



HAL
open science

L'import de l'adénosine monophosphate cyclique chez **Escherichia coli**

Claire Villiers

► **To cite this version:**

Claire Villiers. L'import de l'adénosine monophosphate cyclique chez Escherichia coli. Microbiologie et Parasitologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV034 . tel-01555577

HAL Id: tel-01555577

<https://theses.hal.science/tel-01555577>

Submitted on 4 Jul 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Claire VILLIERS** »

Thèse dirigée par « **Hans GEISELMANN** »

préparée au sein du **Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

L'import de l'adénosine monophosphate cyclique chez *Escherichia coli*.

Thèse soutenue publiquement le **15 octobre 2013**,
devant le jury composé de :

Mr. Marc SAVASTA

Directeur de recherche, INSERM, Président

Mme. Ariane TOUSSAINT

Professeur, Université Libre de Bruxelles, Rapporteur

Mr. Michael CHANDLER

Directeur de recherche, CNRS, Rapporteur

Mme. Cécile WANDERSMAN

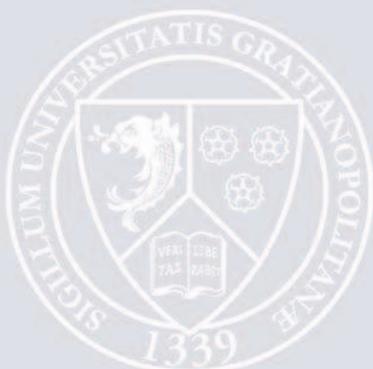
Professeur, Institut Pasteur, Paris, Membre

Mme. Delphine ROPERS

Chargée de Recherche, INRIA, Membre

Mr. Hans GEISELMANN

Professeur, UJF, Directeur de thèse



Remerciements

En cette fin de thèse, je tiens à remercier tout particulièrement Hans Geiselman pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Il a su me faire confiance et m'a permis d'aller au bout de ce grand défi qu'est un doctorat. Il m'a appris à gérer un projet de A à Z avec toute l'indépendance dont j'avais besoin tout en restant disponible à chaque fois que je le sollicitais. Sa passion pour la microbiologie a été une source inépuisable pour faire avancer mes travaux.

Je remercie aussi Marc Savasta pour son soutien inébranlable au début de cette thèse et qui a su, lui aussi, me faire confiance. Je le remercie également de bien vouloir présider mon Jury de thèse.

Je remercie Ariane Toussaint et Micheal Chandler pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux. Tout comme je remercie Delphine Ropers et Cécile Wandersman pour avoir accepté d'évaluer ces travaux en tant qu'examineurs.

Si cette thèse a pu se dérouler dans d'aussi bonnes conditions c'est grâce à toute une équipe formidable et soudée. Je remercie Corinne pour ses nombreux conseils techniques. Tout comme je la remercie, ainsi que Caroline et Babeth, pour leur présence et les discussions scientifiques ou non qu'on pouvait avoir. Je remercie Stephan pour ses conseils scientifiques avisés. Je remercie toute la bande de joyeux drilles du bureau : Stéphane, Julien, Guillaume, Jérôme, Omayya, Mathieu, Clément, Pierre, Cindy, Sevcan, Chloé et tout ceux qui sont passés par là et que j'oublie honteusement, pour avoir mis une sacrée ambiance dans le bureau et sans qui, je n'aurais certainement pas autant rigolé ! Je remercie également Léo pour avoir fait de nombreuses manip sur mon projet durant cet été. Je remercie Christiane pour avoir toujours répondu présente quand j'avais besoin de matériel ou de milieu. Je remercie Nicole Kopczynski, Anna Cova et Natalie Camerino pour leur efficacité.

Je remercie toute l'équipe IBIS pour m'avoir rappelée que j'avais commencé mes études par un parcours biologie-informatique. Finalement, je crois que j'ai fait le bon choix en me centrant sur la biologie, vos formules magiques sont toujours un peu obscures pour moi mais c'était un réel plaisir de voir les choses d'un autre point de vu. Alors merci à Delphine, Hidde, Diana, Edith, Valentin, Nils, Sara, Eugenio et tous les autres.

Je remercie également Delphine Ropers et Cécile Wandersman pour avoir accepté de faire partie de mon Comité de Suivi de Thèse pendant ces 3 ans. Vos conseils et questions m'ont permis d'avancer dans ce travail.

Je remercie de tout cœur Caroline, David et Dalil pour leur soutien lors de ma première année.

Mais une thèse n'est pas un long fleuve tranquille et je ne serais certainement pas arriver au bout si je n'avais pas eu le soutien inconsideré de ma famille. Alors je tiens à remercier mes parents, le Ch'ti Flo et ma Choucroute préférée pour leur réconfort et leur présence de tous les instants.

Pour finir, je tiens à dire un grand merci à Rémi. Il m'a soutenue, supportée et encouragée tous les jours de ce doctorat. Il était là quand tout allait bien et quand un coup de blues faisait son apparition. Alors un grand merci à toi qui savait me redonner courage et sourire.

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE.....	3
TABLE DES FIGURES.....	7
Liste des Tableaux	11
TABLE D'ABREVIATIONS	13
I- INTRODUCTION.....	15
I.1 GENERALITES	17
I.1.1 <i>Escherichia coli</i>	17
I.1.2 <i>Membrane cellulaire</i>	21
I.1.3 <i>Les systèmes de transport</i>	26
I.1.3.a <i>La simple diffusion</i>	27
I.1.3.b <i>La diffusion facilitée</i>	27
I.1.3.c <i>Le transport actif</i>	28
I.2 LE SYSTEME DE TRANSPORT OPP	31
I.2.1 <i>La découverte du transporteur Opp</i>	31
I.2.2 <i>Fonctionnement du transporteur Opp</i>	33
I.2.3 <i>Régulation de l'expression de l'opéron opp</i>	38
I.2.4 <i>Rôle du système Opp chez les bactéries</i>	41
I.3 ADENOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE	45
I.3.1 <i>Découverte de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc)</i>	45
I.3.2 <i>Le complexe CRP-AMPc</i>	46
I.3.3 <i>Les gènes régulés par le complexe CRP-AMPc</i>	54
I.3.4 <i>Régulation de la concentration intracellulaire d'AMPc</i>	55
I.3.5 <i>Transport d'AMPc</i>	59
II- MATERIELS ET METHODES	63
II.1 MATERIELS.....	65
II.1.1 <i>Souches utilisés</i>	65
II.1.2 <i>Plasmides utilisés</i>	66
II.1.3 <i>Amorces utilisées :</i>	66
II.1.4 <i>Milieu de culture</i>	67
II.1.5 <i>Sources de carbone</i>	67
II.1.6 <i>Antibiotiques</i>	68
II.1.7 <i>Produits chimiques</i>	68
II.2 METHODES	69
II.2.1 <i>Culture bactérienne</i>	69

II.2.2	<i>Transformation des bactéries</i> :	69
II.2.3	<i>Création d'une banque de mutants</i> :	69
II.2.4	<i>Criblage sur rouge Congo</i> :	70
II.2.5	<i>Détection de luminescence avec la caméra</i> :	70
II.2.6	<i>Suivi de la production de la fluorescence, de la luminescence ou de la croissance bactérienne</i> :	70
II.2.7	<i>Identification des mutants : 2 protocoles ont été utilisés</i>	71
II.2.8	<i>Transduction</i>	71
II.2.9	<i>Biologie moléculaire</i>	72
II.2.10	<i>Purification protéique</i>	72
II.2.10.a	<i>Surexpression protéique</i>	72
II.2.10.b	<i>Extraction protéique</i>	73
II.2.10.c	<i>Purification protéique</i>	73
II.2.11	<i>Dialyse protéique</i>	73
II.2.12	<i>Mesure de la fluorescence émise par l'ϵ-AMPc ou OppA</i>	74
III-	OBJECTIF	75
IV-	STRATEGIE	79
V-	RESULTATS	85
V.1	IDENTIFICATION D'UNE PROTEINE CANDIDATE A L'IMPORT D'AMPc	87
V.1.1	<i>Stratégie d'identification du gène codant pour la protéine responsable de l'import d'AMPc</i> .	87
V.1.2	<i>Création d'une banque de mutants</i>	89
V.1.3	<i>Criblage de mutant candidats à l'import d'AMPc</i>	91
V.1.3.a	<i>Production de luminescence en milieu solide</i>	91
V.1.3.b	<i>Croissance sur maltose</i>	92
V.1.3.c	<i>Coloration au rouge Congo</i>	94
V.1.3.d	<i>Production de luminescence en milieu liquide</i>	95
V.1.3.e	<i>Analyse des résultats des différents cribles</i>	96
V.1.4	<i>Identification des mutants d'intérêt</i>	99
V.2	TESTS PHENOTYPIQUES.....	107
V.2.1	<i>Reconstruction du mutant</i>	107
V.2.2	<i>Complémentation du double mutant</i>	115
V.3	TESTS BIOCHIMIQUES.....	121
V.3.1	<i>Stratégie de l'étude biochimique de l'interaction entre OppA et l'AMPc</i>	121
V.3.2	<i>Démonstration de l'interaction entre OppA et l'AMPc</i>	123
V.3.2.a	<i>Titration d'OppA par l'AMPc fluorescent</i>	123
V.3.2.b	<i>Titration de l'AMPc par la protéine OppA</i>	129
V.3.2.c	<i>Interaction en condition équimolaire</i>	132
V.3.2.d	<i>Nouvelle purification de la protéine OppA</i>	134
V.4	POUR ALLER PLUS LOIN	139
V.4.1	<i>La protéine TolC</i>	139

V.4.2	<i>Autres importateurs d'AMPc</i>	142
V.4.2.a	NupC et NupG	142
V.4.2.b	DppA	144
VI-	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	149
VII-	ANNEXES	163
	ANNEXE 1 : SYSTEME RAPPORTEUR	165
	ANNEXE 2 : RESULTATS OBTENUS AUX DIFFERENTS CRIBLES	167
	ANNEXE 3 : IDENTIFICATION DES MUTANTS OPPA	175
	ANNEXE 4 : EXPRESSION DE DIFFERENTS TRANSPORTEURS EN PRESENCE DE TRIALANINE	177
VIII-	BIBLIOGRAPHIE	181

Table des figures

Figure I-1: Le professeur Theodor Escherich.	17
Figure I-2 : Relation phylogénétique entre diverses souches d'<i>Escherichia coli</i>.	19
Figure I-3 : <i>Escherichia coli</i>.	20
Figure I-4 : La membrane cellulaire.	22
Figure I-5 : Exemple de coloration de Gram.	23
Figure I-6 : Les peptidoglycanes.	24
Figure I-7 : La membrane externe.	25
Figure I-8 : Exemple de transporteur de type ABC.	29
Figure I-9 : Organisation des gènes des systèmes Opp chez différentes espèces.	33
Figure I-10 : Structure du complexe Opp.....	34
Figure I-11 : Structure de la protéine périplasmique OppA ayant fixé une trilysine.	35
Figure I-12 : régulation de l'opéron opp.	40
Figure I-13 : Adénosine monophosphate cyclique.....	45
Figure I-14 : Schématisation de la protéine CRP liée à de l'AMPc.....	47
Figure I-15 : Séquence consensus du site de fixation de CRP.	48
Figure I-16 : Interaction entre la protéine CRP et l'ARN polymérase.....	51
Figure I-17 : Complexe CRP-ADN.....	51
Figure I-18 : Régulation de l'expression de gènes par le complexe CRP-AMPc.	53
Figure I-19 : La concentration d'AMPc est reliée à la présence de glucose.	56
Figure I-20 : Interaction entre l'adénylate cyclase et le PTS.	57
Figure I-21 : Régulation de la concentration intracellulaire d'AMPc.....	59
Figure I-22 : Export de molécule par le système TolC.	60
Figure IV-1 : Construction des mutants de la collection Keio.....	81
Figure IV-2 : Mécanisme de transposition.....	83
Figure V-1 : Production de lumière des clones <i>cyaA</i> ⁻	89
Figure V-2 : Plasmide pSC189.....	90
Figure V-3 : Collection de mutants.	91
Figure V-4 : Crible sur gélose.	94
Figure V-5 : Crible sur rouge Congo.	95
Figure V-6 : Cinétique de production de lumière par les mutants.	96
Figure V-7 : Identification des mutants d'intérêt.	100

Figure V-8 : Amplification des mutants 1.4 ; 1.5 ; 1.15 et 1.47 afin de les identifier.	101
Figure V-9 : Vérification des mutations dans la souche <i>cyaA⁻oppA⁻</i>	108
Figure V-10 : Production de lumière chez des mutants.	109
Figure V-11 : Croissance sur maltose des souches <i>cyaA⁻</i> et <i>cyaA⁻oppA⁻</i>	110
Figure V-12 : Vérification des doubles mutants.	112
Figure V-13 : Production de lumière par les doubles mutants.	113
Figure V-14 : Production de lumière par le mutant <i>cyaA⁻oppA⁻</i>	114
Figure V-15 : Production de lumière après complémentation par <i>cyaA</i>	115
Figure V-16 : Croissance sur maltose après complémentation par <i>cyaA</i>	117
Figure V-17 : Croissance et production de lumière en présence de trialanine.	119
Figure V-18 : Production de lumière en présence de casamino acides.	120
Figure V-19 : Structure de la molécule d' ϵ -AMPc.	121
Figure V-20 : Fluorescence de l' ϵ -AMPc en présence ou absence de protéine.	122
Figure V-21 : Fluorescence de ϵ -AMPc en présence de CRP.	122
Figure V-22 : Purification de la protéine OppA.	123
Figure V-23 : Fluorescence du tampon après dialyse.	124
Figure V-24 : Comparaison de la fluorescence émise par l' ϵ -AMPc en présence et en absence d'OppA.	126
Figure V-25 : Fluorescence d' ϵ -AMPc en présence d'AMPc.	127
Figure V-26 : Fluorescence d' ϵ -AMPc en présence de trilysine.	128
Figure V-27 : Fluorescence d'OppA.	129
Figure V-28 : Fluorescence d'OppA en présence de 12 μ M d'AMPc.	130
Figure V-29 : Différence de fluorescence d'OppA en présence et en absence d'AMPc.	131
Figure V-30 : Modification de la fluorescence par ajout d'OppA.	133
Figure V-31 : Fluorescence d'OppA en présence de trilysine.	135
Figure V-32 : Fluorescence d'OppA en présence d'AMPc.	136
Figure V-33 : Modification de la fluorescence de la BSA en présence d'AMPc.	137
Figure V-34 : Croissance sur maltose du clone <i>cyaA⁻tolC⁻</i>	140
Figure V-35 : Luminescence de la souche <i>cyaA⁻tolC⁻</i>	141
Figure V-36 : Croissance et production de luminescence par les mutants <i>cyaA⁻ nupC/G⁻</i>	143
Figure V-37 : Croissance et production de luminescence par les mutants <i>cyaA⁻ nupC/G⁻</i>	144
Figure V-38 : Croissance et luminescence du mutant <i>cyaA⁻dppA⁻</i>	145
Figure V-39 : Croissance et luminescence du mutant <i>cyaA⁻oppA⁻</i> en présence d'AMPc et de trialanine.	146

Figure V-40 : Croissance et expression du gène <i>dppA</i>	148
Figure VI-1 : Les mutants 1.87 et 2.5.	153

Liste des tableaux

Tableau II-1 : Souches utilisées lors de ces travaux.....	65
Tableau II-2 : Plasmides utilisés au cours de ces travaux	66
Tableau II-3 : Amorces utilisées au cours de ces travaux	66
Tableau V-1 : Score donné pour chaque condition de crible	97
Tableau V-2 : mutants pré-sélectionnés à la fin des différents cribles.....	98
Tableau V-3 : Identification des mutants d'intérêt.....	102

Table d'abréviations

ABC : ATP-binding cassette

ADN : Acide DésoxyriboNucleique

AMPc : 3',5'-Adenosine MonoPhosphate cyclique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

aTc : anhydrotétracycline, inducteur du promoteur tet

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAP : Catabolite gene Activator Protein (=CRP)

CRP : cAMP receptor protein (=CAP)

CSF : Competence and sporulation factor

Dpp : transporteur de dipeptide

ϵ -AMPc : 1, N⁶- Ethenoadenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate

E. coli : *Escherichia coli*, bactérie de référence lors de cette étude

GFP : Green Fluorescence Protein

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MCS : Multiple Cloning Site

Opp : système de transport d'oligopeptides

ORF : Open Reading Frame

pb : paire de base

PEP : PhosphoEnol Piruvate

PPi : groupe diphosphate

PTS : PhosphoTransferase System

wt : wild type, souche sauvage

I-Introduction

I.1 Généralités

I.1.1 Escherichia coli

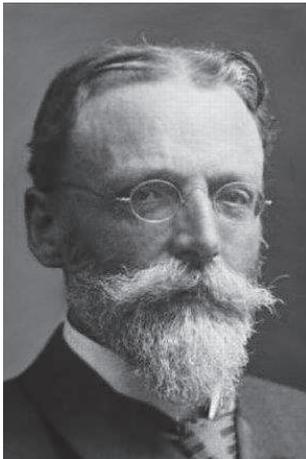


Figure I-1: Le professeur Theodor Escherich.
Il découvre la bactérie *Escherichia coli* en 1886.

Le microorganisme au centre de nos intérêts dans cette étude est une bactérie appelée *Escherichia coli* (*E. coli*). Elle fait partie des cinq espèces appartenant au genre *Escherichia*, à savoir *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. coli*. Cette dernière fut découverte en 1886 par le professeur Theodor Escherich (figure I-1) et pris son nom définitif de *Escherichia* sur proposition de Castellani et Chalmers qui la baptisèrent ainsi en 1919 en l'honneur de son découvreur. C'est en étudiant la digestion chez des nourrissons que le pédiatre germano-autrichien Escherich découvrit la présence de cette bactérie chez l'Homme. En effet, il s'agit de l'une des 500 espèces bactériennes formant le microbiote du tractus digestif humain comme celui de tous les animaux homéothermes. Ces bactéries ne sont pas reconnues comme pathogènes par le système immunitaire de leur hôte grâce au mécanisme de tolérisation mettant en jeu les cellules dendritiques de celui-ci. *E. coli* est présente chez 90% des humains alors que sa fréquence ne dépasse pas 56%, 23% ou même 10% chez les mammifères sauvages, les oiseaux ou les reptiles respectivement (Tenailon et al. 2010). C'est l'une des premières bactéries à coloniser l'intestin du nourrisson.

Cette colonisation permet d'une part à la bactérie d'avoir un apport constant en nutriments, un environnement stable ainsi qu'une protection contre certains stress tout en assurant son transport et sa dissémination. D'autre part, la présence d'*E. coli* dans l'appareil digestif de l'Homme protège celui-ci d'autres bactéries qui lui seraient toxiques. On dit qu'*E. coli* est une bactérie commensale de l'Homme.

Il existe, au sein de l'espèce *E. coli*, de très nombreuses souches qui diffèrent par leur contenu en gènes. Chaque hôte possède son propre répertoire d'*E. coli*, certaines souches

pouvant représenter jusqu'à 50% de l'espèce *E. coli* présente dans le tractus digestif. Il y a un renouvellement constant de ces souches qui peuvent rester quelques jours seulement ou quelques mois, voire quelques années dans le tractus digestif (Tenailon et al. 2010).

Cependant, malgré la découverte de cette bactérie qui remonte maintenant à plus d'un siècle et sa très forte présence dans notre quotidien, il a toujours été bien difficile de définir avec précision les différentes souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli*. En effet, cette bactérie est capable d'intégrer dans son génome de l'ADN provenant d'autres souches, voire d'autres espèces. Cet événement peut avoir lieu à partir d'un plasmide (conjugaison), d'un fragment d'ADN (transformation) ou encore d'un phage (transduction). Ceci implique qu'*E. coli* est capable de recombinaison permettant l'insertion ou la délétion de certaines parties de son génome. Ainsi, sur les plus de 4 000 gènes que compte le génome d'*E. coli*, seuls environ 2 000 sont conservés dans toutes les souches appartenant à cette espèce, ces gènes formant le génome « cœur ». Diverses méthodes ont été progressivement mises au point pour définir les différentes populations génétiques présentes en sein de l'espèce *Escherichia coli* (Tenailon et al. 2010) :

- la technique d'identification des antigènes (Kauffmann 1947). Elle est basée sur l'agglutination des bactéries lorsqu'elles sont mises en contact avec un sérum contenant des antigènes dirigés contre certaines des molécules bactériennes. On distingue trois types de molécules reconnues : l'antigène O qui se trouve dans les polysaccharides présents sur la paroi des bactéries (cf. section suivante) ; l'antigène K, lui aussi contenu dans la paroi lorsqu'il est présent, qui rassemble en réalité les antigènes L, A et B ; enfin, l'antigène H qui est une protéine de structure du flagelle.

- l'électrophorèse d'enzymes (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) (Selander et al. 1986). Elle est basée sur le principe qu'une protéine migre sur un gel d'électrophorèse selon sa charge électrique et son poids, ceux-ci étant directement liés à la séquence d'acides aminés constituant la protéine et donc à la séquence ADN codant pour celle-ci. Chaque allèle d'une même protéine migrera donc de façon différente, permettant d'obtenir ainsi un profil appelé ET (electromorph type) spécifique à chaque souche. Cette méthode s'applique à diverses enzymes telles que la glucosyltransférase, la nucléoside phosphatase ou encore la glucose 6-phosphate déshydrogénase.

- le multilocus sequence typing (MLST) (Enright et al. 1999). Il consiste à amplifier certains gènes par PCR avant de les séquencer. On s'intéresse alors principalement à des gènes dits domestiques, présents dans toutes les souches.

- la PCR multiplexe (Clermont et al. 2000). Elle permet d'augmenter le rendement de la précédente technique en détectant plusieurs gènes en une seule PCR.

Ces techniques ont peu à peu permis d'identifier les différentes souches d'*E. coli* et de démontrer les relations qui existent entre ces souches comme le montre l'arbre phylogénétique présenté en figure I-2.

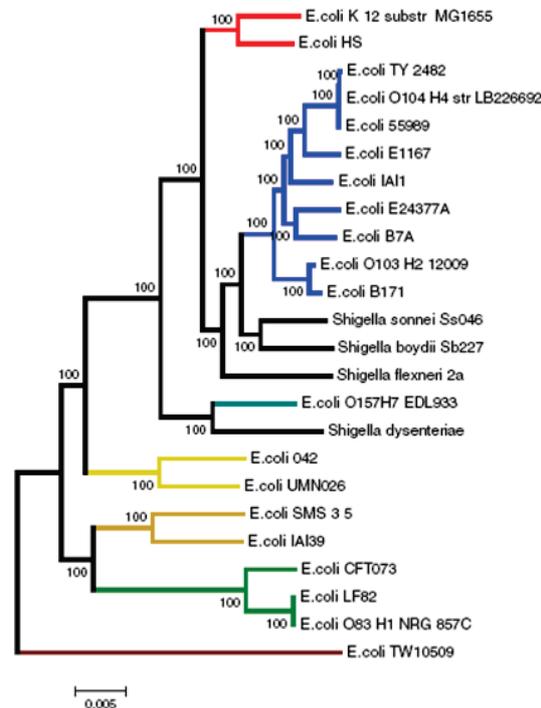


Figure I-2 : Relation phylogénétique entre diverses souches d'*Escherichia coli*.

Comme l'illustre l'arbre phylogénétique présenté ici, le MLST est l'une des techniques qui permet de classifier les différentes souches d'*E. coli*. Les principaux groupes qui ressortent de cette étude sont représentés par différentes couleurs et seules quelques unes des souches d'*E. coli* et *Shigella* sont présentées ici (Chaudhuri et al. 2012).

Bien que cette espèce soit nécessaire à l'Homme pour ne pas être infecté par certains pathogènes tels que *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, etc., il arrive que des souches d'*E. coli* soient à l'origine de graves problèmes de santé (Levine 1987). L'épidémie la plus récente en Europe causée par cette bactérie est celle qui débuta en Allemagne en 2011. 4 137 personnes furent infectées dans les 16 pays touchés et 50 décédèrent des suites de cette contamination (source OMS). Au total, ce sont plus de 2 millions de personnes qui meurent chaque année suite à une infection par *E. coli* (Tenailon et al. 2010)

Six souches pathogènes sont aujourd'hui décrites (Kaper et al. 2004) :

- E.coli entérotoxigénique (ECET),
- E.coli entéroinvasives (ECEI),
- E.coli entéropathogènes (ECEP),
- E.coli entérohémorragique (ECEH),
- E.coli entéroaggrégatives (ECEAgg),
- E.coli à adhésion diffuse (ECDA).

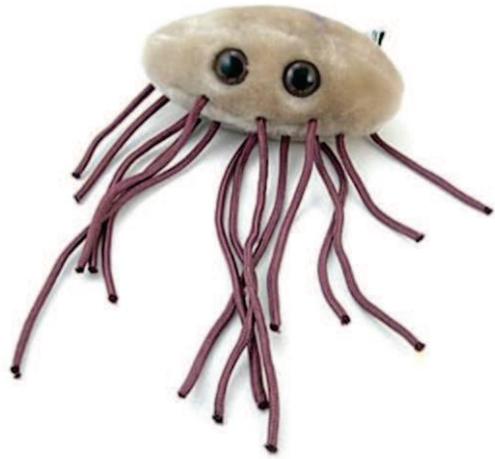


Figure I-3 : *Escherichia coli*.

La bactérie, devenue symbole des laboratoires de microbiologie, a son effigie en peluche (GIANTmicrobes®)

Les toxines produites, les mécanismes d'adhésion et les lieux d'infection permettent de différencier entre elles ces catégories. Quelle que soit la souche présente dans le corps, pathogène ou non, elle peut provoquer des méningites, des abcès, des péritonites, des septicémies ou encore des infections urinaires si elle se trouve en dehors du système digestif.

Escherichia coli est utilisée comme modèle d'étude dans de très nombreux laboratoires de recherche. En effet, le siècle qui s'est écoulé depuis sa découverte a apporté une bonne connaissance de cet organisme. D'autre part, sa simplicité de culture et sa croissance rapide facilitent les travaux des chercheurs. La croissance d'*E. coli* est caractérisée par une phase exponentielle durant laquelle la bactérie va se reproduire rapidement, avec un temps de doublement de génération pouvant atteindre 20 min dans un milieu riche. La croissance sera influencée par la présence de sucres plus ou moins vite assimilés, de traces de métaux ou encore d'acides aminés, etc. Cette phase exponentielle de croissance est suivie par une phase stationnaire, induite par l'appauvrissement en nutriments ou l'acidification du milieu due aux éléments rejetés par la bactérie lors de sa croissance. Durant cette phase, la population cellulaire se maintient, avant de décliner si le milieu n'est pas renouvelé.

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent la souche non pathogène BW25113, dérivée de la souche K12 d'*E. coli*. Nous allons maintenant aborder la membrane cellulaire, élément indispensable à la vie de la bactérie.

I.1.2 Membrane cellulaire

Toutes les cellules vivantes sont organisées de la même manière : l'information génétique, ainsi que les différents protagonistes assurant la reproduction, l'évolution et la production d'énergie cytoplasmique permettant la vie cellulaire, sont contenus dans un cytoplasme qui est délimité par une membrane cellulaire.

Alors que les premiers types cellulaires (bactéries et spermatozoïdes) furent observés pour la première fois au XVII^{ème} siècle par Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek, scientifiques respectivement anglais et néerlandais, le mystère de la structure de la membrane cellulaire ne commença à être éclairci qu'à partir des années 1890. C'est en effet à la fin du XIX^{ème} siècle que le scientifique anglais Charles Ernest Overton observa que des composés traversaient la membrane cellulaire avec plus ou moins de facilité selon leur caractéristique d'hydrophobicité. Il émit alors l'hypothèse selon laquelle la membrane cellulaire est formée de lipides. Il faudra ensuite attendre 1925 pour en savoir un peu plus grâce à Gorter et Grendel, deux scientifiques allemands (Gorter et al. 1925). Ceux-ci comparèrent le volume cellulaire des globules rouges d'une part et la surface couverte par les lipides issus de ces mêmes globules rouges d'autre part. Quel que soit l'organisme de mammifère étudié (chien, mouton, lapin, homme), un même constat fut fait : la surface couverte par les lipides est deux fois plus importante que le volume total des globules rouges. Ils en conclurent que la membrane cellulaire est composée d'une bicouche lipidique.

Les éléments constituant cette bicouche lipidique sont des molécules dérivées du glycérol (chez les bactéries et les végétaux) ou de la sphingosine (chez les animaux). Le glycérol est modifié au niveau de ses groupes alcools sur lesquels sont fixées deux molécules d'acides gras et un groupe phosphate lui-même lié à une molécule polaire, qui est souvent la choline (figure I-4). Les acides gras vont former une queue hydrophobe tandis que le groupe

phosphate va former une tête polaire hydrophile. Ces molécules, appelées phospholipides, vont ainsi pouvoir s'organiser en exposant la tête polaire vers le milieu extérieur ou intérieur de la cellule, gardant les queues hydrophobes à l'intérieur de la bicouche lipidique comme le montre la figure I-4.

Cette bicouche de phospholipides se retrouve dans tous les genres cellulaires. Selon les organismes, elle peut être complétée par différentes structures comme la paroi cellulaire dans le cas des cellules végétales ou encore une membrane externe chez certaines bactéries par exemple. En ce qui concerne les bactéries, la membrane cellulaire, également appelée membrane interne, possède des éléments supplémentaires spécifiques qui permettent de classer ces organismes.

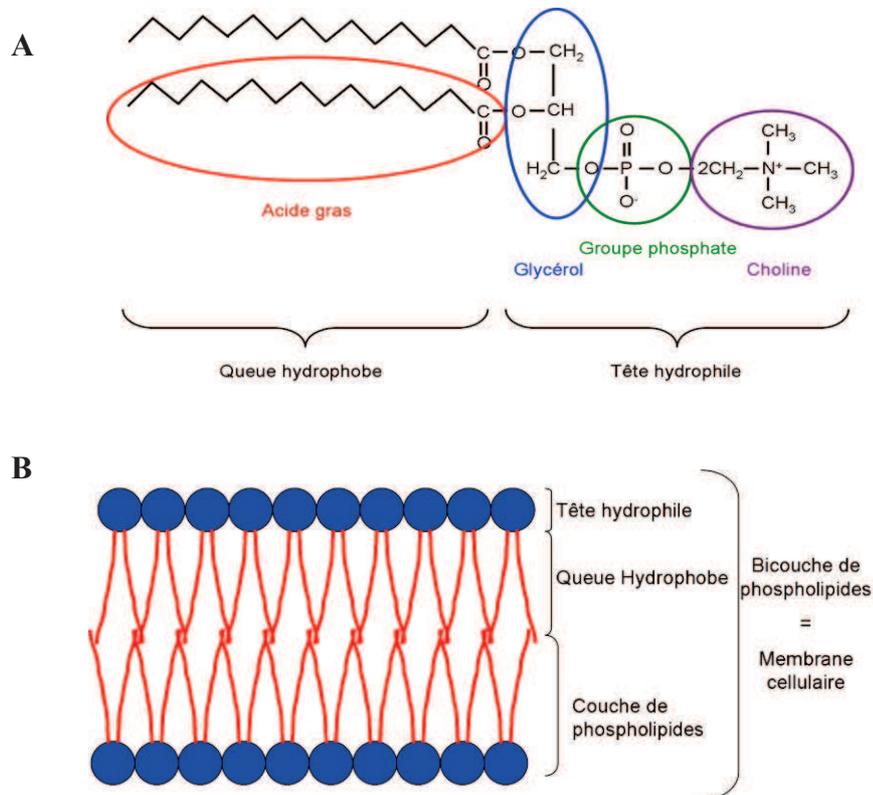


Figure I-4 : La membrane cellulaire.

A : les phospholipides sont formés d'une queue hydrophobe composée d'acides gras et d'une tête hydrophile constituée d'un glycérol modifié.

B : les phospholipides s'organisent en double couche afin de former la membrane cellulaire. Les têtes hydrophiles sont tournées vers le milieu tandis que les queues hydrophobes sont à l'intérieur de la bicouche.

Les bactéries sont divisées en deux groupes principaux : les bactéries dites à Gram positif et les bactéries dites à Gram négatif. Cette dénomination provient d'une coloration mise au point par le bactériologiste danois Hans Christian Gram en 1884. Cette technique consiste à incuber les cellules avec du violet de gentiane (aussi appelé cristal violet) afin de donner au cytoplasme une couleur violette. Les cellules subissent ensuite un lavage avec de l'alcool et de l'acétone. Cette coloration va résister aux lavages chez une bactérie à Gram positif alors qu'elle sera éliminée dans le cas de bactéries à Gram négatif (figure I-5).

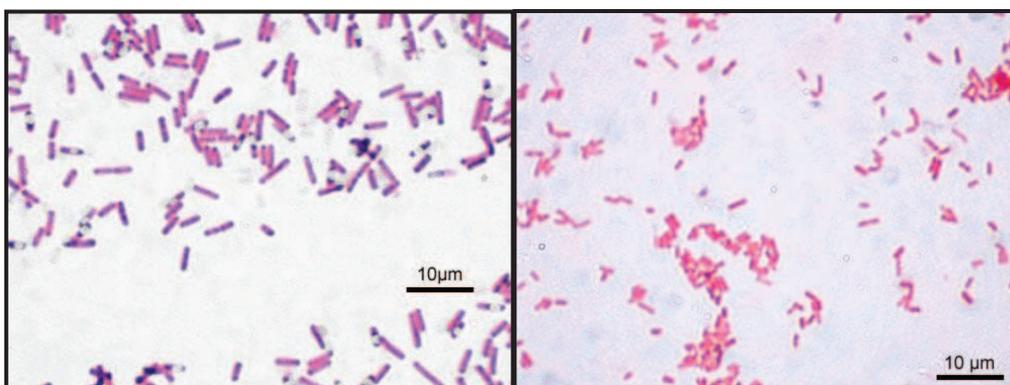


Figure I-5 : Exemple de coloration de Gram.

À gauche, *Bacillus subtilis*, les bactéries à Gram positif conservent la coloration due au violet de gentiane. À droite, *Escherichia coli*, les bactéries à Gram négatif laissent passer les éléments permettant la décoloration du cytoplasme.

Cette différence entre les deux catégories bactériennes provient de la nature des éléments associés à la membrane cellulaire. Dans le cas des bactéries à Gram positif, les cellules possèdent une couche épaisse (entre 10 et 80 nm) de peptidoglycanes qui ne permet pas le passage des molécules d'acétone et d'alcool utilisées au cours de la décoloration. Par contre les bactéries à Gram négatif, dont fait partie *E. coli*, possèdent une couche de peptidoglycanes plus fine (2 à 6 nm) ce qui rend la décoloration possible. Ces peptidoglycanes sont des éléments formés d'une part d'un polysaccharide et d'autre part d'un peptide. Le polysaccharide peut être soit un N-acétyl-glucosamine (NAG) soit un N-acétyl-muramique (NAM). Ils sont reliés les uns aux autres pour former un maillage plus ou moins solide autour de la bactérie (cf figure I-6).

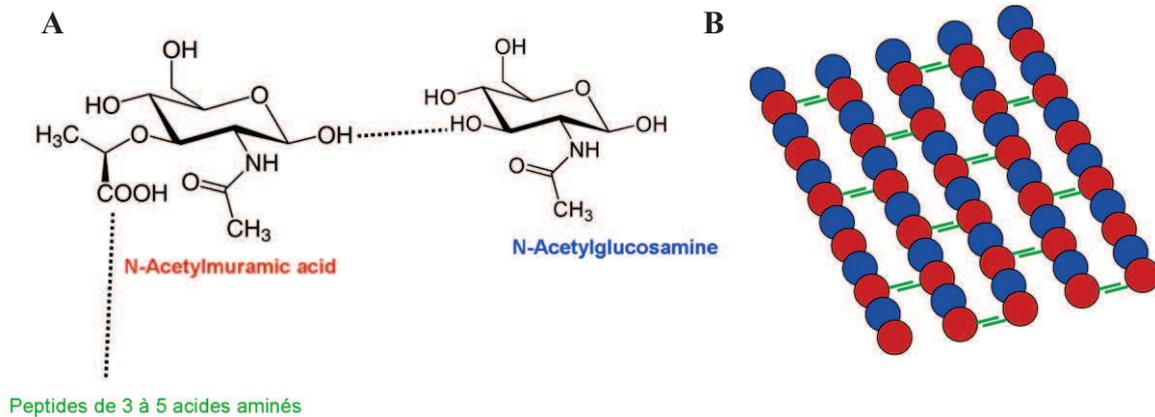


Figure I-6 : Les peptidoglycans.

Les peptidoglycans sont constitués d'acide acétyl muramique et d'acétyl glucosamine qui forment des chaînes polysaccharidiques (A). Celles-ci sont reliées entre elles par des acides aminés (alanine, acide glutamique, lysine ou acide diaminopimélique) créant ainsi un maillage autour de la cellule (B).

Cette structure permet de donner à la bactérie sa forme, sa solidité ainsi que sa rigidité. Elle permet également de protéger la membrane cellulaire des différentes attaques extérieures qu'elle pourrait subir. Ces peptidoglycans sont très importants pour la survie cellulaire. C'est d'ailleurs en bloquant la formation de ce maillage que la pénicilline empêche les cellules possédant une paroi de se diviser, jouant ainsi son rôle d'antibiotique.

Chez les bactéries à Gram négatif, cette fine couche de peptidoglycans est surmontée d'une structure appelée membrane externe. L'espace entre les membranes interne et externe, où se situent les peptidoglycans est appelé le périplasme. La membrane externe, au contraire de la membrane interne n'est pas symétrique. Elle est formée d'une couche de phospholipides dirigée vers le périplasme et d'une couche de lipopolysaccharides (LPS) dirigée vers le milieu extérieur. Une autre différence majeure avec la membrane interne est l'absence de gradient de protons entre les deux faces de la membrane externe. La présence de cette seconde membrane permet une meilleure protection des bactéries face aux facteurs immunologiques, à la phagocytose ou encore à certaines enzymes de digestion.

Le LPS est constitué de 3 parties :

- l'antigène O, qui est formé d'une chaîne saccharidique qui est spécifique de l'espèce, voire de la souche bactérienne. Ainsi, 160 antigènes O ont été identifiés chez *E. coli*. C'est cette partie du LPS qui permet la reconnaissance des bactéries par le système immunitaire.

- l'oligosaccharide, qui est un ensemble de sucres permettant de relier l'antigène O au lipide A.

- le lipide A (figure I-7A), qui est, généralement, formé d'une double glycosamine (noir) phosphorylée (bleu) qui relie plusieurs acides gras (rouge).

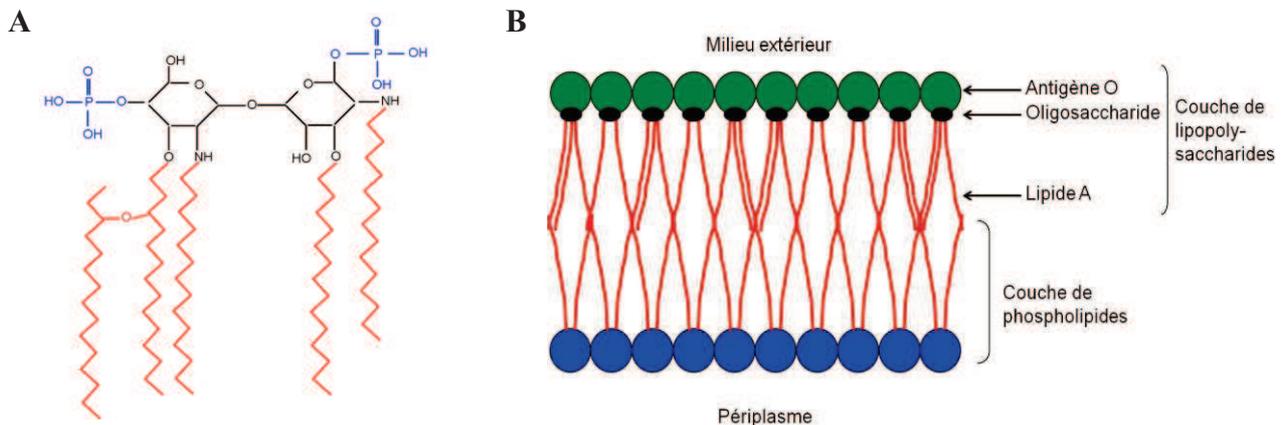


Figure I-7 : La membrane externe.

Le lipide A est formé d'acides gras reliés entre eux par une double glycosamine phosphorylée (A). Celui-ci, couplé à un antigène O et à un oligosaccharide, forme un lipopolysaccharide, lui-même nécessaire, au même titre que les phospholipides, à la constitution de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (B).

Cependant, les lipides ne sont pas les seuls éléments composant la membrane cellulaire. En effet, en 1926, suite à la purification des éléments constituant la membrane des hématies, il fut démontré que les lipides ne représentent que 40% des composants de la membrane cellulaire. Le reste correspond à des glucides mais aussi, et surtout, à des protéines. Ces dernières ont des rôles très divers allant de la génération d'énergie à la catalyse enzymatique en passant par l'adhérence ou encore le transport.

Cette découverte donna naissance en 1935 au modèle dit de « sandwich lipido-protéique » de Danielli et Dawson selon lequel la bicouche de phospholipides serait associée de part et d'autre à des protéines (Danielli et al. 1935). Ce modèle fut confirmé en 1959 par microscopie électronique, cette technique ayant permis d'observer, au niveau des membranes cellulaires, deux feuillet sombres qui entourent un feuillet clair, formant ainsi une structure dite « trilaminaire ».

Mais quelques années plus tard, ce concept fut mis à mal par la technique de cryofracture. En effet, il fut alors prouvé que les protéines ne tapissent pas de manière

continue la bicouche lipidique. Cette structure trilaminaire était un artefact dû aux traitements chimiques imposés par la technique de microscopie électronique, conduisant à la dénaturation des protéines membranaires, qui en conséquence s'agrégeaient de part et d'autre de la membrane.

Les avancées techniques permirent de mettre au point le modèle de Singer et Nicolson (Singer et al. 1972) actuellement admis et appelé modèle de la mosaïque fluide. Selon celui-ci, les protéines présentes à la surface des bactéries sont mobiles dans le plan de la membrane grâce à l'agitation moléculaire et aux faibles interactions mises en jeu.

Alors que ces membranes sont essentielles à la survie de la bactérie, elles représentent également une barrière à franchir pour les éléments qui se trouvent dans le milieu extérieur et qui doivent être importés par la cellule. En effet, la bactérie doit puiser dans son environnement des nutriments, des ions mais aussi des petites molécules qui lui sont indispensables pour son bon fonctionnement. D'autre part, la cellule doit pouvoir rejeter certaines molécules qui lui sont toxiques.

C'est pour permettre l'entrée et la sortie de ces différentes molécules que la bactérie possède divers moyens de transport.

I.1.3 Les systèmes de transport

La capacité des molécules à traverser les membranes interne et externe par elles-mêmes dépend de leur grosseur, leur polarité ainsi que leur hydrophobicité. Il est communément accepté qu'il existe deux types de transports : d'une part le transport passif, qui regroupe les transports par simple diffusion et par diffusion facilitée, et d'autre part le transport actif qui, contrairement au transport passif, nécessite un apport d'énergie.

Nous allons maintenant voir plus en détail ces différents mécanismes de transport et leurs caractéristiques.

I.1.3.a La simple diffusion

La membrane cellulaire étant constituée en partie de lipides, les petites molécules hydrophobes ou polaires non chargées (O_2 , CO_2 , N_2 , urée, glycérol, éthanol, etc.) peuvent la traverser librement. Les molécules tendent à équilibrer leurs concentrations entre les deux côtés de la membrane, allant toujours du côté le plus concentré vers le moins concentré. Ce qui implique une vitesse de transport proportionnelle à la différence entre les concentrations et un transport non saturable. Les molécules polaires sont aussi concernées par cette simple diffusion malgré le fait qu'elles ne peuvent pas traverser la zone interne de la bicouche de phospholipides. C'est le cas des molécules d'eau qui utilisent des canaux appelés aquaporines afin de pouvoir traverser la membrane.

Ce type de transport est caractérisé par une absence de spécificité vis-à-vis des éléments qui traversent la membrane et une certaine lenteur de diffusion. Il n'est pas saturable et a lieu dès qu'une différence de concentration apparaît entre les milieux de chaque côté de la membrane.

C'est très majoritairement ce type de transport qui permet le passage des diverses molécules au travers de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif. Les substrats dont le poids est inférieur à 600 Da, comme les nutriments, peuvent traverser cette membrane grâce à des canaux non spécifiques appelés porines. Celles-ci sont généralement formées de trimères et ont un diamètre d'environ 10 Å. Chez *E. coli*, il existe quatre porines connues : PhoE, NmpC et surtout OmpF et OmpC. Ces deux dernières ont une préférence pour les molécules neutres ou les cations (sucres, acides aminés, ions, etc.) contrairement à PhoE et NmpC (Nikaido 1994).

I.1.3.b La diffusion facilitée

La diffusion facilitée est un mode de transport qui concerne les molécules hydrophiles de petites tailles. Ce mécanisme met en jeu des protéines transmembranaires qui transportent les molécules concernées d'un côté à l'autre de la membrane en interagissant avec elles. Ce mode de transport est donc saturable, contrairement à la simple diffusion. Ces perméases sont spécifiques et, contrairement aux aquaporines, elles forment une liaison avec le substrat. Elles fonctionnent toujours en déplaçant les éléments du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré, ce qui explique l'absence de besoin d'énergie de la part de ce mode de transport. Il est supposé que ce mécanisme soit rendu possible du fait d'une

interaction plus fréquente entre le transporteur et la molécule transportée du côté de la plus forte concentration. Le bilan net du transport est donc en faveur de la zone la moins concentrée.

Les ions utilisent principalement ce mode de transport, par l'intermédiaire de canaux ioniques sensibles non seulement à la concentration des ions mais également à la différence de potentiel qui existe de part et d'autre de la membrane. En général, l'intérieur des cellules est chargé négativement comparé au milieu environnant. Ces canaux ioniques permettant le passage des ions fonctionnent comme les aquaporines mais sont généralement fermés jusqu'à l'apparition d'un signal extérieur qui peut être une modification du champ électrique transmembranaire, la fixation d'un ligand ou encore un phénomène mécanique.

I.1.3.c Le transport actif

Le transport de molécule est qualifié d'« actif » s'il nécessite un apport d'énergie, ce qui est le cas pour toutes les molécules transportées contre leur gradient de concentration.

Deux sources d'énergie peuvent être utilisées :

- la première consiste à coupler le transport de deux molécules : l'une se déplace selon son gradient de concentration et fournit l'énergie nécessaire à l'autre pour se déplacer contre son gradient. Selon que les molécules se déplacent dans le même sens ou dans le sens opposé, on parle de symport ou d'antiport respectivement. Ce transport est qualifié d'« actif secondaire ». Comme son nom le laisse penser, cette source d'énergie n'est pas la plus courante.
- la deuxième source d'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). Ce mécanisme est le plus répandu et est appelé transport « actif primaire ». Dans ce cas une seule molécule est transportée, on parle alors d'« uniport ».

Les pompes à protons que l'on retrouve dans les cellules végétales ou de champignons, mais aussi chez certaines bactéries, sont un exemple de ce type de transport. Mais les protéines les plus représentatives du transport actif sont celles qui forment les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette). Ces complexes de transport sont retrouvés dans un grand nombre d'organismes allant des bactéries à l'Homme et assurent le

passage de nutriments, de protéines, etc. Cette famille de protéines est caractérisée par un domaine de fixation à l'ATP. Chacun de ces transporteurs se révèle être très spécifique et peut fonctionner soit en important soit en exportant la molécule à transporter (aucun transporteur fonctionnant dans les deux sens n'a encore été trouvé). Ces complexes sont généralement constitués de quatre protéines membranaires : deux d'entre elles forment un canal qui assure la spécificité alors que les deux autres sont localisées au niveau du cytoplasme et assurent la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Pour les transporteurs qui importent une molécule, une cinquième protéine est nécessaire à la fixation du substrat. Cette protéine est localisée dans le périplasm. Un exemple d'un tel transporteur est montré en figure I-8.

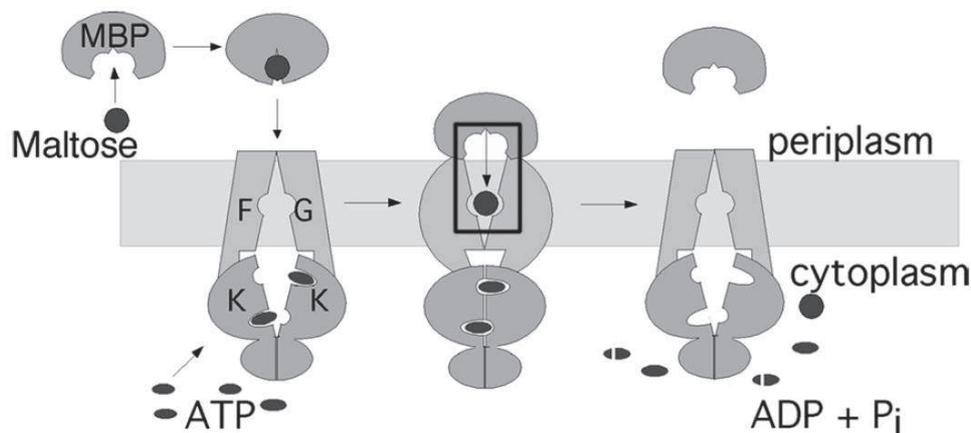


Figure I-8 : Exemple de transporteur de type ABC.

L'import du maltose par *Escherichia coli* se fait via un transporteur de type ABC. Deux protéines (F et G) forment un canal dans la membrane, tandis qu'un dimère de protéines (K) permet l'hydrolyse de l'ATP. Le maltose est fixé dans le périplasm par la MBP (Maltose Binding Protein) qui le transfère sur les protéines F et G (Cui et al. 2010).

Au sein des complexes de transport, les protéines périplasmiques sont souvent les plus étudiées du fait de leur solubilité qui les rend plus faciles à purifier. Il a été démontré que différentes protéines périplasmiques peuvent se fixer sur un même transporteur. Leur taille varie entre 25 et 59 KDa et elles ont toutes la même structure : deux domaines reliés par une charnière formant ainsi une poche dans laquelle vient se fixer le substrat. Il semblerait que la fixation du substrat sur la protéine périplasmique constitue le mécanisme limitant le taux de transport de la molécule. Un changement de conformation protéique catalysé par l'hydrolyse d'ATP permet ensuite au substrat de passer de la zone périplasmique au canal puis au cytoplasme (Higgins 1992).

Parmi la petite centaine de systèmes de transport de type ABC existant chez *E. coli*, un des plus étudiés est celui d'Opp qui permet l'import d'oligopeptides. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à ce système dans le chapitre suivant.

I.2 *Le système de transport Opp*

I.2.1 La découverte du transporteur Opp

Les peptides présents dans l'environnement sont d'une grande importance pour les bactéries. En effet, ils constituent une source d'acides aminés, de carbone et d'azote, éléments indispensables à la néo-synthèse de protéines et au bon fonctionnement de la bactérie. Connaissant la taille et la charge globale des peptides, il est vite apparu évident qu'un tel composé ne pouvait pas être importé par simple diffusion ou même par diffusion facilitée et que son transport nécessitait un mécanisme actif.

En 1968, Payne et Gilvarg démontrèrent que les dipeptides et les tripeptides sont transportés selon deux mécanismes différents, les oligopeptides plus grands étant peu voire pas du tout assimilés par les bactéries. Cette étude fut basée sur la capacité des bactéries à croître sur différents peptides et sur la mise en évidence d'une compétition entre les peptides nutritifs et la triornithine (peptide toxique). Elle établit les premières caractéristiques de ce transport telles que l'importance de la taille du peptide (Payne 1968, Payne et al. 1968, Payne et al. 1968). Quelques années plus tard, Smith et ses collègues confirmèrent cette dernière caractéristique à l'aide de tri-, tétra- et pentapeptides radiomarqués qui leur permirent de démontrer que le taux de transport est inversement proportionnel au nombre d'acides aminés présents dans le peptide (Smith et al. 1970). En 1979, Payne et ses collègues, réaffirmèrent cette particularité à l'aide de peptides fluorescents et démontrèrent également que l'ATP était nécessaire pour ce transport (Payne et al. 1979).

En 1973, le locus codant pour le transporteur d'oligopeptides de petite taille (3-4 acides aminés) fut identifié chez *E. coli* par l'équipe de Iaccarino (De Felice et al. 1973) suite à des expériences de conjugaison réalisées sur des mutants déficients pour le transport d'oligopeptides. C'est à ce moment là, que ce transporteur prit le nom de « Opp », pour oligopeptide. En parallèle, le locus pour le transporteur homologue de dipeptides fut identifié par cette même équipe et pris le nom de « Dpp », pour dipeptides. En 1980, ces loci furent localisés chez *E. coli* mais aussi chez *Salmonella typhimurium* par Lenny et Margolin

d'une part, et par Higgins et ses collègues d'autre part, qui identifiaient les gènes entourant ces loci : *tonB* et *GalU* chez les deux espèces (Higgins et al. 1983, Lenny et al. 1980). Quelques années après, il fut démontré que le locus codant pour Opp est formé de quatre gènes co-transcrits appelés *oppA*, *oppB*, *oppC* et *oppD* (Hogarth et al. 1983) pour une taille globale de 5 à 6 kb (Higgins et al. 1983). Par la suite, il fut établi qu'un cinquième gène est co-transcrit avec les quatre gènes précédemment décrits (Hiles et al. 1986). Il sera dénommé *oppF*, suivant la logique alphabétique. En effet un locus, découvert entre temps, fut baptisé *oppE* suite à des études sur la croissance de bactéries en présence de tripeptides toxiques (Andrews et al. 1985). Il s'avéra par la suite que la protéine codée par *oppE* n'a pas de rôle direct dans le système Opp (Andrews et al. 1986, Andrews et al. 1986). Depuis cette première étude du locus de *opp*, des homologues furent découverts dans de nombreuses souches bactériennes tant à Gram positif qu'à Gram négatif telle que *Lactococcus lactis* (Tynkkynen et al. 1993), *Borrelia burgdorferi* (agent pathogène responsable de la maladie de Lyme, (Das et al. 1996)), *Treponema denticola* et *Trepanoma vicentii* (Fenno et al. 2000), *Listeria monocytogene* (Borezee et al. 2000), *Bacillus subtilis* (Rudner et al. 1991), *Bacillus thuringiensis* (Gominet et al. 2001), *Streptococcus agalactiae* (Samen et al. 2004), *Lactobacillus delbrueckii* (Peltoniemi et al. 2002), etc. L'organisation de l'opéron *opp* est globalement la même chez ces différentes souches (figure I-9) malgré quelques spécificités telles que l'ordre des gènes ou le nombre de copies. Ainsi, chez *L. lactis* les gènes se suivent dans l'ordre suivant : *oppDFBCA* (Tynkkynen et al. 1993) alors que chez *E. coli*, les gènes se succèdent ainsi : *oppABCD* (Hogarth et al. 1983). D'autre part, chez diverses souches de *Borrelia*, le gène codant pour OppA est présent en cinq exemplaires, trois copies se situant sur le chromosome et deux copies supplémentaires sur des plasmides (Bono et al. 1998, Kornacki et al. 1998). *Staphylococcus aureus* possède quant à lui quatre opérons *opp* et un gène *oppA* indépendant alors que l'opéron *opp2* ne possède pas de gène *oppA* (Hiron et al. 2007).

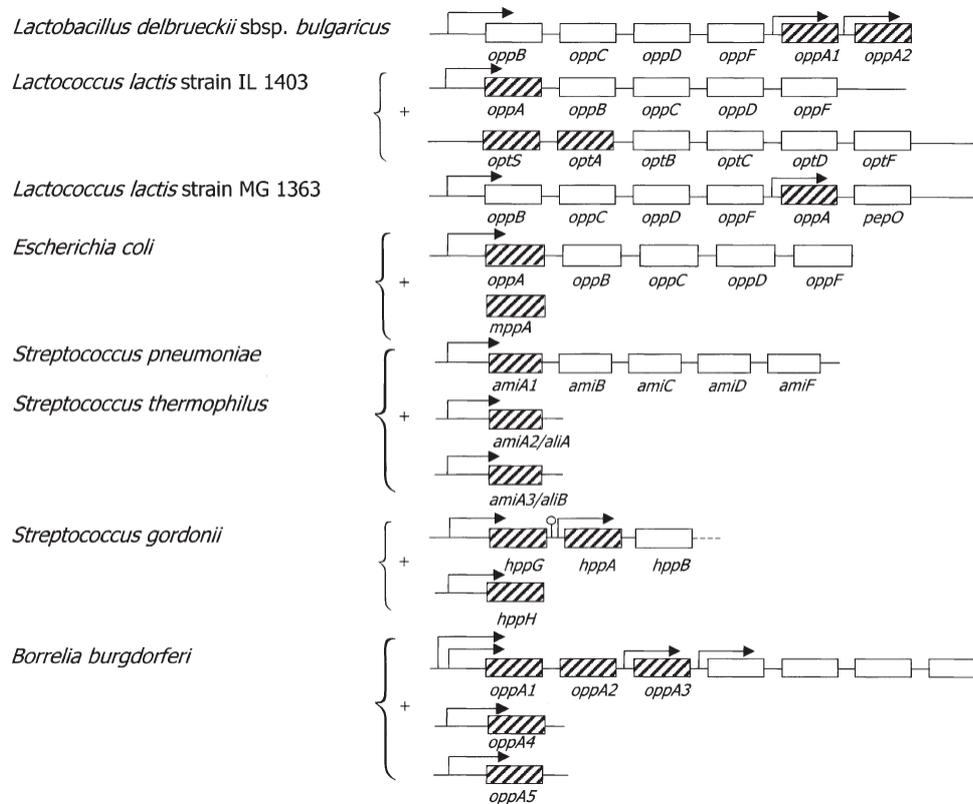


Figure I-9 : Organisation des gènes des systèmes Opp chez différentes espèces.

Le système Opp, qui permet l'import d'oligopeptides par les bactéries, se retrouve dans de nombreuses espèces. Il est, la plupart du temps, codé par un opéron, mais certains gènes peuvent être indépendants des autres. Les gènes codant pour les protéines qui fixent le substrat sont hachurés, les promoteurs fonctionnels sont représentés par une flèche (Monnet 2003).

I.2.2 Fonctionnement du transporteur Opp

Alors que les peptides traversent la membrane extérieure d'*E. coli* via les protéines OmpF et OmpC (Andrews et al. 1985), le système Opp permet, quant à lui, leur passage du périplasme au cytoplasme.

Le complexe Opp est un transporteur de type ABC et est formé de cinq protéines (figure I-10) :

- OppA, une protéine soluble qui se trouve dans le périplasma des bactéries à Gram négatif (Guyer et al. 1985, Hiles et al. 1986) et est également présente chez les bactéries à Gram positif sous forme d'une lipoprotéine ancrée à la membrane cellulaire.

- OppB et C, deux protéines membranaires (Hiles et al. 1987) qui forment un canal permettant le passage des peptides du périplasma vers le cytoplasme.

- OppD et F, deux protéines cytoplasmiques associées au canal formé par OppB et C. Elles permettent l'hydrolyse de l'ATP, fournissant ainsi l'énergie nécessaire à l'import des peptides.

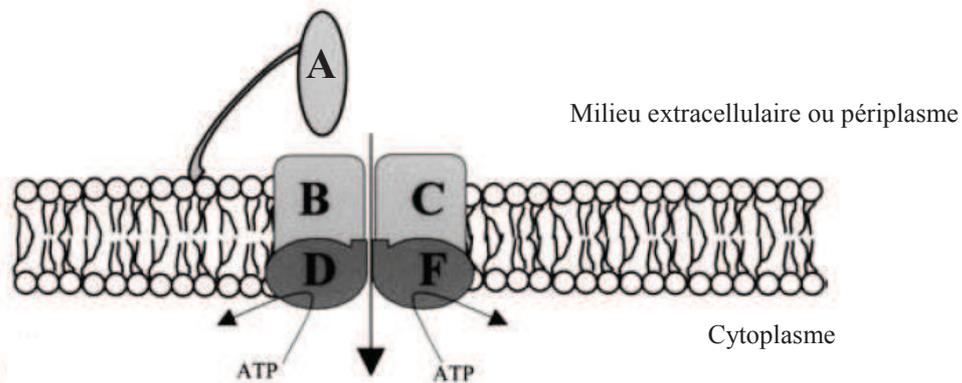


Figure I-10 : Structure du complexe Opp.

