

INRS – Institut Armand Frappier

Étude des deux gènes de la famille Nramp
chez *Dictyostelium discoideum*.

Par
Laetitia Cortes

Mémoire
pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Éric Déziel, INRS-IAF

Examineur externe

Martin Olivier, McGill University

Directeur de recherche

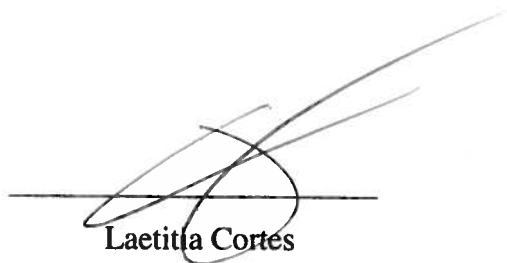
Mathieu Cellier, INRS-IAF

RÉSUMÉ

Les protéines de la famille Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) sont des transporteurs de cations divalents et de protons de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme. Des membres de la famille Nramp ont été caractérisés chez des eucaryotes et des procaryotes, où ils sont appelés MntH (transporteur de manganèse dépendant du proton). Des analyses phylogénétiques suggèrent que cette famille a émergé chez les procaryotes où ces transporteurs participent à l'homéostasie de certains cations divalents et peut-être à la virulence de certains pathogènes. Un gène *mntH* aurait été transféré au noyau eucaryote lors de l'endosymbiose à l'origine des mitochondries pour donner le gène eucaryote *Nramp* ancestral, dont la duplication aurait conduit à la divergence d'un Nramp «prototypé» (proche du gène bactérien) et d'un «archétype» (présent uniquement chez les eucaryotes). L'archétype a persisté et a été dupliqué chez les vertébrés mais on trouve plusieurs copies de prototypes chez les levures, des mousses et certains organismes unicellulaires. L'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* possède un archétype (*DdNR2*) et un prototype (*DdNR1*), et représente un modèle de phagocyte ancestral. L'archétype Nramp étant associé au transport permettant d'évacuer certains cations du phagosome suite à un repas phagocytaire, on peut se demander si cette spécialisation résulte de la duplication/divergence du gène *Nramp* ancestral. Notre étude visait donc à déterminer le rôle physiologique des homologues Nramp de *D. discoideum* et vérifier l'hypothèse leur association à la membrane du phagosome.

L'approche a consisté en plusieurs volets, que nous souhaitons appliquer à chacun des deux gènes. Toutefois, devant les difficultés techniques, nous nous sommes concentrés sur l'étude du prototype *DdNR1*. Le premier volet visait à cloner et exprimer une version écourtée de *DdNR1* dans *E. coli*, mais aucune expression n'a pu y être détectée dans les conditions testées. Le deuxième volet avait pour but de sous cloner les versions écourtée et pleine longueur de *DdNR1* pour expression future dans Dicty. En troisième objectif, nous voulions inactiver chez *D. discoideum* chacun des gènes *Nramp* par double recombinaison homologue pour déterminer le phénotype associé, puis compléter la mutation en y restaurant une copie fonctionnelle. Une construction pour

inactiver le gène *DdNR1* a été créée contenant une cassette de résistance à la blasticidine, puis introduite par électroporation dans *D. discoideum*. Plusieurs clones résistants ont été obtenus, mais une copie du gène sauvage a pu y être détectée par Southern blot. En parallèle, un antisérum spécifique de lapin ayant été produit et vérifié dans le laboratoire contre la partie N-terminale de DdNR1, nous avons pu l'utiliser pour déterminer son (ses) site(s) d'expression chez *D. discoideum* par immunofluorescence indirecte *in situ*. Les résultats préliminaires suggèrent qu'elle serait localisée à la membrane plasmique.



Laetitia Cortés



Mathieu Cellier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, le Docteur Mathieu Cellier, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et offert un sujet représentant un si grand défi. Je le remercie également pour ses conseils et la rigueur qu'il m'a demandée.

Je remercie aussi les bailleurs de fonds, CRSNG et IRSC, qui ont permis la réalisation de ce projet.

Je remercie également nos collaborateurs de l'Université Concordia, le Docteur Adrian Tsang, et son étudiante Kimchi Doquang, pour leurs conseils, l'accueil dans leur laboratoire qui a permis de réaliser quelques expériences sur *D. discoideum* et les souches et plasmides qu'ils nous ont fournis.

Un merci particulier à Louise Wilson, la technicienne de notre laboratoire, pour son soutien, tous ses conseils, techniques ou non, le développement de l'anticorps, toute l'aide qu'elle a apportée à ce projet et sa patience envers Dicty. Nos derniers mois de collaboration rapprochée m'ont permis d'en apprendre beaucoup.

Merci aussi à Pascal Courville pour son expertise sur les différentes protéines de la famille Nramp, la réalisation des tests de diffusion des métaux, et de marquage métabolique.

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, Carole Campion, Evelyn Castillo, Roman Chaloupka, Étienne Richer et Frédéric Veyrier, pour leur amitié et la solidarité qu'ils ont participé à créer, surtout lors des moments difficiles.

Je remercie aussi l'INRS-IAF, ses professeurs, étudiants, techniciens, et tout le personnel en général pour m'avoir permis de mettre entièrement à profit ces années de Maîtrise.

Je remercie enfin mon mari, Guillaume Giraudon, pour sa patience et son soutien lors des moments difficiles; ma famille, mes parents et ma sœur, Élodie, qui malgré la distance géographique, ont su rester proches.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 Relations hôte-pathogène / Infections intracellulaires	5
2.1.1 Généralités	5
2.1.2 Rôle du macrophage	6
2.1.3 Pathogènes intracellulaires.....	7
2.1.3.1 Évasion du phagosome	8
2.1.3.2 Empêchement de la fusion phagosome-lysosome	9
2.1.3.2.1 <i>Legionella pneumophila</i>	9
2.1.3.2.2 <i>Salmonella typhimurium</i>	9
2.1.3.2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.1.3.3 Survie à l'intérieur du phagolysosome.....	10
2.2 Importance des métaux pour la survie des pathogènes intracellulaires	12
2.2.1 Le fer	12
2.2.2 Le manganèse.....	13
2.3 Nramp	14
2.3.1 Historique.....	14
2.3.2 Expression / Fonction	15
2.3.3 Nramp chez les autres organismes / MntH	18
2.3.4 Évolution.....	19
2.4 <i>Dictyostelium discoideum</i>	23
2.4.1 Généralités	23

2.4.2	Génome et protéome	26
2.4.3	Modèle de phagocyte	27
2.4.4	Dans ce projet / Hypothèse de travail	28
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	30
3.1	Analyse informatique	33
3.2	Matériel courant utilisé	38
3.3	Biologie moléculaire	38
3.3.1	PCR	38
3.3.1.1	Amorces	38
3.3.1.2	Mélange réactionnel et paramètres de PCR	40
3.3.2	Précipitation d'ADN	43
3.3.3	Électrophorèse	43
3.3.3.1	Paramètres suivis	43
3.3.3.2	Visualisation au bromure d'éthidium	44
3.3.3.3	Révélation aux UV	44
3.3.4	Digestions et autres traitements enzymatiques	44
3.3.5	Ligation	45
3.3.6	Extractions de plasmides (Mini- ou Maxi-prep)	46
3.3.6.1	Miniprep manuelle	46
3.3.6.2	Miniprep Qiagen	47
3.3.6.3	Maxiprep Qiagen	48
3.3.7	Extractions d'ADN chez <i>D. discoideum</i>	48
3.3.7.1	Extraction d'ADN génomique avec le kit DNEasy de Qiagen	48
3.3.7.2	Extraction rapide	48
3.3.8	Southern blot	49
3.3.8.1	Préparation des échantillons d'ADN / Migration et traitements du gel d'agarose	49
3.3.8.2	Transfert sur la membrane	50
3.3.8.3	Préparation de la sonde radioactive	51
3.3.8.4	Préhybridation	52
3.3.8.5	Hybridation	52

3.3.8.6	Lavages	53
3.3.8.7	Exposition / révélation	53
3.4	Cultures et techniques de transformations	54
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	54
3.4.1.1	Souches et milieux de culture	54
3.4.1.2	Préparation de cellules électrocompétentes	54
3.4.1.3	Transformation par électroporation et sélection	55
3.4.2	<i>Klebsiella aerogenes</i>	56
3.4.3	<i>Dictyostelium discoideum</i>	57
3.4.3.1	Souche	57
3.4.3.2	Conservation	57
3.4.3.2.1	DMSO	57
3.4.3.2.2	Grains de silice	58
3.4.3.3	Techniques de culture	59
3.4.3.3.1	Milieu axénique	60
3.4.3.3.2	Milieu SM avec bactéries	62
3.4.3.4	Transformations	64
3.4.3.4.1	Par électroporation	64
3.4.3.4.2	Chimique	65
3.4.3.5	Clonage	67
3.5	Expression chez <i>Escherichia coli</i>	69
3.5.1	Clonage dans le plasmide pBad	69
3.5.2	Expression	72
3.5.2.1	« Disc assay » ou test de diffusion radiale des métaux	72
3.5.2.2	La souche SL93	73
3.5.2.3	Marquage métabolique à la méthionine- ³⁵ S	74
3.6	Création de souches de <i>D. discoideum</i> KO	75
3.6.1	Stratégie	75
3.6.2	Clonage dans pRHI19	75
3.6.2.1	<i>DdNR1</i>	75
3.6.2.2	<i>DdNR2</i>	79

3.6.3	Transformation de <i>D. discoideum</i>	79
3.7	Expression chez <i>D. discoideum</i>	83
3.7.1	Expression inductible : prnrP	83
3.7.1.1	Stratégie de clonage	83
3.7.1.2	Transformation dans <i>D. discoideum</i>	86
3.7.2	Expression constitutive : pDNeo2	87
3.7.2.1	Stratégie	87
3.7.2.2	Transformation dans <i>D. discoideum</i>	90
4.	RÉSULTATS	91
4.1	Étude des séquences des deux protéines	92
4.1.1	Domaines transmembranaires	92
4.1.2	O-glycosylation	92
4.1.3	Évolution	92
4.2	Efficacité de ligation et clonage dans <i>E. coli</i>	102
4.3	Efficacité de transformation et de clonage chez <i>D. discoideum</i>	103
4.4	Expression chez <i>E. coli</i>	107
4.5	Création d'une souche KO pour DdNR1	110
4.6	Surexpression chez <i>D. discoideum</i>	114
4.6.1	Construction d'une souche contenant prnrP-DdNR1	114
4.6.2	Problèmes et solutions lors de la transformation de <i>D. discoideum</i> avec pDNeo2-DdNR1	114
4.7	Vecteurs et souches créés dans ce projet	117
5.	DISCUSSION	118
	Appendice 1	126
	Appendice 2	131
	RÉFÉRENCES	134

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Protéines Nramp de l'hôte et MntH bactérienne lors d'une infection intracellulaire.	16
Figure 2 : Schéma hypothétique de l'évolution de la famille Nramp.	21
Figure 3 : Cycle de vie chez <i>Dictyostelium discoideum</i>	24
Figure 4 : Résumé de la méthodologie proposée pour l'étude des deux gènes <i>Nramp</i> de <i>D. discoideum</i>	32
Figure 5 : Séquence codante du gène <i>DdNR1</i>	34
Figure 6 : Séquence codante du gène <i>DdNR2</i>	36
Figure 7: Stratégie de clonage dans pBad24, vecteur d'expression dans <i>E. coli</i> inducible à l'arabinose.	70
Figure 8 : Stratégie de clonage pour la construction d'un allèle inactif qui sera utilisé pour la création de souches de <i>D. discoideum</i> KO.	76
Figure 9 : Vérification des souches potentiellement KO pour <i>DdNR1</i>	81
Figure 10 : Stratégie de clonage de <i>DdNR1</i> court dans le vecteur prnrP dont l'expression est inducible dans <i>D. discoideum</i> en réponse aux agents endommageant l'ADN.	84
Figure 11 : Stratégie de clonage de <i>DdNR1</i> complet dans le vecteur pDNeo2 permettant une expression constitutive dans <i>D. discoideum</i>	88
Figure 12 : Analyse informatique de <i>DdNR1</i>	94
Figure 13 : Analyse informatique de <i>DdNR2</i>	96
Figure 14 : Alignement à l'aide du logiciel ClustalX (version 1.83) de la séquence des deux protéines de <i>D. discoideum</i> appartenant à la famille Nramp avec les séquences d'autres protéines de la famille (MntH de <i>E. coli</i> , Nramp1 et 2 humaines).	98
Figure 15 : Arbre phylogénétique établi grâce aux logiciels Mega2 et Tree-Puzzle, permettant de positionner les séquences de <i>D. discoideum</i> au sein de la famille Nramp.	100
Figure 16 : Vérification par digestion enzymatique des constructions pour créer les souches KO, puis par PCR et Southern blot des clones de <i>D. discoideum</i> obtenus.	111

Figure 17 : Vérification des vecteurs de surexpression chez <i>D. discoideum</i> et des clones issus de la transformation de <i>D. discoideum</i>	115
Figure 18 : Protéines utilisées pour l'injection au lapin et vérification du sérum produit contre (DdNR1 _{Ac}).	129
Figure 19 : Premiers résultats d'immunofluorescence utilisant le sérum anti-DdNR1 _{Ac} contre des <i>D. discoideum</i> sauvages au repos.	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Ensemble des amorces utilisées pour les PCR durant ce projet.....	39
Tableau 2 : Résumé des PCR effectuées au cours de ce projet.....	41
Tableau 3 : Résumé des différents milieux et techniques de culture de <i>D. discoideum</i> ainsi que leur utilisation.....	60
Table 4 : Efficacité de transformation par électroporation et de clonage chez <i>D. discoideum</i> selon les paramètres (vecteur, quantité d'ADN, résistance, voltage, capacité,...) et/ou l'électroporateur utilisé.....	104
Tableau 5 : Efficacité de la transformation chimique et de clonage à l'aide de vecteurs de surexpression chez <i>D. discoideum</i>	106
Tableau 6 : Évaluation de la toxicité de l'expression de DdNR1 chez <i>E. coli</i>	107
Tableau 7 : Évaluation de l'activité fonctionnelle de DdNR1 chez <i>E. coli</i>	108
Tableau 8 : Récapitulatif des vecteurs et souches créés au cours de ce projet.	117

LISTE DES ABRÉVIATIONS

(d)ATP : (déoxy) Adénosine Tri Phosphate

BSA : Bovine Serum Albumine

(d)CTP : (déoxy) Cytosine Tri Phosphate

DHFR : DiHydrofolate Reductase

DMSO : Di Méthyl SulfOxide

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

GFP : Green Fluorescent Protein

GST : Glutathione S-Transférase

(d)GTP : (déoxy) Guanosine Tri Phosphate

HL5 : milieu de culture solide ou liquide, pour *D. discoideum*

IPTG : IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside

LB : Luria-Bertani ou Lysogeny Broth (Bertani 2004), milieu de culture pour bactéries

Me²⁺ : métaux divalents

(d)NTP : (déoxy) Nucléoside Tri Phosphate

OLB : Oligo Labelling Buffer

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PVDF : Polyvinylidene fluoride

rpm : revolutions per minute = tours par minute

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SM : milieu de culture solide pour *D. discoideum*

TBE : tampon Tris Borate EDTA

TM : TransMembranaire

(d)TTP : (déoxy) Thymidine Tri Phosphate

UV : Ultra Violet

1. INTRODUCTION

De notre naissance à notre mort, nous sommes constamment exposés à des substances et des microorganismes qui peuvent mettre en péril le bon fonctionnement de notre organisme. Les mécanismes divers et complexes qui servent à combattre ces envahisseurs chez les vertébrés, notamment l'homme, sont mis en œuvre par le système immunitaire, et subdivisés en mécanismes innés ou adaptatifs. Les phagocytes professionnels (granulocytes et macrophages) occupent un rôle particulièrement important dans le système immunitaire inné, surtout en début d'infection. De nombreuses protéines sont impliquées dans ce phénomène, dont *Nramp1* (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1), qui serait précisément impliquée dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires. Cette protéine appartient à une famille conservée, la famille *Nramp*, qui regroupe des transporteurs de cations divalents et de protons de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme. Des membres de la famille *Nramp* ont été caractérisés chez des eucaryotes et des procaryotes, où ils sont appelés *MntH* (transporteur de manganèse dépendant du proton). Or, lors d'une infection, les cations divalents jouant un rôle déterminant pour la survie des pathogènes intracellulaires, il semblerait logique que l'hôte ait développé des outils pour priver ces envahisseurs de l'acquisition de moyens de défense. L'évolution de la famille *Nramp* pourrait en être une illustration puisque, lors d'une infection, après la phagocytose, la protéine *MntH* tenterait de capter les métaux divalents contenus dans le phagosome au profit du microorganisme, et la protéine *Nramp* (*Nramp1* chez l'homme) essaierait au contraire de les évacuer. Or, les analyses phylogénétiques suggèrent que le gène *mntH* aurait été transféré au noyau eucaryote lors de l'endosymbiose à l'origine des mitochondries pour donner le gène eucaryote *Nramp* ancestral, dont la duplication aurait conduit à la divergence d'un *Nramp* «prototype» et d'un «archétype» (présent uniquement chez les eucaryotes). L'archétype se serait à son tour dupliqué pour donner *Nramp1* (impliquée dans la résistance contre les pathogènes intracellulaires) et *Nramp2* impliquée dans l'homéostasie du fer. Il semblerait donc qu'au cours de l'évolution, le gène *mntH* se serait retourné contre son propriétaire original.

Il est par ailleurs intéressant de noter que, puisque l'interaction avec les microorganismes a commencé tôt dans l'évolution, Nramp fait partie de ces défenses communes qui peuvent être retrouvées autant chez les vertébrés que chez certaines amibes, la NADPH oxydase des phagocytes (Phox) en étant un autre exemple. L'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* a ceci de particulier qu'elle possède deux gènes *Nramp*, un archétype (*DdNR2*) et un prototype (*DdNR1*), et représente un modèle de phagocyte ancestral. L'archétype Nramp étant associé au transport permettant d'épuiser certains cations dans le phagosome suite à un repas phagocytaire, on peut se demander si cette spécialisation fonctionnelle résulte de la duplication/divergence du gène *Nramp* ancestral. Le but principal de notre étude visait donc à déterminer le rôle physiologique des homologues Nramp de *D. discoideum* et leur association possible à la membrane du phagosome.

Dans la première partie de ce document, la revue de littérature nécessaire à la mise en perspective de notre sujet est présentée, en traitant en particulier de l'importance de Nramp1 au cours de la maturation du phagosome, et en présentant l'évolution présumée des protéines de la famille Nramp. La deuxième section résume l'ensemble des techniques et du matériel nécessaires pour répondre à notre hypothèse, suivie des résultats découlant de leur utilisation. Enfin, une discussion vient approfondir l'analyse des résultats obtenus et proposer des perspectives à ce travail.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Relations hôte-pathogène / Infections intracellulaires

2.1.1 Généralités

Pour faire face à la menace permanente que sont certains microorganismes, un ensemble de mécanismes divers et complexes servant à combattre ces envahisseurs est retrouvé entre autres chez les vertébrés, notamment l'homme, et a été dénommé système immunitaire. Une lutte incessante pour la survie a donc lieu entre l'hôte et les pathogènes. Ces derniers peuvent être extracellulaires (leur pathogénicité n'est pas liée à leur capacité à envahir les cellules) ou intracellulaires. En effet, un pathogène peut soit trouver un avantage à se répliquer dans une cellule (pour échapper au système immunitaire par exemple ((Goldsby 2000), p.42-44), soit être obligé de se répliquer à l'intérieur d'une cellule parce que son cycle de vie l'y oblige (ex. : *Plasmodium falciparum*) ou parce qu'il ne possède pas la machinerie nécessaire (ex. : les virus).

Un pathogène peut utiliser plusieurs voies pour entrer dans son hôte : soit par les voies naturelles (respiratoires, digestives...) soit par une blessure ((Goldsby 2000), p.42-44). Ensuite, survient l'infection qui passe par quatre étapes essentielles : l'attachement aux cellules de l'hôte, la prolifération, l'invasion des tissus de l'hôte et les dommages induits aux cellules de l'hôte ((Goldsby 2000), p.432-437). Les défenses de l'hôte interviennent à chaque étape de l'infection. Le succès de cette dernière est directement lié à deux facteurs, la taille de l'inoculum et/ou la virulence du pathogène. Si ces derniers sont faibles, les pathogènes seront rapidement détruits par un des premiers remparts servant à lutter contre les infections, le macrophage, aidé ou non par l'opsonisation par le complément et/ou des anticorps dirigés contre la particule infectante. S'ils sont élevés, une succession de réactions plus complexes va commencer, avec souvent comme point de départ le macrophage ((Goldsby 2000), p.432-437), même s'il n'est pas le seul à pouvoir le faire. Le macrophage a donc un rôle clé dans le système immunitaire, surtout au début de l'infection.

2.1.2 Rôle du macrophage

Les macrophages résident dans les tissus périphériques, aux alentours des épithélia et des vaisseaux. Ils sont attirés sur le lieu d'une infection par chimiotactisme ((Abbas 2000) p. 279-283). La phagocytose est une fonction-clé de leur activité antimicrobienne. Rapidement, le macrophage adhère au pathogène ce qui peut induire, par exemple, la formation de pseudopodes qui vont entourer la particule à phagocyter. Ces réarrangements de membrane se font grâce au cytosquelette, sous la régulation de plusieurs protéines G notamment ((Abbas 2000), p.279-283). La particule finit par être enfermée dans une vacuole appelée phagosome, qui va ensuite entrer dans la voie de maturation endocytaire, où il va notamment fusionner avec les lysosomes. C'est durant ces étapes que doivent normalement être tués et dégradés les pathogènes.

L'activité antimicrobienne et la cytotoxicité des macrophages proviennent de deux grandes catégories de mécanismes : ceux dépendant de l'oxygène et ceux qui en sont indépendants. Les mécanismes d'élimination dépendants de l'oxygène se manifestent avec la flambée respiratoire (respiratory burst) qui produit grâce au système de la NADPH oxydase des phagocytes (Phox) et à la synthase d'oxyde nitrique inducible (iNOS) des intermédiaires réactifs de l'oxygène (H_2O_2 , OH^\cdot , etc) et de l'azote (NO , NO_2 ,...), qui sont seuls ou combinés, extrêmement toxiques pour les microorganismes ((Abbas 2000), p.279-283; (Goldsby 2000), p.432-437). Ces derniers possèdent donc plusieurs mécanismes pour y résister, dont certains reposent sur les cations divalents, qui agissent soit directement en détoxifiant ces radicaux (Jakubovics et Jenkinson 2001), soit comme cofacteurs d'enzymes assurant ce même rôle (Tsolis *et al.* 1995). Le captage de ces cations leur est donc essentiel. À l'opposé, se trouve sur la membrane du macrophage la protéine Nramp1 chargée d'appauvrir la vacuole de phagocytose en cations divalents. Mais, Nramp1 induit aussi l'expression de Phox et iNOS. Bien que de nombreux travaux aient déjà donné une indication claire quant au rôle antimicrobien direct de Nramp1 (Abel *et al.* 1998; Forbes et Gros 2001; Hoal *et al.* 2004), des travaux récents viennent de confirmer cette hypothèse, en particulier dans les étapes précoces d'une infection. Toutefois, iNOS se révèle indispensable dans le contrôle plus tardif d'une infection par

certains microorganismes (*Leishmania donovani*), ou dans certains organes de l'hôte (le foie par exemple) (White *et al.* 2005).

Après environ trois heures, c'est au tour des mécanismes d'élimination indépendants de l'oxygène d'entrer en jeu (Tsolis *et al.* 1995). Ils reposent quant à eux principalement sur les enzymes (ex : le lysozyme) et autres peptides cytotoxiques (ex : les défensines) contenus dans le lysosome qui vient fusionner avec le phagosome ((Abbas 2000), p.279-283; (Goldsby 2000), p.432-437). Toutefois, les pathogènes intracellulaires possèdent tout un arsenal de dispositifs de résistance contre ces mécanismes d'élimination. Une fois dégradés, les déchets produits peuvent soit entrer en interaction avec le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II pour ensuite être présentés aux autres cellules du système immunitaire, soit être rejetés du macrophage par exocytose ((Goldsby 2000), p.432-437).

2.1.3 Pathogènes intracellulaires

La plupart des microorganismes qui entrent dans un hôte subissent le traitement décrit ci-dessus. Toutefois, les pathogènes essaient d'échapper au système immunitaire et en particulier à la phagocytose puisque il s'agit d'une étape carrefour en début d'infection. Certains essaient tout simplement d'empêcher la phagocytose, comme la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (dont la capsule riche en polysaccharides est très efficace à accomplir cette tâche, surtout lors de réinfection) ou encore certains staphylocoques pathogènes (qui grâce à leur coagulase sont capables de se constituer un manteau de fibrine bloquant la phagocytose) ((Goldsby 2000), p.432-437). D'autres ont développé des systèmes qui leur permettent de survivre dans, voire d'échapper au phagosome. Évidemment, pour que l'infection soit un succès, le pathogène doit également être capable de se répliquer à l'intérieur du macrophage.

2.1.3.1 Évasion du phagosome

Une première stratégie consiste à dissoudre la vacuole de phagocytose, permettant ainsi l'accès au cytoplasme, riche en nutriments et beaucoup moins bien équipé pour la destruction de pathogènes. Elle est utilisée par des bactéries comme *Rickettsia prowazekii* ou *Listeria monocytogenes*. Cette dernière a un mécanisme d'invasion actif, grâce à des protéines de surface nommées les internalines (A ou B par exemple) qui réagissent avec des protéines de l'hôte. Pour l'internaline A, il s'agit de l'E-cadhérine. Pour l'internaline B, deux récepteurs sont impliqués : gC1q-R (le récepteur naturel de C1q, premier composant de la cascade du complément) et Met (un récepteur transmembranaire, contenant un domaine tyrosine kinase cytoplasmique) (Machner *et al.* 2003). Après infection, sa stratégie est de s'évader du phagosome pour aller se répliquer dans le cytoplasme. Pour cela, elle dégrade au moyen d'enzymes activées par l'acidité croissante du milieu (ex : la listériolysine O ou certaines phospholipases C), la vacuole dans laquelle elle se trouve. La listériolysine O forme des pores (Repp *et al.* 2002) dans la membrane de la vacuole dans laquelle se trouve la bactérie, permettant le transfert d'électrolytes entre le cytoplasme et la vacuole, mais trop petits toutefois pour rendre une évasion possible. La phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol (PI-PLC) est quant à elle impliquée dans l'activation d'une cascade induite par une protéine kinase C (PKC) de l'hôte qui promouvrait l'évasion du phagosome (Poussin et Goldfine 2005). Elle se déplace ensuite au sein du cytoplasme et entre les cellules de l'hôte, en détournant des éléments du cytosquelette de ce dernier. Elle utilise pour cela une de ses protéines de surface, ActA, qui permet une forte polymérisation d'actine autour de la bactérie, créant ainsi l'allure typique de comète (Finlay et Falkow 1997).

Concernant *R. prowazekii*, cette bactérie est également capable de s'évader du phagosome. Un certain nombre de ses gènes (*tlyA*, *tlyC*, *pat1*, et *pld*) étaient soupçonnés de promouvoir une activité membranolytique. Une étude récente a en fait démontré que seuls les produits des gènes *tlyC* et *pld* possèdent réellement cette propriété. En effet, l'expression de ces gènes de *R. prowazekii* dans *Salmonella enterica* serovar Typhimurium rendait cette dernière capable de s'évader du phagosome, alors qu'elle en est normalement incapable (Whitworth *et al.* 2005).

2.1.3.2 Empêchement de la fusion phagosome-lysosome

2.1.3.2.1 *Legionella pneumophila*

Cette bactérie intracellulaire facultative se trouve à l'intérieur d'un phagosome qui reste attaché à la membrane plasmique dans les cellules qu'elle infecte. Tous les phénomènes induits par la bactérie, le sont grâce entre autres aux gènes *dot / icm* et à un système de sécrétion extracellulaire très riche et très efficace (Cossart 2000; Molmeret *et al.* 2004). La vacuole contenant la bactérie, appelée « phagosome répliatif », beaucoup moins acide qu'un phagosome classique, ne fusionnera pas avec le lysosome mais s'associera avec des mitochondries et le réticulum endoplasmique, entre autres (Finlay et Falkow 1997; Clemens *et al.* 2000; Cossart 2000; Tilney *et al.* 2001). Ces caractéristiques étant similaires à l'autophagie, cette bactérie semble donc en détourner la machinerie (Finlay et Falkow 1997), et réguler de manière très serrée l'apoptose du macrophage dans lequel elle se trouve. En effet, cette bactérie entraîne grâce au système *dot / icm*, l'activation de la caspase 3 de l'hôte. Cette caspase, qui est par exemple exprimée lors de l'ajout d'agents induisant l'apoptose, ne conduit pas à l'apoptose du macrophage lorsqu'elle est induite par *Legionella*. Ce n'est que lorsque cette bactérie a fini sa réplication au sein du macrophage que ce dernier commence sa mort par apoptose (Abu-Zant *et al.* 2005).). Une remarque intéressante dans le contexte de ce travail est que cette bactérie survit dans le sol en infectant des amibes ((Finlay et Falkow 1997; Cossart 2000), p.6).

2.1.3.2.2 *Salmonella typhimurium*

Cette bactérie est internalisée par les macrophages, peut-être selon différentes voies (Finlay et Falkow 1997). Sa survie intracellulaire est déterminée par les gènes situés dans l'îlot de pathogénicité 2 (SPI2) entre autres, qui codent pour un système de sécrétion et de nombreux effecteurs. Le pH faible du phagosome favoriserait la réplication de la bactérie ((Cossart 2000), p.10), en activant certains gènes (Finlay et Falkow 1997). Suite à l'entrée dans la cellule hôte, un « phagosome spacieux » (spacious phagosome) se forme et il semble nécessaire à la survie de la bactérie (Finlay et Falkow

1997; Cossart 2000). Cette dernière induit la transformation de cette vacuole initiale en SCV (*Salmonella* Containing Vacuole), en procédant notamment à un tri des molécules de l'hôte qui vont s'y retrouver en surface, et en la déconnectant de la voie endocyttaire (Finlay et Falkow 1997). De plus, l'entrée dans la cellule (et non la réplication) a la capacité d'induire l'apoptose chez les macrophages, phénomène variable selon le degré d'activation de ceux-ci. Un des mécanismes qui permettrait la survie serait le pompage par des transporteurs ABC des peptides antimicrobiens de l'hôte hors de la bactérie. De plus, les mécanismes de réparations de l'ADN, codés par *recA*, *B* ou *C*, sont essentiels à la survie, notamment pour lutter contre la flambée respiratoire (« respiratory burst ») (Finlay et Falkow 1997). Enfin, une remarque intéressante dans notre contexte est que la survie intracellulaire de cette bactérie est inhibée par l'activité de Nramp1 (Cuellar-Mata *et al.* 2002).

2.1.3.2.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Après avoir été phagocytée, cette bactérie reste à l'intérieur de la vacuole dont elle empêche l'acidification en excluant la H⁺-ATPase (principale responsable de l'acidification du phagosome) de la membrane de la vacuole ((Cossart 2000), p.7 (Finlay et Falkow 1997)). Elle empêche la maturation du phagosome, ce qui bloque à son tour la fusion avec le lysosome ((Cossart 2000), p.139). Ainsi, la capacité hydrolytique de la vacuole s'en trouve grandement réduite ((Cossart 2000), p.140-141). De plus, la structure même de la membrane des mycobactéries, riche en lipides (dont les acides mycoliques) mais faible en protéines, favoriserait la résistance à la dégradation par les enzymes de l'hôte, et empêcherait la fusion avec le lysosome ((Cossart 2000), p.140-141).

2.1.3.3 Survie à l'intérieur du phagolysosome

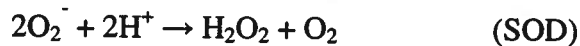
Certains pathogènes, comme *Coxiella burnetii*, semblent posséder des mécanismes qui leur permettent non seulement de survivre mais également de se répliquer dans le phagolysosome, qui peut ici continuer d'interagir avec plusieurs autres compartiments de la voie endocyttaire ((Cossart 2000), p.5). Ces bactéries intracellulaires

obligatoires ont en effet besoin d'un pH faible, comme celui d'un phagosome mature pour stimuler leur croissance et leur réplication ((Cossart 2000), p.5). Une étude récente impliquant une double infection séquentielle, d'abord par *C. burnetii* puis par *L. pneumophila*, de différentes lignées cellulaires (cellules épithéliales simiesques, macrophages murins ou humains, et cellules dendritiques humaines), suggère que même si ces bactéries sont phylogénétiquement proches, elles ne partagent pas les mêmes niches intracellulaires (Sauer *et al.* 2005). D'autre part, il semblerait que cette bactérie utilise ses LPS (lipopolysaccharides) comme rempart pour empêcher la maturation et l'activation des cellules dendritiques de l'hôte, ce qui faciliterait la persistance du pathogène au sein de celui-ci (Shannon *et al.* 2005).

Un autre pathogène, le protozoaire *Leishmania*, survit lui aussi à l'intérieur du phagolysosome, en étant notamment insensible aux hydrolases lysosomales (ex. : les cathepsines) pourtant présentes et fonctionnelles ((Cossart 2000), p.134-135). Comme pour *Coxiella*, cette vacuole est capable de fusionner avec plusieurs autres compartiments de la voie endocytaire, notamment avec les vacuoles d'autophagie, riches en nutriments, caractéristique partagée avec *Legionella* cette fois ((Cossart 2000), p.134-135).

2.2 Importance des métaux pour la survie des pathogènes intracellulaires

Les éléments en traces, tels certains métaux (fer, manganèse, cuivre, etc.), sont nécessaires à la survie de la plupart des organismes. Ils doivent être présents en faible quantité, sinon ils peuvent devenir toxiques, d'où l'importance d'en réguler strictement l'homéostasie. De plus, les métaux jouent un rôle très important pour la survie des pathogènes intracellulaires (Gebran *et al.* 1994; Poyart *et al.* 2001; Boyer *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 2002) lors de l'infection. En effet, pour lutter contre le stress oxydatif imposé dans le phagosome, les pathogènes ont besoin de métaux, notamment comme cofacteurs d'enzymes de détoxification des radicaux oxygénés ou de réparation de l'ADN. Ces enzymes sont, entre autres, les superoxydes dismutases (SOD), les catalases ou les peroxydases (Jakubovics et Jenkinson 2001) qui elles catalysent les réactions :

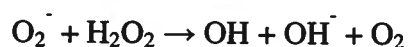


Deux métaux semblent se démarquer dans ces rôles : le fer et le manganèse.

2.2.1 Le fer

En plus des raisons citées ci-dessus, le fer est nécessaire à la chaîne respiratoire, comme cofacteur de certains cytochromes, ou de la cytochrome oxydase (Jakubovics et Jenkinson 2001). Il est donc essentiel pour un pathogène d'être capable de capter efficacement le fer de son environnement. Deux problèmes se posent alors. D'une part, à pH neutre, en milieu oxygéné, le fer est présent en majorité sous forme peu soluble, le Fe^{3+} , mais aussi en quantités moindres sous forme de Fe^{2+} soluble, facilement transportable. D'autre part, il s'agit également d'un nutriment essentiel pour l'hôte qui doit affronter le même problème d'insolubilité et qui a choisi de le résoudre en sécrétant des protéines hautement spécifiques au captage du Fe^{3+} , comme la transferrine ou la lactoferrine. Certaines bactéries pathogènes sont d'ailleurs capables d'entrer en compétition avec l'hôte pour la capture de ces protéines chargées en fer (ex : *Neisseria* (Schryvers et Stojiljkovic 1999)), alors que d'autres préfèrent sécréter leurs propres molécules de capture du fer, les sidérophores (ex : *Salmonella* (Benjamin *et al.* 1985)). Il

y a donc compétition avec l'hôte lors d'une infection (Ferguson et Deisenhofer 2004). Le fer sous forme Fe^{2+} peut aussi être capté, grâce à des systèmes tels SitABCD ou appartenant à la famille Nramp (Jakubovics et Jenkinson 2001). Bien que certaines bactéries, par exemple, possèdent un système efficace de stockage du fer (ferritine, bacterioferritine) (Andrews *et al.* 2003), un excès de fer accumulé peut se révéler dangereux car il catalyse la réaction de Fenton qui a le potentiel d'augmenter la quantité de radicaux oxygénés dans la cellule, en présence d'eau oxygénée, selon la réaction :



2.2.2 Le manganèse

Contrairement au fer, le manganèse est présent dans l'environnement sous une forme soluble, directement transportable, le Mn^{2+} . On lui attribue des rôles biologiques aussi variés que de faciliter la sporulation chez *Bacillus subtilis*, la photosynthèse produisant de l' O_2 chez les cyanobactéries, une étape essentielle dans la glycolyse chez certaines des bactéries Gram + formant des endospores (Chander *et al.* 1998), ou la résistance aux radiations (Daly *et al.* 2004). Dans les dernières années toutefois, l'intérêt pour le manganèse s'est accru de par le rôle de plus en plus évident de celui-ci dans la lutte contre le stress oxydatif (Tsolis *et al.* 1995; Jakubovics et Jenkinson 2001; Boyer *et al.* 2002). En effet, certaines enzymes impliquées dans la détoxification des radicaux oxygénés, comme la MnSOD (Manganese SuperOxide Dismutase = SodA), ou les manganicatalases, nécessitent du manganèse pour être actives (Tsolis *et al.* 1995). De plus, des données expérimentales suggèrent que l'ion Mn^{2+} à lui seul serait capable de désactiver les radicaux oxygénés, selon un mécanisme non élucidé toutefois (Jakubovics et Jenkinson 2001). Ces résultats suggèrent donc que l'acquisition du manganèse chez les organismes pathogènes est essentielle. En effet, il a été remarqué qu'une diminution de la capacité à capter le Mn^{2+} peut être associée à une diminution de la virulence chez certaines bactéries (Jakubovics et Jenkinson 2001; Boyer *et al.* 2002). Les transporteurs impliqués sont des protéines du type transporteur ABC chez les Streptocoques ou *Enterococcus faecalis* (Singh *et al.* 1998) par exemple, ou appartenant à la famille Nramp chez les salmonelles (voir plus bas).

