



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Contribution à l'établissement de l'interactome de *Brucella melitensis*

Pegorer, Sarah

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Contribution à l'établissement de l'interactome de *Brucella melitensis***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Sarah PEGORER

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## Contribution à l'établissement de l'interactome de *Brucella melitensis*

PEGORER Sarah

### Résumé

La protéomique, ou étude du protéome (ensemble des protéines d'un organisme donné), prend chaque jour de plus en plus d'importance. La protéomique dite classique se focalise sur la caractérisation des protéines directement à partir d'extraits cellulaires de l'organisme d'intérêt. La protéomique inverse, quant à elle, consiste à introduire puis à exprimer de façon hétérologue des gènes d'un organisme d'intérêt dans des hôtes cellulaires comme la bactérie *Escherichia coli* ou la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette dernière approche s'avère particulièrement utile dans le cadre, par exemple, de l'étude d'interactions protéine-protéine. Nous l'avons donc utilisée pour amorcer l'étude de l'interactome de *Brucella melitensis*, bactérie pathogène vecteur de la brucellose, en vue d'établir une carte d'interactions protéine-protéine de cette espèce. La découverte de partenaires protéiques interagissant entre eux est essentielle à la compréhension des mécanismes cellulaires et contribue à modifier notre vision des phénomènes biologiques. Dans le cadre de ce travail, 39 ORFs ont été choisies pour leur capacité supposée à interagir sur base de données de la littérature ou en fonction de leur rôle biologique, puis ont été clonées dans des vecteurs d'expression par la technique de clonage GATEWAY™. Les interactions protéine-protéine ont été mises en évidence par la technique du double-hybride au moyen de trois gènes rapporteurs. Treize interactions spécifiques ont ainsi été révélées à l'issue de ce travail qui démontre donc l'efficacité de la méthode utilisée et la faisabilité de l'étude de l'interactome de *B. melitensis* à plus grande échelle, c'est-à-dire sur le protéome entier.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

**Promoteur:** Professeur J. Vandenhoute

**Co-promoteur :** Professeur J-J. Letesson

J'adresse tout d'abord mes plus sincères remerciements à mon promoteur, le Professeur J. Vandenhoute, pour son accueil au sein de son laboratoire ainsi que pour son dévouement sans limite et ses nombreux conseils.

Je remercie ensuite les membres du jury, les Professeurs M. Raes et B. Flamion, le Docteur A. Tibor, et M. J-F. Dierick, pour avoir prêté attention à ce manuscrit.

Je remercie également le Docteur M. Vidal pour nous avoir fourni les souches et les vecteurs.

Un grand merci à Vincent, mon tuteur, pour m'avoir suivie tout au long de ce mémoire. Merci pour tes nombreux conseils, pour tout le temps que tu m'as consacré et pour ta patience.

Merci à Ben et à Max pour leur soutien , leur aide ainsi que leur amitié.

Merci à Monique et Rose-Ma pour leur bonne humeur et leur rire caractéristique. Merci aussi à Sophie pour son soutien, son aide et son amitié, ainsi que Lionel et Méla. Merci à Godi de détendre l'atmosphère.

Je tiens également à remercier les *brucellistes* pour leur collaboration.

Je remercie particulièrement Frwed pour son énorme patience, son amitié et pour son aide. Merci à Gla, Géraldine, Sophie et les VTs pour leur soutien et leur amitié.

Et enfin, merci à mes parents ainsi que Xa pour leur soutien moral.



### Abréviations employées

3AT	3AminoTriazole
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
°C	Degré Centigrade
DO	Densité Optique
EDTA	EthylèneDiamine-TétraAcétate
g	Gramme
l	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
mg	Milligramme
µg	Microgramme
min	Minute
ml	Millilitre
µl	Microlitre
mM	Millimolaire
ORF	phase ouverte de lecture ; <u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>G</u> <u>F</u> rame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyEthylène Glycol
rpm	Tours par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
sec	Seconde
SS-DNA	ADN de sperme de saumon
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultra-Violet
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indoyl, βDgalactopyranoside.
YPD	Milieu Yeast Peptone Dextrose

# **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Importance nouvelle de l'interactome .....</b>	<b>1</b>
1.1. Afflux de génomes, transcriptomes et protéomes de bactéries .....	1
1.2. Le génome de <i>Brucella melitensis</i> .....	2
1.3. Stade ultérieur pour la compréhension : l'interactome .....	2
<b>2. L'approche double-hybride .....</b>	<b>3</b>
2.1. Principe .....	3
2.2. Limitations .....	4
2.3. Clonage de l' ORFéome par Gateway™ en vecteur AD et BD .....	5
<b>BUT DU TRAVAIL .....</b>	<b>7</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Principe du test double-hybride et outils nécessaires .....</b>	<b>8</b>
1.1. Principe du test double-hybride .....	8
1.2. Croisements .....	9
1.3. Les plasmides .....	9
1.3.1. Le plasmide « appât » pGBT9 .....	9
1.3.2. Le plasmide « proie » pACTII .....	9
<b>2. Etapes préliminaires: choix et clonage des ORFs .....</b>	<b>10</b>
2.1. ORFs .....	10
2.2. Clonage des ORFs .....	10
<b>3. Recherche d'interactions protéine-protéine par double-hybride .....</b>	<b>12</b>
3.1. Test préliminaires de quelques couples de protéines de <i>B. melitensis</i> censées interagir .....	12
3.2. Réalisation de la matrice d'interaction protéine-protéine .....	13
3.2.1. Transformation .....	13
3.2.2. Méthode de croisement .....	13
3.2.3. Analyse des résultats .....	14
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Interactions non-spécifiques .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Interactions spécifiques .....</b>	<b>20</b>
2.1. Interactions démontrées précédemment .....	20
a) Protéines impliquées dans la division cellulaire .....	20
b) L'interactome chez <i>H. pylori</i> .....	20
2.2. Etude d'interactions protéine-protéine au sein d'un complexe flagellaire .....	21
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>22</b>
<b>1. Matériel .....</b>	<b>22</b>
1.1. Les tampons .....	22
1.2. Les solutions .....	23
1.3. Souches et plasmide .....	25
1.3.1. Souche de bactérie .....	25
1.3.2. Souches de levures .....	25
1.3.3. Les plasmides .....	26
1.3.3.1 Le plasmide pGBT9 .....	26
1.3.3.2. Le plasmide pACTII .....	26



1.4. Milieux de culture.....	26
1.4.1. Milieux de culture bactériens.....	26
1.4.1.1. Milieu LB liquide.....	26
1.4.1.2. Milieu LB solide.....	27
1.4.1.3. Milieu SOB liquide.....	27
1.4.2. Milieux de culture levuriens.....	27
1.4.2.1. Milieu YPD liquide.....	27
1.4.2.2. Milieu minimum.....	28
1.4.2.3. Milieu synthétique.....	28
1.4.2.4. Milieu synthétique + 3AT.....	28
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>29</b>
2.1. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.....	29
2.1.1 Préparation de cellules compétentes.....	29
2.1.2 Transformation par choc thermique.....	29
2.2. Techniques relatives à l'utilisation de levures.....	30
2.2.1 Transformation par choc thermique.....	30
2.2.2. Technique de la réplique sur velours.....	30
2.2.3. Coloration en surcouche.....	31
2.3. Techniques relatives à l'ADN.....	31
2.3.1. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	31
2.3.2. Minipréparation d'ADN plasmidique.....	32
2.3.2.1. Minipréparation.....	32
2.3.2.2. Restriction d'ADN plasmidique.....	33
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>35</b>



# **INTRODUCTION**

## **1. Importance nouvelle de l'interactome**

### **1.1. Afflux de génomes, transcriptomes et protéomes de bactéries**

Le génome correspond à la totalité de l'ADN d'un individu ou d'une espèce. Ses cousins, le transcriptome et le protéome, correspondant respectivement à l'ensemble des ARN messagers et des protéines, font de plus en plus parler d'eux.

Le séquençage de génomes bactériens a pris ces dernières années beaucoup d'ampleur. On peut dénombrer à ce jour au moins quatre-vingt génomes totalement séquencés, parmi lesquels *E. coli* et *H. pylori*. Des milliers de gènes potentiels pour lesquels il n'existe aucune information fonctionnelle sont disponibles dans les banques de données. Le transcriptome et le protéome constituent respectivement le répertoire total (en fonction des conditions externes et internes) des transcrits et des protéines traduites d'un organisme ou cellule. Le développement en particulier de la protéomique vise au delà à attribuer une fonction à chaque protéine de l'organisme.

La protéomique classique se focalise sur la caractérisation des protéines exprimées *in vivo*, c'est-à-dire directement à partir d'extraits cellulaires d'un organisme d'intérêt. Cette stratégie se limite cependant à l'étude des protéines ayant un niveau d'expression élevé. Pour résoudre le problème des protéines à faible expression, une nouvelle stratégie a été mise sur pied : la protéomique inverse. Elle s'intéresse aux produits d'expression dont l'existence est prédite par les programmes de recherche en génomique mais dont l'expression sera assurée de façon hétérologue, voire acellulaire, ouvrant ainsi la porte à la caractérisation fonctionnelle.

Nous verrons plus loin que cette approche se montre aussi très utile dans le cadre d'études portant, par exemple, sur des interactions protéine-protéine où il s'agit de co-produire dans une cellule hôte des protéines partenaires potentiels et ce à des taux contrôlés.



## 1.2. Le génome de *Brucella melitensis*

*B. melitensis* est un cocobacille Gram négatif, non sporulant et aérobic strict. Cette bactérie est un pathogène intracellulaire facultatif responsable de la brucellose, une anthrozoonose à extension mondiale.

Il y a quelque mois s'est clôturé le séquençage de *B. melitensis* (DelVecchio *et al.* 2002). Dans ce cadre divers laboratoires, dont le nôtre, ont entrepris d'assigner une annotation, c'est-à-dire une fonction aux trois mille deux cents ORFs du génome de 3.3 Mb. 78% des ORFs ont une fonction assignée et sur les 22% restantes, environ 2/3 sont similaires à des protéines hypothétiques d'autres organismes et seulement 1/3 ne montre pas de séquence similaire avec d'autres protéines.

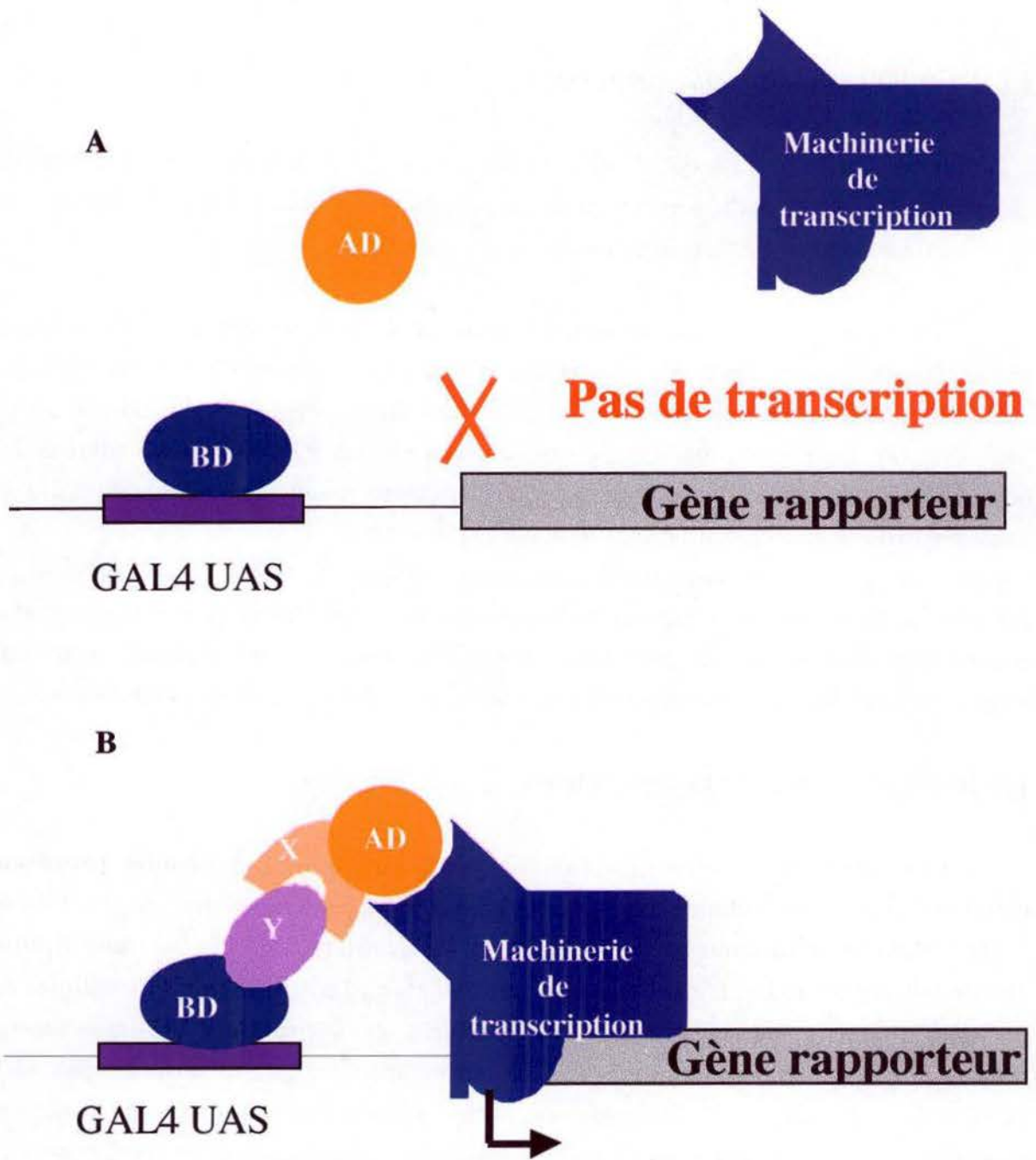
On sait que ce sont les réseaux d'interactions protéiques et leur combinatoire qui assurent la diversité des adaptations fonctionnelles cellulaires, or ces réseaux sont encore peu connus. La découverte de partenaires protéiques interagissant entre eux reste donc une étape à franchir pour la compréhension des mécanismes cellulaires.