Le système Opp est constitué de cinq protéines. OppB et OppC forment un canal dans la membrane interne de la bactérie. OppD et OppF sont situées dans le cytoplasme et permettent l'hydrolyse de l'ATP fournissant ainsi l'énergie nécessaire au transport de l'oligopeptide. La protéine OppA est ancrée à la membrane chez les bactéries à Gram positif et périplasmique dans le cas des bactéries à Gram négatif (Monnet 2003).

La protéine OppA fut purifiée pour la première fois par Guyer et ses collègues, en 1985 (Guyer et al. 1985). Ils se servirent pour cela du fait qu'OppA est relâchée en très grande quantité dans le périplasma suite à un choc osmotique, puis utilisèrent des chromatographies séparant les protéines selon leur taille. Cette protéine, de 60 kDa, est l'une des plus abondantes et des plus grosses du périplasma. La séquence exacte en acides aminés de la protéine OppA fut déterminée pour la première fois chez *E. coli* et *S. typhimurium* en 1986 par Hiles et ses collègues qui se basèrent, pour cela, sur la séquence ADN du gène (Hiles et al. 1986).

Comme nous avons pu le voir dans la section précédente, certaines espèces possèdent plusieurs copies du gène *oppA*. Ceci permet d'accroître l'efficacité du transport. Dans certains cas, c'est aussi un moyen d'élargir un peu la spécificité lorsque les diverses copies ont des spécificités légèrement différentes, comme c'est le cas chez *B. Burgdorferi* (Lin et al.

2001). Une autre manière d'augmenter l'efficacité du transport consiste à avoir une expression du gène *oppA* indépendante du reste de l'opéron (Monnet 2003). Selon Poolman, le taux de transport des peptides est imposé en grande partie par la vitesse de leur transfert d'OppA vers le canal (Picon et al. 2000).

La protéine périplasmique OppA est capable de fixer un seul peptide à la fois (Guyer et al. 1985). De très nombreuses études furent réalisées en vue de caractériser de façon précise le mécanisme de fixation des peptides sur OppA. Il fut rapidement mis en évidence que la taille du peptide est un facteur déterminant pour cette interaction : les tri- et tétrapeptides sont les oligopeptides qui se fixent avec la plus grande affinité, alors que les di- et pentapeptides ont une affinité bien plus faible et que les acides aminés seuls ne se fixent pas (Guyer et al. 1986). Il semblait logique de penser qu'un tel transporteur avait une faible spécificité. En effet, la diversité des oligopeptides ($20^2 = 400$ dipeptides ; $20^3 = 8000$ tripeptides ; $20^4 = 160\,000$ tétrapeptides) est telle que l'existence d'un transporteur spécifique à chaque peptide paraissait peu probable ! De nombreuses équipes tentèrent de confirmer cette hypothèse en utilisant différents peptides pour étudier le système de transport Opp, comme l'illustre Payne et ses collègues, en 1979 en utilisant 24 oligopeptides de taille et de nature différentes (Payne et al. 1979). Cette faible spécificité d'OppA envers ses ligands est en apparence contradiction avec le mode de liaison entre OppA et le peptide. En effet, Tame et ses collègues prouvèrent en 1994 (Tame et al. 1994) que OppA est formé de trois domaines (figure I-11) : les domaines I et III, fortement conservés dans les protéines périplasmiques, forment une cavité dans laquelle vient se loger le peptide qui est alors complètement isolé à l'intérieur de la protéine, laissant supposer un nombre important de



Figure I-11 : Structure de la protéine périplasmique OppA ayant fixé une trilysine.

La protéine OppA est constituée de trois domaines. Celle-ci permet le transport de peptide en les fixant, ici le tripeptide KTK lié à la protéine OppA de *Salmonella enterica*.

liaisons entre le peptide et OppA. Ces deux domaines sont reliés l'un à l'autre par des segments qui leur permettent d'être en position ouverte ou fermée comme décrit dans le modèle de Venus's flytrap de Mao (Mao et al. 1982). Le dernier domaine, le domaine II, n'a pas d'homologie dans les autres protéines périplasmiques fixant un substrat, contrairement aux domaines I et III. Malgré le fait que ce domaine possède 120 acides aminés et soit responsable de la taille particulièrement élevée d'OppA par rapport aux

autres protéines périplasmiques, sa fonction n'est toujours pas comprise.

De nombreuses études visèrent à comprendre comment une si faible spécificité de substrat pouvait être couplée à une poche de fixation qui se referme sur le ligand, l'isolant entièrement de l'environnement. Ces recherches débutèrent dès que la protéine fut purifiée par l'équipe de Staros et les premiers résultats obtenus par cette même équipe démontrèrent que les extrémités du peptide sont structurellement importantes pour assurer la fixation du ligand sur OppA (Guyer et al. 1986). Tame et ses collègues précisèrent par la suite que les chaînes latérales du peptide n'ont, quant à elles, guère d'importance dans la fixation du ligand, expliquant par là même le large éventail de peptides fixés par OppA (Tame et al. 1994).

La nature de cette interaction entre OppA et le peptide fixé fut approfondie peu à peu laissant apparaître le fait que la poche dans laquelle vient se mettre le peptide est hydrophobe (Sleigh et al. 1999, Tame et al. 1995). De nouveaux résultats obtenus à la fin des années 1990 vinrent préciser le modèle de fixation du peptide sur la protéine OppA. Il fut tout d'abord établi que la fixation d'un peptide provoque la stabilisation de la forme fermée de la protéine qui se trouve, en absence de ligand, à l'équilibre entre les formes ouvertes et fermées (Sleigh et al. 1997). Davies et ses collègues confirmèrent que les chaînes latérales du peptide ne jouent qu'un faible rôle dans la fixation du peptide à OppA, tout en précisant que la présence de charges positives sur la chaîne latérale diminue l'affinité du peptide par rapport à un peptide qui n'aurait que des résidus hydrophobes (Davies et al. 1999). Quant aux extrémités du peptide, elles permettent la formation de ponts salins entre la protéine et son substrat (Sleigh et al. 1999), ce qui explique l'importance de la taille du peptide et l'absence de fixation observée lorsque le N-ter du peptide est acétylé (Rostom et al. 2000).

La plupart des études sur la protéine OppA furent réalisées chez *E. coli* ou chez *S. typhimurium*, mais un nombre non négligeable d'équipes analysèrent l'interaction d'OppA avec son substrat chez *L. lactis*. En effet, cette espèce a la particularité d'importer, via le système Opp, des peptides pouvant atteindre une longueur de 18 acides aminés (Detmers et al. 1998) voire 35 acides aminés (Detmers et al. 2000), bien que les nonapeptides soient les oligopeptides transportés avec le plus d'affinité. Lanfermeijer et ses collègues affirmèrent que ce phénomène est dû au fait que seuls les cinq premiers acides aminés du peptide se trouvent à l'intérieur de la poche formée par les domaines I et III d'OppA alors que le reste

du peptide interagit avec la surface externe de la protéine, augmentant ainsi l'affinité du transporteur pour les longs peptides (Lanfermeijer et al. 2000, Lanfermeijer et al. 1999). Ceci fut contredit par un article de 2009 s'appuyant sur l'étude de la fixation de la bradykinine (nonapeptide substrat d'OppA) sur OppA de *L. lactis*. Celui-ci démontra que la totalité du peptide se trouve à l'intérieur de la poche de fixation du substrat. Il est en effet intéressant de constater que cette poche est bien plus large chez *L. lactis* que chez *E. coli* ou *S. typhimurium* ($4\ 900\ \text{\AA}^3$ contre $1\ 000\ \text{\AA}^3$). Il n'est pourtant pas dénué de sens d'imaginer que des peptides plus longs pourraient dépasser de cette poche de fixation (Berntsson et al. 2009). Chez *L. lactis*, tout comme chez *E. coli*, les peptides possédant des résidus hydrophobes se fixent plus facilement sur OppA que ceux qui en sont dépourvus (Detmers et al. 2000). Une autre bactérie a la caractéristique de fixer des peptides plus longs que les tri- ou pentapeptides connus pour être transportés via le système Opp. Il s'agit de *Aeropyrum pernix*, bactérie vivant dans les sources chaudes, dont la protéine OppA transporte des peptides allant de 8 à 13 acides aminés (Palmieri et al. 2006). Cette souche étant peu étudiée, le mécanisme exact de ce transport n'est pas connu et ne peut donc pas être comparé au mécanisme présent chez *L. lactis*.

Une fois le peptide fixé par la protéine OppA, il faut encore qu'il soit transporté à travers la membrane interne de la bactérie. Le mécanisme de transport du peptide semble être guidé par le fait que la protéine ayant fixé un peptide a plus d'affinité pour le canal de transport que la protéine libre. Doeven démontra que OppA sans peptide ne se fixe pas sur le complexe OppBCDF chez *L. lactis* (Doeven et al. 2008). Une fois la protéine OppA liée au canal, l'affinité pour le ligand diminue et celui-ci peut alors se fixer sur le canal où un site d'interaction est apparu suite à un changement de conformation induit par la fixation de OppA (Chen et al. 2001) ou d'ATP (Doeven et al. 2008). Puis le peptide est transporté dans le cytoplasme grâce à l'énergie délivrée par l'hydrolyse de l'ATP par les protéines OppD et OppF. Il semblerait que deux molécules d'ATP puissent se fixer de façon coopérative sur ces protéines alors que l'hydrolyse d'une seule de ces molécules permet le passage du peptide à travers la membrane (Chen et al. 2001, Davidson 2002). Une étude réalisée chez *L. lactis* en 2004 trouve un K_M de $50\ \mu\text{M}$ pour le complexe OppA/peptide sur le complexe OppBCDF (Doeven et al. 2004).

I.2.3 Régulation de l'expression de l'opéron *opp*

La première étude de la régulation de l'expression de l'opéron *opp* date de 1984 et fut réalisée chez *S. typhimurium*, une année seulement après sa découverte (Jamieson et al. 1984). Sa régulation transcriptionnelle fut étudiée grâce à l'utilisation de fusions entre les promoteurs des différents gènes de l'opéron et le gène de la β -galactosidase. Les chercheurs conclurent à ce moment que l'opéron *opp* est constitutivement exprimé. En effet selon leurs expériences, l'activité de la β -galactosidase traduisant l'expression de l'opéron *opp* reste identique quelle que soit la source de carbone, la quantité d'azote, ou encore la présence d'acides aminés tels que la leucine, la proline ou encore la glutamine. Cette conclusion fut contredite une première fois par Hiles et ses collègues qui démontrèrent en 1986 que la quantité de protéine OppA présente dans le périplasma augmente lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance chez *S. typhimurium* (Hiles et al. 1986). Une autre étude en contradiction avec les résultats de Jamieson fut publiée par Andrews et ses collègues en 1986 : ceux-ci démontrèrent que, chez *S. typhimurium* et chez *E. coli*, la présence de leucine dans le milieu de culture permet d'augmenter la sensibilité des bactéries à la triornithine (peptide toxique importé par le système Opp) mais également d'augmenter la croissance sur d'autres peptides non toxiques (Andrews et al. 1986, Andrews et al. 1986). Cette contradiction pouvait être expliquée par le fait que la première étude s'intéresse à la transcription alors que la seconde prend également en compte la traduction de l'ARN messager. Mais cette hypothèse fut très vite balayée par cette même équipe qui démontra seulement quelques mois après sa précédente étude que la transcription des gènes OppA, OppB et OppD est elle-même régulée par la présence de leucine ou d'alanine ainsi que par le passage de conditions aérobiques à des conditions anaérobiques de croissance (Andrews et al. 1986). La raison pour laquelle Jamieson et ses collègues trouvèrent une expression constitutive de l'opéron reste inconnue à ce jour.

En 1990, un autre élément induisant l'expression du gène *oppA* fut découvert. Il s'agit des polyamines (putrescine, spermidine et spermine), molécules indispensables à la croissance bactérienne (Kashiwagi et al. 1990). Le mécanisme de cette régulation fut approfondi par la suite par l'équipe de Kashiwagi en 1997 qui mis en évidence que les polyamines influencent l'expression du gène *oppA* uniquement lorsque celui-ci est en faible nombre de copies, ce qui explique que cette régulation n'ait pas été observée plus tôt lors

d'utilisation de plasmides à grand nombre de copies comme rapporteur. Ces travaux révélèrent également que les polyamines agissent non pas sur la transcription mais sur la traduction d'OppA. Il fut alors supposé que les polyamines permettaient une stabilisation de l'ARN après fixation au niveau de la séquence de Shine et Dalgarno (Igarashi et al. 1997). Le mécanisme mis en jeu fut précisé deux années plus tard lorsque l'équipe démontra que les polyamines se lient non pas à la séquence Shine et Dalgarno mais à une séquence riche en GC qui permet d'exposer la séquence Shine et Dalgarno ainsi que le codon initiateur aux ribosomes et par là même de faciliter la traduction de l'ARN messenger (Yoshida et al. 1999).

Peu après, Smith et Payne découvrirent que, contrairement à nombre de protéines périplasmiques, la transcription du gène *oppA* est inhibée par un défaut de phosphate. Cette inhibition serait induite par la protéine PhoB, régulateur de la transcription sensible à la présence de phosphate dans l'environnement. Cette protéine se fixe au niveau d'une séquence appelée « Pho-box » qui chevauche la séquence de Shine et Dalgarno dans le cas du gène *oppA*, gênant de cette manière la fixation des ribosomes (Smith et al. 1992).

Un dernier élément qui entre en jeu dans la régulation d'*oppA* est un petit ARN du nom de GcvB qui inhibe l'expression d'*oppA* (tout comme celle de *dppA*) (Urbanowski et al. 2000). Ce petit ARN fut découvert en 2000 sur le brin opposé et chevauchant le gène *GcvA*, régulateur de l'opéron *gcvTHP* permettant le clivage de la glycine. Ce petit ARN est exprimé en début de phase exponentielle de croissance et son niveau d'expression diminue lorsque le taux de croissance augmente (Argaman et al. 2001). Cependant cette molécule n'agit pas seule et a besoin de la protéine Hfq pour se fixer au niveau du RBS de l'ARNm d'*oppA* et inhiber ainsi efficacement la traduction du gène *oppA*. Le fait d'avoir une traduction inefficace diminue la demi-vie de l'ARN messenger et donc la quantité de protéine finale (Sharma et al. 2007). Cette inhibition par GcvB semble être plus complexe qu'un simple appariement (Pulvermacher et al. 2008). Il se pourrait que Hfq permette la stabilisation de l'ARN *gcvB* en se fixant à lui, masquant ainsi les sites reconnus par l'ARNase E, et facilite de cette manière l'interaction entre *gcvB* et l'ARNm d'*oppA* (Pulvermacher et al. 2009).

Très récemment il fut démontré qu'un autre petit ARN, appelé DapZ, inhibe également l'expression d'*oppA*. Il est présent principalement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (Chao et al. 2012)

En plus de toutes ces études, des résultats indiquent qu'il existe d'autres éléments de régulation de l'opéron *opp*. En effet, Guédon et ses collègues affirmèrent que CodY inhibe l'opéron *opp* en présence de di- ou tripeptides chez *L.lactis* (Guedon et al. 2001), tandis que Yohannes et ses collègues prouvèrent qu'un pH élevé est important pour l'augmentation de l'expression d'*oppA* chez *E.coli* (Yohannes et al. 2004). Par ailleurs Easton illustra le fait qu'un stress au zinc induit également l'expression d'*oppA* chez *E. coli* (Easton et al. 2006).

Comme nous venons de le voir, de nombreux mécanismes permettent le contrôle de l'expression du système Opp. Cette régulation est encore plus complexe dans les souches possédant plusieurs copies du gène *oppA* comme c'est le cas chez *B. burgdorferi*. En effet, les différentes copies ne sont pas exprimées à un niveau équivalent et ne répondent pas de façon identique à un même stimulus comme l'augmentation de glucose ou leur environnement (tique ou mammifère) (Wang et al. 2002) (figure I-12).

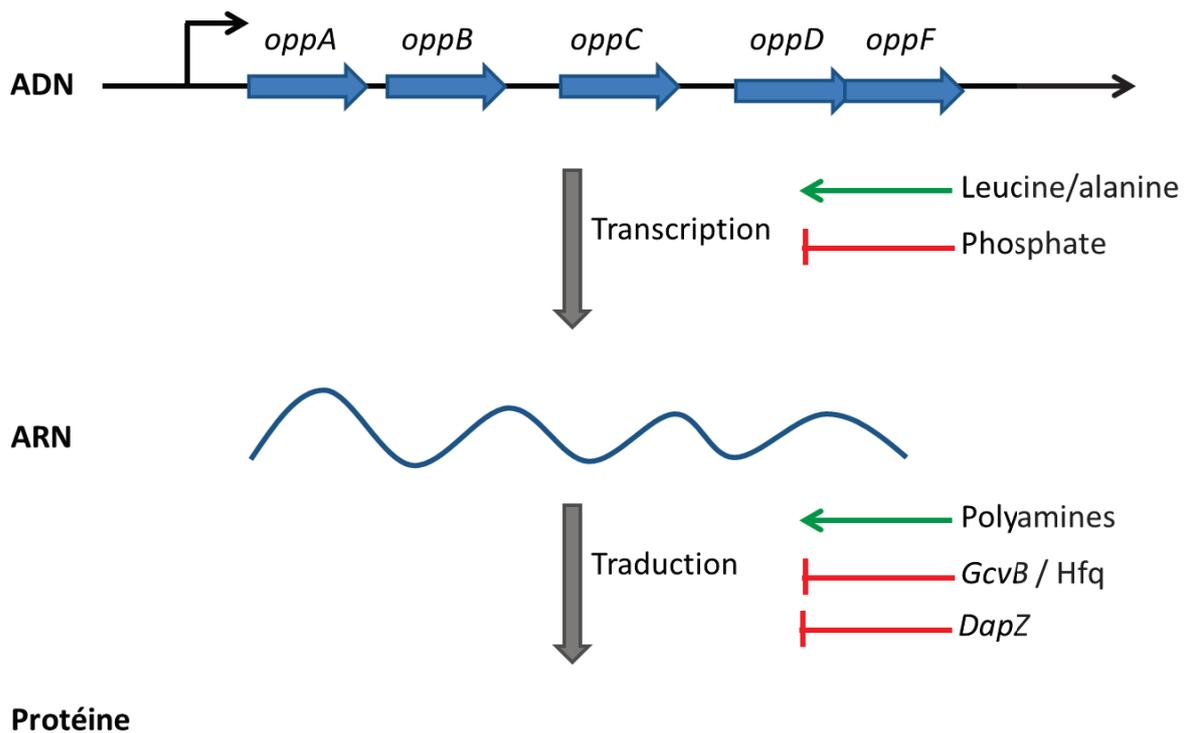


Figure I-12 : régulation de l'opéron *opp*.

La régulation de l'expression de l'opéron *opp* s'effectue à différents niveaux. Le phosphate ou certains acides aminés tels que la leucine ou l'alanine permettent une régulation de la transcription alors que les polyamines ou certains petits ARN permettent une régulation de la traduction.

I.2.4 Rôle du système Opp chez les bactéries

La fonction première d'OppA et plus généralement du système de transport Opp est bien entendu le transport de peptides. En effet, l'import de peptides par la bactérie représente une source importante d'acides aminés, de carbone ou encore d'azote. Chez *L. lactis*, Opp représente même le seul système permettant l'import de peptides issus de la β -caséine et est donc indispensable pour la croissance de la bactérie sur du lait (Kunji et al. 1995). Le revers de la médaille à cette porte d'entrée des peptides, est le fait que tous les peptides peuvent entrer dans la cellule, y compris ceux qui sont toxiques. C'est le cas pour ceux qui sont émis par d'autres bactéries en compétition pour coloniser une même niche écologique. Citons parmi tant d'autres la toxine phaseolo produite par *Pseudomonas syringae* (Staskawicz et al. 1980). Mais l'import de peptides est loin d'être la seule fonction de ce transporteur.

Un autre rôle important du système Opp est le recyclage des peptides de la membrane cellulaire. En effet, près de 50% de ces peptides peuvent être recyclés en une seule génération. Malgré le fait que ces constituants de la membrane cellulaire n'aient pas la même structure que les protéines (ils contiennent des acides aminés d'isoforme D au lieu de L), Goodell et ses collègues démontrèrent que c'est bien le système Opp qui est à l'origine du recyclage des peptides membranaires (Goodell et al. 1987). C'est près de dix ans après cette découverte que Park et ses collègues précisèrent ce mécanisme de recyclage en prouvant que l'interaction des peptides se fait avec une autre protéine périplasmique du nom de MppA, qui interagit, au même titre qu'OppA, avec le complexe OppBCDF (Park et al. 1998).

Selon Richarme et ses collègues il semblerait qu'OppA joue également un rôle de protéine chaperonne, tout comme MglB et MalE, deux autres protéines périplasmiques dont la fonction principale est de fixer respectivement du galactose et du maltose. À l'inverse de beaucoup de protéines cellulaires, l'expression de ces protéines périplasmiques reste constante après un choc thermique (Richarme et al. 1997). Chez *Listeria monocytogenes*, OppA est indispensable à la croissance à 4°C. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ce phénomène est l'implication d'un peptide « phéromone du froid » (Borezee et al. 2000).

Dès 1991, un mutant de *B. subtilis* montra des difficultés à entrer en sporulation et une diminution de la compétence (Rudner et al. 1991). Cette souche est mutée au niveau d'un locus dénommé spoOK, qui fut identifié comme étant pour partie le gène *trpS* et pour autre partie l'opéron *opp* (Perego et al. 1991). La mutation dans le gène *trpS* est suffisante pour

obtenir une souche déficiente pour la sporulation alors que celle dans l'opéron *opp* augmente cette déficience tout en étant incapable de la provoquer par elle-même. Lazazzera et ses collègues précisèrent par la suite qu'OppA permet l'entrée dans la cellule de CSF, peptide de quorum sensing qui est important pour la sporulation et la compétence (Lazazzera et al. 1997). Cependant, le rôle d'OppA ne se limite pas à l'entrée de CSF puisque le mutant CSF est moins diminué dans ses capacités de sporulation et de compétence que le mutant OppA. D'autre part, un homologue de la protéine OppA, PlpA, fut identifié chez *Streptococcus pneumoniae* comme étant important lors de la transformation des bactéries (Pearce et al. 1994).

Le système Opp, et plus précisément la protéine OppA, est également important pour l'homme, puisqu'il peut jouer un rôle dans l'éradication de certaines bactéries ou les pathologies qu'elles causent. Tout d'abord, le transporteur Opp est la porte d'entrée d'une certaine classe d'antibiotiques que sont les aminoglycosides (gentamycine, kanamycine, neomycine, paromomycine ou encore streptomycine) comme l'a découvert Kashiwagi en 1992 (Kashiwagi et al. 1992). Cet auteur démontra que 40% des souches *E. coli* naturellement résistantes à la kanamycine ont une diminution de l'expression du gène *oppA*. Cette diminution peut avoir lieu soit suite à une mutation qui induit l'apparition d'un codon stop prématurément dans le gène *oppA*, soit par l'inhibition d'un activateur de l'expression du gène *oppA* (Kashiwagi et al. 1998). Ce phénomène n'est pas réservé aux laboratoires : Acosta observa en 2000 que 46% des résistances aux antibiotiques rencontrées en milieu hospitalier sont liées à OppA (Acosta et al. 2000). À l'opposé, Nakamatsu et ses collègues démontrèrent qu'il n'y a pas de lien direct entre la résistance aux antibiotiques et la sous-expression du gène *oppA* (Nakamatsu et al. 2007).

D'autre part, il a été démontré à plusieurs reprises qu'OppA joue un rôle important dans la virulence des pathogènes en particulier en influençant l'adhésion sur les cellules hôtes. Ainsi Henrich et ses collègues prouvèrent qu'OppA (alors connue sous le nom de P100) permet l'adhésion de *Mycoplasma hominis* sur des cellules eucaryotes (Henrich et al. 1993, Henrich et al. 1999). De même Ami, un homologue de Opp chez *Streptococcus pneumoniae*, permet l'adhérence des bactéries sur des cellules eucaryotes (Cundell et al. 1995). OppA joue également un rôle important dans l'adhérence de *S. agalactiae* aux tissus hôtes (Samen et al. 2004) en favorisant l'expression de FbsA, protéine majeure qui permet la fixation de la bactérie sur les molécules du fibrinogène de l'hôte. Dans le même ordre d'idée, en 1997, Mei et ses collègues affirmèrent qu'un mutant *Staphylococcus aureus opp* est moins

virulent qu'une souche sauvage (Mei et al. 1997), tout comme c'est le cas dans le groupe A des *Streptocoques* (Wang et al. 2005). On peut aussi observer un retard de croissance d'un mutant *L. monocytogenes* dans un macrophage, bien que la population finale soit la même que pour un sauvage (Borezee et al. 2000). De plus, le système Opp permet l'entrée d'un peptide indispensable à la fixation de la protéine PlcR, régulateur des gènes de virulence chez *Bacillus cereus* (Slamti et al. 2002).

L'importance d'OppA dans la lutte contre certaines pathologies fut soupçonné dès 1996 lorsque des anticorps dirigés contre une protéine ayant une forte homologie avec OppA furent détectés chez des souris et chez l'Homme après une infection par *B. burgdorferi* (Das et al. 1996). Quelques années plus tard, OppA se révéla immunogène chez le lapin lors d'une infection par *B. burgdorferi* (Crother et al. 2004). Par la suite, Nowalk et ses collègues démontrèrent que la protéine OppA de *B. burgdorferi* est reconnue par le système immunitaire murin et humain lors d'une infection (Nowalk et al. 2006). De la même manière, OppA de *Haemophilus parasuis* (pathogène de porc) a été démontré comme étant immunogénique (Hong et al. 2011). De façon intéressante, il a également été découvert que les anticorps anti-OppA protègent contre la bactérie *Yersinia pestis* (Tanabe et al. 2006). En 2010, la protéine OppA fut testée dans un vaccin chez des souris : celui-ci se montra efficace pour protéger non seulement contre la maladie causée par *Chlamydia pneumoniae* mais également pour éliminer de l'organisme cette souche bactérienne (Li et al. 2010). De plus, cette même protéine permet l'adaptation de la bactérie au changement d'hôte (de la tique au mammifère).

De nombreuses études ponctuelles révèlent d'autres rôles de la protéine OppA. Ainsi il a été démontré qu'elle permet à elle seule l'hémolyse des cellules hôtes et est cytotoxique, tout en inhibant la formation de biofilms dans *Vibrio furnissii* (Wu et al. 2007). Chez *Mycobacterium tuberculosis*, OppA induit la libération de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'interleukine-6 ce qui provoque l'apoptose des cellules infectées (Dasgupta et al. 2010).

Malgré les très nombreuses études visant à comprendre les mécanismes en jeu dans le complexe Opp en particulier et les systèmes de transport en général, tout n'est pas encore compris et certaines questions restent sans réponse. Ainsi les scientifiques ignorent encore par quels processus certains éléments pénètrent à l'intérieur de la cellule. C'est le cas pour

une molécule appelée adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dont nous allons parler plus précisément dans le chapitre suivant.

I.3 Adénosine monophosphate cyclique

I.3.1 Découverte de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC)

Sutherland et ses collègues découvrirent l'existence de l'adénosine monophosphate 3'-5'-cyclique (AMPC) à la fin des années 1950. A cette époque ils travaillaient sur le rôle de l'épinéphrine dans l'activation de la phosphorylase présente dans le foie de chien. Ils remarquèrent que cette activation a lieu en deux temps : la première étape consiste en la production d'un facteur actif, résistant à la chaleur qui, lors d'une deuxième étape, permet l'activation de la phosphorylase (Berthet et al. 1957). Par la suite, ce facteur fut identifié comme étant de l'AMPC grâce à deux études menées en parallèle : celle de Cook et ses collègues qui analysèrent les produits de la dégradation alcaline de l'ATP (Cook et al. 1957), et celle de Sutherland et ses collègues qui caractérisèrent ce facteur actif qu'ils venaient de découvrir (Sutherland et al. 1957). Les deux molécules présentaient les mêmes propriétés ce qui aboutit à la conclusion qu'il s'agissait du même élément : l'adénosine monophosphate cyclique (figure I-13). L'AMPC fut ainsi le premier messager secondaire à être découvert.

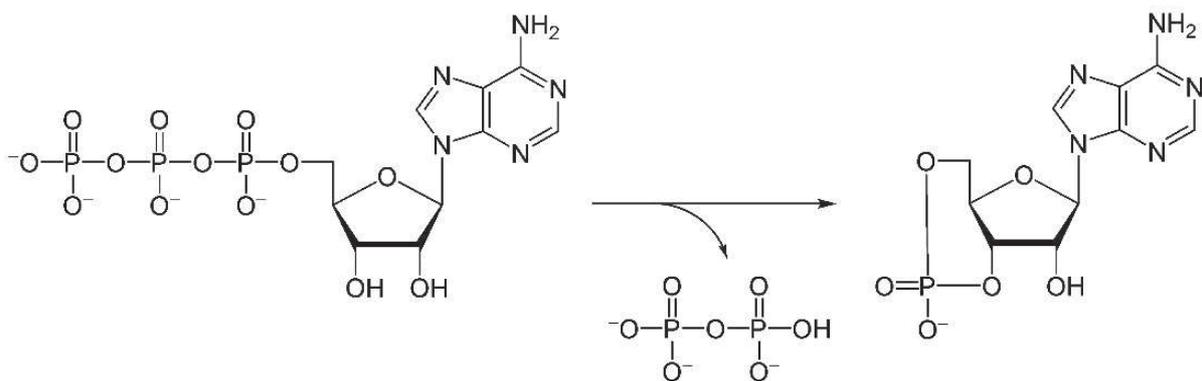


Figure I-13 : Adénosine monophosphate cyclique.

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC, à droite) est synthétisée par l'adénylate cyclase à partir d'adénosine triphosphate (ATP, à gauche).

Il est très vite apparu que l'AMPc n'était pas l'apanage des cellules eucaryotes puisque Okabayashi et ses collègues démontrent dès 1963 que la bactérie *Brevibacterium liquefaciens* produit et excrète dans le milieu de culture de l'AMPc (Okabayashi et al. 1963). La concentration de la molécule est d'ailleurs jusqu'à 100 fois plus élevée que dans les cellules eucaryotes puisqu'elle se trouve à 1 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait sec dans *Fasciola hepatica* (vers parasite du foie) alors qu'elle atteint 100 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait sec dans *B. liquefaciens*. La présence d'adénosine monophosphate cyclique fut prouvée chez *E. coli* quelques années après par Makman et Sutherland (Makman et al. 1965).

I.3.2 Le complexe CRP-AMPc

L'intervention de l'AMPc d'une part, lors de la répression catabolique par le glucose, et d'autre part la découverte d'un mutant incapable de pousser sur lactose ou arabinose à cause d'un défaut dans la protéine CRP (cAMP receptor protein) (Schwartz et al. 1970) permirent de faire le lien pour la première fois entre l'AMPc et CRP. L'hypothèse selon laquelle ces deux éléments interagissent fut initialement émise par Zubay et ses collègues en 1970. La protéine CRP était alors connue sous le nom de CAP (Catabolite gene activator protein) et ces auteurs démontrèrent qu'elle est indispensable à l'action de l'AMPc. CRP est ainsi le premier activateur transcriptionnel à être purifié (Zubay et al. 1970) et dont la structure fut résolue (McKay et al. 1981). Très rapidement, des études établirent que la protéine CRP est constituée de deux sous-unités identiques de 22,5 KDa (Anderson et al. 1971) ne fixant qu'une seule molécule d'AMPc. Cependant, cette dernière caractéristique fut démentie par Weber et Steitz en 1987 qui prouvèrent par cristallographie que chacune des sous-unités fixe une molécule d'AMPc (Weber et al. 1987). À la suite de ces résultats, Heyduk et Lee émirent l'hypothèse selon laquelle la protéine CRP peut se trouver sous trois formes différentes (Heyduk et al. 1989) : CRP seul, CRP avec une molécule d'AMPc ou CRP avec deux molécules d'AMPc. Selon eux, la concentration en AMPc fait toute la différence : en dessous de 200 μM d'AMPc la protéine fixe une seule molécule d'AMPc, tandis que si la concentration est supérieure, alors deux molécules peuvent se fixer sur CRP. La concentration intracellulaire d'AMPc se situant entre 0 et 10 μM , il semblerait que la

forme naturellement présente soit le complexe CRP-AMPc au détriment du complexe CRP-2AMPc.

Il fallu attendre 1982 pour que la structure du complexe formé par une sous-unité de la protéine CRP et une molécule d'AMPc soit élucidée (McKay et al. 1982). Chacune des sous-unités de la protéine CRP possède deux domaines : le domaine C-ter (le plus petit) lie l'ADN, tandis que le domaine N-ter permet la fixation de l'AMPc (McKay et al. 1981). Ces deux domaines sont reliés par une fine charnière. Ce n'est qu'en 2009 que le mécanisme permettant l'activation de CRP par l'AMPc fut décrit par Popovych et ses collègues (Popovych et al. 2009) : l'AMPc, en se fixant au niveau du domaine N-ter de CRP, induit un changement de conformation dans le domaine C-ter de la protéine. Dans cette nouvelle topologie, les deux hélices responsables de la liaison à l'ADN se rapprochent l'une de l'autre et se tournent légèrement formant ainsi une structure favorable à la fixation de la molécule d'ADN (figure I-14).

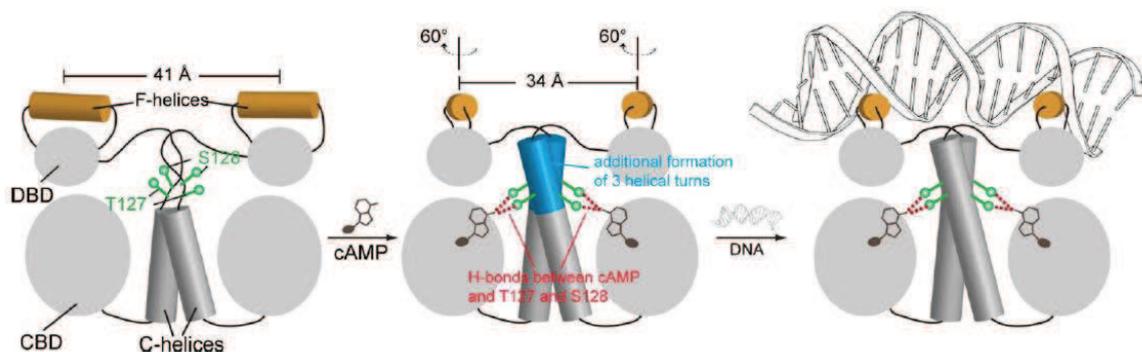


Figure I-14 : Schématisation de la protéine CRP liée à de l'AMPc.

La protéine CRP est symbolisée par ses différents domaines : CBD (cAMP-binding domain), DBD (DNA-binding domain), et les hélices F et C. Un dimère de CRP (à gauche) peut interagir avec deux molécules d'AMPc ce qui provoque un changement de conformation de celui-ci (au milieu). Le complexe CRP-AMPc se fixe sur la molécule d'ADN (à droite) provoquant ainsi sa courbure (Popovych et al. 2009).

Taniguchi et ses collègues émirent pour la première fois une hypothèse quant à la séquence consensus sur l'ADN nécessaire à la fixation du complexe CRP-AMPc en 1979 (Taniguchi et al. 1979). Mais c'est de Crombrugghe et ses collègues qui étudièrent en détail cette séquence en comparant divers promoteurs sensibles au complexe CRP-AMPc (de Crombrugghe et al. 1984). Il en ressort qu'il existe un site extrêmement conservé : TGTGA, qui participe à la fixation du complexe sur l'ADN. Cette séquence se retrouve en symétrie sur le brin opposé mais la conservation de cette seconde séquence est plus faible. Il se dégage

de leur étude une séquence consensus de 30 paires de bases. Cette séquence fut par la suite affinée par Ebright et ses collègues (Ebright et al. 1989). Le site de fixation du complexe CRP-AMPc est réduit à 22 paires de bases puis 16. Celles-ci forment un palindrome laissant apparaître que chacune des sous-unités de la protéine intervient pour la moitié dans la fixation à l'ADN (figure I-15) :

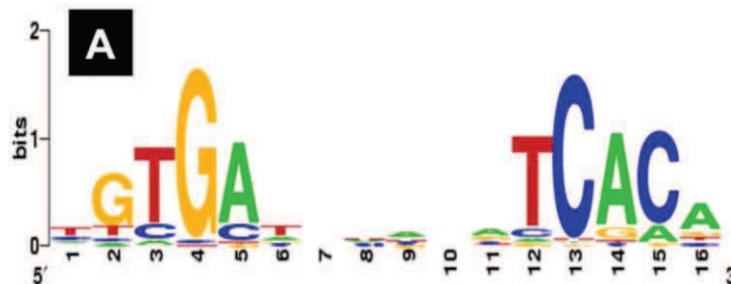


Figure I-15 : Séquence consensus du site de fixation de CRP.

Le complexe CRP-AMPc se fixe au niveau de certains promoteurs sur une séquence spécifique. Cette représentation permet d'identifier les bases azotées les plus conservées dans ce site. On remarque les deux loci qui se lient au dimère de CRP (Shimada et al. 2011).

Schultz et ses collègues démontrèrent en 1991 que la fixation du complexe CRP-AMPc sur l'ADN provoque une courbure de la molécule d'ADN (Schultz et al. 1991), formant ainsi un angle de 90°C. Ceci fut confirmé par la suite par Parkinson et ses collègues (Parkinson et al. 1996).

Deux mécanismes expliquent l'activation des promoteurs par le complexe CRP-AMPc.

- Le premier consiste à augmenter le taux de fixation de l'ARN polymérase sur les promoteurs AMPc-dépendants. Différentes études vont dans ce sens comme celles concernant le promoteur *gal* (Taniguchi et al. 1979), le promoteur *lac* (Fried et al. 1983) ou encore le promoteur *malT* (Chapon et al. 1983).
- Le deuxième mécanisme favorise l'initiation de la transcription au niveau de certains promoteurs AMPc-dépendants. En effet, selon Gaston, la présence du complexe CRP-AMPc favorise le passage du complexe ARN polymérase-ADN de la position fermée (les deux brins d'ADN encore liés) à la position ouverte (les deux brins d'ADN sont séparés) (Gaston et al. 1990), favorisant ainsi la transcription du gène.

En parallèle de ces études, Igarashi et Ishihama établirent que le C-ter de la sous-unité α de l'ARN polymérase (complexe formé de deux sous-unités α , une sous-unité β , une sous-unité β' et une sous-unité σ) est indispensable à la régulation des promoteurs par le complexe CRP-AMPc (Igarashi et al. 1991). De plus, Blazy démontra que seul CRP complexé à une molécule d'AMPc est capable de favoriser l'activation de la transcription par l'ARN polymérase (Blazy et al. 1980). Ces diverses expériences laissaient toutes supposer une interaction directe entre l'ARN polymérase et le complexe CRP-AMPc. C'est en 1980 que Blazy démontra cette interaction (Blazy et al. 1980) qui fut précisée par Chen et ses collègues en 1994 à l'aide de la technique de photocrosslinking (Chen et al. 1994).

Il existe trois types de promoteurs AMPc-dépendants (Busby et al. 1999, Ebright 1993) :

- les promoteurs de classe I sont activés par la seule présence de l'AMPc et le site de fixation du complexe CRP-AMPc se trouve en amont du site de fixation de l'ARN polymérase. Il fut établi par Ushida que ces deux sites peuvent se trouver à différentes distances à partir du moment où ils se trouvent du même côté de la molécule d'ADN (Ushida et al. 1990). Le promoteur le plus étudié de cette classe est le promoteur de l'opéron *lac*.
- les promoteurs de classe II sont également activés par la seule présence de l'AMPc mais, à la différence des promoteurs de classe I, le site de fixation du complexe CRP-AMPc chevauche le site de fixation de l'ARN polymérase. Le promoteur le plus étudié de cette classe est le promoteur *galP1*.
- les promoteurs de classe III, quant à eux, nécessitent un régulateur spécifique en plus du complexe CRP-AMPc. Ce régulateur peut être un deuxième complexe CRP-AMPc ou une protéine activatrice supplémentaire. Les promoteurs les plus représentatifs de cette classe sont les promoteurs *araBAD* et *malk* qui nécessitent respectivement les complexes arabinose-AraC et maltotriose-MalT en plus du complexe CRP-AMPc pour être activés.

Les interactions liant les divers partenaires au niveau des promoteurs, varient selon la classe du promoteur activé. Ainsi Zhou et ses collègues démontrèrent en 1993 l'existence

d'un domaine à l'intérieur de CRP, constitué des acides aminés 156 à 162, indispensable à l'activation des promoteurs de classe I et II par le complexe CRP-AMPc mais pas à sa sur l'ADN ni à la courbure de l'ADN. Il fut supposé que ce « domaine d'activation » (AR1=activating region 1), localisé en C-ter, permet une interaction avec l'ARN polymérase (Zhou et al. 1993). Bien que la protéine CRP soit constituée de deux sous-unités identiques, Zhou et ses collègues affirmèrent qu'une seule de celles-ci interagit avec l'ARN polymérase. Cette conclusion fut obtenue après étude du promoteur *lac* (Zhou et al. 1993) puis de deux autres promoteurs de classe I ainsi qu'avec un promoteur de classe II (Zhou et al. 1994). Dans le cas des promoteurs de classe I, il s'agit de la sous-unité la plus proche du promoteur, alors que pour les promoteurs de classe II, il s'agit de la sous-unité la plus éloignée.

Par ailleurs, Niu et ses collègues démontrèrent en 1996 qu'un second domaine d'activation est nécessaire dans le cas des promoteurs de classe II mais pas de ceux de classe I. Ce second domaine, formé des acides aminés 19, 21, 96 et 101, se trouve en N-ter. Ce domaine AR2 (Activating Region 2) de la sous-unité de CRP la plus proche du promoteur interagit avec le domaine N-ter de la sous-unité alpha de l'ARN polymérase (Niu et al. 1996). Il semble alors que les deux domaines d'activation n'aient pas le même rôle dans l'activation des promoteurs de classe II. En effet, AR1 favorise la formation du complexe ADN-ARN polymérase alors qu'AR2 favorise le passage du complexe fermé au complexe ouvert permettant ainsi la transcription du promoteur (figure I-16).

Il existe également une troisième région d'activation potentielle dans CRP pour les promoteurs de classe II. Ce domaine, appelé AR3, fut découvert par Bell et ses collègues en 1990 (Bell et al. 1990) (figure I-17) : la mutation de la lysine 52 permet d'augmenter l'efficacité de l'activation du promoteur par le complexe CRP-AMPc après fixation au niveau des promoteurs de classe II mais pas de ceux de classe I. Cette troisième région d'activation potentielle se situe dans la sous-unité la plus proche du promoteur selon Williams et ses collègues (Williams et al. 1996) et interagit avec la sous-unité σ^{70} de l'ARN polymérase (Jin et al. 1995). Il semblerait que ce domaine d'activation permette d'augmenter le passage du complexe ARN polymérase-ADN de la forme fermée à la forme ouverte tout comme le domaine AR2 (Busby et al. 1999) (figure I-17).

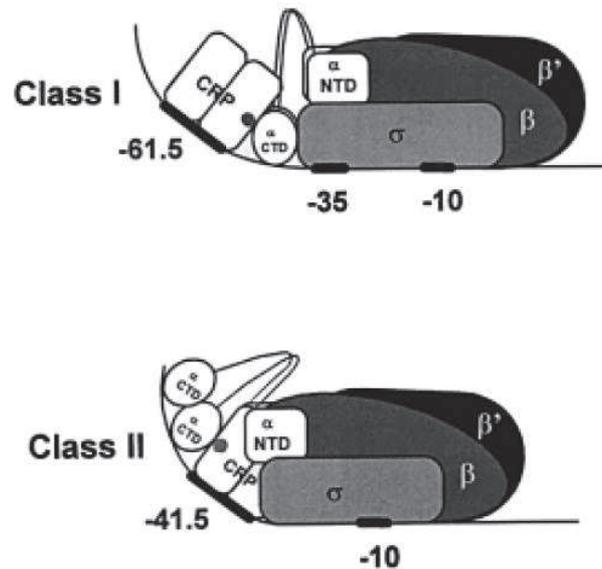


Figure I-16 : Interaction entre la protéine CRP et l'ARN polymérase.

Schéma de l'interaction entre le complexe CRP-AMPc et l'ARN polymérase au niveau d'un promoteur de classe I (en haut) ou de classe II (en bas). Le domaine AR1 du complexe CRP-AMPc permet une interaction avec le domaine C-ter de la sous-unité α de l'ARN polymérase tandis que le domaine AR2, présent uniquement dans le cas des promoteurs de classe II, se lie au domaine N-ter de cette même sous-unité (W et al. 2000).

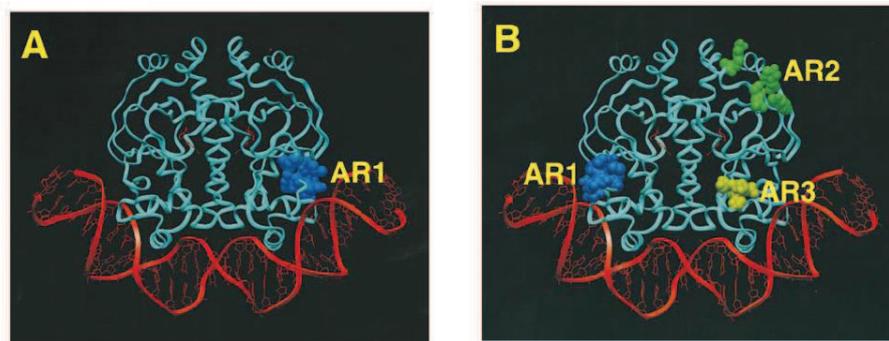


Figure I-17 : Complexe CRP-ADN.

Structure du complexe CRP-AMPc-ADN formé au niveau des promoteurs de classe I (A) ou de classe II (B) (Busby et al. 1999). L'ADN est représenté par une double hélice rouge tandis que le dimère CRP est présenté en bleu. Les domaines AR1 (acides aminés 156 à 162) et AR2 (acides aminés 19, 21, 96 et 101) interagissent avec l'ARN polymérase, ce qui induit l'activation de l'expression des gènes régulés par le complexe CRP-AMPc. Le domaine AR3 (lysine 52) permet d'augmenter l'efficacité du complexe CRP-AMPc s'il est muté.

Quant aux promoteurs de classe III, ils utilisent les mécanismes décrits pour les promoteurs de classe I ou II selon la position du site de CRP, mais font intervenir en plus, un second régulateur. Nous pouvons ainsi citer le promoteur du gène *acs* (Acetyl-Coenzyme A synthétase) qui entre en jeu lors de l'utilisation de l'acétate comme source d'énergie. Ce

promoteur possède deux sites de fixation du complexe CRP-AMPc. Chacun de ceux-ci se trouvant en amont du site de fixation de l'ARN polymérase, ils se comportent tous deux comme de simples promoteurs de classe I (Beatty et al. 2003).

Cependant les promoteurs de classe III concernent également les gènes dont l'activation nécessite la présence d'une molécule autre que le complexe CRP-AMPc. Parmi ceux-ci, nous trouvons le promoteur *melAB* (qui code pour les protéines nécessaires à l'utilisation du mélibiose comme source d'énergie) qui requiert, en plus du complexe CRP-AMPc, la protéine MelR. Ces deux éléments vont interagir entre eux afin d'activer la transcription à partir de ce promoteur (Belyaeva et al. 2000).

Un autre mécanisme pouvant entrer en jeu au niveau de ces promoteurs de classe III est la capacité du complexe CRP-AMPc à courber la molécule d'ADN. Ainsi, la transcription à partir du promoteur *araBAD* est activée grâce à ce phénomène qui favorise la fixation de la protéine AraC couplée à une molécule d'arabinose au niveau du promoteur au détriment du dimère AraC qui inhibe la transcription (Lobell et al. 1991).

Bien que l'activation d'un promoteur par le couple CRP-AMPc soit le phénomène le plus connu, il existe aussi des promoteurs qui sont inhibés par ce complexe. Deux types de répression sont observés *in vivo* (Kolb et al. 1993). Le premier consiste en une inhibition directe de la fixation de l'ARN polymérase par encombrement stérique de son site de fixation par le complexe CRP-AMPc. C'est le cas, par exemple, pour les promoteurs des gènes *cya* (codant pour l'adénylate cyclase, (Aiba 1985)) et *galP2* (codant pour les protéines nécessaires à l'utilisation du galactose comme source d'énergie, (Musso et al. 1977)).

Le deuxième type de répression par le complexe CRP-AMPc est de type indirect. C'est le cas pour le promoteur *spf*, codant pour un petit ARN, où le site de fixation du complexe CRP-AMPc recouvre un site de fixation pour un facteur d'activation. Les deux éléments entrant en compétition, le complexe CRP-AMPc est donc répresseur par inhibition d'un activateur (Polayes et al. 1988). Un autre type de compétition conduit à l'inhibition d'un promoteur : il s'agit de celle qu'il y a entre la protéine CytR et l'ARN polymérase. En effet, ces deux protéines forment des interactions protéine-protéine avec le complexe CRP-AMPc. Ainsi lorsque seule l'ARN polymérase est présente, le promoteur en aval est activé. Cependant, lorsque la protéine CytR qui a une forte affinité pour le complexe CRP-AMPc est présente, elle empêche l'ARN polymérase d'interagir avec celui-ci. Il en résulte une diminution de l'activation du promoteur (Mollegaard et al. 1993).

Un dernier mécanisme connu expliquant l'inhibition d'un promoteur par le complexe CRP-AMPc est la stabilisation de la forme ouverte du complexe ADN-ARN polymérase. En effet, une fois que le complexe ADN-ARN polymérase est passé de la forme fermée à la forme ouverte, l'élongation de l'ARN peut commencer. En stabilisant le complexe d'initiation de la transcription, CRP diminue la fréquence d'élongation de l'ARN et bloque l'apparition d'un nouveau complexe d'initiation. C'est ce qui a été observé au niveau du promoteur P1 du gène *lac* (Liu et al. 2004) et du promoteur P2 du gène *gal* (Rostoks et al. 2000) (figure I-18).

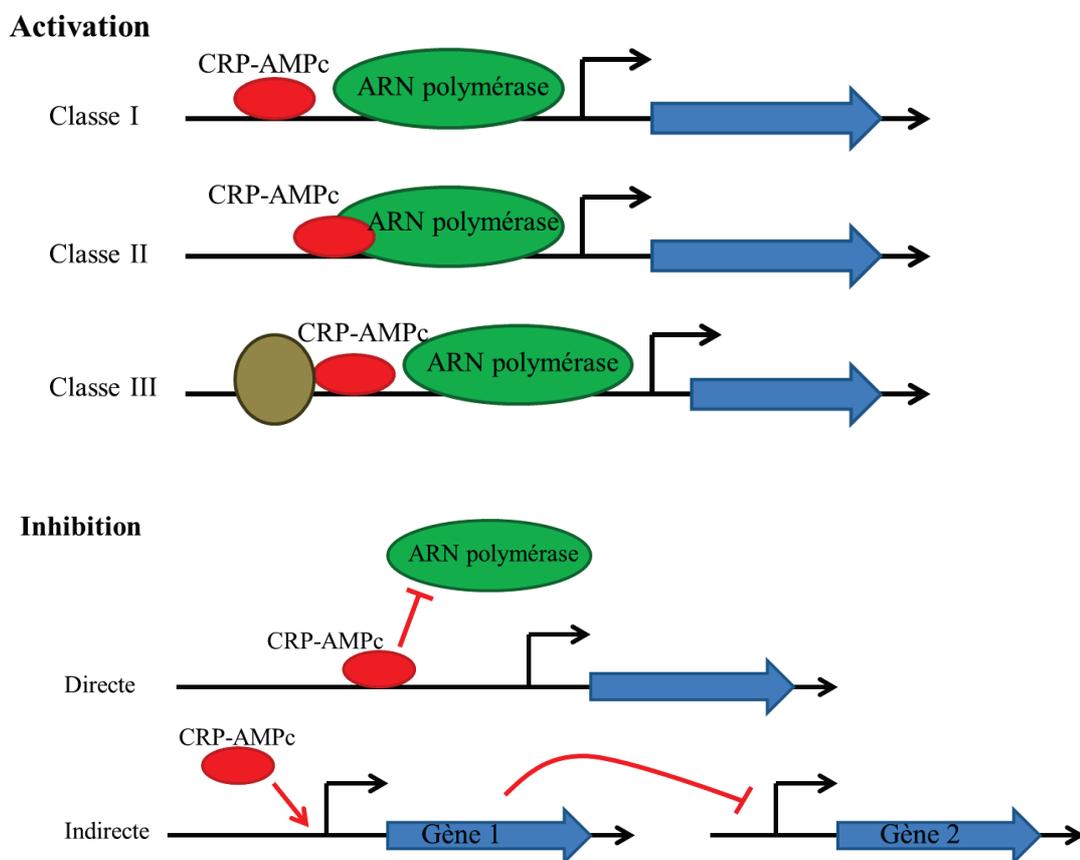


Figure I-18 : Régulation de l'expression de gènes par le complexe CRP-AMPc.

L'activation par le complexe CRP-AMPc se fait par différents mécanismes selon la classe du promoteur. Le site de fixation du complexe peut être en amont (classe I) ou au niveau (classe II) du site de fixation de l'ARN polymérase. Une protéine supplémentaire peut être nécessaire dans le cas d'un promoteur de classe III.

L'inhibition peut être directe par inhibition de la fixation de l'ARN polymérase ou indirecte par activation d'un inhibiteur.

I.3.3 Les gènes régulés par le complexe CRP-AMPc

L'AMPc régule environ 300 gènes lorsqu'il est fixé sur la protéine CRP et il serait bien inutile de vouloir en faire une liste exhaustive ici (Zheng et al. 2004). Je me contenterai donc de ne citer que les gènes les plus étudiés.

Un fait intéressant concerne la régulation des gènes codant pour CRP et l'adénylate cyclase par le complexe CRP-AMPc lui-même. En effet, Aiba démontra que les gènes *cyaA* (Aiba 1985) et *crp* (Aiba 1983) sont inhibés par le complexe CRP-AMPc. Cependant, ce gène *crp* se révèle également être activé par le complexe CRP-AMPc lorsque les concentrations d'AMPc sont plus élevées (Hanamura et al. 1992).

Les gènes du catabolisme constituent une classe très importante régulée par le complexe CRP-AMPc. Ce sont d'ailleurs les premiers gènes identifiés du régulon de CRP-AMPc (Pastan et al. 1970, Ullmann et al. 1968). Ainsi, ce complexe active les gènes codant pour les protéines nécessaires à l'utilisation du lactose (Schmitz 1981), du galactose, du maltose, de l'arabinose ou tout autre sucre hormis le glucose. En l'absence de ce dernier, la concentration en AMPc intracellulaire augmente permettant ainsi la mise en place d'autres systèmes producteurs d'énergie et utilisant des sucres dits alternatifs (Gosset et al. 2004).

Au fur et à mesure de l'avancée des études concernant l'AMPc, il s'avéra que les gènes du catabolisme sont loin d'être les seuls à être régulés par le complexe CRP-AMPc. En effet, de nombreux gènes liés à la pathogénie de la souche bactérienne sont dépendants de ce régulateur. Jackson et ses collègues démontrèrent en 2002 son implication dans la production des biofilms chez les entérobactéries (Jackson et al. 2002) tandis que Nishino et ses collègues affirmèrent son rôle dans la résistance aux antibiotiques grâce à l'effet répresseur de l'expression des gènes codant pour les protéines MdtE et MdtF, pompes à efflux utilisées pour l'export d'antibiotiques tels que l'oxacilline, l'azithromycine ou encore l'érythromycine (Hirakawa et al. 2006, Nishino et al. 2008).

Le complexe CRP-AMPc joue également un rôle dans mécanismes qui font l'objet d'un plus faible nombre d'études. Il agit, entre autre, comme un senseur de l'osmolarité (Balsalobre et al. 2006, Landis et al. 1999), il active l'import de fer (Zhang et al. 2005) ou encore la compétence (Sinha et al. 2009).

La très grande variété des gènes régulés par le complexe CRP-AMPC explique le fait que la concentration intracellulaire d'AMPC soit extrêmement régulée elle-même.

I.3.4 Régulation de la concentration intracellulaire d'AMPC

La présence d'AMPC dans la cellule résulte d'un équilibre entre l'activité de l'enzyme adénylate cyclase, responsable de la production de cette molécule à partir d'adénosine triphosphate (ATP), et celle de l'enzyme phosphodiesterase, responsable de son élimination. Comme le laisse supposer la très large distribution de l'AMPC, ces deux enzymes se retrouvent dans un grand nombre d'organismes.

Chez *Escherichia coli*, l'adénylate cyclase est codée par le gène *cyaA* dont l'expression est très finement contrôlée. En effet, une expression excessive de ce gène est létale pour la bactérie (Reddy et al. 1989). Ce gène a la particularité de posséder trois promoteurs (P1, P1' et P2). Cependant, la très grosse majorité de la transcription se fait à partir d'un seul de ces promoteurs : P2 (Aiba 1985). L'adénylate cyclase fut purifiée pour la première fois par Yang et Epstein en 1983 (Yang et al. 1983). Ils purent ainsi démontrer qu'il y a à peu près 15 molécules par cellule ce qui est similaire à d'autres protéines régulatrices telles que le repréresseur Lac. Contrairement à ce qui avait été soupçonné jusqu'à présent (Janecek et al. 1980, Majerfeld et al. 1981), cette étude indique que l'adénylate cyclase est une protéine principalement cytoplasmique. C'est une enzyme qui est inhibée de façon non compétitive par la présence de PPI, laissant supposer que le relâchement de cette molécule après transformation de l'ATP en AMPC est l'étape limitante de cette réaction (Yang et al. 1983). Il fut également confirmé que le glucose (mais pas le glucose-6-phosphate) inhibe jusqu'à 85% de l'activité de l'adénylate cyclase (Harwood et al. 1975). Ceci vint réaffirmer le rôle primordial du glucose dans la régulation de l'AMPC. En effet, Makman et Sutherland constatèrent que la quantité d'AMPC présente dans le milieu est inversement proportionnelle à la quantité de glucose contenue dans ce milieu (figure I-19) (Makman et al. 1965). D'autre part, l'ajout de glucose dans un milieu n'en contenant pas, induit une forte et rapide diminution de la quantité d'AMPC détectée. Réciproquement, l'élimination du glucose contenu dans un milieu lors d'une croissance bactérienne provoque une augmentation de la

concentration d'AMPc. Il fut ainsi supposé que l'AMPc est un acteur clé de la répression catabolique exercée par le glucose. Ce sucre entre dans la cellule via le système PTS (phosphotransférase system) constitué de plusieurs protéines (EI, HPr et EII) qui transfèrent le groupe phosphate du phosphoenolpyruvate (PEP) sur le glucose. Celui-ci, une fois phosphorylé, peut entrer dans la chaîne de la glycolyse permettant la production d'énergie (Deutscher et al. 2006). Le rôle du glucose dans la régulation de l'AMPc fut plus amplement étudié par la suite ; ainsi Peterkofsky et Gazdar démontrèrent que l'enzyme I du PTS est impliquée dans l'activation de l'adenylate cyclase (Peterkofsky et al. 1975). Plus précisément, la forme phosphorylée de l'enzyme I permet l'activation de l'adenylate cyclase alors que la forme dephosphorylée l'inhibe.

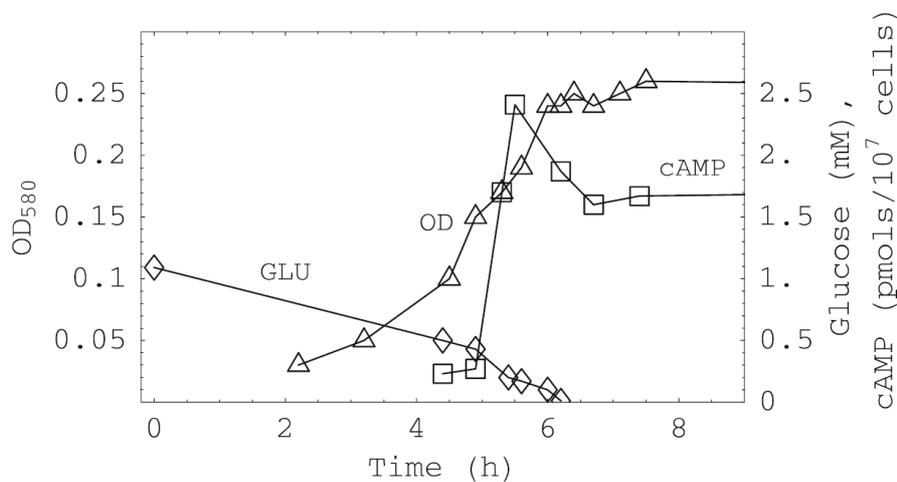


Figure I-19 : La concentration d'AMPc est reliée à la présence de glucose.