2.3 Nramp

2.3.1 Historique

Il y a près de trente ans (Plant et Glynn 1976), l'observation de souris sensibles aux infections intracellulaires causées par des pathogènes éloignés phylogénétiquement (i.e *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Leishmania*) laissait supposer qu'un facteur de l'hôte était impliqué (Bellamy 1999). Un locus situé sur le chromosome 1, appelé *Ity*, *Lsh* ou *Bcg*, a été délimité par des analyses génétiques, et la protéine Nramp1 (pour Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1) associée a pu être identifiée par clonage positionnel (Bellamy 1999). C'est une protéine à douze segments transmembranaires (TM), exprimée à la surface des phagosomes. Une seule mutation, Gly169Asp, dans le quatrième segment suffit à rendre la protéine instable donc à conférer une sensibilité accrue aux infections intracellulaires (Forbes et Gros 2001). Un homologue de Nramp1 a été découvert chez les humains, exprimé dans les granulocytes, monocytes et macrophages. Le polymorphisme de ce gène et/ou de son promoteur a été associé à une susceptibilité accrue à la tuberculose (Hoal *et al.* 2004) ou à la lèpre (Abel *et al.* 1998; Ferreira *et al.* 2004).

Une protéine Nramp2, démontrant 64 % d'identité en séquence d'acides aminés à Nramp1, a également été découverte (Forbes et Gros 2001). Elle est exprimée de manière ubiquitaire, en particulier à la surface apicale des cellules épithéliales du duodénum. Il s'agit d'un transporteur de fer impliqué dans l'homéostasie du fer qui est indépendant de la transferrine au niveau de l'intestin, et dépendant de celle-ci dans les cellules de l'organisme, incluant les globules rouges (Wang *et al.* 2002). Une mutation dans le gène *Nramp2* conduit à une anémie microcytaire (Bellamy 1999).

2.3.2 Expression / Fonction

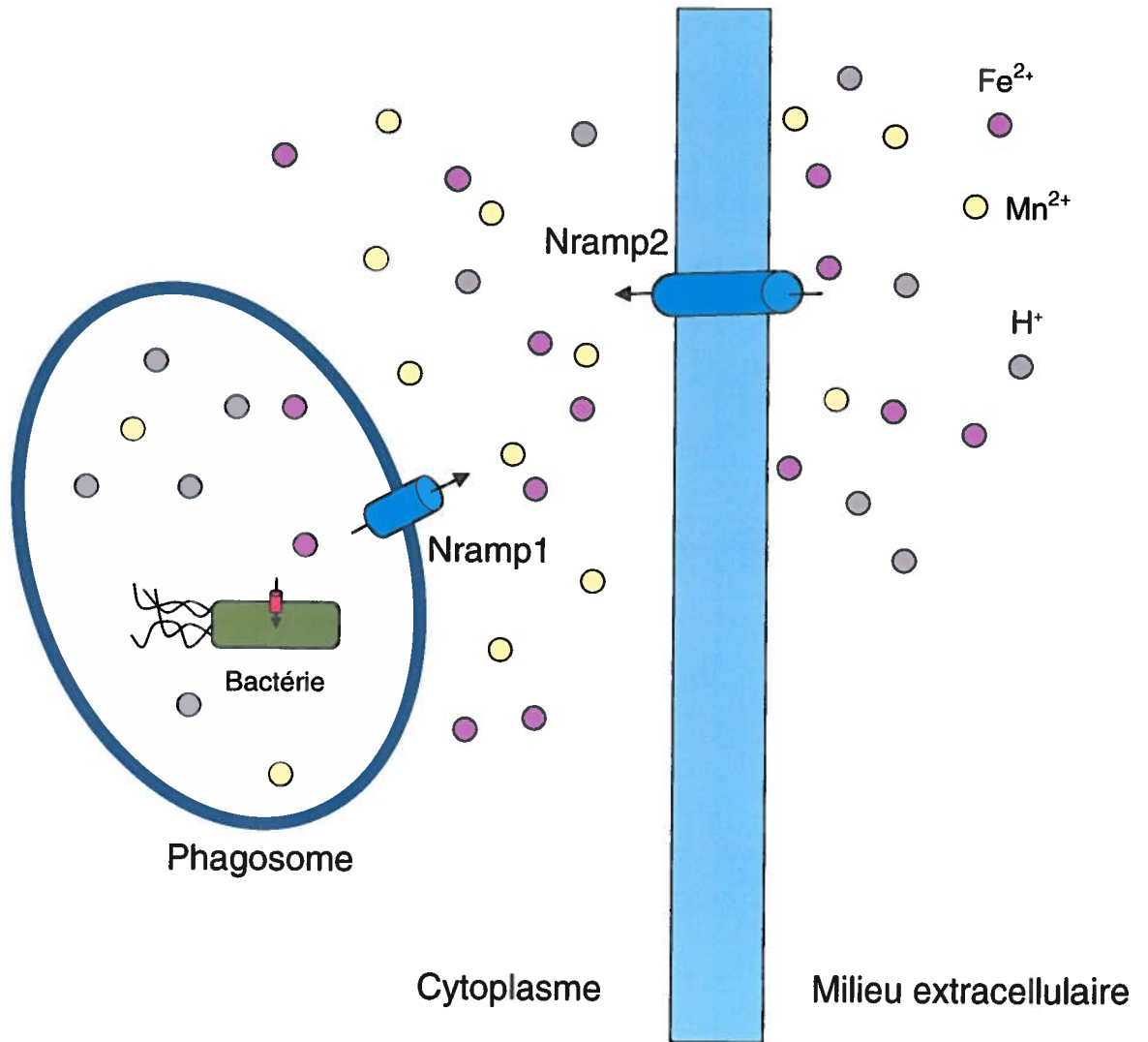
Nramp1 est exprimée dans la lignée myélo-monocytaire (granulocytes et macrophages). Son expression est augmentée par l'inflammation, l'interféron γ , les lipopolysaccharides ou la migration vers le lieu de l'infection. La protéine se trouve à la surface des endosomes tardifs et des lysosomes (colocalisation avec LAMP1). Après la phagocytose, elle est rapidement recrutée au phagosome en cours de maturation (Forbes et Gros 2001).

La fonction de Nramp1 est la lutte contre les microorganismes phagocytés. Elle semblerait également favoriser les propriétés fusogéniques du phagosome, par un mécanisme non élucidé toutefois. Mais quelle est sa fonction biochimique précise ? Pour Nramp2, son expression dans des œufs de *Xenopus laevis* et certaines lignées de cellules de mammifères a montré qu'il s'agissait d'un transporteur de métaux divalents, qui utilise le gradient électrochimique du proton comme source d'énergie pour cotransporter H^+ et métaux. Sa gamme de substrats est large : Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} et Co^{2+} (Forbes et Gros 2001; Forbes et Gros 2003), avec une préférence pour le Fe^{2+} .

Pour Nramp1, les fonctions principales font consensus, à savoir qu'il s'agit vraisemblablement d'un co-transporteur H^+ / Me^{2+} , impliqué dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires. Toutefois, deux théories opposées s'affrontent : soit Nramp1 pompe le Fe^{2+} dans le phagosome pour favoriser la réaction de Fenton et donc la formation de radicaux oxygénés (Zwilling *et al.* 1999), soit elle exporte les cations divalents du phagosome pour priver les pathogènes de nutriments essentiels et de moyens de lutte contre les radicaux oxygénés (Forbes et Gros 2003). L'avantage de cette seconde hypothèse est que Nramp1 conserverait la même orientation dans la membrane que Nramp2, et il y aurait conservation du symport avec le proton plutôt qu'un antiport comme le suggère la première hypothèse (Forbes et Gros 2001). La théorie qui est la plus largement soutenue par les données expérimentales obtenues jusqu'à ce jour, est celle où Nramp1 agirait comme pompe d'efflux du phagosome.

Figure 1 : Protéines Nramp de l'hôte et MntH bactérienne lors d'une infection intracellulaire.

Nramp 2 est exprimée dans la membrane plasmique et dans les endosomes précoces, et est impliquée dans l'homéostasie des métaux divalents, et du fer en particulier. Nramp2 utilise comme énergie la dissipation du gradient électrochimique du proton pour co-transporter les métaux. Nramp 1 est exprimée dans la membrane des lysosomes dans les cellules au repos et est retrouvée, après phagocytose, dans la membrane du phagosome où elle participe à la lutte contre les pathogènes intracellulaires, en les privant des métaux divalents nécessaires à leur survie. MntH, la version bactérienne de Nramp, est exprimée à la membrane plasmique et pourrait fonctionner en compétition avec Nramp1 lors d'une infection intracellulaire pour la capture des métaux divalents.



2.3.3 Nramp chez les autres organismes / MntH

On trouve Nramp des bactéries à l'homme, en passant par les levures (Portnoy *et al.* 2000), les plantes et les mammifères. Ces homologues sont des protéines transmembranaires responsables du transport de métaux divalents, par un mécanisme dépendant du pH, avec un nombre de segments TM variables toutefois. Grâce aux séquençages intensifs des dernières années, des homologues bactériens de Nramp, appelés MntH (H^+ -dependent Manganese Transporter) ont été trouvés chez des Gram + et Gram -, ou encore chez une eubactérie verte sulfureuse (*Cholorobium tepidum*) (Cellier *et al.* 2001; Forbes et Gros 2001). Des analyses plus détaillées semblent démontrer une origine polyphylétique, avec probablement des transferts horizontaux des eucaryotes vers les procaryotes (Cellier *et al.* 2001; Richer *et al.* 2003) (voir plus bas). Ce sont des co-transporteurs de Mn^{2+} et d' H^+ . Ces protéines, selon leur origine, sont également capables de transporter, à des degrés variables, les ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} et Ni^{2+} . L'expression de ces gènes est diminuée par le régulateur Fur mais augmentée par le H_2O_2 ou lors de l'infection intracellulaire (Forbes et Gros 2001).

La capacité à transporter les métaux par MntH a été confirmée par des mutations ponctuelles de quatre acides aminés supposés importants pour le transport. La détermination théorique de ces résidus s'est faite en comparant les protéines de la famille Nramp au groupe de protéines microbiennes le plus proche, appelé « outgroup ». Ces deux familles semblent donc issues d'un ancêtre commun, puisqu'elles possèdent encore des résidus communs. Les acides aminés supposés importants pour le transport ont été définis comme invariants au sein de la famille Nramp mais différents de ceux de l'outgroup, chez qui ils sont également invariants. Ce phénomène laissait donc supposer une spécialisation fonctionnelle. La mutation de chacun de ces résidus chez la protéine MntH de *E. coli* a permis de montrer pour la première fois le co-transport de Me^{2+} et de protons par un homologue bactérien de Nramp (Chaloupka *et al.* 2005).

En résumé, chez les bactéries, l'homologue de Nramp, appelé MntH, importe les métaux divalents, en particulier le Mn^{2+} , de manière dépendante du pH.

2.3.4 Évolution

L'étude de l'évolution de la famille Nramp permet d'améliorer nos connaissances sur la relation structure / fonction dans cette famille et de comprendre le rôle des homologues lors de l'infection et/ou dans l'homéostasie du fer et du manganèse. Elle a fait l'objet de quelques publications, dont trois vont être discutées ici : (Cellier *et al.* 2001; Richer *et al.* 2003; Richer *et al.* 2004).

En se basant sur les études faites sur les membres de la famille Nramp, tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes, des caractéristiques communes ont pu être dégagées. Comme déjà décrit plus haut, il s'agit d'une famille de protéines transmembranaires, responsables du transport de métaux divalents (Me^{2+}), de manière dépendante du pH. D'autres caractères communs ont été remarqués. La partie N-terminale est cytoplasmique, et suivie de 11 à 12 segments TM. Parmi ceux-ci, 10 forment un « core » hydrophobe très conservé, dont certains possèdent un caractère amphiphile, avec des résidus chargés négativement, intervenant sans doute plus ou moins directement dans le transport du H^+ et du Me^{2+} , dans les interactions interhélices ou avec le solvant. Cette conservation des séquences correspondant à une conservation fonctionnelle suggère donc une histoire commune.

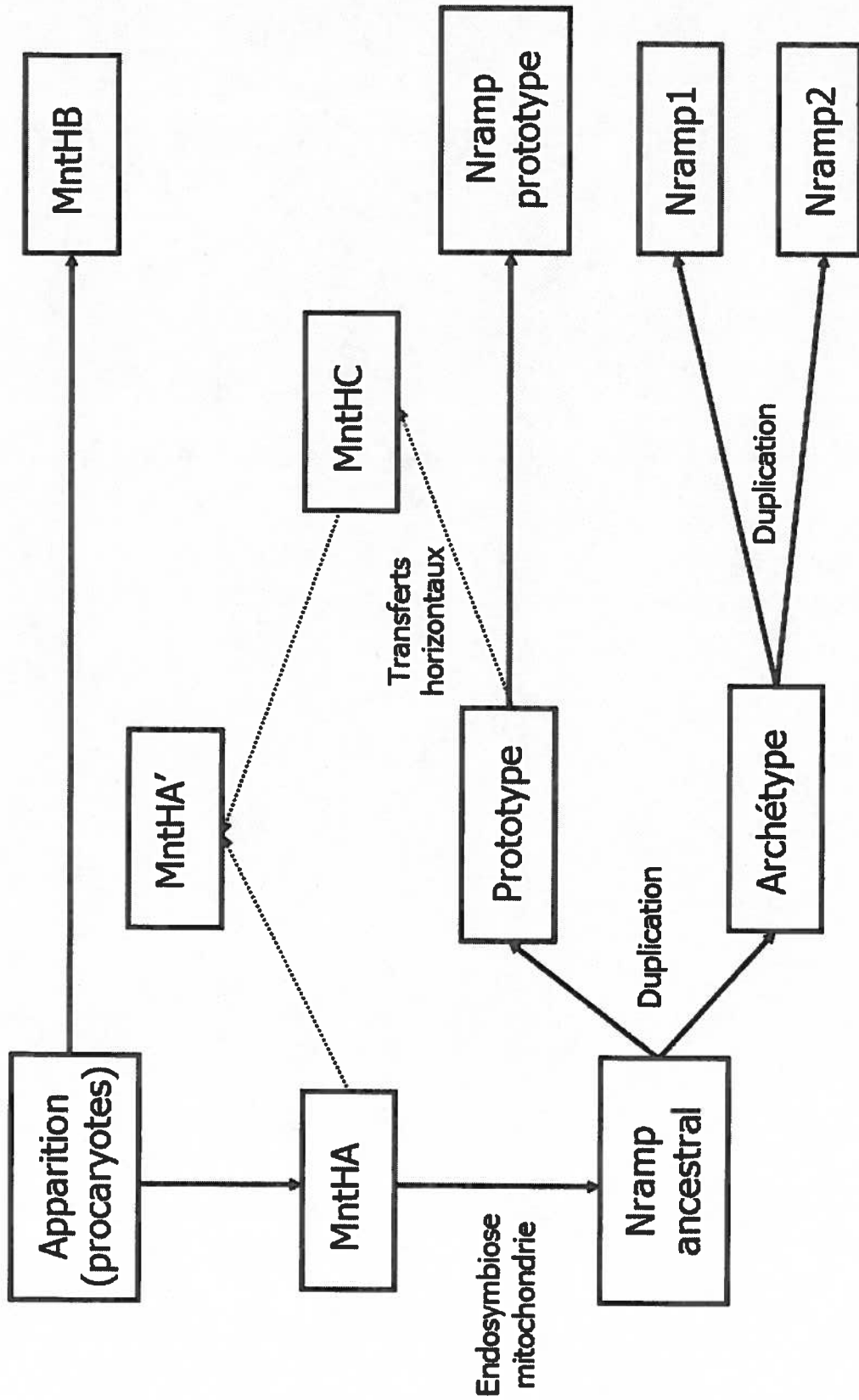
D'abord, l'évolution de la famille Nramp suit majoritairement celle de l'ARN16S, ainsi que le phénomène de spéciation. Des études à partir de logiciels d'analyse de séquences suggèrent que le gène serait apparu chez les procaryotes, évoluant par la suite pour donner MntH. Il aurait également été transmis aux eucaryotes lors de l'endosymbiose qui conduira à la mitochondrie, pour donner naissance à un Nramp ancestral. Ceci expliquerait la grande similitude observée encore aujourd'hui entre MntH et Nramp. Selon leur degré de ressemblance, les protéines MntH peuvent être classées en trois groupes : A, B ou C (ce dernier subdivisé en α , β et γ). MntH B se retrouve chez certaines bactéries anaérobies, plus ou moins éloignées phylogénétiquement, et serait le plus proche de la forme ancestrale. MntH A se retrouve à la fois chez des bactéries Gram + et Gram -, et à cause de sa plus grande similarité de séquence avec celui-ci, semble être à l'origine du Nramp eucaryote. Le groupe MntH C sera discuté plus bas.

Ensuite, le gène aurait continué d'évoluer chez les eucaryotes en se dupliquant. Un indice conduisant à cette hypothèse est que les protéines Nramp se divisent clairement en deux groupes. Le premier groupe, appelé « prototype », se retrouve principalement chez les eucaryotes unicellulaires (ex. : *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlamydomonas reinhardtii*,...), chez une mousse et chez certains insectes (ex. : *Anopheles gambiae*), c'est-à-dire avant la séparation d'avec les plantes ou les vertébrés, respectivement. Ces protéines sont proches entre elles, mais également des protéines bactériennes MntH. Tout porte donc à croire que le prototype dériverait de l'ancêtre commun des protéines Nramp eucaryotes. Il a également été constaté que le groupe bactérien MntH C partageait de grandes similarités avec le prototype Nramp, plus même qu'avec les autres groupes bactériens. Ceci suppose donc des transferts horizontaux des eucaryotes vers les procaryotes. Par opposition au prototype, le deuxième groupe de protéines, appelé « archétype », se retrouve seulement chez les eucaryotes. Ces éléments s'ajoutant aux analyses statistiques du taux de remplacement des acides aminés, amènent à la conclusion que l'archétype et le prototype dérivent d'un ancêtre commun sans doute par duplication de gène. Selon le même principe, il a été constaté qu'une deuxième duplication de gène a eu lieu à partir de l'archétype, conduisant aux protéines Nramp1 et Nramp2, qui diffèrent par leurs localisations cellulaires et le contrôle de leur expression tissulaire, phénomènes illustrés aujourd'hui chez l'homme. Cette deuxième duplication s'est sans doute produite chez les vertébrés.

En résumé, la protéine Nramp serait apparue chez les procaryotes, aurait été transférée aux eucaryotes, chez qui elle aurait continué d'évoluer, chaque nouvelle version remplaçant la précédente. Toutefois, certains organismes, dont *D. discoideum*, possèdent à la fois l'« ancienne » (= prototype) et la « nouvelle » (= archétype) versions de la même protéine.

Figure 2 : Schéma hypothétique de l'évolution de la famille Nramp.

Des analyses phylogénétiques (Richer *et al.* 2004) suggèrent que cette famille a émergé chez les procaryotes où ces transporteurs participent à l'homéostasie de cations divalents et peut-être à la virulence de certains pathogènes. Un gène *mntH* aurait été transféré au noyau eucaryote lors de l'endosymbiose à l'origine des mitochondries pour donner le gène eucaryote *Nramp* ancestral, dont la duplication aurait conduit à la divergence d'un *Nramp* «prototype» (proche du gène bactérien) et d'un «archétype» (présent uniquement chez les eucaryotes). L'archétype a persisté et a été dupliqué chez les vertébrés pour donner *Nramp1* et *Nramp2* chez l'être humain.



2.4 *Dictyostelium discoideum*

2.4.1 Généralités

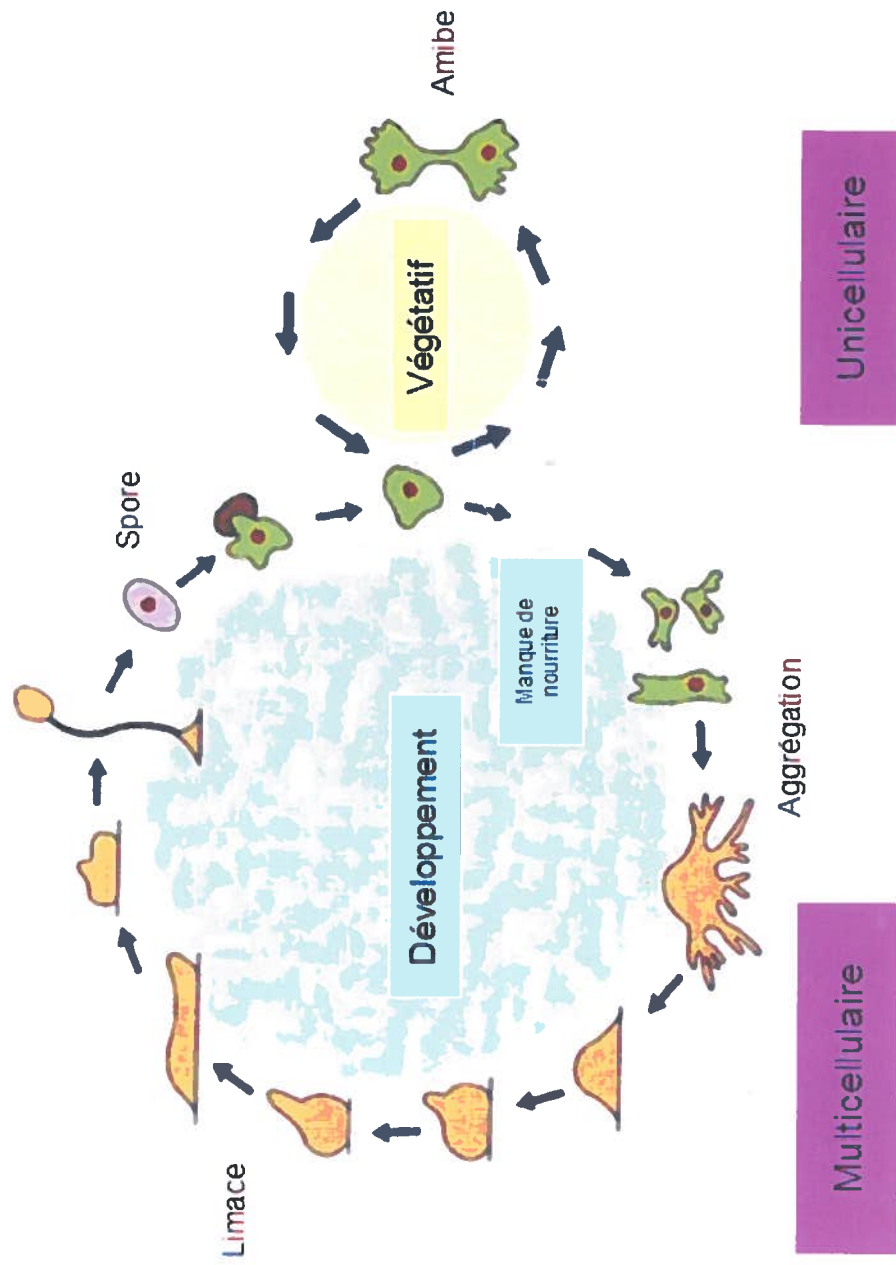
D. discoideum, décrit pour la première fois en 1935 (Raper 1935), est donc étudié depuis soixante dix ans, mais il fait l'objet ces dernières années d'un intérêt grandissant. Cet eucaryote est communément appelé Dicty, et il appartient à l'ordre *Dictyosteliida* regroupant les « amibes sociales ». Cet organisme vit en général sous forme unicellulaire dans le sol, où il se nourrit de bactéries et levures. Cependant, lorsque la nourriture se fait plus rare, jusqu'à 100000 cellules peuvent s'assembler, en communiquant grâce à des signaux d'AMPc pour d'abord former une limace capable de se déplacer vers un endroit plus riche en proies, attirée entre autres par la lumière (www.dictybase.org) (lien 1). Cette limace se transforme alors en un pied supportant une tige et une spore, dont seules ses cellules pourront recommencer la vie unicellulaire.

L'étude de son cycle de vie a aidé à améliorer notre compréhension sur la motilité cellulaire, la signalisation ou les interactions entre cellules. D'ailleurs, certaines études sur *D. discoideum* ont amené les premières descriptions d'un chimioattractant chez une cellule eucaryote ou de protéine d'adhésion cellulaire (Eichinger *et al.* 2005). On comprend donc l'intérêt qu'il suscite dont l'aboutissement est sa récente reconnaissance comme organisme modèle par les National Institutes of Health (NIH). En effet, son cycle de vie en fait un modèle idéal pour étudier le développement, et son mode d'alimentation un autre pour la phagocytose, pour ne citer que ces deux exemples. De plus, comme il est haploïde, les manipulations génétiques sont simplifiées, d'autant plus que son génome a entièrement été séquencé (www.dictybase.org; Eichinger *et al.* 2005).

Figure 3 : Cycle de vie chez *Dictyostelium discoideum*.

À l'état végétatif, *D. discoideum* est un organisme unicellulaire et se nourrit de bactéries par phagocytose. Lorsque la nourriture manque, il entre alors dans son cycle de développement où des centaines de milliers de cellules se rassemblent pour former une spore qui permettra de résister à ces conditions défavorables et d'être transporté vers un endroit plus favorable (Laboratoire-d'-Informatique-Fondamentale-de-Lille).

Dictyostelium discoideum



Adapté et traduit de (Laboratoire-d'-Informatique-Fondamentale-de-Lille)

2.4.2 Génome et protéome

Son génome de 34 Mb est composé de 6 chromosomes, contenant environ 12500 gènes selon les dernières estimations. Il est riche en (A+T) : 77,57 % en moyenne, mais se répartissant en 73 % pour les exons, 88 % pour les introns et 85 % pour les régions intergéniques. Cette richesse en (A+T) introduit évidemment un biais au niveau des codons utilisés et de la composition des protéines. Les codons NNA et NNT sont favorisés par rapport à leurs synonymes NNG ou NNC. Au niveau des protéines, les codons de la forme WWN (où W représente A ou T, et N n'importe quelle base, c'est-à-dire codant pour Asn, Ile, Lys, Phe et Tyr) sont favorisés par rapport aux codons SSN (où S représente G ou C, et N n'importe quelle base, c'est-à-dire codant pour Ala, Arg, Gly et Pro). Un autre fait remarquable chez *D. discoideum* est l'abondance de longues répétitions du même acide aminé (en particulier l'asparagine et la glutamine) dans plus de 2000 des protéines prédites. Ces répétitions se retrouvent évidemment au niveau du génome, même si l'utilisation de synonymes est fréquente, suggérant qu'elles ont plutôt été sélectionnées au niveau des protéines. Un autre indice vient confirmer cette hypothèse : ces répétitions n'apparaissent pas du tout chez certaines protéines, mais apparaissent sous forme de plusieurs « clusters » chez d'autres. Les protéines contenant les polyasparagines (polyN) et polyglutamines (polyQ) sont surtout des protéines kinases, des lipides kinases, des composantes du spliceosome, des ARN-hélicases ou des protéines se liant aux ARN. Il semblerait également que leur expression soit régulée à la hausse durant les premières heures du développement (Eichinger *et al.* 2005).

De plus, jusqu'à 20 % des isolats sauvages contiennent un ou des plasmides extrachromosomiques, capables de se répliquer eux-mêmes. Des dérivés de ces plasmides sont d'ailleurs utilisés aujourd'hui pour exprimer / surexprimer des protéines chez *D. discoideum* ((Kessin 2001), p. 44-45; (Metz *et al.* 1983)).

2.4.3 Modèle de phagocyte

Pour revenir au sujet qui nous intéresse ici, *D. discoideum* est un phagocyte très efficace, deux à dix fois plus qu'un macrophage humain (Gotthardt *et al.* 2002). Il partage également d'autres caractéristiques, comme la chimiotaxie, une signalisation avec des protéines G ou l'autophagie. Tous ces domaines ont été étudiés vastement chez *D. discoideum*, rarement toutefois dans le contexte de la relation hôte / pathogène. Ce domaine semble se développer ces dernières années puisque l'utilisation de *D. discoideum* comme modèle simple dans la relation hôte / pathogène permettrait de trouver de nouveaux facteurs de virulence chez le pathogène, de résistance chez l'hôte et les relations qui les lient l'un à l'autre (Steinert et Heuner 2005). Cependant, les résultats sont plus ou moins encourageants selon le pathogène testé.

Par exemple, un groupe (Cosson *et al.* 2002; Pukatzki *et al.* 2002) a réussi à démontrer que *D. discoideum* pouvait bel et bien être infecté et tué par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* pathogènes, issues d'isolats cliniques, et non par des souches non pathogènes. De plus, les voies de virulence seraient conservées puisque des souches mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* qui sont moins virulentes chez les mammifères le sont également moins pour *D. discoideum*. Pour mesurer ce phénomène, les bactéries sont ensemencées sur agar nutritif, avec un nombre connu de *D. discoideum*. Si la souche est non virulente pour *D. discoideum*, des plaques de lyse se forment dans le tapis bactérien. Dans le cas contraire, le nombre de plaques de lyse diminue ou devient même nul. De même, il a été démontré par un autre groupe que le même phénomène était observé pour un autre pathogène, *L. pneumophila*. Comme chez le macrophage humain, cette bactérie est phagocytée mais elle bloque la maturation du phagosome en empêchant la fusion avec le lysosome. Ce même groupe a aussi démontré qu'elle est également capable de s'y répliquer, comme le montre des observations par microscopie électronique ou confocale (Hagele *et al.* 2000).

À l'opposé, un autre groupe a montré que *Mycobacterium marinum*, bien que capable de se répliquer dans *D. discoideum*, n'utilisait pas tout à fait les mêmes mécanismes de virulence. En effet, chez les macrophages de souris, la coronine de l'hôte est en quelque sorte détournée par la mycobactérie et impliquée dans le maintien de l'infection par celle-ci. Or, une souche de *D. discoideum* dont la coronine a été mutée augmente la capacité de la bactérie à s'y répliquer, contrairement à ce que l'on pourrait attendre (Solomon *et al.* 2003).

D. discoideum se révèle donc un organisme potentiellement intéressant pour étudier les mécanismes fondamentaux de la phagocytose et de la relation hôte / pathogène.

2.4.4 Dans ce projet / Hypothèse de travail

Grâce aux analyses de séquences des protéines de la famille Nramp / MntH, l'évolution de celle-ci a pu être reconstituée (voir plus haut). La protéine serait apparue à la membrane plasmique en tant que transporteur de Me^{2+} dépendant du pH chez les procaryotes. Sa fonction, qui persisterait toujours à l'heure actuelle, serait de fournir la bactérie en métaux essentiels à la vie cellulaire dans des conditions adverses, puis plus tardivement dans l'histoire de la vie, de participer à la survie intracellulaire des bactéries dans les eucaryotes primitifs. Cette protéine bactérienne aurait été transférée aux eucaryotes lors des phénomènes endosymbiotiques à l'origine de la mitochondrie. Une duplication se serait alors produite, conduisant au prototype et à l'archétype Nramp, tous deux présents chez *D. discoideum*, et au moins une espèce de moustiques, de mousses et de levures. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, trois exemplaires de prototype sont présents, avec des localisations cellulaires différentes, mais une fonction commune, l'homéostasie des métaux (Portnoy *et al.* 2000). Quant à l'archétype, il se serait dupliqué très tôt dans l'évolution des vertébrés, pour donner Nramp1 (plus proche du prototype, donc de l'archétype ancestral) et Nramp2, présents uniquement chez les mammifères supérieurs.

Rappelons également que Nramp1 est présent dans la membrane des phagosomes et qu'elle est impliquée dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires. Nramp2 est, elle, principalement exprimée dans la membrane plasmique ou celle des endosomes, et impliquée dans l'homéostasie du fer. Leur divergence d'expression et de localisation cellulaire suffirait à expliquer le maintien des deux gènes après la duplication (paralogues).

Il reste donc à élucider à quel moment de l'évolution des eucaryotes une protéine située à la membrane plasmique et impliquée dans l'homéostasie des métaux est devenue une protéine du phagosome, impliquée dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires, se retournant en quelque sorte contre le propriétaire original, les bactéries. Autrement dit, à quel moment de l'évolution la spécialisation fonctionnelle de Nramp à la membrane du phagosome, pour lutter contre les organismes pathogènes intracellulaires, est-elle intervenue ?

Notre hypothèse était donc qu'un organisme en particulier permettrait sans doute de répondre à ces questions puisqu'il possède le prototype et l'archétype (= carrefour évolutif) et qu'il se nourrit principalement de bactéries (= macrophage ancestral) : *D. discoideum*.

Notre objectif général était de trouver la localisation et la fonction des deux protéines Nramp de *D. discoideum*. Pour cela, nous envisagions de travailler sur trois objectifs spécifiques :

1. Étudier la fonction biochimique de chacune des protéines en essayant de les exprimer à l'aide des systèmes couramment utilisés dans le laboratoire (pBad24 et *E. coli*, SL93,...).
2. Créer des souches de *D. discoideum* où chacun des gènes serait non fonctionnel afin de vérifier si cela confère un nouveau phénotype.
3. Montrer la localisation subcellulaire de chacune des protéines de *D. discoideum* (grâce à un antisérum ou à une fusion avec la GFP), en surexprimant chacune d'elles, au repos ou après phagocytose.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La méthodologie employée pour répondre à notre hypothèse est décrite à la Figure

4.

