

Thèse de Doctorat
De l'Université Louis Pasteur
STRASBOURG I

Présentée par
Christian RICK

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université STRASBOURG I

Spécialité : Biophysique

Mesure cellule par cellule du nombre de copies de plasmide chez *Escherichia coli*

Soutenue publiquement le 24 mai 2005

Jury

M. Eric KARSENTI	(rapporteur externe)
M. Pascal SILBERZAN	(rapporteur externe)
M. Jean-Pierre MUNCH	(rapporteur interne)
M. Didier CHATENAY	(directeur)

Remerciements

Je remercie Didier Chatenay de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Didier est quelqu'un de très reconnu et les gens qu'il rencontre sont le plus souvent impressionnés par son enthousiasme ou par ses qualités d'expérimentateur. Pour ma part je trouve que son trait de caractère le plus remarquable est cette sorte d'humilité et d'attention avec laquelle il sait écouter les gens. Au milieu de ses multiples activités, il trouve toujours le temps de prendre un café et de discuter.

Je remercie Didier pour son soutien et pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de cette thèse.

Je remercie Michael Poirier pour son aide et son amitié.

Michael a une compétence scientifique exceptionnelle, beaucoup de patience et surtout des qualités humaines rares. Quelles qu'aient été les circonstances, je l'ai toujours vu souriant et décontracté. Il s'entend avec tout le monde. Et lorsqu'il parle à quelqu'un, son attitude et les mots qu'il emploie expriment toujours l'intérêt et la considération.

Je remercie Michael pour son aide à mon travail de thèse et pour les bons moments que nous avons passés ensemble.

Je remercie Benoît Kammerer pour son aide et ses conseils.

Benoît Kammerer a une connaissance encyclopédique de la biologie, une rigueur scientifique poussée à l'extrême et un caractère bien trempé...

J'aimerais le remercier pour les nombreuses heures qu'il m'a consacré, pour ses encouragements, et pour nos conversations parfois très longues...

Je remercie l'ensemble des membres du LDFC pour leur aide et les moments que nous avons passé ensemble à boire un café ou discuter. En particulier j'aimerais remercier notre staff technique : Annie Picchinenna, Marc Basler, Alain Steyer, Patrick Braun et Catherine Herr

mes frères de paillasse : Thierry Marchal, Luis Alvarez-Sanchez, Sébastien Harlepp, Philippe Thomen et Alain Xayaphoummine

et nos secrétaires : Nadia Bouaouina et Josiane Haccoun

Merci aussi au service de séquençage de l'IBMP : Philippe Hammann et Malek Alioua

Je remercie également Serge Potier et les membres du Laboratoire de Microbiologie et de Génétique qui m'ont accueilli après la fermeture du LDFC.

Et enfin je remercie Eric Karsenti, Jean-Pierre Munch et Pascal Silberzan d'avoir accepté de juger ce travail.

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
i.1. Des différences entre individus identiques.....	2
i.2. Les origines de ces différences : la régulation de l'expression génétique et le bruit d'expression génétique.....	2
i.3. Mise en évidence du bruit d'expression génétique.....	3
i.4. Du matériel génétique supplémentaire : les plasmides.....	4
i.5. Comment compter le nombre de plasmides dans une cellule.....	5
Chapitre I : Résumé de microbiologie et biologie moléculaire	7
I.1. <i>Escherichia coli</i>	8
I.2. L'ADN support de l'information génétique.....	8
I.3. Les plasmides.....	11
I.4. L'expression génétique.....	12
I.5. L'opéron lactose : un exemple de régulation génétique.....	13
I.6. Deux protéines fluorescentes : la GFP et la DsRed.....	18
I.7. Le bactériophage Lambda.....	19
I.8. La recombinaison homologue.....	22
I.9. Les enzymes de restriction.....	22
I.10. Génotype et phénotype.....	23
I.11. La variabilité phénotypique.....	25

Chapitre II : Principe de l'expérience.....	26
II.1. Mesures cellule par cellule.....	27
II.2. Détermination du nombre de plasmides dans une cellule.....	27
II.3. Commentaires.....	32
II.3.1. Niveau d'expression et localisation du gène.....	32
II.3.2. Niveau d'expression et nombre de copies du gène.....	32
II.3.3. Étalonage du niveau d'expression.....	32
II.3.4. Critère de validation.....	33
Chapitre III : Techniques utilisées au cours de cette thèse.....	34
III.1. Techniques de biologie moléculaire et cellulaire.....	36
III.1.1 PCR.....	37
III.1.2. Utilisation d'enzymes de restriction.....	37
III.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	37
III.1.4. Culture de bactéries en milieu liquide.....	38
III.1.5.	
Électroporation.....	42
III.1.6. Utilisation de milieux sélectifs - Isolation d'une population monoclonale....	42
III.1.7. Transformation chromosomique.....	44
III.1.7.1. Définition.....	44
III.1.7.2. Transformation chromosomique par recombinaison homologue incluant l'utilisation d'une stratégie de sélection/contre-sélection.....	44
III.1.7.3. Protocole d'introduction d'un fragment d'ADN dans le chromosome d' <i>Escherichia coli</i>	46

III.2. Techniques de micro-lithographie : Construction du dispositif de tri cellulaire.....	49
III.2.1. Exposé du principe.....	50
III.2.2. Protocoles.....	51
III.2.2.1. Lithographie optique (réalisation de la matrice)	51
III.2.2.2. Lithographie douce (moulage du motif expérimental)	54
III.2.2.3. Assemblage (construction du dispositif expérimental)	56
III.2.2.4. Enduit (préparation du dispositif expérimental)	58
III.2.3. Plan du masque.....	59
III.3. Techniques de microscopie de fluorescence : Acquisition et traitement des données..	60
III.3.1. Présentation du montage.....	61
III.3.2. Réglages.....	63
III.3.3. Acquisition.....	66
III.3.4. Traitement des données.....	67
Chapitre IV : Constructions.....	68
IV.1. Présentation générale.....	69
IV.1.1. Choix des plasmides.....	69
IV.1.2. Choix des souches bactériennes.....	70
IV.1.3. Vue d'ensemble des constructions.....	70
IV.2. Première série de constructions.....	73
IV.2.1. Construction du plasmide pTG1.....	73
IV.2.2. Construction des plasmides pTG2, pTG3, pTG4 et pTG5.....	74
IV.2.3. Construction des souches RP2, RP3, RP4 et RP5.....	82
IV.3. Deuxième série de constructions.....	82
IV.3.1. Synthèse des gènes codants pour les protéines fluorescentes verte et rouge..	82
IV.3.2. Construction des plasmides pTG322, pTG82, pTG64 et pTG320.....	84
IV.3.3. Construction des souches CR1, CR12 et CR19.....	90
IV.4. Séquences des oligonucléotides.....	93

Chapitre V : Résultats	98
V.1. Préparation des bactéries.....	99
V.2. Résultats des mesures.....	100
V.3. Épilogue.....	104
V.3.1. Une deuxième stratégie de mesure du nombre de copies de plasmides.....	104
V.3.2. Un autre trait phénotypique observable : les flagelles.....	106
V.3.3. D'autres expériences de Microscopie de fluorescence.....	108
Conclusion	110
Références bibliographiques	113

Introduction

Introduction

Les caractéristiques d'une cellule dépendent à la fois de son hérédité et de son environnement. Mais également d'une troisième variable : le hasard...

i.1. Des différences entre individus identiques

Des cellules génétiquement identiques ne sont généralement pas identiques.