Des bactéries *Escherichia coli* sont mises en culture dans un milieu contenant 0,2% de glucose. La croissance (triangles) est divisée en deux phases. La phase exponentielle induit une forte diminution de la concentration de glucose (losanges). Une fois celui-ci épuisé, les bactéries entrent en phase stationnaire et c'est à ce moment-là que la concentration intracellulaire en AMPc augmente brutalement (carrés) (Narang 2009).

En parallèle à cette étude, Saier et Feucht proposèrent un mécanisme selon lequel ce n'est pas l'enzyme I du PTS qui permet la régulation de l'adénylate cyclase mais une protéine appelée RPr (connue plus tard sous le nom de Enzyme II du PTS) (Saier et al. 1975). La suite des expériences validera cette dernière hypothèse au détriment de celle de Peterkofsky, en apportant des preuves génétiques (Feucht et al. 1980) puis biochimiques (Reddy et al. 1998). C'est cependant l'équipe de Peterkofsky qui confirmera définitivement ce mécanisme en démontrant de manière directe, l'interaction entre EII et l'adénylate cyclase (Park et al. 2006). Néanmoins, il prouva lors de cette étude que l'interaction entre les deux protéines a lieu quelque soit le stade de phosphorylation de l'enzyme II du PTS. L'activation

spécifique de l'adénylate cyclase, quant à elle, nécessite un troisième facteur qui entre en jeu uniquement lorsque l'enzyme II du PTS est phosphorylée. L'identité de ce facteur est encore inconnue à ce jour. Il serait intéressant de tester l'efficacité d'autres protéines du PTS dans cette régulation puisque Reddy et ses collègues démontrèrent que EII n'était pas la seule protéine du PTS nécessaire à l'activation de l'adénylate cyclase et que les enzymes I et HPr sont également indispensables (Reddy et al. 1985) (figure I-20).

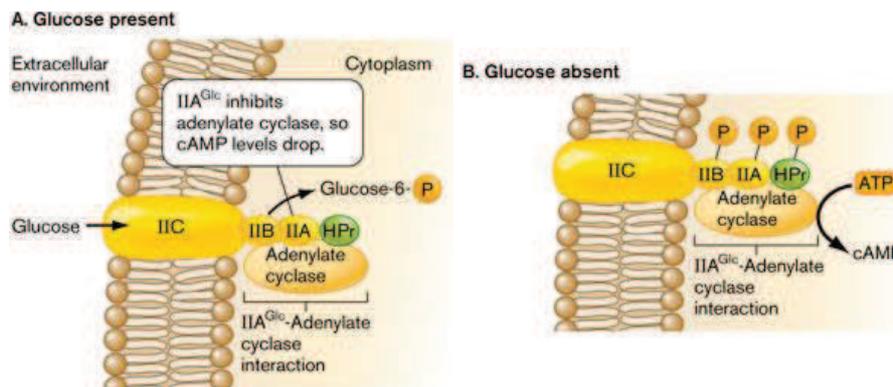


Figure I-20 : Interaction entre l'adénylate cyclase et le PTS.

L'adénylate cyclase interagit avec le PTS en présence (A) et en absence (B) de glucose. Lorsque le sucre est épuisé, l'interaction entre le PTS phosphorylé, l'adénylate cyclase et vraisemblablement un troisième protagoniste induit l'activation de l'enzyme (Slonczewski et al. 2008).

Un autre mécanisme expliquant la très fine régulation de l'adénylate cyclase réside dans le fait que le codon initiateur du gène *cyaA* n'est pas AUG comme pour la plupart des gènes mais le codon UUG, bien moins efficace au moment de la traduction du gène (d'un facteur 3 à 6 selon les expériences, (Reddy et al. 1985)). Bien que ce codon diminue l'efficacité de la traduction, il semblerait qu'il ne modifie pas le rendement de la transcription. Les polyamines sont capables de contre-balancer, en partie, ce codon initiateur faible en favorisant la fixation du codon UUG sur l'anticodon fMet-tRNA_i, augmentant ainsi d'un facteur de 2,5 la synthèse d'adénylate cyclase (Yoshida et al. 2001).

Il fut également démontré que d'autres facteurs pouvaient influencer l'activité de l'adénylate cyclase. En effet, Reddy affirma que le facteur d'élongation EF-Tu serait aussi à l'origine d'une augmentation de l'activité de l'enzyme (Reddy et al. 1986). En parallèle à cela, Joseph et ses collègues établirent en 1982 que l'activité de l'adénylate cyclase peut être inhibée par le complexe CRP-AMPc (Joseph et al. 1982).

Bien que la principale voie d'inhibition de l'adénylate cyclase soit l'absence de EII phosphorylée (Takahashi et al. 1980), il existe tout de même au moins un mécanisme spécifique à l'inhibition de cette enzyme. Il s'agit de l'inhibition de la transcription du gène *cyaA* par le complexe CRP-AMPC. En effet, divers études prouvèrent que ce complexe se fixe au niveau du site de liaison de l'ARN polymérase empêchant ainsi la transcription d'avoir lieu (Aiba 1985, Inada et al. 1996).

La concentration intracellulaire d'AMPC est dépendante de l'activité de l'adénylate cyclase mais également de celle de la phosphodiesterase, responsable de la dégradation de cette molécule. Cette enzyme est codée par le gène *cpdA* découvert en 1996 par Imamura et ses collègues (Imamura et al. 1996). Lors de cette étude, il fut établi que ce gène, tout comme celui de *cyaA*, possède un codon initiateur faible : UUG, ce qui induit une traduction peu efficace. Aboud et ses collègues démontrèrent en 1971 que *cpdA* est également sensible à la répression catabolique (Aboud et al. 1971). Un autre élément permettant de réguler la quantité intracellulaire de la phosphodiesterase est le complexe CRP-AMPC lui-même. En effet, Kim et ses collègues affirmèrent en 2009 que ce complexe active la transcription à partir du gène *cpdA* chez *Vibrio vulnificus*, laissant supposer que le même mécanisme a lieu également chez *E.coli* (Kim et al. 2009) (figure I-21).

Malgré la présence de cette phosphodiesterase chez *E.coli*, Hantke et ses collègues (Hantke et al. 2011) émirent l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse de l'AMPC n'est pas la voie primordiale pour faire baisser sa concentration intracellulaire. En effet, la faible affinité de l'AMPC pour cette phosphodiesterase (500 μ M (Imamura et al. 1996)) comparée à la constante de dissociation du complexe CRP-AMPC (400 nM (Suh et al. 2002)) suggère que l'hydrolyse n'a que peu d'effet sur la présence intracellulaire de l'AMPC. Selon eux, l'export de la molécule dans le milieu environant est le principal mécanisme permettant l'élimination de l'AMPC.

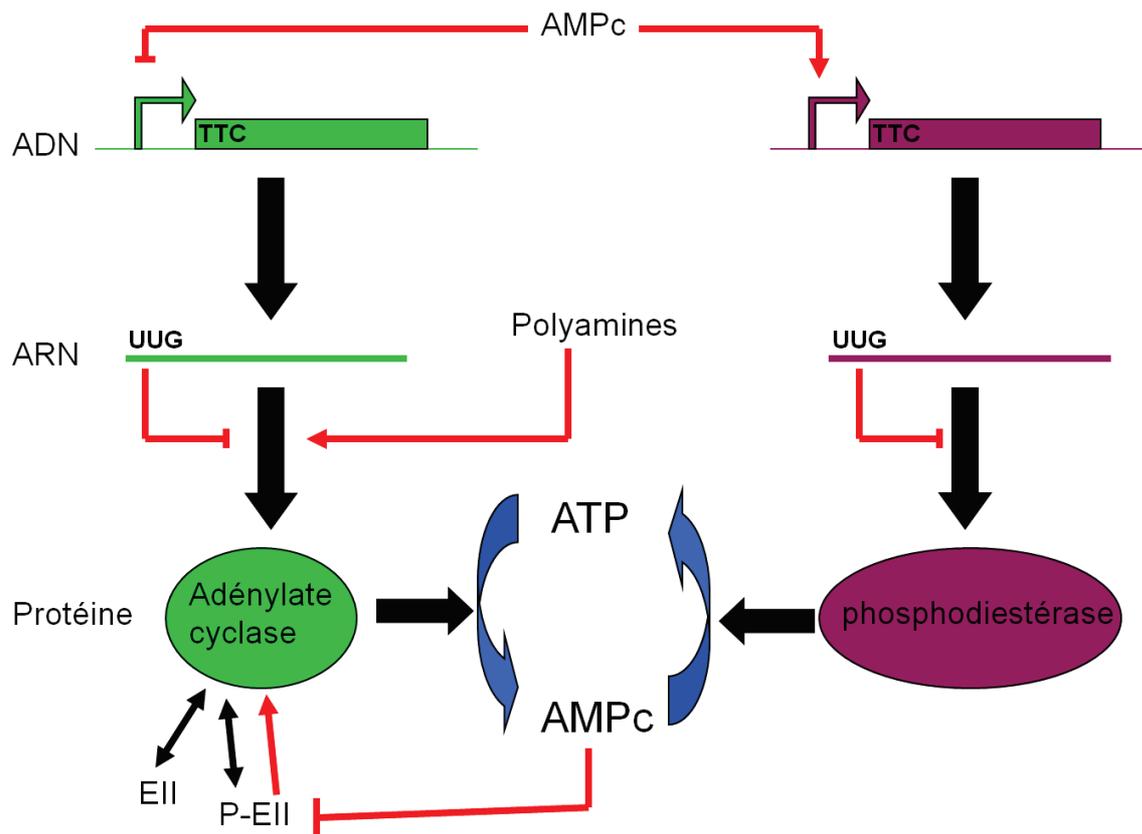


Figure I-21 : Régulation de la concentration intracellulaire d'AMPc.

La production d'AMPc à partir d'ATP est régulée par de nombreux mécanismes qui agissent sur l'adénylate cyclase et la phosphodiesterase. Les flèches noires indiquent les actions des enzymes, les doubles flèches noires indiquent une interaction, les flèches rouges indiquent une activation tandis que les traits rouges indiquent une inhibition.

I.3.5 Transport d'AMPc.

Pendant de longues années, les données sur le rôle de l'AMPc dans les cellules furent acquise grâce à l'ajout de celui-ci dans le milieu de culture des bactéries. Il était communément accepté que la présence d'EDTA dans ces expériences était indispensable pour permettre la perméabilisation des membranes cellulaires et donc l'entrée de la molécule d'intérêt dans la cellule. Cependant, en 1969, Perlman et ses collègues démontrèrent que l'AMPc a autant d'effet sur les cellules non traitées que les cellules traitées à l'EDTA (Perlman et al. 1969).

Alors que différentes études démontrent que l'AMPc peut être exporté et importé par *Escherichia coli*, la preuve réelle de ce transport fut apportée par Goldenbaum et Halle en 1979. C'est en étudiant le transfert de l'AMPc de l'extérieur vers l'intérieur de vésicules

membranaires qu'ils commencèrent à caractériser le transport de l'AMPc (Goldenbaum et al. 1979).

Contrairement à l'import dont nous parlerons plus loin, l'export semble être dépendant de l'énergie cellulaire et donc se fait via un transport actif. Mais il faudra attendre 2011 et les travaux de Hantke pour que la protéine TolC soit identifiée comme étant la responsable de l'export de l'AMPc chez *E. coli* (Hantke et al. 2011).

TolC est une protéine qui forme un pore au niveau de la membrane externe d'*E. coli*. Cette protéine, associée à divers complexes de la membrane interne tels que HlyBD, CvaBA ou encore AcrAB ou AcrEF, permet l'export de nombreuses molécules. Les protéines de la membrane interne vont être responsables de la spécificité du transport (hémolysine pour Hly, colicine pour Cva, acriflavine, β -lactames, ou encore les acides gras pour Acr). Ces protéines sont couplées à un mécanisme qui fournit de l'énergie (hydrolyse d'ATP ou antiport de protons) pour permettre l'export des substrats. Ceux-ci se retrouvent ensuite dans le périplasma et sont pris en charge par TolC qui les transporte vers le milieu extérieur (Koronakis et al. 2004) (figure I-22).

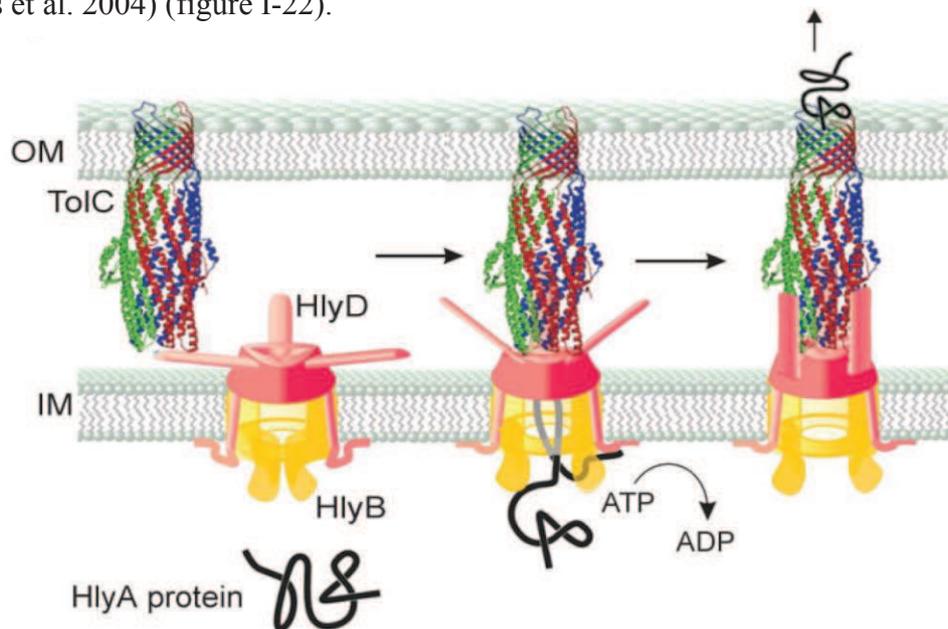


Figure I-22 : Export de molécule par le système TolC.

TolC est une protéine qui forme un canal dans la membrane externe (OM) de la bactérie. Les molécules à exporter (ici HlyA) sont prises en charge par divers complexes (ici, le complexe HlyDB) situés dans la membrane interne (IM). L'hydrolyse de l'ATP induit un changement de conformation qui provoque l'interaction entre ce canal et la protéine TolC, ce qui permet l'export de la molécule (Koronakis et al. 2004).

Connaissant les propriétés de transport de cette protéine, Hantke testa son efficacité à exporter de l'AMPc. Pour cela, il étudia le comportement d'un mutant *tolC* face à une

induction par IPTG. L'activité de la β -galactosidase étant liée à la présence d'IPTG et du complexe CRP-AMPc, elle se révèle être le reflet de la concentration en CRP-AMPc et donc en AMPc puisque la quantité d'IPTG est connue, non limitante et identique pour le mutant *tolC* et la souche sauvage. Il s'avéra que la souche mutée pour la protéine TolC possède une activité β -galactosidase plus importante que celle de la souche sauvage pour une quantité d'inducteur identique (Hantke et al. 2011). Ces résultats tentent à démontrer que l'absence de la protéine TolC induit une augmentation de la concentration intracellulaire de la molécule AMPc, sous-entendant son rôle dans l'export de la molécule cyclique (Hantke et al. 2011).

En ce qui concerne l'import de la molécule, Goldenbaum et ses collègues affirmèrent, en utilisant le couple ascorbate-PMS, que l'énergie du métabolisme n'est pas nécessaire à l'entrée de l'AMPc. Ils éliminent ainsi l'hypothèse selon laquelle un transport actif serait à l'origine de l'import d'AMPc. D'autre part, ils observèrent une saturation de leur système d'étude lorsque la concentration en AMPc devenaient importante (indiquant un K_M de 10 mM), ainsi qu'une compétitivité entre l'AMPc et ses analogues, ce qui indique la présence d'un transporteur. Ils en conclurent que l'AMPc entre dans la cellule via un processus de diffusion facilitée. À la vue du K_M élevé révélé par cette étude, les auteurs émirent l'hypothèse selon laquelle l'import de l'AMPc ne serait pas la fonction première du transporteur. Ils supposèrent que celui-ci serait plutôt consacré au transport de nucléosides, de purines, voire à l'export d'AMPc. Un autre fait intéressant révélé par cette étude est l'augmentation de l'import de l'AMPc par les vésicules lorsque celles-ci sont préparées en sa présence. Il semblerait donc que la molécule induise elle-même une augmentation soit du nombre de transporteurs qui la prend en charge soit de l'efficacité de celui-ci.

Aucune étude n'a pu identifier jusqu'à présent une quelconque protéine mise en jeu malgré la preuve apportée par Goldenbaum concernant son existence. Ce sera tout l'enjeu de l'étude sur le transport de l'AMPc présentée ici.

II- Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

Toutes les bactéries utilisées sont des souches d'*E. coli*. Sauf mention contraire, elles ont été obtenues par la collection Keio ou étaient présentes dans les stocks du laboratoire.

II.1.1 Souches utilisés

Le tableau suivant résume les souches utilisées lors de ces travaux :

Tableau II-1 : Souches utilisées lors de ces travaux

Souche	Source/référence	Utilisation
DH5α λpir	Stock laboratoire / (Chiang et al. 2002)	Contrôle de la transposition
SM10 λpir	Stock laboratoire / (Chiang et al. 2002)	Transposition
BW25113 CyaA ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Banque de mutants Etude d'OppA
BW25113 OppA ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Etude d'OppA Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ OppA ⁻
BW25113 OppB ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ OppB ⁻
BW25113 OppC ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ OppC ⁻
BW25113 OppD ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ OppD ⁻
BW25113 OppF ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ OppF ⁻
BW25113 CyaA ⁻ OppA ⁻	Créé lors de cette étude	Etude du rôle d'OppA
BW25113 CyaA ⁻ OppB ⁻	Créé lors de cette étude	Etude du système opp
BW25113 CyaA ⁻ OppC ⁻	Créé lors de cette étude	Etude du système opp
BW25113 CyaA ⁻ OppD ⁻	Créé lors de cette étude	Etude du système opp
BW25113 CyaA ⁻ OppF ⁻	Créé lors de cette étude	Etude du système opp
Clone ASKA OppA	Donné par C. Wandersman / (Kitagawa et al. 2005)	Purification d'OppA
BW25113 NupC ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ NupC ⁻
BW25113 NupG ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ NupG ⁻
BW25113 CyaA ⁻ NupC ⁻	Créé lors de cette étude	Etude de NupC
BW25113 CyaA ⁻ NupG ⁻	Créé lors de cette étude	Etude de NupG
BW25113 DppA ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Création de la souche BW25113 CyaA ⁻ DppA ⁻
BW25113 CyaA ⁻ DppA ⁻	Créé lors de cette étude	Etude de DppA
BW25113 TolC ⁻	Stock laboratoire / (Baba et al. 2006)	Etude du rôle de TolC
BW25113 CyaA ⁻ TolC ⁻	Créé lors de cette étude	Etude du rôle de TolC

II.1.2 Plasmides utilisés

Le tableau suivant résume les plasmides utilisés lors de ces travaux ainsi que leur caractéristique :

Tableau II-2 : Plasmides utilisés au cours de ces travaux

Plasmide	Source/référence	Utilisation
pZA-tetR-crp	Stock laboratoire	Surexpression de CRP
pSB-acs-luc	Stock laboratoire	Etude de l'import d'AMPc
pSB-sdh-luc	Stock laboratoire	Etude de l'import d'AMPc
pZA-tetR-cyaA	Stock laboratoire	Surexpression de l'adénylate cyclase
pSU19	Donné par C.Wandersman / (Bartolome et al. 1991)	Surexpression de l'opéron <i>opp</i>
pQE80	Stock laboratoire	Surexpression de l'opéron <i>opp</i>
pUA139-RM-gfp	Stock laboratoire	Etude de l'import d'AMPc
pUA139-sdh-gfp	Stock laboratoire / (Zaslaver et al. 2006)	Etude de l'import d'AMPc
pUA139-gfp	Stock laboratoire / (Zaslaver et al. 2006)	Etude de l'import d'AMPc

II.1.3 Amorces utilisées :

Le tableau suivant résume les amorces utilisées lors de ces travaux. Elles ont été obtenues par le fournisseur Sigma[®]. Le nom des amorces fait généralement référence au gène amplifié grâce à celles-ci. Tandis que la précision 3' ou 5' en fin de nom permet de localiser l'amorce par rapport au gène qu'elle amplifie.

Tableau II-3 : Amorces utilisées au cours de ces travaux

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation
TnSC189_IDF	GCTCTCATGGCTAACGTACTAAGC	Identification du lieu d'insertion du transposon
TnSC189_IDR	GTCATCGTCATCCTTGTAATCG	Identification du lieu d'insertion du transposon
pScIR1	AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTG	PCR aléatoire pour identifier les mutants
pScIR2Km	CTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG	PCR aléatoire pour identifier les mutants
ARBN1	GGCCACGCGTCGACTAGTACN ₁₀ GATAT	PCR aléatoire pour identifier les mutants
ARBN6	GGCCACGCGTCGACTAGTACN ₁₀ ACGCC	PCR aléatoire pour identifier les mutants
pScIR1bis	CTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCG	PCR aléatoire pour identifier les mutants
ARBbis	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	PCR aléatoire pour identifier les mutants

PscIR2Kmbis	TTCTGAGCGGGACTCTGGGGTACG	PCR aléatoire pour identifier les mutants
<i>cyaA1</i>	GGTTACCTTTGACATACG	Vérification du gène <i>cyaA</i>
<i>cyaA2</i>	GTGAAACAGTCAGTTTCC	Vérification du gène <i>cyaA</i>
OppA-5'	GGATTACACATGCTGGTTAA	Vérification du gène <i>OppA</i>
OppA-3'	TGCGATAAAAATCAGACACC	Vérification du gène <i>OppA</i>
OppB-5'	CATTACAGAAGGCACAGGCC	Vérification du gène <i>OppB</i>
OppB-3'2	ATCGCGAGCTCCAGTATCAG	Vérification du gène <i>OppB</i>
OppC-5'	AAATCCGTTACTGATACTGG	Vérification du gène <i>OppC</i>
OppC-3'2	ATGGCTGCACTCCTTAACGA	Vérification du gène <i>OppC</i>
OppD-5'	GATGCCCTCGACCCGAAAGA	Vérification du gène <i>OppD</i>
OppD-3'2	TTCCTTCAGTTACAGCATTC	Vérification du gène <i>OppD</i>
OppF-5'	CGTCTGCGTGCTTGCTTTAA	Vérification du gène <i>OppF</i>
OppF-3'2	GTCAGCCCTTATTGTTTTTA	Vérification du gène <i>OppF</i>
TolC-3'	TTTACGTTGCCTTACGTTTACG	Vérification du gène <i>TolC</i>
TolC-5'	TACTGCTTACCACAAGGAATG	Vérification du gène <i>TolC</i>

II.1.4 Milieu de culture

- Milieu riche Luria Broth (LB) ;
- Milieu minimum M9 :
 - Sels (NaHPO₄, 7H₂O 52 mM ; KH₂PO₄ 53 mM ; Na Cl 8,6 mM ; NH₄Cl 18,6 M)
 - MgSO₄ 2 mM
 - CaCl₂ 0,1 mM
 - Thiamine 0,01%
 - Métaux (Na₂EDTA, 2H₂O 15 mg/L ; ZnSO₄, 7H₂O 4,5 mg/L ; CoCl₂, 6H₂O 0,3 mg/L ; MnCl₂, 4H₂O 1 mg/L ; H₃BO₃ 1 mg/L ; Na₂MoO₄, 2H₂O 0,4 mg/L ; FeSO₄, 7H₂O 3mg/L ; CuSO₄, 5H₂O 0,3 mg/L)
- LA (LB + 12 % agar) ;

II.1.5 Sources de carbone

Les sources de carbonnes sont préparées à partir de poudre qui proviennent de Sigma Aldrich® et sont utilisées dans les concentrations suivantes sauf indication contraire : glucose 0,03% (lors des expériences) ou 0,3% (lors des pré-cultures), maltose 0,3%. Les poudres sont

diluées dans de l'eau ultrapure (Milli-Q[®]) puis stérilisées grâce à des filtres de 0,20 µm. Les solutions sont conservées à température ambiante.

II.1.6 Antibiotiques

Les antibiotiques sont achetés chez Sigma Aldrich[®] et sont utilisés dans les concentrations suivantes : kanamycine (Kan) 50 µg/mL ; ampicilline (Amp) 50 µg/mL ; chloramphénicol (Cm) 30 µg/mL ; spectinomycine (Spec) 50 µg/mL. Ils sont tous préparés à une concentration de 1 000 X dans de l'eau (kanamycine, ampicilline, spectinomycine) ou de l'éthanol (chloramphénicol) et sont conservés à -20°C.

II.1.7 Produits chimiques

Les différentes molécules utilisées au cours de cette étude ont été achetées chez Sigma Aldrich[®] (AMPc, trialanine, trilysine) ou chez BioLog[®] (ε-AMPc). Elles sont diluées dans de l'eau ultrapure (Milli-Q[®]) et conservées à -20°C. Différentes solutions mère dont la concentration varie de 1 mM à 1 M sont préparées.

II.2 Méthodes

II.2.1 Culture bactérienne

Sauf indication contraire, les souches sont cultivées à 37°C sous agitation avec l'antibiotique adapté si elles possèdent un plasmide. Elles sont conservées à -80°C dans du glycérol 20%.

II.2.2 Transformation des bactéries :

Sauf cas mentionnés, la transformation des bactéries se fait selon à l'aide du TSS (Transformation and Storage Solution). Après une culture sur la nuit à 37°C dans du milieu riche LB, les bactéries sont dilués au 1/100^{ème} dans du milieu LB frais et incubées à 37°C jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,3. 50 µL de culture bactérienne sont mélangés à autant de TSS 2X (DMSO 10% ; PEG6000 20% ; MgSO₄ 100 mM ; dans LB pH 6,5) et laissées 45 min à 4°C. 10 ng de plasmide sont ajoutés avant de laisser à nouveau 10 min à 4°C et de faire un choc thermique à 42°C pendant 1 min 30. Les cellules sont incubées pendant 10 min à 4°C, puis mises dans 900 µL de milieu LB pendant 1h sous agitation. 150 µL de cette solution sont étalées sur boîte LA contenant l'antibiotique dont le plasmide porte la résistance. Les clones poussent sur la nuit à 37°C et sont récupérés le lendemain.

II.2.3 Création d'une banque de mutants :

Les souches *cyaA*⁻ (de la collection Keio, (Baba et al. 2006)) et SM10 λpir (ou DH5α en tant que contrôle) sont mises en culture sur la nuit dans du milieu LB à 37°C. 10 µL de chacune des cultures sont mélangées et déposées sur une boîte LA. La goutte ainsi formée est mise à sécher puis incubée à 37°C pendant 3h. Les bactéries sont ensuite récupérées et mises dans 1 mL de LB frais. 10µL de cette solution sont étalées sur des boîtes LA contenant de la kanamycine, de l'ampicilline, du chloramphénicol et de l'AMPc à 1 mM et incubés à 37°C pendant 72h.

II.2.4 Criblage sur rouge Congo :

Les souches de bactéries sont mises en culture en LB sur la nuit à 37°C. Une goutte de ces cultures est déposée sur une boîte LA contenant 0,004% de Rouge Congo. L'incubation se fait à 30°C pendant 48h. Les couleurs des colonies sont renforcées en laissant les boîtes à 4°C pendant 24h.

II.2.5 Détection de luminescence avec la caméra :

Des cultures des souches d'intérêts sont lancées la veille dans 1 mL de LB ou M9. Selon les expériences, les cultures sont repiquées à partir d'une microplaque ou 150 µL de culture sont étalés sur du LA ou M9+agarose est incubée 24h à 37°C. La boîte est ensuite mise sous la caméra CCD amplifiée.

II.2.6 Suivi de la production de la fluorescence, de la luminescence ou de la croissance bactérienne :

Les souches bactériennes sont mises en culture en LB sur la nuit à 37°C. Dans une microplaque 96 puits, 140 µL de milieu sont mélangés à 10 µL d'une pré-culture de 15 heures diluée 20 fois. Chaque puits contient également une bille de verre de 2 mm de diamètre et 50 µL d'huile minérale sont ajoutés sur l'échantillon pour limiter l'évaporation. La plaque 96 puits est ensuite insérée dans un lecteur microplaque (Fusion, Perkin Elmer) maintenu à 37°C qui assure les mesures de fluorescence, de luminescence et d'absorbance pendant le temps nécessaire à la cinétique à raison d'environ 5 mesures par heure et 3 minutes par lecture de microplaque.

Les données sont analysées à l'aide de deux programmes Matlab[®] : wellreader (Boyer et al. 2010) et wellDataAnalysis. Les mesures aberrantes dues à la présence d'une bille dans chaque puits sont éliminées puis un assemblage de polynômes d'ordre trois permet de créer une courbe qui est ajustée au plus près des données obtenues. Selon les expériences, plusieurs jeux de données sont rassemblés afin d'obtenir une moyenne et des écart-types.

II.2.7 Identification des mutants : 2 protocoles ont été utilisés

Dans tous les cas, l'ADN génomique du clone d'intérêt est purifié grâce au kit Wizard Genomic DNA purification de Promega. Le principe de purification de ce kit est le suivant : les cellules sont lysées et incubées avec de la RNase. Puis les protéines sont précipitées, l'ADN génomique est récupéré et lavé à l'éthanol avant d'être resuspendu dans 100 µL de tampon Tris-HCl 10 mM pH8.

Protocole 1 :

1 µg d'ADN génomique est digéré, selon les recommandations du fournisseur, avec un des mélanges d'enzymes suivant : DraI/HindII ou DraI/NaeI ou DraI/MLsI ou DraI/PvuII. Chacune des enzymes a une concentration finale de 10 U dans un volume de réaction de 20 µL. La digestion se fait pendant 1 heure à 37°C. Une ligation est ensuite réalisée sur 5 µL de la digestion grâce à 400 U d'enzyme T4 ligase selon le protocole de cette enzyme dans un volume finale de 50 µL. Pour finir une PCR est effectuée dans un volume de 50 µL : 10 µL de la ligation sont mélangés avec 10 µL du tampon HF, 1 µL de Phusion, 500 nM de chacun des amorces TnSC189_IDF et TnSC189_IDR et 200 µM de dNTP. Une dénaturation est réalisée à 98°C pendant 30 secondes. La fixation des amorces se fait à 55°C pendant 30 secondes et l'élongation à 72°C pendant 1 minute. Les produits PCR ainsi obtenus sont envoyés à séquencer avec les amorces utilisés pour l'amplification.

Protocole 2 :

Une PCR est réalisée directement sur le chromosome dans un volume final de 50 µL : 1 µg d'ADN est mélangé à 1,25 U d'enzyme TaqPol, 200 nM de chacun des amorces et 200 µM de chacun des quatre dNTP. Les quatre couples d'amorces utilisées pour cette PCR aléatoire sont : pscIR1 / ARBN1 ; pscIR1 / ARBN6 ; pscIR2Km / ARBN1 ; pscIR2Km / ARBN6. Une seconde PCR est réalisée à partir de 1 µL de ces premières amplifications. Pour cela, j'utilise des nouveaux couples d'amorces : pscIR1bis / ARBbis ou pscIR2Kanbis / ARBbis. Les amplicons obtenus sont envoyés à séquencer.

II.2.8 Transduction

Pour créer les différents doubles mutants utilisés dans cette étude, la technique de transduction est utilisée selon le protocole décrit par Thomason et ses collègues (Thomason

et al. 2007). Brièvement, la souche donneuse, cultivée sur la nuit, est diluée au 1/100^{ème} dans du LB-0,2% glucose – 5 mM CaCl₂. Après 45 min à 37°C, 50 µL de phages P1 à 10⁹-10¹⁰ pfu/mL sont ajoutés et les bactéries sont à nouveau incubées à 37°C pendant 3h. 100 µL de chloroforme sont ajoutés avant de poursuivre l'incubation pendant 5 min. Après avoir centrifugé 10 min à 9 200 g à 4°C, le surnageant est conservé à 4°C.

La souche receveuse, cultivée sur la nuit dans 5 mL de LB, est centrifugée. Le culot est repris dans 750 µL de sel P1 (10 mM CaCl₂ – 5 mM MgSO₄). 100 µL de cette solution bactérienne sont mélangés avec des quantités croissantes de lysats préparés à partir de la souche donneuse. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 min. 1 mL de LB-150 mM de citrate de sodium est ajouté avant de poursuivre l'incubation pendant 1h à 37°C. Les cellules sont culotées, reprises dans 100 µL de LB et étalées sur des boîtes LA-5 mM citrate de sodium et incubées sur la nuit à 37°C.

II.2.9 Biologie moléculaire

Les diverses PCR réalisées au cours de cette étude utilisent différentes Taq polymérase : OneTaq, Phusion, TaqPol, KOD (Biolabs[®]) choisi selon la longueur de l'amplicon attendu et l'objectif de la PCR (clonage ou séquençage). Le protocole est adapté à chacune de ces enzymes selon les indications du fournisseur.

Les digestions par des enzymes de restriction qui ont été réalisées au cours de cette étude suivent également les indications du fournisseur (Biolabs[®]).

Les ligations ont été réalisées à l'aide de l'enzyme T4 ligase de Biolabs[®]. Entre 50 et 100 ng de vecteur sont mélangés à l'insert dans un ratio 1:3 et incubés sur la nuit à 16°C.

Les séquençages sont effectués par l'entreprise GATC ou par l'entreprise Eurofins.

II.2.10 Purification protéique

II.2.10.a Surexpression protéique

La purification protéique se fait à partir d'un clone issu de la collection ASKA (Kitagawa et al. 2005). Cette banque rassemble des bactéries contenant chacune un des ORF d'*E. coli* sur un plasmide de surexpression, pCA24N. Chacune des protéines ainsi surexprimée possède un tag histine (et une protéine GFP pour certains clônes, non utilisés lors de cette étude). Le protocole suivi afin de purifier la protéine est celui décrit par les

créateurs de cette collection (Kitagawa et al. 2005). Brièvement, les cellules sont mises en pré-culture la veille puis diluées au $100^{\text{ème}}$ dans 500 mL de LB ou de M9-0,3% glucose en présence de chloramphénicol 30 $\mu\text{g/mL}$. Les cultures sont incubées à 37°C jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne 0,3. 1 mM d'IPTG est alors ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 2h. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation et conservées à -80°C .

II.2.10.b Extraction protéique

Les culots bactériens sont repris dans 7 mL de tampon TES (Tris HCl 50 mM pH8 ; NaCl 25 mM ; EDTA 2 mM) en présence d'un inhibiteur de protéase (Roche[®], à utiliser selon les instructions du fournisseur). Les bactéries sont incubées 30 min à 37°C puis elles subissent cinq cycles de congélation / décongélation à l'aide de carboglace et d'un bain-marie à 37°C . Du MgCl_2 20 mM et 20 $\mu\text{g/mL}$ de DNase (Sigma[®]) sont ajoutés avant de faire une incubation de 30 min à 37°C . Les échantillons sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 20 min à 4°C . Les protéines solubles se trouvent dans le surnageant qui est mélangé à du glycérol pour avoir une concentration finale de 20% et conservé à -80°C .

II.2.10.c Purification protéique

OppA est ensuite purifié sur colonne de nickel (quiagen). 1 mL de résine et 30 mL d'extrait protéique sont incubés sous agitation pendant 1h à 4°C avant d'être mis sur la colonne. La résine est lavée deux fois avec 15 mL de tampon (20 mM Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl, 10 % glycérol, 20 mM imidazole) puis la protéine est éluée avec un deuxième tampon (20 mM Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl, 10 % glycérol, 250 mM imidazole). Des éluats de 1 mL sont récupérés puis un échantillon de 5 μL de chacun d'entre eux est déposé sur un gel de polyacrylamide afin de déterminer dans quel éluat se trouve la protéine OppA. La quantification de la protéine se fait soit à l'aide de la technique de Bradford, soit par mesure de l'absorbance à 280 nm par un Nanodrop.

II.2.11 Dialyse protéique

1 mL de protéine est placé dans une poche à dialyse elle-même placée dans un becher contenant 1 L de tampon. La dialyse se fait en 3 temps en diminuant progressivement la concentration en imidazole afin de ne pas risquer d'aggraver la protéine en cas de diminution trop rapide. Le premier tampon utilisé est constitué de 20 mM Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl,

10 % glycérol et 200 mM imidazole. La protéine est dialysée pendant 2h, à 4°C, sous faible agitation. Puis le tampon est remplacé par le suivant : 20 mM Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl, 10 % glycérol et 100 mM imidazole. A nouveau, la protéine est dialysée pendant 2h, à 4°C, sous faible agitation. La dernière étape se fait avec un tampon sans imidazole : 20 mM Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl, 10 % glycérol. La protéine est dialysée une dernière fois pendant 2h, à 4°C, sous faible agitation.

II.2.12 Mesure de la fluorescence émise par l' ϵ -AMPc ou OppA

Les mesures de fluorescence sont toutes réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin Elmer, LS55) maintenu à 37°C. La cuve de mesure contient au départ 50 ou 100 μ L d'échantillon selon les expériences. Sauf indication contraire, le gain est réglé sur high et les fenêtres sur 5 nm. Un spectre d'émission de fluorescence est fait après excitation à 275 nm, 290 nm ou 310 nm (selon les expériences) puis 1 μ L ou 2 μ L d'un élément (AMPc, ϵ -AMPc ou trilyline) sont ajoutés, l'échantillon est mélangé et un nouveau spectre d'émission de la fluorescence est pris. Les spectres de fluorescence sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Excel. Pour tenir compte de l'évolution du volume et donc de la dilution de la fluorescence au cours de l'expérience, les données sont corrigées en les multipliant par le volume de l'échantillon puis en divisant par le volume initial.

III- Objectif

L'adénosine monophosphate cyclique est très largement répandue au sein du règne animal. Chez *Escherichia coli*, cette molécule permet la régulation d'un très grand nombre de gènes en formant un complexe avec la protéine CRP qui peut se fixer au niveau des promoteurs favorisant ainsi ou, au contraire, inhibant l'expression des gènes correspondants. L'AMPc est non seulement la clé de voute de la répression catabolique mais permet également la régulation de plusieurs gènes tels que ceux de la synthèse du flagelle ou encore la production de toxines.

Malgré des décennies d'études focalisées sur la compréhension des mécanismes impliquant l'AMPc, le système permettant l'import de l'AMPc par *Escherichia coli* n'est toujours pas connu.

L'objectif de ma thèse a été de découvrir par quel(s) moyen(s) l'adénosine monophosphate cyclique entre dans la cellule.

IV-Stratégie

Afin d'identifier le système de transport permettant l'import de l'AMPc chez *Escherichia coli*, deux outils principaux sont utilisés : la collection Keio et les transposons.

La collection Keio

Créée en 2006 par Baba et ses collègues (Baba et al. 2006), cette banque contient toutes les simples délétions des 3985 gènes non essentiels d'*Escherichia coli*. Une cassette codant pour un gène de résistance à la kanamycine est insérée par recombinaison juste après le codon initiateur du gène cible grâce à des amorces spécifiques à celui-ci (figure IV-1). Cette cassette contient également des séquences FRT. La reconnaissance de ces séquences par une enzyme appelée FLP recombinase et la recombinaison qui s'en suit permettent l'élimination de la cassette. Dans ces conditions, un ARN de 102 nucléotides est transcrit. Celui-ci est délimité par les codons initiateur et stop du gène supprimé ce qui permet d'éliminer tout effet polaire que pourrait induire l'insertion de la cassette et d'assurer une expression normale des gènes se trouvant en aval du gène supprimé.

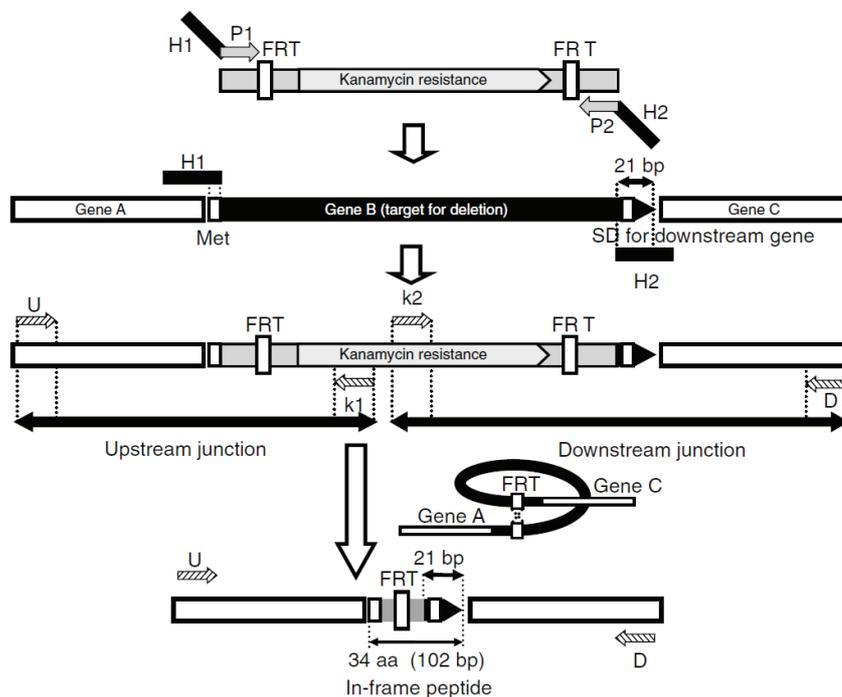


Figure IV-1 : Construction des mutants de la collection Keio

Un gène est éliminé par l'insertion d'une cassette. Cette insertion se fait par recombinaison grâce à des amorces spécifiques du gène cible. La cassette peut par la suite être éliminée par recombinaison grâce aux séquences FRT (Baba et al. 2006).

Afin d'étudier l'import de l'AMPc chez *Escherichia coli*, le mutant *cyaA*⁻ de la banque de Keio est utilisé puisque celui-ci ne produit pas d'AMPc. La présence de la molécule à l'intérieur de la cellule est donc uniquement dépendante de son import. Afin de faciliter l'étude, la cassette de résistance à la kanamycine a été éliminée par les soins de Guillaume Baptist (LAPM, UMR 5163)

Les transposons

Les transposons sont des séquences d'ADN mobiles qui se déplacent au sein du génome. Ils furent découverts en 1950 par Barbara McClintock qui reçut pour cela le prix Nobel de médecine en 1983. Ce phénomène est possible grâce à une enzyme appelée transposase qui va permettre la coupure du transposon et son insertion au niveau d'un site cible spécifique à chaque transposon. La grande majorité de ces enzymes possède un domaine appelé DDE (formé de deux acides aspartiques et d'un acide glutamique) qui catalyse l'excision du transposon et son intégration au niveau du site cible. Il existe deux types de transposon : les séquences d'insertion (IS) et les transposons composites.

Les IS sont rassemblées en 19 familles distinctes qui sont caractérisées par des tailles, des enzymes ou des séquences d'insertion spécifiques. Ces IS ne dépassent pas 2 500 paires de bases et codent exclusivement pour les enzymes utiles à leur déplacement. A chacune des extrémités des IS, une courte séquence (moins de 50 paires de bases) est reconnue par la transposase et permet l'excision du transposon.

Lorsque deux IS sont proches l'une de l'autre, elles peuvent être transposées en même temps, déplaçant ainsi le ou les gènes présents entre les deux IS. On parle alors de transposon composites. Les transposons sont dans ce cas beaucoup plus grand (plusieurs milliers de paires de bases) et peuvent coder pour des gènes divers tel que la résistance à un antibiotique ou aux métaux lourds

Lors de la transposition, le transposon peut-être dupliqué, on parle alors de transposition répllicative ; ou non dupliqué et on parle alors de transposition conservative (figure IV-2). Lors de la transposition conservative, une coupure double brin permet d'exciser le transposon qui se retrouve alors sous la forme d'un ADN linéaire ou cyclique qui va par la suite s'intégrer au niveau d'un site spécifique sur l'ADN cible. La réparation de l'ADN cible est essentiel à la survie de la cellule et nécessite la machinerie de l'hôte. Cette

réparation est bien souvent imprécise et provoque elle-même des mutations au sein du génome. Dans le cas de la transposition répllicative, des coupures simple brin ont lieu et un brin du transposon est inséré dans l'ADN cible avant qu'il ne soit complètement excisé de l'ADN d'origine. On est alors en présence d'une structure intermédiaire, appelée intermédiaire de Shapiro, qui est proche de celle rencontrée lors de la réplication d'un ADN.

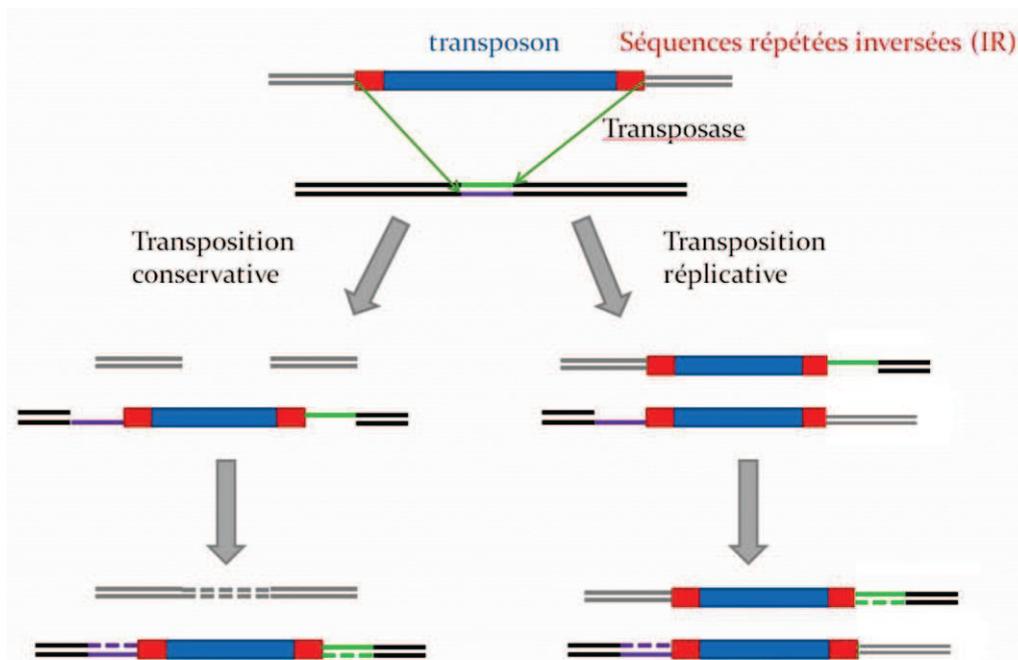


Figure IV-2 : Mécanisme de transposition

Le transposon se déplace au sein d'un génome au cours d'un phénomène appelé transposition. Celle-ci peut conduire à la duplication du transposon (transposition répllicative) ou non (transposition conservative).

Du fait de la capacité à muter un génome, les transposons ont évolués de telle sorte à diminuer leur propre déplacement. Cette régulation peut se faire à différents niveaux tels que :

- Le contrôle de l'assemblage des éléments nécessaires au déplacement et formant le transpososome ;
- L'impossibilité pour un transposon de s'insérer sur un ADN où un transposon de la même famille se trouve déjà. On parle alors d'immunité de transposition ;

- Le contrôle de l'activité de la transposase par l'hôte via des chaperones ou des protéases ;
- L'expression du gène codant pour la transposase possible uniquement après un décalage du cadre de lecture.

En ce qui concerne cette étude, le transposon est codé par le plasmide pSC189 et sera décrit plus loin (section V.1.2). La transposase mise en jeu a été modifiée afin d'être hyperactive et ainsi profiter au maximum du pouvoir mutateur du transposon et détecter un défaut dans l'import de l'AMPc.

V-Résultats

V.1 *Identification d'une protéine candidate à l'import d'AMPc*

V.1.1 Stratégie d'identification du gène codant pour la protéine responsable de l'import d'AMPc

La stratégie adoptée pour identifier les protéines indispensables à l'entrée de l'AMPc chez *Escherichia coli* est principalement basée sur un mécanisme permettant de témoigner de la présence de cette molécule à l'intérieur de la cellule. Ce dispositif, appelé système rapporteur, est constitué de l'opéron de la luciférase (opéron *luc*) contrôlé par le promoteur d'un gène AMPc-dépendant. Deux promoteurs ont été utilisés lors de cette étude : celui du gène *acs* et celui de l'opéron *sdh*. Le premier de ces gènes code pour l'acetyl-CoA synthétase nécessaire à l'utilisation de l'acétate comme source de carbone. Il est activé uniquement en présence du complexe CRP-AMPc. En effet, ce promoteur possède deux sites de fixation du complexe CRP-AMPc situés en amont des boîtes situées en -35 et -10. Ceux-ci ne chevauchant pas le site de fixation de l'ARN polymérase, il s'agit d'un promoteur de classe III dont l'activation par CRP se déroule comme celle des promoteurs de classe I (cf. section I.3.2). Le deuxième promoteur est celui de l'opéron *sdh*. Celui-ci code pour la succinate déshydrogénase, enzyme indispensable à l'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs. Ce promoteur possède un seul site de fixation pour le complexe CRP-AMPc en amont de l'ARN polymérase, il s'agit donc d'un promoteur de type I. En présence d'AMPc, la protéine CRP est activée et se fixe sur le promoteur AMPc-dépendant, induisant ainsi la transcription du gène ou de l'opéron se trouvant en aval du promoteur. Dans ces conditions, la luciférase est synthétisée par la bactérie. Cette protéine, produite naturellement par des bactéries telles que *Xenorhabdus luminescens*, est capable de produire des photons lumineux à partir d'ATP et d'aldéhydes. Dans notre système, ce dernier composé est produit, à partir d'acides gras, grâce aux enzymes codées par les gènes *luxCDE*. En effet, l'opéron *luc* est constitué de cinq gènes : les trois gènes *luxCDE* codent pour une réductase, une transférase et une synthétase alors que les deux gènes *luxAB* codent pour la luciférase elle-même.

L'enzyme produit ainsi un photon à 520 nm en oxydant le substrat et une molécule de FMNH₂ en présence d'oxygène (Meighen 1991).

Ce système rapporteur se trouve sur un plasmide de type pSB dont l'origine de réplication est *colEI* et la cassette de résistance est celle de l'ampicilline (cf Annexe 1). Une vingtaine de copies de ce plasmide est présente dans chaque cellule, assurant ainsi une production de lumière facilement détectable. Une souche portant ce système rapporteur va donc émettre de la lumière en fonction de la quantité d'AMPc présente dans la cellule. Cette lumière, détectable dans certaines conditions à l'œil nu, est plus généralement analysée grâce à une caméra ultra-sensible ou un lecteur de microplaque.

Afin d'étudier l'entrée de l'AMPc dans la cellule, nous utiliserons une souche n'en produisant pas. Une telle souche, appelée *cyaA*⁻, ne possède pas le gène codant pour l'adénylate cyclase (*cyaA*), est tout à fait viable et n'exprime aucun phénotype autre qu'une croissance plus faible sur un milieu riche (Perrenoud et al. 2005). Le mutant est issu de la collection Keio (Baba et al. 2006).

Notre système rapporteur est inséré dans la bactérie par la technique de transformation au TSS telle qu'elle est expliquée dans la section Matériels et Méthodes. Cette nouvelle souche est appelée *cyaA*⁻ + pSB-*sdh*-luc ou *cyaA*⁻ + pSB-*acs*-luc selon que la luciférase est sous le contrôle du promoteur *sdh* ou *acs* respectivement. Celle-ci est incapable de produire de la lumière à moins que de l'AMPc soit ajouté au milieu comme le montrent les photographies présentées figure V-1. Celles-ci ont été prises avec la caméra. Un premier cliché est pris en lumière blanche afin de détecter les colonies (cliché colorisé en vert par la suite) et un deuxième est pris dans l'obscurité afin de détecter la luminescence produite (cliché colorisé en rouge). Les deux photographies sont ensuite superposées les unes aux autres pour être analysées. Sur la totalité des colonies visibles, seules quatre, soit moins de 3%, produisent de la luminescence en absence d'AMPc. Ceci est sans doute dû à des mutations ponctuelles soit au niveau de CRP, qui peut alors activer les promoteurs en l'absence d'AMPc, soit au niveau du promoteur de *sdh*, qui devient alors AMPc-indépendant. On remarque qu'en présence d'AMPc, la totalité des colonies émettent de la luminescence.

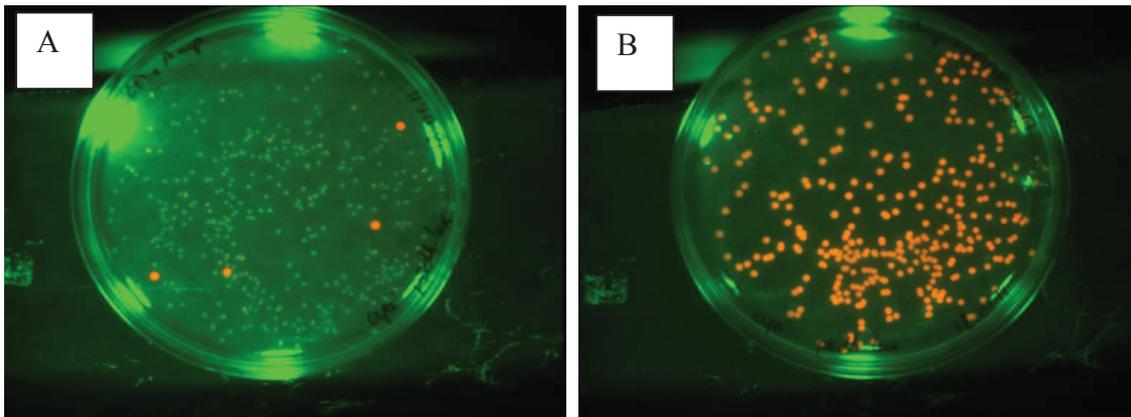


Figure V-1 : Production de lumière des clones *cyaA*⁻.

Les clones *cyaA*⁻ sont capables d'importer de l'AMPc présent dans le milieu. Des souches *cyaA*⁻ + pSB-sdh-luc sont étalées sur milieu riche + agar (LA) (A) ou LA + 1 mM AMPc (B). Les 6 spots verts visibles sur les contours de la boîte sont dûs aux ampoules allumées lors de la prise de la photographie en lumière blanche.

V.1.2 Création d'une banque de mutants

La stratégie suivie pour la suite des expériences repose sur la création d'une banque de mutants à partir de cette souche. L'objectif consiste à muter chacun des gènes de la bactérie et à détecter, grâce à notre système rapporteur quels sont les mutants qui n'émettent plus de lumière en présence d'AMPc dans le milieu. Pour cela, je choisis de travailler avec la souche *cyaA*⁻ + pSB-acs-luc. En effet, le promoteur *sdh* étant bien plus sensible à l'AMPc que le promoteur *acs*, la lumière émise par certains clones étaient trop importante et rendaient la détection des clones éteints difficile. Mais avant de créer cette banque et afin d'éviter les faux-positifs qui pourraient résulter d'une mutation dans le gène codant pour CRP, protéine indispensable à l'activation des promoteurs AMPc-dépendants, nous avons transformé la souche *cyaA*⁻ + pSB-acs-luc avec un plasmide de surexpression de la protéine CRP. Ce plasmide, appelé pZAtetR-crp a pour origine de répllication *p15A* et est présent en une dizaine de copies par cellule. Le promoteur *tetR* est un promoteur artificiel issu du promoteur P_L du phage lambda (Lutz et al. 1997). Il est réprimé par le represser TetR et est activé environ 5 000 fois par l'anhydrotétracycline (aTc), ce qui induit une surexpression de

crp. C'est à partir de cette souche *cyaA*⁻ + pSB-acs-luc + pZAtetR-*crp* que l'étude sur l'import de l'AMPc par *E. coli* est réalisée.

La création de la banque de mutants est basée sur l'utilisation d'un transposon porté par un plasmide (Chiang et al. 2002). Dans le cas qui nous intéresse, le transposon code pour le gène de la résistance à la kanamycine et possède un site d'insertion peu spécifique caractérisé par un dinucléotide TA. Ce transposon est porté par un plasmide appelé pSC189 (figure V-2) qui a pour origine de répllication *oriR6K* située sur le transposon lui-même. En plus du transposon, ce plasmide code pour une résistance à l'ampicilline et une transposase hyperactive, appelée C9 (Lampe et al. 1999). Cette dernière va permettre au transposon d'être transféré du plasmide vers le chromosome bactérien. Ce faisant, le plasmide perd son origine de répllication et est donc éliminé au cours de la croissance bactérienne. Une fois le plasmide perdu, le transposon ne peut plus se déplacer du fait de l'absence de l'enzyme assurant son transfert. D'autre part, la répllication du plasmide nécessite la présence de la protéine Pi, codée uniquement par la cellule donneuse. Le plasmide ne peut donc pas se répliquer dans la souche *cyaA*⁻ et le transposon ne peut se déplacer qu'une seule fois. Le plasmide pSC189 est inséré dans la souche *cyaA*⁻ + pSB-acs-luc + pZAtetR-*crp* par conjugaison tel qu'indiqué dans la section Matériels et Méthodes. Nous obtenons ainsi une culture de cellules ne produisant pas d'AMPc, avec une mutation apportée par l'insertion du transposon et un vecteur témoin de la présence d'AMPc dans la cellule.

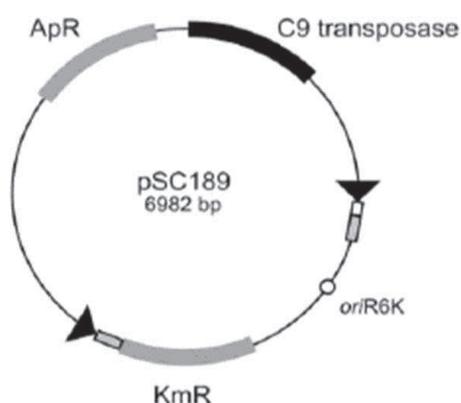


Figure V-2 : Plasmide pSC189.

Carte du plasmide pSC189 qui contient le transposon utilisé pour créer une collection de mutants. Le plasmide code pour une résistance à l'ampicilline, une transposase et un transposon contenant lui-même une résistance à la kanamycine (Chiang et al. 2002).

V.1.3 Criblage de mutant candidats à l'import d'AMPc

V.1.3.a Production de luminescence en milieu solide

Ces cellules sont étalées sur des boîtes LA contenant de l'ampicilline (assurant la présence du vecteur rapporteur), du chloramphénicol (assurant la présence du vecteur de surexpression de CRP), de la kanamycine (assurant la présence du transposon) et de l'AMPc 1 mM. Les bactéries sont mises en culture à 37°C pendant 72h. J'obtiens ainsi une banque d'environ 32 000 clones distincts répartis sur 89 boîtes de pétri. Cette quantité de clones nous permet de supposer que chacun des gènes non essentiels d'*Escherichia coli* est muté dans au moins un des clones de cette collection. Des photographies de chacune des boîtes sont prises à 24h et 72h. Il est ainsi possible de déterminer si une colonie donnée émet ou non de la lumière. La figure V-3 donne un exemple de ce qui a pu être obtenu.

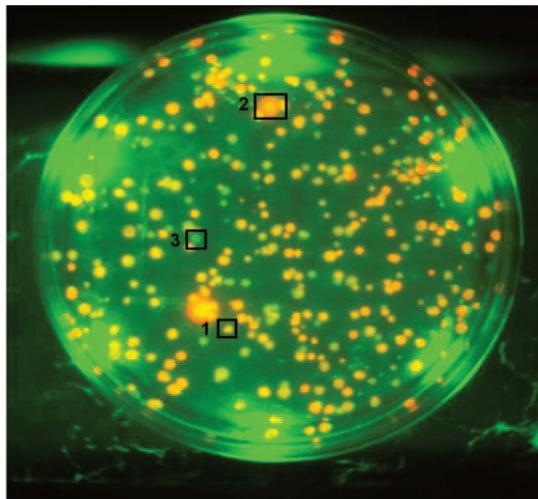


Figure V-3 : Collection de mutants.