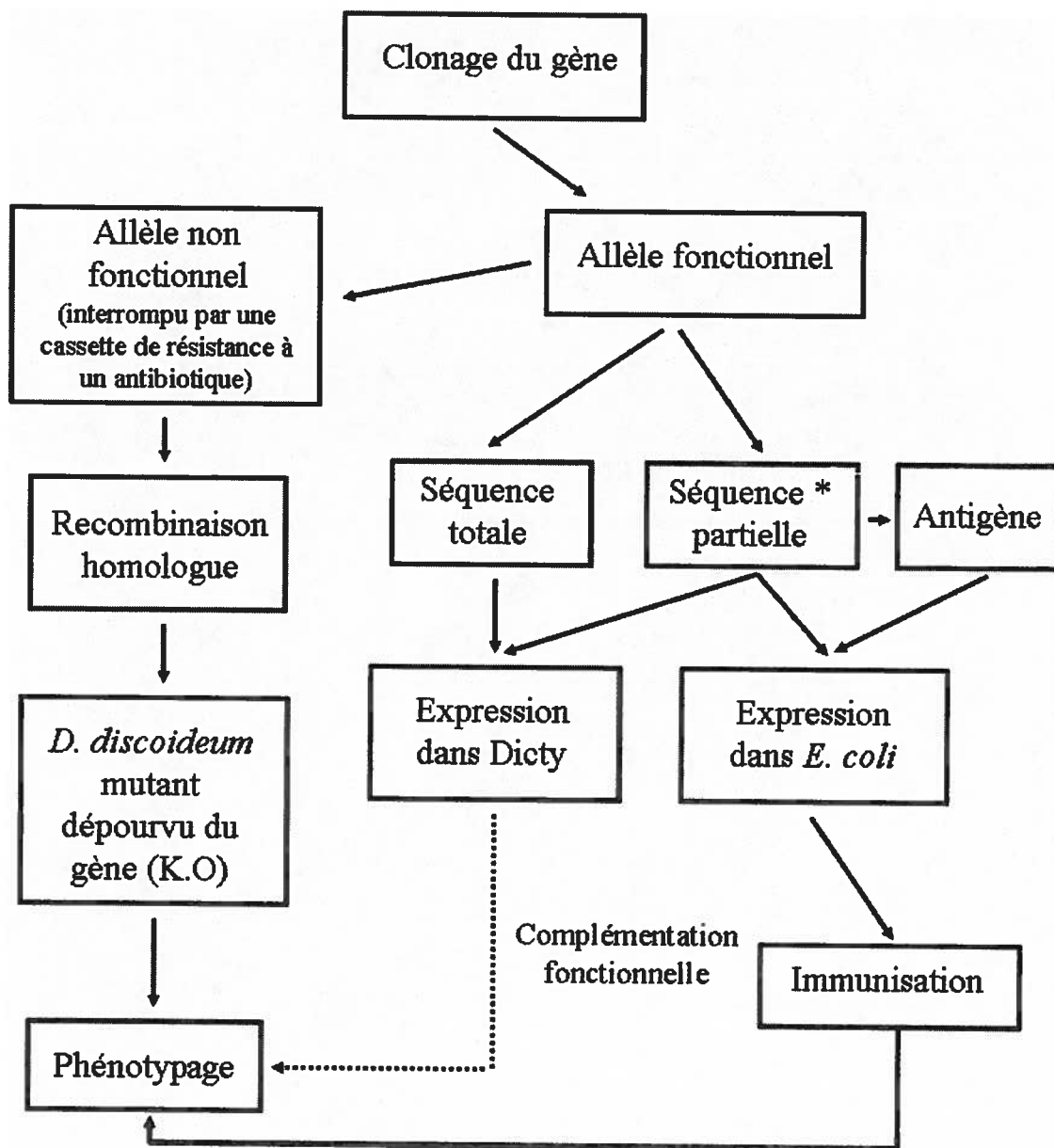


Figure 4 : Résumé de la méthodologie proposée pour l'étude des deux gènes *Nramp* de *D. discoideum*.

* La séquence partielle correspond à la séquence réduite en répétitions poly-Q / poly-N (spécifiques à *D. discoideum*) flanquant les extrémités de la chaîne polypeptidique.

3.1 Analyse informatique

Les séquences des deux homologues *Nramp* de *D. discoideum* ont été récupérées à partir du site DictyBase (www.dictybase.org). Le prototype, que nous avons choisi de nommer *DdNR1*, se situe sur le chromosome 2, en position 5508913 à 5510802 (numéro d'accès DictyBase : JC2V2_0_02184). Sa séquence de 1890 pb coderait donc pour une protéine de 629 acides aminés (Figure 5). L'archétype, que nous avons nommé quant à lui *DdNR2*, se situe également sur le chromosome 2, en position 7542966 à 7544678 (numéro d'accès DictyBase : JC2V2_0_02998). Il possède deux exons et un intron, ce dernier allant de la position 199 à 309 inclusivement (Figure 6). Il est d'ailleurs intéressant de noter que la position de l'intron est conservée chez *D. discoideum* (elle est identique à celle de l'Homme ou de la drosophile), les frontières canoniques 5'-GT...3'-AG l'étant tout autant (Richer *et al.* 2004). La séquence codante ferait donc 1602 pb, correspondant à 533 acides aminés.

Ces deux séquences ont été analysées grâce aux logiciels TMpred (Hofmann et Stoffel 1993) et TMHMM (Sonnhammer *et al.* 1998) pour en prédire le nombre de segments transmembranaires, DictyOGlyc (Gupta *et al.* 1999) pour la prédiction des sites de O-glycosylation de type GlcNAc chez *D. discoideum*, et ClustalX (Thompson *et al.* 1997), Mega2 (Mukhopadhyay *et al.* 2005) et Tree-Puzzle (Schmidt *et al.* 2002) pour déduire leur place dans l'évolution de la famille *Nramp*.

Figure 5 : Séquence codante du gène *DdNR1*.

La traduction apparaît en bleu. La partie soulignée en bleue correspond à la zone utilisée comme antigène spécifique de DdNR1 (appelé DdNR1_{Ac}). Les parties en gris clair correspondent aux régions hautement répétitives qui ont été retirées dans la version réduite du gène, pour maximiser les chances d'expression dans *E. coli* ainsi que la spécificité du peptide produit pour l'immunisation.

ATG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAA AAA TTA AAT AAA GAA AAT TTA AAT GAA ATT
 M N N N N N N K K L N K E N L N E I
 GAA AAT TGG AAT GAA ATA GAG TTA ACA GAT TAT AAG AAA CAA GGT TTA GAT GAA
 E N W N E I E L T D Y K K Q Q
 GGT ACA TCA AGT AAT ATT TAT TTA TTT GAA AGT AAT GGT AAT GTT GTT AAT GGT
 G T S S N I Y L F E S N G N V V N G
 AGT ATT GAA GAT TCA CCA AAG CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA
 S I E D S P K Q
 CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA AAT ATA ATA TCA TCA
 Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q N I I S S
 GAT GAG GAA ATT GAA GAT AAA CCA TTT CAA GAT AGA GAT AGT AAT ATT GGT GAT
 D E E I E D K P F Q Q D R D S N I G D
 GGT AGT GAT ATC GAT AGT AGT GGT GAT TCA ATC GAT ATA GAG AAT ACT GAT TAT
 G S D I D S S G D S I D I E N T D Y
 TCA ATA TTG GTA CCA TTC GAA GAT GAA GAA AAC AAC AAT GGA AGT AAA AGT AAA
 S I L V P F E D E E N N N G S K S K
 TTT TCA ATT AAA AAA TTA AAA TCA TTT TTA GGA CCT GCA TTA TTT ATA TCG GTG
 F S I K K L K S F L G P A L F I S V
 GGA TAT ATG GAT CCA GGT AAT TGG GCA ACA GAT TTA GAA GGT GGG TCA AGA TTT
 G Y M D P G N W A T D L E G G S R F
 GGG TAT CAA TTA ATG TGG GTA TTA TTA TTT TCA AAT ATT ATG GCA CTA TTT TTA
 G Y Q L M W V L L F S N I M A L F L
 CAA ACT TTG GTG ATA AAA TTA GCA TTG GTG ACA AAG AAT GAT TTA GCT CAA CAA
 Q T L V I K L A L V T K N D L A Q Q
 TGT AGA AAA GAG TAT AGT AAA ACC GTG AAT ATA TTC CTA TGG TTA ATA TTA GAG
 C R K E Y S K T V N I F L W L I L E
 TTG GCA ATA ATT TCA ACA GAT TTA GCA GAG GTT ATT GGT ACA GCA ATT GGT TTG
 L A I I S T D L A E V I G T A I G L
 AAT ATT CTA TTT GGC TTA CCG TTG ATT GCA GGC GTT GCT ATC ACT TCA TTG GAT
 N I L F G L P L I A G V A I T S L D
 ACT CTA CTG TTT TTA GCC ATT CAA AGA TGG GGT ATT AGG AAA TTG GAA TTG TTA
 T L L F L A I Q R W G I R K L E L L
 ATT CTA TTA CTT TTA TCA ATG ATA ACA ATG TGT TTT GTG ATA GAA CTT TTT CTT
 I L L L L S M I T M C F V I E L F L
 AGC AAA CCA ATT GCG TCC GAG GTT TTC TCT GGT TTC GTG CCA AGG TTA AAT AGT
 S K P I A S E V F S G F V P R L N S
 GAT AGT GTT ATG GTT GCA ACT GGC ATC GTT GGT GCT ACC ACT ATG CCC CAT AAT
 D S V M V A T G I V G A T T M P H N
 TTG TTT TTA CAT GGT AGT GTG GTG AAA TCA AGA AAG ATT CCA AAC GAT CGT AGA
 L F L H G S V V K S R K I P N D R R
 AAA TCA GTG ATC AAA CAA GCT TAC CGT TAT AAC GTT ATC GAT ACG GTT TTG GCT
 K S V I K Q A Y R Y N V I D T V L A
 TTG AAT TGT GCA TTC TTT GTT AAT ATC GCA ATA TTA ATG TTG GCT GCC TCT GTC
 L N C A F V N I A I L M L A A S V
 TTT TGG AAA TCA AAT ATC CAA GTA ACC GAA TTG TCA GAG GCC TAT AGA TTA TTA
 F W K S N I Q V T E L S E A Y R L L
 ACT AAA TTA ATG GAT GGG AAA TTA GCC GCA GTT TTA TTT GGG TTG GGT TTG TTC
 T K L M D G K L A A V L F G L G L F
 TTG GCT GGT CAA TCC TCA ACT ATC ACC GGT ACA ATG GCG GGC CAA ATA GGT ATG
 L A G Q S S T I T G T M A G Q I V M
 GAA GGT TTC ATA AAA TTA AGA ATT AAA CCT TGG TTA AGA AGA TTC ATA ACT CGA
 E G F I K L R I K P W L R R F I T R
 CTT TTG GCT ATA ATC CCC GCT ATT GTT ATC ATT GTT TTA GGT GAC AAA GGT
 L L A I I P A A I V I I V L G D K G
 ACC TAT ACC CTA TTA ATT ATC TCA CAA GTG CTT TTA TCA ATT GGT TTA CCT TTT
 T Y T L L I I S Q V L L S I G L P F
 GCT GTG GTC CCC TTA ATC TTT ACA AGT TCT TAC GAA ATA ATG GGT GAA TTT
 A V V P L I I F T S S Y E I M G E F
 AAA AAT AGG TTG TCA ATT ATT ATT ATC AAT TCA ATA ATT GCT CTA TTC ATT ATT
 K N R L S I I I I N S I I A L F I I
 GGT TTA AAT TTA GCA ACT ATT TTT CAA TTA ATT AAT GAT TTC CTT CAT AAT GAT
 G L N L A T I F Q L I N D F L H N D
 TCA ATA ATT TCA AAA TGT TTA ACA ATT ATC TTT TTA ATC CCT TTA TCA ATT GCT
 S I I S K C L T I I F L I P L S I A
 TTA TGT TGT TTA TTA TTA TGG TTA ATA ATT TCT TCA AAT AAT TTC TTT ACA AAT
 L C C L L L W L I I S K I N F F T N
 TTA TTA TCA AAA ATT TTT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
 L L S K I F N
 AAT AAT AAT AAT AAT TAT TCT GGT AAT ACA ATT AAT AAT CAA ACT ATA CAA TAA
 N N N N N Y S G N T I N N Q T I Q *

Figure 6 : Séquence codante du gène *DdNR2*.

La traduction apparaît en bleu. La partie en gris clair correspond à l'intron.

ATG ACA CCC AGA ATT GAA AGT GAG GAA TCT GCT CCT CTA GTA AAT AAA AAC AAC
 M T P R I E S E E S A P L V N K N N
 AAC AAT AAT AAC GAT AAT AAT AAT AAT AAT GTT GAT GAA GAA AAC CCT TTA
 N N N N D N N N N N V D E N P L
 ATA ATA GAA AGT GGT ATT CCA ATT GAA GAT TTA GAA CAA AAA AAT AAA CCA TAT
 I I E S G I P I E D L E Q K N K P Y
 TTA ATT AAA GTA CCA AAT ATT GAT AAA CCA GAT TCT
 L I K V P N I D K P D S
 TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA TTA ATA ATA ATA ATA ATA ATA ATA
 TAA TTT TTT ATT TTT TTT TTT TTT TTA ATT AAA AAA AAA AAA TGG ATA AAT TTT
 K W I N F
 AAA ACA TTA TGG GCA TTT ACA GGA CCA GGA TTT TTA ATG AGT ATA GCA TAT TTA
 K T L W A F T G P G F L M S I A Y L
 GAT CCT GGT AAT TTA GAG AGT GAT ATT CAA GCA GGA GCA ATG GCA GGA TAT CAA
 D P G N L E S D I Q A G A M A G Y Q
 TTA CTT TGG GTA TTA TTT TGG TCA ACA GTT ATT GGA TTT TGG TTA CAA ATG TTA
 L L W V L F W S T V I G F W L Q M L
 GCA TCA AGA TTG GGT GTT GTA ACA GGT AAA CAT TTA GCT GAA CAT TGT AGA GAA
 A S R L G V V T G K H L A E H C R E
 CAA TAT CCA AAG ACA CCA AGG CTA TTG TTA TGG TTA ATG ACA GAG TTG GCC ATT
 Q Y P K T P R L L L W L M T E L A I
 ATA GGT AGT GAT ATT CAA GAG GTT ATC GGT ACT GCG ATT GCC TTG CAA ATC TTA
 I G S D I Q E V I G T A I A L Q I L
 TCG AAT GGA CAT ATA CCA TTA TGG GCT GGT GTA TTA TTC ACT GCA GCT GAT ACA
 S N G H I P L W A G V L F T A A D T
 TTC ACA TTT TTA TTT TTA GAG AAA TAT GGT ATT AGA AAG TTG GAG GCA TTC TTT
 F T F L F L E K Y G I R K L E A F F
 TGC TCC TTG ATT GCA ATC ATG GCC ATT TCT TTT GGT GTA GAA TAC ATC ATT AGC
 C S L I A I M A I S F G V E Y I I S
 AAG CCC GAC CAA ATT GAG GTG GTA AAA GGT GTA TTC ATA CCA TTA TGC TCA CAG
 K P D Q I E V V K G V F I P L C S Q
 AAC AAC ATT TCC CAA GCT GTG GGT ATC TTG GGG GCA GTT GTA ATG CCA CAT AAT
 N N I S Q A V G I L G A V V M P H N
 ATC TAC TTA CAT AGC GCT TTG GTA CAG TCA AGA GAA ATC GAT AGA AAG AGT GAA
 I Y L H S A L V Q S R E I D R K S E
 ACT CAA GTA AAA ATC GCA AAT AAA TAC AAT CGT TTA GAA TCT GCA TTC GCA TTG
 T Q V K I A N K Y N R L E S A F A L
 ATC ATC TCT TTT ATT ATT AAT CTA TTA TTG GTA TCA GTT TTC GCT AAA GGA TTC
 I I S F I L I N L L L V S V F A K G F
 TAT GGA GAA ACT ACA GAG ATT GGG TTA TCA TCG GCT GCT GAT TTC CTT ATG GAC
 Y G E T T E I G L S S A A D F L M D
 AAG TAT GGT AAG GTT GCA AAA TAC ATT TGG GCA ATC GGT TTA TTT AGT GCT GGT
 K Y G K V A K Y I W A I G L F S A G
 CAA TGC TCG ACT ATG ACA GGT ACC TAT AGT GGT CAA TTT GTA ATG GAA GGT TTC
 Q C S T M T G T Y S G Q F V M E G F
 TTA AAA TTA AAA ATC GCA CCT TGG AAA AGA TTA TTA ATC ACC CGT TGT ACC GCT
 L K L K I A P W K R L L I T R C T A
 ATC GTT CCT GCT ATG GTT GTT GCT ATA TTA TCG ACT TCT CAT TTG GAT TCT TTA
 I V P A M V V A I L S T S H L D S L
 GAT CAA TGG TTA AAC ATT TTG CAA AGT ATT CAA TTA CCC TTT GCA GTG GTA CCT
 D Q W L N I L Q S I Q L P F A V V P
 GTA TTA TTA TTT ACA AGC TCT GAG AAA ATT ATG GGT TCA AAA TTT AAA AAT CAT
 V L L F T S S E K I M G S K F K N H
 TGG TTA AAT AAT CAA TTT GTT AGA TTT TTA TCA CTA TTA ATC ATT GCA ATC AAC
 W L N N Q F V R F L S L L I I A I N
 ATT TAT TTA ATT ATC ACT TTC TCA ATG CAA ATC TCT GAA TCA GCT TGG ATG ATT
 I Y L I I T F S M Q I S E S A W M I
 TCA ATA GTT TCA ATA TCT TTC TTT TTT TAT TTC ATT TTC ATA GTT TAT TTA TCA
 S I V S I S F F F Y F I F I V Y L S
 ATG GGT CAA GAA AAC TTT AAT TCT ATG ACT AAA AAA ATC AAA AAT TTA TTT AAT
 M G Q E N F N S M T K K I K N L F N
 AAT AAT TCA AAT CAA ACT TAT AAT AAT ATT AAT TAT TAA
 N N S N Q T Y N N I N Y *

3.2 Matériel courant utilisé

Sauf mention spécifique, les produits chimiques et milieux de culture proviennent des compagnies Fisher, BD ou Sigma. Les enzymes de restrictions ont été obtenues de New England Biolabs (NEB). La Taq, l'échelle de taille « 1 kb+ ladder », l'échelle de masse « low mass ladder », la CIP sont produites par Invitrogen.

L'eau MilliQ est une eau ultra pure où les ions et produits organiques ont été réduits à l'état de traces, filtrée à 0,22 µm, photo-oxydée aux UV et ultrafiltrée pour en retirer toutes traces de nucléases notamment. Elle est indispensable pour toutes les techniques de biologie moléculaire.

Le spectrophotomètre utilisé pour évaluer la quantité d'ADN ou de bactéries par exemple est le Ultrospec 1000 UV/Visible spectrophotometer de la compagnie Biochrom. Pour la centrifugation de petits volumes, la microcentrifugeuse Micromax de la compagnie IEC est couramment utilisée.

3.3 Biologie moléculaire

3.3.1 PCR

3.3.1.1 Amorces

Les amorces utilisées dans ce projet se trouvent rassemblées dans le Tableau 1. Parmi celles-ci, l'amorce DDNR1 1648-1625 ne sera pas citée explicitement dans le reste de la présentation car elle n'a été créée que pour réaliser des séquençages, plus particulièrement pour permettre de couvrir complètement la séquence de *DdNR1*.

Tableau 1 : Ensemble des amorces utilisées pour les PCR durant ce projet.

Nom de l'amorce	Séquence (5' vers 3') (les sites de clonage sont en caractères gras)	Sites de clonage
Dd1RClon3'	TTTCTAGATTAAGCGGCCGCGGACAGGAAATTTGTAAAGA	<i>NotI</i> <i>SacII</i> <i>EagI</i>
Dd1RClon5'	GATACCGTCGAATTCGAGGAATTATGG	<i>EcoRI</i>
Dd2RClon5'	TGCGAATTCTACTTGAGTTTCACTCTT	<i>EcoRI</i>
Dd2FClon3'	ATAAATACACTAGTTTAGAATCTGCATTCG	<i>SpeI</i> <i>NotI</i>
Dd2RClon3'	TTGCGGCCGCGGAAATTTTTGATT	<i>SacII</i> <i>EagI</i>
Dd2R2.2	TTTCTAGATTATAAATTTTTGATTTTTTTAGTCA	
SEQRNRPF	GGATTGATTTCAAACCTTAATAAAATCTC	
SEQRNRPR	CTGTGAACAATTGATGGACGACTCTAG	
FG1PDNEO2.2	GCGTCGACAAATAAATGCTTTGAAAATG	<i>Sall</i>
RG1Comple	TTTTTGAATTCCTGTATAGTTTGATTATTAATTGT	<i>EcoRI</i>
VERIFKOG1	GATTTTAAAGTGGTTACCCCAT	
VERIFKOG2	TTGGGTAGTTATAATAATAATAA	
SEQFPDNEO2	CCATGGGTGGTTTTTCGCTTTAAAATTGGG	
SEQRPDNEO2	CAATTGATGGACGACTCTAGCGAGCTCG	
DD1PGEXF	TCACCAGATCTTCATCAGATGAG	
DD1PGEXR	CTCTGAATTCAAAATCTTTGACAG	
DD1F1	AACCATGGTATCATCAGATGAGGAAATTGA	<i>NcoI</i>
DD1R1	TTTCTAGATTAAGAGATCTTTGACAGGAAATTTGTAAAGA	<i>XbaI</i>
DDNR1/PRNRF	TCACCAGATCTTCATCAGATGAGG	<i>BglII</i>
DDNR1/PRNRR	CGACTCGAGATTAATAAATCTTTG	<i>XhoI</i>
DDNR1 1648-1625	GCACAATTCAAAGCCAAAACCGTA	
Dd1L3	GATCCACTAGTTCTAGAGCGGTTTTTACATGGTAGTGT	<i>SpeI</i>
DdIFRPON52	TGGGATCCGTCGACGAGGAAATTGA	<i>Sall</i>
Dd2RComp	AAAGGGCCCTGGATAAATTTTAAAACATTAT	<i>ApaI</i>

3.3.1.2 Mélange réactionnel et paramètres de PCR

Pour les PCR, deux températures d'élongation sont utilisées avec la Pfu (Stratagene), soient 72°C (température optimale conseillée par le fabricant) et 68°C qui nous a été recommandée pour pallier au biais en (A+T) de *D. discoideum*.

De manière générale, les PCR ont été réalisées avec la Pfu (Stratagene) pour limiter les erreurs de polymérisation. Le mélange réactionnel, placé dans des tubes de 0,6 mL (Progene), a été le suivant : 2,5 µL de tampon Pfu, 0,25 µL du mélange de dNTPs adapté pour *D. discoideum*, 1 µL d'amorce amont à 5 pmol / µL, 1 µL d'amorce aval à 5 pmol / µL, 0,25 µL de Pfu, du MgSO₄ (concentration finale de 2 à 12 mM), de l'ADN servant de patron et la quantité nécessaire d'eau MilliQ pour compléter à 25 µL.

Mélange de dNTPs adapté pour *D. discoideum*

dATP	25 mM
dTTP	25 mM
dCTP	12,5 mM
dGTP	12,5 mM

Les tubes étaient ensuite placés dans le thermocycleur Programmable Thermal Controller PTC-100 (MJ Research Inc.) aux conditions suivantes : un cycle de dénaturation initiale (DI), 5 cycles de dénaturation (D), appariement au T_m approprié (T_m : Melting temperature. Température théorique définie comme celle en dessous de laquelle l'amorce va se lier à l'ADN servant de patron et au dessus de laquelle elle va s'en dissocier) (A) et élongation (E), suivis de 25 cycles de dénaturation, appariement et élongation se terminant par une extension finale (EF) et un cycle de conservation (C) à 4°C. Les résultats de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose selon le protocole décrit à la section 3.3.3.

Le Tableau 2 présente l'ensemble des PCR réalisées pour ce projet, avec tous les paramètres s'y rattachant. Seuls les paramètres spécifiques y apparaissent, les autres suivant les règles édictées ci-dessus.

Tableau 2 : Résumé des PCR effectuées au cours de ce projet.

Les amorces spécifiques à chaque objectif sont présentées. Seules la concentration en $MgSO_4$ et la quantité d'ADN servant de patron sont données car elles représentent les seules variables au niveau du mélange réactionnel. Pour les paramètres de programmation du thermocycleur, température et durée de chacun sont données selon le format : un cycle de dénaturation initiale (DI), 5 cycles de dénaturation (D), appariement (A) et élongation (E), suivis de 25 cycles de dénaturation, appariement et élongation se terminant par une extension finale (EF). Toutes les PCR se finissent par un cycle de conservation à 4°C.

Objectif	Amorces	Mélange réactionnel	Paramètres	But
Clonage de <i>DdNR1</i> court dans pBad24	Dd1F1 et Dd1R1	6 mM de MgSO ₄ , ADN génomique Dicty (~25 ng)	DI : 45 s à 95°C, 5 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 45°C, E : 2 min à 72°C), 25 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 57°C, E : 2 min à 72°C), (EF) de 10 min à 72°C	Expression dans <i>E. coli</i>
Clonage 3' de <i>DdNR1</i> court dans pRHI119	Dd1L3 et Dd1RClon3'	10 mM de MgSO ₄ , ADN génomique Dicty (~25 ng)	DI : 5 min à 95°C, 5 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 41°C, E : 2 min à 68°C), 25 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 50°C, E : 2 min à 68°C), EF : 10 min à 68°C	Création de la construction pour réaliser le KO de <i>DdNR1</i>
Clonage 5' de <i>DdNR1</i> court dans pRHI119	DdIFRPON52 et Dd1RClon5'	Idem que pour la portion 3' sauf pour la concentration de MgSO ₄ , qui était de 6 mM		
Clonage 5' de l'exon 2 de <i>DdNR2</i> dans pRHI119	Dd2RComp et Dd2RClon5'	Idem que pour la portion 5' de <i>DdNR1</i>		Création de la construction pour réaliser le KO de <i>DdNR2</i>
Clonage 3' de l'exon 2 de <i>DdNR2</i> dans pRHI119	Dd2FClon3' et Dd2RClon3'	Idem que pour la portion 5' de <i>DdNR1</i>		
Amplification de <i>DdNR2</i> (promoteur à fin du gène)	VerifKOG2 et DdNR22.2	Idem que pour la vérification des KO <i>DdNR1</i> potentiels		Vérification clones obtenus par électroporation de pRHI119- <i>DdNR2</i>
Amplification de <i>DdNR1</i> (promoteur à fin du gène)	VerifKOG1 et RG1Complet	2 mM de MgSO ₄ , ADN génomique Dicty (~25 ng)	DI : 5 min à 95°C, 5 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 50°C, E : 5 min à 68°C), 25 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 55°C, E : 5 min à 68°C), EF : 10 min à 68°C	Vérification clones obtenus par électroporation de pRHI119- <i>DdNR1</i>
Amplification portion <i>DdNR1</i> _{Ac}	Dd1pGexF et Dd1pGexR	2 mM de MgSO ₄ , ADN génomique Dicty (~25 ng)	DI : 45 sec à 95°C, 5 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 45°C, E : 1 min à 72°C), 25 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 57°C, E : 1 min à 72°C), EF : 10 min à 72°C	
Clonage de <i>DdNR1</i> court dans pnrnP	DdNR1/rnrPF et DdNR1/rnrPR	2 mM de MgSO ₄ , ADN génomique Dicty (~25 ng)	DI : 45 s à 95°C, 5 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 51°C, E : 3 min à 72°C), 25 cycles (D : 45 s à 95°C, A : 45 s à 54°C, E : 3 min à 72°C), EF : 10 min à 72°C	Expression dans <i>D. discoideum</i>
Amplification de <i>DdNR1</i> contenu dans pnrnP	SeqRNRPF et SeqRNRPR	2 mM de MgSO ₄ , ADN extraction rapide	DI : 5 min à 95°C, 5 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 48°C, E : 3 min à 68°C), 25 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 52°C, E : 3 min à 68°C), EF : 10 min à 68°C	Vérification clones issus transformation chimique par pnrnP- <i>DdNR1</i>
Clonage de <i>DdNR1</i> complet dans pDNeo2	FG1PDNEO2.2 et RG1Complet	2 mM de MgSO ₄ , ADN génomique Dicty (~25 ng)	DI : 5 min à 95°C, 5 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 48°C, E : 3 min à 68°C), 25 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 51°C, E : 3 min à 68°C), EF : 10 min à 68°C	Expression dans <i>D. discoideum</i>
Amplification de <i>DdNR1</i> contenu dans pDNeo2	SeqPDNEO2F et SeqPDNEO2R	2 mM de MgSO ₄ , ADN extraction rapide	DI : 5 min à 95°C, 5 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 48°C, E : 2 min 30 à 68°C), 25 cycles (D : 1 min à 95°C, A : 1 min 30 à 54°C, E : 2 min 30 à 68°C), EF : 10 min à 68°C	Vérification clones issus transformation chimique par pDNeo2- <i>DdNR1</i>

3.3.2 Précipitation d'ADN

Cette technique est utilisée pour concentrer de l'ADN dans un volume plus petit (Ausubel 1992). À la solution initiale, sont ajoutés 1/10 de volume d'acétate de sodium, 0,6 volume d'isopropanol et 1 μL de glycogène (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) (qui sert en quelque sorte de lest pour l'ADN). Ce mélange est laissé pour précipitation de 2 à 16 heures à -20°C . Après une centrifugation à $21000 \times g$ de 5 à 15 minutes dépendant s'il s'agit d'ADN génomique ou non respectivement, deux lavages successifs consistant en l'ajout de 500 μL d'éthanol 75 %, une centrifugation de 5 minutes à $21000 \times g$ et le retrait du surnageant sont effectués pour retirer les sels. Après séchage du culot, celui-ci est resuspendu dans le volume désiré d'eau MilliQ par deux cycles de 5 minutes à 65°C suivies de 5 minutes à 4°C .

3.3.3 Électrophorèse

L'ADN étant chargé négativement, migre vers l'anode lorsqu'il est placé dans un champ électrique. S'il est situé dans une matrice, tel un gel d'agarose, il va accumuler du retard par rapport au front de migration proportionnellement à sa taille.

3.3.3.1 Paramètres suivis

Selon le nombre d'échantillons et/ou le volume à faire migrer, le modèle EasyCast Electrophoresis System, Model #B1A (Owl Scientific Inc., Woburn, USA) (12 échantillons ou moins) ou le modèle EasyCast Electrophoresis System, Model #B2 (Owl Scientific Inc., Woburn, USA) (jusqu'à 48 échantillons) est utilisé. Le volume du gel est de 40 ou 120 mL de TBE 0,5x respectivement. Le gel est placé dans la cuvette d'électrophorèse correspondante contenant le volume de TBE 0,5x nécessaire pour le recouvrir. Pour une résolution optimale, le pourcentage en agarose est ajusté en fonction de la taille des fragments d'ADN à faire migrer. L'ADN est toujours co-migré avec l'échelle de taille 1 kb+ ladder (Invitrogen) couvrant des tailles de 100 à 12000 paires de bases, et parfois avec l'échelle de masse Low DNA mass ladder (Invitrogen) permettant

d'évaluer des quantités d'ADN comprises entre 5 et 400 ng. Tout ADN est mélangé à 1/6 de tampon de chargement (« loading buffer », (Sambrook 1989)). La migration se fait entre 100 et 150 volts.

Tampon de chargement		TBE 10x	
Bromophénol	0,25 %	Tris-base	108 g
Xylène	0,25 %	Acide borique	55 g
Glycérol	30 %	EDTA 0,5 M, pH 8,0	40 mL

3.3.3.2 Visualisation au bromure d'éthidium

Après migration, le gel est placé pour 30 à 45 minutes dans un bain contenant 200 mL d'eau distillée et 12 µL de bromure d'éthidium à 10 mg/mL. Ce dernier est un agent intercalant qui se fixe spécifiquement à l'ADN et qui est fluorescent aux UV.

3.3.3.3 Révélation aux UV

Pour vérifier les résultats obtenus sur gel, celui-ci est exposé aux UV dans le Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, USA), qui est couplé au logiciel Molecular Analyst Version 1.3 Build 376 (BioRad, Hercules, USA) et à l'imprimante Video Copy Processor (Mitsubishi). Cette image peut aussi être stockée sur le serveur pour utilisation ultérieure.

3.3.4 Digestions et autres traitements enzymatiques

Toutes les enzymes de restriction utilisées dans ce projet proviennent de la compagnie NEB et sont employées selon les recommandations du fabricant. Elles sont capables de couper en des sites spécifiques l'ADN double brin.

Pour une digestion classique, le mélange typique de réaction contient la quantité suffisante d'ADN, 1/10 du volume total en tampon recommandé pour l'enzyme utilisée, 1/10 du volume total en BSA (Bovine Serum Albumin) 10x si recommandé, 1/20 du volume total en enzyme (ou de chaque enzyme s'il s'agit d'une digestion double), le tout

complété à 10 μL avec de l'eau MilliQ stérile. Ce mélange est placé à la température recommandée et incubé une heure.

Pour la préparation d'un vecteur en vue d'une ligation, le mélange réactionnel conserve les mêmes proportions de réactifs, mais le volume final est plus important, en général entre 50 et 80 μL . Ce mélange est placé à la température recommandée et incubé pendant quatre heures. Les enzymes sont ensuite inactivées par la chaleur selon les températures fournies par le fabricant. Enfin, la CIP (NEB) est ajoutée à un volume équivalent à 1/10 du volume total de la digestion pour déphosphoryler les extrémités du vecteur linéarisé et l'empêcher de se refermer sur lui-même.

Pour la préparation d'un insert en vue d'une ligation, les conditions sont les mêmes que pour la préparation du vecteur sauf pour le volume réactionnel qui est conservé entre 10 et 15 μL , et pour le traitement à la CIP, qui est omis.

3.3.5 Ligation

La T4 DNA ligase (Invitrogen) est une enzyme capable de lier les extrémités de fragments d'ADN double brin entre elles. Nous l'utilisons selon les conseils du fabricant, pour insérer un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur. Brièvement, l'insert et le vecteur préalablement digérés selon les conditions voulues sont mélangés selon un ratio 3 pour 1 (compris dans l'échelle de ratios de 2 à 6 pour 1 recommandée par le fabricant) ou à un ratio plus élevé d'insert si besoin et placés 5 minutes à 65°C pour séparer les bouts cohésifs. Vient ensuite l'eau MilliQ en quantité suffisante pour obtenir un volume final de 10 μL (en tenant compte de tous les réactifs), à qui sont ajoutés 1 μL de ligase et 2 μL de tampon à ligase 5x. Deux contrôles sont également préparés. Dans le premier, le volume de l'insert est échangé par de l'eau MilliQ, et dans le deuxième la ligase est également remplacée. Le tout est incubé à 16°C pendant 4 à 16 heures. Enfin, ces trois réactions sont précipitées selon le protocole décrit plus tôt pour ramener le volume à cinq microlitres.

3.3.6 Extractions de plasmides (Mini- ou Maxi-prep)

Cela consiste à extraire les plasmides contenus dans une bactérie. Cette méthode est utilisée pour passer au crible des clones, les préparer en vue de les sous-cloner ou pour faire des transformations chez *D. discoideum*.

3.3.6.1 Miniprep manuelle

Le protocole que utilisé est une adaptation de celui de Sambrook *et al.* ((Sambrook 1989), chapitre 1.21). La souche dont on veut extraire le plasmide est mise en culture pendant 16 heures à 37°C sous agitation (250 rpm) dans 5 mL de LB (voir section 3.4.1) additionné de l'antibiotique approprié. Après centrifugation pendant 40 secondes à 6000 x g, le surnageant de 1,5 mL de cette culture est retiré. Le culot est resuspendu au vortex Genie 2 (Scientific Industries) dans 250 µL de tampon P1. Pour lyser les cellules, le tampon P2 est ajouté et mélangé par inversion. Suit une incubation de 5 minutes à température pièce. Enfin, 250 µL du tampon P3 sont ajoutés et mélangés pour séparer l'ADN plasmidique (qui reste en suspension) de l'ADN génomique (qui précipite). Après une nouvelle incubation de 5 minutes à température pièce, ce mélange est centrifugé à 21000 x g pendant 25 minutes. Sept cents microlitres du surnageant sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf de 1,7 mL.

Les étapes suivantes sont facultatives, ce surnageant pouvant immédiatement être utilisé à l'étape de mélange à l'isopropanol décrite au paragraphe suivant. Leur principal inconvénient est qu'elles allongent la durée du protocole. Elles sont tout de même effectuées dans certains cas, car l'ADN obtenu au final peut se révéler difficile à digérer si elles sont ignorées, sa pureté n'étant pas optimale. Donc, au surnageant sont ajoutés 250 µL de chloroforme-alcool isoamilique (49:1) et 250 µL de phénol saturé à l'eau, et le tout est mélangé vigoureusement. Le chloroforme sert à éliminer les lipides résiduels. Combiné au phénol, il sert à dénaturer les protéines encore présentes, les rendant ainsi solubles dans la phase organique formée par le mélange phénol-chloroforme après centrifugation de 5 minutes à 21000 x g. La phase aqueuse est alors transférée dans un

nouveau tube, pour subir une nouvelle fois ce même traitement. Elle est enfin extraite dans un tube neuf et utilisée à l'étape suivante.

Sont ajoutés 600 μL d'isopropanol. Une nouvelle centrifugation à 21000 x g pendant 30 minutes est effectuée après une incubation de 20 minutes à température pièce. Pour retirer les sels, deux lavages successifs consistant en l'ajout de 500 μL d'éthanol 75 %, une centrifugation de 5 minutes à 21000 x g et le retrait du surnageant sont effectués. Après séchage du culot, celui-ci est resuspendu dans 25 μL d'eau MilliQ par deux cycles de 5 minutes à 65°C suivies de 5 minutes à 4°C.

Tampon P1 (Conservé à 4°C)

Tris-HCl 1,25 M, pH 8,0	2 mL
EDTA 0,5 M, pH 8,0	1 mL
RNAse (10 μg / mL)	100 μL
Eau distillée stérile	49,6 mL

Tampon P2

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon P3

KOAc (acétate de potassium)	12,51 g
Eau distillée stérile	20 mL

Ajuster le pH à 4,8 avec de l'acide acétique glacial.
Compléter à 500 mL avec de l'eau distillée stérile.

