

Caractérisation du site actif de la relaxase d'ICESt3 de Streptococcus thermophilus

Philippe Monteiro

▶ **To cite this version:**

Philippe Monteiro. Caractérisation du site actif de la relaxase d'ICESt3 de Streptococcus thermophilus. Biotechnologies. 2016. hal-01824834

HAL Id: hal-01824834
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01824834

Submitted on 27 Jun 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

MASTER BioMANE
Biotechnologies Microbiologie Aliment
Nutrition Environnement

BioMANE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Master BioMANE 2e année

Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Spécialité Biotechnologie Microbienne

Année Universitaire 2015/2016

Caractérisation du site actif de la relaxase d'ICE*St3* de *Streptococcus thermophilus*

Mémoire présenté par

Philippe MONTEIRO

Stage effectué du 15 janvier au 15 juillet 2016

Laboratoire DynAMic, UMR1128 INRA – Université de Lorraine

Encadré par le docteur Nicolas Soler, Maitre de conférences

Remerciements

Je tiens à remercier Nicolas Soler, pour m'avoir permis de participer à son projet d'étude mais également pour son soutien, ses explications, sa confiance et surtout la patience qu'il m'a accordé tout au long de ce stage.

Je remercie également Emilie Robert, qui a participé à mon encadrement et fait découvrir le merveilleux monde des protéines, je la remercie également pour tout le soutien qu'elle m'a apporté durant ce stage.

Je remercie aussi Marie Dominique Devigne qui a traité la structure de notre protéine, et grâce à qui les traitements de ces données m'ont permis de réaliser des expériences intéressantes, et qui m'a accordé une bonne partie de son temps.

Je remercie Claudia, ma compatriote portugaise, qui m'a permis de perfectionner mon portugais mais aussi d'élaborer le protocole de mutagénèse.

Je remercie Virginie pour sa bonne humeur et son grand soutien

Je remercie Stephane, Johan et Anthony pour tous les petits délires auxquels ils m'ont fait participer.

Je remercie Nari, Charles et Maxime pour m'avoir apporté leur bonne humeur.

Je remercie mon petit Ganache avec qui on se marre tout le temps, et qui m'a permis de ne pas manger seul au RU.

Je remercie Nazim, Paul et Benji le pompier pour m'avoir toujours apporté le sourire avec leurs blagounettes.

Je m'excuse pour les oubliés mais malheureusement je manque de temps, sachez tous de même que je vous remercie de m'avoir supporté durant ce stage.

Abréviations :

BET = bromure d'éthidium

CD = dichroïsme circulaire

FS : fraction soluble

FT : fraction totale

GF = Gel filtration

ICE = intégrative conjugative element

IPTG = isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

Lin = plasmide sous forme linéaire

MOB = mobilisation

OC = plasmide sous forme open circular

oriT = origine de transfert

Rel*St3* = relaxase ICE*St3*

SC = plasmide sous forme superenroulé

SDS = laurysulfate de sodium

TAE = Tris Acetate EDTA

Les acides aminés pourront être écrit en code monolettre ou en 3 lettres (ex : Tyrosine/Tyr/Y)

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des ICE et des plasmides conjugatifs dans les différentes groupes de l'arbre phylogénétique de VirB4 – d'après Guglielmin i *et al.*……3

Figure 2 : Représentation des trois étapes principales de la conjugaison d'un ICE ❶ Excision, ❷ Transfert ❸ Intégration……3

Figure 3 : Protéines nécessaires à l'initiation et la terminaison de la conjugaison - exemple du plasmide F – d'après Bellanger *et al.* 2013……4

Figure 4 : Structure modulaire de l'ICE*St3* de *Streptococcus thermophilus* d'après Bellanger *et al.* 2009……5

Figure 5 : Représentation de la répartition des familles MOB et alignement de membres de la famille MOB_Q……5

Figure 6 : Alignement illustrant la conservation des Tyr catalytiques potentielles de différentes relaxases de la famille MOB_F (Grandoso *et al*, 2000)……9

Figure 7 : Alignement des séquences protéiques de relaxases et protéines Rep appartenant à la famille MOB_T/Rep-trans……10

Figure 8 : structure de la protéine RepSTK1 du plasmide pSTK1……12

Figure 9 : Schéma de la méthode de PCR par overlap……14

Figure 10 : Résumé des premières étapes de purification de la Rel*St3*……17

Figure 11 : PCR 1 et 2 pour les mutations Y252A, Y252F, K254A et E257A……21

Figure 12 : Analyse des produits des PCR sur colonies réalisés sur les clones candidats pour les mutations Y252A, Y252F, K254A et E257A……22

Figure 13 : Gel 1ere colonne de nickel……23

Figure 14 : Gel 2^e colonne……24

Figure 15 : Gel GF……24

Figure 16 : spectre de dichroïsme circulaire……24

Figure 17 : Test d'activité relaxase avec différentes températures……24

Figure 18 : Test d'activité relaxase à différents temps avec la protéine sauvage. ……25

Figure 19 : Test d'activité relaxase avec différents métaux……26

Figure 20 : Test d'activité relaxase de la Rel*St3* sauvage……26

Figure 21 : Test d'activité pour les mutants putatifs du site actif……27

Figure 22 : Graphe représentant l'activité de la Rel*St3* sauvage des mutants putatifs dans la prise en charge du métal……..30

Figure 23 : Test d'activité relaxase de la RelSt3 avec gel BET……31

Figure 24 : Test de liaison à l'ADN par la RelSt3……31

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activité de RepA étudié in vivo, par quantification de l'intermédiaire de réplication simple brin……8

Tableau 2 : Résumé des mutations effectuées afin d'identifier les potentielles Y catalytiques de TrcW(R388) ainsi que leur effets sur la conjugaison et l'activité endonucléase simple brin……9

Tableau 3 : Représentation de l'avancé de mon travail au laboratoire……25

SOMMAIRE

Introduction

I. Le laboratoire DynAMic……1
II. L'évolution bactérienne par acquisition de gènes……2
III. Le transfert conjugatif……3
IV. L'organisation génomique des ICE……4
V. Les différentes familles de relaxases……6
1. Les familles à une tyrosine……7
2. Les familles à deux tyrosines……8
3. La relaxase d'ICESt3, une représentante d'une nouvelle famille de relaxase……8
VI. Travaux antérieurs portant sur des protéines de la superfamille MOB_T/Rep-trans……9
1. Travaux sur des relaxases de la famille MOBT……10
2. La protéine RepD du plasmide pC221……11
3. La protéine RepSTK1 du plasmide pSTK1……11
VII. Les objectifs de mon stage……12

Matériels et méthodes

I. Souches bactériennes et plasmides utilisés dans ce travail……13
II. Mutagénèse et clonage de la séquence codant la RelSt3 mutée chez E. coli……14
1. Mutagénèse dirigée par PCR overlap……14
2. Digestion des inserts et ligation dans le vecteur pSKB3……15
3. Transformation dans E. coli DH5α……15
4. Transformation dans E. coli BL21……15
III. Purification de protéines……17
1. Induction de la protéine……17
2. Purification de la protéine……17
IV. Test d'activité relaxase……18
V. Dichroïsme circulaire ……19

Résultats……20

Discussion……32

Annexe……37

Références bibliographiquess……39

I. Présentation du laboratoire

J'ai effectué mon stage au laboratoire DynAMic qui étudie la dynamique des génomes ainsi que l'adaptation microbienne, c'est une unité mixte de recherche entre l'INRA et l'Université de Lorraine. Il se situe à la faculté des sciences et technologies à Vandœuvre-lès-Nancy.

La thématique de recherche est basée sur les mécanismes d'évolution rapide chez les bactéries par transfert horizontal. Ce dernier correspond aux échanges d'informations génétiques entre bactéries apparentées ou non. Les études sont effectuées *in vivo*, mais également *in vitro* sur la caractérisation des mécanismes moléculaires de ce transfert d'informations génétiques.

Il est composé d'un directeur Pierre Leblond, d'un directeur adjoint Bertrand Aigle, de 7 autres enseignant chercheur dont mon maître de stage Nicolas Soler, 4 doctorants et 7 techniciens et une gestionnaire.

Le laboratoire se divise en 2 thématiques de recherches : l'équipe StrAda (*Streptomyces* Adaptation) qui travaille sur les *Streptomyces* et l'équipe ICE-TeA (*ICE Transfer & Adaptation*) qui travaille sur les Streptocoques. :

- StrAda axe ses recherches sur les *Streptomyces*, qui sont des bactéries ubiquistes des sols forestiers et utilisées notamment dans la fabrication d'antibiotiques, d'anticancéreux ou encore d'insecticides. L'équipe StrAda étudie particulièrement la dynamique et l'adaptation génomique des *Streptomyces* au sein de la communauté microbienne forestière de la rhizosphère qui regroupe grand nombre d'autres bactéries, de champignons qui interagissent avec les racines végétales.

- l'équipe ICE-Tea travaillant sur les Streptocoques se trouvant dans le lait et ceux retrouvé dans la cavité orale chez l'homme. Les études de cette équipe, dont j'ai fait partie durant ce stage, s'intéresse à des éléments génétiques mobiles particuliers : les ICE (integrative conjugative element). Ces éléments peuvent coder des gènes d'adaptation tels que des gènes de résistance d'antibiotiques ou de virulence par exemple. L'équipe met en place à la fois des approches génétiques et moléculaires, afin de mieux comprendre comment ces ICE se transfèrent par conjugaison.

II. L'évolution bactérienne par acquisition de gènes :

Les bactéries sont les organismes vivants les plus répandus sur la surface du globe. Au fil du temps, elles ont réussi à coloniser la plupart des milieux présents sur la planète. Chez les bactéries, les transferts horizontaux, qui consistent en l'acquisition de gènes provenant d'un autre organisme sans en être le descendant, jouent un rôle clé dans l'évolution de leurs génomes. Ces transferts se produisent entre souches de la même espèce mais également entre bactéries éloignées du point de vue phylogénétique. Ils jouent un rôle essentiel dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. Ceci sera le cas, par exemple, si les gènes transférés confèrent une fonction d'adaptation avantageuse pour l'organisme, comme la résistance à des antibiotiques, l'utilisation de nouveaux substrats ou la synthèse de nouveaux métabolites. Inversement, si les gènes transférés ne sont pas utiles à l'hôte, ils ne seront pas maintenus dans le génome (pression de sélection).

Chez les bactéries, un mécanisme majeur d'acquisition de gènes est la conjugaison. Elle résulte du transfert d'un élément conjugatif d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse et nécessite un contact physique étroit entre elles. Deux grandes classes d'éléments conjugatifs autonomes existent chez les bactéries : ceux qui sont retrouvés sous forme libre dans le cytoplasme, les plasmides conjugatifs, et ceux intégrés dans les génomes, les ICE pour « Integrative Conjugative Element ».

Depuis quelques années, on observe une forte augmentation du nombre de génomes bactériens complets séquencés. Cette recrudescence s'explique en premier lieu par les nouvelles technologies qui permettent le séquençage d'un génome de quelques mégabases en très peu de temps et à un coût raisonnable. Cependant de nombreux problèmes d'annotation des génomes demeurent. Si nous sommes capables de séquencer et d'identifier certains gènes, il n'est pas encore possible d'identifier la fonction de tous les gènes codant les protéines. En moyenne, un tiers des protéines d'un génome sont de fonction inconnue. En particulier, les éléments conjugatifs intégratifs restent encore mal connus et ne sont que très rarement annotés voire identifiés dans les génomes bactériens. Bien que peu d'ICE aient été étudiés à ce jour, les analyses de divers génomes suggèrent que ceux-ci sont extrêmement répandus (Figure 1) et jouent donc un rôle important dans l'évolution bactérienne (Guglielmini et al. 2011; Xavier Bellanger et al. 2014)

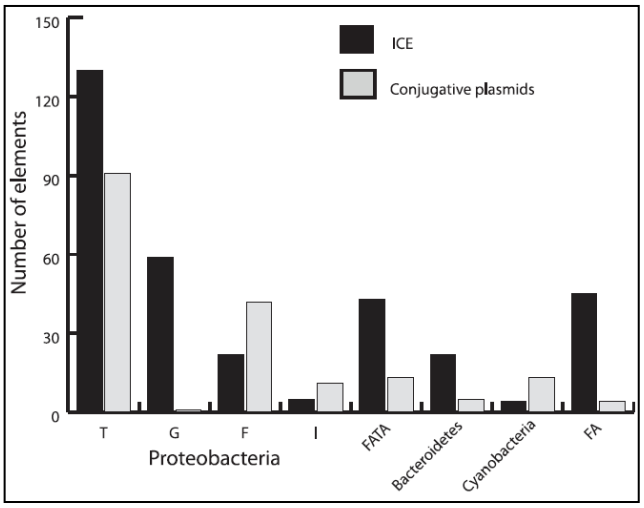


Figure 1 : Distribution des ICE et des plasmides conjugatifs dans les différentes groupes de l'arbre phylogénétique de VirB4 – d'après Guglielmini *et al.*
Les familles de VirB4 correspondent aux quatre types MPF de protéobactérie (T, G, F et I) ainsi que leur famille associé avec d'autres phyla (bacteroidetes, cyanobacteria) ou un mélange de phyla (FA = firmicutes et actinobacteria) or FATA (firmicutes, actinobacteria, tenericutes et archaea)

III. Le transfert conjugatif

Le mécanisme du transfert conjugatif des ICE est mal connu mais est probablement analogue à celui des plasmides conjugatifs, bien décrit pour divers plasmides de bactéries gram positif (Grohmann *et al.* 2003). Toutefois, contrairement aux plasmides, l'ICE doit tout d'abord s'exciser du génome bactérien pour pouvoir se transférer. La figure 2 schématise les trois étapes majeures du processus de transfert des ICE par conjugaison.

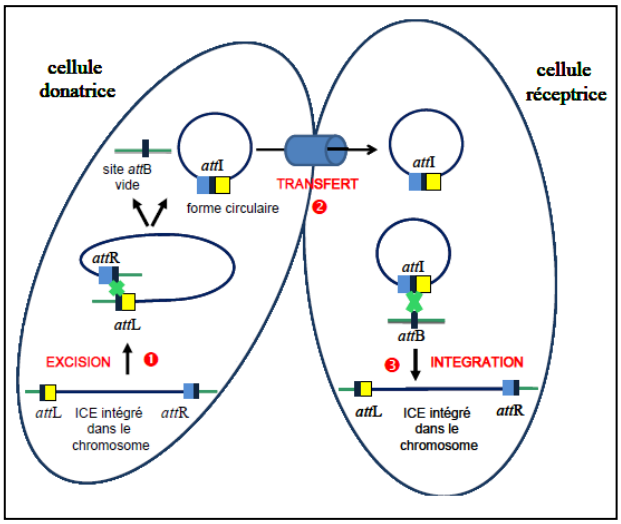


Figure 2 : Représentation des trois étapes principales de la conjugaison d'un ICE ❶ Excision, ❷ Transfert ❸ Intégration
Les rectangles bleus et jaunes représentent respectivement les bras des sites *attR* et *attL* et leurs équivalents dans le site *attI*.