## 1.3. Stade ultérieur pour la compréhension : l'interactome

Les interactions protéine-protéine sont intrinsèques à chaque processus cellulaire. Aussi l'importance des complexes multiples protéiques dans le contrôle du cycle cellulaire, le mécanisme de sécrétion, la réplication de l'ADN, la transcription, etc, ne fait pas de doute. L'établissement de véritables atlas fonctionnels de cellules est un des objectifs de la biologie moléculaire et cellulaire. Diverses cartes transcriptomiques (transcriptome), protéomiques (protéome), de localisation des ARN et protéines (localisome), des phénotypes associés à l'inactivation des fonctions (phéno) composent cet atlas futur. Une des cartes essentielles pour appréhender de manière intégrée, c'est-à-dire comprendre, la fonction des gènes est sans nul doute l'interactome.

Dans le cadre de ce projet, le but est d'établir une carte d'interaction protéine-protéine. Nous avons choisi *B. melitensis* en raison de l'intérêt porté à cette bactérie au laboratoire qui se justifie par la nature inconnue de certaines adaptations de ce pathogène et par son importance en santé publique. Une analyse protéomique et interactomique permettrait d'obtenir plus d'informations à propos notamment des interactions moléculaires nécessaires à diverses étapes adaptatives pour que la bactérie





**Figure I1 : Principe du double-hybride.**

**A** : L'activateur transcriptionnel GAL4 est composé d'un domaine de liaison à l'ADN (BD) et d'un domaine d'activation transcriptionnel (AD).

La séparation de ces deux domaines entraîne la perte de l'activation transcriptionnelle.

**B** : Lorsque la protéine d'intérêt (X) est fusionnée au domaine BD, et que cette protéine interagit avec un partenaire Y (fusionné au domaine AD), il y a restauration de l'activation transcriptionnelle, c'est-à-dire transcription du gène rapporteur.

puisse exercer son pouvoir pathogène et éventuellement d'imaginer des parades thérapeutiques nouvelles.

## **2. L'approche double-hybride**

Il existe plusieurs méthodes permettant de mettre en évidence les interactions protéiques (Phizicky et Fields, 1995). Citons les méthodes *in vitro* comme la chromatographie d'affinité où une protéine d'intérêt est fixée à un support solide. Le mélange protéique à tester est ensuite mis en contact avec ce support. Après plusieurs lavages, seules les protéines ayant une affinité suffisante pour la protéine d'intérêt restent fixées au support.

Une autre technique *in vitro* est la co-immunoprécipitation dont le principe est de précipiter la protéine d'intérêt avec toute autre macromolécule qui y est fixée au moyen d'anticorps.

Au rang des méthodes *in vivo* la technique du double-hybride occupe la place de choix.

Dans le cadre de l'élaboration de cartes d'interaction elle s'est révélée efficace notamment sur *C. elegans* (Walhout *et al*, 2000a) et sur *H. pylori* (Rain *et al*, 2001).

### **2.1. Principe**

Le système double-hybride est une méthode génétique qui utilise l'activité transcriptionnelle comme révélatrice d'une interaction protéine-protéine. Des transactivateurs, tel Gal4, sont constitués de deux domaines fonctionnels distincts : le domaine de transactivation ou AD et le domaine de liaison ou BD (Fig. I1). On peut concevoir que ces deux domaines soient physiquement séparables, biochimiquement, ou plus aisément, par génie génétique. La séparation physique de ces deux domaines entraîne la perte de fonction du transactivateur dans la mesure où le domaine de transactivation n'est pas capable de se lier à l'ADN et que le domaine de liaison ne peut à lui seul activer la transcription (figure I1a).

En liant également par génie génétique chacun d'eux à des protéines X et Y, il est possible de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel si les deux protéines candidates X et Y sont effectivement capables d'interagir l'une avec l'autre (BD-Y:X-AD) (figure I1b). L'expression de gènes rapporteurs sous contrôle du facteur Gal4 signalera la reconstitution par l'interaction de deux protéines hybrides.



La mise en œuvre de ce système requiert la construction de deux protéines hybrides : le domaine de liaison fusionné à une protéine d'intérêt Y, et le domaine de transactivation de la transcription fusionné à une protéine X. L'expression de ces deux hybrides est obtenue par transformation dans la levure.

Différentes approches peuvent être envisagées pour la mise en évidence d'interactions protéine-protéine en double-hybride.

Dans le cas de *C. elegans*, l'équipe de Monsieur M.Vidal a établi une matrice d'interaction double-hybride entre 29 ORFs fusionnées au domaine de liaison (BD-ORF) et ces mêmes ORFs fusionnées au domaine d'activation (AD-ORF) (Walhout *et al.* 2000a). Ces protéines de fusions ont ensuite été testées deux à deux pour leur capacité à interagir.

Dans le cas d'*H. pylori*, les protéines ont été trouvées lors d'un crible en testant une ORF clonée en appât contre une banque composée de fragments aléatoires d'ADN génomique clonée en proie. La banque a d'abord été obtenue chez *E. coli* et a ensuite été introduite dans la levure par transformation. Ce test révèle donc une interaction entre une protéine entière et généralement un fragment protéique.

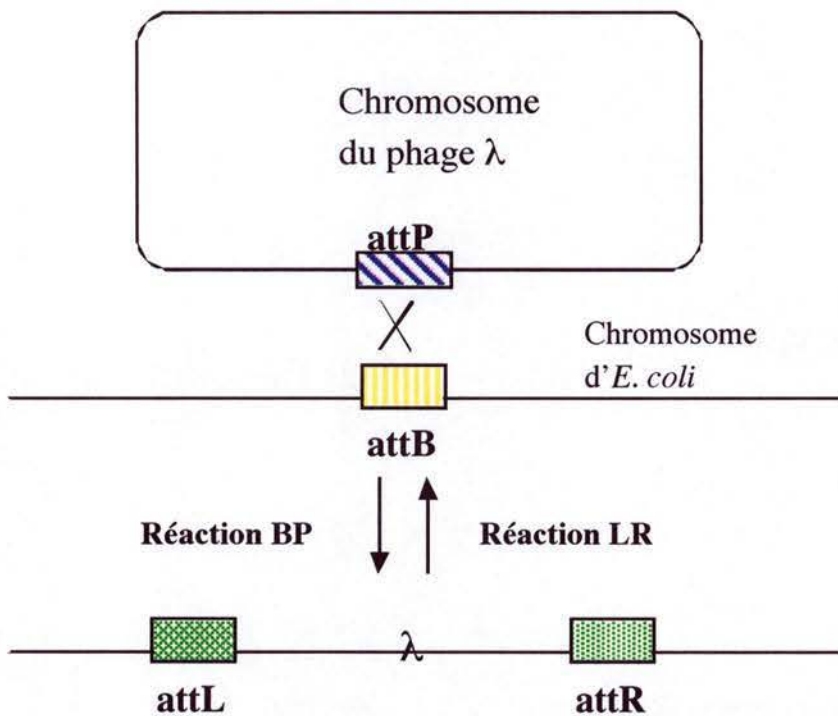
### 2.2. Limitations

Certaines protéines sont réfractaires à l'analyse dans le système double-hybride décrit ci-dessus. Il s'agit par exemple des protéines transmembranaires. En effet, certaines de ces protéines possèdent des séquences leur dictant la localisation en membrane. De ce fait leur translocation nucléaire, qu'exige le système double-hybride, aura donc moins de chance de se réaliser.

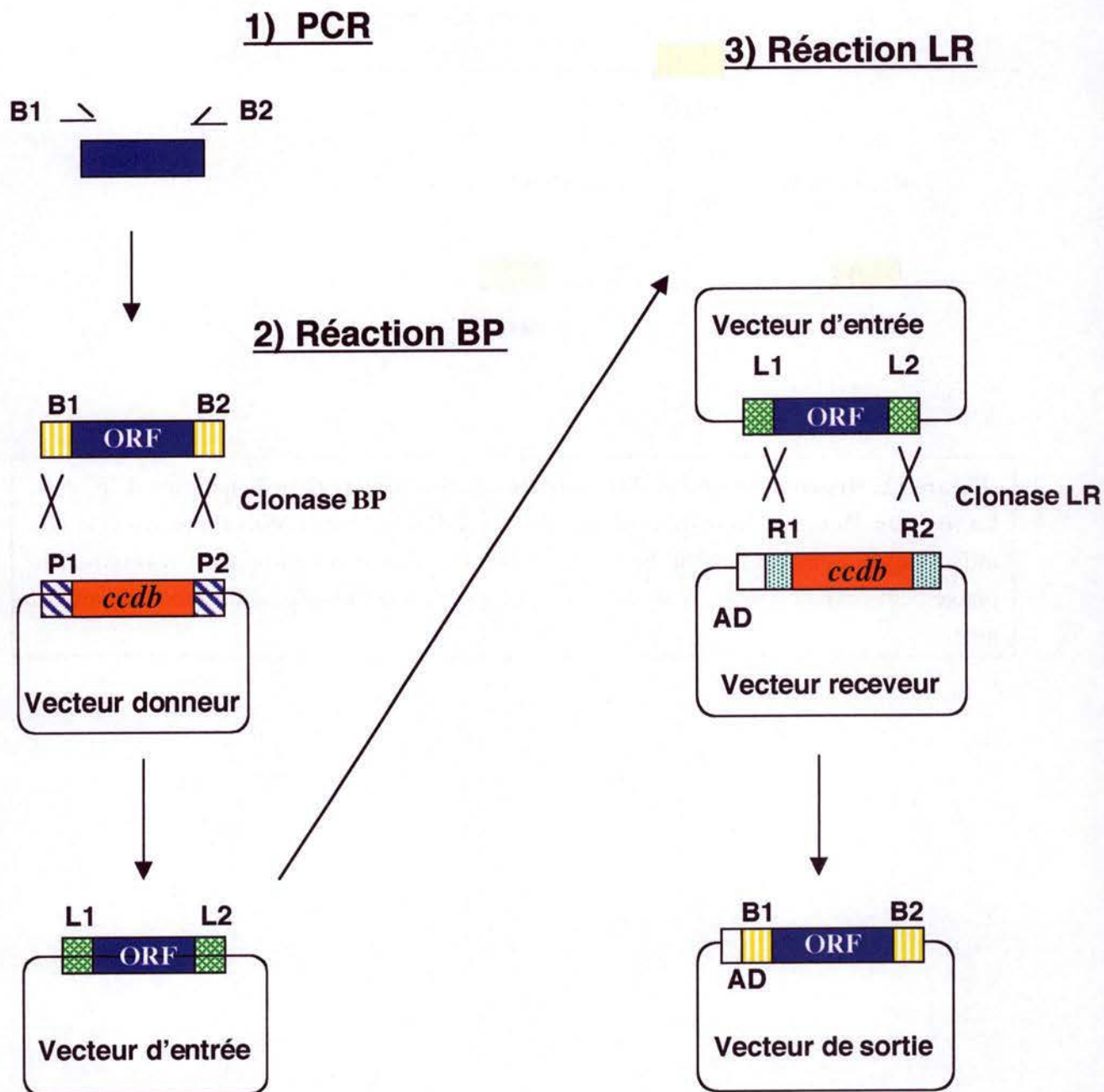
Un autre exemple concerne les protéines qui subissent des modifications post-traductionnelles qui ne se dérouleraient pas dans la levure. Si certaines interactions dépendent de ces modifications, elles ne seront pas détectées. Notons que les protéines fusionnées au domaine de Gal4 peuvent, en raison de cette fusion, ne plus être capables de se replier correctement dans la levure, ce qui peut conduire à empêcher l'interaction (faux négatifs) ou au contraire produire des interactions non spécifiques (faux positifs).