Boîte de pétri appartenant à la collection de clones mutés par l'insertion du transposon. 3 intensités de luminescence ont été obtenue : [1] intensité moyenne ; [2] forte intensité ; [3] absence de lumière.

Comme l'indique cette photographie, nous obtenons trois types de clones différents au cours de ce premier crible. Les premiers ([1] sur la figure V-3) émettent autant de lumière

que la souche *cyaA*⁻ + pSB-acs-lux sans transposon. Cette lumière traduit la capacité de l'AMPc à être importé par une souche dont le système de transport est intact. D'autres mutants émettent beaucoup plus de lumière, allant même jusqu'à former un halo autour de la colonie ([2] sur la figure V-3). Il serait intéressant d'analyser ces clones pour étudier l'export d'AMPc. En effet, si l'export est rendu impossible par l'insertion du transposon, alors la concentration intracellulaire d'AMPc augmente ce qui explique cette émission très importante de lumière. Ceci suppose néanmoins que l'activité de la phosphodiesterase reste inchangée dans de telles conditions. Il est à noter également qu'un défaut de la phosphodiesterase induirait un résultat similaire, à savoir une forte luminescence due à un excès d'AMPc. Nous n'avons pas analysés plus en détail ces colonies Et enfin, la dernière catégorie de mutant est celle qui nous intéresse le plus puisque ceux-ci n'émettent pas de lumière ([3] sur la figure V-3). Si l'import d'AMPc est inactivé par l'insertion du transposon dans le chromosome alors la concentration intracellulaire d'AMPc est nulle et l'opéron luciférase ne peut pas être transcrit : la colonie n'émet pas de lumière. Cependant, bien d'autres mutations peuvent expliquer cette absence de lumière et des analyses plus poussées sont nécessaires afin d'éliminer les clones inintéressants dans l'étude de l'import d'AMPc par *Escherichia coli*.

Une analyse à l'œil nu de la totalité des clichés des boîtes de pétri constituant la collection permet de sélectionner les mutants intéressants. 293 clones éteints sont repérés et 20 clones dont la lumière est « normale » sont sélectionnés pour servir de contrôle dans les cribles suivants. Chacun de ces clones est repiqué en LB puis conservé à -80°C.

Afin de diminuer le nombre de candidats, de nouveaux cribles visant à affiner notre tri sont mis en place.

V.1.3.b Croissance sur maltose

Un premier test est réalisé sur gélose (agar ajouté à du milieu pauvre appelé M9). Trois milieux différents sont utilisés : M9 complémenté par 0,3% de glucose ; M9 complémenté par 0,3% de maltose ; ou M9 complémenté par 0,3% de maltose et 1 mM d'AMPc. La condition « glucose » permet de s'assurer que le mutant n'a pas de problème de croissance. Nous faisons l'hypothèse qu'un mutant incapable d'importer de l'AMPc est tout à fait viable puisque la souche *cyaA*⁻ est viable même lorsque l'AMPc n'est pas présent dans le milieu, ce qui sous-entend que l'AMPc par lui-même n'est pas indispensable à la vie

cellulaire. Les conditions « maltose +/- AMPc » constituent un test supplémentaire qui permet de vérifier l'entrée de l'AMPc dans la cellule. En effet, les gènes assurant l'utilisation du maltose comme source de carbone sont dépendants de la présence du complexe CRP-AMPc. Une souche *cyaA*⁻ ne peut donc pas croître avec pour seule source d'énergie le maltose, à moins que de l'AMPc soit ajouté dans le milieu. Les mutants ayant conservé la capacité à importer de l'AMPc seront donc incapables de pousser sur maltose mais auront une croissance classique dans la condition « maltose + AMPc » tandis que les clones incapables d'importer cette molécule ne pousseront dans aucune de ces conditions. En parallèle du test de croissance, la luminescence émise par ces clones est enregistrée afin de valider ce qui a été observé lors du premier criblage.

Dans les résultats présentés ci-dessous (figure V-4), aucun des clones testés n'a poussé sur maltose alors qu'ils ne présentent pas d'anomalie de croissance sur glucose. Bien que la plupart des mutants aient retrouvé une croissance tout à fait normale sur maltose en présence d'AMPc, on peut constater que certains d'entre eux ne poussent pas. Ce dernier phénotype est très intéressant puisqu'il pourrait être dû à une impossibilité d'importer de l'AMPc. Concernant la luminescence, il y a peu de surprise dans les résultats obtenus. En effet, aucune lumière n'est visible sur glucose, comme on peut s'y attendre en absence d'AMPc. De plus, la plupart des clones qui sont capables de pousser sur maltose en présence d'AMPc sont également capables de produire de la lumière. Quelques mutants dérogent pourtant à cette règle. Ceci peut s'expliquer par le fait que le transposon ait inactivé un gène indispensable à la production de lumière mais pas à la croissance sur maltose, ce qui signifierait que l'AMPc est toujours capable de pénétrer dans la cellule.

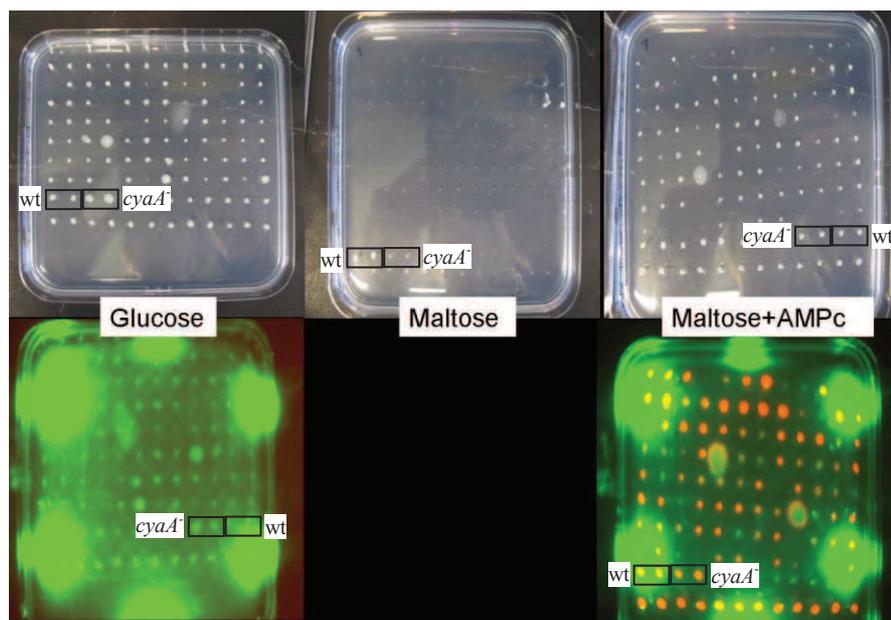


Figure V-4 : Crible sur gélose.

Les mutants sont déposés sur une gélose de milieu pauvre (M9) complétée avec 0,3% de glucose, 0,3% de maltose ou 0,3% de maltose et 1 mM d'AMPC. Après 24h d'incubation à 37°C, la croissance et la luminescence sont analysées. Les contrôles faits avec les souches sauvages et *cyaA*⁻ sont indiqués.

V.1.3.c Coloration au rouge Congo

Le deuxième test effectué sur les clones pré-sélectionnés s'appuie sur une particularité des souches ne produisant pas d'AMPC : la couleur des colonies formées sur un milieu contenant du rouge Congo. Le rouge Congo est une molécule qui se fixe sur les curls des bactéries qui forment alors des colonies rouges. Cependant, les mécanismes exacts de cette fixation ainsi que les protagonistes ne sont pas totalement élucidés. Il a été démontré que les colonies de souches *cyaA*⁻ sont de couleur blanche sur rouge Congo alors qu'elles redeviennent rouges en présence d'AMPC dans le milieu. Bien que les détails mécanistiques de ce phénomène ne soient pas complètement compris, nous faisons l'hypothèse que cela implique l'import d'AMPC par la bactérie. Nous nous basons alors sur ce phénotype pour augmenter nos critères de sélection. En parallèle, la luminescence émise sur ce milieu est analysée.

Dans les résultats présentés ci-dessous (figure V-5), on peut tout de suite remarquer la très grande variabilité de la coloration des colonies. Les souches wt sont rouges sur ce milieu alors que les souches *cyaA*⁻ sont blanches en absence d'AMPC. En présence de celui-ci, la coloration devient plus foncée tout en restant plus pâle que celle des souches sauvages. Concernant les mutants testés, tous les cas de figures sont présents : certaines colonies ne

changent pas de couleur après ajout d'AMPc, d'autres deviennent plus claires ou au contraire plus foncées. On peut également constater la présence de colonies sectorisées, ce qui traduit un probable échappement de bactéries ayant muté lors de la croissance. Concernant la luminescence, la plupart des clones sont incapables de produire de la luminescence en absence d'AMPc et retrouvent cette capacité après ajout de celui-ci.

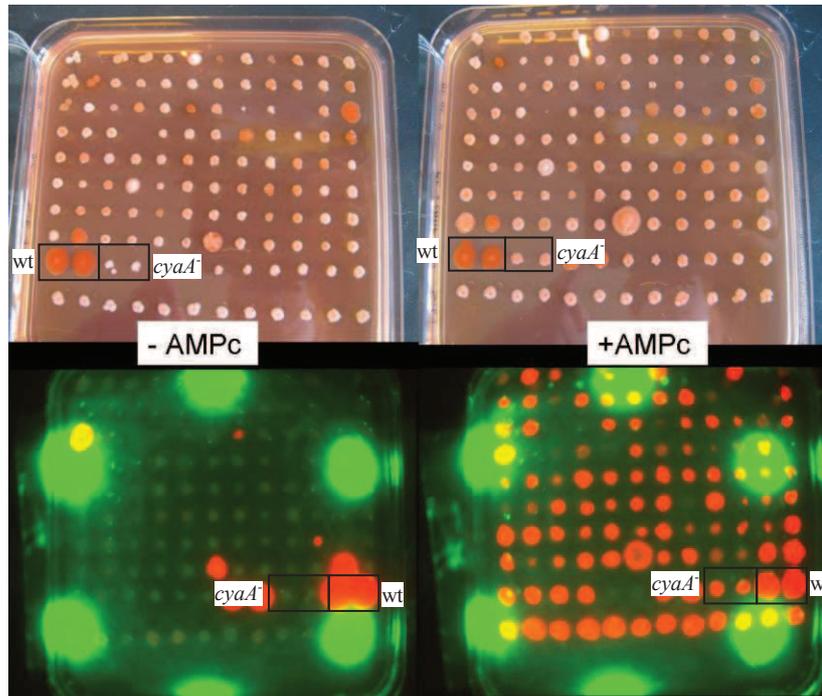


Figure V-5 : Crible sur rouge Congo.

Les mutants sont déposés sur une gélose riche (LA) additionnée de rouge Congo et d'AMPc. Après 24h d'incubation à 37°C, la couleur et la luminescence des colonies sont analysées. Les contrôles faits avec les souches sauvages et *cyaA* sont indiqués.

V.1.3.d Production de luminescence en milieu liquide

Le troisième test réalisé sur les mutants choisis permet de quantifier de façon plus précise la luminescence émise par les différents clones. Cette expérience est réalisée sur des cultures liquides à l'aide d'un lecteur de microplaque (Fusion, Perkin Elmer®) qui mesure pendant 24h la lumière produite par les mutants en absence ou en présence d'AMPc (figure V-6). Comme on peut s'y attendre, la luminescence apparaît uniquement au moment de l'entrée en phase stationnaire (700 min) des cultures ce qui correspond à ce qui est observé dans une souche sauvage qui ne commence à produire de l'AMPc que lorsque le glucose est épuisé. C'est donc la luminescence produite en fin de cinétique qui nous intéresse le plus.

Une fois encore, il y a une hétérogénéité importante entre les mutants puisque l'intensité lumineuse varie de 0 UA à près de 3 000 UA. Certains mutants produisent même plus de luminescence que le contrôle *cyaA*⁻.

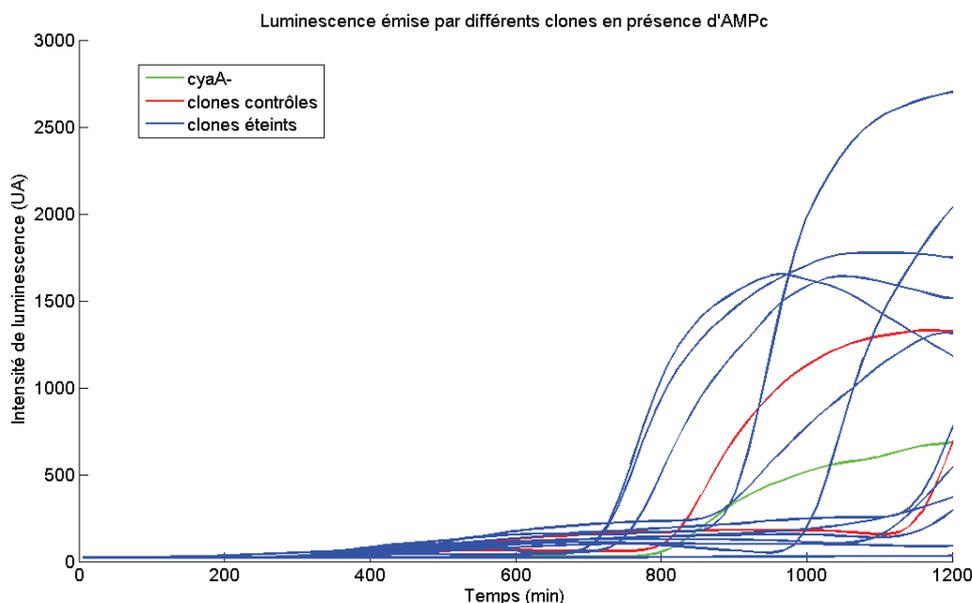


Figure V-6 : Cinétique de production de lumière par les mutants.

Les mutants sont mis en culture sur la nuit puis dilués 300 fois dans du milieu riche (LB) afin de suivre la production de luminescence par le promoteur *acs* pendant 1 200 minutes en présence de 1 mM d'AMPc. Les clones dits « contrôle » sont des clones qui possèdent le transposon mais qui produisaient une luminescence moyenne lors du premier crible.

V.1.3.e Analyse des résultats des différents cribles

Les données de ces trois tests sont enregistrées dans un tableau servant à sélectionner les mutants d'intérêt qui seront par la suite analysés (cf Annexe 2). La classification de ces résultats n'a pas été chose aisée. En effet, nombre de ces critères sont subjectifs et font appel au seul jugement de l'expérimentateur. Ainsi, la production de luminescence sur les milieux solides n'est pas quantifiée mais seulement évaluée à l'œil nu à partir d'images prises par la caméra CCD, ce qui peut induire des erreurs de jugement. De plus, la coloration des colonies sur milieu rouge Congo est l'un des critères les plus difficiles à apprécier de ces expériences. En effet, il est ressorti de ce crible toute une palette de couleur allant du rouge au blanc en passant par toutes les variations possibles de rose. Il faut ajouter à cela le fait que certaines colonies ne sont pas uniformes mais présentent un phénotype de sectorisation sans doute issu d'un échappement. Pour finir, il faut aussi garder à l'esprit que les croissances en milieu solide peuvent donner l'impression qu'il n'y a pas de colonie alors que celle-ci est seulement

trop petite pour être visible traduisant plus un ralentissement de la croissance qu'une absence totale de croissance.

Bien que ces différents cribles ne soient pas parfaits, ils ont l'avantage de pouvoir être réalisés rapidement sur un grand nombre de candidats, tout en multipliant les approches permettant de tester la présence de l'AMPc dans la cellule. Ainsi, la croissance sur maltose, la production de lumière et enfin la coloration sur rouge Congo sont trois approches bien distinctes du problème réduisant d'autant le risque de faux positifs.

Le choix a été fait de ne pas ajouter d'anhydrotétracycline, inducteur du plasmide de surexpression de la protéine CRP, dans ces divers cribles en espérant ainsi sortir un mutant *crp* à la fin de cette analyse. Si tel est le cas, cela démontre la validité de nos tests puisqu'une mutation dans le gène *crp*, au même titre qu'un défaut d'import d'AMPc, implique une absence d'activation du système rapporteur ou de croissance sur maltose puisque ceci nécessite la présence du complexe CRP-AMPc.

Afin de classer ces mutants par ordre d'intérêt, une note est attribuée pour chacun des résultats obtenus lors des tests. La somme de ces valeurs donne un score au mutant permettant un classement par rapport aux autres clones (annexe 2). Le tableau suivant permet de détailler un peu plus ce score :

Tableau V-1 : Score donné pour chaque condition de crible

Expérience	Score	Evaluation
Croissance sur milieu solide-glucose	1	1 : le mutant n'a pas de problème de croissance particulier. 0 : le mutant ne pousse pas.
Luminescence sur milieu solide-glucose	0,5	0,5 : le mutant n'émet pas de lumière. 0 : le mutant émet de la lumière.
Croissance sur milieu solide-maltose	1	1 : le mutant ne pousse pas sur maltose. 0 : le mutant pousse sur maltose.
Croissance sur milieu solide-maltose-AMPc	4	4 : le mutant ne pousse pas sur maltose-AMPc. 0 : le mutant pousse sur maltose-AMPc.
Coloration sur Rouge Congo	1	1 : le mutant est blanc ou rose. 0 : le mutant est rouge.
Coloration sur Rouge Congo-AMPc	2	2 : le mutant est blanc ou rose. 0 : le mutant est rouge.
Luminescence sur Rouge Congo-AMPc	1	1 : le mutant n'émet pas de lumière. 0 : le mutant émet de la lumière
Luminescence en LB	1	1 : le mutant n'émet pas de lumière. 0 : le mutant émet de la lumière
Luminescence en LB-AMPc	4	4 : le mutant n'émet pas de lumière. 0 : le mutant émet de la lumière.

Deux critères sont pris en compte pour définir le nombre de points mis en jeu lors de chacun des cribles : la confiance accordée aux résultats et l'importance du test par rapport à l'import d'AMPc. Ainsi, la croissance sur glucose n'implique par la molécule d'intérêt, de

même l'absence de croissance sur maltose seul est indépendante de la faculté à importer de l'AMPc, à la différence du test de croissance sur maltose + AMPc. De ce fait, les deux premiers tests sont sanctionnés par peu de points au contraire du troisième. De la même manière, la luminescence sur milieu solide ne donne droit qu'à peu de points au vue des difficultés à analyser les photographies, contrairement à la luminescence en milieu liquide qui est mesurée par le lecteur de microplaque. Concernant la coloration sur Rouge Congo, il y avait une réelle difficulté à classer les mutants selon leur coloration du fait des nombreuses nuances de couleurs observées. Afin de faire face à ces subtilités, la stratégie a consisté à ne donner que peu de points à cette évaluation.

Nous avons décidé d'étudier 21 mutants de façon plus approfondie. Ce nombre nous semblait être un bon compromis entre le fait d'étudier trop peu de candidats au risque de ne pas trouver le transporteur ou un nombre trop important de façon superficielle par manque de temps. Mon choix s'est porté sur les 10 mutants qui avaient le score le plus élevé parmi les 293 mutants isolés. Et parce que la Science s'est construite sur des découvertes fortuites, sur des révélations dues au plus grand hasard ou sur des convictions improbables, les 11 autres mutants ont été choisis selon un critère bien peu scientifique mais ô combien intéressant : l'intuition.

Les 21 mutants choisis sont les suivants :

Tableau V-2 : mutants pré-sélectionnés à la fin des différents cribles.

Le nom des mutants et leur score respectifs sont reportés dans la première colonne. Chaque colonne correspond à un crible.

Nom (score /17,5)	Glc (/1)	Glc Lum (/0,5)	Mal (/1)	Mal-AMPc (/4)	RC (/1)	RC-AMPc (/2)	RC-AMPc Lum (/1)	LB lum (/1)	LB-AMPc Lum (/4)
1.4 (15,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Rose (1)	Rose (2)	- (1)	- (1)	- (4)
1.5 (14,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Rose (1)	Rose (2)	- (1)	0	- (4)
1.7 (11)	- (0)	0	- (1)	- (4)	Rouge (0)	Rouge (0)	- (1)	- (1)	- (4)
1.15 (15,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Rose (1)	Blanc (2)	- (1)	- (1)	- (4)
1.47 (15,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Rose (1)	Rose (2)	- (1)	- (1)	- (4)
1.51 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	+ (0)	Blanc (1)	Blanc (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
1.76 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Blanc (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	+ (0)
1.87 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Rose (1)	Blanc (2)	+ (0)	- (1)	+ (0)
2.4 (15,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Blanc (1)	Rose (2)	- (1)	- (1)	- (4)
2.5 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	+ (0)	Blanc (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
2.21 (13)	- (0)	0	- (1)	- (4)	Rose (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
2.40 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	+ (0)	Blanc (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
2.42 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	+ (0)	Blanc (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
2.54 (11,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	+ (0)	Blanc (1)	Rose (2)	- (1)	- (1)	- (4)
2.85 (10,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	+ (0)	Rose (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
2.87 (12)	- (0)	0	- (1)	- (4)	Rouge (0)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
2.92 (10)	- (0)	0	- (1)	- (4)	Rouge (0)	Rouge (0)	+ (0)	- (1)	- (4)
3.1 (10)	- (0)	0	- (1)	- (4)	0	0	0	- (1)	- (4)

3.23 (13)	- (0)	0	- (1)	- (4)	Blanc (1)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)
3.28 (9)	- (0)	0	- (1)	- (4)	Rouge (0)	Rose (2)	- (1)	- (1)	+ (0)
3.57 (13,5)	+ (1)	- (0,5)	- (1)	- (4)	Rouge (0)	Rose (2)	+ (0)	- (1)	- (4)

Glc : croissance sur milieu M9 solide complétement avec du glucose ;
 Glc Lum : luminescence produite sur milieu M9 solide complétement avec du glucose ;
 Mal : croissance sur un milieu M9 solide complétement avec du maltose ;
 Mal-AMPc : croissance sur un milieu M9 solide complétement avec du maltose et de l'AMPc ;
 RC : couleur des colonies sur LA + rouge Congo ;
 RC-AMPc : couleur des colonies sur LA + rouge Congo + AMPc ;
 RC-AMPc Lum : luminescence produite sur LA + rouge Congo + AMPc ;
 LB lum : luminescence produite en milieu liquide LB ;
 LB-AMPc Lum : luminescence produite en milieu liquide LB + AMPc ;
 + : croissance ou production de luminescence
 - : absence de croissance ou de production de luminescence
 0 : test non valide par manque de croissance

V.1.4 Identification des mutants d'intérêt

Pour aller plus loin dans l'étude de ces différents mutants, il a fallu déterminer le gène muté par l'insertion du transposon. Pour cela diverses techniques ont été testées.

La première technique (figure V-7) consiste à digérer le génome bactérien avec une ou deux enzyme(s) de restriction qui coupe(nt) dans le transposon et ailleurs sur le chromosome. Le pari est fait qu'à la vue du nombre important de sites de restriction sur le génome d'*Escherichia coli*, une deuxième coupure aura lieu près du transposon. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont ensuite ligués sur eux-mêmes. Le fragment d'ADN contenant une portion du transposon et du gène dans lequel il s'est inséré va se circulariser. Par la suite, une PCR est faite à l'aide d'amorces se situant dans le transposon et permettant une amplification du gène dans lequel s'est inséré le transposon (TnSC189_IDF et TnSC189_IDR, cf la section Matériels et Méthodes). Les amplicons sont ensuite envoyés à séquencer afin d'identifier le gène flanquant le transposon (figure V-8, amplification du gène muté dans le clone 1.47)

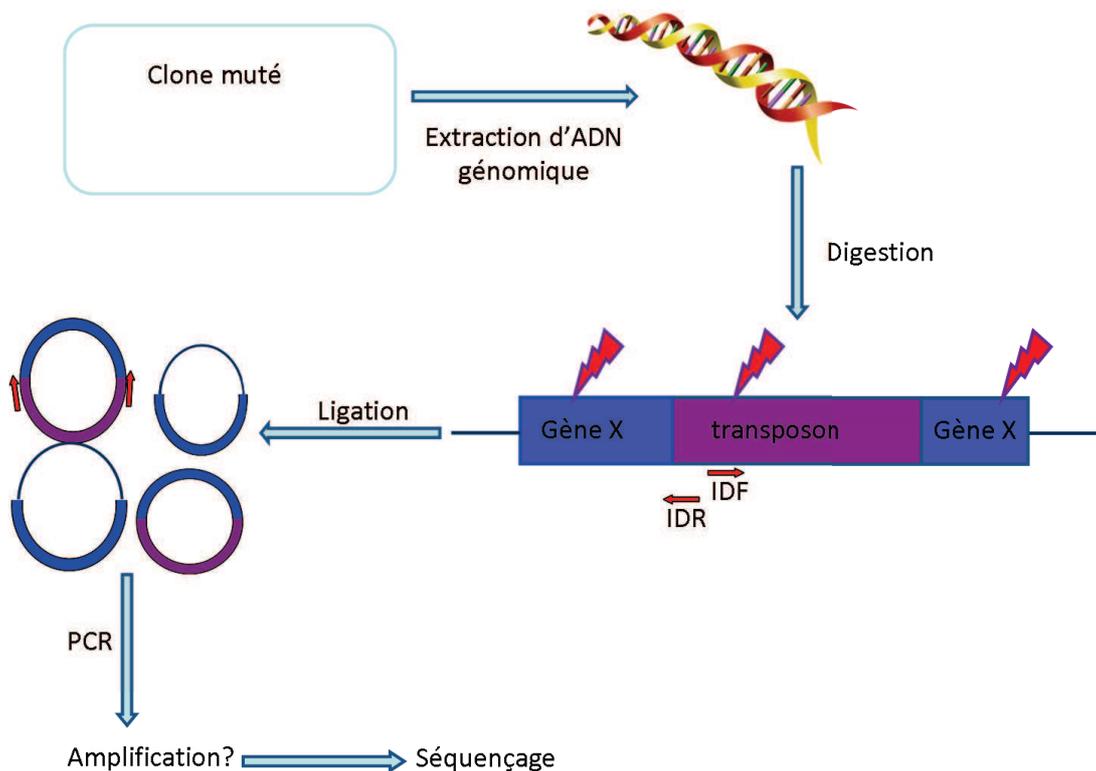


Figure V-7 : Identification des mutants d'intérêt.

Afin d'identifier le gène où est inséré le transposon, l'ADN génomique est purifié puis digéré avec des enzymes de restriction. Les échantillons sont ensuite ligués et amplifiés par PCR à partir des amorces TnSC189_IDF et TnSC189_IDR abrégées IDF et IDR respectivement sur le schéma. Si une amplification est obtenue, alors l'ADN est envoyé à séquencer à partir de ces mêmes amorces.

Plusieurs enzymes de restriction ont été testées : AseI, DraI, DraI+HindII, DraI+NaeI, DraI+MLsI, DraI+PvuII. AseI ne peut pas être utilisée en double digestion puisqu'elle provoque des bouts cohésifs. Par contre, DraI, qui produit des coupures franches peut être utilisée en parallèle avec d'autres enzymes qui forment également des coupures franches, comme c'est le cas pour HindII, NaeI, MLsI et PvuII. La figure V-8 montre un exemple de ce qui a pu être obtenu : l'ADN génomique de quatre mutants (1.4 ; 1.5 ; 1.15 ; 1.47) a été purifié, digéré avec les enzymes AseI ou DraI. Une ligation et une PCR ont ensuite été réalisées. Seul l'ADN du mutant 1.47 a pu être amplifié. Le produit PCR a été séquencé et nous avons pu identifier le gène dans lequel s'est inséré le transposon : *crp*.

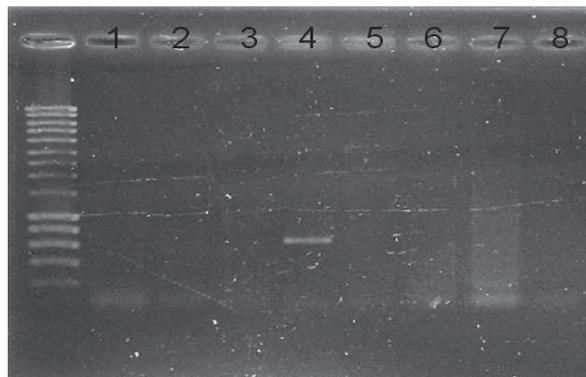


Figure V-8 : Amplification des mutants 1.4 ; 1.5 ; 1.15 et 1.47 afin de les identifier.

Puits 1 à 4 : digestion par AseI – Puits 5 à 8 : digestion par DraI

Puits 1 et 5 : mutant 1.4 – Puits 2 et 6 : mutant 1.5 – Puits 3 et 7 : mutant 1.15 – Puits 4 et 8 : mutant 1.47

La principale difficulté de ce protocole réside dans le fait qu'il faut un site de restriction aux environs du gène muté afin de pouvoir faire une cyclisation suivi d'une amplification. Si le site de restriction est trop loin ou absent, la ligation ne pourra pas avoir lieu et l'amplification sera impossible. De plus, le fait de ne pas connaître la longueur de l'amplicon attendu est à l'origine de difficultés dans le protocole de PCR.

Néanmoins, 16 clones ont pu être caractérisés grâce à cette technique. Afin d'identifier le site d'insertion du transposon dans les clones restants et contourner cette difficulté, une nouvelle technique est testée. Celle-ci est basée sur une amplification directe du génome à partir d'amorces présentes dans le transposon et d'amorces aléatoires qui viennent se fixer sur le chromosome (cf. section Matériels et Méthodes). *In fine*, cette technique nous permet aussi d'obtenir un séquençage à partir du transposon afin d'identifier le gène dans lequel il s'est inséré. L'avantage de cette technique est très clairement l'absence de nécessité d'un site de restriction à proximité du transposon. Par contre, ce protocole a l'inconvénient d'être plus fastidieux que le précédent. Au final, seuls quatre mutants n'ont pas pu être séquencés. Les raisons pour lesquelles ces mutants n'ont pas pu être caractérisés restent inconnues à ce jour. Une absence de site de restriction à proximité du transposon peut expliquer l'échec de la première technique mais pas celui de la deuxième.

Le tableau suivant indique les gènes mutés pour chacun des mutants analysés ainsi que leurs scores respectifs :

Tableau V-3 : Identification des mutants d'intérêt.

Nom du mutant (score)	Gène muté	Nom du mutant (score)	Gène muté
1.4 (15,5)	Non identifié	2.40 (10,5)	<i>dacC</i>
1.5 (14,5)	Non identifié	2.42 (10,5)	<i>mlrA</i>
1.7 (11)	<i>atpD</i>	2.54 (11,5)	<i>dacC</i>
1.15 (15,5)	Non identifié	2.85 (10,5)	<i>entC</i>
1.47 (15,5)	<i>crp</i>	2.87 (12)	Non identifié
1.51 (10,5)	<i>nagC</i>	2.92 (10)	<i>thyA</i>
1.76 (10,5)	<i>argR</i>	3.1 (10)	<i>purA</i>
1.87 (10,5)	<i>oppA</i>	3.23 (13)	<i>Icd</i>
2.4 (15,5)	<i>pcnB</i>	3.28 (9)	<i>pcnB</i>
2.5 (10,5)	<i>oppA</i>	3.57 (13,5)	pSC189
2.21 (13)	<i>purL</i>		

Sur les 17 mutants caractérisés, 14 gènes différents ont été identifiés. Nous pouvons tout de suite remarquer la présence d'une mutation dans le gène *crp* pour un des clones choisis. Celui-ci a un score particulièrement élevé traduisant son incapacité, en présence d'AMPc, à pousser sur maltose et à émettre de la lumière. Ce qui est cohérent avec ce qu'on attend d'un clone déficient pour le complexe CRP-AMPc. Un autre fait intéressant est la présence du plasmide pSC189 porteur du transposon. La seule explication plausible est l'insertion du transposon dans le gène de la transposase du plasmide, permettant ainsi la conservation de l'origine de répllication dans le plasmide tout en rendant impossible une future translocation de celui-ci.

Des recherches bibliographiques ont permis de sélectionner un seul candidat susceptible d'importer l'AMPc parmi les mutant caractérisés.

Le gène *atpD* code pour la sous-unité β de l'ATP synthase. Ce complexe se trouve au niveau de la membrane mais n'est pas connu pour remplir les fonctions de transporteur. De plus, un déficit de l'ATP synthase a pour conséquence une diminution drastique de la quantité d'ATP disponible dans la cellule. Il n'est pas surprenant, dans de telles conditions, d'avoir une absence de lumière qui nécessite beaucoup d'énergie de la part de la cellule. D'autre part, un des critères qui apporte beaucoup de points au score de ce mutant est l'absence de croissance sur maltose en présence d'AMPc. Or ce même mutant est incapable de pousser sur glucose ce qui semble plus traduire un problème de croissance qu'un déficit

d'import d'AMPc. Il n'est pas surprenant qu'un clone ayant un déficit d'ATP, source d'énergie de la bactérie, ait des problèmes de croissance.

Le gène *nagC* code pour un régulateur de transcription. Cette protéine se fixe à l'ADN et inhibe l'opéron *nagBACD* qui permet le métabolisme du N-acetyl-D-glucosamine. L'idée que nous avons d'un transporteur est qu'il se trouve à la membrane et non pas sur l'ADN, pour cette raison, ce mutant n'a pas été retenu. Le principal critère qui est à l'origine du choix de ce mutant est l'absence de lumière lors de la cinétique couplé à une faible coloration sur rouge Congo. Aucun lien manifeste entre ces critères et la protéine NagC n'a pu être mis en évidence.

Le gène *argR* code pour un régulateur de la transcription des gènes responsables de la synthèse, du transport et du catabolisme de l'arginine. Tout comme pour le mutant *nagC*, il est peu probable qu'une protéine ayant pour principale activité la régulation de gène permette l'entrée de l'AMPc de manière directe. Le principal critère de sélection de ce mutant était l'absence de croissance sur maltose en présence d'AMPc. Cependant, une absence de croissance peut être expliquée par de nombreux phénomènes indépendants de l'import d'AMPc. Quant au critère de coloration sur rouge Congo, bien que la coloration globale soit rose en présence d'AMPc et non pas rouge comme c'est le cas pour une souche *cyaA*⁻, il y a quand même une augmentation de la coloration qui passe du blanc, en absence d'AMPc au rose en présence de cette molécule. Ceci laisse supposer un effet de l'AMPc sur la coloration et donc son import dans la cellule.

Le gène *pcnB* code pour une poly(A)-polymérase qui permet la polyadénylation de certains ARNm, jouant ainsi un rôle dans la dégradation de ceux-ci. Il est surprenant de voir ressortir deux fois ce gène dans deux mutants indépendants (2.4 et 3.28) mais avec des scores totalement différents (respectivement 15,5 et 9). La principale différence entre ces deux mutants est la production de lumière par le clone 3.28 et non par le clone 2.4 en milieu liquide en présence d'AMPc. Cependant, un crible réalisé au sein de l'équipe a démontré l'incapacité d'un mutant *pcnB* à émettre de la lumière même dans une souche capable de produire de l'AMPc (Guillaume Baptiste, article en préparation). Ce mutant n'est donc pas le candidat idéal pour étudier l'import d'AMPc.

La protéine PurL permet la néo-synthèse de purine. L'un des critères qui explique le score élevé de ce mutant lors des cribles est l'absence de croissance sur maltose en présence d'AMPc. Cependant, on peut constater que ce même mutant ne pousse pas plus sur glucose. Il semblerait donc qu'il ait un problème de croissance, ce qui est tout à fait logique avec une incapacité à produire des purines, essentielles à la constitution de l'ADN, de l'ARN mais

également de certaines biomolécules telles que l'ATP ou le GTP. Cette dernière déficience permet d'ailleurs d'apporter une explication à l'absence de lumière observée pour ce mutant. Il semble peu probable que la protéine PurL joue un rôle quelconque dans l'import de l'AMPc.

Le gène *dacC*, qui apparaît deux fois dans les mutants sélectionnés (2.40 et 2.54) avec des scores proches et élevés (respectivement 10,5 et 11,5), code pour la protéine PBP6 (Penicillin-binding protein 6) qui assure la morphologie de la cellule en modifiant les peptidoglycanes. Le fait que DacC influence la constitution de la membrane peut expliquer le fait que ces mutants aient une faible teinte sur rouge Congo. En effet, ne connaissant pas avec exactitude les acteurs de cette coloration, l'hypothèse que DacC joue un rôle dans celle-ci en modifiant les caractéristiques de la membrane cellulaire est tout à fait réaliste. Par contre, l'absence de lumière produite lors de la cinétique suivie sur milieu riche n'est pas expliquée. Il est cependant peu probable que cette protéine influence directement l'import d'AMPc par la cellule puisqu'elle ne semble pas jouer le rôle d'un transporteur, ce mutant n'a donc pas été retenu pour une analyse plus approfondie.

Le gène *mlrA* code pour une protéine régulant la production des curlis ce qui explique la faible coloration de ce mutant sur rouge Congo, un des critères de sélection qui offre un score élevé à ce mutant. En parallèle, l'absence de lumière émise lors de la croissance en milieu riche liquide en présence d'AMPc est nuancée par le fait que ce même mutant est capable d'émettre de la lumière sur le milieu riche solide (expérience avec le rouge Congo). Pour ces diverses raisons, ce mutant n'est pas retenu pour l'étude de l'import d'AMPc par *Escherichia coli*.

Le gène *entC* code pour une enzyme permettant la synthèse d'isochorismate. Cette protéine est cytoplasmique et est donc peu susceptible de jouer un rôle dans l'import d'AMPc. De ce fait et malgré que ce mutant ait une faible coloration sur rouge Congo et ne produise pas de lumière lors de la cinétique en présence d'AMPc, il n'est pas gardé pour la suite de l'étude.

Le gène *thyA* code pour une thymidylate synthétase, protéine essentielle à la synthèse d'ADN. En effet, un des critères expliquant son score élevé est l'absence de croissance sur maltose en présence d'AMPc. Or, ce clone ne pousse pas non plus sur glucose ce qui traduit une déficience dans la croissance tout à fait cohérente avec un problème de synthèse d'ADN. De même, celui-ci peut expliquer l'absence de lumière émise lors de la cinétique en présence d'AMPc. Ce mutant n'est pas choisi pour la suite de l'étude.

Le gène *purA* code pour une adenylosuccinate synthétase. Cette enzyme permet la première étape de la synthèse d'AMP. Ce mutant est donc déficient pour l'ATP produit à partir de molécules d'AMP. Cette absence d'énergie dans la cellule explique les problèmes de croissance observés chez ce clone ainsi que l'absence de production de lumière. Ce candidat n'est donc pas retenu.

Le gène *icd* code pour une isocitrate déshydrogénase, enzyme permettant la production d'alpha-cétoglutarate. Cette enzyme est cytoplasmique ce qui lui laisse peu de chance d'intervenir directement dans l'import d'AMPc. D'autre part, il semblerait que ce mutant ait un problème de croissance puisqu'il n'est pas plus capable de croître sur un milieu minimum complémenté en maltose et en AMPc que sur un milieu minimum complémenté avec du glucose. De plus, malgré la faible coloration sur rouge Congo, il y a tout de même une augmentation de la teinte après ajout d'AMPc ce qui semble indiquer que la molécule d'intérêt est importée. Ce mutant n'est donc pas retenu pour la suite de l'étude.

Enfin, le gène *oppA* qui est muté dans deux des clones sélectionnés code pour une protéine périplasmique qui assure le transport d'oligopeptides dans le cytoplasme (cf. section I.2). Bien que ces mutants n'aient pas un score des plus élevés (10,5) ils ont retenu toute notre attention du fait qu'une activité de transport est inactivée chez ceux-ci. Nous avons donc concentré tous nos efforts sur la caractérisation de ce mutant.

V.2 *Tests phénotypiques*

V.2.1 Reconstruction du mutant

Il est intéressant de constater que le gène codant pour la protéine OppA a été muté dans 2 des 21 clones sélectionnés après les différents cribles. Il s'agit des mutants 1.87 et 2.5. Comme le montre le séquençage de ces clones présentés en Annexe 3, le transposon s'est inséré à deux endroits différents du gène, mais toujours en 3'. Il est étonnant d'observer que ces deux clones, pourtant mutés dans le même gène, présentent des phénotypes différents en fonction des divers cribles qui ont pu être réalisés. Une des divergences se situe sur la coloration des colonies sur un milieu rouge Congo. Cependant, comme nous en avons déjà discuté, ce test est d'une fiabilité limitée du fait de la gamme de couleur obtenue. Un point plus surprenant est leur comportement sur des cribles ayant des critères plus drastiques, à savoir la croissance sur maltose ainsi que la production de lumière lors de la culture en milieu riche liquide. Alors que le mutant 2.5 n'émet pas de luminescence dans ces conditions, il est capable de pousser sur un milieu pauvre contenant comme seule source de carbone du maltose et de l'AMPc. Par contre, le mutant 1.87 présente un phénotype totalement inverse avec une lumière émise en milieu riche et une absence de croissance sur maltose en présence d'AMPc.

Ces importantes variations peuvent être dues à la nature des cribles réalisés qui avaient pour objectif de permettre de faire un premier tri parmi tous les candidats à l'import de l'AMPc avant de réaliser une étude plus poussée sur un seul candidat. Il est également possible que la protéine OppA soit en partie produite, puisque le gène qui la code n'est pas délété mais seulement coupé par le transposon. Ce fragment protéique n'est pas le même chez les deux clones puisque le transposon ne s'est pas inséré au même endroit dans le gène. Il se pourrait donc que cette différence soit à l'origine de la variabilité du phénotype alors qu'un seul et même gène est muté dans ces clones.

La première étape a donc consisté à reconstruire un double mutant *cyaA⁻oppA⁻* afin de confirmer le phénotype d'une telle souche et s'affranchir de la présence du transposon. Pour cela une transduction est réalisée à partir des souches *oppA⁻* et *cyaA⁻* de la banque Keio. Cette

technique est basée sur l'utilisation de bactériophages : lors du cycle de multiplication du phage à l'intérieur de la bactérie, celui-ci intègre une partie du génome bactérien. Après lyse des bactéries, le phage infecte une autre bactérie dans laquelle la partie du génome qu'il transporte va pouvoir s'insérer par recombinaison. Une souche *oppA*⁻ est infectée par des phages P1. Cette souche contient un gène de résistance à la kanamycine à la place du gène *oppA*. Le lysat cellulaire est ensuite mis en culture avec une souche *cyaA*⁻ dont la cassette de résistance a été retirée par Guillaume Baptist (LAPM, Grenoble, UMR5163) puis étalé sur LA+kanamycine. Seuls les clones ayant opéré une recombinaison au niveau du gène *oppA* ont inséré la cassette de résistance à cet antibiotique et peuvent pousser.

Par la suite, une PCR est réalisée afin de contrôler l'absence des gènes *cyaA* et *oppA* (cf. section Matériels et Méthodes). Pour cela, j'utilise les amorces CyaA1 et CyaA2 d'une part et les amorces OppA-5' et OppA-3' d'autre part. En effet, alors que la taille de l'amplification du gène *oppA* est de 1 740 pb, la taille de la cassette kanamycine est de 1 434 pb avec les mêmes amorces. De la même manière, on peut s'assurer de la présence du gène *cyaA* (2 706 pb) ou de son absence, puisque l'élimination de la cassette kanamycine laisse une cicatrice de seulement 300 pb après amplification. La différence de taille attendue est révélée après migration sur un gel d'agarose 1%, ce qui nous sert de contrôle pour affirmer la qualité du matériel utilisé (figure V-9).

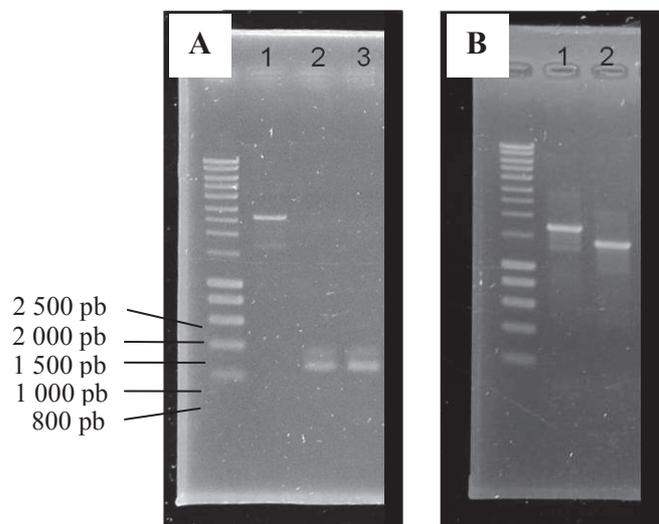


Figure V-9 : Vérification des mutations dans la souche *cyaA oppA*⁻.

A : détection du gène *cyaA*. Puits 1 : wt ; puits 2 : *cyaA*⁻ ; puits 3 : *cyaA oppA*⁻

B : détection du gène *oppA*. Puits 1 : wt ; puits 2 : *cyaA oppA*⁻

Les produits des amplifications à partir des amorces CyaA1 et CyaA2 d'une part (A) et OppA-5' et OppA-3' (B) d'autre part, sont déposés sur un gel d'agarose 1%.

Comme nous pouvons le voir sur la figure V-9, le gène *cyaA* est absent des clones *cyaA⁻oppA⁻*. De la même manière, nous observons que le gène *oppA* (1740 pb) a été remplacé par la cassette de résistance à la kanamycine (1434 pb).

Afin de détecter la présence d'AMPc dans cette nouvelle souche *cyaA⁻oppA⁻*, elle est transformée grâce à la technique du TSS (cf section Matériels et Méthodes) avec le plasmide pSB-acs-luc, notre système rapporteur utilisé lors des cribles précédemment décrits.

En vu de confirmer ce qui a été observé lors des précédents cribles, je réalise une cinétique durant laquelle la croissance et la luminescence sont suivies pendant 1 000 min. Les souches *cyaA⁻* + pSB-acs-luc et *cyaA⁻oppA⁻* + pSB-acs-luc sont mises en culture dans un milieu minimum complémenté par 0,03% de glucose. Cette faible concentration en sucre permet d'assurer un épuisement de celui-ci et donc l'activation du promoteur *acs*, inhibé par la présence de glucose. De l'acétate à 0,03% est également ajouté au milieu. En effet, il a été démontré dans le laboratoire (Guillaume Baptist, article en préparation) que l'épuisement du glucose résultant de la croissance bactérienne provoque une diminution de l'énergie présente dans les cellules ce qui induit une disparition de la luminescence. La présence d'acétate dans le milieu nous permet de nous affranchir de cet artefact. L'absorbance à 600 nm et la luminescence sont mesurées en présence de 0 ; 0,5 ; 1 ou 1,5 mM d'AMPc dans le milieu (figure V-10) grâce à un lecteur de microplaque qui permet une incubation à 37°C et une agitation régulière.

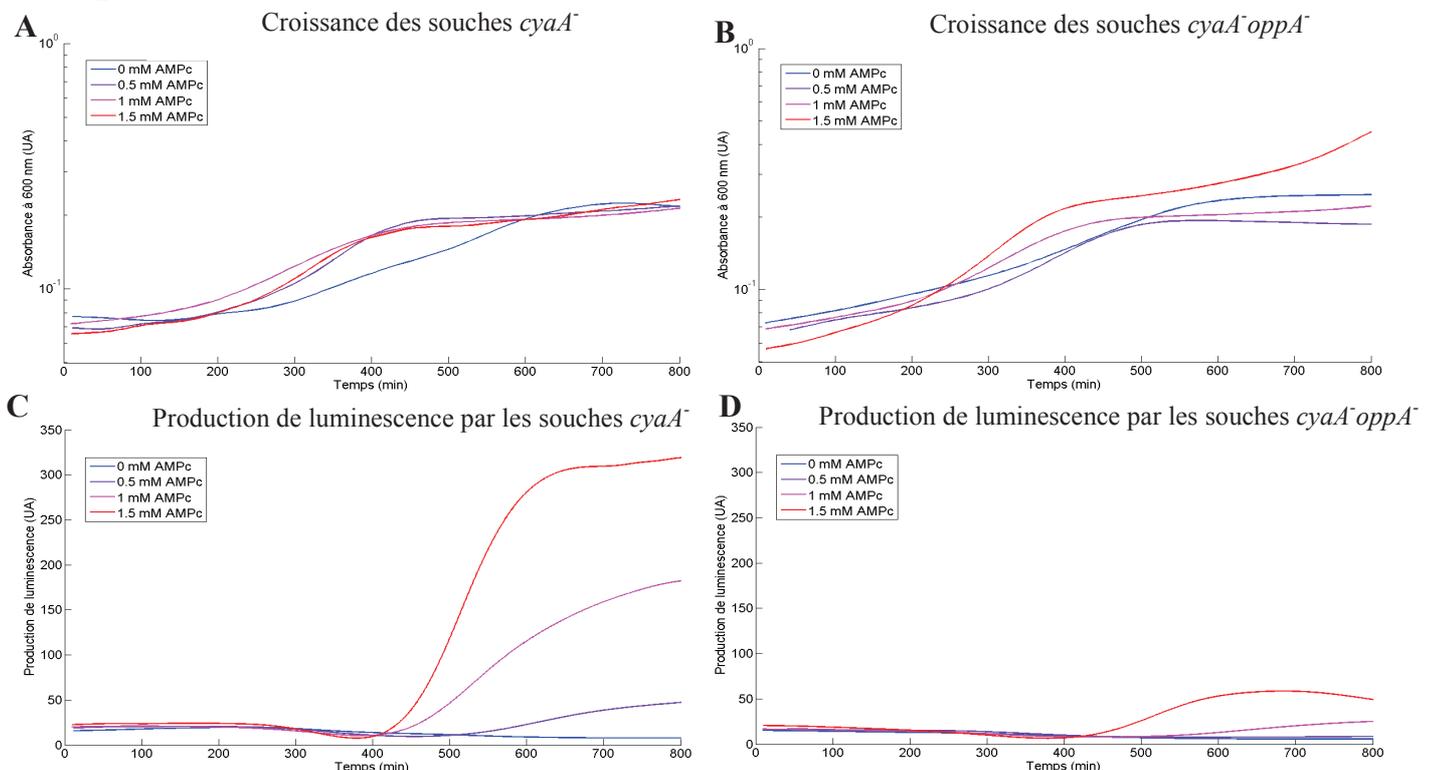


Figure V-10 : Production de lumière chez des mutants.

Les souches *cyaA⁻* (A et C) et *cyaA⁻oppA⁻* (B et D) sont transformées avec le plasmide pSB-acs-luc. Une pré-culture de 15 heures est diluée 300 fois dans le milieu M9 contenant 0,03% de glucose et 0,03% d'acétate. Différentes concentrations d'AMPc sont ajoutées dans le milieu en début de cinétique. Des courbes représentatives de ce qui est obtenu lors du suivi de la croissance (A et B) et de la production de lumière (C et D) pendant 800 minutes sont présentées ici.

Comme l'indique les graphiques de la figure V-10, le double mutant *cyaA⁻oppA⁻* ne semble pas être affecté dans sa croissance. En effet, les deux souches *cyaA⁻* et *cyaA⁻oppA⁻* atteignent la phase stationnaire de croissance au même moment, à savoir entre 400 et 500 min après le début de l'expérience pour une absorbance à 600 nm équivalente à 0,2 UA et ce, quelle que soit la concentration en AMPc. En ce qui concerne la luminescence, on voit très clairement une augmentation de l'intensité lumineuse en fonction de la concentration en AMPc lorsqu'il s'agit de la souche *cyaA⁻*. En effet, celle-ci passe de 0 à plus de 300 unités de luminescence lorsque l'AMPc passe de 0 à 1,5 mM. Par contre, dans le cas de la souche *cyaA⁻oppA⁻*, la luminescence est bien plus faible et dépasse à peine les 50 unités de luminescence pour la concentration en AMPc la plus forte.

Une autre propriété qui a été testée au cours des cribles et qui a permis de sélectionner le mutant *oppA*, concerne l'incapacité à pousser sur maltose en présence d'AMPc. Un test de croissance sur 0,3% de maltose est donc effectué sur les souches *cyaA⁻* et *cyaA⁻oppA⁻* en présence de différentes concentrations d'AMPc dans le milieu. Des courbes représentatives de ce qui a été obtenu sont présentées figure V-11 :

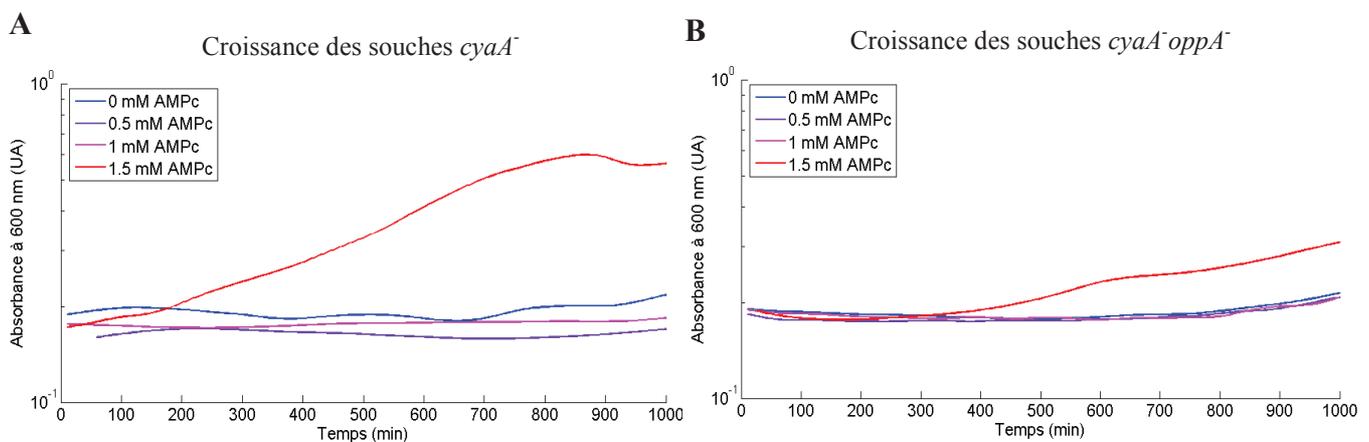


Figure V-11 : Croissance sur maltose des souches *cyaA⁻* et *cyaA⁻oppA⁻*.

Après une pré-culture de 15 heures, des souches *cyaA⁻* (A) et *cyaA⁻oppA⁻* (B) sont diluées 300 fois dans du milieu M9 + 0,3% maltose + 0,03% acétate. La concentration en AMPc dans le milieu varie de 0 mM à 1,5 mM. La croissance est suivie pendant 1 000 minutes par lecture de l'absorbance à 600 nm.

Nous pouvons constater qu'avec une concentration d'AMPc de 1,5 mM, la souche *cyaA⁻* retrouve une croissance classique biphasique : d'abord une phase exponentielle qui voit l'absorbance à 600 nm passer de 0,08 UA à 0,5 UA suivie d'une phase stationnaire atteinte après 800 min de culture. Avec les mêmes conditions expérimentales, on observe une

croissance beaucoup plus faible pour la souche *cyaA⁻oppA⁻* qui peine à atteindre 0,2 UA d'absorbance et n'est toujours pas en phase stationnaire au bout de 1 000 minutes.

Ces premières expériences nous permettent de confirmer ce qui a été observé lors du crible : la souche *cyaA⁻oppA⁻* agit comme si elle était incapable d'importer de l'AMPc puisqu'elle ne produit pas de luminescence et ne pousse pas sur maltose en présence d'AMPc dans le milieu.

Comme nous avons pu le voir dans la section I.2.2, *oppA* appartient à un opéron constitué de cinq gènes : *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* et *oppF*. Afin de déterminer si chacune de ces protéines est importante pour l'import de l'AMPc, les doubles mutants suivants sont construits : *cyaA⁻oppB⁻*, *cyaA⁻oppC⁻*, *cyaA⁻oppD⁻*, *cyaA⁻oppF⁻*. La technique utilisée pour produire ces souches est la même que précédemment, à savoir la transduction (cf section Matériel et Méthodes). Chacune des constructions est ensuite vérifiée par PCR à l'aide des amorces suivantes : OppB-5'/OppB-3'2 ; OppC-5'/OppC-3'2 ; OppD-5'/OppD-3'2 ; OppF-5'/OppF-3'2. La taille des amplicons ainsi obtenus nous indique si le gène est présent ou bien s'il est remplacé par la cassette kanamycine et donc inactif (figure V-12). Les tailles attendues sont les suivantes : 970 pb pour le gène *oppB* ; 950 pb pour le gène *oppC* ; 1 070 pb pour le gène *oppD* ; 1 060 pb pour le gène *oppF* et 1 402 pb pour la cassette kanamycine. La vérification de la présence du gène *oppB* nous a apporté une surprise : en plus de la bande à 970 pb que nous attendions, un autre amplicon d'une taille de 650 pb est visible chez tous les doubles mutants. Il s'agit probablement d'une amplification aspécifique d'une portion d'ADN. Néanmoins, la bande correspondant au gène *oppB* est bien absente chez les deux clones *cyaA⁻oppB⁻* testés et remplacée par une bande à 1 402 pb qui correspond à ce qu'on attend pour l'amplification de la cassette kanamycine. Nous pouvons donc affirmer que ces clones ne possèdent pas le gène *oppB* (figure V-12A). De la même manière, on remarque qu'après amplification du gène *oppC*, l'amplicon d'une taille de 1 070 pb est remplacé par un amplicon d'une taille de 1 402 pb (figure V-12B) ce qui nous permet de garantir la bonne qualité des doubles mutants *cyaA⁻oppC⁻*. Il en va de même pour la vérification des doubles mutants *cyaA⁻oppD⁻* (figure V-12C) et *cyaA⁻oppF⁻* (figure V-12D) où nous observons une amplification correspondant à la taille de la cassette et non pas à celle du gène muté.

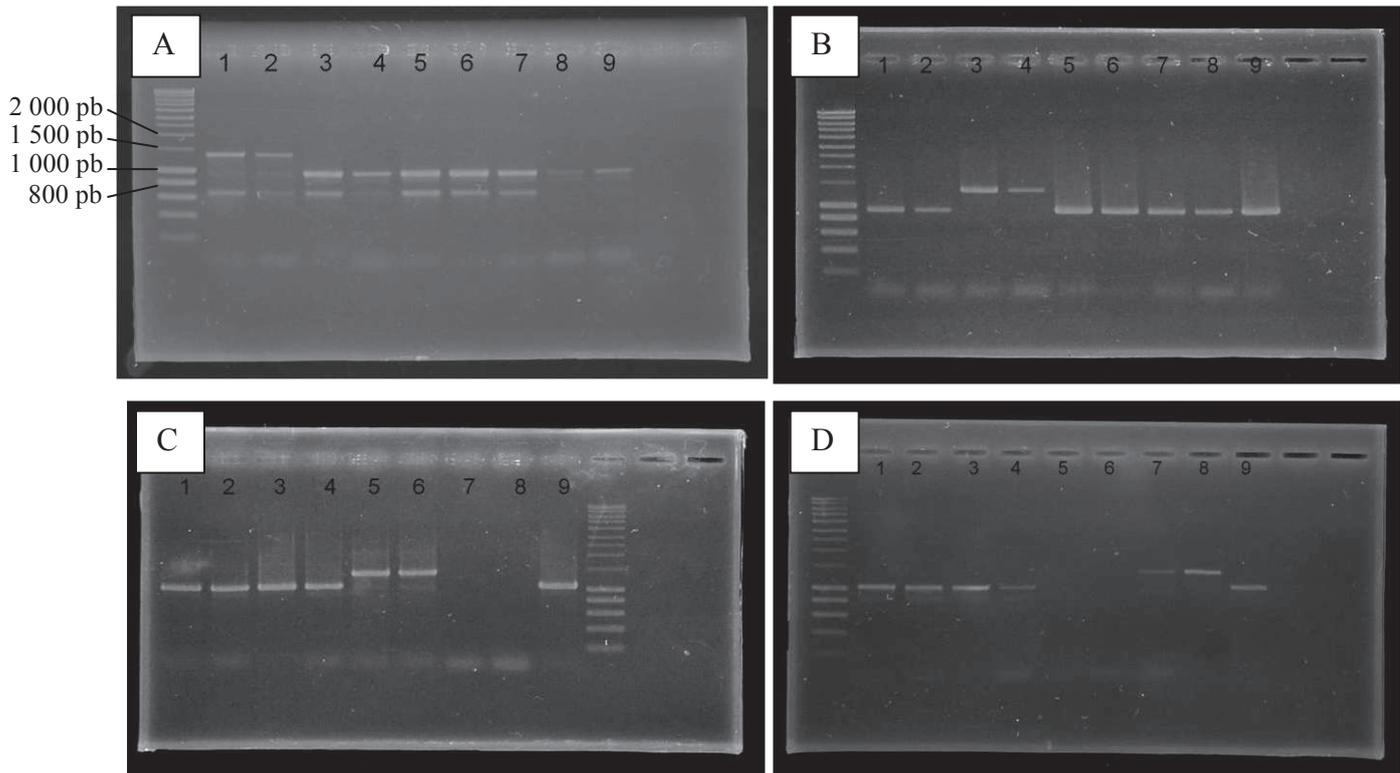


Figure V-12 : Vérification des doubles mutants.