L'étape d'excision (❶ sur la figure 1) est le plus souvent effectuée par une intégrase qui catalyse un événement de recombinaison entre les séquences *attR* et *attL* bordant l'élément. Ceci conduit à l'excision de l'ICE sous forme circulaire ainsi qu'à la formation des sites *attB* (site chromosomique dépourvu d'ICE) et *attI* (porté par la forme circulaire de l'élément). La forme circulaire de l'ICE est ensuite prise en charge par le relaxosome, un complexe multi-protéique contenant notamment la relaxase. Cette dernière est une endonucléase qui génère

une coupure simple brin au niveau de l'origine de transfert (o*riT*) de l'élément (figure 3). Elle se lie de façon covalente à l'extrémité 5' du brin coupé au niveau de *l'oriT*. Le complexe ADN-relaxase est ensuite recruté par une protéine de couplage qui va permettre son entrée au travers du pore de conjugaison (étape ❷, figure 1). La protéine de couplage possède aussi une fonction ATPase et va donc fournir de l'énergie nécessaire au transfert de l'élément.

L'élément est ensuite intégré dans le génome de la cellule réceptrice grâce à l'intégrase (étape ❸, figure 1). Elle catalyse la recombinaison entre les séquences identiques des sites *attI* et *attB* ce qui aboutit à l'intégration de l'ICE dans le génome. L'élément est alors bordé des sites *attL* et *attR*.

A noter que lors du transfert, l'ICE se réplique par cercle-roulant, il est également conservé dans la cellule donatrice.

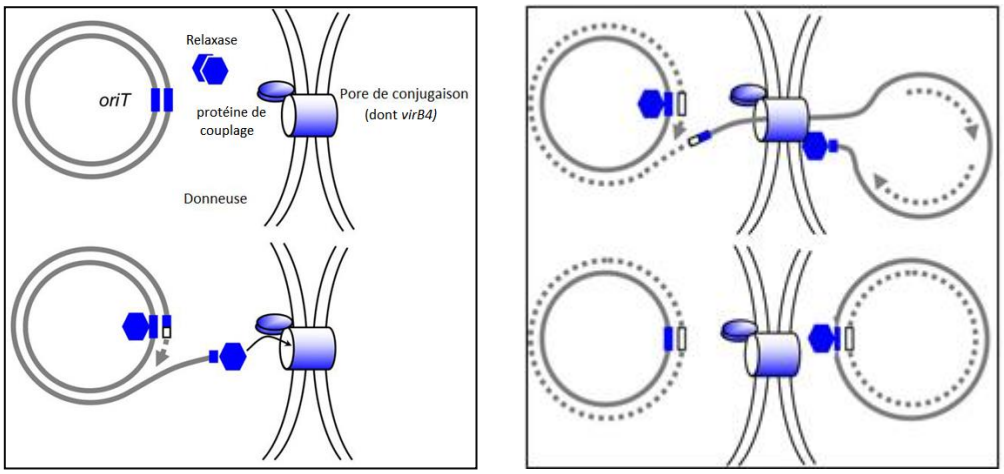


Figure 3 : protéines nécessaires à l'initiation et la terminaison de la conjugaison - exemple du plasmide F – d'après Bellanger *et al.* 2014

La relaxase est la protéine qui va permettre d'initier ce transfert conjugatif, c'est elle qui va intervenir la première dans ce mécanisme de transfert. Une fois que la coupure a été réalisée par la relaxase, elle se lie covalemment à l'extrémité 5' du brin d'ADN coupé. C'est ensuite la protéine de couplage, une ATPase du système de sécrétion de type IV (ou T4SS), qui va recruter le complexe ADN/relaxase et l'entrainer vers le pore de conjugaison qui est nécessaire au transfert de l'élément. Le transfert se fait de manière simple brin par un système de réplication en cercle roulant. Le brin transféré va être religué et sera ensuite répliqué, ce qui permet d'obtenir le brin complémentaire (Figure 3).

Le transfert aura lieu par l'intermédiaire d'un mécanisme de sécrétion de type IV ou T4SS qui est un ensemble protéique. Ce dernier est composé des différentes protéines codées par les

gènes du module de conjugaison, comme la protéine de couplage et les protéines nécessaires à la formation du pore de conjugaison.

IV. L'Organisation génomique des ICE

Les ICE sont capables de se transférer de façon autonome par conjugaison. Ils codent toutes les fonctions nécessaires à leur excision, leur transfert par conjugaison ainsi que leur intégration. Leur taille est variable allant de 10 à 680 kb. Les ICE possèdent une structure et une évolution modulaires, c'est à dire que les gènes assurant une même fonction sont regroupés entre eux. Ils sont composés de 4 types de modules : module de recombinaison, module de conjugaison, module de régulation et module d'adaptation (Figure 4).

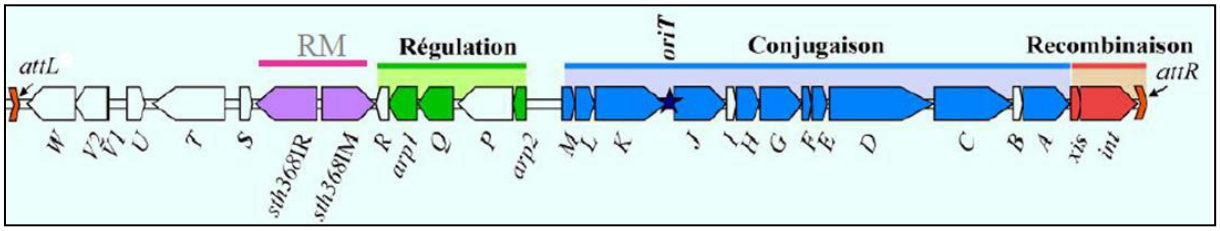


Figure 4 : Structure modulaire de l'ICE*St3* de *Streptococcus thermophilus* d'après Bellanger *et al.* 2009

Le module de recombinaison code l'intégrase et sous sa forme circulaire contient *attI*. Le module de conjugaison contient les gènes nécessaires au transfert par conjugaison, dont ceux codant la relaxase et la protéine de couplage notamment. Ce module contient également l'*oriT*. Le module de régulation régule l'expression et l'excision de l'ICE. Le module d'adaptation quant à lui code des gènes pouvant apporter un bénéfice à l'hôte dans un environnement donné, comme la résistance à des antibiotiques ou des gènes de virulence avec comme exemple l'ICE*Tn916* possédant une résistance à la tétracycline, l'ICE*VanG* portant un gène de résistance à la vancomycine, qui pose particulièrement problème en santé publique dans l'infection par les streptocoques. (Xavier Bellanger et al. 2014; Srinivasan et al. 2014)

Au laboratoire l'ICE étudié est l'ICE*St3* de la famille ICE*St3*, qui est retrouvé chez *Streptococcus thermophilu*s, une Firmicute utilisé lors de la fabrication de yaourts, et dont sa température optimale de croissance est de 42°C. L'ICE*St3*, dont le transfert a été démontré au laboratoire, code un système de restriction-modification. Figure 4(X. Bellanger et al. 2009).

V. Les différentes familles de relaxases

Comme nous l'avons vu plus haut, la relaxase va permettre l'initiation et la terminaison du transfert conjugatif. En règle générale, les relaxases possèdent 1 ou 2 domaines protéiques, dont un domaine relaxase retrouvé le plus souvent au niveau N-ter et un domaine hélicase plutôt retrouvé du côté C-ter. (Garcillán-Barcia *et al.* 2009)

Le domaine relaxase est celui qui va permettre l'activité endonucléase simple brin. Le domaine hélicase quant à lui aura un rôle dans la réplication en cercle roulant. Les domaines relaxases sont par ailleurs analogues à d'autres protéines impliquées dans l'initiation de la réplication en cercle-roulant de nombreux plasmides non conjugatifs et de nombreux virus comme le phage phiX174. Ces dernières sont les protéines Rep (pour réplication). Les protéines Rep ne sont pas des relaxases car elles ne permettent pas, *a priori*, d'initier la conjugaison. Elles ont cependant une activité similaire pour ce qui est de la coupure du plasmide ainsi que sa religation. Des travaux réalisés majoritairement sur des plasmides conjugatifs ont permis de discriminer différentes familles de relaxases à ce jour. On retrouve 6 familles de relaxases (Figure 5). Pour différencier ces familles des études phylogénétiques ont été effectuées, le nom donné à ces familles est composé de MOB et d'une lettre, l'appellation MOB venant du terme mobilisation. On retrouve les familles suivantes : MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P et MOB_V (Figure 5A, (Garcillán-Barcia *et al.* 2009). Pour chaque famille de relaxase on va retrouver 2 à 3 motifs conservés entre les membres de la famille : un motif, qui est parfois absent, dont on n'a pas encore déterminé le rôle, un motif qui porte la tyrosine catalytique et un motif portant un motif HxH (2 histidines séparées par un autre acide aminé). Le motif HxH permet, à l'aide des histidines, de coordonner un cation divalent tel que Mg^{2+} et Mn^{2+} (Figure 5B).

Les protéines Rep, sont des protéines d'initiation de la réplication en cercle-roulant possédant une activité de coupure similaire aux relaxases. Elles possèdent des motifs similaires à ceux des relaxases. On retrouve un motif portant une ou deux tyrosines catalytiques ainsi qu'un motif comportant un HxH (Chandler et al. 2013).

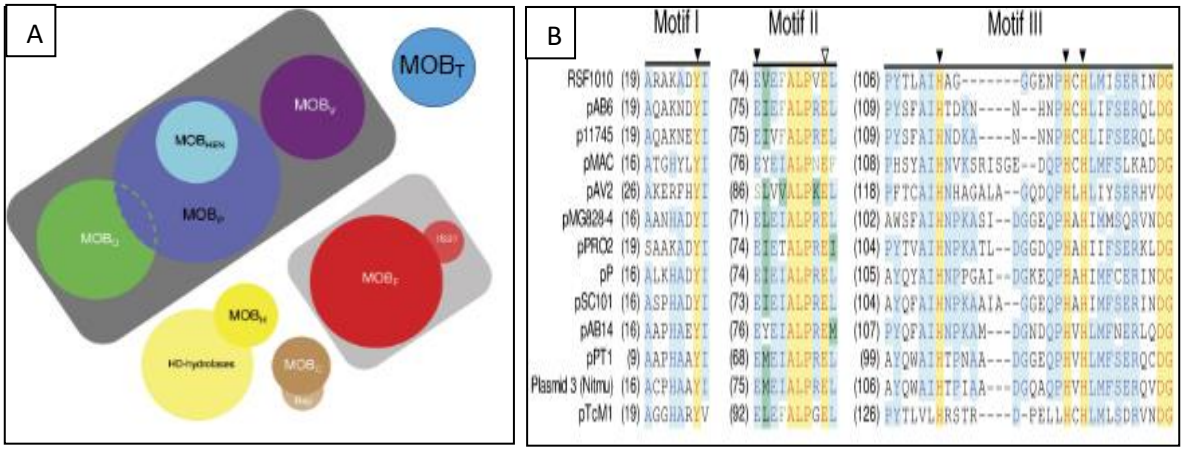


Figure 5 : Représentation de la répartition des familles MOB et alignement de membres de la famille MOB_Q
A : Sur cette figure sont représentées les familles de relaxases possédant une seule tyrosine catalytique (rectangle gris foncé) et celles possédant 2 tyrosines catalytiques (rectangle gris clair), les familles non retrouvées dans l'un de ces 2 rectangles n'ont pas encore été assez caractérisés. Adapté de (Garcillán-Barcia *et al.* 2009)
B : Sur cette figure on observe 3 motifs avec le motif I possédant une tyrosine (flèche noire) ce motif est donc caractérisé comme motif catalytique. Le motif II est présent mais on ne connaît pas encore bien son rôle et le motif III présentant le motif HxH étant le motif permettant la coordination du métal.

Parmi ces différentes familles de relaxases, certaines ont été caractérisées biochimiquement et sont classées comme relaxase possédant une seule ou deux tyrosines catalytiques, la tyrosine étant un acide aminé essentiel pour l'activité endonucléase simple brin de la protéine (notamment grâce à son groupement OH).

Lors de mon stage je me suis intéressé à la relaxase de l'ICE*St3* appartenant à la famille MOB_T, qui n'avait pas été identifiée en 2009 par Garcillan-Barcia *et al.* L'appartenance de cette relaxase à la famille MOB_T a été mise en évidence récemment grâce à la plateforme Mobyle (outil ConjScan) mise au point par l'équipe d'Edouardo Rocha à l'Institut Pasteur (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::CONJscan-T4SSscan). Cette famille présente la particularité de ne pas posséder de motif HxH, ainsi d'autres acides aminés pourraient intervenir dans la prise en charge d'un éventuel cation.

1. Les familles à une tyrosine

La tyrosine est un acide aminé ayant un pouvoir catalytique, il permet l'activité de la relaxase ou protéine Rep en catalysant la coupure simple brin au niveau de l'*oriT*.

Des études dans les années 1990 ont été réalisées en mutant plusieurs potentielles tyrosines catalytiques une à une de la protéine RepA du plasmide pC194 (*Staphylococcus aureus*), ce qui a permis de déterminer que pour cette protéine, la tyrosine en position 214 est la tyrosine catalytique car si elle est muté la réplication du plasmide est nettement amoindrie. Le fait que

cette réplication ne soit pas nulle laisse supposer que d'autres acides aminés pourraient intervenir dans l'activité de cette protéine. (Noirot-Gros et al, 1994).

Ils ont réalisé un alignement avec des protéines phylogénétiquement proches afin de déterminer quels pourraient être les autres acides aminés impliqués. Ils ont étudié ceux étant conservés et ont identifié par mutations que les glutamates en position 142 et 210 étaient essentiels pour l'activité car une fois mutés l'activité est quasiment nulle. Ils ont donc montré que la tyrosine à elle seule ne peut permettre l'activité de la protéine. Ci-dessous un tableau qui résume les mutations effectuées.