Par exemple les cellules du corps humain contiennent chacune la totalité du patrimoine génétique de l'individu. Mais les cellules qui constituent les muscles sont différentes de celles qui constituent le cerveau. Cet exemple de la différenciation cellulaire illustre le fait que le patrimoine génétique ne détermine pas à lui seul l'état physique d'une cellule.

Cette thèse présente une approche quantitative de l'étude des différences dans le cas d'un organisme unicellulaire : la bactérie *Escherichia coli*.

i.2. Les origines de ces différences : la régulation de l'expression génétique et le bruit d'expression génétique

Les différences entre des bactéries génétiquement identiques s'expliquent en partie par le fait qu'elles s'adaptent à leur environnement. Leur comportement change en fonction des conditions de culture (température, composition du milieu). En revanche, pour des conditions de culture données, une population de bactéries se comporte toujours de la même manière. En d'autres termes, l'état d'une population de bactéries est déterminé par les conditions de culture - et pour obtenir à plusieurs reprises une population de bactéries dans un état donné, il suffit de reproduire les conditions de culture.

Cependant, si l'état d'une population de bactéries est déterminé par les conditions de culture, ce n'est pas le cas pour l'état d'une bactérie donnée. Les cellules qui constituent une population sont différentes les unes des autres. C'est-à-dire que même si ces bactéries sont génétiquement identiques et qu'elles sont cultivées ensemble, dans les mêmes conditions, elles sont néanmoins différentes entre elles.

Le fait que des cellules génétiquement identiques soient différentes lorsque les conditions de culture sont différentes correspond à la régulation de l'expression génétique.

Le fait que des cellules génétiquement identiques soient différentes alors que les conditions de culture sont identiques correspond à ce qu'on appelle le bruit d'expression génétique.

i.3. Mise en évidence du bruit d'expression génétique

Toute l'information génétique nécessaire à la vie d'*Escherichia coli* est portée par une seule molécule d'ADN (son chromosome).

Une expérience réalisée par Elowitz et al. et publiée dans la revue *Science* en août 2002 a permis de visualiser le bruit d'expression génétique. Deux gènes codant des protéines fluorescentes de couleurs différentes ont été introduits dans le chromosome d'une bactérie. La bactérie s'est divisée jusqu'à donner un grand nombre de cellules. Et ces cellules ont été observées au microscope.

D'une part l'intensité de la fluorescence varie d'une cellule à l'autre. Et d'autre part les cellules n'ont pas toutes la même couleur.

Par ailleurs pour de forts taux d'expression ces différences s'estompent. – Figure i.3.A

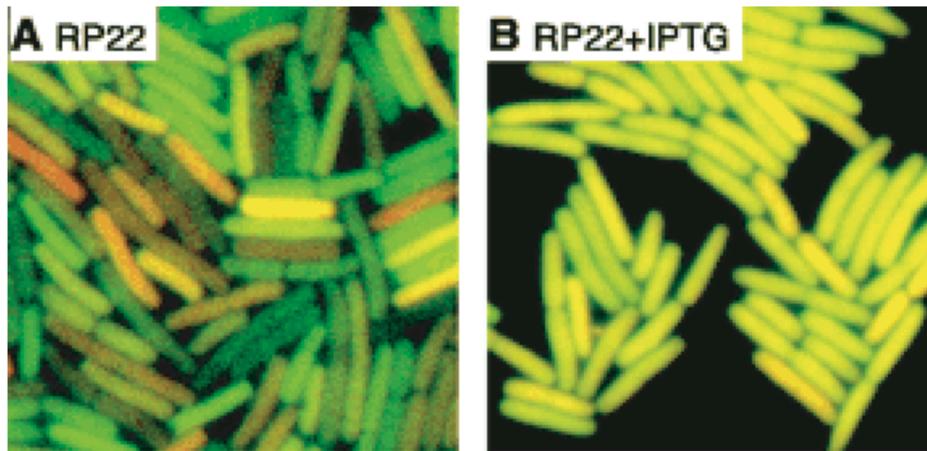


Figure i.3.A. En présence d'IPTG les protéines fluorescentes sont exprimées davantage et la différence de couleur entre cellules s'estompe.

Ces observations montrent le caractère stochastique de l'expression d'un gène.

i.4. Du matériel génétique supplémentaire : les plasmides

Les différences entre deux bactéries peuvent provenir du fait que leurs chromosome portent des gènes différents, ou de ce que ces gènes sont plus ou moins exprimés. Mais il peut encore y avoir une autre raison : en plus de son ADN chromosomique une bactérie peut contenir des molécules d'ADN supplémentaires appelées plasmides.

Ces plasmides portent le plus souvent un gène qui confère un avantage à la bactérie qui les héberge (comme par exemple la résistance à un antibiotique).

Pour un plasmide donné et une souche de bactérie donnée (dans des conditions de culture données) le nombre moyen de copies de plasmide par cellule est déterminé (comme les autres propriétés de la population).

Pour mesurer ce nombre on cultive des bactéries, on mesure leur nombre, et on les fait éclater pour récupérer les plasmides. On mesure le nombre de plasmides et on divise le nombre de plasmides par le nombre de bactéries. Pour des conditions de culture données, le résultat est toujours le même.

Mais ce nombre de plasmides par cellule est une propriété de la population. C'est une moyenne sur un très grand nombre d'individus (typiquement une centaine de millions).

Les bactéries qui constituent cette population n'ont pas toutes le même nombre de plasmides. En fait une bactérie n'a pas le même nombre de plasmides au cours du temps, puisque juste avant de se diviser elle a autant de plasmides que les deux nouvelles cellules réunies. Par ailleurs juste après la division les deux nouvelles cellules ne comptent généralement pas le même nombre de plasmides. Le nombre de plasmides dans une bactérie est différent d'une cellule à l'autre.

i.5. Comment compter le nombre de plasmides dans une cellule ?

L'objet de cette thèse est la mise au point d'une expérience de mesure cellule par cellule du nombre de plasmides chez *Escherichia coli* : il s'agit de 'prendre' les bactéries une par une et de 'compter' le nombre de plasmides qu'elles contiennent.

Pour pouvoir réaliser des mesures cellule par cellule (alors que la taille d'une bactérie est de l'ordre du micron) nous avons construit un dispositif de tri cellulaire constitué de réservoirs de cinq millimètres de diamètre reliés entre eux par un canal de cinq microns de large. Cet espèce de 'couloir pour bactérie' nous permet de faire passer les bactéries d'un réservoir à l'autre, une par une, devant l'objectif d'un microscope inversé.

Pour mesurer le nombre de copies de plasmide dans une cellule nous avons choisi d'utiliser une stratégie de mesure indirecte. Chacun des plasmides que voulons étudier porte un gène codant une protéine fluorescente.

