

#### 4.1. Souches bactériennes

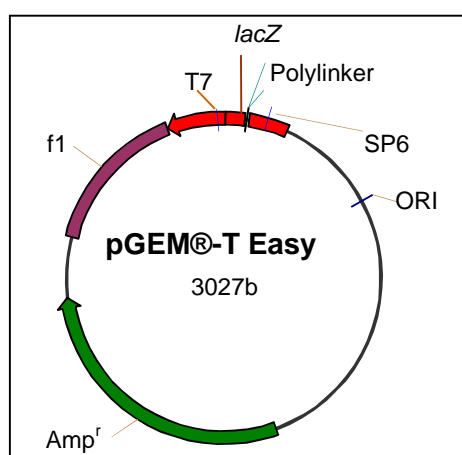
Souches	Génotype	Utilisation et caractéristiques
<b><i>E. coli</i> DH5α</b> (Gibco BRL)	F <sup>-</sup> , ø80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), phoA, supE44, λ <sup>-</sup> , thi-1, gyrA9, relA1	Souche utilisée pour le clonage de fragments d'ADN et la préparation des plasmides.
<b><i>E. coli</i> BL21 DE3</b> (Novagen)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)	Souche utilisée pour l'expression d'un gène sous le contrôle de la T7 RNA polymérase.
<b><i>E. coli</i> C41 DE3</b> (OverExpress)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)	Souche utilisée pour l'expression d'un gène sous le contrôle de la T7 RNA polymérase codant pour une protéine membranaire.
<b><i>B. licheniformis</i> 749I</b>	<i>blaP</i> <sup>+</sup> , <i>blaI</i> <sup>+</sup> , <i>blaR1</i> <sup>+</sup>	Souche sauvage qui produit une β-lactamase de manière inductible en présence d'antibiotiques à noyau β-lactame dans le milieu.
<b><i>B. licheniformis</i> 749C</b>	<i>blaP</i> <sup>+</sup> , <i>blaI</i> <sup>-</sup> , <i>blaR1</i> <sup>+</sup>	Mutant chimique produisant la β-lactamase de manière magno-constitutive, suite à l'inactivation du gène <i>blaI</i> .
<b><i>B. licheniformis</i> 749/Pen27</b>	<i>blaP</i> <sup>+</sup> , <i>blaI</i> <sup>+</sup> , <i>blaR1</i> <sup>+</sup> , <i>blaR2</i> <sup>-</sup>	Mutant chimique non-inductible, suite à l'inactivation du gène <i>blaR2</i> , encore inconnu.
<b><i>B. subtilis</i> 168</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup>	Souche phylogénétiquement très proche de <i>B. licheniformis</i> mais ne contenant pas les gènes <i>blaP</i> , <i>blaI</i> et <i>blaR1</i> .
<b><i>B. subtilis</i> 1541</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup> , P <sub>blaP</sub> lysA	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le promoteur du gène <i>lysA</i> a été remplacé par celui du gène <i>BlaP</i> de <i>B. licheniformis</i> .
<b><i>B. subtilis</i> BFS1807</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup> , <i>YkfA</i> <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfA</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS1808</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup> , <i>YkfB</i> <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfB</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS1809</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup> , <i>YkfC</i> <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfC</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS1810</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup> , <i>YkfD</i> <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfD</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS673</b>	<i>trpC</i> <sup>-</sup> , <i>Yoch</i> <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>yoch</i> a été inactivé.

Les souches sont conservées à -70°C dans un mélange LB-Glycérol 40%.

## 4.2. Vecteurs d'expression et de clonage

### 4.2.1. Le pGEM-T Easy

Ce plasmide, commercialisé par la société Promega, permet l'insertion directe d'un produit PCR dans le plasmide. Le vecteur est prélinéarisé par l'enzyme de restriction *EcoRV* et une thymidine a été ajoutée aux extrémités 3' du fragment linéarisé. L'ajout d'adénine au fragment PCR permet l'insertion de celui-ci dans le plasmide. Le pGEM-T Easy possède le gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène *lacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase (Figure 4.1). L'insertion du fragment PCR dans ce plasmide inactive le gène *lacZ*, la bactérie est alors incapable de produire de la  $\beta$ -galactosidase. Les colonies qui produisent cette enzyme prennent une couleur bleue en présence de X-Gal alors que les non-productrices sont blanches. La sélection des clones recombinants s'effectue sur milieu LB-agar additionné d'ampicilline 100  $\mu$ g/ml.



**Figure 4.1.** Le pGEM T-Easy. *lacZ* : gène du peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase ; *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline.

### 4.2.2. Les vecteurs d'expression pET

Les plasmides pET (Novagen) permettent l'expression de protéines recombinantes chez *E. coli*. Dans ces vecteurs, le gène d'intérêt est sous le contrôle de l'ARN polymérase du phage T7 (Figure 4.2). Les souches *E. coli* « DE3 » possèdent, dans leur génome, le gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*. En absence d'IPTG, la transcription du gène d'intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur *LacI* sur les opérateurs *lac*. L'ajout d'IPTG (0,5 à 2 mM) dans le milieu de culture induit la transcription de l'ARN polymérase du phage T7 à partir du promoteur *lac* par l'ARN polymérase d'*E. coli*. L'ARN polymérase du phage T7 transcrit ensuite le gène d'intérêt à partir du promoteur T7. Les pET22b, pET28a, pET43.1 Ek/LIC et pET52b ont été utilisés lors de ce travail. (Figures 4.3 à 4.6).

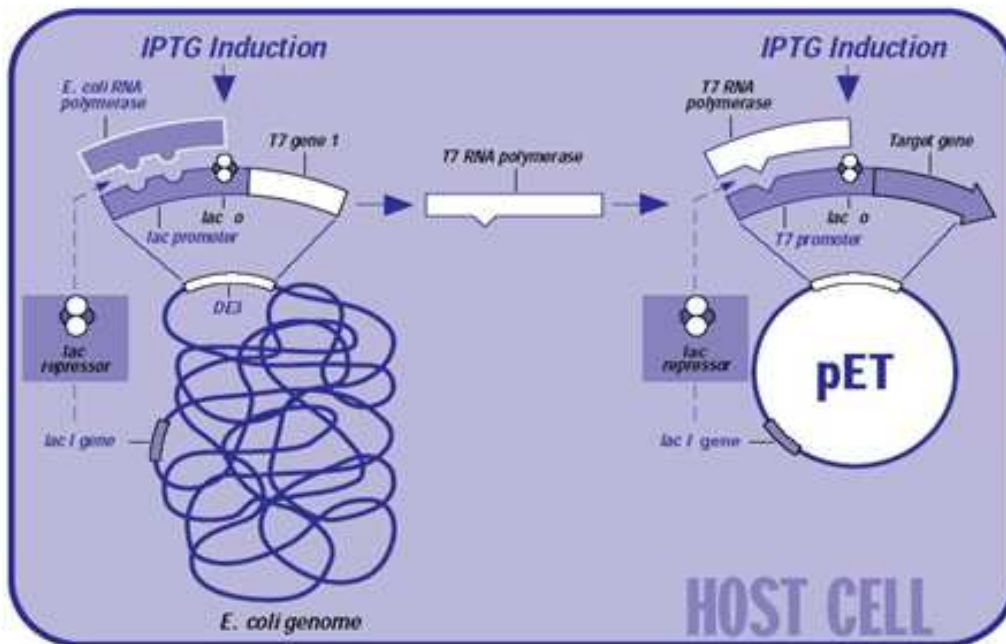


Figure 4.2. Principe des vecteurs d'expression pET

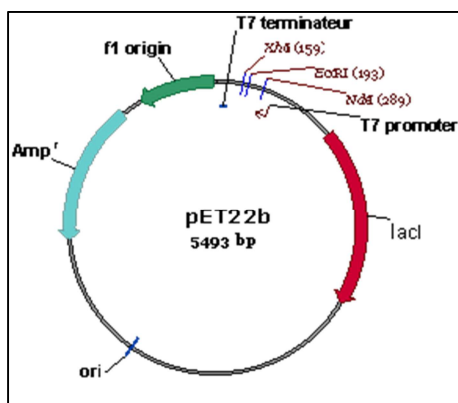


Figure 4.3. Le pET22b. *amp<sup>r</sup>*: gène de résistance à l'ampiciline ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 promoter : promoteur pour la polymérase du phage T7 ; T7 terminateur : terminateur pour la polymérase du phage T7

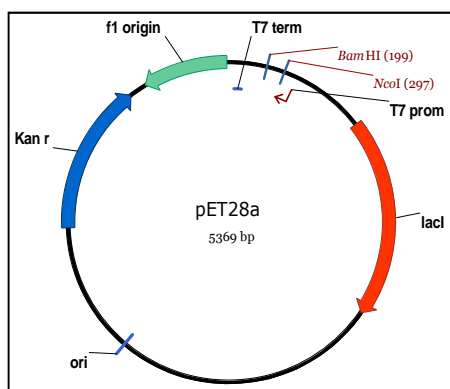
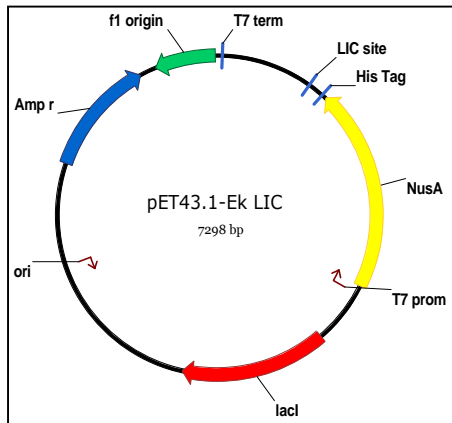
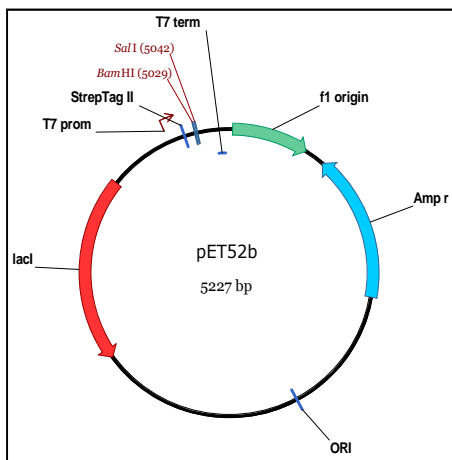


Figure 4.4. Le pET28a. *kan<sup>r</sup>*: gène de résistance à la kanamycine ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 prom : promoteur pour la polymérase du phage T7 ; T7 term : terminateur pour la polymérase du phage T7.