Amino acid changes	Activity (%)
Tyr56−Phe	100
Tyr152−Phe	50
Tyr166−Phe	50
Tyr173−Phe	100
Tyr214−Phe	5
Tyr214−Ser	2
Tyr243−Phe	50
Glu142−Ala	<1
Glu210−Ala	2
Asp220−Ala	50
Tyr209−Phe	75
Ser215−Ala	50
Ser219−Ala	75
Asp218−Ala	100

Tableau 1 : Activité de RepA étudié *in vivo*, par quantification de l'intermédiaire de réplication simple brin
La mutation de la tyrosine 214 n'abolit pas totalement l'activité de RepA, alors que la mutation du glutamate 142 l'abolit. La mutation du glutamate 210 ne possède quasiment plus d'activité non plus.

Grâce à cette étude, ils ont déterminé que pour la protéine RepA de pC194, une seule Tyr catalytique a été identifiée.

2. Les familles à 2 tyrosines

Plusieurs protéines Rep ont été étudiées présentant 2 tyrosines catalytiques, notamment la protéine A codée par le virus PhiX174. Concernant des relaxases à deux tyrosines, la relaxase TrwC du plasmide R388 (plasmide conjugatif chez *E. coli*) a été caractérisée par mutagénèse. Cette protéine, également apparentée à la relaxase codée par le plasmide F, possédait initialement 4 tyrosines catalytiques potentielles conservées (Figure 6,(Grandoso *et al.* 2000) Grandoso *et al*, 2000). Ils ont donc muté ces 4 tyrosines et étudié l'activité de la relaxase afin de déterminer quelle serait la ou les tyrosines catalytiques. Ils ont rapidement écarté la tyrosine 27 comme tyrosine catalytique principale car sa mutation s'est avérée avoir peu d'effet sur l'activité de la relaxase. D'après leurs résultats ils ont déterminé que la Y18 et la Y26 seraient les tyrosines catalytiques principales, et les Y19 et Y27 seraient les tyrosines secondaires pour TrwC. (Figure 6, Tableau 2, (Grandoso, Pilar *et al*, 2000)).

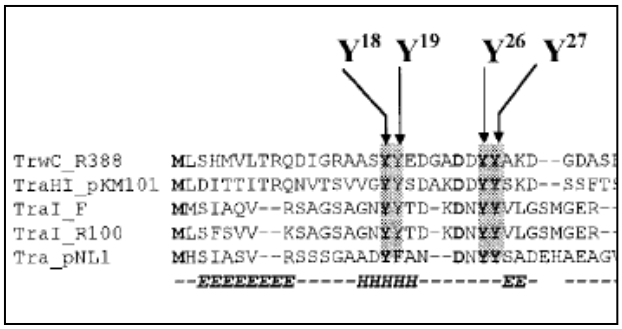


Figure 6 : Alignement illustrant la conservation des Tyr catalytiques potentielles de différentes relaxases de la famille MOB$_F$ (Grandoso *et al*, 2000)

Active center	Conjugative transfer (%)	Oligonucleotide cleavage (%)
YY-Y	100.0	13
FY-Y	0.2	6
YF-Y	20.0	15
FF-Y	0.2	8
YY-F	11.0	6
YF-F	5.0	7
FY-F	<0.01	0
FF-F	<0.01	0

Tableau 2 : Résumé des mutations effectuées afin d'identifier les potentielles Y catalytiques de TrcW(R388) ainsi que leur effets sur la conjugaison et l'activité endonucléase simple brin

D'autres études ont été réalisées pour des relaxases ou protéines Rep à 2 Tyr, et l'observation générale est que l'une des tyrosines est considérée comme la primaire et la deuxième plutôt comme une tyrosine accessoire ou secondaire. C'est-à-dire que si on mute la tyrosine primaire la secondaire pourra prendre le relais afin de permettre l'activité de la relaxase mais plus faiblement (Odegrip and Haggård-Ljungquist 2001);(Nash *et al*. 2011)

3. La relaxase d'ICE*St3*, une représentante d'une nouvelle famille de relaxase

L'équipe a eu recours à une plateforme nommée Phyre2 (**P**rotein **H**omology /Analog**Y** **R**ecognition **E**ngine) avant mon arrivée au laboratoire. Cette plateforme permet de prédire la structure secondaire d'une protéine, mais donne aussi la possibilité de retrouver une similarité de structure 3D avec des protéines dont la structure a été résolue (Guglielmini et al. 2011); (Kelley et al, 2015).

Les résultats de cette analyse en utilisant la séquence de la relaxase de l'ICE*St3* comme requête a permis de montrer que la structure de notre protéine serait proche de celle de deux protéines de la famille Rep-trans (pfam2486), RepSTK1 du plasmide pSTK1, et RepDE, comportant le domaine Rep du plasmide pC221 (Carr *et al.* 2016).

On peut réaliser un alignement avec la Rel*St3*, d'autres relaxases d'ICE appartenant à la famille MOB$_T$ retrouvées chez l'ICE*Tn916* et l'ICE*515* ainsi qu'avec des protéines Rep-trans. Toutes ces protéines possèdent la particularité de ne pas posséder de motif HxH.

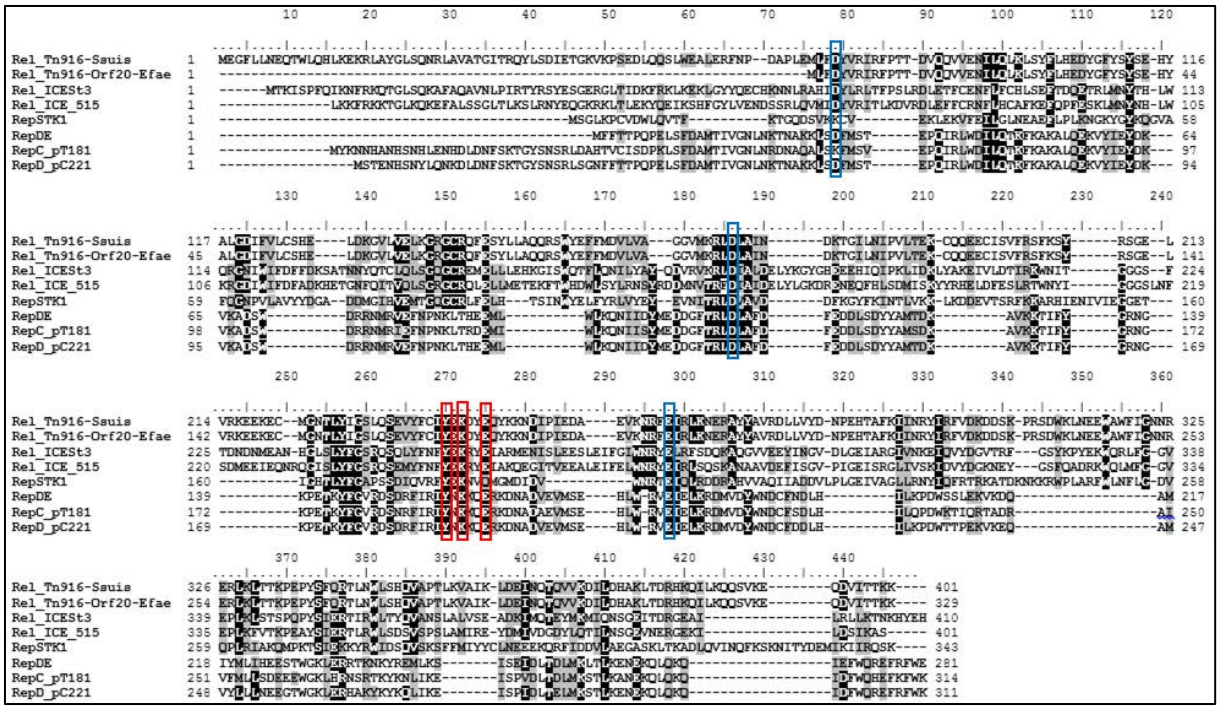


Figure 7 : Alignement des séquences protéiques de relaxases et protéines Rep appartenant à la famille MOB$_T$/Rep-trans.
Les deux premières séquences correspondent à des relaxases d'ICE*Tn916* (l'une d'une souche de *Streptococcus suis*, l'autre d'une souche d'*Enterococcus faecalis*, ((Roberts and Mullany 2011), (Rocco and Churchward 2006). Les deux séquences suivantes correspondent à la relaxase d'ICE*St3* ainsi qu'à la relaxase de l'ICE*515* de *S. agalactiae* (Puymege et al. 2013). On trouve ensuite les séquences de 4 protéines Rep-trans de plasmides de firmicutes se répliquant en cercle roulant : les Rep dont la structure 3D a été résolue récemment (Carr, Phillips, and Thomas 2016), et les Rep des plasmides pT181 et pC221 cités précédemment. Les positions notées par un cadre rouge correspondent aux résidus mutés dans les travaux de caractérisation du site actif de RepD de pC221 (Thomas, *et al.* 1990). Les positions repérées par des cadres bleus correspondent aux résidus impliqués par Carr *et al* dans la coordination du cation pour la protéine RepSTK1.
Cet alignement a été réalisé à l'aide de ClustalW (Larkin et al. 2007)

VI. Travaux antérieurs portant sur des protéines de la superfamille MOB$_T$/Rep-trans

1. Travaux sur des relaxases de la famille MOB$_T$

Deux études moléculaires sommaires ont été réalisées avec des relaxases d'ICE proches de la Rel*St3*, appartenant à la famille MOB$_T$. En 2006, Rocco et Churchward ont montré que la relaxase de l'ICE*Tn916* (*Enterococcus faecalis*) réalise des coupures simples brin de manière peu spécifique, sur des séquences riches en GT. Cependant, en présence de l'intégrase codée par ce même ICE, la coupure de la relaxase devient plutôt site-spécifique et coupe au niveau d'un site TGGT situé au niveau de l'origine de transfert (*oriT*). (Rocco and Churchward 2006).
Une deuxième étude concernant une relaxase de la famille MOB$_T$ concerne la relaxase codée par l'ICEBs1 (*Bacillus subtilis*). Dans ce travail, l'origine de transfert a été identifiée

expérimentalement, mais la seule étude moléculaire concerne la détermination du site de coupure de la relaxase, se trouvant dans une région de l'*oriT* conservée, au niveau d'une épingle à cheveux riche en GC. (Lee and Grossman 2007). A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à la caractérisation biochimique d'une relaxase de la famille MOB_T.

2. La protéine RepD du plasmide pC221

La protéine RepD est retrouvée chez un plasmide pC221 qui est un plasmide mobilisable (*S. aureus*). Elle fait partie de la famille Rep-trans. La protéine RepD possède une seule tyrosine catalytique, et ne porte pas de motif HxH.

A notre connaissance, il s'agit de la seule protéine de la superfamille MOB_T/Rep-trans pour laquelle une étude du site actif a été réalisée (Thomas *et al.* 1990). L'activité endonucléase simple brin de la protéine sauvage et de la protéine mutée pour la tyrosine 188 en phénylalanine a été comparée, indiquant que la protéine mutée présentait une activité abolie. La tyrosine Y188 a ainsi été identifiée comme catalytique. Les auteurs ont également muté les acides aminés E196, K193 et R189 (Figure 7), et observé une diminution de l'activité des protéines mutantes correspondantes. Ces acides aminés joueraient donc un rôle dans cette activité et feraient donc partie du site catalytique. (Thomas *et al.* 1990)

3. RepSTK1 du plasmide pSTK1

Le plasmide pSTK1 est retrouvé chez *Geobacillus stearothermophilus*. Comme pC221, il s'agit d'un petit plasmide à réplication en cercle roulant, apparenté à pT181. La protéine RepSTK1 est une protéine Rep qui ne possède pas non plus de motif HxH. Ce motif n'étant pas présent, Carr *et al.* ont utilisé la structure 3D de la protéine afin de déterminer la région où pourrait se loger un cation. Après l'identification de cette région, ils ont détecté la présence d'acides aminés acides pouvant intervenir dans la prise en charge du cation (Figure 8, Carr *et al.* en 2016). Ils ont ainsi pu déterminer le potentiel emplacement de fixation du métal. Ils ont ensuite muté les acides aminés acides qui pourraient intervenir dans la coordination de ce cation. Les mutations réalisées sont E214A, D142A et D46A (Figure 7). Les résultats ont démontré que lorsqu'ils étaient mutés un à un, l'activité endonucléase simple brin de la protéine Rep-trans était abolie. Un cation divalent étant nécessaire à l'activité de la protéine, s'il n'y a aucune prise en charge de ce dernier la protéine se retrouve inactive ((Carr et al. 2016).

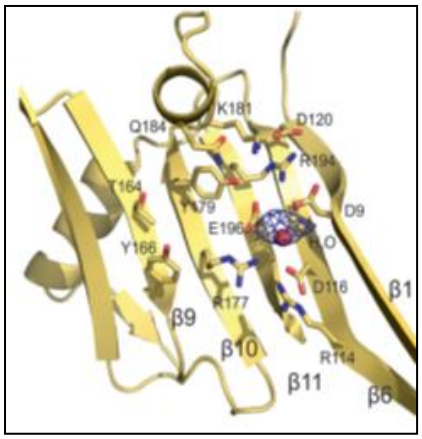


Figure 8 : structure de la protéine RepSTK1 du plasmide pSTK1.

Pour RepSTK1 on peut voir les acides aminés sur lesquels le métal vient se fixer (polygone violet)

<u>Objectifs du stage :</u>

Les objectifs de mon stage sont basés sur la caractérisation du site actif de la relaxase de l'ICE*St3*.

- Caractérisation de l'activité relaxase de la protéine sauvage
- Identification des acides aminés putatifs du site actif
- Identification des acides aminés impliqués dans la coordination du cofacteur cationique

Pour atteindre ces objectifs, j'ai identifié les résidus candidats à muter, réalisé une mutagénèse dirigée sur les résidus sélectionnés, purifié les protéines mutantes correspondantes à partir d'*E. coli*, et testé leur activité relaxase suivant un protocole préalablement mis au point avec la protéine sauvage.

Matériels et Méthodes

I. Souches bactériennes et plasmides utilisés dans ce travail

Les clonages ont été réalisés avec la souche d'*E. coli* DH5α , Elle ne possède aucune résistance à un antibiotique.

La souche d'*E. coli* BL21 qui est la souche utilisée pour l'expression hétérologue des protéines recombinantes.