Les mutants *cyaA⁻oppB⁻* (puits 1 et 2), *cyaA⁻oppC⁻* (puits 3 et 4), *cyaA⁻oppD⁻* (puits 5 et 6) et *cyaA⁻oppF⁻* (puits 7 et 8) ainsi que la souche wt (puits 9) sont contrôlés quant à la présence des gènes *oppB* (A), *oppC* (B), *oppD* (C) et *oppF* (D) par PCR.

Comme l'indique les gels présentés figure V-12, ces doubles mutants ne possèdent ni le gène *cyaA* ni l'un des gènes de l'opéron *opp*. Ces souches sont ensuite transformées avec le plasmide pSB-acs-luc, afin de pouvoir détecter la présence d'AMPc dans la cellule. La production de luminescence par ces souches est analysée : les souches sont cultivées en milieu minimum complémenté avec 0,03% de glucose, 0,03% d'acétate et différentes concentration d'AMPc (figure V-13). On voit très clairement une augmentation de la production de luminescence par la souche *cyaA⁻* en parallèle à l'augmentation de la concentration en AMPc comme observé précédemment (figure V-10). Par contre, pour chacun des doubles mutants testés, aucune augmentation de lumière n'est visible quelle que soit la concentration en AMPc présente dans le milieu de culture. Ces résultats suggèrent que la totalité du système *opp* est nécessaire à l'import de l'AMPc dans la cellule.

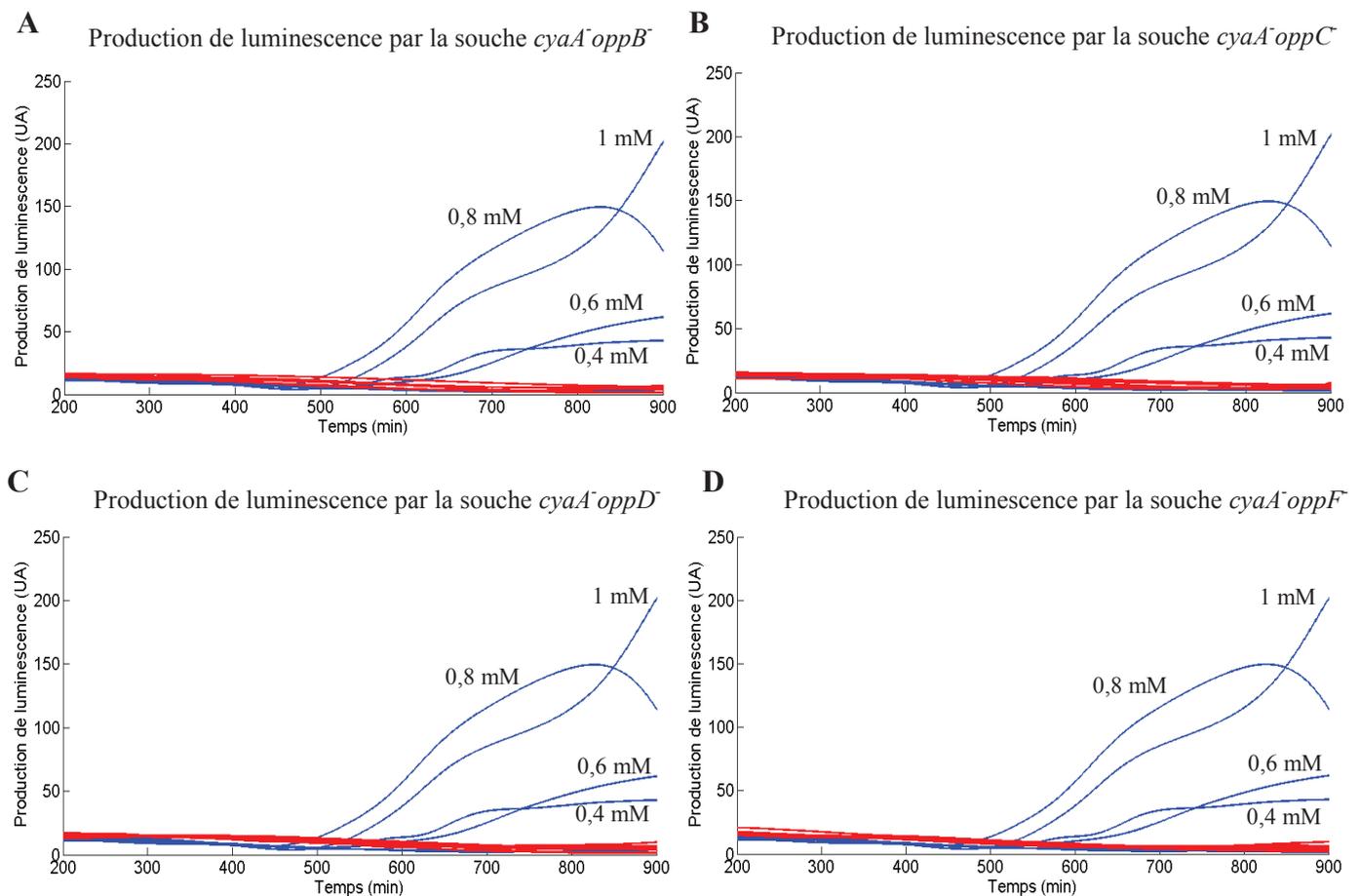


Figure V-13 : Production de lumière par les doubles mutants.

La souche *cyxA⁻* (courbes bleues) et les doubles mutants (courbes rouges) *cyxA⁻oppB⁻* (A), *cyxA⁻oppC⁻* (B), *cyxA⁻oppD⁻* (C), *cyxA⁻oppF⁻* (D) sont transformés avec le plasmide pSB-acs-luc. Des pré-cultures de 15 heures sont diluées 300 fois dans du milieu M9 + 0,03% glucose + 0,03% acétate et différentes concentration d'AMPc. La luminescence émise est mesurée pendant 900 min.

Comme nous l'avons indiqué au début de ce chapitre, nous avons également à notre disposition un système rapporteur basé sur le promoteur *sdh* au lieu du promoteur *acs*. Celui-ci est plus sensible à l'AMPc que le promoteur *acs*, ce qui nous avait conduit dans un premier temps à ne pas l'utiliser (cf section I.1.1). A ce stade de notre étude, il devenait intéressant d'analyser le comportement d'un tel promoteur dans la souche *cyxA⁻oppA⁻*. Celle-ci a donc été transformée grâce à la technique du TSS (cf section Matériels et Méthodes) avec le plasmide pSB-sdh-luc, ainsi que la souche *cyxA⁻*. Une cinétique de production de lumière par ces souches a été suivie lors d'une incubation en milieu minimum M9 complété avec 0,03% de glucose et 0,03% d'acétate avec différentes concentrations d'AMPc (figure V-14).

Ces nouveaux résultats montrent clairement que le simple mutant *cyaA*⁻ émet de la lumière dès 0,1 mM d'AMPc dans le milieu, quantité de lumière qui croît en fonction de la quantité d'AMPc ajoutée jusqu'à atteindre une valeur de 8 000 unités de luminescence pour une concentration d'AMPc de 1 mM. À l'opposé, le double mutant *cyaA*⁻*oppA*⁻ n'émet que 2 000 unités de luminescence à la plus forte concentration d'AMPc. Ce double mutant se comporte donc comme s'il avait une anomalie dans l'import de l'AMPc, molécule nécessaire à l'activation du promoteur du gène *sdh* contrôlant l'opéron de la luciférase. Il est néanmoins remarquable que la souche *cyaA*⁻*oppA*⁻ émette tout de même de la lumière ce qui nous permet d'évoquer la présence d'un système alternatif d'import de l'AMPc, Opp étant tout de même le système principal puisque nous observons une diminution de la luminescence d'un facteur de 4.

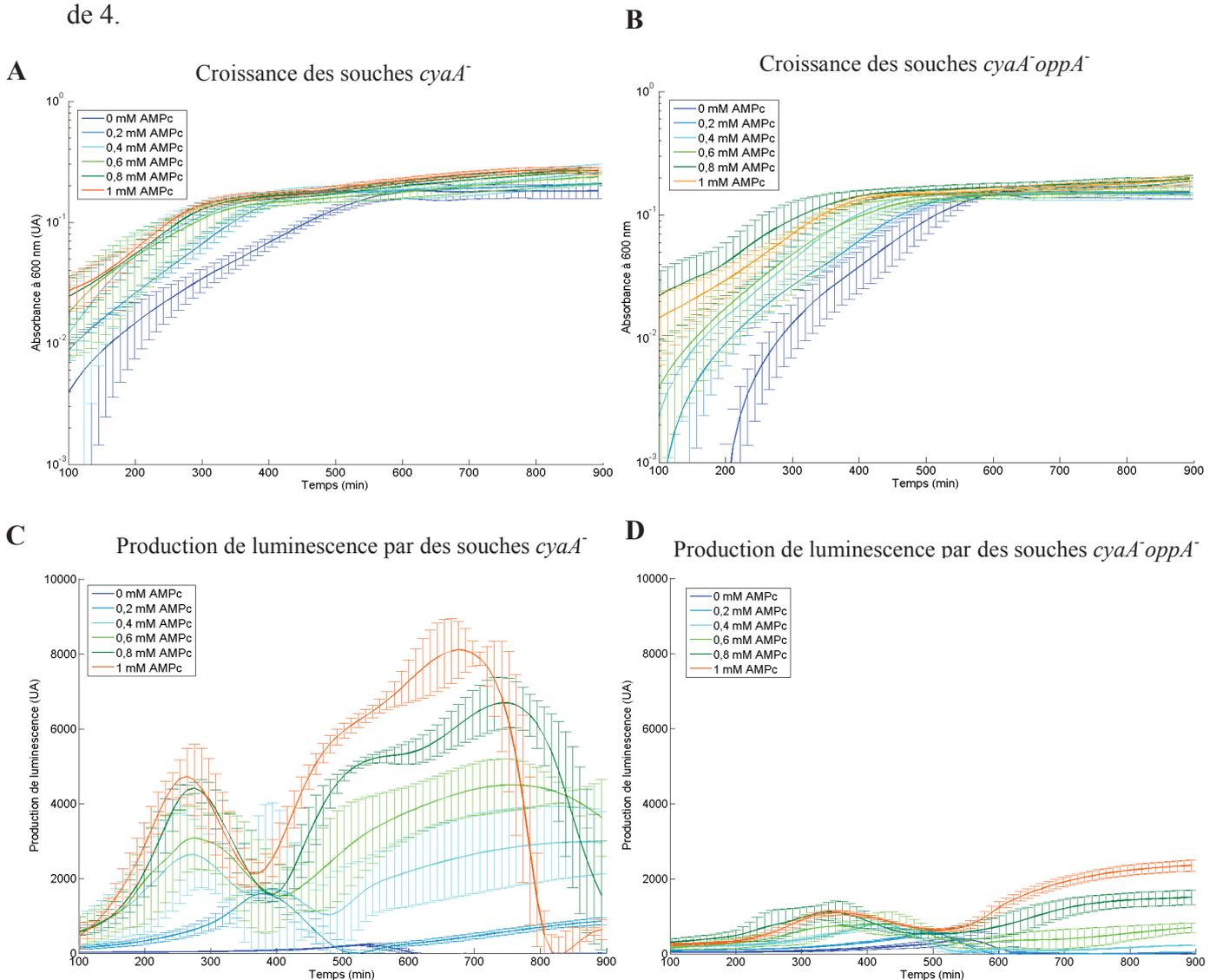


Figure V-14 : Production de lumière par le mutant *cyaA*⁻*oppA*⁻.

Les souches *cyaA*⁻ (A et C) et *cyaA*⁻*oppA*⁻ (B et D) sont transformées avec le plasmide pSB-*sdh*-*luc*. Après une pré-culture de 15 heures, les souches sont diluées 300 fois dans du milieu M9 + 0,03% glucose + 0,03% acétate en présence de différentes concentration d'AMPc. La croissance (A et B) et la luminescence (C et D) sont suivies pendant 900 minutes. Les barres d'erreurs sont calculées à partir de la moyenne de 4 réplicats techniques.

Afin de s'assurer que le système rapporteur basé sur la luminescence n'induit pas d'artefact d'analyse, il était intéressant de tester un autre système rapporteur tel que la GFP. Dans cet but, nous utilisons des plasmides issus de la collection Alon (Zaslaver et al. 2006). Celle-ci regroupe l'ensemble des promoteurs d'ORF connus d'*Escherichia coli* contrôlant un gène codant pour la GFP. Ces plasmides contiennent le gène de la résistance à la kanamycine. Afin de pouvoir étudier ces systèmes dans la souche *cyaA⁻oppA⁻*, elle-même résistante à la kanamycine (à cause de la cassette présente dans le gène *oppA*), nous travaillons actuellement sur le changement de résistance de ces plasmides.

V.2.2 Complémentation du double mutant

N'ayant pas encore travaillé avec différents systèmes rapporteurs, un artefact ne peut pas être définitivement écarté. J'ai donc réalisé une expérience permettant de m'assurer de la capacité de la souche *cyaA⁻oppA⁻* + pSB-acs-luc à produire de la lumière. Pour cela, j'ai transformé cette souche avec le plasmide pZA-tetR-*cya* de surexpression de l'adénylate cyclase, inductible par l'aTc afin de restaurer la production d'AMPc par la cellule. J'ai ensuite mesuré l'émission de lumière par cette nouvelle souche (figure V-15).

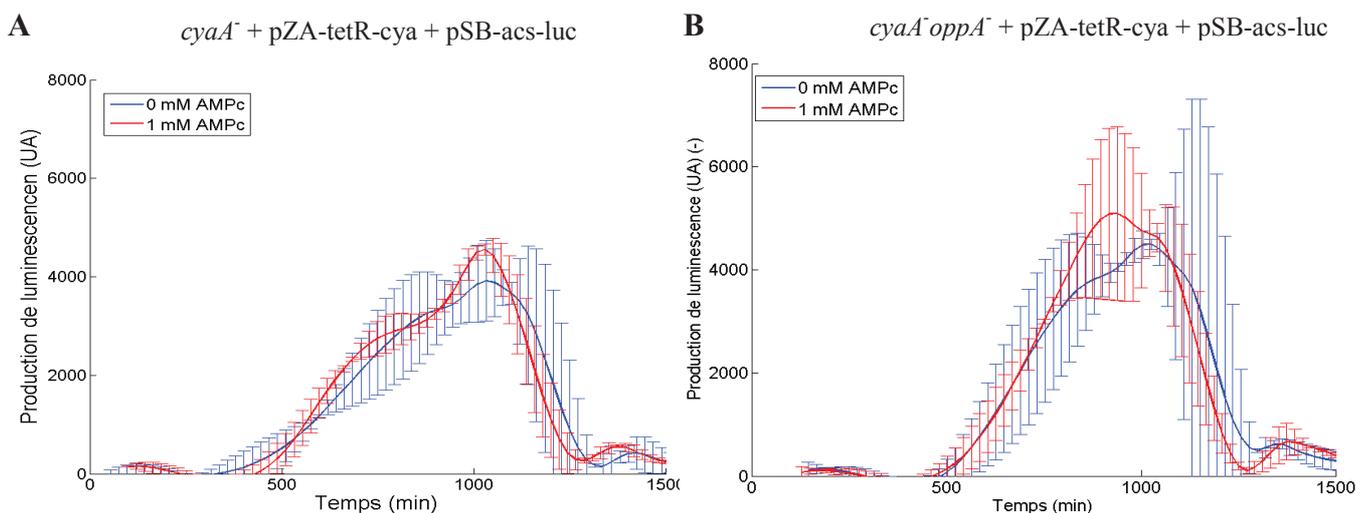


Figure V-15 : Production de lumière après complémentation par *cyaA*.

Les souches *cyaA⁻* (A) et *cyaA⁻oppA⁻* (B) sont transformées avec les plasmides pSB-acs-luc et pZA-tetR-*cyaA*. Après une pré-culture de 15 heures, les souches sont diluées 300 fois dans du milieu M9 + 0,03% glucose + 500 ng/mL d'aTc. 1 mM d'AMPc est ajouté dans la moitié des cultures. La production de lumière est suivie pendant 1 500 minutes.

La figure V-15 démontre très clairement que le double mutant *cyaA⁻oppA⁻* est capable de produire autant de luminescence que le simple mutant *cyaA⁻* en présence d'AMPc intracellulaire. En effet, avec les deux souches, le niveau de luminescence atteint en absence d'AMPc est de 800 UA. Le fait que l'ajout d'AMPc dans le milieu de culture n'apporte absolument rien quant à l'intensité lumineuse prouve l'efficacité du plasmide de surexpression du gène *cyaA*. Nous pouvons ainsi en déduire que l'absence de lumière observée précédemment n'est pas dû à un défaut du système rapporteur dans la souche *cyaA⁻oppA⁻* mais bien à l'absence d'AMPc dans ces cellules et donc à une anomalie dans le système d'import de cette molécule.

Un autre moyen pour observer la présence d'AMPc dans la cellule est la croissance sur maltose. Comme nous l'avons vu lors des cribles effectués sur la banque de mutants (cf chapitre précédent), une souche *cyaA⁻* est incapable de pousser sur un milieu minimum complété avec du maltose sauf s'il y a addition d'AMPc dans le milieu. J'ai donc testé la capacité du mutant à pousser sur un milieu minimum complété par 0,1% de maltose ou 0,05% de glucose et 1 mM d'AMPc. La croissance des souches complétées ou non pour le gène *cyaA* est suivie pendant 24h grâce à un lecteur de microplaque (figure V-16).

Nous voyons très clairement sur la figure V-16 A qu'une souche *cyaA⁻* ne pousse pas sur un milieu minimum complété par du maltose sauf si de l'AMPc est ajouté. Par contre la présence d'AMPc n'est pas nécessaire pour une croissance sur glucose. Nous pouvons constater que la présence du plasmide pZA-tetR-cya, qui permet de restaurer la production d'AMPc, rend l'addition de cette molécule dans le milieu de culture non nécessaire (figure V-16B). Dans le cas du mutant *cyaA⁻oppA⁻*, la présence d'AMPc dans le milieu ne permet pas la croissance de la souche sur maltose (figure V-16C). Par contre, si la production intracellulaire d'AMPc est rétablie, alors la souche pousse sans aucun problème sur un milieu contenant du maltose (figure V-16D). Ces résultats prouvent que le double mutant est capable d'utiliser le maltose comme source de carbone. Le seul prérequis pour que cette croissance soit possible est la présence d'AMPc à l'intérieur de la cellule, condition qui n'est pas remplie lorsque l'AMPc est ajouté dans le milieu de culture d'une souche *cyaA⁻oppA⁻*.

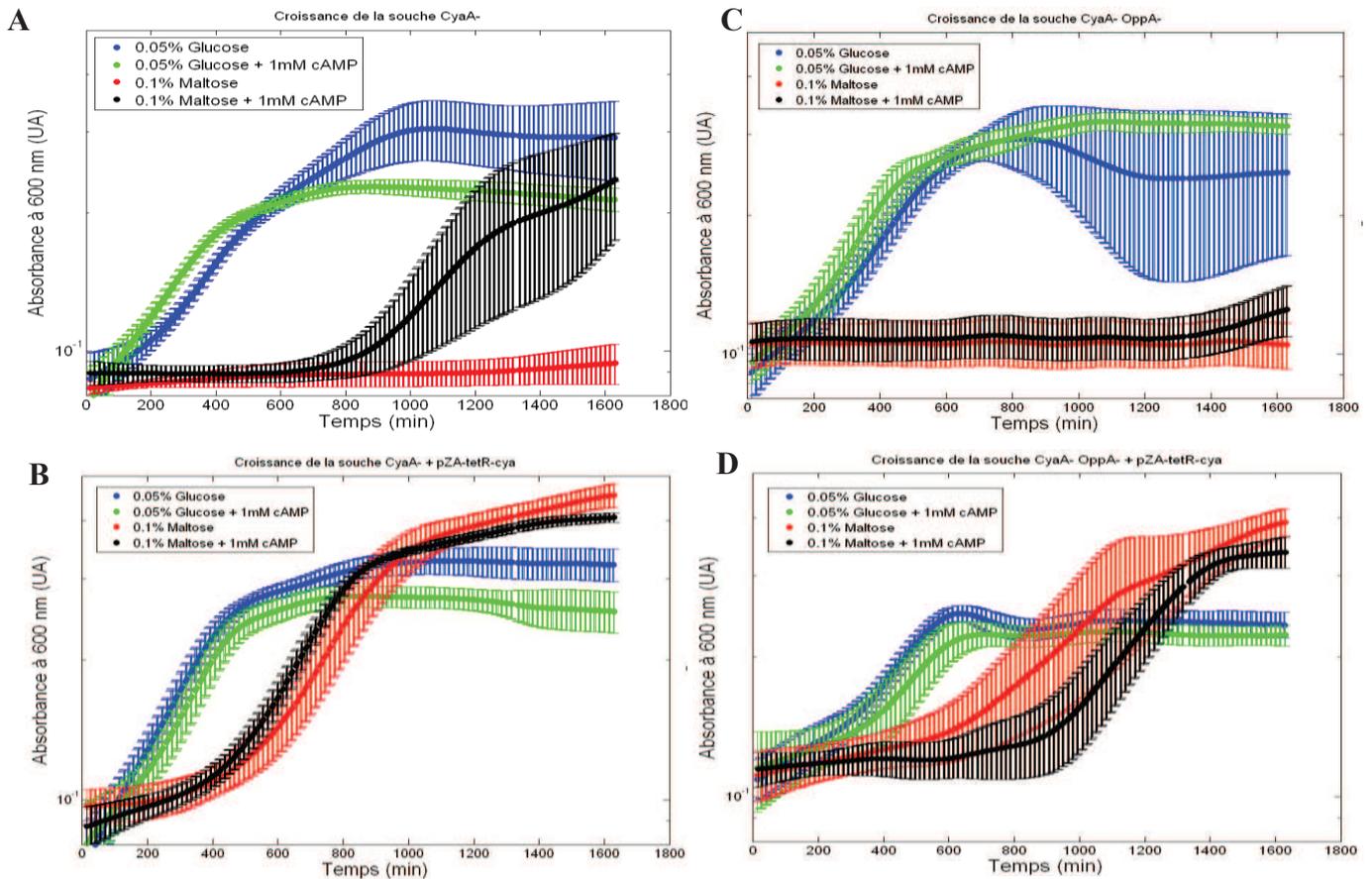


Figure V-16 : Croissance sur maltose après complémentation par *cyaA*.

Les souches *cyaA*⁻ (A et B) et *cyaA*⁻*oppA*⁻ (C et D) sont transformées (B et D) ou non (A et C) avec le plasmide pZA-tetR-*cyaA*. Après une pré-culture de 15 heures, les souches sont diluées 300 fois dans du milieu M9 + 0,05% glucose ou 0,1% maltose + 500 ng/mL aTc avec ou sans addition d'AMPc. La croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm est suivie pendant 1 600 minutes. Les barres d'erreurs sont calculées à partir de la moyenne de 5 à 8 répliquats techniques et biologiques.

La question qui peut être posée à ce moment de l'étude est la suivante : est-ce bien la protéine OppA qui lie l'AMPc dans le périplasma et qui vient ensuite se fixer au complexe Opp afin de faire entrer la molécule dans la cellule ? En effet, puisque les cinq gènes du système sont organisés en opéron, la mutation dans l'un des gènes peut affecter l'expression des gènes qui se trouvent en aval par polarité. Or, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction de cette étude, plusieurs protéines périplasmiques peuvent se fixer sur un même complexe de transport. Le double mutant *cyaA*⁻*oppF*⁻ concerne le dernier gène de l'opéron et, comme indiqué précédemment (figure V-13), il est incapable de faire entrer l'AMPc, ce qui démontre que le complexe OppBCDF est l'importateur principale de l'AMPc. Cependant, lors des expériences utilisant le double mutant *cyaA*⁻*oppA*⁻, rien ne peut être affirmé concernant le rôle d'OppA dans ce transport car, dans ce cas, l'expression de la totalité des gènes de l'opéron *opp* peut être affectée par polarité. Une solution aurait été

d'éliminer la cassette du gène de résistance à la kanamycine selon le protocole indiqué dans l'article de Baba et ses collègues (Baba et al. 2006). En effet, la cassette qui permet la mutation des gènes dans cette collection est construite de telle manière que sa suppression assure l'expression des gènes se trouvant en aval de la mutation grâce à l'élimination du codon stop présent dans la cassette. Cependant, malgré de nombreuses tentatives, il n'a pas été possible d'obtenir une souche *cyaA⁻oppA⁻* sans la cassette.

Devant cette difficulté, nous avons opté pour une autre stratégie qui consistait à surexprimer l'opéron *opp* avec ou sans le gène *oppA*. Ceci devait permettre de connaître le rôle exact de la protéine OppA indépendamment de celui du complexe Opp dans l'import d'AMPc. J'ai choisit d'insérer l'opéron *opp* dans le plasmide pSU19 qui contient un MCS. Cependant, le clonage s'est révélé difficile sans doute à cause des tailles respectives de l'opéron et du vecteur. En effet, alors que le vecteur ne mesure que 2,5 kb, l'opéron, lui, mesure plus de 5,5 kb.

Pour l'instant, la surexpression de l'opéron *opp* avec ou sans le gène *oppA* n'a pas encore abouti malgré de nombreuses tentatives. Nous travaillons toujours sur la mise au point d'une telle souche qui permettrait de démontrer sans ambiguïté la nécessité de la protéine OppA dans l'import de l'AMPc par *E. coli*.

En parallèle, d'autres approches sont possibles afin de préciser l'interaction entre la molécule d'AMPc et la protéine OppA : nous pouvons exploiter le fait que cette molécule est notamment connue pour fixer les tri- et térapeptides. L'idée est donc de réaliser une compétition entre l'AMPc et la trialanine, peptide connu pour se fixer sur OppA. Si une diminution de l'import de l'AMPc par *Escherichia coli* est visible en présence du tripeptide, alors nous pourrions émettre l'hypothèse que la molécule d'AMPc lie OppA au niveau du site de fixation des peptides (compétition) ou à proximité de celui-ci (encombrement stérique).

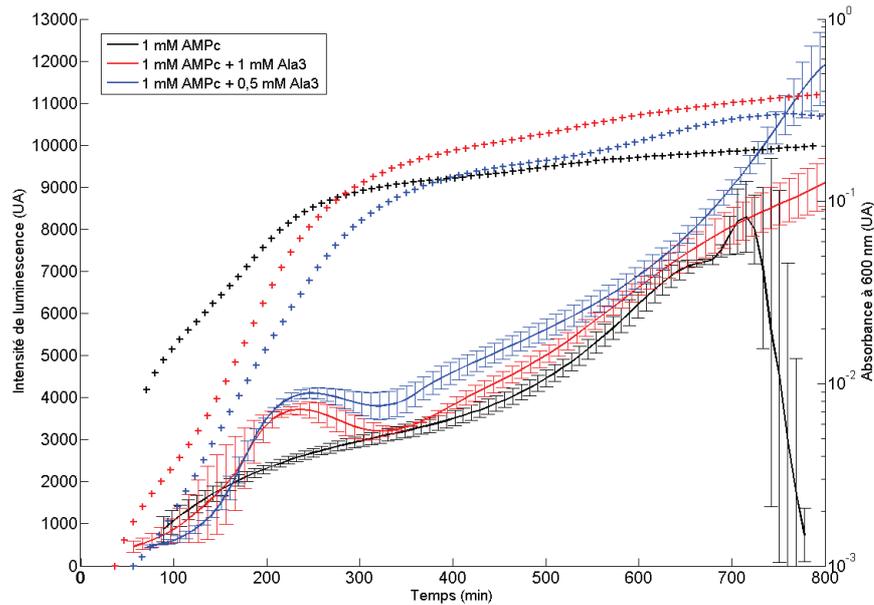
Croissance et production de luminescence par une souche *cyaA*⁻ en présence de trialanine

Figure V-17 : Croissance et production de lumière en présence de trialanine.

Après une pré-culture de 15 heures, la souche *cyaA*⁻ + pSB-sdh-luc est diluée 300 fois dans du milieu M9 + 0,03% glucose + 0,03% acétate + 1 mM AMPc avec différentes concentrations de trialanine. La croissance et la luminescence sont suivies pendant 800 minutes. Des courbes représentatives des croissances sont représentées par des croix. La moyenne de l'intensité lumineuse et les écartypes de 4 réplicats techniques sont représentés par une ligne continue.

Comme nous l'indique la figure V-17, aucune diminution significative n'est visible dans la production de lumière après ajout de la trialanine, ce qui irait dans le sens de deux sites d'interaction distincts pour l'AMPc et les tripeptides. Cependant, une étude plus approfondie du mécanisme de régulation du gène *oppA* nous indique que la trialanine est capable d'induire une augmentation de l'expression de *oppA*. Une telle action aurait pour conséquence d'augmenter le nombre de protéines périplasmiques disponibles ce qui diminuerait considérablement tout effet de compétition entre les molécules d'AMPc et les tripeptides. Pour contourner cette difficulté, nous avons remplacé la trialanine par des casaminoacides, espérant ainsi éviter l'activation du gène *oppA* pour observer directement la compétition entre les deux éléments.

Nous observons cette fois-ci une diminution de la luminescence émise par une souche *cyaA*⁻ en présence de 0,5 mM d'AMPc lorsque les casaminoacides sont ajoutés dans le milieu de culture (figure V-18). Ces résultats suggèrent que les sites d'interaction des peptides et de

l'AMPc sur OppA sont identiques ou assez proche l'un de l'autre pour provoquer une gêne stérique. Des études plus poussées seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

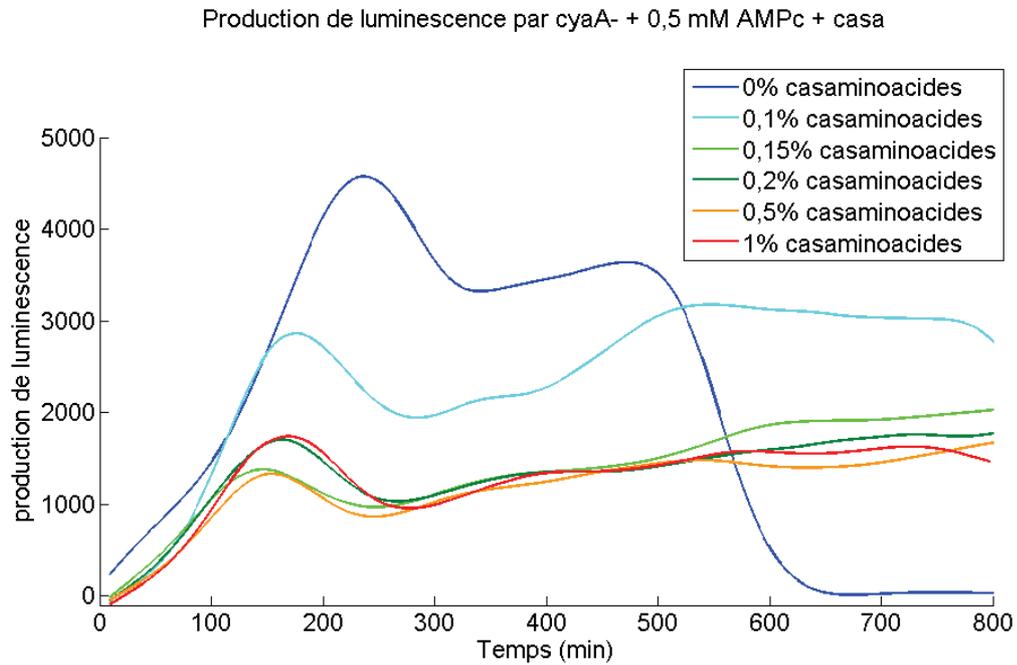


Figure V-18 : Production de lumière en présence de casamino acides.

Après une pré-culture de 15 heures, la souche *cyaA*⁻ + pSB-sdh-luc est diluée 300 fois dans du milieu M9 + 0,03% glucose + 0,03% acétate + 0,5 mM AMPc. Différentes concentrations de casamino acides sont ajoutées dans le milieu allant de 0 à 1%. La croissance et la luminescence sont suivies pendant 800 minutes. Les cellules entrent en phase stationnaire à environ 200 minutes (données non montrées)

V.3 Tests biochimiques

V.3.1 Stratégie de l'étude biochimique de l'interaction entre OppA et l'AMPc

Afin d'établir de manière plus directe une interaction entre la protéine OppA et la molécule d'AMPc, nous avons utilisé une molécule d'AMPc fluorescente connue sous le nom de ϵ -AMPc (1, N⁶-Ethenoadenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate, figure V-19). Cette molécule, créée au début des années 1970, émet de la fluorescence à 415 nm après excitation à 310 nm et semble agir telle que le ferait la molécule d'AMPc classique avec cependant 10 fois moins d'affinité (de 6.10^{-8} M pour l'AMPc à 6.10^{-7} M pour l' ϵ -AMPc : données obtenues avec une protéine kinase eucaryote (Secrist et al. 1972)).

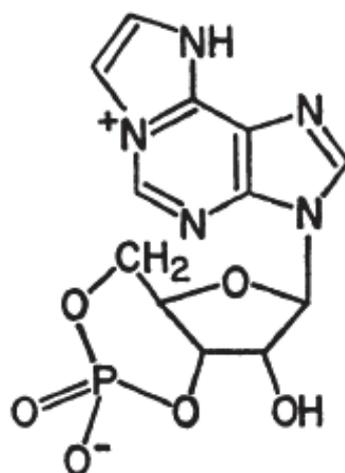


Figure V-19 : Structure de la molécule d' ϵ -AMPc.

Cette molécule fut utilisée dans les années 1980 dans des études d'interaction avec différentes protéines. Je retiens en particulier l'étude menée par Builder et ses collègues qui analysèrent la liaison entre l' ϵ -AMPc et une protéine kinase provenant de cellules musculaires bovines. Ils purent démontrer cette interaction grâce à une diminution de fluorescence émise par l' ϵ -AMPc en présence de la protéine kinase. Cette émission de

lumière revenait à son intensité d'origine après addition d'AMPc non fluorescent à la solution (Builder et al. 1980) (figure V-20).

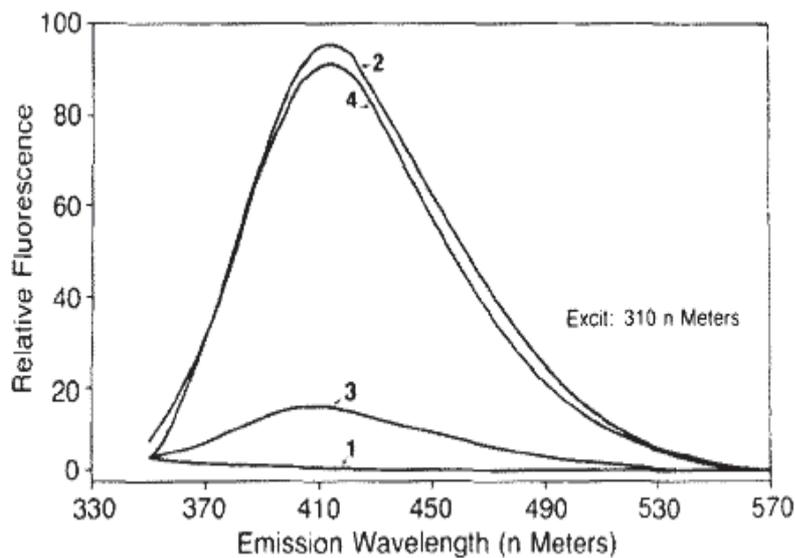


Figure V-20 : Fluorescence de l' ϵ -AMPc en présence ou absence de protéine. L'excitation se fait à 310nm. 0,6 μ M de protéine R¹ (courbe 1) et 1 μ M d' ϵ -AMPc (courbe 2) sont mélangés (courbe 3). 300 μ M d'AMPc non fluorescent sont ensuite ajoutés (courbe 4). (Builder et al. 1980)

Une autre étude réalisée quelques années plus tard utilise également ce changement d'intensité de fluorescence pour prouver l'existence d'une liaison entre la molécule d' ϵ -AMPc et CRP (Donoso-Pardo et al. 1987). Dans ce cas, et contrairement aux expériences précédentes, la fluorescence émise par la molécule d' ϵ -AMPc est augmentée en présence de la protéine (figure V-21).

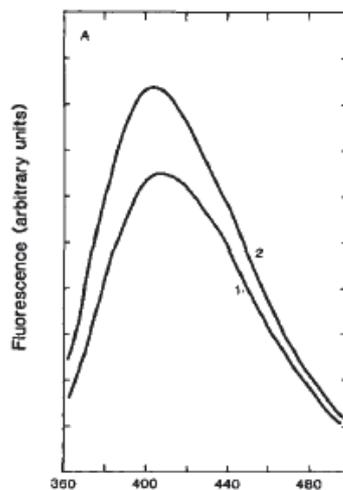


Figure V-21 : Fluorescence de ϵ -AMPc en présence de CRP. 22,6 μ M ϵ -AMPc (courbe 1) sont mélangés à 23,9 μ M de CRP (courbe 2). L'excitation est faite à 375nm. (Donoso-Pardo et al. 1987)

Nous nous sommes donc basés sur ces articles afin de mettre au point une technique permettant de démontrer, de manière directe, une interaction entre la molécule d'AMPc et la protéine OppA.

Pour cela, nous avons utilisé le clone OppA de la collection ASKA (Kitagawa et al. 2005). Cette banque réunit l'ensemble des ORFs d'*Escherichia coli* sur un plasmide de surexpression. La protéine ainsi exprimée peut être couplée ou non à une molécule de GFP. Dans notre cas, OppA ne possède pas ce marqueur.

Cette souche nous a été généreusement donnée par Cécile Wandersman (Institut Pasteur, Paris). J'ai alors entrepris de purifier la protéine OppA à partir de deux litres de culture de cette souche selon le protocole indiqué dans l'article (cf section Matériels et Méthodes) avec l'aide de Pierre-Medhi Hammoudi (équipe de Mohamed Ali Hakimi, LAPM-CNRS-UMR5163). Au final, j'ai obtenu 1 mL de protéine OppA à une concentration finale de 610 nM (mesure réalisée par la technique colorimétrique de Bradford) (figure V-22).

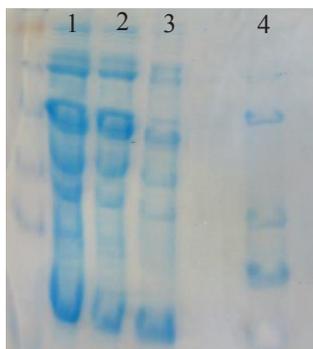


Figure V-22 : Purification de la protéine OppA.

Puits 1 : extrait cellulaire avant purification. Puits 2 : ce qui ne s'est pas fixé à la colonne. Puits 3 : ce qui est parti avec les lavages. Puits 4 : éluat.

V.3.2 Démonstration de l'interaction entre OppA et l'AMPc

V.3.2.a Titration d'OppA par l'AMPc fluorescent

La stratégie suivie afin de prouver l'interaction entre la protéine OppA et l'AMPc est la suivante : si OppA et l' ϵ -AMPc interagissent, alors la fluorescence de la molécule sera

modifiée par l'ajout de la protéine. Néanmoins, si de l'AMPc non fluorescent est ajouté progressivement à la solution, alors il devrait déplacer les molécules d' ϵ -AMPc par compétition et ces dernières émettront à nouveau une fluorescence semblable à celle émise en absence de protéine.

Notre équipe ne possédant pas les compétences et le matériel nécessaires pour réaliser de telles expériences, nous nous sommes tournés vers l'équipe de P. Marche de l'institut Albert Bonniot (INSERM U823) et en particulier vers Christian Villiers.

Après purification, la protéine OppA est en solution dans un tampon composé de 20 mM de Tris-HCl pH8 ; 300 mM de NaCl ; 250 mM d'imidazole et 10 % de glycérol. La protéine est par la suite dialysée (cf section Matériels et Méthodes) afin d'éliminer le maximum d'imidazole, seul composé émettant de la fluorescence dans le tampon (données non montrées). Nous espérons ainsi diminuer le bruit de fond et les interactions possibles entre ce composé et les autres éléments présents dans les échantillons. Après dialyse, OppA se retrouve donc dans un tampon constitué de 20 mM Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl et 10 % glycérol. La concentration en imidazole est passée de 250 mM à 0,1 mM grâce à cette dialyse.

Afin de s'assurer de la diminution de la fluorescence émise par ce nouveau tampon, des mesures sont réalisées à partir des solutions utilisées lors de la dialyse de la protéine (figure V-23). La diminution du bruit de fond laisse entrevoir la possibilité de mesurer la fluorescence d' ϵ -AMPc et non pas celle du tampon.

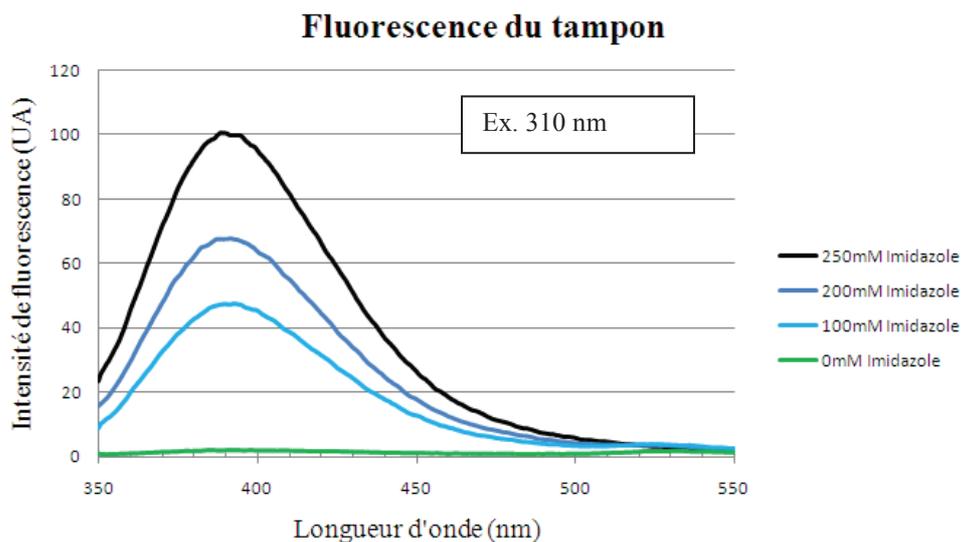


Figure V-23 : Fluorescence du tampon après dialyse.

La fluorescence émise par les différents tampons utilisés lors de la dialyse d'OppA est mesurée après excitation à 310 nm. Les tampons contiennent 20 mM de Tris-HCl pH8, 300 mM NaCl, 10 % glycérol et différentes concentration d'imidazole. Le gain est medium.

Comme nous l'indique les courbes présentées en figure V-23, la suppression de l'imidazole dans le tampon contenant la protéine permet de faire passer la fluorescence de 100 UA à seulement 2 UA. Le premier contrôle qui a été fait dans ce nouveau tampon est la fluorescence émise par les deux types d'AMPc. La fluorescence de l' ϵ -AMPc augmente avec sa concentration et son maximum atteint 120 UA pour une concentration de 17,01 μ M. Cette valeur est atteinte à 420 nm. Et bien que la fluorescence de l'AMPc augmente également avec sa concentration, son intensité n'a rien à voir avec celle de l' ϵ -AMPc puisqu'elle atteint seulement 8 UA pour la plus haute concentration (résultats non montrés). Cette grosse différence entre les deux AMPc nous encourage à penser que les expériences seront plus faciles à analyser que précédemment. De plus la fluorescence émise par la protéine OppA ne dépasse pas une intensité de 3 UA (résultats non montrés) après excitation à 310 nm.

Les intensités maximales de fluorescence atteintes par l' ϵ -AMPc en présence ou en absence d'OppA sont comparées. La concentration en protéine est à nouveau abaissée et passe de 122 nM à 30 nM afin de conserver le maximum de matériel pour cette mise au point du protocole avant de purifier à nouveau la protéine pour les expériences suivantes. La concentration de la molécule varie de 0 μ M à 12 μ M et les maxima atteints sont reportés sur un graphique en fonction de la concentration en ϵ -AMPc (figure V-24.A). Les intensités maximales sont atteintes à 420 nm, ce qui correspond à l'émission attendue de l' ϵ -AMPc. En fin d'expérience, 10 μ M d'AMPc ou 50 μ M de trilycine sont ajoutés afin de libérer l' ϵ -AMPc de la protéine OppA et une nouvelle mesure de fluorescence est réalisée. Contrairement à la trilycine qui n'a aucun effet sur la fluorescence, l'AMPc induit une forte diminution de celle-ci, passant 150 à 82 UA. La différence de fluorescence de l' ϵ -AMPc en présence et en absence de la protéine OppA est reportée sur un graphique en fonction de sa concentration (figure V-24.B).

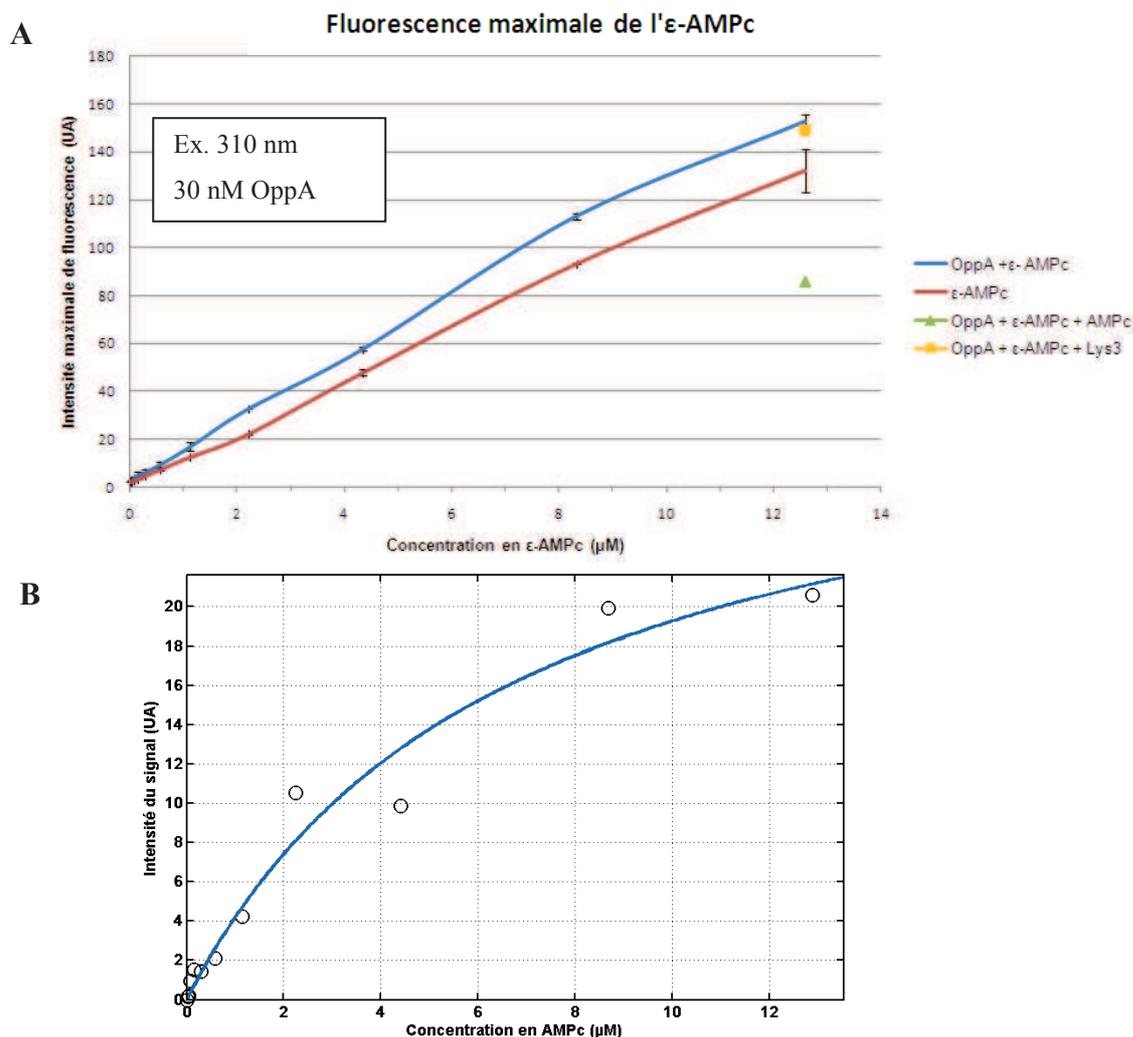


Figure V-24 : Comparaison de la fluorescence émise par l' ϵ -AMPc en présence et en absence d'OppA.

La fluorescence émise par une quantité croissante d' ϵ -AMPc est mesurée en présence ou en absence de 30 nM d'OppA. L'intensité maximale de chacun des spectres est reportée sur ce graphique en fonction de la concentration en ϵ -AMPc (A). Le volume initial est de 100 μ L, l' ϵ -AMPc est ajouté sous un volume de 2 μ L à chaque mesure. 10 μ M d'AMPc ou 50 μ M de Lys3 sont ajoutés en fin d'expérience. L'excitation se fait à 310 nm, le gain est médium. La différence d'intensités entre ϵ -AMPc et ϵ -AMPc en présence d'OppA est reportée en fonction de la concentration en ϵ -AMPc présent dans le milieu. Une courbe de liaison est ajustée à ces valeurs et donne un K_d apparent de 6,6 μ M (B). La moyenne et les écartypes sont réalisées sur deux expériences indépendantes.

De façon très intéressante, nous observons une augmentation de la fluorescence émise par l' ϵ -AMPc lorsque la protéine OppA est présente dans la solution. De plus, cette différence s'accroît avec la concentration en ϵ -AMPc. Il semble donc qu'il y ait bien une interaction entre la molécule d' ϵ -AMPc et la protéine OppA. Un autre point qui retient tout notre attention est le fait que la fluorescence émise diminue lorsque de l'AMPc est ajouté dans la solution, ce qui est en accord avec notre hypothèse selon laquelle celui-ci libère l' ϵ -AMPc d'OppA qui émet alors une fluorescence plus faible. Ces résultats semblent aller

dans le sens d'une interaction entre la protéine OppA et la molécule d'AMPc. Par contre, ce qui est surprenant c'est que cette fluorescence soit plus faible que celle observée lorsque l' ϵ -AMPc est seul. En effet, la logique voudrait que, une fois libérée du contrôle de la protéine, la molécule émette autant de fluorescence que lorsqu'elle se trouve seule. Or ce n'est pas le cas puisque 12,6 μ M d' ϵ -AMPc émette une fluorescence de 130 UA alors que ces mêmes 12,6 μ M d' ϵ -AMPc en présence de 61 nM d'OppA et 10 μ M d'AMPc n'émettent plus qu'une fluorescence de 85 UA. L'hypothèse évoquée pour expliquer ce résultat est un phénomène de « quenching » entre les deux molécules d'AMPc. Afin de vérifier cela, la lumière émise par l' ϵ -AMPc en présence d'une concentration croissante d'AMPc a été mesurée (figure V-25).

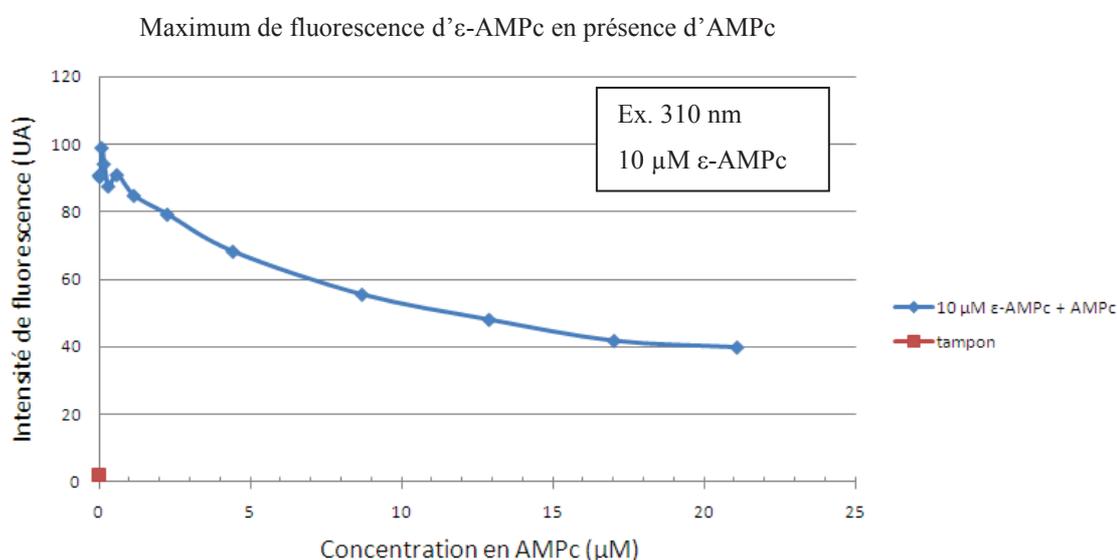


Figure V-25 : Fluorescence d' ϵ -AMPc en présence d'AMPc.

La fluorescence émise par ϵ -AMPc est mesurée en présence d'une concentration croissante d'AMPc. L'intensité maximale de chacun des spectres est reportée sur ce graphique en fonction de la concentration en AMPc. Le volume initial est de 100 μ L, le volume d'AMPc ajouté à chaque mesure est de 2 μ L. L'excitation se fait à 310 nm et le gain est medium.

Comme l'indique le graphique présenté en figure V-25, la présence d'AMPc induit une diminution de la fluorescence de l' ϵ -AMPc. Ce phénomène est encore plus important lorsque le mélange est excité à une longueur d'onde de 275 nm et non pas 310 nm (résultats non montrés). En effet, la fluorescence passe alors de 200 UA à 0 UA lorsque la concentration en AMPc passe de 0 à seulement 1,15 μ M. Ce phénomène peut expliquer la diminution de la fluorescence observée lors de l'expérience de compétition (figure V-23).

A cause de ce « quenching », l'AMPc ne semble pas être idéal comme compétiteur de l' ϵ -AMPc. Nous nous sommes donc intéressés à la trilyisine, peptide connu pour se fixer sur la protéine OppA avec un K_d de 1,96 μM (Sleigh et al. 1997). Notre premier choix ne s'était pas porté sur cette molécule parce que le site d'interaction entre l'AMPc et OppA n'a pas été caractérisé. Nous ne sommes donc pas sûrs de l'efficacité de ce tripeptide pour induire une libération de l' ϵ -AMPc. Nous avons néanmoins tenu à tester son effet lors d'une compétition.

Pour s'assurer que la trilyisine n'influence pas la fluorescence de l' ϵ -AMPc comme le fait l'AMPc, la lumière émise par l' ϵ -AMPc a été mesurée en présence d'une concentration croissante de trilyisine (figure V-26).

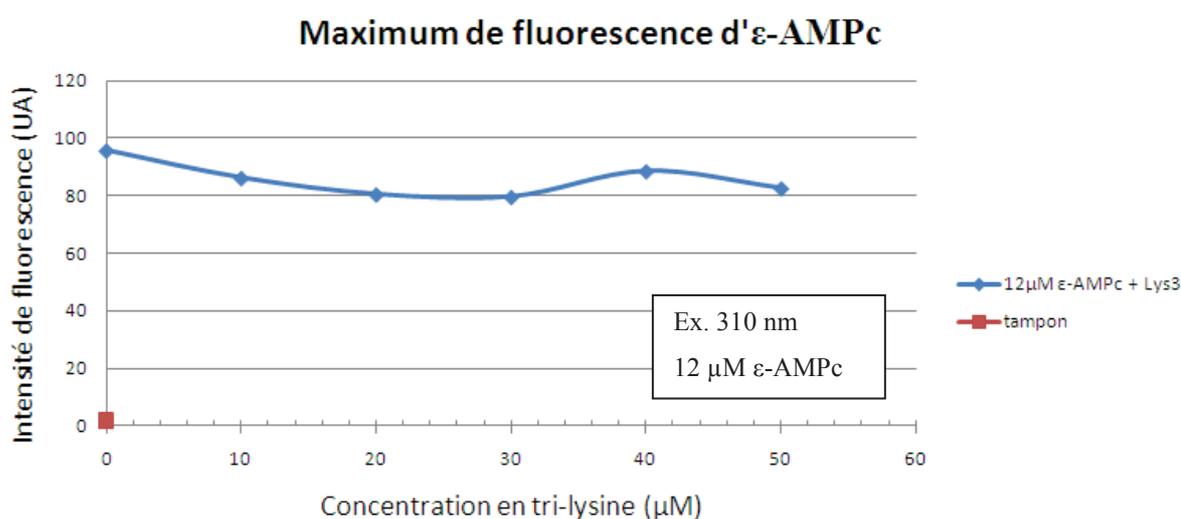


Figure V-26 : Fluorescence d' ϵ -AMPc en présence de trilyisine.

La fluorescence émise par ϵ -AMPc est mesurée en présence d'une concentration croissante de trilyisine. Les maxima de chacun des spectres sont reportés sur ce graphique en fonction de la concentration en trilyisine. Le volume initial est de 100 μL , le volume de trilyisine ajouté à chaque mesure est de 2 μL . L'excitation se fait à 310 nm et le gain est médium.

Nous pouvons constater que la fluorescence de l' ϵ -AMPc n'est que très faiblement modifiée par la présence de trilyisine. Il semblerait donc que le tripeptide puisse être utilisé comme compétiteur de l' ϵ -AMPc. Ceci mis en parallèle avec le fait que la présence de trilyisine ne permet pas une diminution de la fluorescence émise par l' ϵ -AMPc en présence d'OppA (figure V-24) suggère que ces deux molécules ont des sites de fixation différents sur la protéine OppA (à l'opposé de ce qui est supposé dans la section V.2.2).

Suite à ces résultats, de nouvelles modifications sont apportées au tampon utilisé lors de ces mesures. En effet, une très forte concentration en sel (300 mM NaCl) est susceptible d'inhiber la formation de ponts salins entre la molécule d'AMPc et la protéine OppA et donc d'influencer les mesures de fluorescence. La teneur en NaCl du tampon est donc divisée par 6 afin de permettre une meilleure interaction dans le cas où elle mettrait en jeu des ponts salins. Dans ce nouveau tampon, le glycérol a été éliminé puisque celui-ci n'apporte rien aux mesures à part, éventuellement, des liaisons non spécifiques avec les autres constituants de l'échantillon. Ce nouveau tampon est donc constitué de 20 mM de Tris-HCl pH8 et 50 mM de NaCl.

V.3.2.b Titration de l'AMPc par la protéine OppA

Toujours dans l'idée de mettre au point un protocole nous permettant de démontrer de façon formelle l'interaction entre OppA et l'AMPc, nous décidons de rechercher une modification de la fluorescence émise par la protéine elle-même. Nous partons du principe que si l'AMPc est fixé à la protéine, alors celle-ci émettra une fluorescence qui sera différente de celle émise par la protéine libre. Pour cela, les échantillons sont excités à 290 nm et non plus à 310 nm. La lumière émise par la protéine est mesurée dans un premier temps lorsque celle-ci est seule (figure V-27). Le gain du spectrofluorimètre est augmenté afin de pouvoir détecter une faible fluorescence.