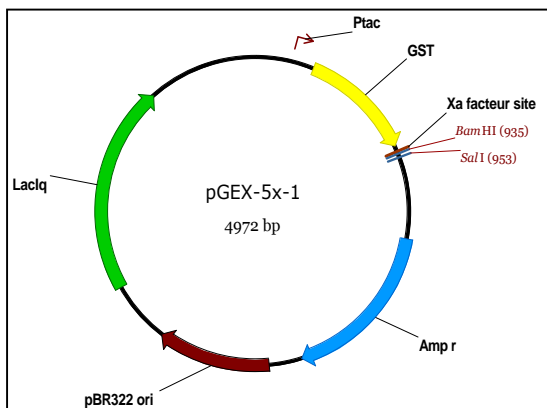
**Figure 4.5.** Le pET43.1 – Ek LIC. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l’ampicilline ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 prom : promoteur de la polymérase du phage T7 ; T7 term : terminateur de la polymérase du phage T7 ; NusA : gène codant pour la protéine NusA ; HisTag : séquence codante pour une queue polyhistidines ; LIC site : site de clonage.



**Figure 4.6.** Le pET52b. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l’ampicilline ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 prom : promoteur de la polymérase du phage T7 ; T7 term : terminateur de la polymérase du phage T7 ; StrepTag II : séquence codant pour une StrepTag.

#### 4.2.3. Le pGEX-5X-1

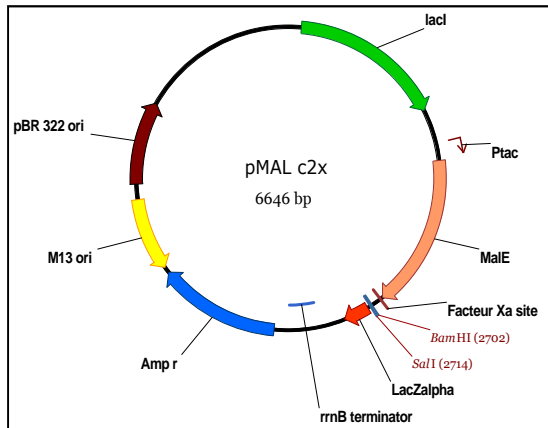
Le pGEX-5X-1 fait partie des plasmides pGEX qui permettent l’expression, chez *E. coli*, de protéines recombinantes fusionnées à la glutathion-S-transferase (GST). Le clonage s’effectue au niveau des sites de restriction situés entre le gène codant pour la GST et le gène de résistance à l’ampicilline (figure 4.7). En absence d’IPTG, la transcription du gène d’intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur LacI sur le promoteur *tac*. L’ajout d’IPTG (0,5 à 2 mM) dans le milieu de culture induit l’expression du promoteur *tac*, ce qui permet la transcription du gène *gst* suivi du gène d’intérêt.



**Figure 4.7.** Le pGex-5x-1. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l’ampicilline ; *lacIq* : gène codant pour le répresseur LacI ; GST : gène codant pour la glutathion-S-transferase ; *ptac* : promoteur *tac*, inducible à l’IPTG ; Xa facteur site : site de clivage enzymatique pour le facteur Xa.

#### 4.2.4. Le pMAL-c2x

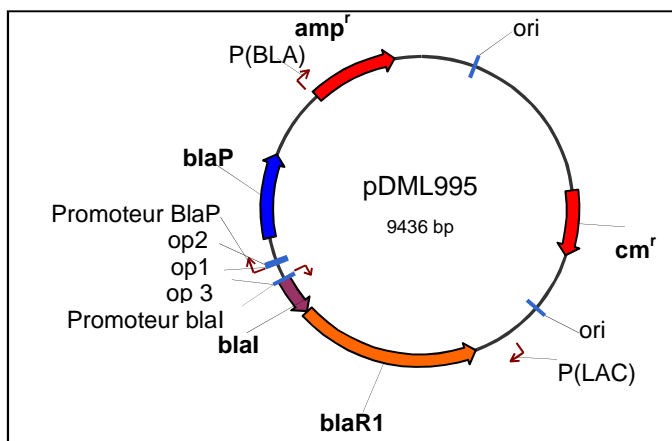
Le pMAL-c2x est un plasmide de type pMAL-2 permettant l'expression de protéines recombinantes fusionnées à la « Maltose-binding protein » (MBP) chez *E. coli* (figure 4.8). Le clonage s'effectue en amont du gène *malE* qui code pour la MBP. Les sites de restriction entre les gènes *malE* et *lacZα* permettent le clonage du fragment d'intérêt. L'insertion de ce dernier inactive la β-galactosidase codée par le gène *lacZα*, ce qui permet une sélection blanc/bleu. En absence d'IPTG, la transcription du gène d'intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur LacI sur le promoteur tac. L'ajout d'IPTG (0,5 à 2 mM) dans le milieu de culture induit l'expression du promoteur tac, ce qui permet la transcription du gène *malE* et du gène d'intérêt.



**Figure 4.8.** Le pMAL-c2x. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline ; *malE* : gène d'expression de la MBP ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; LacZalpha : partie α du gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase ; Ptac : promoteur tac, inducible à l'IPTG ; Facteur Xa site : site de clivage enzymatique pour le facteur Xa.

#### 4.2.5. Le pDML995

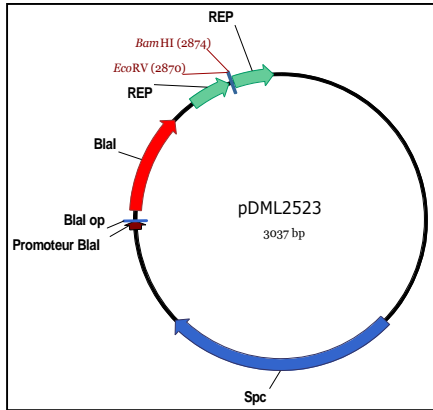
Le pDML995 est un vecteur navette *E. coli/B. subtilis* dérivé du pMK4 et développé par l'équipe du Pr. Bernard Joris. Ce plasmide contient le divergeon *bla* de *B. licheniformis* 749i, un gène de résistance à l'ampicilline exprimé chez *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol exprimé chez *Bacillus*. Ce plasmide permet l'induction de la β-lactamase BlaP chez *B. subtilis* (Figure 4.9).



**Figure 4.9.** Le pDML995. *blaP* : gène de la β-lactamase BlaP ; *blaI* : gène du répresseur BlaI ; *blaR1* : gène du récepteur BlaR1 ; *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline ; *cm<sup>r</sup>* : gène de résistance au chloramphénicol.

#### 4.2.6. Le pDML2523

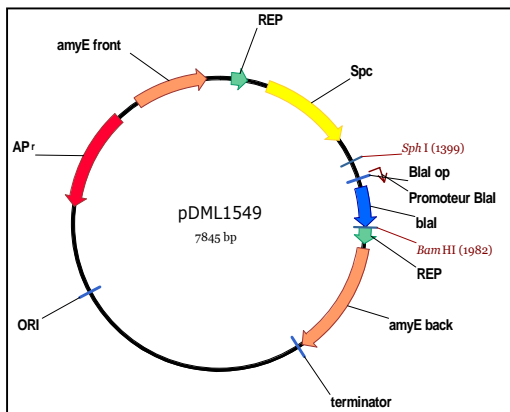
Le pDML2523 est un vecteur navette *E. coli/B. subtilis* contenant le gène *blal* de *B. licheniformis* et un gène de résistance à la spectinomycine (figure 4.10). Ce vecteur est utilisé pour l'inactivation de gènes chez *B. subtilis* (Brans *et al.*, 2004).



**Figure 4.10.** Le pDML2523. *spc* : gène de résistance à la spectinomycine ; *blal* : gène codant pour le répresseur Blal de *B. licheniformis* ; REP : séquences répétées inverses.

#### 4.2.7. Le pDML1549

Le pDML1549 est un vecteur navette *E. coli/B. subtilis* qui présente une cassette *blal* contenant le gène *blal* de *B. licheniformis* 749I et un gène de résistance à la spectinomycine. Cette cassette est entourée des séquences du début (*amyE* front) et de la fin (*amyE* back) du gène *amyE* codant pour l'amylase chez *B. subtilis* 168 (figure 4.11). Ce vecteur a été utilisé pour la complémentation du mutant *ykfA*<sup>-</sup> de *B. subtilis*.



**Figure 4.11.** Le pDML1549. *spc* : gène de résistance à la spectinomycine ; *blal* : gène codant pour le répresseur Blal de *B. licheniformis* ; *amyE* front : séquence du début du gène *amyE* ; *amyE* back : séquence de la fin du gène *amyE* ; *AP<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline ; REP : séquences répétées inverses.

### 4.3. Milieux de culture

Les compositions des milieux de culture sont données pour 1 litre.

- **Milieu LB (Luria Bertani)**: 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) ; 10 g de NaCl.
- **Milieu 2XYT** : 16 g de bactotryptone (Difco) ; 10 g d'extrait de levure (Difco) ; 5 g de NaCl.
- **Milieu Soc** : 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) ; 10 g de NaCl ; 10 mM de MgSO<sub>4</sub> ; 10 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 20 mM de glucose.

- **Milieu LM** : 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) ; 10 g de NaCl ; MgSO<sub>4</sub> 3 mM.
- **Milieu MD** : 92 ml de tampon phosphate-citrate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 107 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 g/l, citrate ferrique 100 g/l) ; 100 ml de glucose 20 % ; 10 ml de L-tryptophane (5 mg/ml) ; 5 ml de citrate d'ammonium ferrique (2,2 mg/ml) ; 25 ml d'aspartate de potassium (100 ng/ml) ; 3 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M.
- **Milieu MMG** : 870 ml de solution 1 (solution 1 : 19 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,12 g de Na<sub>3</sub>Citrate ; 0,2 g de MgSO<sub>4</sub> ; 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans 870 ml d'H<sub>2</sub>O, pH 7) ; 500 µl de FeCl<sub>3</sub> 0,1 M ; 20 µl de MnSO<sub>4</sub> 0,1 M ; 8ml de L-tryptophane 5 mg/ml ; 20 ml de glucose 20% ; 100ml d'acide L-glutamique monopotassium 2%).
- **Milieu minimum** : 12,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,5 g de NaCl ; 1g de NH<sub>4</sub>Cl ; 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M ; 20 ml de glucose 20% ; 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M ; 2 ml de L-tryptophane 100 mg/ml ; pH 7,4.
- **Milieu BH (Brain-Heart)** : 37g de Bacto Brain Heart infusion (Difco)

Les milieux de culture solides équivalant aux milieux liquides sont obtenus par l'addition de 15 g d'agar par litre de milieu.