Enfin, les protéines capables d'activer seules la transcription, car elles constituent elles-mêmes des transactivateurs, donneront des résultats faux-positifs.





**Figure I2: Réactions de recombinaison du phage *Lambda* dans le génome d '*E. coli***  
 La réaction d'intégration se déroule entre le site attP situé dans l'ADN du phage et le site attB localisé dans le génome bactérien. Cette réaction d'intégration est réversible: le phage peut exciser son ADN de celui d'*E. coli* par recombinaison entre les sites attL et attR.



**Figure I3: Etapes de clonage GATEWAY™**

- 1) l'ORF est flanquée de sites attB au moyen d'une réaction PCR
- 2) les sites attB permettent la recombinaison avec les sites attP d'un vecteur donneur, on obtient un vecteur d'entrée où l'ORF est flanquée des sites attL
- 3) l'ORF peut être clonée dans un vecteur de sortie par recombinaison entre les sites attL et attR



### 2.3. Clonage de l'ORFéome par GATEWAY™ en vecteur AD et BD

La réalisation de test double-hybride à grande échelle nécessite le clonage de chaque ORF<sup>1</sup> dans un plasmide contenant la séquence BD, ainsi que dans un plasmide possédant la séquence AD. La technique de clonage utilisée est GATEWAY™ (Walhout *et al*, 2000b), qui combine la plupart des caractéristiques nécessaire à un clonage efficace à grande échelle (robotisable) d'ORFéome.

Cette technique autorise à la fois le clonage initial des ORFs et leur transfert ultérieur dans différents vecteurs d'expression par recombinaison homologue *in vitro*. GATEWAY™ utilise la réaction de recombinaison qui permet naturellement l'intégration du phage *Lambda* à l'intérieur du génome d'*E. coli*, puis son excision pour reformer un ADN circulaire (figure I2). Schématiquement l'intégration implique la recombinaison de sites attP de l'ADN à cloner avec les sites attB du vecteur d'entrée. Cela génère un vecteur d'entrée avec insert, flanqué de nouveaux sites appelés attL et attR. Une nouvelle réaction (de type excision) baptisée LR permettra de transférer l'insert dans un nouveau vecteur de destination de notre choix. Dans notre cas, il s'agit soit du vecteur AD soit du vecteur BD pour le système double-hybride.

Le système GATEWAY dérivé peut être décrit schématiquement comme suit (figure I3).

Le clonage d'ORFs est constitué de trois étapes : premièrement flanquer l'ORF de deux sites attB légèrement différents (attB1 et attB2). Cette première étape est réalisée au moyen d'une réaction PCR utilisant une paire d'amorces dont les extrémités 5' sont constituées par les séquences attB1 et attB2. Deuxièmement, ces sites attB servent à la recombinaison avec un vecteur donneur qui possède un région échangeable flanquée des sites attP1 et attP2. Les sites attB étant homologues mais légèrement différents, attB1 ne pourra recombiner qu'avec attP1 et attB2 avec attP2. On obtient alors des clones d'entrée où l'ORF est maintenant flanquée de sites attL1 et attL2. Lors de la troisième étape, l'ORF contenue dans le vecteur d'entrée pourra être clonée dans toute une série de vecteurs de sortie (vecteur double-hybride,...) par recombinaison entre les sites attR (vecteur d'entrée) et les sites attL (vecteur de sortie).

---

(1) L'ensemble des ORFs (acronyme de Open Reading Frame) d'un organisme constitue ce qu'on appelle l'orféome.



## INTRODUCTION

Le système GATEWAY™ nous permettra de cloner l'ensemble de l'ORFéome d'un organisme à partir duquel l'interactome pourra être entrepris.

**BUT DU TRAVAIL**

## BUT DU TRAVAIL

Le séquençage du génome de *B. melitensis*, bactérie pathogène, s'est achevé il y a quelques mois. Compte tenu de cette connaissance nouvelle et de l'identification *in silico* de l'ensemble des ORFs (environ 3000 ont été annotées) les approches physiogénomiques à haut débit peuvent être entreprises.

Pour détecter les interactions protéine-protéine au sein du protéome, information d'importance centrale à la compréhension de la physiologie de toute cellule, nous avons opté pour la technique du double-hybride. Le but est de réaliser une expérience pilote sur une quarantaine d'ORFs. Ces ORFs ont été choisies sur base de connaissances théoriques, pour leur capacité supposée à interagir entre elles ou sur base d'interactions démontrées chez *H. pylori*. Nous allons donc établir une carte d'interaction protéine-protéine sur base des quarante ORFs choisies.



# **RESULTATS**

## 1. Principe du test double-hybride et outils nécessaires

### 1.1. Principe du test double-hybride

Le transactivateur Gal 4 est constitué de deux domaines fonctionnellement distincts: le domaine de liaison et le domaine d'activation (figure I1). La séparation physique de ces deux domaines entraîne une perte de fonction du transactivateur. La réalisation d'un test double-hybride nécessite la construction d'un plasmide « appât » encodant le produit de la fusion traductionnelle (c'est-à-dire en phase) entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (BD) et l'ORF d'intérêt (Y) ainsi que la construction d'un plasmide « proie » encodant le domaine d'activation de *Gal 4* (AD) fusionnée elle-même à l'ORF d'intérêt (X). Lors d'une interaction physique entre la fusion BD-Y et AD-X, le transactivateur peut être reconstitué et dans ce cas le gène rapporteur sera transcrit. En pratique, l'interaction entre la fusion BD-Y et AD-X sera mise en évidence par l'expression de divers gènes rapporteurs (*HIS3*, *URA3* et *LACZ*). Une interaction est donc visualisée par la capacité de la souche à pousser sur un milieu sans histidine, sans uracile et à produire une réponse positive dans un test de coloration  $\beta$ -Gal.

Un test double-hybride demande de réaliser la cotransformation de ces vecteurs dans une souche de levure possédant un ou plusieurs gènes rapporteurs. Les plasmides « appât » possèdent le marqueur d'auxotrophie *TRP1* et les plasmides « proie » possèdent le marqueur d'auxotrophie *LEU2*. La présence de ces deux vecteurs est donc sélectionnée chez la levure grâce à sa capacité à croître sur un milieu sans leucine et sans tryptophane. Cette méthode de recherche d'interaction par cotransformation est envisageable dans le cas d'une étude sur quelques tests, mais ne serait pas applicable pour un test à plus grande échelle. Dans ce cas on peut tester l'interaction dans un diploïde résultant du croisement de deux souches porteuses chacune d'un vecteur double-hybride.

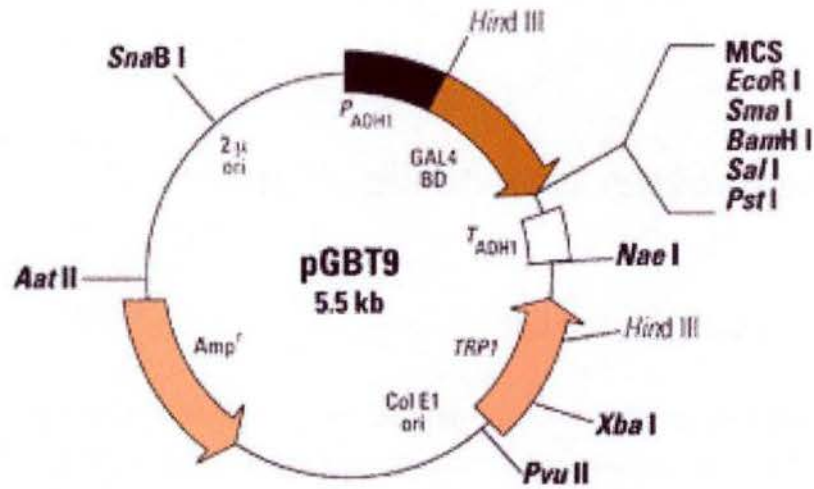


Figure R1a : Le plasmide pGBT9.

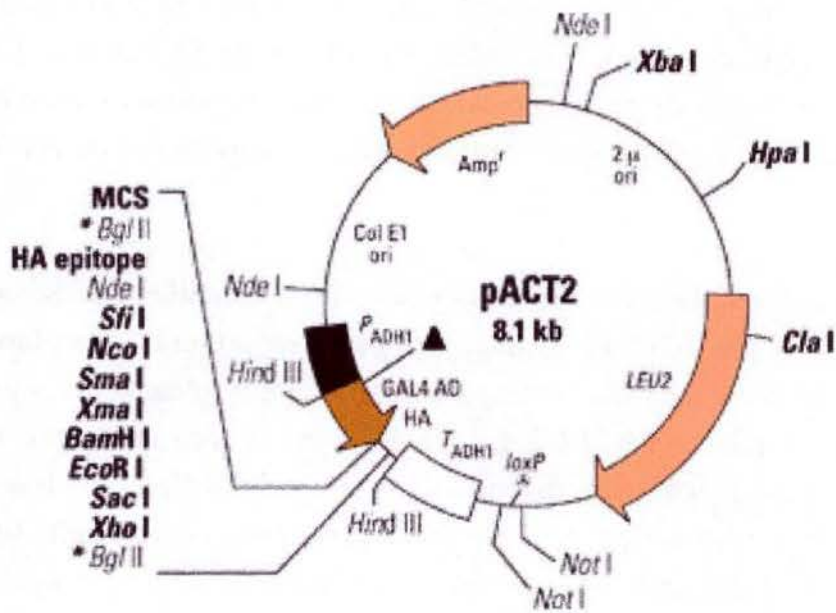


Figure R1b : Le plasmide pACTII.



## 1.2. Croisements

Le but de ce mémoire est de réaliser une carte d'interaction protéine-protéine de *B. melitensis* en utilisant la levure comme outil pour la réalisation du test double-hybride. La réalisation de cette carte nécessitant le test d'un grand nombre d'interactions protéine-protéine, l'approche utilisée sera une méthode de croisement entre deux souches de levure de type conjugant différent.

Pratiquement, une souche de levure de type conjugant  $\alpha$  (Mav 103) sera transformée par la fusion AD-X tandis qu'une souche de type  $\alpha$  (Mav 203) sera transformée par la fusion BD-Y. Le croisement de ces souches possédant les gènes rapporteurs *HIS3*, *URA3* et *LACZ* résulte en la formation d'un diploïde exprimant les fusions AD-X et BD-Y et sélectionné sur un milieu sans leucine ni tryptophane.