Chaque copie du plasmide porte ce gène, et chaque copie du gène commande la synthèse de protéines fluorescentes, de sorte que la fluorescence de la bactérie va refléter le nombre de copies de plasmide.

Après avoir esquissé brièvement quelques notions de base de biologie moléculaire et cellulaire, nous présentons dans le détail l'expérience de mesure cellule par cellule du nombre de plasmides que nous avons mis au point.

Nous expliquons son principe. Nous présentons les techniques de micro-lithographie que nous avons utilisées pour réaliser le dispositif de tri cellulaire. Nous décrivons le montage de microscopie de fluorescence que nous avons mis au point pour cette expérience. Et pour finir, nous commentons les résultats que nous avons obtenus.

Chapitre I

Résumé de microbiologie et biologie moléculaire

Résumé de microbiologie et biologie moléculaire

I.1. *Escherichia coli*

E.coli est une bactérie qui vit dans l'intestin des mammifères. C'est un organisme unicellulaire d'environ deux microns de long pour un micron de diamètre qui se reproduit par division cellulaire : la bactérie s'allonge puis se divise par le milieu pour donner naissance à deux cellules génétiquement identiques. (Berg, 2000) - Figure 1.1.A.



Avec un temps de doublement de l'ordre de la demi-heure, en 12 heures, une bactérie donnera naissance à plus de 16 millions de bactéries quasi-identiques. Cet ensemble de cellules issues d'une même bactérie originelle est appelé une population monoclonale ou encore un clone. (En fait des mutations se produisent spontanément et les cellules d'un clone ne sont pas toutes identiques. Mais la fréquence de ces mutations est faible : 0,003 mutation par génome et par division. Ces mutations sont donc suffisamment rares pour que nous puissions ignorer ce 'détail'. Nous discuterons ce point au moment de l'interprétation de nos résultats.) (Neidhardt & al., 1996)

I.2. L'ADN support de l'information génétique

La molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) est constituée de deux brins enroulés l'un autour de l'autre en 'double hélice'. Quatre bases se succèdent le long de ces brins : l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine.

Elles sont placées de telle sorte qu'à un endroit où se trouve une adénine sur un brin, se trouve une thymine sur l'autre ; et là où il y a une guanine sur un brin, il y a une cytosine sur l'autre : les deux brins qui constituent la molécule d'ADN sont complémentaires. (Watson & Crick, 1953) – Figure 1.2.A.

La molécule d'ARN (acide désoxyribonucléique) est une molécule analogue mais constituée d'un seul brin. – Figure 1.2.C.

L'information génétique est contenue dans la séquence, c'est-à-dire dans l'ordre dans lequel se succèdent les bases le long de la molécule.

Toute l'information génétique nécessaire à la vie de la bactérie *Escherichia coli* est portée par son unique chromosome : une molécule d'ADN circulaire de 4,6 millions de paires de bases. Avant de se diviser la bactérie en réalise une copie pour que les deux nouvelles cellules puissent chacune en emporter un exemplaire. Lors de la réplication, chacun des brins sert de modèle pour la synthèse de brin complémentaire. – Figure 1.2.B.
(Snyder & Champnes, 2002)

Structure de l'ADN

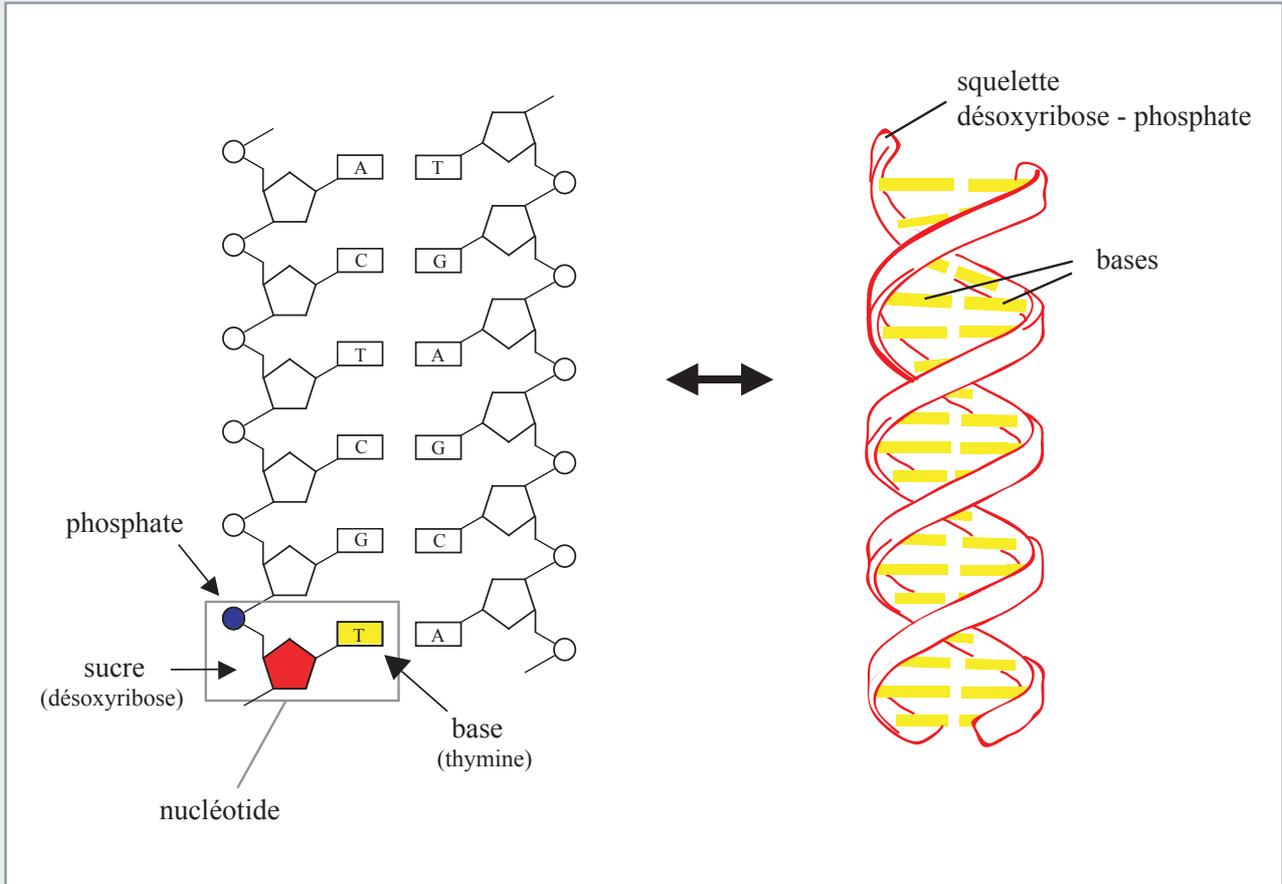


Figure I.2.A. : L'ADN (acide désoxyribonucléique) est constitué de quatre composants élémentaires appelés nucléotides. Chacun de ces nucléotides est lui même composé d'un phosphate, d'un sucre (le désoxyribose) et d'une base qui peut être l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G), ou la cytosine(C). La molécule d'ADN consiste en deux brins enroulés l'un autour de l'autre en 'double hélice'. Chacun des brins est obtenu à partir de la liaison entre le sucre d'un nucléotide et le phosphate d'un deuxième puis celle du sucre du deuxième avec le phosphate d'un troisième, et ainsi de suite. Les deux brins sont complémentaires : les bases qu'ils portent sont placées de sorte qu'à l'endroit où se trouve une adénine sur un brin, se trouve une thymine sur l'autre ; et là où il y a une guanine sur un brin, il y a une cytosine sur l'autre.