#### 4.4. Les antibiotiques

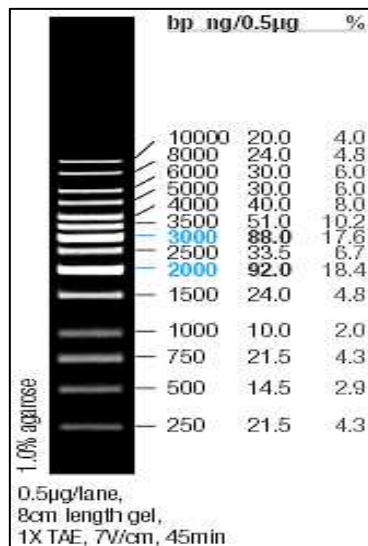
- **L'ampicilline** : antibiotique à noyau β-lactame inhibant la biosynthèse du peptidoglycane. Il est utilisé à une concentration de 100 µg/ml pour les cultures d'*E. coli*.
- **La kanamycine** : aminoglycoside interférant avec la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30s des ribosomes. Elle est utilisée à une concentration de 50 µg/ml pour les cultures d'*E. coli*.
- **La spectinomycine** : aminoside interférant avec le ribosome bactérien, modifiant sa fonction de synthèse protéique. Elle est utilisée à une concentration de 100 µg/ml pour les cultures de *B. subtilis*.
- **Le chloramphénicol** : antibiotique qui affecte la synthèse des protéines en interagissant avec la sous-unité 50s des ribosomes. Il est utilisé à une concentration de 30 µg/ml pour les cultures d'*E. coli* et de 7 µg/ml pour les cultures de *B. subtilis*.
- **L'érythromycine** : antibiotique macrolide qui se lie avec la sous-unité ribosomique 50s et empêche ainsi la translocation des peptides et la formation de polypeptides. Il est utilisé à une concentration de 2µg/ml pour les cultures de *B. subtilis*.

#### 4.5. Les enzymes

Les endonucléases de restrictions, les ADN polymérases et leurs tampons sont fournis par les firmes Promega et Fermentas. Ces différentes enzymes sont utilisées dans les conditions définies par les fabricants.

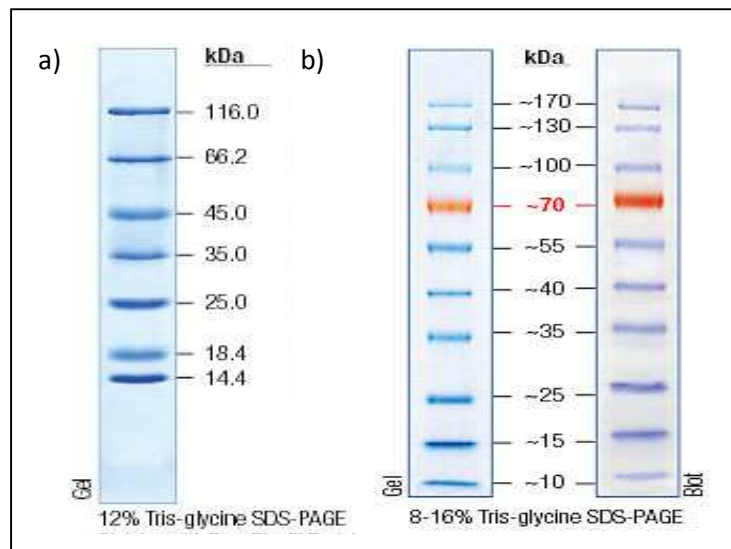
#### 4.6. Les marqueurs de taille

- **Marqueur de taille pour l'ADN :** Le O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) est un marqueur utilisé pour estimer la taille des fragments linéaires d'ADN lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose. La taille des bandes varie de 250 à 10 000 pb (Figure 4.12).



**Figure 4.12.** Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % du marqueur de taille O'GeneRuler .

- **Marqueurs de taille pour les protéines :**
  - Le « Protein Molecular Weight Marker» (Fermentas) est un marqueur utilisé pour évaluer la masse moléculaire des protéines entre 14 et 116 kDa lors d'un SDS-PAGE (Figure 4.13a).
  - Le « PAGE Ruler prestained protein ladder » (Fermentas) est utilisé lors d'un Western blot. Il a été préalablement coloré pour permettre la visualisation du transfert (Figure 4.13b).



**Figure 4.13.** Description des marqueurs de taille « Protein Molecular Weight Marker » (a) et « Page Ruler prestained protein ladder » (b).



#### 4.7. Les oligonucléotides synthétiques

Les oligonucléotides utilisés lors de ce travail ont été synthétisés et fournis par Eurogentec (Belgique). La concentration des solutions stocks est de 100 µM.

##### 4.7.1. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification de la boucle L3 de BlaR1

Nom	Séquence	Application
L3NusA5'	5' -GACGACGACAAGATATATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec NusA
L3NusA3'	5' -GAGGAGAAGCCCGGTTATTTTCGCCTTTAGCAAAGGTGAT-3'	Amplification de L3 pour fusion avec NusA
L3SalI3'	5' - ATGTCGACTTTTCGCCTTTAGCAAAGGTGAT-3'	Amplification de la boucle L3
L3M5'	5' -TAGGATCCTATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec MBP
L3G5'	5' -TAGGATCCATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec GST
L3S5'	5' -TAGGATCCTTATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec streptag

##### 4.7.2. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le séquençage du gène *blaR1*

Nom	Séquence	Application
BlaRSCNcoI5'	5' -TACCATGGGCAGCAGTCTTTTCTTTATTCCC-3'	Amplification du gène <i>blaR1</i> avec une Streptag à l'extrémité C-terminale
BlaRSCBamHI3'	5' -TTGGATCCTTACTTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCATCGGGAAACGGAGGG-3'	Amplification du gène <i>blaR1</i> avec une Streptag à l'extrémité C-terminale
BlaR500	5' -GTCATTTTGAGCCGTTCTCC-3'	Séquençage du gène <i>blaR1</i> de <i>B.licheniformis</i>
BlaR1400	5' -CGTAAATGATCCTCCCAATTT-3'	Séquençage du gène <i>blaR1</i> de <i>B.licheniformis</i>

##### 4.7.3. Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du gène *blaR1*

Nom	Séquence	Application
BlaR_E213A_UP	5' -TGTGTTTTGCTTCATGCATTGTACCATTGCAAACG-3'	Mutation E213A de <i>blaR1</i>
BlaR_E213A_RP	5' -CGTTTGCAATGGTACAATGCATGAAGCAAAACACA-3'	Mutation E213A de <i>blaR1</i>
BlaR_E213D_UP	5' -GTGTTTTGCTTCATGATCTGTACCATTGTAAACG-3'	Mutation E213D de <i>blaR1</i>
BlaR_E213D_RP	5' -CGTTTACAATGGTACAGATCATGAAGCAAAACAC-3'	Mutation E213D de <i>blaR1</i>
BlaR_E213Q_UP	5' -GTGTTTTGCTTCATCAACTGTACCATTGTAAACG-3'	Mutation E213Q de <i>blaR1</i>
BlaR_E213Q_RP	5' -CGTTTACAATGGTACAGTTGATGAAGCAAAACAC-3'	Mutation E213Q de <i>blaR1</i>
BlaR_RRAA_UP	5' -GCAGCTCATACAAAGCAGCGATTGTTACAGTTGTCAAC-3'	Mutation R304A/R305A de <i>blaR1</i>
BlaR_RRAA_RP	5' -GTTGACAACGTGAACAATCGCTGCTTGTATGAGCTGC-3'	Mutation R304A/R305A de <i>blaR1</i>
BlaR_A345D_UP	5' -CTCCTTCTGTGTCTATATTGGACATGCAAAAAGAAACACGC-3'	Mutation A345D de <i>blaR1</i>
BlaR_A345D_RP	5' -GCGTGTCTTCTTTTTCATGTCCAATCTAGACACAGAAGGAG-3'	Mutation A345D de <i>blaR1</i>
BlaR_A345S_Upbis	5' -TCTGTGTCTATATTGTCATGCAAAAAGAAACACGC-3'	Mutation A345S de <i>blaR1</i>
BlaR_A345S_Rpbis	5' -GCGTGTCTTCTTTTTCATGGACAATATAGACACAGA-3'	Mutation A345S de <i>blaR1</i>

4.7.4. Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de l'opéron *ykfABCD* de *B. licheniformis*.

Nom	Séquence	Application
ykfprom5'	5' -CGCCAATATGGAATGGAACACAT- 3'	Séquençage de la région promotrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>
ykfprom3'	5' -CACCAACCGTATCTCCCTTCATT- 3'	Séquençage de la région promotrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>
BlykfAUP	5' -ATCCTGTCGGCTACATTGAA- 3'	Séquençage du gène <i>ykfA</i>
BlykfARP	5' -CAGCGCAACGAACCGTCCGC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfA</i>
BlykfBUP	5' -GTCGGCTTTAAATCGGCC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfB</i>
BlykfBRP	5' -AGCCGTCTCAGTCGCAATG- 3'	Séquençage du gène <i>ykfB</i>
BlykfCUP	5' -ATATCGTTGAAGGCGGCATC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfC</i>
BlykfCRP	5' -GTCGACATCCGGAAGAGTGC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfC</i>
BlykfDUP	5' -TACTGCGGAAACGGAGAGAT- 3'	Séquençage du gène <i>ykfD</i>
BlykfDRP	5' -AATCAGGCGGATCATTAG- 3'	Séquençage du gène <i>ykfD</i>
ykfterm5'	5' -AATCATACTGAAAGCGGAGC- 3'	Séquençage de la région terminatrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>
ykfterm3'	5' -GTTCCAACCTCGGTACAAACG- 3'	Séquençage de la région terminatrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>

