES
<p>Protéines liant les mononucléotides (NTPases à P-loop)</p>	<p>Le cœur structural de ces protéines est généralement composé de cinq brins β formant un feuillet β central le plus souvent parallèle, encadré de part et d'autres par des hélices α.</p>	 <p>RecA</p>
<p>Protéines liant les dinucléotides (« Rossmann fold »)</p>	<p>Le cœur structural de ces protéines est généralement composé de six brins β parallèles connectés par des hélices α, des brins β, ou des boucles irrégulières.</p>	 <p>LDH</p>
<p>Protéine kinases</p>	<p>Elles possèdent un repliement commun caractérisé par deux lobes. Le premier lobe est principalement constitué de brins β avec la boucle riche en glycines alors que le second lobe, plus large, est composé d'hélices α.</p>	 <p>CK2</p>
<p>Les Histidine kinases HSP90 Topoisomérase II</p>	<p>Elles sont caractérisées par un feuillet β de huit brins le plus souvent antiparallèle et par une région α.</p>	 <p>HSP 90</p>
<p>Les Actines HSP70 RNase H</p>	<p>Elles sont caractérisées par un feuillet β de cinq brins, le brin 2 étant antiparallèle au reste du feuillet, et par deux régions α.</p>	 <p>HSP70</p>

Tableau 1 : Les cinq familles majeures de protéines liant les nucléotides. Pour chaque famille, les caractéristiques générales sont détaillées et la structure d'une protéine est présentée.

I-B. Les NTPases à P-loop

I-B-1. Généralités

Les NTPases à P-loop (pour « Phosphate binding loop ») ont le repliement le plus commun dans tous les organismes cellulaires, et on estime que 10 à 18 % des produits de gènes sont des protéines à P-loop (Koonin et al., 2000). La plupart des NTPases à P-loop lient les nucléotides et catalysent l'hydrolyse de la liaison ester entre les phosphates β et γ du nucléotide (Leipe et al., 2002; Saraste et al., 1990). Pour cela, elles requièrent un cation divalent, habituellement un ion magnésium, qui stabilise la charge négative des phosphates, et par conséquent facilite l'hydrolyse. Leur activité d'hydrolyse est généralement faible mais peut être beaucoup plus forte en présence d'un substrat ou d'un effecteur comme l'ADN (Teplyakov et al., 2002). D'autres membres des NTPases à P-loop, des kinases, transfèrent le phosphate γ de l'ATP sur diverses petites molécules incluant notamment des nucléotides (Leipe et al., 2003).

D'un point de vue structural, les NTPases à P-loop ont un repliement globulaire de type α/β , avec au moins cinq brins β formant un feuillet β central le plus souvent parallèle, encadré de part et d'autre par des hélices α (Milner-White et al., 1991).

Au niveau de la séquence, elles sont caractérisées par deux motifs conservés, nommés motifs A et B de Walker (Saraste et al., 1990; Vetter and Wittinghofer, 1999; Walker et al., 1982). Le motif A de Walker, de séquence consensus G/A-X₄-G-K-T/S, forme une boucle flexible riche en glycine, la P-loop, entre le premier brin β et l'hélice α suivante, positionnant le triphosphate du nucléotide. Cette boucle a été identifiée pour la première fois par Walker et ses collègues dans les sous unités α et β de l'ATP synthase, la myosine, l'adénylate kinase et la protéine RecA (Walker et al., 1982). Elle a, par la suite, été découverte dans de nombreuses protéines liant les nucléotides. Cette boucle est stabilisée par la lysine hautement conservée du motif, en formant des liaisons hydrogènes avec les carbonyles de la chaîne principale. Cette lysine, ainsi que la glycine qui la précède, interagissent avec les groupements phosphate β et γ du nucléotide, ce qui permet de neutraliser les charges négatives du phosphate. Ces deux résidus sont conservés dans quasiment toutes les NTPases à P-loop. Le motif B de Walker, beaucoup moins bien défini car beaucoup plus variable, est localisé à la fin d'un brin β hydrophobe. Ce motif contient un résidu avec un groupement carboxylate, un aspartate ou plus rarement un glutamate, capable d'interagir avec le magnésium (Walker et al., 1982).

I-B-2. Classification

I-B-2-a. Les différentes familles

Au sein de la superfamille des NTPases à P-loop, au moins sept familles peuvent être définies en se basant sur les caractéristiques de séquences et de structures (Leipe et al., 2002).

- 1- RecA et ATPases F0-F1
- 2- Les ATPases dépendantes des acides nucléiques comme les hélicases.
- 3- Les ATPases AAA (pour « ATPases Associated with diverse cellular Activities »)
- 4- Les ATPases ABC (pour « ATP-Binding Cassette »)
- 5- Les ATPases apoptotiques (AP) et protéines associées
- 6- Les GTPases
- 7- Les kinases à P-loop, et plus particulièrement les nucléotide kinases.

▪ **RecA** est une ATPase dépendante de l'ADN, nécessaire pour la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN. Elle est la première ATPase possédant les motifs A et B de Walker à avoir été cristallisée (Story and Steitz, 1992), et la résolution de sa structure, en présence d'ADP/Mg, a révélé une nouvelle architecture de liaison aux nucléotides distincte de celles déjà connues chez les G protéines. Plus tard, la résolution de la structure de l'ATPase F1 (Abrahams et al., 1994) a montré un repliement similaire à celui de RecA, ce qui a conduit à proposer que RecA était un modèle pour beaucoup d'ATPases ayant les motifs A et B de Walker (Yoshida and Amano, 1995).

La structure de RecA d'*E. coli* consiste en un domaine majeur central encadré par deux domaines moins importants aux extrémités N et C-terminales. Le domaine central peut être divisé en un large sous domaine comprenant les brins $\beta 1$ à $\beta 5$ ainsi que les hélices et boucles qui les connectent, et un petit sous domaine comprenant les brins $\beta 6$ à $\beta 8$ (tableau 1).

▪ **Les hélicases** sont des enzymes ubiquistes qui permettent le déroulement des acides nucléiques doubles brins, une étape dépendante des nucléosides triphosphates nécessaire lors des processus de réplication, expression, recombinaison et réparation du génome.

Elles ont un site de liaison aux nucléotides semblable à celui de RecA, bien que RecA appartienne à une famille différente de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, ne partageant aucune similarités de séquence, à l'exception des motifs A et B de Walker.

Les hélicases peuvent être subdivisées en plusieurs groupes selon leur séquence en acides aminés (Gorbalenya and Koonin, 1993; Lohman and Bjornson, 1996) (figure 1). Trois

vastes superfamilles et deux familles plus petites ont été décrites. La majorité des hélicases appartiennent aux superfamilles SF1 et SF2, toutes deux caractérisées par sept motifs conservés. La similarité de structure et l'arrangement de ces motifs suggèrent que SF1 et SF2 ont probablement évoluées à partir d'un même ancêtre commun. La troisième superfamille, SF3, comprend les hélicases des virus à ADN et à ARN, et possède seulement trois motifs conservés dont les motifs A et B de Walker. La 4^{ème} famille, F4, inclut l'hélicase DnaB de *E. coli* et les protéines apparentées, et est définie par 5 régions conservées. Enfin la famille F5 comprend l'ATPase Rho de *E. coli*. Elle n'est reliée à aucune autre hélicase mais contient des similarités de séquences avec les ATPases qui pompent des protons, dévoilant une évolution commune entre une hélicase et un groupe de NTPases non hélicase.

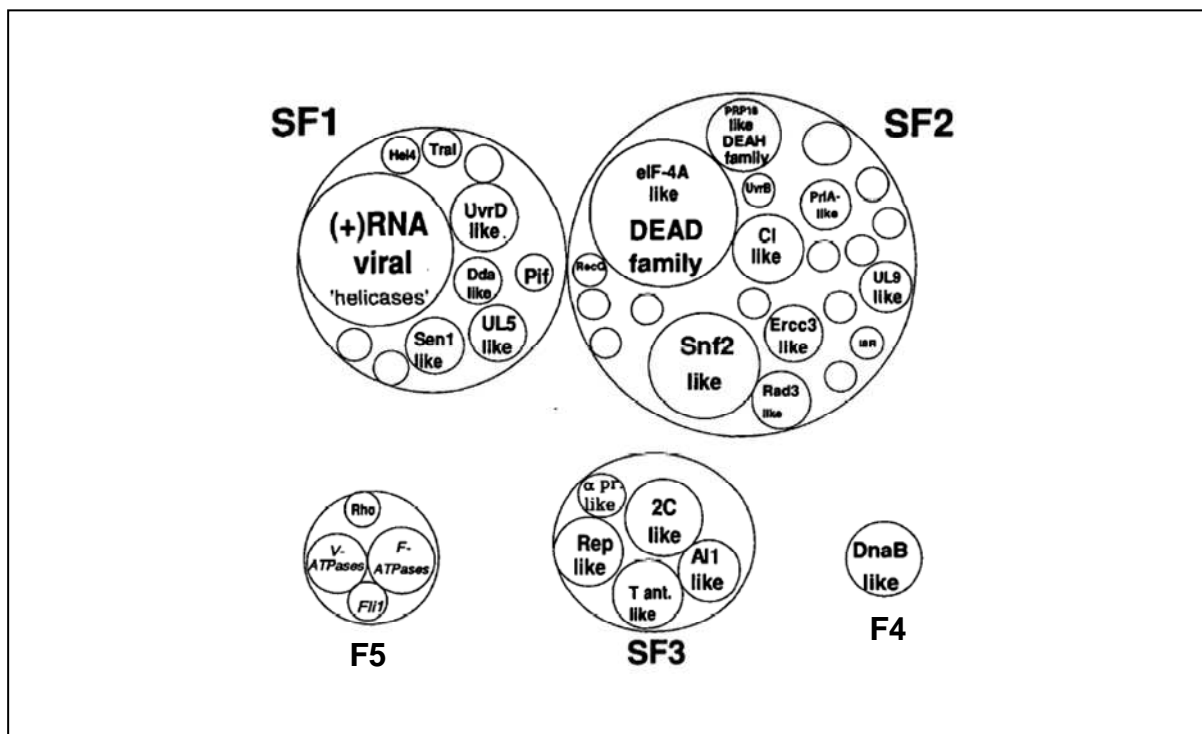


Figure 1 : Schéma représentant les différentes superfamilles et familles d'hélicases. Les superfamilles et familles d'hélicases sont désignées par des cercles dont le diamètre est globalement proportionnel au nombre de protéines, et la distance entre les cercles reflète les relations qui existent entre elles. Les groupes distincts d'hélicases à l'intérieur des 3 superfamilles sont représentés par des cercles plus petits. Seuls les groupes incluant des protéines avec une activité hélicase démontrée, et/ou les groupes contenant plusieurs membres sont représentés. Généralement, ils sont désignés par le nom de la protéine la mieux caractérisée. D'autres groupes, à l'intérieur de SF1 et SF2, contenant une seule hélicase, sont représentés par des cercles vides. D'après (Gorbalenya and Koonin, 1993).

▪ **Les protéines AAA** (pour « ATPases Associated with diverse cellular Activities ») ont été identifiées chez les procaryotes et les eucaryotes. Elles constituent une large famille d'ATPases impliquées dans des fonctions cellulaires variées telles que la régulation du cycle cellulaire, la dégradation des protéines, la biogenèse des organelles ou encore le transport des protéines par des vésicules. Elles sont cytosoliques, membranaires ou associées à la membrane. La structure des protéines AAA consiste en un domaine *N*-terminal non-ATPase appelé domaine N, ainsi que un ou deux domaines ATPases appelés domaines D. Ce dernier est caractérisé par un motif AAA de 230 à 250 acides aminés qui incluent les motifs A et B de Walker ainsi qu'un motif SRH (pour « Second Region Homology ») spécifique aux protéines AAA. Ce domaine est nécessaire pour la fonction de la protéine mais son rôle exact reste inconnu. Par ailleurs, les protéines AAA sont les seules à lier le nucléotide dans une conformation syn (Patel and Latterich, 1998).

▪ **Les transporteurs ABC** (pour « ATP-Binding Cassette ») représentent une des plus larges familles de protéines trouvées dans tous les organismes vivants. Les membres de cette famille sont impliqués dans le transport de divers composés, tels que les sucres, les ions, les peptides ou encore des protéines. La structure des transporteurs ABC consiste en deux domaines membranaires responsables de la translocation du substrat à travers la membrane, et de deux domaines hydrophiles, qui lient et hydrolysent l'ATP. La structure monomérique des domaines de liaison aux nucléotides adopte une forme globale en L composée de deux lobes. Le lobe I, très conservé, est constitué d'un domaine α/β comprenant le coeur du domaine de liaison à l'ATP avec les motifs A et B de Walker. Le lobe II est plus divergent. Il est constitué uniquement d'hélices α et comprend la signature caractéristique de cette famille généralement de séquence L-S-G-G-Q (Higgins and Linton, 2004).

▪ **Les ATPases apoptotiques (AP) et protéines associées**, interviennent dans l'apoptose, phénomène également connu sous le nom de mort cellulaire programmée. Leur structure est définie par cinq motifs conservés : les motifs 1 et 3 correspondent aux motifs A et B de Walker, le motif 4 de séquence T-S-X-R, le motif 5 possédant une proline hautement conservée, et un motif 2 beaucoup moins bien défini. Typiquement, ces protéines possèdent des domaines multiples : en plus du domaine ATPase, elles contiennent des domaines de signalisation et d'interaction. Par conséquent, elles sont probablement impliquées dans des voies de signalisation complexes faisant intervenir de multiples interactions entre protéines (Aravind et al., 1999; Koonin and Aravind, 2000).

▪ **Les GTPases** utilisent le GTP, et non l'ATP, pour réguler un nombre varié de processus cellulaires, incluant l'initiation, l'élongation, et la terminaison de la traduction des protéines, mais aussi la signalisation ou la croissance cellulaire. Elles sont caractérisées par la juxtaposition de six ou sept brins β formants un feuillet β central, ainsi que par quatre séquences spécifiques d'acides aminés, localisées dans le domaine de liaison au GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001). Toutes les GTPases contiennent les motifs très conservés G1, G3 et G4. En revanche, le motif G2 est très conservé au sein d'une même famille de GTPases mais diffère d'une famille à l'autre.

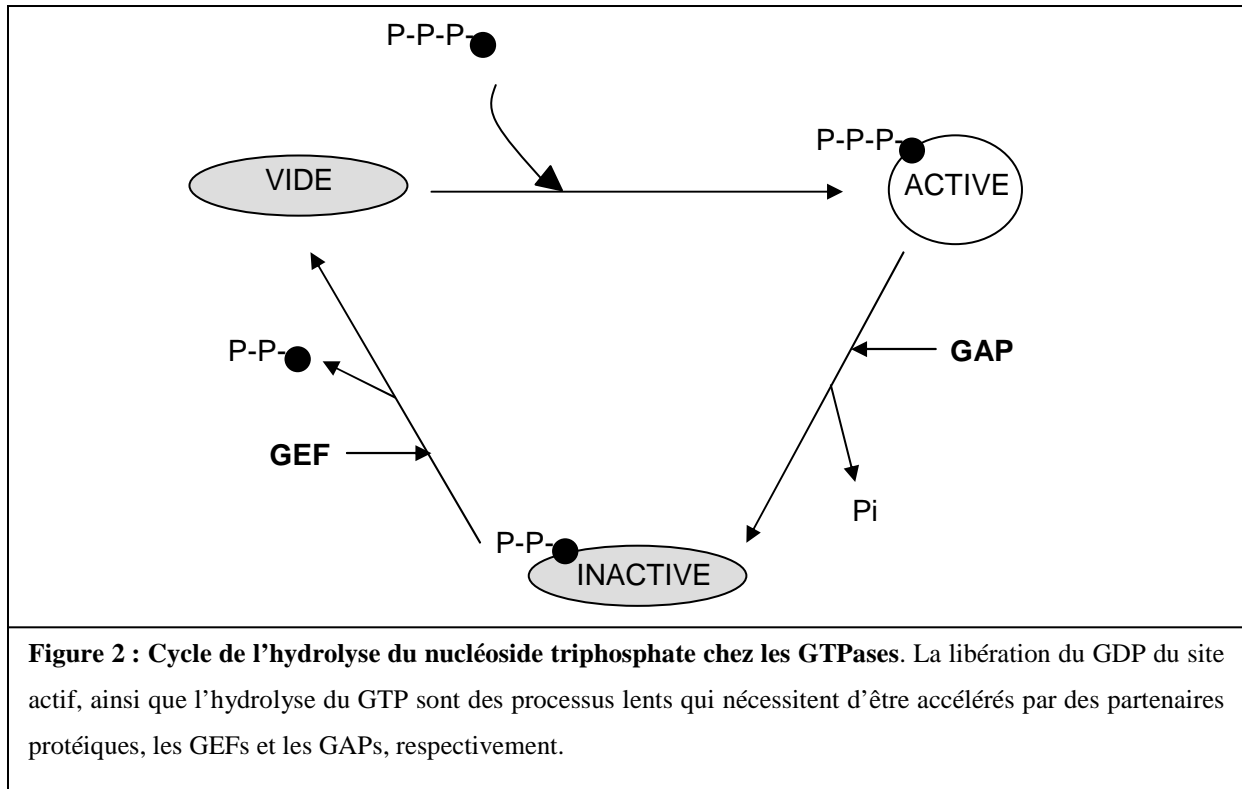
- Le motif G1, localisé dans le brin β 1, correspond au motif A de Walker.

- Le motif G2, situé dans la boucle *N*-terminale du brin β 2, est impliqué dans l'interaction avec une molécule effectrice, qui régule l'équilibre entre les formes GTP et GDP, mais n'intervient pas dans l'hydrolyse du GTP. Il est difficilement reconnaissable puisqu'il diffère d'une famille à l'autre mais contient parfois une thréonine conservée.

- Le motif G3, dans le brin β 3, correspond au motif B de Walker de séquence spécifique D-X-X-G. La glycine, conservée seulement dans cette famille, forme une liaison hydrogène avec le phosphate γ du GTP.

- Le motif G4, localisé dans le brin β 5, de séquence N/T-K-X-D/E, est spécifique des GTPases car il permet la reconnaissance de la guanine. L'asparagine ou la thréonine du motif forme des liaisons hydrogènes avec la base, et l'aspartate stabilise le nucléotide par des liaisons hydrogènes.

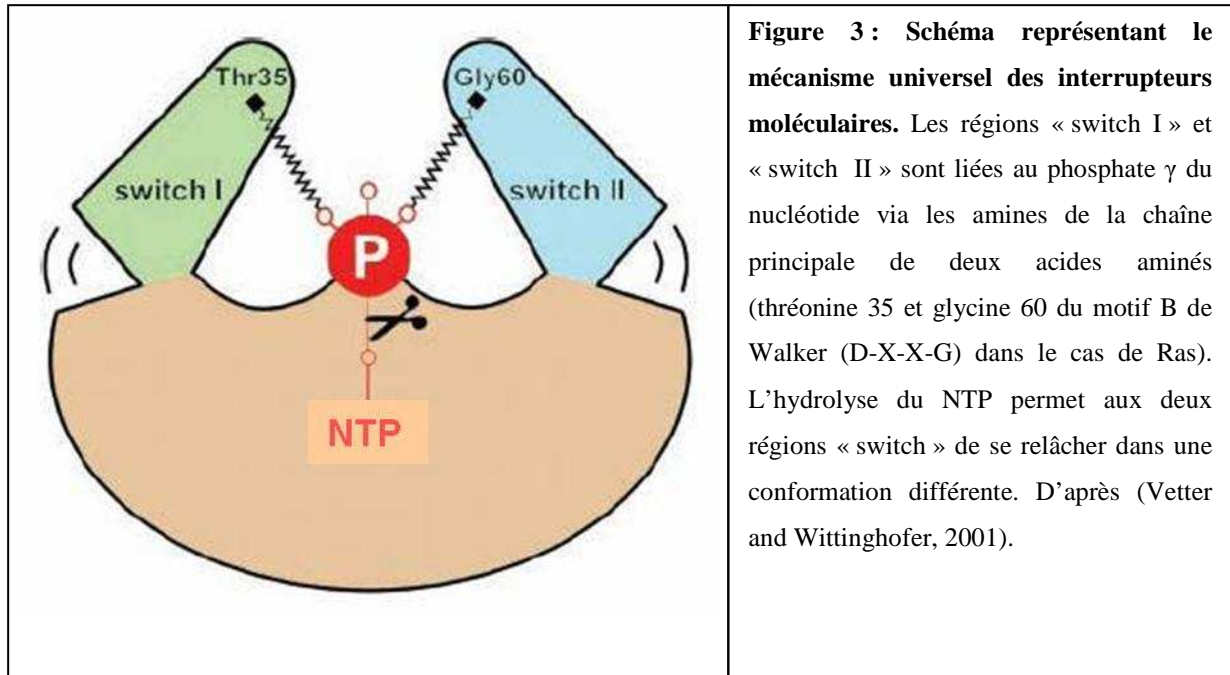
Les GTPases à P-loop sont considérées comme des interrupteurs moléculaires et existent sous trois formes différentes : une forme vide, une forme liée au nucléoside diphosphate dite inactive et une forme liée au nucléoside triphosphate dite active (figure 2). L'activation nécessite la dissociation du GDP lié à la protéine, un processus lent accéléré par les facteurs d'échange de nucléotide GEFs (pour « Guanine nucleotide-exchange factors »). L'échange du GDP en GTP, en général réversible, peut alors se faire. L'inactivation, processus très différent, implique l'hydrolyse irréversible du GTP en GDP, et est accéléré par des protéines GAPs (pour « GTPase-activating proteins »). Les GTPases subissent des changements conformationnels durant l'hydrolyse du nucléotide, puis le signal est transféré à d'autres molécules, ou peut entraîner une interaction avec l'ADN par exemple.



Deux boucles, situées aux alentours du site actif et associées au nucléotide, jouent des rôles majeurs en tant que médiateurs du signal de transduction (Vetter and Wittinghofer, 2001).

La première boucle, située à l'extrémité du feuillet β , est appelée « switch I ». En présence de NTP, elle est impliquée dans la liaison du magnésium. Pendant l'hydrolyse, elle bouge de plusieurs angströms pour adopter une « conformation ouverte ». L'acide aminé situé en haut de la boucle est souvent une thréonine dont le groupement amine de la chaîne principale interagit avec le phosphate γ de l'ATP.

La deuxième boucle, appelé « switch II », suit typiquement le brin β contenant le motif B de Walker. Les premiers acides aminés de la boucle lie le phosphate γ et sont éloignés lors de l'hydrolyse du nucléotide. Cette boucle subit alors des réarrangements conformationnels spectaculaires. Le mécanisme de fonctionnement de telles protéines est illustré par la figure 3.



Koonin et ses collègues ont développé une classification phylogénétique des GTPases à P-loop et ATPases apparentées en divisant 60 groupes distincts en deux classes (Leipe et al., 2002) : Les protéines TRAFAC (pour « TRANslation FACTor-related ») et les protéines SIMIBI (pour « Signal recognition GTPases, MinD, BioD »).

➤ Les GTPases TRAFAC sont caractérisées par une thréonine ou une sérine hautement conservée, située dans la boucle qui précède $\beta 2$, et formant une liaison hydrogène avec le magnésium requis pour l'hydrolyse du GTP. De plus, de nombreuses GTPases TRAFAC possèdent une sérine, localisée dans le brin $\beta 6$, qui est impliquée dans la fixation de la guanine. D'un point de vue structural, le caractère distinctif des GTPases TRAFAC est que les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ sont antiparallèles.

Elles sont divisées en plusieurs grandes superfamilles (Leipe et al., 2002) :

- La superfamille des facteurs de traduction comprend les facteurs de traduction classiques, tels que EF-Tu, EF-G ou encore IF2. A la différence des autres GTPases à P-loop de cette classe, ces protéines sont bien caractérisées dans la littérature (Berchtold et al., 1993; Choi et al., 1998).

EF-Tu est un facteur d'élongation qui forme un complexe avec l' aminoacyl-ARNt et protège la liaison aminoester de l'hydrolyse jusqu'à ce que le positionnement correct s'établisse entre le codon et l'anticodon. Le complexe aminoacyl-ARNt est dissocié après l'hydrolyse du GTP

pour permettre l'incorporation de l'acide aminé dans la chaîne protéique naissante. EF-G est une GTPase ubiquiste qui catalyse la translocation de l'ARN de transfert (ARNt) sur le ribosome. Enfin, IF2, également ubiquiste, assure la liaison de la méthionine-ARNt au ribosome, et permet l'assemblage des deux sous-unités du ribosome chez les eucaryotes.

- La superfamille Ras et ses protéines apparentées sont principalement présentes chez les eucaryotes. Elles ont un rôle important dans la transduction de signaux, le transport intracellulaire de vésicules ou encore l'organisation du cytosquelette (Macara et al., 1996). Comme toutes les protéines de la classe TRAFAC, elles fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires mais ont la particularité de s'associer avec une large variété de protéines GEFs ou GAPs (Leipe et al., 2002).

- La superfamille Obg est caractérisée par la présence d'un résidu phénylalanine conservé dans la boucle du brin β antiparallèle. *Obg* est un gène essentiel impliqué dans l'initiation de la sporulation et la réplication de l'ADN chez *Caulobacter* et *Bacillus*, mais son rôle précis n'est pas connu. La protéine Obg est associée avec le ribosome et la plupart des membres de cette famille possèdent un domaine C-terminal de liaison à l'ARN, suggérant que ce sont des facteurs de traduction (Brown, 2005).

- La superfamille TrmE, Era, EngA, YihA est composée de protéines largement conservées parmi les eubactéries mais absentes chez les archaea, excepté YihA. Par ailleurs, TrmE et YihA sont également trouvées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Brown, 2005).

- TrmE est essentielle à la bactérie, et possède une forte activité GTPase comparée aux autres protéines de ce groupe (500 h^{-1}). Elle joue un rôle dans la modification de l'Uridine en position « wobble » de certains ARNt.

- Era est vraisemblablement un facteur de traduction, dont l'association avec l'ARN 16S via son pseudo domaine KH, stimule son activité GTPase.

- EngA possède deux domaines GTPases en tandem probablement dû à la duplication d'un gène ancestral compte tenu de la similarité des deux domaines. Sa fonction n'est pas caractérisée mais sa conservation suggère une fonction essentielle.

- YihA est une protéine essentielle qui pourrait être impliquée dans le contrôle de la division cellulaire.

- La superfamille des protéines motrices est composée des deux familles majeures, les kinésines et les myosines. Ce sont des protéines eucaryotes qui assurent le mouvement, dépendant de l'ATP, des chromosomes, des vésicules et des organelles le long des microtubules de tubuline pour les kinésines ou le long des filaments d'actines pour les myosines. Ces protéines n'ont pas de spécificité pour le GTP puisqu'elles ne possèdent pas le motif N/T-K-X-D.

➤ Les GTPases SIMIBI partagent des similarités de séquences et de structures qui les distinguent des GTPases TRAFAC. Contrairement aux protéines TRAFAC, le brin $\beta 2$ adjacent au brin $\beta 3$ contenant le motif B de Walker est parallèle au reste du feuillet. Au niveau de la séquence, trois distinctions peuvent se faire : Premièrement, il existe un résidu aspartate conservé dans le brin $\beta 2$ qui interagit avec l'ion magnésium directement ou via une molécule d'eau. Deuxièmement, le motif A de Walker inclut une troisième glycine conservée qui est rarement trouvée chez les GTPases TRAFAC. Enfin, un autre résidu aspartate est conservé au début du brin $\beta 4$ dont le rôle n'est pas connu, mais sa localisation suggère qu'il est requis pour la stabilisation structurale du brin.

Par ailleurs, le motif N/T-K-X-D, responsable de la spécificité pour la guanine chez les protéines TRAFAC, montre des variations de séquences importantes chez les protéines SIMIBI. Beaucoup d'entre elles ne possèdent d'ailleurs pas de spécificité pour le GTP. De la même façon, alors que le motif B de Walker D-X-X-G est très conservé chez les GTPases TRAFAC, l'aspartate est souvent substitué par un glutamate chez les protéines SIMIBI et le nombre d'acides aminés entre le résidu acide conservé et la glycine est variable. Pour finir, les protéines SIMIBI semblent former des dimères à l'opposé des protéines TRAFAC qui fonctionnent typiquement en tant que monomères.

Les protéines SIMIBI peuvent être divisées en trois larges groupes (Leipe et al., 2002):

- La superfamille MinD est caractérisée par un motif A de Walker de séquence G-K-G-G-X-G-K-T/S, et par un motif G4 de reconnaissance spécifique de la guanine où seule l'asparagine est conservée. D'ailleurs très souvent, ces protéines ne montrent pas de spécificité pour le GTP. Cette famille comprend les protéines MinD (impliquées dans le placement correct du site de division chez *E. coli*), ParA/Soj (impliquées dans la ségrégation des plasmides et chromosomes), NifH (protéines du complexe nitrogénase permettant le transfert d'électrons), ou encore ArsA (impliquées dans le transport des oxyanions).

- La superfamille BioD, impliquée dans la synthèse de la biotine (ou vitamine H), est caractérisée par un motif A de Walker légèrement dégénéré de séquence G-X₅-G-K-T/S et un motif B de Walker où l'aspartate conservé est remplacé par un glutamate.

- Les GTPases SRP/SR composées d'une particule de reconnaissance du signal (SRP) et de son récepteur (SR). Elles sont nommées Ffh (SRP) et FtsY (SR) chez les procaryotes.

▪ **Les kinases à P-loop** sont des enzymes ubiquistes qui transfèrent le phosphate γ de l'ATP sur des substrats variés tels que des nucléotides, voire des protéines. Les enzymes possédant une fonction kinase ont évolué indépendamment dans un grand nombre de groupe de repliement, et sont trouvées chez la plupart des familles de protéines liant les nucléotides décrites dans le chapitre I-A. De plus, des études précédentes ont montré que l'activité kinase a pu également évoluer à l'intérieur du groupe de repliement des NTPases à P-loop (Leipe et al., 2003). Concernant les kinases à P-loop les mieux caractérisées, les nucléotide kinases, parmi lesquelles figurent quelques kinases de petites molécules, des études structurales suggèrent qu'elles représentent une classe distincte parmi les autres protéines à P-loop. Elles possèdent les motifs A et B de Walker ainsi que le repliement typique des protéines à P-loop. Néanmoins, dans de nombreuses familles, les derniers résidus serine/thréonine du motif A de Walker sont remplacés par des résidus glycine ou aspartate. De plus, l'aspartate du motif B de Walker est souvent substitué par un glutamate ou est perdu complètement (Leipe et al., 2003). Les Kinases peuvent également être distinguées des autres protéines à P-loop par la présence d'une structure principalement hélicale, le module « lid », située entre les brins β 4 et β 5, dont le rôle est de protéger le site actif du solvant permettant le transfert du phosphate au substrat. Un motif conservé de séquence R-X-X-(X)-R a été mis en évidence dans la première hélice du module « lid ».

La figure 4 illustre les caractéristiques structurales de quelques familles de NTPases à P-loop.

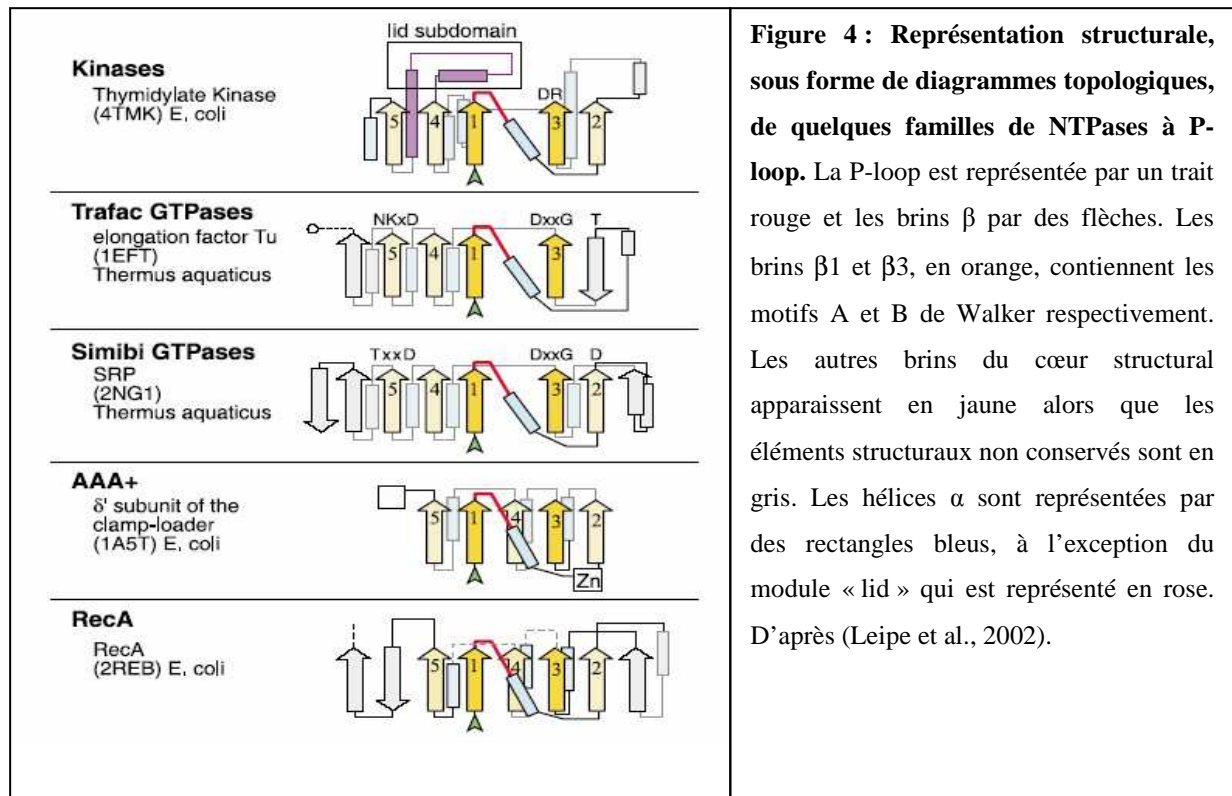
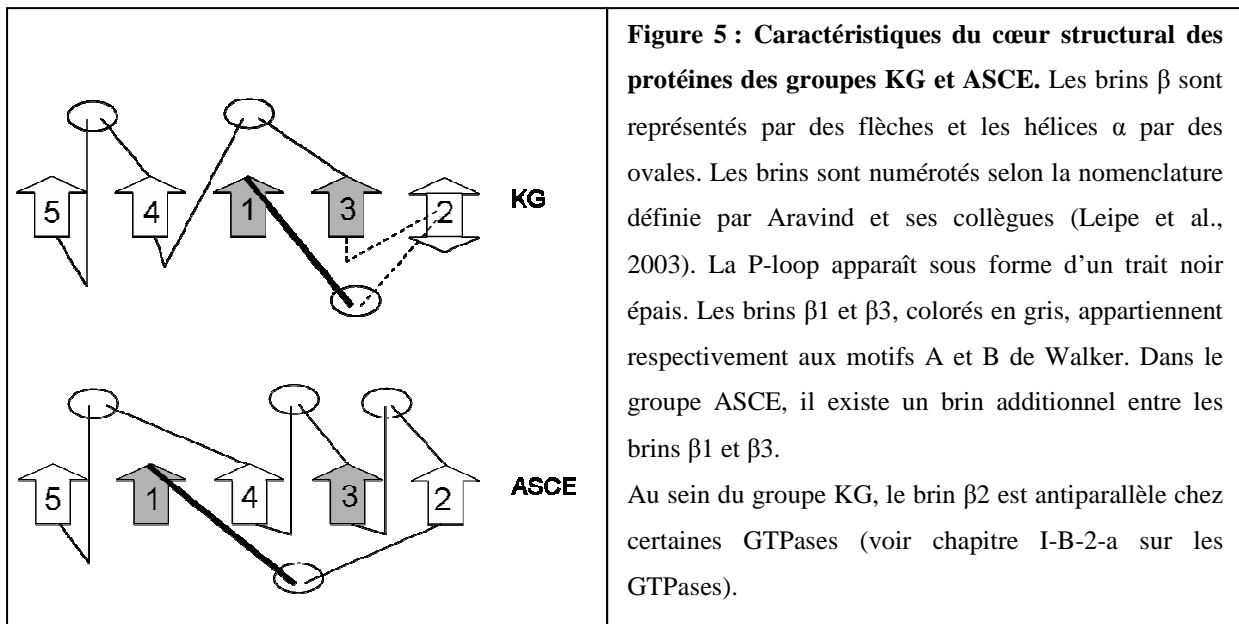


Figure 4 : Représentation structurale, sous forme de diagrammes topologiques, de quelques familles de NTPases à P-loop. La P-loop est représentée par un trait rouge et les brins β par des flèches. Les brins $\beta 1$ et $\beta 3$, en orange, contiennent les motifs A et B de Walker respectivement. Les autres brins du cœur structural apparaissent en jaune alors que les éléments structuraux non conservés sont en gris. Les hélices α sont représentées par des rectangles bleus, à l'exception du module « lid » qui est représenté en rose. D'après (Leipe et al., 2002).

I-B-2-b. Les groupes KG et ASCE

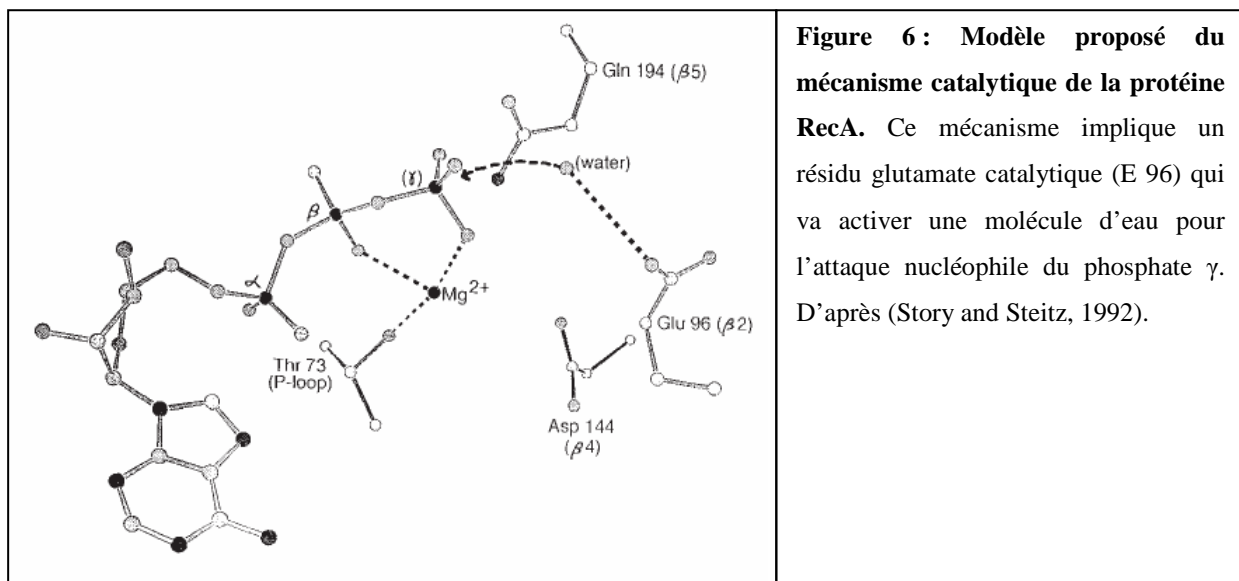
D'un point de vue structural, les NTPases à P-loop peuvent être subdivisées en deux grands groupes : Le groupe KG (pour Kinases-GTPases) et le groupe ASCE (pour « Additional strand, catalytic E ») (Leipe et al., 2003). Le premier groupe inclut les kinases à P-loop et les GTPases qui partagent de nombreuses similarités, comme la position adjacente du brin menant à la P-loop et du brin contenant le motif B de Walker. Le second groupe inclut les cinq autres classes d'ATPases : les ATPases RecA/F0-F1, les hélicases, les protéines AAA, les transporteurs ABC, et un large ensemble des NTPases relatives aux familles AP. Ces protéines possèdent un repliement similaire à celui de la protéine RecA, et sont dites « RecA like ». Ce repliement est caractérisé par la présence d'un brin β additionnel dans le feuillet β , localisé entre le brin β précédant la P-loop et le brin β contenant le motif B de Walker (figure 5).



De plus, à l'opposé des kinases et GTPases, l'hydrolyse de l'ATP par les protéines du groupe ASCE dépend d'un résidu acide conservé qui active une molécule d'eau pour l'attaque nucléophile du phosphate γ de l'ATP (tableau 2 et figure 6). Par conséquent, les protéines du groupe ASCE sont typiquement plus actives que celles du groupe KG, et ne requièrent pas de facteurs accessoires comme les GAPs (pour « GTPase-activating proteins ») ou les GEFs (pour « Guanine nucleotide-exchange factors »). Ce résidu catalytique suit l'aspartate conservé du motif B de Walker chez les protéines AAA, les transporteurs ABC, et les hélicases de la superfamille 1 et 2 (SF1 et SF2), formant la boîte DEXX (Geourjon et al., 2001). En revanche, il est localisé entre les motifs A et B de Walker chez les protéines de la famille RecA/F0-F1 et chez certaines hélicases, où le résidu suivant l'aspartate du motif B de Walker est une sérine ou une thréonine. Enfin, la plupart des protéines du groupe ASCE possèdent un résidu polaire conservé en C-terminal du brin $\beta 4$, qui est inséré entre le brin β précédant la P-loop et le brin β contenant le motif B de Walker. Ce résidu semble intervenir dans les interactions avec d'autres molécules importantes pour l'hydrolyse de l'ATP, comme par exemple avec l'ADN chez les hélicases.

protéines		Résidus conservés
KG	Kinases et GTPasesGX ₄ GK.....D.....
ASCE	protéines AAA, ABC, Hélicases SF1 et SF2GX ₄ GK.....DE.....
	Rec A, Hélicases SF3GX ₄ GK.....E.....D.....

Tableau 2 : Résidus conservés au sein de la séquence des protéines des groupes KG et ASCE. Les deux groupes sont caractérisés par la présence des motifs A et B de Walker. Dans le groupe ASCE, l'hydrolyse de l'ATP dépend d'un résidu glutamate catalytique (représenté en gras) qui suit l'aspartate du motif B de Walker chez les protéines AAA, les transporteurs ABC ou encore les hélicases des familles SF1 et SF2. En revanche, il se situe entre les motifs A et B de Walker chez les protéines RecA/F0-F1 et les hélicases de la famille SF3.



I-B-3. Evolution et hypothèse d'un ancêtre commun

Les protéines sont construites à partir d'un nombre limité d'éléments architecturaux, et la plupart d'entre eux sont impliqués dans le repliement général de la protéine. D'autres motifs ont une activité catalytique ou un rôle dans la liaison d'un ligand. La présence de ce type de motif dans les protéines nouvellement découvertes et de fonction inconnue, peut indiquer une fonction putative. Dans ce contexte, les séquences présentes chez les protéines liant les nucléotides ont attiré l'attention des chercheurs.

De tels motifs fonctionnels peuvent être caractéristiques de superfamilles de protéines qui ont divergées à partir d'un ancêtre commun, puis qui ont perdu leur ressemblance à l'exception des régions fonctionnelles les plus importantes. On parle alors d'évolution divergente. D'un autre côté, ces motifs peuvent refléter une évolution convergente, c'est-à-dire qu'ils sont apparus dans des protéines non apparentées parce qu'ils représentaient une solution unique à un problème.

Il est difficile de faire la distinction entre divergence et convergence et de nombreux débats et désaccords sur l'évolution des NTPases à P-loop existent. A l'exception de la P-loop, le reste de la structure des protéines est assez variable. Leur seul trait commun est la présence d'un corps structural α/β contenant plusieurs brins β qui alternent avec des hélices α . Des auteurs ont prouvé que ce cœur α/β représentait un élément structural conservé au cours de l'évolution pour la liaison des nucléotides, mais qui a subi de nombreux changements. Ce motif fut appelé « coeur structural ancestral » (Milner-White et al., 1991) ou encore « repliement classique des protéines liant les mononucléotides » (Schulz, 1992), et renforce l'hypothèse que les protéines à P-loop descendent d'un ancêtre commun.

Non seulement les topologies observées chez les protéines à P-loop sont différentes, mais le mécanisme de transfert du phosphate et la nature de la réaction catalysée varient considérablement entre les différentes familles.

Les nucléosides monophosphate kinases, comme l'adenylate ou l'uridylylate kinase catalysent le transfert direct du phosphate de l'ATP à l'AMP ou à l'UMP, respectivement. Elles possèdent un grand nombre de résidus arginine qui, avec la lysine conservée de la P-loop, vont stabiliser les charges négatives du phosphate. Il a été montré que ces arginines jouent un rôle très important dans la catalyse (Tsai and Yan, 1991; Yan et al., 1990).

Les ATPases et GTPases catalysent l'hydrolyse de la liaison ester entre les phosphates β et γ du nucléotide. Chez les ATPases, un résidu glutamate active une molécule d'eau proche du phosphate γ , ce qui entraîne l'attaque nucléophile du phosphate γ . Mais certaines ATPases, comme la nitrogénase, utilisent un aspartate comme base catalytique et d'autres, comme la myosine, ne possèdent pas de résidus acides. Dans ce cas précis, le mécanisme d'hydrolyse reste flou. Aucun résidu, agissant comme base catalytique en activant une molécule d'eau, n'a été trouvé chez les GTPases TRAFAC, et il a été proposé que le phosphate γ agit lui-même en temps que base (Schweins et al., 1996; Schweins et al., 1995). La plupart de ces protéines montrent une activité catalytique très faible car un second composant (GAP), fournissant un résidu arginine dans le site actif, doit être ajouté en trans pour compléter le site actif et accélérer la réaction. Ces exemples démontrent qu'un mode similaire de liaison du nucléotide n'implique pas forcément un mode similaire de mécanisme de réaction.

Pour conclure, il n'existe pas de modèle qui identifie toutes les NTPases à P-loop. Le modèle diffère légèrement d'une famille à une autre, mais également au sein d'une même famille. On suppose que ces protéines ont évoluées indépendamment et plus d'une fois, et même lorsqu'elles semblent provenir d'un ancêtre commun, des changements significatifs ont pu apparaître avec le temps.

II-OLIGOMERISATION

Les interactions entre protéines sont la base de la structure quaternaire des complexes protéiques et représentent l'un des niveaux les plus subtils de l'organisation structurale des molécules biologiques. Leur importance est reflétée par l'abondance de la littérature produite dans le domaine de l'association des protéines (Jaenicke and Lilie, 2000; Jones and Thornton, 1995; Park et al., 2001).

Les protéines multimériques constituent seulement un système parmi tous les complexes protéiques existants tels que l'interaction d'une protéine avec un inhibiteur, d'une protéine et son ligand, ou encore d'une protéine avec un autre partenaire cellulaire protéique (voies de signalisation). Ces différents systèmes représentent différents niveaux d'interactions, et les interactions entre les sous-unités d'un multimère sont parmi les plus fortes.

La surface extérieure d'un monomère affiche des détails structuraux qui permettent une disposition dans un ordre spécifique, formant ainsi un oligomère. Ces derniers ont évolué pour acquérir des bénéfices tels que la réduction de la région en surface, l'augmentation de la stabilité, et de nouvelles fonctions à travers la communication entre sous-unités. Ainsi ils exercent une pression de sélection forte pour l'évolution des protéines monomériques en complexes oligomériques.

Les interactions mises en place aux interfaces entraînent, d'un protomère à un autre, un effet de contrainte qui modifie la structure et donc les propriétés fonctionnelles de l'autre protomère : c'est le fondement de nombreux phénomènes cellulaires tels que la transduction du signal, ou la coopérativité enzymatique. Toutes ces interactions ne reposent pas sur de solides liaisons covalentes, mais sur l'ensemble des liaisons faibles qui peuvent unir deux chaînes polypeptidiques. Ces liaisons, bien qu'énergétiquement plus faibles que les liaisons covalentes, sont d'une importance capitale pour les processus biologiques : leur effet cumulatif maintient l'état oligomérique des macromolécules, et inversement, la facilité qu'ont ces forces à se rompre confère toute la souplesse et la dynamique conformationnelle nécessaire aux protéines. Tout ceci est compatible avec la chimie de la cellule où les propriétés de la vie découlent des interactions moléculaires : les biomolécules s'assemblent, puis se dissocient.

En approfondissant nos connaissances sur les interfaces dimériques, on peut ainsi espérer découvrir des molécules qui perturbent la dimérisation de protéines dont la fonction est essentielle à la viabilité des cellules. Ainsi, la caractérisation et la compréhension des

interactions entre protéines sont une étape préliminaire à la conception de nouvelles drogues antibactériennes (Jones and Thornton, 1995).

II-A. Les interactions mises en jeu à l'interface dimérique

Ces liaisons, illustrées par la figure 7, sont de différentes natures. La force du type de liaison à établir va conditionner la distance à laquelle les atomes concernés vont devoir être positionnés (quelques angströms).

- Interactions de type van der Waals

Ces forces apparaissent entre tous les atomes neutres à l'occasion d'interactions électrostatiques transitoires. Elles sont en général de très faible intensité, et diminuent rapidement avec la distance. Elles proviennent de dipôles produits dans les atomes par mouvements des électrons autour de leur noyau chargé positivement, et représentent donc l'attraction électrostatique entre le noyau d'un atome et les électrons d'un autre. Il est intéressant de noter que ce sont ces dipôles transitoires qui constituent l'essence de l'effet hydrophobe.

- Liaisons hydrogène

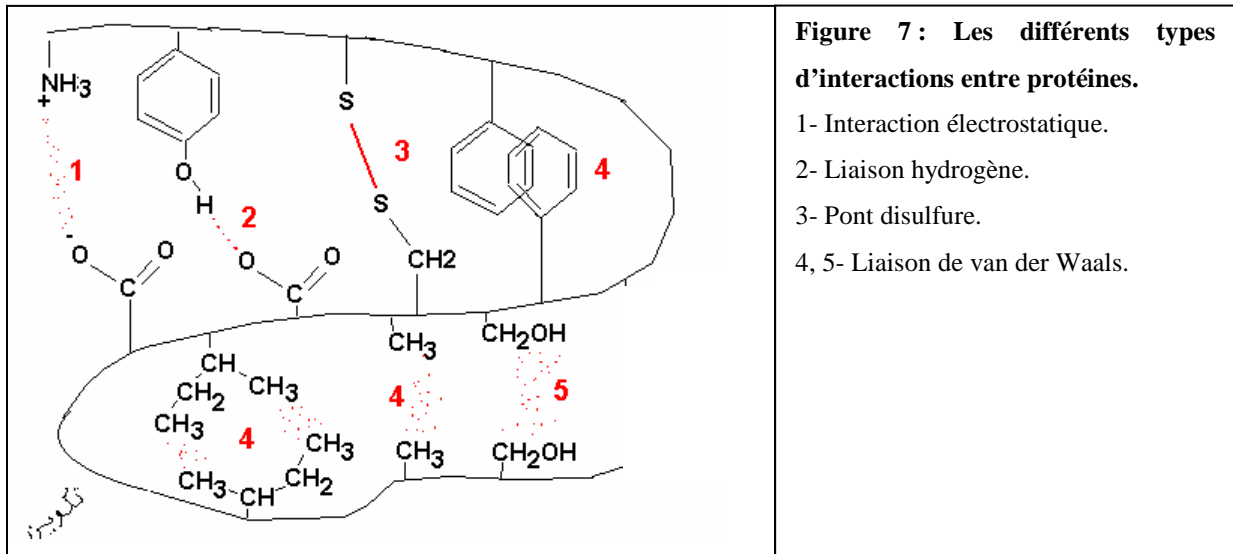
La liaison hydrogène est une liaison faible à caractère essentiellement électrostatique, liant un atome électronégatif doté d'un doublet libre à un atome d'hydrogène, lui-même covalamment lié à un autre atome. Les atomes reliés par les liaisons hydrogène sont essentiellement l'oxygène et l'azote. L'énergie de la liaison hydrogène est en moyenne d'environ 5 kcal/mol, suffisamment faible pour être facilement réversible mais suffisamment élevée pour avoir des conséquences importantes.

- Interactions ioniques

Les liaisons électrostatiques, interactions les plus fortes parmi les liaisons non covalentes, sont dues aux charges électriques des radicaux des acides aminés. Dans les protéines, il existe différents groupes chargés positivement (amide en *N*-terminal, chaîne latérale de la lysine, de l'arginine et de l'histidine) et négativement (carboxyl *C*-terminal, chaîne latérale de l'aspartate et du glutamate). Il se forme alors des forces d'attractions entre deux atomes proches dans l'espace et de charges opposées, qui vont leur permettre de former un pont salin.

▪ Les ponts disulfures

A la différence des autres liaisons, un pont disulfure (lien S-S) est un lien covalent fort qui, par oxydation, réunit les fonctions thiols de deux cystéines. La molécule résultante de la liaison de deux cystéines est la cystine. Ces interactions sont plus rares chez les protéines bactériennes compte tenu, d'une part, de la faible abondance des cystéines au sein des protéines et, d'autre part, du milieu bactérien réducteur défavorable à leur formation.



II-B. Définition d'une interface d'interaction

Une interface d'interaction possède des caractéristiques structurales et chimiques particulières, qui diffèrent d'une protéine à l'autre. Pour déterminer une interface, les premières approches consistent à répertorier et comparer les nombreuses interactions à partir des bases de données, puisque la prédiction des interactions n'est pas encore mise au point. En effet, il existe des méthodes informatiques qui consistent à déterminer le meilleur appariement possible entre deux molécules, où l'ajustement géométrique et la prise en compte des énergies doivent être utilisés pour l'obtention d'un positionnement correct des deux molécules. Cependant, les auteurs montrent que les modèles les plus proches des structures cristallographiques ne correspondent pas toujours aux solutions dont le score est le plus important. Par conséquent, ces méthodes, bien que prometteuses, devront encore subir de nombreux développements afin d'accroître leur efficacité.

Le dépôt des structures tridimensionnelles dans les banques de données de protéines a permis l'analyse d'un large nombre de protéines multimériques. Une étude réalisée sur 23

protéines oligomériques montre une gamme de taille des interfaces très étendue (Janin et al., 1988). Elle constitue en moyenne 20 % de la surface accessible totale, et augmente à la fois en fonction de la taille des sous-unités et du degré d'oligomérisation. Un des aspects principaux dans la stabilisation de l'association des protéines est la présence des interactions de van der Waals entre les résidus hydrophobes (Chothia and Janin, 1975). En effet, la plupart des interfaces sont composées de 70 % de résidus non polaires. L'autre aspect fondamental des interactions entre protéines est la complémentarité : complémentarité de formes mais aussi complémentarité électrostatique, les ponts salins et les liaisons hydrogènes constituant une caractéristique importante des interfaces. D'ailleurs, certains atomes polaires appartenant à l'interface interagissent même grâce à des molécules d'eau intermédiaires situées généralement à la périphérie de l'interface.