On utilise, un vecteur d'expression, pSKB3, qui dérive du plasmide pET28a. Il permet d'induire la production d'une protéine avec de l'IPTG, inducteur gratuit de l'opéron lactose. L'expression passe par l'ARN polymérase T7 qui est également inductible avec de l'IPTG, le vecteur permettant de placer le gène à exprimer sous le contrôle du promoteur du phage T7. Ce plasmide pSKB3 porte une résistance à la kanamycine.

On emploi un plasmide pBR322 portant 300 pb orrespondant à la séquence de l'origine de transfert de l'ICE*St3* (*oriT*). Ce plasmide est utilisé comme substrat lors des tests d'activité de la relaxase. Il porte une résistance à l'ampicilline.

Gel SDS-PAGE

Les gels de protéines sont des gels SDS-PAGE avec 10% d'acrylamide. Pour chaque fraction que l'on souhaite déposer, on prélève 40µL et on ajoute 10µL de bleu Laemmli 5X (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5**%** β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue), que l'on fait ensuite chauffer à 95°C durant 5min pour dénaturer les protéines.

Gel d'agarose

Tous les gels d'ADN sont des gels d'agarose 1%, TAE 1X.

L'appareil de capture d'image pour les gels d'agarose est le GelDOC™ XR et le logiciel de capture d'image est Image Lab®.

Le logiciel utilisé pour réaliser les alignements de séquences est BioEdit avec l'outil ClustalW.

II. Mutagénèse et clonage de la séquence codant la RelSt3 mutée chez *E. coli*

1. Mutagénèse dirigée par PCR overlap

Pour la réalisation de mutants ponctuels de la Rel*St3*, on utilise la méthode de la PCR overlap. On utilise des amorces portant la mutation d'un ou deux nucléotides susceptibles de changer l'acide aminé que l'on souhaite muter (Annexe 3). On réalise 3 PCR, les 2 premières vont permettre d'avoir les fragments de « droite » et de « gauche », qui seront ensuite utilisées comme matrice pour amplifier le gène entier portant la mutation. Ce protocole a été mis au point au début de mon stage.

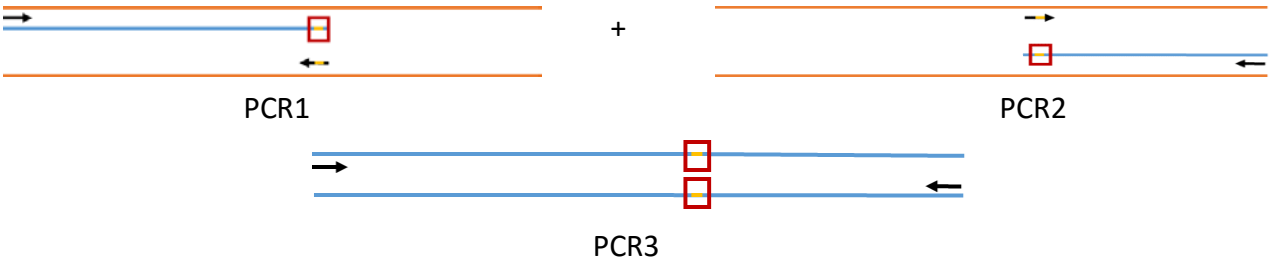


Figure 9 : Schéma de la méthode de PCR par overlap

a. PCR 1 et PCR 2

Ces 2 PCR vont permettre d'obtenir les 2 premiers fragments du gène de la protéine à muter. La composition du mix PCR dans 50 µL final est : 0,2 µM d'amorces, 50 ng d'ADN, 0,2 µM de dNTP, 1 unité de Taq Phusion (Fermentas), 10 µL Tampon 5X HF.

Afin d'obtenir assez de matériel pour la prochaine étape, il faut idéalement faire 3 tubes de 50 µL pour chaque PCR. On dépose sur gel 2 µL de produits de PCR afin de vérifier si le fragment attendu est bien obtenu. S'il est présent, on purifie les produits de PCR à l'aide du kit geneJET PCR purification kit (Thermo scientific).

b. PCR 3

Une fois les 2 fragments purifiés obtenus, on réalise une PCR overlap afin d'obtenir le gène complet codant pour la Rel*St3* portant la mutation voulue.

Le mix PCR qui est utilisé dans 50 µL final : 50 ng de produits de PCR1 et de PCR2, 0,2 µM d'amorces, 0,2µM de dNTP, 1 unité de Taq Phusion, 10 µL tampon 5X HF

On dépose 2 µL sur gel afin de s'assurer de l'obtention du fragment voulu, comme pour les 2 premières PCR. Après la vérification, dépôt sur gel d'agarose de la totalité de la PCR3 que l'on extrait sur gel (Thermo Scientific).

Pour ces 3 PCR, les programmes sont en Annexe.

2. Digestion des inserts et ligation dans le vecteur pSKB3

Après purification des inserts on les digère avec les enzymes *Nde*I et *BamH*I, le vecteur d'expression est également digéré avec les mêmes enzymes. Les inserts et le vecteur sont placé à incuber 1 heure à 37°C puis 10 min à 80°C afin d'inactiver les enzymes. On dépose sur gel d'agarose des produits digéré afin d'évaluer le ratio nécessaire pour la ligation des inserts dans le vecteur. On réalise une ligation avec de la T4 DNA ligase dans 20 µL final : 1 unité d'enzyme, 2 µL tampon T4, inserts et vecteurs (définie par le ratio). On laisse incuber la nuit sur la paillasse à température ambiante.

3. Transformation dans *E. coli* DH5α

Les bactéries utilisées sont des bactéries *E. coli* DH5α chimiocompétentes. Les cellules sont mises en présence de 2 µL de chaque produit de ligation durant 30 min dans la glace. Ensuite un choc thermique est réalisé durant 30 secondes à 42°C, puis 5 minutes dans la glace. On ajoute alors 900µL de LB SOC puis les cellules sont incubées à 37°C durant 1 heure, afin d'exprimer le gène de résistance à la kanamycine. Ensemencement sur boîtes LB + kanamycine (50µg/mL), les boîtes sont ensuite placées à 37°C sur la nuit.

On réalise une PCR sur colonie, afin de vérifier que les clones n'ont pas reçu un vecteur vide.

Le mix utilisé pour cette réaction est le suivant : 0,2µM d'amorces; 0,2µM de dNTP ; 1 unité de Dreamtaq (Fermentas) ; 5µL tampon Dreamtaq 5X.

Le programme de la PCR se trouve en annexe 2.

Ensuite quelques clones positifs sont mis en culture en LB + kanamycine (50 µg/mL), le plasmide est extrait et envoyé à séquencer afin de vérifier que la mutation soit bien présente et qu'il n'y ait pas d'autre mutation indésirée.

4. Transformation dans BL21

Si les résultats du séquençage sont positifs, on transforme le plasmide portant la relaxase mutée dans la souche d'expression *E. coli* BL21. Cette transformation est réalisée de la même façon que pour la souche DH5α, C'est ensuite cette souche possédant le vecteur d'expression et la Rel*St3* mutée qui sera utilisée pour induire la protéine.

III. Purification de protéines

1. Induction de la protéine

A mon arrivée au laboratoire, le gène codant la protéine Rel*St3* sauvage avait déjà été cloné dans un plasmide pSKB3 et utilisé pour transformer la souche d'expression *E. coli* BL21. Après une préculture sur la nuit à 37°C en agitation dans 20mL de LB avec de la kanamycine (50 µg/mL), 1 litre de LB avec de la kanamycine (50 µg/mL) est ensemencé à 37°C. La croissance est alors suivie jusqu'à une DO_{600} = 0,5. En ce milieu de phase exponentielle, 10mL de culture non induite sont prélevés, et la production de la protéine est induite par ajout d'IPTG à 0,5 mM final. La culture est alors placée à 18°C en agitation durant 5 heures. Ensuite on récupère 10mL de culture induite, et le reste de la culture est centrifugée à 4500 rpm durant 15min. Le culot de cellules induites est pesé et stocké à -80°C.

Les 10mL de culture non induite et induite récupérés en cours de manipulation, sont centrifugés à 4200 rpm durant 10 minet congelés à -20°C.

Test d'induction afin de vérifier que la protéine a bien été surproduite dans la fraction soluble

On récupère les culots de culture non induite et induite à -20°C. On effectue la reprise des culots dans 1 mL/1DO dans un tampon de lyse 1 (Annexe X). On prélève 500µL et on lance une sonication en eppendorf des culots repris (3 fois 5min). On prélève 40µL de chaque tube, cela correspondant à la fraction total (ou FT). On lance une centrifugation à 4°C, à 16000rpm durant 30min. On récupère par la suite, 40µL du surnageant, ce qui correspond à la fraction soluble (ou FS). On dépose pour chaque protéine non induite et induite, la FT et la FS sur gel SDS-PAGE acrylamide 10%. Si la protéine se retrouve dans la FS on peut procéder à la purification de la protéine.

2. Purification de la protéine

Le clonage réalisé en vecteur pSKB3 permet l'ajout en Nter d'une étiquette poly His, et d'un site de cleavage à la protéase du virus de la mosaïque du tabac (TEV).

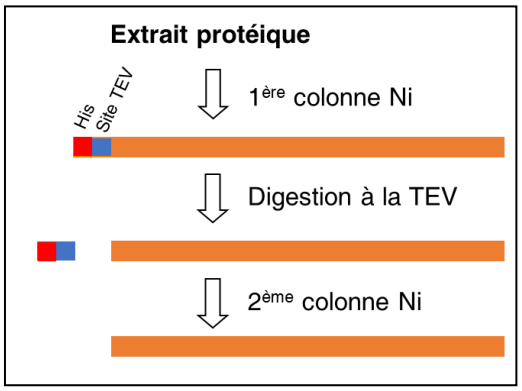


Figure 10 : Stratégie de purification de la Rel*St3*

a. 1ère chromatographie d'affinité au nickel

Le culot induit est lysé dans un tampon de lyse 2 (Annexe 1). On le laisse sous agitation à 4°C dans le tampon afin de reprendre le culot congelé et de débuter la lyse des bactéries. On effectue une sonication, avec un sonicateur Brandson (amplitude 50%, temps de sonication total 1 min, temps de pulsation 20s, temps de repos 59,9s, température maximale 15°C), jusqu'à obtenir une diminution de DO_{600nm} d'au moins 5 fois. On effectue ensuite une centrifugation à 4°C, à 16000g durant 1h30, car la protéine se trouve dans la fraction soluble (FS). On utilise dans une chromatographie d'affinité au nickel (colonne Histrap FF de 1mL) afin de fixer la protéine présente dans la FS, à l'aide de l'appareil AKTA prime, qui permet de suivre la DO_{280nm} et de collecter les fractions. La protéine passe dans la colonne, se fixe grâce au His-tag et est éluée avec différents tampons par des concentrations croissantes en imidazole. L'imidazole est un compétiteur pour le nickel, la protéine sera donc éluée à des concentrations fortes en imidazole. La méthode est la suivante : 10CV (volume de colonne) à à 10mM, le volume de la fraction soluble de la protéine, 10CV à 10mM, 10 CV à 50mM, 24 CV gradient de 50 à 300 mM, 10CV 300 mM ; les concentrations sont correspondent à celle de l'imidazole dans le tampon.

On récupère les fractions adéquates et que l'on dépose sur gel SDS-PAGE acrylamide 10%. On poole ensuite les fractions étant les plus pures possibles. Il est ensuite nécessaire de dialyser le mix, à 4°C, dans le tampon 1 afin d'équilibrer la concentration d'imidazole du mix, pour qu'elle soit de 10 mM pour la deuxième chromatographie d'affinité.

a. Digestion à la TEV et deuxième chromatographie d'affinité au nickel

On reprend la protéine en dialyse que l'on dose en Bradford, c'est un indicateur colorimétrique à DO_{595nm}, puis on digère la protéine à la TEV afin d'éliminer l'étiquette histidine. Le rapport de concentration TEV : Rel*St3* est de 1 : 5. On laisse la TEV agir à 4°C sur la nuit sans agitation.

On récupère la digestion que l'on passe sur une nouvelle résine de nickel (Ni sepharose™ 6 fast low, de GE Healthcore) de 0,8mL, sur une colonne de paillasse, afin de ne récupérer que notre protéine libérée du His-tag. Cela permet aussi d'éliminer tag mais également la TEV ajouté pour la digestion, car elle porte une étiquette histidine. Notre protéine qui ne porte plus cette étiquette ne se fixera plus à la colonne. Après le passage de la protéine sur la résine, plusieurs lavages de la colonne sont effectués, les tampons sont similaire à ceux utilisé en première colonne (Wash1, Wash2, Elution). Deux lavages de la colonne sont réalisés avec 2,5 mL pour chaque tampon.

On effectue un prélèvement des différentes fractions que l'on dépose sur gel. On pool ensuite les fractions contenant la protéine et étant le moins contaminé possible. On dialyse le mix dans un tampon 2 qui ne possède pas d'imidazole afin de l'éliminer du tampon où se trouve la protéine.

b. Gel-filtration

Afin d'éliminer au maximum les contaminants qui pourraient être présents avec notre protéine, on réalise une chromatographie par exclusion de taille, la gel-filtration (Superdex 200 HiLoad 16/600 pg – GE Healthcare).

On fait passer notre protéine dans cette colonne et elle sera éluée selon sa taille, les protéines de masse moléculaire importantes étant les moins retenues dans la colonne, alors que les plus petites le seront davantage. L'élution de la colonne se fera en utilisant le tampon de dialyse, le tampon 2.

On récupère les fractions adéquates, correspondant au pic majoritaire, puis dépôt sur gel SDS-PAGE acrylamide 10%. On poole des fractions contant la protéine la plus pure possible et conservation de la protéine à 4°C.

IV. Test d'activité relaxase

L'activité de la relaxase est une activité endonucléase simple brin visualisé par la relaxation topologique d'un plasmide superenroulé. On cherche à observer si la Rel*St3* coupe un plasmide portant l'oriT *St3*, en observant si à partir d'un plasmide superenroulé on observe l'apparition d'un plasmide sous forme open-circular. Pour cette expérience on utilise un tampon (20mM TrisHCl pH 7,6 ; 200mM NaCl ; 0,05mM EDTA, 1% glycérol et 1mM BSH) (Lorenzo-Diaz et al. 2011), une concentration de 5mM de cation divalent ainsi que diverses concentrations de protéine. Le plasmide utilisé est un plasmide pBR322 portant l'oriT*St3*.

Le premier temps d'incubation est de 20 minutes à 30°C puis ajout d'1µL de SDS 10% (0.5% final) et d'1µL de protéinase K à 2mg/mL (0.1 mg/mL final).