Réplication de l'ADN

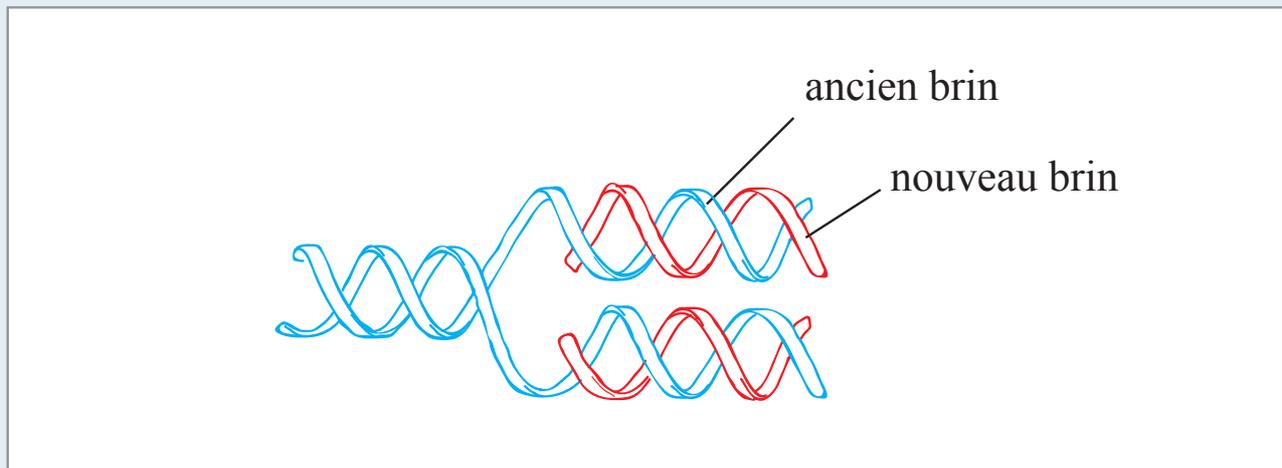


Figure I.2.B. : Lors de la répliation chacun des deux brins sert de modèle pour la synthèse du brin complémentaire

Composition des molécules d'ARN et d'ADN

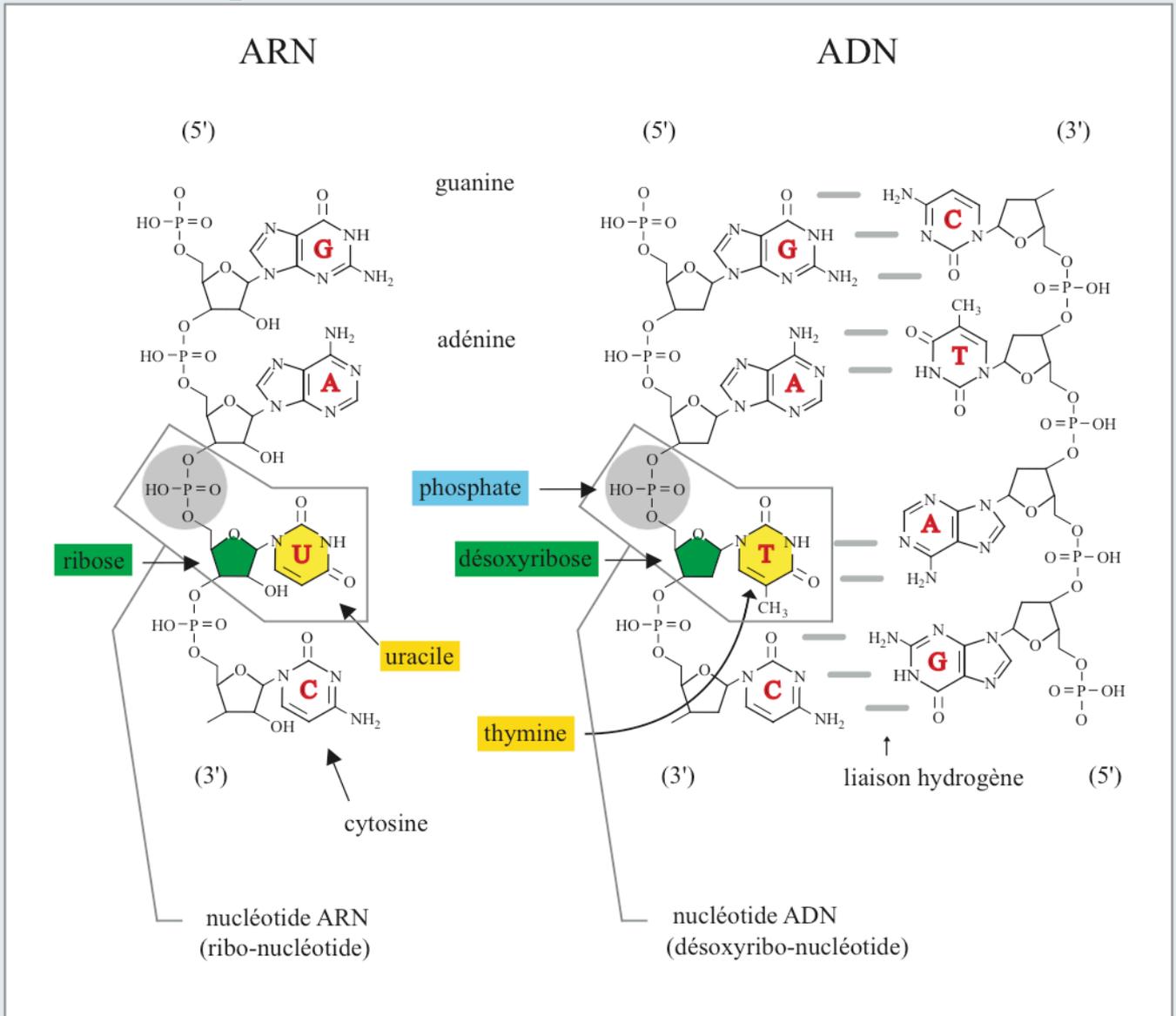


Figure I.2.C. L'ARN (acide ribonucléique) est une molécule semblable à l'ADN, mais constituée d'un seul brin, et dans laquelle le désoxyribose est remplacé par le ribose et la thymine par l'uracile.

Une paire adénine-thymine compte deux liaisons hydrogène, alors qu'une paire guanine-cytosine en compte trois.

Les brins d'ARN et d'ADN sont des molécules orientées. Leurs extrémités sont notées 5' et 3'.