La répartition des zones hydrophobes à l'interface a tout d'abord été considérée comme ressemblant fortement à la coupe transversale d'une protéine, avec une région périphérique hydrophile et une région centrale hydrophobe (Miller, 1989). Mais cette observation n'est pas générale puisque une analyse plus récente a montré que la majeure partie des interfaces étudiées montre une dispersion de petites zones hydrophobes entourées de régions polaires (Larsen et al., 1998). Par ailleurs, l'hydrophobicité avait été défini comme étant le facteur majeur de stabilisation de l'association protéine/protéine, alors que les liaisons hydrogènes et les ponts salins jouaient un rôle sélectif en sélectionnant les protéines qui allaient s'assembler (Chothia and Janin, 1975). Mais l'étude de plusieurs complexes hétérologues (Xu et al., 1997) a montré l'importance non seulement des liaisons de type hydrophobe mais aussi des liaisons électrostatiques dans la stabilité du complexe. Cette observation pourrait donc s'appliquer aux interfaces homodimériques où une large interface hydrophobe confèrerait la même stabilité à un oligomère que la collection de petits patches hydrophobes répartis sur toute l'interface.

En résumé, l'interaction entre deux protéines, différentes ou identiques, est complexe et de nombreux facteurs contribuent à une association stable.

II-C. Les NTPases qui s'oligomérisent

II-C-1. Les protéines du groupe ASCE

II-C-1-a. Les ATPases à P-loop actives sous forme "d'anneau hexamérique"

La plupart des ATPases du groupe ASCE sont capables de former des structures hexamériques en forme d'anneau. Cette structure quaternaire, observée chez les protéines de la famille RecA/F0-F1, les protéines AAA, et certaines hélicases, suggère que c'est un trait ancestral des protéines de ce groupe.

- RecA

Cette ATPase, active sous forme oligomérique, est capable de former des anneaux hexamériques avec un diamètre optimal de façon à encercler l'ADN (Leipe et al., 2000). Le brin β_0 et l'hélice α situés en *N*-terminal d'un monomère sont empaquetés de façon antiparallèle entre le brin β_3 et l'hélice α suivante du domaine α/β de l'autre monomère (Story et al., 1992). Un tel arrangement ajoute une nouvelle unité α/β dans le domaine central de la molécule adjacente, élargissant ainsi le feuillet β à neuf brins. Ainsi, le signal peut être transmis d'une sous-unité à l'autre lors de la liaison et l'hydrolyse du nucléotide via des changements conformationnels, ce qui affecte l'affinité de la protéine pour l'acide nucléique.

- Les protéines AAA

Comme RecA, la majorité des ATPases AAA fonctionnent sous forme de structure en anneau oligomérique, ce qui fournit des surfaces symétriques ou quasi symétriques pour l'interaction avec d'autres molécules ou un pore central à travers lequel peuvent passer l'ADN, l'ARN ou encore des polypeptides (figure 8).

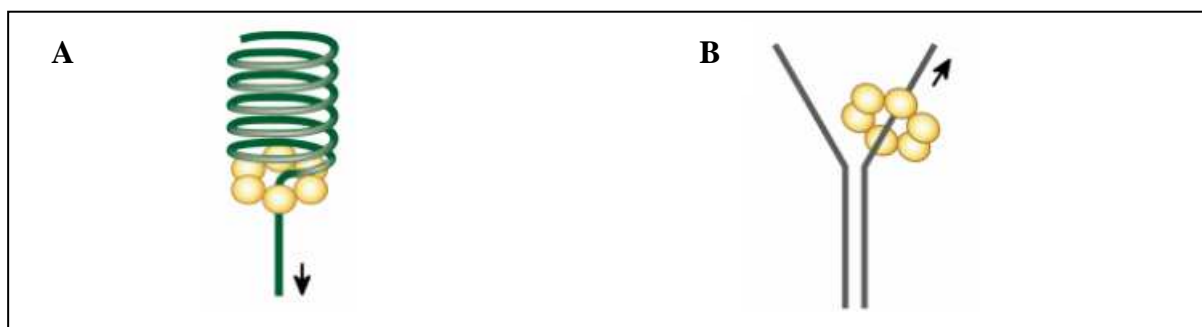


Figure 8 : Schéma simplifié illustrant le mécanisme d'action de protéines AAA. **A.** Un polypeptide, représenté en vert, transite à travers le centre de l'anneau hexamérique où il est déplié. **B.** La protéine AAA agit comme une hélicase en déroulant un acide nucléique double brin. D'après (Ogura and Wilkinson, 2001).

Une arginine conservée, localisée en C-terminal de l'hélice qui suit le brin β_5 , est dirigée vers le site actif du monomère adjacent dans l'anneau (Iyer et al., 2004; Lupas and Martin, 2002). Elle interagit avec le phosphate γ du nucléotide fixé et peut ainsi transmettre un signal à la sous-unité précédente lors de l'hydrolyse de l'ATP via un mouvement de l'hélice (figure 9). Ce mécanisme pourrait expliquer la nette amélioration de l'activité ATPase dans la forme oligomérique. Ceci a été nommé « arginine finger » par analogie avec le résidu équivalent trouvé dans les complexes [Protéine G – GAP] où l'arginine est apportée en trans par la protéine GAP et joue un rôle critique dans l'hydrolyse. Ce phénomène a d'abord été décrit chez les protéines AAA mais est caractéristique de toutes les ATPases de type « RecA like » qui forment des anneaux hexamériques.

La localisation du site de liaison des nucléotides situés à l'interface des sous-unités a permis à certaines protéines AAA de rendre leur oligomérisation dépendante des nucléotides (Lupas and Martin, 2002).

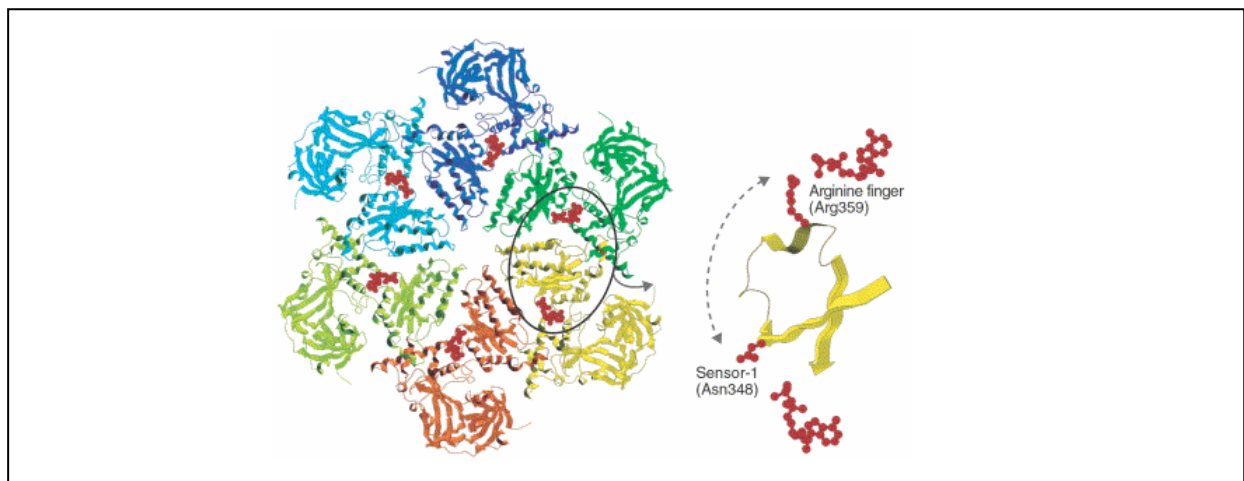


Figure 9 : structure du domaine N-terminal et du premier domaine ATPase de la protéine p97. Les six domaines Rec A sont représentés par des couleurs différentes et le nucléotide fixé dans chaque sous-unité est en rouge. Chez les protéines AAA, le résidu polaire (noté sensor 1) situé dans le brin β_4 (entre les motifs A et B de Walker) et « l'arginine finger » d'une sous-unité sont localisés aux deux extrémités d'une hélice α et forment des contacts simultanément avec les phosphates γ des nucléotides fixés dans deux sites adjacents. Lors de l'hydrolyse du nucléotide dans un site, un signal est transmis au site suivant via le mouvement de l'hélice qui connecte les deux résidus. D'après (Lupas and Martin, 2002).

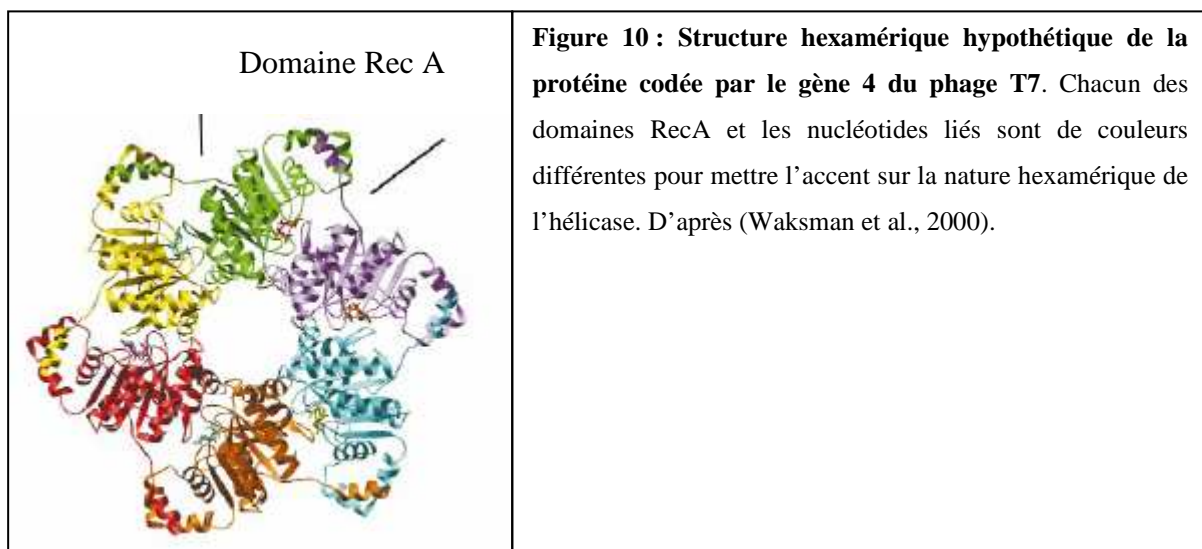
- Les hélicases

Les hélicases de la superfamille SF3 et des familles F4 et F5 sont généralement actives sous forme oligomériques. En effet, le fonctionnement de ces enzymes nécessite qu'elles possèdent plusieurs sites de liaison à l'ADN, ce qu'elles acquièrent en s'oligomérisant, chaque monomère apportant un site de liaison. Il existe deux catégories d'hélicases : les hélicases dimériques et les hélicases hexamériques. Les informations sur les premières se limitent à l'étude des hélicases Rep ou UvrD chez *E. coli* alors que l'assemblage de nombreuses hélicases en hexamères est décrit en détail dans la littérature (Bujalowski et al., 1994; Donmez and Patel, 2006; Finger and Richardson, 1982).

Aucune des hélicases hexamériques connue n'appartient aux superfamilles SF1 et SF2. Par conséquent, les superfamilles reflètent les différences dans l'assemblage quaternaire des sous-unités de ces enzymes.

Le mode de fixation de l'acide nucléique dépend de l'hélicase mais en général il se fixe au centre de l'hexamère dans le cas des hélicases hexamériques.

Dans leur forme homohexamérique, les hélicases forment des structures similaires en forme d'anneau (figure 10), avec un diamètre extérieur de 100 à 130 Å et un diamètre central de 20 à 30 Å (Lohman and Bjornson, 1996). Ces similarités de la taille des diamètres sont surprenantes puisque les poids moléculaires des monomères sont assez variables, allant de 37 kDa pour RuvB à 92 kDa pour l'antigène T du virus SV40.



II-C-1.b. Les transporteurs ABC

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I-B-2-a, la structure des transporteurs ABC consiste en deux domaines membranaires responsables de la translocation du substrat à travers la membrane, et de deux domaines hydrophiles, qui lient et hydrolysent l'ATP pour actionner le transporteur.

La liaison et l'hydrolyse de l'ATP induisent la formation, puis la dissociation du dimère de domaines nucléotidiques, ce qui entraîne des changements de conformation des domaines transmembranaires permettant le transport. Les deux nucléotides sont positionnés à l'interface du dimère, et chacun d'entre eux interagit avec les acides aminés des deux domaines nucléotidiques. Ainsi, il existe deux poches de liaison à l'ATP pour lesquelles les deux domaines nucléotidiques contribuent. Higgins et Linton ont proposé un modèle de mécanisme de fonctionnement des transporteurs ABC, décrit dans la figure 11 (Higgins and Linton, 2004).

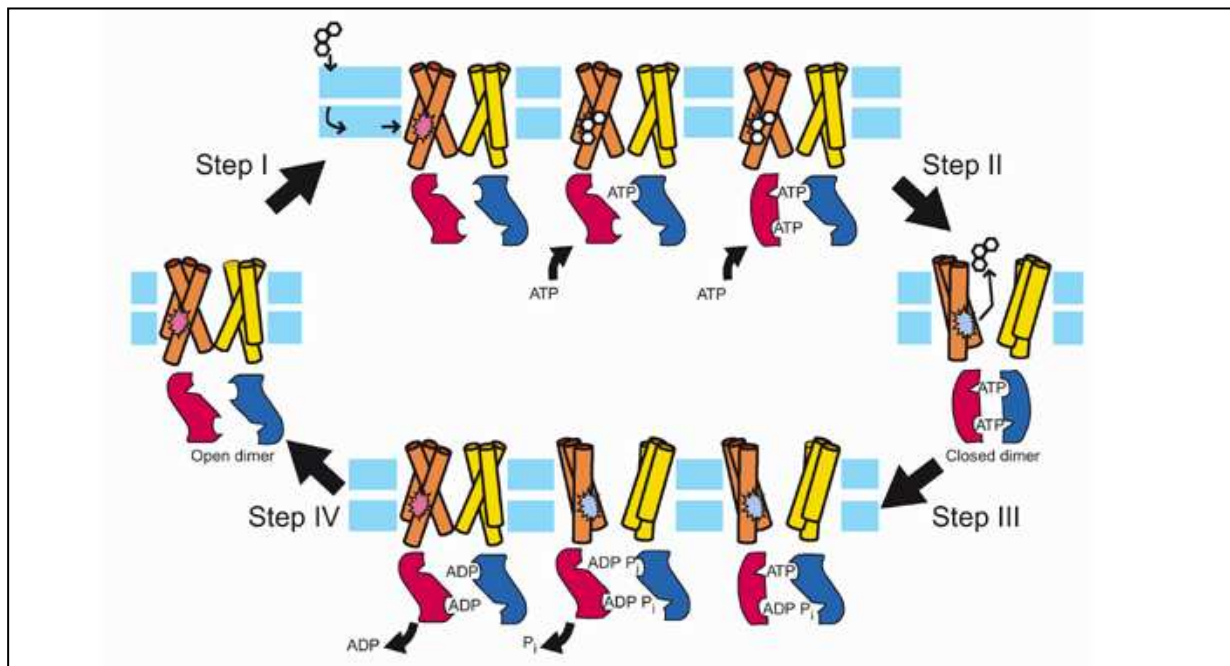


Figure 11 : Modèle du transport dépendant de l'ATP des transporteurs ABC. Les domaines transmembranaires sont représentés par des cylindres qui traversent la membrane et chaque domaine nucléotidique est représenté par une forme rouge ou bleue dans le cytoplasme. Le transporteur, dans son état basal, possède ses domaines nucléotidiques dans une conformation ouverte, caractérisée par une faible affinité pour l'ATP. 1^{ère} étape : le transport est initié par la fixation du substrat sur le domaine transmembranaire. L'affinité du domaine nucléotidique pour l'ATP est alors augmentée, engendrant la formation d'un dimère dans une conformation fermée. 2^{ème} étape : Le dimère formé induit un changement conformationnel des domaines transmembranaires, de telle sorte que l'affinité des domaines transmembranaires pour le substrat est réduite, libérant ainsi la drogue liée. 3^{ème} et 4^{ème} étape : L'hydrolyse de l'ATP déstabilise le dimère dans sa configuration fermée et la libération de l'ADP et du phosphate inorganique restaure la configuration basale du transporteur. D'après (Higgins and Linton, 2004).

Dans ce modèle, les auteurs proposent que la liaison du substrat sur les domaines transmembranaires entraîne un changement de conformation des domaines nucléotidiques qui permet une meilleure accessibilité du site actif à l'ATP (1^{ère} étape, figure 11). La fixation de l'ATP induit alors la formation d'un dimère de domaines nucléotidiques dans une conformation fermée qui engendre un changement de conformation des domaines transmembranaires permettant le transport de la drogue liée (2^{ème} étape, figure 11). Enfin, l'hydrolyse de l'ATP va déstabiliser le dimère, puis la libération de l'ADP et du phosphate inorganique va restituer le dimère dans sa conformation ouverte (3^{ème} et 4^{ème} étapes, figure 11).

II-C-2. Les protéines du groupe KG

II-C-2-a. Les GTPases du groupe SIMIBI

Les GTPases du groupe SIMIBI sont actives sous forme de dimères, à la différence des GTPases TRAFAC qui fonctionnent typiquement sous forme de monomères (Leipe et al., 2002).

Toutes ces protéines sont connues pour former des homodimères (MinD, Soj, NifH, ArsA, BioD) ou des hétérodimères dans le cas d'une molécule et de son récepteur. Les deux nucléotides peuvent être fixés de façon parallèle, les deux molécules étant orientées dans le même sens (NifH, Soj) ou de façon antiparallèle, les deux molécules étant orientées dans des sens opposés (Ffh/FtsY). Cela crée une interface de dimérisation totalement différente et un mécanisme d'hydrolyse du nucléoside triphosphate distinct.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux protéines de la superfamille MinD car elles sont connues pour former des homodimères et sont les mieux décrites dans la littérature.

- **Dimérisation NTP-dépendante**

Certaines protéines de cette famille sont monomériques en absence de nucléoside triphosphate. Le site de liaison au nucléotide impliquant des résidus des deux monomères, la fixation du GTP ou de l'ATP permet la dimérisation. C'est le cas de Soj (figure 12) où le premier monomère apporte le motif A de Walker dans le site actif alors que le second monomère intervient dans la fixation du ribose et de la chaîne polyphosphates (Gasper et al., 2006).

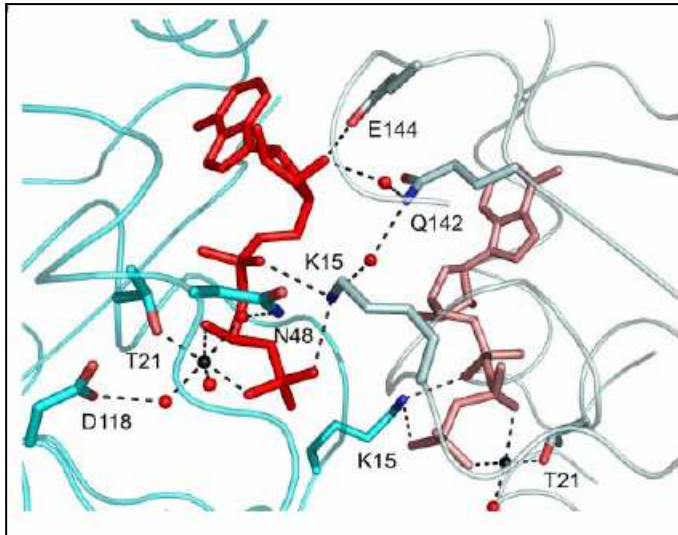


Figure 12 : Site actif de l'homodimère Soj. Les deux monomères apparaissent en bleu et en gris. Les molécules d'ATP, représentées en rouge et en rose, sont orientées dans le même sens. Le second monomère interagit avec le ribose et la chaîne polyphosphates, permettant la dimérisation ATP-dépendante. D'après (Gasper et al., 2006).

D'autres protéines, comme NifH et ArsA, existent sous forme de dimères en absence de nucléotide ou en présence d'ADP mais adoptent une conformation fermée lors de la fixation de l'ATP. Bien que formé principalement des résidus d'un monomère, leur site de liaison au nucléotide implique quelques résidus du second monomère.

- Interrupteurs moléculaires

Comme toutes les GTPases, les protéines SIMIBI agissent en tant qu'interrupteur moléculaire. Cependant, les protéines TRAFAC utilisent les changements conformationnels GTP-dépendants des régions Switch I et II pour interagir avec des molécules effectrices, alors que les protéines SIMIBI utilisent les changements conformationnels dus au NTP pour réguler leur dimérisation (Gasper et al., 2006). Ainsi, la fixation du nucléoside triphosphate entraîne l'association de ces protéines alors que son hydrolyse dissocie le dimère.

L'association de deux sous-unités est requise pour réguler ou acquérir une fonction biologique. Mais souvent elle n'est pas suffisante pour stimuler l'hydrolyse du nucléoside triphosphate, et certaines protéines SIMIBI requièrent une protéine accessoire pour devenir active. C'est le cas de Soj et MinD qui interagissent respectivement avec Spo0J (Leonard et al., 2005) et MinE (Lutkenhaus and Sundaramoorthy, 2003; Ma et al., 2004).

- Exemples de mécanisme de protéines

Après fixation de l'ATP, Soj va dimériser et se lier à l'ADN pour former des filaments de nucléoprotéines. Elle va ainsi réprimer la transcription de certains gènes impliqués dans la sporulation de la bactérie en se fixant sur leur région promotrice. Soj va alors interagir avec

Spo0J qui va stimuler son activité d'hydrolyse. N'ayant plus d'ATP dans le site actif, le complexe va se dissocier (Leonard et al., 2005).

Le même type de mécanisme est décrit pour NifH, où la fixation d'ATP permet au dimère d'acquérir une configuration fermée. Cette configuration possède une meilleure affinité pour la protéine MoFe, à qui NifH va transférer des électrons. Une fois de plus, l'interaction des deux protéines va permettre l'hydrolyse de l'ATP, puis la dissociation du complexe (Lutkenhaus and Sundaramoorthy, 2003).

II-C-2-b. L'HPr kinase/phosphatase (HprK/P)

Les bactéries sont des organismes hautement adaptatifs, capables de croître dans des conditions environnementales variées. Une des clefs de leur adaptation est la multitude de gènes cataboliques permettant à la bactérie de pousser en présence de différentes sources de carbones. L'HprK/P est une enzyme de régulation qui contrôle le métabolisme du carbone chez les bactéries à Gram positif. Elle catalyse la phosphorylation ATP-dépendante de la sérine 46 de l'HPr, une protéine du système phosphotransférase, mais aussi sa déphosphorylation.

Comme nous l'avons énoncé dans le chapitre I-A, l'HprK/P ne ressemble pas aux protéine kinases eucaryotes puisqu'elle ne possède pas les signatures typiques trouvées dans cette famille. En revanche, elle possède un motif A de Walker. L'HprK/P de différents organismes a été étudiée. Les domaines putatifs de liaison au nucléotide et à l'HPr sont très conservés dans les différents organismes, et leur structure tertiaire devrait être la même. En revanche, la structure quaternaire semble beaucoup moins conservée. En effet, les données disponibles suggèrent la présence de dimère chez *Enterococcus faecalis* (Kravanja et al., 1999), d'hexamère chez *Lactobacillus casei* (Fieulaine et al., 2001), *Staphylococcus xylosus* (Marquez et al., 2002), et *Mycoplasma pneumoniae* (Steinhauer et al., 2002), d'octamère ou d'hexamères chez *B. subtilis* selon les auteurs (Jault et al., 2000; Ramstrom et al., 2003), ou encore de décimère chez *Streptococcus salivarius* (Brochu and Vadeboncoeur, 1999). La structure hexamerique est cependant la plus retrouvée. Un équilibre entre dimères et hexamères en fonction du pH a également été décrit pour la protéine de *B. subtilis* (Ramstrom et al., 2003), et la caractérisation de ses propriétés enzymatiques a été exploitée, montrant une forte coopérativité positive pour la liaison du nucléotide et du Fructose 1, 6-bisphosphate (Jault et al., 2000).

II-D. Les facteurs agissant sur l'oligomérisation :

II-D-1. La composition saline

L'état oligomérique d'une protéine dépend souvent de la force ionique du tampon dans lequel elle se trouve. Cependant, l'effet des sels sur sa structure quaternaire est différent selon la nature des interactions impliquées à l'interface du multimère. Les interactions électrostatiques sont rompues à des concentrations salines élevées alors que les liaisons de type hydrophobe sont renforcées (Lebowitz et al., 1994). En effet, les résidus chargés d'un monomère vont interagir avec les contre ions des sels (Cl^- , Na^+ , K^+ ...) et ne vont plus interagir avec les résidus chargés de l'autre monomère alors que les résidus apolaires vont se regrouper entre eux pour éviter toute interactions avec les contre ions chargés. L'addition de sels provoque donc une dissociation du dimère lorsque des interactions électrostatiques sont mises en jeu (Lebowitz et al., 1994) ou, au contraire, une association lorsque des interactions de type hydrophobe sont impliquées (Khayat et al., 2004).

II-D-2. Le pH

Les changements de pH ont une incidence sur les liaisons électrostatiques. L'état d'ionisation de la chaîne latérale des acides aminés acides et basiques dépend de leur pKa et du pH de la solution dans laquelle la protéine se trouve. Le pKa d'un résidu aspartate ou glutamate se situe autour de 4 ou 5, et ceux de l'arginine et la lysine sont d'environ 12,5, et 10,5 respectivement. A pH neutre, la chaîne latérale d'un résidu acide, chargé négativement, pourra alors interagir avec celle d'un résidu basique chargé positivement. Lorsque le pH de la solution augmente il y a une déprotonation ou à l'inverse une protonation lorsqu'il diminue. Ceci occasionne un changement de charges, qui a une conséquence sur les interactions électrostatiques impliquées dans la dimérisation (Chou et al., 2004; Ramstrom et al., 2003).

II-D-3. La température

Comme pour l'effet de la force ionique, les conséquences de la température sur l'oligomérisation d'une protéine dépendent de la nature des interactions à l'interface du multimère. Ainsi, les interactions de type hydrophobe sont renforcées à températures élevées alors que les interactions électrostatiques sont rompues (Lebowitz et al., 1994).

L'augmentation de température provoque donc une association lorsque des interactions de type hydrophobe sont impliquées ou, au contraire, une dissociation du dimère lorsque des interactions électrostatiques sont mises en jeu.

II-D-4. La concentration protéique

Dans la plupart des cas, il existe une corrélation directe entre la distribution des espèces monomériques et dimériques et la concentration en protéine. Une augmentation de la concentration protéique entraîne un rapprochement des molécules dans l'espace et par conséquent, facilite la multimérisation.

II-D-5. Les substrats

Dans certains cas, la fixation d'un substrat ou d'un partenaire protéique entraîne ou favorise la multimérisation de la protéine. C'est le cas des protéines SIMIBI dont la dimérisation est médiée par la fixation du nucléoside triphosphate (voir chapitre II-C-2-a), ou encore de l'hélicase Rep dont la dimérisation est dépendante de l'ADN.

II-D-6. Les agents réducteurs

Le pont disulfure est une liaison covalente mais qui est facilement rompue en milieu réducteur. Ainsi, des réducteurs doux, tel le β -mercaptoéthanol (β ME) ou le dithiothreitol (DTT), permettent la dissociation d'un oligomère lorsque des ponts disulfures sont impliqués dans l'oligomérisation (Sato et al., 2005).

III. VERS DE NOUVELLES CIBLES POUR LA RECHERCHE D'ANTIBIOTIQUES

III-A. La résistance aux antibiotiques, un problème de santé publique

III-A-1. Présentation du problème

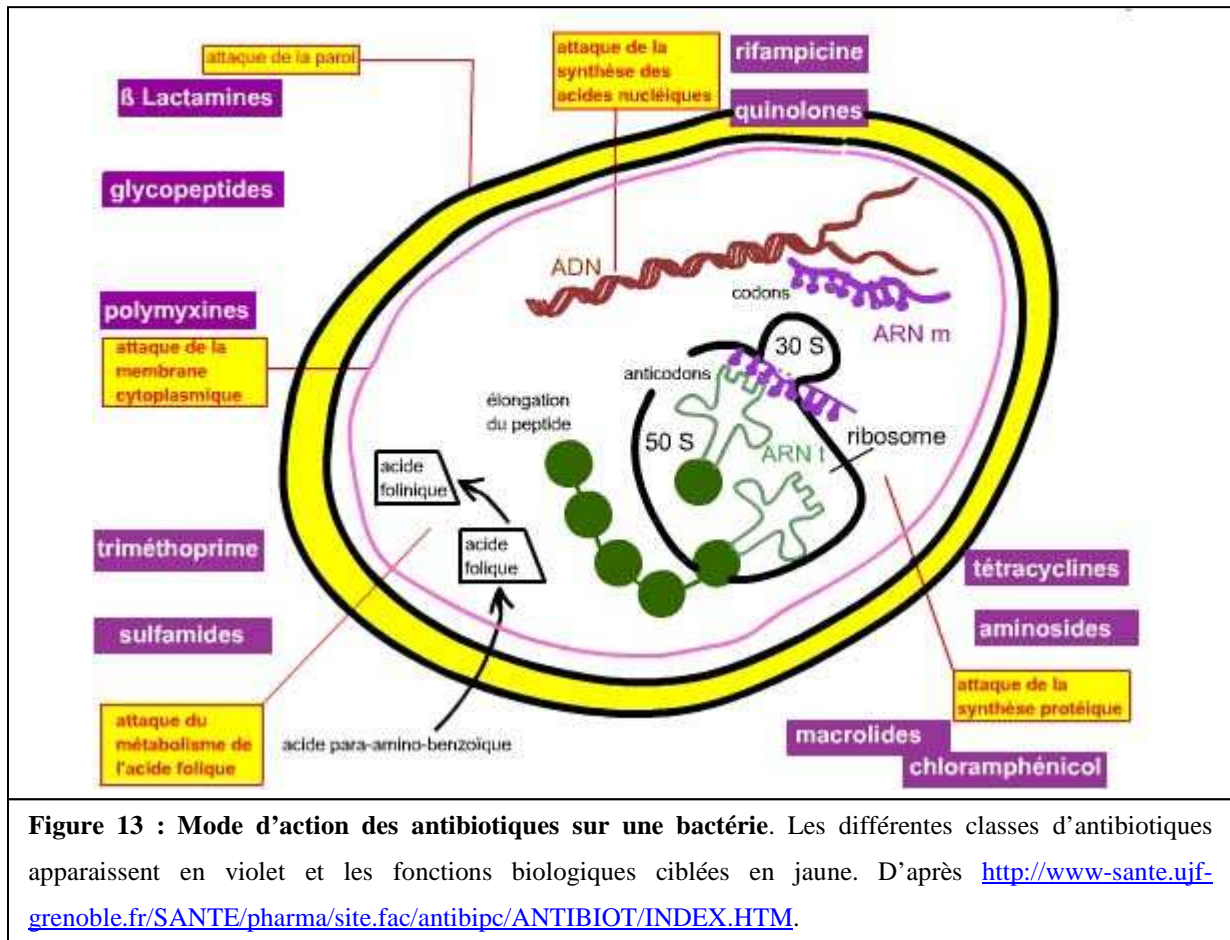
La découverte des antibiotiques est l'une des plus grandes avancées du monde médical. Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par des micro-organismes (champignons ou bactéries), ou chimique, et qui est capable d'inhiber la multiplication d'autres micro-organismes ou de les détruire. Après avoir révolutionné le traitement des maladies infectieuses au cours du XX^{ème} siècle, les antibiotiques semblent aujourd'hui avoir marqué le pas car dans le monde de l'infiniment petit, les bactéries ne s'avouent jamais vaincues. Face à nos médicaments préférés, elles ont appris à se défendre et selon l'Organisation Mondiale de la Santé, certains antibiotiques actuellement disponibles, pourraient ne plus être efficaces d'ici 10 à 20 ans. En effet, leur utilisation trop généralisée en médecine humaine et vétérinaire depuis 50 ans a malheureusement conduit à de graves phénomènes de résistance chez les bactéries. A titre d'exemple, le taux de résistance du pneumocoque aux pénicillines est passé de 0,5 % en 1984 à 42 % en 1999 et, pour la population des enfants, ce taux atteignait même 60 à 70 % en 2001. Ce phénomène est naturel, conséquence de l'écologie microbienne et illustration de l'extraordinaire capacité d'adaptation du vivant, mais il est largement aggravé par l'utilisation inconsidérée des antibiotiques.

III-A-2. Caractéristiques des antibiotiques préexistants

Un antibiotique a un spectre d'activité large s'il s'attaque à plusieurs types de micro-organismes ou un spectre étroit s'il est capable de cibler sélectivement certains pathogènes. On regroupe souvent les antibiotiques selon leur mode d'action et on distingue quatre cibles principales (figure 13) :

- la synthèse de la paroi bactérienne qui peut être interrompue par les β -lactamines, la grande famille des pénicillines et céphalosporines.
- la synthèse des protéines qui peut être perturbée par des antibiotiques tels que le chloramphénicol ou la tétracycline.
- la synthèse des acides nucléiques qui peut être bloquée par la rifampicine ou les quinolones.

- le métabolisme intermédiaire, quant à lui, peut être modifié, entre autres, par les sulfamides, inhibiteurs de l'acide folique synthétase.



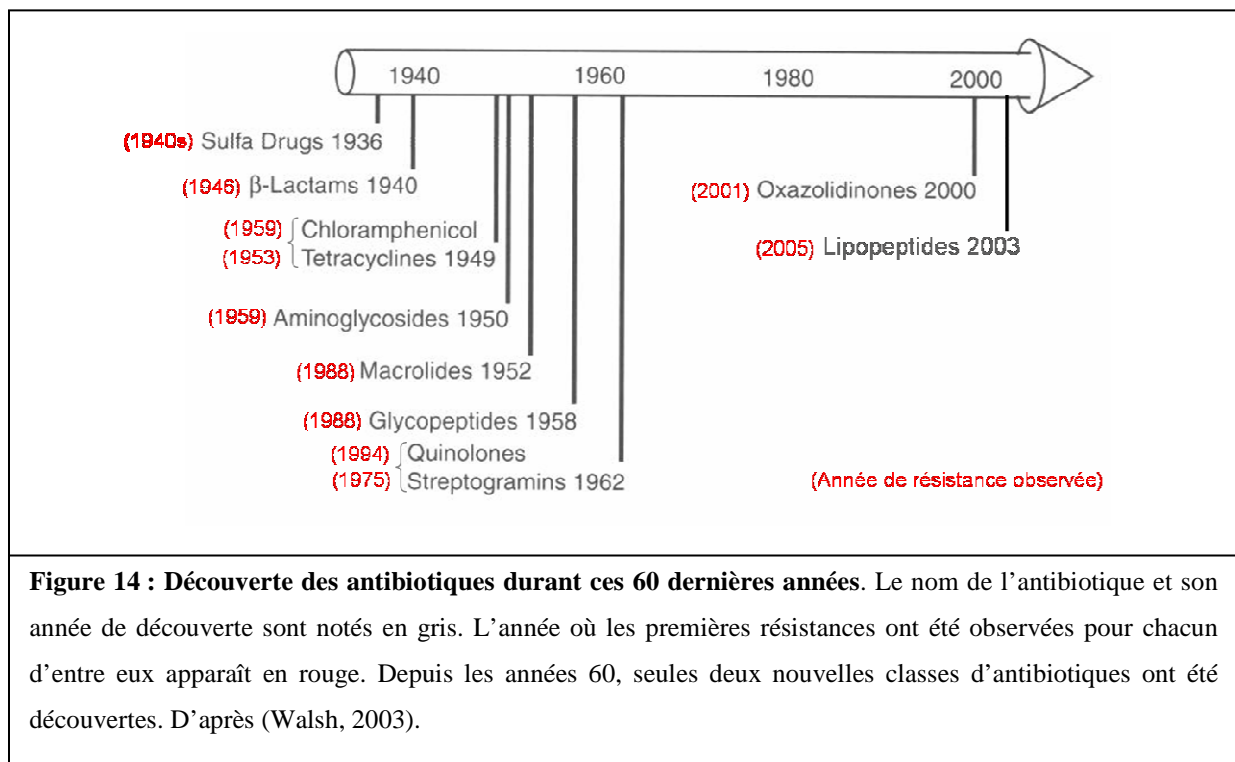
La résistance peut s'acquérir par une mutation dans un gène de la bactérie, ou encore par l'acquisition d'un nouveau gène, en particulier par l'intermédiaire d'un plasmide. De ce fait, les bactéries sont capables d'inactiver tel ou tel antibiotique, soit en rendant impossible sa pénétration cellulaire, soit en le détruisant par une enzyme, soit en contournant par d'autres réactions la cible de l'antibiotique.

III-A-3. Comment lutter contre l'émergence des souches multirésistantes

La résistance multidrogues est due en large partie au répertoire limité des agents antibactériens qui éradiquent les bactéries en utilisant une gamme faible de mécanismes, et il est maintenant clair que l'arsenal existant d'agents antimicrobiens est insuffisant pour nous protéger à long terme. Paradoxalement, depuis 50 ans, moins de 30 protéines ont été ciblées pour la recherche de drogues antibactériennes par les industries pharmaceutiques, qui préfèrent se concentrer sur les maladies chroniques plus prometteuses pour des traitements à

long terme. De même, seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques, oxazolidinones et lipopeptides, ont atteint le seuil clinique durant ces 40 dernières années (figure 14). La solution se trouve donc dans la recherche de nouvelles cibles permettant de développer des inhibiteurs qui agissent différemment de ceux classiquement utilisés. Ces nouveaux inhibiteurs pourraient alors constituer les médicaments du futur, car ne nous hâtons pas de vérifier la célèbre assertion de Pasteur : « Messieurs, ce sont les microbes qui auront le dernier mot »!

L'avènement du séquençage des génomes bactériens a permis de montrer qu'environ 1/3 des gènes codent des protéines de fonction inconnue, appelées « orphelines », qui sont, pour beaucoup d'entre elles, hautement conservées et indispensables à la croissance des bactéries. Certaines de ces protéines constituent alors des cibles non traditionnelles, potentielles pour la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes.



III-A-4. Définition de la cible idéale d'un nouvel inhibiteur

La valeur d'une cible reste aujourd'hui le sujet d'un débat considérable. Typiquement, la cible idéale doit répondre à plusieurs critères.

- C'est une protéine dont le mécanisme et la fonction est pleinement élucidée.
- Elle doit être requise pour la survie de l'organisme.

- Elle est unique à la cellule procaryote ou suffisamment différente des enzymes eucaryotes pour que la toxicité sur l'hôte reste faible.
- Elle est présente dans un grand nombre d'espèces d'importance clinique où le développement d'antimicrobiens pourra conduire à une drogue ayant un large spectre d'activité.
- Elle peut être purifiée en quantité importante en tant que protéine recombinante de telle sorte que de nombreux essais peuvent être réalisés en laboratoire.

III-B. Choix de la cible

III-B-1. Pourquoi une protéine de *B. subtilis* ?

B. subtilis est une eubactérie de l'eau et du sol, non pathogène, très étudiée et dont le génome est totalement séquencé depuis 1997 (Kunst et al., 1997). Elle est utilisée comme modèle chez les bactéries à Gram positif au même titre qu'*E. coli* chez les bactéries à Gram négatif. Ce modèle inclut des bactéries pathogènes telles que *Bacillus cereus* ou *Bacillus anthracis* responsables respectivement d'intoxication alimentaire et de l'anthrax, mais aussi des bactéries de l'industrie ou de la nourriture comme *bacilli* ou *lactococci*.

L'invalidation systématique de tous les gènes de *B. subtilis* par Kobayashi et ses collègues a permis de définir les gènes essentiels de ce micro-organisme (Kobayashi et al., 2003). Ce programme d'analyse fonctionnelle du génome de *B. subtilis* s'est basé sur l'incapacité d'inactiver les gènes vitaux par insertion du vecteur pMUTIN4 dans leur séquence codante. Sur environ 4100 gènes dans le génome, 79 ont été prédits comme essentiels et 192 l'ont été définis expérimentalement. Parmi ces 271 gènes indispensables à la croissance de la bactérie, environ la moitié est impliquée dans la transmission de l'information, 20 % dans la synthèse de l'enveloppe cellulaire et la division cellulaire, 10 % dans l'énergie cellulaire, 10 % dans le métabolisme des nucléotides et seulement 10 % sont des gènes codant des protéines de fonction inconnue ou des protéines dont la fonction est encore vague. Parmi ces familles de protéines inconnues, certaines possèdent dans leur séquence des motifs caractéristiques impliqués potentiellement dans la fixation et/ou l'hydrolyse des nucléotides, GTP ou ATP, suggérant que leur fonction cellulaire est couplée à une activité GTPase ou ATPase. Les NTPases sont souvent associées à des processus cellulaires fondamentaux (Park et al., 2001), et la compréhension de leur rôle au sein des

bactéries ainsi que de leur mécanisme de fonctionnement pourrait alors déboucher, à plus long terme, sur la découverte de nouveaux inhibiteurs utilisables dans des antibiothérapies du futur.

III-B-2. La protéine YdiB est-elle une cible idéale ?

Notre choix s'est porté sur YdiB, une enzyme de *B. subtilis* pour plusieurs raisons :

- YdiB, est une protéine d'environ 20 kDa de fonction inconnue, mais qui possède une signature fonctionnelle putative d'ATPases/GTPases.
- Il a été montré que cette nouvelle enzyme était indispensable à la croissance « normale » des bactéries à gram positif (*B. subtilis*) (Hunt et al., 2006; Kobayashi et al., 2003) et à gram négatif (*E. coli*) (Allali-Hassani et al., 2004; Freiberg et al., 2001).
- C'est une enzyme spécifiquement bactérienne. Elle est absente chez les archaea ou les eucaryotes.
- Le gène est présent chez toutes les bactéries exceptées chez *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Il est donc présent chez de très nombreuses souches pathogènes d'intérêt clinique, telles que *Treponema pallidum* responsable de la syphilis, *Staphylococcus aureus* responsable d'infection nosocomiales mortelles, ou encore *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose. Par conséquent, cette protéine constitue une cible de choix pour de nouvelles drogues possédant un spectre d'activité large.
- Durant mon année de DEA, nous avons établi des conditions expérimentales permettant la surexpression de la protéine avec une étiquette polyhistidines à un niveau élevé, et un protocole très efficace de purification a été mis au point. Ainsi, la quantité de protéine n'est pas limitante pour les essais expérimentaux.

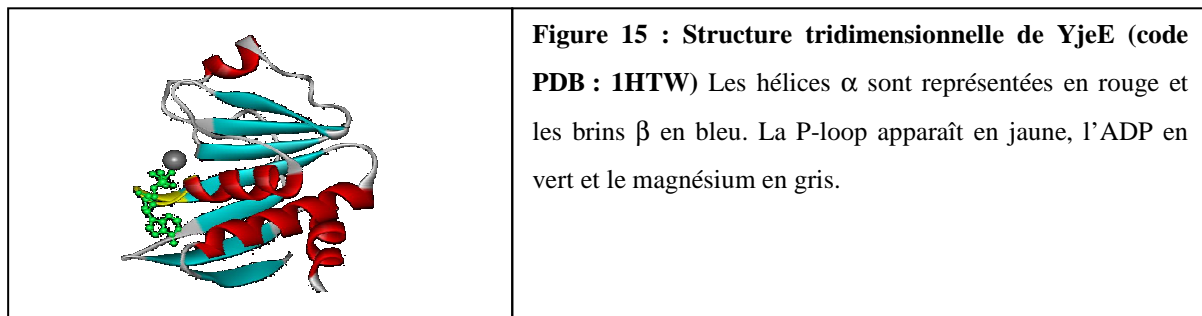
Pour toutes les raisons évoquées ci-dessus, cette protéine constitue une cible idéale pour la recherche de nouveaux inhibiteurs utilisables pour lutter contre la prolifération des germes pathogènes. . A ce titre, notons que la protéine homologue d'*Haemophilus influenzae* a déjà fait l'objet d'une recherche préliminaire d'inhibiteurs par la compagnie pharmaceutique Abbott (Lerner et al., 2007). Cet objectif, à plus long terme, nécessite cependant au préalable une meilleure compréhension de cette nouvelle famille d'enzyme.

III-C. Caractéristiques et classification de YdiB

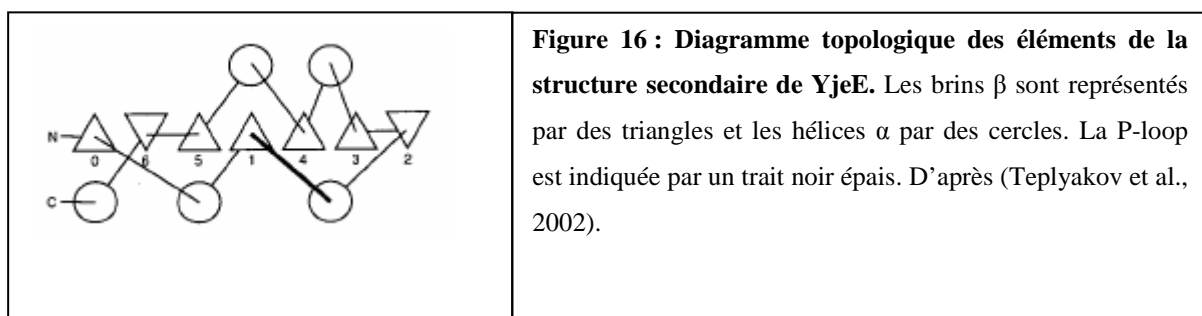
III-C-1. Caractéristiques

III-C-1-a. Au niveau de la structure

En 2002, Teplyakov et ses collègues ont publié la structure de YjeE, l'homologue de YdiB chez *Haemophilus influenzae* (figure 15), dans sa forme apo et liée à l'ADP (Teplyakov et al., 2002). YjeE et YdiB sont très proches puisque l'alignement de leur séquence révèle 31 % d'identité, et 30 % de similarité.

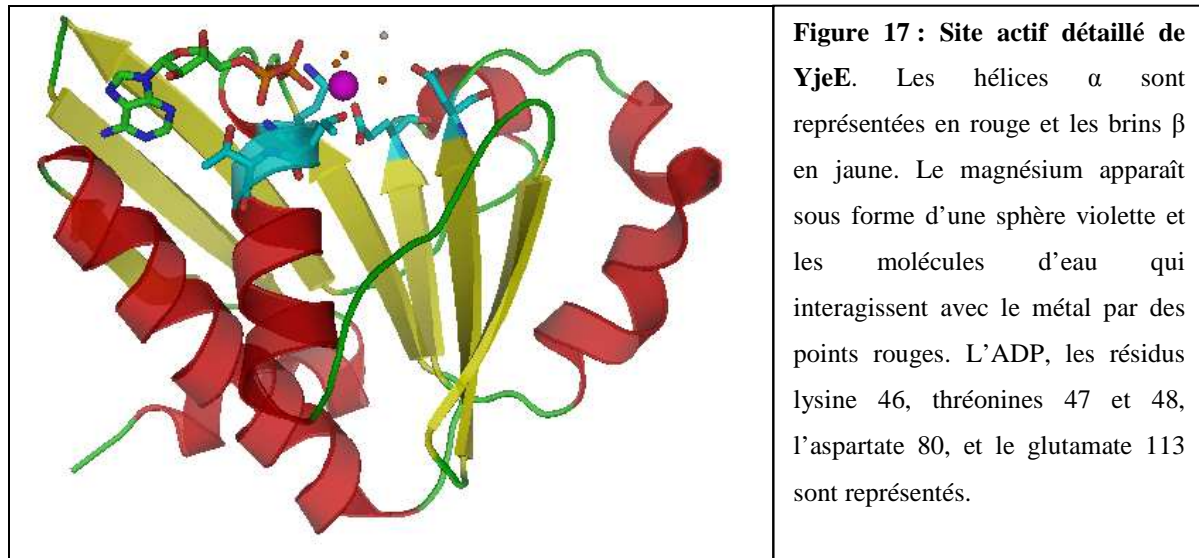


La chaîne polypeptidique de YjeE possède un repliement globulaire de type α/β typique des protéines à P-loop. Elle est repliée en un feuillet β de sept brins d'ordre 0-6-5-1-4-3-2, selon la nomenclature définie par Aravind et ses collègues (Leipe et al., 2003), où β_2 et β_6 sont antiparallèles aux autres. Les connections entre les brins β se font par des hélices α régulières α_1 , α_2 et α_6 d'un coté du feuillet et par de courts tours d'hélice α_3 , α_4 et α_5 de l'autre coté du feuillet. Les acides aminés en *N*-terminal forment un brin β_0 proche du brin β_6 en *C*-terminal, de sorte que les extrémités *N* et *C*-terminales sont spatialement proches (figure16).



D'après la structure, YjeE lie la partie polyphosphate de l'ADP de façon semblable à d'autres protéines à P-loop (figure17). Les phosphates sont « couverts » par la P-loop et maintenus à travers des liaisons hydrogènes avec les groupes amines de la chaîne carbonée et

les groupes hydroxyles des thréonines 47 et 48 (T42 et T43 chez YdiB) du motif A de Walker. La lysine 46 (K41 chez YdiB) interagit avec le phosphate β de l'ADP. Le magnésium est lié à l'atome d'oxygène du phosphate β , au groupe hydroxyle de la thréonine 47, au groupe carboxylate du glutamate 113 (E106 chez YdiB), et à trois molécules d'eau. En revanche, YjeE lie l'adénine dans une conformation syn, ce qui est inhabituel comparé à la majorité des autres protéines à P-loop.



III-C-1-b. Au niveau de la séquence

L'alignement de séquences montre clairement les résidus hautement conservés (figure 18). La séquence G-X₄G-K-T, correspondant au motif A de Walker, est située entre le brin β 1 et l'hélice α suivante, comme chez toutes les protéines à P-loop. Deux résidus acides sont conservés dans le site actif, l'aspartate 80 localisé dans le brin β 3 et le glutamate 106 dans le brin β 4. D'après la structure, les deux interagissent directement ou indirectement avec le magnésium, et l'un pourrait correspondre au motif B de Walker alors que l'autre correspondrait au résidu catalytique trouvé chez les NTPases du groupe ASCE. Ce point est discuté dans le chapitre VII-A dans la partie « Résultats ». Enfin, la thréonine 62, également très conservée, semble appartenir à la région « switch I », trouvée chez les GTPases, qui interagit avec le phosphate γ , et qui est en partie responsable des changements conformationnels occasionnés lors de l'hydrolyse du nucléotide (Teplyakov et al., 2002). Le rôle des autres résidus conservés n'est pas connu, ni suspecté à ce jour.

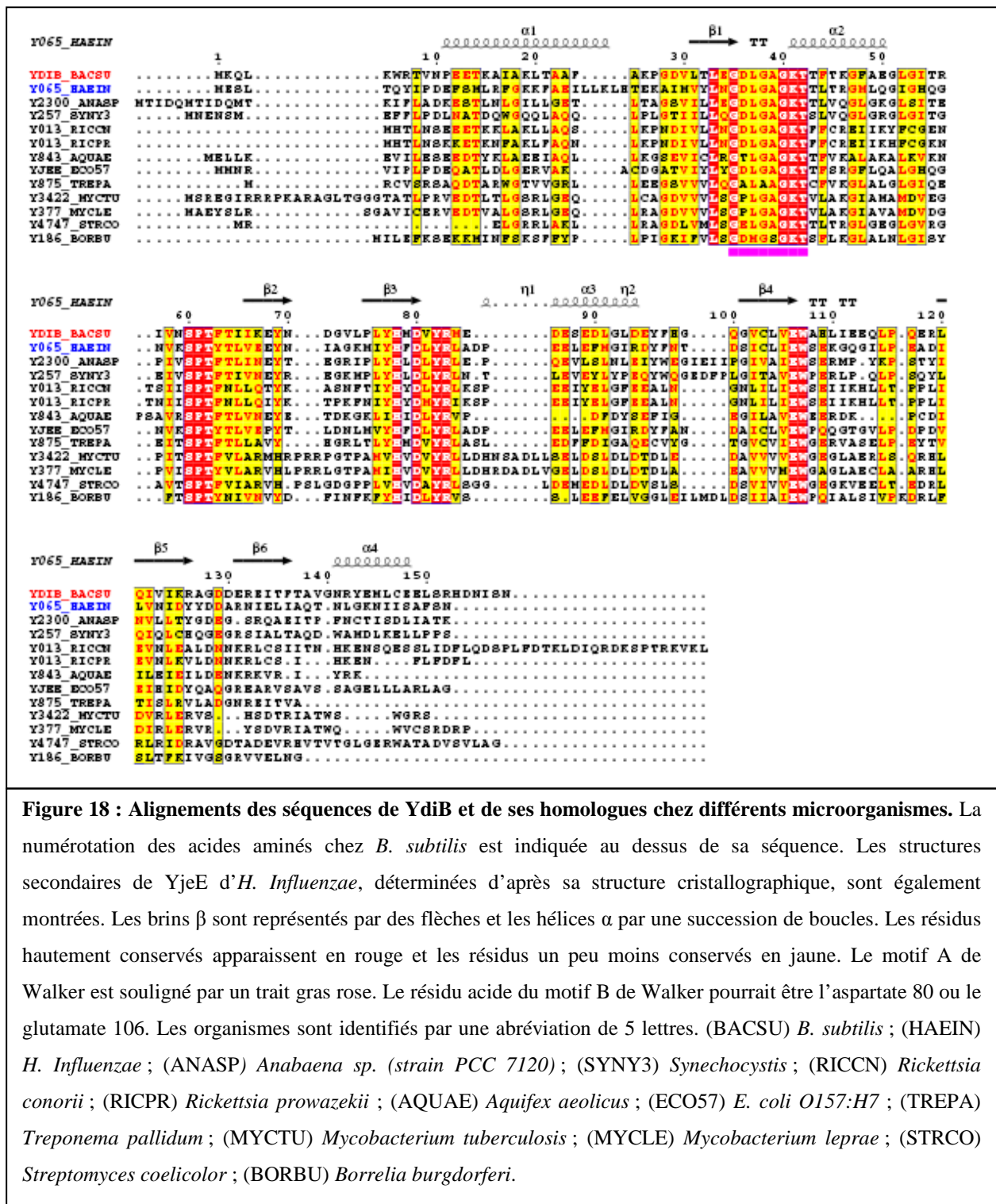


Figure 18 : Alignements des séquences de YdiB et de ses homologues chez différents microorganismes. La numérotation des acides aminés chez *B. subtilis* est indiquée au dessus de sa séquence. Les structures secondaires de YjeE d'*H. Influenzae*, déterminées d'après sa structure cristallographique, sont également montrées. Les brins β sont représentés par des flèches et les hélices α par une succession de boucles. Les résidus hautement conservés apparaissent en rouge et les résidus un peu moins conservés en jaune. Le motif A de Walker est souligné par un trait gras rose. Le résidu acide du motif B de Walker pourrait être l'aspartate 80 ou le glutamate 106. Les organismes sont identifiés par une abréviation de 5 lettres. (BACSU) *B. subtilis*; (HAEIN) *H. Influenzae*; (ANASP) *Anabaena sp. (strain PCC 7120)*; (SYNY3) *Synechocystis*; (RICCN) *Rickettsia conorii*; (RICPR) *Rickettsia prowazekii*; (AQUAE) *Aquifex aeolicus*; (ECO57) *E. coli O157:H7*; (TREPA) *Treponema pallidum*; (MYCTU) *Mycobacterium tuberculosis*; (MYCLE) *Mycobacterium leprae*; (STRCO) *Streptomyces coelicolor*; (BORBU) *Borrelia burgdorferi*.