Le deuxième temps d'incubation de 20 minutes à 30°C, permet de laisser agir la protéinase K et d'éliminer la Rel*St3*, puis on ajoute de 4 µL de bleu de dépôt. On dépose sur gel d'agarose 1%, TAE 1X, avec une migration à 50V d'environ 17 heures.
Pour les tests d'optimisation la quantité de protéines est de 2µg, les températures utilisées pour la première étape sont 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C. Pour ce qui est de l'optimisation du temps de réaction de la première étape, les temps utilisés sont 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes.

V. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode spectroscopique permettant d'étudier les structures secondaires et tertiaires des protéines. Elle est basée sur l'absorption différentielle de lumière polarisée circularisée gauche et droite par des molécules optiquement actives. Ainsi, les structures secondaires des protéines, de même que les séquences non structurées, présentent des spectres de DC caractéristiques entre 180 et 260 nm. Les spectres DC sont enregistrés sur un appareil CD Chirascan d'Applied Photophysics dans l'UV lointain de 180 à 260 nm. La bande passante est de 1 mm. Le spectre de référence a été établi avec le tampon NaP 50mM, NaF 500mM. Les protéines sont dialysées dans ce même tampon. Des cuves plates en quartz de 0,01 cm de trajet optique ont été utilisées, remplies avec 30 µL de tampon ou de protéines concentrées entre 5µM et 30µM

I. Identification des résidus potentiellement impliqués dans l'activité de la relaxase.

1. Les acides aminés putatifs du site actif

Pour la recherche de ces acides aminés, je me suis appuyé sur la protéine RepD du plasmide pC221 dont la mutagénèse du site actif a été réalisée ((Thomas et al. 1990). J'ai donc effectué un alignement avec d'autres relaxases de la famille MOBT ainsi que des protéines Rep de la famille Rep-trans (Figure 7)

Comme on peut le voir sur l'alignement, 3 acides aminés conservés, correspondant à 3 des acides aminés mutés chez pC221, sont retrouvés chez la Rel*St3*. Ces acides aminés sont la Y252, la K254 et le E257, que nous avons décidé de muter. Avec cet alignement on observe également que la S237 est conservé. La S237 est semblable à l'alanine, mais elle possède un groupement OH qui pourrait potentiellement avoir un rôle dans l'activité relaxase, c'est pourquoi nous avons décidé de la muter.

2. Les acides aminés ayant un rôle putatif dans la prise en charge du métal

L'équipe s'est référée à l'étude effectuée sur la protéine RepSTK1 retrouvée chez le plasmide pSTK1 dont la structure 3D est connue (numéro PDB : 4CIJ) (Carr *et al.*, 2016).

Une collaboration avec le LORIA a été réalisée et a permis de modéliser la structure putative de la Rel*St3* et plus particulièrement du site sur lequel viendrait se fixer le métal.

Avec le même alignement (Figure 7), on retrouve 3 acides aminés, qui pour Carr et al ont été impliqué dans la prise en charge du cation et ont été muté chez la RepSTK1. Chez notre Rel*St3* ces acides aminés sont D72, D177, et E280. Sur cet alignement nous avons également observé un acide aminé conservé proche de D177, D181 qui pourrait potentiellement avoir aussi un rôle dans la prise en charge du métal. Nous avons donc décidé de muter ces 4 résidus chez la RelSt3.

II. Mutagénèse par PCR overlap

1. PCR overlap

J'ai dessiné des amorces pour lesquelles 1 ou 2 nucléotides sont modifiés afin de permettre la mutation de l'acide aminé désiré, dans la séquence de la Rel*St3*. Pour toutes les mutations

l'acide aminé est muté en alanine. Pour la Y252 on réalise en plus une mutation en phénylalanine, qui est similaire à la Y sans le groupement OH, permettant ainsi de garder l'encombrement stérique du cycle aromatique. (voir tableau amorce en annexe)

Après quelques semaines d'optimisation du protocole (notamment suite à de nombeaux problèmes de rendement après purification sur gel), le protocole de mutagénèse décrit dans le matériel et méthodes a été mis au point.

Je présenterai ici seulement l'exemple des mutations des acides aminées putatifs du site actif, des résultats similaires ont été obtenus pour les mutations des acides aminés potentiellement impliqués dans la coordination du métal.
On observe que pour chaque mutation les bandes sont aux tailles attendues (environ 761pb pour la PCR1 et environ 476pb pour la PCR2).

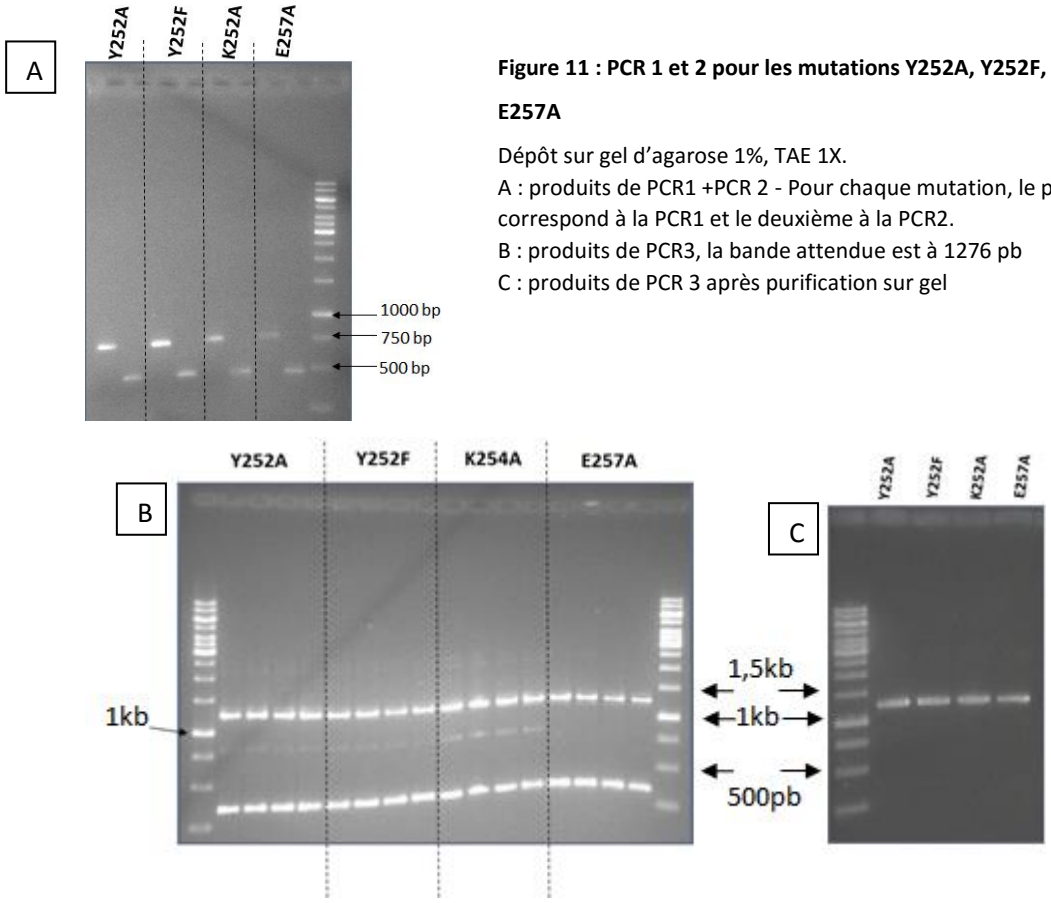


Figure 11 : PCR 1 et 2 pour les mutations Y252A, Y252F, K254A et E257A

Dépôt sur gel d'agarose 1%, TAE 1X.
A : produits de PCR1 +PCR 2 - Pour chaque mutation, le premier dépôt correspond à la PCR1 et le deuxième à la PCR2.
B : produits de PCR3, la bande attendue est à 1276 pb
C : produits de PCR 3 après purification sur gel

Pour la PCR3 on utilise comme ADN matrice les produits de PCR1 et PCR2 purifiés. Quatre réactions par mutant ont été réalisées ici, afin d'optimiser le rendement de l'extraction sur gel.

On observe bien la bande d'intérêt à la bonne taille 1 256 pb, ce qui correspond au gène entier codant pour le relaxase, mais des bandes contaminantes doivent être éliminé avant clonage. Le gel de la figure 12C présente le produit de PCR purifié pour ces 4 mutants, utilisés pour le clonage.

2. Clonage chez *E. coli*

On digère les produits de PCR3 purifiés avec les enzymes *Nde*I et *BamH*I, qui seront également utilisé sur le vecteur d'expression pSKB3 afin de permettre la ligation.

J'ai effectué la transformation avec des bactéries d'*E. coli* DH5α. J'ai effectué une PCR sur des clones obtenus afin de savoir si le plasmide transformé possédait bien le gène de la relaxase entière.

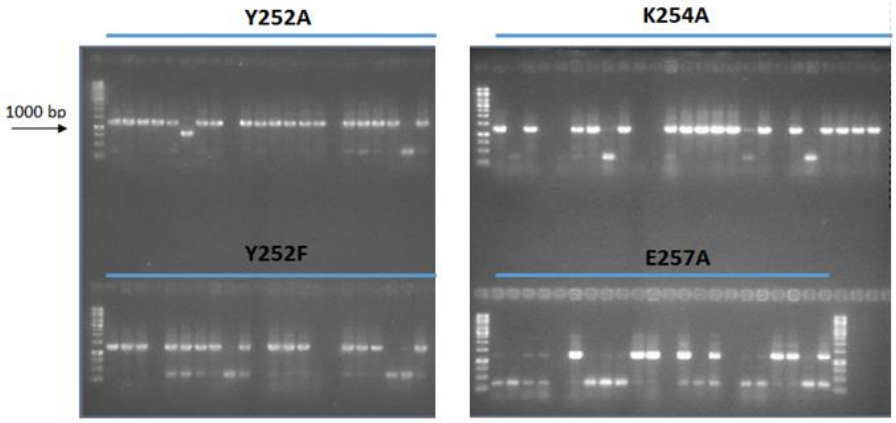


Figure 12 : Analyse des produits des PCR sur clones réalisés sur les clones candidats pour les mutations Y252A, Y252F, K254A et E257A

Dépôt sur gel d'agarose 1%

On observe que pour la majorité des clones, le gène entier codant relaxase est amplifié. Pour vérifier que le plasmide portait bien le gène de la relaxase mutée, j'ai extrait le plasmide de clones candidats et vérifié la présence de la mutation par séquençage. Le séquençage a ensuite permis de confirmer la présence de ce gène muté. Les constructions des relaxases mutées ont alors été utilisées pour transformer *E. coli* BL21, afin de réaliser l'expression hétérologue des protéines correspondantes.

Tous les mutants désirés ont été obtenues.

III. Purification des protéines : exemple de la Rel*St3* sauvage

La RelSt3 WT ainsi que chaque mutant ont été purifiées après l'expression hétérologue à partir d'E. coli en suivant le même protocole, déjà établi au laboratoire (matériels et méthodes).
Le clonage en pSKB3 permet l'ajout d'une séquence poly-His en N-ter qui permettra de conférer une affinité au Ni^{2+}, ainsi qu'une séquence de cleavage reconnue par la protéase du virus de la mosaïque du tabac (TEV)

1. 1ère chromatographie d'affinité au nickel

Après lyse d'un culot cellulaire correspondant à 1L de culture induite, l'échantillon est clarifié par centrifugation et soumis à une chromatographie d'affinité au nickel.
J'utilise un appareil de suivi de DO280 et de collecte de fractions de chromatographie, l'AKTA prime. L'élution se fait par une augmentation de la concentration d'imidazole qui est un compétiteur pour le nickel. On effectue un dépôt sur gel des fractions pour lesquelles on observe un pic.

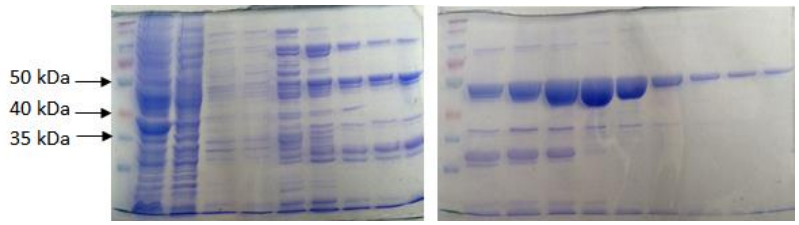


Figure 13 : Première chromatographie d'affinité au nickel

Dépôt sur gel SDS-PAGE acrylamide des différentes fractions de la première chromatographie

Dépôt sur gel SDS-PAGE acrylamide 10%

On récupère les fractions pour lesquelles on retrouve la protéine, mais également celles où on a le moins de contaminants possible. Notre bande portant la relaxase doit être la bande majoritaire. Dans cet exemple on récupère les fractions X à Y.

2. Digestion à la TEV et 2e colonne de Nickel

On digère ensuite à la TEV le mix afin d'éliminer le tag poly-His

La protéine à purifier est soumise à une deuxième colonne de Nickel au cours de laquelle notre protéine ne devrait plus se fixer, mais le tag His, les contaminants éventuels et la TEV taguée His s'y fixent.

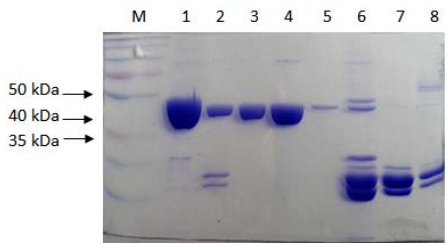


Figure 14 : 2e chromatographie d'affinité au nickel après digestion à la TEV

1 : protéine avant digestion TEV ; 2 : Load, 3 : FT, 4 : W1 10mM, 5 : W2 10mM, 6 : W1 50mM, 7 : W2 50mM, 8 : E1 300mM

Les concentrations sont données pour l'imidazole, W1 = 1er lavage, W2 = 2e lavage, E1 = 1er lavage avec tampon d'élution

Dépôt sur gel SDS-PAGE acrylamide 10%

On pool les fractions possédant la protéine. Dans cet exemple on récupère le Flow through, qui correspond à ce qui passe à travers la colonne sans se fixer, et les 2 lavages à 10 mM d'imidazole.

3. Gel-filtration

La GF a été réalisées pour la plupart des mutants, afin de s'assurer d'avoir la protéine la plus pure possible et de connaître par la même occasion le niveau d'oligomérisation de la protéine purifiée. A l'aide d'AKTA prime on analyse cette protéine par chromatographie.