Synthèse de l'ARN

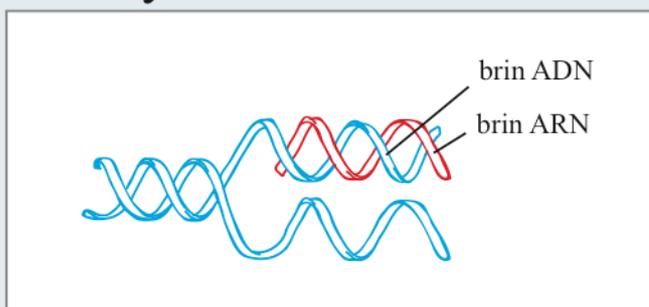


Figure I.2.D. La synthèse de l'ARN qui portera le message contenu dans la séquence ADN (l'ARN messager) se fait d'une manière analogue à celle de l'ADN lors de la réplication : l'un des deux brins d'ADN sert de modèle, et la séquence ADN est copiée (transcrite) en une séquence ARN.

I.3. Les plasmides

En plus de son ADN chromosomique la cellule peut contenir des molécules d'ADN supplémentaires appelées plasmides. – Figures 1.3.A. et 1.3.B.

Ces plasmides portent le plus souvent un gène qui confère un avantage à la bactérie qui les héberge, comme par exemple la résistance à un antibiotique. (Actis & al., 1998)

Pour une souche de bactérie et des conditions de culture données, le nombre de copies d'un plasmide par cellule est déterminé. Il dépend essentiellement d'une partie de la séquence du plasmide appelée réplicon, ou origine de réplication. (Lin-Chao & Bremer, 1986 - Del Solar & al., 1998)

Les plasmides que nous avons utilisés au cours de cette thèse sont des molécules d'ADN circulaires dont la longueur est de l'ordre de cinq mille paires de bases.

I.4. L'expression génétique

Une protéine est formée à partir d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés appelées polypeptides. Leur synthèse se fait en deux étapes : l'ADN est d'abord transcrit en un ARN messager, puis l'ARN messager est traduit en une séquence d'acides aminés. – Figures 1.2.D., 1.4.A., 1.4.B., 1.4.C. et 1.4.D.

ADN → ARNm → polypeptide

I.5. L'opéron lactose : un exemple de régulation de l'expression génétique

Tous les gènes ne sont pas exprimés tout le temps. Certains gènes sont exprimés en permanence (gènes constitutifs), alors que d'autres ne sont exprimés que sous certaines conditions.

Ainsi, la synthèse des enzymes qui permettent à *E.coli* d'utiliser le lactose est inhibée en l'absence de lactose. Une protéine appelée répresseur se fixe sur l'ADN et empêche la transcription. Lorsque du lactose est présent, une partie isomérisée en allolactose. Cet allolactose se fixe sur le répresseur et l'empêche de s'installer sur l'ADN de sorte que la transcription peut avoir lieu. La bactérie exprime alors les gènes qui lui permettent d'assimiler le lactose. – Figure 1.5.A.

(Snyder & Champnes, 2002 - cours de génétique en ligne de D.M. Krempels, University of Miami, USA)

Escherichia coli se reproduit par division cellulaire

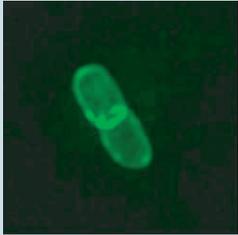


Photo : Jonathan Beckwith
Department of Microbiology of Harvard Medical School
Cambridge - USA

Figure I.1.A. : La bactérie s'allonge puis se divise par le milieu pour donner naissance à deux cellules quasiment identiques.

Les plasmides

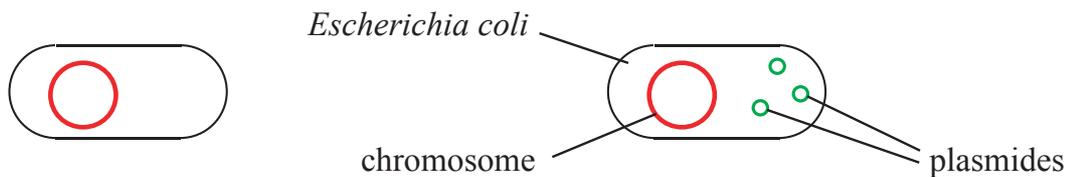


Figure I.3.A. : Toute l'information génétique nécessaire à la vie d'*Escherichia coli* est portée par son unique chromosome : une molécule d'ADN circulaire de 4,6 millions de paires de bases. Les plasmides sont des molécules d'ADN supplémentaires. Ceux que nous avons utilisés sont circulaires et comptent quelques milliers de paires de bases.

Tailles caractéristiques

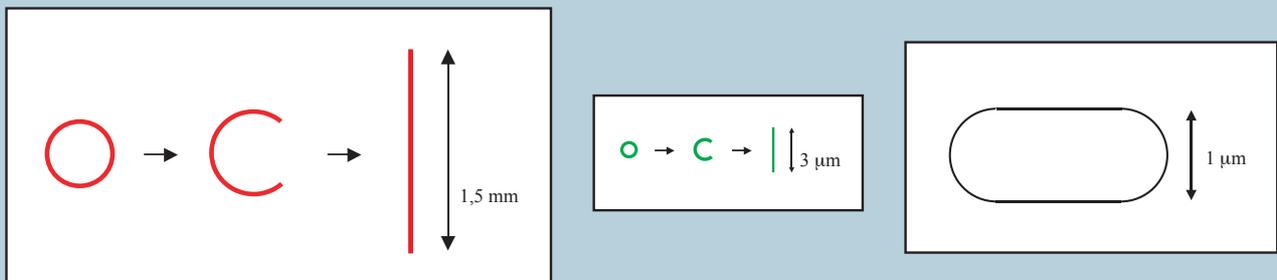


Figure I.3.B. : La figure précédente est très schématique : la longueur étendue du chromosome est d'un millimètre et demi. Un plasmide est mille fois plus petit et mesure environ deux microns - ce qui correspond à la taille de la bactérie.

Architecture d'un gène

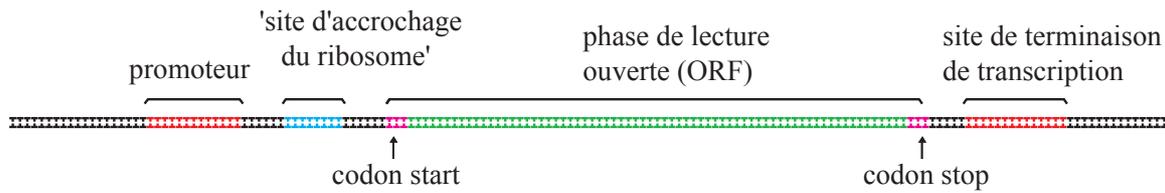


Figure I.4.A. Le terme de gène est employé dans plusieurs sens. Nous l'utiliserons pour désigner la partie de la molécule d'ADN allant du promoteur à la séquence de terminaison. La partie de la molécule d'ADN comprise entre le codon start et le codon stop est appelée phase de lecture ouverte (ORF).