III-C-1-c. Au niveau du génome

Teplyakov et ses collaborateurs ont suggéré un rôle de YjeE dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (Teplyakov et al., 2002). Cette hypothèse est basée, en partie, sur son profil phylogénétique puisque la présence de YjeE dans les génomes bactériens coïncide avec celle d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire. Son absence chez *Mycoplasma* et *Ureaplasma* n'est pas surprenante puisque ces bactéries ne possèdent pas la machinerie de synthèse des peptidoglycanes. De plus, la plupart des protéobactéries possèdent un gène amidase (*amiB*) immédiatement localisé après *yjeE*, et les amidases sont des protéines impliquées dans le recyclage des peptidoglycanes, composés majeurs de la paroi cellulaire. Cependant, dans aucun cas, des expériences phénotypiques et biochimiques confirmant cette hypothèse n'ont été publiées. Par ailleurs, un rôle putatif ne peut pas être attribué à *ydiB* puisqu'il appartient à un opéron différent dans lequel aucune amidase ne figure (figure 19).

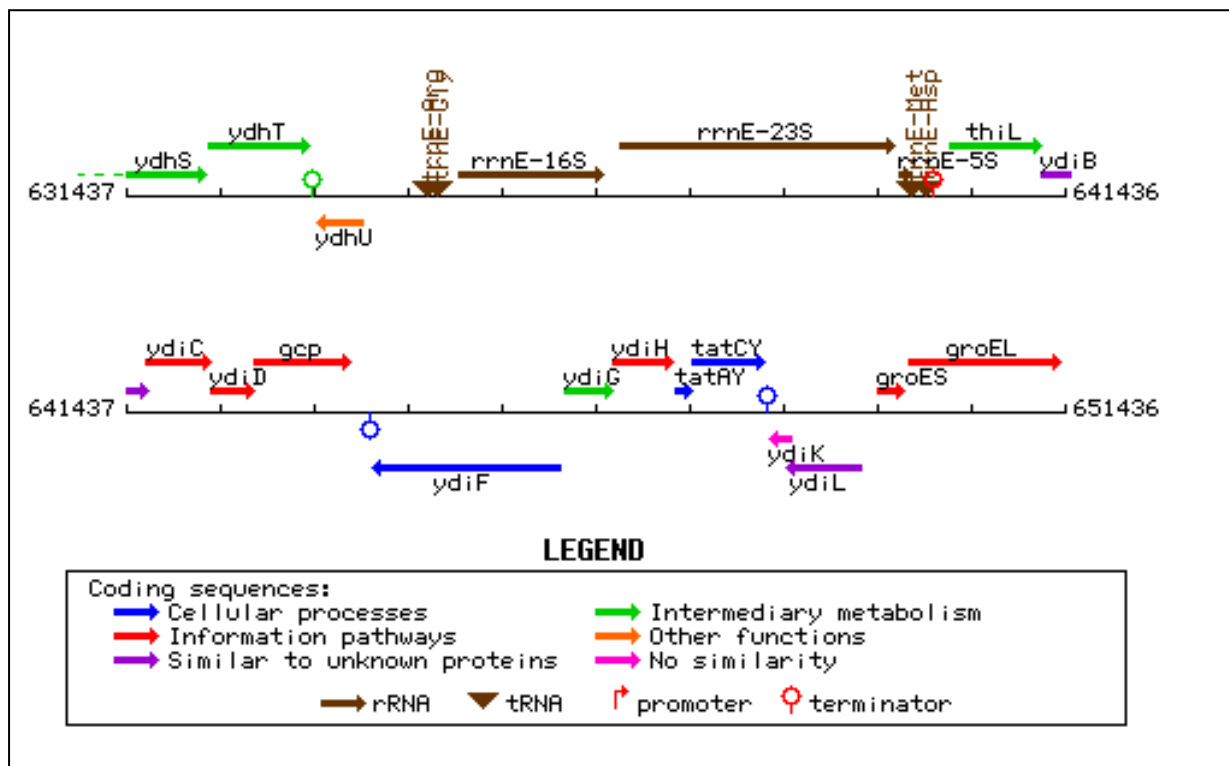


Figure 19 : Gènes présents aux alentours de *ydiB* dans le génome de *B. subtilis*. Ces informations proviennent de la base de données subtilist (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>). *ydiB* est en opéron avec *ydiA* (ou *thiL* : thiamine-monophosphate kinase), *ydiC* (fonction inconnue mais protéine similaire à des endopeptidases de glycoprotéines), *ydiD* (fonction inconnue mais protéine similaire à des protéines ribosomales), et *ydiE* (ou *gcp* : endopeptidase de O-sialoglycoprotéine).

III-C-2. Classification et points communs avec les autres NTPases à P-loop

La séquence protéique ne présente aucune homologie avec d'autres protéines, excepté le motif A de Walker. Le cœur structural de YjeE est typique des NTPases à P-loop avec un repliement globulaire de type α/β , possédant au moins cinq brins β formant un feuillet β central, encadré de part et d'autres par des hélices α (Milner-White et al., 1991). YjeE est une variante du repliement des protéines à P-loop. Sa structure tridimensionnelle montre des ressemblances à la fois avec les protéines des groupes ASCE et KG, comme l'illustre la figure 20. Le brin $\beta 2$ de YjeE est antiparallèle au reste du feuillet β , trait caractéristique des GTPases de la classe TRAFAC. Cependant, comme les ATPases du groupe ASCE, YjeE possède un brin additionnel dans le feuillet β , localisé entre le brin $\beta 1$ menant à la P-loop et le brin $\beta 3$ contenant le motif B de Walker.

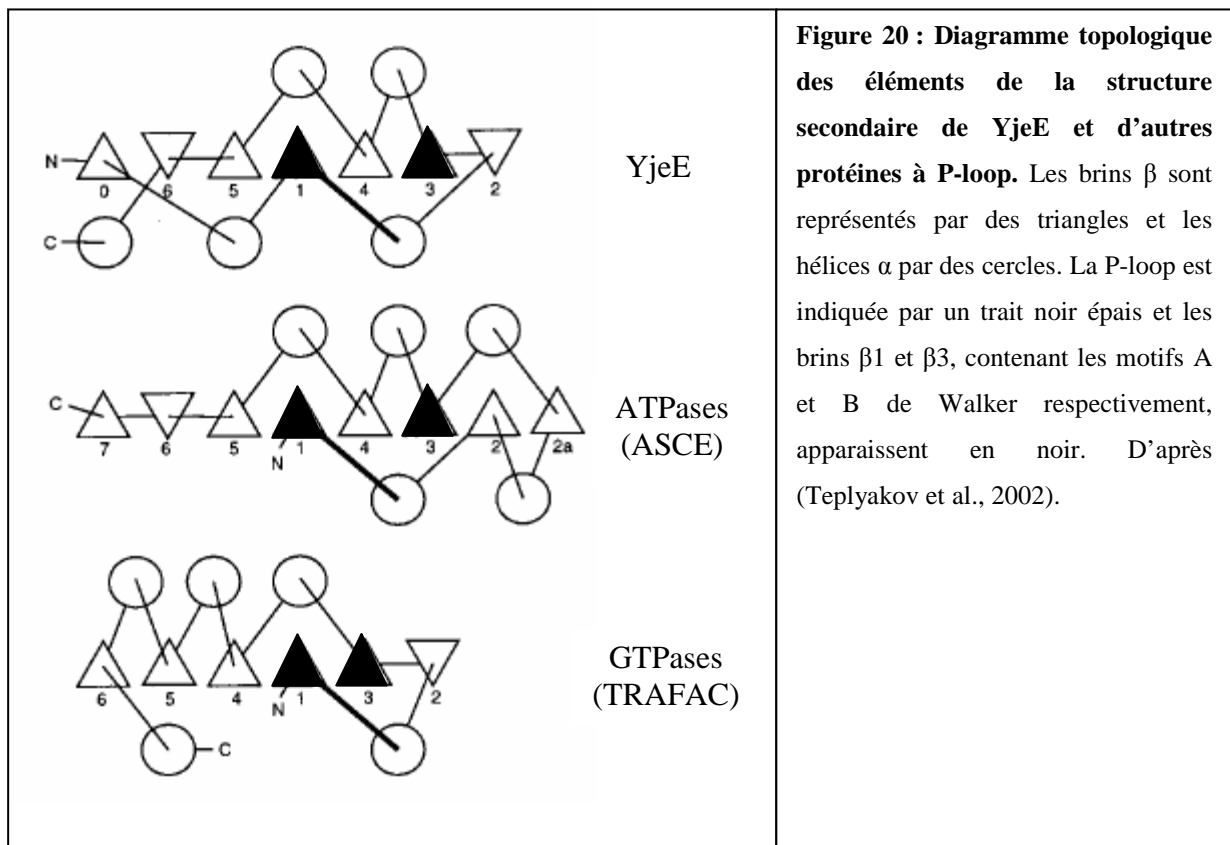


Figure 20 : Diagramme topologique des éléments de la structure secondaire de YjeE et d'autres protéines à P-loop. Les brins β sont représentés par des triangles et les hélices α par des cercles. La P-loop est indiquée par un trait noir épais et les brins $\beta 1$ et $\beta 3$, contenant les motifs A et B de Walker respectivement, apparaissent en noir. D'après (Teplyakov et al., 2002).

YjeE ne peut donc être classée dans aucune des familles citées dans le chapitre I-B-2-a. Brown l'avait inclut dans sa revue sur les GTPases TRAFAC (Brown, 2005) en précisant que la classification structurale de cette protéine était énigmatique puisqu'elle possède une topologie unique. D'ailleurs, YjeE apparaît comme une famille à part entière d'après la classification de la base de données SCOP (<http://scop.berkeley.edu/data/scop.b.html>)

(Murzin et al., 1995). Celle-ci fournit une description complète et détaillée des relations de structure et d'évolution entre les protéines dont les structures tridimensionnelles ont été déterminées. La classification se fait suivant différents niveaux hiérarchiques :

Une famille réunit les protéines qui ont une origine commune, c'est-à-dire les protéines qui ont 30 % ou plus d'identité de séquences ou encore les protéines qui ont peu d'identité de séquences mais dont les structures et fonctions sont très similaires.

Une superfamille regroupe les protéines qui ont une faible identité de séquences mais dont les structures et fonctions suggèrent une origine commune probable.

Un groupe de repliement commun rassemble les protéines qui ont les mêmes structures secondaires majeures dans un même enchaînement.

Enfin, il existe 5 classes majeures de protéines et la plupart des groupes de repliements communs appartiennent à l'une d'entre elles :

- Tout α : protéines dont les structures sont essentiellement formées d'hélices α .
- Tout β : protéines dont les structures sont essentiellement formées de feuillets β .
- α et β : protéines dont les structures sont formées d'hélices α et de brins β alternés.
- α plus β : protéines dont les structures sont formées d'hélices α et de brins β ségrévés.
- Multidomaines : protéines dont les structures sont formées de plusieurs domaines avec différents repliements.

Ainsi la famille « YjeE-like » appartient à la superfamille des protéines à P-loop. Cette superfamille est classée dans le groupe de repliement des protéines à P-loop caractérisé par une structure en feuillet β flanqué par des hélices α . Enfin, ce groupe fait parti de la classe des protéines α et β .

MATERIELS ET METHODES

I. BIOLOGIE MOLECULAIRE

I-A. Conditions de culture

I-A-1. Souches bactériennes

Plusieurs types de souches d'*E. coli* ont été utilisées, et leur génotype est indiqué ci-dessous :

- **JM109** : $e14^-$ (McrA⁻), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_K^- m_K^+$), *supE44*, *relA1*, $\Delta(lac-proAB)$, F'[*traD36 proAB lacI^q Z* Δ M15] (Stratagene).

- **BL21 (DE3)** : F, *ompT*, *hsdS_B*, (r_B^- , m_B^-), *dcm*, *gal*, λ (DE3) (Novagen).

- **Novablues** : *endA1*, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac F'* [*proAB lacI^q Z* Δ M15::*Tn10* (Tet^R)] (Novagen).

- **XLI blues** : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac F'* [*proAB lacI^q Z* Δ M15::*Tn10* (Tet^R)] (Stratagene).

- **La souche EB 437** a été fabriquée par Tracey L. Campbell, dans le laboratoire de Biochimie (McMaster University, Hamilton, Ontario) dirigé par le Pr. E. Brown. Cette souche possède deux copies de *yjeE* : le gène natif et une copie additionnelle fusionnée à une cassette de résistance à la kanamycine au locus ara BAD, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose.

Par ailleurs, deux souches de *B. subtilis* ont également été utilisées :

- la **souche *B. subtilis* 168** (génotype *trpC2*) qui correspond au type sauvage (stock Institut Pasteur)

- la **souche *B. subtilis* Δ YdiB** a été fabriquée à partir de la souche précédente en inactivant le gène *ydiB* par insertion d'un gène de résistance à la spectinomycine et en plaçant une copie du gène sous le contrôle d'un promoteur inductible au xylose. Cette souche a été construite par Tracey L. Campbell, dans le laboratoire de Biochimie (McMaster University, Hamilton, Ontario) dirigé par le Pr. E. Brown.

I-A-2. Vecteurs plasmidiques

Les plasmides pET-15b et pET-28a, commercialisés par Novagen, contiennent le promoteur de l'ARN polymérase du phage T₇ en amont du gène inséré. L'ARN polymérase du phage T₇ est synthétisée par la bactérie-hôte de génotype (DE3) par une induction à l'IPTG.

Le vecteur pET-15b permet de fusionner six résidus histidine du côté *N*-terminal de la protéine d'intérêt produite, et les bactéries contenant ce plasmide peuvent être sélectionnées en présence d'ampicilline (figure 21).

Le vecteur pET-28a-GST a été modifié, à partir du plasmide pET-28a, par un membre de l'équipe afin de permettre la fusion de six résidus histidine du côté *C*-terminal et de la glutathion-S-transférase (GST) du côté *N*-terminal de la protéine d'intérêt produite, et les bactéries contenant ce plasmide peuvent être sélectionnées en présence de kanamycine (figure 22).

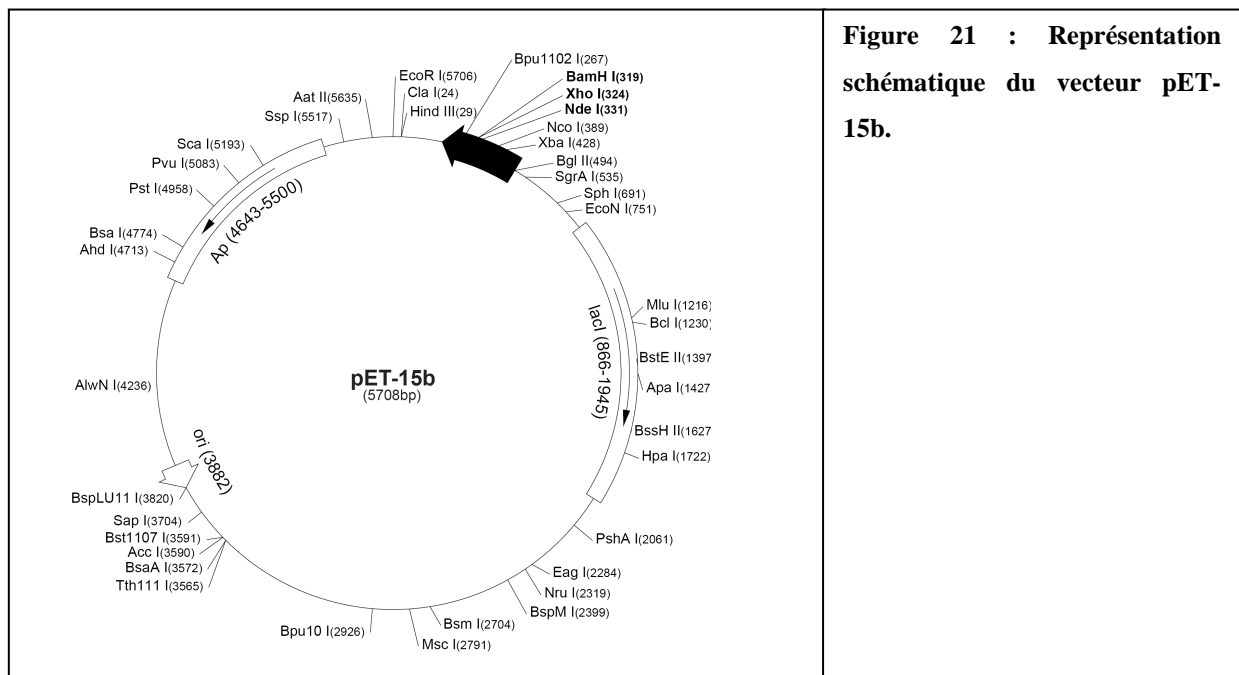
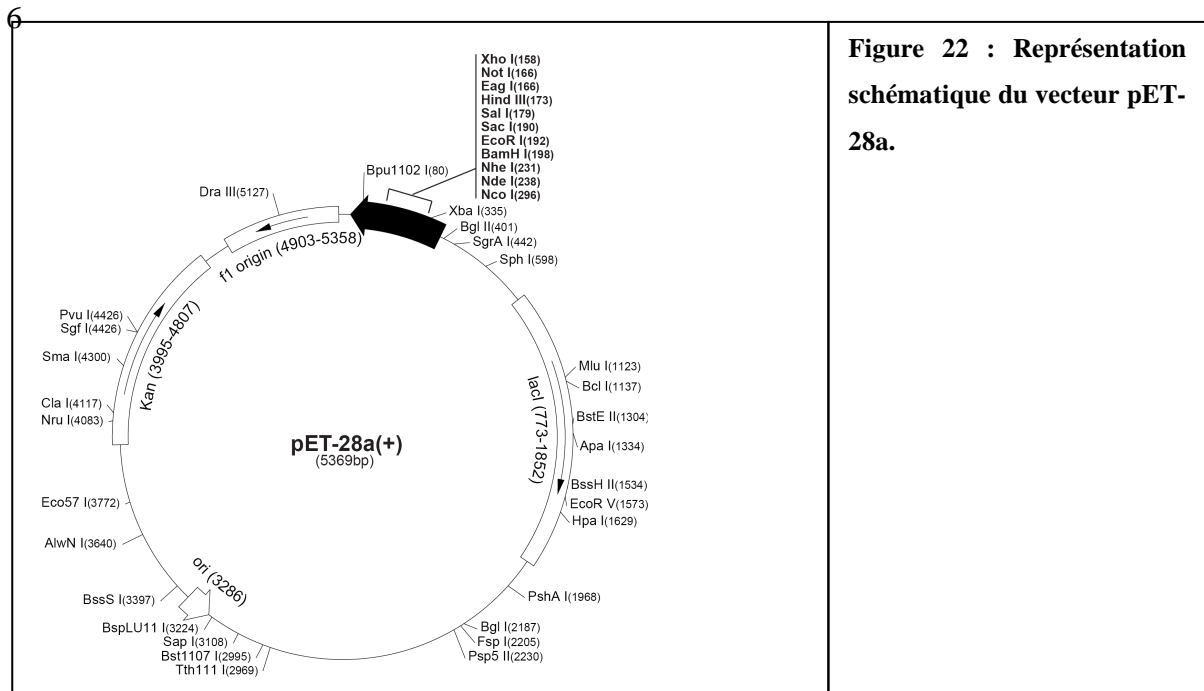
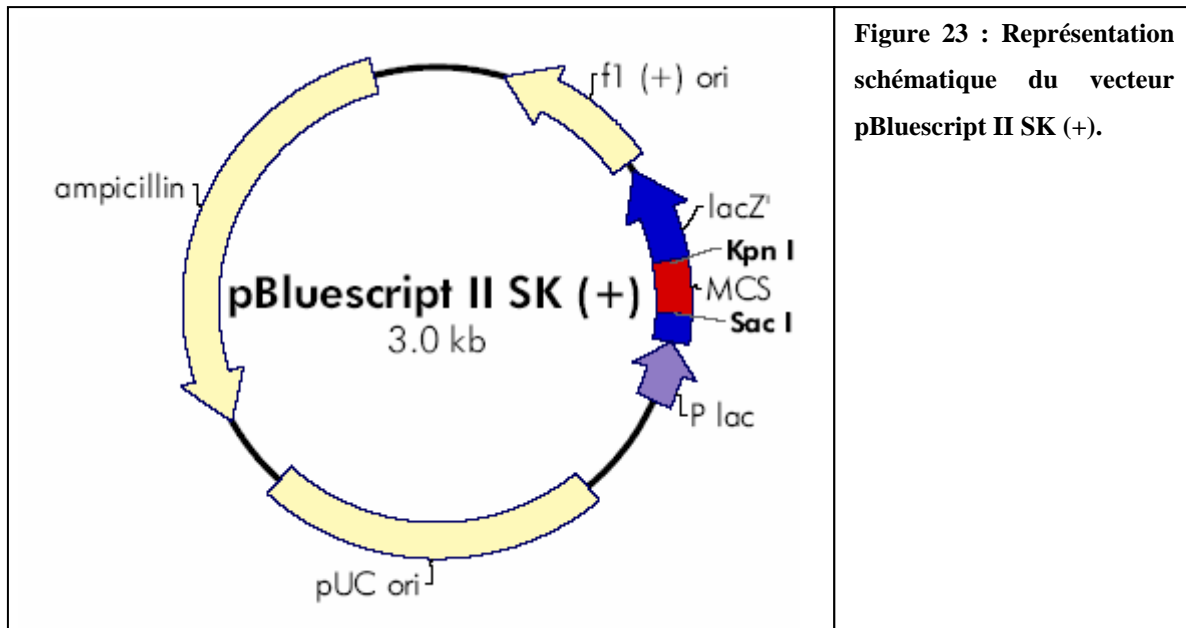


Figure 21 : Représentation schématique du vecteur pET-15b.



- Le plasmide pBluescript II SK (+) est un vecteur de clonage commercial (Stratagene) dont le site de clonage se situe au niveau d'une portion du gène de la β -galactosidase d'*E. coli*, *lacZ'*, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Le gène *lacZ'* code la partie *N*-terminale du gène de la β -galactosidase, peptide complémentaire indispensable pour l'activité de l'enzyme dans la bactérie hôte. Après transformation du plasmide dans une souche exprimant le reste du gène de la β -galactosidase, et en faisant croître les colonies en présence d'IPTG et d'un substrat artificiel incolore (X-Gal), on permet l'hydrolyse de ce substrat par l'enzyme qui libère le produit X (5Br, 4Cl-indol) coloré en bleu. Dans le cas d'un clonage, l'insertion d'un fragment dans le site de clonage du pBluescript entraîne l'interruption de l'expression du peptide LacZ' : la bactérie ne pourra plus digérer le X-Gal, ce qui l'empêchera de prendre la couleur bleue caractéristique. On peut ainsi sélectionner les colonies ayant intégré le vecteur recherché sur milieu supplémenté en IPTG et X-Gal. Les bactéries contenant ce plasmide peuvent être sélectionnées en présence d'ampicilline (figure 23).



I-A-3. Milieux de culture

- Le milieu LB contient 10 g de bactotryptone, 5 g d'extraits de levure et 10 g de NaCl par litre. Il est ajusté à pH 7,5 avant autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes.
- Le milieu SOC contient 20 mM de glucose, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 2,5 mM de KCl, 10 mM de NaCl, 20 g de bactotryptone et 5 g d'extrait de levure par litre de culture.
- Le milieu Turbo Broth est un milieu commercialisé par AthenaES qui utilise le glycérol comme source de carbone et possède une base nutritive riche en acides aminés, vitamines, et minéraux organiques. Ce milieu est tamponné à pH 7,2 avec du phosphate de potassium pour fournir une source de phosphate aux bactéries.
- Les milieux utilisés pour la préparation de souches de *B. subtilis* compétentes sont présentés dans le tableau 3.

	SpC	SpII
T base	25 ml	200 ml
MgSO ₄ 1,2 %	0,375 ml	14 ml
Casamino Acid 1 %	0,625 ml	2 ml
glucose 25 %	0,5 ml	4 ml
Yeast extract 10 %	0,5 ml	2 ml
Tryptophane 4 mg/ml	0,250 ml	2 ml
CaCl ₂ 100 mM		1 ml

Tableau 3 : Composition des milieux utilisés pour la préparation de souches de *B. subtilis* compétentes. Le T base est composé de 150 mM de sulfate d'ammonium, 440 mM de phosphate de potassium monobasique, 800 mM de phosphate de potassium dibasique, et 35 mM de citrate de sodium.

Les croissances bactériennes sont suivies en mesurant la densité optique (D.O.) du milieu de culture à 600 nm.

I-B. Techniques de biologie moléculaire

I-B-1. Préparation de l'ADN génomique bactérien

Principe : Après la lyse des bactéries par un traitement au lysozyme, l'addition de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) et de protéinase K va disperser les bicouches lipidiques des membranes et dénaturer les protéines. Une extraction au phénol permet alors de séparer l'ADN génomique des autres constituants.

Mode opératoire : Les bactéries sont cultivées pendant une nuit sous agitation à 37 °C, dans 5 ml de milieu LB. La culture est centrifugée 5 mn à 3000 g, et le culot obtenu est remis en suspension dans 250 µl de tampon A (Tris/HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 50 mM), par pipetage répété. 25 µl de lysozyme à 10 mg/ml sont ajoutés à la suspension qui est homogénéisée délicatement par inversion, puis incubée 5 mn dans la glace. Après addition de 50 µl de tampon B (Tris/HCl 50 mM pH 8, SDS 0,5 %, EDTA 40 mM, protéinase K 1 mg/ml), la suspension est de nouveau homogénéisée, et incubée 1 h à 50 °C. 300 µl de phénol sont ensuite ajoutés, puis le mélange est centrifugé 5 mn à 14000 g. Le surnageant

obtenu est transféré dans un tube propre, et 25 µl d'une solution d'acétate de sodium à 3 M est additionnée. Ce surnageant contient l'ADN génomique qui est précipité par un ajout de 400 µl d'éthanol 100 %, puis incubé au moins 2 h à -20 °C. Le précipité d'ADN est alors repris dans 100 µl de tampon TE (Tris/HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) supplémenté de RNase à 20 µg/ml, puis incubé pendant 30 mn à 37 °C avant congélation à -20 °C.

I-B-2. Amplification par PCR

Principe : L'ADN est mis en présence de deux sondes oligonucléotidiques qui reconnaissent les extrémités 3' de chaque brin du fragment à amplifier. Ces sondes servent d'amorces pour l'enzyme de polymérisation de l'ADN. L'amplification se fait par une réaction en chaîne, et les polymérases utilisées, la pfu et la Vent, ont la particularité de former des bouts francs aux extrémités des fragments amplifiés.

Mode opératoire pour la construction de ydiB dans le pET-15b et dans le pET-28a modifié:

Réactifs	Quantités
ADN	50 ng
Tampon 10X (Tris/HCl 200 mM pH8,8, MgSO ₄ 20 mM, KCl 100 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM, triton X-100 1 %, "nuclease-free" BSA 1 mg/ml).	5 µl
Sonde oligonucléotidique côté 5'	1 pmol/µl
Sonde oligonucléotidique côté 3'	1 pmol/µl
dNTPs	250 µM chacun
H ₂ O	q.s.p. 50 µl
Pfu Turbo (Stratagene ; 2,5 U/µl)	0,5 µl

Les conditions expérimentales que nous avons utilisées sont les suivantes:

Après une première dénaturation des brins de l'ADN matriciel à 95 °C pendant trois minutes, la réaction se déroule par cycles successifs de trois étapes : dénaturation à 95 °C pendant 1 mn, hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques avec la matrice à 55 °C pendant 1 mn, élongation à 72 °C pendant 3 mn avec l'ADN polymérase pfu Turbo. Ces trois étapes sont répétées trente fois. Au trentième cycle, la dernière étape est prolongée de 3 minutes.

Mode opératoire pour la construction des souches *B. subtilis* mutantes :

Réactifs	Quantités
ADN	50 ng
Tampon 10X (Tris/HCl 200 mM pH8,8 , (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM , KCl 100 mM , MgSO ₄ 20 mM , TritonX-100 1 %).	10 µl
Sonde oligonucléotidique côté 5' 60 µM	10 µl
Sonde oligonucléotidique côté 3' 60 µM	10 µl
dNTPs 10 mM	5µl
MgSO ₄ 100 mM	1,2 µl
H ₂ O	q.s.p. 100 µl
Vent (New England Biolabs ; 2 U/µl)	1 µl

Les conditions expérimentales que nous avons utilisées sont les suivantes:

Après une première dénaturation des brins de l'ADN matriciel à 95 °C pendant deux minutes, la réaction se déroule par cycles successifs de trois étapes : dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques avec la matrice à 55 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 1 mn avec l'ADN polymérase Vent. Ces trois étapes sont répétées trente fois. Au trentième cycle, la dernière étape est prolongée de 7 minutes.

I-B-3. Electrophorèse des fragments d'ADN

Principe : L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN. On peut détecter jusqu'à 1 ng d'ADN. La vitesse de migration d'un fragment d'ADN dépend de sa masse, de sa conformation, de la concentration du gel en agarose et de la tension appliquée. L'agarose est utilisé à des concentrations variant de 0,3 à 2 % (poids/volume) selon la taille des fragments à séparer.

Mode opératoire : Pour un gel à 1 %, 0,5 g d'agarose sont mélangés à 50 ml de tampon TAE (Tris 40 mM, acétate 20 mM, EDTA 1 mM pH 8,3) puis chauffés à 100 °C pour dissoudre l'agarose. La solution est refroidie puis le gel est coulé sur un support horizontal, après ajout de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml).

Les échantillons sont additionnés d'une solution de dépôt 6X (Fermentas : glycérol 50 %, Tris Borate EDTA concentré 6 fois, bleu de bromophénol 1 %, xylène cyanol 1 %) pour avoir une concentration finale en solution de dépôt de 1X.

La migration s'effectue sous une tension de 100 V à température ambiante, jusqu'à ce que le front de migration atteigne les 2/3 du gel.

Les bandes d'ADN, colorées par le bromure d'éthidium, sont ensuite visualisées sous lumière ultraviolette (UV) à 254 nm, et photographiées.

I-B-4. Extraction de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose

L'électrophorèse est identique à celle décrite précédemment. La bande d'ADN est repérée sur une table UV à 365 nm, et découpée. L'ADN est extrait du gel grâce à l'utilisation du kit « GeneClean *Turbo Kit* » (QBIogene) ou « MinElute gel extraction kit » (Qiagen), selon les instructions du fabricant.

I-B-5. Préparation des ADN plasmidiques

Principe : Cette méthode permet d'extraire l'ADN plasmidique en petite quantité par lyse alcaline. Le principe repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique superenroulé. Après la lyse des bactéries par un traitement au SDS et au lysozyme, l'ADN chromosomique est précipité par l'addition de sels de potassium. Il se forme alors un précipité de SDS-protéine-ADN chromosomique, qui est éliminé par centrifugation. Le surnageant contient l'ADN plasmidique et l'ARN (Birnboim and Doly, 1979).

Mode opératoire :

▪ Minipréparation :

Les bactéries sont cultivées dans un faible volume de milieu LB (3 ml) en présence d'ampicilline à 100 µg/ml ou de kanamycine à 50 µg/ml, à 37 °C, pendant la nuit. Un prélèvement de 1,5 ml de culture est centrifugé pendant 5 mn à 9000 g. Le culot est remis en suspension dans 200 µl de solution P1 (glucose 50 mM, Tris/HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM) et les bactéries sont lysées par 200 µl de solution P2 (NaOH 200 mM, SDS 1 %). Les protéines et l'ADN chromosomique sont alors précipités par 200 µl de solution P3 (acétate de potassium 3 M pH 5,2). La suspension est incubée 15 mn dans la glace, centrifugée pendant

10 mn à 9000 g, et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. L'ADN plasmidique est précipité avec de l'éthanol à 100 % puis incubé à -20 °C pendant 20 mn. La suspension est alors centrifugée 10 mn à 9000 g et le culot est lavé avec de l'éthanol à 70 %. L'échantillon est centrifugé comme précédemment, le surnageant est éliminé, puis le culot d'ADN est séché à l'air et remis en suspension dans 20 µl de tampon TE (Tris/HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM).

▪ **Midipréparation :**

Les bactéries sont cultivées dans 50 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline ou de la kanamycine. Les midipréparations d'ADN ont été réalisées grâce au kit « Plasmid Midi Kit » de Qiagen, d'après les instructions du fabricant. Le principe est le même que pour les minipréparations mais la quantité et la pureté de l'ADN sont plus importantes car la préparation est filtrée et passe sur une colonne échangeuse d'anions avant la précipitation de l'ADN.

I-B-6. Restriction de fragments d'ADN

Chacune des enzymes de restriction (Promega, Roche ou New England Biolabs) utilisée est commercialisée avec un tampon qui lui confère une activité maximale. Pour les tests analytiques, 5 µl d'ADN (1 à 5 µg d'ADN) obtenu par minipréparation sont digérés en présence de 1 µl de tampon 10X, 0,5 µl de chaque enzyme à 10 U/µl (1 à 5 unités d'enzyme par µg d'ADN) et 3 µl d'eau stérile, pendant au moins une heure à la température enzymatique optimale. Pour les ADN préparatifs, 10 µg d'ADN de midipréparation sont digérés dans le tampon préconisé en présence de 1 µl de chaque enzyme de restriction, pendant au moins 3 heures.

I-B-7. Ligature des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN extraits du gel préparatif sont d'abord déposés sur un gel analytique pour estimer leurs quantités relatives. Les deux fragments d'ADN, dans un rapport molaire insert/vecteur d'environ 5/1 sont ensuite ligaturés pendant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 16 °C, en présence d'1 µl de T4 ADN ligase à 3 U/µl (Fermentas), 1 µl de tampon de ligature 10X (Tris/HCl 10 mM, pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, BSA 0,1 mg/ml, ATP 0,5 mM) et d'eau stérile q.s.p. 10 µl.

I-B-8. Transformation de bactéries compétentes

I-B-8-a. Perméabilisation de la membrane chez *E. coli*

Principe : Selon Cohen et collaborateurs, le chlorure de calcium perméabilise la membrane bactérienne et induit un état particulier, la compétence (Cohen et al., 1972). Durant cette période, la bactérie peut incorporer un ADN plasmidique.

Mode opératoire :

- Préparation de bactéries compétentes

A partir d'une préculture réalisée sur la nuit, 50 ml de milieu LB sontensemencés à une $D.O_{.600nm} \approx 0,1$, puis incubés à 37 °C, sous agitation. Lorsque la $D.O_{.600nm}$ atteint environ 0,8, la culture est centrifugée à 1600 g pendant 10 mn à 4 °C. Le culot est repris délicatement dans 10 ml de tampon de compétence (CaCl₂ 60 mM, glycérol 15 %, 1.4- piperazinediéthanesulfate 10 mM pH 7,0) préalablement autoclavé, puis la suspension est incubée pendant 2 heures dans la glace. Celle-ci est centrifugée 5 mn à 1600 g à 4 °C, et le culot est repris dans 2 ml de tampon de compétence. Les cellules compétentes sont aliquotées par fractions de 100 µl, puis congelées à -80 °C.

- Transformation des bactéries compétentes

La totalité du milieu de ligature (20 µl) ou 1 µl de préparation plasmidique (mini- ou midipréparation) est ajoutée à 100 µl de bactéries compétentes. Après 10 mn dans la glace, un choc thermique est réalisé pendant 1 mn à 42 °C. 300 µl de milieu LB sont alors ajoutés et l'ensemble est incubé pendant une heure à 37 °C. Des volumes variables sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB, de l'agar (15 g/l) ainsi que de l'ampicilline à 100 µg/ml ou de la kanamycine à 50µg/ml. Les boîtes sont enfin placées à l'étuve (37 °C) pendant une nuit.

I-B-8-b. Electroporation chez *E. coli*

Principe : Cette méthode consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à des chocs électriques. Le protoplaste est le résultat de l'action du lysozyme sur la paroi de la bactérie, les bâtonnets deviennent alors sphériques puisqu'ils perdent la rigidité qui leur était conférée par le peptidoglycane. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique et induit la formation de pores à travers lesquels l'ADN peut transiter. Si

le choc électrique n'a pas été trop violent, ce phénomène est réversible et la membrane peut reprendre son état initial.

Mode opératoire : La préparation et la transformation des souches ont été réalisées selon les instructions du fabricant (BioRad, Hercules, CA, USA).

I-B-8-c. Transformation de *B. subtilis*

Principe : La souche *B. subtilis* devient naturellement compétente, c'est-à-dire que les bactéries ont la capacité à capturer de l'ADN présent dans l'environnement. L'état de compétence apparaît en fin de phase exponentielle de croissance lorsque le taux de nutriments diminue.

Mode opératoire :

- Préparation des bactéries :

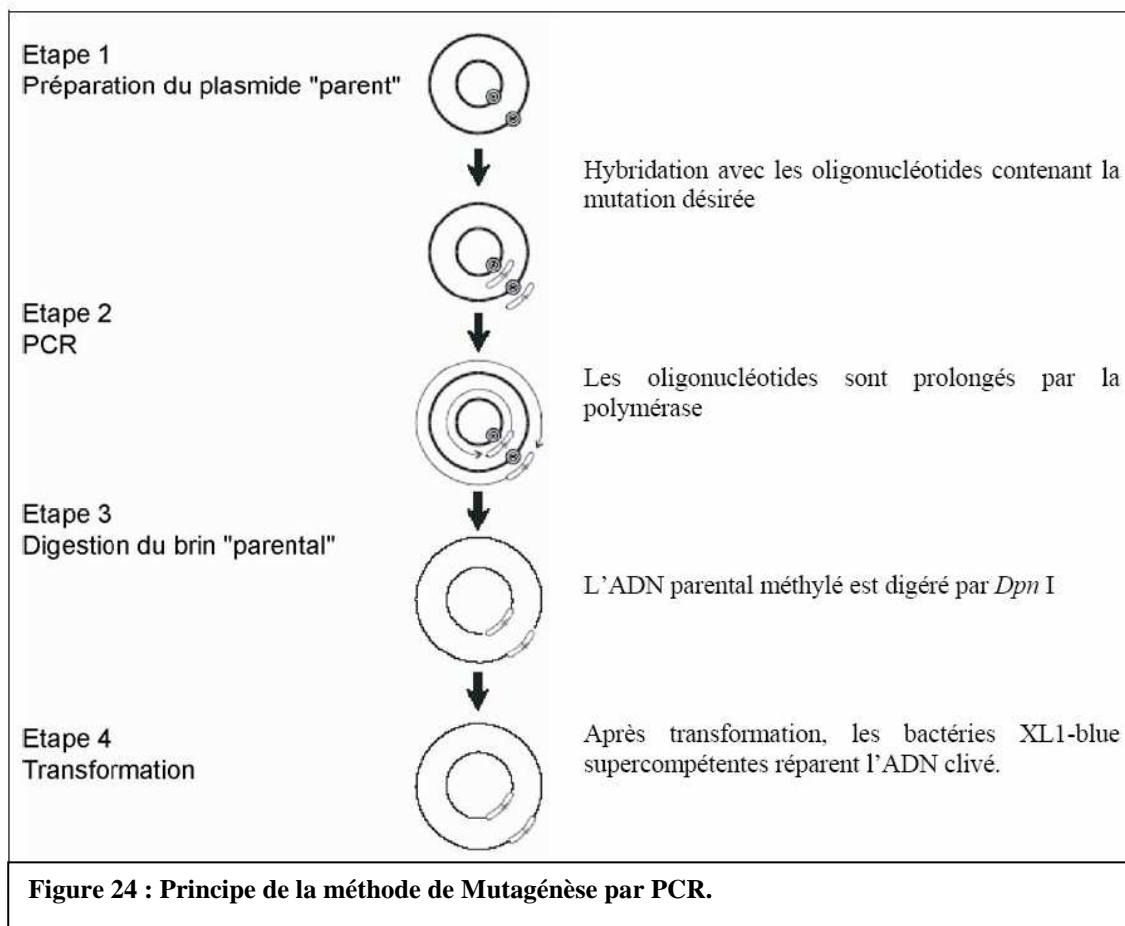
Plusieurs colonies de *B. subtilis* sont inoculées dans 25 ml de milieu SpC jusqu'à ce que la D.O._{600nm} atteigne 0,5 environ, puis la suspension est incubée à 37 °C sous agitation pendant 3 h. La culture est alors diluée 10 fois dans 200 ml de milieu SpII, et est réincubée pendant 90 mn à 37 °C. Les bactéries sont centrifugées à température ambiante pendant 5 mn à 8000 g, puis le culot est repris dans 17 ml de surnageant conservé. 2 ml de glycérol à 70 % sont ajoutés à la suspension et les bactéries sont aliquotées par fractions de 100 µl, puis congelées à -80 °C.

- Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries sont décongelées en passant le tube sous l'eau tiède. 100 µl de SpII, supplémenté par 2 mM d'EGTA, sont ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes. 1 à 20 µl d'ADN est mis en présence des bactéries, et le tout est incubé à 37 °C pendant 1 h. Les cellules sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB/agar, puis sont placées à l'étuve (30 °C) pendant 2 jours.

I-B-9. Mutagenèse dirigée

Principe : Cette méthode, qui est basée sur l'utilisation d'un thermocycleur, présente l'avantage d'être rapide et simple à mettre en œuvre. Elle est commercialisée sous la forme du Kit « QuickChange® Site-Directed Mutagenesis » par la société Stratagene. Les différentes étapes de la méthode sont représentées sur la figure 24. La mutation désirée est apportée par les oligonucléotides qui sont complétés par l'ADN polymérase haute fidélité PfuTurbo. Le brin parental qui est méthylé est ensuite digéré par l'endonucléase Dpn I qui reconnaît les séquences 5-Gm6ATC-3' des ADN méthylés ou hémiméthylés. Le vecteur produit est alors introduit dans des bactéries supercompétentes qui répareront les brins clivés. Les plasmides issus des clones isolés sur milieu sélectif sont ensuite séquencés afin de vérifier la présence de la mutation désirée ainsi que l'intégrité du reste du gène.



Mode opératoire : La mutation doit si possible être située au milieu de la séquence et bordée d'environ 10 à 15 bases de part et d'autre. La mutagenèse est réalisée dans un volume réactionnel de 50 μ L contenant, 50 ng de plasmide matrice, 5 μ L de tampon de la réaction

10 X (KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Tris/HCl 200 mM pH 8,8, MgSO₄ 20 mM, Triton X-100 1 %, BSA 1 mg/mL), le mélange de dNTPs, 125 ng de chacun des deux oligonucléotides et 1 µL d'ADN polymérase PfuTurbo. Le milieu réactionnel est porté à 95 °C afin de déshybrider les deux brins d'ADN, puis 20 cycles de PCR sont réalisés. Chaque cycle comprend 1 mn de dénaturation à 95 °C, 1 mn d'hybridation à 55 °C, et 5 mn d'élongation à 68 °C. En fin de PCR, le milieu est placé dans la glace pendant 10 mn puis l'ADN parental est digéré par 1 µL de Dpn I à 37 °C pendant 1 heure. 1 µL de ce milieu réactionnel est ensuite utilisé pour transformer 50 µL de bactéries supercompétentes XL1 blue. Afin de favoriser la croissance bactérienne, les bactéries sont mises en culture dans 250 µL de milieu SOC pendant 1 h avant d'être sélectionnées sur boîtes de Pétri BL-Agar complémentées par 100 µg/mL d'ampicilline. Le lendemain, quelques dizaines de clones sont généralement trouvés sur les boîtes.

Choix des oligonucléotides de synthèse : Les oligonucléotides choisis contiennent la mutation à introduire, ainsi qu'un site de restriction ajouté ou supprimé qui permet ainsi, sans modifier pour autant la séquence primaire de la protéine, de sélectionner les plasmides qui ont incorporé la mutation. Les séquences des oligonucléotides sont indiquées dans le tableau 4, où les bases soulignées correspondent aux bases modifiées par rapport à la séquence sauvage.

Mutants	Oligonucléotides	modification du site de restriction
K41A	GGGCGATTAGGTGCC <u>GGCGCA</u> ACGACTTTTACGAAAGG	+ NaeI
K41R	GATTTAGGTGCC <u>GGCAGA</u> ACGACTTTTACGAAAGGTTTTGC	+ NaeI
T42S *	GATTTAGGTGCC <u>GGCAAAT</u> CGACTTTTACGAAAGGTTTTGC	+ NaeI
D80A *	GGCGTACTTCCTCTTTATCAT <u>ATGGCT</u> GTGTATAGAATGGAAGATG	+ NdeI
E106A *	GGTGTCTGTCTCGTTGC <u>ATGGGCC</u> CATTTAATTGAAGAAC	+ ApaI
E106D *	CAAGGTGTCTGTCTCGT <u>CGACT</u> GGGCTCATTTAATTGAAG	+ SalI

Tableau 4 : Oligonucléotides de synthèse utilisés pour la mutagenèse des différents mutants de YdiB. Les séquences sont indiquées de 5' vers 3' (de gauche à droite), et les bases soulignées correspondent aux bases non hybridées avec celles de la séquence sauvage.

* Mutants obtenus par l'ingénieur d'étude Anne-Emmanuelle Foucher.

II. PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

II-A. Surproduction des protéines

II-A-1. Surproduction analytique

5 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline ou de la kanamycine sontensemencés à partir de clones provenant d'une transformation fraîche. La culture est incubée à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que la D.O._{600nm} atteigne une valeur de 0,6 à 0,8. Deux fractions de 1,5 ml sont prélevées : l'une est remise directement dans l'incubateur (-IPTG) et l'autre est induite par 1 mM d'IPTG (+IPTG). Les deux fractions sont incubées sous agitation à 37 °C, pendant deux heures, puis sont centrifugées 5 mn à 9000 g. Les culots sont alors repris dans 300 µl de réactif B-PER (Pierce) et analysés par électrophorèse après addition de tampon Laemmli 4X.

II-A-2. Solubilisation des protéines

Après une surproduction analytique, une fraction de 1,5 ml de culture (+IPTG) est centrifugée 5 mn à 9000 g. Le culot est repris dans 300 µl de réactif B-PER (Pierce) et agité fortement pendant une minute. La suspension est de nouveau centrifugée 5 mn à 9000 g. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube (protéines solubles) et le culot est repris dans 300 µl d'eau (protéines non solubles). Les échantillons sont analysés par électrophorèse après addition de tampon Laemmli.

Les conditions optimales permettant l'obtention de la protéine soluble dépendent de plusieurs paramètres comme le milieu de culture utilisé, la température et le temps d'induction ou encore le pH et la composition en sels du tampon de lyse.

II-A-3. Surproduction préparative de YdiB-(his)₆ et des mutants

II-A-3-a. YdiB-(his)₆

Après transformation, un clone sur boîte de Pétri estensemencé dans 1 L de LB contenant de l'ampicilline ainsi que 1 % de glucose, et la culture est incubée à 37 °C, sous agitation. Lorsque la culture atteint une D.O._{600nm} de 0,6, l'expression de la protéine est induite par 1 mM d'IPTG pendant 4 heures à 37 °C.

Les bactéries sont ensuite centrifugées à 7500 g et à 4 °C, pendant 20 mn. Le culot bactérien, correspondant à 1 L de culture, est repris par 20 ml de tampon de lyse (Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, βME 5mM), puis des inhibiteurs de protéases sont ajoutés : 5 µM

leupeptine, 5 μ M pepstatine et 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Les cellules sont ensuite éclatées à l'aide d'une presse de French SLM AMINCO de 40 ml (à une pression de 18000 psi). Après deux passages, la solution est centrifugée pendant 30 mn à 9000 g pour éliminer les cellules non éclatées et les débris cellulaires.

II-A-3-b. Les mutants

Les conditions optimales de surexpression et d'obtention des protéines solubles diffèrent légèrement d'un mutant à un autre (tableau 5). Pour les mutants D80A et T42S, le protocole est le même que pour la protéine sauvage.

	milieu de culture	D.O. d'induction	Temps et température d'induction	pH des tampons de purification
K41A	TB	1,2	25 °C toute la nuit	pH 7,5
K41R	TB	1,2	25 °C toute la nuit	pH 7,5
T42S	LB	0,6	4 h à 37 °C	pH 7,5
D80A	LB	0,6	4 h à 37 °C	pH 7,5
E106A	LB	0,6	25 °C toute la nuit	pH 8,5
E106D	TB	1,2	25 °C toute la nuit	pH 8,5

Tableau 5 : Conditions optimales de surproduction utilisées pour chaque mutant de YdiB.

II-B. Purification de YdiB-(his)₆ et des mutants

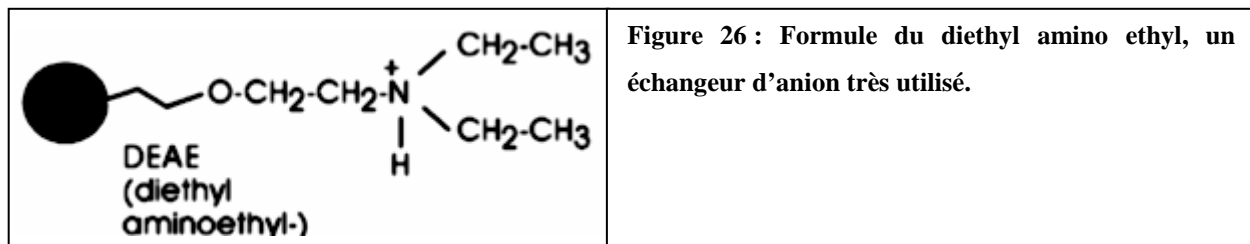
La protéine sauvage et les différents mutants sont purifiés selon le même protocole. Seul le pH des tampons de purification diffère pour les mutants E106A et E106D, solubles à pH 8,5.

II-B-1. Chromatographie échangeuse d'anions

Principe : Les protéines sont des polyélectrolytes, ainsi, à un pH donné, chacun des groupements ionisables sera dans un état d'ionisation donné (en fonction du pKa). Dans une

colonne échangeuse d'ions, les protéines interagissent par affinité électrostatique avec des groupements chargés de la résine. Il existe différents types de supports : cellulose, sephadex, et on peut y fixer des substituants qui vont porter soit une charge positive soit une charge négative. Le diethyl amino ethyl (DEAE) est un des substituants, chargé positivement, le plus utilisé (figure 26). La résine est dite "échangeuse d'anions", parce que des ions négatifs ou les groupements acides d'une protéine peuvent interagir avec.

Les protéines sont éluées en augmentant la force ionique du tampon d'éluion, ou en changeant le pH de telle façon que la protéine soit moins chargée.



Mode opératoire : Au surnageant de centrifugation obtenu précédemment est ajouté environ 10 ml de résine de DEAE (pour un litre de culture), préalablement lavée par 10 volumes de tampon de lyse. Cette suspension est placée sous agitation douce en chambre froide pendant 1h, puis est centrifugée quelques minutes. Le surnageant est éliminé et la résine est lavée trois fois par 40 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, β ME 5 mM. La protéine est ensuite éluée par 20 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, β ME 5 mM.

II-B-2. Chromatographie sur gel de nickel agarose

Principe : La chromatographie d'affinité sur Nickel Agarose utilise un adsorbant NTA (« Nitriilo-Tri-Acetic acid »), chélateur de métal (Nickel), fixé sur une résine sépharose CL.6B. La protéine chimère, qui interagit par des interactions électrostatiques avec le Nickel par ses 6 résidus histidine, peut être ainsi retenue sur la colonne, puis éluée spécifiquement par l'imidazole.

Mode opératoire : A l'éluion obtenue précédemment est ajouté environ 3 ml de gel de Nickel Agarose, préalablement lavé et équilibré par 10 volumes de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, glycérol 10 %, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, β ME 5 mM. Cette suspension est placée sous agitation douce en chambre froide pendant 20 mn puis est déposée,

en chambre froide, sur une colonne de 20 ml (Econo-pac, BIORAD). Après écoulement de la fraction non retenue par la colonne, celle-ci est lavée par 100 ml de tampon de lavage Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, glycérol 10 %, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, β ME 5 mM. La protéine est ensuite éluee par 20 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazole 250 mM, β ME 5 mM.

II-B-3. Précipitation de la protéine par le sulfate d'ammonium

Principe : Les protéines sont solubles dans l'eau car leurs parties hydrophiles ont des interactions avec les molécules d'eau. Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité : neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et entrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci précipite. C'est ce qu'on appelle le phénomène de *salting-out*.

Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, et il ne dénature généralement pas les protéines (tableau 6).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95		100
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

Tableau 6 : Quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0 °C. 100 % correspondent environ à une concentration de 4 M. Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà.

Mode opératoire : L'élution obtenue après chromatographie sur gel de nickel agarose est placée dans la glace, sous agitation. 6,5 g de sulfate d'ammonium sont alors ajoutés petit à petit, ce qui correspond à environ 55 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu peut être conservé ainsi à 4 °C. Après centrifugation, les culots de protéines sont resuspendus dans le tampon désiré. Ils contiendront cependant encore une grande quantité de sulfate d'ammonium dont il faut se débarrasser.

II-C. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Principe : La fixation du bleu de Coomassie R250 sur les protéines, principalement par interaction de type ionique, déplace le maximum d'absorption du colorant de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu). Certains composés provoquent des interférences qu'il est nécessaire de contrôler.

Mode opératoire : Une gamme étalon est réalisée de 0 à 1 mg de BSA, dans un volume final de 25 µl de tampon. Les échantillons à doser contiennent x µl de protéine à doser, et (25-x) µl de tampon identique au précédent. Ensuite, 750 µl de réactif (« Coomassie Plus Protein Assay Reagent » commercialisé par Pierce) sont ajoutées aux essais, et ceux-ci sont immédiatement homogénéisés. Les D.O. sont alors mesurées à 595 nm après 15 minutes d'incubation à température ambiante.

II-D. Concentration des protéines

La protéine purifiée est concentrée à l'aide d'un « Centricon Ultrafree » (Millipore) (cut-off de 10 kDa), d'un volume total de 15 ml ou 0,5 ml selon les cas. La protéine est déposée, puis centrifugée pendant quelques minutes à 1900 g. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une concentration suffisamment élevée en protéines.

II-E. Clivage des protéines à la thrombine

Principe : Le plasmide pET-15b permet d'introduire un site de liaison à la thrombine entre l'étiquette polyhistidines et le gène d'intérêt. Cette protéase reconnaît spécifiquement la séquence Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, et clive la liaison Arg-Gly.

Mode opératoire : 1,5 ml de protéine à 5 mg/ml est incubée avec 50 unités de thrombine à 4 °C pendant 2 h. 2 ml de résine de nickel agarose sont alors ajoutés à la suspension, et le tout est incubé à 4 °C pendant 30 min sous agitation douce. Le mélange est alors centrifugé pour se débarrasser de la résine qui a chélaté la protéine non digérée par la thrombine et les tags résiduels, puis le surnageant est récupéré. Ce surnageant contient la protéine clivée ainsi que la thrombine.

II-F. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

Principe : Les protéines sont incubées en présence de SDS qui les dénature et leur confère une charge globale négative par formation de micelles mixtes protéines-détergent. Elles sont ensuite séparées sous l'influence d'un champ électrique en fonction de leur masse moléculaire, par passage à travers les mailles du réseau de polyacrylamide.