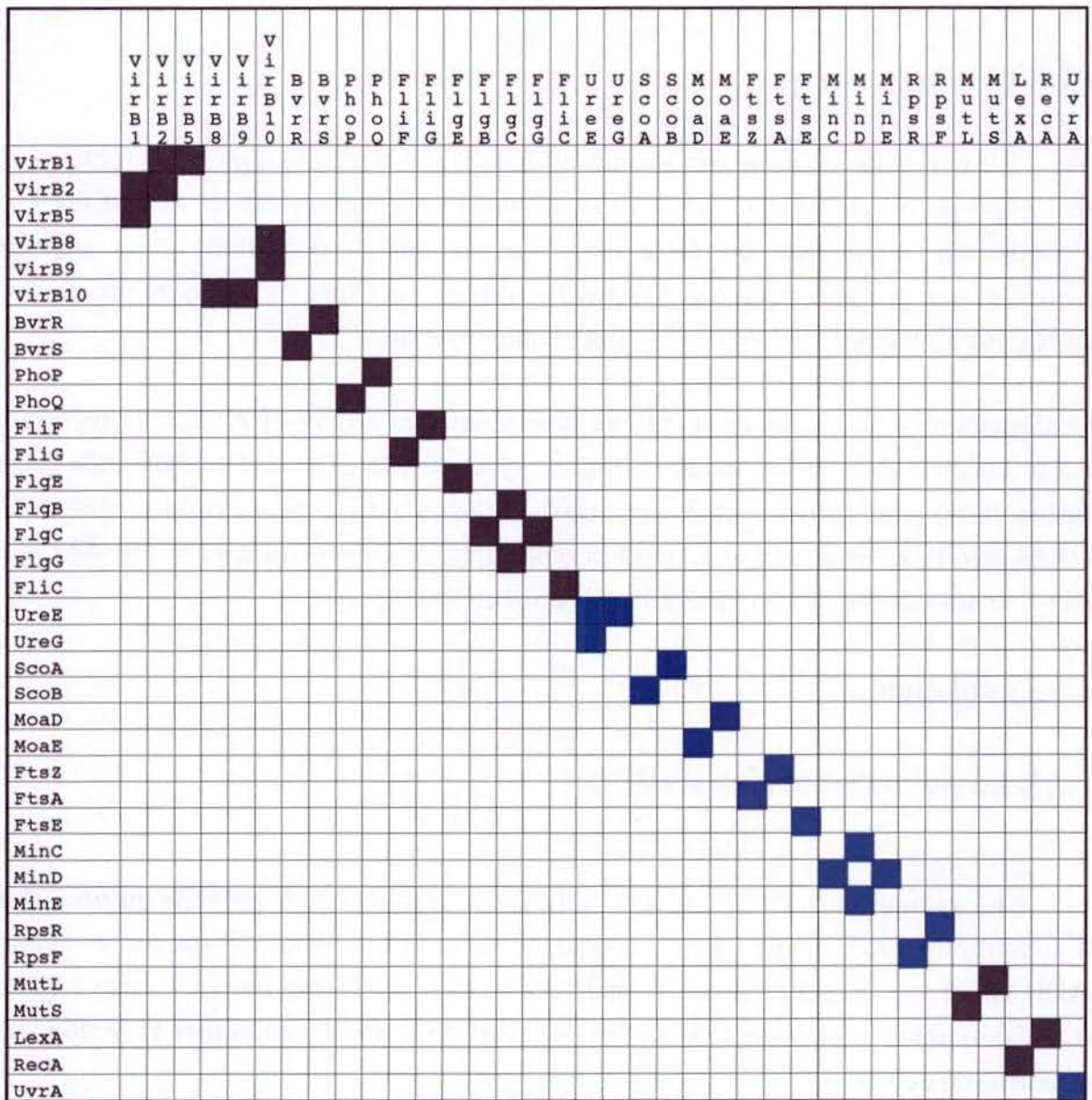
## 1.3. Les plasmides

### 1.3.1. Le plasmide « appât » pGBT9

Le vecteur pGBT9 multicopie code une fusion BD-Y et possède un marqueur d'auxotrophie *TRP1* (figure R1a), le gène de résistance à l'ampicilline, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine d'activation de Gal4 suivi en aval d'un "polylinker" permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine d'activation de Gal4.

### 1.3.2. Le plasmide « proie » pACTII

Ce vecteur multicopie code une fusion AD-X et possède un marqueur d'auxotrophie *LEU2* (figure R1b), le gène de résistance à l'ampicilline, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine d'activation de Gal4 suivi en aval d'un "polylinker" permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine d'activation de Gal4.



**Figure R2: Matrice d'interactions théoriques.**

Les carrés bleus représentent les interactions démontrées chez *H. pylori* (Rain *et al.*, 2001) et les carrés noirs représentent les interactions supposées en fonction du rôle biologique que les protéines possèdent.



## 2. Etapes préliminaires: choix et clonage des ORFs

### 2.1. ORFs

Les ORFs ont été choisies sur base de données de la littérature pour leur capacité supposée à interagir entre elles. Certaines de ces interactions ont été démontrées biochimiquement par immunoprécipitation (exemple: VirB9/VirB10) (E. Beaupré *et al*, 1997), d'autres ont été choisies pour leur capacité supposée à interagir en fonction du rôle biologique qu'elles possèdent (exemple: EnvZ/OmpR) (Cai et Inouye, 2002). Ces deux protéines font partie d'un système à deux composants où EnvZ est une protéine kinase/phosphatase autophosphorylée et capable de transférer son groupement phosphate sur un acide aspartique du facteur de transcription OmpR. On peut donc supposer une interaction entre ces deux protéines. Enfin, certaines ORFs ont été choisies pour leur homologie à des protéines d'*H. pylori* interagissant en double-hybride (Rain *et al*, 2001). Notons cependant que dans le cas d'*H. pylori*, ces protéines ont été obtenues lors d'un crible double-hybride avec en "appât" une ORF et en "proie" une banque d'ADN génomique ; pour rappel en procédant de la sorte on teste l'interaction entre une protéine "appât" complète et des ORFs partielles telles qu'on peut en attendre de l'expression de cDNA provenant de rétrotranscrits incomplets.

La figure R2 présente une matrice d'interaction "théorique". On y représente en effet les interactions attendues pour les ORFs choisies, sur base des résultats obtenus dans la situation homologue (cf. *H. pylori*) ; ou sur base d'autres données d'interaction avec des protéines homologues, rapportées dans la littérature. C'est à cette matrice "théorique" que nous confronterons nos propres données expérimentales avec *B. melitensis*.

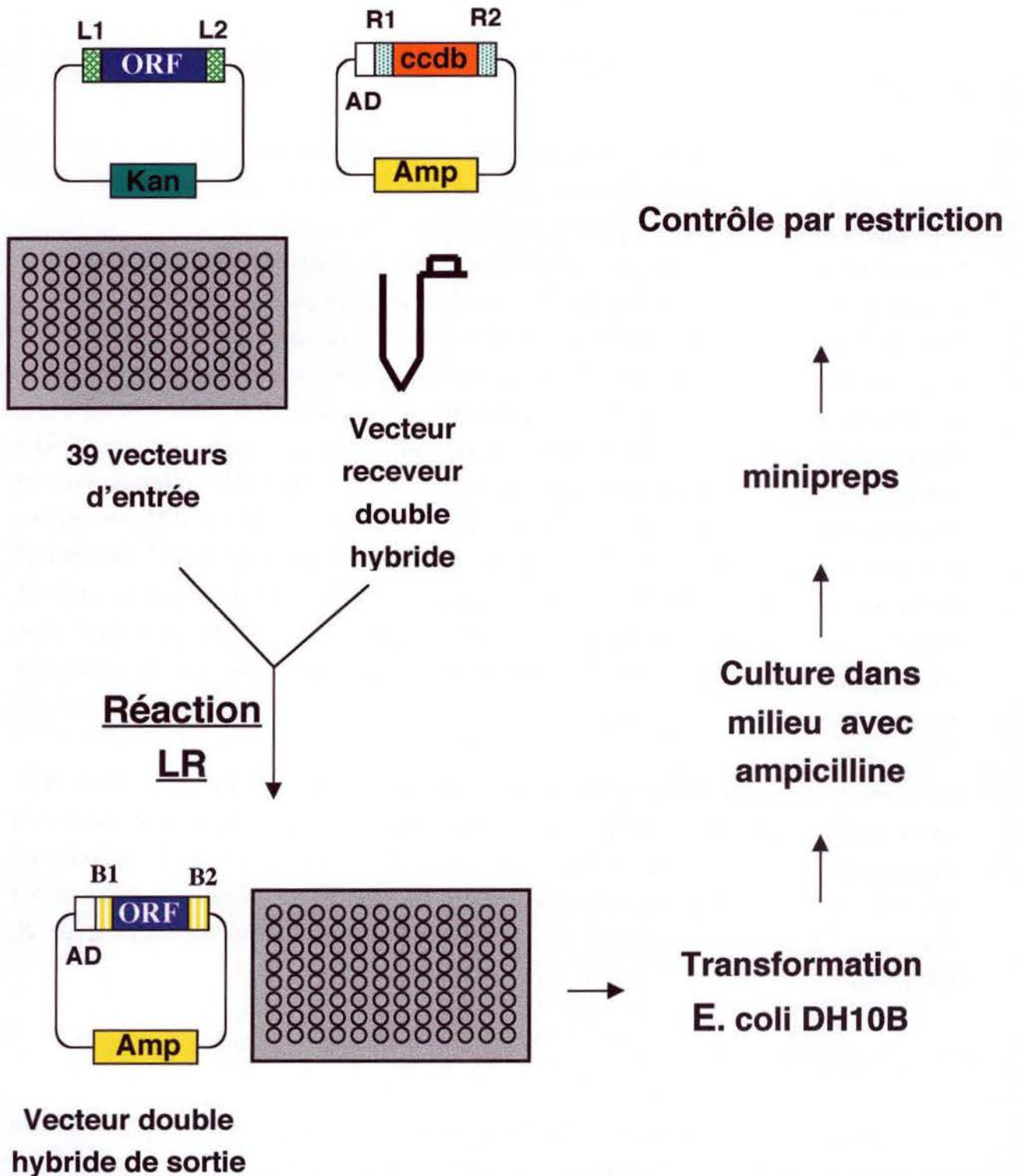
### 2.2. Clonage des ORFs

Nous avons entrepris de cloner 39 ORFs dans des vecteurs multicopie contenant soit la séquence AD soit la séquence BD de Gal4. Pour cette étape, nous avons choisi le système de clonage GATEWAY™ particulièrement adapté pour le clonage à grande échelle.

Ce système se base, dans son principe, sur la recombinaison du phage *Lambda* dans le génome d'*E. coli* (figure I2). La réaction d'intégration (réaction BP) se déroule



# Réaction LR



**Figure R3 : Réaction LR et transformation dans *E. coli***

Le vecteur donneur contient l'ORF flanquée des sites attL et un gène de résistance à la kanamycine. Le vecteur double-hybride possède un gène de résistance à l'ampicilline et un gène *ccdB* entre les sites attR. La recombinaison entre attL et attR génère un vecteur de sortie possédant le marqueur de résistance à l'ampicilline et l'ORF d'intérêt à la place du gène *ccdB*. L'ensemble de la réaction est transformé dans une souche DH10B sur milieu avec ampicilline.

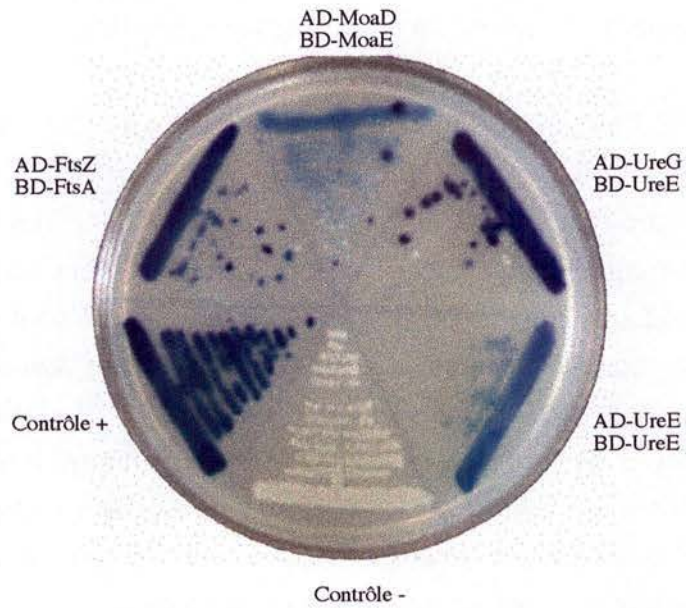
## RESULTATS

entre le site attP situé dans l'ADN du phage et le site attB localisé dans le génome bactérien. Cette réaction d'intégration est réversible et fait appel à deux enzymes: l'intégrase du phage (produit du gène Int) et une protéine bactérienne IHF (Integration Host Factor). Le phage peut exciser son ADN de celui d'*E. coli* (réaction LR) par recombinaison entre les sites attL et attR via l'intégrase et la IHF mais aussi l'excisionase (produit du gène Xis) qui est une autre enzyme phagique.

La réaction GATEWAY™ dérivant de ce principe nécessite trois étapes (figure I3). La première est une amplification PCR afin de flanquer l'ORF d'intérêt de séquences attB1 et attB2, une réaction BP consistant à cloner l'ORF dans un vecteur donneur par recombinaison entre les sites attP1 et attP2 de ce vecteur respectivement avec les sites attB1 et attB2 bordant l'ORF (les sites référés 1 et 2 sont des variants mutés, mais fonctionnels, des sites naturels B et P du système *Lambda*). Cette recombinaison génère un vecteur d'entrée contenant une ORF flanquée des sites désignés attL1 et attL2. Lors de la dernière étape, l'ORF contenue dans le vecteur d'entrée pourra être clonée dans une série de vecteurs de sortie (vecteurs double-hybride, etc...) par recombinaison entre les sites attR (vecteur d'entrée) et attL (vecteur de sortie) grâce à l'intervention du système enzymatique adéquat.