4.7.5. Oligonucléotides utilisés pour l'inactivation des gènes de l'opéron *ykfABCD* de *B. subtilis*

Nom	Séquence	Application
ykfA-5'Upbis	5' -AAGCTGCCGCTTTATCAAATGCGAATTCAATTGTCCGTCACCCTGTGCG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfA5'RPter	5' -TTGGATCCCCTCATCATCCTGTCCCC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfA3' UP	5' -AAGATATCCAAGCCGAATCGCTGTCCCC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfA3'RPbis	5' -AACGACAGGGTGACGGACAATTGAATTCGCATTTGATAAAGCGGCAGC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB5'UPbis	5' -AAGAGCAATGATGCACACTGTCTCGAGTCTACACTGGGCAGCCATT- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB-5'RP	5' -TTGGATCCGATTCGGCTTGTTCGATTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB3'UPbis	5' -AAGATATCCGCCGATTATGGCTGATGAA- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB3'Rpbis	5' -AAAATGGCGTGCCAGTGTAGACTCGAGGACAGTGTGCATCATTGCTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-5'UP	5' -AAGAGCCGATGGAGATTATAAGAATTCGCGGATTATGGCTGATGAA- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-5'RP	5' -TTGGATCCGACAGTGTGCATCATTGCTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-3'UP	5' -AAGATATCGCCGCTGTTTTTCAGAATAA- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-3'RP	5' -AATTCATCAGCCATAATCGGCGGAATTCCTATGAATCTCCATCGGCTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfD5' UP	5' -AACTCTTTCTACGAAAGCCAGCGAATTCATGCGGGAGATCAGGCTAAG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfD</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfD5' RP	5' -TTGGATCCCTTCACGAATCTGAAAGGTG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfD</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfD3' UP	5' -AAGATATCATGTGGAGAATCTCGTCCCC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfD</i> de <i>B. subtilis</i>

ykfD3' RP	5' -AACTTAGCCTGATCTCCCGCATGAATTCGCTGGCTTTCGTAGAAAGAG-3'	Inactivation du gène ykfD de <i>B. subtilis</i>
BSAUP	5' -CGCATCGGGGTTTTGGGAC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfABCD chez <i>B. subtilis</i>
BSDRP	5' -ATACAAATGGCAAGCGACAAAAC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfABCD de <i>B. subtilis</i>
pSpac FW	5' -GGTGTGGCATAATGTGTGGAATTGTGAGC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfA,B,C ou D de <i>B. subtilis</i>
ykfB-5'RP	5' -TTGGATCCGATTCGGCTTGTTCGATTC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfA de <i>B. subtilis</i>
ykfC-5'RP	5' -TTGGATCCGACAGTGTGCATCATTGCTC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfB de <i>B. subtilis</i>
ykfC-3'RP	5' -AATTCATCAGCCATAATCGGCGGAATTCCTATGAATCTCCATCGGCTC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfC de <i>B. subtilis</i>
ykfD-3'RP	5' -AACTTAGCCTGATCTCCCGCATGAATTCGCTGGCTTTCGTAGAAAGAG-3'	Vérification de l'inactivation de ykfD de <i>B. subtilis</i>
ykfASmal5'	5' -AACCCGGGTTATGCGAAGGAGCGGTA-3'	Complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>
ykfASmal3'	5' -CAGAAGGGGCGCTGAAGACACCCGGGAT-3'	Complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>
amyEfront	5' -TTTATTGCTGTTTCATTTGGTTCTG-3'	Vérification de la complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>
amyEback	5' -GATGGTGTATGTTTTGCCAAATTG-3'	Vérification de la complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>

#### 4.7.6. Oligonucléotides utilisés lors des expériences de RT-PCR sur de l'ARN total de *B. licheniformis*

Nom	Séquence	Application
BlaIRTUP	5' -TTCCTTCTTTCTGTTCTTATGTTCTTC-3'	RT-PCR du gène <i>blaI</i>
BlaIRTRP	5' -TACCTCAAATCTCTGATGCGGAATTAG-3'	RT-PCR du gène <i>blaI</i>
BlaPTRUP	5' -GCGTGCTTTTACAACAGAAATCA-3'	RT-PCR du gène <i>blaP</i>
BlaPRTRP	5' -CAAGTGCTCTTGCTGTACTGGTAT-3'	RT-PCR du gène <i>blaP</i>
BL01303RT_UP	5' -ATCATTTACCCGAATACATCCA-3'	RT-PCR du gène <i>BL01303</i>
BL01303RT_RP	5' -GATCCACCGCAATAACCTTG-3'	RT-PCR du gène <i>BL01303</i>
16sUP	5' -CAAGCGTTGTCCGAATTAT-3'	RT-PCR du gène codant pour le RNA16s
16sRP	5' -CTCAAGTTCCCCAGTTCCA-3'	RT-PCR du gène codant pour le RNA16s

#### 4.7.7. Oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard de migration électrophorétique de l'opérateur présent en amont du gène *BL01303*

Nom	Séquence	Application
OP1303_UP	5' -AAAATTTTACATATATAAAATTTTG- 3'	EMSA Blal-OP <sub>BL01303</sub>
OP1303_RP	5' -CAAAATTTATATATGTAAAATTTT- 3'	EMSA Blal-OP <sub>BL01303</sub>
blaP24mer+	5' -AAAGTATTACATATGTAAAGATTTA- 3'	EMSA Blal-OP <sub>blaP</sub>
blaP24mer-	5' -TAAATCTTACATATGTAATACTTT- 3'	EMSA Blal-OP <sub>blaP</sub>

#### 4.7.8. Oligonucléotides utilisés pour le séquençage et l'amplification du gène *BL01303*

Nom	Séquence	Application
BL01303_UP	5' -CGGAGCTGTATTTCTACAGGAGC- 3'	Séquençage du gène <i>BL01303</i>
BL01303_RP	5' -GCTGTAACCTCCCACGCCATCG- 3'	Séquençage du gène <i>BL01303</i>
BL01303Ndel5'	5' -AACATATGGAAGTAACAGTCCAAAAAGGTGAC- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>
BL01303SacI3'open	5' -TTGAGCTCTTTTAAACTTTAACTTTAACCGT- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>
BL01303Sall5'	5' -AAGTCGACGAAGTAACAGTCCAAAAAGGTGAC- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>
BL01303SacI3'open	5' -TTGAGCTCTTTTAAACTTTAACTTTAACCGT- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>

### 4.8. Techniques de biologie moléculaire

#### 4.8.1. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. La visualisation de l'ADN est réalisée grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé entre les paires de bases. Après suspension de l'agarose (1%) dans un tampon TAE (TAE 1x : 40 mM Tris acétate ; 2 mM EDTA), celui-ci est solubilisé par l'action de la chaleur et le gel est formé lors du retour à la température ordinaire. L'ADN chargé négativement par ses groupements phosphates, est déposé dans les puits du gel, soumis à un champ électrique et migre vers le pôle positif. La vitesse de migration de l'ADN à travers les pores du gel est inversement proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire. Un marqueur spécifique de poids moléculaire est utilisé comme référence pour déterminer la taille de l'ADN (cf. § 4.6).

#### 4.8.2. Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN résultant d'une PCR ou d'une digestion d'un plasmide par des enzymes de restriction sont purifiés grâce au kit de purification GFX<sup>TM</sup> PCR (Amersham Pharmacia Biotech). Le principe de ce kit repose sur l'utilisation d'une matrice de silice possédant la propriété de fixer sélectivement l'ADN. Après centrifugation, le surnageant non retenu sur la colonne contient les impuretés telles que les protéines, les sels, les courts fragments d'ARN, les dNTPs, le bromure d'éthidium ainsi que les oligonucléotides. La colonne est lavée jusqu'à élimination complète des impuretés et l'ADN d'intérêt est élué de la matrice de silice par de l'eau stérile.

#### 4.8.3. Extraction et purification de l'ADN plasmidien

L'extraction et la purification des plasmides d'*E. coli* sont réalisées à l'aide du kit Nucleobond AX (Macherey-Nagel) pour une culture de 100 ml et du kit Gene JET™ Plasmide Miniprep (Fermentas) pour une culture de 1 à 3 ml.

Dans le cas du kit Nucleobond AX, les cellules subissent une lyse alcaline. Une solution d'acétate précipite ensuite l'ADN chromosomique et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation ou filtration. L'ADN plasmidien est purifié grâce à une matrice échangeuse d'ions. Les contaminants (sels, protéines, ...) sont éliminés par le tampon de lavage. L'élution est réalisée par une solution de force ionique élevée. L'ADN est précipité par addition de 0,8 volume d'isopropanol, lavé à l'éthanol 70%, séché et enfin dissout dans de l'eau stérile.

Le kit Gene JET™ Plasmide se base sur le même principe. Les différentes étapes sont la lyse cellulaire, l'élimination des débris cellulaires et de l'ADN chromosomique et l'élution. La purification de l'ADN plasmidien est dans ce cas réalisée grâce à une matrice de silice. L'élution est réalisée par de l'eau stérile.

#### 4.8.4. Extraction et purification de l'ADN génomique

L'extraction et la purification d'ADN génomique d'*E. coli* et *B. subtilis* sont réalisées à l'aide du kit « illustra bacteria genomic Prep Mini spin kit » (GE Healthcare) au départ d'une culture de 3 ml. Les bactéries subissent d'abord une lyse permettant une libération douce de l'ADN, grâce à une solution de lysozyme et de protéinase K. S'en suit l'étape d'élimination de l'ARN par une solution de RNase (20 mg/ml). Ensuite, l'ADN est purifié sur une matrice de silice. Les contaminants sont éliminés par une solution de lavage. L'élution est réalisée par le tampon d'élution, dont le volume est fonction de la concentration désirée.

#### 4.8.5. Mesure de la concentration en ADN

Le spectromètre Genequant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech) permet l'estimation de la concentration en ADN d'une solution. Une mesure d'absorbance à 260 nm égale à 1, équivaut à une concentration en ADN double brin de 50 µg/ml (pour un trajet optique de 1 cm).

#### 4.8.6. Ligation

Le fragment d'ADN à cloner et le plasmide dans lequel il doit être inséré sont mis en présence de la T4 DNA ligase dans un volume final de 10 µl de tampon de ligation. La solution est incubée soit trois heures à température ambiante, soit cinq à six heures à 16°C ou une nuit à 4°C suivie d'une heure à température ambiante.