Mode opératoire :

Préparation des échantillons : les échantillons protéiques sont dissous dans un tampon de reprise (Laemmli, 1970), appelé tampon de Laemmli, et de composition suivante : Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 3 %, glycérol 10 %, β ME 1,25 %, bleu de bromophénol 0,001 %. Les échantillons sont chauffés pendant 5 mn à 100 °C avant d'être déposés sur gel d'électrophorèse.

Préparation des gels :

- Le gel de concentration : acrylamide/bisacrylamide 4 %, Tris/HCl 100 mM, pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfate d'ammonium (PSA) 0,1 %, TEMED 0,1 %.
- Le gel de séparation: acrylamide/bisacrylamide 14 %, Tris/HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, PSA 0,1 %, TEMED 0,04 %.

La polymérisation s'effectue en ajoutant extemporanément le TEMED et les gels sont coulés dans le minisystème de Biorad.

Migration : les échantillons sont déposés sous un volume maximal de 20 μ l. La migration est effectuée à 90 V dans le gel de concentration, puis à 180 V dans le gel de séparation. Le tampon de migration est constitué de Tris/HCl 25 mM pH 8,8, glycine 192 mM et SDS 0,1 %.

Coloration et décoloration : les protéines sont colorées pendant 15 mn à 1 heure dans une solution de coloration (bleu de Coomassie R 250 0,2 %, éthanol 25 %, acide acétique 10 %), puis le gel est décoloré par une solution d'éthanol 20 %, acide acétique 10 %. Le gel

est scanné, puis séché afin de le conserver. Le bleu de Coomassie permet de détecter des quantités de protéines supérieures à 50 ng.

II-G. Détection des protéines par immuno-révélation

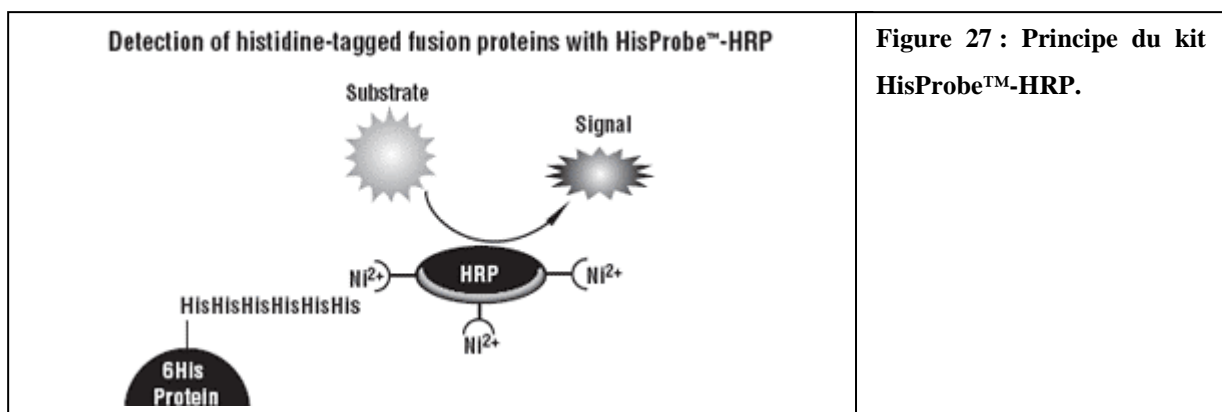
II-G-1. Transfert

Après électrophorèse des protéines, le gel de polyacrylamide est placé 15 mn dans du tampon de transfert (Tris/HCl 25 mM pH 8,0, glycine 192 mM, méthanol 15 % (v/v)). Par ailleurs, une membrane PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) est préhumidifiée par immersion 15 sec dans du méthanol, rincée 2 mn dans l'eau, puis 5 mn dans le tampon de transfert. Les protéines du gel sont ensuite électro-transférées sur la membrane PVDF, grâce à un système de transfert Biorad, pendant une heure (50 mA par gel), en refroidissant la cuve par un bloc de glace pour éviter la surchauffe lors du transfert.

II-G-2. Immuno-révélation des protéines

II-G-2-a. Anticorps anti-6-histidines

La révélation s'est faite grâce au kit « HisProbe™-HRP » (Pierce), selon les instructions du fabricant. Hisprobe HRP est un dérivé de Ni²⁺ couplé à la peroxydase (HRP), utilisé pour détecter des molécules ayant une affinité pour le nickel (Ni²⁺), comme les protéines possédant une étiquette polyhistidines (figure 27).



II-G-2-b. Anticorps polyclonaux de lapin anti-YdiB ou anti-YjeE (fournis par Cocalico Biologicals, Reamstown, PA, U.S.A.)

Après le transfert des protéines sur la membrane de PVDF, celle-ci est saturée par incubation dans une solution de lait écrémé en poudre à 5 % (w/v) dilué dans du tampon TBS (Tris/HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 0,9 %) pendant une heure. Elle est ensuite incubée en présence de l'anticorps polyclonal de lapin anti-YdiB ou anti-YjeE dilué au 1/10000^{ème} dans du TBS additionné de lait à 1 %. Suivent alors successivement les lavages suivants : 10 mn dans l'eau, 10 mn dans du TBS, puis 10 mn dans du TBS-Tween 20 (0,1 %). La membrane est alors incubée 1 h en présence d'anticorps secondaires anti-lapin couplés à la peroxydase, dilués au 1/5000^{ème} dans du TBS additionnés de lait à 1 %. Après une série de lavages identiques à ceux effectués précédemment, le signal peut être révélé grâce au système de détection « Western Exposure Chemiluminescent Detection System » (Pierce).

III. MESURE DE L'ACTIVITE ATPase

Principe (Pullman et al., 1960) : L'ADP formé au cours de la réaction d'hydrolyse de l'ATP est dosé à l'aide d'un système pluri-enzymatique couplé, régénérant continuellement l'ATP et aboutissant à l'oxydation du NADH en NAD^+ , que l'on peut suivre au spectrophotomètre à 340 nm (figure 28). Ainsi, à une mole d'ATP hydrolysée correspond une mole de NAD^+ formée.

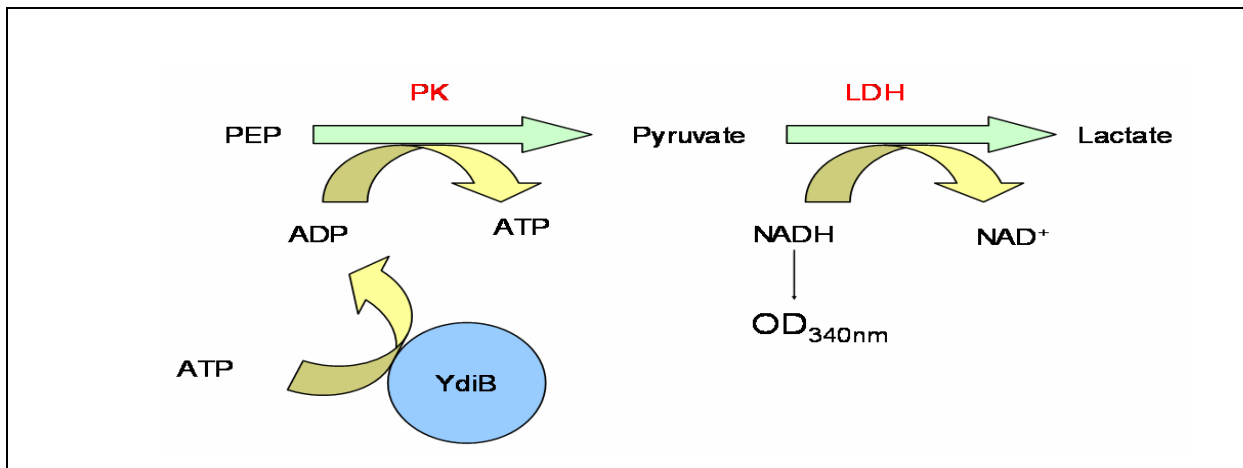


Figure 28 : mesure d'une activité ATPase couplée à la disparition de NADH. L'ATP est hydrolysé en ADP par YdiB. La pyruvate kinase (PK) va alors catalyser le transfert du groupement phosphate du phosphoenolpyruvate (PEP) à l'ADP en conduisant à la formation d'une molécule de pyruvate ainsi qu'à une molécule d'ATP. Le pyruvate va ensuite être converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), donnant lieu à l'oxydation d'une molécule de NADH en NAD^+ .

Mode opératoire : La mesure est réalisée dans une cuve thermostatée à 37 °C, dans un volume de 750 μl de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, MgCl_2 6 mM, PEP 4 mM, lactate déshydrogénase 20 $\mu\text{g/ml}$, pyruvate kinase 40 $\mu\text{g/ml}$, NADH 0,4 mM. Le milieu réactionnel est incubé à 37 °C pendant 5 mn, et la réaction est initiée par l'ajout d'ATP. L'oxydation du NADH est alors enregistrée à 340 nm, et la pente de la droite ($\Delta\text{DO}/\text{mn}$) permet de calculer la vitesse d'hydrolyse de l'ATP selon l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique} = \Delta\text{DO}/\text{mn} \times V_r / \epsilon_{\text{NADH}} \quad \text{mol}/\text{mn}$$

où Volume réactionnel (V_r) = $0,75 \cdot 10^{-3}$ L

$$\text{Coefficient d'absorption molaire du NADH } (\epsilon_{\text{NADH}}) = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Activité enzymatique spécifique} = \text{Activité enzymatique} / [\text{protéine}] \quad \text{mol}/\text{mn}/\text{mg de protéine}$$

IV. ETUDE DE LA MULTIMERISATION

IV-A. Etude de la multimérisation *in vitro*

IV-A-1. Ultracentrifugation analytique

Introduction : La centrifugation est une méthode d'analyse des macromolécules en solution, donnant des informations sur leur taille, leur masse, leur forme et leur composition. Une force centrifuge est appliquée et la distribution spatiale de la macromolécule est suivie en temps réel. Cette méthode ne requière pas de modification chimique de la protéine, ni de tag, et il n'y a pas d'interaction avec une quelconque matrice. Deux types de mesures existent : la vitesse de sédimentation et l'équilibre de sédimentation. Seules les expériences de vitesse de sédimentation ont été utilisées lors de ma thèse, qui sont très utiles car rapides et visuelles, puisque l'on sépare les espèces.

Principe : Lorsque l'on centrifuge une macromolécule avec une grande vitesse angulaire (par rapport à sa capacité à sédimenter), celle-ci est alors entraînée vers l'extérieur, puis culotte. Durant l'expérience, on observe à différents temps et à une longueur d'onde donnée, l'absorbance de l'échantillon en fonction de la distance à l'axe de rotation, grâce à un système optique. On obtient donc la répartition du matériel (exprimé en absorbance) dans la cellule de centrifugation. Un front se forme et se déplace vers le fond de la cellule, et la position de ce front en fonction du temps permet d'obtenir un coefficient de sédimentation s , caractérisant la particule dans son milieu.

La migration de la macromolécule est gouvernée par trois forces : la force centrifuge, la force d'Archimède et la force de frottement. La sédimentation de la particule est due à la force centrifuge $F_c = M_p \cdot \omega^2 \cdot r$, M_p étant la masse de la protéine, ω la vitesse angulaire du rotor et r la distance par rapport à l'axe du rotor. Selon le principe d'Archimède, la force de flottement, $F_A = -M_p \cdot V_p \cdot \rho_s \cdot R_H$, va s'opposer à la sédimentation de la macromolécule. Elle dépend de la masse de la protéine, de son volume spécifique partiel (V_p), de la densité du solvant (ρ_s), et du rayon hydrodynamique de la protéine (R_H) donc de sa forme. De même, la force de frottement s'oppose à la force centrifuge. Cette force est exprimée par $F_f = -f \cdot v$, où f est le coefficient de friction et v la vitesse absolue. f dépend de la viscosité du solvant et de la forme de la macromolécule puisque $f = 6\pi\eta \cdot R_H$ où η représente la viscosité du solvant. Par ailleurs, $v = s \cdot \omega^2 \cdot r$ où s est le coefficient de sédimentation de la macromolécule, exprimé en Svedberg (S) avec $1S = 10^{-13}$ seconde.

A l'équilibre, la somme des forces est nulle, d'où l'équation :

$$F_c + F_A + F_f = 0$$

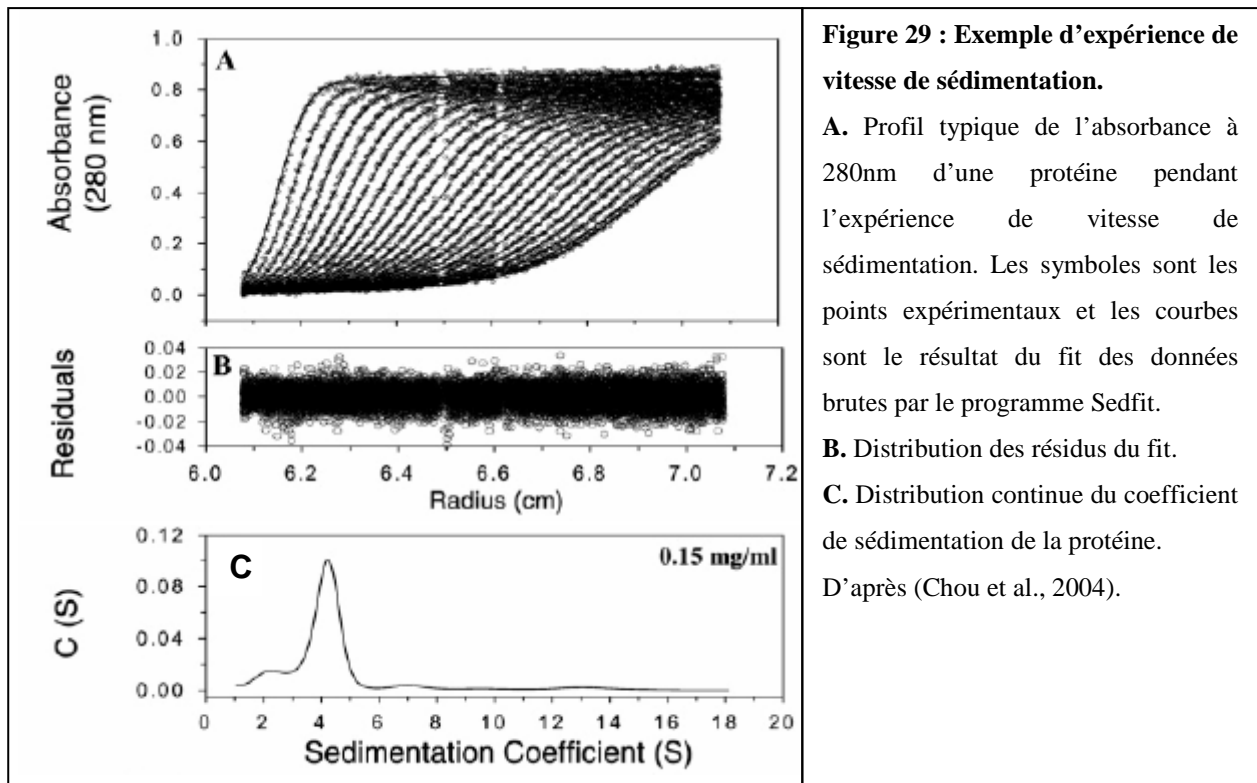
$$(M_p \cdot \omega^2 \cdot r) + (-M_p \cdot V_p \cdot \rho_s \cdot R_H) + (-f \cdot v) = 0$$

$$(M_p \cdot \omega^2 \cdot r) + (-M_p \cdot V_p \cdot \rho_s \cdot R_H) + (-f \cdot s \cdot \omega^2 \cdot r) = 0$$

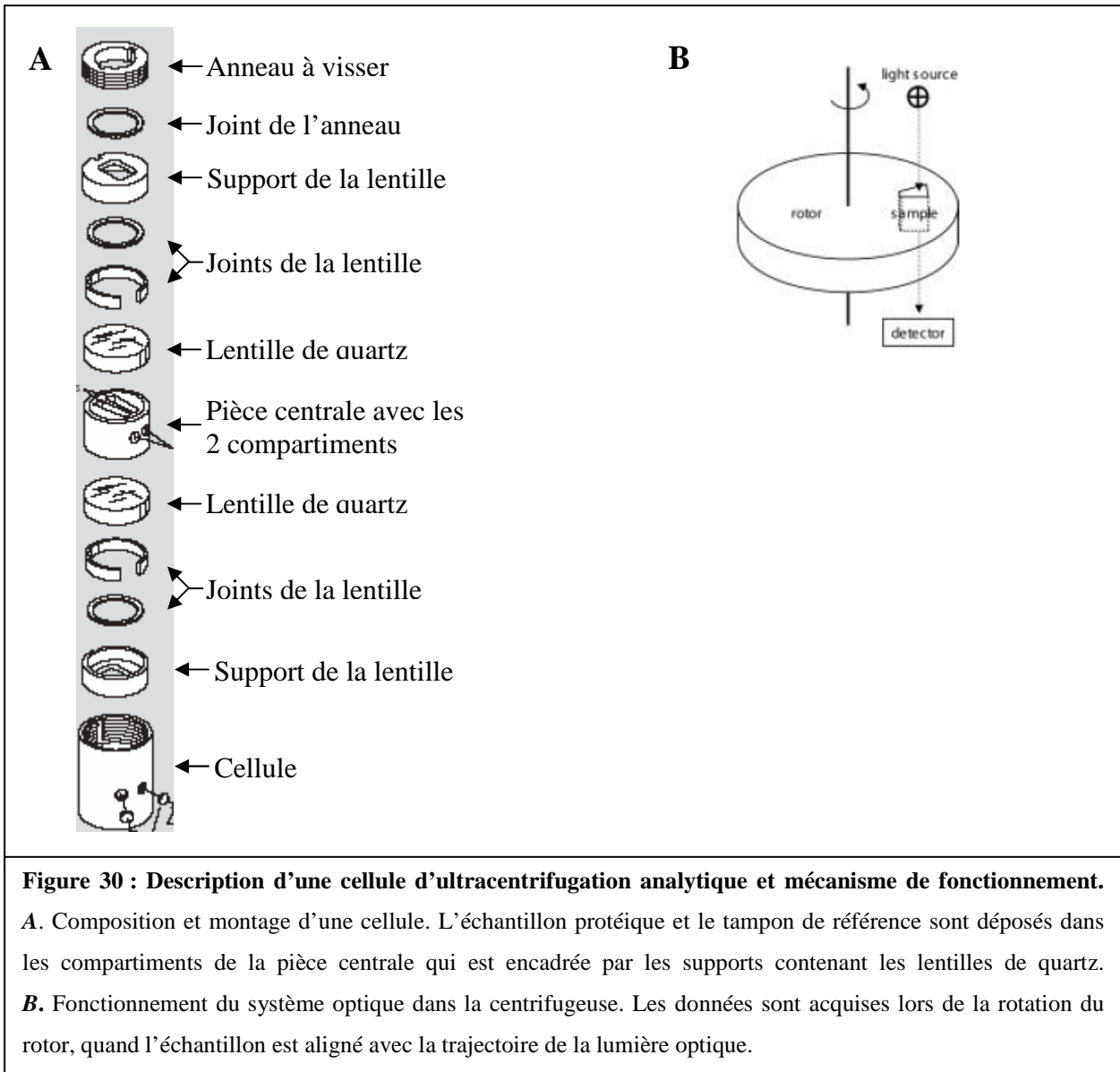
$$s = M(1 - \rho V_p) / Nf \text{ où } N \text{ est le nombre d'Avogadro.}$$

La valeur du coefficient de sédimentation va donc dépendre des propriétés de la macromolécule et de celles du solvant. Le volume spécifique partiel de la protéine, la densité et la viscosité du solvant sont calculés à l'aide du programme SEDNTERP (Laue et al., 1992). En considérant que YdiB est une protéine globulaire, le rayon hydrodynamique peut être estimé par la formule : $R_h = 1,27 \times R_g$, R_g étant le rayon de giration qui a été calculé d'après la structure connue de YjeE, l'homologue de YdiB chez *H. influenzae* (Damaschun et al., 1993). Tous ces paramètres, ainsi que les coefficients de sédimentation obtenus expérimentalement permettent de calculer le poids moléculaire des différentes espèces séparées.

Les données ont été analysées avec le programme SEDFIT (Schuck, 2000), utilisant un modèle c(s) (Continuous size-distribution) simple dans lequel on obtient la distribution des coefficients de sédimentation sans estimation de la taille des espèces. La répartition des résiduels du fit permet de savoir si le modèle utilisé est en adéquation avec les données expérimentales (figure 29A et B). Le résultat de l'analyse aboutit à une distribution de pics reflétant l'abondance des différentes espèces, ressemblant en quelques sortes à un chromatogramme (figure 29C). Il faut cependant garder en mémoire que c'est une courbe obtenue par modélisation des données brutes.



Mode opératoire : Les expériences ont été réalisées avec une ultracentrifugeuse analytique Beckman XL-I équipée d'un rotor AnTi. Les cellules utilisées comportent une pièce centrale composée de deux compartiments et encadrée par deux lentilles de quartz (figure 30A). L'échantillon protéique est déposé dans un compartiment et le tampon dans lequel se trouve la protéine est déposé dans l'autre compartiment, il sert de référence. La détection optique est initiée par la rotation du rotor, de telle sorte que les données sont acquises pendant un intervalle de temps court, quand l'échantillon est aligné avec la trajectoire de la lumière optique (figure 30B). La centrifugation est lancée toute la nuit à 142 000 g et la sédimentation des protéines est suivie à 280 nm. Plusieurs conditions, comme l'effet de la concentration protéique ou l'effet de la force ionique peuvent être testées.



IV-A-2. Chromatographie d'exclusion

Principe : La chromatographie d'exclusion, également appelée filtration sur gel ou tamisage moléculaire, permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Le support solide, constitué de polysaccharides (type « *Sephadex*TM » ou « *Sepharose*TM »), se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau. Il existe différents types de support en fonction de la taille des billes et de leur porosité. D'une façon générale, les molécules sont d'autant plus retenues qu'elles sont petites et les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

Mode opératoire : Un échantillon de 500 µl de protéine est déposé sur une colonne Superdex 75 ou 200 (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée par 25 ml de tampon filtré Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, et différentes concentrations de NaCl. Le débit de la colonne est réglé à 0,5 ml/mn de façon à ce que la pression ne dépasse pas 261 psi. Un détecteur UV en sortie de colonne permet de suivre la sortie des protéines qui sont collectées par fractions de 500 µL. Les standards utilisés pour étalonner la colonne sont le bleu dextran (2 000 000 Da), l'albumine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), le chymotrypsinogène A (25 kDa) et la ribonucléase (13 kDa).

IV-A-3. Electrophorèse des protéines en conditions natives

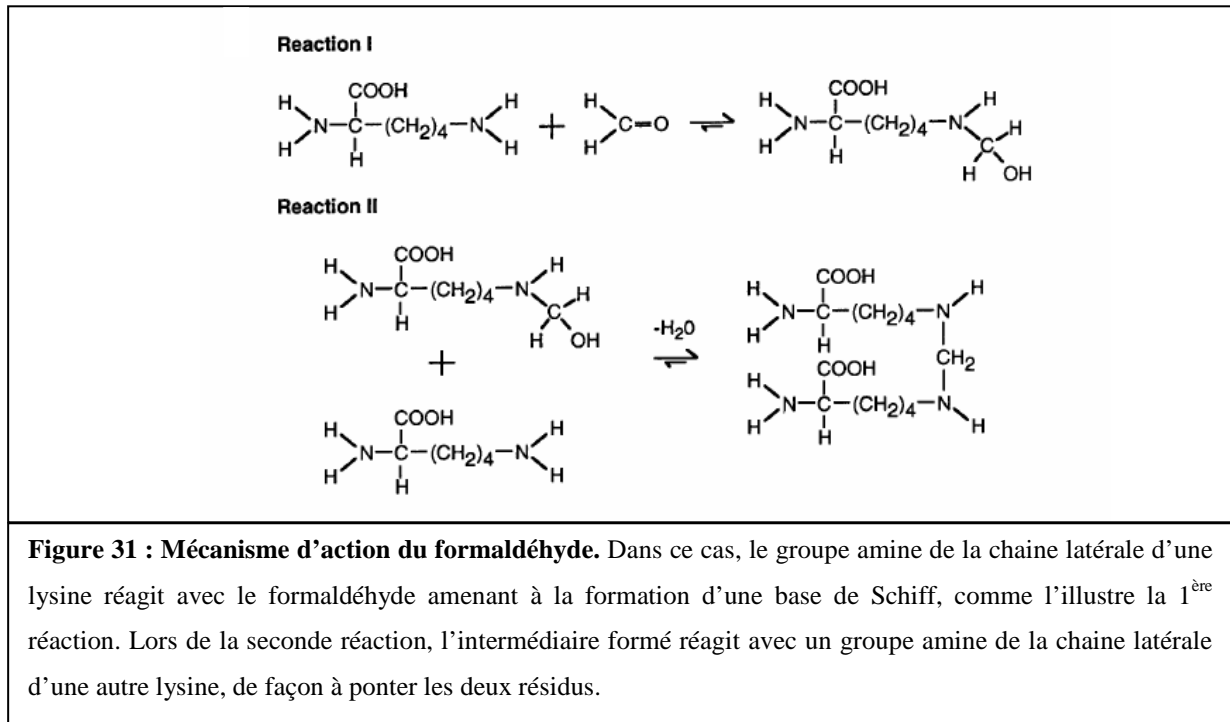
Principe : Dans ce cas, la mobilité va se faire en fonction du rayon hydrodynamique et de la charge de la protéine dans le tampon de migration (Betts et al., 1999). La charge de la protéine dépend de son pI, donc de sa composition en acides aminés. Le pI de YdiB-(his)₆ étant de 5,4 et le tampon utilisé dans notre cas ayant un pH de 8,4, YdiB est chargé négativement à ce pH, et va pouvoir migrer vers la anode. Il en est de même pour YjeE. Comme la protéine reste dans sa conformation native, la migration va également dépendre de sa conformation : les petites protéines globulaires migreront rapidement alors que les structures plus larges tels que les oligomères migreront lentement.

Mode opératoire : Les échantillons et les gels sont préparés de la même façon mais sans SDS, ni βME. La migration s'effectue à 4 °C, à 20 mA et le tampon de migration est constitué de Tris/HCl 50 mM pH 8,4, glycine 400 mM. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie, puis décolorés.

IV-B. Etude de la multimérisation *in vivo*

Principe : Le formaldéhyde (HCHO) est un agent puissant qui produit facilement et de façon réversible des pontages entre protéines *in vivo* (Peters and Richards, 1977). C'est un petit composé dipolaire très réactif dont l'atome de carbone est un centre nucléophile. Les groupes amines des protéines réagissent avec le formaldéhyde amenant à la formation d'une base de Schiff comme l'illustre la figure 31. Cet intermédiaire peut alors réagir avec un second groupe amine et ponter ainsi deux protéines proches dans l'espace. La liaison peut être rompue en chauffant dans un tampon Tris/HCl, ce qui conduit à une baisse du pH et à la

protonation des groupes amines, forçant ainsi la dissociation des protéines (Prossnitz et al., 1988; Skare et al., 1993).



Mode opératoire : Les bactéries EB 437 sont cultivées dans du milieu LB supplémenté de 0,001 % d'arabinose, permettant une légère induction de la protéine YjeE. Quand la D.O._{600nm} atteint 1, les bactéries sont centrifugées et le culot est resuspendu dans du tampon phosphate 100 mM à pH 6,8 de façon à ce que la D.O._{600nm} soit de 0,7 environ. Le formaldéhyde est alors ajouté à une concentration finale de 1 % (w/w) puis l'échantillon est incubé à température ambiante. A différents temps, 1 ml de culture est prélevé et centrifugé immédiatement. Le culot est lavé deux fois avec le tampon phosphate utilisé précédemment, puis est repris dans du tampon Laemmli 4x. Les échantillons sont chauffés pendant 10 mn à 60 °C pour maintenir les pontages entre protéines ou sont chauffés à 95 °C pendant 20 mn pour casser les liaisons formées. Ils sont ensuite analysés sur gel SDS PAGE, et les espèces pontées sont détectées par immuno-révélation avec des anticorps anti-YjeE.

V. MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION ENDOGENE DE YdiB

Les cultures sont réalisées dans 100 ml de milieu LB. Celles de *B. subtilis* sont incubées à 30 °C et celles d'*E. coli* à 37 °C jusqu'à ce que la D.O._{600nm} atteigne environ 1. Après centrifugation, les culots bactériens sont repris dans 4 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM supplémenté en inhibiteurs de protéases. Les cellules sont lysées à l'aide d'une presse de French et le lysat obtenu est centrifugé pendant 30 mn à 9 000 g. 45 µl de surnageant sont récupérés et additionnés de 15 µl de tampon Laemmli 4 X, puis 50 µl du mélange sont déposés sur un gel SDS/PAGE de 1,5 mm d'épaisseur. La migration du gel, le transfert et l'immunorévélation sont réalisés comme décrit dans les chapitres II-F et II-G.

VI. RECHERCHE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE YdiB PAR LA TECHNIQUE DE « PULL-DOWN »

Principe : Cette technique permet d'isoler les partenaires d'une protéine donnée (Benard and Bokoch, 2002; Ren et al., 2003). Après immobilisation de la protéine fusionnée à la GST sur des billes couplées au glutathion, la protéine « appât » est incubée en présence d'un lysat cellulaire de *B. subtilis*. Les protéines de *B. subtilis* qui interagissent avec la protéine d'intérêt sont alors retenues sur la colonne. Après lavage, les protéines sont éluées puis déposées sur gel SDS/PAGE. Une analyse par spectrométrie de masse et une recherche bioinformatique permettent d'identifier le ou les partenaires mis en évidence.

Mode opératoire :

Construction dans le plasmide pET-28a-GST

Le gène *ydiB* a été amplifié à partir de l'ADN génomique de *B. subtilis* en utilisant les amorces décrites dans le tableau 7. Dans un premier temps, le fragment obtenu a été inséré dans le plasmide pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia) entre les sites EcoRI et XhoI. Le gène a ensuite été récupéré par digestion au niveau des sites BamHI et XhoI, et inséré dans le vecteur d'expression pET-28a-GST entre ces deux sites. Ce vecteur provient de la modification du plasmide pET-28a par Catherine Wicker Planquart, permettant de fusionner la GST du côté N-terminal de la protéine d'intérêt et un hexapeptide d'histidines de son côté C-terminal.

Après vérification de la présence de l'insert, un clone positif a été séquencé par la société *Genome Express*.

Oligonucléotides	sites de restrictions introduits
a. 5'-GGGGAATTC <u>CGTGAAGCAAT</u> TAAAATGGAGAAC-3'	EcoRI
b. 5'-GGGCTCGAGATTGCTAATATTGTCATGTCTACT-3'	XhoI

Tableau 7 : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour le clonage dans le vecteur pGEX-4T-1. Les oligonucléotides **a** et **b** ont permis l'amplification du gène *ydiB* à partir de l'ADN génomique de *B. subtilis*, **a** étant l'amorce sens, et **b** l'amorce anti sens. Les sites de restrictions apportés sont soulignés : EcoRI (GAATTC), et XhoI (CTCGAG).

Après une surproduction préparative de bactéries BL21 transformées par le plasmide pET28a/*ydiB*, les bactéries sont centrifugées à 7500 g et à 4 °C, pendant 20 mn. Le culot bactérien, correspondant à 1 L de culture, est repris par 20 ml de tampon de lyse Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, glycérol 10%, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, β ME 5 mM, auquel on ajoute des inhibiteurs de protéases (PMSF 1 mM, pepstatine 5 μ M et leupeptine 5 μ M). Les cellules sont ensuite éclatées à l'aide d'une presse de French, puis centrifugées pendant 30 mn à 9 000 g pour éliminer les cellules non éclatées et les débris cellulaires.

Le surnageant obtenu est déposé sur 3 ml de billes de nickel-agarose. La colonne est lavée par 100 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 8,2, NaCl 300 mM, β ME 5 mM, imidazole 20 mM, puis la protéine est éluée par 15 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 8,2, NaCl 300 mM, β ME 5 mM, imidazole 100 mM.

L'imidazole présent dans l'éluat est éliminé à l'aide d'un centricon (Amicon, Millipore) laissant passer les molécules d'un poids moléculaire inférieur à 10 kDa. La protéine est retenue sur la membrane du centricon puis est reprise dans 15 ml de tampon sans imidazole après plusieurs lavages.

La solution protéique obtenue est ajoutée à environ 2 ml de billes de glutathion-agarose (Sigma), préalablement lavées et équilibrées par 10 volumes de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7, NaCl 200 mM, β ME 5 mM.

Cette suspension est placée sous agitation douce en chambre froide pendant 45 mn puis elle est déposée, en chambre froide, sur une colonne de 20 ml (Econo-pac, BIORAD). Après écoulement de la fraction non retenue par la colonne, celle-ci est lavée par 60 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, β ME 5 mM, Tween 20 0,5 %.

Préparation du lysat de B. subtilis

Une culture de 500 ml de *B. subtilis* est incubée à 37 °C, sous agitation, toute la nuit. La suspension bactérienne est alors centrifugée pendant 20 minutes à 7500 g, puis le culot est repris dans 20 ml de tampon (Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, β ME 5 mM), auquel on ajoute des inhibiteurs de protéases. Après rupture des cellules à la presse de French, la suspension est centrifugée à 9000 g pendant 30 minutes et le surnageant est conservé.

« *Pull-down* »

Le surnageant du lysat de *B. subtilis* est alors incubé avec les billes couplées à la protéine d'intérêt, toute une nuit, sous agitation douce, à 4 °C puis le mélange est déposé sur la colonne de glutathion-agarose. Après écoulement de la fraction non retenue, celle-ci est lavée par 50 ml de tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, β ME 5 mM. 10 ml de tampon Tris/HCl 50 mM pH 8, glutathion 10 mM sont alors ajoutés à la résine pour permettre l'élution des protéines. Les protéines éluées sont lyophilisées, resuspendues dans un volume plus faible, puis analysées sur gels SDS/PAGE. Les bandes détectées sont ensuite analysées par spectrométrie de masse (étape réalisée par l'équipe de Jérôme Garin, CEA Grenoble) et une recherche bioinformatique permet d'identifier les partenaires potentiels.

RESULTATS

I- YdiB EST-ELLE ESSENTIELLE ?

Des résultats contradictoires ont été publiés sur l'essentialité de *ydiB* chez *B. subtilis* (Hunt et al., 2006; Kobayashi et al., 2003). Nous avons alors tenté d'étudier à notre tour ce problème. Un mutant conditionnel de *B. subtilis* avait déjà été construit dans le laboratoire de Eric Brown à l'université McMaster de Hamilton (Ontario, Canada), selon le protocole développé dans leur équipe (Bhavsar et al., 2001). Ce mutant, où le gène *ydiB* natif est remplacé par une cassette de résistance à la spectinomycine, possède une copie de *ydiB* sous le contrôle d'un promoteur inductible au xylose au locus *amyE*, cette copie étant fusionnée à une cassette de résistance au Chloramphénicol (*amyE :: ydiB Cm ydiB :: spec*). Des étalements sur boîtes de Pétri, supplémentées ou non par 2 % de xylose, ont montré que le mutant était capable de pousser lentement en absence d'inducteur (résultat non montré), indiquant que la protéine YdiB n'est vraisemblablement pas essentielle à la croissance de la bactérie. Afin de mieux caractériser ce mutant, des courbes de croissance en milieu LB liquide et à 30 °C ont été réalisées avec la souche sauvage et le mutant délété, en absence ou en présence de xylose (figure 32). La souche sauvage pousse régulièrement et atteint un plateau à ≈ 9 h. Pour le mutant conditionnel, et en absence d'inducteur, une longue phase de latence et une diminution du taux de croissance pendant la phase exponentielle sont observées. Une forte concentration d'inducteur (2 %) réduit légèrement la phase de latence et permet au mutant de retrouver une croissance comparable à celle du sauvage. Ces résultats suggèrent que la vitesse du taux de croissance est directement liée à l'expression de YdiB bien que *ydiB* ne soit pas indispensable pour *B. subtilis*.

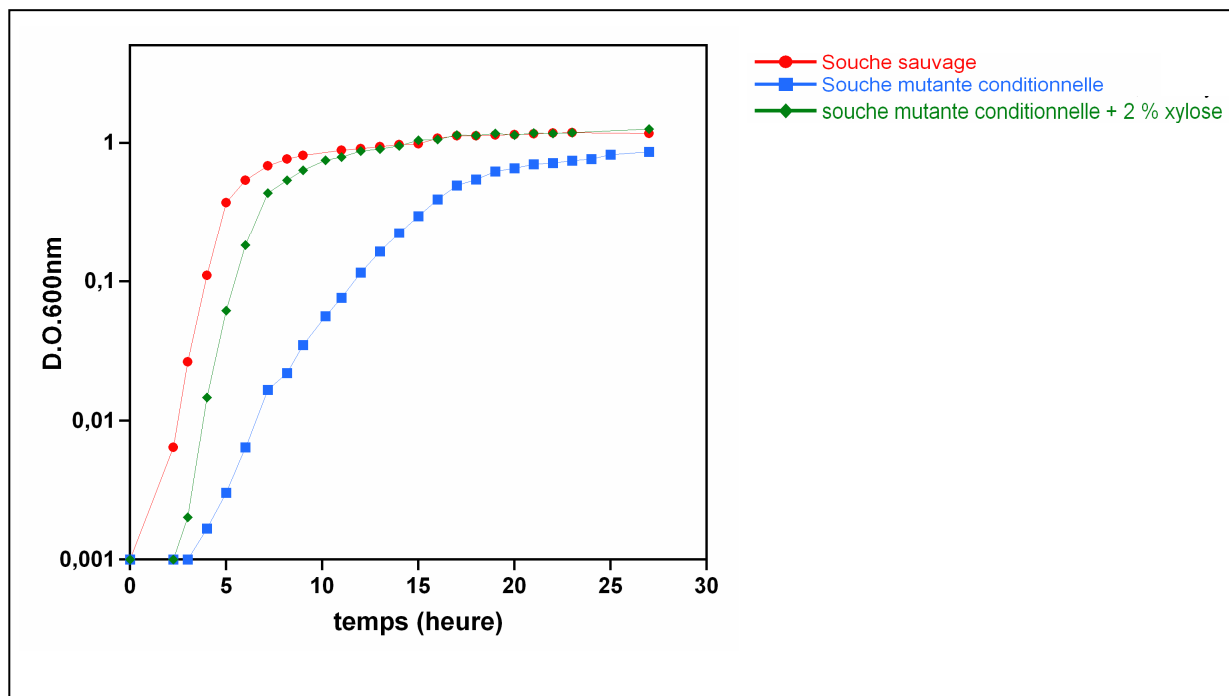
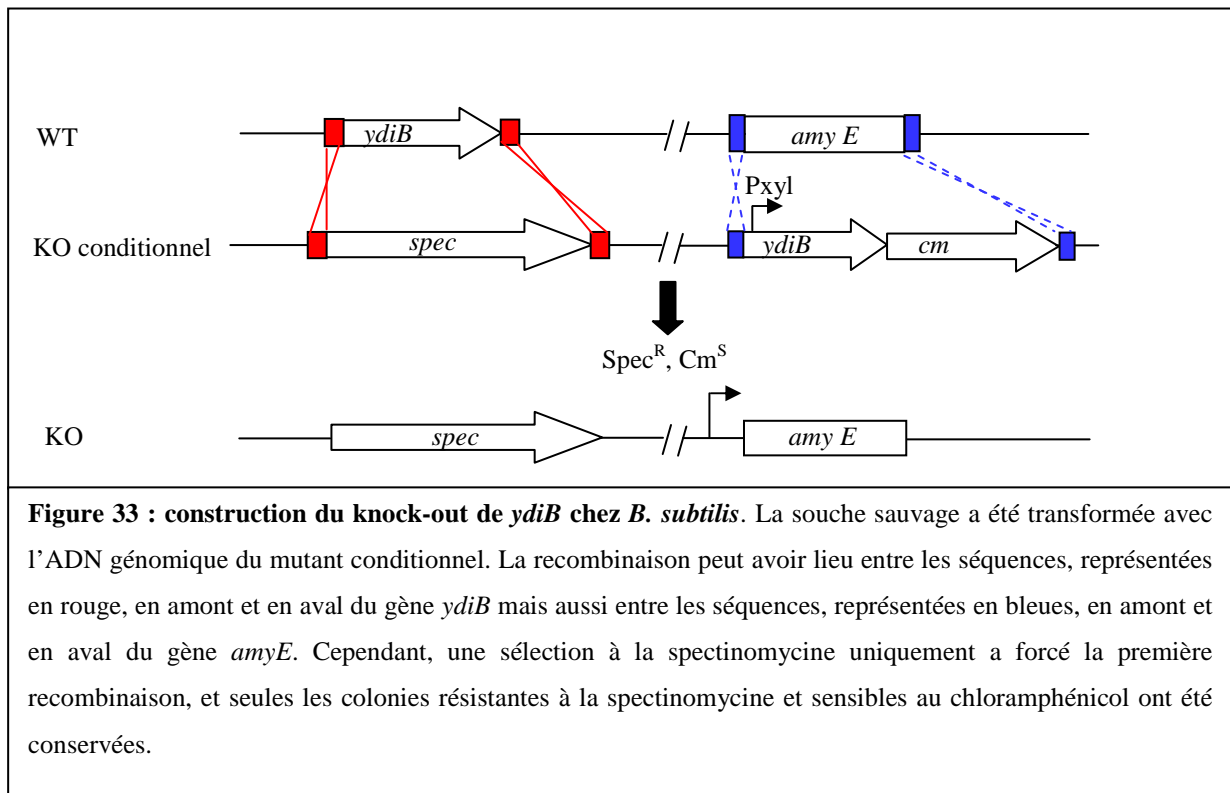


Figure 32 : courbes de croissance de la souche sauvage et du mutant conditionnel. Une colonie de chacune des deux souches, ayant poussé toute la nuit sur LB/agar, a été inoculée dans du LB liquide. Après dilution des cultures jusqu'à une D.O._{600nm} de environ 0,001, la croissance de la souche sauvage (courbe rouge) et du mutant a été suivie à 30 °C pendant 26 heures. La croissance du mutant conditionnel a été étudiée en absence de xylose (courbe bleue) et en présence de 2 % de xylose (courbe verte).

Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'une légère fuite du promoteur soit responsable de la croissance lente du mutant conditionnel en absence d'inducteur. Par conséquent, nous avons entrepris la construction d'un mutant totalement délété en transformant la souche sauvage de *B. subtilis* avec l'ADN génomique du Knock-out conditionnel, et en sélectionnant à la spectinomycine. Quelques colonies résistantes à cet antibiotique et qui demeurent sensibles au chloramphénicol ont été obtenues, trait caractéristique d'un vrai Knock-out (figure 33).



Afin de confirmer l'absence d'expression de YdiB dans la nouvelle souche, un Western blot a été réalisé sur les lysats bactériens de la souche sauvage et du mutant. L'expression endogène de YdiB étant très faible, un protocole bien défini a été mis au point (voir chapitre V dans la partie « Matériels et méthodes »), et la révélation avec des anticorps anti-YdiB montre bien la présence de la protéine dans la souche sauvage, et son absence totale dans la souche délétée (figure 34). Des courbes de croissance ont alors été réalisées avec cette nouvelle souche dans les mêmes conditions que précédemment, montrant que celle-ci pousse très lentement en milieu riche, à une vitesse comparable à celle du mutant conditionnel en absence de xylose (figure 34).

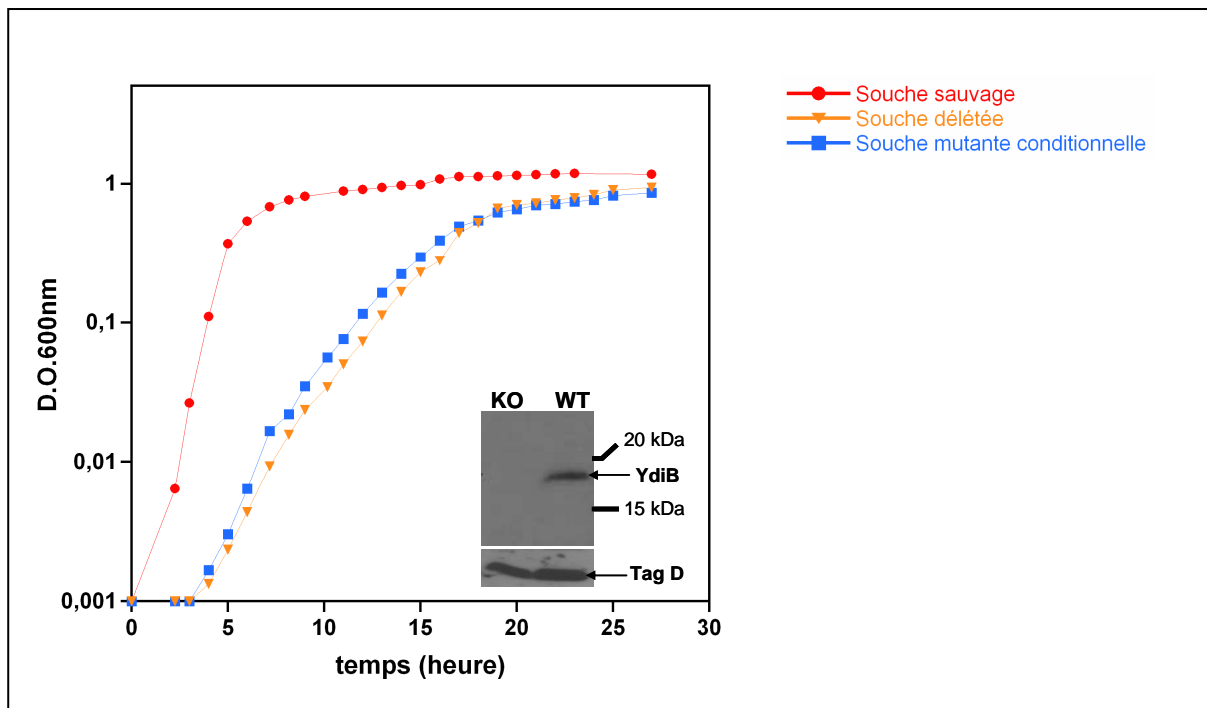


Figure 34 : Courbes de croissance de la souche sauvage, de la souche déléetée et du mutant conditionnel en absence d'inducteur et expression basale de YdiB dans les souches sauvage et déléetée. Les courbes de croissances ont été réalisées comme dans la figure 32 pour la souche sauvage (courbe rouge), la souche déléetée (courbe orange) et la souche mutante conditionnelle (courbe bleue). Le niveau d'expression de la protéine a été examiné sur des extraits totaux de protéines séparées sur gel SDS-PAGE 14 % d'acrylamide, électro-transférées sur membrane de nitrocellulose, puis immunodétectées par des anticorps anti-YdiB, et révélés par chimioluminescence. De gauche à droite : lysat bactérien de la souche déléetée ; lysat bactérien de la souche sauvage.

Un contrôle a été réalisé en parallèle avec des anticorps dirigés contre la protéine TagD qui est impliquée dans la voie de biosynthèse des acides téichoïques de la paroi de *B. subtilis*.

Ces résultats prouvent définitivement que YdiB n'est pas essentielle pour la croissance de la bactérie en milieu riche, mais qu'en absence de son expression, il y a un ralentissement très important du taux de croissance, indiquant qu'une fonction cellulaire clef est affectée.

II- CLONAGE ET PURIFICATION

A mon arrivée au laboratoire, le gène *ydiB* était cloné dans le vecteur pET-15b, permettant de fusionner un hexapeptide d'histidines du côté *N*-terminal de la protéine (construction réalisée par Anne-Emmanuelle Foucher). Il contient un promoteur tac inducible par l'IPTG permettant un haut niveau d'expression.

Nous avons établi des conditions expérimentales permettant de surexprimer la protéine à un niveau élevé, et un protocole très efficace de purification de YdiB a été mis au point, prenant avantage du bas pI de la protéine et des propriétés de chélation du métal de l'étiquette polyhistidines (voir chapitre II-B dans la partie « Matériels et méthodes »). En réalisant une culture à 37 °C, suivie d'une induction par 1mM d'IPTG quand la D.O._{600nm} atteint 0,6 environ, la protéine recombinante est obtenue en quantité relativement importante sous forme soluble. Le surnageant est soumis à une chromatographie échangeuse d'anions, puis à une chromatographie d'affinité sur gel de Nickel-agarose. La protéine est ensuite précipitée par environ 55 % de sulfate d'ammonium, et conservée comme telle à 4 °C. Par cette méthode de purification, la quantité de YdiB qu'il est possible de purifier avoisine les 40 mg de protéine par litre de culture bactérienne. Les profils électrophorétiques correspondants aux différentes étapes du protocole de surproduction de YdiB sont illustrés par la figure 35.

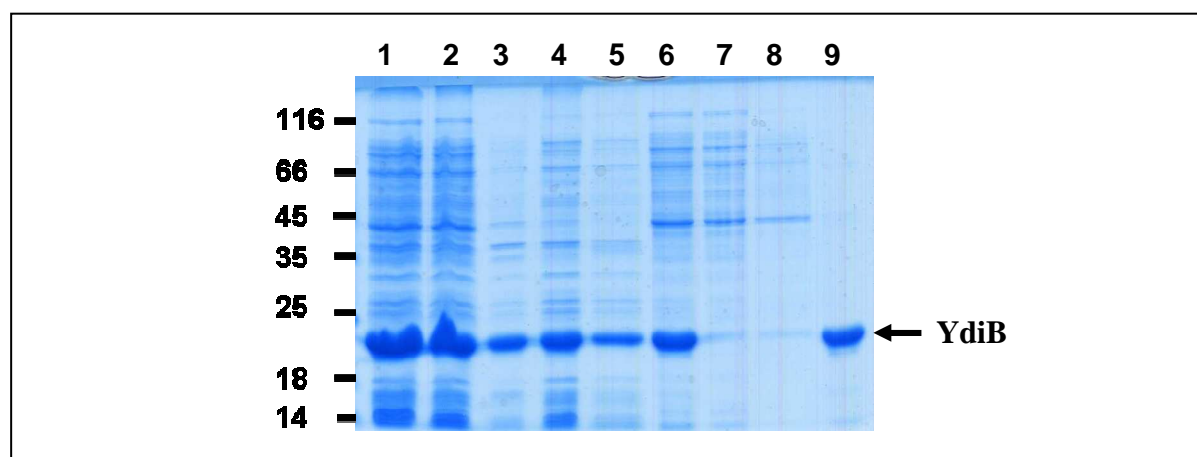


Figure 35 : Analyse sur gel SDS/PAGE des fractions obtenues à différentes étapes de la purification de YdiB. Les étapes du protocole de purification sont détaillées dans le chapitre II-B dans la partie « Matériels et méthodes ». Les puits correspondent à : (1) extrait bactérien obtenu après induction de l'expression de YdiB ; (2 et 3) Fractions soluble et insoluble respectivement, obtenues après une centrifugation à basse vitesse ; (4) Fraction non retenue sur colonne échangeuse d'anions ; (5) Lavage de la colonne échangeuse d'anions ; (6) élution de la colonne échangeuse d'anions ; (7) Fraction non retenue sur colonne de nickel agarose ; (8) Lavage de la colonne de nickel agarose ; (9) élution de la colonne de nickel agarose. La taille (en kDa) et la position des marqueurs de poids moléculaires sont indiquées sur la gauche. La flèche indique la position de YdiB.

III- YdiB FORME DES MULTIMERES IN VITRO

III-A. Equilibre dynamique entre les différentes formes

Afin d'améliorer la pureté de la protéine, une étape de gel filtration a été ajoutée à la purification. Le profil d'élution de YdiB est illustré par la figure 36A. Un pic *b* majoritaire sort au volume attendu pour le monomère de YdiB (avec une masse apparente de 20 kDa), tandis qu'un pic *a* minoritaire correspond vraisemblablement à un mélange de dimères et d'oligomères de plus haut poids moléculaires de YdiB (avec une masse apparente de 40 kDa et plus). Une analyse sur un gel SDS/PAGE a confirmé que YdiB est la protéine majeure dans toutes ces fractions (figure 36B), mais contrairement à nos attentes, les fractions du pic *a* correspondent à un mélange de monomères et de dimères résistants au SDS, également révélés par des anticorps anti-histidines (figure 36C). Cette caractéristique inhabituelle suggère que des dimères de YdiB maintiennent leur structure quaternaire malgré les conditions dénaturantes extrêmes utilisées (3 % de SDS dans le tampon de charge, et 0,1 % de SDS dans le gel et le tampon de migration). Néanmoins, certains dimères de protéines sont connus pour résister à de telles conditions (Cladiere et al., 2006).

L'oligomérisation de YdiB a par la suite été confirmée par la migration des fractions obtenues en sortie de gel filtration sur un gel non-dénaturant (figure 36D). Cette technique a l'avantage de maintenir la structure quaternaire des protéines durant la migration, et la mobilité va dépendre de la viscosité du gel, de la forme de la protéine et de sa densité de charge. La macromolécule, chargée négativement à pH 8,4, va migrer vers l'anode en fonction de sa conformation : les petites protéines globulaires migreront rapidement alors que les structures plus larges tels que les oligomères migreront plus lentement. Dans ces conditions, les fractions du pic *a* contiennent un mélange de monomères et d'oligomères de différentes tailles, tous reconnus par des anticorps anti-histidines. Cependant, un profil similaire est observé lors de la migration des fractions du pic *b*, alors que seule une bande monomérique était attendue dans ce cas. Ceci suggère que YdiB existe sous forme d'équilibre entre monomères et oligomères et que cette inter-conversion entre les différentes espèces moléculaires est rapide.