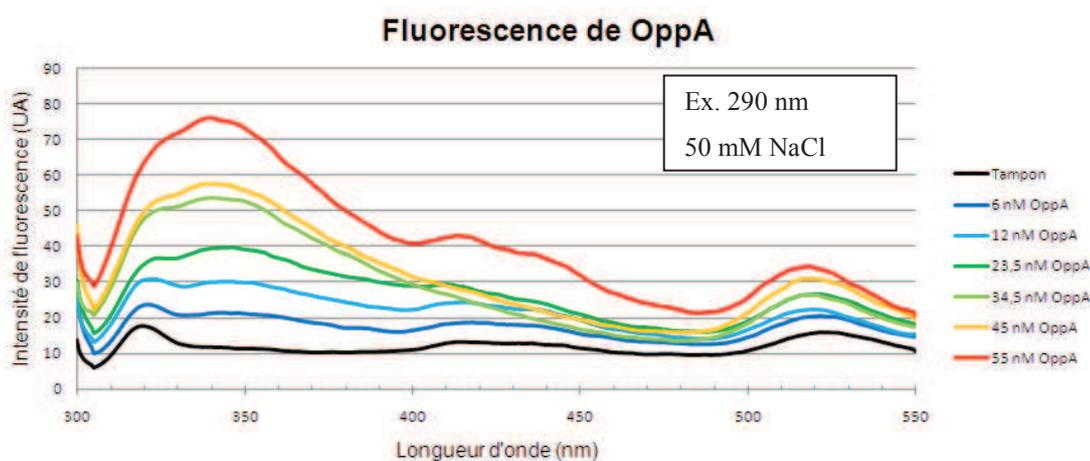


Figure V-27 : Fluorescence d'OppA.

La fluorescence d'OppA est mesurée lorsque sa concentration augmente. Le volume initial est de 100 μ L, le volume ajouté à chaque mesure est de 2 μ L. L'excitation se fait à 290 nm.

Nous pouvons observer un pic de fluorescence à 340 nm ce qui correspond à la fluorescence attendue des tryptophanes contenus dans les protéines. Le pic à 520 nm que nous observons apparaissait déjà lors de précédentes expériences (données non montrées). Ces nouveaux résultats suggèrent que le tampon dans lequel se trouve la protéine est peut-être à l'origine de ce pic de fluorescence observée à 520 nm.

Constatant que nous avons bien une augmentation de la fluorescence lorsque la concentration d'OppA augmente, nous avons voulu savoir si cette évolution était modifiée par la présence d'AMPc. Pour cela, la fluorescence a été mesurée après ajout de 12 μM d'AMPc (figure V-28).

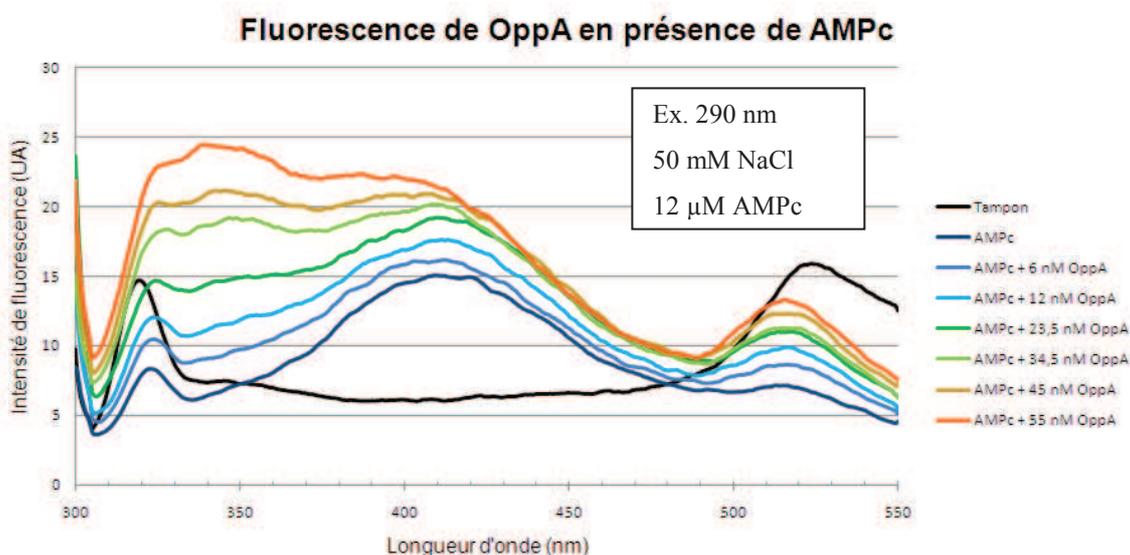


Figure V-28 : Fluorescence d'OppA en présence de 12 μM d'AMPc.

La fluorescence de concentration croissante d'OppA est mesurée en présence de 12 μM d'AMPc. Le volume initial est de 100 μL , le volume ajouté à chaque mesure est de 2 μL . La longueur d'onde d'excitation est 290 nm.

Il est évident que la fluorescence est modifiée par l'ajout d'AMPc. En effet, l'addition d'AMPc fait passer le maximum de fluorescence de 80 UA (figure V-27) à 25 UA (figure V-28) pour une concentration de 55 nM d'OppA. Ces résultats vont donc également dans le sens d'une interaction entre OppA et l'AMPc. Par contre, les spectres d'émission sont plus difficiles à analyser que ceux obtenus après une excitation à 310 nm puisque nous obtenons plusieurs pics d'émission (320 nm, 340 nm, 430 nm, et 520 nm). Il est donc plus ardu de reporter les maxima obtenus en fonction des concentrations en OppA utilisé. Néanmoins, l'intensité à 340 nm est intéressante puisqu'elle correspond au pic de fluorescence le plus important d'une part et que cette longueur d'onde correspond aux tryptophanes d'autre part.

Les valeurs de fluorescence atteintes à 340 nm avec (figure V-28) ou sans AMPc (figure V-27) sont donc reportées en fonction de la concentration protéique présente dans les échantillons (figure V-29).

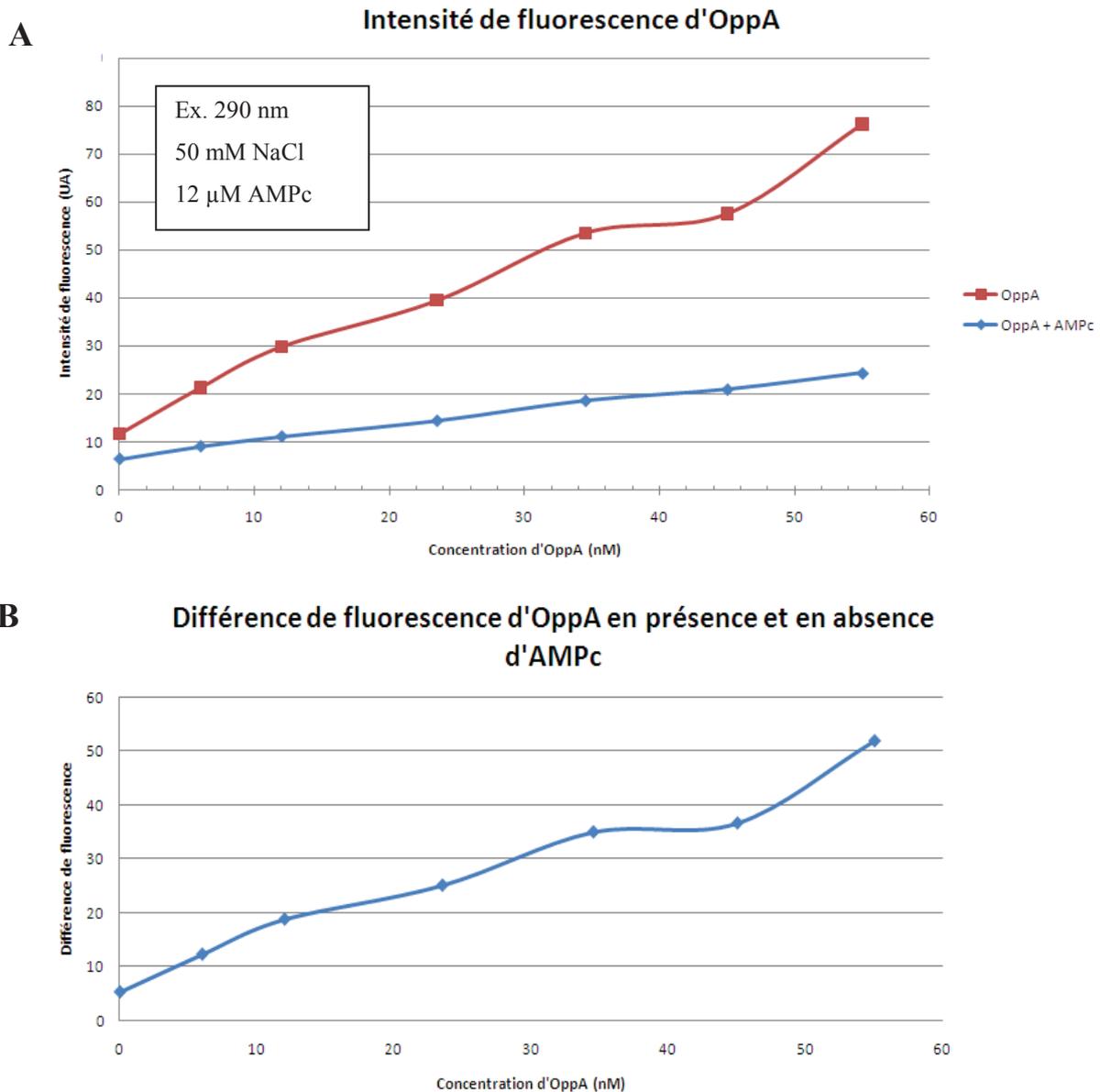


Figure V-29 : Différence de fluorescence d'OppA en présence et en absence d'AMPc.

Les intensités de fluorescence à 340 nm mesurées lors des expériences présentées en figure IV-37 et IV-38 sont reportées en fonction de la concentration en OppA (A). La différence entre les intensités obtenues en présence ou en absence d'AMPc est reportée en fonction de la concentration en OppA (B)

Une nouvelle fois, ces résultats montrent une modification de la fluorescence émise par la protéine OppA lorsque de l'AMPc est ajouté aux échantillons. Cette différence augmente avec la concentration en OppA, ce qui est compatible avec une interaction entre la protéine OppA et la molécule d'AMPc.

V.3.2.c Interaction en condition équimolaire

Nous avons dans un premier temps voulu évaluer l'affinité de l'AMPc pour la protéine OppA. Pour cela, il nous fallait obtenir une courbe de liaison avec une large gamme de substrat. Cependant, devant la complexité des résultats obtenus, nous décidons de nous rapprocher des conditions expérimentales décrites dans les articles faisant mention de l' ϵ -AMPc. Pour cela, nous utilisons la protéine et la molécule dans un ratio proche de 1:1. En effet, le large excès de l' ϵ -AMPc par rapport à OppA utilisé jusqu'à présent peut expliquer la difficulté à voir de façon reproductible le changement de fluorescence de la molécule. Nous avons également décidé d'essayer différents tampons afin de tester l'effet du pH et de la concentration en NaCl sur l'interaction entre OppA et l'AMPc. La faible concentration en NaCl induisant une diminution de la concentration osmotique, du glucose a été ajouté afin d'augmenter celle-ci de façon à ne pas perturber les interactions entre protéines et molécules. Six tampons ont été utilisés :

Tampon 1 : 20 mM Tris HCl pH8 50 mM NaCl 200 mM glucose	Tampon 2 : 20 mM Tris HCl pH8 150 mM NaCl	Tampon 3 : 20 mM Tris HCl pH7 50 mM NaCl 200 mM glucose
Tampon 4 : 20 mM Tris HCl pH7 150 mM NaCl	Tampon 5 : 20 mM Tris HCl pH6 50 mM NaCl 200 mM glucose	Tampon 6 : 20 mM Tris HCl pH6 150 mM NaCl

Pour chacun de ces tampons, quatre mesures sont réalisées : l'émission de fluorescence

- du tampon
- de 100nM d' ϵ -AMPc,
- de 100nM d' ϵ -AMPc + 97nM d'OppA
- de 100nM d' ϵ -AMPc + 97nM d'OppA + 1 μ M d'AMPc

Les résultats obtenus avec les différents tampons sont semblables entre eux et seuls ceux obtenus avec le tampon 1 sont montrés ici (figure V-30).

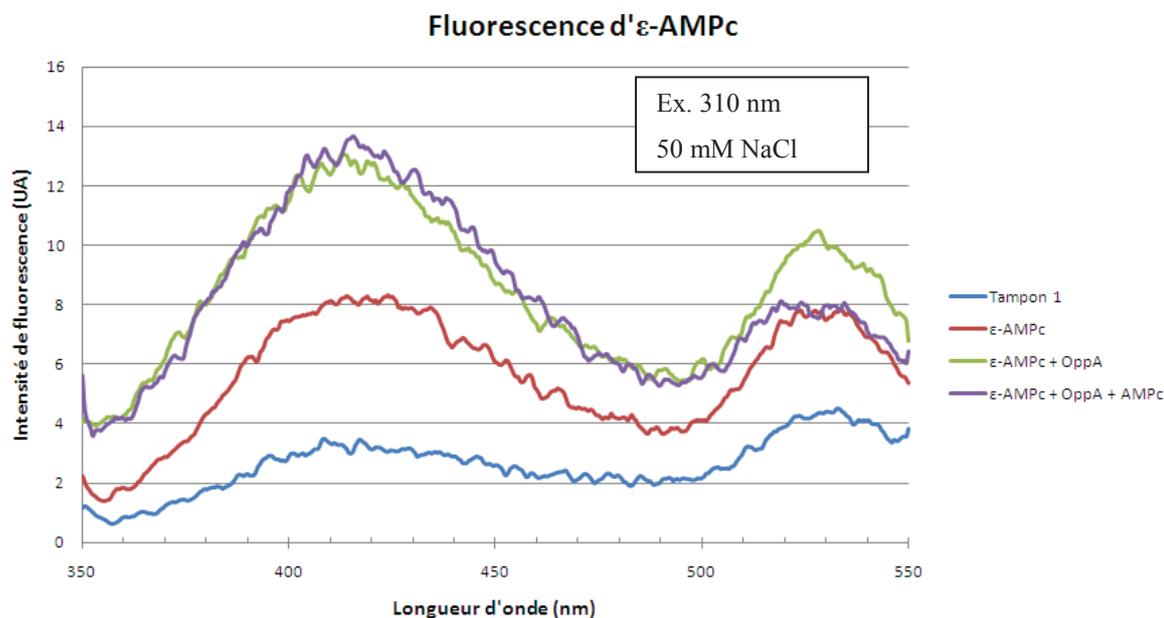


Figure V-30 : Modification de la fluorescence par ajout d'OppA.

La fluorescence émise par 100 nM d' ϵ -AMPc est mesurée avant et après ajout de 97 nM d'OppA. 1 μ M d'AMPc est ajouté en fin d'expérience. Le volume initial est de 100 μ L. L'excitation se fait à 310 nm.

Nous pouvons observer une augmentation de plus de 50% de la fluorescence d' ϵ -AMPc lorsque la protéine OppA est ajoutée à l'échantillon. Ce qui va encore une fois dans le sens d'une interaction entre OppA et l'AMPc. La fluorescence est bien plus faible que précédemment puisque la concentration d' ϵ -AMPc utilisée est entre 10 et 100 fois plus petite. Effectivement, souhaitant avoir un ratio proche de 1:1 entre la protéine et l'AMPc, nous n'avons pas pu utiliser une concentration en ϵ -AMPc plus élevée par manque de matériel protéique. Néanmoins, nous observons très clairement une augmentation du signal après ajout d'OppA et ce, quel que soit le tampon utilisé. Par contre, malgré un excès de 10 fois en AMPc, nous n'observons pas un retour de la fluorescence à son niveau basal pour le pic à 420 nm. Par contre, une telle diminution est visible sur le pic à 520 nm. Nous n'avons pas d'explication à ce phénomène surtout si on considère que l'AMPc induit une diminution de la fluorescence d' ϵ -AMPc (figure V-25).

Les preuves allant dans le sens d'une interaction entre la protéine OppA et la molécule d'AMPc s'accumulent malgré le fait que nous n'avons pas encore réussi à mettre

au point un protocole permettant de le démontrer clairement. Cependant, certains résultats inattendus peuvent être expliqués par le fait que la protéine a été purifiée à partir d'une culture réalisée en milieu riche. Or le milieu riche contient des substrats susceptibles d'être fixés par OppA. Nous ne pouvons donc pas assurer que la protéine utilisée au cours de ces expériences est bien libre. Etant à cours de matériel protéique, je réalise une nouvelle purification à partir du clone ASKA. Cette fois-ci j'utilise des cultures faites en milieu minimum complémenté en glucose afin d'éliminer ce risque. Mise à part le milieu de culture, le protocole de purification reste le même. Néanmoins, l'utilisation d'un milieu pauvre induit une très forte diminution du taux de croissance de la souche et les temps d'incubation sont plus longs (cf section Matériels et Méthodes).

V.3.2.d Nouvelle purification de la protéine OppA

De nouvelles expériences ont pu être réalisées à partir de cette seconde purification d'OppA. Voyant que si nous voulions respecter une stoechiométrie de 1:1 pour la protéine et l'AMPc, nous avions un signal trop faible de la part d' ϵ -AMPc, nous avons décidé d'étudier à nouveau la fluorescence émise par la protéine elle-même. Afin de valider cette stratégie, la fluorescence d'OppA a été mesurée en présence de la trilyisine, ligand spécifique de la protéine OppA, en concentration croissante. Dans le but de faciliter l'analyse des résultats, la concentration protéique utilisée a été augmentée à 300 nM pour avoir un signal plus important (figure V-31).

Une diminution de près de 50% de l'intensité de fluorescence est visible dès les premières concentrations de trilyisine ajoutées avant une stabilisation du signal. Ce profil d'évolution est caractéristique d'une courbe d'interaction entre deux éléments, tel qu'on peut l'attendre de la trilyisine et de la protéine OppA. Notre stratégie de suivi de la fluorescence de la protéine semble donc être tout à fait adaptée à notre étude. Nous avons donc par la suite analysé l'évolution de la fluorescence d'OppA en présence d'AMPc dans les mêmes conditions expérimentales (figure V-32).

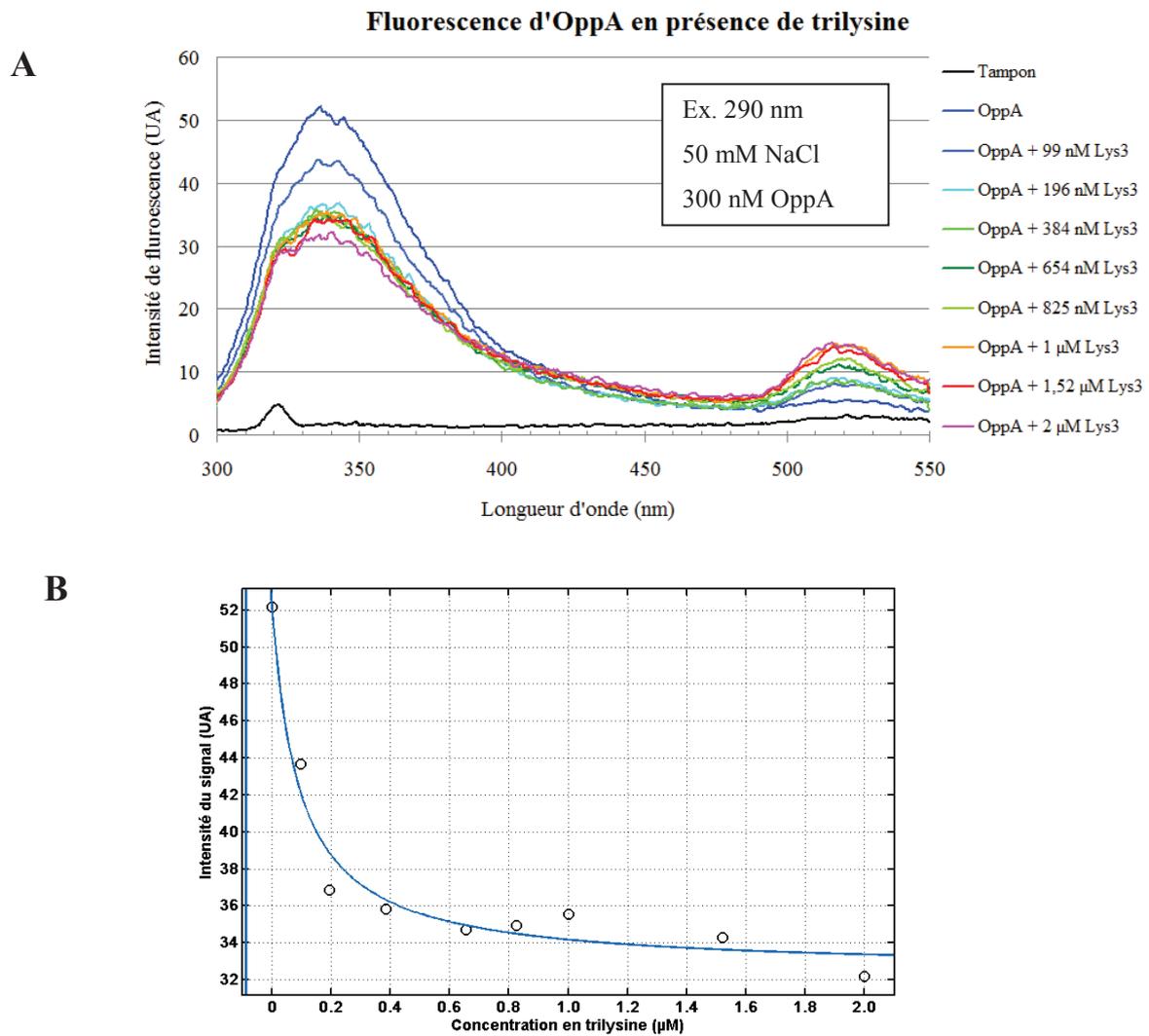


Figure V-31 : Fluorescence d'OppA en présence de trilyisine.

300 nM d'OppA sont mélangés avec une concentration croissante de trilyisine. Le volume initial est de 100 µL. La trilyisine est ajoutée par volume de 2 µL. La fluorescence est mesurée après excitation à 290 nm (A). L'intensité maximale de chaque spectre d'émission est reportée sur un graphique en fonction de la concentration en trilyisine. Une courbe de liaison est ajustée à ces valeurs et donne un K_d apparent de 0,1 µM (B).

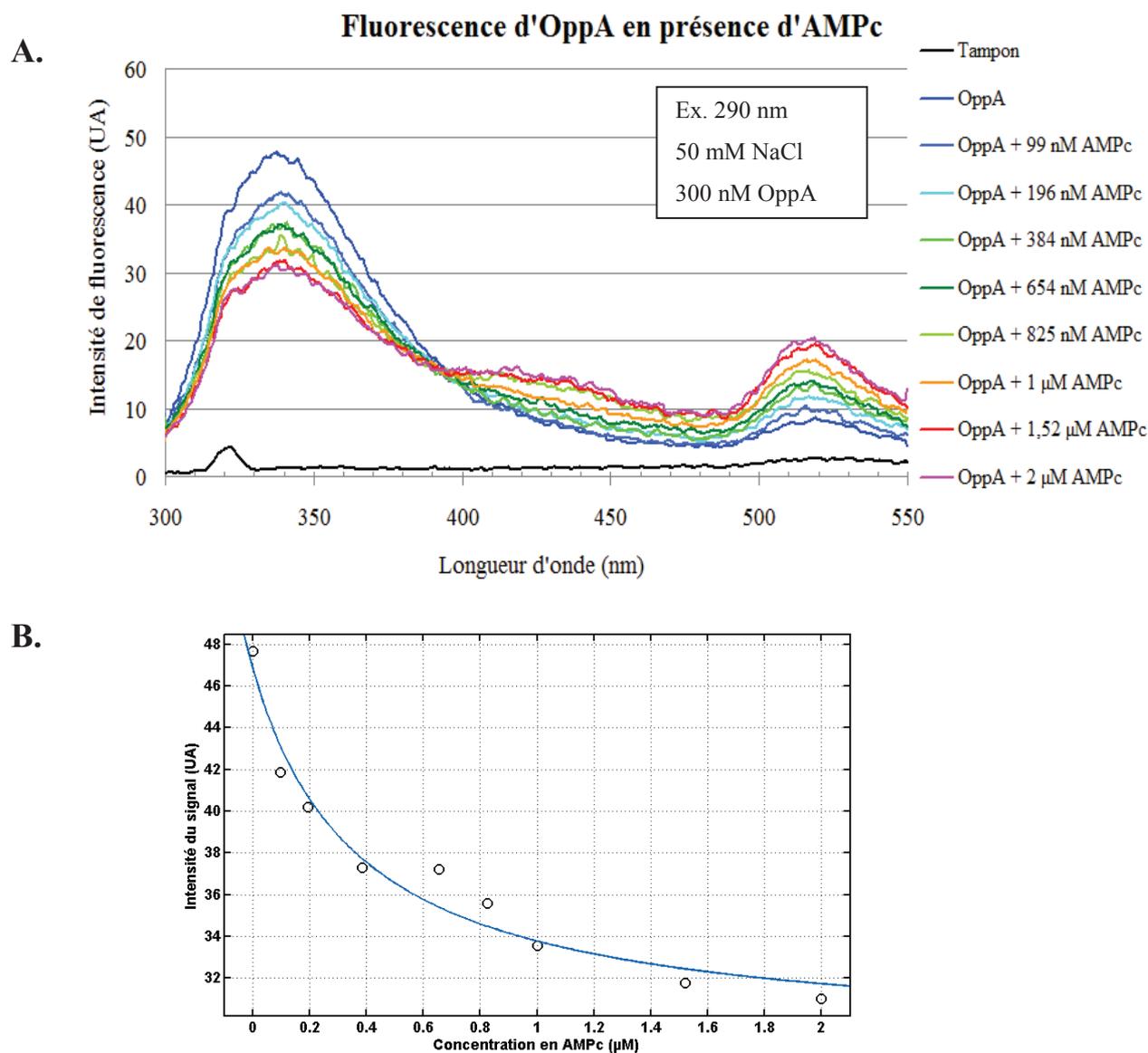


Figure V-32 : Fluorescence d'OppA en présence d'AMPc.

300 nM d'OppA sont mélangés avec une concentration croissante d'AMPc. Le volume initial est de 100 μ L. L'AMPc est ajoutée par volume de 2 μ L. La fluorescence est mesurée après excitation à 290 nm (A). L'intensité maximale de chaque spectre d'émission est reportée sur un graphique en fonction de la concentration en AMPc. Une courbe de liaison est ajustée à ces valeurs et donne un K_d apparent de 0,4 μ M (B).

Il est tout à fait remarquable d'observer une évolution de l'intensité de fluorescence d'OppA semblable à celle observée en présence d'un ligand connu de la protéine. L'ajout d'AMPc dans l'échantillon induit une diminution de la fluorescence de quasiment 20 UA c'est-à-dire une diminution de près de 37 %.

Afin de s'assurer que cette évolution de l'intensité de fluorescence est spécifique à l'interaction de l'AMPc sur OppA, la même expérience est réalisée avec de l'albumine

bovine (Bovine Serum Albumin, BSA). Cette protéine, utilisée classiquement dans diverses techniques biochimiques telles que le dosage protéique, possède deux résidus tryptophanes susceptibles d'émettre de la fluorescence après excitation à 290 nm. Aucune interaction entre cette protéine et l'AMPc n'a été démontrée jusqu'à présent ce qui va nous permettre de l'utiliser comme contrôle négatif. Le principe reste identique : 300 nM de protéine sont mis dans un volume de 100 μ L et de l'AMPc est ajouté en concentration croissante (figure V-33).

Modification de la fluorescence de la BSA en présence d'AMPc

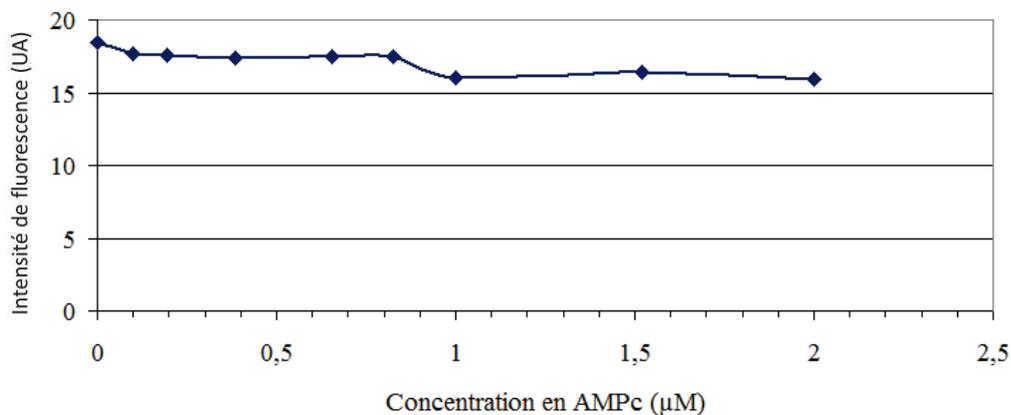


Figure V-33 : Modification de la fluorescence de la BSA en présence d'AMPc.

300 nM de BSA sont mélangés avec une concentration croissante d'AMPc. Un spectre de fluorescence est mesuré pour chacune des concentrations après excitation de l'échantillon à 290 nm. Le volume initial est de 100 μ L. L'intensité maximale de chacun de ces spectres est reportée sur ce graphique en fonction de la concentration en AMPc présente dans l'échantillon.

La diminution de la fluorescence émise par la BSA en présence d'AMPc est bien plus faible que celle observée pour la protéine OppA. En effet, la fluorescence passe de 18 à 16 UA ce qui correspond à 10 % soit plus de trois fois moins que la diminution de la fluorescence émise par OppA.

Tous ces éléments réunis nous permettent d'appuyer notre hypothèse selon laquelle il y a bien interaction entre la protéine OppA et la molécule d'AMPc. Il est bien évident que de nouveaux contrôles sont nécessaires afin de confirmer ces derniers résultats mais par manque de temps, ils n'ont pas encore pu être réalisés.

Dans certaines expériences, une courbe de liaison a pu être ajustée aux valeurs obtenues. Les K_d ont ainsi pu être estimés. En ce qui concerne la constante de dissociation de la trilycine, un K_d apparent de $0,1 \mu\text{M}$ a été mesuré (figure V-31) alors que les valeurs obtenus dans d'autres études sont de l'ordre du micromolaire ($1,96 \mu\text{M}$ (Sleigh et al. 1997) et $2,9 \mu\text{M}$ (Davies et al. 1999)). Une telle différence n'a pas pu être expliquée. Dans le cas de l'AMPc, le K_d apparent est différent selon que la molécule est fluorescente ou non : le K_d de l' ϵ -AMPc est de $6,6 \mu\text{M}$ (figure V-24) alors qu'il est de $0,4 \mu\text{M}$ pour l'AMPc (figure V-32). Cette différence s'explique par le fait que les molécules étudiées ne sont pas les mêmes et qu'elles peuvent avoir une affinité différente pour une même protéine comme le suggère l'étude de Secrist et ses collègues (Secrist et al. 1972).

V.4 *Pour aller plus loin*

Nous avons pu remarquer que le double mutant *cyaA⁻oppA⁻* émet un peu de luminescence en présence d'AMPc (2 000 UA), même si l'intensité est quatre fois plus faible que pour un simple mutant *cyaA⁻* (figure V-14). Dans ces conditions, il semble évident qu'il existe un, voire plusieurs autres transporteurs impliqués dans l'import d'AMPc puisqu'il est très peu probable que cette molécule puisse traverser la membrane seule. J'ai donc réalisé quelques expériences afin de tenter d'identifier une autre protéine candidate à l'import d'AMPc. En parallèle à cela, j'ai également testé quelques hypothèses concernant l'export de l'AMPc. Ce dernier chapitre rassemble ces expériences.

V.4.1 La protéine TolC

Hantke et ses collègues ont démontré en 2011 le rôle joué par la protéine TolC dans l'export d'AMPc (Hantke et al. 2011) en invalidant le gène correspond chez *Escherichia coli*. Leurs expériences s'appuient principalement sur l'activité de la bêta-galactosidase, enzyme dont la transcription du gène est dépendante de la présence de l'IPTG mais également de celle du complexe CRP-AMPc. Leur stratégie est basée sur le fait que, pour une concentration d'IPTG identique, une souche incapable d'exporter l'AMPc aura une concentration intracellulaire en AMPc plus forte et donc une activité bêta-galactosidase plus élevée qu'une souche sauvage. Leur hypothèse est confirmée par un test de croissance sur maltose pour laquelle une souche *cyaA⁻* nécessite un apport d'AMPc plus important qu'une souche *cyaA⁻tolC⁻*.

Connaissant ces résultats, j'ai voulu à mon tour faire quelques tests concernant l'export de l'AMPc afin de vérifier qu'avec mes conditions expérimentales, nous pouvions arriver aux mêmes conclusions. Pour cela, j'ai travaillé avec une souche *tolC⁻* issue de la banque de Keio et une souche *cyaA⁻tolC⁻* que j'ai produite par transduction selon le protocole décrit dans la section Matériels et Méthodes (la construction a été vérifiée par PCR à l'aide des amorces TolC-5' et TolC3'). Plusieurs expériences ont été réalisées avec ce matériel. J'ai tout d'abord testé la croissance sur maltose de ces différents mutants puisque, comme décrit précédemment, l'utilisation du maltose comme source de carbone par *Escherichia coli* n'est possible qu'en présence d'AMPc dans la cellule. Pour cela, après avoir fait une culture de ces clones ainsi que des souches *cyaA⁻* et sauvage pendant 15 heures, j'ai déposé une goutte de

2 μL de ces cultures sur une boîte de gélose complétement par 0,03% de maltose et diverses concentrations d'AMPc: 0 mM ; 0,25 mM ; 0,5 mM et 1 mM. Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C et la croissance de chacune des souches est analysée (figure V-34).

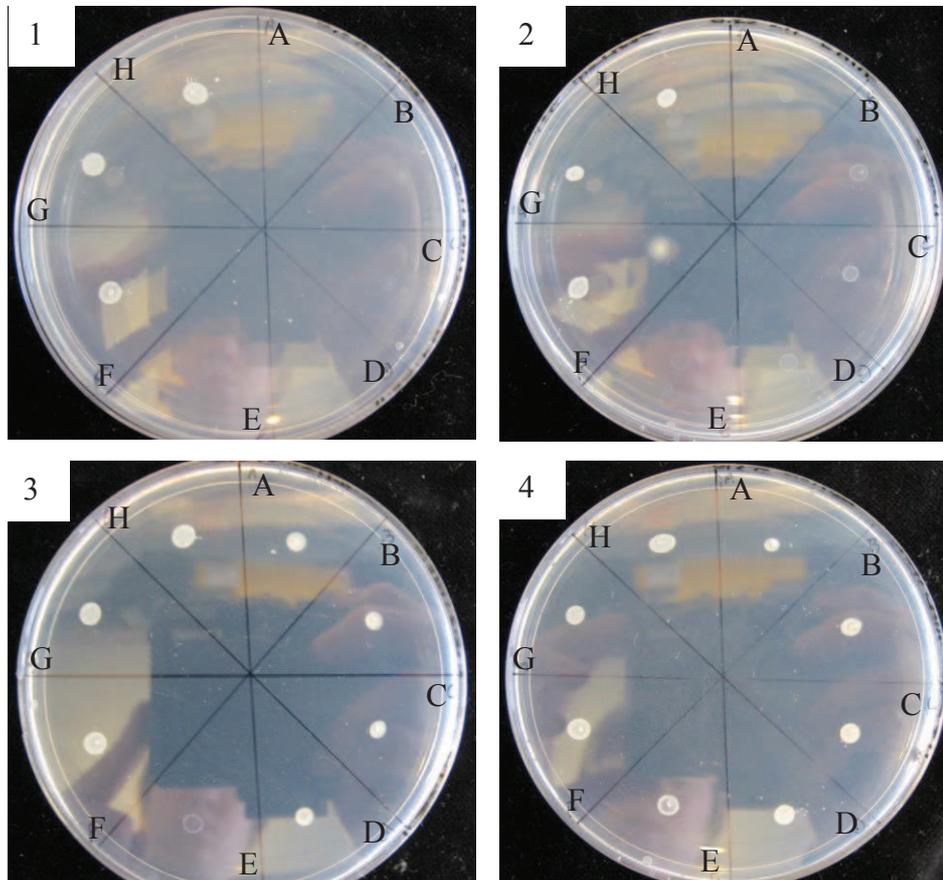


Figure V-34 : Croissance sur maltose du clone *cyaA tolC*.

Quatre clones *cyaA tolC* (section A à D) ; un clone *cyaA* (section E) ; *tolC* (section F) et 2 clones sauvages (section G et H) sont testés. Les souches sont mises en culture la veille dans du milieu riche, à 37°C. 2 μL de ces cultures sont déposés sur des boîtes de gélose complétement avec 0,3% de maltose et 0 mM d'AMPc (1) ; 0,25 mM d'AMPc (2) ; 0,5 mM d'AMPc (3) ou 1 mM d'AMPc (4).

Comme décrit dans l'article de Hantke et ses collègues, les doubles mutants *cyaA tolC* ne poussent pas sur maltose tout comme la souche *cyaA*. Par contre, comme on pouvait s'y attendre, les souches sauvages et *tolC* n'ont aucun souci pour utiliser le maltose comme source d'énergie. L'ajout d'AMPc dans le milieu de culture permet aux souches ne produisant pas d'AMPc de retrouver une croissance semblable à celle des souches sauvages. Nous pouvons constater que les doubles mutants *cyaA tolC* peuvent croître dès 0,25 mM d'AMPc alors que 0,5 mM d'AMPc sont nécessaires à la souche *cyaA* pour retrouver un début de croissance. Ces résultats sont en accord avec un rôle d'export pour la protéine TolC

puisque'en absence d'export, la concentration intracellulaire d'AMPc est plus élevée pour une même quantité d'AMPc dans le milieu comparée à une souche dont le système d'export est intact.

Dans un deuxième temps, les souches *tolC*⁻, *cyaA*⁻, *cyaA*⁻*tolC*⁻ et wt ont été transformées avec le plasmide pSB-acs-luc par la méthode du TSS (cf section Matériels et Méthodes) afin d'étudier leur production de luminescence lors de la croissance (figure V-35).

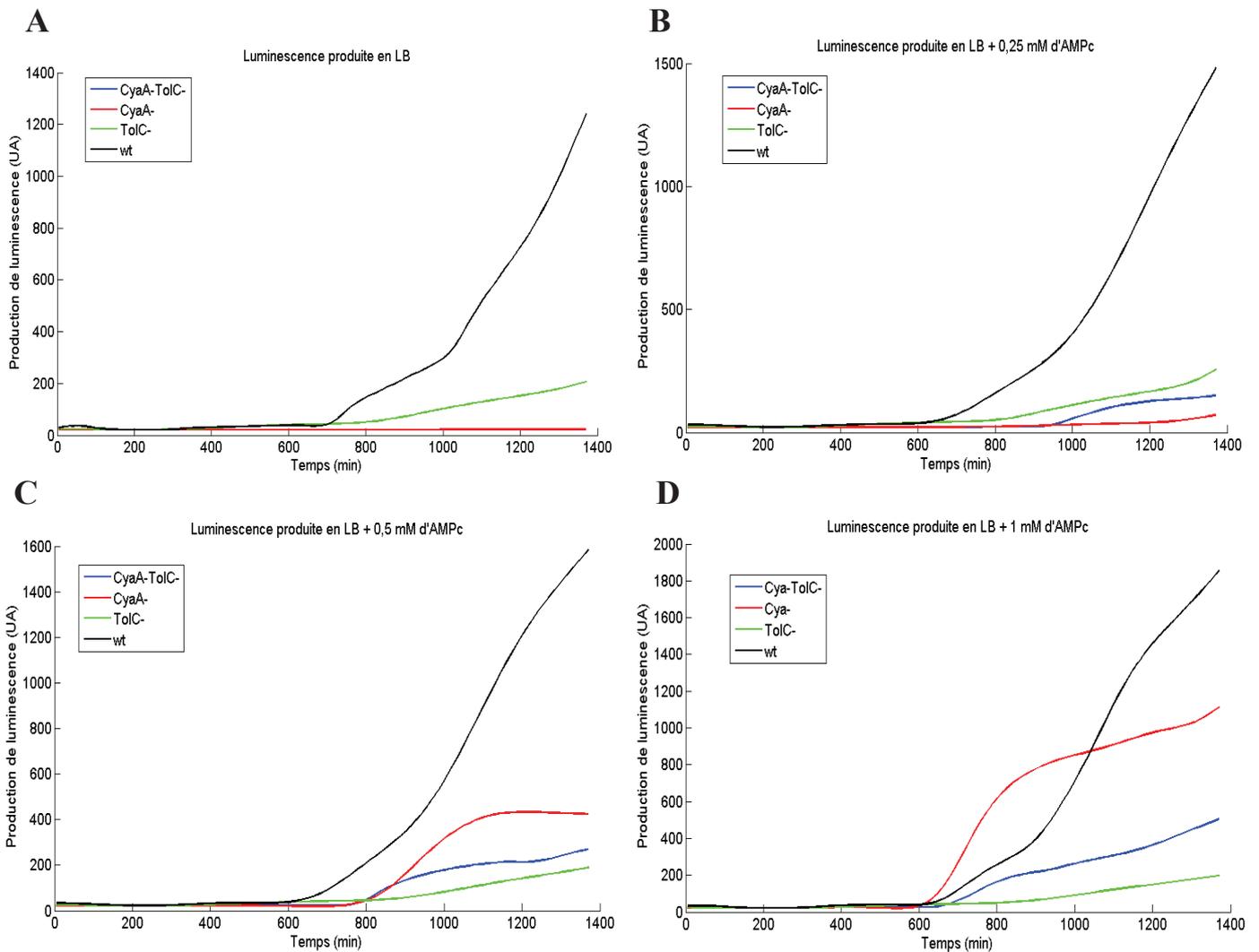


Figure V-35 : Luminescence de la souche *cyaA*⁻*tolC*⁻.

Les souches *tolC*⁻, *cyaA*⁻, *cyaA*⁻*tolC*⁻ et wt sont mises en culture la veille dans du LB à 37°C. Elles sont ensuite diluées 20 fois dans du LB et la production de luminescence est suivie pendant 1400 min. Différentes concentrations d'AMPc sont ajoutées dans le milieu de culture : 0 mM (A) ; 0,25 mM (B) ; 0,5 mM (C) ou 1 mM (D). Les courbes présentées ici sont représentatives de triplicats.

Comme attendu, les souches *cyaA*⁻ et *cyaA*⁻*tolC*⁻ ne produisent pas de lumière en absence d'AMPc (figure V-35A) alors que la souche sauvage et le mutant *tolC*⁻ en produisent. Cependant, le fait que cette souche produise moins de luminescence que la souche sauvage est surprenant si TolC est bien l'exportateur d'AMPc. En effet, dans ces conditions la concentration intracellulaire d'AMPc devrait être plus élevée dans la souche *tolC*⁻ que dans la souche sauvage entraînant une intensité lumineuse plus importante dans la souche *tolC*⁻. Or ce n'est pas ce qui est observé. Les courbes de croissance des différentes souches sont semblables et n'expliquent pas cette luminescence plus faible que prévu. Les résultats obtenus avec 0,25 mM d'AMPc (figure V-35B.) sont en accord avec un rôle d'export pour la protéine TolC puisque le double mutant émet plus de lumière que le simple mutant *cyaA*⁻ ce qui traduit une concentration intracellulaire d'AMPc plus élevée chez le double mutant. Pour une concentration de 0,5 mM (figure V-35C.) ou 1 mM d'AMPc (figure V-35D.), les résultats sont plus surprenants. En effet, le simple mutant *cyaA*⁻ émet plus de lumière que le simple mutant *tolC*⁻ mais également plus de lumière que le double mutant *cyaA*⁻*tolC*⁻. A cette concentration, TolC agit à nouveau comme si, au lieu d'exporter l'AMPc, elle importait l'AMPc ce qui est en totale contradiction avec les résultats obtenus jusqu'à présent ainsi que ceux présentés dans l'article d'Hantke et ses collègues.

V.4.2 Autres importateurs d'AMPc

V.4.2.a NupC et NupG

Comme nous avons pu le voir avec la figure V-14, le double mutant *cyaA*⁻*oppA*⁻ produit un peu de lumière, ce qui signifie qu'une faible quantité d'AMPc entre dans la cellule en absence du complexe Opp. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il existe un autre transporteur. J'ai réalisé plusieurs expériences afin de tester quelques candidats.

Divers molécules sont susceptibles d'être impliquées dans l'import de l'AMPc. C'est le cas de deux transporteurs connus pour les nucléosides : NupC et NupG. Le premier assure le transport des nucléosides hormis la guanosine ou la désoxyguanosine alors que le second assure le transport de tous les nucléosides. J'ai testé leur efficacité pour importer l'AMPc qui est un nucléoside cyclique. Pour cela, j'ai construit les nouveaux doubles mutants *cyaA*⁻

nupC et *cyaA*⁻*nupG*⁻ et j'ai transformé ces souches avec le plasmide pSB-acs-luc afin d'étudier la concentration d'AMPC dans de telles souches (figure V-36).

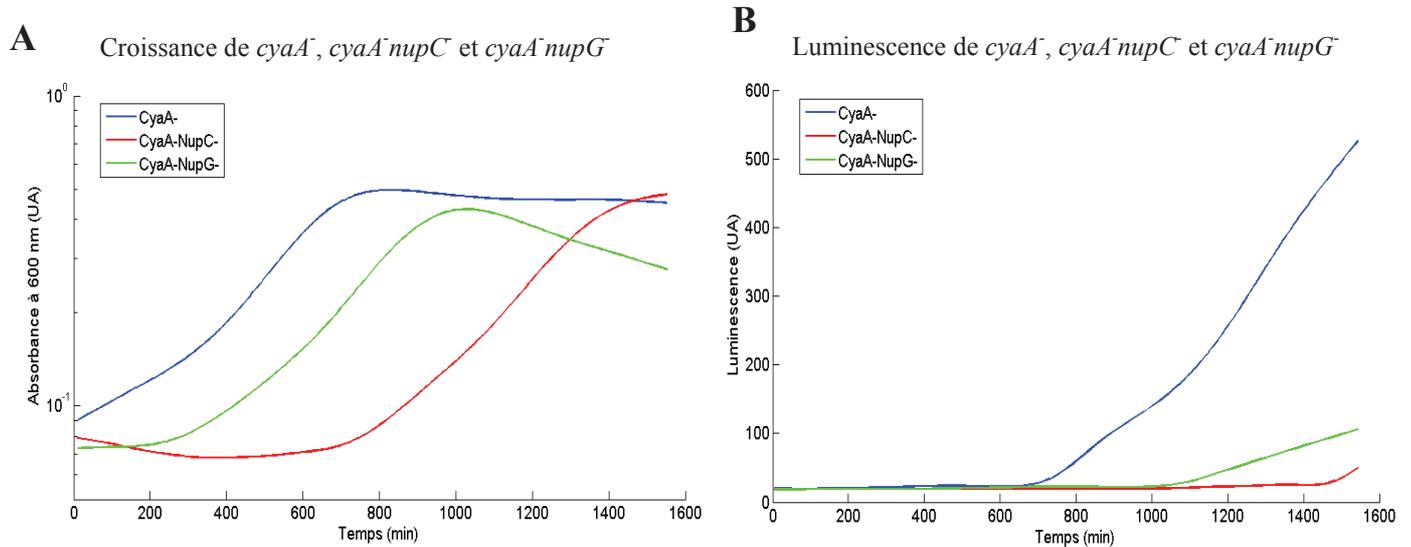


Figure V-36 : Croissance et production de luminescence par les mutants *cyaA*⁻ *nupC*⁻/*G*⁻.

La croissance (A) et la luminescence (B) des souches *cyaA*⁻, *cyaA*⁻*nupC*⁻ et *cyaA*⁻*nupG*⁻ transformées avec le plasmide pSB-acs-luc sont suivies pendant 1 600 minutes en milieu M9 + 0,03% glucose + 1 mM AMPc.

Ces résultats montrent que la production de lumière est bien plus faible chez les doubles mutants comparés à la souche *cyaA*⁻ (figure V-36B). Cependant, il faut mettre ceci en parallèle avec le fait que ces mêmes mutants ont des problèmes de croissance non négligeables (figure V-36A). Alors que la souche *cyaA*⁻ atteint la phase stationnaire de croissance dès 600 minutes, la souche *cyaA*⁻*nupG*⁻ l'atteint seulement à 1 000 minutes et l'absorbance chute immédiatement après. Quant à la souche *cyaA*⁻*nupC*⁻, elle semble atteindre la phase stationnaire à 1 600 minutes. La faible luminescence visible en fin d'expérience est donc toute relative puisque l'entrée en phase stationnaire de ces souches est largement déplacée. Je réalise une nouvelle expérience en augmentant d'un facteur 30 la quantité de bactéries analysées afin d'atteindre plus rapidement la phase stationnaire et permettre ainsi l'étude de la production de luminescence par ces souches (figure V-37).

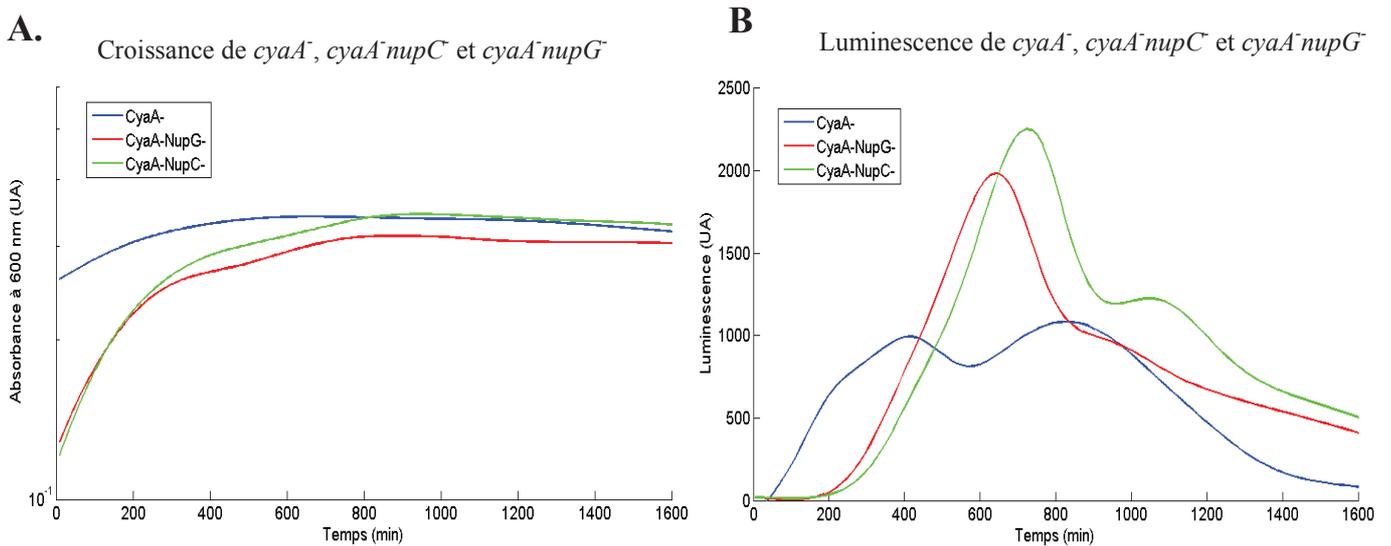


Figure V-37 : Croissance et production de luminescence par les mutants *cyaA nupC/G*.

La croissance (A) et la luminescence (B) des souches *cyaA*⁻, *cyaA nupC*⁻ et *cyaA nupG*⁻ + pSB-acs-luc sont suivies pendant 1 600 minutes en milieu M9 + 0,03% glucose + 1 mM AMPc.

Dans ces nouvelles conditions, on voit très clairement que les doubles mutants *cyaA nupC*⁻ et *cyaA nupG*⁻ émettent plus de luminescence qu'une souche *cyaA*⁻ et sont donc capables d'importer l'AMPc présent dans le milieu. Nous pouvons donc en conclure que les protéines NupC et NupG ne jouent pas un rôle majeur dans l'import de l'AMPc.

V.4.2.b DppA

Une autre protéine pouvant jouer un rôle dans le transport de l'AMPc est DppA. En effet, comme mentionné dans la section I.2.1, Dpp est un système homologue à Opp, spécialisé dans le transport de dipeptides. DppA est la protéine périplasmique qui lie le substrat, tout comme OppA. Connaissant les similitudes entre les deux complexes, nous avons testé l'efficacité des mutants *cyaA dppA*⁻ pour importer l'AMPc (figure V-38).

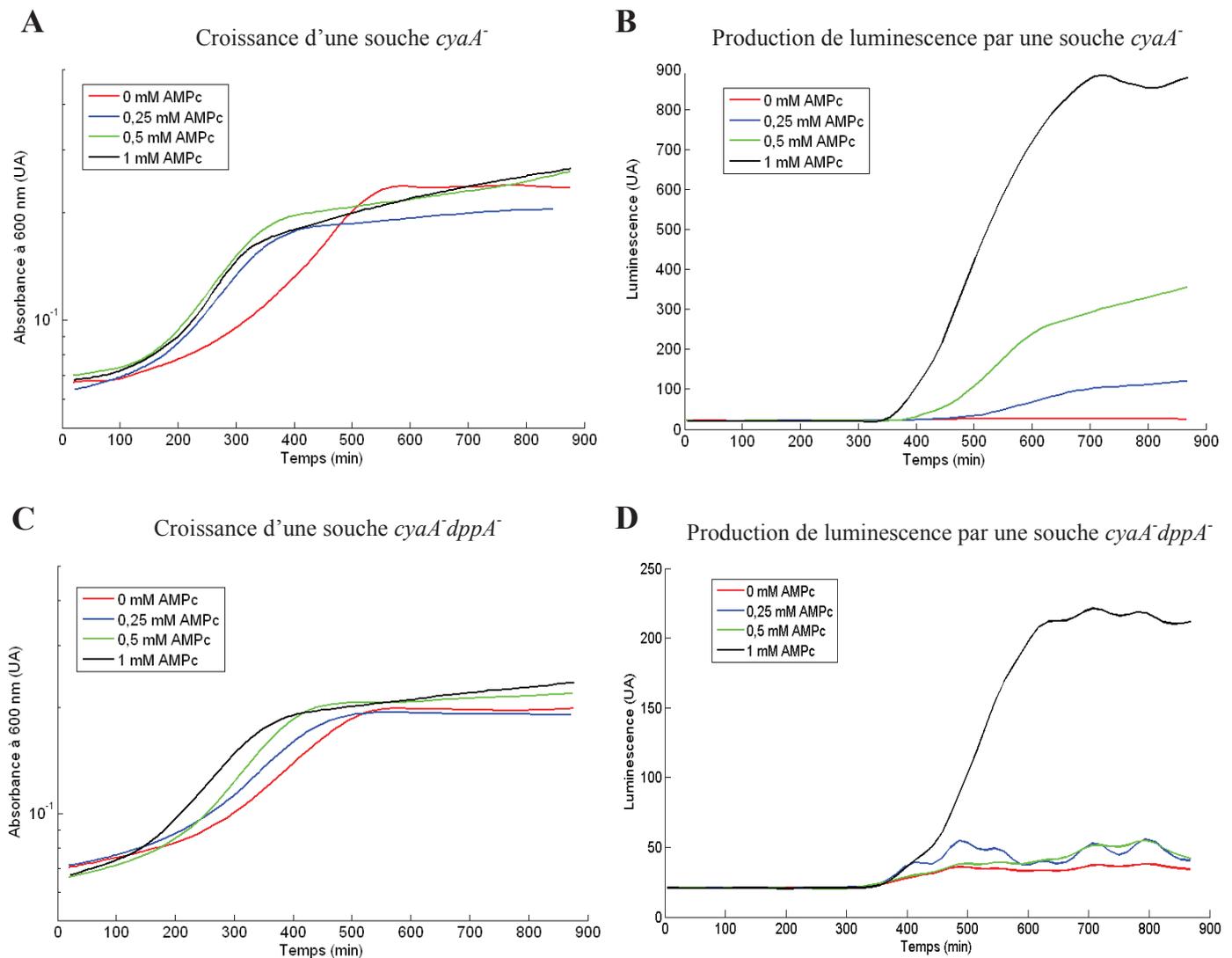


Figure V-38 : Croissance et luminescence du mutant *cyaA dppA*.

La croissance (A et C) et la luminescence (B et D) des souches *cyaA* (A et B) et *cyaA dppA* (C et D) + pSB-acs-luc sont suivies pendant 900 minutes en milieu M9 - 0,03% glucose - 0,03% acétate. La concentration en AMPc varie de 0 à 1 mM.

Les croissances des deux souches sont tout à fait semblables. Comme déjà remarqué au cours d'autres expériences, la présence d'AMPc dans le milieu augmente légèrement le taux de croissance mais l'absorbance finale reste identique quelles que soient les conditions de culture. Ces expériences montrent clairement une forte diminution de la production de luminescence par la souche *cyaA dppA* par rapport à la souche *cyaA*, l'intensité lumineuse passant de 210 UA pour cette dernière à 50 UA dans le double mutant. Ces résultats vont dans le sens d'un rôle de la protéine DppA dans l'import de l'AMPc. Il est donc possible que le système Dpp participe à l'import d'AMPc par *E. coli*.

Au cours de la mise au point d'un protocole de compétition entre AMPc et le tripeptide alanine, nous avons découvert que la présence de trialanine induit une augmentation importante de la fluorescence émise par une souche *cyaA⁻oppA⁻* en présence d'AMPc (figure V-39).

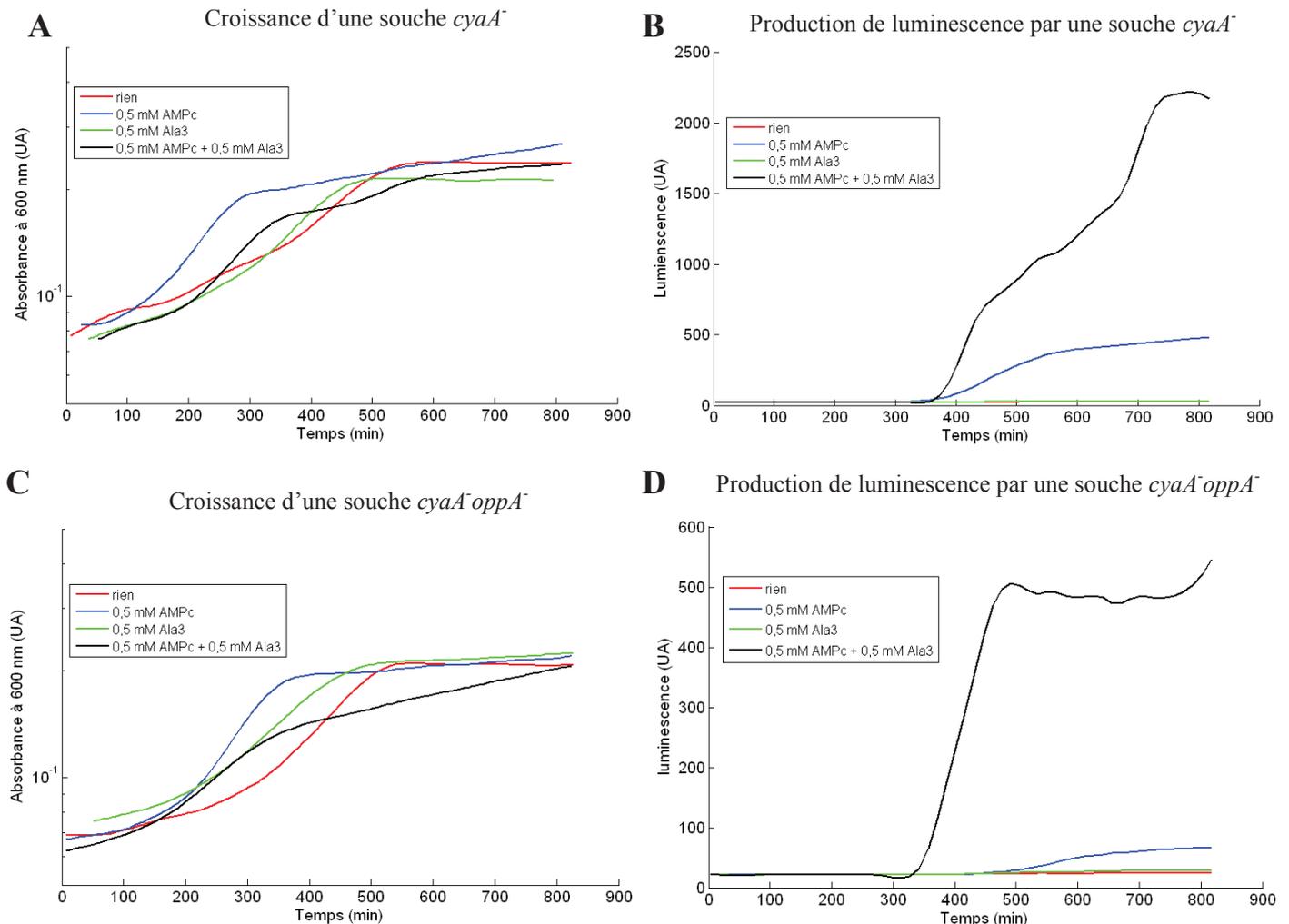


Figure V-39 : Croissance et luminescence du mutant *cyaA⁻oppA⁻* en présence d'AMPc et de trialanine.