Dans la pratique, le vecteur donneur (plasmide 1) contient l'ORF flanquée des sites attL et un gène de résistance à la kanamycine (figure R3). Le vecteur double-hybride (plasmide 2), quant à lui, possède un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un gène *ccdB* entre les sites attR. L'expression de ce gène *ccdB* est toxique (par interférence avec la gyrase) pour *E. coli* (souche DH10B). La recombinaison entre attL et attR génère un vecteur de sortie (plasmide 3) possédant le marqueur de résistance à l'ampicilline et l'ORF d'intérêt à la place du gène *ccdB*. L'ensemble de la réaction, c'est-à-dire les plasmides 1, 2 et 3, est transformé dans une souche DH10B sur un milieu avec ampicilline. A l'issue de la réaction LR seul le plasmide 3 permet la croissance de souches de DH10B.





**Figure R4 : Cette figure représente les quatres couples d'ORFs testés avec le gène rapporteur *LACZ* .**  
La coloration bleue révèle l'interaction entre les deux partenaires.  
Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été réalisés.



### 3. Recherche d'interactions protéine-protéine par double-hybride

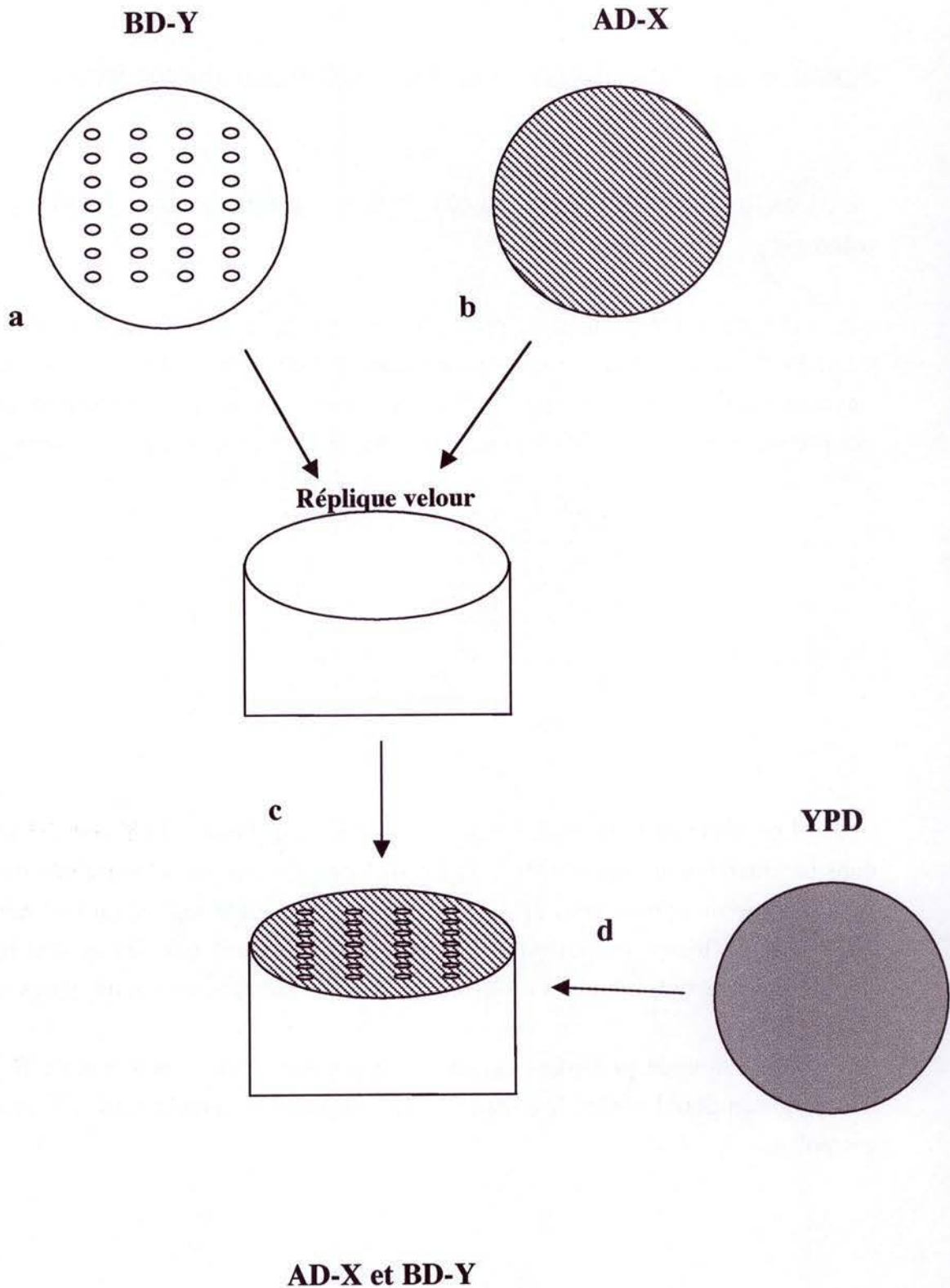
#### 3.1. Test préliminaires de quelques couples de protéines de *B. melitensis* censées interagir

Avant d'entreprendre la réalisation d'une carte d'interaction double-hybride à grande échelle, quelques couples potentiels ont été testés pour leur capacité à interagir physiquement. Notre choix s'est porté sur quatre couples présentant une homologie à des protéines d'*H. pylori* interagissant en double-hybride (tableau ci-dessous).

AD	BD
UreE	UreE
UreG	UreE
FtsA	FtsZ
MoaE	MoaD

Les plasmides ayant la fusion Gal4 AD-X et Gal4 BD-Y ont été transformés dans la souche de levure Mav103. Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu sans leucine ni tryptophane et un test d'interaction a été réalisé en utilisant *LACZ* et *HIS3* comme gènes rapporteurs. Les résultats montrent que les quatre interactions double-hybride ont été mises en évidence par l'expression des deux gènes rapporteurs (figure R4).

Cette donnée préliminaire montrant la capacité des protéines de *B. melitensis* d'interagir en double-hybride chez la levure, la réalisation de la carte d'interaction a été entreprise.



**Figure R5 : Technique de la réplique sur velour**

Les ORFs fusionnées en BD se trouvent sous forme de gouttes (a) et les ORFs fusionnées en AD se trouvent sous forme de tapis cellulaire (b). Lors d'un croisement, une ORF fusionnée en AD est répliquée sur le velour contenant les BD sous forme de gouttes (c). L'ensemble est ensuite répliqué sur milieu YPD (d).



## 3.2. Réalisation de la matrice d'interaction protéine-protéine

### 3.2.1. Transformation

Les souches Mav103 et Mav203 ont été transformées avec les plasmides de fusion Gal4 AD-X et Gal4 BD-Y. La souche Mav103 (Mat a) a été transformée avec le plasmide pACTII (AD-X) et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu sans leucine. La souche Mav203 (Mat  $\alpha$ ) a été transformée avec le plasmide pGBT9 (BD-Y) et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu sans tryptophane.

### 3.2.2. Méthode de croisement

Nous avons étudié les interactions double-hybride entre 39 ORFs clonées avec la séquence du domaine d'activation Gal4 (AD-X) et ces mêmes ORFs clonées avec la séquence du domaine de liaison Gal4 (BD-Y). Pour rappel nous procédons pour ce faire par croisement. Chaque fusion AD-X a été croisée avec toutes les fusions BD-Y. Les interactions potentielles ont été mises en évidence au moyen des gènes rapporteurs *LACZ*, *HIS3* et *URA3*.

Les croisements ont été réalisés par répliques velours comme décrit à la figure R5. Les souches Mav 103 (Mat a) contenant les 39 ORFs fusionnées au domaine d'activation ont été mises en culture dans 5 ml de SD liquide sans leucine à 30 °C durant vingt-quatre heures. 1ml de chaque culture liquide a ensuite été étalé individuellement sur boîte SD solide sans leucine et incubée jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire (fig. R5b). Les souches contenant les 39 ORFs en domaine de liaison (Mav 203-Mat  $\alpha$ ) ont été mis à croître sous forme de gouttes sur une seule boîte SD sans tryptophane (fig.R5a).

Chaque souche portant une fusion AD-X sera croisée par réplique velours avec une boîte portant les souches transformées par les plasmides encodant la fusion BD-Y disposées en gouttes individuelles et répertoriées (fig.R5c). Le tout sera ensuite mis à incuber vingt-quatre heures à 30°C sur un milieu riche (YPD)(fig.R5d). Les diploïdes seront ensuite sélectionnés sur un milieu sans leucine ni tryptophane.



### 3.2.3. Analyse des résultats

Trois gènes rapporteurs ont été utilisés dans le cadre de ce test: *HIS3*, *URA3* et *LACZ*.

Les diploïdes ont donc été répliqués sur milieu :

-3AT (75 mM)

-sans uracile

-sans leucine ni tryptophane où le test  $\beta$ -Gal a été réalisé en surcouche (cf. matériel et méthodes)

#### ORFs sans interaction révélée

Sur les trente-neuf ORFs testées<sup>2</sup> contenant la séquence AD de Gal4, quinze n'ont démontré aucune interaction lors du croisement avec les ORFs contenant la séquence BD de Gal4. Ces ORFs sont citées dans le tableau ci-dessous.

<b>ORFS+domaine d'activation</b>
FlgE
EnvZ
RpsR
UvrA
OmpR
LexA
RpsF
RecA
VirB9
VirB5
VirB6
FlgG
PhoQ
MutS
VirB2

Ces quinze ORFs n'ont donné aucun résultat et cela a été observé sur les trois milieux de sélection utilisés.

<sup>2</sup> Notons que BvrS fusionné au domaine de liaison à l'ADN n'a pas été obtenu lors des réactions LR (gateway).

## RESULTATS

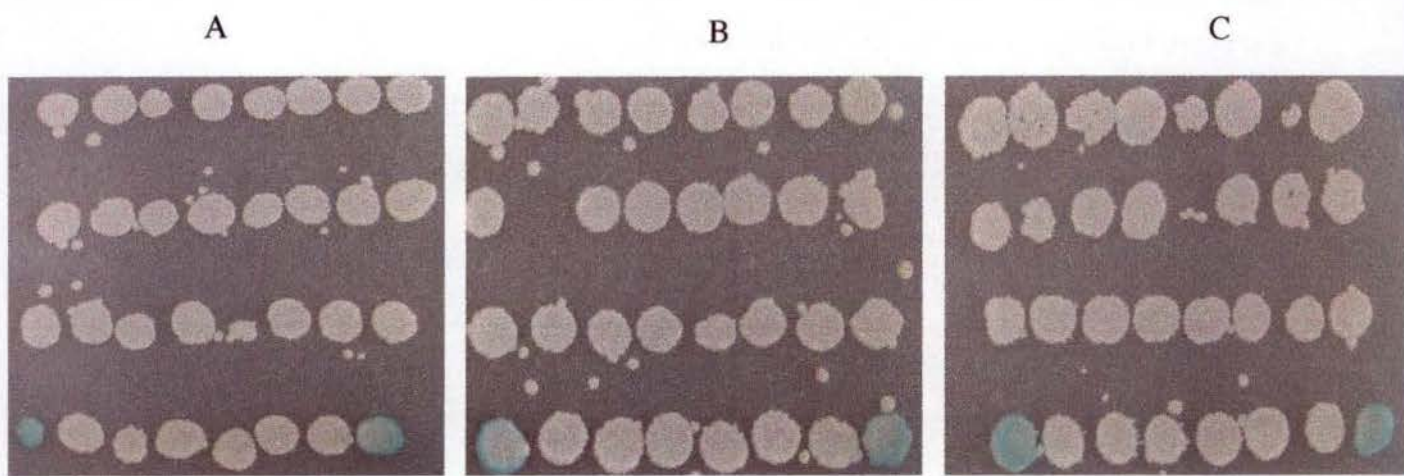
### ORFs avec des interactions non-spécifiques

Dix ORFs fusionnées avec AD de Gal4 ont présenté des interactions avec ScoB et UvrA (ces dernières étant fusionnées avec BD de Gal4). Ces interactions n'ont pas été considérées comme pertinentes compte tenu de leur manque de spécificité. Ces interactions ont été révélées par l'expression du gène rapporteur *LACZ*. Une seule ORF (FlgB) a démontré une interaction avec UvrA sur 3AT seul.