3.3.6.2 Miniprep Qiagen

Il s'agit du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Nous l'utilisons lorsque nous souhaitons une qualité d'ADN supérieure à celle obtenue dans la méthode manuelle (c'est-à-dire entièrement débarrassé des ARN et des protéines contaminantes). Elle est effectuée selon les recommandations du fabricant.

3.3.6.3 Maxiprep Qiagen

Elle est utilisée lorsque de grandes quantités du plasmide sont nécessaires, en général pour les transformations. Deux kits ont été utilisés, tous deux de la compagnie Qiagen : le premier est le Plasmid Maxi Kit et le second est l'EndoFree Plasmid Maxi Kit. Ce dernier est employé pour les transformations dans *D. discoideum* car il est supposé faciliter les transformations difficiles à réaliser autrement, selon le fabricant.

3.3.7 Extractions d'ADN chez *D. discoideum*

3.3.7.1 Extraction d'ADN génomique avec le kit DNEasy de Qiagen

Le DNEasy Tissue kit de Qiagen est utilisé selon les conseils du fabricant dans la section « Protocol: Purification of Total DNA from Cultured Animal Cells ». Pour un rendement d'environ 5 µg chez *D. discoideum*, $1,2 \times 10^7$ cellules sont utilisées.

3.3.7.2 Extraction rapide

Ce protocole est une adaptation de celui mis au point par Charrette *et al.* (2004). Il a pour avantage d'être très rapide et permet donc en particulier le criblage par PCR des clones de surexpression chez *D. discoideum*. Les cellules sont resuspendues dans le volume désiré de HL5 (voir section 3.4.3). Quatre volumes de tampon de lyse LyB y sont ajoutés et mélangés au vortex pour briser les cellules et détruire les diverses enzymes préjudiciables présentes (DNAses en particulier). Une incubation d'une minute à 95°C suit pour inactiver la protéinase K.

Tampon de lyse LyB

KCl	50 mM
Tris pH 8,3	10 mM
MgCl ₂	2,5 mM
NP40	0,45 %
Tween 20	0,45 %
Protéinase K (à 20 µg / µL)	1 µL par 25 µL de LyB

3.3.8 Southern blot

La technique de Southern consiste à digérer des ADN grâce à des enzymes de restriction. Les produits de cette digestion sont ensuite mis à migrer sur gel d'agarose pour être séparés selon leur taille. Puis, ils sont dénaturés *in situ* et transférés sous forme d'ADN simple brin par capillarité vers une membrane de nylon. Enfin, le ou les fragments d'intérêt sont révélés par hybridation grâce à une sonde spécifique marquée (par exemple radioactive).

3.3.8.1 Préparation des échantillons d'ADN / Migration et traitements du gel d'agarose

Dans un premier temps, il faut extraire l'ADN génomique, le doser sur gel et au spectrophotomètre, et le digérer de la manière appropriée.

Un échantillon des produits de digestion précipités (20 μ L) est mélangé à 4 μ L de tampon de chargement et chargé sur un gel d'agarose à 1%. Après une migration d'environ deux heures trente à 100 volts, le gel est placé dans un bain de bromure d'éthidium pour 45 minutes et révélé aux UV selon le protocole habituel, en ajoutant une règle permettant d'estimer la distance parcourue par les marqueurs de migration.

Le gel est alors lavé pour en retirer le maximum du bromure d'éthidium. L'ADN est ensuite fragmenté (dépurination) par un traitement de 10 minutes dans 500 mL de HCl 0,2 N, puis lavé 4 fois 3 minutes dans de l'eau distillée, et enfin dénaturé dans deux bains de 15 minutes dans 500 mL de solution de dénaturation, et de 15 minutes dans 500 mL de solution de neutralisation (Ausubel 1992).

Solution de dénaturation		Solution de neutralisation	
NaCl	0,6 M	NaCl	1,5 M
NaOH	0,4 N	Tris-HCl	0,5 M

SSC 20x (Ausubel 1992)

NaCl 3 M

Na₃-citrate.2H₂O 0,3 M

Ajuster le pH à 7,0 avec du HCl 1 M.

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée stérile.

3.3.8.2 Transfert sur la membrane

Une membrane de nylon NEN-976 Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane (NEN Life Science Products) de la taille du gel est découpée et un coin en est retiré (la même chose est faite sur le gel). Elle est préparée par immersion dans l'eau distillée, puis dans le SSC 10x pour 5 à 10 minutes. En se préoccupant toujours de ne laisser aucune bulle, la superposition suivante est effectuée dans la cuvette de transfert Blot Transfer System 11.14 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) : une mèche de papier filtre Whatman qui assure le contact avec le SSC 10x, 3 papiers Whatman de la taille du gel, le gel (face vers le bas), la membrane de nitrocellulose selon l'orientation recommandée par le fabricant et dont le coin coupé correspond à celui du gel, de nouveau 3 papiers Whatman de la taille du gel et une dizaine de centimètres d'épaisseur de papier absorbant. La cuve est fermée avec du Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA) pour éviter l'évaporation et favoriser le transfert par capillarité du gel vers la membrane. Pour accentuer ce phénomène, des poids sont ajoutés au sommet des papiers absorbants. Le transfert se fait pendant deux jours, avec changement des papiers absorbants à intervalles réguliers (Ausubel 1992). Lorsqu'il est terminé, la membrane est mouillée quelques minutes dans le SSC 10x, subit un passage rapide par le côté opposé à l'ADN dans 2 mL de solution de dénaturation puis dans 2 mL de solution de neutralisation. La membrane est retournée dans le SSC 10x puis déposée sur du papier cellophane avant d'être fixée par 150 mJ d'UV au GS Gene Linker (BioRad). Enfin, elle est libérée de sa cellophane et déposée à l'intérieur d'un papier Whatman replié de façon à ce qu'elle soit exposée à l'air. Ces deux étapes permettent de fixer irréversiblement l'ADN à la membrane. Cette dernière est ensuite conservée à l'abri.

3.3.8.3 Préparation de la sonde radioactive

Le tampon OLB contenant tous les dNTP sauf le dATP est d'abord préparé. Ensuite, le volume nécessaire d'eau MilliQ et 1 à 2 μL (soient 100 à 150 ng) de l'ADN servant de matrice sont incubés à 100°C pendant 5 minutes pour dénaturer les brins d'ADN. Sont immédiatement ajoutés, pour éviter toute renaturation, 7 μL de $\alpha^{32}\text{PdATP}$ (Amersham), 2 μL de BSA 100x (NEB), 10 μL d'OLB, et la Klenow (NEB). Le tout est incubé 16 heures à température pièce. La purification de la sonde (séparation des nucléotides radioactifs non incorporés, de l'enzyme,...) se fait grâce au kit Nucleotide Removal de Qiagen selon les recommandations du fabricant.

Un décompte de la radioactivité est ensuite réalisé en plaçant 2 μL de la sonde dans un flacon à scintillation mis dans le compteur à scintillations Beckman LS 1701 (Beckman) dont la fenêtre de comptage pour le ^{32}P s'étend de 0 à 1000 (valeur exprimée en « channel units »). La radioactivité est ensuite ramenée en coups par minute (CPM) par μL .

Tampon OLB		Solution O	
Solution A	100 μL	MgCl ₂	0,125 M
Solution B	250 μL	Tris pH 8,0	1,25 M
Solution C	150 μL		
Solution A		Solution B	
Solution O	1 mL	Hepes pH 6,6 (ajuster avec	
β -mercaptoéthanol	18 μL	du NaOH 4 M)	2 M
Chaque dNTP à 100 mM (sauf dATP)	5 μL		

Solution C

Hexanucléotides pd(N)₆ Random hexamer 5'-phosphate, sodium salt (Amersham) préparés à une concentration finale de 90 OD / mL dans du Tris 3 mM, EDTA 0,2 mM pH 7,0.

3.3.8.4 Préhybridation

Cette étape sert à saturer les zones de la membrane qui ne contiennent pas d'ADN, afin d'éviter la fixation non spécifique de la sonde dans l'étape subséquente.

Dans le four à hybridation Hybridization Incubator Model 310 (Robbins Scientific) réglé à 60°C (plutôt que 65°C à cause du biais en (A+T) de *D. discoideum*), est placé le tube à hybridation contenant 5 mL de tampon de préhybridation préchauffé à 60°C et la membrane séparée du verre par un treillis de nylon, la face ADN tournée vers l'intérieur du tube. La préhybridation se déroule pendant 2 à 16 heures.

Tampon d'acide maléique

Acide maléique	100 mM
NaCl	150 mM
Ajusté à pH 7,5 avec du NaOH	

Solution de blocage

Blocking reagent (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) dilué à 10% (poids / volume) dans le tampon d'acide maléique par agitation et chauffage, puis autoclavé.

Tampon de préhybridation (conserver à 60°C)

Eau MilliQ stérile	16,29 mL
Solution de blocage	6 mL
SSC 20x	7,5 mL
Sarkosyl 20%	150 µL
SDS 10%	60 µL

3.3.8.5 Hybridation

Dans un premier temps, la sonde est mise à bouillir pendant 10 minutes pour assurer sa dénaturation et un potentiel maximal d'hybridation à l'ADN fixé sur la membrane de nitrocellulose.

La solution ayant servi à la préhybridation est jetée et remplacée par du tampon de préhybridation frais préchauffé à 60°C auquel est ajoutée la quantité suffisante de sonde pour assurer une concentration finale en radioactivité de 2 millions de CPM par mL de tampon (mélange d'hybridation). Le tube est remplacé pour 4 à 16 heures dans le four à hybridation à 60°C.

3.3.8.6 Lavages

Ici encore, il est important que les deux solutions de lavages, dénommées simplement solution 1 et 2, soient conservées à 60°C. Après s'être débarrassé du mélange d'hybridation de la manière recommandée pour les solutions radioactives et avoir préhumidifié le contenu du tube à hybridation, deux lavages de 15 minutes sont effectués avec la solution 1. Les mêmes étapes sont alors répétées pour la solution 2. La membrane est enfin sortie du tube et placée dans un papier cellophane soigneusement replié pour en éviter le dessèchement.

Solution 1		Solution 2	
SSC 20x	1x	SSC 20x	0,1x
SDS	0,1 %	SDS	0,1 %
Lauryl sarcosyl	0,02 %	Lauryl sarcosyl	0,02 %

3.3.8.7 Exposition / révélation

Dans une cassette Spectroline de 8x10 pouces (Spectronics Corporation, Westbury, USA), un film Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) est exposé de quatre heures à deux semaines avec ou sans écran intensificateur (Kodak BioMax MS Intensifying Screen), puis révélé au Mini-Med/90 X-Ray Processor (AFP Imaging, USA).

3.4 Cultures et techniques de transformations

3.4.1 *Escherichia coli*

3.4.1.1 Souches et milieux de culture

Les différentes souches utilisées dans ce projet (XL1 Blue (Stratagene), DH1, ...) sont, sauf avis contraire, cultivées 16 heures en milieu LB (Luria-Bertani ou Lysogeny Broth (Bertani 2004)), liquide ou solide (1,5 % d'agar), additionné de 100 µg de l'antibiotique ampicilline (Roche) par mL de milieu lorsqu'une sélection était nécessaire.

Milieu LB (Luria-Bertani ou Lysogeny Broth)

Tryptone 10 g

Extraits de levure 5 g

Chlorure de sodium (NaCl) 10 g

Pour LB agar, ajouter 15 g d'agar.

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et autoclaver.

Pour leur conservation, toutes les souches originelles ainsi que celles obtenues lors de ce projet ont été placées en stock glycérol (LB + quantité suffisante de glycérol (Fisher) pour avoir une concentration finale de 17 %, conservation à -80°C).

3.4.1.2 Préparation de cellules électrocompétentes

Le protocole employé a été tiré du manuel édité par Sambrook *et al.* (1989). Les étapes en sont les suivantes.

Dix microlitres du stock glycérol de la souche d'intérêt sont inoculés dans un Erlenmeyer de 250 mL à 20 mL de LB liquide et le tout est placé pendant 16 heures dans un incubateur LabLine Shaker (Lab-Line Instruments Inc., USA) à 37°C sous agitation (250 rpm). Cinq millilitres de cette culture sont ensuiteensemencés dans un Erlenmeyer de 2 L contenant 500 mL de LB et laissés incubés dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ (Densité Optique à 600 nm) de 0,6 (mesures effectuées sur le

spectrophotomètre habituel). Les cellules sont alors refroidies 15 à 30 minutes sur glace puis réparties dans deux bouteilles à centrifugation pour rotor JA10 de centrifugeuse Beckman. Les cellules sont alors centrifugées dans le rotor JA10 à 4500 rpm à une température de 4°C dans une centrifugeuse Beckman Model J2-21 Centrifuge (Beckman). En travaillant sur glace le plus possible, le surnageant d'une première bouteille à centrifugation est décanté et le culot est resuspendu dans 25 mL d'eau MilliQ froide (4°C) stérile par agitation et non par pipetage. Cette suspension cellulaire est alors transférée à la deuxième bouteille à centrifugation et sert à son tour à resuspendre le culot de celle-ci. Cent millilitres d'eau MilliQ sont ensuite ajoutés. Ces étapes sont répétées une deuxième fois à partir de la centrifugation. Ensuite, une nouvelle centrifugation se fait dans les mêmes conditions. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 5 mL de glycérol 10 % stérile qui sont ensuite transférés dans un tube de centrifugation de 13 mL (Sarstedt) puis centrifugés, à l'aide d'un adaptateur pour rotor JA20 (Corning, USA), à 4500 rpm dans un rotor JA20 pendant 22 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite retiré et le culot resuspendu dans 500 µL de glycérol 10 % stérile. Les cellules, qui sont alors prêtes, sont réparties en aliquots de 50 µL dans des tubes Eppendorf de 1,7 mL et placées à -80°C pour conservation.

3.4.1.3 Transformation par électroporation et sélection

L'électroporation consiste à faire entrer grâce à un fort champ électrique du matériel étranger, souvent de l'ADN, à l'intérieur d'une cellule. Le protocole utilisé, tiré des recommandations du fabricant de l'électroporateur Gene Pulser (BioRad), est le suivant :

D'abord, une précaution importante ici est de garder sur glace les cellules, les cuvettes d'électroporation ainsi que l'ADN à transformer. L'ADN issu de la ligation, précipité et resuspendu dans 5 µL d'eau MilliQ stérile, est ajouté aux cellules électrocompétentes. Le tout est transféré à une cuvette d'électroporation de 1 mm (BioRad). L'électroporation en tant que telle se fait grâce au Gene Pulser (BioRad) selon les paramètres du fabricant, soient à un voltage de 1,6 kV, une résistance de 400 Ω et une

capacitance de 25 μ F. Les cellules sont ensuite récupérées grâce à 1 mL de milieu SOC et incubées dans un tube à culture stérile en polystyrène (Simport) à 250 rpm pendant une heure à 37°C dans l'incubateur LabLine Shaker. 100 μ L de cette suspension sont ensuite ensemencés sur une première gélose LB contenant de l'ampicilline à 100 μ g / mL de milieu pour la sélection. Le volume restant (soit environ 900 μ L) est centrifugé à 6000 x g pendant 1 minute. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 100 μ L de PBS 1x stérile. Ceux-ci sont ensemencés de la manière décrite ci-dessus sur une deuxième gélose. Les cellules sont incubées 16 heures (ou jusqu'à l'apparition de colonies si nécessaire) à 37°C.

SOC

À 1 L de SOB, ajouter 10 mL de $MgCl_2$ 1M stérile et 20 mL de glucose 1M stérile. Il doit être préparé frais pour chaque transformation.

SOB		PBS (Phosphate-Buffered Saline) 10x	
Tryptone	20 g	NaCl	80 g
Extraits de levure	5 g	KCl	2 g
NaCl	0,5 g	Na_2HPO_4	14,4 g
KCl à 250 mM	10 mL	KH_2PO_4	2,4 g
Compléter à 900 mL d'eau distillée.		Compléter à 900 mL d'eau distillée.	
Ajuster le pH à 7 et compléter à 1 L.		Ajuster le pH à 7,4 et compléter à 1 L.	

3.4.2 *Klebsiella aerogenes*

Cette souche nous a été fournie par le laboratoire du Dr Tsang, de l'Université Concordia à Montréal. La culture se fait sur gélose SM agar (voir section 3.4.3.3.2, bactéries vivantes), durant 16 heures, dans un contenant plastique dont le fond est couvert d'un papier absorbant humidifié, et placé dans un incubateur Low Temperature Incubator Model 146 (Fisher) à 22°C. Pour sa conservation à -80°C, cette souche est placée en stock glycérol (15 % de glycérol + LB).

3.4.3 *Dictyostelium discoideum*

3.4.3.1 Souche

La souche utilisée dans ce travail est AX2 et nous a été fournie par le laboratoire du Dr Tsang, de l'Université Concordia à Montréal. La souche AX2 est une descendante de la souche NC4 issue d'un isolement à partir du milieu naturel. Elle a été sélectionnée sur plusieurs générations, mais sans ajout d'agents mutagènes, pour ses capacités à croître en milieu axénique (lien 2) (www.dictybase.org).

3.4.3.2 Conservation

Deux techniques principales existent mais la durée durant laquelle la survie des cellules ou des spores est assurée varient selon les sources (pour un résumé voir www.dictybase.org (liens 3 et 4)), de même que divers autres paramètres. Voici les versions que nous avons choisies, parce qu'elles semblaient faire consensus.

3.4.3.2.1 DMSO

Les cellules sont cultivées en milieu liquide HL5 agité et 5×10^7 d'entre elles sont récoltées dans un tube conique de 15 mL (Corning, USA) lorsqu'elles atteignent environ la densité de 2×10^6 cellules / mL. Plusieurs tubes par souche à congeler sont ainsi préparés car plusieurs paramètres de stockage seront appliqués. Les cellules sont alors centrifugées à 1500 rpm à 4°C pendant 5 minutes dans la centrifugeuse Sorvall Legend RT (Sorvall) équipée du rotor Round bucket 75006441 contenant le support à tubes 12 puits (Heraeus). Le milieu est décanté et les cellules sont resuspendues dans du KK2 1 x pour lavage grâce à une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions. Le tampon est retiré et remplacé par 1 mL de milieu HL5 frais supplémenté de DMSO Hybri-Max (Sigma) dont la concentration finale est de 7,5 ou 10 %. Il est à noter que le DMSO doit absolument être de qualité « culture cellulaire » (par exemple, le DMSO Hybri-Max) sinon la survie chute drastiquement. Les cellules sont resuspendues et transférées dans

des tubes à bouchon vissés de 2 mL (Sarstedt) placés préalablement sur glace. Le refroidissement devant se faire lentement, les cellules sont laissées quelques minutes sur glace, quelques heures à - 20°C, une nuit à - 80°C où une partie des tubes sont laissés, l'autre partie étant déposée à - 150°C.

Pour repartir des cellules ainsi stockées, le contenu complet d'un tube est dégelé car la survie n'est que de 1 à 10 %. Il est transféré dans un vase de Pétri 100 mm dans 10 mL de HL5 liquide. Le lendemain, le milieu est changé pour se débarrasser du DMSO et la sélection est ajoutée si nécessaire.

3.4.3.2.2 Grains de silice

Le matériel à préparer au préalable consiste d'abord en du lait en poudre de la marque Carnation dilué à 5 % dans de l'eau distillée et filtré pour stérilisation. Il faut ensuite préparer des tubes à bouchons vissés de 2 mL (Sarstedt) contenant environ 1 mL de grains de silice Silica Gel Dessicant 3-8 mesh (Fisher), les faire cuire à 180°C pendant 90 minutes au four à chaleur sèche pour en retirer toute l'humidité et les rendre stériles. Enfin, nous utilisons de la silice contenant un indicateur coloré Silica Gel Dessicant (Fisher), qui vire au rose lorsqu'elle se charge en humidité. Elle est également cuite au four à chaleur sèche dans les mêmes conditions. Elle est ensuite déposée dans le fond de la boîte dans laquelle seront stockés les tubes contenant les spores sur grains de silice, pour s'assurer de leur conservation dans les conditions les plus sèches possibles.

Trois géloses SM sont préparés avec des *D. discoideum* laissés à sporuler (voir section 3.4.3.3.2, bactéries vivantes). Lorsque toutes les bactéries ont été consommées, et que les spores se sont formées, les spores d'une première gélose sont décrochées vers le couvercle du vase de Pétri, en tapant celui-ci sur une surface solide. La même méthode est appliquée pour les deux autres vase de Pétris, en conservant le même couvercle à chaque fois. À partir de ce moment, tout le matériel utilisé ainsi que les cellules doivent être à 4°C, en particulier les grains de silice. En effet, leur hydratation entraîne un fort dégagement de chaleur qui pourrait tuer les spores. Les spores sont resuspendues dans

500 µL du lait à 5 % et le contenu en silice de quatre tubes est versé dans ce mélange. À l'aide d'une pince stérile, les grains de silice sont déplacés dans le couvercle pour absorber le lait et les spores. Ils sont ensuite remis dans les tubes, qui sont immédiatement refermés et placés dans la boîte prévue à cet effet (avec la silice colorée dans le fond). La boîte est scellée avec du parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA) et placée à 4°C.

La technique pour répartir des spores ainsi stockées est décrite à la section 3.4.3.3.2, bactéries vivantes.

3.4.3.3 Techniques de culture

Le Tableau 3 illustre les techniques de culture possibles et leur fonction. Toutes les manipulations reliées à la culture de *D. discoideum* ou de *K. aerogenes* se font sous une hotte de culture cellulaire Steril Guard Hood (the Baker Company Inc., USA). La culture en tant que telle se fait dans un incubateur à 22°C, température optimale pour *D. discoideum* (Kessin 2001; Pintsch *et al.* 2001), à l'abri de la lumière. En effet, et ceci est surtout pertinent pour les cultures non agitées, *D. discoideum* se déplaçant vers la lumière (Kessin 2001), cette consigne doit donc être respectée pour avoir une culture répartie uniformément ou pour éviter de voir des colonies se déplacer trop rapidement. De plus, pour toutes les cultures en vase de Pétri ou en plaques 6 et 24 puits, celles-ci sont placées dans des contenants plastiques dont le fond est couvert d'un papier humide. À titre indicatif, il faut remarquer qu'une dizaine de cellules de *D. discoideum* sauvage met environ 2 semaines pour recouvrir un vase de Pétri liquide ou former une plaque de lyse. Ces temps peuvent être allongés pour les souches modifiées.

Il est à noter que beaucoup de publications (Metz *et al.* 1983; Cosson *et al.* 2002) suggèrent de n'utiliser que les produits de la marque Oxoid pour le dextrose, le protéose peptone, le peptone bactériologique et les extraits de levure entrant dans la composition des milieux de culture de *D. discoideum*.

Tableau 3 : Résumé des différents milieux et techniques de culture de *D. discoideum* ainsi que leur utilisation.

La température optimale de culture est de 22°C.

	Milieu	Utilisation
HL5 (axénique)	Agité (150 rpm)	Maintien
	Pétri ou plaque 6 à 24 puits	Transformation / clonage
	Agar + agar mou	Transformation / clonage
SM (bactéries)	Bactéries vivantes	- Sporulation
		- Repartir une culture
		- Isolement
	Bactéries tuées à la chaleur	Souches à croissance trop lente

3.4.3.3.1 Milieu axénique

Pour des raisons pratiques, des souches capables de pousser sur milieu nutritif sans bactérie (= axénique) ont été isolées il y a une trentaine d'années environ ((Kessin 2001) (p. 64)). *D. discoideum* se nourrit alors par macropinocytose. Le milieu mis au point pour supporter une telle culture s'appelle HL5 (Ashworth et Watts 1970). À ce milieu fut ajouté de la streptomycine à 200 µg / mL (Sigma) pour les premiers mois, puis remplacé par le mélange Antibiotic-Antimycotic à 100 µg / mL (Invitrogen).

Milieu HL5

Dextrose	16 g
Protéose peptone	14 g
Extraits de levure	7 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Na ₂ HPO ₄	0,95 g

Compléter à 1 L et conserver à 4°C à l'abri de la lumière.

HL5 agar : ajouter de l'agar à une concentration finale de 5 g / L.

HL5 agarose mou : ajouter de l'agarose gélifiant à basse température (8 à 17°C)

Sea-Prep Agarose (Cambrex) à une concentration finale de 1,2 g / L.

Il est de plus recommandé d'ajouter à une concentration 1x le mélange de vitamines suivant :

Vitamines 20x (Franke et Kessin 1977)

Biotine (4 mg / L de NaHCO ₃ à 10 mM)	100 mL
Cynocobalamine (5 mg / L)	20 mL
Acide folique (40 mg / L de NaHCO ₃ à 10 mM)	100 mL
Acide lipoiique (80 mg / L de NaHCO ₃ à 10 mM)	100 mL
Riboflavine (100 mg / L de NaHCO ₃ à 10 mM)	100 mL
Thiamine.HCl (120 mg / L)	100 mL
Compléter à 1 L et conserver à -20°C.	

D'une part, le milieu HL5 peut être utilisé sous forme liquide. Les cellules sont placées dans un volume de HL5 ne représentant pas plus de 20 % de l'Erlenmeyer dans lesquelles elles se trouvent pour assurer une aération optimale. La culture se fait dans l'incubateur Low Temperature Incubator Model 146 (Fisher) à 22°C, sous agitation à 150 rpm sur le Lab-Rotor (Lab-Line, USA). Pour avoir un temps de génération optimal, soit 8-10 heures, les cellules doivent être conservées en phase exponentielle, c'est-à-dire à des concentrations comprises entre $2,5 \times 10^5$ et 5×10^6 cellules par mL. En dessous de la concentration minimale, se produit une période de latence dont la durée est difficile à prévoir et au dessus de la concentration optimale, la croissance atteint un plateau. Les cellules en culture liquide agitée ont donc l'inconvénient de devoir être comptées et transférées tous les 2 jours environ. De plus, il est conseillé de ne les garder qu'un mois en culture liquide agitée et de repartir à partir de spores tous les mois. Lorsqu'une sélection est nécessaire, 10 µg de blasticidine (Invivogen) ou 30 µg de G418 Sulfate (GibcoBRL) par mL de HL5 peuvent être ajoutés au besoin.

Il est également possible d'utiliser le milieu HL5 liquide en culture non agitée, en vase de Pétri ou en plaque 6 ou 24 puits (Corning, USA), et incubée dans les conditions standard (boîte + papier humide + 22°C). Les cellules sont alors collées au fond du récipient et nécessitent beaucoup moins d'entretien. Le milieu y est changé une à deux fois par semaine.

D'autre part, *D. discoideum* peut également être cultivé en milieu HL5 solide. Dans un premier temps, 15 mL de HL5 agar sont coulés et laissés à solidifier dans un vase de Pétri. Ensuite, la quantité de cellules de *D. discoideum* désirée est mélangée à 5 mL de HL5 agarose mou, et le tout est coulé sur la base de HL5 agar. Le tout est placé à 4°C pour permettre à l'agarose mou de solidifier, car il n'en est pas capable à température pièce. Cette méthode permettant d'obtenir des clones isolés, la quantité de *D. discoideum*ensemencée est calculée pour avoir moins de 200 colonies par vase de Pétri au final. L'avantage de cette technique est que les cellules restent capables de se multiplier tout en étant restreintes dans leur mouvement. Une colonie restera donc clairement isolée, d'autant plus que ce milieu riche et emprisonnant les cellules, ne permet pas la sporulation. La sélection est ici aussi possible mais les concentrations en antibiotique sont toutefois adaptées : 40 µg / mL pour la blasticidine ou 100 µg / mL pour le G418, aussi bien dans le HL5 agar et que dans le HL5 agarose mou. La blasticidine a toutefois l'inconvénient d'avoir un effet statique plutôt que toxique sur les *D. discoideum* non résistants en milieu solide (Faix *et al.* 2004).

3.4.3.3.2 Milieu SM avec bactéries

Ici, ce sont les bactéries qui servent de source d'alimentation. Le milieu SM ne sert qu'à nourrir les bactéries. Des bactéries tuées à la chaleur peuvent également être utilisées, et le milieu ne sert alors que de support physique.

Milieu SM ((Sussmann 1966), p 397-410)

MgSO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	2,2 g
Dextrose	10 g
Peptone bactériologique	10 g
Extraits de levure	1 g
Agar	15 g

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée.

Pour un rendement optimal, 35 mL de milieu doivent être coulés par vase de Pétri.

Bactéries vivantes

Des bactéries de l'espèce *K. aerogenes* cultivées au préalable sont récoltées grâce à un fil bouclé jetable et resuspendues dans le volume désiré de tampon KK2 1x pour atteindre environ la densité d'une culture de 16 heures. Deux possibilités existent alors. Si les *D. discoideum* sont sous forme unicellulaire, ils sont directement mélangés dans un tube de 1,7 mL à 200 µL du mélange bactéries-tampon et ensemencés tels quels sous forme de tapis uniforme sur une gélose SM. S'ils sont sous formes de spores stockées sur grain de silice, 200 µL de la suspension bactérienne sont alors ensemencés directement sur gélose SM. Après séchage, quelques grains de silice (4 à une dizaine) sont déposés sur le vase de Pétri et le couvercle est refermé. Pour assurer une bonne répartition des spores, le vase de Pétri est secoué vigoureusement plusieurs secondes. Dans les deux cas, les géloses sont incubées dans les conditions standard (boîte + papier humide + 22°C). Les bactéries poussant beaucoup plus rapidement, un tapis bactérien apparaîtra avant que des plaques de lyse correspondant aux cellules de *D. discoideum* en train de se nourrir et de se multiplier ne se dévoilent. Lorsque toutes les bactéries ont été consommées, les *D. discoideum* n'ont plus de source de nourriture et ils entrent alors en développement, jusqu'à former des spores.

KK2 10x

KH_2PO_4 22 g

K_2HPO_4 7 g

Compléter à 1 L et conserver à 4°C.

Bactéries tuées à la chaleur (Lloyd *et al.* 1990)

Le principe est exactement le même que pour les bactéries vivantes, à trois exceptions près. D'abord, les bactéries sont tuées à la chaleur par un traitement à 70°C pendant 10 minutes (Lloyd *et al.* 1990). Ensuite, la suspension bactérienne est préparée de manière à être beaucoup plus dense puisque elle représente une source de nourriture non renouvelable. Enfin, les *D. discoideum* y seront moins nombreux à se multiplier, à cause de la quantité de nourriture limitée, et ne pourront peu ou pas y produire de spore.

3.4.3.4 Transformations

3.4.3.4.1 Par électroporation

Plusieurs techniques ont été testées, avec différents électroporateurs.

La première décrite ici (mais plus tardive dans le cours de ce projet) est une adaptation du protocole fourni avec l'électroporateur Gene Pulser Xcell (Biorad). Les cellules cultivées en milieu liquide HL5 agité sont récoltées en phase exponentielle et 10^7 d'entre elles sont mises dans un tube conique de 15 mL (Corning, USA). Plusieurs tubes sont ainsi préparés à chaque transformation pour pouvoir transformer plusieurs quantités d'ADN et faire des contrôles. Les cellules sont alors collectées à 1500 rpm à 4°C pendant 5 minutes dans la centrifugeuse Sorvall Legend RT équipée du rotor Round bucket 75006441 contenant le support à tubes 12 puits (Heraeus). Elles sont lavées deux fois avec le tampon E BioRad et resuspendues dans 800 µL de ce même tampon au final. Tout le matériel ainsi que les cellules doivent par la suite être refroidis à 4°C. Les cellules sont ensuite mélangées à la quantité voulue d'ADN (en général deux quantités sont testées par transformation) et transférées dans une cuvette à électroporation de 0,4 cm (BioRad). L'électroporation se fait alors selon le programme préinstallé dans le Gene Pulser Xcell qui consiste en deux chocs électriques (signal carré, 1 kV, 10 µF) d'une milliseconde chaque, espacés de cinq secondes. Les cellules sont ensuite remises dans un vase de Pétri contenant du milieu liquide HL5 et cultivées dans les conditions standard (boîte + papier humide + incubateur à 22°C). La sélection n'est commencée que le lendemain, tout comme le clonage (voir section 3.4.3.5).

Tampon E BioRad

NaH ₂ PO ₄ (100 mM, pH ajusté au KOH à 6,1)	10 mL
Sucrose 0,5 M	10 mL
Compléter à 100 mL avec de l'eau distillée et autoclaver.	

La seconde technique utilise l'électroporateur Gene Pulser (BioRad). Les étapes générales sont les mêmes que pour le protocole de Biorad (culture, récolte en phase exponentielle, lavage, mélange à l'ADN, électroporation) mais plusieurs paramètres peuvent être variés pour obtenir le résultat voulu. Le premier paramètre est la quantité de cellules, allant de $2-5 \times 10^6$ à 10^7 par transformation, prévues pour des cuvettes de 0,1 ou 0,4 cm respectivement. Le tampon varie également : H50 ou tampon E. Enfin, deux groupes de paramètres d'électroporation sont possibles, les deux utilisant une version modifiée du module de résistance du Gene Pulser : $3 \mu\text{F} / 0,8-1 \text{ kV} / 5 \Omega$ (Knecht et Pang 1995) ou $25 \mu\text{F} / 1,2-1,5 \text{ kV} / 5 \Omega$ (Pang *et al.* 1999).

H50 (Knecht et Pang 1995)		Tampon E (Knecht et Pang 1995)	
HEPES	20 mM	Phosphate de potassium (pH 6,1)	10 mM
KCl	50 mM	Sucrose	50 mM
NaCl	10 mM		
MgSO ₄	1 mM		
NaHCO ₃	5 mM		
NaH ₂ PO ₄	1 mM		
Ajuster à pH 7,0			

3.4.3.4.2 Chimique (Nellen *et al.* 1984)

La première étape consiste à préparer les cellules. À partir d'une culture HL5 liquide en phase exponentielle, 10 mL sont prélevés, transférés dans un vase de Pétri de 100 mm de diamètre et laissés reposer 30 minutes pour que les cellules puissent y adhérer. Le milieu est ensuite retiré avec une pipette Pasteur stérile pour être remplacé par 10 mL de milieu MOPS.

Pour adapter les cellules à ce nouveau milieu, elles sont laissées de nouveau 30 minutes au repos. Pendant les deux temps d'incubation précédents, l'ADN est préparé en ajoutant 40 μg dans 600 μL d'HBS 2x et 600 μL d'eau MilliQ. Le tout est mélangé au vortex pendant que sont ajoutés lentement 78 μL de CaCl₂ 2M stérile (concentration

finale = 125 mM). Ce mélange est laissé 30 minutes à température pièce et un précipité devrait apparaître. Suit ensuite la transformation au CaCl₂. Pour cela, le milieu MOPS est complètement retiré du vase de Pétri avec une pipette Pasteur stérile, avant d'ajouter le précipité d'ADN. Le vase de Pétri est alors agité doucement pour répartir l'ADN, laissé incubé 30 minutes avant d'y adjoindre 10 mL de milieu MOPS. Il s'ensuit une incubation de 3 à 6 heures dans une boîte avec papier humide à 22°C pour laisser l'ADN coller aux cellules.

Enfin, vient le choc glycérol pour faire rentrer l'ADN à l'intérieur des cellules. Une solution à 18 % de glycérol est préparée fraîche comme suit : 3 mL de glycérol 60 %, 2 mL d'eau MilliQ et 5 mL de HBS 2x. Le milieu MOPS est retiré avec une pipette Pasteur stérile et remplacé par 2.5 mL de glycérol 18 % ajouté lentement. Après une incubation de 5 minutes, le glycérol est retiré lentement (car les cellules sont facilement détachables à cette étape) avec une pipette Pasteur stérile. Les cellules sont ensuite cultivées de manière standard (10 mL de HL5 + boîte avec papier humide + incubateur à 22°C). Le lendemain, la sélection commence avec le changement de milieu, remplacé par du milieu contenant l'antibiotique approprié.

HEPES-buffered saline (HBS) 2x		Milieu MOPS	
NaCl	8 g	Extraits de levure	2,5 g
KCl	0,36 g	Protéose peptone	5 g
Na ₂ HPO ₄	0,1g	Dextrose	5 g
HEPES	5 g	MOPS	0,65 g
Dextrose	1 g	Ajuster à pH 7,05 avec du NaOH.	
Ajuster à pH 7,05 avec du NaOH.		Compléter à 500 mL.	
Compléter à 500 mL.		Autoclaver et stocker à 4°C.	
Stériliser par filtration			
Stocker à -20°C.			

3.4.3.5 Clonage

Les deux techniques de transformations de *D. discoideum* utilisées dans ce projet permettent d'obtenir des cellules transformées dans un vase de Pétri de 100 mm. Le principal inconvénient est donc que tous les clones se trouvent dans le même récipient ce qui pose problème lorsque le nombre de colonies dépasse un certain seuil ou même si celui reste faible, *D. discoideum* étant mobile, les colonies ne restent pas longtemps isolées. Pour remédier à cela, nous avons choisi de tester plusieurs méthodes.