#### 4.8.7. Technique de Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cette technique a pour but d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN spécifique à partir d'amorces appelées oligonucléotides. L'ADN subit tout d'abord une étape de dénaturation initiale à 95°C

pendant 5 minutes. S'en suit un cycle de polymérisation commençant par une nouvelle étape de dénaturation à 95°C pendant 1 minute. Chacun des deux brins monocaténares de l'ADN ainsi obtenu est alors hybridé avec un oligonucléotide synthétique complémentaire en abaissant la température jusqu'à une température optimale pour chacune des hybridations pendant une durée de 30 secondes. Ensuite, en présence de désoxynucléotides, une ADN polymérase thermophile synthétise le brin complémentaire en utilisant les oligonucléotides comme amorces à une température fonction de la polymérase employée. La durée de cette étape varie selon la taille du fragment à amplifier et la rapidité de la polymérase utilisée. Ces cycles sont répétés de 20 à 40 fois.

Composition du milieu de réaction :

- Tampon de la polymérase recommandé par le fournisseur
- 0,2 mM de chaque dNTPs
- 200 pmoles de chaque oligonucléotide
- ADN polymérase 1 u/100 µl
- 10 pg à 1 µg de matrice
- H<sub>2</sub>O

#### 4.8.8. Mutagenèse dirigée

Pour réaliser une mutagenèse dirigée à l'aide du kit « QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene), deux amorces complémentaires portant la mutation à introduire sont utilisées au cours d'une seule réaction de PCR. Les conditions d'amplification sont celles recommandées par le fournisseur. En général, le mélange réactionnel de base comprend 50 ng de matrice, 125 ng de chaque oligonucléotide, 10 mM de dNTP et 2,5 unités de DNA polymerase dans un volume final de 50 µl. Ce mélange est soumis à une première dénaturation à 95°C pendant 30 sec, suivie de 18 cycles de PCR (dénaturation à 95°C, 30 sec ; hybridation à 55°C, 1 minute ; élongation à 68°C, 2 minutes/kb de plasmide). Le produit de la PCR est ensuite incubé 60 minutes à 37°C en présence de 10 unités de l'enzyme *DpnI* afin de digérer l'ADN méthylé provenant du plasmide matrice. Enfin, 1 à 2 µl de ce mélange final sont utilisé(s) pour la transformation des cellules compétentes *E. coli* DH5α. Après transformation, culture et extraction, les plasmides obtenus sont analysés par digestion enzymatique et vérifiés par séquençage.

#### 4.8.9. Séquençage de séquence nucléotidique

Le séquençage de l'ADN repose sur la technique de terminaison des chaînes en présence de didésoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). On obtient alors des fragments d'ADN de tailles différentes selon la position où la polymérisation a été interrompue. Les amorces de séquençage sont couplées à une substance fluorescente. Lors de l'électrophorèse, le passage des fragments d'ADN devant un faisceau laser provoque une émission de fluorescence qui est détectée par un photomultiplicateur placé en face de chacune des pistes du gel d'électrophorèse. Les séquences sont lues par un séquenceur automatique à laser. Le séquençage de toutes nos constructions a été effectué par le service GIGA-séquençage de l'Université de Liège.

#### 4.8.10. Isolement et purification des ARN totaux de *B. licheniformis*

Les ARN totaux de *B. licheniformis* sont isolés à l'aide du « RNeasy Protect Bacteria Mini Kit » (Qiagen) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Une culture de *B. licheniformis* de 40 ml est réalisée en milieu LB à 37°C. Lorsque l' $A^{600}$  a atteint une valeur de 0,8, la culture est divisée en deux. Les 20 premiers millilitres sont additionnés de céphalosporine C 2,5 µg/ml et les deux cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 3h. 1 ml de chaque culture est ensuite prélevé et 2 ml de « RNA protect reagent » (Qiagen) y sont ensuite ajoutés. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution contenant du lysozyme (15 mg/ml) et de la protéinase K (10% v/v). Le lysat est alors centrifugé puis resuspendu dans de l'éthanol avant d'être chargé sur une matrice de silice RNeasy. L'ARN se fixe sur la colonne et tous les contaminants sont éliminés par lavage. L'ARN est ensuite élué par de l'eau.

Afin de s'assurer que l'échantillon d'ARN préparé est dépourvu d'ADN, celui-ci est traité par le « RNase-Free DNase Set » (Qiagen). Ce kit permet une digestion efficace de l'ADN sur colonne lors de la purification d'ARN lorsqu'on utilise les kits RNeasy. La DNase est efficacement éliminée par lavage.

#### 4.8.11. RT-PCR

La RT-PCR est une technique qui permet de préparer des ADN complémentaires (ADNc) spécifiques à partir d'un mélange d'ARN totaux et d'une amorce complémentaire au brin d'intérêt. Ensuite, l'ADNc est amplifié par PCR.

Les expériences de RT-PCR ont été réalisées à l'aide du « QIAGEN OneStep RT-PCR Kit » (Qiagen). Comme son nom l'indique, ce kit permet de préparer et d'amplifier l'ADNc en une seule réaction. En effet, le mix d'enzymes fourni contient une reverse transcriptase et la HotStarTaq DNA polymerase. Après la transcription inverse (réalisée par incubation 30 minutes à 50°C), les réactions sont chauffées à 95°C pendant 15 minutes pour simultanément inactiver la reverse transcriptase et activer la polymérase. Les fragments PCR sont ensuite amplifiés par PCR classique.

#### 4.8.12. Préparation de cellules compétentes et transformation d'*E. coli*

Chez *E. coli*, l'état de compétence est obtenu par une fragilisation chimique au  $\text{CaCl}_2$  et à froid de la membrane plasmique. Ce traitement permettrait la formation de pores dans la membrane et faciliterait ainsi l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la bactérie (Sambrook *et al.*, 1989). Pour ce faire, 100 ml de milieu liquide LB sontensemencés avec 2 ml de préculture d'*E. coli* réalisée dans ce même milieu. La culture est incubée à 37°C jusqu'à ce que l' $A_{600}$  atteigne 0,6. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (10 minutes à 4000 g) et reprises dans 20 ml de tampon TFB1 ( $\text{CH}_3\text{COOK}$  30 mM ;  $\text{CaCl}_2$  10 mM ; KCl 100 mM ; Glycerol 15% ;  $\text{MnCl}_2$  50 mM) stérilisé par filtration. La solution bactérienne est incubée 2 heures sur glace puis centrifugée (10 minutes à 4000 g). Les bactéries sont reprises dans 4 ml de tampon TFB2 (MOPS 10 mM ;  $\text{CaCl}_2$  75 mM ; Glycerol 15%) filtré. Les cellules dites compétentes sont alors aliquotées et conservées à -70°C.

Pour transformer *E. coli*, 2 µl de plasmide purifié ou 5 µl de produit d'une ligation sont ajoutés à 100 µl de cellules compétentes. Ce mélange est incubé sur glace pendant 15 à 30 minutes puis est

soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42°C. On y ajoute ensuite 400 µl de milieu SOC et le tout est incubé à 37°C pendant 1h30 à 2h. La sélection de clones transformés s'effectue par étalement sur milieu LB-Agar additionné du marqueur de sélection approprié. Les boîtes de Pétri sont incubées 16 h à 37°C.

#### 4.8.13. Préparation de cellules compétentes et transformation de *B. subtilis*

*B. subtilis* présente un état de compétence naturel observé en fin de phase exponentielle de croissance, plus précisément lorsque la vitesse décroît juste avant d'atteindre la phase plateau, stade où la paroi bactérienne est naturellement fragilisée. Une première préculture est réalisée en inoculant 2 ml de milieu LM avec 50 µl d'inoculum de *B. subtilis*. Cette préculture est incubée 16 heures à 28°C puis est utilisée pour ensemercer 5 ml de milieu LM de manière à obtenir une  $A^{600}$  égale à 0,2. Cette seconde préculture, additionnée de 50 µl de L-tryptophane 5 mg/ml, est incubée à 37°C jusqu'à ce que l' $A^{600}$  atteigne une valeur de 1. Ensuite, 500 µl de la seconde préculture sont ajoutés à 10 ml de milieu MD. La suspension bactérienne est incubée durant 4 heures à 37 °C. Une fois la phase stationnaire atteinte, les cellules sont dites compétentes. Avant d'être aliquotées et conservées à -70°C, les bactéries sont additionnées de glycérol (10 % final).

Pour transformer *B. subtilis*, les cellules compétentes additionnées d'ADN (maximum 20 ng) sont incubées à 37°C pendant 50 minutes à 1h30 sous agitation orbitale. Les cellules sont ensuite étalées sur boîtes LB-agar additionnées de l'antibiotique approprié.

Si la transformation est difficile, un autre protocole de transformation peut être utilisé : la souche à transformer est inoculée dans 1 ml de milieu LB et incubée à 37°C pendant 6 heures. L'absorbance à 450 nm de la préculture est mesurée et on inocule ensuite 1 ml de milieu MMG avec la préculture de façon à obtenir une absorbance de 0,01. A ce moment, le plasmide est ajouté (0,5 à 1 µg d'ADN) et la culture est incubée 24h à 37°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 100 µl de milieu LB et étalé sur boîte LB-agar additionné de l'antibiotique approprié.

### 4.9. Techniques d'analyse des protéines

#### 4.9.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Le SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Analysis Gel Electrophoresis) permet de séparer un mélange de protéines en fonction de leur taille. La concentration des gels de polyacrylamide est choisie en fonction de la masse moléculaire des protéines à analyser. La préparation des gels de concentration et de séparation s'effectue à partir des solutions et des réactifs suivants (volume total pour deux gels) :



	Gel de concentration	Gel de séparation			
	4%	10%	12%	15%	18%
Solution d'acrylamide/ bisacrylamide 30%	1,2 ml	3,325 ml	5 ml	5 ml	6 ml
Tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10% (w/v) dans H <sub>2</sub> O	60 µl	100µl	100 µl	100µl	100µl
Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,5 ml	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	4,05 ml	3,4 ml	2,4 ml	1,29 ml
Persulfate d'ammonium 10% (w/v) dans H <sub>2</sub> O	60 µl	100µl	100 µl	50µl	100 µl
TEMED	6 µl	10µl	10 µl	10µl	10 µl

Le gel de séparation est coulé entre deux plaques de verre préalablement lavées à l'acétone. Afin de s'assurer un front de migration horizontal, de l'isopropanol est déposé au-dessus du gel de séparation. Après la polymérisation de celui-ci, l'isopropanol est éliminé et remplacé par le gel de concentration. Un peigne est introduit dans le gel de concentration avant sa polymérisation de manière à former les puits.