La croissance (A et C) et la luminescence (B et D) des souches *cyaA⁻* (A et B) et *cyaA⁻oppA⁻* (C et D) transformées avec le plasmide pSB-acs-luc sont suivies pendant 900 minutes en milieu M9 - 0,03% glucose - 0,03% acétate. De l'AMPc et/ou de la trialanine sont ajoutés à 0,5 mM.

Aucune des deux souches *cyaA⁻* et *cyaA⁻oppA⁻* n'a de problème de croissance et une même absorbance de 0,2 est atteinte quelque soit la souche et les conditions de culture. Comme attendu, les mutants étudiés ne produisent pas de luminescence en absence d'AMPc extracellulaire. En présence de cette molécule, le mutant *cyaA⁻* émet une intensité lumineuse de 2 200 UA. Comme nous l'avons déjà mentionné, la lumière produite par la souche *cyaA⁻*

oppA⁻ dans ces conditions n'est pas nulle mais diminuée d'un facteur 5 comparé au simple mutant *cyaA*⁻. D'autre part, la présence de trialanine dans le milieu de culture n'influence pas l'intensité lumineuse émise par les souches *cyaA*⁻ et *cyaA*⁻*oppA*⁻. Cependant, lorsque le tripeptide se trouve en combinaison avec l'AMPc, la luminescence émise augmente d'un facteur 5 comparé à la présence d'AMPc seul. Ces résultats suggèrent que le(s) transporteur(s) supplémentaire(s) permettant l'import de l'AMPc est (sont) activé(s) par la trialanine.

En partant du principe que ce nouveau transporteur serait du même type qu'Opp, j'ai testé la sensibilité des gènes codant pour une protéine périplasmique d'un transporteur de type ABC. Pour cela, j'ai répertorié les gènes intéressants à partir d'une base de données disponible sur internet (ecocyc) et présents dans la collection de fusions transcriptionnelles (Zaslaver et al. 2006) que possède notre équipe. 22 clones ont ainsi été sélectionnés :

alsB : transporteur du D-allose

araF : transporteur de l'arabinose

cysP : transporteur du sulfate et du thiosulfate

dppA : transporteur de dipeptides

fepB : transporteur de l'enterobactine ferrique

fliY : transporteur de la cystine

glnH : transporteur de la glutamine

hisJ : transporteur de l'histidine

malE : transporteur du maltose

mglB : transporteur du galactose

potF : transporteur de la putrescine

proX : transporteur de la glycine bêtaïne et de la proline

pstS : transporteur du phosphate

sapA : transporteur de peptides

ugpB : transporteur du glycerol-3-phosphate et du glycérol-2-phosphate

xylF : transporteur du xylose

yejA : transporteur de peptides

ytfQ : transporteur du galactofuranose et du galactopyranose

ycdS : protéine périplasmique d'un transporteur prédit pour la spermidine et la putrescine

ygiS : protéine non caractérisée de la famille des transporteurs ABC

yphF : protéine préplasmique d'un transporteur ATP-dépendant prédit pour des sucres

Cette collection de promoteurs permet de suivre l'expression de certains gènes d'*E. coli* en temps réel grâce à la fusion des régions promotrices sur le gène codant pour une protéine GFP (Zaslaver et al. 2006). L'expression de ces 22 protéines a été suivie au cours d'une cinétique de 900 minutes en présence d'AMPc et/ou de trialanine. Les résultats obtenus pour la protéine DppA sont présentés figure V-40, ceux obtenus pour les autres protéines sont présentés en annexe 4.

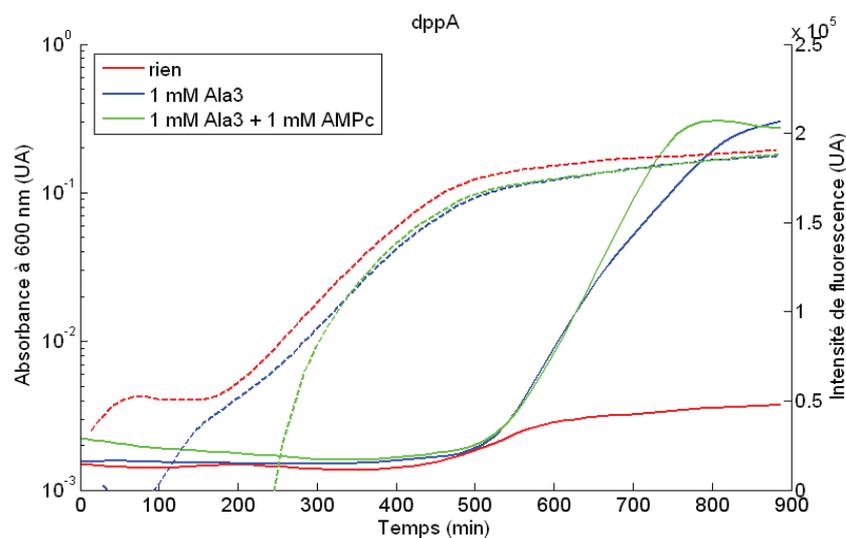


Figure V-40 : Croissance et expression du gène *dppA*.

Le clone *dppA* de la collection Alon est mis en culture pendant 15 heures en milieu minimum complété avec 0,3% de glucose puis dilué 300 fois dans du milieu minimum complété avec 0,03% de glucose en présence ou non de 1 mM de trialanine et 1 mM d'AMPc. La croissance est suivie pendant 900 minutes par lecture de l'absorbance à 600 nm (trait pointillé). La régulation de l'expression du gène *dppA* est suivie par mesure de la fluorescence (trait plein).

Ces résultats montrent que l'ajout de trialanine dans le milieu de culture ne change pas grand-chose pour la majorité des gènes étudiés. Seul un promoteur semble être activé par la présence du tripeptide : *dppA*. Le fait que DppA soit une protéine similaire à OppA, qu'une souche *cyoA⁻dppA⁺+pSB-acs-luc* soit incapable de produire de la lumière en présence d'AMPc et que le promoteur de *dppA* soit sensible à la trialanine nous conduit à émettre l'hypothèse que DppA a de forte probabilité de jouer un rôle non négligeable dans l'import de l'AMPc chez *E. coli*. Il serait donc très intéressant de pousser plus loin l'étude de cette protéine.

VI- Discussion et perspectives

L'AMPc dans le monde vivant

L'AMPc est une molécule très largement répandue qui est présente chez tous les êtres vivants, à l'exception des végétaux. Dans le règne bactérien, celle-ci a de nombreux rôles allant de la croissance sur diverses sources carbonées à la virulence en passant par la compétence et la sporulation. Il est intéressant de noter que la concentration intracellulaire est très variable d'une bactérie à une autre comme le décrit Bai et ses collègues (Bai et al. 2011), allant de 1 000 pmol/mg d'extrait sec pour *Mycobacterium phlei* à seulement 2,5 pmol/mg pour *Mycobacterium smegmatis*. Chez *Escherichia coli*, la concentration intracellulaire varie de 370 à 450 pmol/mg. Cependant, il est difficile de tirer une conclusion sur ces concentrations qui sont issues de diverses études faites dans des conditions de cultures différentes les unes des autres, avec des systèmes de mesures et des normalisations tout aussi variables. Néanmoins, même si ces valeurs ne sont pas comparables, elles traduisent probablement une réalité bien présente quant à la variation de la concentration intracellulaire de l'AMPc.

Le transport d'AMPc

L'AMPc peut traverser la membrane externe grâce à des canaux aspécifiques. Cependant il fût démontré dès les années 1970 qu'une telle molécule a besoin d'un transporteur afin de traverser la membrane interne d'*Escherichia coli* (Goldenbaum et al. 1979). Malgré de nombreuses études, l'identité de ce système restait un mystère. L'objectif de ces travaux était d'identifier la ou les protéines qui sont responsables de l'import de l'AMPc.

Les résultats exposés dans ce manuscrit démontrent clairement le rôle principal joué par le système Opp dans l'import d'AMPc. Ce transporteur a été identifié à partir d'une banque de mutants d'*E. coli* créée à l'aide d'un transposon qui s'est inséré au hasard dans le génome de la bactérie. Avec plus de 32 000 clones ainsi obtenus, nous pouvons affirmer que la totalité des gènes non essentiels pour la survie de la bactérie sont mutés au moins une fois dans l'un de ces clones. L'analyse de la luminescence produite par ces mutants nous a permis de sélectionner 293 clones qui semblaient insensibles à la présence d'AMPc dans le milieu. Une série de cribles réalisés sur ces clones a permis d'affiner la sélection de mutants et une vingtaine de candidats intéressants pour l'import de l'AMPc ont été retenus. Ces tests ont permis d'évaluer la présence d'AMPc à l'intérieur des bactéries par différentes méthodes

(croissance sur maltose, production de luminescence ou coloration sur rouge Congo). Les principaux avantages de ces cribles étaient d'être facilement mis au point, réalisables sur un très grand nombre de mutants et d'apporter rapidement des résultats. À notre connaissance, aucun crible de ce genre n'avait encore été réalisé afin d'étudier l'import d'une molécule par une bactérie. Il pourrait se révéler être prometteur pour découvrir les systèmes de transport d'autres molécules impliquées dans l'expression de gènes. La création de la banque de mutants en début d'étude permet de tester un très grand nombre de mutations dans le génome afin d'avoir la certitude d'obtenir celle qui nous intéresse à condition, toutefois, que celle-ci ne soit pas létale. La principale difficulté rencontrée lors de ces tests a été l'analyse des résultats. En effet, une très grande variabilité inter-clone lors de la coloration sur rouge Congo ou lors de la détection de l'intensité lumineuse a été source de discussion pour savoir si tel ou tel clone devait être conservé ou non. Cette stratégie nous a permis de sélectionner 21 clones qui semblaient être de bons candidats pour l'import de l'AMPc. 14 gènes ont pu être identifiés comme étant muté dans ces clones, parmi ceux-ci, seul le gène *oppA* semblait coder pour une protéine possédant les caractéristiques d'un transporteur. En effet, OppA est une protéine périplasmique qui fait parti du complexe OppABCDF et assure l'import de polypeptides. Bien que ce gène ait été muté dans deux clones distincts, les phénotypes observés lors des cribles sont très différents. Cependant, dans les deux cas, la délétion se situe au niveau du C-ter. Dans le mutant 2.5, deux hélices formées par la protéine sont éliminés alors que seule une chaîne est supprimée chez le mutant 1.87. Ces différentes structures se situent autour de la poche de fixation de substrat et peuvent expliquer la variabilité de phénotype observée (figure VI-1). La protéine OppA a donc été étudiée de façon plus approfondie au cours de ce travail.

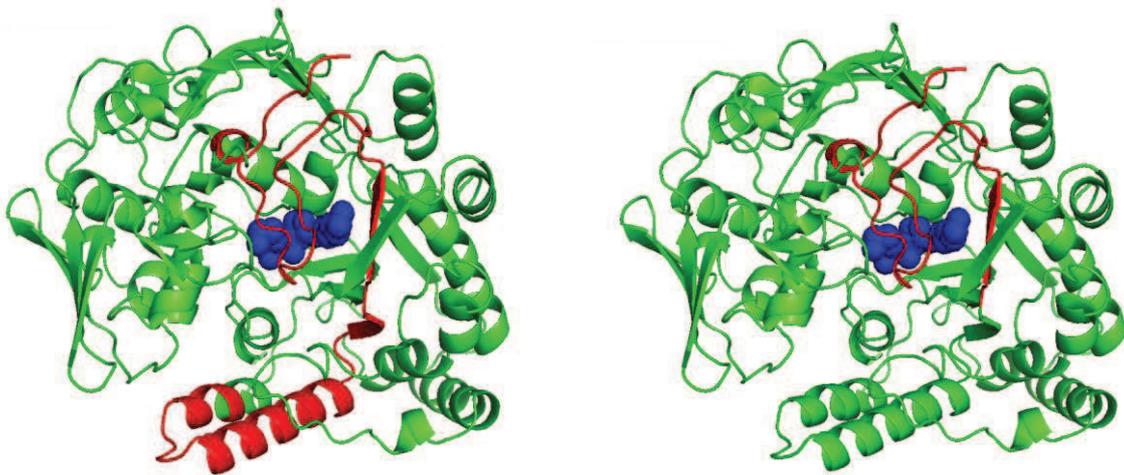


Figure VI-1 : Les mutants 1.87 et 2.5.

Les mutants 1.87 (à droite) et 2.5 (à gauche) ont une insertion du transposon au niveau du C-ter de la protéine éliminant ainsi les derniers acides aminés (en rouge). Ces portions éliminées sont proches du site de fixation des oligopeptides, représenté ici en bleu par le tripeptide KTK.

Caractérisation du système *Opp*

Après avoir reconstruit le double mutant *cyaA⁻oppA⁻*, des tests phénotypiques ont été réalisés sur cette souche afin de détecter l'import d'AMPc. L'un de ceux-ci est la production de luminescence par des systèmes rapporteurs basés sur l'utilisation de promoteurs AMPc-dépendant tels que *sdh* ou *acs*. On peut remarquer à cette occasion que l'émission de lumière ne débute qu'à partir du moment où les cellules entrent en phase stationnaire. En effet, il a été démontré au sein du laboratoire (Guillaume Baptist, article en soumission) que l'ajout d'AMPc dans le milieu de culture lors de la phase exponentielle de croissance ne permet pas de lever la répression catabolique induite par la présence de glucose. Il se pourrait que cette absence d'effet soit due, tout du moins en partie, par un import non efficace de l'AMPc à ce moment de la phase de croissance. En effet, Hiles et ses collègues (Hiles et al. 1987) démontrèrent que l'expression d'*opp* augmente lors de l'entrée en phase stationnaire. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le niveau basal de complexe *Opp* se trouvant dans la membrane ne permet pas l'import d'AMPc en quantité suffisante pour lever la répression catabolique et assurer l'activation des gènes AMPc-dépendant. Cependant, après l'entrée en phase stationnaire et, alors que la quantité de transporteurs devient plus importante, l'import d'AMPc devient efficace. Dans une souche sauvage, les gènes AMPc-dépendants sont

également exprimés uniquement à partir de l'entrée en phase stationnaire. Dans ce cas, l'absence d'activation des gènes semble être dû au fait de l'inhibition de l'adénylate cyclase par le PTS et non pas à un problème d'import de la molécule.

Lorsque l'opéron de la luciférase est sous le contrôle du promoteur *sdh*, la production de lumière émise par la souche *cyaA⁻oppA⁻* est 4 fois moins importante que celle émise par une souche *cyaA⁻*. Il serait intéressant de confirmer ces résultats avec un système rapporteur basé sur la GFP et non pas sur la luciférase pour s'affranchir du risque de résultats artéfactuels dû à un manque d'énergie nécessaire à la production de luminescence ou tout autre problème intrinsèque à ce système. Néanmoins, il est fort probable que le changement de système rapporteur donne des résultats très semblables à ce qui a été observé au cours de ces travaux puisque le rétablissement de la production intracellulaire d'AMPc permet une production de luminescence identique dans les deux souches. Ces résultats nous permettent en effet d'affirmer que le système rapporteur est aussi efficace dans une souche *cyaA⁻* que dans une souche *cyaA⁻oppA⁻*. Cependant, des expériences sont actuellement en cours afin d'obtenir un plasmide sur lequel le gène de la GFP est sous le contrôle du promoteur *sdh* ou du promoteur *pRM*. Ce dernier est un promoteur provenant d'un phage et est indépendant de la présence d'AMPc. Une fois ce clonage obtenu, nous pourrions confirmer les résultats que nous observons avec les plasmides d'expression de la luciférase.

Par ailleurs et contrairement au simple mutant *cyaA⁻*, une souche *cyaA⁻oppA⁻* est incapable de croître sur un milieu minimum complété avec du maltose et de l'AMPc. Afin de vérifier que cette absence de croissance n'est pas due à un défaut d'assimilation du maltose, nous avons rétabli la production intracellulaire d'AMPc. Dans ces conditions, la souche *cyaA⁻oppA⁻* est capable de pousser sur milieu minimum complété avec du maltose. Ces résultats démontrent clairement le rôle principal joué par le système Opp dans l'import de l'AMPc.

La croissance sur maltose, tout comme la production de luminescence via le système rapporteur, est un indicateur indirect de la présence d'AMPc au sein de la cellule. En effet, il s'avère difficile de mesurer directement la concentration intracellulaire d'AMPc puisque le lavage des cellules, indispensable pour éliminer les traces d'AMPc extracellulaire qui représente jusqu'à 90% de la totalité de l'AMPc, modifie la concentration intracellulaire de la molécule cyclique (Bettenbrock et al. 2007, Matin et al. 1982). Cependant, il serait intéressant de faire des quantifications plus directes de la concentration intracellulaire d'AMPc de la souche *cyaA⁻oppA⁻* en présence d'AMPc dans le milieu de culture au moyen de tests ELISA

ou encore de la technique du FRET, déjà utilisée dans des cellules eucaryotes (Borner et al. 2011) par exemple.

Analyse du canal Opp

La souche *cyaA⁻oppA⁻* a été obtenue à partir des simples mutants *cyaA⁻* et *oppA⁻* de la collection Keio (Baba et al. 2006). Le gène *oppA* est donc remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine. Du fait de la présence de celle-ci, les gènes en aval d'*oppA* peuvent être inactivés par polarité. Il ne peut donc pas être exclu que la protéine OppA et le complexe OppBCDF soient indépendants l'un de l'autre et n'aient pas la même importance dans le transport d'AMPc. En effet, il se pourrait que la protéine OppA fixe l'AMPc mais utilise un autre canal que le complexe OppBCDF, tel que le complexe DppBCDF, pour le transporter dans le cytoplasme ou bien que l'AMPc soit fixé par une autre protéine que OppA mais utilise le canal formé par OppBCDF. Afin de démontrer de façon formelle le rôle de chacun de ces éléments, nous avons voulu rétablir l'expression du complexe OppBCDF en l'absence de la protéine OppA. Dans un premier temps, j'ai tenté d'éliminer la cassette de résistance à la kanamycine comme décrit par Baba et ses collègues afin de rétablir l'expression des gènes en aval de la mutation (Baba et al. 2006). Malgré de nombreuses tentatives, je n'ai pas réussi à obtenir un double mutant *cyaA⁻oppA⁻* sans la cassette de résistance. Après avoir effectué des recherches bibliographiques, j'ai découvert qu'OppA permet le transport de divers antibiotiques dont la kanamycine (cf section I.2.4). Il a été démontré dans différentes études que l'absence de la protéine OppA dans une bactérie provoque une augmentation de la résistance à la kanamycine (Kashiwagi et al. 1992). Ceci pourrait expliquer les difficultés rencontrées lors de la tentative d'obtenir une souche *cyaA⁻oppA⁻* sensible à cet antibiotique au moment de la sélection négative des clones. Il nous semblait cependant étonnant que cette augmentation de la résistance à la kanamycine joue un rôle important au point de ne plus nécessiter la cassette pour survivre à 50 µg/mL de cet antibiotique. Nous n'avons pourtant trouvé aucune autre hypothèse pour expliquer le fait de ne pas avoir réussi à obtenir la souche *cyaA⁻oppA⁻* sans cassette de résistance. Nous avons donc opté pour une autre stratégie qui consiste à cloner l'opéron *opp* avec ou sans le gène *oppA* dans un plasmide afin de rétablir l'expression de ces protéines dans la cellule. Mais là aussi, nous nous sommes heurtés à des difficultés malgré le fait d'avoir testé plusieurs techniques de clonage (technique de digestion-ligation et Gibson). L'opéron *opp* entier mesure 5,5 kb ce qui peut être à l'origine de complications au moment du clonage. D'autre

part, nous ne pouvons pas exclure une fuite au niveau du plasmide ce qui impliquerait une expression de l'opéron *opp* en l'absence d'inducteur. Le complexe Opp se situant dans la membrane de la cellule, ceci peut provoquer des problèmes de croissance en modifiant la structure de la membrane s'il est en trop grand nombre. Des expériences sont toujours en cours afin d'obtenir un tel plasmide qui nous permettrait de confirmer la nécessité de la totalité du complexe de transport d'oligopeptides afin d'importer l'AMPc. On peut, néanmoins, déjà affirmer que le canal OppBCDF est bien celui emprunté par la molécule d'AMPc.

Caractérisation biochimique du système Opp

En parallèle à ces tests phénotypiques, des expériences de biochimie basées sur la fluorescence émise par la protéine elle-même ou par un homologue de l'AMPc, l' ϵ -AMPc ont été réalisées. Cette molécule possède les mêmes caractéristiques que la molécule d'AMPc et se fixe sur des protéines afin de permettre leur activation tout comme le fait l'AMPc (Secrist et al. 1972). Il faut cependant garder en mémoire que l'affinité de ces deux molécules n'est pas tout à fait identique : ainsi la constante de dissociation de l'AMPc sur CRP est de 5,1 μ M alors qu'elle est de 9 μ M pour l' ϵ -AMPc (Donoso-Pardo et al. 1987). Cette différence est à prendre en compte lors de l'étude de l'affinité de l'AMPc sur OppA en utilisant la molécule fluorescente. La première difficulté rencontrée lors de la mise au point du protocole fut la fluorescence émise par le tampon dans lequel se trouve la protéine OppA. Afin de faciliter l'analyse des résultats obtenus, une dialyse a été effectuée pour éliminer l'imidazole, unique composant du tampon à émettre de la fluorescence selon nos résultats. Malgré cette précaution, l'analyse des résultats n'a pas été triviale. Ainsi, de nombreux résultats ne validaient pas nos hypothèses sans toutefois les contredire. En fait, la concentration en OppA utilisée au cours de ces expériences est faible par soucis d'économie de matériel. En effet, une concentration trop faible en matériel induit un signal de faible intensité où les variations deviennent difficilement interprétables. D'autre part, il n'existe que peu d'étude réalisée avec l' ϵ -AMPc, ce qui implique que nous avons du mettre au point un protocole qui s'applique à notre étude et donc tester diverses conditions de mesure de fluorescence. Néanmoins, que ce soit pour la fluorescence de l' ϵ -AMPc ou celle d'OppA, nous détectons une variation d'intensité au cours des expériences lorsque ces deux éléments sont mélangés. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ce phénomène est une interaction entre l'AMPc et la protéine OppA. Des expériences sont en cours afin de

confirmer ces résultats très encourageants. D'autres techniques pourraient compléter cette étude pour valider cette hypothèse, que ce soit la technique de SPR (résonance plasmonique de surface), la microcalorimétrie ou encore la cristallographie.

Au cours de ces expériences nous avons également utilisé une molécule pour « chasser » l'AMPc de la protéine OppA et revenir à une fluorescence identique à celle obtenue sans AMPc : la trilysine. Ce tripeptide est très couramment utilisé lors de l'étude d'OppA (Davies et al. 1999, Sleigh et al. 1997, Tian et al. 2011) puisqu'il a une grande affinité pour celle-ci, à savoir 1,96 μM (Sleigh et al. 1997). Ce tripeptide n'a cependant pas été utilisé lors des expériences de compétition in vivo puisque Perry et ses collègues ont démontré que ce peptide avait une affinité de seulement 0,4 μM contre 0,03 μM pour la trialanine (Perry et al. 1984). Ceci peut s'expliquer par le fait que la trilysine, contrairement à la trialanine, est chargée positivement et est piégée au niveau de la membrane externe, chargée négativement. A la vue de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'OppA est très vraisemblablement la protéine qui permet la fixation de l'AMPc dans le périplasme.

OppA est une protéine connue pour importer les oligopeptides. Sa spécificité est faible et de nombreux peptides peuvent se fixer sur cette protéine avec une affinité plus ou moins grande selon les charges présentes sur les chaînes latérales (Klepsch et al. 2011). D'autre part, il semble que ce système permette également l'entrée de certains antibiotiques. Ici, nous démontrons que les peptides et les antibiotiques ne sont pas les seules molécules capables d'être transportées par le système Opp et que l'AMPc est, lui aussi, importé par ce complexe. Se posent alors de nombreuses questions quant à la spécificité de la protéine OppA. Quel est l'affinité de la molécule d'AMPc pour son transporteur ? Peut-on encore parler de transport spécifique pour OppA devant une telle diversité de composés se fixant sur la protéine ? Y'a-t-il d'autres éléments qui peuvent se lier à la protéine tels que le GMPc ou le di-AMPc, deux molécules importantes à la vie cellulaire ? Autant de questions qu'une étude plus approfondie du système Opp pourrait aborder.

Connexions avec les connaissances antérieures

Goldenbaum et ses collègues avaient démontré que l'énergie métabolique n'était pas nécessaire à l'import de l'AMPc et que, au contraire, celle-ci semblait inhiber l'entrée de la molécule (Goldenbaum et al. 1979). Or, Opp est un système de transport dit actif qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP afin d'importer les peptides. La différence entre ces résultats

n'est pas clairement comprise. Mais une piste qui apporterait une interprétation est le fait que le couple ascorbate-PMS utilisé comme donneur d'énergie dans les expériences de Goldenbaum est en fait un inhibiteur de transport actif chez certaines bactéries comme *P. aeruginosas* (Eagon et al. 1979) alors que, au contraire, chez *E. coli*, ce système fournit de l'ATP. Il se pourrait que cet outil ne soit pas aussi simple d'utilisation qu'il n'y paraît et que son comportement varie non seulement d'une espèce à une autre mais également avec les conditions expérimentales. Un autre fait surprenant est l'absence d'effet de l'ajout de leucine dans les tests réalisés par Goldenbaum alors que le système Opp est activé par la présence de cet acide aminé (Andrews et al. 1986, Andrews et al. 1986). Dans ces dernières études, la concentration en leucine utilisée est de 50 µg/mL soit 0,380 mM contre deux fois moins dans l'étude réalisée par Goldenbaum et ses collègues (0,125 mM). Cette différence peut éventuellement expliquer le fait que Goldenbaum observe une absence d'effet de la leucine sur l'import d'AMPc.

Autre système d'import de l'AMPc

Il semble évident que le système Opp soit essentiel à l'import d'AMPc par la cellule mais celui-ci n'est pas le seul puisque la souche *cyaA⁻oppA⁻* n'est pas totalement insensible à la présence d'AMPc. C'est pourquoi il faudrait réaliser de nouvelles études afin d'identifier le(s) transporteur(s) qui permettent, tout comme Opp, l'import de l'AMPc. Dans cette optique, j'ai testé plusieurs candidats. Alors que les protéines NupC et NupG ne semblent pas être impliquées dans ce transport, DppA semble être un excellent candidat aux vues des résultats préliminaires que nous avons pu obtenir. En effet, un double mutant *cyaA⁻dppA⁻* produit moins de luminescence qu'un simple mutant *cyaA⁻* et le gène *dppA* est activé par la présence du peptide trialanine, tout comme semble l'être le transport d'AMPc. Il serait donc approprié de créer un triple mutant *cyaA⁻oppA⁻dppA⁻* afin de tester son comportement en présence d'AMPc dans le milieu de culture. Si nos prédictions sont justes, alors cette souche devrait produire encore moins de luminescence que le double mutant *cyaA⁻oppA⁻* lorsque l'opéron de la luciférase est sous le contrôle du promoteur *sdh*. Il faudrait alors vérifier que DppA permet bien l'entrée de l'AMPc dans la cellule via le complexe DppBCDE et qu'il ne se fixe pas sur un autre canal d'entrée. En effet, connaissant la similarité entre les protéines OppA et DppA, on peut émettre l'hypothèse qu'elles sont capables de fixer l'AMPc et qu'elles utilisent un seul et même canal pour permettre l'entrée de l'AMPc dans la cellule.

Export de l'AMPc

L'AMPc ne traverse pas la membrane cellulaire dans un seul sens. Alors que les travaux présentés ici se concentrent sur l'import, l'export de cette molécule est tout aussi important. En effet, il a été démontré par Martin et al que jusqu'à 99% de l'AMPc produit par la bactérie est exporté (Martin et al. 1982) ce qui nécessite 9% de l'énergie totale produite par la cellule. Il semble donc évident que l'export de cette molécule joue un rôle important dans la vie cellulaire d'une manière ou d'une autre. Alors que Goldenbaum et ses collègues ont démontré, il y a plusieurs décennies, la nécessité d'un transporteur actif pour assurer l'export (Goldenbaum et al. 1979), ce n'est que très récemment que celui-ci a été identifié.

Une étude réalisée en 2011 par Hantke et ses collègues (Hantke et al. 2011) démontra par mesure de l'activité de la β -galactosidase que le système TolC, qui transporte des toxines et des antibiotiques, permet l'export de l'AMPc. Néanmoins, très peu d'articles font mention du rôle de TolC dans le transport de l'IPTG, molécule essentielle dans cette étude afin d'activer la β -galactosidase, et il serait nécessaire de vérifier qu'une souche *tolC* a la même concentration intracellulaire d'IPTG qu'une souche sauvage. Dans l'idée de comparer les deux systèmes d'études, j'ai réalisé des expériences visant à mettre en évidence l'export de l'AMPc par TolC. Les tests de croissance sur maltose présentés dans ce manuscrit tendent également à démontrer le rôle de TolC dans l'export de cette molécule puisqu'une souche ne possédant pas cette protéine est plus sensible à la présence d'AMPc que celles qui l'ont. Cependant, les tests de production de luminescence réalisés avec les mutants *tolC* et *cyaA* *tolC* sont moins convaincants et ne permettent pas de conclure quant à l'implication de la protéine TolC dans l'export de l'AMPc. Il semble indispensable d'approfondir ces résultats afin de pouvoir affirmer de façon formelle le rôle de TolC dans ce transport. De plus, le génome d'*E. coli* code pour trois homologues de la protéine TolC (Koronakis et al. 2004) qu'il serait très intéressant d'étudier afin de connaître leur rôle dans le transport de la molécule cyclique. En effet, il est fort probable que TolC ne soit pas l'unique protéine permettant la sortie de l'AMPc. En outre, TolC permet le transport des molécules du périplasma vers le milieu extérieur tandis que la membrane interne est traversée grâce à différents canaux tel que HlyBD, CvaBA, AcrAB, AcrEF, EmrAB ou encore MacAB (Koronakis et al. 2004). Chacun de ces canaux a une spécificité de substrat mais aucun de ceux-ci n'est connu pour transporter l'AMPc. Il manque donc un élément indispensable à la compréhension totale de l'export de l'AMPc. Il est cependant intéressant de constater que Rosner et Martin ont décrit un modèle de régulation de TolC (Rosner et al. 2009). Selon eux,

le métabolisme intracellulaire génère des métabolites qui s'accumulent et activent les gènes *marA*, *soxX* et *rob* qui codent pour trois activateurs de *tolC*. Or le gène *marA* est activé par le complexe CRP-AMPC. Il n'est donc pas dénué de sens d'émettre l'hypothèse qu'un niveau intracellulaire d'AMPC trop élevé chez *Escherichia coli* est détecté par la protéine MarA qui induit ensuite l'expression du gène *tolC*, permettant ainsi l'export de l'AMPC présent en trop grande quantité.

L'excès d'AMPC dans la cellule est létal et *Escherichia coli* a mis en place des système permettant de réguler la concentration intracellulaire de cette molécule. Que ce soit par l'export ou par l'activation de la phosphodiesterase la molécule indésirable est éliminée. On peut cependant se demander quel est l'efficacité d'un tel garde-fou. Est-ce que la concentration est ramenée à une valeur proche du zéro ou bien est-elle ramenée à une concentration intermédiaire ? On peut se poser la question à la vue des résultats obtenus lors de la mesure de luminescence émise par une souche *tolC*. En effet, une telle souche émet 6 fois moins de lumière qu'une souche sauvage dans les mêmes conditions (figure V. 45). Il serait intéressant d'approfondir ces résultats afin de pouvoir les confirmer et les expliquer.

Role d'AMPC dans la communication intercellulaire

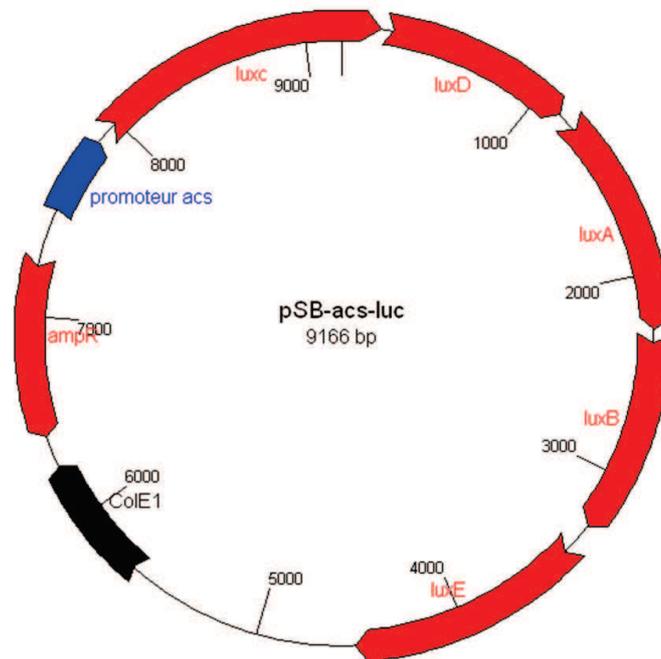
Il a été démontré au sein de notre équipe (Guillaume Baptist) que l'AMPC permet une communication intercellulaire. Ceci a été démontré au cours d'expériences durant lesquelles des bactéries *crp*⁻ sont mises en contact de bactéries *cyaA*⁻ qui possèdent un système rapporteur permettant la production de lumière en présence d'AMPC au sein de la cellule. De la luminescence est détectée lorsque ces deux souches sont mises en contact alors que prises séparément, aucune des deux n'est capable d'en produire. On peut en déduire que l'AMPC peut être relargué dans l'environnement par certains individus et importé par d'autres qui activeront alors des circuits de régulations AMPC-dépendant sans avoir produit la moindre molécule d'AMPC. Le rôle exact de cette communication entre bactéries n'est pas encore élucidé mais il serait très intéressant à étudier. Il est possible qu'il permette à la bactérie de « gagner du temps » et d'exprimer des gènes permettant par exemple la croissance sur certaines sources carbonées avant qu'elles ne soient détectées par la bactérie puisque l'AMPC est synthétisé en début de phase stationnaire (Makman et al. 1965) ou encore d'entrer en sporulation avant que le stress ne soit détecté afin de diminuer le risque de dommage généré par celui-ci. De telles expériences pourraient être réalisées afin de tester le rôle de TolC dans l'export de l'AMPC. En effet, en mettant en contact une souche *crp*⁻*tolC*⁻ avec une souche

cyaA⁻ + psdh-luc, aucune luminescence ne devrait être détectée si la protéine TolC est bien le principal moyen d'export de l'AMPc. Grâce à ce protocole, la communication inter-espèce pourrait également être testée. En effet, l'AMPc est une molécule très largement répandue dans le domaine du vivant puisqu'elle se retrouve chez les archéobactéries, les bactéries, les champignons, les eucaryotes parasites, mammifères etc. et pourrait ainsi permettre une communication entre cellules d'espèces différentes. Cette communication peut être bénéfique comme dans le cas d'une réponse groupée face à un stress, mais elle peut également être néfaste pour l'une des cellules. Ainsi, il a été démontré que certaines souches bactériennes injectent l'adénylate cyclase au sein des cellules de leur hôte : après infection par *Bordetella pertussis*, la concentration intracellulaire d'AMPc augmente d'un facteur de 20 dans des lymphocytes induisant de cette manière un défaut dans la réponse immunitaire de l'hôte (Botsford et al. 1992). On peut également citer *Bacillus anthracis* qui provoque une augmentation d'un facteur de 200 de l'AMPc dans les cellules CHO lorsque l'adénylate cyclase est exportée en même temps que la protéine PA qui permet l'entrée de l'enzyme dans la cellule (Leppä 1984). A la vue de ces informations, on peut se demander si l'AMPc relargué par la cellule peut, lui aussi, jouer un rôle dans l'interaction bactérie-hôte comme ça a été observé chez *Mycobacterium tuberculosis* (Bai et al. 2011). Cette molécule pourrait jouer un rôle de toxine et perturber les mécanismes de survie ou de défense des cellules de l'hôte comme il est suggéré dans l'article de Ahuja et ses collègues (Ahuja et al. 2004).

Malgré les très nombreuses études sur l'adénosine monophosphate cyclique, beaucoup de questions restent sans réponse. Les années à venir apporteront sûrement de nouvelles certitudes sur cette molécule si largement répandue dans l'Univers.

VII- Annexes

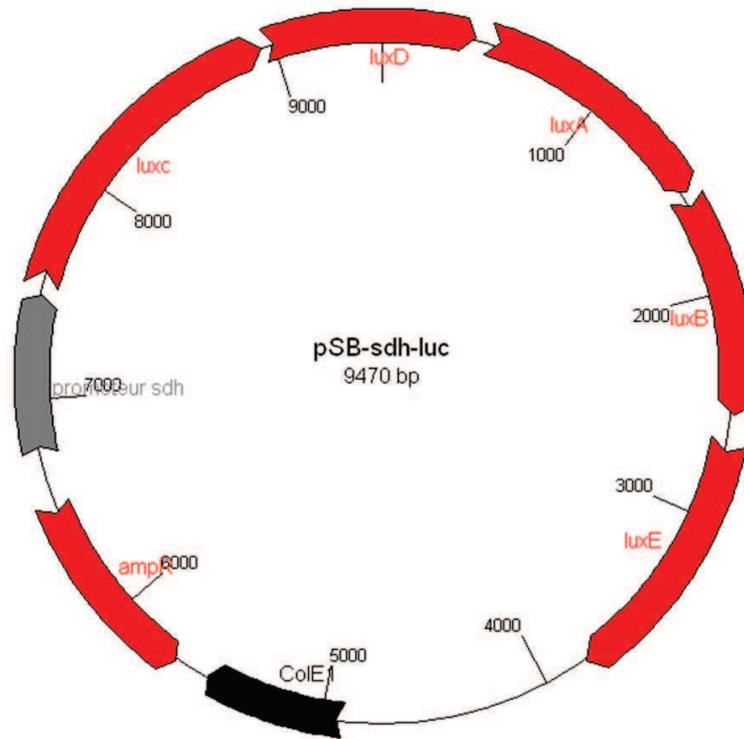
Annexe 1 : système rapporteur



```

7291 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCGCG GCACATTTCC CCGAAAAGTG
7381 CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTACTC
    promoteur acs
7471 GAGAGGGGCT TCATCCGAAT TGCGCCATTG TTGCAATGGC GGTTTTTTATT GTTTTTCACG ACAGTAACCG CACCTACACT GTCATGACAT
    (promoteur acs)   fis                               IHF
7561 TGCTCGCCCC TATGTGTAAC AAATAACCAC ACTGTGAATG TTGTCTTTAA TCAATTGTAA GTGCATGTAA AATACCACTT TAGAGTTAGT
    (promoteur acs)   IHF                               IHF                               CRP
7651 CAGTATCTTC CTCTTTTCA ACAGCATGCA TAACTGCATG TTCCTCAAAG AATTAATCAA CTTTGTGTGC TGACCTTCAA AAATTACCCT
    Fis (promoteur acs)   CRP                               Fis                               -35
7741 GCCGTTTATT TGCACAATTC TACTTTTGCG TGATCTGTCG CCCAAATACT AAACAAAAC TCCAATACCC CTACATTTAA CGCTTATGCC
    (promoteur acs)
7831 ACATATTATT AACATCCTAC AAGGAGAACA AAAGCGGATC CGGTACCGAA TTCCCCGGGT AATTCAGGCC TGGAGGATAC GTATGACTAA
    (luxc)
    K I S F I I N G Q V E I F P E S D D L V Q S I N F G D N S V
7921 AAAAATTTCA TTCATTATTA ACGGCCAGGT TGAATCTTT CCCGAAAGTG ATGATTTAGT GCAATCCATT AATTTTGGTG ATAATAGTGT
  
```

L'opéron de la luciférase est sous le contrôle du promoteur du gène *acs*. Celui-ci possède deux sites de fixation du complexe AMPc-CRP, ce qui rend l'expression de la luciférase AMPc-dépendante. Cette construction, portée par un plasmide de type pSB, nous permet de détecter la présence d'AMPc dans la cellule.



```

6661 TGCCACCTGA CGTCTAAGAA ACCATTATTA TCATGACATT AACCTATAAA AATAGGCGTA TCACGAGGCC CTTTCGTCTT CAAGAATTAC
      (promoteur sdh)
6751 TCGAGTTAAG GTCTCCTTAG CGCCTTATTG CGTAAGACTG CCGGAACTTA AATTTCCTT CGCACATCAA CTGGGCTTTA CCCGTTTTTT
      (promoteur sdh)
6841 ATTTGGCTCG CCGCTCTGTG AAAGAGGGGA AAACCTGGGT ACAGAGCTCT GGGCGCTTGC AGGTAAGGA TCCATTGATG ACGAATAAAT
      (promoteur sdh)
6931 GCGGAATCAA GTACTTAGCA ATCCGAATTA TTAACTTGT CTACCACTAA TAACTGTCCC GAATGAATTG GTCAATACTT CCACACTGTT
      (promoteur ArcA) ArcA
7021 ACATAAGTTA ATCTTAGGTG AAATACCGAC TTCATAACTT TTACGCATTA TATGCTTTTC CTGGTAATGT TTGTAACAAC TTGTTGAAT
      (ArcA) promoteur sdh crp
7111 GATTGTCAAA TTAGATGATT AAAAATTAAT TAAATGTTGT TATCGTGACC TGGATCACTG TTCAGGATAA AACCCGACAA ACTATATGTA
      (Flx ArcA ArcA) -10
7201 GGTAAATTGT AATGATTTTG TGAACAGCCT ATACTGCGCG CAGGTCTCCG GAACACCCTG CAATCCCAGG CCACCCAGCG TTGTAACGTG
      (promoteur sdh)
7291 TCGTTTTTCG ATCTGGAAGC AGTGTTTTGC ATGACGCGCA GTTATAGAAA GGACGCTGTC TGACCCGCAA GCAGACCGGA GGAAGGAAAT
      (promoteur sdh)
7381 CCCGACGTCT CCAGGTAACA GAAAGTTAAC CTCTGTGCCG GTAGTCCCCA GGGGAATAATA AGAACAGCAT GTGGGCGTTA TTCGAATTCC
      luxC
      H T P R K I S P I I N G Q V E I F P E S D D
7471 CCGGTAATT CAGGCCTGGA GGATACGTAT GACTAAAAAA ATTCATTCA TTATTAACGG CCAGTTGAA ATCTTICCG AAAGTGATGA
  
```

L'opéron de la luciférase est sous le contrôle du promoteur du gène *sdh*. Celui-ci possède un site de fixation du complexe AMPc-CRP, ce qui rend l'expression de la luciférase AMPc-dépendante. Cette construction, portée par un plasmide de type pSB, nous permet de détecter la présence d'AMPc dans la cellule.

Annexe 2 : résultats obtenus aux différents cribles

La légende se situe en fin de tableau

Test / Score Mutant	gic	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
1-4	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	15,50
1-15	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	blanc	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	15,50
2-4	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	15,50
1-47	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	15,50
1-5	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	0,00	-	4,00	14,50
3-57	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	13,50
2-21	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	13,00
3-23	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	13,00
2-87	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	12,00
2-54	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	11,50
2-80	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	11,50
3-22	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	11,50
1-9	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	11,50
1-7	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rouge	0,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	11,00
2-40	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-42	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
1-76	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
2-5	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
1-51	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
1-87	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
2-85	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-29	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-30	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-1	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
1-8	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
1-16	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
1-94	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
1-95	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	10,50
1-6	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
1-19	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-27	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-14	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-17	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-23	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-35	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-43	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-45	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-47	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mat-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
2-58	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-89	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-90	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-91	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
2-94	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-5	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-6	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-7	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-8	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-9	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-12	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-13	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-14	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-15	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-16	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-21	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-46	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-51	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,50
3-1	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	10,00
2-92	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	10,00
1-2	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	10,00
1-33	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rouge	0,00	-	1,00	-	1,00	-	4,00	9,50
2-34	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	9,50
2-72	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	9,50
3-17	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	9,50
3-28	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	9,00
2-51	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
3-52	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
1-53	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
1-88	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
1-90	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
2-82	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
2-84	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
3-71	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
3-82	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
3-94	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	9,00
2-18	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	8,50
1-93	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	8,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
2-2	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	8,50
2-19	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	8,50
2-33	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	8,50
1-37	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	7,50
2-15	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	7,50
2-63	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	7,50
2-78	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	-	4,00	7,50
3-64	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	7,50
2-96	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	7,50
1-46	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	blanc	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	7,00
2-28	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-31	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-39	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-41	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-26	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-38	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-22	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-80	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-78	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-85	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-89	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-96	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-83	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-92	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-1	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-3	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-12	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-13	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-17	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-18	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-20	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-23	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-26	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-27	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-29	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-31	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-32	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-38	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
1-39	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-41	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-42	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-43	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-45	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-49	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-52	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-55	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-56	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-61	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-62	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-64	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-66	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-67	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-68	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-72	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-73	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-79	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-84	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
1-86	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	4,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	+	0,00	+	0,00	6,50
3-3	-	0,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	6,50
3-79	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
4-2	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-3	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-8	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-9	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-10	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-11	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-12	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-13	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-16	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-24	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-25	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-26	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-27	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-36	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-37	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-38	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
2-44	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-48	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-49	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-50	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-52	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-53	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-55	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-56	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-57	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-59	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-60	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-61	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-66	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-67	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-68	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-69	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-70	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-71	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-74	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-75	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-76	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-79	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-81	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-83	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-86	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-88	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
2-95	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-4	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-10	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-18	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-19	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-20	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-24	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-25	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-30	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-31	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-32	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-33	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
3-34	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-35	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-36	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-37	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-39	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-40	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-43	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-44	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-45	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-47	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-48	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-49	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-50	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-53	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-56	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-59	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-60	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-62	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-63	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-67	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-68	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-69	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-70	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-72	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-73	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-74	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-77	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-78	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-81	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-83	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-84	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-90	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-91	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-92	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-93	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-96	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
4-1	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
4-3	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
4-4	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
4-5	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,50
3-85	+	1,00	-	0,50	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	+	0,00	+	0,00	6,50
3-2	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	6,00
1-34	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	6,00
3-42	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	6,00
3-87	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	6,00
2-77	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	6,00
3-58	-	0,00	-	0,00	-	1,00	-	4,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	6,00
3-75	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-65	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-77	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-82	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-91	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-21	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-24	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-28	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rose	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-50	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	blanc	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-58	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-63	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-74	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
2-6	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
2-62	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
2-65	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
3-61	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
3-95	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	5,50
1-40	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	4,00	5,00
2-22	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-14	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-11	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-44	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	-	1,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-57	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-60	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-71	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,50
3-80	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	blanc	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,50
1-25	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	2,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	4,00
1-70	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-48	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50

Test / Score Mutant	glc	score /1	lum	score /0,5	mal	score /1	mal-AMPc	score /4	RC	score /1	RC-AMPc	score /2	lum	score /1	LB	score /1	LB-AMPc	score /4	score final
1-59	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-10	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-35	+	1,00	-	0,50	+	0,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-54	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-69	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-75	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
1-81	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
2-93	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
3-41	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
3-54	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
3-65	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
3-66	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
3-76	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
3-55	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
2-7	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
2-46	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
2-64	+	1,00	-	0,50	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,50
2-73	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	rose	1,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	3,00
1-30	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	-	1,00	+	0,00	2,00
3-11	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	2,00
3-86	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	2,00
3-88	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	2,00
3-89	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	1,00	+	0,00	2,00
1-36	+	1,00	-	0,50	+	0,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	+	0,00	+	0,00	1,50
3-29	+	1,00	-	0,50	+	0,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	+	0,00	+	0,00	1,50
2-20	+	1,00	-	0,50	+	0,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	+	0,00	+	0,00	1,50
2-32	+	1,00	-	0,50	+	0,00	+	0,00	rouge	0,00	rouge	0,00	+	0,00	+	0,00	+	0,00	1,50

Résumé des résultats obtenus aux différents cribles pour les 292 mutants sélectionnés.

glc : croissance sur milieu M9 solide complété avec 0,3% de glucose ;

mal : croissance sur milieu M9 solide complété avec 0,3% de maltose ;

mal-AMPc : croissance sur un milieu M9 solide complété avec 0,3% de maltose et 1 mM d'AMPc ;

RC : couleur des colonies sur LA + rouge Congo ;

RC-AMPc : couleur des colonies sur LA + rouge Congo + 1 mM d'AMPc ;

LB : luminescence produite en milieu liquide LB ;

LB-AMPc : luminescence produite en milieu liquide LB + 1 mM d'AMPc ;

lum : luminescence produite lors du crible présent dans la colone de gauche

score : points accordés en fonction des résultats obtenus au crible présent dans la colone de gauche.

Les pointillés séparent les résultats à un crible du nombre de points obtenus

Les traits pleins séparent les différents cribles.

+ : croissance ou production de luminescence

- : absence de croissance ou de production de luminescence

La couleur violette correspond à un résultat conforme à ce qui est attendu d'un clone qui n'importe par l'AMPc.

La couleur verte correspond aux 21 mutants choisi pour être identifiés

Annexe 3 : identification des mutants OppA

Séquençage du mutant 1.87

```

transposon                                     OppA
??WGVSLFLC V|SVSLYMWG V|ENIFSL|R ERDTPRGGGD TLLYISQSAP QNTPLCVLYT RV|ENMCARA RVSLWGV|EK NTPRVWGGVL
001 CNTGGTCTTT GTAGTCTATG GTGAATTCTA GAGACCGGGG ACTTATCAGC CAACCTGTTA CGTGAATGCG CGTCTGGTGA AACCGTGGGT

(OppA)
WGVWALYIY TPRGAQKKRD ISPRALWGD I|NIYTPLYIY TPRGENIYM CVYTHILCV| EKSATL|NM WGAQNIYTRV WGGGAQRGES
091 TGGTGGCTAT ACCGGCAAAG ATCCGCTGGA TAATACCTAT ACCCGGAATA TGTACATTGT GAAGCACTAA TGGCAATACG TGGGGCAGGA

VCVSPICALS PHTRGVCSVL |DIFFFLYIS RAHILYTORE KRGHAHQGA POREKRGV|R GGAQNMCVL| KKNIFLYIFS LYTRVSRALC
181 GTGTCCTGCT CCACGGGTGC TGATTTTAT CGCATTACAG AAGGCACAGG CCAGAAGGTA GGGCAATGTT AAAATTTATT CTACGTCGCT

(OppB)
VSLWGEKSAR DIFSPRDTRA LYIFLYIFSL LYILYLYIF FSRVPSLFY M|DMCARAPL SRARAPRGGG KSAPPLFFLY TPRGARENTR
271 GTCTGGAAGC GATTCCGACG CTATTTATTC TTATTACTAT TTCGTTCTTT ATGATGCGCC TCGCGCCGGG AAGCCCTTTT ACCGGCGAAC

(OppB)
VYTLFLYTPR APQREKSV|D MWGE
361 GTACTTTACC GCCAGAAGTG ATGG

```

Séquençage du mutant 2.5

```

Transposon                                     OppA
WGVSLFLCV| SVSLYMWGV| ENIFSL|RER DTPRGGGDTL LYISQSAPQN TPLCVLWVG ARGEKNTAL |EKKSVDL |DTRERGARA
001 TGGTCTTTGT AGTCTATGGT GAATCTAGA GACCGGGGAC TTATCAGCCA ACCTGTTATG GCGGAAACGC TGAAAGTGAC TGACGAGGGC

(OppA)
QSARAHTQSA LSLCVYTHL |KKAORENT QNTQSALWGD I|KRGDIFSR GAPHILCVFS PLCVFLYIYL FLYTRV|ENM CARARVSLWG
091 CAGCGCACAG CTCTGTACAC TAAAGCAGAA CAACAGCTGG ATAAGGATTC GGCCATTGTT CCTGTTTATT ACTACGTGAA TGCGCGTCTG

(OppA)
V|EKNTPRVW GGVLWGVWGA LYIYTPRGAQ KRRDISPRAL WGD I|NIYTP LYIYTPRGE NIYMCVYTHI LCV|EKSAT L|NMWGAQNI
181 GTGAAACCGT GGGTTGGTGG CTATACCGGC AAAGATCCGC TGGATAATAC CTATACCGG AATATGTACA TTGTGAAGCA CTAATGGCAA

YTRVWGGGAQ RGSVCVSP CALSPHTRGV CVSL|DIFFF LYISRAHILY TOREKRGHAHT QRGAPQREKR GV|RGGAQNM CVL|KKNIFL
271 TACGTGGGGC AGGAGTGTC TGCTCCACGG TGTCTGATTT TTATCGCATT ACAGAAGGCA CAGGCCAGAA GGTAGGGCAA TGTTAAATTT

(OppB)
YIFSLYTRVS RALCVSLWGE KSARDIFSPR DTRALYIFLY IFSLLYIYLYT LYIFFSRVFS LFLYM|DMCA RAPLSRARAP RGGEKSAPPL
361 TATCTACGT CGCTGTCTGG AAGCGATTCC GACGCTATTT ATTCTTATTA CTATTCGTT CTTTATGATG CGCCTCGCGC CGGGAAGCCC

(OppB)
FFLYTPRGAR ENRVYTLFL YTPRAPQRE
451 TTTTACCGGC GAACGTACTT TACCGCCAG

```

Les mutants ont été séquencés à partir de l'amorce TnSC189_IDR après que le chromosome ait été digéré par l'enzyme Mls. Un trait noir indique une portion du transposon. Un trait bleu indique les gènes présents à proximité du transposon. Un cadre rouge encadre le dinucléotide TA, séquence reconnue par la transposase.