On dépose ensuite sur gel SDS-PAGE les fractions pour lesquelles on observe un pic de DO_{280nm}. Par la suite on pool les fractions ne possédant que la Rel*St3* « pure ». Cette protéine pourra ensuite être utilisée afin de réaliser une expérience de test d'activité relaxase.

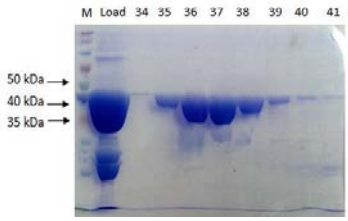


Figure 15 : Gel filtration de la RelSt3

Dépôt sur gel SDS-PAGE des fractions où le pic majoritaire à DO_{280nm} est observé

M : marqueur de taille, Load : protéine avant colonne, numéro : fractions

La GF ayant été préalablement calibrée en laboratoire avec différents standards (Annexe 4), va également nous permettre de déterminer si la Rel*St3* sauvage ou mutée est retrouvée sous forme dimérique ou non. Pour nos mutants comme pour la sauvage, elle est retrouvée sous forme dimérique.

Presque toutes nos protéines sont trouvées dans la fraction soluble et ont été purifiées avec succès en quasi-homogénéité.

Pour seulement une protéine, possédant la mutation D181A, la purification n'a pas pu aboutir car elle est devenu insoluble, et ne permet donc pas de réaliser une chromatographie d'affinité qui a été tenté deux fois.

IV. Analyse de la structuration des protéines par dichroïsme circulaire

Avant de faire les tests d'activité de la relaxase, il faut savoir si la protéine mutée est bien repliée. Si jamais on n'observe pas d'activité de la relaxase cela nous permettrai d'écarter l'hypothèse d'un mauvais repliement.

On utilise pour cela une analyse en dichroïsme circulaire permettant d'appréhender le niveau de structuration secondaire des protéines (héciles α, feuillets β, random coiled).

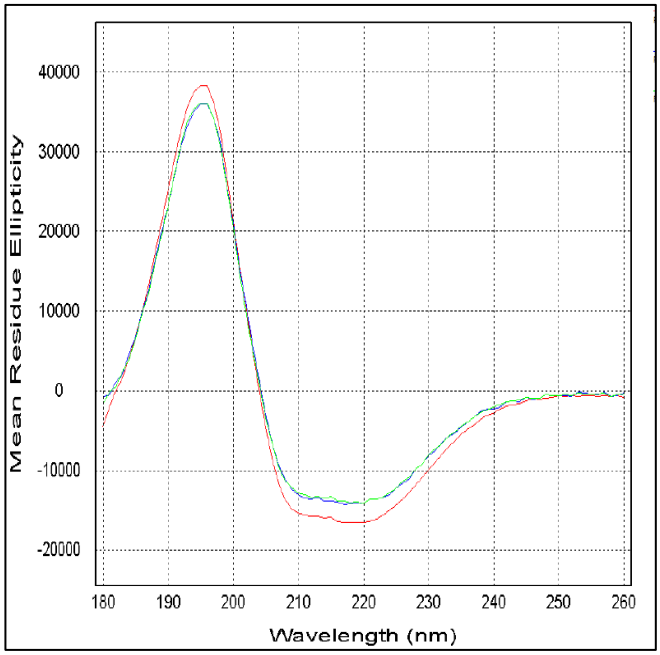


Figure 16 : spectre de dichroïsme circulaire
En rouge la Rel*St3* sauvage

En bleu le mutant S237A

En vert le mutant Y252F

Je n'ai montré ici que 2 exemples par souci de lisibilité mais toutes les protéines ont été analysées et sont bien repliées

Rel*St3*	Purification	GF	CD	Nombres de tests relaxases réalisés
WT	√	√	√	3
Y252A	√	-	√	3
Y252F	√	-	√	3
K254A	√	√	√	1
E257A	√	√	√	1
S237A	√	√	√	1
D72A	√	√	√	2
D177A	√	√	√	3
D181A	insoluble	-	-	-
E280A	√	√	√	3

Tableau 3 : Représentation de l'avancée de mon travail au laboratoire

En rouge : les mutants correspondant aux acides aminés putatifs du site actif

En bleu : les mutants correspondant aux acides aminées ayant un rôle potentiel dans la prise en charge d'un cation

V. Etude de l'activité relaxase

1. Optimisation du test d'activité relaxase avec la Rel*St3* WT

Le principe du test de l'activité relaxase (endonucléase simple brin) est d'observé si la relaxase va couper l'ADN plasmidique portant la séquence oriT de l'ICESt3. Ainsi la forme super-enroulée de l'ADN sera potentiellement coupée, et donnera une forme open-circular pour laquelle seulement un des deux brins d'ADN sera coupé.

a. Optimisation de la température d'incubation

J'ai réalisé une activité relaxase pour laquelle on utilise différentes températures. Cette étape étant l'étape permettant à la relaxase de réaliser son activité endonucléase simple brin. Pour cette étape j'ai donc utilisé les températures suivantes : 4°C, 10°C, 20°C, 30°C et 40°C. L'expérience se déroule ensuite de la même façon pour chaque tubes.
Pour ce test on utilise 5µg de protéine avec 200ng de plasmide pBR322 portant la séquence de l'oriT de l'ICESt3.

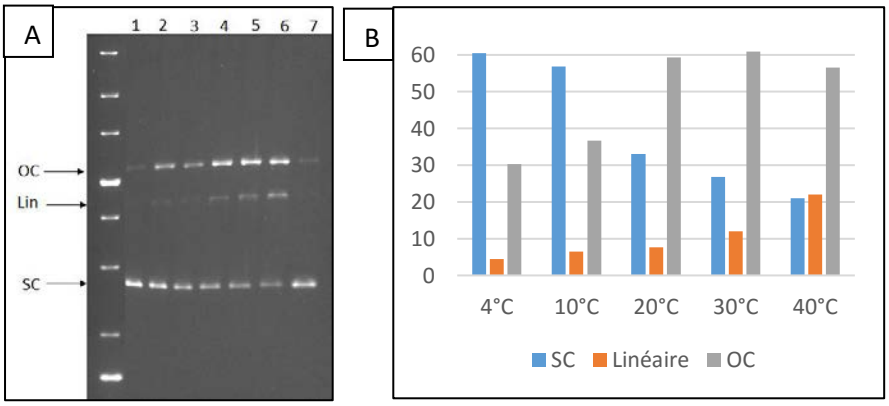


Figure 17 : Test d'activité relaxase avec différentes températures

A : Gel d'agarose, 1 = 4°C sans protéine, 2 : 4°C, 3 : 10°C, 4 : 20°C, 5 : 30°C, 6 : 40°C et 7 : 40°C sans protéine

B : Graphe représentant le pourcentage d'intensité de chaque forme selon la température utilisée pour la réaction

On observe que lorsque l'on augmente la température, la disparition du plasmide sous forme superenroulé (SC) augmente au profit de l'apparition de la forme open-circular (OC). Cependant, l'intensité d'une troisième bande augmente (Lin). Au sein de l'équipe nous avons émis l'hypothèse que cette bande serait de l'ADN linéaire, car la relaxase fixé à l'ADN pourrait réaliser sa coupure simple brin, et étant donné qu'elle reste fixée à l'ADN, elle pourrait couper l'autre brin, au même niveau, ce qui donnerait de l'ADN linéaire.

Au de ces résultats l'activité semble importante à 30°C, tout en limitant l'apparition de la bande linéaire comparé à 40°C.

b. Optimisation du temps de réaction

Maintenant que l'on a notre température idéale pour réaliser notre expérience, il est nécessaire d'estimer le temps optimal pour que l'activité relaxase ait lieu.

Différents temps d'activités pour la première étape ont donc été utilisés : 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes. On procède de la même façon ensuite, puis dépôt sur gel, migration et utilisation d'Image lab®.

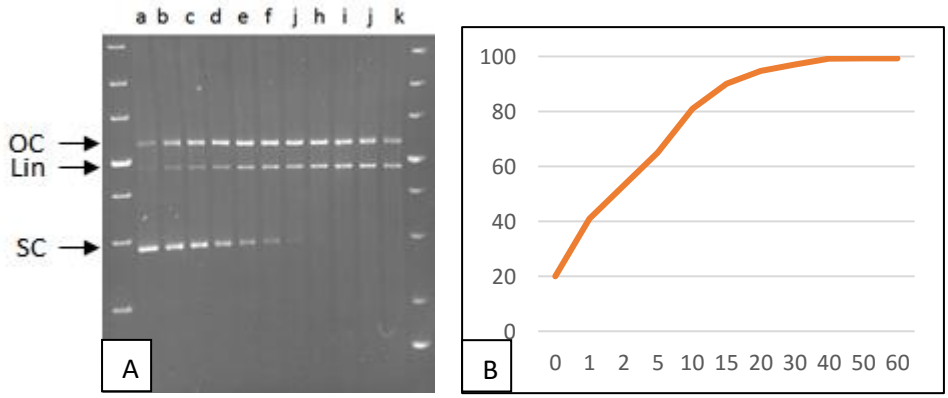


Figure 18 : Test d'activité relaxase à différents temps avec la protéine sauvage
A : Gel d'agarose ; a : 0 ; b : 1; c : 2 ; d : 5 ; e : 10 ; f : 15, g : 20 h : 30, i : 40, j : 50 et k : 60 minutes
B : Graphe représentant le temps de réaction entre l'ADN et la relaxase en minutes

On observe que plus on augmente le temps de réaction plus l'activité semble importante (diminution de la forme SC). Cependant à partir de de 20 min, on arrive à un maximum d'activité matérialisé par l'apparition d'un plateau (Fig 18B). Ce qui semblerait indiquer que 20 minutes à 30°C est suffisant pour réaliser cette expérience.

c. Recherche du meilleur cofacteur

Pour tous les tests précédents j'ai utilisé comme cation le Mn^{2+}, mais je me suis demandé si un autre métal pourrait lui aussi permettre l'activité de la relaxase et pourquoi pas une meilleure activité que Mn^{2+}.

J'ai donc réalisé cette expérience, qui est du coup standardisé à un temps d'activité de 20 minutes à 30°C, avec différentes métaux : Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+} et Co^{2+} (manganèse, magnésium, nickel, zinc, calcium et cobalt).

La concentration de chaque métal est de 5mM final mis en présence de 0,5 et 5 µg de protéine.

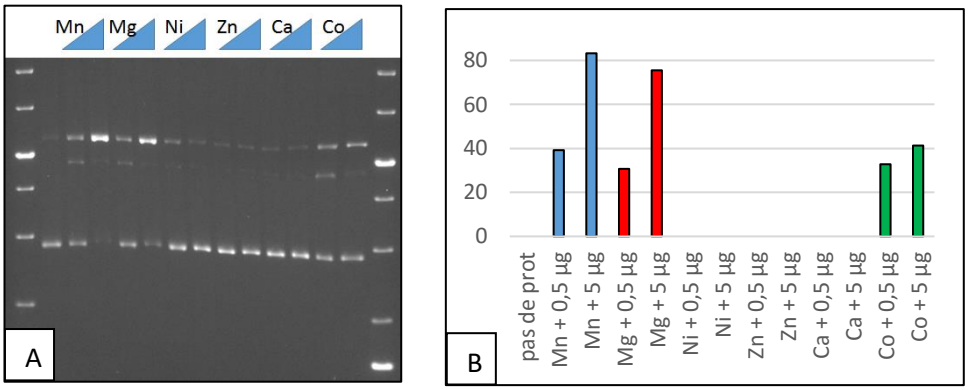


Figure 19 : Test d'activité relaxase avec différents métaux
A : Gel d'agarose, pour chaque métal 0,5 et 5 µg de protéine ont été utilisé

B : Graphe représentant l'activité relaxase selon le métal utilisé et la quantité de protéine

On observe que le nickel, le zinc et le calcium ne permettent pas d'obtenir d'activité. Par contre on peut voir que c'est le cas pour le cobalt, mais bien plus faiblement que pour le manganèse et le magnésium. Ces derniers semblent être les plus efficaces afin de permettre l'activité relaxase mais le manganèse possède tout de même un effet supérieur au magnésium, il a l'air de permettre une meilleure activité à plus faible concentration. ICI cation

d. <u>Test standard avec différentes quantités de protéines</u>

Après avoir optimisé le test d'activité relaxase, j'ai testé différentes quantité de protéines afin de standardisé le test, les quantités de protéines croissantes retenues sont : 0 / 0,02 / 0,05 / 0,2 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 7 / 10 µg. J'ai pu réaliser cette expérience en triplicat et ainsi obtenir des écart-types.

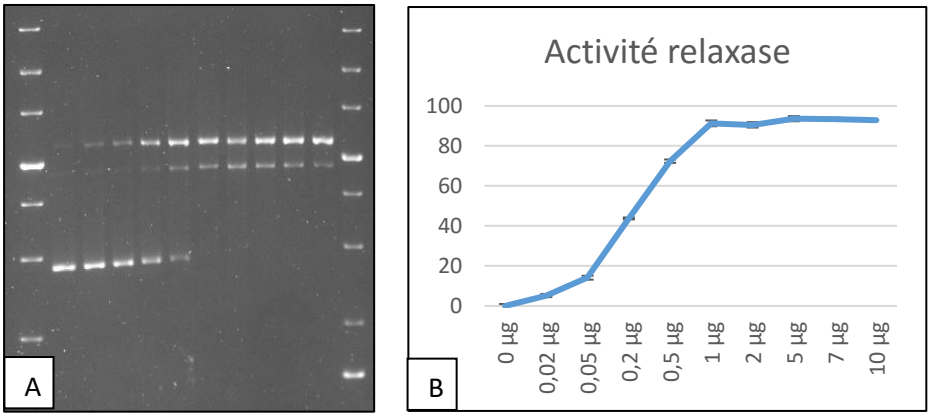


Figure 20 : Test d'activité relaxase de la Rel*St3* sauvage

A : Gel d'a1garose

B : graphe représentant l'activité relaxase

On observe ici qu'à partir de 1µg de protéine, la relaxase semble avoir une activité quasiment maximale.

Cette expérience sera ainsi reproduite avec les diverses protéines mutantes purifiées.

2. Etude de l'activité relaxase des protéines mutées

a. Relaxase mutées pour les acides aminés putatifs du site actif

J'ai effectué le test standardisé avec les relaxases mutée Y252A, Y252F, K254A et E257A.