Avant le chargement, du tampon de dénaturation (0,6 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; 2,5 ml de glycérol ; 2 ml de SDS 10% w/v ; bleu de bromophénol 0,1% (w/v) ; 0,5 ml de mercaptoéthanol ; amené à 10 ml avec de l'eau) est ajouté aux échantillons protéiques. Ce mélange est chauffé à 100°C pendant cinq minutes. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel de concentration. L'électrophorèse est réalisée à un voltage constant. Un marqueur de poids moléculaire est utilisé comme référence afin de déterminer les masses moléculaires apparentes des protéines à analyser (cf. § 4.6.). La migration est réalisée à l'aide du tampon TGS : Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1% (w/v) ; H<sub>2</sub>O. Après migration, le gel est coloré par une solution de « PageBlue™ Protein Staining Solution » (Fermentas). L'excès de colorant est éliminé par incubation dans de l'eau stérile de manière à ne laisser apparaître que les protéines colorées.

#### 4.9.2. Test d'acylation

L'échantillon à analyser est incubé avec de l'ampicilline fluorescente (0,5 mM) pendant 30 minutes à 37°C et est ensuite analysé par SDS-PAGE. Après la migration, le gel est analysé à l'aide du PhosphorImager (Biorad). Ce type d'appareillage permet l'excitation et l'observation d'un fluorophore présent dans le gel. L'image obtenue est analysée à l'aide du programme Quantity One (Biorad).

#### 4.9.3. Production et purification des anticorps dirigés contre BlaR-CTD

Le serum polyclonal dirigé contre le senseur de la protéine BlaR1 (BlaR-CTD) a été obtenu d'un lapin de Nouvelle-Zélande immunisé avec la protéine BlaR-CTD purifiée (Duval *et al.*, 2003). Les anticorps polyclonaux ont été purifiés à l'aide d'une colonne Sepharose 4B sur laquelle a été immobilisée la protéine BlaR-CTD purifiée.

Pour cela, 25 mg de la protéine BlaR-CTD purifiée sont tout d'abord dialysés contre un tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M. Ensuite, 330 mg de sépharose (CNBr-activated Sepharose 4 fast

flow, Amersham Biosciences) sont lavés 6 fois à l'aide de HCl 1 mM. La protéine concentrée (volume finale de 500 µl) est ensuite ajoutée à la sépharose et le tout est agité doucement à 4°C pendant une nuit. La matrice est ensuite lavée 3 fois avec du tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M. Les groupes actifs restants sont ensuite bloqués lors d'une incubation de 2h à température ambiante dans du tampon Tris 0,1 M pH 8. Ensuite, une série de lavages sont réalisés : 3 lavages avec un tampon Tris 0,1 M pH 8 NaCl 0,5 M, suivis de trois lavages avec du tampon Acétate 0,1 M pH 4 NaCl 0,5 M et de 3 lavages avec du PBS pH 7,4. Le sérum est ajouté à la matrice à ce moment et l'ensemble est incubé à 4°C pour la nuit. Trois lavages supplémentaires au PBS pH 7,4 sont réalisés. La matrice est alors pactée dans une colonne et à nouveau lavée avec du PBS pH 7,4. Les anticorps sont ensuite élués avec du tampon glycine (glycine 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 2,3) en fractions de 1 ml. L'éluat est immédiatement neutralisé en ajoutant à chaque fraction 30 µl de tampon Tris 3 M pH 8,8 et 20 µl de NaCl 5 M.

Les anticorps purifiés dirigés contre BlaR-CTD ont été utilisés à une dilution finale de 1:1000.

#### 4.9.4. Immunodétection (Western blotting)

Les protéines préalablement séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nylon (PVDF, Immobilon, Millipore) grâce à l'appareil de transfert (Hoefer Semiphor, Amersham Biosciences). Le transfert se fait pendant 60 minutes à 45 mA par gel dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; glycine 192 mM ; éthanol 20%. La membrane est ensuite incubée une heure dans un tampon de blocage (lait en poudre 5 % dans du TBS (TBS : Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; NaCl 500 mM)). Elle est alors mise en contact avec les anticorps primaires, dirigés contre la protéine d'intérêt pendant 90 minutes (anticorps dilués dans une solution TTBS additionnée de 1% de BSA (TTBS : TBS + Tween 20 0,05 %)). La membrane est ensuite lavée dans le TTBS puis placée pendant 90 minutes dans la solution d'anticorps secondaires, couplés à la phosphatase alcaline. Après lavage au TTBS puis TBS, la membrane est révélée en présence de 150 µl de NitroBlue 22 Tetrazolium (NBT, 30 mg/ml dans du DMF 70%) et 150 µl de 5-bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate (BCIP, 22,5 mg/ml dans du DMF 70%) dans un volume de 15 ml de tampon carbonate (NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 9,8) pendant 3 à 10 minutes.

#### 4.9.5. Séquençage NH<sub>2</sub> terminal

Les protéines séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) sont transférées sur une membrane PVDF (Millipore), préalablement rincée dans du méthanol et incubée dans le tampon de transfert (CAPS 10 mM, pH 10,5). Après le transfert, la membrane est colorée au bleu de coomassie (H<sub>2</sub>O, méthanol 50%, bleu de coomassie R-250 0,1%) fraîchement préparé et filtré, elle est ensuite lavée dans la solution de décoloration (méthanol 50%, acide acétique 10%) et séchée pendant la nuit à température ambiante. Ensuite, la protéine à séquencer est découpée du blot par un instrument stérilisé. Le séquençage se fait dans un microséquenceur automatique, le « Pulsed Liquid Phase Protein Sequenator » (Applied Biosystems).

#### 4.9.6. Dosage des protéines par la méthode au BCA (Pierce)

La méthode au BCA est une méthode sensible de dosage des protéines basée sur la réduction du Cu<sup>2+</sup> en milieu alcalin par les liaisons peptidiques, les résidus tryptophane, cystéine et tyrosine. Le Cu<sup>2+</sup> en présence d'acide bicinchoninique (BCA) forme un complexe qui absorbe à 562 nm. Cette technique est utilisée pour déterminer la concentration en protéines totales dans un extrait cellulaire

brut non purifié (limites de sensibilité: 20 à 2000 µg/ml). La réaction de dosage est réalisée en microplaques à fond plat (format 96 puits, Merck). 200 µl de réactif BCA sont ajoutés dans les puits correspondants à l'échantillon, au blanc et aux standards de sérum albumine bovine (BSA) puis ceux-ci sont additionnés de 20 µl d'échantillon, du blanc (tampon de conditionnement de la protéine à doser) ou des standards de BSA (0 ; 0,025 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 mg/ml). La microplaque est incubée 30 minutes à 37°C avant d'être lue sur un lecteur pour microplaque.

#### 4.9.7. Fractionnement cellulaire

Lors des tests de production de protéines recombinantes chez *E. coli*, des échantillons de 1 ml de culture sont récoltés, centrifugés et remis en suspension dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7 par unité d'A<sup>600</sup> de l'échantillon. Pour récolter la fraction totale, cette suspension cellulaire subit une sonication (3 fois 15 secondes). La fraction soluble est séparée de l'insoluble par centrifugation de l'échantillon pendant 20 minutes à 13000 g. Le culot correspondant à la fraction insoluble est remis en suspension dans un volume équivalant à la fraction soluble.

#### 4.9.8. Purification de protéines par IMAC (« Immobilized Metal Affinity Chromatography »)

L'IMAC est un type de chromatographie d'affinité qui fait appel à l'immobilisation, sur une résine, d'un atome métallique comme le nickel, le zinc, le cobalt, etc. Lors de ce travail, nous avons utilisé une matrice « chelating sépharose™ Fast Flow » (Amersham Biosciences) sur laquelle ont été immobilisés des ions Ni<sup>2+</sup>. Ce métal de transition chargé positivement peut former six liaisons de coordination : trois avec le sépharose et trois avec des molécules d'eau. Les molécules d'eau peuvent être remplacées par la protéine ligand durant la phase d'adsorption et par une molécule de faible poids moléculaire (l'imidazole) durant l'élution. Une colonne de 10 ml a été utilisée avec un débit de 1,5 à 3 ml/minute. La colonne est préalablement équilibrée avec un tampon permettant la fixation de la protéine (tampon A : Tris 20 mM pH 8). L'échantillon est ensuite injecté sur la colonne. Les contaminants sont éliminés par un lavage avec le tampon d'équilibration additionné de NaCl 2 M. L'élution est réalisée par un gradient en tampon B (Tris 20 mM pH 8, Imidazole 250 mM). La colonne est ensuite régénérée et conservée dans une solution d'éthanol 20%. La régénération de la colonne est réalisée en injectant les volumes appropriés des solutions suivantes :

- 3 volumes de colonne d'EDTA 100 mM
- 5 volumes de colonne d'H2O milliQ
- 2 volumes de colonne de NaOH 1M
- 10 volumes de colonne d'H2O milliQ
- 5 volumes de colonne de tampon Tris 1 M pH7, NaCl 150 mM
- 5 volumes de colonne d'H2O milliQ
- 3 volumes de colonne de NiSO4 100mM
- 10 volumes de colonne d'H2O milliQ
- 3 volumes de colonne d'éthanol 20%

#### 4.9.9. Purification de protéines sur colonne StrepTactin

Les résines de type StrepTactin permettent la purification de protéines portant une StrepTag par chromatographie d'affinité basée sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine. La Strep-Tag est un peptide synthétique de 8 acides aminés (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Cette séquence peptidique mime la poche de liaison de la biotine et montre donc une affinité intrinsèque pour la StrepTactin qui est une streptavidin modifiée. Lors de ce travail, 2 types de colonnes ont été utilisées : une colonne de 1 ml Gravity flow *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup>column (IBA BioTAGnology) et une colonne de 5 ml *Strep-Tactin*<sup>®</sup>Superflow<sup>®</sup> cartridge H-PR (IBA BioTAGnology).

Le processus chromatographique se déroule comme suit. La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de colonne de tampon de lavage. L'échantillon protéique est ensuite injecté sur la colonne. Les contaminants sont éliminés par un lavage avec 5 volumes de colonne de tampon de lavage. L'élution de la protéine d'intérêt est réalisée à l'aide de 4 volumes de colonne de tampon d'élution qui contient de la desthiobiotine, une biotine modifiée qui a une très grande affinité pour la résine. Lors de l'élution, des fractions de ½ volume de colonne sont récoltées. La colonne est ensuite régénérée à l'aide de 15 volumes de colonne de tampon de régénération. Pour la colonne de 1 ml, le débit est fonction de la gravité et pour la colonne de 5 ml, le débit utilisé est de 3 ml/minutes pour toutes les étapes excepté la charge de l'échantillon qui est réalisée avec un débit de 1,5 ml/minutes.