Transcription

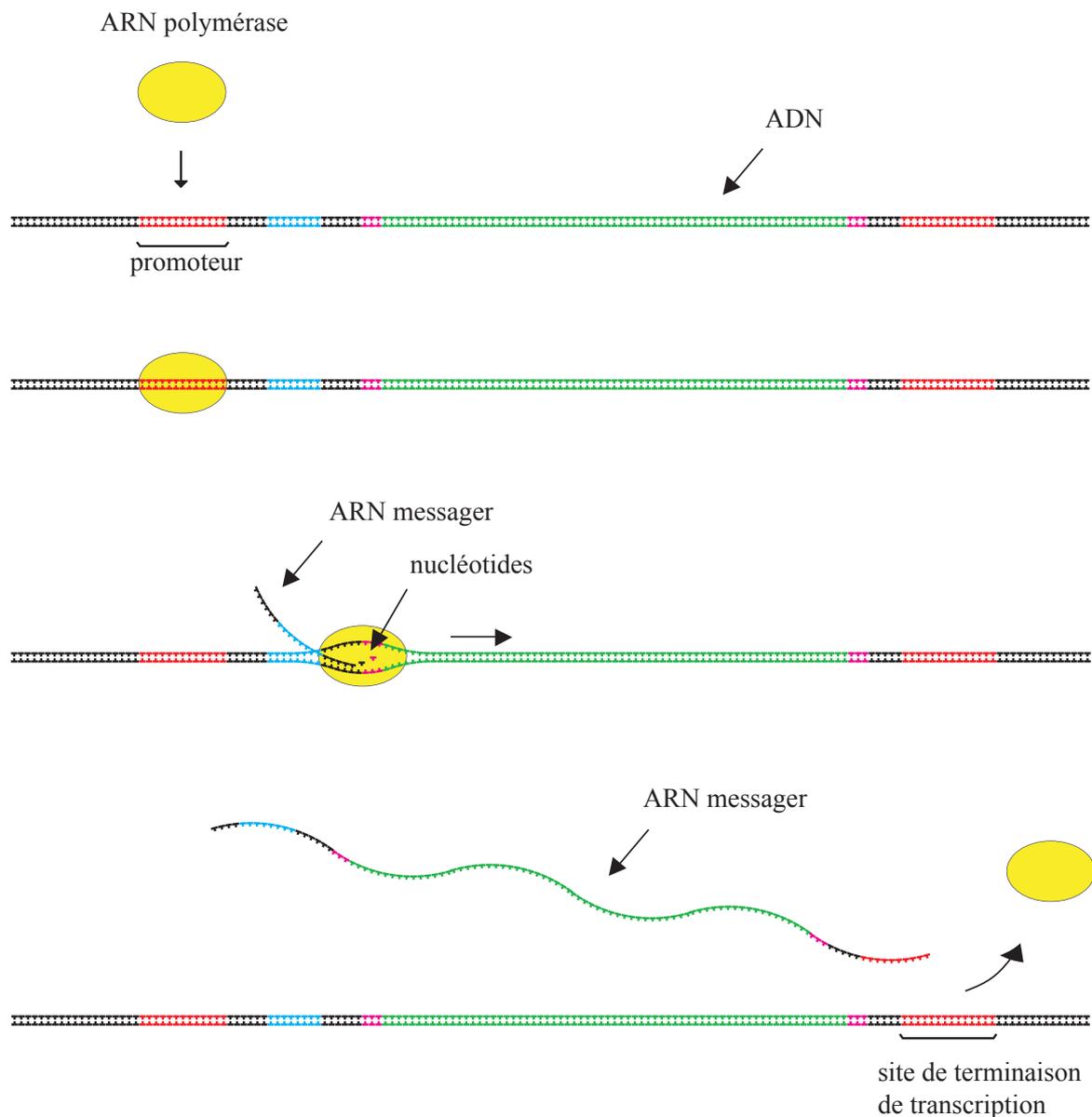


Figure I.4.A. La synthèse de l'ARN est catalysée par une enzyme appelée ARN-polymérase. Pour initier la transcription, l'ARN-polymérase se lie à une protéine appelée facteur sigma qui lui permet de reconnaître une séquence ADN particulière appelée promoteur. La polymérase vient se fixer sur le promoteur et entame la synthèse du brin d'ARN ; elle libère alors le facteur sigma et continue la transcription jusqu'à rencontrer une séquence de terminaison.