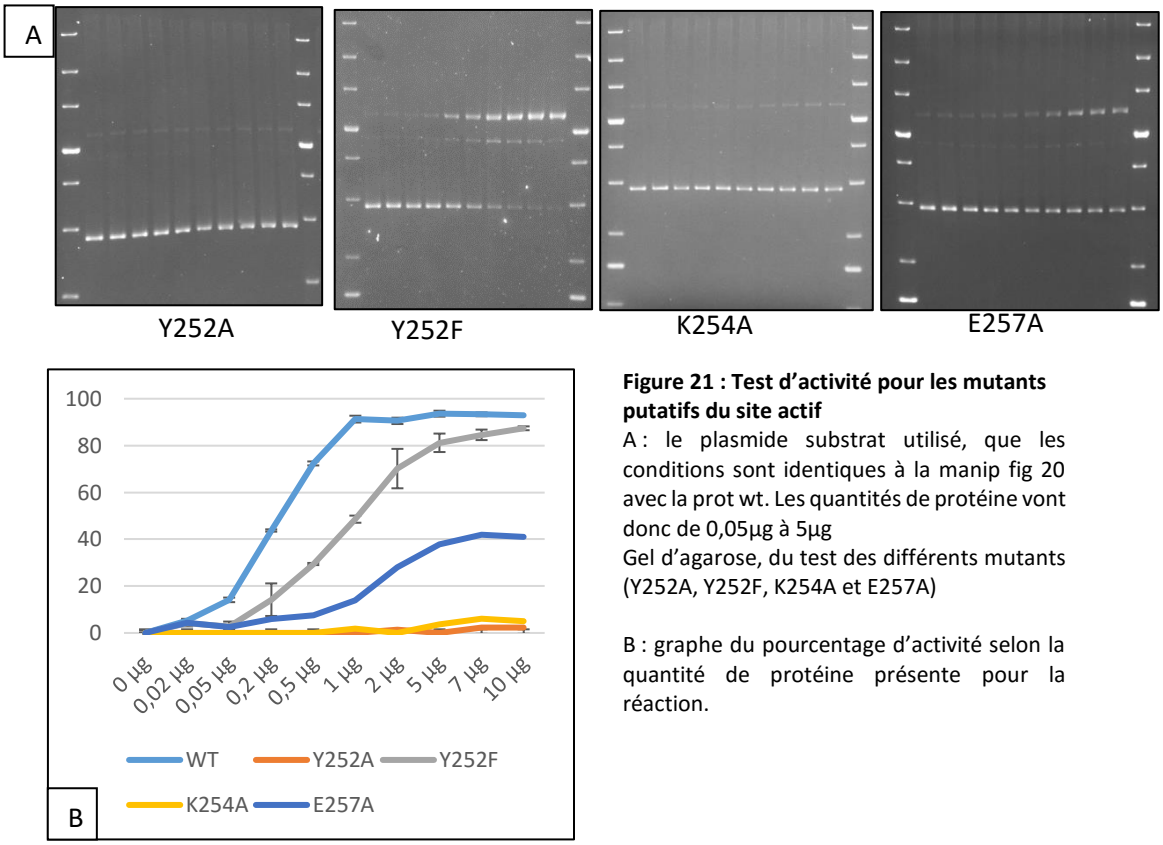


Figure 21 : Test d'activité pour les mutants putatifs du site actif
A : le plasmide substrat utilisé, que les conditions sont identiques à la manip fig 20 avec la prot wt. Les quantités de protéine vont donc de 0,05µg à 5µg
Gel d'agarose, du test des différents mutants (Y252A, Y252F, K254A et E257A)

B : graphe du pourcentage d'activité selon la quantité de protéine présente pour la réaction.

On observe que pour les mutations Y252A, K254A et S237A, on perd totalement l'activité de la Rel*St3*. Pour le mutant E257A, la relaxase possède toujours une activité moyenne. Par contre on observe une chose assez étrange pour la mutation Y252F, la protéine est toujours relativement active, bien que plus faiblement que la sauvage, alors que quand l'on utilise la protéine mutée Y252A il n'y a aucune activité.

Pour la plupart des protéines j'ai pu réaliser ces test au moins deux fois c'est pourquoi nous avons décidé de réaliser des écart-types à partir de deux tests effectués (voir tableau 3).

b. Relaxase mutées pour les acides aminés putatifs dans la prise en charge d'un cation

La démarche mise en œuvre est identique à celle présentée pour les mutants impliqués dans le site actif : après purification de la protéine mutante, les protéines ont été soumises au test d'activité relaxase, et les résultats ont été comparés à ceux de la protéine sauvage

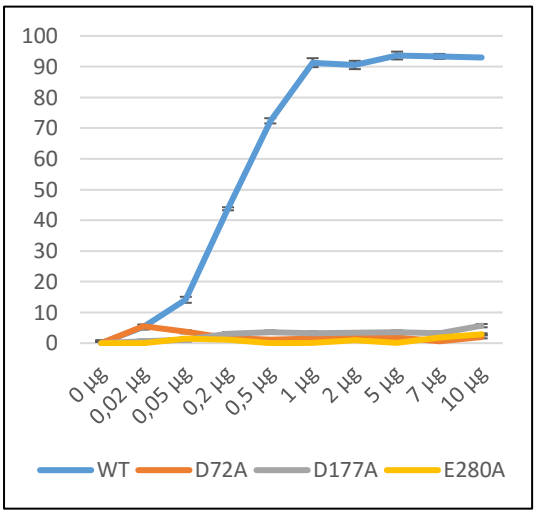


Figure 22 : Graphe représentant l'activité de la Rel*St3* sauvage des mutants putatifs dans la prise en charge du métal

On observe une perte d'activité pour chaque mutant ayant un rôle putatif dans la prise en charge du métal.

3. Caractérisation des autres activités de la relaxase

a. Test de l'activité de religation de la RelSt3 WT

Afin de vérifier si notre relaxase pouvait effectuer une religation, j'ai réalisé une expérience avec du BET (dans le gel et dans le tampon de migration). Le BET est un intercalant de l'ADN et va réaliser des super-tours positif sur le plasmide utilisé. On pourra donc visualiser sur gel si on observe une disparition de l'ADN linéaire.

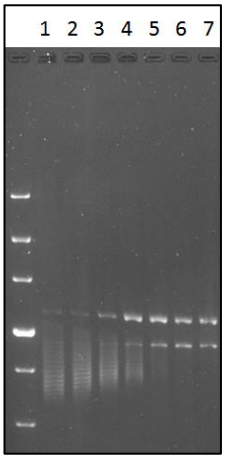


Figure 23 : Test d'activité relaxase de la RelSt3 avec gel BET

1 : pas de métal et pas de protéine, 2 : pas de protéine, 3 : 0,03 µg, 4 : 0.12µg, 5 : 0.5µg, 6 : 2µg et 7 : 8µg

Gel d'agarose 1%, TAE 1X avec 1µg/mL de BET

Avec l'augmentation de la quantité de protéine, on observe une augmentation de la forme OC et une diminution des topoisomères. Cependant on observe toujours cet ADN linéaire.

b. Test de l'activité de liaison de la RelSt3 WT

Pour réaliser ce test j'ai effectué des modifications dans la deuxième étape de l'activité relaxase, qui consiste à rajouter de la protéinase K et du SDS. J'ai donc réalise un test d'activité relaxase où je n'ai pas mis de protéinase K et où je n'ai mis ni protéinase K ni SDS.
La protéinase K ne digèrera pas la relaxase, et le SDS manquant ne pourra pas linéarisé la protéine.

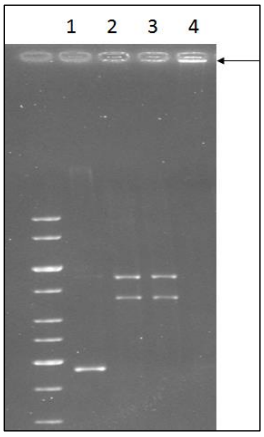


Figure 24 : Test de liaison à l'ADN par la RelSt3

1 : sans protéine, 2 : avec 5µg de protéine, 3 : avec 5µg de protéine et sans protéinase K, 4 : avec 5µg de protéine sans protéinase K et sans SDS – Gel d'agarose 1%, TAE 1X

Que l'on ajoute de la protéinase K ou non, ne semble avoir aucun effet. Cependant ce qui est étrange est lorsque l'on ne met ni protéinase K ni SDS, la migration ne se fait pas, le mix reste bloqué dans le puit.

DISCUSSION

La relaxase étudiée est la relaxase de l'ICE*St3* retrouvée chez *S. thermophilus* qui a une température optimale de croissance de 42°C, ses protéines peuvent donc fonctionnées à cette température. Malgré cela on observe que la protéine possède une activité proche du maximum à 30°C.

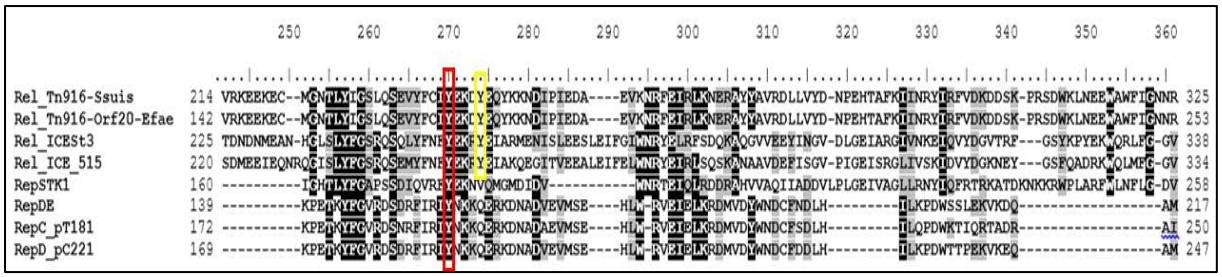
A travers les tests d'activité relaxases effectués, on observe la nécessité d'avoir la présence afin de permettre l'activité, car si ce dernier est absent, la protéine ne pourra avoir d'activité. Le meilleur cofacteur pour cette protéine est le manganèse, c'est avec ce cation que l'activité est maximale est observée. Cependant on observe aussi que le magnésium permet une activité presque aussi importante. Le cobalt quant à lui permet une activité mais plus faiblement. On peut cependant imaginer que dans la cellule le cation physiologique soit plutôt le Mn^{2+} ou le Mg^{2+}

Pour les tests d'activité concernant les mutants pour lesquels on n'observe pas ou peu d'activité, on pourrait émettre l'hypothèse que cela vient d'un mauvais repliement de la protéine suite à la mutation. Cependant grâce au dichroïsme circulaire on observe que les protéines sont bien repliées, la perte d'activité ne vient pas donc pas d'un mauvais repliement mais bien de la mutation de l'acide aminé.

Les acides aminés putatifs du site actif

Pour ces acides aminés mutés, on observe que la mutation Y252A abolit l'activité ce qui porte à croire que cette tyrosine est la tyrosine catalytique. De manière inattendue, lors de la mutation de la Tyr en Phe on observe toujours cette activité, malgré des écarts types assez importants pour certains points, l'allure de la courbe resterait potentiellement la même. Cela est difficile à expliquer étant donné que la mutation en Ala ne permet plus à la protéine d'être active. Néanmoins, des travaux effectués sur la relaxase TraI du plasmide conjugatif RP4, ont montré que lors de la mutation de la potentielle tyrosine catalytique de la protéine, il restait toujours une légère activité, qu'ils ont essayé de comprendre en vain (Pansegrau *et al.* 1994). L'encombrement stérique de la Y reste identique étant donné que la F est similaire, mais ne porte pas de groupement OH qui permet l'activité.

Nous avons également observé, un peu tard, que pour les relaxases d'ICE, une deuxième Y semble conservé, cette Y n'est pas présente chez les protéines Rep c'est pourquoi nous n'y avons pas fait attention. Cette conservation ne se retrouve que chez les ICE et pourrait



indiquer que ces relaxases possèdent deux tyrosines catalytiques et non une seule comme nous le pensions.

Figure 25 : Partie de l'alignement des séquences protéiques de relaxases et protéines Rep appartenant à la famille MOB_T/Rep-trans

Cela pourrait expliquer le fait d'observé une activité plus faible que le sauvage malgré la mutation. S'il s'avère que la RelSt3 possède bien deux Tyr, il y a de forte chance, au vu des précédentes études (Odegrip and Haggård-Ljungquist 2001; Nash et al. 2011), que l'une des Y soit la primaire et l'autre la secondaire.

Lorsque la mutation K254A est réalisée, l'activité relaxase est abolie comme pour la mutation Y252A, ce qui semble nous informer que cette K conservée est un acide aminé important pour l'activité de la relaxase. D'autant plus que lorsque qu'elle est mutée, la Y252 n'est pas muté, et malgré cela l'activité est quasiment nulle, ce qui pourrait indiquer une que la charge + de la Lys pourrait servir à stabiliser l'ensemble du site actif, ou de placer la Tyr dans la bonne position.

La mutation E257A quant à elle permet à la protéine de toujours avoir une faible activité, diminuée d'un peu plus de la moitié si l'on compare à la sauvage. Ce qui laisse entendre que cet acide aminé n'est pas tout à fait essentiel pour l'activité de la relaxase, il semble agir en association avec la Y252 et la K254. Ces dernières à elles seules sembleraient être les acides aminés permettant d'observer cette activité restante.

Cette perte d'activité a également observé lors de la mutation de ces aminés chez la protéine RepD du plasmide pC221, qui est proche de notre Rel*St3*, comme nous l'avons vu plus haut. Cependant seulement un résumé de congrès est disponible pour cette étude, on sait donc qu'il y a une perte d'activité pour la mutation du E257, mais on ne sait pas s'ils observent un restant d'activité comme pour la Rel*St3*.

La mutation S237A rend la relaxase inactive, son groupement OH pourrait permettre une certaine activité. Toujours est-il que les autres acides aminés ne sont pas mutés et cela ne permet plus à la protéine d'être active, ce qui pourrait indiquer ces acides aminés interagissent entre eux.

Ces observation rappelle celles effectuées avec les familles à 2 Tyr pour lesquelles on observe une Y primaire et une Y secondaire (Odegrip *et al.*,2001 ; Nash *et al.*, 2013). Il est possible que certains acides aminés soient majoritaires pour l'activité de la relaxase, notamment Y252, K254 et S237, et qu'un acide aminé soit quant à lui plutôt secondaire, le E257.