Composition des tampons :

- Tampon de lavage : Tris-HCl 100 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM.
- Tampon d'élution : Tris-HCl 100 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; desthiobiotine 2,5 mM.
- Tampon de régénération : Tris-HCl 100 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; HABA 1 mM.

Pour la purification de la protéine membranaire BlaR1, les tampons de lavage et d'élution sont additionnés de DDM 0,01 %.

#### 4.9.10. Induction des souches de *B. subtilis* et dosage de l'activité $\beta$ -lactamasique

Pour les tests d'induction et le dosage de l'activité  $\beta$ -lactamasique, 40 ml de milieu LB additionnés de chloramphénicol 7  $\mu$ g/ml sont inoculés avec une préculture de *B. subtilis* transformé par le pDML995 ou un dérivé de celui-ci. La culture est placée sous agitation dans un incubateur liquide à 37°C. Lorsque l' $A_{600}$  atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8, la culture est séparée en deux volumes de 20 ml : un étant induit par l'ajout d'une  $\beta$ -lactamine, la céphalosporine C (concentration finale de 2,5  $\mu$ g/ml) et l'autre servant de témoin. Un échantillon est prélevé et la  $A_{600}$  est mesurée toutes les heures pour les cultures induite et non-induite.

La mesure de l'activité  $\beta$ -lactamasique de chaque échantillon est basée sur le changement du spectre d'absorption de la nitrocéfine lors de son hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase. La nitrocéfine ou CPR (céphalosporine rouge) est un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame chromogène. Une solution stock de nitrocéfine à 10 mM est préparée en solubilisant 5,38 mg de nitrocéfine dans 1 ml de

diméthylformamide (DMF). La solution utilisée (100  $\mu\text{M}$ ) est obtenue en diluant 500  $\mu\text{l}$  de solution stock dans 50 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7. La variation d'absorbance est mesurée à 482 nm. Le milieu réactionnel est composé de 5 à 50  $\mu\text{l}$  de surnageant de culture contenant la  $\beta$ -lactamase synthétisée par les bactéries, additionné de nitrocéfine pour atteindre un volume final de 500  $\mu\text{l}$ . La réaction est réalisée à 37°C. Le dosage de la quantité de  $\beta$ -lactamases produites est obtenu en effectuant le rapport de la variation d'absorbance à 482 nm par unité de temps et par unité d' $A_{600}$  de la suspension cellulaire. La quantité de  $\beta$ -lactamases  $[E_t]$  est calculée à partir des équations suivantes :

$$v_0 = (\Delta A \times s^{-1} \times A^{600-1}) / \varepsilon$$

$$v_0 = (k_{cat} \times [E_t] \times [S]) / (K_m + [S])$$

où

$$\left\{ \begin{array}{l} v_0 = \text{vitesse initiale;} \\ \Delta A = \text{variation d'absorbance} \\ k_{cat} = \text{constante catalytique (470 s}^{-1}\text{)} \\ [S] = \text{concentration molaire en substrat} \\ \quad (100 \mu\text{M}) \\ K_m = 40 \mu\text{M} \\ \varepsilon = \text{coefficient d'extinction molaire de la} \\ \quad \text{nitrocéfine (15000 M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} \end{array} \right.$$

#### 4.10. Reconstitution de la protéine BlaRE213A dans des liposomes

Afin de réinsérer une protéine membranaire dans des liposomes, il faut en premier lieu réaliser un film lipidique. Pour cela, des extraits de lipides polaires d'*E. coli* (Avanti), solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 20 mg/ml, sont utilisés. La solution de lipide, placée dans un tube en verre de 5 ml, est séchée par un flux d'azote. Le tube est ensuite placé dans un dessiccateur pendant deux heures afin d'éliminer toute trace de chloroforme.

Le film lipidique est ensuite remis en suspension avec une solution de n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside 0,1% contenant la protéine membranaire. Le détergent est progressivement éliminé à l'aide de Biobeads SM-2 Adsorbent (Bio-Rad). Ces dernières sont préalablement hydratées avec de l'eau milliQ. L'eau est ensuite retirée à l'aide d'une seringue et remplacée par la solution lipides/protéines. Le tout est agité pendant une heure à 4°C. Ensuite, la solution lipides/protéines est récupérée à l'aide d'une seringue et déposée sur des billes fraîches. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à élimination du détergent.

La solution lipides/protéines est ensuite additionnée de sucrose (concentration finale 40%). Cette solution est soumise à une ultracentrifugation de 1 heure à 100000 g afin de concentrer le mélange lipides/protéines à la surface. Au-dessus de cette surface est ensuite coulé un gradient de sucrose de 30 à 5 %. Le tout est soumis à une ultracentrifugation de 16h à 100000 g.

Le gradient de sucrose est ensuite fractionné à l'aide d'une pompe péristaltique. Chaque fraction est analysée par mesures d'absorbance à 400nm (détection des lipides) et à 280nm (détection des protéines). Les fractions dans lesquelles des protéines et des lipides sont détectés contiennent des liposomes dans lesquels sont réinsérées les protéines membranaires.

#### 4.11. Test d'activité de la boucle L3 de BlaR1

Afin de tester l'activité de la boucle L3, les échantillons contenant 5 pmoles de tripeptide dans 100 µl de tampon phosphate 20 mM pH 7 sont incubés pendant 1h à 37°C avec les membranes de *B. subtilis* enrichies en BlaR1 ou la protéine NusA-L3. L'échantillon est ensuite congelé puis lyophilisé et resuspendu dans 50 µl de tampon borate 50 mM pH 9,5. Ensuite, 15 µl de TNBSA 0,3 % sont ajoutés et la solution est incubée 55 minutes à 37°C. Cette opération est répétée une seconde fois. L'échantillon est ensuite congelé puis lyophilisé et resuspendu dans 100 µl de tampon C (tampon C = H<sub>2</sub>O mQ, 0,1 % TFA). Après une centrifugation de 10 minutes à 14000 g, le surnageant est injecté sur une colonne HPLC Nucléodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans du tampon C. La colonne a ensuite été lavée avec du tampon C. Le débit utilisé tout au long du processus chromatographique est de 0,7 ml/minute. L'élution est réalisée par un gradient de 0 à 70 % en tampon D (tampon D = acétonitrile, TFA 1 %) en 60 minutes, suivi du plateau à 70 % pendant 5 minutes. Ensuite, la concentration en tampon D passe de 70 à 100 % en 1 minute. Il s'en suit un plateau de 5 minutes à 100 % en tampon D. La concentration en tampon D retombe alors à 0 % en 1 minute et reste stable pendant 10 minutes. L'ensemble du processus chromatographique est suivi par mesures d'absorbance à 335 nm.

#### 4.12. Préparation des membranes de *Bacillus*

*B. subtilis* transformé ou non par le pDML995, est mis en culture dans du milieu LB additionné ou non de chloramphénicol à 37°C. Lorsque l'A<sup>600</sup> atteint une valeur de 0,6, les cultures sont séparées en deux. Une partie est induite par addition de céphalosporine C (2,5 mg/ml) et l'incubation des deux demi-cultures est poursuivie à 37°C jusqu'à obtenir une valeur d'A<sup>600</sup> d'environ 1,5. Les cellules sont ensuite isolées par centrifugation 10 minutes à 6000 g. Le culot est ensuite resuspendu dans 10 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7. La lyse cellulaire est obtenue par l'ajout de lysozyme (2 mg/ml) suivi d'une sonication (2 pulses de 30 sec). Les cellules non lysées sont éliminées par une centrifugation de 10 minutes à 6000 g. Ensuite, les membranes sont récupérées par la centrifugation du surnageant pendant 30 minutes à 39000 g. Le culot contenant les membranes est ensuite lavé 2 fois dans du tampon phosphate 50 mM pH 7. Finalement, les extraits membranaires sont repris dans 500 µl du même tampon et conservés à -20°C.

#### 4.13. Analyse par gel retard ou « EMSA » (electrophoretic migration shift assay)

Pour réaliser les analyses par gel retard, 2 techniques ont été utilisées. La première permet de mettre en évidence la formation d'un complexe protéine-ADN, grâce à un séquenceur automatique Alf Express (Amersham Pharmacia Biotech) et deux oligonucléotides synthétiques complémentaires dont un brin est marqué à son extrémité 5' d'indodicarbocyanine (Filée *et al.*, 2001). Les oligonucléotides hybridés, la protéine liant l'ADN purifiée, ainsi que de l'ADN de sperme de saumon (ADN non spécifique, Sigma) sont dilués dans le tampon EMSA dont la composition est : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM ; NaCl 100 mM ; EDTA 1 mM ; glycérol 5 % ; BSA 50 µg/ml ; pH 7,5. Le mélange est incubé à 30°C pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel acrylamide/bisacrylamide non dénaturant de 4,5%. La migration du gel s'effectue dans un tampon

TBE (Tris 9 mM, acide borique 90 mM, EDTA 2 mM) sur le séquenceur automatique Alf Express. La migration se déroule à puissance constante (10W, 800V et 45 mA) pendant 180 minutes. Les résultats sont analysés grâce au logiciel Fragment Manager (Amersham Pharmacia Biotech).

Le retard de migration d'une sonde ADN fluorescente par fixation d'une protéine peut également être analysé sur gel agarose 1%. La protéine liant l'ADN purifiée est incubée avec la sonde d'ADN dans du tampon EMSA. De l'ADN non spécifique de sperme de saumon (Sigma-Aldrich) est également ajouté au mélange. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1% préparé avec du tampon TA (Tris acétate 40mM). Après une migration à 90 V pendant 30-45 minutes, le gel est révélé au Typhoon Trio+ (GE Healthcare) par excitation du fluorophore Cy5 à 633nm.

#### 4.14. Test d'autolyse cellulaire

Afin de déterminer le profil d'autolyse d'une souche de *Bacillus*, une préculture de 3 ml en milieu LB est placée pour la nuit à 37°C. Elle est ensuite diluée 100 fois dans un volume de 100 ml du même milieu. La culture est incubée à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité optique de 0,6-0,7. Elle est alors placée sur glace puis centrifugée à 7000g pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées 3 fois avec une solution de NaCl 0,9 g/L puis resuspendues dans 20 ml de tampon phosphate 100 mM pH 7 et incubée à 37°C avec une légère agitation. La lyse est ensuite analysée en mesurant l'absorbance à 575 nm toutes les 5 à 10 minutes pendant 100 minutes.