BvrR, FliF et LexA sont fusionnées avec le domaine de liaison de Gal4. Ces ORFs ont démontré des interactions avec huit ORFs fusionnées avec AD de Gal4. Ces interactions sont donc considérées comme non spécifiques.

Le tableau ci-dessous cite ces différentes ORFs.

ORF + domaine d'activation	ORF+domaine de liaison	3AT	Ura-	Test $\beta$ -Gal
ScoA	ScoB UvrA	-	-	+
FliC	ScoB UvrA	-	-	+
BvrR	ScoB UvrA	-	-	+
FliF	ScoB UvrA	-	-	+
FtsE	ScoB UvrA	-	-	+
FtsZ	ScoB UvrA	-	-	+
MutL	ScoB UvrA	-	-	+
MinD	ScoB UvrA	-	-	+
MoaD	ScoB UvrA	-	-	+
FlgC	ScoB UvrA	-	-	+
FlgB	UvrA	+	-	-
MinE	BvrR LexA FliF	+	+	+



**Figure R6. Test d'interaction entre 3 proies et 32 appâts.**

Les proies testées sont: FliC (A), BvrR (B), FtsE (C). Pour chacune de ces proies, 2 interactions ont été révélées sur milieu synthétique sans leucine, ni tryptophane + X-Gal avec les deux mêmes appâts: ScoB et UvrA. Ces interactions ont été mises en évidence par l'expression du gène rapporteur *LACZ* et ont été considérées comme non-spécifiques.



RESULTATS

MinC	BvrR FliF	+	+	+
ScoB	BvrR FliF	+	+	+
VirB8	BvrR LexA FliF	+	+	+
FliG	BvrR FliF	+	+	+
VirB1	BvrR FliF	+	+	+
PhoP	BvrR FliF	+	+	+
BvrS	BvrR	-	-	+

**INTERACTIONS OBSERVEES PAR CROISEMENT**

**+ : Interaction révélée**

**- : Interaction non démontrée**

On peut remarquer que le test  $\beta$ -Gal est le plus sensible, la majorité de ces interactions ayant été démontrées avec le gène rapporteur *LACZ* (fig.R6).

RESULTATS

ORFs avec des interactions spécifiques

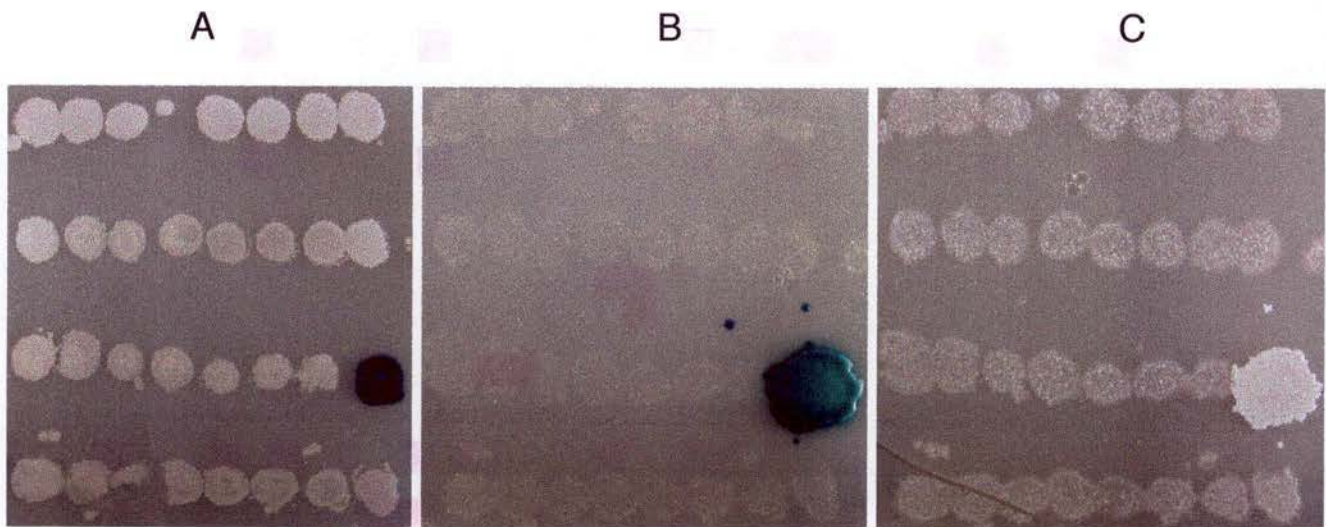
Neuf ORFs fusionnées en AD ont démontré des interactions spécifiques avec une ou deux ORFs fusionnées en BD. Ces interactions ont été démontrées par l'expression d'un ou plusieurs gènes rapporteurs. Le tableau ci-dessous représente ces résultats.

ORF + domaine d'activation	ORF+domaine de liaison	3AT	Ura-	Test $\beta$ -Gal
FtsA	FtsZ	+	+	+
	FtsA	+	+	+
UreE	UreE	+	+	+
UreG	UreE	+	+	+
MinC	MinD	+	+	+
MinD	MinE	+	+	+
	MinC	-	-	+
FlgC	FlgC	+	-	+
MoaD	MoaE	+	-	+
MoaE	MoaE	+	-	+
	MoaD	-	-	+
FlgB	FlgG	+	-	-
	FlgC	+	-	-

**INTERACTIONS OBSERVEES PAR CROISEMENT**

**+ : Interaction révélée**

**- : Interaction non démontrée**



**Figure R7. Test d'interaction entre UreG (proie) et 32 appâts.**

Une interaction est révélée par mise en évidence de l'expression du (des) gène(s) rapporteur(s) :

- *LACZ* sur milieu synthétique sans leucine, ni tryptophane + X-Gal (A),
- *LACZ* et *URA3* sur milieu synthétique sans leucine, ni tryptophane, ni uracile + X-Gal (B),
- *HIS3* sur milieu synthétique sans leucine, ni tryptophane, ni histidine + 3AT 75 mM (C).

Ce test révèle l'interaction entre UreG (proie) et UreE (appât) sur les 3 milieux de sélection.



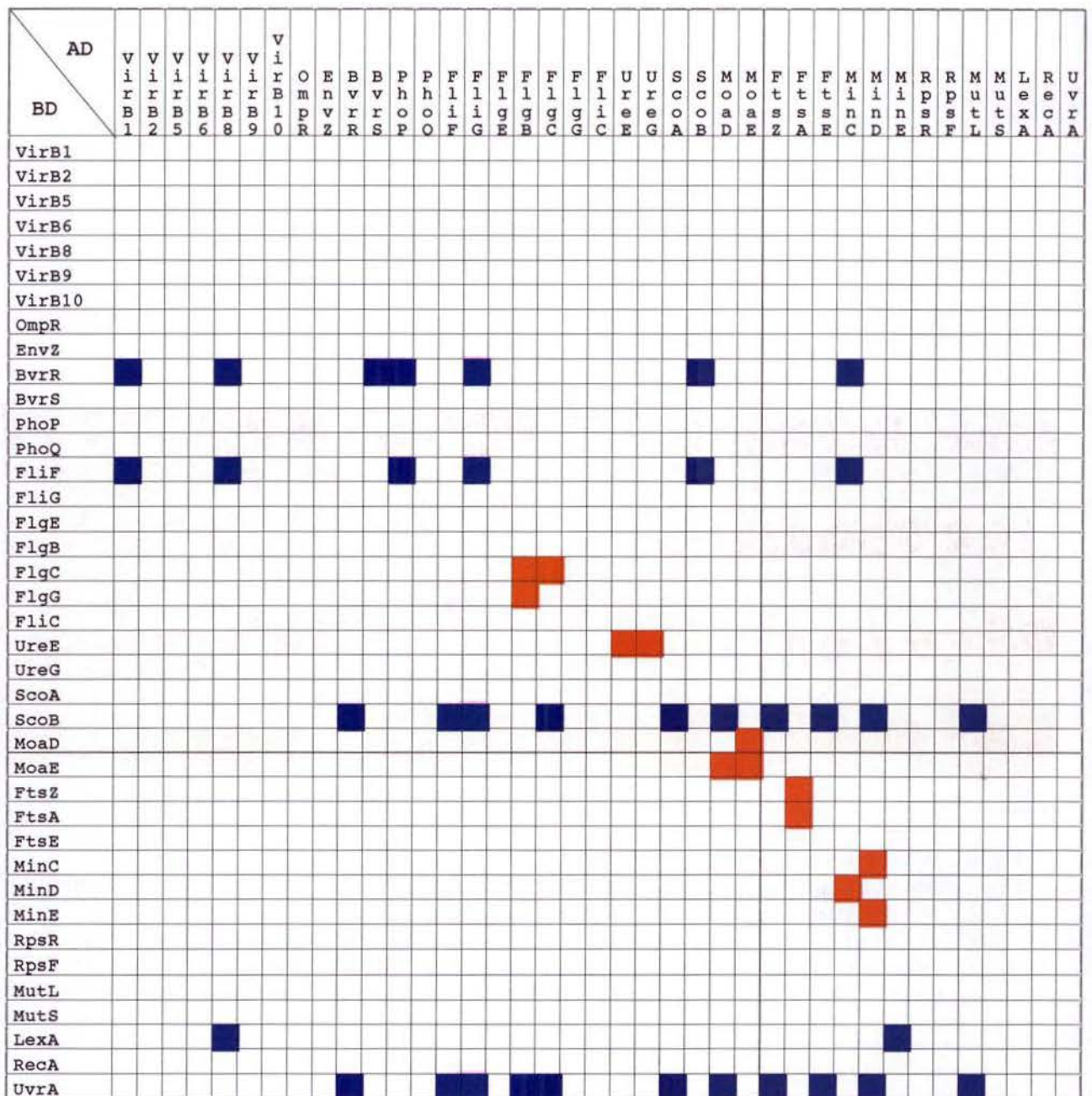


Figure R8 : matrice d'interaction protéine-protéine

- : interaction non-spécifique
- : interaction spécifique
- : absence d'interaction

## RESULTATS

On peut résumer les résultats comme suit:

Interactions mises en évidence par les trois gènes rapporteurs:

- FtsA/FtsZ
- FtsA/FtsA
- UreG/UreE (figure R7)
- UreE/UreE
- MinD/MinE
- MinC/MinD

Interactions mises en évidence par deux gènes rapporteurs:

- FlgC/FlgC
- MoaE/MoaE
- MoaD/MoaE

Interactions mises en évidence par un seul gène rapporteur:

- MoaE/MoaD
- FlgB/FlgG
- FlgB/FlgC
- MinD/MinC

Les résultats sont résumés sur la matrice (figure R8) où les interactions non spécifiques sont représentées par des carrés bleus, les interactions spécifiques par des carrés rouges et l'absence d'interaction par des carrés blancs.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



Au terme de ce mémoire, nous avons testé 39 protéines de *B. melitensis* en vue d'évaluer leur capacité à interagir entre elles. Elles ont toutes été testées deux à deux par la technique du double-hybride (figure R8). 13 interactions spécifiques ont été mises en évidence, 38 interactions sont considérées comme non spécifiques et 15 protéines n'ont révélé aucune interaction.

### 1. Interactions non-spécifiques

Cinq protéines ont montré des interactions avec plusieurs partenaires (entre 2 et 11 partenaires par protéine « appât »)

Les ORFs codant ces protéines sont : - **ScoB**  
- **UvrA**  
- **BvrR**  
- **FliF**  
- **LexA**

Parmi ces interactions, certaines semblent plausibles en terme de sens biologique. Ainsi, à titre d'exemple, BvrR et BvrS (respectivement régulateur et senseur d'un système à deux composants) interagissent en double-hybride. Cependant, pour ces cinq protéines, ces interactions n'ont pas été prises en considération compte tenu du critère de spécificité qui n'est pas vérifié ici. Une explication simple de ce manque de spécificité pourrait être la capacité de ces protéines à interagir avec le domaine d'activation (AD), ce qui n'exclut pas qu'une interaction physique existe, mais ait été masquée. Pour en avoir le coeur net il y aurait lieu de tester ces mêmes couples dans le contexte d'un système double-hybride ne dépendant pas de Gal4.