Les acides aminés ayant un rôle putatif dans la prise en charge du métal

Nos résultats ont montré que lorsque les acides aminés potentiellement impliqués dans la prise en charge du métal étaient muté un à un, une perte d'activité était observée. Ces résultats avaient été observés par Carr *et al.* en 2016, pour la protéine RepSTK1 du plasmide pSTK1. Ceci nous réconforte étant donné que l'on s'est basé sur la structure de cette protéine, pour identifier les acides aminés acides. Ces derniers ont été sélectionnés comme ayant un rôle potentiel dans la prise en charge du métal. Il semblerait donc que ces 3 acides aminés sont susceptibles de coordonner un cation, il s'agit ici de la première démonstration expérimentale de cette implication pour une relaxase de la famille MOB_T

Si c'est bien le cas, ce qui est observé montrerait que ces acides aminés ne peuvent coordonner le métal si seulement 2 des 3 acides aminés sont présents. Si on mute un des acides aminés les autres restent présents, tout comme les acides aminés du site actif qui ne sont pas mutés, et malgré cela aucune activité n'est observée. Cela confirme le fait que le cation est un cofacteur essentiel pour l'activité relaxase de la Rel*St3*. Ces aminés formeraient à eux 3 une sorte de piège pour le cation.

Pour la mutation D181A, nous n'avons pas pu la purifier. On observe une particularité surprenante, la protéine s'est retrouvée dans la fraction insoluble, malgré les deux tentatives de purification. La mutation rendrait donc la protéine insoluble, il est possible que le changement de cet acide aminé change la conformation de la protéine, entraînant la formation de corps d'inclusion.

Afin de savoir si les acides aminés coordonnent bien le métal, on pourrait réaliser une expérience de spectrométrie de flamme, on flambe la protéine et selon la couleur observée on peut déterminer le métal qui est lié. Cela nous donnerait aussi la possibilité de vérifier expérimentalement qu'avec ces mutations la coordination du métal ne s'effectue pas

Pour le test en gel BET on observe qu'il n'y pas de religation dans nos conditions et que ADN linéaire est toujours présent, notre relaxase nécessiterait potentiellement la présence d'autres protéines afin de pouvoir religuer le plasmide.
Pour le test avec le non ajout de protéinase K on observe qu'il n'y a pas de fixation covalente de la RelSt3 au plasmide. Cependant en l'absence SDS on n'observe aucune migration ce qui semble indiquer que la molécule d'ADN aurait lié plusieurs molécules de relaxases au point de ne plus pouvoir migrer. Cela peut s'expliquer par l'observation que nous par ailleurs au laboratoire de la fixation de la relaxase entière sur l'ADN par l'intermédiaire de son domaine Hélice Tour Hélice (HTH).

ANNEXE

Annexe 1 : différents tampons utilisés

Tampon 1	10 mM Imidazole ; 20 mM TrisHCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 2 mM BSH
Tampon 2	20 mM TrisHCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 2 mM BSH
Wash 1	10 mM Imidazole ; 20 mM TrisHCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 2 mM BSH
Wash 2	50 mM Imidazole ; 20 mM TrisHCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 2 mM BSH
Elution	300 mM Imidazole ; 20 mM TrisHCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 2 mM BSH
Tampon de lyse 1	20 mM TrisHCl pH7,5 ; 200 mM NaCl ; 0,04 mg/mL lysozyme ; 0,05% desoxycholate Na
Tampon de lyse 2	10 mM Imidazole ; 20 mM TrisHCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 2 mM BSH ; 0,04 mg/mL lysozyme ; 0,1% Triton

Annexe 2 : Programmes PCR

- PCR1 et PCR 2

98°C	2 min	
98°C	40 sec	x35
55°C	30 sec	
72°C	40 sec	
72°C	5 min	
12°C	infini	

- PCR3

98°C	2 min	
98°C	1 min	X 5
50°C	3 min	
72°C	1 min	
98°C	40 sec	X 30
55°C	30 sec	
72°C	40 sec	
72 °C	5 min	
12°C	infini	

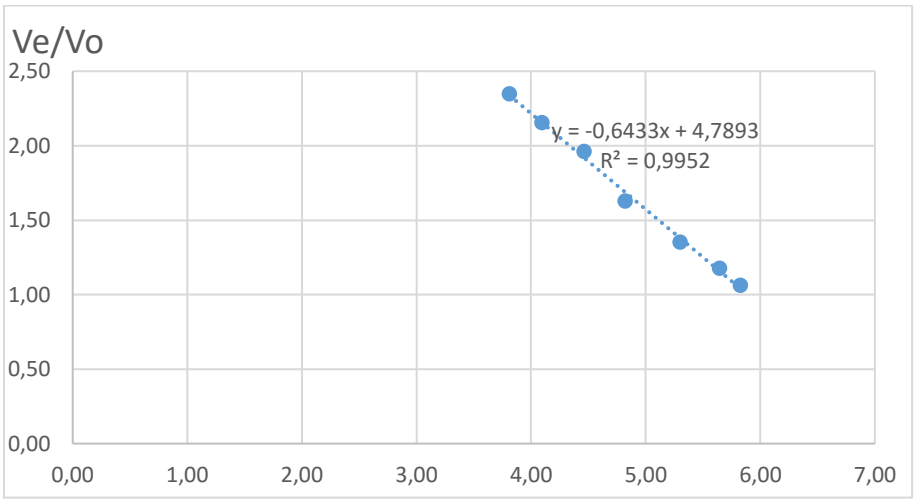
- PCR sur clones

95°C 1 min 30 s
95°C 45 s
55°C 30 s
72°C 40 s
X35
72°C 5 min
12°C infini

Annexe 3 : tableau d'amorces

Mutation	nucléotides modifiés	Amorces 1 et 2
Y252A	**TAT en GCT**	TTTTCA**GC**AAAGTTGAAGTAGA
		AACTTT**GC**TGAAAAGCGATAC
Y252F	**TAT en TTT**	TTTTCA**AA**AAAGTTGAAGTAGAGC
		AACTTT**TT**TGAAAAGCGATAC
K254A	**AAG en GCG**	TATCGC**GC**TTCATAAAAGTTG
		TATGAA**GC**GCGATACGAAATC
E257A	**GAA en GCA**	CGATT**G**CGTATCGCTTTT
		ATACG**C**AATCGCCCGTAT
S237A	**TCC en GCC**	TAAAGG**GC**AAGACCGTG
		GTCTT**GC**CCTTTACTTTGG
D72A	**GAC en GCC**	AATAG**G**CGATGTGTGCTCTA
		CATCG**C**CTATTTGCGAC
D177A	**GAT en GCT**	CGATA**G**CAAGGCGTTTTAC
		CTTG**A**TATCGCCCTAGACG
D181A	**GAC en GCC**	GTTC**G**GCTAGGGCGATA
		CCTAG**C**CGAACTCTATAAAGG
E280A	**GAA en GCA**	GTAGT**G**CGTAGCGGTTC
		CTACG**C**ACTACGCTTTTCA

Annexe 4 **: Courbe de calibration de la GF**



Références bibliographiques

Active Site of the Replication Protein of the Rolling Circle Plasmid pC194 - Noirot-Gros et Al - EMBO J - 1994.pdf." n.d.

Bellanger, X., A. P. Roberts, C. Morel, F. Choulet, G. Pavlovic, P. Mullany, B. Decaris, and G. Guedon. 2009. "Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICESt1 and ICESt3 from Streptococcus Thermophilus." *Journal of Bacteriology* 191 (8): 2764–75. doi:10.1128/JB.01412-08.

Bellanger, Xavier, Sophie Payot, Nathalie Leblond-Bourget, and Gérard Guédon. 2014. "Conjugative and Mobilizable Genomic Islands in Bacteria: Evolution and Diversity." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (4): 720–60. doi:10.1111/1574-6976.12058.

Carr, Stephen B., Simon E.V. Phillips, and Christopher D. Thomas. 2016. "Structures of Replication Initiation Proteins from Staphylococcal Antibiotic Resistance Plasmids Reveal Protein Asymmetry and Flexibility Are Necessary for Replication." *Nucleic Acids Research* 44 (5): 2417–28. doi:10.1093/nar/gkv1539.

Chandler, Michael, Fernando de la Cruz, Fred Dyda, Alison B. Hickman, Gabriel Moncalian, and Bao Ton-Hoang. 2013. "Breaking and Joining Single-Stranded DNA: The HUH Endonuclease Superfamily." *Nature Reviews Microbiology* 11 (8): 525–38. doi:10.1038/nrmicro3067.

Garcillán-Barcia, María Pilar, María Victoria Francia, and Fernando de La Cruz. 2009. "The Diversity of Conjugative Relaxases and Its Application in Plasmid Classification." *FEMS Microbiology Reviews* 33 (3): 657–87. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x.

Grandoso, Guadalupe, Aliva Pilar, and Fernando De La Cruz. 2000. "Two Active-Site Tyrosyl Residues of Rotein TrwC Act Sequentially at the Origin of Transfer during Plasmid R388 Conjugation." *JMB*.

Grohmann, E., G. Muth, and M. Espinosa. 2003. "Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (2): 277–301. doi:10.1128/MMBR.67.2.277-301.2003.

Guglielmini, Julien, Leonor Quintais, Maria Pilar Garcillán-Barcia, Fernando de la Cruz, and Eduardo P. C. Rocha. 2011. "The Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation." Edited by Josep Casadesús. *PLoS Genetics* 7 (8): e1002222. doi:10.1371/journal.pgen.1002222.

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, et al. 2007. "Clustal W and Clustal X Version 2.0." *Bioinformatics* 23 (21): 2947–48. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.

Lee, C. A., and A. D. Grossman. 2007. "Identification of the Origin of Transfer (oriT) and DNA Relaxase Required for Conjugation of the Integrative and Conjugative Element ICEBs1 of Bacillus Subtilis." *Journal of Bacteriology* 189 (20): 7254–61. doi:10.1128/JB.00932-07.

Lorenzo-Diaz, F., L. Dostal, M. Coll, J. F. Schildbach, M. Menendez, and M. Espinosa. 2011. "The MobM Relaxase Domain of Plasmid pMV158: Thermal Stability and Activity upon Mn2+ and Specific DNA Binding." *Nucleic Acids Research* 39 (10): 4315–29. doi:10.1093/nar/gkr049.

Nash, Rebekah P., Franklin C. Niblock, and Matthew R. Redinbo. 2011. "Tyrosine Partners Coordinate DNA Nicking by the *Salmonella Typhimurium* Plasmid pCU1 Relaxase Enzyme." *FEBS Letters* 585 (8): 1216–22. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.043.

Odegrip, Richard, and Elisabeth Haggård-Ljungquist. 2001. “The Two Active-Site Tyrosine Residues of the A Protein Play Non-Equivalent Roles during Initiation of Rolling Circle Replication of Bacteriophage P21 1Edited by M. Gottesman.” *Journal of Molecular Biology* 308 (2): 147–63. doi:10.1006/jmbi.2001.4607.

Puymege, A., S. Bertin, S. Chuzeville, G. Guedon, and S. Payot. 2013. “Conjugative Transfer and Cis-Mobilization of a Genomic Island by an Integrative and Conjugative Element of Streptococcus Agalactiae.” *Journal of Bacteriology* 195 (6): 1142–51. doi:10.1128/JB.02199-12.

Roberts, Adam P., and Peter Mullany. 2011. “Tn916-like Genetic Elements: A Diverse Group of Modular Mobile Elements Conferring Antibiotic Resistance: Diversity of Gram-Positive Tn916 Elements.” *FEMS Microbiology Reviews* 35 (5): 856–71. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x.

Rocco, J. M., and G. Churchward. 2006. “The Integrase of the Conjugative Transposon Tn916 Directs Strand- and Sequence-Specific Cleavage of the Origin of Conjugal Transfer, oriT, by the Endonuclease Orf20.” *Journal of Bacteriology* 188 (6): 2207–13. doi:10.1128/JB.188.6.2207-2213.2006.

Srinivasan, V., B. J. Metcalf, K. M. Knipe, M. Ouattara, L. McGee, P. L. Shewmaker, A. Glennen, et al. 2014. “vanG Element Insertions within a Conserved Chromosomal Site Conferring Vancomycin Resistance to Streptococcus Agalactiae and Streptococcus Anginosus.” *mBio* 5 (4): e01386-14-e01386-14. doi:10.1128/mBio.01386-14.

Thomas, Christopher D., D. F. Balson, and W. V. Shaw. 1990. “In Vitro Studies of the Initiation of Staphylococcal Plasmid Replication. Specificity of RepD for Its Origin (oriD) and Characterization of the Rep-Ori Tyrosyl Ester Intermediate.” *Journal of Biological Chemistry* 265 (10): 5519–5530.

Résumé :

Le transfert horizontal d'éléments génétiques joue un rôle clé dans l'évolution des génomes bactériens. Parmi ces éléments, certains sont capables de se transférer par conjugaison, c'est le cas des éléments intégratifs conjugatifs (ICE). La relaxase, qui est une protéine essentielle pour ces éléments conjugatifs, est une endonucléase simple brin qui initie le transfert de l'élément. L'objectif de ce stage est la caractérisation du site actif de la relaxase d'ICE*St3*, un ICE retrouvé chez *Streptococcus thermophilus,* et membre d'une famille particulièrement représentée au sein des firmicutes. Cette relaxase présente la particularité d'appartenir à une nouvelle famille de relaxases (famille MOB_T) qui n'a à ce jour jamais été étudiée biochimiquement. Le site actif de cette relaxase a été muté au niveau de différents résidus susceptibles d'être impliqués dans l'activité de la protéine, ou indirectement dans la coordination d'un cofacteur métallique souvent utilisé par ce type d'enzyme. Après avoir standardisé un test d'activité de la relaxase, des protéines mutantes ont été produites et testées. Les résultats ont permis de déterminer les acides aminés impliqués dans l'activité de la relaxase ainsi que ceux permettant la coordination du cation.

Abstract :

Horizontal transfer of genetic elements play a key role in evolution of bacterial genomes. Among these elements some are transferred by conjugation, especially integrative and conjugative elements (ICEs). The relaxase, which is an essential protein for these conjugative elements, is a single stranded endonuclease that initiate the DNA transfer. My internship objective is the active site characterization of ICE*St3* relaxase, an ICE found in *Streptococcus thermophilus*, member of a large ICE family especially represented among firmicutes. This relaxase belongs to a new relaxase family (MOB_T family) which have never been studied biochemically until now. Different residues of this relaxase active site have been mutated, that aresusceptible to be involved in protein activity, or indirectly in metallic cofactor coordination (an allmark for these endonucleases). The development of a relaxase activity test was carried out. Mutated proteins were produced and tested, allowing the identification of the residues involved in relaxase activity and in cation coordination.