La première consiste à repiquer individuellement dans un nouveau récipient (vase de Pétri 100 mm ou plaque 6 à 24 puits) les colonies qui semblent isolées dès leur apparition. Pour cela, les colonies à repiquer sont repérées au microscope en entourant leur position sur le dessous du vase de Pétri original. Ensuite, celui-ci est vidé de son milieu et les colonies sont récupérées individuellement à l'aide de quelques dizaines de μL de HL5 frais, pipeté et rejeté plusieurs fois dans la zone entourée pour décrocher les cellules. Ces dernières sont alors transférées dans leur nouveau contenant et cultivées selon les méthodes standard, en conservant la sélection. L'avantage principal de cette technique est que les cellules restent toujours en milieu liquide, ce qui permet d'en produire facilement en quantité suffisante pour pouvoir les tester (extraction ADN, PCR, etc). Les deux inconvénients majeurs sont qu'elle nécessite beaucoup de surveillance, et que les colonies peuvent se dessécher. En effet, le vase de Pétri étant vidé de son milieu pendant l'étape de transfert, les cellules ont alors tendance à mourir très vite.

La deuxième technique est moins directe, nécessite moins de surveillance mais est plus longue. Elle consiste à laisser les colonies apparaître et grossir. Lorsque la croissance est jugée suffisante, le milieu du vase de Pétri original est retiré et la plus grande partie des cellules est décrochée à l'aide d'1 mL de HL5 frais, pipeté et rejeté plusieurs fois. Les cellules sont ensuite comptées et diluées en série dans du KK2 1x, pour être sûr de n'avoir qu'entre 40 et 200 cellules dans le volume choisi, en général 200 μL . Deux possibilités existent alors. Soit les cellules sont repiquées en milieu SM avec bactéries

vivantes. Soit elles le sont en milieu HL5 agar / HL5 agarose mou. Les techniques de culture standard s'appliquent ensuite. L'inconvénient de cette méthode est que pour pouvoir tester ces colonies, elles devront de nouveau être transférées en milieu liquide pour être produites en quantité suffisante. Cela a donc pour effet de rallonger la procédure. En effet, le retour en milieu liquide nécessite de découper à l'aide d'une lame de scalpel n°15 (Fisher) la portion d'agar qui contient la colonie et de la mettre dans un nouveau récipient contenant du HL5 liquide. Un problème se pose alors pour le milieu SM avec bactéries vivantes : comme celles-ci se multiplient plus rapidement que *D. discoideum*, elles peuvent prendre le dessus par rapport à lui en milieu liquide. Pour répondre à ce problème, la concentration en Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen) est doublée. Une autre possibilité est de laisser la colonie entrer en développement et former une spore. Celle-ci est alors recueillie, sans toucher au milieu, à l'aide d'un fil bouclé en plastique stérile jetable Ino-Loop (Simport) et transférée en milieu liquide. Dans tous les cas, il faut ensuite laisser les cellules se multiplier suffisamment.

La dernière technique testée combine les avantages des deux précédentes. Elle consiste à décrocher les cellules dès le lendemain de la transformation à l'aide d'1 mL de HL5 frais, pipeté et rejeté plusieurs fois. Comme le nombre de transformants n'est pas encore connu puisque la sélection n'a pas encore été appliquée, des dilutions en série sont effectuées etensemencées en HL5 agar / agarose mou. L'avantage ici est de raccourcir d'au moins 2 semaines l'expérience par rapport à la deuxième méthode de clonage décrite plus haut, mais l'inconvénient majeur est que, comme les cellules n'ont pas eu le temps de se multiplier en colonie, il est très facile de passer à côté lors de l'étape de décrochage. Il est donc sage de conserver tout de même le vase de Pétri original dans cette situation, auquel il sera toujours possible d'appliquer une des deux autres méthodes de clonage décrites ci-dessus.

3.5 Expression chez *Escherichia coli*

3.5.1 Clonage dans le plasmide pBad

La stratégie consiste à insérer le gène d'intérêt dans le vecteur pBad24 (Khlebnikov *et al.* 2000) à expression inductible à l'arabinose. Ce vecteur est présent en grand nombre de copies et confère la résistance à l'ampicilline. Ce système est couramment utilisé au laboratoire pour évaluer les capacités de transport des métaux divalents par les protéines de la famille Nramp (Makui *et al.* 2000). Nous avons donc envisagé de l'utiliser pour exprimer les deux protéines Nramp de *D. discoideum* dans *E. coli* (Figure 7).

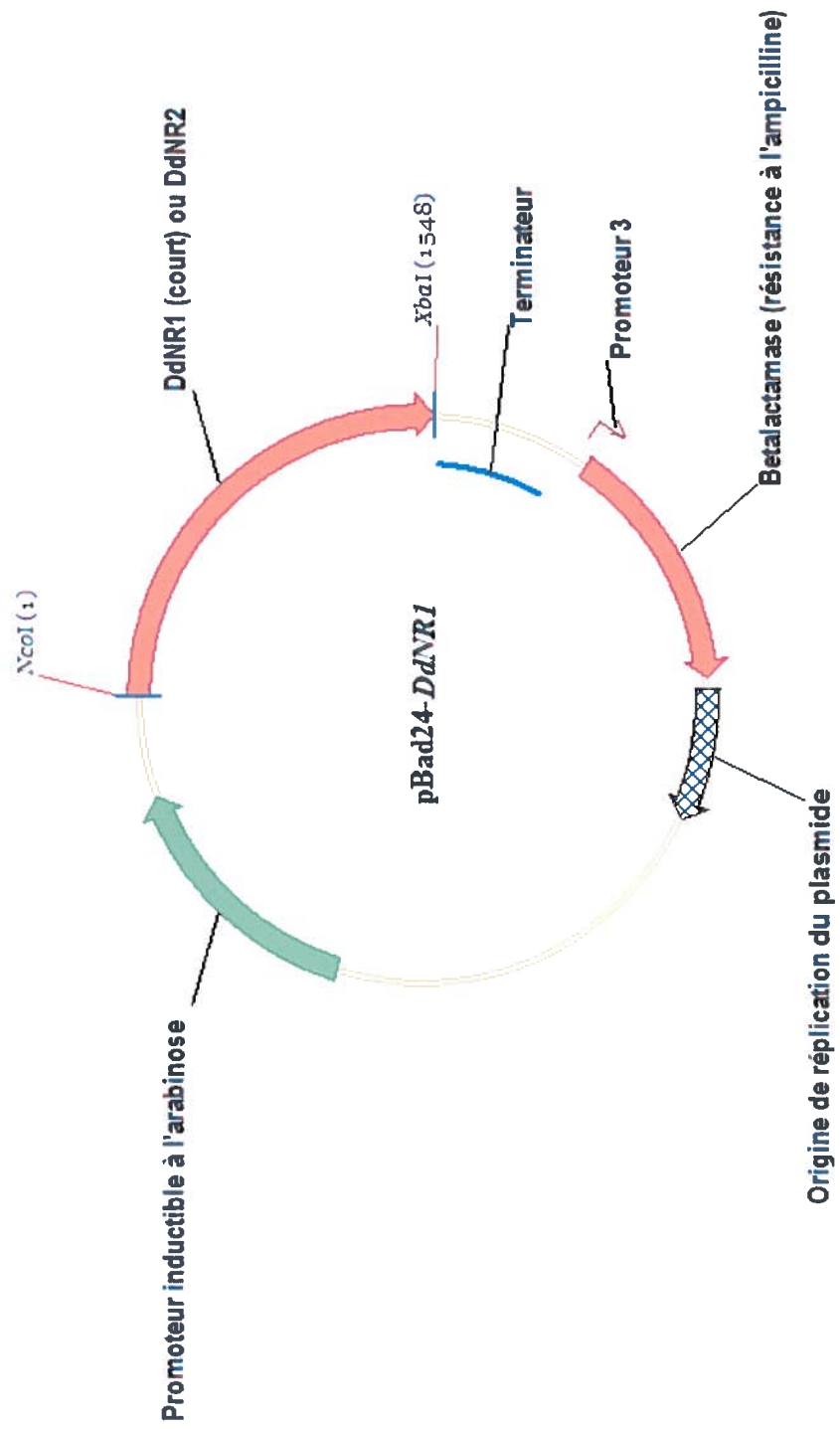
Plusieurs essais de clonage de *DdNR2* ont été faits mais aucun n'a donné de résultats, sans doute à cause de la présence l'intron.

Pour le gène *DdNR1*, nous avons choisi de travailler avec la version courte du gène pour optimiser les chances d'expression chez *E. coli*. Les amorces utilisées pour la PCR ont été Dd1F1 (ajoutant le site de restriction pour *NcoI*) et Dd1R1 (ajoutant le site de restriction pour *XbaI*) (Tableau 1). Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés grâce au kit PCR purification de Qiagen selon le protocole du fabricant. Le fragment purifié, vérifié par *KpnI* et *ClaI*, a été digéré, tout comme le plasmide, par *NcoI* et *XbaI* (section 3.3.4), puis utilisés pour la ligation (section 3.3.5). Enfin, est venue la transformation par électroporation suivie de la sélection des clones, ayant acquis le vecteur contenant ou non l'insert, sur milieu LB supplémenté d'ampicilline.

Plusieurs colonies isolées ont été repiquées dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté d'ampicilline pour les utiliser dans une Miniprep manuelle (voir section 3.3.6.1). L'ADN ainsi obtenu a été testé avec les enzymes de restriction *KpnI*, *ClaI*, *NcoI* et/ou *XbaI* pour identifier les clones contenant *DdNR1* court intégré dans pBad24. Enfin, l'ADN d'un clone supposé bon a été envoyé à un service de séquençage pour vérification définitive.

Figure 7: Stratégie de clonage dans pBad24, vecteur d'expression dans *E. coli* inducible à l'arabinose.

Les sites *Nco*I et *Xba*I ont été utilisés pour l'insertion du gène d'intérêt.



3.5.2 Expression

Deux tests sont couramment utilisés au laboratoire pour vérifier la fonction de transporteur de Me^{2+} des protéines de la famille Nramp exprimées dans *E. coli*.

3.5.2.1 « Disc assay » ou test de diffusion radiale des métaux

Le premier test utilise la souche *E. coli* DH11S $\Delta mntH$ construite au laboratoire (Makui *et al.* 2000) transformée avec le vecteur pBad24 contenant le gène de la protéine Nramp à étudier, ici DdNR1. Deux témoins sont aussi utilisés : une souche de *E. coli* DH11S $\Delta mntH$ contenant uniquement le vecteur pBad24 (témoin négatif) et une souche contenant *E. coli* DH11S $\Delta mntH$ possédant le vecteur pBad24-NX1.1 (témoin positif), NX1.1 étant le gène *mntH* natif de *E. coli*. Deux clones (clones 1 et 12) ont été utilisés, dont seul le premier a été vérifié par séquençage. Tout d'abord, la concentration optimale d'arabinose permettant l'induction de l'expression non toxique de la protéine DdNR1 par pBad24 a été déterminée. Pour cela, des cultures agitées à 250 rpm de 16 heures à 37°C en milieu LB supplémenté d'ampicilline à 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (LB-ampi) ont été réalisées avec les clones 1 et 12, et avec la souche contenant pBad24 seul comme contrôle. Les suspensions ainsi obtenues étaient ajustées à une DO_{600} de 0.5 et diluées 1 / 100 dans du LB-ampi. Ces cultures diluées ont ensuite été incubées avec plusieurs concentrations d'arabinose (6×10^{-2} à $6 \times 10^{-5}\%$), à 37°C et 250 rpm. Pour évaluer la toxicité de l'induction à l'arabinose, la DO_{600} était mesurée pour chaque culture après 6 heures. La concentration d'arabinose optimale a donc été déterminée à $6 \times 10^{-3}\%$ (voir section 4.4) et a été utilisée pour l'étape suivante de détermination de la fonction de DdNR1. Pour cela, la sensibilité aux métaux habituellement transportés par les protéines Nramp a été évaluée en soumettant les clones 1 et 12, ainsi que les deux contrôles décrits plus haut au test du « disk assay ». Des cultures de 16 heures en bouillon GTA contenant 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'ampicilline ont été ajustées à une DO_{600} de 0,5-0,55 en bouillon GTA. Des vases de Pétris de milieu GTA agar contenant 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'ampicilline et $6 \times 10^{-3}\%$ d'arabinose ont ensuite été préparés. Cent microlitres des suspensions ajustées à une DO_{600} de 0,5-0,55 ont ensuite été ensemencés dans 3 mL de GTA préparé comme dans les vases de

Pétris mais à 0,6% d'agar seulement puis le tout a été coulé sur les vases de Pétris et laissé à solidifier. Chaque vase de Pétri recevait alors 3 disques faits de papier filtre imbibé de 10 µL d'une solution d'un des métaux suivants : FeSO₄ à 1 M, CoCl₂ à 0,25 M ou CdCl₂ à 0,125 M. Les géloses ont été incubées 16 heures à 37°C.

Comme les bactéries ne peuvent pas pousser en présence de doses toxiques de métaux, l'observation d'une différence du diamètre d'inhibition de croissance autour des disques entre les cellules du témoin négatif pBad24 et le plasmide recombinant testé indique une capacité de transport des métaux par la protéine testée.

Milieu GTA

K ₂ HPO ₄	3 g
NaH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
NH ₄ Cl	1 g
D(+)-tréhalose	10 g
Acide L-glutamique	1 g

Compléter à 1 litre et ajouter 14 g d'agar pour milieu solide.

3.5.2.2 La souche SL93

Alors que le test du « disk assay » donne des résultats quantitatifs et permet de répondre à la question « la protéine testée permet-elle d'augmenter la sensibilité vis-à-vis des métaux ? », le test avec la souche SL93 donne quant à lui une réponse qualitative (« y a-t-il effectivement transport des métaux ? »). En effet, cette souche de *E. coli* contient plusieurs mutations dans le gène codant pour une protéase – chaperonne, HflB, dont l'activité dépend de certains métaux. La croissance de la souche SL93 est inhibée à 42°C si le milieu ne contient pas suffisamment des métaux divalents Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ ou Ni²⁺. La surexpression de protéines de transport des métaux fonctionnelles suffit en général à compenser cette mutation et à restaurer la croissance en milieu riche à 42°C (Makui *et al.* 2000). Sinon, le protocole est quasiment le même que pour le « disk assay » sauf que seul

un disque imbibé de 10 μ L de métal (FeSO_4 à 1 M ou MnCl_2 à 1 M) a été déposé par vase de Pétri, qui a ensuite été incubé 16 heures à 42°C. Un anneau de croissance a ensuite été mesuré autour du disque pour les souches vérifiées. Comme précédemment, la différence par rapport au témoin négatif pBad24 permet de déduire l'activité de la protéine testée.

3.5.2.3 Marquage métabolique à la méthionine-³⁵S

Cette expérience est destinée à la détection de protéines exprimées. Après 15 minutes d'induction à 0.2 % d'arabinose des souches de *E. coli* contenant soit pBad24 seul, soit pBad24-NX1.1, soit pBad24-*DdNRI*, celles-ci ont été incubées 30 minutes avec de la méthionine-³⁵S pour marquer les protéines en cours de synthèse. Une minute ou une heure de lavage avec de la méthionine froide 100 fois en excès ont suivi le marquage qui a été mis en évidence par SDS-PAGE.

3.6 Création de souches de *D. discoideum* KO

3.6.1 Stratégie

La stratégie que nous avons choisie consiste à insérer chaque moitié du gène d'intérêt de part et d'autre de la cassette de résistance à la blasticidine contenue dans le vecteur pRHI119, ne contenant pas d'origine de réplication spécifique à *D. discoideum*. Après transformation dans *D. discoideum*, le résultat recherché est la recombinaison homologue des deux portions du gène contenues sur le vecteur avec le gène sauvage sur le chromosome. Pour maintenir la résistance à l'antibiotique, il doit y avoir recombinaison; une double recombinaison permet l'échange d'allèle, et la souche perd la copie fonctionnelle de ce gène et devient résistante à la blasticidine : on parle alors de souche KO (Knock-out), puisque *D. discoideum* possède un génome haploïde.

Pour *DdNR1*, le travail a été effectué en ne tenant compte que de la version courte du gène débarrassée des portions hautement répétitives (donc non spécifiques) pour éviter l'insertion dans un endroit non désiré du génome. Pour les mêmes raisons, seul l'exon 2 a été considéré pour *DdNR2*.

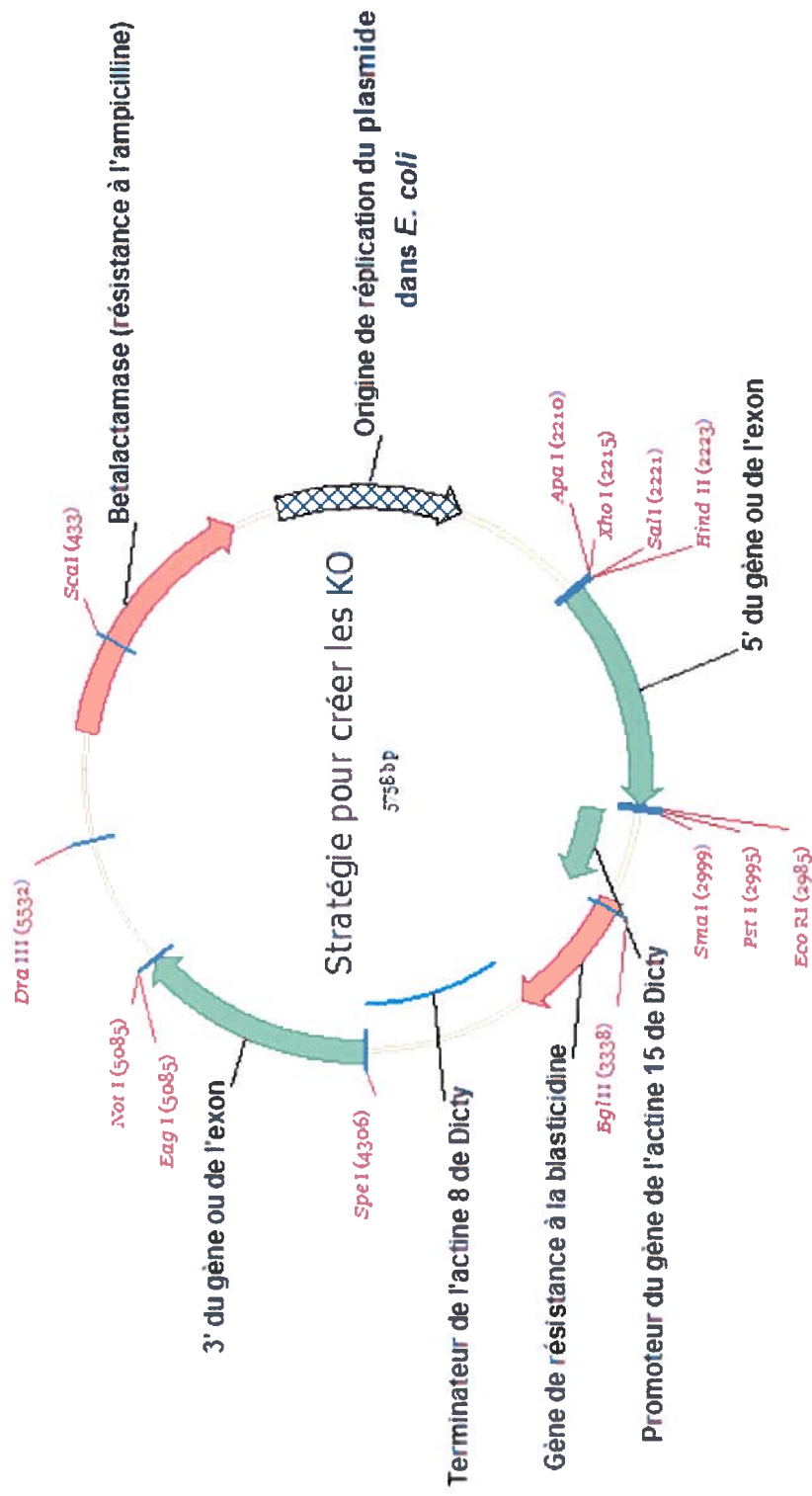
3.6.2 Clonage dans pRHI119

3.6.2.1 *DdNR1*

Pour amplifier la partie 3', les amorces qui ont été utilisées sont Dd1L3 (ajoutant un site de restriction pour *SpeI*) et Dd1RClon3' (ajoutant les sites de restrictions pour *NotI*, *SacII* et *EagI*) (Tableau 1). Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2.

Figure 8 : Stratégie de clonage pour la construction d'un allèle inactif qui sera utilisé pour la création de souches de *D. discoideum* KO.

La stratégie que nous avons choisie consiste à insérer chaque moitié de la phase codante d'intérêt de part et d'autre de la cassette de résistance à la blasticidine. Le vecteur pRHI119 ne contenant pas d'origine de répllication spécifique à *D. discoideum* est perdu après la première génération. *D. discoideum* étant haploïde, une double recombinaison des deux portions du gène contenues sur le vecteur avec le gène sauvage sur le chromosome entraînera la création d'une souche KO pour ce gène.



Les produits de PCR ont ensuite été purifiés sur gel grâce au kit Gel extraction de Qiagen. Le fragment purifié, après vérification qu'il s'agissait bien du bon grâce à des digestions par plusieurs enzymes de restriction (*AgeI*, *KpnI*), a été digéré par les enzymes de restriction *SpeI* et *NotI* puis purifié grâce au kit Nucleotide Removal de Qiagen. Cinq microgrammes du vecteur pRHI119 ont été préparés avec les mêmes enzymes selon la méthode décrite à la section 3.3.4, puis purifiés sur gel grâce au kit Gel extraction de Qiagen. Pour la ligation (voir section 3.3.5), 32 ng de l'insert ont été mélangés à 4 ng de vecteur. Enfin, la transformation a été effectuée par électroporation, suivie de la sélection des clones sur milieu LB supplémenté à 100 µg / mL d'ampicilline. Plusieurs colonies isolées ont été repiquées pour les utiliser dans une Miniprep manuelle (voir section 3.3.6.1). L'ADN ainsi obtenu a été testé par double digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI*. Enfin, l'ADN d'un clone supposé bon a été envoyé au séquençage pour vérification définitive. Cette construction contenue dans le clone ainsi obtenu a enfin été extraite et préparée en quantité par le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

Pour amplifier la partie 5', les amorces qui ont été utilisées sont DdIFRPON52 (ajoutant un site de restriction pour *SalI*) et Dd1RClon5' (ajoutant celui pour *EcoRI*) (voir Tableau 1). Les étapes ont été sensiblement les mêmes que pour la partie 3'. Les seules différences se sont situées, pour la PCR, au niveau de la quantité de $MgSO_4$ qui a été de 6 mM. Pour les vérifications de l'insert, les enzymes utilisées ont été *BamHI* et *PpuMI*. Le fragment purifié et la construction pRHI119-3'*DdNR1* ont été digérés par *SalI* et *EcoRI* et les clones obtenus ont été examinés par les deux couples d'enzymes de restriction (*ScaI* / *EcoRI* et *SpeI* / *PpuMI*) puis par séquençage pour ceux qui présentaient le profil attendu.

Le clone a été stocké avec du glycérol et la construction appelée pRHI119-*KODdNR1* a été extraite et préparée en grandes quantités grâce au kit EndoFree Plasmid Maxi Kit de Qiagen en vue des expériences ultérieures.

3.6.2.2 DdNR2

Les mêmes principes ont été appliqués pour préparer la construction de l'exon 2 de *DdNR2* dans pRHI119 que pour la construction équivalente avec *DdNR1* court.

Rapidement, pour la partie 5' de l'exon 2, ce sont les amorces Dd2RComp (introduisant un site *ApaI*) et Dd2RClon5' (ajoutant un site *EcoRI*) qui ont été utilisées. Les conditions de PCR ont été les mêmes que pour préparer la partie 5' de *DdNR1* court, tout comme la plupart des étapes suivantes. Les seules différences se situent au niveau de la vérification du fragment qui s'est faite grâce à l'enzyme de restriction *PstI*. Ce fragment ainsi que le vecteur pRHI119 ont été digérés par *ApaI* / *EcoRI*. Après transformation, l'identification des bons clones a été faite grâce au couple d'enzymes *SpeI* / *NotI*. Toutefois, il n'y a pas eu séquençage à cette étape. La construction a directement été extraite et préparée en quantité par le kit QIAprep Spin Miniprep.

Pour la partie 3', les amorces qui ont servies à l'amplification ont été Dd2FClon3' (ajoutant un site *SpeI*) et Dd2RClon3' (introduisant les sites *NotI*, *SacII* et *EagI*). Les étapes ont été les mêmes que pour la partie 5' de *DdNR1*. Les vérifications de l'insert ont été faites avec *KpnI* et *HinfI* et celles des constructions finales avec *KpnI* et *ScaI*, ainsi que de la préparation de l'insert et du vecteur par digestion avec le couple d'enzymes *SpeI* / *NotI*.

La construction finale, appelée pRHI119-KODdNR2, a été séquencée, extraite par le kit EndoFree Plasmid Maxi Kit de Qiagen en vue des expériences ultérieures, et le clone la contenant stocké en glycérol.

3.6.3 Transformation de *D. discoideum*

Pour la transformation de *D. discoideum*, chacune des constructions a d'abord été linéarisée par digestion avec l'enzyme de restriction *ScaI* et dosée sur gel et au spectrophotomètre. Toutes les techniques d'électroporation et de clonage décrites plus

haut ont été utilisées pour les deux constructions obtenues ci-dessus. Des clones ont été obtenus pour les deux constructions (voir section 4.3). Les vérifications ont été faites par PCR puis, le cas échéant, par Southern blot sur l'ADN génomique extrait grâce au DNEasy Tissue kit de Qiagen, selon les paramètres décrits à la section 3.3.7.

Pour tester les KO *DdNR2* potentiels, une PCR utilisant les amorces DdNR2.2 et VerifKOG2 a été utilisée selon les mêmes paramètres que pour les vérifications des KO *DdNR1* potentiels décrits plus bas.

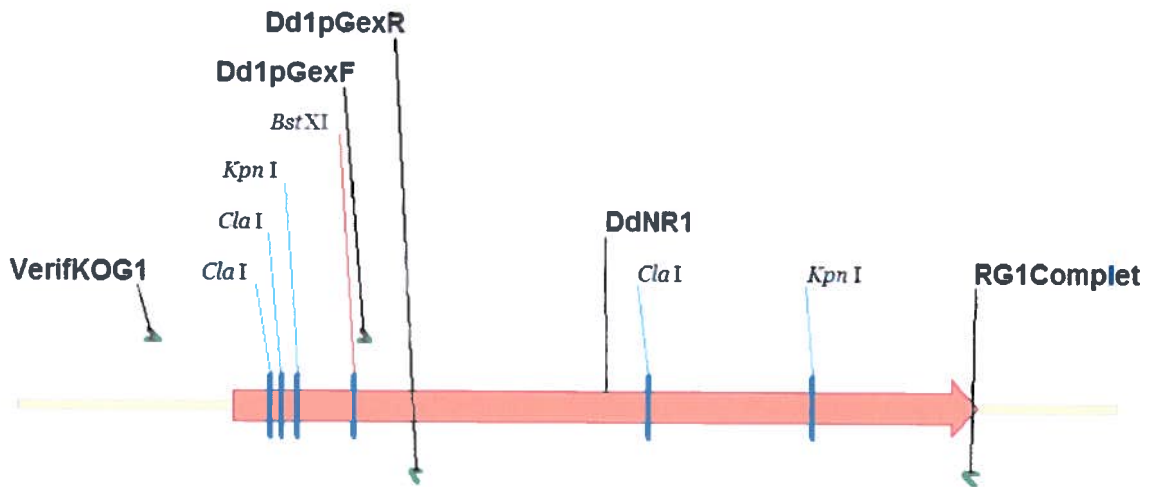
Deux PCR ont été faites à des fins de vérifications des KO *DdNR1* potentiels. Pour la première PCR, les amorces utilisées ont été RG1Complet et VerifKOG1 (spécifique au promoteur de *DdNR1*, donc indique non seulement si l'insertion a bien eu lieu, mais également si elle s'est faite au bon endroit). Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2. La deuxième PCR a été faite avec les amorces Dd1pGexF et Dd1pGexR (qui correspondent au fragment qui a servi à produire l'antigène utilisé pour préparer le sérum). Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2.

Pour les clones semblant intéressants après les deux PCR, une dernière vérification par Southern blot a été faite selon la méthode décrite plus haut. La sonde a été préparée par digestion par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BstXI* de 5 µg de pRHI119-KO*DdNR1*, correspondant à un fragment de 526 pb (Figure 9), selon le protocole décrit plus haut pour la digestion de vecteur. Le fragment d'intérêt a ensuite été purifié et extrait sur gel, dosé sur un nouveau gel et utilisé pour préparer la sonde selon le protocole décrit à la section 3.3.8. L'ADN génomique a été digéré par *KpnI* pendant 16 heures, et utilisé pour faire un Southern blot selon le protocole décrit à la section 3.8. Comme montré à la Figure 9, une digestion par *KpnI* de l'ADN d'une souche sauvage devrait donner un fragment marqué à 1069 pb, et celle d'une souche rendue KO par la construction pRHI119-KO*DdNR1*, un fragment à 2408 pb.

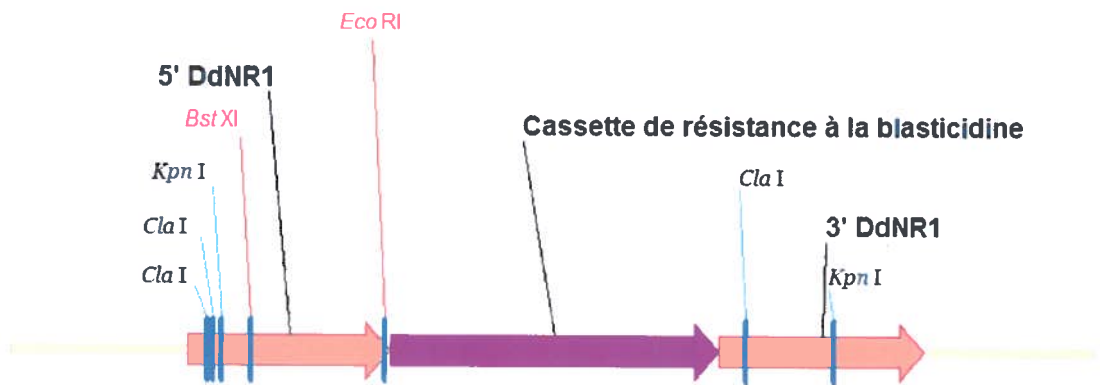
Figure 9 : Vérification des souches potentiellement KO pour *DdNR1*.

A. Région de *DdNR1* dans une souche sauvage. Sont également présentées les positions des différentes amorces utilisées pour les contrôles. B. Carte théorique de la région de *DdNR1* après double recombinaison homologe avec pRHI119-KO*DdNR1*, dans une souche donc potentiellement devenue KO. La sonde issue de la digestion par *Bst*XI et *Eco*RI de pRHI119-KO*DdNR1* permettrait de marquer en Southern blot un fragment à 1069 pb pour la souche sauvage et 2408 pb pour la souche KO, si les deux ADN génomiques étaient digérés par *Kpn*I. Les résultats en sont présentés à la Figure 16.

A



B



3.7 Expression chez *D. discoideum*

3.7.1 Expression inductible : pnrP

Le vecteur pnrP place sous contrôle du promoteur rnrP (inductible aux agents endommageant l'ADN tels les UV ou certains agents chimiques) l'expression du gène d'intérêt (Gaudet *et al.* 2001), ici DdNR1 court.

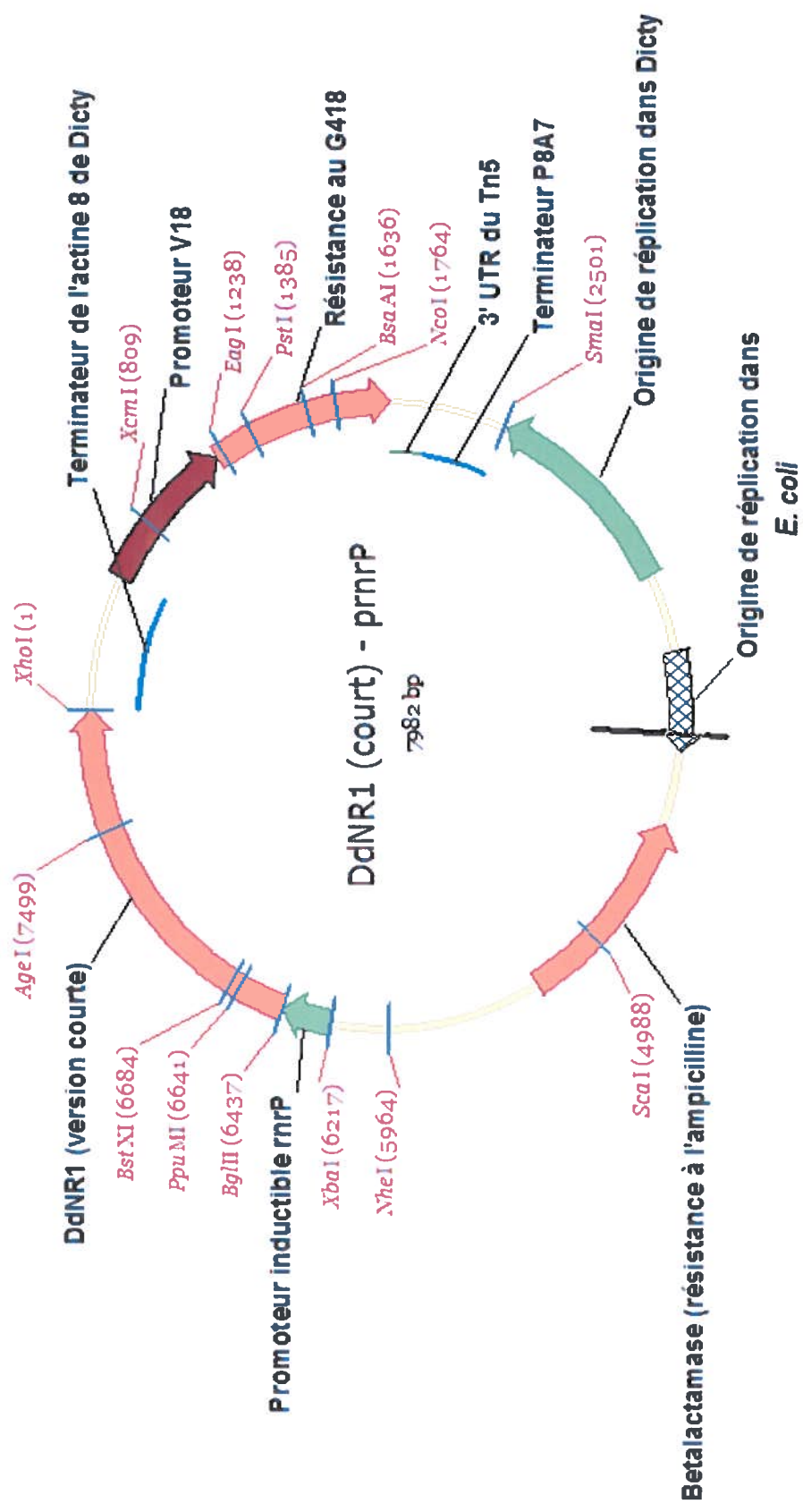
3.7.1.1 Stratégie de clonage

La stratégie de clonage est décrite à la Figure 10.

Pour obtenir *DdNR1* avec les sites *Bgl*III et *Xho*I, les amorces qui ont été utilisées sont DdNR1/rnrPF et DdNR1/rnrPR (voir Tableau 1). Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2. Tous les tubes contenant la bande attendue ont été mis en commun.

Figure 10 : Stratégie de clonage de *DdNRI* court dans le vecteur prnrP dont l'expression est inductible dans *D. discoideum* en réponse aux agents endommageant l'ADN.

Ce vecteur contient en particulier une origine de réplication spécifique à *D. discoideum* permettant le maintien du vecteur dans *D. discoideum* après la transformation.