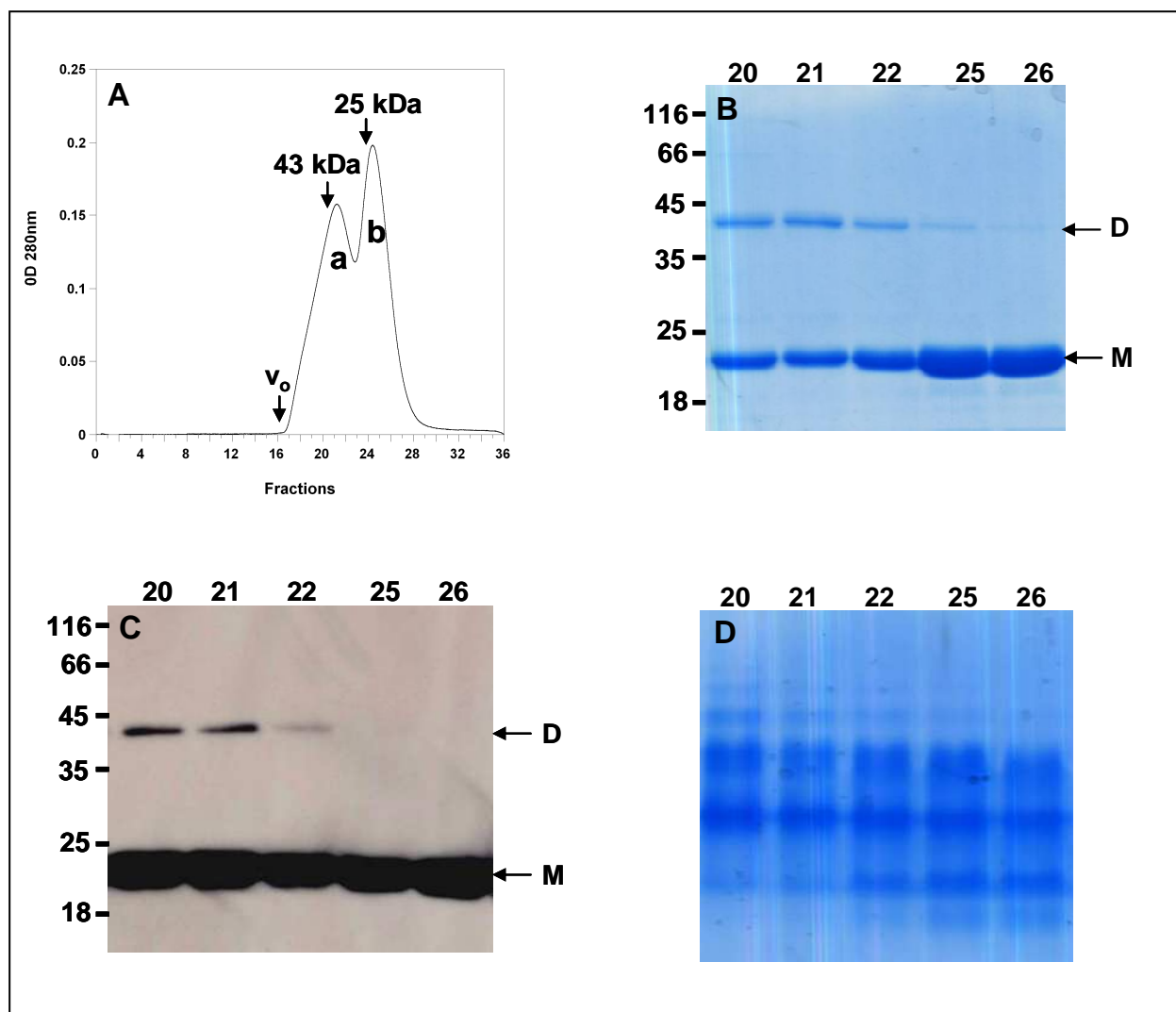
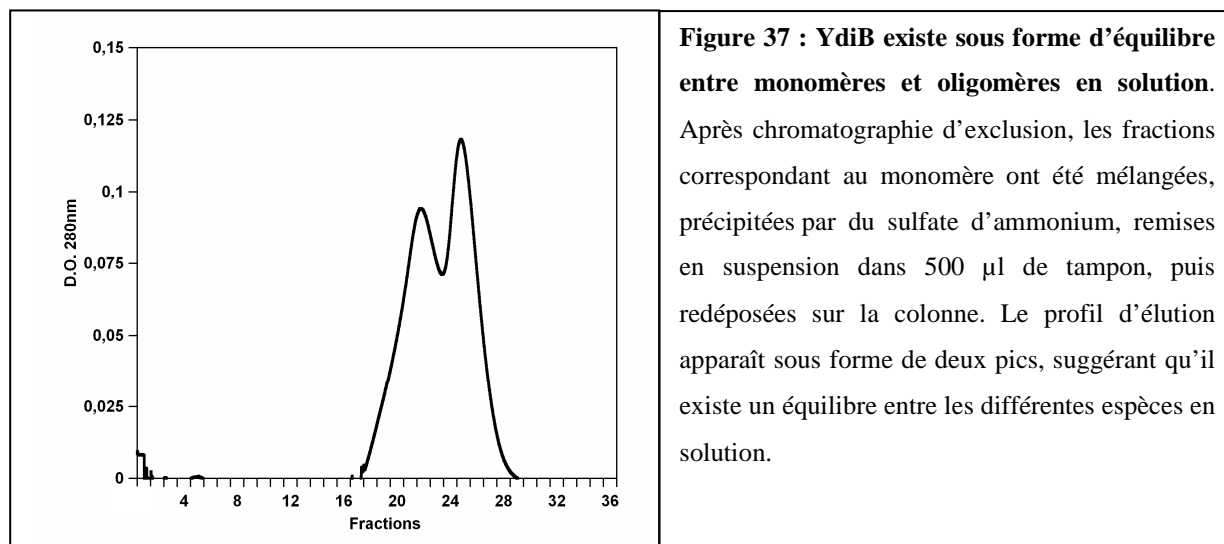


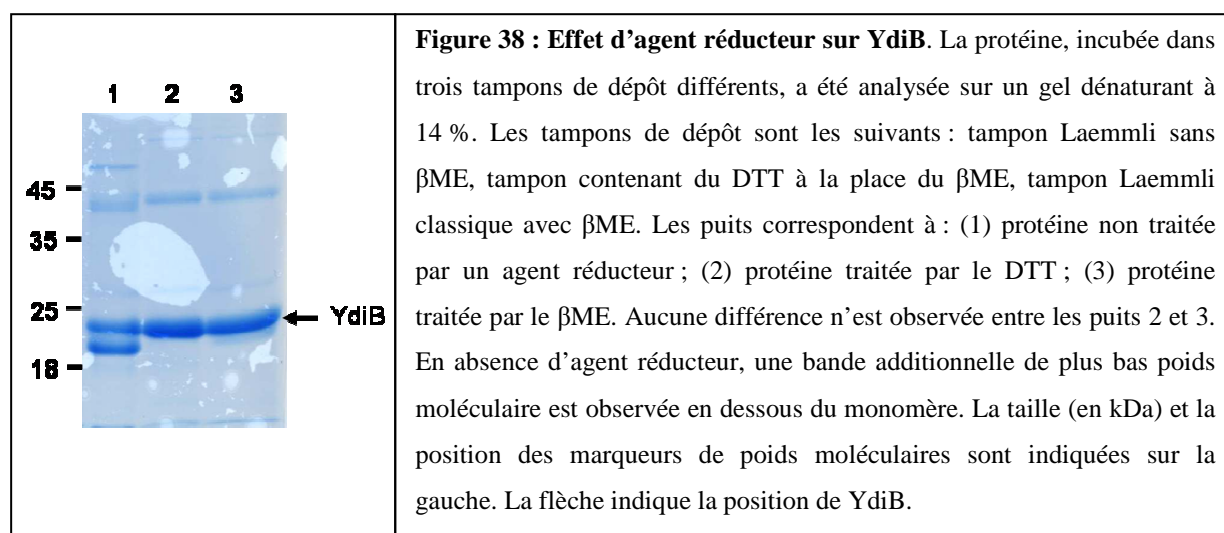
Figure 36 : Oligomérisation de YdiB. **A.** Chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 75 (Pharmacia) de YdiB purifiée. La colonne a été équilibrée dans un tampon 50 mM Hepes/KOH, pH 7,5 et 50 mM NaCl. 500 μ l de protéines sont déposés sur la colonne et des fractions de 500 μ L ont été récoltées à un débit de 0,5 ml/min. Les flèches indiquent le volume mort (V_o) calibré avec le bleu dextran, et les pics d'élution de standards : ovalbumine (43,0 kDa), et chymotrypsinogène (25,0 kDa). Le pic *a* correspond à un mélange de dimères et d'oligomères de plus haut poids moléculaires de YdiB. Le pic *b* correspond au volume d'élution attendu pour un monomère de YdiB. **B.** Des aliquotes des fractions indiquées ont été analysées sur un gel SDS/PAGE à 14 % coloré au bleu de Coomassie. **C.** Les mêmes aliquotes ont été analysées par Western-blot avec des anticorps anti-histidines. Dans **B** et **C**, la position et la taille des marqueurs de poids moléculaires sont indiquées sur la gauche, et les mobilités électrophorétiques du monomère (M) et du dimère (D) sont indiquées sur la droite. **D.** Les mêmes aliquotes ont été analysées sur un gel non dénaturant. Ce type d'électrophorèse, effectuée en absence de bleu de coomassie dans le tampon de charge, ne permet pas l'utilisation de marqueurs de poids moléculaires (Speed et al., 1995).

Lorsqu'une fraction du pic *a* ou *b* est redéposée sur la même colonne d'exclusion, deux pics d'éluion sont de nouveau observés, démontrant une fois de plus qu'il existe un équilibre entre les différentes espèces en solution (résultat montré uniquement pour le pic *b* : figure 37).



III-B. Effet d'agents réducteurs

YdiB possède deux cystéines dans sa séquence. Pour s'assurer qu'elles ne sont pas impliquées dans l'oligomérisation, la migration de la protéine a été analysée sur un gel dénaturant en présence ou en absence d'agent réducteur (figure 38).



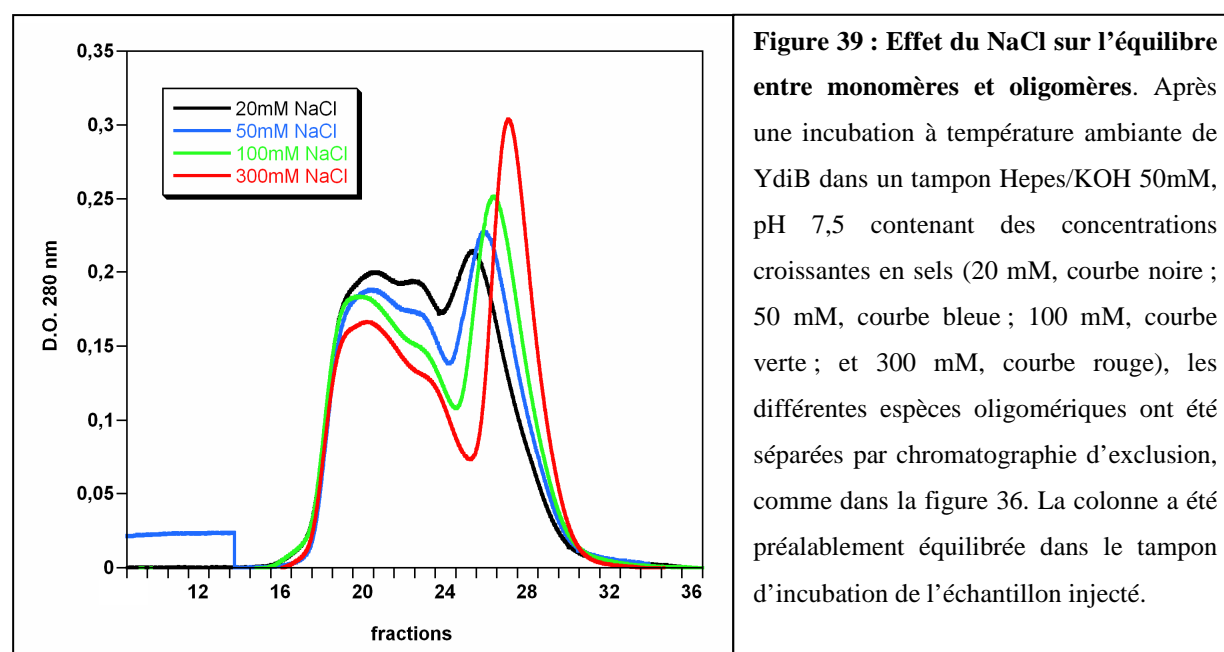
La figure 38 indique qu'il n'y a pas de ponts disulfures impliqués dans l'oligomérisation puisque l'absence d'agent réducteur dans le tampon de charge n'augmente pas la quantité de dimères. En revanche, une bande additionnelle de plus bas poids

moléculaire est observée en absence d'agent réducteur qui pourrait correspondre à une forme de YdiB où les deux cystéines forment un pont disulfure intramoléculaire.

III-C. Effet des sels sur l'oligomérisation de YdiB

Il a été décrit dans la littérature que la concentration saline de la solution protéique pouvait influencer l'équilibre monomère/multimère (Lebowitz et al., 1994). Afin de savoir si la force ionique affectait l'état oligomérique de YdiB, la protéine a été préincubée avec différentes concentrations en chlorure de sodium, puis déposée sur colonne d'exclusion préalablement équilibrée avec un tampon de même composition saline (figure 39). En présence de 20 mM NaCl, un profil d'élution similaire à celui observé en figure 36 est obtenu. Cependant, cette fois, le premier pic est clairement scindé en deux, ce qui reflète l'existence de deux populations d'espèces oligomériques différentes. La présence de ce doublet n'est pas toujours observée, dépendant du lot de protéines purifiées utilisé, mais cette particularité n'a pas de conséquences sur les résultats obtenus.

Des concentrations croissantes de chlorure de sodium réduisent progressivement la quantité de matériel présente dans le doublet alors que celle présente dans le second pic augmente. Simultanément, le second pic se déplace légèrement vers des temps d'élution plus longs. Ce déplacement progressif suggère qu'à des faibles concentrations en sels, l'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de YdiB est rapide. En revanche, en présence de fortes concentrations salines, la forme monomérique semble beaucoup plus stable, et peut, par conséquent, être éluée de la colonne plus tardivement.

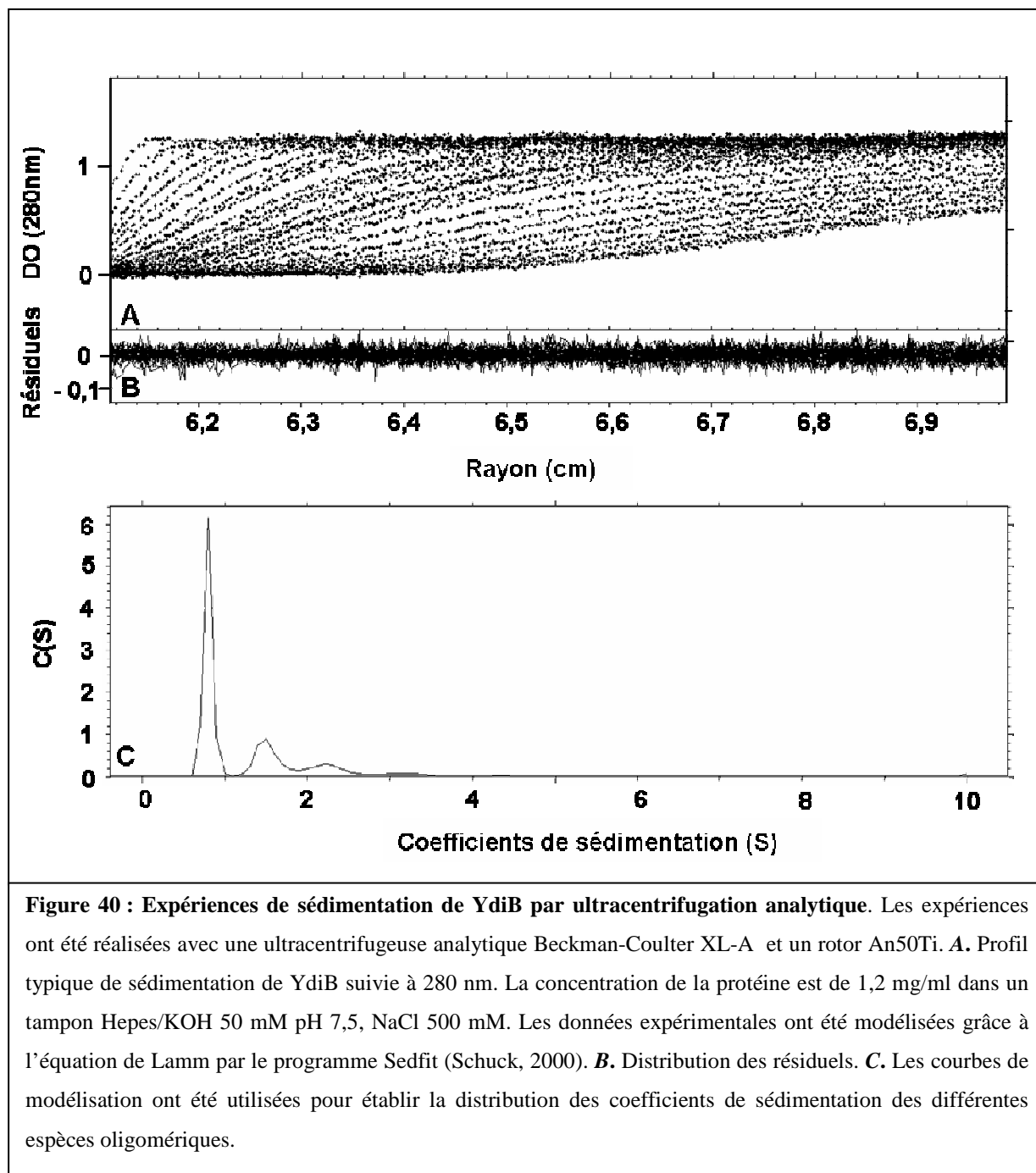


Pour compléter les résultats sur l'état oligomérique de YdiB, des expériences de sédimentation en ultracentrifugation analytique ont été réalisées en collaboration avec David Stroebel et Christine Ebel à l'IBS. Le rayon hydrodynamique de la macromolécule a été estimé d'après la formule : $R_h = 1,27 \times R_g$ considérant que YdiB est une protéine globulaire (Damaschun et al., 1993). Le rayon de giration (R_g) a été déduit de la structure de YjeE, l'homologue de YdiB chez *H. influenzae*. Les propriétés du solvant et de la protéine, utilisées pour le traitement des données, ont été calculées grâce au logiciel SEDNTERP. Tous ces paramètres sont présentés dans le tableau 8.

viscosité (η) en poise	masse volumique (ρ) en g/ml	Rayon hydrodynamique (RH) en Å	Volume partiel spécifique (Vp) en cm ³ /g	Masse moléculaire de YdiB (M) en Da
2,21.10 ⁻²	1,04921	24,1	0,7235	20169

Tableau 8 : Paramètres nécessaires pour le traitement des données d'ultracentrifugation analytique. Le tampon utilisé est un tampon Hepes/KOH 50mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glycérol 10 %. Les paramètres ont été calculés pour une température de 4 °C. La masse moléculaire de YdiB tient compte de l'étiquette polyhistidine ajoutée.

La figure 40 montre le profil de sédimentation de YdiB dans un tampon riche en sels (500 mM NaCl). La superposition des points expérimentaux avec les courbes de fitting (figure 40A) obtenues grâce au programme Sedfit (voir chapitre IV-A-1 dans la partie « Matériels et méthodes »), ainsi que la distribution de façon aléatoire des résiduels (figure 40B), attestent qu'un modèle fiable de sédimentation a été utilisé. La figure 40C indique que la majorité de la protéine sédimente à 0,85 S, ce qui correspond à un coefficient théorique calculé pour une espèce globulaire de poids moléculaire d'environ 20 kDa en solution dans un tampon de cette composition. Par ailleurs, deux autres pics de coefficients de sédimentation de 1,45 S et 2,3 S sont observés, correspondants à des protéines d'environ 40 kDa (dimère) et de 80 kDa (tétramère) respectivement. Aucune agrégation à des coefficients supérieurs à 10 S, n'est mise en évidence.

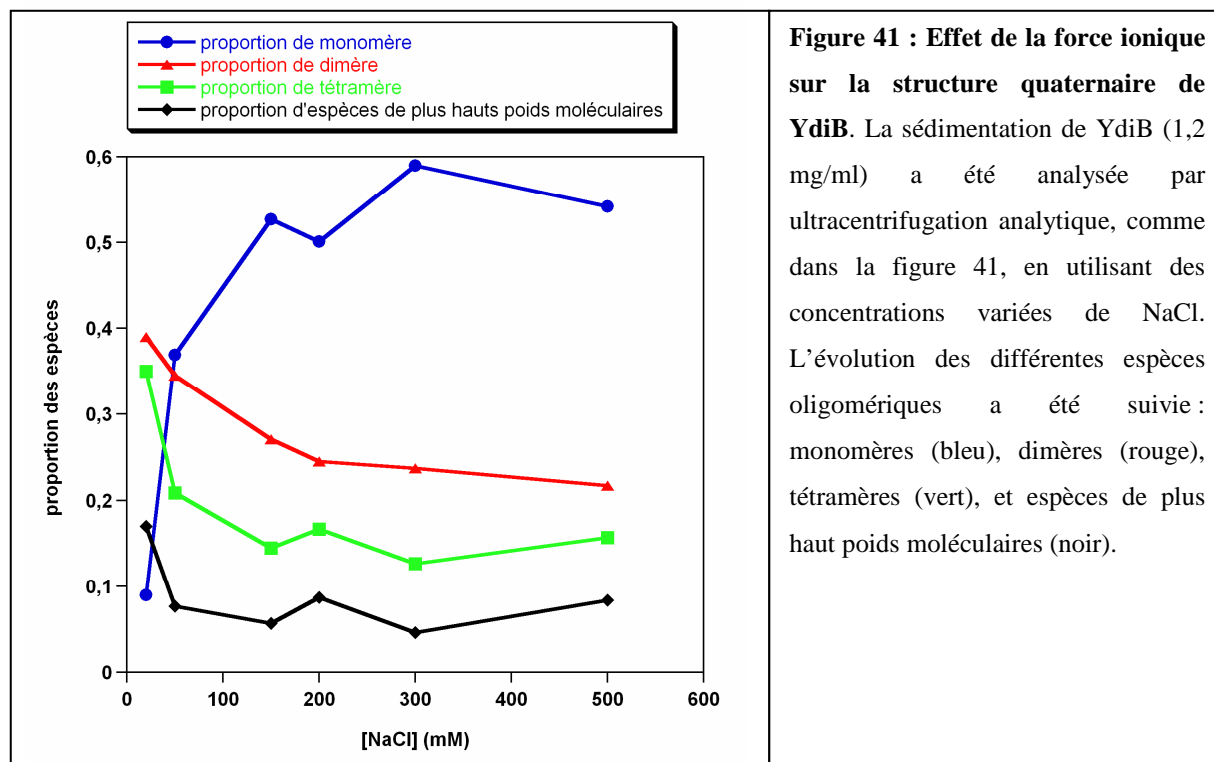


La proportion de chaque espèce a été analysée par des expériences de sédimentation en ultracentrifugation analytique dans différentes conditions de concentrations salines. Comme précédemment, les paramètres utiles au traitement des données ont été définis pour chaque tampon grâce au logiciel SEDNTERP, et sont présentés dans le tableau 9. Seules la viscosité et la masse volumique du tampon diffèrent à chaque condition.

conditions	viscosité (η) en poise	masse volumique (ρ) en g/ml
20 mM NaCl	$2,142.10^{-2}$	1,02956
50 mM NaCl	$2,146.10^{-2}$	1,03081
150 mM NaCl	$2,1599.10^{-2}$	1,03493
200 mM NaCl	$2,167.10^{-2}$	1,03699
300 mM NaCl	$2,181.10^{-2}$	1,04109
500 mM NaCl	$2,21.10^{-2}$	1,04921

Tableau 9 : Viscosité et masse volumique de chaque tampon. Le tampon de base utilisé est un tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glycérol 10 %. Seules les concentrations en NaCl diffèrent.

Pour chaque condition, la surface des pics correspondants aux différentes espèces a été calculée, puis rapportée à un pourcentage. La figure 41 illustre l'effet observé de la force ionique sur l'état oligomérique de YdiB. Ces résultats confirment ceux obtenus en chromatographie d'exclusion. A une faible concentration en sels (20 mM NaCl), la forme monomérique de YdiB est minoritaire puisqu'elle représente moins de 10 % des espèces totales, alors que les espèces dimériques et tétramériques sont dans des proportions similaires et constituent 80 % des espèces totales à elles deux. À des conditions de forces ioniques élevées, la situation s'inverse. Lorsque la concentration saline atteint 150 mM, un état stable des différentes espèces est observé, avec 50 à 60 % de forme monomérique, et environ 25 % et 15 % de forme dimérique et tétramérique, respectivement.



Un contrôle a été réalisé dans lequel l'étiquette polyhistidines a été clivée par la thrombine. Comme le montrent les profils d'élution de la colonne d'exclusion (figure 42A et B), l'absence de tag ne modifie pas le comportement de la protéine, qui est toujours sous forme de monomères et d'oligomères en solution, et l'équilibre entre les différentes formes est influencé par la concentration saline. La protéine traitée à la thrombine a été déposée sur gel pour confirmer la coupure (figure 42C).

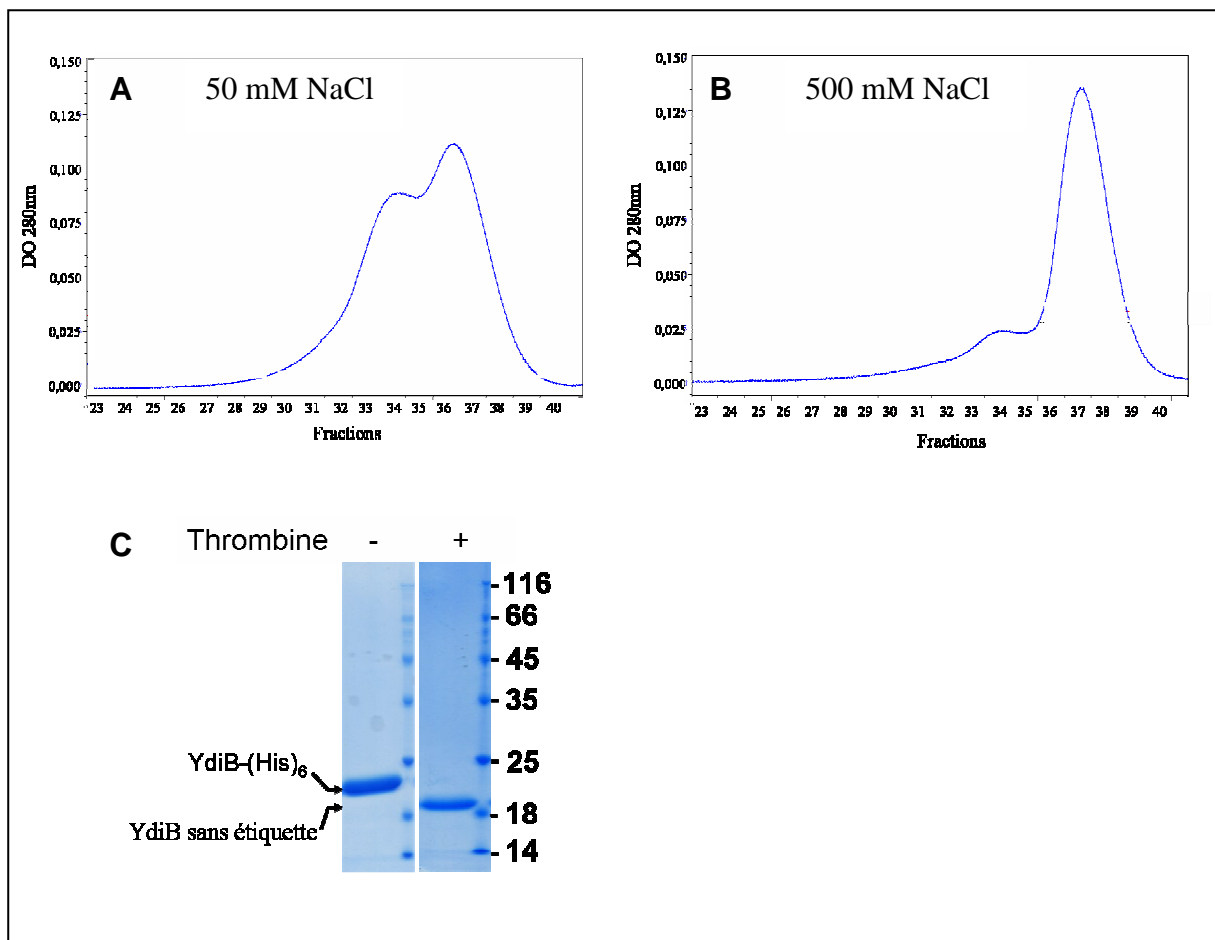


Figure 42 : Effet des sels sur l'oligomérisation de YdiB sans étiquette polyhistidines. Après traitement de la protéine à la thrombine, puis incubation avec de la résine de Nickel-agarose, la suspension a été centrifugée et le surnageant récupéré. Cette étape a permis d'éliminer toute protéine non clivée et tout tag résiduel. La protéine clivée a ensuite été incubée en présence d'un tampon Hepes/KOH 50 mM contenant 50 ou 500 mM de chlorure de sodium, puis a été injectée sur une colonne Superdex 200 équilibrée dans le tampon d'incubation de la protéine. Les figures **A** et **B** montrent le profil d'élution de la protéine après clivage par la thrombine dans un tampon pauvre ou riche en sels, respectivement. **C**. Un échantillon de la fraction monomérique a été déposé sur gel SDS/PAGE. La comparaison avec la migration d'une fraction monomérique non traitée préalablement par la thrombine confirme que le clivage a eu lieu. La taille (en kDa) et la position des marqueurs de poids moléculaires sont indiquées sur la droite. Les flèches indiquent les positions relatives de YdiB avec ou sans étiquette polyhistidines.

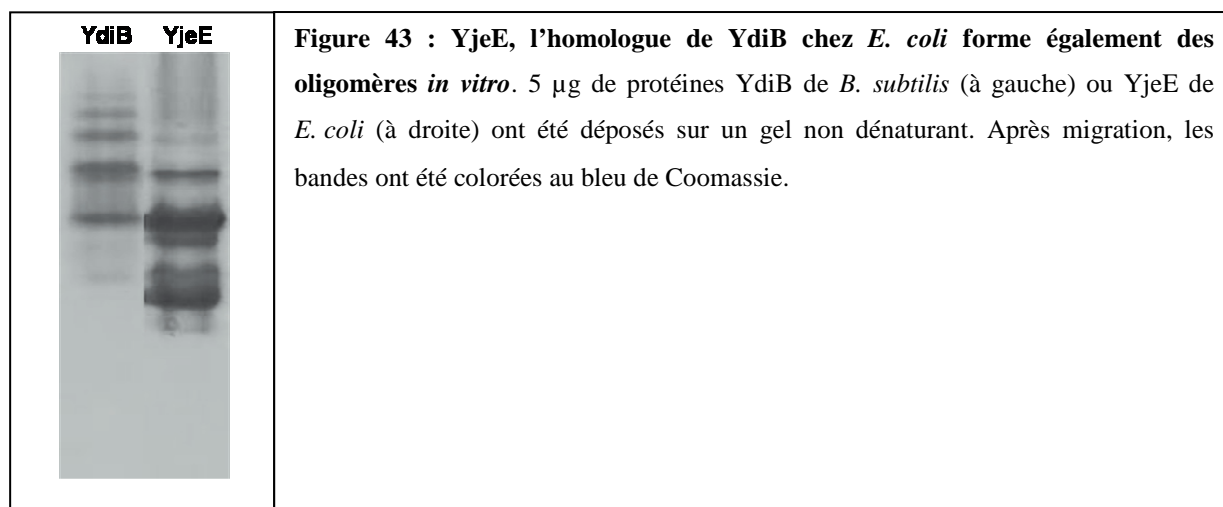
Globalement, tous ces résultats soulignent l'importance de la force ionique sur la structure quaternaire de YdiB. Le chlorure de sodium induit la dissociation de la protéine d'une manière concentration-dépendante, ce qui suggère que les interactions à l'interface du dimère sont plutôt de nature électrostatique.

IV- YjeE, L'HOMOLOGUE DE YdiB CHEZ E. COLI, FORME ÉGALEMENT DES MULTIMÈRES IN VITRO

Afin de savoir si l'oligomérisation est une caractéristique unique de YdiB chez *B. subtilis*, ou si au contraire, c'est une propriété partagée par ses homologues chez d'autres espèces bactériennes, YjeE d'*E. coli* a été purifiée par un membre du laboratoire de Eric Brown, selon le protocole développé dans leur équipe (Allali-Hassani et al., 2004).

Une aliquote de la protéine purifiée ($\approx 5 \mu\text{g}$) a été déposée sur un gel non dénaturant. Après coloration au bleu de coomassie, le profil de migration observé est semblable à celui de YdiB (figure 43). Par ailleurs, toutes les bandes sont reconnues par des anticorps anti-YjeE, prouvant que ce ne sont pas des contaminants, ni des produits de dégradation puisqu'une bande unique est détectée sur un gel dénaturant.

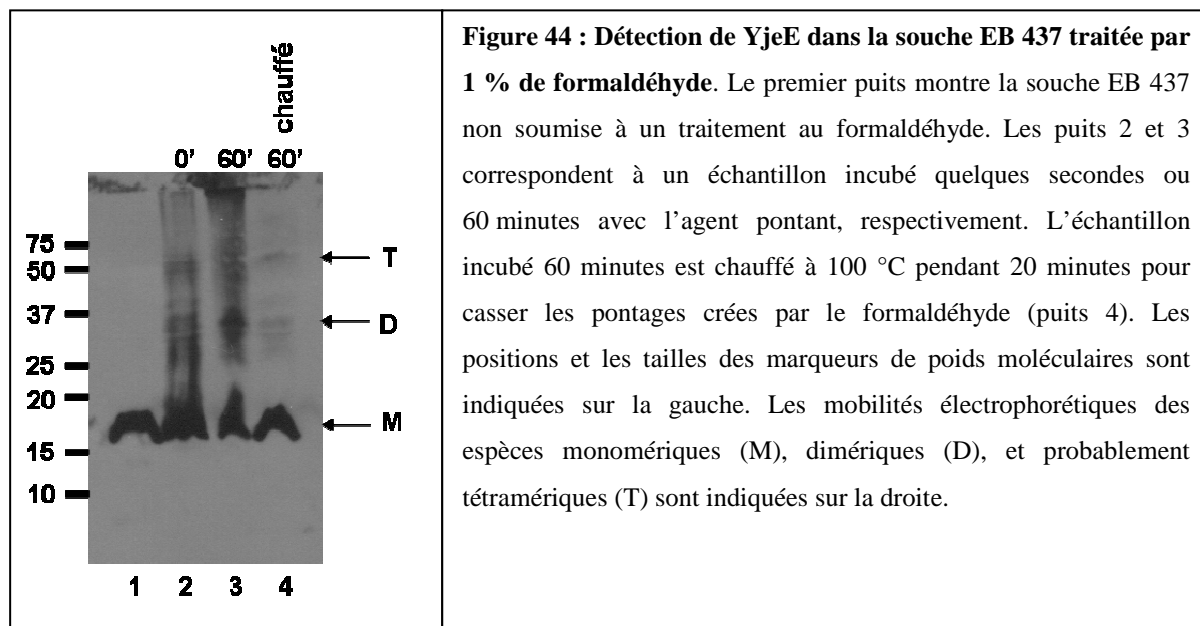
Il est cependant important de noter que les profils de migration des deux protéines ne peuvent pas être directement comparés puisque la migration ne dépend pas de la taille de la protéine mais plutôt de sa forme et de sa densité de charge (Betts et al., 1999).



V- MULTIMERISATION IN VIVO

Pour déterminer si cette classe de protéines est capable de former des multimères *in vivo*, une approche de « cross-linking » au formaldéhyde a été utilisée. Cette petite molécule réactive, capable de ponter deux protéines proches dans l'espace, peut être utilisée sur des cellules intactes afin de mettre en évidence des interactions *in vivo* (Peters and Richards, 1977). Par ailleurs, les liaisons formées par le formaldéhyde sont facilement réversibles puisqu'elles peuvent être rompues en chauffant l'échantillon.

Cette expérience a été réalisée avec la souche d'*E. coli* EB 437 qui possède une seconde copie du gène *yjeE* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. La figure 44 montre les résultats obtenus avec des cellules exprimant YjeE, et traitées par 1 % de formaldéhyde pendant des temps variables. Comme attendu, tous les échantillons révèlent la présence de YjeE qui migre à une masse moléculaire apparente de 17 kDa environ, et cette bande seulement est révélée dans le contrôle sans formaldéhyde (puits 1). Une bande additionnelle, d'une masse apparente de \approx 35 kDa, correspondant approximativement à la taille d'un dimère de YjeE, est détectée immédiatement après l'addition de formaldéhyde, et son intensité augmente après une heure d'incubation (puits 2 et 3). Cette bande disparaît quasiment totalement après chauffage à 100 °C pendant 20 minutes (puits 4), ce qui indique que le pontage est dû spécifiquement au formaldéhyde. Une espèce minoritaire, d'une masse moléculaire d'environ 60 kDa, correspondant probablement à un tétramère, est également détectée immédiatement après l'addition de formaldéhyde, mais semble s'estomper après une heure d'incubation (puits 3). Cependant, de façon surprenante, une bande de masse moléculaire très grande, incapable de pénétrer dans le gel, est détectée après une heure d'incubation avec l'agent pontant, et disparaît après chauffage à 100 °C (puits 3 et 4). Ceci pourrait correspondre à un multimère de YjeE de très haut poids moléculaire révélé uniquement après une longue incubation avec le formaldéhyde. Si c'est le cas, il est possible qu'immédiatement après addition de formaldéhyde, des tétramères appartenant à des complexes multimériques plus larges soient pontés mais qu'après une heure d'incubation, des pontages additionnels conduisent à la disparition du tétramère et à l'apparition concomitante d'espèces de plus haut poids moléculaires. Par ailleurs, les « smear » observés dans les puits 2 et 3 correspondent vraisemblablement à des oligomères pontés plus d'une fois, ce qui altère la migration sur un gel SDS/PAGE.



VI- ACTIVITES ATPase DE LA SOUCHE SAUVAGE

VI-A. Caractérisation de l'activité ATPase des espèces monomériques et multimériques

De précédentes études ont montré que deux des homologues de YdiB, YjeE de *H. influenzae* et de *E. coli*, étaient dotés d'une très faible activité ATPase (Allali-Hassani et al., 2004; Teplyakov et al., 2002). Par conséquent, nous avons cherché à savoir si YdiB possédait également une activité ATPase, et compte tenu de son habilité à s'oligomériser, nous avons tenté de comprendre comment ce processus pouvait affecter son activité enzymatique. Pour cela, une forte concentration saline a été utilisée pendant l'étape de chromatographie d'exclusion afin de séparer les deux pics de façon optimale. L'activité ATPase des deux fractions a immédiatement été testée à l'aide d'un système plurienzymatique couplé qui régénère l'ATP et aboutit à l'oxydation du NADH. La figure 45 indique que la vitesse d'hydrolyse de l'ATP par la fraction monomérique est environ trois fois plus élevée que celle de la fraction multimérique. En effet, l'activité de la fraction monomérique s'élève à 11 nmol d'ATP hydrolysé/min/mg de protéine alors que l'activité de la fraction multimérique est d'environ 3,5 nmol d'ATP hydrolysé/min/mg de protéine.

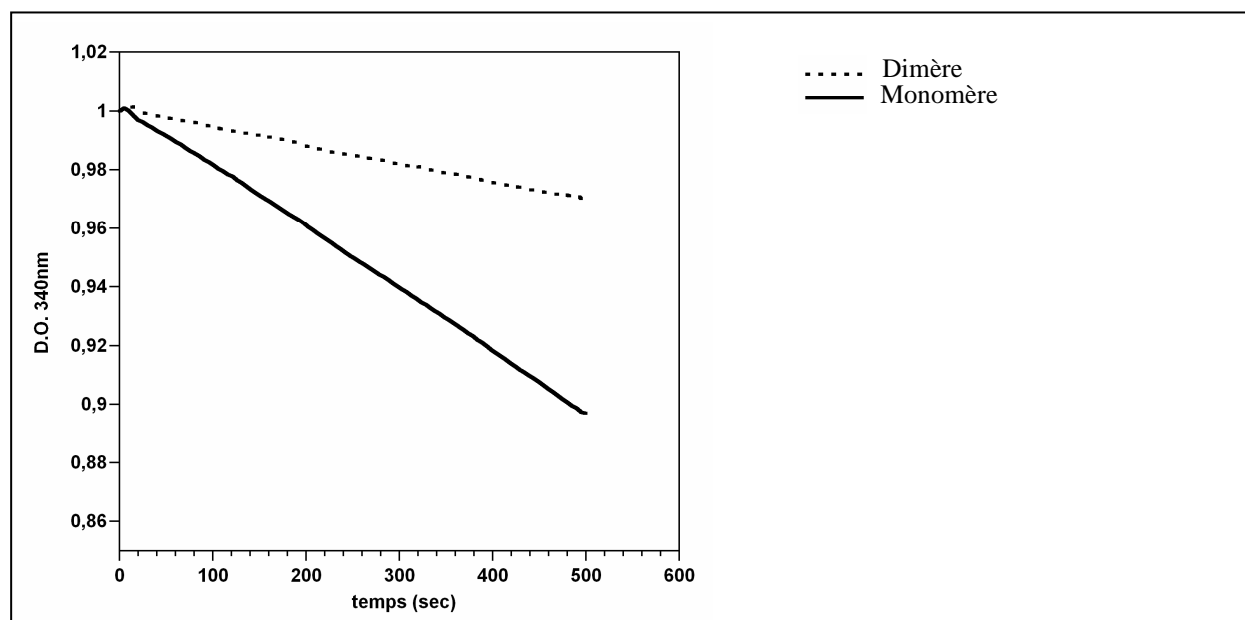
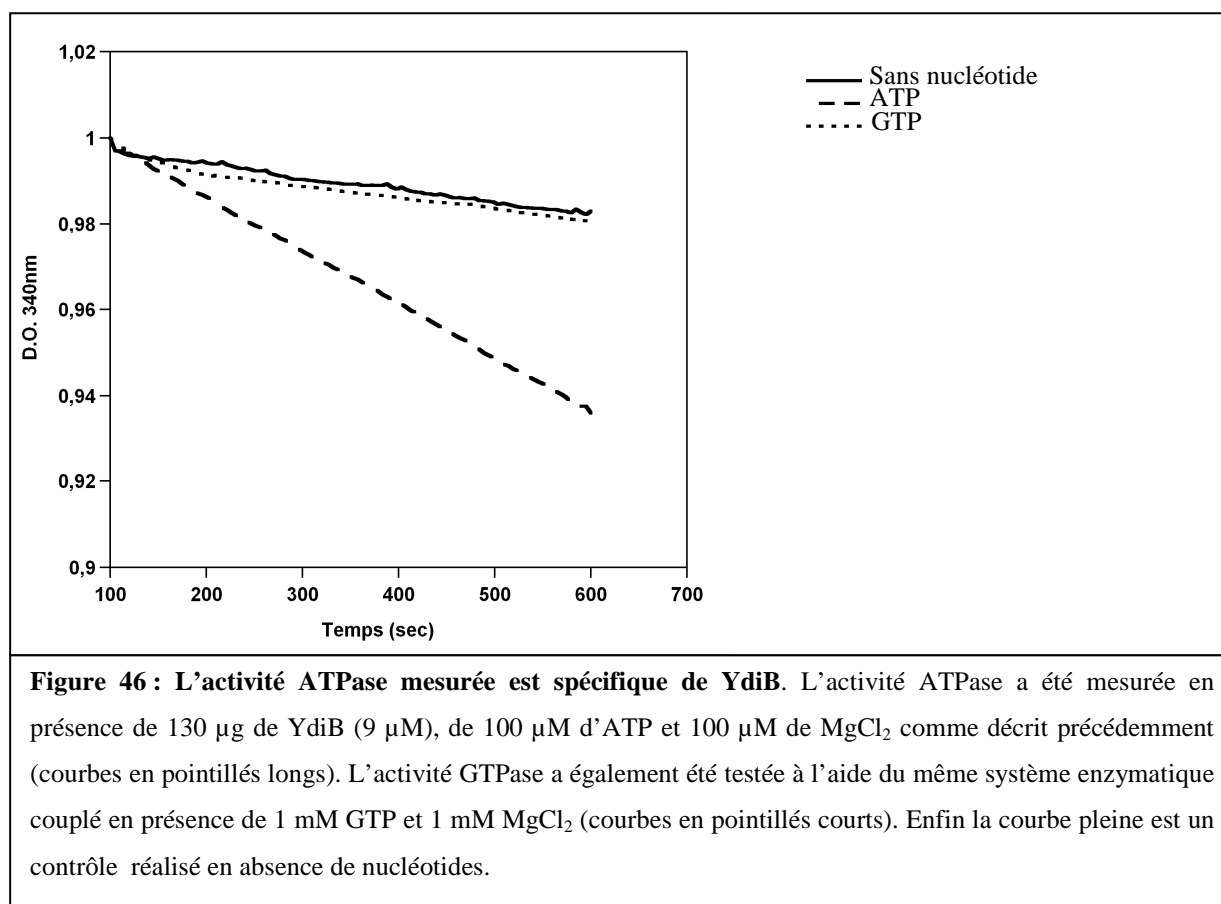


Figure 45 : Comparaison de l'activité ATPase des fractions monomériques et multimériques de YdiB. Les fractions monomériques et dimériques/oligomériques ont été séparées par chromatographie d'exclusion comme décrit dans la figure 36 en présence de 500 mM NaCl, puis l'activité enzymatique de chaque fraction (130 µg de protéine par essai, soit 9 µM de protéine) a immédiatement été déterminée en présence de 5 mM d'ATP et de 6 mM de MgCl₂. Les activités de la fraction monomérique (courbe pleine) et multimérique (courbe en pointillés) ont été mesurées à l'aide d'un système plurienzymatique couplé en suivant la disparition du NADH à 340 nm.

Il est important de noter que cette différence entre les deux fractions est une valeur moyenne puisque nous ne pouvons pas empêcher l'inter-conversion rapide des oligomères en monomères après gel filtration, et inversement. D'ailleurs, lorsque l'activité ATPase de la fraction oligomérique a été mesurée à différents temps après l'étape de gel filtration, une augmentation progressive de l'activité a été observée. Jusqu'à présent, nous n'avons pas été capable de nous affranchir de ce phénomène, quelles que soit les conditions utilisées (température, nature des sels, tampons...). D'un autre côté, l'activité ATPase de la fraction monomérique semble beaucoup plus stable dans le temps mais les résultats d'ultracentrifugation analytique indiquent que même dans des conditions salines élevées, la proportion de monomères ne représente pas plus de 60 % de la population totale (figure 41). Puisque l'activité enzymatique des fractions multimériques n'est pas stable dans le temps, nous nous sommes focalisés sur l'activité du monomère. A une concentration de 5 mM d'ATP et 5 mM de MgCl₂, l'activité est d'environ 11 nmol d'ATP hydrolysé/min/mg de protéine (10 h⁻¹), ce qui est faible mais en accord avec l'activité ATPase de l'homologue de YdiB chez *E. coli* (12 h⁻¹ ; (Allali-Hassani et al., 2004)) ou chez *H. influenzae* (25 h⁻¹ ou 1,2 h⁻¹ selon les auteurs ; (Allali-Hassani et al., 2004; Teplyakov et al., 2002)).

Pour exclure la possibilité que la faible activité ATPase soit due à un contaminant, des contrôles ont été réalisés. Dans un premier temps, un essai en présence de 1 mM de GTP à la place de 1 mM d'ATP, a donné un taux d'hydrolyse très faible similaire à l'essai sans nucléotide (figure 46). Ceci démontre que l'activité mesurée en présence de YdiB n'est pas due à une GTPase qui posséderait une activité ATPase résiduelle, ni à un contaminant indétectable sur gel dénaturant coloré au bleu de commassie portant une activité NADH déshydrogénase. Cependant, le meilleur contrôle est de construire un mutant du site actif dépourvu d'activité ATPase, ce qui a été réalisé par la suite (voir chapitre VII-D).



VI-B. Effet des sels sur l'activité enzymatique

L'activité enzymatique d'un échantillon, composé d'un mélange de monomères et d'oligomères, a été mesurée dans différentes conditions salines. Pour cela, nous avons utilisé la protéine avant l'étape de chromatographie d'exclusion.

La protéine précipitée dans le sulfate d'ammonium a été centrifugée, puis le culot a été repris dans du tampon Hepes/KOH 50mM pH 7,5. La suspension a alors été de nouveau centrifugée puis dessalée afin d'éliminer toute trace résiduelle de sulfate d'ammonium. La solution protéique a ensuite été séparée en deux tubes : la concentration en NaCl du premier tube a été ajustée à 50 mM et celle du second tube à 500 mM. L'activité ATPase des deux échantillons a ensuite été mesurée, et comme le montre la figure 47, celle de l'échantillon incubé dans 500 mM NaCl est plus élevée. Ceci signifie qu'un équilibre vers le monomère s'est probablement produit, se traduisant ainsi par une augmentation de l'activité catalytique. Cette expérience a été répétée plusieurs fois, et chaque fois une activité plus grande est observée dans 500 mM NaCl. Cependant, le rapport entre les deux activités est très variable,

dépendant certainement des proportions initiales de monomères et de multimères dans la solution et du temps d'incubation avant mesure de l'activité.

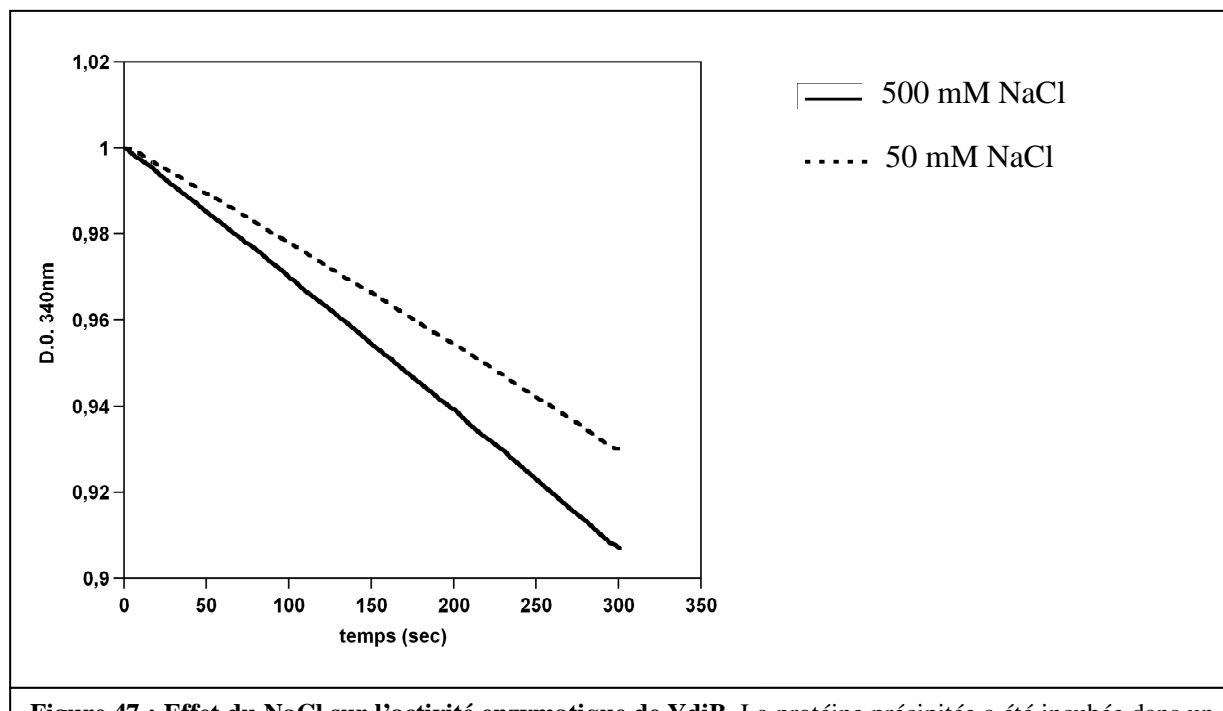
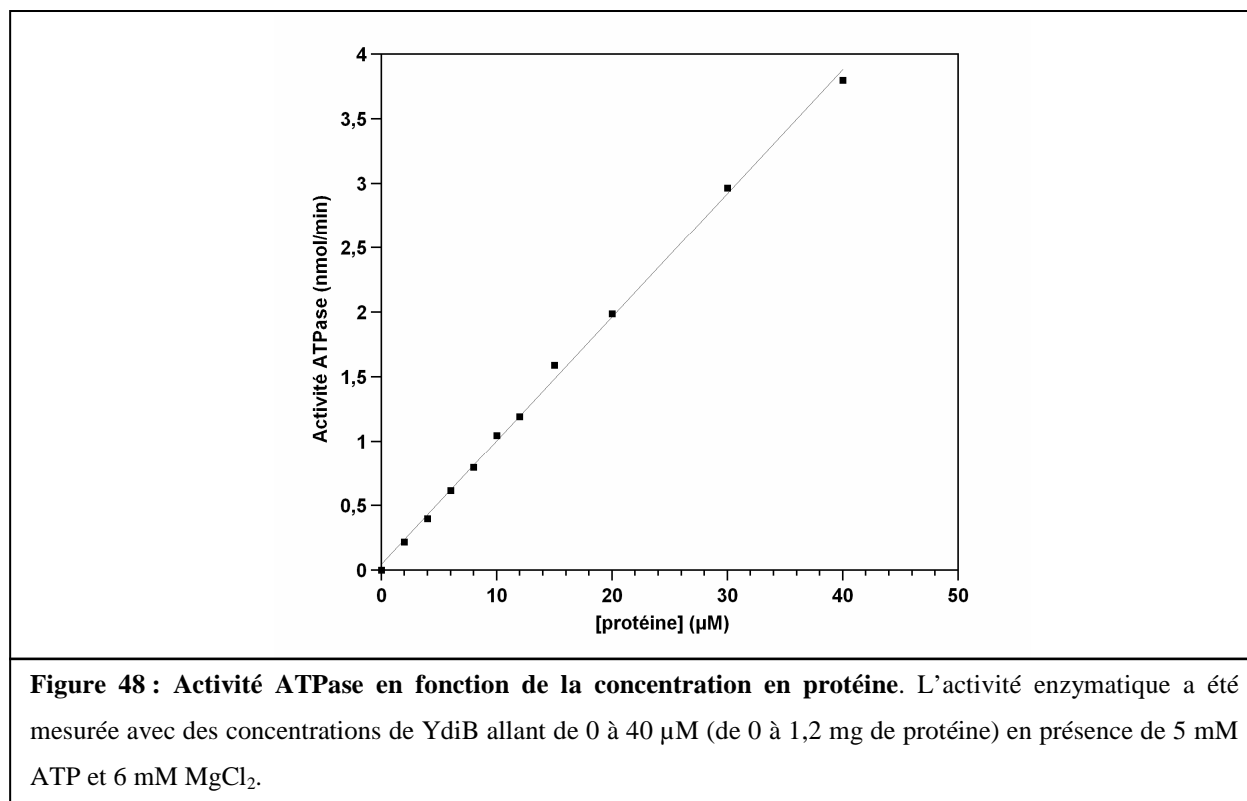


Figure 47 : Effet du NaCl sur l'activité enzymatique de YdiB. La protéine précipitée a été incubée dans un tampon contenant 50 mM NaCl ou 500 mM NaCl, puis son activité enzymatique a été testée. Lorsqu'elle est incubée dans 500 mM NaCl (courbe pleine), l'activité mesurée est d'environ 7,5 nmol d'ATP hydrolysé/mn/mg de protéine alors que, incubée dans 50 mM NaCl (courbe en pointillés), l'activité mesurée est d'environ 5,5 nmol d'ATP hydrolysé/mn/mg de protéine.

Il est important de noter que cet effet n'est pas spécifique du NaCl puisqu'il est également observé avec le KCl.