## 2. Interactions spécifiques

### 2.1. Interactions démontrées précédemment

Un des objectifs de ce mémoire étant la validation de la méthode double-hybride dans le cadre de la réalisation d'une carte d'interaction protéine-protéine à grande échelle de *B. melitensis*, quelques partenaires ayant déjà été isolés pour leur capacité à interagir ont été choisis comme « contrôle positif ». Différents exemples d'interactions sont décrits ci-dessous.

#### a) Protéines impliquées dans la division cellulaire

La division cellulaire chez les bactéries est un processus complexe impliquant une régulation spatiale et temporelle de la formation du septum de division (Huang *et al*, 1996). La première étape consiste en l'assemblage de la protéine FtsZ en un anneau au futur site de division. La suite de la septation requiert le recrutement d'autres protéines dont FtsA. En accord avec ce modèle, des interactions double-hybride ont été montrées précédemment entre FtsA et FtsZ ainsi qu'entre FtsZ et lui-même (Huang *et al*, 1996) (Yim *et al*, 2000).

MinC et MinD constituent un complexe inhibiteur de la division cellulaire et leur activité est régulée par MinE. Les interactions entre MinC/MinD et MinD/MinE ont été démontrées précédemment par la technique du double-hybride (Huang *et al*, 1996).

#### b) L'interactome chez *H. pylori*

Lors de la réalisation de l'interactome d'*H. pylori* (Rain *et al*. 2001), des protéines impliquées dans la dégradation de l'urée (UreE, UreG) ou dans la synthèse du cofacteur molybdoptérine (MoaE, MoaD) ont été mises en évidence pour leur capacité à interagir en double-hybride.

Dans le cadre de ce travail, des interactions ont été mises en évidence entre :

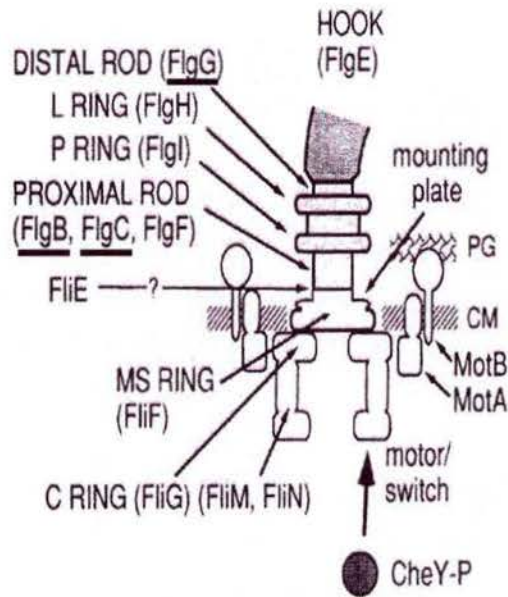
FtsA/FtsZ

FtsA/FtsA

MinC/MinD

MinD/MinE

UreE/UreG



**Figure C1: Représentation schématique du corps basal** (1996). Flagella and motility. *E. coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Washington, ASM. **2**: 123-145.

Les différentes protéines situées au niveau du corps basal du flagelle sont représentées sur cette figure. Celles que nous avons testées par double-hybride se trouvent au niveau de la tige distale (distal rod) pour FlgG et au niveau de la tige proximale (proximal rod) pour FlgB et FlgC.



UreE/UreE

MoaE/moaD

MoaE/moaE

Ces interactions, non surprenantes, entre protéines de *B. melitensis* nous indiquent, d'une part, une conservation de certains mécanismes cellulaires entre *H. pylori* et *B. melitensis* et, d'autre part, nous démontrent la faisabilité d'une carte d'interaction protéine-protéine de *B. melitensis*. Dès lors ces résultats, couplés à la faisabilité du clonage d'ORFs à grande échelle par la méthode GATEWAY™, ouvrent la porte à la réalisation d'un interactome à l'échelle du protéome entier.

## 2.2. Etude d'interactions protéine-protéine au sein d'un complexe flagellaire

Outre les protéines ayant été isolées pour leur capacité à interagir entre elles chez *B. melitensis* ou *H. pylori*, notre choix s'est orienté sur l'étude d'un complexe étudié au laboratoire : le système flagellaire (David Fretin, thèse en cours). Six protéines ont été choisies parmi lesquelles des interactions ont été montrées entre FlgB et FlgG, FlgB et FlgC, ainsi qu'entre FlgC et lui-même. Ces protéines constituent majoritairement le corps basal du flagelle (figure C1).

Dans leur ensemble, ces données sont un premier pas dans la compréhension des interactions protéine-protéine de ce complexe et illustrent la faisabilité de l'approche double-hybride choisie dans ce travail et sa pertinence pour l'étude du fonctionnement cellulaire de *B. melitensis*.

**MATERIEL  
ET  
METHODES**

**1. Matériel.****1.1. Les tampons.**

Tampon  $K_2HPO_4$  1M

$K_2HPO_4+3H_2O$  87,09 g

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

Tampon  $KH_2PO_4$  1M

$KH_2PO_4$  68,045 g

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

Tampon K- $PO_4$  pH 7,0

$K_2HPO_4$  1M 61,5 ml

$KH_2PO_4$  38,5 ml

Tampon TAE 10x (Gibco BRL)

Tris-Acétate 400 mM

EDTA 10 mM

Tampon TE 10x

Tris-HCl 100 mM

EDTA 10 mM

pH 8.0

Tampon de transformation TB (Transformation Buffer)

Pipes (Piperazine anhydre) 10 mM

$MnCl_2$  55 mM

$CaCl_2$  15 mM

KCl 250 mM

Ajuster à pH 6.7 avec du KOH 5N avant d'ajouter le  $MnCl_2$ .



1.2. Les solutions

## Acide aminé et base azotée 100x

Adénine sulfate	0.2 g
Uracile	0.2 g
L-Tryptophane	0.2 g
L-Histidine-HCl	0.2 g
L-Leucine	0.3 g
L-Lysine-HCl	0.3 g

Porter, séparément, à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis autoclaver. Conserver le tryptophane à 4°C et à l'abri de la lumière afin d'éviter sa dégradation.

## Agarose

De 0,8 à 0,2 g pour un volume de 100 ml de TAE 1x en fonction de la concentration désirée. Porter à ébullition et laisser refroidir à une température de 55°C. Couler ensuite le gel sur un support approprié. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium (solution stock à 2 mg/ml).

## Ampicilline 10%

Ampicilline	100 mg
-------------	--------

Porter à un volume de 1 ml avec de l'eau distillée puis stériliser par filtration sur un filtre 0,22 µm (Millipore). Conserver à -20°C. Ne pas ajouter à des milieux ayant une température supérieure à 55°C afin de ne pas dégrader l'antibiotique.

## Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10x

LiAc	10,2 g
------	--------

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

## Polyéthylène glycol (PEG) 50 %

PEG 4000	50 g
----------	------

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis stériliser par filtration sur un filtre 0,45 µm (Millipore).

## MATERIEL ET METHODES

### Mélange LiAc/TE 1x

LiAc 10x	1/10 <sup>ème</sup> de volume
TE 10x	1/10 <sup>ème</sup> de volume
H <sub>2</sub> O	8/10 <sup>ème</sup> de volume

### Mélange LiAc/TE/PEG 4000

LiAc 10x	1/10 <sup>ème</sup> de volume
TE 10x	1/10 <sup>ème</sup> de volume
PEG 50 %	8/10 <sup>ème</sup> de volume

### ADN de sperme de saumon (SS-DNA)

SS-DNA 2 mg

Dissoudre dans 1 ml de TE 1x. Passer dans une seringue pour réduire la taille des brins grâce aux forces de cisaillement. Stériliser par filtration sur un filtre 0,22 µm (Millipore). Conserver à -20°C.

Avant chaque utilisation, dénaturer à 100°C pendant 5 minutes, puis maintenir sur glace jusqu'à emploi.

### Solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-Gal) 4%

X-Gal 40 mg

Dissoudre dans 1 ml de NN' diméthylformamide.

### SDS 10%

SDS 10 g

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

### Solution de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) 2M

3AT 42,04 g

Porter à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée, stériliser par filtration avec un filtre 0,22 µm (Millipore). Conserver à 4°C.

### Solution de coloration et d'alourdisseur 10x

Sucrose 50%

Na<sub>2</sub>.EDTA 100 mM

SDS 1%

Bleu de Bromophénol 0.1%

### 1.3. Souches et plasmide.

#### 1.3.1. Souche de bactérie.

La souche utilisée est DH 10B : *F<sup>-</sup> mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara,leu)7697, galU, galK, λ<sup>-</sup>, rspL, nupG*

Cette souche possède les caractéristiques suivantes :

-*recA1* réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène,

-*endA1* améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléase,

-*Δlac* est une délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

Cette souche est sensible au gène *ccdB*. Elle est mise en culture à 37°C dans du milieu de Luria-Bertani (LB). Dans le cas d'une sélection d'un plasmide porteur du gène de résistance à l'ampicilline, celle-ci est ajoutée au milieu LB à une concentration de 100 µg/ml.

#### 1.3.2. Souches de levures.

Les souches utilisées sont MAV103 (*Mata*) et MAV203 (*Mata*) : *leu2-3, 112 trp-901 his3Δ200 ade2-1gal4Δ gal80Δ SPAL10 ::URA3 GAL1 ::lacZGAL1 ::HIS3-@LYS2 can1<sup>R</sup> cyh2<sup>R</sup>*



### 1.3.3. Les plasmides

Tous les plasmides utilisés possèdent en aval de la région Gal4 la cassette GATEWAY possédant les sites attR1 et attR2.

#### 1.3.3.1 Le plasmide pGBT9.

Ce plasmide multicopie possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *TRP1*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4, suivi en aval par un adaptateur permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4.

#### 1.3.3.2. Le plasmide pACTII.

Ce plasmide multicopie possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *LEU2*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine d'activation de Gal4, suivi en aval d'un adaptateur permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine d'activation de Gal4.

### 1.4. Milieux de culture.

#### 1.4.1. Milieux de culture bactériens.

##### 1.4.1.1. Milieu LB liquide.

Tryptone	10 g/l
NaCl	5 g/l
Yeast Extract	5 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

1.4.1.2. Milieu LB solide.

Tryptone	10 g/l
NaCl	5 g/l
Yeast Extract	5 g/l
Agar	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri. Conserver celles-ci à 4°C.

L'ampicilline peut être ajoutée à une concentration finale de 100 µg/ml au milieu LB liquide ou solide, ayant été autoclavé, puis refroidi à une température de 55°C

1.4.1.3. Milieu SOB liquide

Tryptone	20 g/l
Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
pH	6.7-7.0

1.4.2. Milieux de culture levuriens.1.4.2.1. Milieu YPD liquide.

Glucose	20 g/l
Peptone	20 g/l
Yeast Extract	10 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

#### 1.4.2.2. Milieu minimum

Yeast Nitrogen Base w/o amino acid	6,80 g/l
Glucose	20 g/l

Pour la préparation d'un milieu minimum solide, ajouter également :

Agar	20 g/l
------	--------

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

#### 1.4.2.3. Milieu synthétique.

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant dans le milieu minimum les acides aminés et bases azotées à raison de 1 ml de solution stock pour 100 ml de milieu (voir point 1.2).

#### 1.4.2.4. Milieu synthétique + 3AT.

Préparer un milieu synthétique solide ne contenant pas d'histidine, autoclaver.  
Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C, puis ajouter le 3AT suivant la concentration désirée.  
Couler le milieu dans des boîtes de Pétri et conserver à 4°C.



## 2. Méthodes.

### 2.1. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.

#### 2.1.1 Préparation de cellules compétentes (Méthode Inoue)

- Inoculer 250 ml de milieu SOB avec 5 colonies obtenues sur milieu LB solide.
- Incuber la culture liquide à 18°C sous agitation jusqu'à obtention d' une D.O<sub>600</sub> de 0,6 (24 à 36 heures).
- Refroidir la culture 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 2500 rpm et à 4°C.

Dans une pièce froide :

- Eliminer le surnageant, puis resuspendre délicatement les cellules dans 80 ml de TB froid.
- Centrifuger 15 minutes à 2500 rpm et à 4°C.
- Eliminer le surnageant puis resuspendre délicatement les cellules dans 20 ml de TB froid.
- Ajouter du DMSO à une concentration finale de 7%.
- Conserver les cellules 10 minutes sur glace .
- Echantillonner les cellules par 100 µl, puis congeler directement dans l'azote liquide, et stocker à -80°C.