Les produits de PCR ont ensuite été purifiés sur gel, puis précipités à l'éthanol (même technique que celle décrite à la section 3.3.2 sauf que l'isopropanol est remplacé par 2,5 volumes d'éthanol à 100%). Le fragment purifié a été resuspendu dans 15 μL d'eau MilliQ, 2 μL de BSA 10 x, et 2 μL de tampon NEB3 puis digéré avec 0,5 μL de *Bgl*III, 0,5 μL de *Xho*I, , et de nouveau purifié grâce au kit Nucleotide Removal de Qiagen. Trois microgrammes du vecteur pnrP ont été préparés avec les mêmes enzymes selon la méthode décrite à la section 3.3.4, puis purifiés sur gel. Pour la ligation (section 3.3.5), des quantités variables d'insert (3, 6 et 9 fois celle du vecteur) ont été mélangés à 50 ng de vecteur. Enfin, la transformation par électroporation a été effectuée dans la souche *E. coli* DH11S Δ *mntH*, suivie de la sélection des clones sur milieu LB supplémenté d'ampicilline à 100 μg / mL. Plusieurs colonies isolées ont été repiquées dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté d'ampicilline à 100 μg / mL pour les utiliser dans une Miniprep manuelle. L'ADN ainsi obtenu a été testé avec les enzymes de restriction *Bgl*III et *Xho*I. Enfin, l'ADN d'un clone supposé bon a été envoyé au séquençage pour vérification définitive. Cette construction contenue dans le clone ainsi obtenu a enfin été extraite et préparée en quantités suffisantes.

3.7.1.2 Transformation dans *D. discoideum*

Toutes les techniques décrites à la section 3.4.3.4, autant pour l'électroporation, la transformation chimique que pour le clonage, ont été testées.

Le protocole qui a été utilisé avec succès est la transformation chimique dans les conditions décrites à la section 3.4.3.4.2. Il a été utilisé à la fois pour la construction pnrP-*DdNR1* et pour le pnrP seul, pour en faire un contrôle au niveau de la transformation en tant que telle et pour la fluorescence. La technique de clonage qui a été utilisée est la première décrite dans la section 3.4.3.5. Les clones isolés ont été testés par PCR grâce aux amorces SeqRNRPF et SeqRNRPR qui sont spécifiques respectivement du promoteur et du terminateur contenus dans le pnrP, assurant ainsi que c'est bien le *DdNR1* contenu dans le vecteur et non le gène sauvage qui était amplifié. Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2.

Deux clones contenant le *pnrP-DdNR1* et un contenant le *pnrP* seul ont été sélectionnés et conservés en DMSO.

3.7.2 Expression constitutive : pDNeo2

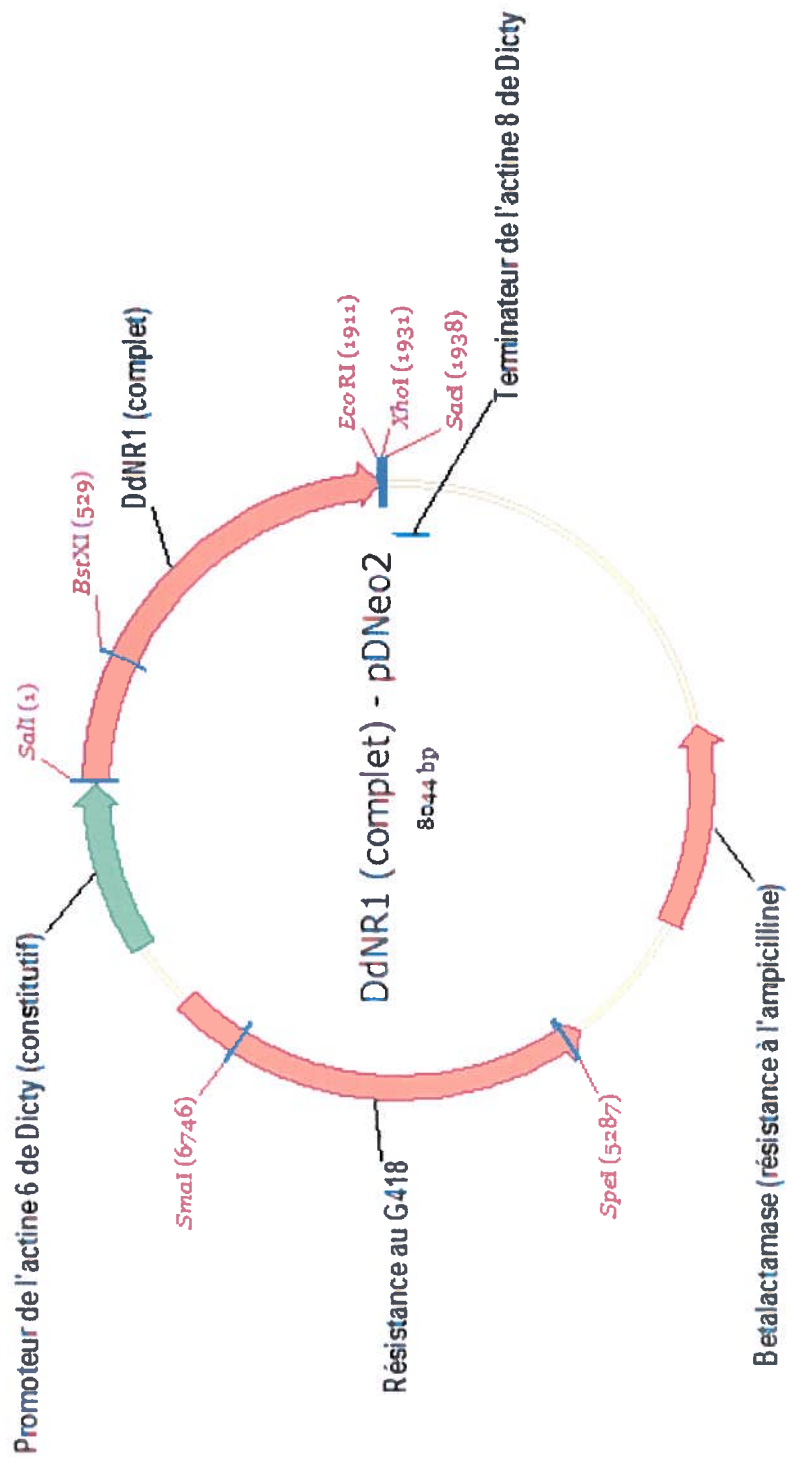
3.7.2.1 Stratégie

Le vecteur pDNeo2 place sous contrôle du promoteur constitutif de l'actine 6 de *D. discoideum* l'expression de DdNR1 dans sa version complète. Il nous a été fourni par le laboratoire du Dr Tsang de l'Université Concordia. La stratégie de clonage est décrite à la Figure 11.

Pour obtenir *DdNR1* complet avec les sites *SalI* et *EcoRI*, les amorces qui ont été utilisées sont FG1PDNEO2.2 et RG1Complet (voir Tableau 1). Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2.

Figure 11 : Stratégie de clonage de *DdNR1* complet dans le vecteur pDNeo2 permettant une expression constitutive dans *D. discoideum*.

Comme pour le *pnrP*, ce vecteur contient une origine de réplication spécifique à *D. discoideum* permettant le maintien du vecteur dans *D. discoideum* après la transformation. Le cadre de lecture sera ici constitué de *DdNR1* complet, c'est-à-dire incluant les répétitions poly-Q / poly-N flanquant les extrémités de la chaîne polypeptidique.



Tous les tubes contenant la bande attendue ont été mis en commun pour la purifier sur gel. Le fragment purifié a été digéré par *SalI* et *EcoRI* puis de nouveau purifié. Deux microgrammes du vecteur pDNeo2 ont été préparés avec les mêmes enzymes selon la méthode décrite plus haut, puis purifiés sur gel. A suivi la ligation où 30 ng d'insert ont été mélangés à 3 ng de vecteur (voir section 3.3.5). Enfin, la transformation par électroporation a été effectuée dans la souche *E. coli* XL1Blue, suivie de la sélection des clones sur milieu LB supplémenté d'ampicilline à 100 µg / mL. Plusieurs colonies isolées ont été repiquées dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté d'ampicilline à 100 µg / mL pour les utiliser dans une Miniprep manuelle (voir section 3.3.6.1). L'ADN ainsi obtenu a été testé avec les enzymes de restriction *SalI* et *EcoRI* en digestion double. Enfin, l'ADN d'un clone supposé bon a été envoyé au séquençage pour vérification définitive. Cette construction clonée a finalement été extraite et préparée en quantités suffisantes.

3.7.2.2 Transformation dans *D. discoideum*

Le seul protocole qui a été utilisé est la transformation chimique dans les conditions décrites à la section 3.4.3.4.2, avec 2 quantités d'ADN toutefois, 30 et 40 µg. Il a été utilisé à la fois pour la construction pDNeo2-*DdNR1* et pour le pDNeo2 seul, ce dernier représentant un témoin de la transformation et pour l'étude d'immuno-fluorescence. La technique de clonage est la dernière décrite dans la section 3.4.3.5. Des clones isolés ont été testés par PCR grâce aux amorces SeqPDNEO2F et SeqPDNEO2R qui sont spécifiques respectivement du promoteur et du terminateur contenus dans le pDNeo2, pour s'assurer que c'est bien le *DdNR1* contenu dans le vecteur et non le gène sauvage qui était amplifié. Le reste du mélange réactionnel et les paramètres de la PCR sont décrits dans le Tableau 2. Les résultats de la PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose selon le protocole décrit à la section 3.3.3.

4. RÉSULTATS

4.1 Étude des séquences des deux protéines

4.1.1 Domaines transmembranaires

Les deux logiciels utilisés, TMpred et TMHMM, prédisent 12 domaines transmembranaires, avec les extrémités N- et C- terminales toutes deux cytoplasmiques à la fois pour DdNR1 et DdNR2 (voir A et B des Figures 12 et 13). À quelques exceptions près, ce nombre de domaines TM ne se retrouve que chez les protéines Nramp eucaryotes, les exceptions notables étant les levures chez qui ils ne sont que 11, et les protéines MntH bactériennes du groupe C β 1 qui elles, en possèdent 12 (Richer *et al.* 2004). L'extrémité N-terminale située dans le cytoplasme est une caractéristique des protéines de la famille Nramp, confirmée tant chez les bactéries (Courville *et al.* 2004) que chez les mammifères (Vidal *et al.* 1996).

4.1.2 O-glycosylation

Le logiciel DictyOGlyc ne prévoit aucun site de O-glycosylation ni pour DdNR1 ni pour DdNR2 ce qui présentait a priori un bon présage quant à notre objectif d'exprimer ces protéines dans *E. coli*. (voir C Figures 12 et 13)

4.1.3 Évolution

L'analyse des séquences de *D. discoideum* a déjà fait l'objet d'une publication au sein du laboratoire (Richer *et al.* 2003). La séquence des deux protéines appartenant à la famille Nramp de *D. discoideum* a été analysée par alignement dans le logiciel ClustalX (version 1.83) avec les séquences d'autres protéines de la famille (MntH de *E. coli*, Nramp1 et 2 humaines), ce qui a permis de mettre en évidence la grande similarité entre elles, mais aussi de remarquer que DdNR1 est plus proche de MntH alors que DdNR2 est plus proche de Nramp1 ou 2 (Figure 14) (Richer *et al.* 2004). De plus, des arbres phylogénétiques ont été établis grâce aux logiciels Mega2 et Tree-Puzzle, contenant les séquences de nombreuses protéines de la famille Nramp et permettant ainsi de situer

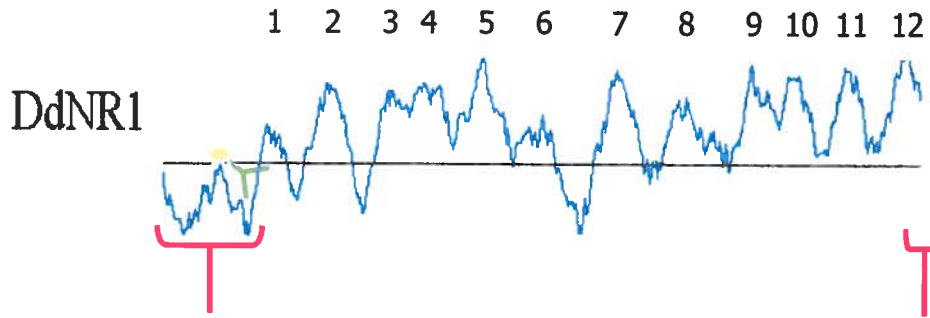
celles de *D. discoideum* au sein de celle-ci (Figure 15) (Richer *et al.* 2003; Chaloupka *et al.* 2005).

C'est ainsi qu'il a été constaté que DdNR1 appartenait aux prototypes, et DdNR2 aux archétypes (Richer *et al.* 2003; Chaloupka *et al.* 2005), tel que décrit en introduction.

Figure 12 : Analyse informatique de DdNR1.

A. Résumé présentant les 12 domaines hydrophobes, les séquences extrêmement répétitives et la portion contre laquelle le sérum (en vert sur la figure) est dirigé. B. Le logiciel TMHMM confirme ces résultats, en prédisant 12 domaines transmembranaires et que les extrémités N- et C- terminales seraient cytoplasmiques. C. Le logiciel DictyOGlyc ne prédit quant à lui aucun site de O-glycosylation de DdNR1.

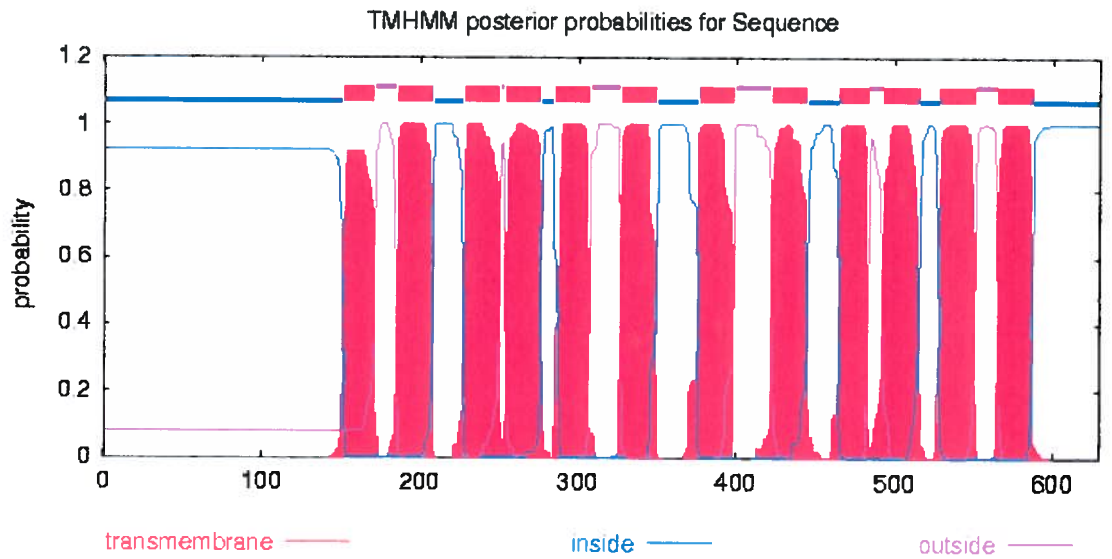
A



MNNNNNNK KLNKENLNEIENWNEIELTDYKK
 QGLDEGTSSNIYLFESNGNVNGSIEDSPKQQ
 OOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOONII...

...NNNNNNNNKNII NNNNNY
 SGTINNQTIQ*

B



C

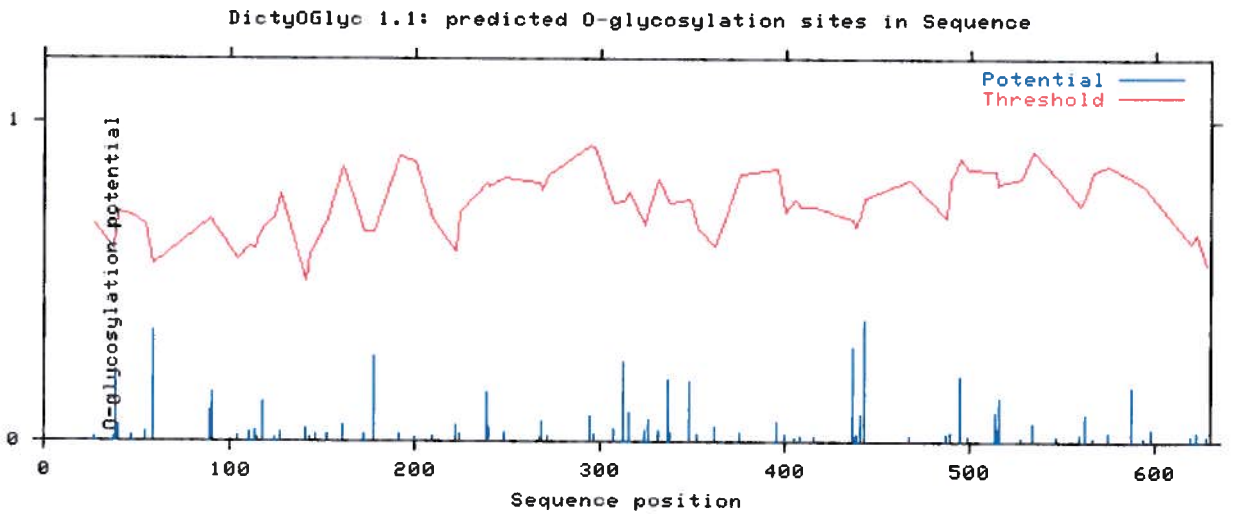
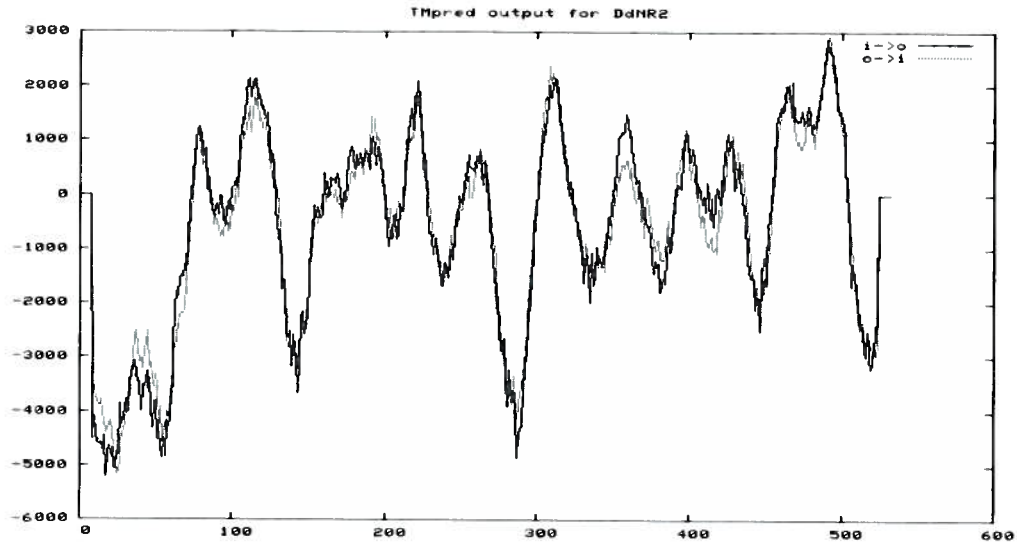


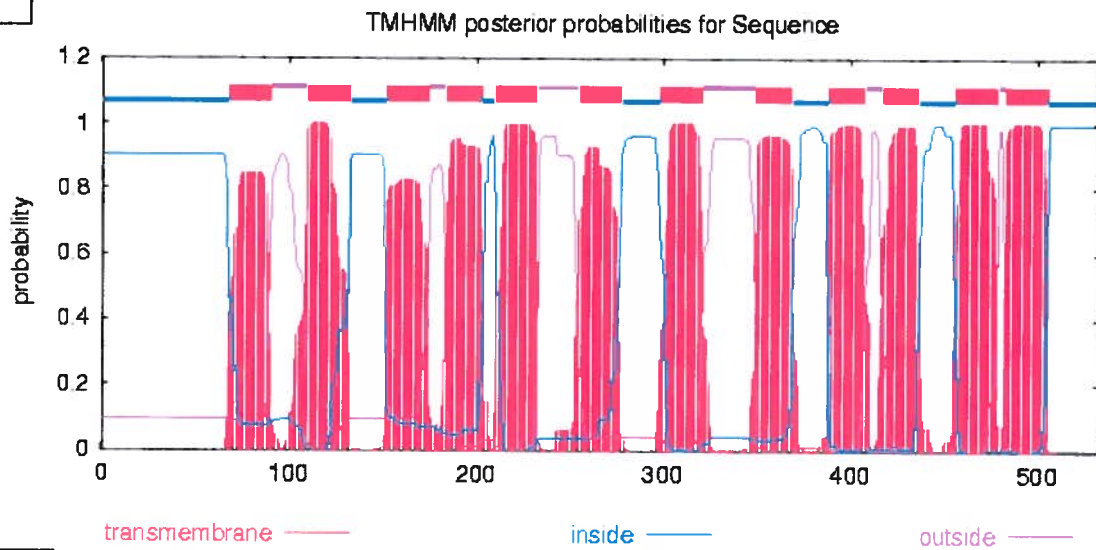
Figure 13 : Analyse informatique de DdNR2.

A et B. Les logiciels TMpred et TMHMM respectivement prédisent tous deux qu'il y aurait 12 domaines transmembranaires et que les extrémités N- et C- terminales seraient cytoplasmiques. C. Le logiciel DictyOGlyc ne détecte pas de site de O-glycosylation de DdNR2.

A



B



C

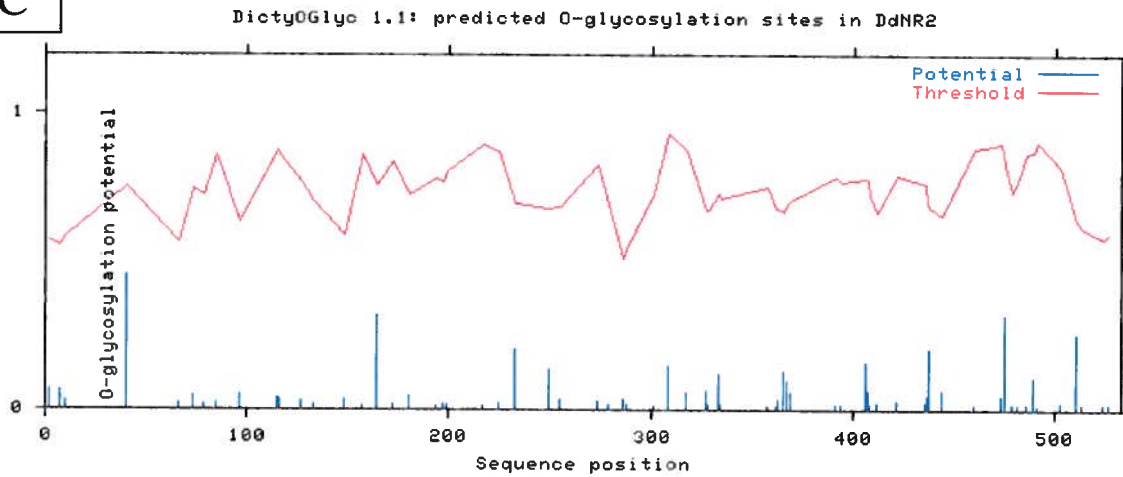


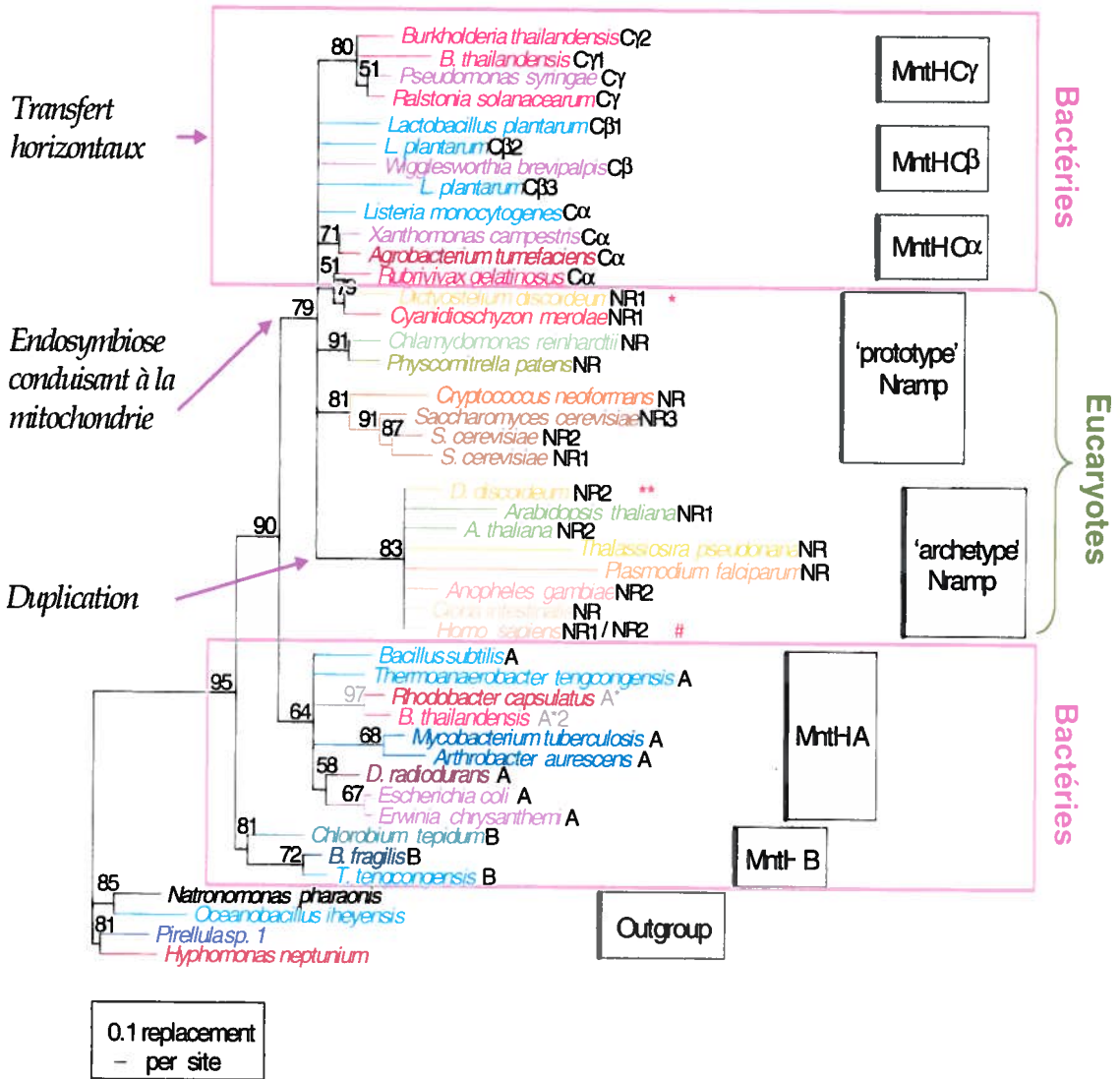
Figure 14 : Alignement à l'aide du logiciel ClustalX (version 1.83) de la séquence des deux protéines de *D. discoideum* appartenant à la famille Nramp avec les séquences d'autres protéines de la famille (MntH de *E. coli*, Nramp1 et 2 humaines).

Ceci illustre la grande similarité entre elles et permet d'observer que DdNR1 est plus proche de MntH alors que DdNR2 est plus proche de Nramp1 ou 2.

Figure 15 : Arbre phylogénétique établi grâce aux logiciels Mega2 et Tree-Puzzle, permettant de positionner les séquences de *D. discoideum* au sein de la famille Nramp.

Reproduction directe avec permission de (Chaloupka *et al.* 2005).

Groupes phylogénétiques de la famille Nramp (MntH A, MntH B, MntH C, “prototype” et “archétype” (Richer *et al.* 2003)). Ce dendrogramme a été obtenu par alignement dans le logiciel ClustalX d’un ensemble de 40 séquences représentatives de la famille Nramp et de 4 séquences appartenant à l’« outgroup ». Un groupe de 245 sites informatifs et parcimonieux (au moins 2 acides aminés différents, chacun représenté au moins 2 fois) a été généré à partir de la suite Mega2. Il a ensuite été utilisé pour une analyse de type « Maximum Likelihood » avec la matrice de substitution Blosum 62 et une distribution gamma continue pour modéliser l’hétérogénéité du taux de remplacement des acides aminés à un site spécifique. Le niveau de confiance statistique de chaque noeud (déterminé par bootstrap, répété 1000 fois) est indiqué à sa gauche sous forme de pourcentage. Des données similaires ont été obtenues avec d’autres approches (Évolution Minimale, Parcimonie Maximale, non présentées). Distributions taxonomiques : **Outgroup** [Archaea, Planctomycetes, α -Proteobacteries (α -P), Gram positive faible en GC (IGp)]; **MntH B** [Bactéries vertes sulfureuses, Bacteroides, IGp]; **MntH A** [Deinococcus, IGp, Gram positive riche en GC (hGp), α -P, β - and γ -Proteobacteries (β -P and γ -P)]; **MntH C**: MntH C α [IGp, Cyanobacteries-non présentées, α -P, β -P, γ -P], MntH C β [IGp, γ -P], MntH C γ [β - and γ -P]; « **prototype** » **Nramp** [Amebozoa, Plantae (algues vertes, algues rouges, mousses), Champignons, Animaux (Invertébrés - non présentés)]; « **archétype** » **Nramp** [Amebozoa, Plantae (plantes vertes, et algues rouges - non présentées), Diatomées, Alvéolaires, Animaux].



4.2 Efficacité de ligation et clonage dans *E. coli*

Un ratio de 3 molécules d'inserts pour une de vecteur, compris dans la fourchette de 2 à 6 conseillée par le fabricant de la ligase, ne donnait pas des résultats satisfaisants lorsque appliqué à *D. discoideum*. En effet, le nombre de colonies obtenues après électroporation était en général suffisant mais l'analyse par digestion enzymatique des Minipreps issues de ces clones montrait que la plupart des clones obtenus ne donnaient pas les résultats attendus. Les patrons de digestions obtenus semblaient en effet dévoiler qu'il devait y avoir eu réarrangement entre le vecteur et l'insert. Comme la ligation semblait produire beaucoup de déchets, nous avons fait plusieurs tentatives pour essayer d'en améliorer les résultats. Nous avons notamment tenté d'utiliser un ratio de 10 inserts pour 1 vecteur (contre 3 pour 1 habituellement). Le nombre de colonies obtenues après transformation dans *E. coli* s'en est trouvé très légèrement amélioré, en particulier dans les ligations où il s'agissait de cloner le gène au complet. Quelques uns de nos résultats sembleraient indiquer que le nombre de colonies obtenues serait proportionnel à la quantité d'insert utilisée lors de la ligation. Il semblerait donc que le fait d'augmenter la quantité de matériel de départ améliore les chances de succès, en augmentant sans doute la fréquence d'évènements apparemment défavorisés. Ces résultats restent toutefois largement à confirmer, d'autant que selon la littérature, ce serait l'étape d'extraction sur gel qui poserait problème (Prevorovsky et Puta 2003).

4.3 Efficacité de transformation et de clonage chez *D. discoideum*

La littérature donnant des paramètres très différents pour l'électroporation de *D. discoideum*, nous avons décidé de tester plusieurs d'entre eux.

La première tentative a consisté à tester les paramètres 3 μF / 0,8-1 kV / 5 Ω sur le Gene Pulser de BioRad avec le vecteur pRHI119 seul comme contrôle de la spécificité de recombinaison de ce vecteur et 10 μg des constructions pRHI119-KODdNR1 et -KODdNR2 pour essayer d'obtenir des souches KO de *D. discoideum* pour chacun de ces gènes. Comme attendu, aucune colonie n'a été obtenue pour la transformation avec le vecteur pRHI119 seul. Par contre, 7 colonies ont été obtenues avec chacune des constructions par clonage selon la première technique décrite à la section 3.4.3.5, consistant à transférer les colonies très tôt du vase de Pétri originel vers des vase de Pétris indépendants. L'ADN génomique de chacun de ces clones a été extrait et testé par PCR. Malheureusement, pour chacun des clones, le gène sauvage pouvait encore être amplifié. Pour alléger les expériences, il a ensuite été décidé de ne travailler que sur *DdNR1*.

La deuxième tentative s'est faite selon les paramètres 25 μF / 1,2-1,5 kV / 5 Ω sur le Gene Pulser de BioRad avec 25 μg de pRHI119-KODdNR1 et n'a donné aucune colonie.

Pour vérifier si le problème venait du vecteur pRHI119, nous avons décidé de tester les électroporations avec le vecteur de surexpression prnrP avec les paramètres qui avaient déjà donné des colonies (3 μF / 0,8-1 kV / 5 Ω) et de tester en même temps plusieurs quantités d'ADN. Ici aussi, aucune colonie n'a pu être obtenue.

Nous avons alors décidé de tester les transformations avec un autre électroporateur, préprogrammé pour *D. discoideum* par le fabricant, le Gene Pulser Xcell de BioRad. Nous avons également choisi deux quantités d'ADN de la construction pRHI119-KODdNR1 qui avait, jusqu'à ce moment-là, été la seule à fournir des résultats. Des colonies ont pu être effectivement obtenues, et ce proportionnellement à la quantité

d'ADN utilisée. Le clonage a été fait après obtention de la confluence dans le vase de Pétri originel par repiquage sur milieu SM et bactéries vivantes comme décrit plus haut. Six clones de la transformation avec 25 µg d'ADN ont été testés par les deux PCR décrites à la section 3.6.3 et montraient que l'amplification de gène sauvage n'y était plus possible alors que l'amplification correspondant à DdNR1_{Ac} était elle toujours faisable (voir A et B Figure 15). Deux d'entre eux ont alors été vérifiés par Southern, comme décrit dans la section Matériel et Méthodes (voir section 4.5 pour plus de détails sur ces clones).

Enfin, comme les transformations avec le Gene Pulser Xcell semblaient donner des résultats intéressants à ce moment-là, nous avons décidé de l'utiliser pour le vecteur prnrP. Malgré plusieurs tentatives, aucune colonie n'a jamais pu être obtenue, ce qui nous a alors poussé à chercher une solution alternative : la transformation chimique.

Table 4 : Efficacité de transformation par électroporation et de clonage chez *D. discoideum* selon les paramètres (vecteur, quantité d'ADN, résistance, voltage, capacité,...) et/ou l'électroporateur utilisé.

Électroporateur	Moyenne du nombre de colonies observées					
	Gene Pulser Xcell			Gene Pulser		
Paramètres	2 chocs électriques (signal carré, 1 kV, 10 µF) d'1 ms chaque, espacés de 5 s.			3 µF / 0,8-1 kV / 5 Ω		25 µF / 1,2-1,5 kV / 5 Ω
Quantité d'ADN (µg)	10	25	5	10	20	25
pRHI119				0		
pRHI119-KODdNR1	10	300		7		0
pRHI119-KODdNR2				7		
prnrP	0	0	0	0	0	
prnrP-DdNR1				0		

La transformation chimique chez *D. discoideum* est bien documentée et est réputée plus efficace pour la transformation de vecteur de surexpression contenant la cassette de résistance au G418 car le niveau d'expression de la protéine est proportionnel au nombre de molécules du vecteur présent par cellule, lui-même proportionnel à la concentration en antibiotique à laquelle se fait la sélection après transformation (communication personnelle, Dr Adrian Tsang). La concentration optimale en antibiotique qui nous été suggérée est de 30 µg / mL.

Plusieurs essais ont été réalisés avec différentes quantités d'ADN. La première tentative réussie a permis d'obtenir un très grand nombre de colonies (confluence) pour des transformations avec 40 µg de *pnrP* ou de *pnrP-DdNR1* mais aussi avec 80 µg de *pnrP-DdNR1*. Comme les cultures dans les vase de Pétris étaient à confluence, nous avons décidé d'obtenir des clones isolés en décrochant les cellules du vase de Pétri originel, pour les compter et les diluer en série avant de les ensemercer sur milieu solide SM et en présence de bactéries vivantes. Les spores ainsi obtenues ont ensuite été mises en vase de Pétri liquide HL5 pour pouvoir être testées par PCR avec les amorces SeqRNRPF et SeqRNRPR après extraction rapide d'ADN (Charette et Cosson 2004). Tous les clones issus de transformation par *pnrP* ont été vérifiés par PCR et ont donné les résultats attendus. Mais, le processus de clonage ayant pris trop de temps, tous les clones transformés avec *pnrP-DdNR1* ne donnaient pas la bande attendue, signifiant ainsi que *DdNR1* avait sans doute commencé à être éliminé par les cellules au cours du processus. Encore une fois, ce processus est largement documenté dans la littérature (Maselli *et al.* 2002) et par la communauté *D. discoideum*, les deux suggérant de raccourcir au maximum la durée du clonage, stocker les clones intéressants et de ne conserver les cultures que pour un mois (Maselli *et al.* 2002) puis de les jeter pour repartir à partir du stock.