VI-C. Dépendance de la concentration en protéine

L'activité ATPase a par la suite été analysée en fonction de la concentration de protéine. Dans les conditions utilisées, l'hydrolyse de l'ATP par YdiB dépend linéairement de la concentration en protéine, autrement dit, l'activité ATPase est indépendante de la concentration protéique, suggérant que les proportions de monomères et d'oligomères sont les mêmes à chaque mesure. Les concentrations utilisées dans cet essai n'influencent donc pas l'état d'oligomérisation de YdiB (figure 48).



VI-D. Dépendance de la concentration en ATP

L'activité ATPase de la fraction monomérique a alors été étudiée en fonction de la concentration en ATP, et les résultats sont reportés dans la figure 49A. Les points expérimentaux ont été modélisés à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten. Elle permet de calculer les caractéristiques d'une enzyme ne fixant qu'une molécule de substrat par molécule d'enzyme, dite Michaelienne pour cette raison (en opposition avec une enzyme allostérique).

L'équation décrivant la vitesse de réaction enzymatique est la suivante :

$$V_i = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

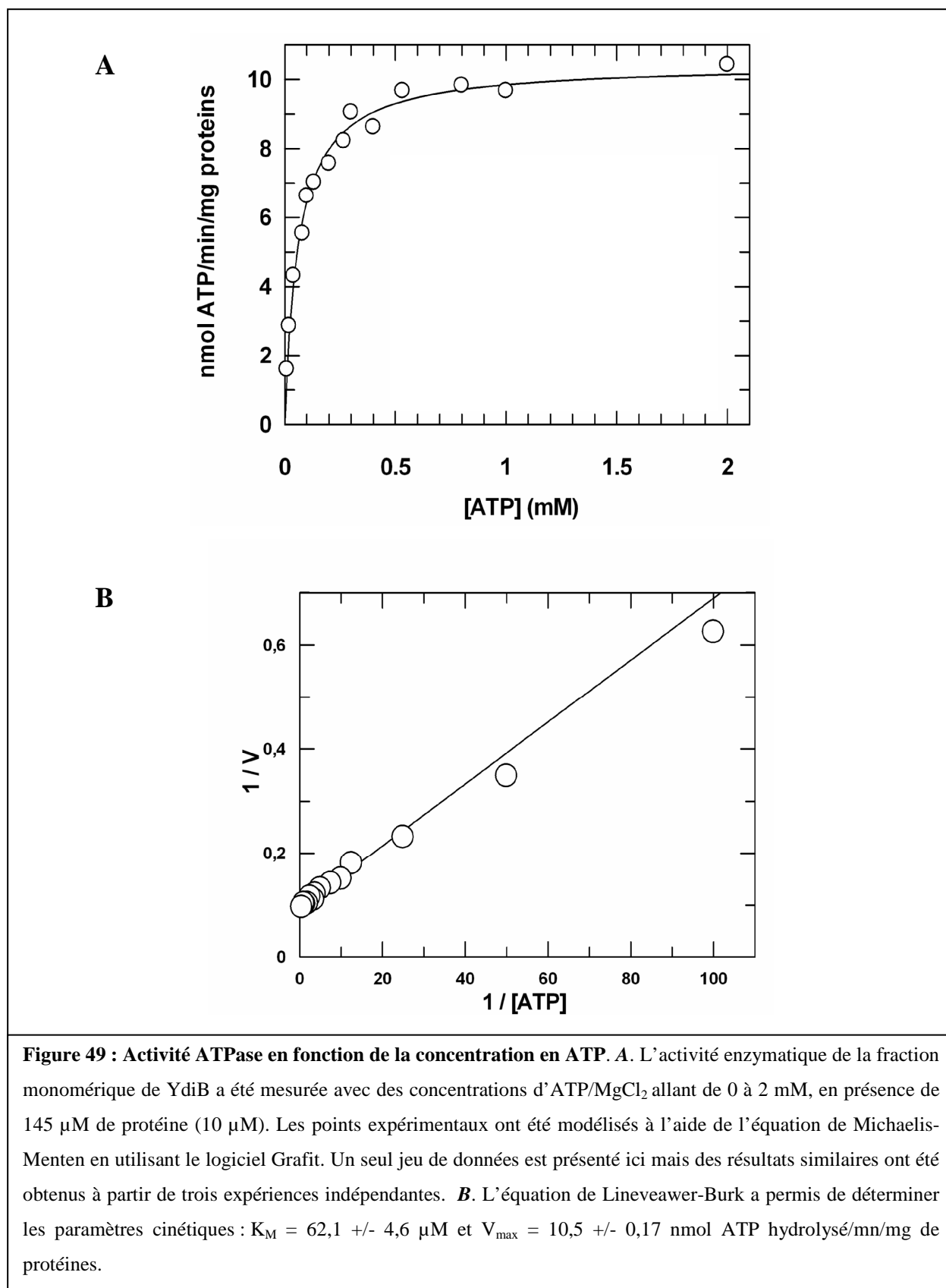
Avec :

- V_i : Vitesse initiale (c'est-à-dire en absence de produit) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat (en mol/mn)
- V_{\max} : Vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat (en mol/mn)
- $[S]$: Concentration en substrat (en mol/L)
- K_M : Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme. C'est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié du V_{\max} (en mol/L).

Graphiquement, l'équation de Michaelis est une hyperbole. En pratique, on détermine les constantes de l'enzyme K_M et V_{\max} par la représentation en double inverses (représentation de Lineweaver et Burk) qui est une droite d'équation (figure 49B) :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Les valeurs des paramètres cinétiques de YdiB, K_M et V_{\max} , déterminées à partir de la courbe théorique, sont de 62,1 +/- 4,6 μM et 10,5 +/- 0,17 nmol d'ATP hydrolysé/mn/mg de protéine (10h^{-1}), respectivement. Aucune coopérativité n'est observée avec des concentrations croissantes d'ATP.



VII- ETUDES DES MUTANTS

VII-A. Le choix des mutations

La structure tridimensionnelle de l'orthologue de YdiB chez *H. influenzae* (Teplyakov et al., 2002) a permis de proposer un rôle pour certains résidus hautement conservés dans la fixation de l'ATP et dans son hydrolyse (voir chapitre III-C-1-b dans la partie « Rappels bibliographiques »). Afin d'étudier plus en détail le rôle fonctionnel de quatre de ces résidus, des mutants ont été construits (tableau 10). Une altération significative de l'activité enzymatique d'autres protéines qui hydrolysent l'ATP a été observée lors de mutations de résidus similaires (Deyrup et al., 1998; Sato et al., 1996; Zhou and Rosen, 1999).

Résidu muté	Ce que l'on sait sur ce résidu	Résidu le remplaçant
Lysine 41	Cette lysine, hautement conservée, du motif A de Walker interagit généralement avec les groupements phosphates β et γ du nucléotide, ce qui permet de neutraliser les charges négatives du phosphate. De plus, elle forme des liaisons hydrogènes avec les carbonyles de la chaîne principale, stabilisant ainsi la P-loop.	Alanine ou arginine
Thréonine 42	Cette thréonine du motif A de Walker suit la lysine conservée, et interagit avec le magnésium via son groupement hydroxyle. Selon les protéines à P-loop, une thréonine ou une sérine peut être trouvée à cet endroit.	Sérine
Aspartate 80	Cet aspartate, présent dans le brin β_3 , lie le magnésium par l'intermédiaire d'une molécule d'eau.	Alanine
Glutamate 106	Ce glutamate, présent dans le brin β_4 , lie le magnésium directement. Dans la structure de YjeE, il est à proximité du phosphate β de l'ADP.	Alanine ou aspartate

Tableau 10 : Choix des mutants du site actif.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I-B-1 dans la partie « Rappels bibliographiques », la liaison du magnésium est renforcée par le carboxylate d'un aspartate, ou plus rarement d'un glutamate, du motif B de Walker présent dans le brin β_3 , selon la nomenclature définie par Aravind et ses collègues (Leipe et al., 2003). Ce résidu peut lier le métal directement ou à travers une molécule d'eau, et dans certaines protéines, il est suivi par un résidu glutamate qui pourrait agir comme une simple base dans la catalyse (voir chapitre I-B-2-b dans la partie « Rappels bibliographiques »).

Deux acides aminés acides sont conservés dans le site actif de YdiB : l'aspartate 80 et le glutamate 106. Tous deux lient le magnésium, et sont des résidus potentiels du motif B de Walker.

D'après la structure de YjeE, la probabilité pour que le glutamate 106 interagisse avec une molécule d'eau nucléophile capable d'attaquer le phosphate γ est faible. En revanche, l'aspartate interagit directement avec une molécule d'eau qui pourrait agir comme nucléophile lors de la catalyse. Ceci suggère que le glutamate serait le résidu acide du motif B de Walker, alors que l'aspartate serait plutôt le résidu catalytique.

Cependant, le motif B de Walker se trouve généralement dans le brin $\beta 3$ des protéines à P-loop, et le glutamate 106 se trouve dans le brin $\beta 4$, ce qui semble contredire la première hypothèse. Il a alors été proposé que YdiB serait plus proche des GTPases que des ATPases (Teplyakov et al., 2002). En effet, chez les ATPases et chez YdiB, le brin $\beta 4$ se situe entre les brins $\beta 1$ et $\beta 3$ contenant les motifs A et B de Walker alors que chez les GTPases, les brins $\beta 1$ et $\beta 3$ contenant les deux motifs sont adjacents. Si le glutamate du brin $\beta 4$ appartient au motif B de Walker chez YdiB, alors les deux brins contenant les motifs conservés sont adjacents, comme chez les GTPases. Le cas de ces deux résidus acides reste ainsi l'objet d'un débat de nos jours.

VII-B. Clonage, expression et purification des mutants

Ces mutants ont été construits à l'aide du kit de mutagenèse selon le protocole décrit dans le chapitre I-B-9 dans la partie « Matériels et méthodes ». L'ADN matrice utilisé est le vecteur pET15b-YdiB.

Tous ces mutants ont été purifiés, avec un rendement similaire à celui de la protéine sauvage, mais dans des conditions parfois différentes, indiquées dans le tableau 11.

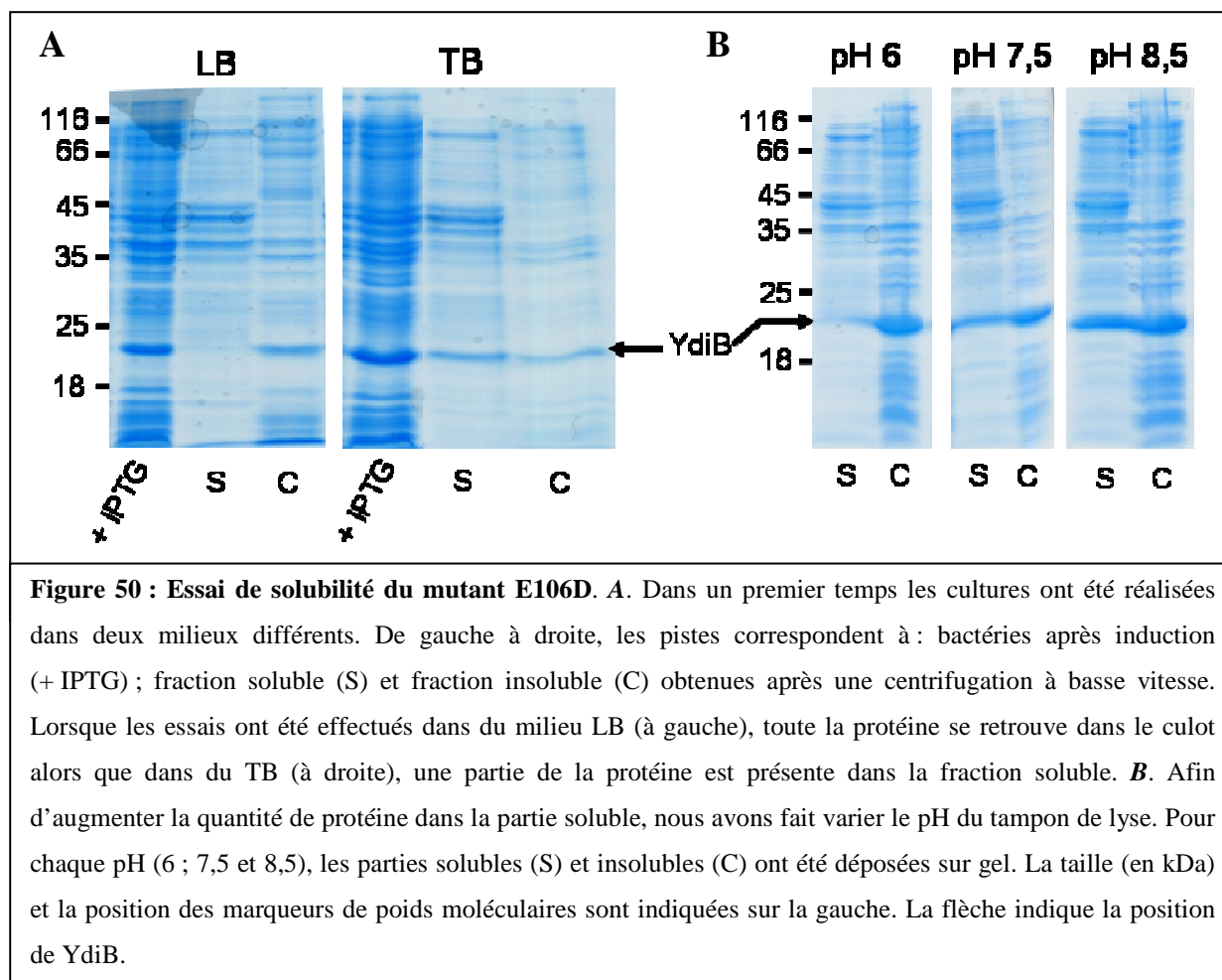
Protéines	milieu de culture	D.O. d'induction	Temps et température d'induction	pH des tampons de purification
sauvage	LB	0,6	4 h à 37°C	pH 7,5
K41A	TB	1,2	25 °C toute la nuit	pH 7,5
K41R	TB	1,2	25 °C toute la nuit	pH 7,5
T42S	LB	0,6	4 h à 37 °C	pH 7,5
D80A	LB	0,6	4 h à 37 °C	pH 7,5
E106A	LB	0,6	25 °C toute la nuit	pH 8,5
E106D	TB	1,2	25 °C toute la nuit	pH 8,5

Tableau 11 : Conditions optimales de surexpression et de solubilité des protéines sauvage et mutantes de YdiB. Les paramètres suivants ont été étudiés : milieu de culture, D.O. d'induction, temps et température d'induction, et pH des tampons. Pour chaque souche, les conditions optimales sont indiquées.

La mise au point de la solubilité du mutant E106D est présentée dans la figure 51. Pour chaque condition, une analyse sur gel SDS/PAGE des fractions soluble et non soluble est réalisée.

Le mutant est insoluble lorsque la culture est faite dans du milieu LB alors qu'une partie de la protéine est retrouvée dans la fraction soluble lorsque la culture est réalisée dans du milieu TB (figure 50A), le TB étant un milieu beaucoup plus riche (voir chapitre I-A-3 dans la partie « Matériels et méthodes »). De plus, la proportion en protéines solubles est augmentée lorsque le pH du tampon de lyse est plus élevé (pH 8,5) (figure 50B). Par ailleurs, un meilleur rendement a été obtenu lorsque les inductions ont été effectuées à 25 °C au lieu de 37 °C (résultat non montré).

Une mise au point similaire a été réalisée pour chacun des mutants.



VII-C. Oligomérisation des mutants

Le profil en sortie de chromatographie d'exclusion de chacun des mutants a été étudié. Les deux mutants de la lysine 41 et le mutant de la thréonine 42 se comportent apparemment de la même façon que la protéine sauvage en présence de 500 mM de NaCl, avec une proportion de monomère majoritaire comparée à la proportion de dimères et multimères (figure 51) Par ailleurs, la sensibilité aux sels est gardée (résultats non montrés). Curieusement, le mutant de l'aspartate 80, et les deux mutants du glutamate 106 (résultat montré seulement pour le mutant E106A) se comportent totalement différemment. En effet, même en présence d'une forte concentration saline, l'oligomérisation est très forte et la proportion de monomère est minoritaire, voir quasiment nulle (figure 51). Ainsi, la sensibilité aux sels est quasiment perdue puisque les profils sont semblables lorsque l'expérience est réalisée dans 50 mM NaCl (résultat non montré).

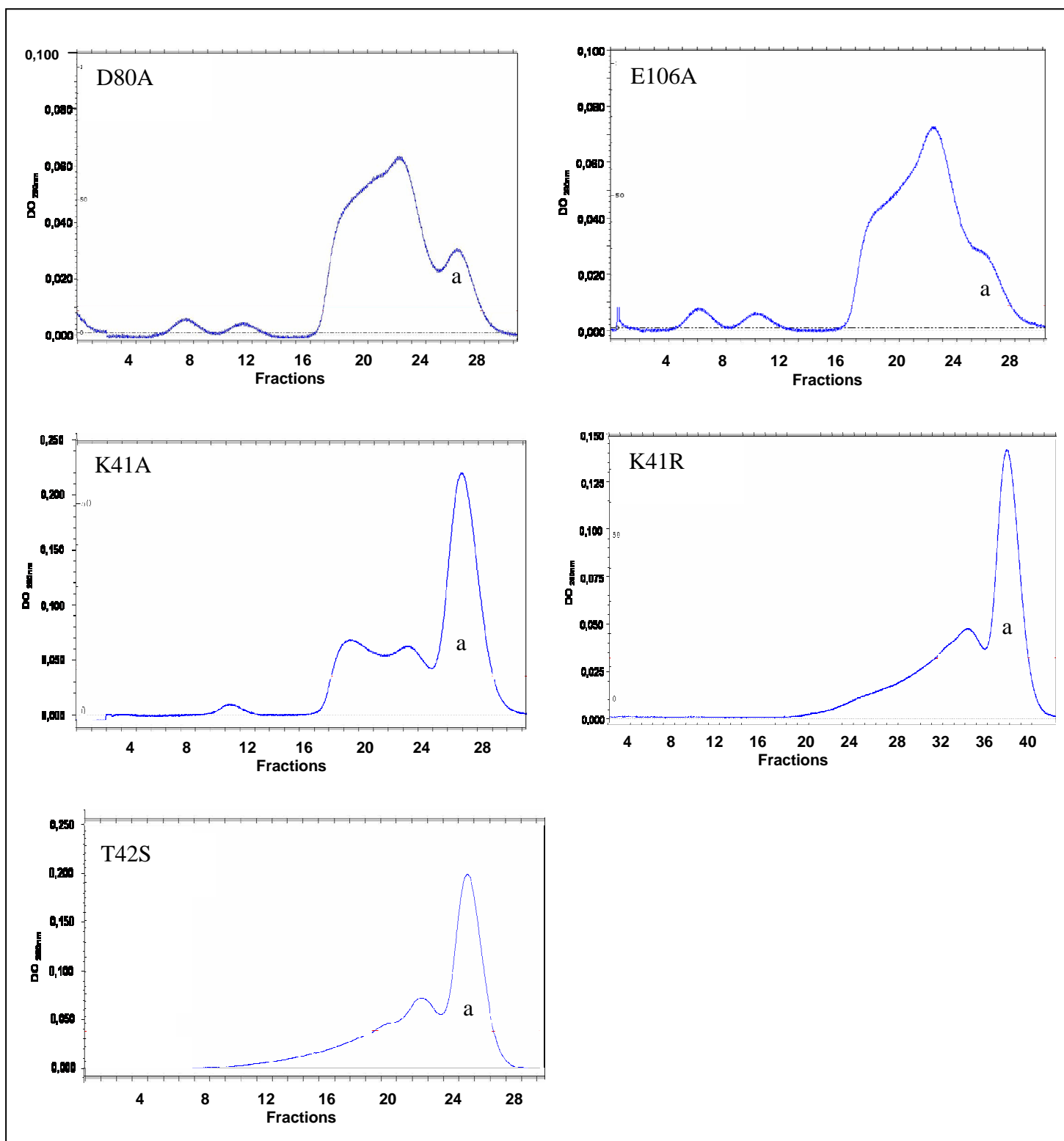


Figure 51 : Oligomérisation des mutants. Les différentes espèces oligomériques ont été séparées par chromatographie d'exclusion sur une colonne Superdex 75 dans le cas des mutants YdiB D80A, E106A, K41A et T42S ou sur une colonne Superdex 200 dans le cas du mutant K41R. La colonne a été équilibrée dans un tampon Hepes/KOH 50 mM pH 7,5 et NaCl 500 mM. Le pic *a* correspond au monomère de YdiB alors que le reste correspond à un mélange de dimères et d'oligomères de plus haut poids moléculaires de YdiB.

Ces deux résidus acides pourraient être situés proches de l'interface de dimérisation, et une perturbation de la charge négative locale affecterait fortement l'oligomérisation. Ce scénario suggère encore que des interactions de nature électrostatique sont mises en jeu à l'interface du multimère.

VII-D. Activité enzymatique des mutants

Après chromatographie d'exclusion dans 500 mM NaCl, les fractions monomériques des mutants K41A, K41R, T42S et D80A ont été récupérées et leur activité ATPase a été mesurée. Pour les deux mutants du glutamate 106, aucune mesure n'a pu être effectuée puisque la fraction monomérique est résiduelle en sortie de chromatographie (figure 51). L'activité a été mesurée en présence de 100 μ M d'ATP et 100 μ M de magnésium ou en présence de 5 mM d'ATP et 5 mM de magnésium, et les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Protéines	Activité ATPase (nmol/mn/mg)	
	100 μ M ATP	5 mM ATP
Sauvage	5,2	11,3
K41A	0,1	1,7
K41R	0,5	2,3
T42S	0,4	6,1
D80A	0,3	4,8

Tableau 12 : Activités ATPases de la protéine sauvage et des différents mutants. Les activités spécifiques de chacune des protéines ont été mesurées selon l'équation décrite dans le paragraphe III dans la partie « Matériels et méthodes », et à deux concentrations d'ATP : 100 μ M ou 5 mM.

Comme l'illustre le tableau 12, en présence de 100 μ M d'ATP, l'activité enzymatique de chaque mutant est quasiment nulle.

- Mutant de la lysine 41

La lysine du motif A de Walker (ou P-loop) est un résidu très conservé parmi les ATPases et GTPases (Leipe et al., 2002) dont la mutation en différents résidus abolit généralement toute activité hydrolytique (Deyrup et al., 1998; Schneider and Hunke, 1998).

Dans notre cas, l'activité du mutant K41A est quasiment nulle en présence de 100 μ M d'ATP et très faible en présence de 5 mM d'ATP, ce qui confirme l'importance de ce résidu. Par ailleurs, ce résultat nous permet de confirmer que la faible activité ATPase mesurée pour la protéine sauvage est bien due à YdiB, et pas à un contaminant présent dans la solution. Le mutant K41R présente, quant à lui, une activité ATPase plus élevée que le mutant K41A aussi bien à faible qu'à forte concentration en ATP mais son activité demeure très fortement affectée.

- Mutant de la thréonine 42

L'activité de ce mutant est quasiment nulle en présence de 100 μ M d'ATP mais n'est pas du tout négligeable en présence de 5 mM d'ATP, ce qui suggère que la mutation jouerait sur l'affinité de la protéine pour l'ATP ou pour le magnésium.

- Mutant de l'aspartate 80 :

Comme pour le mutant T42S, le mutant D80A possède une activité non négligeable en présence de 5 mM d'ATP alors qu'elle est quasi-nulle à 100 μ M d'ATP, ce qui suggère également que la mutation affecte l'affinité de la protéine pour le nucléotide et/ou pour le magnésium. Par ailleurs, ce résultat laisse à penser que le résidu aspartate serait plutôt le résidu acide du motif B de Walker, puisque si ce résidu était le résidu catalytique, sa mutation devrait abolir toute activité enzymatique.

VII-E. Complémentation

VII-E-1. Description des souches

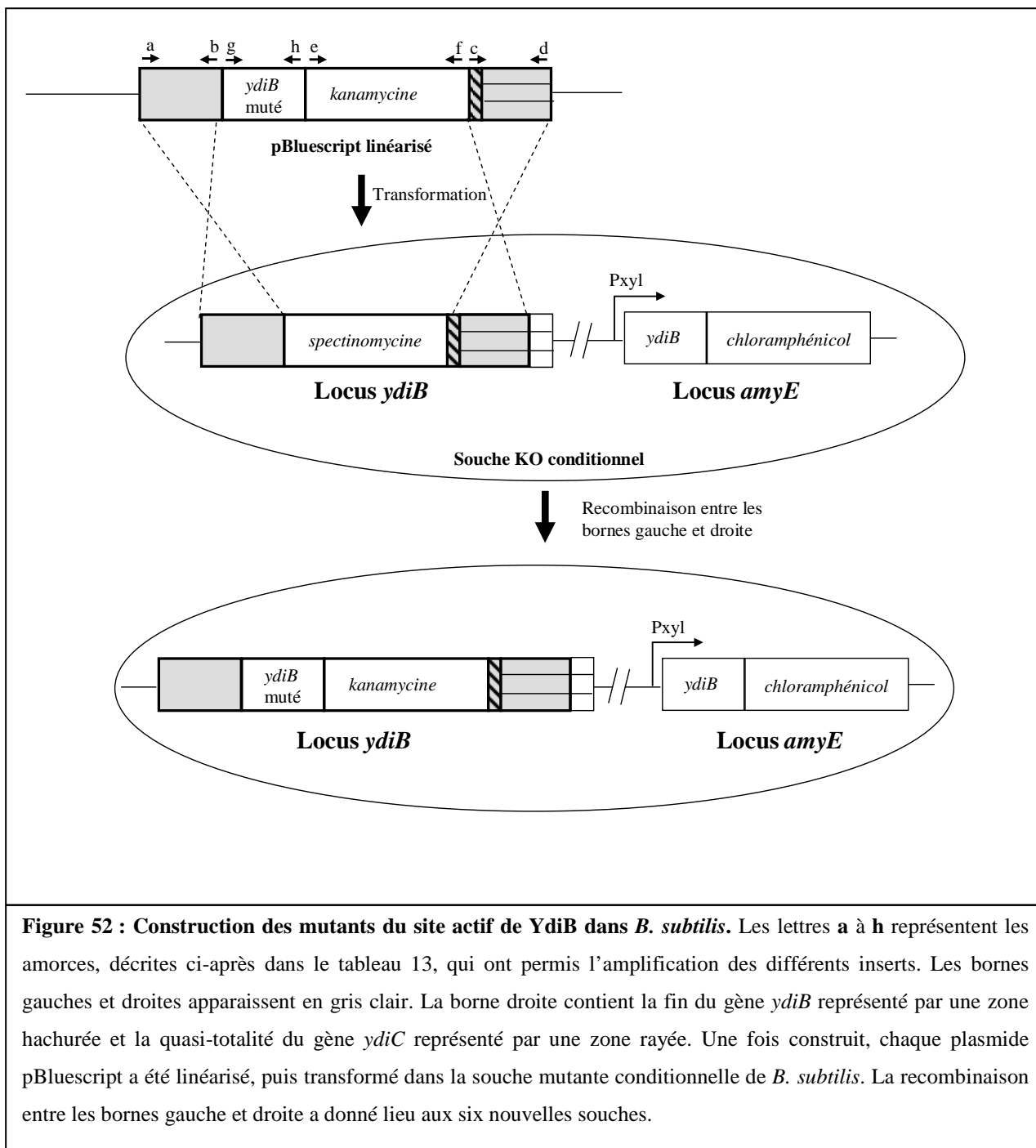
Afin de déterminer si ces mutants du site actif sont capables de croître normalement, de nouvelles souches ont été construites à partir du mutant conditionnel où la cassette de résistance à la spectinomycine a été remplacée par le gène de *ydiB* muté et fusionné à une cassette de résistance à la kanamycine.

VII-E-2. Construction des souches

Stratégie utilisée

Chaque gène *ydiB* muté (K41A, K41R, T42S, D80A, E106A, E106D) fusionné au gène de résistance à la kanamycine a été cloné dans le vecteur pBluescript. Les séquences présentes en amont et en aval de *ydiB* (bornes gauche et droite) ont également été insérées dans le vecteur de part et d'autre de la fusion. Le mutant conditionnel de *B. subtilis* a ensuite été transformé par le plasmide, et une sélection à la kanamycine a forcé la recombinaison entre les bornes gauche et droite. Les colonies résistantes à la kanamycine et au chloramphénicol ont alors été sélectionnées (figure 52).

Les oligonucléotides ont été choisis de façon à ce que *ydiB* soit en phase avec le cadre de lecture. Par ailleurs, l'ATG de *ydiC* se trouve à la fin de *ydiB* puisque les deux gènes se chevauchent. *ydiC* étant un gène essentiel chez *B. subtilis* (Hunt et al., 2006; Kobayashi et al., 2003), la fin du gène *ydiB* a été incluse dans la borne droite afin de ne pas empêcher l'expression de *ydiC* lors de la création du knock-out de *ydiB*. Il pourra ainsi être exprimé grâce au promoteur du gène de la kanamycine, d'où l'importance du sens d'insertion de la cassette.



Amplification des inserts

Les séquences en amont et en aval de *ydiB* (bornes gauche et droite) ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN chromosomique de *B. subtilis*.

Le gène de résistance à la kanamycine a été obtenu après amplification à partir du plasmide pUC19. Le gène a été amplifié avec son promoteur ainsi que son site de liaison aux ribosomes.

Enfin, chaque gène *ydiB* muté a été amplifié par PCR à partir de l'ADN des plasmides construits par mutagenèse dirigée : pET15-*ydiB* K41A, pET15-*ydiB* K41R, pET15-*ydiB* T42S, pET15-*ydiB* D80A, pET15-*ydiB* E106A, puis pET15-*ydiB* E106D.

Les amorces oligonucléotidiques utilisées sont indiquées dans le tableau 13. L'amplification a été réalisée grâce à la polymérase VENT selon le protocole décrit dans le chapitre I-B-2 dans la partie « Matériels et méthodes », permettant d'introduire des bouts francs aux extrémités 5' et 3' de chaque fragment d'ADN.

insert	ADN matrice	oligonucléotides	Sites de restriction introduits
Borne gauche	ADN génomique de <i>B. subtilis</i>	a. 5'-GGAAGGATCCATCGGTTCTTCTGCAGCAGGGC-3'	BamHI
		b. 5'-GCTCGCCCGGGCGTTTAAACGTCACCCGTC'TTATTAAAA'G-3'	SmaI, PmeI
Borne droite	ADN génomique de <i>B. subtilis</i>	c. 5'-GAGCGGGAAATTACCTTTACTG-3'	
		d. 5'-GGAAGGATCCCTAAAAACAAAACAGGGCGG-3'	BamIII
Cassette kanamycine	pUC 19	e. 5'-CTGGTATTTAAGGTTT TAGAATGC-3'	
		f. 5'-CTAAAACAATTCATCCAGTAAAAT-3'	
YdiB	pET-15b	g. 5'-ATGGTGAAGCAATTTAAAATGGAGA-3'	
		h. 5'-TCAATTGCTAATATTGTCATGTCT-3'	

Tableau 13 : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour la création des mutants. Les oligonucléotides sont nommés par des lettres de **a** à **h**. Les couples d'amorces **a/b**, **c/d**, **e/f** et **g/h** ont permis l'amplification de la borne gauche, de la borne droite, du gène de résistance à la kanamycine et du gène *ydiB* muté, respectivement. Les amorces sens sont représentées par les lettres **a**, **c**, **e**, et **g**, et les amorces anti sens par les lettres **b**, **d**, **f**, et **h**.

Chaque oligonucléotide possède au moins 20 bases pour permettre un appariement optimal avec l'ADN matrice. Les sites de restrictions apportés sont soulignés : BamHI (GGATTC), SmaI (GCCCCGGC), et PmeI (GTTTAAAC). Le codon STOP dans l'amorce anti-sens (h) de *ydiB* est représenté en gras.

Clonage des différents inserts dans le plasmide pBluescript

Après digestion du plasmide pBluescript par SmaI, enzyme présente dans le site de clonage du plasmide et capable de générer des bouts francs, la borne droite a été insérée. L'insertion de la borne va interrompre l'expression du peptide lacZ', empêchant les bactéries transformées par le plasmide de digérer le X-Gal, ajouté dans le milieu. Ainsi, en présence d'IPTG et du substrat artificiel, les bactéries blanches, c'est-à-dire possédant le plasmide avec la borne droite insérée, ont été facilement sélectionnées. Ensuite, le sens d'insertion de la borne a été vérifié par PCR.

Dans un second temps, le plasmide a été digéré par EcoRV, enzyme également présente dans le site de clonage du plasmide et capable de générer des bouts francs. La borne gauche a pu à son tour être insérée, puis sa présence et son sens d'insertion ont été vérifiés par PCR.

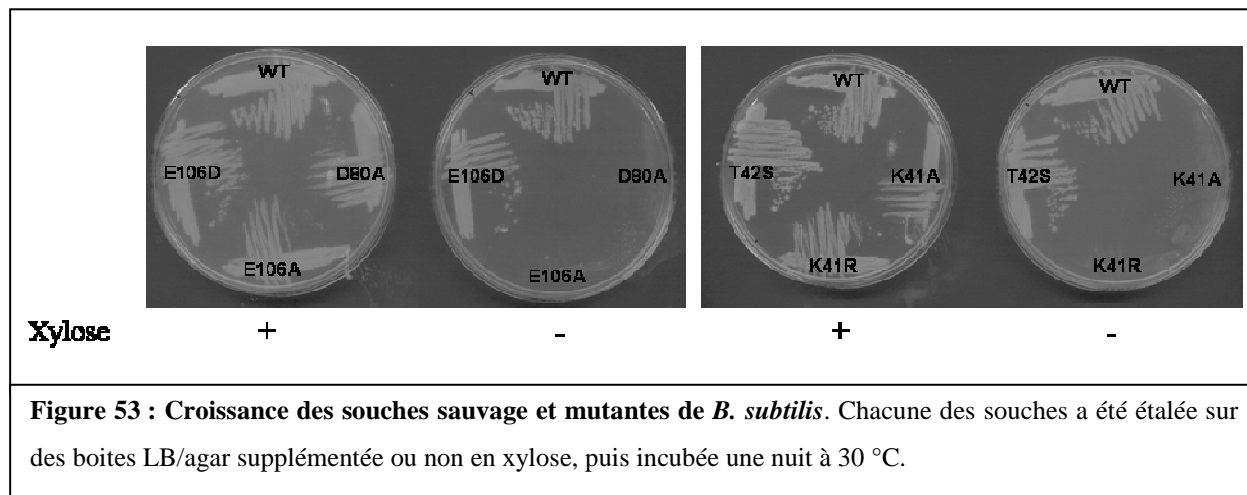
L'amorce oligonucléotidique anti-sens (b) de la borne gauche a permis d'introduire les sites de restrictions SmaI et PmeI à l'extrémité 3', générant, encore une fois, des bouts francs après digestion. La cassette de résistance à la kanamycine a été insérée après digestion du plasmide pBluescript par l'enzyme de restriction SmaI, et chaque gène de *ydiB* muté a été inséré après digestion du plasmide par PmeI. Après vérification du sens d'insertion des gènes, chacun des six vecteurs pBluescript a été linéarisé par digestion enzymatique puis transformé dans le KO conditionnel de *ydiB*. L'addition de kanamycine dans le milieu de culture a permis de favoriser la recombinaison homologe entre les bornes gauche et droite (figure 52).

VII-E-3. Croissance des souches sauvage et mutantes

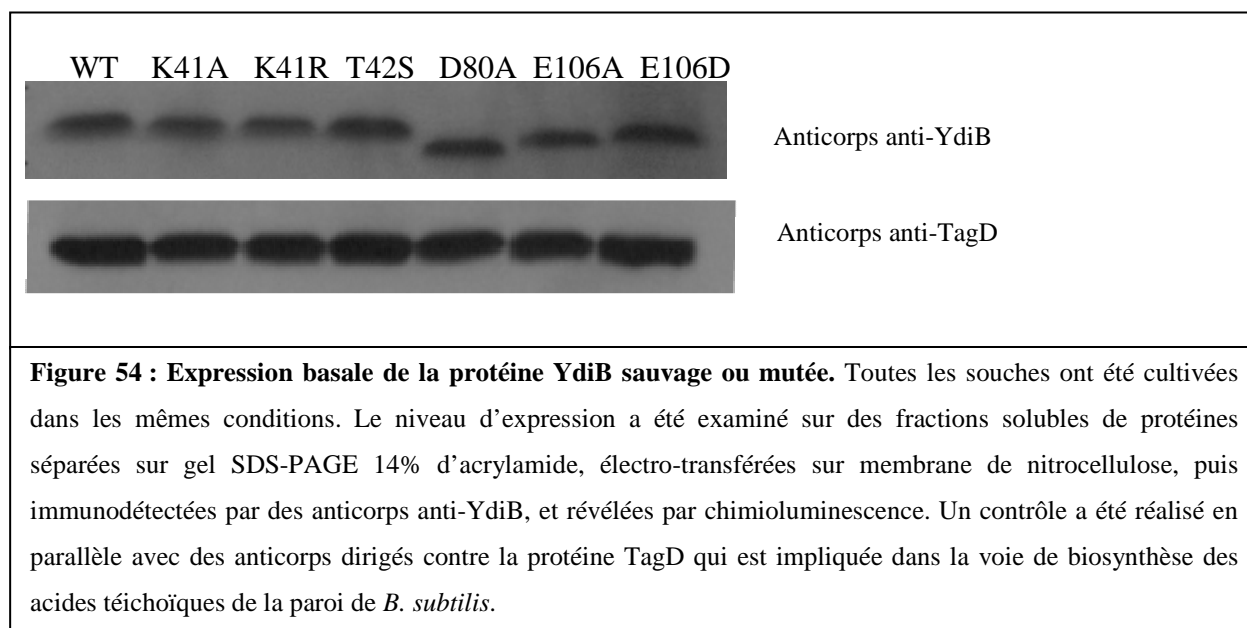
Les différents mutants du site actif ont été cultivés avec ou sans xylose, pendant une nuit à 30 °C. Comme prévu, tous les mutants poussent en présence de xylose, mais seuls les mutants T42S et E106D sont capables de restaurer une croissance normale en absence de xylose (figure 53) au bout d'une nuit à 30 °C. Tous les mutants sont capables de croître au bout de deux jours, comme la souche délétée (résultats non montrés).

Les mutants de la lysine en alanine et en arginine sont incapables de croître normalement, ce qui confirme l'importance de ce résidu. De même la mutation de l'aspartate en alanine réduit considérablement la croissance. Le mutant de la thréonine 42 en sérine n'affecte pas la croissance, ce qui nous laisse penser que le groupement hydroxyle de la sérine est capable d'interagir avec le magnésium ou que cette interaction n'est pas indispensable. Enfin, la mutation du glutamate 106 en aspartate n'altère pas la croissance alors que sa mutation en alanine ne permet pas une croissance normale, montrant l'importance du groupement carboxylate pour la fonction de YdiB.

Si le comportement du mutant E106D est le même *in vitro* et *in vivo*, c'est-à-dire s'il forme principalement des oligomères *in vivo*, alors ceci suggère que la forme oligomérique est la forme fonctionnelle *in vivo* puisque ce mutant est capable de croître normalement. On ne peut cependant pas exclure que très peu de formes monomériques suffisent à la fonctionnalité de l'enzyme.



Pour vérifier que les protéines mutées sont bien exprimées, un Western blot a été réalisé à partir de la fraction soluble des lysats de chaque mutant. La figure 54 montre que dans toutes les souches, YdiB est retrouvé dans la fraction soluble et que le niveau d'expression est sensiblement le même que dans la souche sauvage. L'absence de croissance des mutants K41A, K41R, D80A, et E106A n'est donc pas du à une absence d'expression, ni vraisemblablement à un mauvais repliement de la protéine car une quantité de protéines mutantes semblable à celle de la protéine sauvage est retrouvée dans la fraction soluble.



VIII. RECHERCHE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE YdiB PAR LA TECHNIQUE DE « PULL-DOWN »

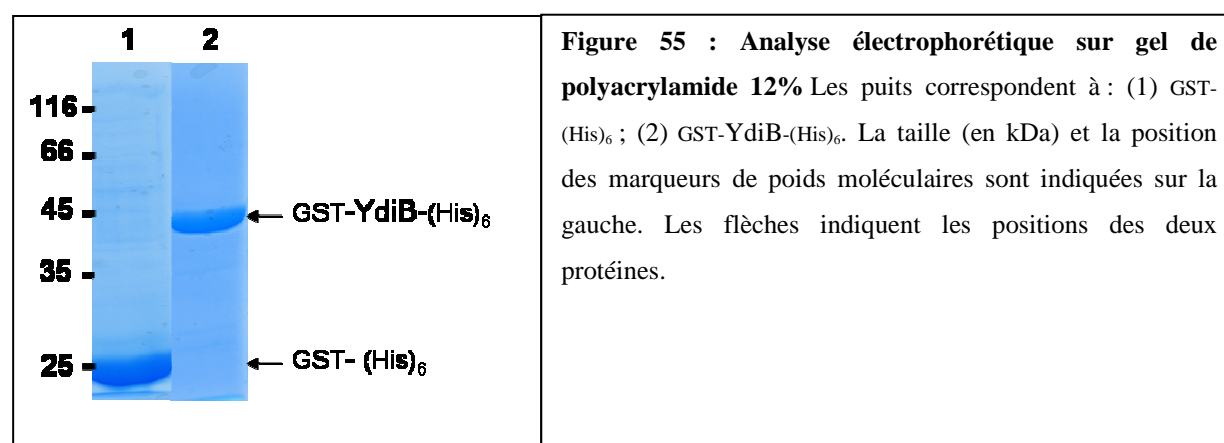
Nous avons établi des conditions expérimentales permettant de surexprimer la protéine à un niveau élevé, et de l'obtenir sous forme soluble. Les conditions optimales de solubilisation de GST-YdiB-(His)₆ sont présentées dans le tableau 14.

Paramètres :	milieu de culture	D.O. d'induction	Temps et température d'induction	pH des tampons de purification
	LB	0,6	4 h à 25 °C	pH 8,2

Tableau 14 : Conditions optimales de surexpression et de solubilité de GST-YdiB-(his)₆. Les paramètres suivants ont été étudiés : milieu de culture, D.O. d'induction, temps et température d'induction, et pH des tampons.

Grâce aux deux étiquettes, la protéine a pu être purifiée en deux étapes, par une chromatographie d'affinité sur gel de Nickel-agarose, puis par une chromatographie d'affinité sur billes de glutathion-agarose. Ce protocole de purification, très efficace, nous a permis d'obtenir la protéine à un niveau de pureté très satisfaisant (figure 55). De plus, les produits de dégradation provenant de protéolyses du côté *N*-terminal ont été éliminés sur la colonne de nickel et les produits de dégradation provenant de protéolyses du côté *C*-terminal ont été éliminés sur la colonne de glutathion.

Par ailleurs, toute la purification a été réalisée avec la GST-(his)₆ seule, dans les mêmes conditions, afin d'utiliser cette protéine comme un témoin lors de la co-purification.



Les billes couplées à GST-YdiB-(His)₆ ou à GST-(his)₆ ont été incubées en présence de la fraction soluble d'un lysat cellulaire de *B. subtilis* dans plusieurs conditions (pH différents, présence ou absence d'ADP). Idéalement, les protéines de *B. subtilis* qui interagissent avec la protéine d'intérêt sont retenues sur la colonne et après lavage, elles sont co-éluées avec la protéine d'intérêt. Comme l'illustre la figure 56A, aucune bande additionnelle n'a pu être détectée sur le gel. Nous avons alors décidé de lyophiliser tout l'éluat et de le resuspendre dans un volume plus petit afin de concentrer les protéines au maximum. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 56B. Seule une condition est montrée puisque les paramètres utilisés ne semblent pas avoir influencé les interactions potentielles.

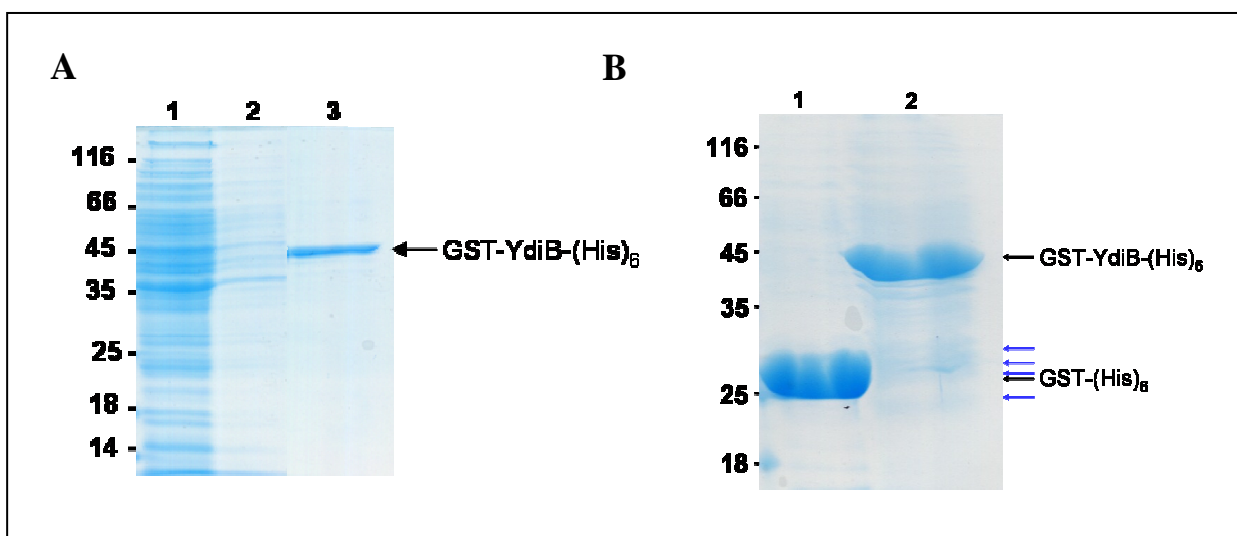


Figure 56 : Co-purification de la protéine recombinante GST-YdiB-(His)₆ avec ses partenaires potentiels de *B. subtilis*. **A.** Analyse sur gel SDS/PAGE des fractions à différentes étapes de la co-purification. Les puits correspondent à : (1) fraction non retenue sur la colonne de glutathion-agarose après incubation de la protéine GST-YdiB-(His)₆ avec l'extrait de *B. subtilis* ; (2) lavage de la colonne de glutathion-agarose ; (3) Elution de la colonne de glutathion-agarose. La flèche indique la position de GST-YdiB-(His)₆. **B.** Analyse sur gel SDS/PAGE des fractions de l'éluat de la colonne de glutathion-agarose après concentration des protéines par lyophilisation. Les puits correspondent à : (1) Elution de la protéine témoin GST-(His)₆ ; (2) Elution de la protéine d'intérêt GST-YdiB-(His)₆ et ses partenaires potentiels. Ces derniers sont indiqués par des flèches bleues. Les mobilités électrophorétiques de la GST-YdiB-(His)₆ et de la GST-(His)₆ sont indiquées sur la droite. La taille (en kDa) et la position des marqueurs de poids moléculaires sont indiquées sur la gauche.

Les bandes détectées ont été analysées par spectrométrie de masse réalisée en collaboration avec le laboratoire de Jérôme Garin au CEA de Grenoble et une recherche bioinformatique a permis d'identifier plusieurs partenaires potentiels présentés dans le tableau 15.

Partenaires potentiels	Fonctions	Masse moléculaire (Da)	Nombre de peptides fragmentés
<i>Superoxide dismutase (sodA)</i>	Détruit les radicaux produits à l'intérieur de la cellule, toxiques pour les systèmes biologiques.	22 476	2
<i>Thioredoxin peroxidase (ahpC)</i>	Réduit directement les espèces réactives de l'oxygène (hydroperoxydes) en utilisant la thioredoxine comme donneur d'hydrogènes. Son expression est induite par un choc thermique, un stress salin, un stress oxydatif ou une carence en glucose.	20 614	2
<i>Protéine de stress général (yceD)</i>	Protéine de stress général induite par un choc thermique, un stress salin, un stress oxydatif, une carence en glucose ou un manque d'oxygène.	20 550	2
<i>Protéine ribosomale L1 (rplA)</i>	Protéine ribosomale de la sous-unité 50S qui se lie directement sur l'ARNr 23S. Elle est localisée à proximité du site de liaison au ribosome du facteur d'élongation Tu.	24 776	4
<i>Protéine ribosomale S3 (rpsC)</i>	Protéine ribosomale de la sous-unité 30S. Elle se lie à l'ARNm dans le ribosome 70S, le positionnant ainsi pour la traduction. Elle forme un complexe avec les protéines S10 et S14.	24 186	3
<i>Protéine non caractérisée (yvyD)</i>	Fonction inconnue mais apparentée aux protéines ribosomales.	21 966	1
<i>Urydilate kinase (pyrH)</i>	Intervient dans la voie de biosynthèse des nucléotides. Elle catalyse la phosphorylation de l'UMP pour donner de l'UDP.	26 066	2
<i>Orotate phosphoribosyltransferase (pyrE)</i>	Intervient dans la voie de biosynthèse des nucléotides, et notamment dans la biosynthèse de l'UMP.	23 507	1
<i>Protéine végétative 296 (yurY)</i>	Appartient à la famille des transporteurs ABC.	28 881	1

Tableau 15 : Partenaires potentiels de GST-YdiB-(His)₆ révélés par co-purification suivie d'une analyse par spectrométrie de masse et d'une recherche bioinformatique. Les protéines sont classées en trois catégories : Les protéines de réponse à un stress, les protéines ribosomales, et les protéines impliquées dans la biosynthèse de nucléotides. En revanche, la protéine végétative 296 ne possède aucun lien avec les autres partenaires identifiés.

Plusieurs catégories de protéines partenaires potentiels peuvent être repérées dans ce tableau :

- Des protéines impliquées dans une réponse à un stress, suggérant que YdiB pourrait intervenir en réponse à une agression ou à une carence en nutriment ou oxygène. Ce scénario pourrait expliquer pourquoi la protéine n'est pas essentielle en milieu riche.
- Des protéines ribosomales, suggérant que YdiB interagit avec le ribosome.
- Des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de l'UDP, suggérant que YdiB catalyse une réaction intervenant dans cette voie métabolique.
- Enfin, une protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC a été identifiée mais n'a aucun lien avec les autres, donc est vraisemblablement un artefact.

Ce travail est préliminaire, des contrôles sont nécessaires et l'expérience doit être répétée pour valider la méthode. Le contrôle réalisé avec la GST-(his)₆ n'est pas idéal dans ce cas puisque la plupart des bandes séquencées correspondant potentiellement à des partenaires de YdiB migrent au même endroit que la GST-(his)₆ (figure 57).

Les interactions entre YdiB et les partenaires potentiels mis en évidence par cette approche devront être confirmées par d'autres techniques *in vitro*, par résonance plasmonique de surface (Biacore), ou *in vivo* par transfert d'énergie de fluorescence (FRET), par exemple.

Par ailleurs, deux études chez *E. coli* ont identifié des partenaires potentiels de YjeE (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005).

Emili et son équipe ont intégré directement dans le chromosome une cassette d'ADN, portant un marqueur de sélection et une étiquette Tap en C-terminal de *yjeE*. L'avantage de cette méthode est que la protéine étiquetée est sous le contrôle de son propre promoteur, donc elle est exprimée à un niveau endogène. Par ailleurs, le tag Tap possède deux domaines : un domaine de fixation des immunoglobulines G de la protéine A et un domaine de liaison à la calmoduline. La co-purification de YjeE et de ses partenaires peut donc se faire en deux étapes, en utilisant des billes couplées aux immunoglobulines de la protéine A, puis des billes de calmodulines. L'élution de la première colonne se fait en traitant avec la protéase TEV (pour « Tobacco Etch Virus ») dont le site de coupure se trouve entre les deux domaines du tag, et la seconde élution se fait par ajout d'EDTA (Butland et al., 2005).

Mori et ses collègues ont utilisé une approche différente, semblable à la notre, de co-purification mais avec une étiquette polyhistidines. Dans ce cas, l'expression de la protéine a été induite par ajout d'IPTG et la co-purification s'est faite sur colonne de nickel-agarose (Arifuzzaman et al., 2006).

Dans les deux études, les protéines éluées ont été analysées sur gel SDS/PAGE puis séquencées en spectrométrie de masse ou analysées directement en spectrométrie de masse sans passer par l'étape d'électrophorèse.

Les deux approches, ont permis de mettre en évidence plusieurs partenaires potentiels de YjeE, présentés dans le tableau 16. Cependant, aucune protéine commune n'est détectée dans les deux études. Par ailleurs, le réseau d'interactions de YjeE et ses partenaires possibles est vaste comme illustré par la figure 57.

Partenaires potentiels	Fonctions
<i>Protéine chaperone (dnaK)</i>	Joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réplication de l'ADN du phage Lambda. DnaK est également impliquée dans la réplication de l'ADN chromosomal. Enfin, elle participe activement à la réponse à un stress hyperosmotique.
<i>Chaperone 60 (mopA/groEL)</i>	Chaperone qui empêche le mauvais repliement des protéines et qui favorise le bon assemblage des peptides non repliés générés dans des conditions de stress. Lors d'un choc thermique, elle est phosphorylée de façon réversible.
<i>Glutamate décarboxylase (dceb/gadB)</i>	Convertit le glutamate en gamma-aminobutyrate en consommant un proton du milieu intracellulaire lors de la réaction. Ce système aide à maintenir un pH intracellulaire quasiment neutre quand les cellules sont exposées à des conditions acides extrêmes.
<i>Protéine ribosomale S2 (rs2/rpsB)</i>	Protéine ribosomale S2 de la sous-unité 30S.
<i>Protéine ribosomale S3 (rs3/rpsC)</i>	Protéine ribosomale S3 de la sous-unité 30S. Elle se lie à l'ARNm dans le ribosome 70S, le positionnant ainsi pour la traduction. Elle forme un complexe avec les protéines S10 et S14.
<i>Protéine ribosomale S5 (rs5/rpsE)</i>	Protéine ribosomale S5 de la sous-unité 30S qui joue un rôle important dans la fiabilité de la traduction avec les protéines S4 et S12.
<i>Protéine ribosomale S11 (rs11/rpsK)</i>	Protéine ribosomale S11 de la sous-unité 30S qui interagit avec les protéines S7 et S18
<i>Protéine ribosomale S1 (rs1/rpsA)</i>	Protéine ribosomale S1 de la sous-unité 30S se lie à l'ARNm, et par conséquent facilite la reconnaissance du point d'initiation.
<i>Protéines ribosomales L7/L12 (rl7/rplL)</i>	Protéines ribosomales L7 et L12 de la sous-unité 50S essentielles pour la fiabilité de la traduction. L7 et L12 forment un dimère et l'association de deux dimères et de la protéine L10 va former un complexe stable.
<i>Protéine ribosomale L14 (rl14/rplN)</i>	Protéine ribosomale L14 de la sous-unité 50S qui est liée directement à l'ARNr 23S. Dans le ribosome 70S, elle est en contact avec l'ARN 16S de la sous-unité 30S.