Traduction

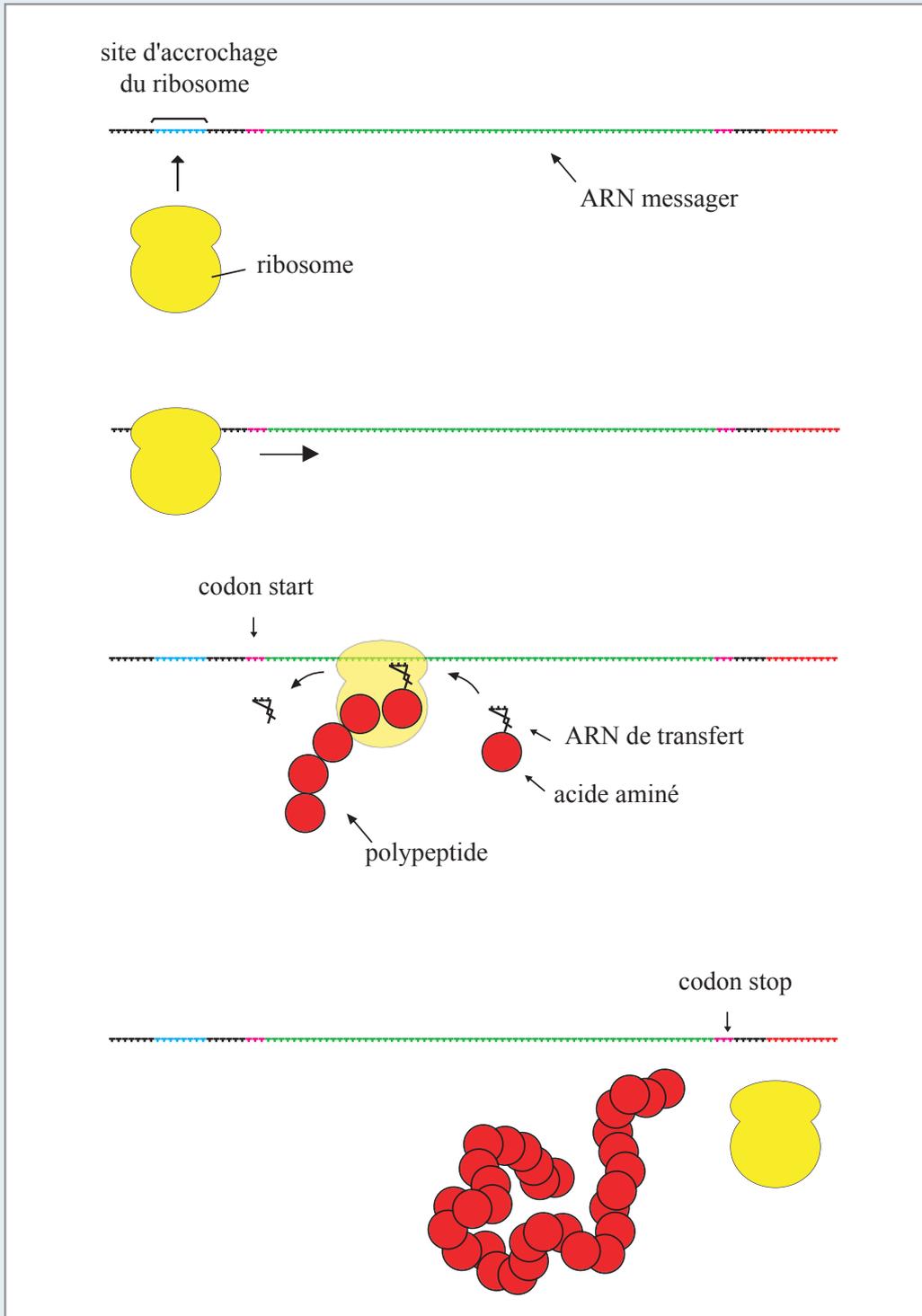


Figure I.4.C. La synthèse d'un polypeptide à partir de l'ARN messenger fait intervenir le ribosome et des 'molécules adaptatrices' : les ARN de transfert. Un ARN de transfert comporte un site de fixation pour un acide aminé spécifique et une séquence de trois bases qui peuvent s'apparier avec celles de l'ARN messenger. Le ribosome entame la traduction au niveau d'une séquence de trois bases appelée codon initiateur (codon start), puis il parcourt le brin d'ARN messenger en ajoutant un nouvel acide aminé pour chaque triplet de bases. La traduction s'arrête lorsque le ribosome rencontre un codon terminateur (codon stop). L'ADN, l'ARN, et les chaînes polypeptidiques sont des molécules orientées. Leur synthèse s'effectue de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' pour les acides nucléiques et de l'extrémité N vers l'extrémité C pour les polypeptides. La règle de correspondance entre triplets de bases et acides aminés est appelée code génétique.

L'opéron lactose

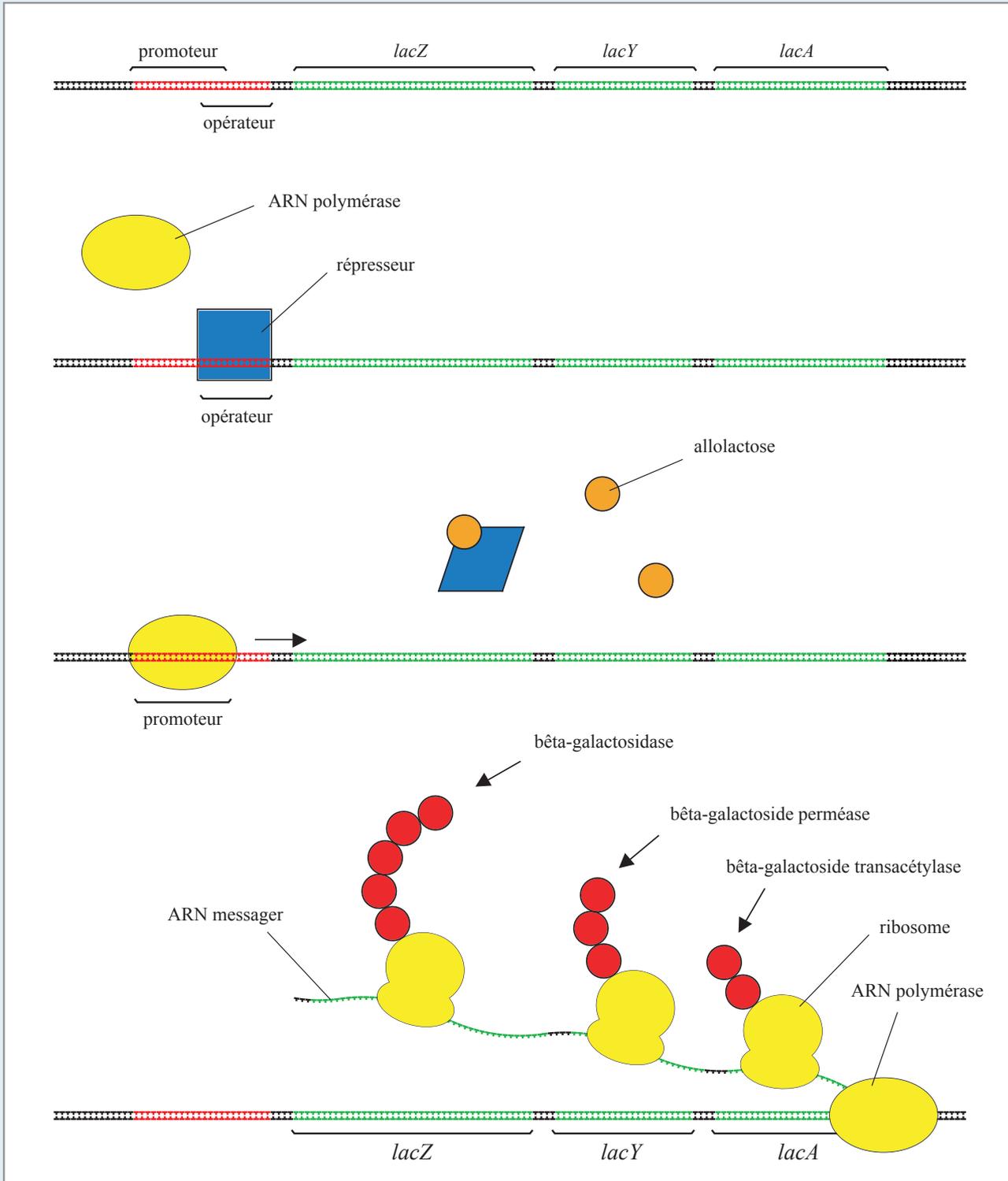


Figure I.5.A. La synthèse des enzymes qui permettent à *E.coli* d'utiliser le lactose est inhibée en l'absence de lactose. Une protéine (répresseur) se fixe sur une séquence ADN particulière (opérateur) et empêche la polymérase d'initier la transcription. Si des molécules de lactose sont présentes une partie d'entre elles isomérise en allolactose (spontanément ou sous l'action de la bêta-galactosidase). L'allolactose se fixe sur le répresseur et l'empêche de s'installer sur l'opérateur. La polymérase peut alors effectuer la transcription. Le gène du répresseur (*lacI*) est exprimé de façon constitutive. Les trois gènes de structure *lacZ*, *lacY* et *lacA* placés sous le contrôle du promoteur lac sont transcrits en un seul ARN messager (polycistronique). Les gènes sont ensuite traduits en bêta-galactosidase, bêta-galactoside perméase et bêta-galactoside transacétylase. La bêta-galactoside perméase permet au lactose d'entrer à l'intérieur de la cellule, la bêta-galactosidase hydrolyse le lactose en glucose et galactose (ou isomérise le lactose en allolactose) et la bêta-galactoside transacétylase ajoute un groupement acétyl aux galactosides autre que le lactose pour éviter que la bêta-galactosidase ne les hydrolyse.