#### 4.15. Préparation de peptidoglycane de *B. licheniformis* purifié

Une préculture de *B. licheniformis* 749I de 20 ml en milieu LB est incubée à 37°C pendant une nuit. 10 ml de préculture sont ensuite ajoutés à 1 litre de milieu BH. La culture est placée à 37°C jusqu'à obtenir une  $A^{600}$  égale à 1 et est ensuite centrifugée 10 minutes à 4°C à 6000 g. Le culot comprenant les cellules est resuspendu dans 20 ml d'eau mQ froide. Ensuite, la suspension bactérienne est ajoutée goutte à goutte et sous agitation à 20 ml d'une solution SDS 8% bouillante. Après avoir laissé la solution obtenue bouillir pendant 1 h sous agitation, une nouvelle centrifugation est réalisée (20 minutes à 39000g). Le culot est lavé 5 à 10 fois avec 20 ml d'eau mQ froide jusqu'à l'élimination totale du SDS (ultracentrifugation de 60 minutes à 100000 g). Le culot est ensuite resuspendu dans 20 ml de tampon phosphate 20 mM pH 6,9 NaCl 7 mM auxquels sont ajoutés 200 µg/ml d' $\alpha$ -amylase. Après une incubation de 2 à 3 h à 20°C, la solution est centrifugée (60 minutes à 100000 g). Le culot obtenu est resuspendu dans 20 ml de tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 auxquels sont ajoutés 200 µg/ml de Trypsine. Cette solution est incubée à 25°C pendant une nuit et est ensuite centrifugée (60 minutes à 100000 g). Le culot est resuspendu dans 20 ml de tampon Tris 100 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 10 mM auxquels sont ajoutés 500 µg/ml de Pronase. La solution obtenue est incubée à 40°C pendant 2 à 3 h. Ensuite, la solution est à nouveau centrifugée (60 minutes à 100000 g). Le culot est lavé 2 fois à l'eau mQ froide, une fois avec 20 ml d'une solution de LiCl 8M et, à nouveau, une fois avec 20 ml d'eau mQ. Finalement, le culot est resuspendu dans 5 ml d'eau mQ, congelé à -70°C et lyophilisé.



#### 4.16. Test de fixation d'une protéine sur du peptidoglycane purifié de *Bacillus*

Dans un volume total de 500 µl d'eau, 20 µg de protéine purifiée sont incubés en présence de 3 mg de peptidoglycane de *Bacillus* pendant 10 minutes sur glace. Le surnageant est récupéré par centrifugation (10 minutes à 13000 g). Le peptidoglycane est alors lavé avec 1 ml d'H<sub>2</sub>O. Le surnageant est récupéré par centrifugation et mélangé avec les 500 µl de surnageant de départ (= échantillon 1). Le peptidoglycane est ensuite incubé en présence de 500 µl d'une solution NaCl 5 M pendant 10 minutes sur glace. Le surnageant est récupéré par centrifugation. Un second lavage avec 1 ml de solution saline est réalisé. Le surnageant est alors récupéré et mélangé avec les 500 µl du premier lavage (= échantillon 2). Le peptidoglycane est ensuite incubé dans 500 µl d'une solution SDS 2 %. La solution est mise dans un bain marie en ébullition pendant 5 minutes. Cette étape est reproduite une seconde fois avec 1 ml de solution SDS 2 %. Les surnageants sont mélangés (= échantillon 3). Le peptidoglycane est remis en suspension dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7 et est dialysé contre 1 l de ce même tampon pendant une nuit à 4°C. L'échantillon est récupéré puis est ajusté à 1,5 ml avec le tampon phosphate avant d'être additionné de 4 µg de mutanolysine. La digestion est réalisée pendant 3h à 37°C. Pour compléter la dégradation du peptidoglycane, une sonication (2 fois 20 sec) est réalisée (= échantillon 4). Un volume de 300 µl de chaque échantillon est dialysé contre 1 l d'eau puis est lyophilisé avant d'être resuspendu dans 30 µl d'eau. Enfin, les échantillons sont analysés par SDS-PAGE.

#### 4.17. Etude de l'activité de Yoch par zymogramme

Afin de déterminer si une protéine est capable de digérer le peptidoglycane de *Bacillus*, elle est déposée sur un gel SDS-PAGE 12% dont le gel de séparation est additionné de 0,05 % de peptidoglycane. Après la migration électrophorétique, le gel est placé pendant 30 minutes dans de l'eau mQ puis 30 minutes dans une solution de renaturation (Tris-HCl 25 mM pH7,5 ; 0,1 % triton x-100 ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM) à température ambiante. Ensuite, le gel est incubé 16 h à 37°C dans une solution de renaturation fraîche. Le gel est ensuite rincé à l'eau et coloré pendant 3h dans une solution de coloration (bleu de méthylène 0,1 % ; KOH 0,01 %). Finalement, le gel est décoloré à l'eau mQ jusqu'à apparition des zones décolorées correspondant à une digestion du peptidoglycane.

#### 4.18. Analyse par HPLC de la dégradation du peptidoglycane

Afin de tester l'activité autolytique de Yoch, 200 µl de peptidoglycane solubilisé dans de l'eau mQ (11 mg/ml) sont ajoutés à 25 µl de tampon phosphate 200 mM pH 6,8 et 25 µl de protéine (50 µg/ml). Ce mélange réactionnel est placé à 37°C sous agitation pendant une nuit. Ensuite, le peptidoglycane non digéré est éliminé par centrifugation (1 minute à 14000g) et le surnageant est filtré (filtre 0,22 µm). Ensuite, chaque échantillon est analysé par HPLC sur une colonne Nucléosil 100-3 C18 (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée par du tampon C (tampon C = H<sub>2</sub>O mQ, 0,1 % TFA). Le débit utilisé tout au long du processus chromatographique est de 0,5 ml/minute. L'éluion est réalisée par un gradient de 0 à 30 % en tampon D (tampon D = acétonitrile 60 %, TFA 0,035 %) en 100 minutes puis un deuxième gradient de 30 à 100 % en tampon D en 20 minutes et enfin un plateau à 100 % en tampon D pendant 10 minutes. Ensuite, la concentration en tampon D retombe à



0 % en 5 minutes et reste stable pendant 5 minutes. L'ensemble du processus chromatographique est suivi par mesure d'absorbance à 210 nm.

#### 4.19. Outils bioinformatiques

Les oligonucléotides sont choisis grâce au programme **Vecteur NTI** (Invitrogen) qui permet d'évaluer différents paramètres tels que la formation de structures secondaires ou la température de fusion. Ce programme est également utilisé pour construire graphiquement des plasmides.

L'alignement de séquences nucléotidiques ou peptidiques peut être réalisé à l'aide du programme **Multalin** disponible sur le site internet de l'INRA à l'adresse : <http://www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

Le site internet du **NCBI** (National Center for Biotechnology Information ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) donne l'accès à différentes banques de données génomiques et protéomiques. Il propose également le programme **Blastp** qui permet la comparaison d'une séquence peptidique avec les séquences peptidiques des banques de données.

De nombreux outils permettant l'analyse de séquences génomiques et protéiques sont également disponibles sur le site de **BCM Search Launcher** (The Baylor College of Medicine Search Launcher) dont l'adresse est <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> ainsi que sur le site <http://www.expasy.org/> qui est le serveur protéomique **Expasy** de l'Institut suisse de bioinformatique (SIB).

#### 4.20. PREDetector

PREDetector est un programme informatique qui permet l'identification de séquences similaires à celles reconnues, et déjà validées expérimentalement, par une protéine liant l'ADN sur base de la méthode des matrices de scores. Ainsi, il convertit un alignement multiple de séquences *cis* en matrices de scores via la formule de Hertz et Stormo (Hertz & Stormo, 1999) :

$$weight_{i,j} = \ln \left\{ \frac{[(n_{i,j} + p_i)/(N + 1)]}{p_i} \right\} \sim \ln \left( \frac{f_{i,j}}{p_i} \right)$$

**N** est le nombre total de séquences alignées, **p<sub>i</sub>** est l'« a priori », c'est-à-dire la fréquence d'apparition du nucléotide **i** dans le génome dans lequel la recherche de séquences similaires à la séquence consensus va être effectuée, et **f<sub>i,j</sub> = n<sub>i,j</sub>/N** est la fréquence d'apparition du nucléotide **i** en position **j**. Le score d'un nucléotide **i** en position **j** de l'alignement est positif, nul ou négatif selon que sa fréquence d'apparition à cette position est plus grande, égale ou plus petite que l'« a priori » de ce nucléotide (**ln f<sub>i,j</sub>/p<sub>i</sub>**).

A l'aide de la matrice créée, PREDetector scanne la région génomique souhaitée et attribue un score aux séquences cibles potentielles identifiées. Le score attribué à une séquence similaire à la séquence consensus est la somme des scores de chaque nucléotide qui la compose. Le programme détermine également la position de chaque séquence *cis* par rapport au codon d'initiation de leurs

gènes respectifs et stipule le nom de ces gènes, leurs fonctions, ainsi que les gènes potentiellement co-transcripts. Les résultats de la prédiction sont classés en fonction de leur localisation dans le génome, c'est-à-dire dans une région codante (« coding region ») ou dans une région intergénique, celle-ci étant divisée en région régulatrice (« regulatory region », où les éléments régulateurs sont les plus susceptibles d'être trouvés), en région amont (« upstream region », située en amont d'un codon *start* mais au-delà de la région régulatrice) et en région terminatrice (« terminator region », c'est-à-dire la région définie comme comprise entre deux codons *stop*).

PREDetector scanne les génomes dans les deux sens de lecture (forward et reverse). Les données brutes issues de cette recherche comportent donc parfois des doublons, c'est-à-dire une même séquence ayant des scores différents selon le sens de sa lecture. Dans ce cas, lors de notre analyse, nous avons conservé la séquence de score le plus élevé. Le programme détermine également la position de chaque séquence *cis* par rapport au codon d'initiation de leurs gènes respectifs et stipule le nom de ces gènes, leurs fonctions, ainsi que les gènes potentiellement co-transcripts.