<i>Adenylosuccinate synthetase</i> (<i>purA</i>)	Intervient dans la voie de biosynthèse des nucléotides, notamment celle de l'AMP.
<i>Protéine de dégradation de l'acide phénylacétique</i> (<i>paaB</i>)	Impliquée dans la dégradation de l'acide phénylacétique, et est activée par le récepteur de l'AMP cyclique.
<i>Protéine de dégradation de l'acide phénylacétique</i> (<i>paaI</i>)	Impliquée dans la dégradation de l'acide phénylacétique, et est activée par le récepteur de l'AMP cyclique.
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A</i> (<i>g3p1/gapA</i>)	Catalyse la réaction : D-glycéraldéhyde 3-phosphate + phosphate + NAD ⁺ → 3-phospho-D-glyceroyl phosphate + NADH.
<i>NH(3)-dependent NAD(+)</i> <i>synthetase</i> (<i>nadE</i>)	Impliquée dans la voie de biosynthèse du NAD.
<i>Methionine synthase</i> (<i>metE</i>)	Impliquée dans la biosynthèse de la méthionine.
<i>Formate acetyltransferase</i> (<i>pflB</i>)	Catalyse la réaction : Acetyl-CoA + formate → CoA + pyruvate
<i>Lipoprotéine hypothétique</i> (<i>yaeF</i>)	Précurseur d'une lipoprotéine hypothétique
<i>Protéine hypothétique</i> (<i>yjeN</i>)	
<i>Protéine hypothétique</i> (<i>yjID</i>)	Acyltransferase putative.
<i>Protéine hypothétique</i> (<i>yjeF</i>)	Kinase putative.
<i>Protéine hypothétique</i> (<i>rimB</i> ou <i>yjFH</i>)	Appartient à la famille des ARN methyltransferases.
<i>Sulfurtransferase</i> (<i>sirA</i> ou <i>yhhP</i>)	Petite protéine de liaison à l'ARN requise pour une croissance normale.

Tableau 16 : Partenaires potentiels de YjeE révélés par deux études différentes. Les protéines qui apparaissent en bleu ont été identifiées par Emili et son équipe, alors que les autres protéines ont été identifiées par Mori et ses collègues (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005). Dans ce tableau, nous avons classé les protéines en six catégories. Les trois premières catégories sont celles décrites précédemment : Les protéines de réponse à un stress, les protéines ribosomales, et les protéines impliquées dans la biosynthèse de nucléotides. La 4^{ème} catégorie regroupe les protéines impliquées dans des voies métaboliques variées, et la 5^{ème} rassemble les protéines de fonction inconnue. Enfin les deux dernières protéines, RimB et SirA, ont servi d'appât pour capturer YjeE, à l'inverse de toutes les autres protéines qui ont été copurifiées avec la protéine YjeE étiquetée.

Comme l'illustre le tableau 16, nous retrouvons deux protéines chaperones GroEL et DnaK, impliquées dans une réponse à un stress. De même, plusieurs protéines ribosomales ont été identifiées, et notamment la protéine S3 de la sous-unité 30S, également mise en évidence par notre approche de co-purification. En revanche, une seule protéine est impliquée dans la voie de biosynthèse des nucléotides, celle de l'AMP. Par ailleurs, deux protéines sont impliquées dans la dégradation de l'acide phénylacétique et toutes les protéines restantes ne possèdent pas de liens communs évidents.

Ces observations nous permettent d'émettre des hypothèses quand au rôle des protéines YdiB/YjeE. Les deux hypothèses les plus vraisemblables sont l'intervention de la protéine lors d'un stress, et un rôle dans la fonction du ribosome. Cependant, bien que les deux études sur YjeE ne soutiennent pas vraiment l'hypothèse de la participation de la protéine dans la voie de biosynthèse de l'UDP, on ne peut pas exclure cette possibilité.

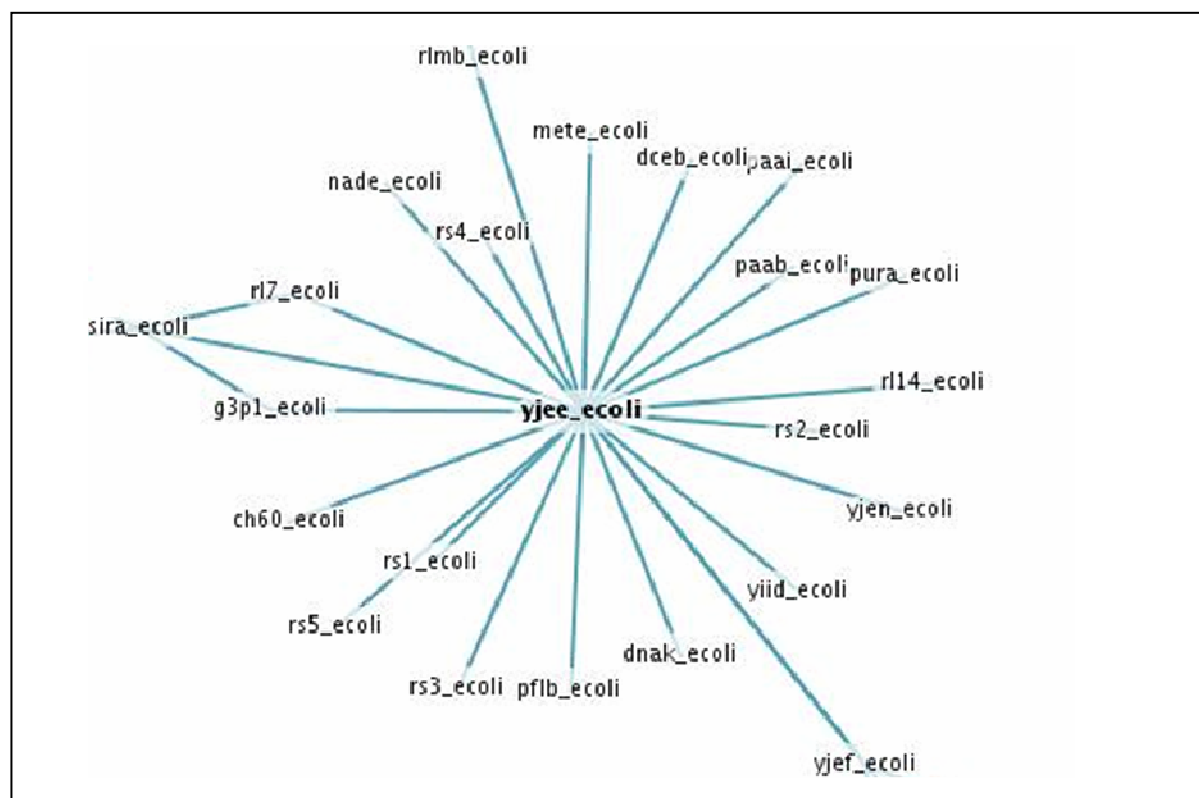


Figure 57 : Réseau d'interactions de YjeE et ses partenaires potentiels chez E. coli. Les partenaires figurant dans ce schéma ont été mis en évidence par Emili et son équipe d'une part, et par Mori et son équipe d'autre part, et sont classés dans le tableau 16 (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005). Toutes les protéines ont été copurifiées avec YjeE lors d'expérience de « pull-down » où YjeE est l'appât, excepté pour SirA et RimB où YjeE est la proie. SirA a non seulement été copurifiée avec YjeE mais aussi avec la protéine ribosomale L7 et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase qui ont également été copurifiées avec YjeE. D'après le site web <http://www.ebi.ac.uk/intact/search/do/search>.

DISCUSSION

La notion d'essentialité est très discutée en Microbiologie. L'essentialité d'un gène est habituellement étudiée *in silico* en se basant sur la conservation du gène, ou expérimentalement en étudiant la croissance du « knock-out » dans un milieu riche. Chez les bactéries, les gènes essentiels sont plus conservés que les non essentiels, ce qui souligne leur contribution pour le bien-être du micro-organisme (Jordan et al., 2002). En revanche, des études ont montré que tous les gènes conservés dans le génome ne conduisaient pas forcément à des phénotypes létaux lors de leur inactivation (Fang et al., 2005), alors que leur persistance suggère que la perte de tels gènes est létale ou très nuisible pour la bactérie. Ces gènes, appelés « conservés non essentiels », peuvent jouer un rôle crucial lorsque la bactérie doit faire face à des conditions hostiles, ce qui montre les limites des techniques expérimentales pour définir l'essentialité d'un gène (Fang et al., 2005). En effet, il est différent pour une bactérie de pousser dans des conditions de laboratoire avec des métabolites fournis en abondance et de survivre dans la nature, en compétition avec d'autres organismes pour des ressources limitées. Les gènes définis comme essentiels expérimentalement le sont seulement dans les conditions utilisées en laboratoire, c'est-à-dire sur un milieu défini et en absence d'agression et de carences, pourtant omniprésents dans la nature. La conservation d'un gène dans la majorité des bactéries est donc un critère majeur pour classifier les gènes comme essentiels, même si leur délétion n'empêche pas totalement la croissance de la bactérie lors des expériences réalisées en milieu riche.

Une étude basée sur l'incapacité à invalider *ydiB* a initialement défini ce gène comme essentiel chez *B. subtilis* (Kobayashi et al., 2003) et une conclusion similaire a été donnée pour le gène orthologue chez *E. coli*, *yjeE* (Allali-Hassani et al., 2004; Freiberg et al., 2001). En revanche, un mutant délété viable a été obtenu récemment, remettant en question l'essentialité de *ydiB* (Hunt et al., 2006). Nos résultats sont en accord avec cette dernière étude mais montrent clairement que la croissance de la souche délétée en milieu riche est fortement affectée comparée à celle de la souche sauvage. Selon la définition de Danchin et ses collègues exposée ci-dessus (Fang et al., 2005), il est alors clair que *ydiB* et ses orthologues, conservés dans quasiment toutes les bactéries, peuvent être classifiés comme des gènes essentiels.

Un des résultats majeurs décrit dans ce manuscrit est la capacité de YdiB et de YjeE de *E. coli* à former des homo-dimères et des homo-oligomères *in vitro*, et probablement *in vivo*. Cette conclusion est soutenue par l'étude d'Emili et ses collègues, dans laquelle ils ont

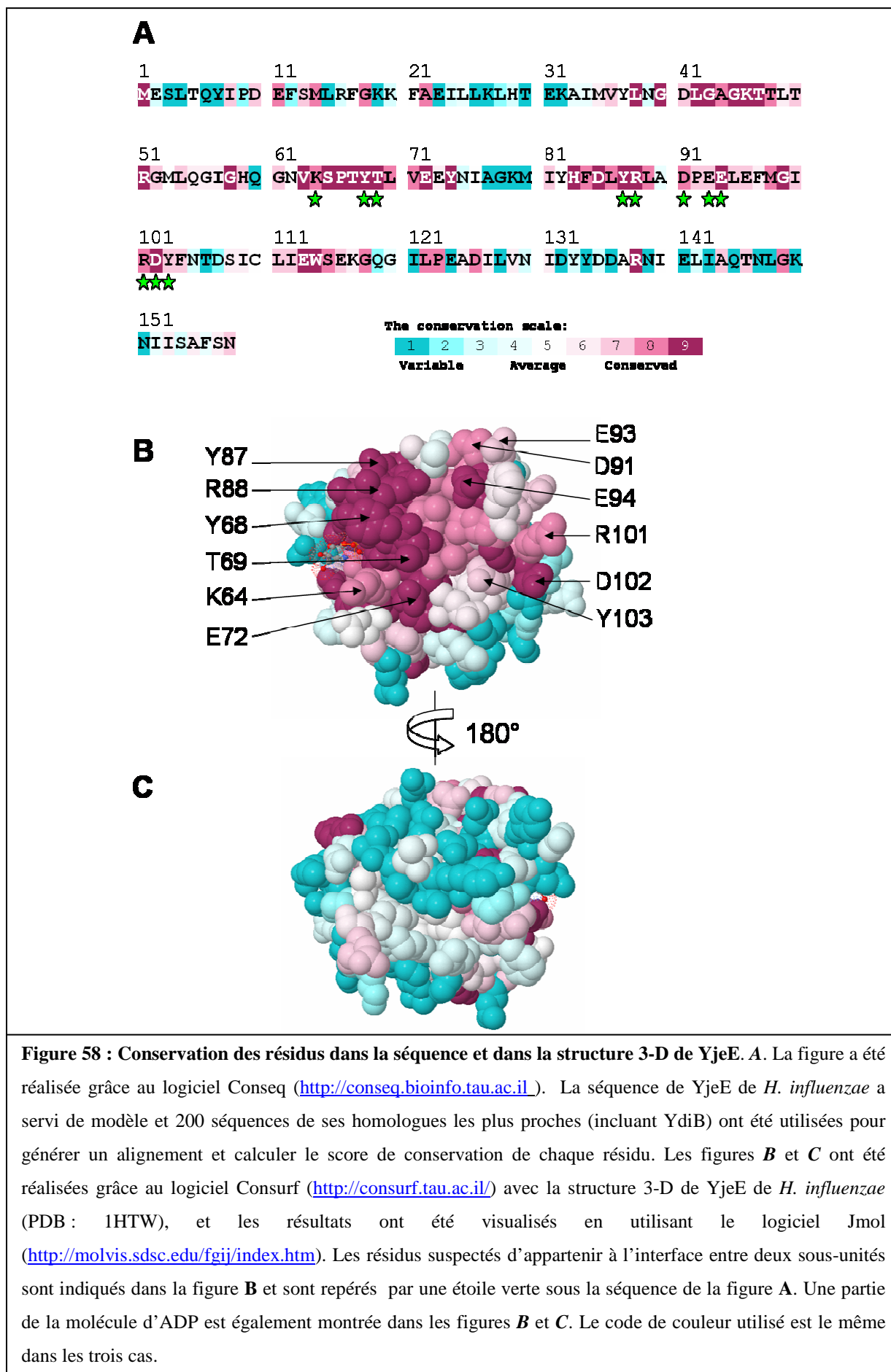
découvert que YjeE interagissait avec lui-même lors d'une approche de co-purification (Butland et al., 2005). D'un autre côté, YjeE de *H. influenzae* a été cristallisé sous forme de monomère, que ce soit dans sa forme apo ou dans sa forme liée à l'ADP et au magnésium (Teplyakov et al., 2002). Pourtant, il est peu probable que cet homologue se comporte différemment de YdiB étant donné la forte identité de séquence partagée entre les deux protéines. Une explication plausible est que les fortes concentrations salines utilisées pour la cristallisation des deux formes de la protéine ont empêché l'oligomérisation de YjeE, comme c'est le cas pour YdiB.

La capacité à dimériser ou à oligomériser est une propriété de nombreuses protéines (Park et al., 2001). Dans le cas des enzymes, cette caractéristique est généralement associée à l'aptitude à réguler étroitement l'activité catalytique, expliquant probablement l'effet négatif de l'oligomérisation sur l'activité ATPase de YdiB. Par ailleurs, les concentrations salines, qui affectent l'état d'oligomérisation de YdiB *in vitro*, appartiennent à la gamme de concentrations physiologiques de sels trouvés chez *B. subtilis* (Teixeira de Mattos and Neijssel, 1997), ce qui rend possible un effet de modulation de l'activité enzymatique de YdiB *in vivo*.

L'effet prononcé de la force ionique sur l'oligomérisation de YdiB suggère que les interactions entre les différents monomères impliquent principalement des résidus polaires ou chargés. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'activité ATPase du dimère incubé à 37 °C augmente plus rapidement que lorsqu'il est incubé à 4 °C. Ce phénomène est vraisemblablement dû à un équilibre vers le monomère, puisque les interactions électrostatiques sont rompues à des températures élevées (Lebowitz et al., 1994). De plus l'oligomérisation des mutants des résidus acides, D80 et E106, où la charge négative est perturbée, est fortement affectée.

Ceci pourrait expliquer pourquoi les oligomères, et en particulier les dimères, sont partiellement résistants à la dissociation par le SDS. En effet, si les interfaces entre monomères sont stabilisées par un réseau d'interactions polaires, incluant des résidus chargés négativement, alors l'interaction de l'interface dimérique avec l'agent dénaturant chargé négativement serait défavorable. Un tel scénario a été proposé pour la β -glycosidase de la bactérie thermophile *Sulfolobus solfataricus* (Gentile et al., 2002). Par ailleurs, la structure tridimensionnelle de YjeE révèle la présence d'une zone de résidus relativement conservés en dehors du site de liaison au nucléotide, incluant des acides aminés chargés négativement dont la chaîne latérale est orientée vers l'extérieur (figure 58). Cette zone, composée de patches

hydrophobes et de patches hydrophiles, pourrait constituée une partie de l'interface entre deux monomères. De plus, la dispersion de petites zones hydrophobes entourées de régions polaires rappelle les interfaces les plus couramment rencontrées (Larsen et al., 1998). Ces résidus conservés feront l'objet d'une étude plus approfondie pour déterminer s'ils appartiennent à cette interface.



Comme le décrit ce manuscrit, YdiB possède une faible activité enzymatique (10 h^{-1}), néanmoins significative puisque un mutant de la lysine conservée du motif A de Walker est quasiment inactif. De plus, cette activité est en accord avec la faible activité ATPase de l'homologue de YdiB chez *E. coli* (12 h^{-1} ; (Allali-Hassani et al., 2004)) ou chez *H. influenzae* (25 h^{-1} ou $1,2 \text{ h}^{-1}$ selon les auteurs; (Allali-Hassani et al., 2004; Teplyakov et al., 2002)).

Par ailleurs, ce mutant de la lysine 41 dévoile une croissance similaire à celle de la souche délétée, suggérant que l'activité ATPase est nécessaire pour une croissance normale. De même, la croissance du mutant de l'aspartate 80, dont l'activité enzymatique est faible, est très affectée. De façon contradictoire, le mutant de la thréonine 42, dépourvu d'activité enzymatique à faible concentration en ATP, est capable de croître. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la croissance a été testée sur un milieu riche, où les conditions les plus favorables pour la cellule sont trouvées, et par conséquent, où le niveau d'ATP est optimum. Or nous avons vu que ce mutant est actif *in vitro* lorsque le taux d'ATP est plus élevé.

Il est intéressant de noter que mutant E106D, qui est principalement sous forme oligomérique *in vitro*, et donc probablement *in vivo*, est capable de croître normalement. Ceci suggère que la forme oligomérique serait la forme fonctionnelle *in vivo*. Cependant, nous n'avons, à ce jour, aucune donnée sur son activité enzymatique.

De nombreuses ATPases sont connues pour s'oligomériser à l'intérieur de la cellule. C'est le cas des protéines AAA (Lupas and Martin, 2002), des hélicases (Lohman and Bjornson, 1996), ou encore des protéines SIMIBI (Leipe et al., 2002), telles que ParA ou MinD (voir chapitre II-C dans la partie « Rappels bibliographiques »). Ces ATPases couplent l'hydrolyse de l'ATP à une fonction cellulaire, mais cette activité est souvent faible en absence de partenaires (protéine, ADN, membrane...).

Jusqu'à présent, la fonction cellulaire de YdiB/YjeE reste floue mais il est vraisemblable que l'activité ATPase de cette nouvelle classe de protéines soit stimulée en présence d'un partenaire physiologique, encore non identifié. Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier comment l'état d'oligomérisation de YdiB est affecté par ce partenaire. Il est possible que la protéine soit peu active sous forme de dimère ou de multimère car le site catalytique est masqué. Nous pouvons alors imaginer que, dans des conditions particulières, un partenaire va interagir avec YdiB et va dissocier l'oligomère ou changer sa conformation de façon à rendre le site accessible au nucléotide, et rendre la protéine plus active.

Les expériences de « pull-down » réalisées avec YjeE (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005) ou YdiB suggèrent que cette protéine pourrait intervenir en réponse à une agression ou à une carence en nutriment ou oxygène. Ce scénario pourrait expliquer pourquoi la protéine n'est pas essentielle en milieu riche. Dans des conditions normales, elle serait sous forme de multimères donc peu active, puis un stress quelconque pourrait entraîner la dissociation de la protéine pour la rendre active et essentielle afin de lutter contre l'agression.

Une deuxième possibilité découlant des expériences de « pull-down » est que YdiB interagit avec le ribosome. L'interaction avec le ribosome pourrait alors moduler l'état d'oligomérisation de YdiB, et donc son activité enzymatique.

Il serait alors intéressant de confirmer toutes les interactions mises en évidence par « pull-down », et de voir si les partenaires potentiels sont différents en présence de faibles ou de fortes concentrations salines.

En se basant sur la distribution phylogénétique de la famille « YjeE like », trouvée chez toutes les bactéries excepté *Mycoplasma* et *Ureaplasma*, Teplyakov et ses collègues ont suggéré qu'elle jouait un rôle dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (Teplyakov et al., 2002). Cette hypothèse est renforcée par le fait que chez les protéobactéries, *yjeE* est souvent dans le même opéron que *amiB*, qui code pour une amidase impliquée dans le recyclage des peptidoglycanes, et les deux gènes sont transcrits ensemble chez *E. coli* (Tsui et al., 1994). Cependant, des preuves expérimentales sont nécessaires afin de confirmer le rôle cellulaire de YdiB/YjeE.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons établi des conditions expérimentales permettant de surexprimer YdiB avec une étiquette polyhistidines à un niveau élevé chez *E. coli*, et un protocole très efficace de purification a été mis au point. Par cette méthode, il est possible de purifier cette enzyme avec un rendement pouvant atteindre 40 mg de protéine par litre de culture bactérienne.

Après avoir montré l'importance de la protéine au sein de la bactérie par la création d'une souche délétée et par l'étude approfondie de sa croissance, nous avons tenté de caractériser le mécanisme de fonctionnement à l'échelle moléculaire de YdiB. Nous avons alors étudié l'état oligomérique de YdiB grâce à la technique de chromatographie d'exclusion de taille et d'ultracentrifugation analytique. Ces approches nous ont permis de démontrer que YdiB existait sous forme d'équilibre en solution entre monomères et oligomères, et que cet équilibre était influencé par la concentration saline. A l'avenir, l'effet du pH sur l'oligomérisation sera étudié. Nous suspectons qu'une zone de résidus conservés chez YdiB et ses homologues appartienne à l'interface dimérique, et ces résidus feront l'objet d'une étude plus approfondie. Certains d'entre eux seront mutés et l'oligomérisation des différents mutants sera étudiée. De même, nous avons entrepris de cristalliser la forme dimérique de YdiB, en collaboration avec Laurence Serre (Institut de Biologie Structurale, Grenoble).

De façon intéressante, l'activité ATPase de la forme monomérique s'est révélée être trois fois plus élevée que l'activité ATPase de la forme dimérique/multimérique. Ces activités enzymatiques sont très faibles mais néanmoins significatives puisque l'activité d'un mutant de la lysine conservée du motif A de Walker est quasiment totalement abolie. D'autres mutants des motifs A et B de Walker ont été créés et leur état d'oligomérisation ainsi que leur activité enzymatique ont été analysés. Seule l'activité du mutant du glutamate 106 n'a pu être mesurée car sa purification sous forme monomérique est problématique et une mise au point est nécessaire.

Par ailleurs, l'étude de la croissance des différents mutants du site actif de YdiB a révélé que l'activité de l'enzyme semble être nécessaire pour permettre à *B. subtilis* de croître normalement.

Une recherche des partenaires protéiques de YdiB par une approche de « pull-down » a suggéré un rôle de la protéine lors d'un stress ou bien une interaction avec le ribosome. Une des perspectives intéressantes de ce travail sera de cloner, surexprimer et purifier les partenaires potentiels identifiés et les interactions seront étudiées par différentes approches : *in vitro* en marquant chacun des deux partenaires purifiés par une sonde de fluorescence différente et compatible pour visualiser un transfert de fluorescence entre les deux fluorochromes ou par la technique de résonance plasmonique de surface (Biacore) ; *in vivo* en

confirmant l'expression simultanée des deux partenaires par PCR quantitative et en visualisant leur co-localisation cellulaire par la technique de transfert de fluorescence (chacun des deux partenaires étant fusionné en tandem à une protéine fluorescente différente et compatible pour le transfert de fluorescence, comme la GFP et YFP). A terme, il sera intéressant de comprendre comment la faible activité enzymatique ou l'état d'oligomérisation de YdiB pourraient être modifiés lors d'une interaction avec un ou plusieurs partenaires potentiels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. and Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628.
- Allali-Hassani, A., Campbell, T.L., Ho, A., Schertzer, J.W. and Brown, E.D. (2004) Probing the active site of YjeE: a vital *Escherichia coli* protein of unknown function. *Biochem J*, **384**, 577-584.
- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*, **24**, 47-53.
- Arifuzzaman, M., Maeda, M., Itoh, A., Nishikata, K., Takita, C., Saito, R., Ara, T., Nakahigashi, K., Huang, H.C., Hirai, A., Tsuzuki, K., Nakamura, S., Altaf-Ul-Amin, M., Oshima, T., Baba, T., Yamamoto, N., Kawamura, T., Ioka-Nakamichi, T., Kitagawa, M., Tomita, M., Kanaya, S., Wada, C. and Mori, H. (2006) Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res*, **16**, 686-691.
- Benard, V. and Bokoch, G.M. (2002) Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol*, **345**, 349-359.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M. and Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature*, **365**, 126-132.
- Betts, S., Speed, M. and King, J. (1999) Detection of early aggregation intermediates by native gel electrophoresis and native western blotting. *Methods Enzymol*, **309**, 333-350.
- Bhavsar, A.P., Zhao, X. and Brown, E.D. (2001) Development and characterization of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in *Bacillus subtilis*: conditional complementation of a teichoic acid mutant. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 403-410.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Brochu, D. and Vadeboncoeur, C. (1999) The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J Bacteriol*, **181**, 709-717.
- Brown, E.D. (2005) Conserved P-loop GTPases of unknown function in bacteria: an emerging and vital ensemble in bacterial physiology. *Biochem Cell Biol*, **83**, 738-746.
- Bujalowski, W., Klonowska, M.M. and Jezewska, M.J. (1994) Oligomeric structure of *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein. *J Biol Chem*, **269**, 31350-31358.

- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J. and Emili, A. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*, **433**, 531-537.
- Choi, S.K., Lee, J.H., Zoll, W.L., Merrick, W.C. and Dever, T.E. (1998) Promotion of met-tRNAⁱMet binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast. *Science*, **280**, 1757-1760.
- Chothia, C. and Janin, J. (1975) Principles of protein-protein recognition. *Nature*, **256**, 705-708.
- Chou, C.Y., Chang, H.C., Hsu, W.C., Lin, T.Z., Lin, C.H. and Chang, G.G. (2004) Quaternary structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus main protease. *Biochemistry*, **43**, 14958-14970.
- Cladiere, L., Hamze, K., Madec, E., Levdivkov, V.M., Wilkinson, A.J., Holland, I.B. and Seror, S.J. (2006) The GTPase, CpgA(Y10Q), a putative translation factor, is implicated in morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Genet Genomics*, **275**, 409-420.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K., Misselwitz, R., Zirwer, D., Guhrs, K.H., Hartmann, M., Schlott, B., Triebel, H. and Behnke, D. (1993) Physical and conformational properties of staphylokinase in solution. *Biochim Biophys Acta*, **1161**, 244-248.
- Deyrup, A.T., Krishnan, S., Cockburn, B.N. and Schwartz, N.B. (1998) Deletion and site-directed mutagenesis of the ATP-binding motif (P-loop) in the bifunctional murine ATP-sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase enzyme. *J Biol Chem*, **273**, 9450-9456.
- Donmez, I. and Patel, S.S. (2006) Mechanisms of a ring shaped helicase. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4216-4224.
- Fang, G., Rocha, E. and Danchin, A. (2005) How essential are nonessential genes? *Mol Biol Evol*, **22**, 2147-2156.
- Fieulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Monedero, V., Gueguen-Chaignon, V., Galinier, A., Janin, J., Deutscher, J. and Nessler, S. (2001) X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *Embo J*, **20**, 3917-3927.
- Finger, L.R. and Richardson, J.P. (1982) Stabilization of the hexameric form of *Escherichia coli* protein rho under ATP hydrolysis conditions. *J Mol Biol*, **156**, 203-219.

- Fischer, C., Geourjon, C., Bourson, C. and Deutscher, J. (1996) Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis prkA* gene encoding a novel serine protein kinase. *Gene*, **168**, 55-60.
- Freiberg, C., Wieland, B., Spaltmann, F., Ehlert, K., Brotz, H. and Labischinski, H. (2001) Identification of novel essential *Escherichia coli* genes conserved among pathogenic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **3**, 483-489.
- Galnier, A., Lavergne, J.P., Geourjon, C., Fieulaine, S., Nessler, S. and Jault, J.M. (2002) A new family of phosphotransferases with a P-loop motif. *J Biol Chem*, **277**, 11362-11367.
- Gaspar, R., Scrima, A. and Wittinghofer, A. (2006) Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J Biol Chem*, **281**, 27492-27502.
- Gentile, F., Amodeo, P., Febbraio, F., Picaro, F., Motta, A., Formisano, S. and Nucci, R. (2002) SDS-resistant active and thermostable dimers are obtained from the dissociation of homotetrameric beta-glycosidase from hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* in SDS. Stabilizing role of the A-C intermonomeric interface. *J Biol Chem*, **277**, 44050-44060.
- Geourjon, C., Orelle, C., Steinfels, E., Blanchet, C., Deleage, G., Di Pietro, A. and Jault, J.M. (2001) A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem Sci*, **26**, 539-544.
- Gorbalenya, A.E. and Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Struct Biol*, **3**, 419-429.
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vaganay, E., Vincent, C., Deleage, G., Duclos, B. and Cozzone, A.J. (1997) Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene*, **204**, 259-265.
- Higgins, C.F. and Linton, K.J. (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 918-926.
- Hunt, A., Rawlins, J.P., Thomaidis, H.B. and Errington, J. (2006) Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **152**, 2895-2907.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol*, **146**, 11-31.
- Jaenicke, R. and Lilie, H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv Protein Chem*, **53**, 329-401.
- Janin, J., Miller, S. and Chothia, C. (1988) Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *J Mol Biol*, **204**, 155-164.

- Jault, J.M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. and Galinier, A. (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem*, **275**, 1773-1780.
- Jones, S. and Thornton, J.M. (1995) Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog Biophys Mol Biol*, **63**, 31-65.
- Jordan, I.K., Rogozin, I.B., Wolf, Y.I. and Koonin, E.V. (2002) Essential genes are more evolutionarily conserved than are nonessential genes in bacteria. *Genome Res*, **12**, 962-968.
- Khayat, R., Batra, R., Beberitz, G.A., Olson, M.W. and Tong, L. (2004) Characterization of the monomer-dimer equilibrium of human cytomegalovirus protease by kinetic methods. *Biochemistry*, **43**, 316-322.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S.C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L.C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deurling, E., Devine, K., Devine, S.K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S.J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C.R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M.F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R.P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H.M., Rapoport, G., Rawlins, J.P., Rivas, L.A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H.H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J.F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H.B., Vagner, V., van Dijl, J.M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U. and Ogasawara, N. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4678-4683.
- Koonin, E.V. and Aravind, L. (2000) The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci*, **25**, 223-224.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I. and Aravind, L. (2000) Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem*, **54**, 245-275.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N. and Hengstenberg, W. (1999) The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol*, **31**, 59-66.

- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A. and et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249-256.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Larsen, T.A., Olson, A.J. and Goodsell, D.S. (1998) Morphology of protein-protein interfaces. *Structure*, **6**, 421-427.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M. and Pelletier, S.L. (1992) Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, 90-125.
- Lebowitz, J., Kar, S., Braswell, E., McPherson, S. and Richard, D.L. (1994) Human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase heterodimer stability. *Protein Sci*, **3**, 1374-1382.
- Leipe, D.D., Aravind, L., Grishin, N.V. and Koonin, E.V. (2000) The bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication. *Genome Res*, **10**, 5-16.
- Leipe, D.D., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2003) Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol*, **333**, 781-815.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, **317**, 41-72.
- Leonard, T.A., Butler, P.J. and Lowe, J. (2005) Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. *Embo J*, **24**, 270-282.
- Lerner, C.G., Hajduk, P.J., Wagner, R., Wagenaar, F.L., Woodall, C., Gu, Y.G., Searle, X.B., Florjancic, A.S., Zhang, T., Clark, R.F., Cooper, C.S., Mack, J.C., Yu, L., Cai, M., Betz, S.F., Chovan, L.E., McCall, J.O., Black-Schaefer, C.L., Kakavas, S.J., Schurdak, M.E., Comess, K.M., Walter, K.A., Edalji, R., Dorwin, S.A., Smith, R.A., Hebert, E.J., Harlan, J.E., Metzger, R.E., Merta, P.J., Baranowski, J.L., Coen, M.L., Thornewell, S.J., Shivakumar, A.G., Saiki, A.Y., Soni, N., Bui, M., Balli, D.J., Sanders, W.J., Nilius, A.M., Holzman, T.F., Fesik, S.W. and Beutel, B.A. (2007) From bacterial genomes to novel antibacterial agents: discovery, characterization, and antibacterial activity of compounds that bind to HI0065 (YjeE) from *Haemophilus influenzae*. *Chem Biol Drug Des*, **69**, 395-404.
- Lohman, T.M. and Bjornson, K.P. (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem*, **65**, 169-214.
- Lupas, A.N. and Martin, J. (2002) AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 746-753.

- Lutkenhaus, J. and Sundaramoorthy, M. (2003) MinD and role of the deviant Walker A motif, dimerization and membrane binding in oscillation. *Mol Microbiol*, **48**, 295-303.
- Ma, L., King, G.F. and Rothfield, L. (2004) Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the *Escherichia coli* MinD ATPase during division site selection. *Mol Microbiol*, **54**, 99-108.
- Macara, I.G., Lounsbury, K.M., Richards, S.A., McKiernan, C. and Bar-Sagi, D. (1996) The Ras superfamily of GTPases. *Faseb J*, **10**, 625-630.
- Marquez, J.A., Hasenbein, S., Koch, B., Fieulaine, S., Nessler, S., Russell, R.B., Hengstenberg, W. and Scheffzek, K. (2002) Structure of the full-length HPr kinase/phosphatase from *Staphylococcus xylosus* at 1.95 Å resolution: Mimicking the product/substrate of the phospho transfer reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3458-3463.
- Miller, S. (1989) The structure of interfaces between subunits of dimeric and tetrameric proteins. *Protein Eng*, **3**, 77-83.
- Milner-White, E.J., Coggins, J.R. and Anton, I.A. (1991) Evidence for an ancestral core structure in nucleotide-binding proteins with the type A motif. *J Mol Biol*, **221**, 751-754.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T. and Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, **247**, 536-540.
- Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*, **6**, 575-597.
- Park, J., Lappe, M. and Teichmann, S.A. (2001) Mapping protein family interactions: intramolecular and intermolecular protein family interaction repertoires in the PDB and yeast. *J Mol Biol*, **307**, 929-938.
- Patel, S. and Latterich, M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol*, **8**, 65-71.
- Peters, K. and Richards, F.M. (1977) Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. *Annu Rev Biochem*, **46**, 523-551.
- Prossnitz, E., Nikaido, K., Ulbrich, S.J. and Ames, G.F. (1988) Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, **263**, 17917-17920.
- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, **235**, 3322-3329.

- Ramstrom, H., Sanglier, S., Leize-Wagner, E., Philippe, C., Van Dorsselaer, A. and Haiech, J. (2003) Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **278**, 1174-1185.
- Ren, L., Chang, E., Makky, K., Haas, A.L., Kaboord, B. and Walid Qoronfleh, M. (2003) Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin. *Anal Biochem*, **322**, 164-169.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. and Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, **15**, 430-434.
- Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S., Takeyasu, K. and Wada, C. (2005) The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells*, **10**, 393-408.
- Sato, K., Mori, H., Yoshida, M. and Mizushima, S. (1996) Characterization of a potential catalytic residue, Asp-133, in the high affinity ATP-binding site of *Escherichia coli* SecA, translocation ATPase. *J Biol Chem*, **271**, 17439-17444.
- Schneider, E. and Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev*, **22**, 1-20.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, **78**, 1606-1619.
- Schulz, G.E. (1992) Binding of nucleotides by proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **2**, 61-67.
- Schweins, T., Geyer, M., Kalbitzer, H.R., Wittinghofer, A. and Warshel, A. (1996) Linear free energy relationships in the intrinsic and GTPase activating protein-stimulated guanosine 5'-triphosphate hydrolysis of p21ras. *Biochemistry*, **35**, 14225-14231.
- Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H.R. and Wittinghofer, A. (1995) Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat Struct Biol*, **2**, 36-44.
- Skare, J.T., Ahmer, B.M., Seachord, C.L., Darveau, R.P. and Postle, K. (1993) Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem*, **268**, 16302-16308.
- Soulat, D., Jault, J.M., Duclos, B., Geourjon, C., Cozzone, A.J. and Grangeasse, C. (2006) *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J Biol Chem*, **281**, 14048-14056.
- Speed, M.A., Wang, D.I. and King, J. (1995) Multimeric intermediates in the pathway to the aggregated inclusion body state for P22 tailspike polypeptide chains. *Protein Sci*, **4**, 900-908.

- Steinhauer, K., Allen, G.S., Hillen, W., Stulke, J. and Brennan, R.G. (2002) Crystallization, preliminary X-ray analysis and biophysical characterization of HPr kinase/phosphatase of *Mycoplasma pneumoniae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 515-518.
- Story, R.M. and Steitz, T.A. (1992) Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature*, **355**, 374-376.
- Story, R.M., Weber, I.T. and Steitz, T.A. (1992) The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer. *Nature*, **355**, 318-325.
- Teixeira de Mattos, M.J. and Neijssel, O.M. (1997) Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments. *J Biotechnol*, **59**, 117-126.
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Tordova, M., Thanki, N., Bonander, N., Eisenstein, E., Howard, A.J. and Gilliland, G.L. (2002) Crystal structure of the YjeE protein from *Haemophilus influenzae*: a putative Atpase involved in cell wall synthesis. *Proteins*, **48**, 220-226.
- Tsai, M.D. and Yan, H.G. (1991) Mechanism of adenylate kinase: site-directed mutagenesis versus X-ray and NMR. *Biochemistry*, **30**, 6806-6818.
- Tsui, H.C., Zhao, G., Feng, G., Leung, H.C. and Winkler, M.E. (1994) The *mutL* repair gene of *Escherichia coli* K-12 forms a superoperon with a gene encoding a new cell-wall amidase. *Mol Microbiol*, **11**, 189-202.
- Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q Rev Biophys*, **32**, 1-56.
- Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299-1304.
- Waksman, G., Lanka, E. and Carazo, J.M. (2000) Helicases as nucleic acid unwinding machines. *Nat Struct Biol*, **7**, 20-22.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**, 945-951.
- Walsh, C. (2003) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. . *ASM Press*.
- Xu, D., Lin, S.L. and Nussinov, R. (1997) Protein binding versus protein folding: the role of hydrophilic bridges in protein associations. *J Mol Biol*, **265**, 68-84.
- Yan, H.G., Shi, Z.T. and Tsai, M.D. (1990) Mechanism of adenylate kinase. Structural and functional demonstration of arginine-138 as a key catalytic residue that cannot be replaced by lysine. *Biochemistry*, **29**, 6385-6392.
- Yoshida, M. and Amano, T. (1995) A common topology of proteins catalyzing ATP-triggered reactions. *FEBS Lett*, **359**, 1-5.

Zhou, T. and Rosen, B.P. (1999) Asp45 is a Mg²⁺ ligand in the ArsA ATPase. *J Biol Chem*, **274**, 13854-13858.

PUBLICATIONS

« Oligomerisation of an essential bacterial enzyme of *Bacillus subtilis*, YdiB, modulates its ATPase activity ». Johanna C. Karst, Anne-Emmanuelle Foucher, Tracey L. Campbell, David Stroebel, , Chand S. Mangat, Eric D. Brown & Jean-Michel Jault. *Soumis*

Oligomerisation of an 'essential' bacterial enzyme of *Bacillus subtilis*, YdiB, modulates its ATPase activity.

Johanna C. Karst¹, Anne-Emmanuelle Foucher¹, Tracey L. Campbell²,
David Stroebel¹, Chand S. Mangat², Eric D. Brown² &
Jean-Michel Jault^{1*}

¹Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 Université Joseph Fourier/CEA/CNRS, 41 rue Jules Horowitz 38027 Grenoble cedex 1, France;

²Antimicrobial Research Centre, Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, 12 McMaster University, 1200 Main Street West, Hamilton, Ontario, Canada L8N 3Z5 ;

*To whom correspondence should be addressed. Fax : 33 4 38 78 54 94 ; Phone : 33 4 38 78 31 19 ; E-mail : jean-michel.jault@ibs.fr

Keywords : YdiB, YjeE, ATPase, oligomerisation, *Bacillus subtilis*.

Running title: YdiB forms homo-oligomers

SUMMARY

Characterization of ‘unknown’ proteins is one of the challenges of the post-genomic era. Here, we report the study of the *Bacillus subtilis* YdiB, which belongs to an uncharacterised class of P-loop ATPases. Precise deletion of gene *ydiB* yielded a mutant with much reduced growth rate compared to the wild-type strain. *In vitro*, purified YdiB was in equilibrium among different forms, monomers, dimers and oligomers, and this equilibrium was strongly affected by salts; high concentration of NaCl favored the monomeric over the oligomeric form of the enzyme. Interestingly, the ATPase activity of the monomer was ~ 3 times higher than that of the oligomer, and the monomer showed a K_m of about 60 μM for ATP and a V_{max} of about 10 nmol/min/mg proteins ($k_{\text{cat}} \sim 10 \text{ h}^{-1}$). This low ATPase activity was shown to be specific to YdiB because mutation of an invariant lysine residue in the P-loop motif (K41A) strongly attenuated this rate. Oligomerisation was also observed with the purified YjeE from *E. coli*, a YdiB orthologue. Importantly, formaldehyde cross-linking revealed that YjeE formed, at least, dimers inside the bacteria suggesting that oligomerisation might regulate the function of this new class of proteins.

INTRODUCTION

With the advent of the post-genomic era, the scientific community has to face the tremendous challenge to assign a biological role for each protein in every organism (Galperin and Koonin, 2004). This task is even much more painstaking for the uncharted (or unknown) proteins because they are *a priori* unrelated to any previously characterised cellular function. Yet, it has been estimated that these unknown proteins account for approximately one third of each genome, emphasizing the need to fully characterise them (Roberts, 2004; Tatusov *et al.*, 2000).

In most living cells, one of the major classes of proteins is the P-loop (or Walker A motif: G/AX₄GKT/S; (Walker *et al.*, 1982)) NTP hydrolase since it amounts to 10 to 18% of all gene products (Koonin *et al.*, 2000). These proteins are quite versatile, interact with many different classes of proteins of different folds, and often play essential roles in the cell (Brown, 2005; Park *et al.*, 2001). As such, uncovering the role of newly uncharted bacterial proteins with a P-loop motif, not found in humans and widely distributed in the prokaryotic kingdom, represent an important first step towards the search of new antibacterial compounds (Brown and Wright, 2005). One family of proteins that suits these criteria and for which little information is yet available is the Uncharacterised Protein Family (UPF) 0079 of the Swiss-Prot database (<http://www.expasy.org/>). This family is represented by YdiB in *Bacillus subtilis* or YjeE in either *E. coli* or *Haemophilus influenzae*, and recently YjeE from *H. influenzae* has been targeted for the search of new antimicrobial compounds {Lerner, 2007 #44}. Early investigations suggested that this protein was essential in *E. coli* and in *B. subtilis* (Allali-Hassani *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2003), however, more recently, the ‘essentiality’ of *ydiB* in *B. subtilis* has been questioned (Hunt *et al.*, 2006). In *H. influenzae*, the intracellular concentration of YjeE was abundant enough to be detected by a proteomic approach (Langen *et al.*, 2000). YjeE purified from either *E. coli* or *H. influenzae*

possessed a very low, but significant, ATPase activity (Allali-Hassani *et al.*, 2004; Teplyakov *et al.*, 2002), and as part of a structural genomic project, the 3D structure of YjeE from *H. influenzae* was solved either in an empty form (apo-enzyme) or in complex with ADP-Mg (Teplyakov *et al.*, 2002). Apart from the classical P-loop motif found in many NTP hydrolases (Geourjon *et al.*, 2001; Saraste *et al.*, 1990), this protein displayed a unique ATP-binding fold unrelated to any known ATPases or GTPases and thus formed a new family of enzymes (Teplyakov *et al.*, 2002). Recently, it has been shown that high copy of *rstA*, encoding an uncharacterised response regulator, was able to suppress the growth phenotype of YjeE depleted cells in *E. coli*, though the functional connection between the two proteins is still unclear (Campbell *et al.*, 2007).

Here, we have revisited the dispensability of *ydiB* in *B. subtilis* with the construction of both a conditional knock out and a deletion mutant. In addition, YdiB was overexpressed in *E. coli* and purified for the first time to homogeneity by a three-step procedure and the properties of the protein were studied. In particular, YdiB was shown to elute from a size-exclusion chromatography as a heterogeneous mixture of monomers, dimers and higher molecular weight oligomers and this propensity to oligomerise was confirmed by different techniques. Pure recombinant YdiB exhibited a low ATPase activity that was abrogated by a mutation of an invariant lysine in the Walker A motif, and this mutant was unable to complement a conditional knock out mutant of *ydiB*. Interestingly, the oligomerisation of YdiB affected its ATPase activity and cross-linking experiments using the YdiB orthologue from *E. coli*, YjeE, supported the likelihood that this process might also occur *in vivo*.

RESULTS

A *ydiB* deletion strain grows slowly on a rich medium. Contradictory results have been reported regarding the essentiality of YdiB in *B. subtilis* (Hunt *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2003), and so here we have re-investigated this point. A conditional knock out strain was created using a method previously described (Bhavsar *et al.*, 2001). Gene *ydiB* was deleted from its original wild-type location on the chromosome and a rescue copy was placed under the control of a tightly regulated xylose-inducible promoter at the *amyE* locus (*amyE::ydiB Cm ydiB::spec*). Figure 1 shows a comparison of the growth obtained in a rich medium for the wild-type *B. subtilis* and the conditional knock out mutant. After a short lag period (~ 3 h), the wild-type grew steadily to reach a plateau at ~ 16 h. For the conditional knock out mutant grown in the absence of inducer, a large increase in the lag phase (~ 8 h) and a decrease in the growth rate during the exponential phase were observed. Additionally, the mutant reached a lower final cell density compared to the wild-type. Addition of a low level of inducer (0.02% xylose), did not affect the lag in the growth rate of the mutant but significantly increased the final cell density although to a lower level than wild-type. A higher concentration of inducer (2% xylose) strongly reduced the lag period (~ 4 h) and permitted a nearly normal growth rate of the mutant. These results suggested that YdiB was ‘dispensable’ in *B. subtilis* although we could not rule out that a slight leak of the promoter might account for the slow growth of the mutant observed in the absence of inducer. Therefore, we attempted to make a disrupted *ydiB* mutant by transformation of the wild-type *B. subtilis* strain with genomic DNA from the conditional mutant, followed by a spectinomycin selection. Our efforts resulted in the creation of a disrupted *ydiB* mutant strain (inset Figure 1), which grew very slowly in a rich medium, at a rate comparable to that of the conditional mutant in the absence of xylose. This showed that the presence of YdiB was not essential to the growth of *B. subtilis* in a rich medium, but rather that the expression of YdiB was required to rapid growth of the bacterium.

Purification of recombinant YdiB. The *ydiB* gene from *B. subtilis* was cloned into a pET15b vector allowing the fusion of a poly-histidine tag on the *N*-terminus of the protein, and recombinant YdiB_(his6) was over-expressed in *E. coli* and purified in soluble form. The expression level of wild-type YdiB_(his6) was high (Figure 2, lane 1), and the purification was carried out in two successive steps of chromatography taking advantage of the low pI of this protein (5.42 for the His-tagged protein) and of the metal chelating properties of the histidine tag. A yield of 20 to 40 mg of protein per litre of culture was routinely obtained and SDS/PAGE analysis suggested that the purified recombinant protein was nearly homogenous (Figure 2).

YdiB forms oligomers. To further increase the purity of the protein, a size exclusion chromatography was employed. As shown in figure 3A, YdiB was resolved as two major peaks during this step. Peak *b* (fractions 25-28) eluted at the volume expected for the monomeric form of YdiB (~ 20 kDa), whereas peak *a* (fractions 18-22) corresponded most likely to a mixture of dimers of YdiB and oligomers of higher molecular weights. That YdiB was indeed the major protein found in all these fractions, from peaks *a* and *b*, was confirmed by a coomassie-stained SDS-PAGE (Figure 3B) and by a western blotting using an anti-his antibody (Figure 3C). Interestingly, samples from peak *a* migrated in the SDS-PAGE as a mixture of YdiB monomers and SDS-resistant dimers. This surprising result was confirmed using the anti-his antibody and suggested that some YdiB dimers maintained quaternary structure despite the harsh conditions of sample preparation and electrophoresis (exposure to 3% SDS in the loading buffer and 0.1 % SDS in the running buffer). When either peak *a* or *b* was re-chromatographed on gel filtration, two major peaks were again observed suggesting that, in solution, YdiB existed as an equilibrium between monomers and oligomers of higher molecular weights (data not shown). Further support for this conclusion came from analysis

of the fractions obtained from the gel filtration using native PAGE (Figure 3D). Under these conditions, and as expected, fractions from peak *a* (20-22) contained a mixture of oligomers of YdiB of different sizes that migrated as a ladder of species of increasing molecular weights. Oligomers were also observed when fractions from peak *b* (25-26) were analyzed, using native PAGE, which due to their elution times from the size exclusion chromatography were expected to contain only the monomeric form of YdiB. Again, this suggested an equilibrium among monomers and oligomers, and that the inter-conversion of the different molecular species of YdiB occurred rapidly, on a short time scale. A control was performed where the His₆-tag was removed from YdiB by proteolytic cleavage using thrombin (as checked by SDS-PAGE due to a different size of the tagged and untagged YdiB) and this did not modify the behaviour of the protein which still migrated as a mixture of monomers and dimers/oligomers on gel filtration (data not shown), showing that the presence of the His₆-tag did not influence the equilibrium.

The oligomerisation of YdiB is modulated by the salt concentration. Purified YdiB was analysed by size-exclusion chromatography over a large salt concentration, ranging from 20 to 300 mM of NaCl (Figure 4). In the presence of 20 mM NaCl, an elution profile similar to that seen in figure 3 was obtained, except that the first peak was clearly split into a doublet of peaks. The presence of this doublet, reflecting the occurrence of two main populations of oligomers of YdiB, was sometimes observed depending on the batch of purified YdiB used. Increasing the concentration of salt progressively reduced the amount of material recovered in the doublet while it increased the quantity of YdiB recovered in the second peak. Simultaneously, this second peak was slightly shifted towards a longer elution time. This progressive shift in the elution time suggested that at low salt concentrations, there was a fast equilibrium between monomeric and dimeric forms of YdiB. On the other hand, in the

presence of a high concentration of salt, the monomeric form of YdiB appeared much more stable and was therefore eluted from the column slightly later than at low salt concentrations.

To further characterise the oligomeric species formed by YdiB, an analysis was undertaken by analytical ultracentrifugation. Data from a typical sedimentation velocity experiment is shown in Figure 5 where the analysis was performed in the presence of 500 mM NaCl. The experimental points (Figure 5A) were fitted by a theoretical curve and the goodness of the fit was verified by both the randomly distribution of the residual values and the low values of the residuals (Figure 5B). This indicated that a reliable model was obtained for the sedimentation velocity experiments. According to this model, most of the protein (~ 54%) sedimented with a value of 0.85 S (Figure 5C), corresponding to one species with a mass of 20 kDa, in agreement with that predicted for the monomer. Two additional peaks were obtained at 1.45 S (~ 22%) and 2.3 S (~ 16%), corresponding to the predicted masses of the dimer (40 kDa) and tetramer (80 kDa), respectively, and a very faint peak around 3.2 S (presence of some oligomers of higher molecular weights, ~ 8%). The lack of additional peak at sedimentation coefficient of up to 10 S indicated that the protein did not form aggregates. The proportion of each species under various NaCl concentrations was studied by sedimentation velocity experiments. As expected from the results previously obtained by size-exclusion chromatography, Figure 6 shows that the ionic strength has a profound effect on the oligomerisation properties of YdiB monitored by analytical ultracentrifugation. At a low salt concentration (20 mM NaCl), the monomeric form of YdiB was a minority since it amounted to less than 10% of YdiB species, while there was a similar proportion of dimer and tetramer (~ 40% each). Higher salt concentrations progressively reversed this situation. When the salt concentration reached about 150 mM NaCl, a stable proportion of each species was observed, with 50 to 60% of YdiB being monomeric, and ~ 25% and ~ 15% of YdiB being dimeric and tetrameric, respectively. It must be noted that this effect was not salt-specific since it was also

observed using other salts such as KCl or Na₂SO₄ (data not shown). Overall, these results show the importance of the ionic strength in modulating the quaternary assembly of the protein.

The oligomerisation of YdiB affects its ATPase activity. Previous reports have shown that orthologues of YdiB, namely YjeE from either *E. coli* or *H. influenzae*, exhibited a very low ATPase activity (Allali-Hassani *et al.*, 2004; Teplyakov *et al.*, 2002). Therefore, we investigated whether YdiB from *B. subtilis* also displays an ATPase activity and, given its propensity to oligomerise, we evaluated how this process might affect YdiB ATPase activity. For this purpose, a high salt concentration was used during the size-exclusion chromatography to resolve at best the fractions of monomers from dimers/oligomers, and these two fractions were immediately assayed for their ATPase activity using an enzymatic-coupled assay system. In this assay, the hydrolysis of ATP is directly coupled to the disappearance of NADH monitored by the decrease of optical density at 340 nm, and the ADP produced is immediately converted back to ATP; this allows to maintain a constant level of ATP while preventing the product-inhibition by the ADP produced and thus to sustain an initial rate of ATPase activity over several minutes. Using a saturating concentration of ATP (5 mM, see below), the rate of ATP hydrolysis was about three times higher for the monomeric fractions as compared to the dimers/oligomers fractions (11 and 3.5 nmol/min/mg proteins, respectively). It is important to note here that this magnitude very probably underestimates the true difference in ATPase activity between the two fractions, because on the time scale of this experiment, we could not prevent some inter-conversion of the dimers/oligomers into monomers after the size-exclusion chromatography step. Indeed, when the ATPase activity of the dimers/oligomers was monitored at different times after the gel filtration, a progressive increase of the activity was observed (data not shown). We have been

unable to stabilize the oligomeric state(s) of YdiB despite investigating a wide variety of experimental conditions (various temperatures and/or different salts or buffers), precluding a thorough characterisation of the ATPase activity of this fraction. On the other hand, the ATPase activity of the monomeric fraction was rather stable over the time. Nevertheless, our ultracentrifugation experiments (Figure 6) indicated that even at a high salt concentration (500 mM NaCl), the monomer represented no more than 60% of the whole population of YdiB. Therefore, it is likely that after the recovery of the monomeric fraction of YdiB from the gel filtration, a fast equilibrium was reached where the 'true' monomer amounted to ~ 60% of the whole population of YdiB.