En suivant tous ces conseils, nous avons refait une transformation de *pnrP-DdNR1* en prenant soin de transférer les colonies dans des vase de Pétris séparés dès leur apparition, qui a permis d'obtenir les clones attendus (voir section 4.6.1).

En appliquant cette même technique, nous avons obtenu des clones de *D. discoideum* contenant pDNeo2 et pDNeo2-*DdNR1* (voir section 4.6.2 pour plus de détails sur ces clones). Comme attendu, c'est plus le nombre de molécules de vecteur qui est important pour assurer le succès d'une transformation que la quantité totale en μg .

D'autre part, nos résultats ne semblent pas montrer que nous ayons atteint la quantité saturante en ADN, puisqu'en continuant d'en augmenter la quantité, le nombre de clones obtenus augmentait également sans en diminuer la qualité (voir section 4.6 pour les PCR de vérification).

Tableau 5 : Efficacité de la transformation chimique et de clonage à l'aide de vecteurs de surexpression chez *D. discoideum*.

Quantité d'ADN (μg)	Nombre de colonies observées			
	30	40	60	80
prnrP		0+0+0+300		
prnrP- <i>DdNR1</i>		0+0+2+300+15+300	2	300
pDNeo2	13	50		
pDNeo2- <i>DdNR1</i>	11	1		

4.4 Expression chez *E. coli*

L'expression de protéines membranaires dans *E. coli* étant généralement toxique, les deux modèles que nous utilisons ici nécessitent donc comme étape préliminaire de déterminer la concentration optimale d'arabinose nécessaire à l'induction de l'expression par pBad24. Pour évaluer la toxicité de l'induction à l'arabinose, trois souches ont été utilisées: la souche de référence contenant pBad24, et les clones 1 et 12 déjà décrits contenant pBad24-*DdNR1*. Pour cela, la DO₆₀₀ était mesurée pour chaque culture après 6 heures. La concentration d'arabinose optimale a donc été déterminée comme étant 6 x 10⁻³% (voir Tableau 6) et a été utilisée pour les deux étapes suivantes de détermination de la fonction de *DdNR1*. En effet, c'est à cette concentration que la croissance des clones 1 et 12 commence à être affectée, suggérant une toxicité de la protéine, sans pour autant arrêter totalement la croissance des bactéries. Cette concentration, lorsque utilisée dans les tests de diffusion radiale des métaux, est un bon compromis pour l'obtention d'une densité du tapis bactérien et des zones de sensibilité satisfaisantes.

Tableau 6 : Évaluation de la toxicité de l'expression de *DdNR1* chez *E. coli*.

Mesure de la DO₆₀₀ après 6 heures de culture pour trois souches : la souche de référence contenant pBad24, et les clones 1 et 12 contenant tous deux pBad24-*DdNR1*.

	Pourcentage d'arabinose	pBad24	Clone 1	Clone 12
DO ₆₀₀ de départ ajustée à		0,461	0,544	0,520
	0	1,048	0,735	1,057
DO ₆₀₀ après 6 heures d'incubation	6 x 10 ⁻⁵	1,175	0,780	0,683
	6 x 10 ⁻⁴	1,170	0,829	0,881
	6 x 10 ⁻³	0,867	0,369	0,296
	6 x 10 ⁻²	1,293	0,280	0,250

Deux systèmes ont été utilisés : le « disc assay » ou test de diffusion radiale des métaux (Makui *et al.* 2000), d'une part, donnant un diamètre d'inhibition autour d'un disque imbibé d'une solution de métal proportionnel à la capacité de transport, et la complémententation de la souche SL93 (Makui *et al.* 2000), d'autre part, capable de pousser

à 42°C, si une protéine fonctionnelle permet d'accumuler des métaux divalents dans le cytoplasme. Le clone 1 contient la construction pBad24-DdNR1.

Le premier test, celui du « disk assay » ou test de diffusion radiale des métaux (Makui *et al.* 2000), impliquait que des cultures des souches *E. coli* DH11S Δ mntH contenant pBad24 ou pBad24-NX1.1 (vecteur surexprimant la protéine MntH sauvage de *E. coli*) ou pBad24-DdNR1 (clone 1) soient induites avec $6 \times 10^{-3}\%$ d'arabinose, ajustées à la même DO₆₀₀ (~0,55) et ensemencées sur vase de Pétri. Chaque gélose recevait alors 3 disques de papier filtre imbibé de 10 μ L d'une solution d'un des métaux suivants : FeSO₄ à 1 M, CoCl₂ à 0,25 M ou CdCl₂ à 0,125 M (Makui *et al.* 2000). Après incubation de 16 heures à 37°C, le diamètre d'inhibition de croissance était mesuré autour des disques de métaux. Cette sensibilité est proportionnelle à l'efficacité de liaison ou de transport par la protéine de la famille Nramp testée (Tableau 7). Comme attendu, c'est la souche contenant le vecteur pBad24 seul qui a donné le diamètre d'inhibition le plus faible, quel que soit le métal, puisqu'elle ne contient pas de protéine surexprimée capable de transporter efficacement les métaux dans la cellule. En comparaison, la souche contenant le vecteur pBad24-NX1.1 exprimant une protéine capable de transporter les métaux montrait des zones d'inhibition beaucoup plus grandes. Ces deux souches pouvaient donc nous servir de contrôles négatif et positif, respectivement. Par contre, la protéine que nous souhaitons tester, à savoir DdNR1, ne semblait pas être capable de transporter les métaux, puisque les diamètres d'inhibition pour cette souche étaient les mêmes que ceux du témoin négatif.

Tableau 7 : Évaluation de l'activité fonctionnelle de DdNR1 chez *E. coli*.

Souche contenant le plasmide	Diamètre d'inhibition (mm)			Complémentation SL93	
	Fe (1M)	Co (0,25M)	Cd (0,125M)	Fe (1M)	Mn (1M)
pBad24	14	12	16	-	-
pBad24-MntH (ou pBad24-NX1.1)	23	27	34	+++	+++
Clone 1	13	12	17	-	-

Le deuxième test, impliquant la souche SL93, permettant de détecter l'accumulation intracellulaire et donc le transport de métal, a été réalisé. Rappelons d'une part, que la croissance de cette souche est inhibée à 42°C si le milieu ne contient pas suffisamment des métaux divalents Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} , et d'autre part, que la surexpression de protéines de transport des métaux fonctionnelles permet de compenser cette mutation et de retrouver la croissance à 42°C sans ajouter de métal additionnel (Makui *et al.* 2000). Au besoin, le protocole peut être modifié pour devenir très similaire à celui du « disk assay » sauf qu'un seul disque imbibé de 10 μL de métal (FeSO_4 à 1 M ou MnCl_2 à 1 M) est déposé par vase de Pétri, qui est ensuite incubé 16 heures à 42°C. Un anneau de croissance apparaît alors pour les souches qui ont été complémentées (Makui *et al.* 2000). Les résultats que nous avons obtenus (Tableau 7) pour nos témoins étaient bien ceux attendus, à savoir que seule la souche contenant le vecteur pBad24-NX1.1 exprimant une protéine capable de transporter les métaux a pu croître. La souche contenant quant à elle le vecteur pBad24-DdNR1 n'a pas permis de compléter les mutations de SL93.

À la vue de ces résultats, deux conclusions pouvaient être tirées : soit la protéine DdNR1 est exprimée, mais elle n'est pas fonctionnelle, soit la protéine n'est pas du tout exprimée dans *E. coli*. La première hypothèse était supportée par le fait que l'induction à l'arabinose avait bien un effet sur la souche contenant pBad24-DdNR1, suggérant une expression de la protéine mais pas forcément convenablement insérée dans la membrane. Pour vérifier si la protéine était effectivement exprimée, nous avons utilisé la technique par marquage métabolique à la méthionine- ^{35}S . Le gel SDS-PAGE montre bien une protéine très fortement exprimée pour la souche pBad24-NX1.1 mais aucune expression n'a pu être observée pour celle contenant pBad24-DdNR1 (résultat non présenté). L'étape suivante a donc été de tester l'expression de DdNR1 dans d'autres souches de *E. coli* modifiées pour être plus permissives à l'expression de protéine étrangères (par exemple par ajout d'ARN_i pour des codons normalement peu utilisés par *E. coli*), comme les souches BL21 ou Rosetta (Novagen). Là encore, aucune expression n'a pu être obtenue.

Nous en avons donc conclu que bien que nous ayons pris la peine d'écouter la protéine, l'expression de DdNR1 n'a pas été possible dans *E. coli*, principalement en raison de sa toxicité.

4.5 Création d'une souche KO pour DdNR1

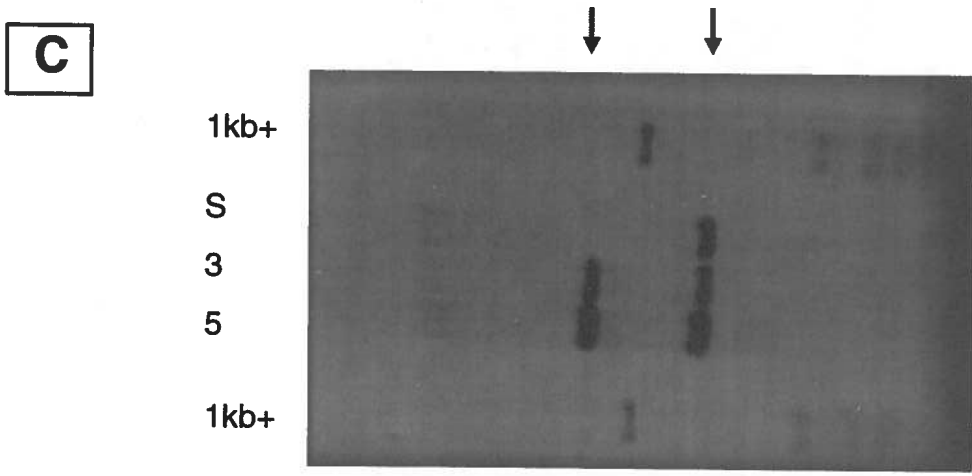
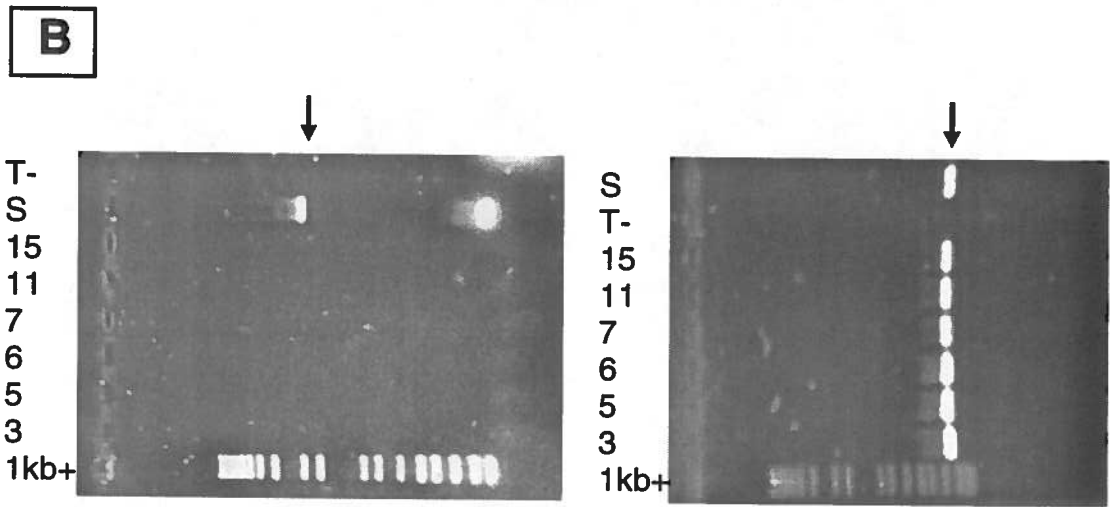
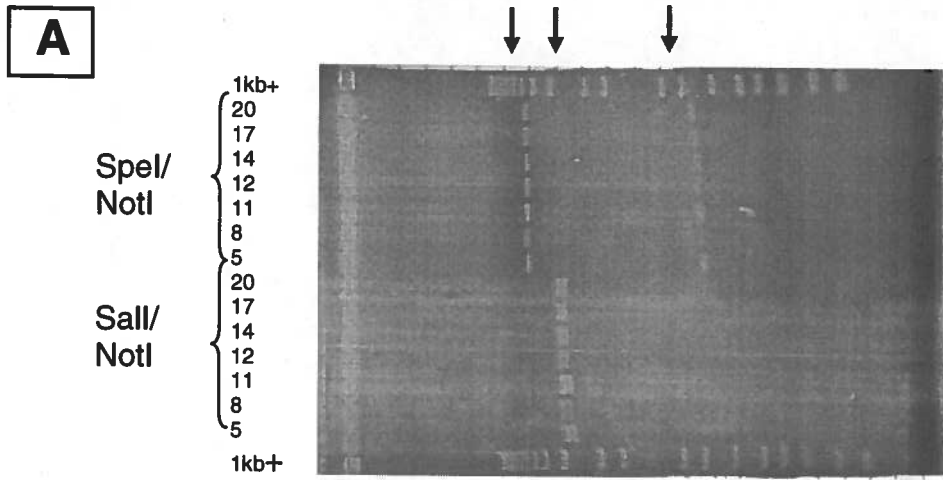
Les vérifications des constructions pRHI119-KODdNR1 et KODdNR2 ont déjà été décrites dans la section Matériel et méthodes. La Figure 16 illustre une des étapes de vérification, soit la digestion après Miniprep des plasmides contenus dans les colonies obtenues.

D. discoideum a ensuite été transformé avec chacune de ces constructions qui ont donné des clones. La première étape de vérification de ceux-ci était la PCR. Pour la construction pRHI119-KODdNR2, le gène sauvage pouvait toujours être amplifié dans les clones obtenus qui ont donc du être éliminés. Il a ensuite été décidé de se concentrer sur *DdNR1*. Rappelons que les clones ont été obtenus grâce au Gene Pulser Xcell de BioRad, selon le protocole décrit plus haut. Ils ont d'abord été vérifiés par PCR grâce aux amorces RG1Compleat et VerifKOG1 qui ont montré que le gène sauvage ne pouvait plus être amplifié chez six de ces clones, alors que les témoins de PCR donnaient bien les résultats attendus (voir B. a. Figure 16). Pour vérifier ce résultat, nous avons fait une deuxième PCR toujours sur ces clones, utilisant les amorces Dd1pGexF et Dd1pGexR capables d'amplifier une petite portion du gène, et qui a donné les résultats attendus, à savoir que ce fragment était le même que celui du contrôle positif représenté par une souche sauvage (S) de *D. discoideum* (voir B. b. Figure 16). Ces résultats étant encourageants et semblent montrer que tous ces clones étaient identiques, nous avons donc décidé d'en vérifier deux par Southern. De manière surprenante, cela a permis de démontrer que dans la population testée pour chaque clone, le gène sauvage et la construction permettant de faire le KO étaient présents (voir C Figure 16).

Figure 16 : Vérification par digestion enzymatique des constructions pour créer les souches KO, puis par PCR et Southern blot des clones de *D. discoideum* obtenus.

A. Digestions par les enzymes de restriction *SalI*, *SpeI* et *NotI* des Minipreps issues de la transformation dans *E. coli* de la ligation *DdNR1* court dans pRHI119. B. PCR sur les clones de *D. discoideum* obtenus après électroporation de la construction pRHI119-*KODdNR1*. i) L'amplification n'est possible que chez la souche sauvage (S) mais pas dans les clones, par ailleurs résistants à la blasticidine. ii) L'amplification de la portion *DdNR1_{Ac}* est possible dans tous les cas comme attendu. C. Southern blot effectué sur les clones 3 et 5 supposés KO et la souche sauvage (S). La bande attendue correspondant à l'insertion de la construction 5'*DdNR1*-cassette blasticidine-3'*DdNR1* et la bande correspondant au gène sauvage sont indiquées.

Pour toutes les PCR, T- correspond au témoin négatif de PCR.



Cependant, le succès du Southern ayant nécessité plusieurs tentatives, nous avons dû faire plusieurs extractions d'ADN génomique sur un même clone sur une période s'étendant sur plusieurs mois. Comme la totalité de l'extrait n'avait pas été utilisée pour faire le Southern, le reste étant conservé, ceci nous a permis de faire des PCR et d'observer que bien que le gène sauvage n'était pas amplifiable pour la première extraction faite, on pouvait le voir apparaître et augmenter en intensité au cours du temps dans les échantillons subséquents (résultats non présentés ici). Ceci n'est pas un phénomène inconnu chez *D. discoideum* et il a été documenté au sein de la communauté, notamment au travers du forum du site Internet Dictybase (lien 5).

Deux hypothèses peuvent donc expliquer nos résultats. La première, classique pour toute culture sur une longue période, est que la population obtenue après la transformation était bien KO pour *DdNRI* (ceci expliquant le résultat de la première PCR) mais elle aurait été contaminée par des *D. discoideum* sauvages qui, bien que non résistants à la blasticidine, arriveraient tout de même à se maintenir dans la population notamment à cause du fait que la portion de la population qui est vraiment résistante à la blasticidine est mutée pour un gène qui pourrait se révéler essentiel pour sa nutrition. C'est l'hypothèse que nous privilégions. La deuxième hypothèse avancée dans Dictybase (lien 5) est que la construction utilisée pour faire la transformation étant linéarisée, elle pourrait s'insérer en multiples copies (concatémères), créant ainsi une souche mutée dans un premier temps. Mais, le gène étant vraiment indispensable, une pression s'exercerait sur la population encourageant une recombinaison au sein même du concatémère permettant de régénérer le gène sauvage. Ceci est d'autant moins vraisemblable que nous avons pris la peine, lors de la construction du vecteur pRHI119-*DdNRI*, de retirer trois bases (empiétant sur 2 codons) de la séquence totale de *DdNRI*, pour justement éviter ce genre de reconstitution. Pour pouvoir répondre définitivement à cette question, il faudrait repartir de la population stockée dans le DMSO (elle aussi contenant déjà le gène sauvage et la construction créant le KO), en faire des dilutions en série pour obtenir des clones isolés et vérifier ainsi s'il s'agit bien d'une contamination postérieure à l'obtention du KO.

4.6 Surexpression chez *D. discoideum*

Les vérifications des constructions *prnrP-DdNR1* et *pDNeo2-DdNR1* ont été décrites au chapitre Matériel et méthodes, et une partie en est montrée à la Figure 17.

4.6.1 Construction d'une souche contenant *prnrP-DdNR1*

Six clones ont été testés selon la méthode décrite à la section 3.7.1.2 pour lesquels la bande attendue en PCR était bien visible (Figure 17 B.). Pour deux d'entre eux, seule la bande attendue pouvait être observée mais pour les quatre autres, elle était accompagnée de bandes plus petites montrant sans doute que le processus d'élimination du gène surexprimé avait déjà du commencer (Maselli *et al.* 2002). Donc, seuls les deux présentant une bande unique ont été conservés.

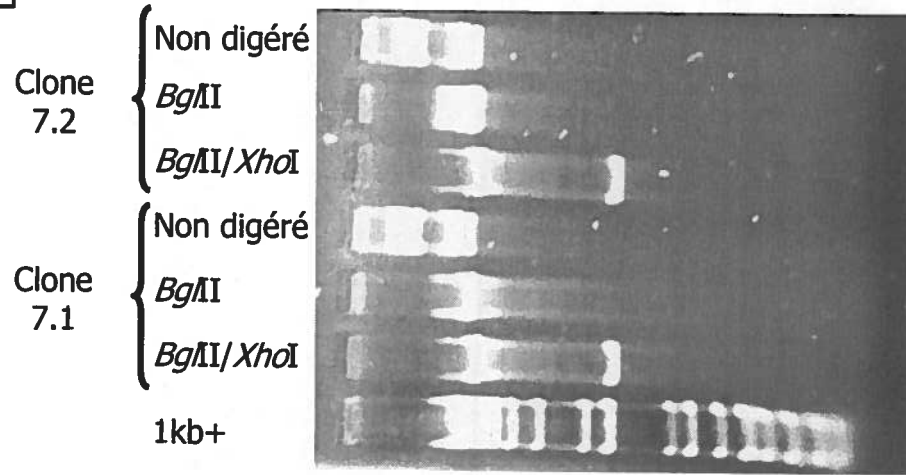
4.6.2 Problèmes et solutions lors de la transformation de *D. discoideum* avec *pDNeo2-DdNR1*

La transformation de *pDNeo2* et *pDNeo2-DdNR1* a dans un premier temps bien fonctionné et a fourni un certain nombre de colonies (Tableau 5) immédiatement repiquées dans des vase de Pétris indépendants. Malheureusement, après avoir commencé à se multiplier pendant quelques jours, le milieu a été changé et les cellules se sont mises à mourir. Le milieu utilisé correspondait à une préparation fraîche, et avait été préparé avec un lot de protéose peptone ouvert à cette occasion. Or, nos collaborateurs de Concordia nous avaient informés que certains lots de protéose peptone peuvent présenter des carences en vitamines entraînant un ralentissement ou même l'arrêt de la croissance de *D. discoideum*. Il est donc suggéré de les compléter avec le mélange de Vitamines 20x détaillé à la section 3.4.3.3.1. C'est ce que nous avons fait mais seuls 2 clones ont pu être sauvés et se multiplier suffisamment pour être testés. Comme la période entre la transformation et le test par PCR grâce aux amorces SeqPDNEO2F et SeqPDNEO2R a de nouveau été trop longue, ces deux clones ne possédaient plus *DdNR1* dans sa totalité et ont donc été jetés.

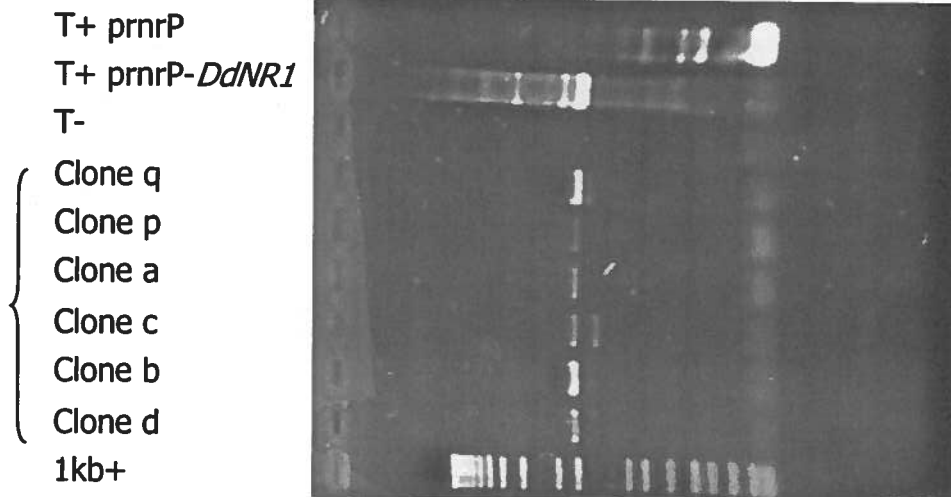
Figure 17 : Vérification des vecteurs de surexpression chez *D. discoideum* et des clones issus de la transformation de *D. discoideum*.

A. Contrôle par digestion enzymatique avec *Bgl*III et *Xho*I des Minipreps de 2 clones issus de la transformation de la ligation *DdNR1* court dans pnrP. B. PCR pour vérifier les clones a, b, c, d, p et q issus de la transformation dans *D. discoideum* de pnrP-*DdNR1*. T- = témoin négatif, T+ = PCR effectuée à partir d'une dilution des maxi-preps de pnrP et pnrP-*DdNR1*. C. Vérification par digestion enzymatique avec *Bam*HI et *Kpn*I des Minipreps de clones issus de la transformation de la ligation *DdNR1* complet dans pDNeo2.

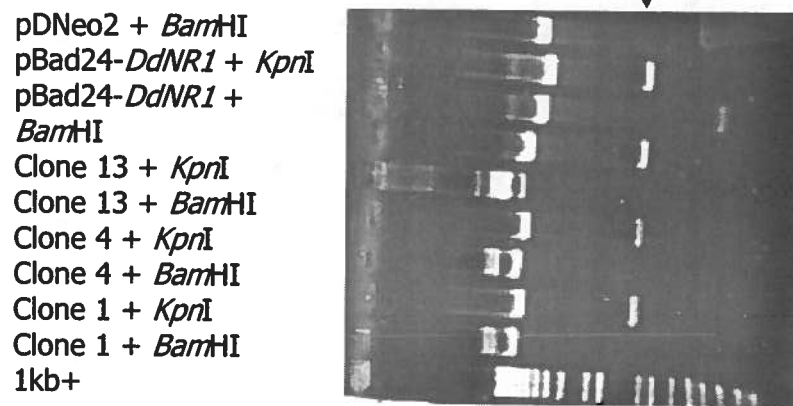
A



B



C



4.7 Vecteurs et souches créés dans ce projet

Cette section a pour but de résumer ce qui a été accompli durant ce projet. Le Tableau 8 présente l'ensemble des souches créées dans le laboratoire.

Tableau 8 : Récapitulatif des vecteurs et souches créés au cours de ce projet.

Nom	Souche (S) ou Vecteur (V)	But / Fonction	Commentaires
pBad24- <i>DdNR1</i>	V et S	Expression du DdNR1 court dans différentes souches de <i>E.coli</i>	Aucune activité fonctionnelle n'a pu être détectée
pRHI119- <i>KODdNR1</i>	V et S (<i>E. coli</i> et <i>D. discoideum</i>)	Création d'une souche de <i>D. discoideum</i> KO pour <i>DdNR1</i>	La souche de <i>D. discoideum</i> congelée ne semble pas être pure (voir Figures 9 et 16 et le texte pour plus de détails)
pRHI119- <i>KODdNR2</i>	V et S (<i>E. coli</i>)	Création d'une souche de <i>D. discoideum</i> KO pour <i>DdNR2</i>	Quelques tentatives de transformation ont été faites chez <i>D. discoideum</i> mais n'ont rien donné et il a été décidé de se concentrer sur DdNR1
prnrP	V et S (<i>E. coli</i> et <i>D. discoideum</i>)	Contrôle d'efficacité de transformation	
prnrP- <i>DdNR1</i>	V et S (<i>E. coli</i> et <i>D. discoideum</i>)	Expression du DdNR1 court dans <i>D. discoideum</i>	
pDNeo2	V et S (<i>E. coli</i> et <i>D. discoideum</i>)	Contrôle d'efficacité de transformation	La souche de <i>D. discoideum</i> contenant pDNeo2 n'a pas été conservée à cause des problèmes rencontrés lors de la transformation
pDNeo2- <i>DdNR1</i>	V et S (<i>E. coli</i>)	Expression du DdNR1 long dans <i>D. discoideum</i>	

5. DISCUSSION

Le grand défi de ce projet a été de dépasser les différentes difficultés reliées à la culture et aux manipulations génétiques chez *D. discoideum*. Après plusieurs essais et mises au point, nous avons pu toutefois commencer à maîtriser l'ensemble des techniques de culture, de biologie moléculaire et de transformations chez *D. discoideum*. Toutefois, le retard accumulé pour faire ces mises au point nous a obligé à revoir nos ambitions à la baisse pour ce projet en particulier, et à ne travailler que sur DdNR1, le prototype Nramp de *D. discoideum*.

Les analyses informatiques des deux protéines Nramp de *D. discoideum* avaient déjà permis de les classer dans la famille Nramp, DdNR1 comme un prototype et DdNR2 en tant qu'archétype et de mettre ainsi en évidence l'originalité de *D. discoideum* (Richer *et al.* 2003). En effet, *D. discoideum* est un des rares organismes à posséder les versions proto- et archétypique de la protéine Nramp. Comme déjà dit en introduction, c'est cette particularité venant s'ajouter au fait que *D. discoideum* est un être unicellulaire se nourrissant de bactéries par phagocytose, et qui est haploïde de surcroît, qui ont fait de lui un organisme de choix pour étudier l'évolution fonctionnelle des protéines de la famille Nramp (Richer *et al.* 2004). Les autres logiciels utilisés nous ont également permis de prédire que ces deux protéines possèdent sans doute 12 domaines transmembranaires, avec les extrémités N- et C- terminales toutes deux cytoplasmiques. Ce résultat était sans surprise pour DdNR2, qui appartient aux archétypes, groupe retrouvé uniquement chez les eucaryotes, chez qui les protéines Nramp possèdent toujours 12 segments TM (Richer *et al.* 2003). Par opposition, le nombre de segments du prototype était moins évident à anticiper, car bien qu'eucaryote, la protéine de *D. discoideum* est proche de celles des levures qui ne possèdent 11 segments TM (Richer *et al.* 2004). L'extrémité N-terminale située dans le cytoplasme est par contre, une caractéristique des protéines de la famille Nramp, confirmée tant chez les bactéries (Courville *et al.* 2004) que chez les mammifères (Vidal *et al.* 1996). Ceci reste bien sûr à vérifier expérimentalement chez *D. discoideum*. Cependant, l'expérience acquise au sein du laboratoire sur les protéines de la famille Nramp nous a confortés dans l'idée que l'extrémité N-terminale de DdNR1 était cytoplasmique et que l'anticorps que nous

souhaitions créer devait être dirigé contre une portion de celle-ci. Ainsi, que la protéine soit située sur la membrane plasmique ou sur celle du phagosome, les cellules devront être perméabilisées pour permettre à l'anticorps d'aller s'y fixer.

Les techniques de biologie moléculaire utilisées couramment au laboratoire ont nécessité quelques aménagements, principalement pour répondre au biais en (A+T) et au caractère hautement répétitif du matériel génétique de *D. discoideum*. En effet, les liaisons hydrogène permettant l'appariement de G et C (3) étant plus nombreuses qu'entre A et T (2), les régions riches en (A+T) sont donc moins adhésives, et résistent donc moins à la dénaturation. Pour compenser au niveau de nos PCR par exemple, nous avons bien souvent dû utiliser une température d'élongation de 68°C au lieu des 72°C recommandés pour l'ADN polymérase thermostable. Nous avons également dû utiliser des amorces au T_m^* théorique (basé sur la règle de Wallace (Wallace *et al.* 1979), calculé selon la formule $T_m = (4 \times (\text{nombre de G+C}) + 2 \times (\text{nombre de A+T}))$) de l'ordre de 100°C au lieu des 60-70°C habituels. Ces deux modifications permettent sans doute un meilleur appariement de l'amorce sur sa séquence cible, améliorant ainsi les chances de succès de la PCR.

Une autre technique ayant nécessité beaucoup d'essais est sans doute la ligation. En effet, malgré plusieurs aménagements, notamment l'utilisation d'un ratio de 10 inserts pour 1 vecteur (contre 3 pour 1 habituellement), le nombre et la qualité des colonies obtenues après transformation dans *E. coli* semblent ne s'être que peu améliorés. Le principal problème a été révélé lors de l'analyse des Minipreps issus de ces clones. La plupart de ces clones, bien que résistants à l'ampicilline, ne présentaient pas du tout le patron attendu lors des digestions, et semblaient avoir subi des recombinaisons. Une des hypothèses pour expliquer ce résultat est donné dans l'article de Prevorovsky *et al.* (2003), où il est suggéré que les agents chaotropiques utilisés dans les kits de purification sur gel de Qiagen déstabilisent les régions riches en (A+T), présentes en grand nombre chez *D. discoideum*, ce qui poserait des problèmes lorsque ce matériel doit être utilisé dans des expériences subséquentes. Sur le site Dictybase (lien 6), il est donc suggéré à défaut de mieux, de ne pas utiliser ces kits lorsque l'ADN qui y est soumis doit servir à

une ligation. Cette suggestion devra toutefois être vérifiée au sein du laboratoire, car elle a pour principal inconvénient d'avoir le potentiel de générer la ligation de portions non désirées dans certaines situations. De plus, comme déjà indiqué dans la section Résultats, il semble que la quantité totale d'ADN utilisée lors de la ligation joue aussi un rôle, ce qui reste encore à être vérifié.

Un autre des grands défis de ce projet a été de maîtriser les différentes techniques de culture et de stockage de *D. discoideum*. Pas moins de cinq techniques de culture différentes ont été utilisées, chacune répondant à un besoin spécifique. De même, deux techniques de stockage, sur grains de silice ou en DMSO, ont été utilisées car la bibliographie est contradictoire sur le sujet quant à la durée de survie des souches. Les contaminations ont été rares à partir du moment où les manipulations des cultures se sont faites sous une hotte de culture cellulaire, plutôt qu'à proximité d'une flamme. Un autre problème rencontré (et déjà détaillé à la section 4.6.2 entre autres) a été celui du manque d'uniformité d'un lot à l'autre de protéose peptone, certains nécessitant d'être complétés en vitamines. Ce problème s'étant présenté pour la première fois à une étape critique de la transformation de pDNeo2-*DdNR1*, il a eu comme conséquence la perte totale des clones obtenus. Deux solutions peuvent alors être envisagées à l'avenir : compléter en vitamines de manière systématique tous les milieux contenant du protéose peptone, ou vérifier chaque nouveau lot de protéose peptone sur des cultures non critiques avant de l'utiliser dans les cultures courantes.

Les principales avancées de ce projet résident dans le fait que certains outils nécessaires pour l'étude du rôle des deux protéines Nramp de *D. discoideum* ont pu être créés. D'une part, les constructions tant pour faire les KO que pour la surexpression sont prêtes pour *DdNR1*. Des transformations ont été réalisées dans *D. discoideum*, permettant de montrer que la transformation chimique est la méthode de choix pour la création de souches de surexpression (que ce soit avec le vecteur pnrP ou pDNeo2). Les différentes tentatives effectuées nous ont, entre autres, permis de réaliser que le succès d'une transformation est directement lié au nombre de molécules de vecteur utilisées plutôt que la quantité totale en µg. Nous avons ainsi obtenu une des deux souches de surexpression

de DdNR1, AX2(prnrP-*DdNR1*) et son contrôle négatif AX2(prnrP). Rappelons que c'est la version réduite de *DdNR1* sous le contrôle d'un promoteur inductible qui s'y trouve. Nous n'avons d'ailleurs fait qu'une seule tentative d'induction aux UV de cette souche, mais elle n'a pas été concluante, sans doute parce que la dose d'UV que nous avons choisie était trop forte. Une mise au point s'avèrera donc nécessaire, en essayant par exemple d'induire avec une gamme d'UV, pour trouver la meilleure induction tout en assurant la meilleure survie possible aux cellules.

Quant à l'autre souche de surexpression, contenant la séquence de *DdNR1* complète dans le vecteur pDNeo2 à expression constitutive, il sera sans doute assez facile de l'obtenir par transformation chimique. En effet, sans le problème de milieu déjà évoqué plusieurs fois, nous aurions sans doute obtenus des clones contenant pDNeo2-*DdNR1*, basé sur le nombre intéressant de colonies détectées après la transformation mais perdues lors de l'étape de clonage.

Il est plus difficile par contre de conclure quant à l'électroporation. En effet, bien que des colonies aient toujours été obtenues avec l'électroporateur Gene Pulser Xcell de Biorad, nous n'avons toujours pas obtenu de souche de *D. discoideum* KO. Comme précisé dans la section Résultats, la raison pour laquelle le gène sauvage est à nouveau amplifiable après plusieurs mois, alors que lors de la première PCR réalisée sur cette même souche quelques mois plus tôt montrait qu'il ne l'était pas, reste incertaine. L'hypothèse que nous favorisons est celle d'une contamination par une souche sauvage arrivant à survivre en milieu sélectif à cause de la place laissée par la souche mutée. Pour confirmer ceci, il faudrait en faire des dilutions en série pour essayer d'obtenir des clones isolés et les tester. Cependant, le délai pour réaliser ceci équivaldrait quasiment à celui nécessaire pour reprendre une transformation dans *D. discoideum* à partir de l'électroporation, qui semblerait être la meilleure solution car elle nous permettrait de respecter la période d'un mois maximum en culture, largement dépassée avec les clones déjà stockés. Dans le cas où ce serait l'hypothèse alternative d'une « reconstitution » du gène comme discutée sur Dictybase (où le vecteur s'insérerait en concatémère permettant ainsi la restauration subséquente du gène), qui s'avèrerait être la bonne, une nouvelle

construction pour faire les KO devrait être préparée, abolissant cette possibilité. En effet, comme nous l'avons déjà dit, cette hypothèse de « reconstitution » du gène nous paraît peu probable, puisque nous avons pris soin de retirer 3 bases (empiétant sur 2 codons) à la fin de la portion 5' du gène clonée dans pRHI119. Donc si une reconstitution se produisait, elle pourrait donner une bande de taille quasi identique à celle du gène sauvage en Southern blot, mais il n'y aurait aucune raison que les souches présentant ce profil soient sélectionnées favorablement dans les cultures puisqu'elles ne devraient pas posséder le gène sauvage. Mais pour être certains d'éliminer cette hypothèse, nous n'aurions qu'à insérer les régions immédiatement en amont et immédiatement en aval du gène, avant et après la cassette de résistance à la blasticidine, respectivement au lieu de placer les deux moitiés du gène de part et d'autre de la cassette (Figure 8). Ainsi, même si le vecteur s'insérait en concatémère, le gène sauvage ne pourrait jamais être reconstitué. Toutefois, nous avons tenté d'appliquer cette stratégie et elle s'est révélée difficile à réaliser. En effet, les régions en amont et en aval de *DdNR1* étant des régions intergéniques, elles sont extrêmement riches en (A+T), donc très peu complexes, la rendant délicate dès les étapes de PCR pour amplifier les parties à cloner. Faute de temps, nous avons dû l'abandonner, d'autant que nous anticipions de nombreux problèmes lors de la transformation dans *D. discoideum*, dus au manque de complexité, donc de spécificité, des séquences destinées à la recombinaison homologue.