OppA

0001 GDILYTHTHM CALWGLV|NI YTPQSV|NIL YI|NM|ERGG ESVSPQKKK NTQNM|DTPQ NTHISHTPQK REREKSVFL| SV|SAQSAW GARVFSWGA LCARAL|NMW
GGATTACACA TGCTGGTTAA TACCAGTAAT TATAATGAGG GAGTCCAAAA AACATGACC AACATCACCA AGAGAAGTTT AGTAGCAGCT GCGTCTCTGG CTGCCTAAT

(OppA)

0111 GAQRGGENMC VSRARALWGA QSAL|DMCVY TPRRAQRGAR VSHHTLWGA RGEKKNTQK NHTLWGVYTV RV|NTQNMWG VFSQREKSVF SQSVSHIL|R DISPRAHTQK
GGCAGGAAT GTCGCGCTGG CAGCTGATGT ACCCGCAGGC GTCACACTGG CGGAAAAACA AACACTGGTA CGTAACAATG GTTCAGAAGT TCAGTCATTA GATCCGCA

(OppA)

0221 KNIL|EKRGV CVFSPRGESV SL|NIYISQS APRERDTPLC VFL|EKRGAL LYTLWGVVSQS ARDISL|DT RGVSHISPQS AHTPLWGARV SRAL|ENISP LWGGDI|NI|
AAATTGAAGG TGTTCCGGAG TCTAATATCA GCCGAGACCT GTTGAAGGC TTACTGGTCA GCGATCTTGA CCGTCATCCA GCACCTGGCG TCCTGAATC CTGGGATAAT

(OppA)

0331 KKRDRAREK KSVSLWGDTP LFSPHIFLCA RV|KKRDMCA REKNMWGVS L|DMWGAHTRA PQSVSHTQSA HTQKRDTLFL CVCVYI|SAL WGAQNTRVFS LCVL|DISPR
AAAGACGCGA AAGTCTGGAC CTTCCATTTG CGTAAAGATG CGAAATGGTC TGATGGCAGC CCAGTCACAG CACAAGACTT TGTGTATAGC TGGCAACGTT CTGTGTATCC

(OppA)

0441 ENHTLICALF SLSPRVYMC PQSVLYISLC AQNIYMWGGA HIYISRAPRG VYIL|DM|EK NIFSL|EKR GGEKKKNTF RDILYTPRDI SLSRGARV|E KKSALYIL|D
GAACACTGCT TCTCCGTATG CCAATATCTG CAATATCGCG CATATCGCCG GTATTGATGA AATCTTGAA GGGAAAAAC CGATTACCGA TCTCGCGCTG AAGCTATTG

(OppA)

0551 M|DISHTHTH IL|REKSVSH PPLL|KSV|E NTPRVFSPR VYTLFSLYI| KNILYTLV FSHTPPHISQ NTLFSTPRG VCAPQKKKSA PRALYISRER EKNIFSRGAR
ATGATCACAC ATTAGAAGTC ACCTAAGTG AACCCGTTCC GFACTTCTAT AAATTACTTG TTACCACATC AACTTCACCG GTGCCAAAAG CCGCTATCGA GAAATTCGCG

(OppA)

0661 EKKKMWGDT PPQSAPLWGV |NIYISRVSH TPQNRGVCA PLYIYTPLL| KKRDRILWGG VSRV|KNTRE NTRENISRVF SLL|ENTRAQ SAPPRDTPLY TLWGENTQNT
GAAAAATGGA CCCAGCCTGG TAATATCGTC ACCAACGGTG CCTATACCTT AAAAGATTGG GTCGTAACG AACCAATCGT TCTTGAACGC AGCCCGACT ACTGGAACAA

(OppA)

0771 RAREKNTPR VLYIL|NTPQ RGV|NTPLYI FLCAPLYILC ALFSL|EKS LYTPRDMCVS QNTPRALYTP RV|SVWGV|E KNISRDTM| DTRVYI|NTQ SAHMCAPRDI
CGCGAAAACC GTTATTAACC AGGTAACCTA TTTGCTTATT GCTTCTGAAG TTACCAGTGT CAACCGCTAC CGTAGTGGTG AAATCGACAT GACGTATAAC AGCATGCCGA

(OppA)

0881 SRENILCVFS PQREKSA|E KKKKRRERDI SPPRGDTREK SVFSHTRVL| DISPHIYTPL CVCAHTLLYT LYILYTREKN IL|NTQNTPO REKNTPRAPH IFSQNTDRMC
TCGAATTGTT CCAGAAGCTG AAAAAAGAGA TCCCGGACGA AGTTCACGTT GATCCATACC TGTGCATTA CTATTACGAA ATTAACAACC AGAACCGCC ATTCAACGAT

(OppA)

0991 VCARVVCAR VYTPRAHTL| EKNTL|RGVY MWGDTPRARD IYISHILCVL |NI|KKS|E KKSARAQRGG AQNTMCAFP RAPLYMWGV L YHTLSPHTP RVYIYTL|DM
GTGCGTGTGC GTACCGCACT GAAACTAGTG ATGGACCGCG ATATCATTGT TAATAAAGTG AAAGCGCAGG GCAACATGCC CGCCTATGTT TACTCTCAC CGTATACTGA

(OppA)

1101 WGARAQKKNI L|DTLSQSAP QRENMMGVFL WGA LWGESAP QRGEKKKNT R V|NTREKREK SAREKKKNT LCALWGA|E KSARGGVLYI YTPRAQRDTQ KNTPRVL|DT
TGGCGAAAA TTGACTCAGC CAGAATGGTT TGGCTGGAGC CAGGAAAAAC GTAACGAAGA AGCGAAAAAA CTGCTGGCTG AAGCGGGTTA TACCGCAGAC AAACCGTTGA

(OppA)

1211 PHISQNTPLC VLCVYI|NTH TPLSPRDISL CAHI|KKKKS ALWGARDILC ALCAPLSLFS HILCVWGEKR EKKKNTLW GVCV|KNTRV SQKNTLWGV L|NTPQRGESV
CCATCAACCT GTTGATAAC ACCTCCGATC TGCATAAAA GCTGGCGATT GCTGCCTCTT CATTGTGGAA GAAAAACATT GGTGTAACG TCAAACTGGT TAACCGAGG

(OppA)

1321 WGEKNTRVF SPLSRDHTP PRVSHTPQRG GVTYTLFLL|D MCWGAAPRV CAQRGALWGV CVCAL|DTLY TQNTRENTPO NTLFSLFSP L|ENTHTPHM CALFFSRENT
TGGAAAACGT TCCTCGACAC CCGTACCAG GGTACTTTTG ATGTGGCCCG TGCAGGCTGG TGTGCTGACT ACAACGAACC AACTTCCTTC CTGAACACCA TGCTTCGAA

(OppA)

1431 QSALS RDM|E NIYTPRARAH ILYI|KRESA PPRGAPLFL| DTQSAHIL M WGARGEKNT R AL|EKKS|D TL|DTRERGA RAQSARAHTQ SALSVCVYTH TL|KKSARE
CAGCTCGATG AATACCGCGC ATTATAAGAG CCCGCGCTTT GACAGCATT TGGCGGAAAC GCTGAAAGTG ACTGACGAGG CGCAGCGCAC AGCTCTGTAC ACTAAAGCAG

(OppA)

1541 NTQNTQSALW GDI|KRGDIF SRGAPHILCV FSPLCVFLYI LYTL|TRV|E NMCARARVSL WGV|EKNTPR VWGGVWLVW GALYIYTPRG AQKKRDISPR ALWGD|NIY
AACACAGCT GGATAAGGAT TCGGCCATTG TTCTGTTA TTACTACGTG AATGCGCGTC TGGTGAACCC GTGGTGGTGGT GGCTATACCG GCAAGATCC GCTGGATAAT

(OppA)

1651 TPLYIYTPPR GENIYMCVYT HILCV|EKSA HTL|NMWGAQ NIYTRVWGGG AQRGESVCVS PLCALSPHTR GVCVSL|DIF FFLYISRAHI LYTQREKRG HTQRGAPQRE
ACCTATACCC GGAATATGTA CATTGTGAAG CACTAATGGC AATACGTGGG GCAGGAGTGT CCTGCTCCAC GGTGTCTGAT TTTATCGCA TTACAGAAGG CACAGGCCAG

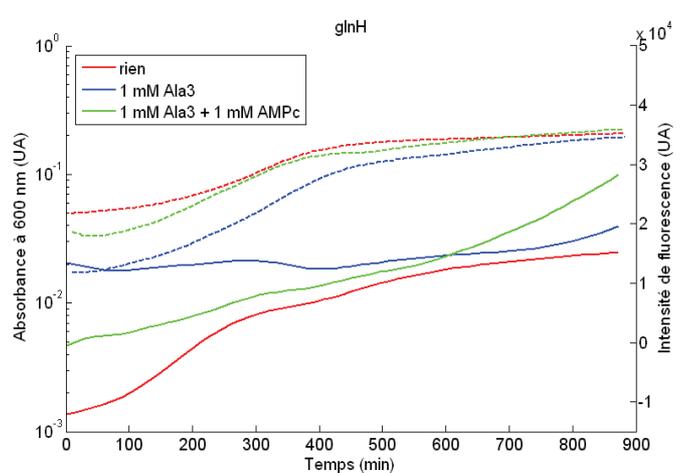
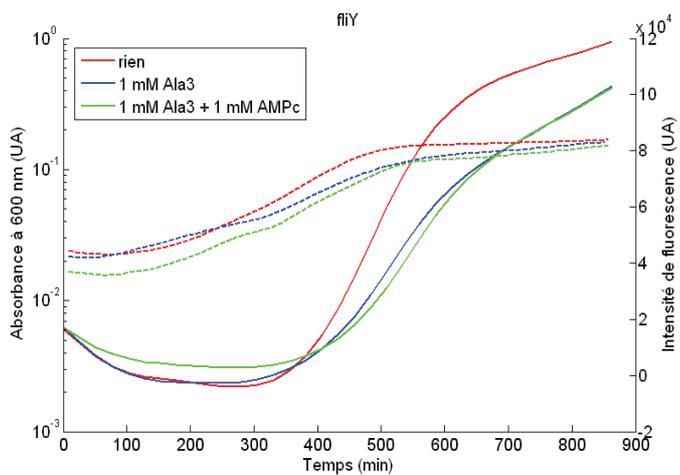
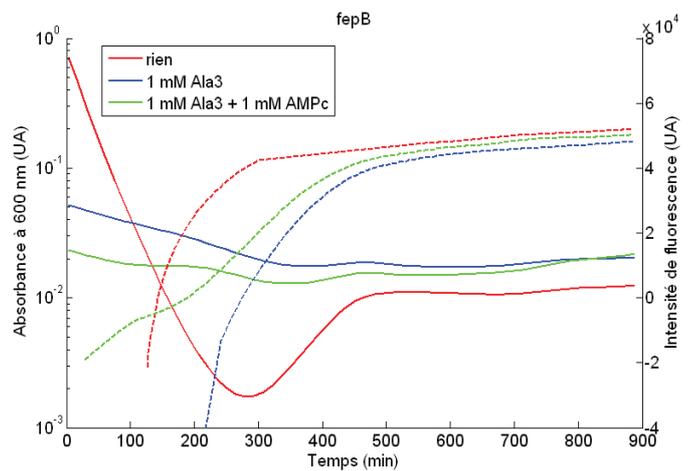
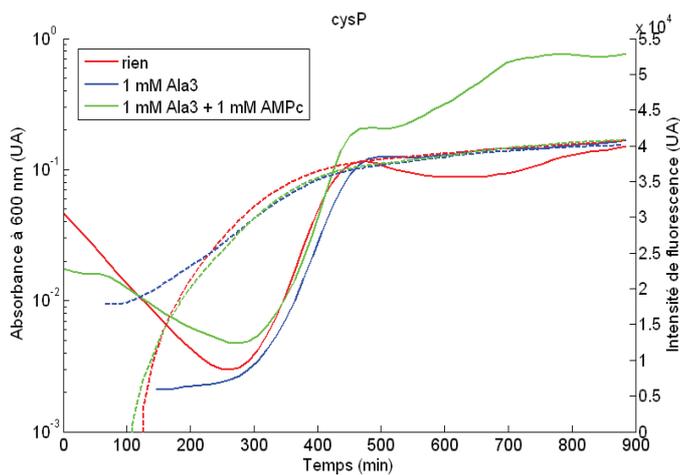
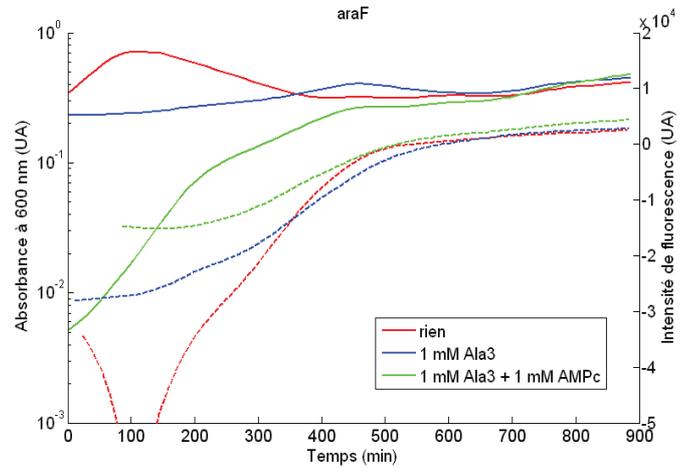
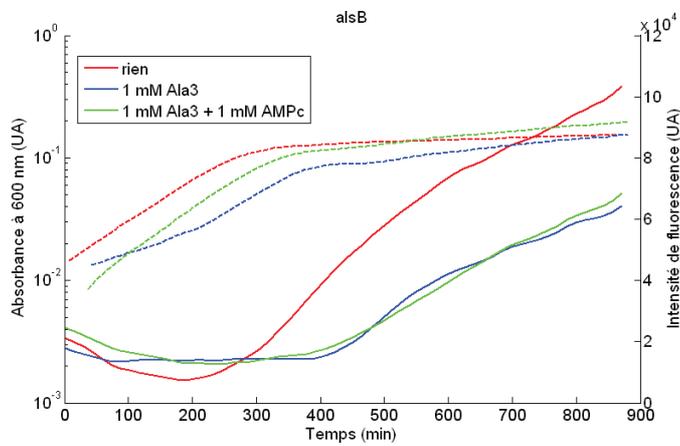
KRGV|RGGAQ NMCV|KKN I FLYIFSLYTR VSRALCVSL? ?
1761 AAGTAGGGC AATGTAATAA TTTATTCTAC GTCGCTGTCT G

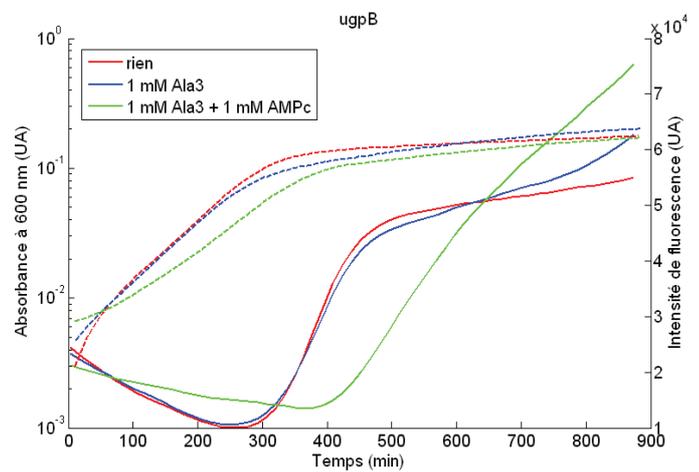
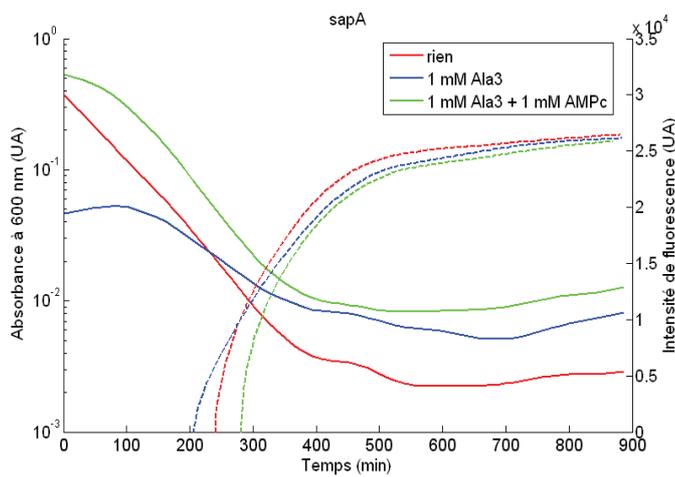
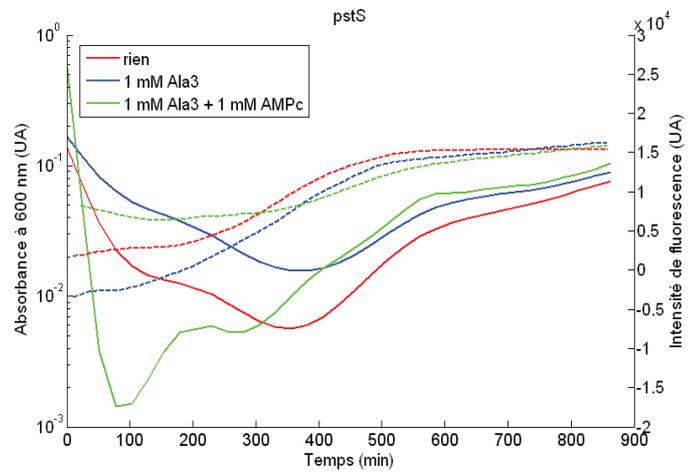
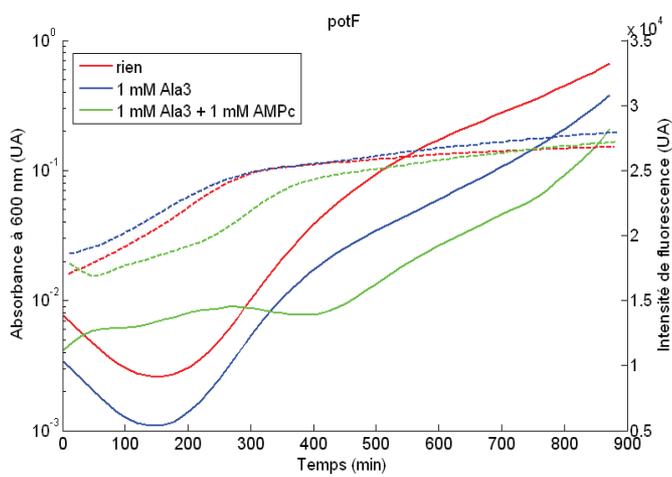
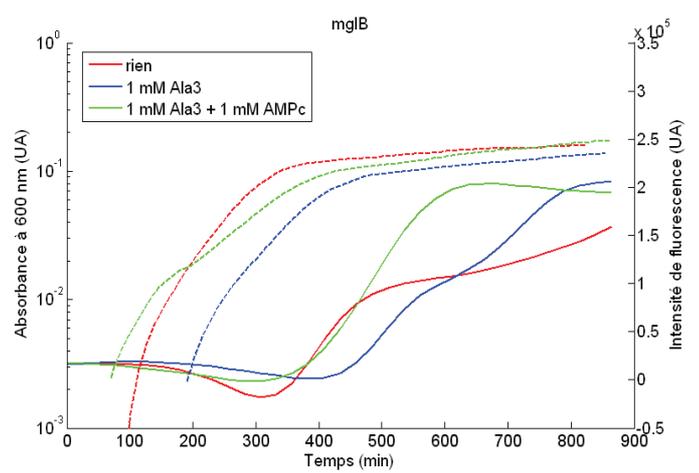
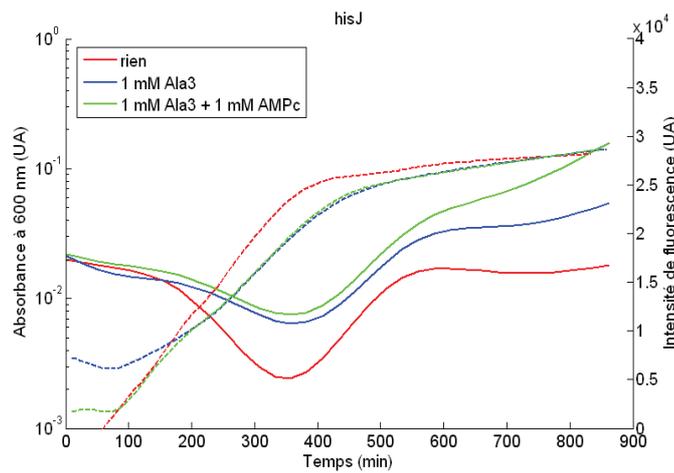
Insertion du transposon dans le mutant 2.5

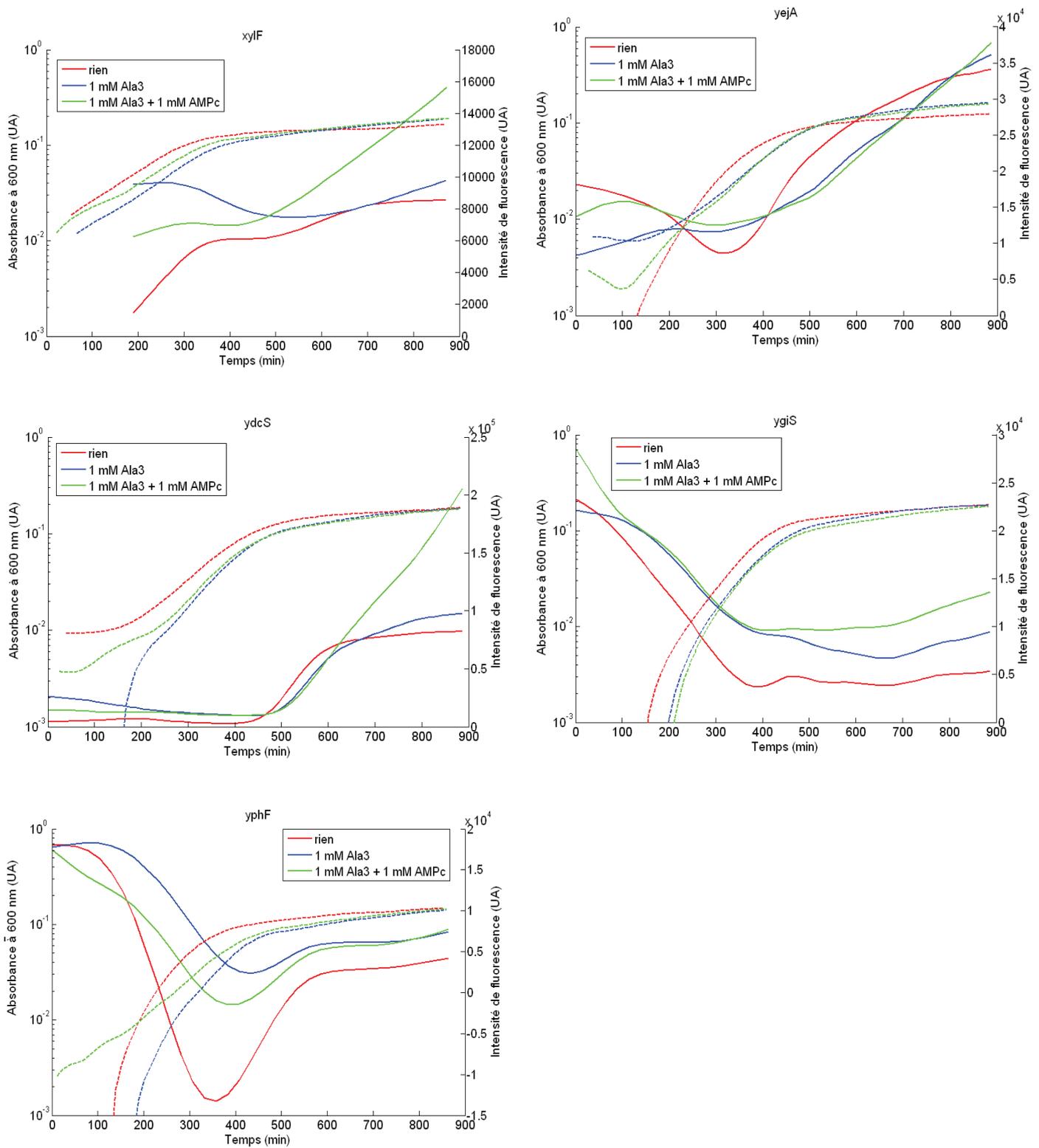
Insertion du transposon dans le mutant 1.87

Le lieu d'insertion du transposon dans chacun des mutants 1.87 et 2.5 est indiqué sur cette séquence du gène *oppA*.

Annexe 4 : expression de différents transporteurs en présence de trialanine







L'expression de différents gènes codant pour un transporteur a été suivie. Les clones sont issus de la collection Alon (Zaslaver et al. 2006). Une pré-culture de 15 heures en milieu minimum M9 complétementé avec 0,3% de glucose est diluée 300 fois dans du milieu M9 complétementé avec 0,03% de glucose. La croissance (trait pointillé) et la fluorescence (trait plein) sont suivies pendant 900 minutes.

VIII- Bibliographie

- About, M. and M. Burger (1971). "Cyclic 3';5' adenosine monophosphate-phosphodiesterase and the release of catabolite repression of beta-galactosidase by exogenous cyclic 3';5' adenosine monophosphate in *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **43**(1): 174-82.
- Acosta, M. B., R. C. Ferreira, G. Padilla, L. C. Ferreira and S. O. Costa (2000). "Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains." J Med Microbiol **49**(5): 409-13.
- Ahuja, N., P. Kumar and R. Bhatnagar (2004). "The adenylate cyclase toxins." Crit Rev Microbiol **30**(3): 187-96.
- Aiba, H. (1983). "Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene: CRP is a transcriptional repressor for its own gene." Cell **32**(1): 141-9.
- Aiba, H. (1985). "Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein." J Biol Chem **260**(5): 3063-70.
- Anderson, Schneider, Emmer, Perlman and Pastan (1971). "Purification of and Properties of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Receptor Protein which Mediates Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependent Gene Transcription in *Escherichia coli*." The Journal of Biological Chemistry **246**: 5929-37.
- Andrews, J. C., T. C. Blevins and S. A. Short (1986). "Regulation of peptide transport in *Escherichia coli*: induction of the *trp*-linked operon encoding the oligopeptide permease." J Bacteriol **165**(2): 428-33.
- Andrews, J. C. and S. A. Short (1985). "Genetic analysis of *Escherichia coli* oligopeptide transport mutants." J Bacteriol **161**(2): 484-92.
- Andrews, J. C. and S. A. Short (1986). "*opp-lac* Operon fusions and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* *trp*-linked oligopeptide permease." J Bacteriol **165**(2): 434-42.
- Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E. G. Wagner, H. Margalit and S. Altuvia (2001). "Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*." Curr Biol **11**(12): 941-50.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.
- Bai, G., G. S. Knapp and K. A. McDonough (2011). "Cyclic AMP signalling in mycobacteria: redirecting the conversation with a common currency." Cell Microbiol **13**(3): 349-58.
- Balsalobre, C., J. Johansson and B. E. Uhlin (2006). "Cyclic AMP-dependent osmoregulation of *crp* gene expression in *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(16): 5935-44.
- Bartolome, B., Y. Jubete, E. Martinez and F. de la Cruz (1991). "Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives." Gene **102**(1): 75-8.
- Beatty, C. M., D. F. Browning, S. J. Busby and A. J. Wolfe (2003). "Cyclic AMP receptor protein-dependent activation of the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by a synergistic class III mechanism." J Bacteriol **185**(17): 5148-57.
- Bell, A., K. Gaston, R. Williams, K. Chapman, A. Kolb, H. Buc, S. Minchin, J. Williams and S. Busby (1990). "Mutations that alter the ability of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein to activate transcription." Nucleic Acids Res **18**(24): 7243-50.
- Belyaeva, T. A., J. T. Wade, C. L. Webster, V. J. Howard, M. S. Thomas, E. I. Hyde and S. J. Busby (2000). "Transcription activation at the *Escherichia coli* *melAB* promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein." Mol Microbiol **36**(1): 211-22.
- Berntsson, R. P., M. K. Doeven, F. Fusetti, R. H. Duurkens, D. Sengupta, S. J. Marrink, A. M. Thunnissen, B. Poolman and D. J. Slotboom (2009). "The structural basis for peptide selection by the transport receptor OppA." Embo J **28**(9): 1332-40.

- Berthet, J., T. W. Rall and E. W. Sutherland (1957). "The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates." *J Biol Chem* **224**(1): 463-75.
- Bettenbrock, K., T. Sauter, K. Jahreis, A. Kremling, J. W. Lengeler and E. D. Gilles (2007). "Correlation between growth rates, EIICrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **189**(19): 6891-900.
- Blazy, B., M. Takahashi and A. Baudras (1980). "Binding of CRP to DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*: modulation by cAMP of the interactions with free and DNA-bound holo and core enzyme." *Mol Biol Rep* **6**(1): 39-43.
- Bono, J. L., K. Tilly, B. Stevenson, D. Hogan and P. Rosa (1998). "Oligopeptide permease in *Borrelia burgdorferi*: putative peptide-binding components encoded by both chromosomal and plasmid loci." *Microbiology* **144 (Pt 4)**: 1033-44.
- Borezee, E., E. Pellegrini and P. Berche (2000). "OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival." *Infect Immun* **68**(12): 7069-77.
- Borner, S., F. Schwede, A. Schlipp, F. Berisha, D. Calebiro, M. J. Lohse and V. O. Nikolaev (2011). "FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells." *Nat Protoc* **6**(4): 427-38.
- Botsford, J. L. and J. G. Harman (1992). "Cyclic AMP in prokaryotes." *Microbiol Rev* **56**(1): 100-22.
- Boyer, F., B. Besson, G. Baptist, J. Izard, C. Pinel, D. Ropers, J. Geiselmann and H. de Jong (2010). "WellReader: a MATLAB program for the analysis of fluorescence and luminescence reporter gene data." *Bioinformatics* **26**(9): 1262-3.
- Builder, S. E., J. A. Beavo and E. G. Krebs (1980). "Stoichiometry of cAMP and 1,N6-etheno-cAMP binding to protein kinase." *J Biol Chem* **255**(6): 2350-4.
- Busby, S. and R. H. Ebright (1999). "Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)." *J Mol Biol* **293**(2): 199-213.
- Chao, Y., K. Papenfort, R. Reinhardt, C. M. Sharma and J. Vogel (2012). "An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs." *Embo J* **31**(20): 4005-19.
- Chapon, C. and A. Kolb (1983). "Action of CAP on the malT promoter in vitro." *J Bacteriol* **156**(3): 1135-43.
- Chaudhuri, R. R. and I. R. Henderson (2012). "The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny." *Infect Genet Evol* **12**(2): 214-26.
- Chen, J., S. Sharma, F. A. Quioco and A. L. Davidson (2001). "Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1525-30.
- Chen, Y., Y. W. Ebright and R. H. Ebright (1994). "Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking." *Science* **265**(5168): 90-2.
- Chiang, S. L. and E. J. Rubin (2002). "Construction of a mariner-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting." *Gene* **296**(1-2): 179-85.
- Clermont, O., S. Bonacorsi and E. Bingen (2000). "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." *Appl Environ Microbiol* **66**(10): 4555-8.
- Cook, Lipkin and Markham (1957). "The formation of a cyclic dianhydrodiadenylic acid (I) by the alkaline degradation of adenosine-5'-triphosphoric acid (II)." *J Am Chem Soc* **79**(13): 3607-8.
- Crother, T. R., C. I. Champion, J. P. Whitelegge, R. Aguilera, X. Y. Wu, D. R. Blanco, J. N. Miller and M. A. Lovett (2004). "Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin." *Infect Immun* **72**(9): 5063-72.

- Cui, Qasim and A. L. Davidson (2010). "Uncoupling substrate transport from ATP hydrolysis in the *Escherichia coli* maltose transporter." J Biol Chem **285**(51): 39986-93.
- Cundell, D. R., B. J. Pearce, J. Sandros, A. M. Naughton and H. R. Masure (1995). "Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells." Infect Immun **63**(7): 2493-8.
- Danielli, J. F. and D. Hugh (1935). "A contribution to the theory of permeability of thin films." J Cell Comp Physiol **5**(4): 495.
- Das, S., D. Shraga, C. Gannon, T. T. Lam, S. Feng, L. R. Brunet, S. R. Telford, S. W. Barthold, R. A. Flavell and E. Fikrig (1996). "Characterization of a 30-kDa *Borrelia burgdorferi* substrate-binding protein homologue." Res Microbiol **147**(9): 739-51.
- Dasgupta, A., K. Sureka, D. Mitra, B. Saha, S. Sanyal, A. K. Das, P. Chakrabarti, M. Jackson, B. Gicquel, M. Kundu and J. Basu (2010). "An oligopeptide transporter of *Mycobacterium tuberculosis* regulates cytokine release and apoptosis of infected macrophages." PLoS One **5**(8): e12225.
- Davidson, A. L. (2002). "Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters." J Bacteriol **184**(5): 1225-33.
- Davies, T. G., R. E. Hubbard and J. R. Tame (1999). "Relating structure to thermodynamics: the crystal structures and binding affinity of eight OppA-peptide complexes." Protein Sci **8**(7): 1432-44.
- de Crombrughe, B., S. Busby and H. Buc (1984). "Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation." Science **224**(4651): 831-8.
- De Felice, M., J. Guardiola, A. Lamberti and M. Iaccarino (1973). "*Escherichia coli* K-12 mutants altered in the transport systems for oligo- and dipeptides." J Bacteriol **116**(2): 751-6.
- Detmers, F. J., E. R. Kunji, F. C. Lanfermeijer, B. Poolman and W. N. Konings (1998). "Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*." Biochemistry **37**(47): 16671-9.
- Detmers, F. J., F. C. Lanfermeijer, R. Abele, R. W. Jack, R. Tampe, W. N. Konings and B. Poolman (2000). "Combinatorial peptide libraries reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12487-92.
- Deutscher, J., C. Francke and P. W. Postma (2006). "How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 939-1031.
- Doeven, M. K., R. Abele, R. Tampe and B. Poolman (2004). "The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter." J Biol Chem **279**(31): 32301-7.
- Doeven, M. K., G. van den Bogaart, V. Krasnikov and B. Poolman (2008). "Probing receptor-translocator interactions in the oligopeptide ABC transporter by fluorescence correlation spectroscopy." Biophys J **94**(10): 3956-65.
- Donoso-Pardo, J. L., P. C. Turner and R. W. King (1987). "Cyclic nucleotide binding to cAMP receptor protein from *Escherichia coli*. Optical and ligand-binding studies." Eur J Biochem **168**(3): 687-94.
- Eagon, R. G., T. W. Hodge, 3rd, J. B. Rake and J. M. Yarbrough (1979). "The effect of phenazine methosulfate-ascorbate on bacterial active transport and adenosine triphosphate formation: inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and stimulation of *Escherichia coli*." Can J Microbiol **25**(7): 798-802.
- Easton, J. A., P. Thompson and M. W. Crowder (2006). "Time-dependent translational response of *E. coli* to excess Zn(II)." J Biomol Tech **17**(5): 303-7.
- Ebright, R. H. (1993). "Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters." Mol Microbiol **8**(5): 797-802.

- Ebright, R. H., Y. W. Ebright and A. Gunasekera (1989). "Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site." Nucleic Acids Res **17**(24): 10295-305.
- Enright, M. C. and B. G. Spratt (1999). "Multilocus sequence typing." Trends Microbiol **7**(12): 482-7.
- Fenno, J. C., M. Tamura, P. M. Hannam, G. W. Wong, R. A. Chan and B. C. McBride (2000). "Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment." Infect Immun **68**(4): 1884-92.
- Feucht, B. U. and M. H. Saier, Jr. (1980). "Fine control of adenylate cyclase by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **141**(2): 603-10.
- Fried, M. G. and D. M. Crothers (1983). "CAP and RNA polymerase interactions with the lac promoter: binding stoichiometry and long range effects." Nucleic Acids Res **11**(1): 141-58.
- Gaston, K., A. Bell, A. Kolb, H. Buc and S. Busby (1990). "Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP." Cell **62**(4): 733-43.
- Goldenbaum, P. E. and G. A. Hall (1979). "Transport of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate across *Escherichia coli* vesicle membranes." J Bacteriol **140**(2): 459-67.
- Gominet, M., L. Slamti, N. Gilois, M. Rose and D. Lereclus (2001). "Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence." Mol Microbiol **40**(4): 963-75.
- Goodell, E. W. and C. F. Higgins (1987). "Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(8): 3861-5.
- Gorter, E. and F. Grendel (1925). "On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood." J Exp Med **41**(4): 439-43.
- Gosset, G., Z. Zhang, S. Nayyar, W. A. Cuevas and M. H. Saier, Jr. (2004). "Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(11): 3516-24.
- Guedon, E., P. Serror, S. D. Ehrlich, P. Renault and C. Delorme (2001). "Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*." Mol Microbiol **40**(5): 1227-39.
- Guyer, C. A., D. G. Morgan, N. Osheroff and J. V. Staros (1985). "Purification and characterization of a periplasmic oligopeptide binding protein from *Escherichia coli*." J Biol Chem **260**(19): 10812-8.
- Guyer, C. A., D. G. Morgan and J. V. Staros (1986). "Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*." J Bacteriol **168**(2): 775-9.
- Hanamura, A. and H. Aiba (1992). "A new aspect of transcriptional control of the *Escherichia coli* *crp* gene: positive autoregulation." Mol Microbiol **6**(17): 2489-97.
- Hantke, K., K. Winkler and J. E. Schultz (2011). "*Escherichia coli* Exports Cyclic AMP via TolC." J Bacteriol **193**(5): 1086-9.
- Harwood, J. P. and A. Peterkofsky (1975). "Glucose-sensitive adenylate cyclase in toluene-treated cells of *Escherichia coli* B." J Biol Chem **250**(12): 4656-62.
- Henrich, B., R. C. Feldmann and U. Hadding (1993). "Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*." Infect Immun **61**(7): 2945-51.
- Henrich, B., M. Hopfe, A. Kitzerow and U. Hadding (1999). "The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an opp operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*." J Bacteriol **181**(16): 4873-8.

- Heyduk, T. and J. C. Lee (1989). "*Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities." Biochemistry **28**(17): 6914-24.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.
- Higgins, C. F., M. M. Hardie, D. Jamieson and L. M. Powell (1983). "Genetic map of the opp (Oligopeptide permease) locus of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **153**(2): 830-6.
- Hiles, I. D., M. P. Gallagher, D. J. Jamieson and C. F. Higgins (1987). "Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **195**(1): 125-42.
- Hiles, I. D. and C. F. Higgins (1986). "Peptide uptake by *Salmonella typhimurium*. The periplasmic oligopeptide-binding protein." Eur J Biochem **158**(3): 561-7.
- Hirakawa, H., Y. Inazumi, Y. Senda, A. Kobayashi, T. Hirata, K. Nishino and A. Yamaguchi (2006). "N-acetyl-d-glucosamine induces the expression of multidrug exporter genes, mdtEF, via catabolite activation in *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(16): 5851-8.
- Hiron, A., E. Borezee-Durant, J. C. Piard and V. Juillard (2007). "Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **189**(14): 5119-29.
- Hogarth, B. G. and C. F. Higgins (1983). "Genetic organization of the oligopeptide permease (opp) locus of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*." J Bacteriol **153**(3): 1548-51.
- Hong, M., J. Ahn, S. Yoo, J. Hong, E. Lee, I. Yoon, J. K. Jung and H. Lee (2011). "Identification of novel immunogenic proteins in pathogenic *Haemophilus parasuis* based on genome sequence analysis." Vet Microbiol **148**(1): 89-92.
- Igarashi, K. and A. Ishihama (1991). "Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP." Cell **65**(6): 1015-22.
- Igarashi, K., T. Saisho, M. Yuguchi and K. Kashiwagi (1997). "Molecular mechanism of polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein." J Biol Chem **272**(7): 4058-64.
- Imamura, R., K. Yamanaka, T. Ogura, S. Hiraga, N. Fujita, A. Ishihama and H. Niki (1996). "Identification of the cpdA gene encoding cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*." J Biol Chem **271**(41): 25423-9.
- Inada, T., H. Takahashi, T. Mizuno and H. Aiba (1996). "Down regulation of cAMP production by cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: an assessment of the contributions of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase." Mol Gen Genet **253**(1-2): 198-204.
- Jackson, D. W., J. W. Simecka and T. Romeo (2002). "Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation." J Bacteriol **184**(12): 3406-10.
- Jamieson, D. J. and C. F. Higgins (1984). "Anaerobic and leucine-dependent expression of a peptide transport gene in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **160**(1): 131-6.
- Janecek, J., J. Naprstek, Z. Dobrova, M. Jiresova and J. Spizek (1980). "Characterization of adenylate cyclase from *Escherichia coli*." Folia Microbiol (Praha) **25**(5): 361-8.
- Jin, R., K. A. Sharif and J. S. Krakow (1995). "Evidence for contact between the cyclic AMP receptor protein and the delta 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." J Biol Chem **270**(33): 19213-6.
- Joseph, E., C. Bernsley, N. Guiso and A. Ullmann (1982). "Multiple regulation of the activity of adenylate cyclase in *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **185**(2): 262-8.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-40.
- Kashiwagi, K., A. Miyaji, S. Ikeda, T. Tobe, C. Sasakawa and K. Igarashi (1992). "Increase of sensitivity to aminoglycoside antibiotics by polyamine-induced protein (oligopeptide-binding protein) in *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(13): 4331-7.

- Kashiwagi, K., M. H. Tsuchioka, K. Sakata, T. Saisho, A. Igarashi, S. O. da Costa and K. Igarashi (1998). "Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein." *J Bacteriol* **180**(20): 5484-8.
- Kashiwagi, K., Y. Yamaguchi, Y. Sakai, H. Kobayashi and K. Igarashi (1990). "Identification of the polyamine-induced protein as a periplasmic oligopeptide binding protein." *J Biol Chem* **265**(15): 8387-91.
- Kauffmann, F. (1947). "The serology of the coli group." *J Immunol* **57**(1): 71-100.
- Kim, H. S., S. M. Kim, H. J. Lee, S. J. Park and K. H. Lee (2009). "Expression of the *cpdA* gene, encoding a 3',5'-cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase, is positively regulated by the cAMP-cAMP receptor protein complex." *J Bacteriol* **191**(3): 922-30.
- Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga and H. Mori (2005). "Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research." *DNA Res* **12**(5): 291-9.
- Klepsch, M. M., M. Kovermann, C. Low, J. Balbach, H. P. Permentier, F. Fusetti, J. W. de Gier, D. J. Slotboom and R. P. Berntsson (2011). "*Escherichia coli* peptide binding protein OppA has a preference for positively charged peptides." *J Mol Biol* **414**(1): 75-85.
- Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges and S. Adhya (1993). "Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein." *Annu Rev Biochem* **62**: 749-95.
- Kornacki, J. A. and D. B. Oliver (1998). "Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters." *Infect Immun* **66**(9): 4115-22.
- Koronakis, V., J. Eswaran and C. Hughes (2004). "Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs." *Annu Rev Biochem* **73**: 467-89.
- Kunji, E. R., A. Hagting, C. J. De Vries, V. Juillard, A. J. Haandrikman, B. Poolman and W. N. Konings (1995). "Transport of beta-casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*." *J Biol Chem* **270**(4): 1569-74.
- Lampe, D. J., B. J. Akerley, E. J. Rubin, J. J. Mekalanos and H. M. Robertson (1999). "Hyperactive transposase mutants of the Himar1 mariner transposon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11428-33.
- Landis, L., J. Xu and R. C. Johnson (1999). "The cAMP receptor protein CRP can function as an osmoregulator of transcription in *Escherichia coli*." *Genes Dev* **13**(23): 3081-91.
- Lanfermeijer, F. C., F. J. Detmers, W. N. Konings and B. Poolman (2000). "On the binding mechanism of the peptide receptor of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*." *Embo J* **19**(14): 3649-56.
- Lanfermeijer, F. C., A. Picon, W. N. Konings and B. Poolman (1999). "Kinetics and consequences of binding of nona- and dodecapeptides to the oligopeptide binding protein (OppA) of *Lactococcus lactis*." *Biochemistry* **38**(44): 14440-50.
- Lazazzera, B. A., J. M. Solomon and A. D. Grossman (1997). "An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*." *Cell* **89**(6): 917-25.
- Lenny, A. B. and P. Margolin (1980). "Locations of the opp and supX genes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **143**(2): 747-52.
- Leppla, S. H. (1984). "*Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells." *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**: 189-98.
- Levine, M. M. (1987). "*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent." *J Infect Dis* **155**(3): 377-89.
- Li, Y., S. K. Ahluwalia, A. Borovkov, A. Loskutov, C. Wang, D. Gao, A. Poudel, K. F. Sykes and B. Kaltenboeck (2010). "Novel *Chlamydia pneumoniae* vaccine candidates confirmed by Th1-enhanced genetic immunization." *Vaccine* **28**(6): 1598-605.

- Lin, B., S. A. Short, M. Eskildsen, M. S. Klempner and L. T. Hu (2001). "Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of *Borrelia burgdorferi*: a complementation model in opp(-) *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1499**(3): 222-31.
- Liu, M., S. Garges and S. Adhya (2004). "lacP1 promoter with an extended -10 motif. Pleiotropic effects of cyclic AMP protein at different steps of transcription initiation." J Biol Chem **279**(52): 54552-7.
- Lobell, R. B. and R. F. Schleif (1991). "AraC-DNA looping: orientation and distance-dependent loop breaking by the cyclic AMP receptor protein." J Mol Biol **218**(1): 45-54.
- Lutz, R. and H. Bujard (1997). "Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements." Nucleic Acids Res **25**(6): 1203-10.
- Majerfeld, I. H., D. Miller, E. Spitz and H. V. Rickenberg (1981). "Regulation of the synthesis of adenylate cyclase in *Escherichia coli* by the cAMP -- cAMP receptor protein complex." Mol Gen Genet **181**(4): 470-5.
- Makman, R. S. and E. W. Sutherland (1965). "Adenosine 3',5'-Phosphate in *Escherichia coli*." J Biol Chem **240**: 1309-14.
- Mao, B., M. R. Pear, J. A. McCammon and F. A. Quijcho (1982). "Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model." J Biol Chem **257**(3): 1131-3.
- Matin, A. and M. K. Matin (1982). "Cellular levels, excretion, and synthesis rates of cyclic AMP in *Escherichia coli* grown in continuous culture." J Bacteriol **149**(3): 801-7.
- McKay, D. B. and T. A. Steitz (1981). "Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA." Nature **290**(5809): 744-9.
- McKay, D. B., I. T. Weber and T. A. Steitz (1982). "Structure of catabolite gene activator protein at 2.9-Å resolution. Incorporation of amino acid sequence and interactions with cyclic AMP." J Biol Chem **257**(16): 9518-24.
- Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford and D. W. Holden (1997). "Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis." Mol Microbiol **26**(2): 399-407.
- Meighen, E. A. (1991). "Molecular biology of bacterial bioluminescence." Microbiol Rev **55**(1): 123-42.
- Mollegaard, N. E., P. B. Rasmussen, P. Valentin-Hansen and P. E. Nielsen (1993). "Characterization of promoter recognition complexes formed by CRP and CytR for repression and by CRP and RNA polymerase for activation of transcription on the *Escherichia coli* deoP2 promoter." J Biol Chem **268**(23): 17471-7.
- Monnet, V. (2003). "Bacterial oligopeptide-binding proteins." Cell Mol Life Sci **60**(10): 2100-14.
- Musso, R. E., R. Di Lauro, S. Adhya and B. de Crombrughe (1977). "Dual control for transcription of the galactose operon by cyclic AMP and its receptor protein at two interspersed promoters." Cell **12**(3): 847-54.
- Nakamatsu, E. H., E. Fujihira, R. C. Ferreira, A. Balan, S. O. Costa and L. C. Ferreira (2007). "Oligopeptide uptake and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* K12." FEMS Microbiol Lett **269**(2): 229-33.
- Narang, A. (2009). "Quantitative effect and regulatory function of cyclic adenosine 5'-phosphate in *Escherichia coli*." J Biosci **34**(3): 445-63.
- Nikaido, H. (1994). "Isolation of outer membranes." Methods Enzymol **235**: 225-34.
- Nishino, K., Y. Senda and A. Yamaguchi (2008). "CRP regulator modulates multidrug resistance of *Escherichia coli* by repressing the mdtEF multidrug efflux genes." J Antibiot (Tokyo) **61**(3): 120-7.
- Niu, W., Y. Kim, G. Tau, T. Heyduk and R. H. Ebright (1996). "Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase." Cell **87**(6): 1123-34.

- Nowalk, A. J., R. D. Gilmore, Jr. and J. A. Carroll (2006). "Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins." Infect Immun **74**(7): 3864-73.
- Okabayashi, T., A. Yoshimoto and M. Ide (1963). "Occurrence of Nucleotides in Culture Fluids of Microorganisms. V. Excretion of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate by *Brevibacterium Liquefaciens* Sp. N." J Bacteriol **86**: 930-6.
- Palmieri, G., A. Casbarra, I. Fiume, G. Catara, A. Capasso, G. Marino, S. Onesti and M. Rossi (2006). "Identification of the first archaeal oligopeptide-binding protein from the hyperthermophile *Aeropyrum pernix*." Extremophiles **10**(5): 393-402.
- Park, J. T., D. Raychaudhuri, H. Li, S. Normark and D. Mengin-Lecreulx (1998). "MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate." J Bacteriol **180**(5): 1215-23.
- Park, Y. H., B. R. Lee, Y. J. Seok and A. Peterkofsky (2006). "In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*." J Biol Chem **281**(10): 6448-54.
- Parkinson, G., C. Wilson, A. Gunasekera, Y. W. Ebright, R. H. Ebright and H. M. Berman (1996). "Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 angstroms resolution: a complete picture of the protein-DNA interface." J Mol Biol **260**(3): 395-408.
- Pastan, I. and R. Perlman (1970). "Cyclic adenosine monophosphate in bacteria." Science **169**(3943): 339-44.
- Payne, J. W. (1968). "Oligopeptide transport in *Escherichia coli*. Specificity with respect to side chain and distinction from dipeptide transport." J Biol Chem **243**(12): 3395-403.
- Payne, J. W. and G. Bell (1979). "Direct determination of the properties of peptide transport systems in *Escherichia coli*, using a fluorescent-labeling procedure." J Bacteriol **137**(1): 447-55.
- Payne, J. W. and C. Gilvarg (1968). "The role of the terminal carboxyl group on peptide transport in *Escherichia coli*." J Biol Chem **243**(2): 335-40.
- Payne, J. W. and C. Gilvarg (1968). "Size restriction on peptide utilization in *Escherichia coli*." J Biol Chem **243**(23): 6291-9.
- Pearce, B. J., A. M. Naughton and H. R. Masure (1994). "Peptide permeases modulate transformation in *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol **12**(6): 881-92.
- Peltoniemi, K., E. Vesanto and A. Palva (2002). "Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus." Arch Microbiol **177**(6): 457-67.
- Perego, M., C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher and J. A. Hoch (1991). "The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation." Mol Microbiol **5**(1): 173-85.
- Perlman, R. L., B. De Crombrughe and I. Pastan (1969). "Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *E. coli*." Nature **223**(5208): 810-2.
- Perrenoud, A. and U. Sauer (2005). "Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(9): 3171-9.
- Perry, D. and C. Gilvarg (1984). "Spectrophotometric determination of affinities of peptides for their transport systems in *Escherichia coli*." J Bacteriol **160**(3): 943-8.
- Peterkofsky, A. and C. Gazdar (1975). "Interaction of enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system with adenylate cyclase of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(8): 2920-4.
- Picon, A., E. R. Kunji, F. C. Lanfermeijer, W. N. Konings and B. Poolman (2000). "Specificity mutants of the binding protein of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*." J Bacteriol **182**(6): 1600-8.
- Polayes, D. A., P. W. Rice, M. M. Garner and J. E. Dahlberg (1988). "Cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein as a repressor of transcription of the *spf* gene of *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(7): 3110-4.

- Popovych, N., S. R. Tzeng, M. Tonelli, R. H. Ebright and C. G. Kalodimos (2009). "Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 6927-32.
- Pulvermacher, S. C., L. T. Stauffer and G. V. Stauffer (2008). "The role of the small regulatory RNA GcvB in GcvB/mRNA posttranscriptional regulation of oppA and dppA in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **281**(1): 42-50.
- Pulvermacher, S. C., L. T. Stauffer and G. V. Stauffer (2009). "Role of the *Escherichia coli* Hfq protein in GcvB regulation of oppA and dppA mRNAs." Microbiology **155**(Pt 1): 115-23.
- Reddy, P. and M. Kamireddi (1998). "Modulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase activity by catalytic-site mutants of protein IIA(Glc) of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system." J Bacteriol **180**(3): 732-6.
- Reddy, P., D. Miller and A. Peterkofsky (1986). "Stimulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase activity by elongation factor Tu, a GTP-binding protein essential for protein synthesis." J Biol Chem **261**(25): 11448-51.
- Reddy, P., A. Peterkofsky and K. McKenney (1985). "Translational efficiency of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene: mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in increased gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5656-60.
- Reddy, P., A. Peterkofsky and K. McKenney (1989). "Hyperexpression and purification of *Escherichia coli* adenylate cyclase using a vector designed for expression of lethal gene products." Nucleic Acids Res **17**(24): 10473-88.
- Richarme, G. and T. D. Caldas (1997). "Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins." J Biol Chem **272**(25): 15607-12.
- Rosner, J. L. and R. G. Martin (2009). "An excretory function for the *Escherichia coli* outer membrane pore TolC: upregulation of marA and soxS transcription and Rob activity due to metabolites accumulated in tolC mutants." J Bacteriol **191**(16): 5283-92.
- Rostoks, N., S. Park and H. E. Choy (2000). "Reiterative transcription initiation from galP2 promoter of *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1491**(1-3): 185-95.
- Rostom, A. A., J. R. Tame, J. E. Ladbury and C. V. Robinson (2000). "Specificity and interactions of the protein OppA: partitioning solvent binding effects using mass spectrometry." J Mol Biol **296**(1): 269-79.
- Rudner, D. Z., J. R. LeDeaux, K. Ireton and A. D. Grossman (1991). "The spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence." J Bacteriol **173**(4): 1388-98.
- Saier, M. H., Jr. and B. U. Feucht (1975). "Coordinate regulation of adenylate cyclase and carbohydrate permeases by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*." J Biol Chem **250**(17): 7078-80.
- Samen, U., B. Gottschalk, B. J. Eikmanns and D. J. Reinscheid (2004). "Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*." J Bacteriol **186**(5): 1398-408.
- Schmitz, A. (1981). "Cyclic AMP receptor proteins interacts with lactose operator DNA." Nucleic Acids Res **9**(2): 277-92.
- Schultz, S. C., G. C. Shields and T. A. Steitz (1991). "Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees." Science **253**(5023): 1001-7.
- Schwartz, D. and J. Beckwith (1970). The Lac operon.
- Secrist, J. A., 3rd, J. R. Barrio, N. J. Leonard, C. Villar-Palasi and A. G. Gilman (1972). "Fluorescent modification of adenosine 3',5'-monophosphate: spectroscopic properties and activity in enzyme systems." Science **177**(4045): 279-80.
- Secrist, J. A., 3rd, J. R. Barrio, N. J. Leonard and G. Weber (1972). "Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties." Biochemistry **11**(19): 3499-506.

- Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour and T. S. Whittam (1986). "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics." *Appl Environ Microbiol* **51**(5): 873-84.
- Sharma, C. M., F. Darfeuille, T. H. Plantinga and J. Vogel (2007). "A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites." *Genes Dev* **21**(21): 2804-17.
- Shimada, T., N. Fujita, K. Yamamoto and A. Ishihama (2011). "Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources." *PLoS One* **6**(6): e20081.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* **175**(4023): 720-31.
- Sinha, S., A. D. Cameron and R. J. Redfield (2009). "Sxy induces a CRP-S regulon in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **191**(16): 5180-95.
- Slamti, L. and D. Lereclus (2002). "A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group." *Embo J* **21**(17): 4550-9.
- Sleigh, S. H., P. R. Seavers, A. J. Wilkinson, J. E. Ladbury and J. R. Tame (1999). "Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein." *J Mol Biol* **291**(2): 393-415.
- Sleigh, S. H., J. R. Tame, E. J. Dodson and A. J. Wilkinson (1997). "Peptide binding in OppA, the crystal structures of the periplasmic oligopeptide binding protein in the unliganded form and in complex with lysyllysine." *Biochemistry* **36**(32): 9747-58.
- Slonczewski, J. L. and Foster (2008). *Microbiology : an evolving science*.
- Smith, M. W. and J. W. Payne (1992). "Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* **79**(1-3): 183-90.
- Smith, R. L., E. G. Archer and F. W. Dunn (1970). "Uptake of [¹⁴C]-labeled tri-, tetra-, and pentapeptides of phenylalanine and glycine by *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **245**(11): 2967-71.
- Staskawicz, B. J. and N. J. Panopoulos (1980). "Phaseolotoxin transport in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* via the oligopeptide permease." *J Bacteriol* **142**(2): 474-9.
- Suh, S. J., L. J. Runyen-Janecky, T. C. Maleniak, P. Hager, C. H. MacGregor, N. A. Zielinski-Mozny, P. V. Phibbs, Jr. and S. E. West (2002). "Effect of vfr mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **148**(Pt 5): 1561-9.
- Surtherland and T. W. Rall (1957). "The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon." *Journal of American Chemical Society* **79**(13): 3608-.
- Takahashi, M., B. Blazy and A. Baudras (1980). "An equilibrium study of the cooperative binding of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate to the adenosine cyclic 3',5'-monophosphate receptor protein from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **19**(22): 5124-30.
- Tame, J. R., E. J. Dodson, G. Murshudov, C. F. Higgins and A. J. Wilkinson (1995). "The crystal structures of the oligopeptide-binding protein OppA complexed with tripeptide and tetrapeptide ligands." *Structure* **3**(12): 1395-406.
- Tame, J. R., G. N. Murshudov, E. J. Dodson, T. K. Neil, G. G. Dodson, C. F. Higgins and A. J. Wilkinson (1994). "The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein." *Science* **264**(5165): 1578-81.
- Tanabe, M., H. S. Atkins, D. N. Harland, S. J. Elvin, A. J. Stagg, O. Mirza, R. W. Titball, B. Byrne and K. A. Brown (2006). "The ABC transporter protein OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection." *Infect Immun* **74**(6): 3687-91.

- Taniguchi, T., M. O'Neill and B. de Crombrughe (1979). "Interaction site of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein on DNA of galactose operon promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5090-4.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard and E. Denamur (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **8**(3): 207-17.
- Thomason, L. C., N. Costantino and D. L. Court (2007). "*E. coli* genome manipulation by P1 transduction." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 1**: Unit 1 17.
- Tian, F., L. Yang, F. Lv, X. Luo and Y. Pan (2011). "Why OppA protein can bind sequence-independent peptides? A combination of QM/MM, PB/SA, and structure-based QSAR analyses." Amino Acids **40**(2): 493-503.
- Tynkkynen, S., G. Buist, E. Kunji, J. Kok, B. Poolman, G. Venema and A. Haandrikman (1993). "Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*." J Bacteriol **175**(23): 7523-32.
- Ullmann, A. and J. Monod (1968). "Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*." FEBS Lett **2**(1): 57-60.
- Urbanowski, M. L., L. T. Stauffer and G. V. Stauffer (2000). "The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **37**(4): 856-68.
- Ushida, C. and H. Aiba (1990). "Helical phase dependent action of CRP: effect of the distance between the CRP site and the -35 region on promoter activity." Nucleic Acids Res **18**(21): 6325-30.
- W, M., S. N, S. Busby and T. M (2000). "The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit linker : length requirements for transcription activation at CRP-dependent promoters." Embo J **19**(7): 1555.
- Wang, B. and H. K. Kuramitsu (2005). "Inducible antisense RNA expression in the characterization of gene functions in *Streptococcus mutans*." Infect Immun **73**(6): 3568-76.
- Wang, X. G., B. Lin, J. M. Kidder, S. Telford and L. T. Hu (2002). "Effects of environmental changes on expression of the oligopeptide permease (*opp*) genes of *Borrelia burgdorferi*." J Bacteriol **184**(22): 6198-206.
- Weber, I. T. and T. A. Steitz (1987). "Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution." J Mol Biol **198**(2): 311-26.
- Williams, R. M., V. A. Rhodius, A. I. Bell, A. Kolb and S. J. Busby (1996). "Orientation of functional activating regions in the *Escherichia coli* CRP protein during transcription activation at class II promoters." Nucleic Acids Res **24**(6): 1112-8.
- Wu, T. K., Y. K. Wang, Y. C. Chen, J. M. Feng, Y. H. Liu and T. Y. Wang (2007). "Identification of a *Vibrio furnissii* oligopeptide permease and characterization of its in vitro hemolytic activity." J Bacteriol **189**(22): 8215-23.
- Yang, J. K. and W. Epstein (1983). "Purification and characterization of adenylate cyclase from *Escherichia coli* K12." J Biol Chem **258**(6): 3750-8.
- Yohannes, E., D. M. Barnhart and J. L. Slonczewski (2004). "pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **186**(1): 192-9.
- Yoshida, M., K. Kashiwagi, G. Kawai, A. Ishihama and K. Igarashi (2001). "Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase sigma 28 subunit." J Biol Chem **276**(19): 16289-95.
- Yoshida, M., D. Meksuriyen, K. Kashiwagi, G. Kawai and K. Igarashi (1999). "Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon aug in oppa mRNA." J Biol Chem **274**(32): 22723-8.

- Zaslaver, A., A. Bren, M. Ronen, S. Itzkovitz, I. Kikoin, S. Shavit, W. Liebermeister, M. G. Surette and U. Alon (2006). "A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*." Nat Methods **3**(8): 623-8.
- Zhang, Z., G. Gosset, R. Barabote, C. S. Gonzalez, W. A. Cuevas and M. H. Saier, Jr. (2005). "Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(3): 980-90.
- Zheng, D., C. Constantinidou, J. L. Hobman and S. D. Minchin (2004). "Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling." Nucleic Acids Res **32**(19): 5874-93.
- Zhou, Y., P. S. Pendergrast, A. Bell, R. Williams, S. Busby and R. H. Ebright (1994). "The functional subunit of a dimeric transcription activator protein depends on promoter architecture." Embo J **13**(19): 4549-57.
- Zhou, Y., X. Zhang and R. H. Ebright (1993). "Identification of the activating region of catabolite gene activator protein (CAP): isolation and characterization of mutants of CAP specifically defective in transcription activation." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6081-5.
- Zubay, G., D. Schwartz and J. Beckwith (1970). "Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(1): 104-10.

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est une molécule très largement conservée dans le monde du vivant. Chez les bactéries, cette molécule signal est impliquée, entre autres, dans l'adaptation aux changements de milieu, au développement de la virulence, à la sporulation et la compétence. Bien qu'il fut démontré dans les années 1970 que cette molécule nécessitait un transporteur afin de traverser la membrane cellulaire, l'identité de celui-ci restait jusqu'à très récemment inconnue. Ce n'est qu'en 2011 que Hantke et ses collègues démontrèrent l'implication de la protéine TolC dans l'export de l'AMPC.

Au cours de ma thèse, j'ai démontré le rôle prépondérant du complexe Opp dans l'import d'AMPC chez *Escherichia coli*. Ce complexe, formé des protéines OppABCD et F, est connu pour transporter des oligopeptides et se trouve dans la membrane interne de nombreuses bactéries. Pour arriver à la conclusion de son implication dans le transport d'AMPC, une banque de mutants a été créée dans une souche ne produisant pas d'AMPC (*cyaA*⁻). Afin d'identifier le transporteur responsable de l'import de l'AMPC, différents cribles qui testent la présence de cette molécule dans la cellule, ont ensuite été réalisées sur ces clones. Après analyse des résultats obtenus, l'opéron *opp* a été pressenti comme étant nécessaire à l'entrée de l'AMPC dans la cellule. Le double mutant *cyaA*⁻*oppA*⁻ a été créé et de nouvelles expériences sont venues confirmer notre hypothèse. La protéine OppA a ensuite été surexprimée et purifiée pour nous permettre de faire des tests biochimiques d'interaction entre AMPC et OppA, basés sur la fluorescence émise par la protéine elle-même ou un homologue de l'AMPC, l' ϵ -AMPC. Ces expériences nous ont permis de confirmer l'interaction entre la protéine OppA et l'AMPC.

Le système Opp est donc le principal importateur d'AMPC chez *Escherichia coli*, mais il ne semble pas être l'unique transporteur impliqué. Un autre candidat très intéressant est le complexe Dpp, connu pour transporter les dipeptides. En effet, les expériences préliminaires effectuées démontrent une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPC dans une cellule *cyaA*⁻*dppA*⁻ comparée à celle observée dans une souche *cyaA*⁻.

Les travaux réalisés pendant ces trois dernières années permettent de conclure que le complexe Opp est le principal importateur d'AMPC, très probablement secondé par le complexe Dpp.

Mot-clés : adénosine monophosphate cyclique (AMPC), transport, système Opp

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is a signalling molecule conserved in all reigns of life. In bacteria, cAMP plays an important role in processes as diverse as the adaptation to a changing environment, the control of virulence, sporulation and competence. Although it has been proven in the 1970s that this molecule needs an active transporter to traverse the plasma membrane, the first one of these transporters was discovered only a few years ago. In 2011, Hantke et al have shown that the TolC protein is involved in the efflux of cAMP.

During my PhD work I have identified the Opp complex as a major player of cAMP import into *Escherichia coli*. This complex, composed of proteins called OppABCD and F, is known to transport oligopeptides across the inner membrane of numerous bacterial species. To prove the involvement of the Opp complex in cAMP transport, I have used transposon mutagenesis to generate a collection of random mutants in a strain that does not produce cAMP (*cyaA*⁻). Different screens were used to detect mutants with impaired transport of extracellular cAMP into the cell. The *opp* operon emerged as the most promising candidate from this screen. The double mutant *cyaA*⁻*oppA*⁻ was constructed and experiments designed to test the function of OppA confirmed our hypothesis. Subsequently, I overexpressed and purified OppA in order to perform biochemical experiments destined to measure the physical interaction between cAMP and OppA. I show that the Opp system is the major importer of cAMP in *Escherichia coli*. However, it seems that Opp is not the unique importer of cAMP. The other, very interesting candidate is the complex Dpp, known to transport dipeptides. Preliminary experiments revealed a decreased amount of cAMP in strain *cyaA*⁻*dppA*⁻ compared to strain *cyaA*⁻.

The experiments carried out during the last three years allow us to conclude that the Opp complex is the major importer of cAMP into *E. coli* and that the Dpp complex is probably a secondary transporter.

Keywords : cyclic adenosine monophosphate, (cAMP), transport, Opp system