With the oligomeric fraction unstable over time, we focused our attention on the ATPase activity of the monomeric fraction. First, to rule out the possibility that this low activity was due to contaminant(s), several controls were performed. Addition of 1 mM GTP instead of ATP gave a very slow rate of hydrolysis (Figure 7A, dashed line), similar to that obtained when no nucleotide was added (not shown), but much lower than that measured in the presence of ATP (Figure 7A, plain line). This indicated that the ATPase activity measured in the presence of YdiB was neither due to some contaminants bearing a NADH dehydrogenase activity nor caused by some GTPase enzyme having a residual ATPase activity. In addition, a YdiB variant was created where the conserved Walker A lysine residue was mutated to an alanine (K41A), and the monomeric fraction of the variant was purified as for the wild-type with both a similar yield, degree of purity and oligomerisation state (data not shown). This K41A variant exhibited an extremely low ATPase activity (Figure 7A, dotted line) as compared to the wild-type enzyme, barely above the background level, showing that this substitution led to an inactive enzyme. Therefore, the ATPase activity measured with the wild-type enzyme can be confidently attributed to an intrinsic property of YdiB. Furthermore, the native ATPase activity of YdiB was required for its cellular function since the K41A

mutant failed to complement a conditional knock out of *ydiB* (data not shown), as previously observed with a similar mutant of YjeE from *E. coli* (Allali-Hassani *et al.*, 2004).

The ATPase activity was then analysed as a function of the concentration of YdiB. A linear dependence was observed between the rate of ATP hydrolysis and the concentration of the monomeric fraction of YdiB, suggesting that the range of YdiB concentrations used in this assay did not influence the oligomerisation state of YdiB (data not shown). Then, the ATPase activity of YdiB was studied as a function of ATP concentration and the results are reported in Figure 7B. The values of the kinetic parameters, K_M and V_{max} , were determined from the fitted curve as being $62.1 \pm 4.6 \mu\text{M}$ and $10.5 \pm 0.17 \text{ nmol ATP hydrolysed/min/mg proteins}$ ($k_{cat} \sim 10 \text{ h}^{-1}$), respectively.

YjeE, the YdiB orthologue from E. coli, also forms oligomers in vitro. In order to investigate whether the oligomerisation of YdiB was a unique property of the *B. subtilis* enzyme or, instead, if it was a common property shared with other members of the same family, YjeE from *E. coli* was purified as previously described (Allali-Hassani *et al.*, 2004). When about 5 μg of purified YjeE and YdiB were loaded onto a native PAGE, both proteins were resolved as a ladder of several bands corresponding to different states of oligomerisation (Figure 8). It should be noted here that in this kind of electrophoresis, one cannot directly compare the profile of migration of the two proteins because the migration is not strictly proportional to the size of the protein (or its oligomers) as it depends also on the charge of the protein (Speed *et al.*, 1995).

YjeE likely forms oligomers in vivo. We then asked whether this class of proteins can form oligomers *in vivo*. To investigate this, a formaldehyde cross-linking approach was used. This small reactive molecule, capable of polymerization, can be used in whole cells to reflect

protein-protein interactions as they occur *in vivo* (Peters and Richards, 1977). Furthermore, the cross-linked products formed can be destroyed by a subsequent heating of the samples. Figure 9 shows the results obtained when cells expressing YjeE treated with 1% formaldehyde for various times, were analysed by SDS-PAGE and immuno-detected using anti-YjeE antibodies. YjeE was present in all the samples, as expected, and migrated with an apparent molecular mass of ~ 17 kDa (Fig. 9, lanes 1 to 4) and this band was the only one revealed in the control experiment (lane 1). An additional band with an apparent molecular mass of ~ 35 kDa, corresponding approximately to the expected size of a dimer of YjeE, was detected immediately after formaldehyde addition and its intensity increased after 1 h of incubation (lanes 2 and 3, respectively). This band essentially disappeared after a subsequent step of boiling (lane 4) showing that it was indeed due to a cross-link by formaldehyde. A minor band corresponding putatively to a tetramer (apparent molecular weight of ~ 60 kDa) was also detected right after formaldehyde addition (lane 2) but this band seemed to vanish in the sample incubated during 1 h (lane 3). Surprisingly, however, in this 1 h incubation, a band with a quite large molecular weight, not capable of penetrating through the gel, was detected. This species too disappeared after the subsequent boiling step (compare lane 3 and 4). This might possibly correspond to a high molecular weight assembly of YjeE which was revealed only after 1 hour of incubation in the presence of formaldehyde. If this were the case, it is possible that just after formaldehyde addition, some tetramers belonging to larger oligomeric assemblies were immediately cross-linked (lane 2) but after the 1 h incubation period, additional cross-links led to the disappearance of the tetramer and, concomitantly, to the occurrence of larger molecular weight cross-linked species. The smear observed in lanes 2 and 3 also warrants some comments here. These species presumably corresponded to oligomers (dimers or higher molecular weight species) cross-linked more than once with formaldehyde.

DISCUSSION

Gene dispensability has been a recurrent question in the post-genomic era of Bacteriology. The *ydiB* gene was initially defined as being essential in *B. subtilis* based on failed attempts at gene disruption (Kobayashi *et al.*, 2003). More rigorous studies in *E. coli* led to an essential designation for orthologous gene *yjeE* (Allali-Hassani *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2001). Most recently, however, a viable knock out mutant of *B. subtilis ydiB* was reported suggesting that *ydiB* was not *stricto sensus* ‘essential’ (Hunt *et al.*, 2006). Our results agree with this latter study but clearly show that a *ydiB* knock out mutant is profoundly impaired for growth compared to the wild-type strain. Thus, the notion of ‘essentiality’ for a gene deserves perhaps another boundary than just its ability to allow some growth, or not, on a defined medium, and this point has been thoroughly discussed recently by Danchin and colleagues (Fang *et al.*, 2005). Accordingly, the conservation of a gene among the majority of bacteria, even if proven nonessential for growth on rich laboratory media, is grounds to classify a gene as critical to cellular viability. These type of genes, called ‘persistent nonessential’, might play a crucial role when bacteria have to cope with hostile conditions especially in the wild where they thrive under limited conditions while they compete with other microbes. Considering this definition, it is clear that *ydiB* or its orthologues, which are conserved in almost all bacteria, have critical though currently elusive functions in bacterial physiology.

A key discovery reported here is the propensity of YdiB and YjeE to form higher oligomers *in vitro*, and possibly *in vivo*. In support of this conclusion, it is noteworthy that using a tandem affinity purification tag approach, Butland and co-workers found that *E. coli* YjeE interacts with itself (Butland *et al.*, 2005). On the other hand, crystal structures of YjeE from *H. influenzae*, either the apo- or the ADP-Mg bound enzyme, were shown to be monomeric in the crystal (Teplyakov *et al.*, 2002). It is worth noting that both structures were

however obtained in the presence of a high concentration of salts, shown here to discourage the oligomerisation of the YdiB protein.

The salt concentrations that affected the oligomerisation status of YdiB *in vitro* appear to be in the range of the physiological concentration of salts found in *B. subtilis* (Teixeira de Mattos and Neijssel, 1997), consistent with a possible modulating effect on the ATPase activity of YdiB *in vivo*. Because high ionic strength has a profoundly negative effect on the oligomerisation of the protein, this suggests that, at the molecular level, interactions between different monomers mainly involve charged, or polar, residues. This feature might explain why the oligomers, notably the dimers, of YdiB were partially resistant to SDS. Indeed, if the interfaces between monomers were stabilized by a network of polar interactions, including negatively charged residues, this would possibly result in an unfavourable interaction with SDS thereby leading to SDS-resistant oligomers. Such a scenario has been proposed before for the β -glycosidase from the hyperthermophilic bacterium, *Sulfolobus solfataricus* (Gentile *et al.*, 2002). Interestingly, the 3-D structure of YjeE from *H. influenzae* revealed the presence of a patch of relatively conserved residues, including some negatively charged amino-acids, outside of the ATP-binding site, and we propose that this might constitute in one of the monomer, part of the interface between two monomers (Figure 10).

The ability to dimerise or oligomerise appears to be a common property of many proteins (Park *et al.*, 2001). In the case of enzymes, this feature is generally associated with the ability to tightly control the catalytic activity, and this may explain the apparent negative effect of the oligomerisation reported here on the ATPase activity of YdiB. Many ATPases have been shown previously to function as oligomers inside the cell, including for instance the AAA proteins (for ‘ATPase Associated with many cellular Activities’; (Lupas and Martin, 2002)), the ParA superfamily involved in bacterial DNA segregation (Barilla *et al.*, 2005) or MinD which spatially regulates cell division in *E. coli* (Hu *et al.*, 2003). When these ATPases

couple ATP hydrolysis to a given cellular function, their ATPase activity is usually low in the absence of the cellular partner (e.g. membrane bound components for members of the secretion NTPase superfamily (Crowther *et al.*, 2005)) or the physiological substrate (e.g. DNA for helicase; (Wong *et al.*, 1996)). As shown here, YdiB has a low ATPase activity ($\sim 10 \text{ h}^{-1}$) consistent with the low activity reported previously for YjeE from either *E. coli* (12 h^{-1} ; (Allali-Hassani *et al.*, 2004)) or *H. influenzae* (1.2 h^{-1} or 25 h^{-1} according to the authors; (Allali-Hassani *et al.*, 2004; Teplyakov *et al.*, 2002)). Until now, the cellular function of YdiB/YjeE has remained elusive but it is likely that the low ATPase activity of this new class of protein will be stimulated by the presence of its physiological partner, once identified. In this regard, it will be of interest to check how the oligomerisation status of YdiB will affect the interaction with its partner. Based on the phylogenetic distribution of the YdiB/YjeE family in all bacteria except *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, it has been suggested that it plays a role in the cell-wall biosynthesis (Teplyakov *et al.*, 2002). In support of this hypothesis, *yjeE* is present in some species in the same operon as *amiB*, which encodes for an amidase involved in recycling of peptidoglycan, and both genes are transcribed together in *E. coli* (Tsui *et al.*, 1994). Using different co-purification approaches to identify protein-protein partners on a wide genomic scale, two recent studies reported several but different putative protein partners for YjeE in *E. coli*, making thus difficult to rationalize the possible function of this protein inside the cell {Arifuzzaman, 2006 #45; Butland, 2005 #25}. Clearly, further experimental evidence will be required in order to decipher the cellular role of the bacterial YdiB/YjeE family.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of disrupted and conditional knock out mutants of ydiB and growth curves.

The conditional knock out mutant was constructed by insertion of a second copy of *ydiB* at the *amyE* locus using the plasmid pSWEET (Bhavsar *et al.*, 2001), and by replacing *ydiB* with a spectinomycin resistance cassette. The additional copy is under the control of a xylose inducible promoter. The *ydiB* disrupted mutant strain was obtained by transformation of the wild-type *B. subtilis* strain with the conditional knock out mutant genomic DNA, followed by a spectinomycin selection. The full depletion of YdiB was checked using anti-YdiB antibodies obtained from Cocalico Biologicals (Reamstown, PA, USA).

The growth of different strains was monitored as follows. The strains were grown overnight on LB (Luria-Bertani) plates at 30 °C. One colony from each plate was used to inoculate an overnight liquid culture. On the following day, the cells were diluted into 200 µl of LB medium in a 96-well microtitre plate at an initial OD_{600 nm} of about 0.001. Samples were incubated at 30 °C with shaking at 250 rev./min for 26 h and the OD_{600 nm} was measured at different times. For the conditional knock out strain, a growth analysis in the presence and in the absence of xylose was performed to assess the inducer dependence in liquid media.

Construction of the overexpression plasmid pET15b-ydiB. *ydiB* was amplified by PCR using

B. subtilis DNA with the following primers : 5'-
GGGGCTCAGCTCAATTGCTAATATTGTCATGTCTAC-3' and 5'-
GGGCATATGGTGAAGCAATTTAAAATGGAGAAC-3' with the underlined sequences corresponding to the restriction sites of BspI and NdeI, respectively, and the stop codon being in bold, and were cloned subsequently into the BspI and NdeI sites of pET15b (Novagen). The resulting plasmid (pET15b-*ydiB*) encodes for the YdiB protein fused at its *N*-terminal end to a His₆ tag followed by a thrombin cleavage site. A variant of YdiB (K41A) was constructed

with the Quick ChangeTM site directed mutagenesis kit (Stratagene) using the pET15b-YdiB expression vector as a template. To screen for positive clones, oligonucleotides were designed to introduce the desired mutation and to simultaneously introduce a new NaeI restriction site (in bold character) without modifying the protein sequence: 5'-GGGCGATTTAGGT**GCGGCGCA**ACGACTTTTACGAAAGG-3' (the mutated bases are underlined). A second primer was used with a complementary sequence to this first primer. The correct sequences of wild-type and mutant genes were verified by DNA sequencing (Genome express, France).

Production and purification of YdiB. *E.coli* strain BL21(DE3) (Novagen) was transformed with the plasmid pET15b-*ydiB*. Cultures in 1 litre of LB medium with 100 µg/ml ampicillin were grown at 37 °C until the OD_{600nm} reached 0.6, induced by 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, and further grown for 4 h. Cells were harvested by centrifugation, and were resuspended in 20 ml of lysis buffer (50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 10 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol) supplemented by 1 mM Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride (PMSF), 5 µM leupeptine and 5 µM pepstatine A. The lysate was disrupted twice at 18 000 p.s.i. in a French press apparatus, and cell debris were pelleted by centrifugation at 9,000 g for 30 min at 4 °C. The clarified lysate containing YdiB was first purified by an anion-exchange step: 10 ml of DEAE cellulose slurry (Sigma), equilibrated in lysis buffer, was added to the clear lysate, and the solution was mixed gently at 4 °C for 60 min. The resin was then washed three times with a washing buffer containing 50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl and 5 mM β-mercaptoethanol, and beads were resuspended in an elution buffer containing 50 mM Hepes/KOH pH 7.5, 5 mM β-mercaptoethanol and 500 mM NaCl, and incubated 30 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant was collected and loaded onto a nickel chelate chromatography (Qiagen) at 4 °C. The column (Econo-pac from Biorad) was allowed to drain

(flow-through fraction), washed with 100 ml buffer containing 50 mM Hepes/KOH pH 7.5, 5 mM β -mercaptoethanol, 300 mM NaCl and 20 mM imidazole and eluted with a buffer containing 50 mM Hepes/KOH pH 7.5, 5 mM β -mercaptoethanol, 100 mM NaCl and 250 mM imidazole. The purified protein was precipitated by 55% ammonium sulphate and stored at 4 °C. Using this procedure, 20 to 40 mg of YdiB was routinely recovered. The purity of the recombinant protein was analysed by 14% polyacrylamide gel and the protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Coomassie plus, Pierce), using bovine serum albumin as a standard.

Before use, the precipitated protein in ammonium sulphate was centrifuged 15 min at 15, 000 g and 4°C, and the pellet was resuspended into an appropriate buffer for the size exclusion chromatography step (see below).

Size exclusion chromatography. Size exclusion chromatography experiments were performed at 4 °C on a Superdex 75 column (Amersham Biosciences), equilibrated with 50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, containing different concentrations of NaCl as indicated. The samples were centrifuged for 10 min at 18, 000 g at 4 °C prior to loading 500 μ l aliquots onto the column at a protein concentration between 1 and 5 mg/ml. Elution profiles were monitored by recording the OD_{280 nm} using a flow rate of 0.5 ml/min and different fractions were analysed by SDS/PAGE and used for enzymatic assays. For calibration, bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), and chymotrypsinogen (25 kDa) were used as molecular weight markers (gel filtration calibration kit LMW from Amersham GE Healthcare).

Proteolytic cleavage using thrombin. The pET15b plasmid allowed the fusion of a His₆ tag followed by a thrombin cleavage site at the *N*-terminal end of the protein. When indicated, the

His₆-tag was removed by incubation of 3 mg of YdiB with 20 units of thrombin at 4 °C for 2 hours. Nickel-agarose resin was then incubated with the mixture for 30 minutes. The solution was spun and the supernatant containing the YdiB protein without any tag and the thrombin was used for gel filtration experiments.

SDS-PAGE and Western Blot analyses. For the SDS-PAGE, the basic procedure was that of Laemmli (Laemmli, 1970), using a 14% (w/v) acrylamide resolving gel, with a 4 % stacking gel. Gels were stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue. Western-blot analyses were performed with either rabbit polyclonal anti-YjeE antibodies (dilution 1/10000) or rabbit polyclonal anti-YdiB antibodies (dilution 1/10000) raised by Cocalico Biologicals (Reamstown, PA, U.S.A.). To detect his-tagged proteins, the SuperSignal West HisProbe Kit (Pierce) was used, as described by the manufacturer.

Native gel electrophoresis. Nondenaturing PAGE was performed using a discontinuous buffer system. The resolving gel contained 370 mM Tris/HCl, pH 8.8, 14% acrylamide, 0.1% TEMED, and 0.1% ammonium persulfate. The stacking gel contained 70 mM Tris/HCl, pH 6.8, 4% acrylamide, 0.1% TEMED, and 0.1% ammonium persulfate. Gels were run in 50 mM Tris/HCl, pH 8.4 and 400 mM glycine at constant current (20 mA/gel) for 3-4 h at 4 °C, and then stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue.

Ultracentrifugation analysis. In order to remove ammonium sulphate and obtain appropriate NaCl concentration, precipitated YdiB samples were spun and pellet were re-suspended in a desired buffer and then equilibrated in the same buffer using a PD-10 column (from Amersham). Sedimentation velocity experiments were performed using a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge equipped with an AnTi rotor. Samples and appropriate buffers

(400 μl and 430 μl , respectively) were loaded into their respective channels in double-sector ultracentrifuge cells and run at 45 000 rev./min at 4 °C. Scans were recorded at OD_{280 nm}. The Sedfit programm continuous distribution c(s) analysis (Sedfit: <http://www.analyticalultracentrifugation.com>) (Dam and Schuck, 2004; Schuck, 2000) allowed us to fit the data by generating the sedimentation distribution profiles.

Mass identification of each peak was done by solving the sedimentation equation: $s \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h = M_b = M(1 - \delta \cdot v_p)$, where s is the sedimentation coefficient of the analysed species, with calculated solvent viscosity (η) and density (δ) and estimated protein mass M and specific partial volume v_p . Considering YdiB as a globular protein, the Stokes radius R_h could be estimated by: $R_h = 1.27 R_g$ {Damaschun, 1993 #46}. The gyration radius R_g was deduced from the known structure of YjeE (PDB: 1f19).

ATPase assay

An enzymatic assay was used which couples the regeneration of ATP from the ADP produced to the conversion of phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate by pyruvate kinase (PK) and the conversion of pyruvate to lactate by lactate dehydrogenase (LDH). Hence, one mole of ATP hydrolysed is directly converted to one mole of NADH oxidized to NAD⁺, and the ATPase activity is monitored by the disappearance of NADH followed at OD_{340 nm}. A typical reaction mixture (750 μl) contained 50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 30 mM KCl, 4 mM PEP, 40 $\mu\text{g/ml}$ PK, 20 $\mu\text{g/ml}$ LDH, 0.4 mM NADH (Jault *et al.*, 1991), with various amounts of proteins and the indicated salt and ATP plus MgCl₂ concentrations. The ATPase activity was monitored at 37 °C. K_M and V_{max} values were determined from iterative non linear fits of the theoretical Michaelis and Menten equation to the experimental data, using the GraFit 5.0.11 software (from Erithacus software).

Formaldehyde cross linking in vivo. *E.coli* strain EB437 was used for this experiment. This strain contains an additional copy of *YjeE* at the *araBAD* locus which is under the control of the tightly regulated P_{BAD} promoter (Allali-Hassani *et al.*, 2004). Bacteria were grown on LB liquid media supplemented by 0.001% arabinose until the $OD_{600\text{ nm}}$ reached ~ 1 . Cross-linking was performed as previously described (Prossnitz *et al.*, 1988; Skare *et al.*, 1993), on bacteria resuspended in 100 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 at an $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.7$. Formaldehyde (Fisher Chemical; 37% w/w) was added at a final concentration of 1%, and the samples were incubated at room temperature. 1 ml volumes were then removed at the time indicated, and the samples were centrifuged immediately to pellet the whole cells. Pellets were washed once in the same buffer, and then resuspended in concentrated (4 x) Laemmli sample buffer (250 mM Tris/HCl pH 6.8, 12% SDS, 40% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol and 0.01 mg/ml bromophenol blue). The samples were either heated at 60 °C for 10 min to maintain the formaldehyde cross-links or at 95 °C for 20 min to break the chemical cross-links. Protein samples were analysed by SDS/PAGE (14% acrylamide), transferred to PVDF membrane (immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) and then revealed by immunoblotting using anti-*YjeE* antibodies.

AKCNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by an ATIPE ‘Young Investigator’ grant from the CNRS to J.-M. J and by an operating grant from the Canadian Institutes of Health (MOP-64292) and an investigator award from the Canada Research Chairs program to E. D. B. The financial support from the Fondation Jacques Cartier is also acknowledged.

We thank Dr. Christine Ebel for her advice with ultracentrifugation analysis and for her critical reading of the manuscript and Michael A. d’Elia for his help with the cloning experiments.

Abbreviations: SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

References

- Allali-Hassani, A., Campbell, T.L., Ho, A., Schertzer, J.W., and Brown, E.D. (2004) Probing the active site of YjeE: a vital Escherichia coli protein of unknown function. *Biochem J* **384**: 577-584.
- Barilla, D., Rosenberg, M.F., Nobbmann, U., and Hayes, F. (2005) Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *Embo J* **24**: 1453-1464.
- Bhavsar, A.P., Zhao, X., and Brown, E.D. (2001) Development and characterization of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in Bacillus subtilis: conditional complementation of a teichoic acid mutant. *Appl Environ Microbiol* **67**: 403-410.
- Brown, E.D. (2005) Conserved P-loop GTPases of unknown function in bacteria: an emerging and vital ensemble in bacterial physiology. *Biochem Cell Biol* **83**: 738-746.
- Brown, E.D., and Wright, G.D. (2005) New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chem Rev* **105**: 759-774.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., and Emili, A. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli. *Nature* **433**: 531-537.
- Campbell, T.L., Ederer, C.S., Allali-Hassani, A., and Brown, E.D. (2007) Isolation of the rstA gene as a multicopy suppressor of YjeE, an essential ATPase of unknown function in Escherichia coli. *J Bacteriol* **189**: 3318-3321.

- Crowther, L.J., Yamagata, A., Craig, L., Tainer, J.A., and Donnenberg, M.S. (2005) The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. *J Biol Chem* **280**: 24839-24848.
- Dam, J., and Schuck, P. (2004) Calculating sedimentation coefficient distributions by direct modeling of sedimentation velocity concentration profiles. *Methods Enzymol* **384**: 185-212.
- Fang, G., Rocha, E., and Danchin, A. (2005) How essential are nonessential genes? *Mol Biol Evol* **22**: 2147-2156.
- Freiberg, C., Wieland, B., Spaltmann, F., Ehlert, K., Brotz, H., and Labischinski, H. (2001) Identification of novel essential *Escherichia coli* genes conserved among pathogenic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 483-489.
- Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2004) 'Conserved hypothetical' proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic Acids Res* **32**: 5452-5463.
- Gentile, F., Amodeo, P., Febbraio, F., Picaro, F., Motta, A., Formisano, S., and Nucci, R. (2002) SDS-resistant active and thermostable dimers are obtained from the dissociation of homotetrameric beta-glycosidase from hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* in SDS. Stabilizing role of the A-C intermonomeric interface. *J Biol Chem* **277**: 44050-44060.
- Geourjon, C., Orelle, C., Steinfels, E., Blanchet, C., Deleage, G., Di Pietro, A., and Jault, J.M. (2001) A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem Sci* **26**: 539-544.
- Hu, Z., Saez, C., and Lutkenhaus, J. (2003) Recruitment of MinC, an inhibitor of Z-ring formation, to the membrane in *Escherichia coli*: role of MinD and MinE. *J Bacteriol* **185**: 196-203.

- Hunt, A., Rawlins, J.P., Thomaidis, H.B., and Errington, J. (2006) Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **152**: 2895-2907.
- Jault, J.M., Di Pietro, A., Falson, P., and Gautheron, D.C. (1991) Alteration of apparent negative cooperativity of ATPase activity by alpha-subunit glutamine 173 mutation in yeast mitochondrial F1. Correlation with impaired nucleotide interaction at a regulatory site. *J Biol Chem* **266**: 8073-8078.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S.C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L.C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S.K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S.J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C.R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M.F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mael, C., Meima, R., Mellado, R.P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H.M., Rapoport, G., Rawlins, J.P., Rivas, L.A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H.H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J.F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H.B., Vagner, V., van Dijk, J.M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., and Ogasawara, N. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678-4683.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I., and Aravind, L. (2000) Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem* **54**: 245-275.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langen, H., Takacs, B., Evers, S., Berndt, P., Lahm, H.W., Wipf, B., Gray, C., and Fountoulakis, M. (2000) Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* **21**: 411-429.
- Lupas, A.N., and Martin, J. (2002) AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 746-753.
- Park, J., Lappe, M., and Teichmann, S.A. (2001) Mapping protein family interactions: intramolecular and intermolecular protein family interaction repertoires in the PDB and yeast. *J Mol Biol* **307**: 929-938.
- Peters, K., and Richards, F.M. (1977) Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. *Annu Rev Biochem* **46**: 523-551.
- Prossnitz, E., Nikaido, K., Ulbrich, S.J., and Ames, G.F. (1988) Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **263**: 17917-17920.
- Roberts, R.J. (2004) Identifying protein function--a call for community action. *PLoS Biol* **2**: E42.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**: 430-434.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**: 1606-1619.
- Skare, J.T., Ahmer, B.M., Seachord, C.L., Darveau, R.P., and Postle, K. (1993) Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* **268**: 16302-16308.

- Speed, M.A., Wang, D.I., and King, J. (1995) Multimeric intermediates in the pathway to the aggregated inclusion body state for P22 tailspike polypeptide chains. *Protein Sci* **4**: 900-908.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., and Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**: 33-36.
- Teixeira de Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1997) Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments. *J Biotechnol* **59**: 117-126.
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Tordova, M., Thanki, N., Bonander, N., Eisenstein, E., Howard, A.J., and Gilliland, G.L. (2002) Crystal structure of the YjeE protein from *Haemophilus influenzae*: a putative Atpase involved in cell wall synthesis. *Proteins* **48**: 220-226.
- Tsui, H.C., Zhao, G., Feng, G., Leung, H.C., and Winkler, M.E. (1994) The mutL repair gene of *Escherichia coli* K-12 forms a superoperon with a gene encoding a new cell-wall amidase. *Mol Microbiol* **11**: 189-202.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Wong, I., Moore, K.J., Bjornson, K.P., Hsieh, J., and Lohman, T.M. (1996) ATPase activity of *Escherichia coli* Rep helicase is dramatically dependent on DNA ligation and protein oligomeric states. *Biochemistry* **35**: 5726-5734.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Growth of wild-type and *ydiB* depleted cells in liquid media. Wild-type (○) and disrupted mutant (□) strains were grown overnight on LB plates and used to inoculate LB media. Growths were followed at 30 °C for 26 h. Conditional knock out mutant was similarly grown in the presence of 2% xylose (■), 0.02% xylose (●) or no xylose (▲). The inset shows a western blot of *B. subtilis* lysates of wild-type (wt) and disrupted mutant (ko) revealed by anti-YdiB antibodies. A control using anti-TagD antibodies (Tag D is involved in the biosynthesis of cell wall teichoic acid of *B. subtilis*; {Bhavsar, 2001 #43}) was also performed.

Figure 2. SDS-PAGE analysis of fractions obtained at different stages of YdiB_(his6) purification. Crude extract obtained after over-expression of YdiB (lane 1); soluble and insoluble fractions obtained after a low-speed centrifugation of the crude extract (9 000 g for 30 min, lane 2 and 3, respectively); anion exchange chromatography flow through, (lane 4); wash from the anion exchange chromatography (lane 5); elution from the anion exchange chromatography (lane 6); nickel-agarose chromatography flow through, (lane 7); wash from the nickel-agarose chromatography (lane 8); elution from the nickel-agarose chromatography, (lane 9). The size (in kDa) and the position of molecular weight markers are indicated on the left.

Figure 3. Oligomerisation of YdiB. A, Size-exclusion chromatography on a Superdex 75 column (Pharmacia) of purified YdiB. The column was equilibrated in 50 mM Hepes/KOH, pH 7.5 and 50 mM NaCl. 500 µl of protein was loaded onto the column and fractions of 0.5 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min. Arrows indicate the void volume, V_0 (calibrated with dextran blue), and the elution peak of molecular weight standards: ovalbumin

(43 kDa), and chymotrypsinogen (25 kDa). Peak *a* corresponds to a mixture of high oligomeric forms and probably dimers of YdiB (the molecular weight of the dimer is ~ 40 kDa); peak *b* corresponds to the expected elution time of the monomer (~ 20 kDa). **B**, aliquots of the indicated fractions were resolved on a 14% SDS-PAGE stained with Coomassie blue. **C**, aliquots of the same fractions as in **B** were analysed by western blotting with the anti-his antibody. In panel **B** and **C**, positions of molecular weight markers and their size (in kDa) are indicated on the left and the electrophoretic mobilities of the monomer (M) and dimer (D) of YdiB are indicated on the right. **D**, Aliquots of the same fractions as in **B** were analysed by native gel electrophoresis and, after migration, the bands were stained by Coomassie Blue. Please, note that this type of electrophoresis, migrated in the absence of Coomassie Blue, does not allow the use of molecular weights markers (Speed *et al.*, 1995).

Figure 4. Effect of increasing concentrations of NaCl on the monomer/oligomer equilibrium. After a prior incubation of YdiB for 5 min at 23 °C in 50 mM Hepes/KOH, pH 7.5 with increasing concentrations of NaCl (20 mM, black solid line; 50 mM, black dotted line; 100 mM, grey solid line; and 300 mM, grey dotted line), the molecular species were resolved by size-exclusion chromatography as in figure 3, except that the column was pre-equilibrated with the same buffer as that used for the injected sample.

Figure 5. Sedimentation velocity experiments and sedimentation distribution profile of YdiB. The sedimentations of YdiB were analyzed with a Beckman-Coulter XL-A analytical ultracentrifuge. **A**, a typical trace of optical density obtained at 280 nm of YdiB during sedimentation velocity experiments; the protein concentration was 1.2 mg/mL in 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5) and 500 mM NaCl. Experimental data obtained in **A** were fitted using the Lamm equation by the SEDFIT program (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>)

and the residuals are shown in panel **B**. The fitted curves were used to calculate the sedimentation coefficient distribution of the enzyme (panel **C**).

Figure 6. Effect of ionic strength on the quaternary structure of YdiB. The sedimentations of YdiB (1.2 mg/ml) were analysed by analytical ultracentrifugation as in figure 5, using various concentrations of NaCl as indicated and proportions of each species were estimated by integration of their corresponding peak. The species are as follows: monomers (●), dimers (□), tetramers (■), and oligomers of higher molecular weights (○).

Figure 7. Characterisation of the ATPase activity of the monomeric fraction of YdiB. **A**, ATPase activity of 130 µg of wild-type YdiB (plain line) or K41A variant (dotted line) was measured in the presence of 100 µM ATP and 100 µM MgCl₂, following the disappearance of NADH at 340 nm using an enzymatic-coupled assay system (see Experimental Procedures). The GTPase activity (1 mM GTP-Mg instead of ATP-Mg) was also monitored for the wild-type YdiB (dashed line). **B**, ATPase activity as a function of the ATP concentration; 145 µg (10 µM) of YdiB from the monomeric fraction were used. The data were fitted to the Michaelis-Menten equation using the GraFit software allowing the determination of the kinetic parameters: $K_M = 62.1 \pm 4.6 \mu\text{M}$ and $V_{\text{max}} = 10.5 \pm 0.17 \text{ nmol ATP hydrolysed/min/mg proteins}$ ($k_{\text{cat}} \sim 10 \text{ h}^{-1}$). The inset shows the Lineweaver-Burk plot ($1/v = f(1/[ATP])$) of the data with the fitted curve. One set of data is shown here but similar results were obtained from three independent experiments.

Figure 8. YjeE from *E. coli* forms oligomers *in vitro*. 5 µg of pure recombinant YdiB from *B. subtilis* obtained before gel filtration or 5 µg of pure recombinant YjeE from *E. coli*

obtained as previously described (Allali-Hassani *et al.*, 2004) were loaded onto a native PAGE as in Figure 3D and, after migration, the bands were stained by Coomassie Blue.

Figure 9. YjeE forms oligomers *in vivo*. Detection of YjeE in strain EB 437 cross-linked *in vivo* for the indicated time with 1% formaldehyde and revealed by Western blotting using anti-YjeE antibodies. The 60 min sample, lane 4, was heated at 95 °C for 20 min to release the cross-links prior to SDS-PAGE electrophoresis. Lane 1 shows strain EB 437 not submitted to the formaldehyde pre-treatment. Positions of molecular weight markers and their size in kDa are indicated on the left. Positions of monomers (M), dimers (D) and possibly tetramers (T) are indicated on the right.

Figure 10. Conservation of residues in the sequence and in the 3-D structure of YjeE. **A**, the panel was drawn using the Conseq server (<http://conseq.bioinfo.tau.ac.il>); the sequence of YjeE from *H. influenzae* was used as a query and 200 sequences of closest orthologues (including notably YdiB) were used to generate the alignment and calculate a conservation score for each residue. **B** and **C**, panels were drawn using the Consurf server (<http://consurf.tau.ac.il/>) with the 3-D structure of YjeE from *H. influenzae* (PDB code : 1HTW), and the results were visualised using the FirstGlance in Jmol server (<http://molvis.sdsc.edu/fgij/index.htm>). The conserved residues proposed here to belong to the interface between two subunits are indicated in panel **B** and are marked by a green star underneath the sequence in panel **A**. Part of the ADP molecule is also shown in **B** and **C** (in ball and sticks representation, coloured by atoms and surrounded by a dotted-shell) as the nucleotide-binding site forms a groove partially shielded by the view used here. The colour-coded used was the same for the three panels.

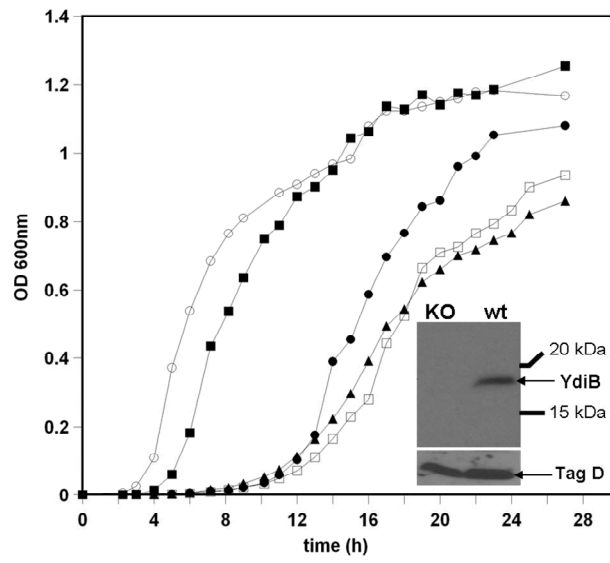


Figure 1

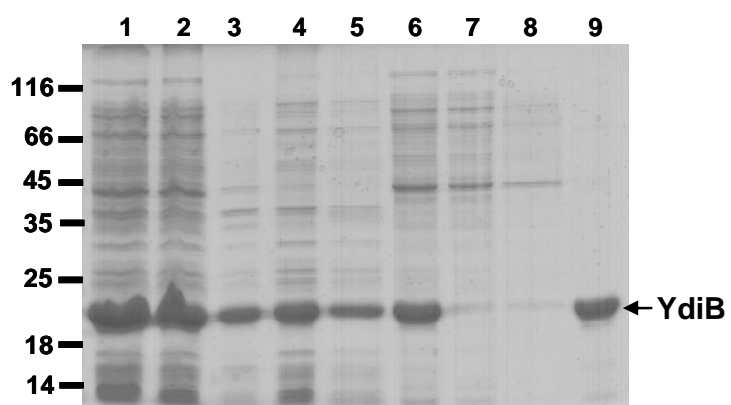


Figure 2

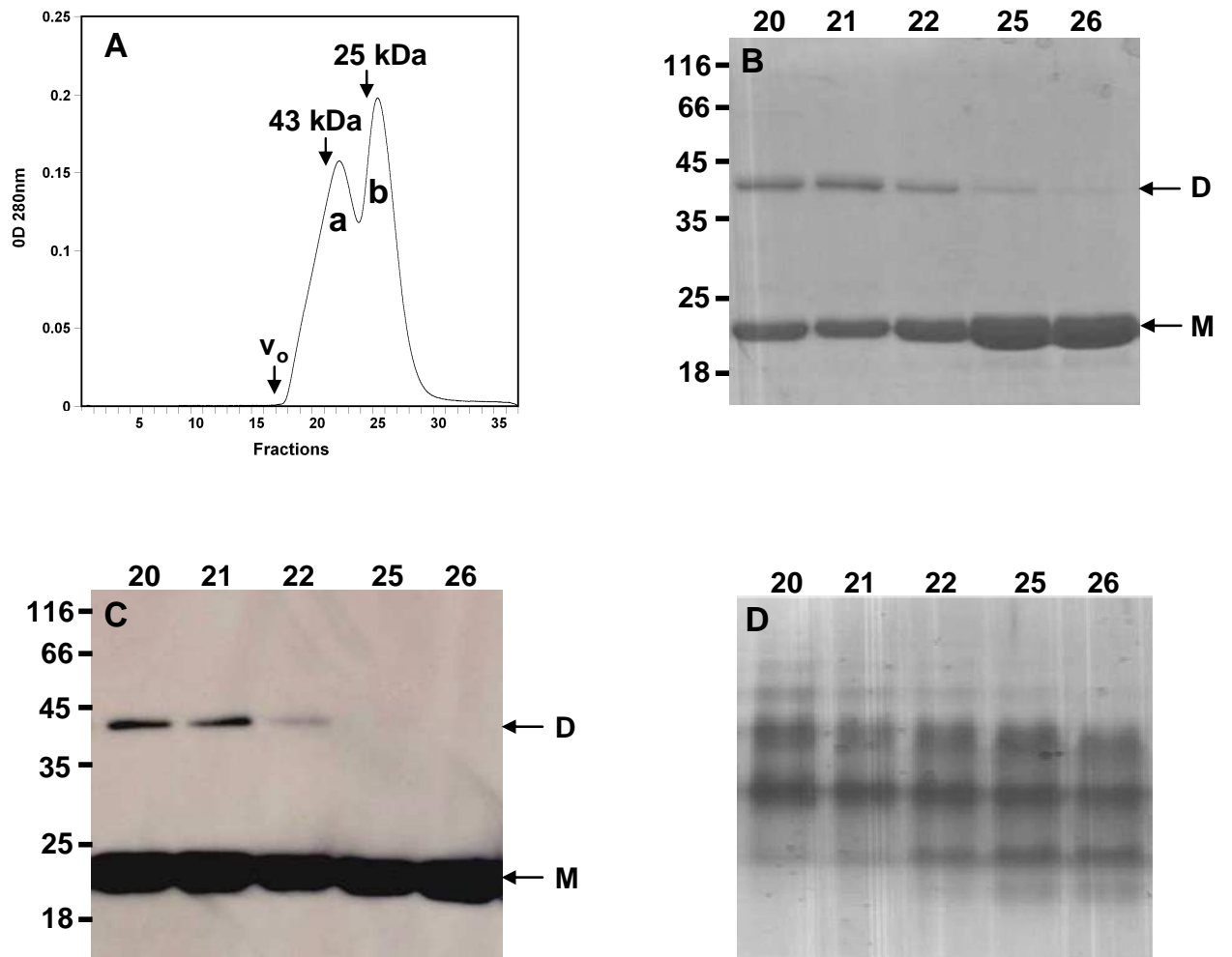


Figure 3

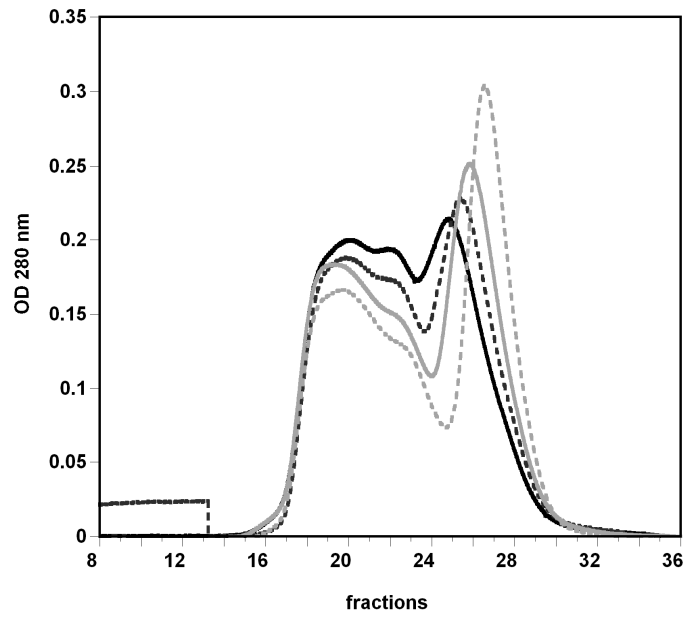


Figure 4

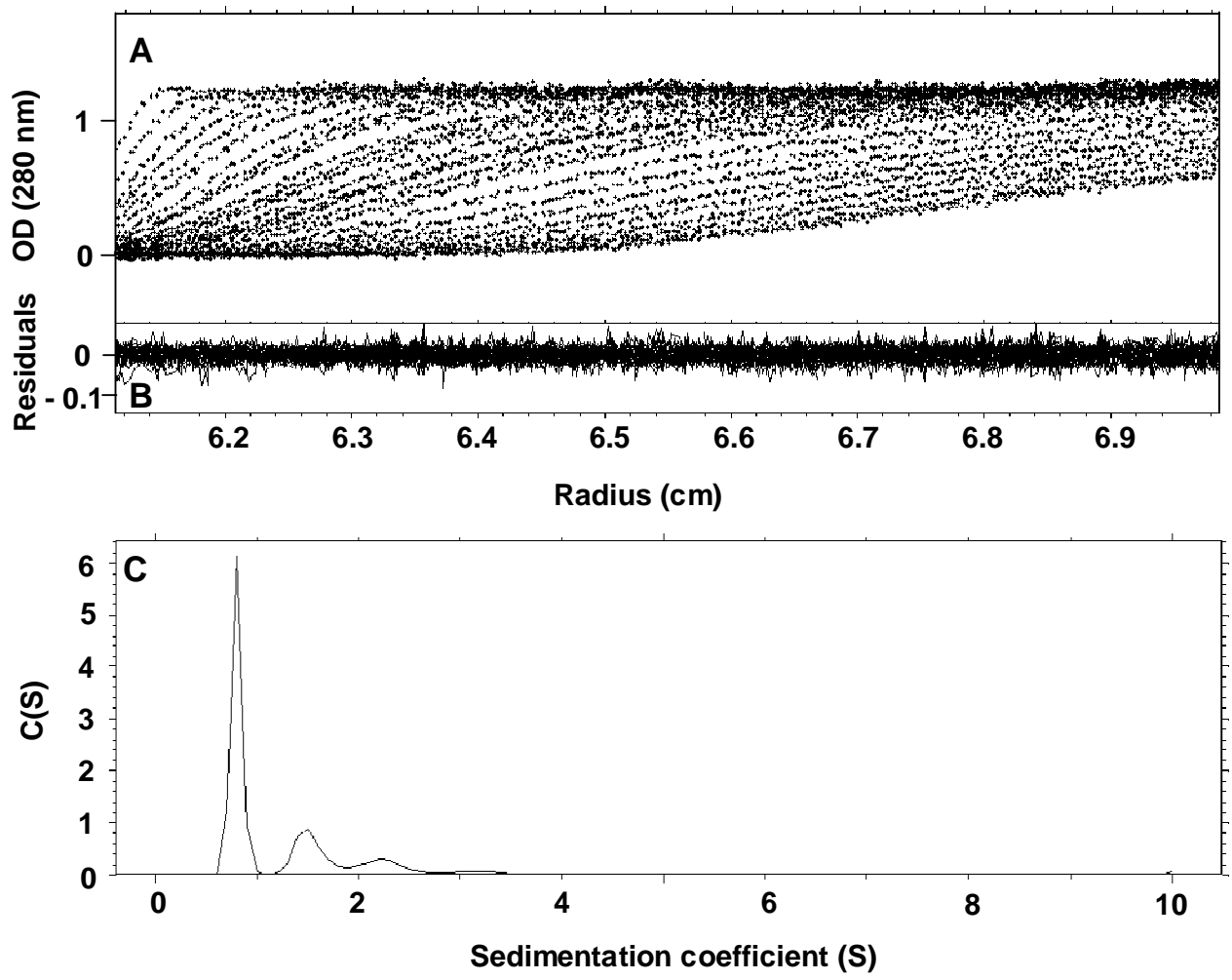


Figure 5

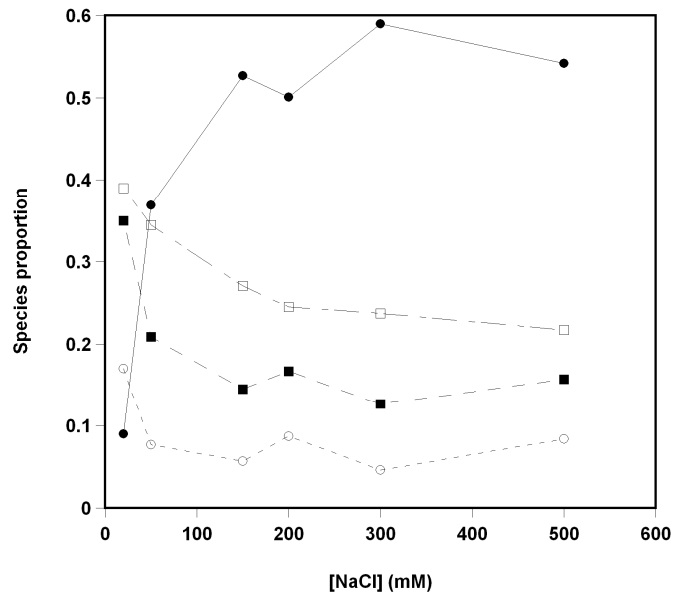


Figure 6

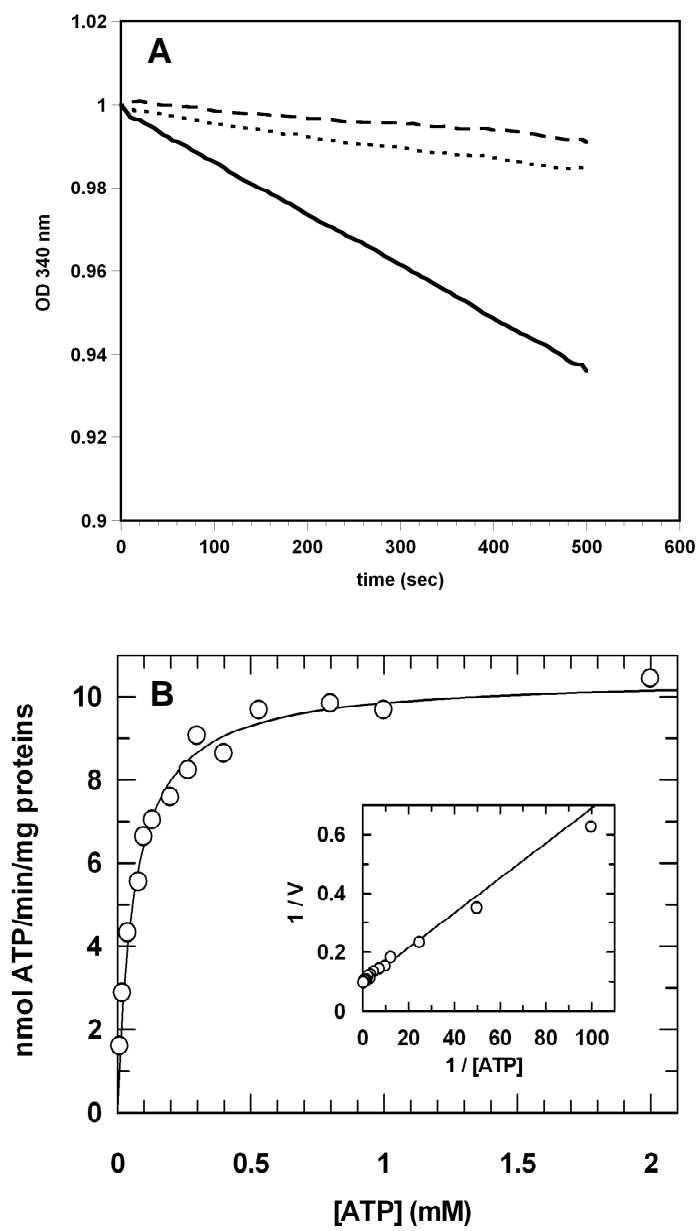


Figure 7



Figure 8

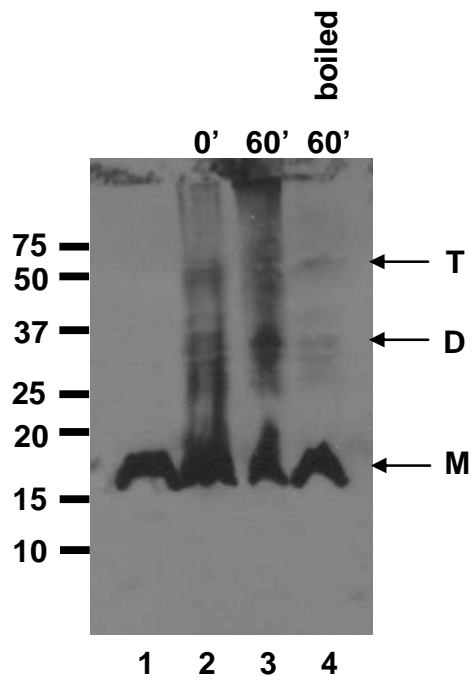
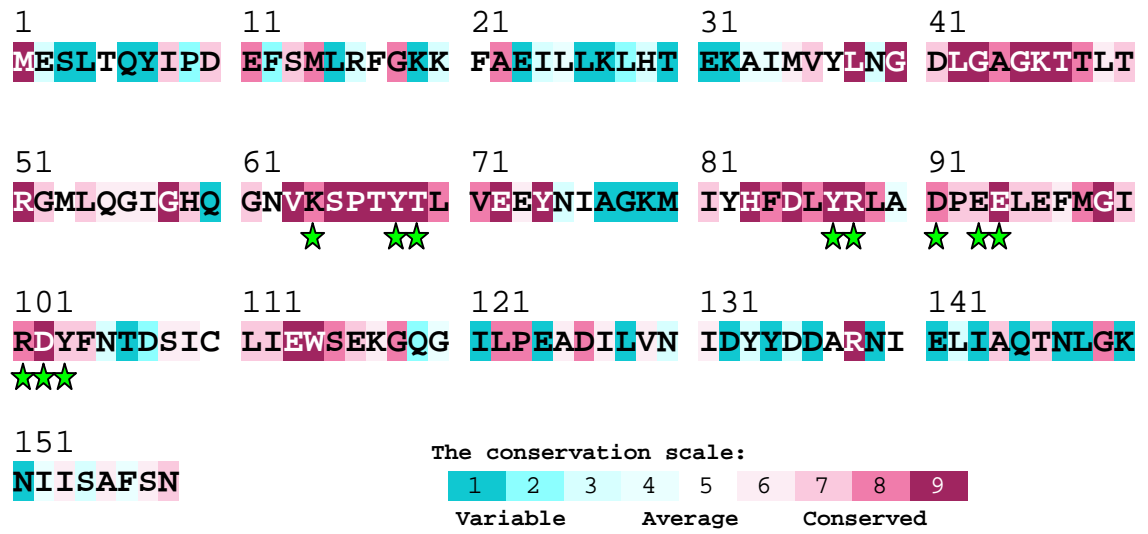
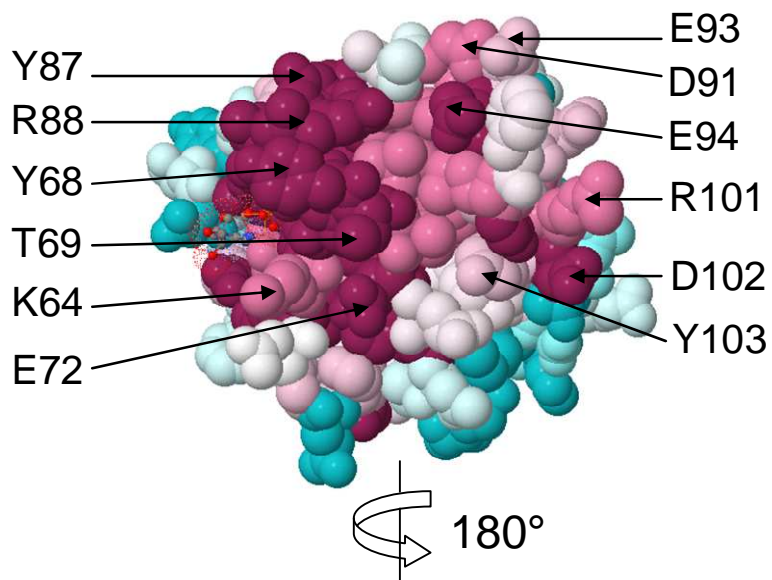


Figure 9

A



B



C

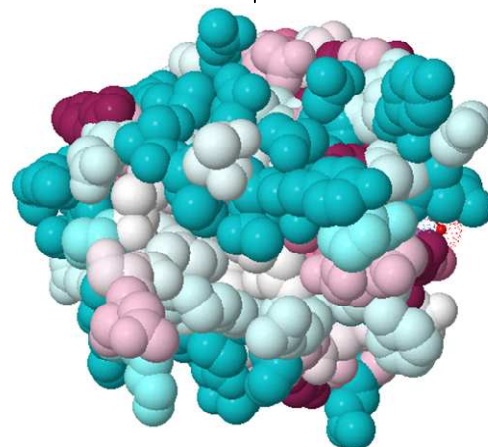


Figure 10

***COMMUNICATIONS A DES CONGRES
SCIENTIFIQUES***

« Study of a novel bacterial enzyme, YdiB. » Johanna C. Karst, Tracey L. Campbell, Anne-Emmanuelle Foucher, Chand S. Mangat, Jean-Michel Jault & Eric D. Brown. **56th Annual Conference Canadian Society of Microbiologists, London, Canada** (18-21 juin 2006).

« Etude d'une nouvelle enzyme bactérienne. » Johanna C. Karst, Tracey L. Campbell, Anne-Emmanuelle Foucher, Chand S. Mangat, David Stroebel, Christine Ebel, Eric D. Brown & Jean-Michel Jault. **Journée de l'IBS, Grenoble, France** (20 avril 2007).

« Etude d'une nouvelle enzyme bactérienne. » Johanna C. Karst, Tracey L. Campbell, Anne-Emmanuelle Foucher, Chand S. Mangat, David Stroebel, Christine Ebel, Eric D. Brown & Jean-Michel Jault. **Journée de l'EDCSV, Grenoble, France** (12 juin 2007).

« Characterization of *B. subtilis* YdiB, a new class of bacterial enzyme. » Johanna C. Karst, Tracey L. Campbell, Anne-Emmanuelle Foucher, Chand S. Mangat, David Stroebel, Christine Ebel, Eric D. Brown & Jean-Michel Jault. **4th Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms (14th International Conference on Bacilli), Pise, Italie** (24-28 juin 2007).