#### 2.1.2 Transformation par choc thermique

- Dégeler les cellules compétentes quelques minutes sur glace.
- Dans un tube Eppendorf stérile froid, mélanger 100 µl de cellules compétentes avec de l'ADN.
- Laisser 30 minutes sur glace.
- Soumettre les cellules à un choc thermique en incubant 1 minute à 42°C.
- Laisser 5 minutes sur glace, puis ajouter 1 ml de LB liquide.
- Incuber 1 heure à 37 °C.
- Etaler sur milieu LB avec ampicilline, et incuber une nuit à 37°C.

## 2.2. Techniques relatives à l'utilisation de levures.

### 2.2.1 Transformation par choc thermique.

- Inoculer 100 ml de YPD avec une colonie isolée obtenue sur milieu solide.
- Incuber une nuit à 30°C sous agitation, afin d'arriver à une  $DO_{600}$  comprise entre 0,6 et 0,8.
- Centrifuger la culture 5 minutes à 4500 rpm, à température ambiante.
- Eliminer le surnageant puis laver le culot avec 25 ml d'eau stérile.
- Centrifuger les cellules 5 minutes à 4500 rpm, à température ambiante.
- Eliminer le surnageant puis, laver le culot avec 10 ml de LiAc/TE 1x.
- Centrifuger les cellules 5 minutes à 4500 rpm, à température ambiante.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de LiAc/TE 1x.
- dans un tube Eppendorf stérile déposer :
  - 2  $\mu$ g d'ADN
  - 25  $\mu$ l d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C, puis maintenir sur glace
  - 50  $\mu$ l de cellules
  - 300  $\mu$ l de mélange LiAc/TE/PEG
- Incuber 2h30 à 30°C avec agitation toutes les demi-heures.
- Soumettre à un choc thermique 20 minutes à 42°C.
- Centrifuger les cellules 5 minutes à 8000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 300  $\mu$ l d'eau stérile.
- Etaler sur milieu synthétique solide.

### 2.2.2. Technique de la réplique sur velours

Cette technique de dépôt de cellules sur boîte de Pétri permet de répliquer un nombre important de colonies. Le milieu solide (en boîte de Pétri) portant des colonies est amené au contact d'un velours stérile de sorte que des cellules de chaque colonie s'y déposent. Un contact entre ce velours et un autre milieu solide coulé en boîte de Pétri, entraîne le dépôt de cellules sur le milieu. L'ordre des colonies reste identique sur les deux boîtes de Pétri.

Concentration de l'agarose dans le gel

Taille des fragments d'ADN séparés

(%)

(kb)

0.3

5-60

0.6

1-20

0.7

0.8-10

0.9

0.5-7

1.2

0.4-6

1.5

0.2-3

2.0

0.1-2

**Tableau M1 : Ce tableau représente la concentration de gel idéale en fonction de la taille des fragments à séparer.**



### 2.2.3. Coloration en surcouche

- Préparer 5 ml d'agarose 1% dans de l'eau et porter à ébullition, puis refroidir à 50°C.
- Préchauffer à 50°C 5 ml de tampon K-PO<sub>4</sub> pH 7,0.
- Mélanger la solution d'agarose et le tampon K-PO<sub>4</sub>, puis conserver à 50°C.
- Ajouter 0,1 ml de SDS 10%
- Ajouter 0,6 ml de NN' diméthylformamide
- Ajouter 0,1ml de X-Gal 4%
- Mélanger et couler une surcouche de 10 ml sur la boîte à colorer
- Attendre la solidification puis incuber une nuit à 30°C

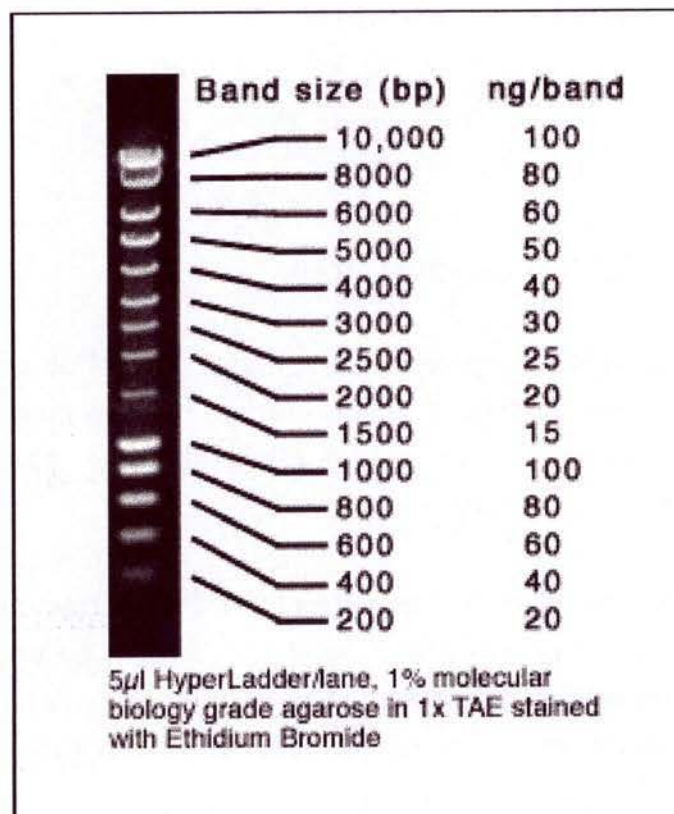
### 2.3. Techniques relatives à l'ADN.

#### 2.3.1. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN de tailles différentes, d'estimer la taille de fragment d'ADN et la concentration via un marqueur de taille et de masse. L'ADN est soumis à un champ électrique, cet ADN étant chargé négativement, il va migrer vers l'anode.

En règle générale, un gel plus concentré (1,5 à 2%) permettra de séparer des fragments de petites tailles (100 à 3000 bp), tandis qu'un gel plus lâche permettra de séparer des fragments de plus grandes tailles. Le tableau M1 reprend la concentration de gel idéale pour les différentes tailles d'ADN à séparer.

- Dissoudre en chauffant une quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE 1x.
- Ajouter 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.
- Couler le gel dans un support plexiglas.
- Ajouter un ou deux peignes pour former des puits dans le gel.
- Laisser le gel polymériser.
- Enlever les peignes et démouler le gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Immerger complètement le gel dans du tampon TAE 1x.
- Déposer les échantillons dans les puits, alourdis par du bleu de bromophénol (solution d'alourdisseur/colorant) à raison de 1/10 du volume final, dans les puits.



**Figure M1 : Marqueur de poids moléculaire HyperLadder 1 (Bioline)**

- Charger également dans un ou plusieurs puits un marqueur de taille (ou de masse) approprié (figure M1).
- Laisser migrer. Il est recommandé de ne pas migrer à un voltage supérieur à 100 Volts pour avoir une bonne séparation des différentes bandes d'ADN.
- Visualiser les bandes d'ADN sous U.V.

Attention: il est recommandé d'utiliser des gants pour manipuler tout ce qui est, ou a pu, être en contact avec le bromure d'éthidium ainsi que de se protéger les yeux des rayons U.V. à l'aide d'un casque ou de lunettes en plexiglas.

### 2.3.2. Minipréparation d'ADN plasmidique

#### 2.3.2.1. Minipréparation

Cette méthode a pour but l'extraction rapide d'une petite quantité d'ADN plasmidique (1-7 $\mu$ g) à partir d'une culture d'*E. coli*.

Une minipreparation se divise en quatre étapes :

- La lyse alcaline des bactéries.
- La précipitation des protéines et des débris cellulaires.
- La précipitation de l'ADN plasmidique.
- Le lavage et la resuspension de l'ADN plasmidique.

La lyse bactérienne est réalisée grâce à une solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) et du NaOH. Le SDS dénature les protéines et le NaOH dénature l'ADN chromosomique et plasmidique. Une solution de neutralisation permet ensuite la renaturation des brins plasmidiques. L'ADN simple brin ainsi que les protéines sont éliminées par précipitation.

Kit utilisé: CONCERT™ Rapid Plasmid Purification Systems

- Inoculer 5 à 10 ml de milieu LB (+antibiotique) avec une colonie isolée obtenue sur milieu solide.
- Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation.



***Pvu II***

5'-CAG↓CTG-3'  
3'-GTC↑GAC-5'

***Kpn I***

5'-GGTAC↓C-3'  
3'-C↑CATGG-5'

***EcoR I***

5'-G↓AATTC-3'  
3'-CTTAA↑G-5'

**Figure M2 : Exemple d'enzymes de restriction**

Etape préliminaire: préchauffer entre 65°C et 70°C un aliquot d'eau distillée et rajouter l'ARNase A au tampon de suspension G1 ainsi que l'ethanol au tampon de lavage G4.

- Récolte des cellules: centrifuger environ 1 à 5 ml de la culture.
- Reprise des cellules: reprendre le culot dans 250 µl du tampon de suspension G1+ARNase A et resuspendre les cellules.
- Lyse des cellules: ajouter 250 µl de la solution de lyse G2. Mélanger en inversant le tube 5 fois. Incuber la solution à une température ambiante pendant 5 minutes.
- Neutralisation: ajouter 350 µl du tampon de neutralisation M3 et mélanger en inversant le tube 5 fois. Centrifuger la solution à 12000 rpm pendant 10 minutes.
- Chargement de la cartouche: placer une cartouche à centrifuger dans un tube de 2 ml. Déposer le surnageant obtenu à l'étape précédente au sommet de la colonne. Centrifuger à 12000 rpm pendant 1 minute. Eliminer la solution sortie de la cartouche.
- Lavage de la cartouche: replacer la cartouche dans un tube de 2 ml. Déposer 700 µl du tampon de lavage G4. Centrifuger à 12000 rpm pendant 1 minute. Eliminer la solution écoulee. Re-centrifuger à 12000 rpm pendant 1 minute pour éliminer tout résidus possible du tampon de lavage.
- Elution de l'ADN plasmidique: placer la cartouche de centrifugation dans un tube de récupération de 1,5 ml. Déposer 75 µl d'eau stérile chaude directement au centre de la cartouche. Incuber à température ambiante pendant 1 minute et centrifuger à 12000 rpm pendant 2 minute.

#### 2.3.2.2. Restriction d'ADN plasmidique

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui se lient à l'ADN double brin en des sites spécifiques, palindromique et généralement de 4 à 6 bp, et qui coupent l'ADN au niveau de ces séquences ou à proximité.

Certaines enzymes de restriction coupent les liens phosphodiester de façon symétrique (figure M2). On dit alors que l'ADN est coupé à bouts francs (ex : *Pvu* II). D'autres coupent les liens phosphodiester de façon asymétrique laissant une extrémité 3' protrudante (ex : *Kpn* I) ou laissant une extrémité 5' protrudante (ex : *EcoR* I).

L'ADN peut être restreint par plusieurs enzymes en même temps si celles-ci fonctionnent dans un tampon commun.

## MATERIEL ET METHODES

- Dans un tube Eppendorf, mélanger l'ADN à restreindre,  $1/10^{\text{ème}}$  du volume du tampon de restriction concentré 10x, 1 unité d'enzyme par  $\mu\text{g}$  d'ADN à restreindre, puis porter à volume avec de l'eau distillée.
- Incuber au moins 1 heure à température optimale pour l'enzyme (généralement  $37^{\circ}\text{C}$ ).
- Si nécessaire, inactiver l'enzyme par chauffage (15 à 20 minutes à  $65^{\circ}\text{C}$  pour une enzyme thermosensible), par extraction au phénol ou par addition d'EDTA.



# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- Beaupre, C.E., Bohne, J., Dale, E.M. et Binns, A.N. (1997) Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.*, **179**, 78-89.
- Cai, S.J. et Inouye, M. (2002) EnvZ-OmpR interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **24**, 24.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagijs, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N. et Overbeek, R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 443-448.
- Huang, J., Cao, C. et Lutkenhaus, J. (1996) Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. *J. Bacteriol.*, **178**, 5080-5085.
- Macnab, R. (1996) Flagella and motility. In Neidhardt, F.C. (ed.) *E. coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. ASM, Washington, Vol. 2, pp. 123-145.
- Phizicky, E.M. et Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.*, **59**, 94-123.
- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. et Legrain, P. (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, **409**, 211-215.
- Walhout, A.J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., Thierry-Mieg, N. et Vidal, M. (2000a) Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science*, **287**, 116-122.
- Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S. et Vidal, M. (2000b) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.*, **328**, 575-592.
- Yim, L., Vandenbussche, G., Mingorance, J., Rueda, S., Casanova, M., Ruyschaert, J.M. et Vicente, M. (2000) Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self-interaction and cell division. *J. Bacteriol.*, **182**, 6366-6373.