D'autre part, le sérum anti-DdNR1_{Ac} (voir la section Appendice 1) semble bien être spécifique contre DdNR1 selon les vérifications réalisées tant sur la protéine de fusion GST-DdNR1_{Ac} que contre les extraits totaux de la souche *E. coli* BL21-pRep4 contenant le vecteur pQE40-HisDHFR-DdNR1_{Ac} produisant la fusion HisDHFR-DdNR1_{Ac} (~ 42 kD). Toutefois, dans le deuxième cas, une « clarification » du sérum était d'abord nécessaire par préincubation du sérum contre un extrait total de la souche *E. coli* BL21-pRep4 avec le vecteur pQE40-HisDHFR pour retirer les anticorps non spécifiques de DdNR1_{Ac}, qui créent un bruit de fond trop important. La spécificité du sérum contre DdNR1 a donc été établie puisqu'il est capable de réagir contre deux protéines de fusion différentes, toutes deux contenant DdNR1_{Ac}, mais l'une étant à la GST, l'autre à HisDHFR. Cependant, il n'est pas sûr que le sérum anti-DdNR1_{Ac} puisse être utilisé dans

les expériences d'immunofluorescence *in situ* sur *D. discoideum* sans avoir à purifier l'anticorps anti-DdNR1.

Ce qui nous conduit donc à parler des résultats très préliminaires obtenus en immunofluorescence *in situ*, où nous avons utilisé notre sérum sur des cellules sauvages de *D. discoideum* perméabilisées (voir la section Appendice 2). Nous avons ainsi pu observer que les cellules émettaient une fluorescence diffuse en présence de l'anticorps, aucune inclusion intracellulaire définie ne semblant apparaître. Cette fluorescence diffuse est observée pour la protéine Nramp2 humaine, dont on sait qu'elle se localise principalement à la membrane plasmique (Gruenheid *et al.* 1999). Selon ces premiers résultats, la protéine DdNR1 se répartirait à la surface de la cellule et non sur des vésicules intracellulaires, ce qui éloignerait l'hypothèse que DdNR1 ait un quelconque rôle dans la maturation du phagosome. Toutefois, ces résultats doivent être confirmés, notamment en faisant réagir l'anticorps avec des cellules non perméabilisées, puis contre une souche surexprimant DdNR1 et contre une souche KO pour *DdNR1*. En effet, notre sérum n'ayant pas été purifié, il reste toujours possible que l'aspect observé ne soit dû qu'au bruit de fond non spécifique de l'anticorps. Cependant, il semblerait que, sauf durant le développement, DdNR1 soit bel et bien exprimée à la membrane plasmique et non au phagosome, comme le démontre les travaux de Bozzaro *et al.* (Peracino *et al.* 2003). Leurs travaux viennent tout juste de faire l'objet d'une publication (Peracino *et al.* 2006), mais certains des résultats présentés ci-dessous l'ont été lors des trois Congrès Dicty les plus récents. Par fusion avec la GFP, ce groupe a montré que DdNR1 est exprimée à la membrane plasmique. DdNR2 (dénommée Nramp1 par ce groupe) est au contraire exprimée dans un sous groupe de vésicules acides, l'appareil de Golgi et des vésicules non acides, possiblement des postlysosomes, les endosomes tardifs, mais pas précoces et les phagosomes. En exprimant une construction antisens du gène *DdNR2* dans une souche sauvage, sa capacité à phagocyter *E. coli*, *L. pneumophila* ou *M. avium* s'en est trouvée réduite, montrant ainsi un rôle probable de DdNR2 dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires (Peracino *et al.* 2003). Ces résultats ont été confirmés par inactivation du gène (Peracino *et al.* 2003; Balest *et al.* 2004). Ils ont également rapporté

que DdNR2 transporterait les cations divalents, en particulier Fe^{2+} , hors du phagosome par symport avec des ions H^+ (Bozzaro *et al.* 2005).

En perspective pour ce projet, plusieurs suggestions peuvent être faites pour le mener à bien. D'abord, la poursuite de l'étude de DdNR1 avec une nouvelle transformation dans *D. discoideum* de pDNeo2-DdNR1 permettra d'obtenir l'expression constitutive chez *D. discoideum* et de déterminer si le sérum peut être utilisé tel quel pour corroborer les résultats de Bozzaro *et al.*, qui ont eux utilisé une protéine de fusion DdNR1-GFP. L'obtention d'une souche KO pour *DdNR1* sera quant à elle déterminante tant pour la poursuite du projet que pour les études d'immunofluorescence ou pour son phénotypage et sa complémentation s'il en apparaît un. Pour vérifier si la disparition du gène a un effet sur la phagocytose et/ou la maturation du phagosome, il faudra mesurer notamment la capacité de celle-ci à se nourrir sur un tapis bactérien constitué de la nourriture habituelle de *D. discoideum* (*K. aerogenes*) ou d'une souche pathogène de *P. aeruginosa*, phagocytée par la souche sauvage mais plus difficile à phagocyter pour une souche mutée dans un gène essentiel à la phagocytose (Cosson *et al.* 2002). Si la souche KO pour *DdNR1* semblait avoir des difficultés à digérer des souches pathogènes, cela pourrait révéler un rôle de DdNR1 dans le processus de phagocytose et de maturation du phagosome. Les conclusions ainsi obtenues pourront être confirmées par immunofluorescence *in situ* avec le sérum anti-DdNR1_{Ac}. Enfin, pour étudier la fonction biochimique de cette protéine, nous pourrions reprendre l'expression dans *E. coli* en fusionnant en amont de DdNR1 une autre protéine. En effet, le Dr Tsang (Université Concordia) nous a suggéré cette méthode qui semblerait parfois donner des résultats sans que l'on puisse vraiment en expliquer la cause. Une de ses hypothèses serait qu'une fois que *E. coli* aurait lancé la traduction de cette protéine de fusion, elle serait alors capable de traduire également la portion issue de *D. discoideum*. Le sérum anti-DdNR1_{Ac} et une expression réussie dans *E. coli* viendrait compléter les résultats de Bozzaro *et al* décrits plus haut. Nous aurions alors une meilleure idée si la duplication de DdNR1 / 2 a conduit au rôle de DdNR2 au phagosome et ainsi la chance de répondre à notre hypothèse de départ.

Appendice 1

Vérification du sérum anti-DdNR1

La création et les vérifications du sérum ayant été faites par une autre personne que l'auteur de ce travail, elles ne seront que peu détaillées ici. Toutefois, nous avons jugé intéressant d'en décrire quelques étapes importantes de part le rôle clé que ce sérum occupe dans ce sujet.

Production d'une portion de la protéine DdNR1 en vue de l'injection au lapin

Nous avons utilisé très largement le protocole commercial GST Gene Fusion System de la compagnie Pharmacia, également utilisé pour la création d'un sérum anti-Nramp2 humain (Gruenheid *et al.* 1999).

Rapidement, une portion de la protéine d'intérêt (ici DdNR1_{Ac}) a été clonée à la suite de la GST (Glutathione S-Transferase) dans le vecteur pGEX. La protéine de fusion totale a alors pu être produite après transformation dans *E. coli* et purifiée selon la méthode fournie par le fabricant, basée sur le fait que la GST se fixe sur la Glutathione Sepharose 4B. Il est à noter que la thrombine est capable de couper entre la GST et DdNR1_{Ac} (voir 1 Figure 18). Un lapin a alors reçu plusieurs injections, contenant d'abord la protéine totale (car la GST est hautement immunogène et utilisée comme adjuvant) puis avec DdNR1_{Ac} uniquement. Au jour 97, le sérum du lapin a été récupéré (dénommé sérum anti- DdNR1_{Ac} dans le reste de la présentation).

Vérification de la spécificité du sérum anti- DdNR1_{Ac}

Pour vérifier la spécificité de ce sérum, plusieurs tests ont été effectués (voir 2 et 3 Figure 18). Le premier a consisté à vérifier la spécificité contre les protéines qui ont servi lors des injections au lapin. Pour cela, une analyse par Western blot a été faite (voir 2 Figure 18) faisant réagir le sérum anti-DdNR1_{Ac} contre la fusion GST-DdNR1_{Ac} (A) et contre DdNR1_{Ac} seul (B). Dans les deux cas, un gel SDS-PAGE a été effectué puis transféré sur membrane de PVDF. Une dilution à 1 / 25 du sérum a alors été mise à réagir

avec la membrane et la visualisation s'est faite grâce à un anticorps anti-anticorps de lapin couplé à la peroxydase de raifort. Il a ainsi été permis de mettre en évidence que le sérum anti- DdNR1_{Ac} réagissait très fortement contre une protéine d'environ 45 kDa, correspondant à la taille attendue de la protéine de fusion GST-DdNR1_{Ac}.

Toutefois, comme les premières injections se sont faites avec la fusion totale, le lapin a donc pu faire des anticorps contre la portion GST de celle-ci, d'autant plus que la GST est un adjuvant puissant entraînant donc une réaction très importante du système immunitaire. Pour confirmer que des anticorps ont été formés contre DdNR1_{Ac}, le sérum a également été testé contre une préparation contenant la portion DdNR1_{Ac}, clivée à partir de la fusion GST-DdNR1_{Ac}. Nous avons alors pu observer une réaction avec une protéine d'environ 8 kDa, correspondant à la taille attendue de DdNR1_{Ac}. Cependant, une réaction à environ 45 kDa pouvait toujours être observée, montrant que le sérum anti-DdNR1_{Ac} pourrait devoir être purifié par affinité. Pour cela, une autre protéine de fusion a été créée, HisDHFR-DdNR1_{Ac}. Comme contrôle que cette protéine était bien produite, nous avons d'abord fait réagir un anticorps commercial anti-His contre un extrait total du clone 8 issu de la transformation de la souche BL21-pRep4 avec le vecteur pQE40-HisDHFR-DdNR1_{Ac} produisant la fusion HisDHFR-DdNR1_{Ac} (~ 42 kD) (Figure 18, 3 A). Comme prévu, une protéine d'environ 42 kDa a pu être observée, avec toutefois un autre signal minoritaire.

Les étapes suivantes ont par contre présenté un défi plus important. En effet, l'anticorps anti-DdNR1_{Ac} n'étant pas pur, un bruit de fond trop important, occultant tout autre réaction, était présent lorsqu'il était mis à réagir avec un extrait total de la souche contenant pQE40-HisDHFR-DdNR1_{Ac}, sans doute dirigé contre des composantes de *E. coli*, bactérie à laquelle le lapin a sans doute été exposé naturellement. Donc, pour éliminer une partie de cette réponse non spécifique, le sérum (dilué 1 / 200) était d'abord pré adsorbé avec un extrait total de la souche BL21-pRep4, pour éliminer en partie les anticorps anti-*E. coli*. Ainsi, il a été permis d'observer la protéine de fusion HisDHFR-DdNR1_{Ac} à sa taille attendue, lorsque ce sérum pré adsorbé a été mis à réagir contre le clone 8. Pour confirmer que cette réaction venait bien de la portion DdNR1_{Ac}, le même sérum anti-DdNR1_{Ac} « amélioré » a été laissé à réagir contre la souche BL21-pRep4

contenant pQE40 seul (donc produisant uniquement la portion HisDHFR). La protéine d'environ 42 kDa n'était alors plus observable, confirmant la spécificité contre DdNR1_{Ac}.

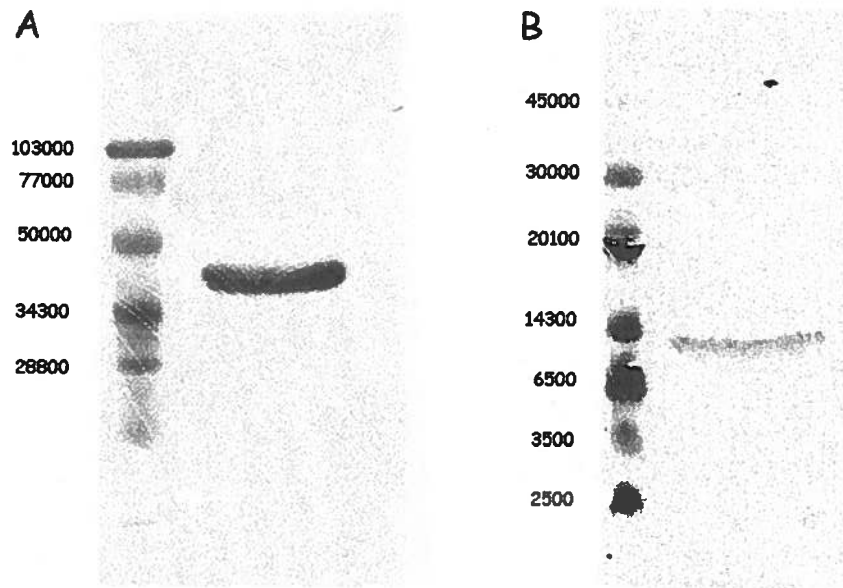
Figure 18 : Protéines utilisées pour l'injection au lapin et vérification du sérum produit contre (DdNR1_{Ac}).

1 : Vérification par SDS-PAGE de l'expression de la fusion GST (Glutathione S-Transférase) - portion de DdNR1 choisie pour faire le sérum (DdNR1_{Ac}) (Figure 5). A. Visualisation avec du bleu de Coomassie du gel SDS-PAGE (12%) de la fusion GST-DdNR1_{Ac} (37.1kDa) après induction avec de l'IPTG, chromatographie d'affinité et purification sur gel. B. Visualisation au bleu de Coomassie du gel SDS-PAGE (15%) de la portion DdNR1_{Ac} (8.1kDa) après purification et clivage par la thrombine et purification préparative sur gel.

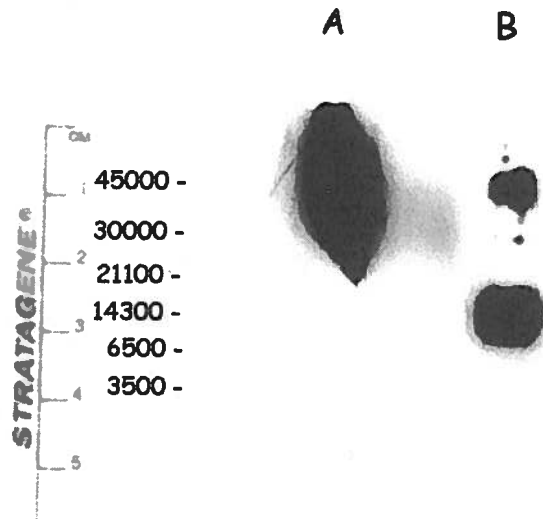
2 : Analyse par Western blot de la spécificité du sérum de lapin contre la fusion GST-DdNR1_{Ac} (A) et contre DdNR1_{Ac} seul (B). Dans les deux cas, un gel SDS-PAGE a été effectué puis transféré sur membrane de PVDF. Une dilution à 1 / 25 du sérum produit a alors été mis à réagir avec la membrane et la visualisation s'est faite grâce à un anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin couplé à la peroxydase de raifort.

3 : Vérification de la spécificité du sérum produit en le faisant réagir contre une autre fusion (HisDHFR-DdNR1_{Ac}). A. Anticorps commercial anti-His réagissant contre un extrait total du clone 8 issu de la transformation de la souche BL21-pRep4 avec le vecteur pQE40-HisDHFR-DdNR1_{Ac} produisant la fusion HisDHFR-DdNR1_{Ac} (~ 42 kD). B. Sérum anti-DdNR1_{Ac} (dilué 1 / 200) réagissant contre un extrait du clone 8. C. Sérum anti-DdNR1_{Ac} (dilué 1 / 200) réagissant contre la souche BL21-pRep4 contenant pQE40 seul.

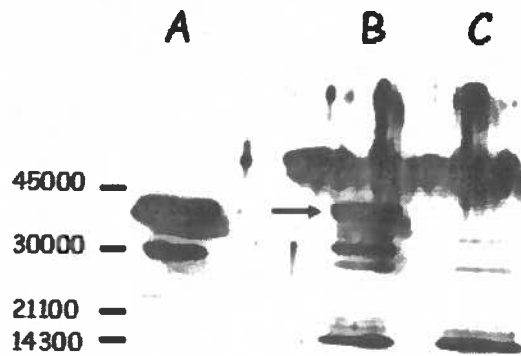
1



2



3



Appendice 2

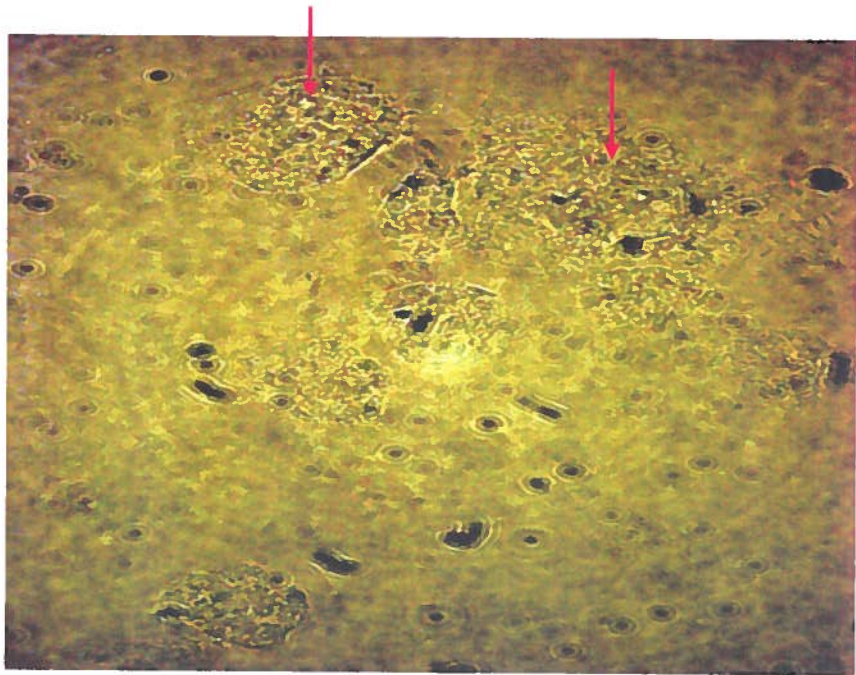
Premiers résultats d'immunofluorescence

Des cellules de *D. discoideum* sauvages, perméabilisées et exposées au sérum anti-DdNR1_{AC}, ont été repérées dans un premier temps en contraste de phase, puis observées en fluorescence. Les cellules ont alors montré une fluorescence diffuse, d'intensité assez forte. Ces résultats très préliminaires (Figure 19) semblent montrer que la protéine DdNR1 se répartirait à la surface de la cellule et non sur des vésicules intracellulaires.

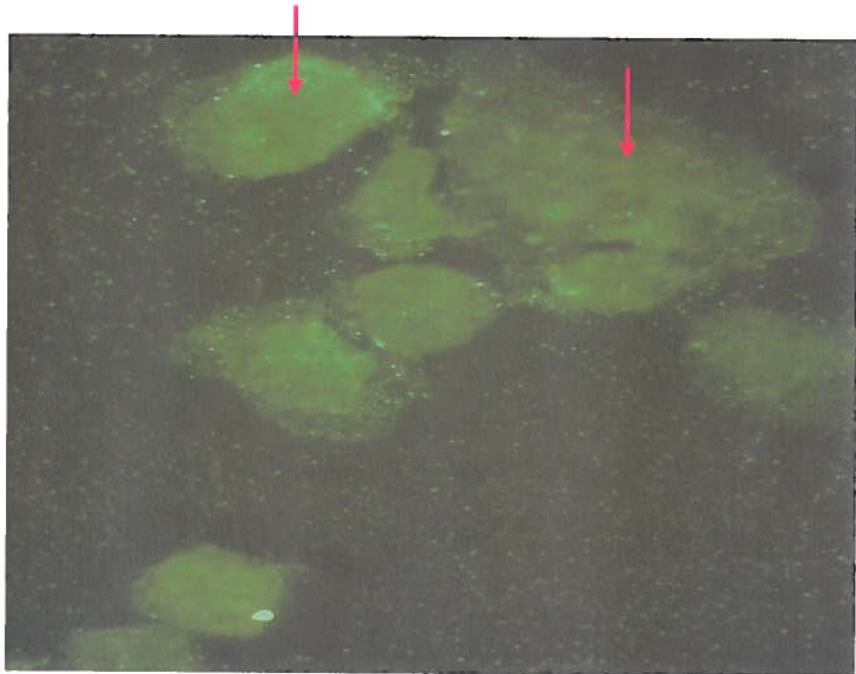
Figure 19 : Premiers résultats d'immunofluorescence utilisant le sérum anti-DdNR1_{Ac} contre des *D. discoideum* sauvages au repos.

Cellules observées en contraste de phase (A) et en fluorescence (B). L'aspect diffus suggère une répartition à la membrane plasmique de DdNR1, et non sur des vésicules intracellulaires.

A



B



RÉFÉRENCES

- Abbas, A. K., Lichtman, A.H, Pober, J.S (2000). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, W.H Saunders Company.
- Abel, L., F. O. Sanchez, J. Oberti, N. V. Thuc, L. V. Hoa, V. D. Lap, E. Skamene, P. H. Lagrange et E. Schurr (1998). "Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene." J Infect Dis **177**(1): 133-45.
- Abu-Zant, A., M. Santic, M. Molmeret, S. Jones, J. Helbig et Y. Abu Kwaik (2005). "Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*." Infect Immun **73**(9): 5339-49.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-37.
- Ashworth, J. M. et D. J. Watts (1970). "Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture." Biochem J **119**(2): 175-82.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992). Short Protocols in Molecular Biology. USA, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.
- Balest, A., B. Peracino, C. Skriwan, M. Steinert et S. Bozzaro (2004). Differential effects of Nramp1 expression on phagocytosis and resistance to infection by pathogenic bacteria. Dicty Annual Conference 2004, Canada.
- Bellamy, R. (1999). "The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens." Microbes Infect **1**(1): 23-7.
- Benjamin, W. H., Jr., C. L. Turnbough, Jr., B. S. Posey et D. E. Briles (1985). "The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid." Infect Immun **50**(2): 392-7.
- Bertani, G. (2004). "Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems." J Bacteriol **186**(3): 595-600.
- Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros et M. F. Cellier (2002). "Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." Infect Immun **70**(11): 6032-42.

- Bozzaro, S., B. Peracino, C. Wagner, A. Balest, A. Balbo, B. Pergolizzi, A. Noegel et M. Steinert (2005). Function and mechanism of action of *Dictyostelium* Nramp1 in bacterial infection. Dicty Annual Conference 2005, France.
- Cellier, M. F., I. Bergevin, E. Boyer et E. Richer (2001). "Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters." Trends Genet **17**(7): 365-70.
- Chaloupka, R., P. Courville, F. Veyrier, B. Knudsen, T. A. Tompkins et M. F. Cellier (2005). "Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport in vivo." Biochemistry **44**(2): 726-33.
- Chander, M., B. Setlow et P. Setlow (1998). "The enzymatic activity of phosphoglycerate mutase from gram-positive endospore-forming bacteria requires Mn²⁺ and is pH sensitive." Can J Microbiol **44**(8): 759-67.
- Charette, S. J. et P. Cosson (2004). "Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis." Biotechniques **36**(4): 574-5.
- Clemens, D. L., B. Y. Lee et M. A. Horwitz (2000). "*Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7." Infect Immun **68**(9): 5154-66.
- Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., Rappuolo, R. (2000). Cellular Microbiology. Washington, ASM Press.
- Cosson, P., L. Zulianello, O. Join-Lambert, F. Faurisson, L. Gebbie, M. Benghezal, C. Van Delden, L. K. Curty et T. Kohler (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system." J Bacteriol **184**(11): 3027-33.
- Courville, P., R. Chaloupka, F. Veyrier et M. F. Cellier (2004). "Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog." J Biol Chem **279**(5): 3318-26.
- Cuellar-Mata, P., N. Jabado, J. Liu, W. Furuya, B. B. Finlay, P. Gros et S. Grinstein (2002). "Nramp1 modifies the fusion of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles with cellular endomembranes in macrophages." J Biol Chem **277**(3): 2258-65.

- Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M. V. Omelchenko, H. M. Kostandarithes, K. S. Makarova, L. P. Wackett, J. K. Fredrickson et D. Ghosal (2004). "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance." Science **306**(5698): 1025-8.
- Eichinger, L., J. A. Pachebat, G. Glockner, M. A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M. A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabbinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E. C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell et A. Kuspa (2005). "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." Nature **435**(7038): 43-57.
- Faix, J., L. Kreppel, G. Shaulsky, M. Schleicher et A. R. Kimmel (2004). "A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system." Nucleic Acids Res **32**(19): e143.
- Ferguson, A. D. et J. Deisenhofer (2004). "Metal import through microbial membranes." Cell **116**(1): 15-24.
- Ferreira, F. R., L. R. Goulart, H. D. Silva et I. M. Goulart (2004). "Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter

- polymorphisms and the lepromin response." Int J Lepr Other Mycobact Dis **72**(4): 457-67.
- Finlay, B. B. et S. Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." Microbiol Mol Biol Rev **61**(2): 136-69.
- Forbes, J. R. et P. Gros (2001). "Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions." Trends Microbiol **9**(8): 397-403.
- Forbes, J. R. et P. Gros (2003). "Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane." Blood **102**(5): 1884-92.
- Franke, J. et R. Kessin (1977). "A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(5): 2157-61.
- Gaudet, P., H. MacWilliams et A. Tsang (2001). "Inducible expression of exogenous genes in *Dictyostelium discoideum* using the ribonucleotide reductase promoter." Nucleic Acids Res **29**(2): E5.
- Gebran, S. J., C. Newton, Y. Yamamoto, R. Widen, T. W. Klein et H. Friedman (1994). "Macrophage permissiveness for *Legionella pneumophila* growth modulated by iron." Infect Immun **62**(2): 564-8.
- Goldsby, R. A., Kindt, T.J, Osborne, B.O (2000). Immunology. New York, W.H Freeman and Company.
- Gotthardt, D., H. J. Warnatz, O. Henschel, F. Bruckert, M. Schleicher et T. Soldati (2002). "High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases." Mol Biol Cell **13**(10): 3508-20.
- Gruenheid, S., F. Canonne-Hergaux, S. Gauthier, D. J. Hackam, S. Grinstein et P. Gros (1999). "The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes." J Exp Med **189**(5): 831-41.
- Gupta, R., E. Jung, A. A. Gooley, K. L. Williams, S. Brunak et J. Hansen (1999). "Scanning the available *Dictyostelium discoideum* proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using neural networks." Glycobiology **9**(10): 1009-22.

- Hagele, S., R. Kohler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker et M. Steinert (2000). "*Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*." Cell Microbiol **2**(2): 165-71.
- Hoal, E. G., L. A. Lewis, S. E. Jamieson, F. Tanzer, M. Rossouw, T. Victor, R. Hillerman, N. Beyers, J. M. Blackwell et P. D. Van Helden (2004). "SLC11A1 (Nramp1) but not SLC11A2 (Nramp2) polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis in a high-incidence community in South Africa." Int J Tuberc Lung Dis **8**(12): 1464-71.
- Hofmann, K. et W. Stoffel (1993). "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." Biol. Chem. Hoppe-Seyler **374**(166).
- Jakubovics, N. S. et H. F. Jenkinson (2001). "Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria." Microbiology **147**(Pt 7): 1709-18.
- Kessin, R. H. (2001). *Dictyostelium* - Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity. Cambridge, Cambridge University Press.
- Khlebnikov, A., O. Risa, T. Skaug, T. A. Carrier et J. D. Keasling (2000). "Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture." J Bacteriol **182**(24): 7029-34.
- Knecht, D. et K. M. Pang (1995). "Electroporation of *Dictyostelium discoideum*." Methods Mol Biol **47**: 321-30.
- Laboratoire-d'Informatique-Fondamentale-de-Lille. (12 octobre 2005). Extrait, de http://www.lifl.fr/~bonte/stage_DEA/images/Dicty2.jpg.
- Lloyd, M. M., A. Ceccarelli et J. G. Williams (1990). "Establishment of conditions for the transformation of nonaxenic *Dictyostelium* strains." Dev Genet(11): 391-395.
- Machner, M. P., S. Frese, W. D. Schubert, V. Orian-Rousseau, E. Gherardi, J. Wehland, H. H. Niemann et D. W. Heinz (2003). "Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **48**(6): 1525-36.
- Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Hellmann, P. Gros et M. F. Cellier (2000). "Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter." Mol Microbiol **35**(5): 1065-78.

- Maselli, A. G., R. Davis, R. Furukawa et M. Fechheimer (2002). "Formation of Hirano bodies in *Dictyostelium* and mammalian cells induced by expression of a modified form of an actin-crosslinking protein." J Cell Sci **115**(Pt 9): 1939-49.
- Metz, B. A., T. E. Ward, D. L. Welker et K. L. Williams (1983). "Identification of an endogenous plasmid in *Dictyostelium discoideum*." EMBO J. **2**(4): 515-519.
- Molmeret, M., S. D. Zink, L. Han, A. Abu-Zant, R. Asari, D. M. Bitar et Y. Abu Kwaik (2004). "Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome." Cell Microbiol **6**(1): 33-48.
- Mukhopadhyay, N., L. Almasy, M. Schroeder, W. P. Mulvihill et D. E. Weeks (2005). "Mega2: data-handling for facilitating genetic linkage and association analyses." Bioinformatics **21**(10): 2556-7.
- Nellen, W., C. Silan et R. A. Firtel (1984). "DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion." Mol Cell Biol **4**(12): 2890-8.
- NIH. Extrait le 14 juillet, 2005, de <http://www.nih.gov/science/models/>.
- Pang, K. M., M. A. Lynes et D. A. Knecht (1999). "Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*." Plasmid **41**(3): 187-97.
- Peracino, B., C. Skriwan, A. Balest, A. Balbo, B. Pergolizzi, A. Noegel, M. Steinert et S. Bozzaro (2003). *Dictyostelium* as a model study for Nramp1 function in phagocytosis and resistance to pathogens. Dicty Annual Conference 2003, Australia.
- Peracino, B., C. Wagner, A. Balest, A. Balbo, B. Pergolizzi, A. A. Noegel, M. Steinert et S. Bozzaro (2006). "Function and mechanism of action of *Dictyostelium* Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection." Traffic **7**(1): 22-38.
- Pintsch, T., M. Satre, G. Klein, J. B. Martin et S. C. Schuster (2001). "Cytosolic acidification as a signal mediating hyperosmotic stress responses in *Dictyostelium discoideum*." BMC Cell Biol **2**: 9.
- Plant, J. et A. A. Glynn (1976). "Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice." J Infect Dis **133**(1): 72-8.

- Portnoy, M. E., X. F. Liu et V. C. Culotta (2000). "Saccharomyces cerevisiae expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters." Mol Cell Biol **20**(21): 7893-902.
- Poussin, M. A. et H. Goldfine (2005). "Involvement of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C and host protein kinase C in permeabilization of the macrophage phagosome." Infect Immun **73**(7): 4410-3.
- Poyart, C., E. Pellegrini, O. Gaillot, C. Boumaila, M. Baptista et P. Trieu-Cuot (2001). "Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*." Infect Immun **69**(8): 5098-106.
- Prevorovsky, M. et F. Puta (2003). "A/T-rich inverted DNA repeats are destabilized by chaotrope-containing buffer during purification using silica gel membrane technology." Biotechniques **35**(4): 698-700, 702.
- Pukatzki, S., R. H. Kessin et J. J. Mekalanos (2002). "The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3159-64.
- Raper, K. B. (1935). "*Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves." J Agr Res(50): 135-47.
- Repp, H., Z. Pamukci, A. Koschinski, E. Domann, A. Darji, J. Birringer, D. Brockmeier, T. Chakraborty et F. Dreyer (2002). "Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations." Cell Microbiol **4**(8): 483-91.
- Richer, E., P. Courville, I. Bergevin et M. F. Cellier (2003). "Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria." J Mol Evol **57**(4): 363-76.
- Richer, E., P. Courville et M. F. Cellier (2004). Chapter 16: Molecular evolutionary analysis of Nramp family. The Nramp Family. M. F. Cellier, Gros, P. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Rodriguez, G. M., M. I. Voskuil, B. Gold, G. K. Schoolnik et I. Smith (2002). "*ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response." Infect Immun **70**(7): 3371-81.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, J. D., J. G. Shannon, D. Howe, S. F. Hayes, M. S. Swanson et R. A. Heinzen (2005). "Specificity of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* vacuoles and versatility of *Legionella pneumophila* revealed by coinfection." Infect Immun **73**(8): 4494-504.
- Schmidt, H. A., K. Strimmer, M. Vingron et A. von Haeseler (2002). "TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing." Bioinformatics **18**(3): 502-4.
- Schryvers, A. B. et I. Stojiljkovic (1999). "Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*." Mol Microbiol **32**(6): 1117-23.
- Shannon, J. G., D. Howe et R. A. Heinzen (2005). "Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8722-7.
- Singh, K. V., T. M. Coque, G. M. Weinstock et B. E. Murray (1998). "In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification." FEMS Immunol Med Microbiol **21**(4): 323-31.
- Solomon, J. M., G. S. Leung et R. R. Isberg (2003). "Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin." Infect Immun **71**(6): 3578-86.
- Sonnhammer, E. L., G. von Heijne et A. Krogh (1998). "A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences." Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol **6**: 175-82.
- Steinert, M. et K. Heuner (2005). "*Dictyostelium* as host model for pathogenesis." Cell Microbiol **7**(3): 307-14.
- Sussmann, A. S. (1966). Methods in Cell Physiology. New York, Academic Press.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin et D. G. Higgins (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res **25**(24): 4876-82.
- Tilney, L. G., O. S. Harb, P. S. Connelly, C. G. Robinson et C. R. Roy (2001). "How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and

- transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4637-50.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler et F. Heffron (1995). "Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages." Infect Immun **63**(5): 1739-44.
- Vidal, S. M., E. Pinner, P. Lepage, S. Gauthier et P. Gros (1996). "Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains." J Immunol **157**(8): 3559-68.
- Wallace, R. B., J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose et K. Itakura (1979). "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch." Nucleic Acids Res **6**(11): 3543-57.
- Wang, X., A. J. Ghio, F. Yang, K. G. Dolan, M. D. Garrick et C. A. Piantadosi (2002). "Iron uptake and Nramp2/DMT1/DCT1 in human bronchial epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(5): L987-95.
- White, J. K., P. Mastroeni, J. F. Popoff, C. A. Evans et J. M. Blackwell (2005). "Slc11a1-mediated resistance to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Leishmania donovani* infections does not require functional inducible nitric oxide synthase or phagocyte oxidase activity." J Leukoc Biol **77**(3): 311-20.
- Whitworth, T., V. L. Popov, X. J. Yu, D. H. Walker et D. H. Bouyer (2005). "Expression of the *Rickettsia prowazekii* *pld* or *tlyC* gene in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mediates phagosomal escape." Infect Immun **73**(10): 6668-73.
- www.dicthybase.org. Extrait le 19 juillet, 2005, de http://www.dicthybase.org.
- Lien 1 (12 octobre 2005) : http://www.dicthybase.org/tutorial/about_dictyostelium.htm
- Lien 2 (12 octobre 2005) : http://www.dicthybase.org/strain_history.htm
- Lien 3 (12 octobre 2005) :
http://www.dicthybase.org/techniques/media/listserv_freezing.html
- Lien 4 (17 octobre 2005) :
http://www.dicthybase.org/techniques/media/listserv_storing_dicty.htm
- Lien 5 (19 octobre 2005) :
http://www.dicthybase.org/ListServ_archive/listserv_archive_ko.html#ko5

Lien 6 (20 octobre 2005) :

http://www.dictybase.org/ListServ_archive/listserv_archive_molecbiol.html#genomic5-2

Zwilling, B. S., D. E. Kuhn, L. Wikoff, D. Brown et W. Lafuse (1999). "Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth." Infect Immun **67**(3): 1386-92.