I.6. Deux protéines fluorescentes : la GFP et la DsRed

Certaines protéines ont la particularité d'absorber de la lumière dans une couleur pour ensuite la ré-émettre dans une autre couleur : c'est ce qu'on appelle la fluorescence. – Figure 1.6.A.

La GFP (Green Fluorescent Protein) découverte chez la méduse *Aequorea victoria* est une protéine monomérique dont la structure tridimensionnelle est celle d'un cylindre de 4 nanomètres de long pour 2 nanomètres de diamètre. Elle peut être synthétisée dans n'importe quel organisme.

(Chalfie & al., 1994 - Kain & al., 1995 - Ormö & al., 1996 - Yang & al., 1996)

La GFP que nous avons utilisé au cours de cette thèse - la EGFP - est une variante plus fluorescente, plus photo-stable et dont la formation est plus efficace que celle de la protéine originale. Son maximum d'absorption se situe dans le bleu (488nm) et son maximum d'émission dans le vert (507nm). – Figure 1.6.B.

La DsRed est une protéine 'analogue' découverte chez l'anémone *Discosoma* sp. (Matz & al., 1999 - Yarbrough & al., 2001 - Wachter & al., 2001)

La DsRed que nous avons utilisé au cours de cette thèse - la DsRed.T3-DNT - est une variante dont la solubilité est meilleure, la formation plus efficace, et le niveau d'émission dans le vert moindre que celui de la protéine originale. De plus elle a été optimisée du point de vue de son expression chez *E.coli*. (Bevis & Glick, 2002 - Sørensen & al., 2003) Son maximum d'émission se situe dans le rouge (587nm). – Figure 1.6.B.

Nous avons utilisé la raie bleue à 488nm d'un laser à argon pour exciter simultanément ces deux protéines fluorescentes afin de les observer séparément l'une en lumière verte, l'autre en lumière rouge.

I.7. Le bactériophage Lambda

Un bactériophage (phage) est un virus qui infecte des bactéries. Comme tous les virus il est dépourvu de la machinerie cellulaire qui lui permettrait de se reproduire. Il utilise celle de la cellule qu'il colonise. – Figure 1.7.A.

La fluorescence

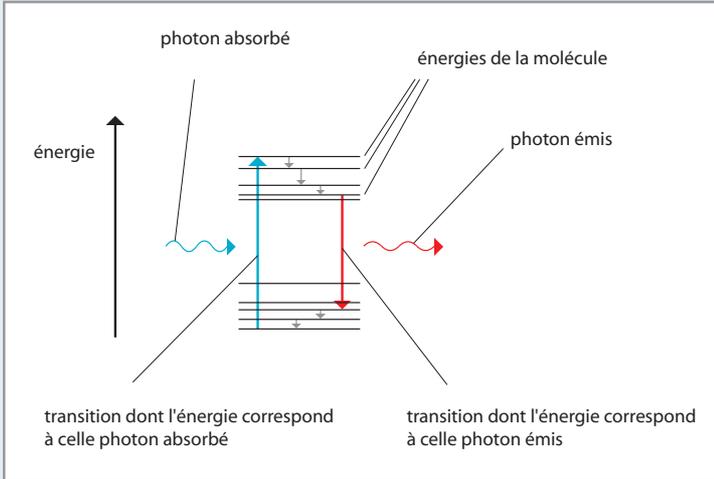
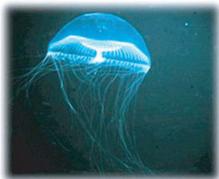


Figure I.6.A. Le schéma ci-contre décrit le principe du mécanisme de fluorescence : de la lumière est absorbée dans une certaine couleur, puis elle ré-émit dans une autre couleur. Les lignes horizontales figurent les énergies de la molécule. Lorsque la molécule absorbe un photon, son énergie augmente de l'énergie du photon. La fluorescence de la molécule provient de ce qu'une partie de l'énergie absorbée par la molécule est dissipée, de sorte que le photon émis n'emporte pas toute l'énergie du photon absorbé. Or, la couleur de la lumière correspond à la longueur d'onde des photons, et la longueur d'onde d'un photon est inversement proportionnelle à son énergie. La différence d'énergie entre les photons absorbés et les photons émis se traduit donc par une différence de couleur entre la lumière absorbée et la lumière émise.

Les protéines fluorescentes GFP et DsRed



Aequorea victoria



La GFP (Green Fluorescent Protein) découverte chez la méduse *Aequorea victoria* est une protéine monomérique constituée de 238 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle est celle d'un cylindre de 4 nanomètres de long pour 2 nanomètres de diamètre. Une fois la séquence d'acides aminés synthétisée, sa formation se fait de manière auto-catalytique : la GFP peut être synthétisée dans n'importe quel organisme.

La GFP que nous avons utilisée au cours de cette thèse (EGFP) est une variante plus fluorescente, plus photo-stable et dont la formation est plus efficace que celle de la protéine originale. Elle émet une lumière verte (507nm) lorsqu'elle est éclairée avec une lumière bleue (488nm).

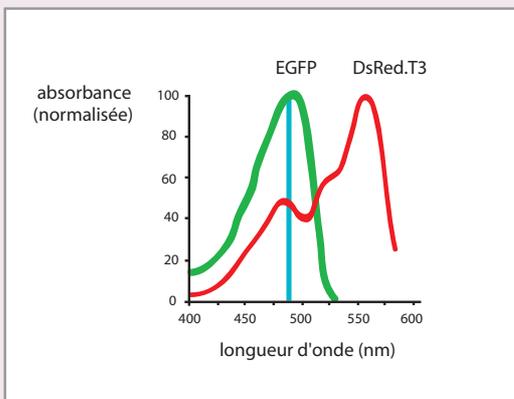


Discosoma sp.



La DsRed est une protéine 'analogue' découverte chez l'anémone *Discosoma sp.* La DsRed que nous avons utilisée au cours de cette thèse (DsRed.T3-DNT) est une variante dont la solubilité est meilleure, la formation plus efficace, et le niveau d'émission dans le vert moindre que celui de la protéine originale. De plus elle a été optimisée du point de vue de son expression chez *E.coli*. Son maximum d'émission se situe dans le rouge (587nm).

spectres d'absorption



spectres d'émission

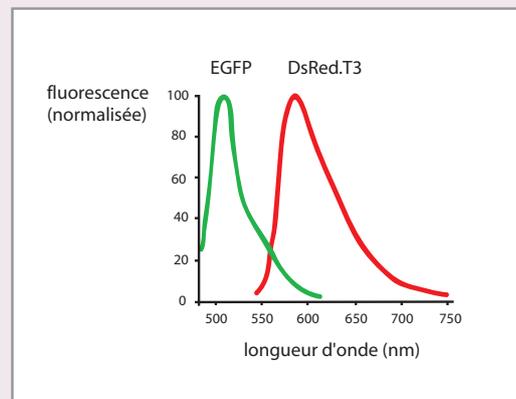


Figure I.6.B. On peut utiliser un laser à argon pour exciter simultanément la EGFP et la DsRed.T3-DNT pour pouvoir les observer séparément l'une en lumière verte, l'autre en lumière rouge.

Le phage lambda

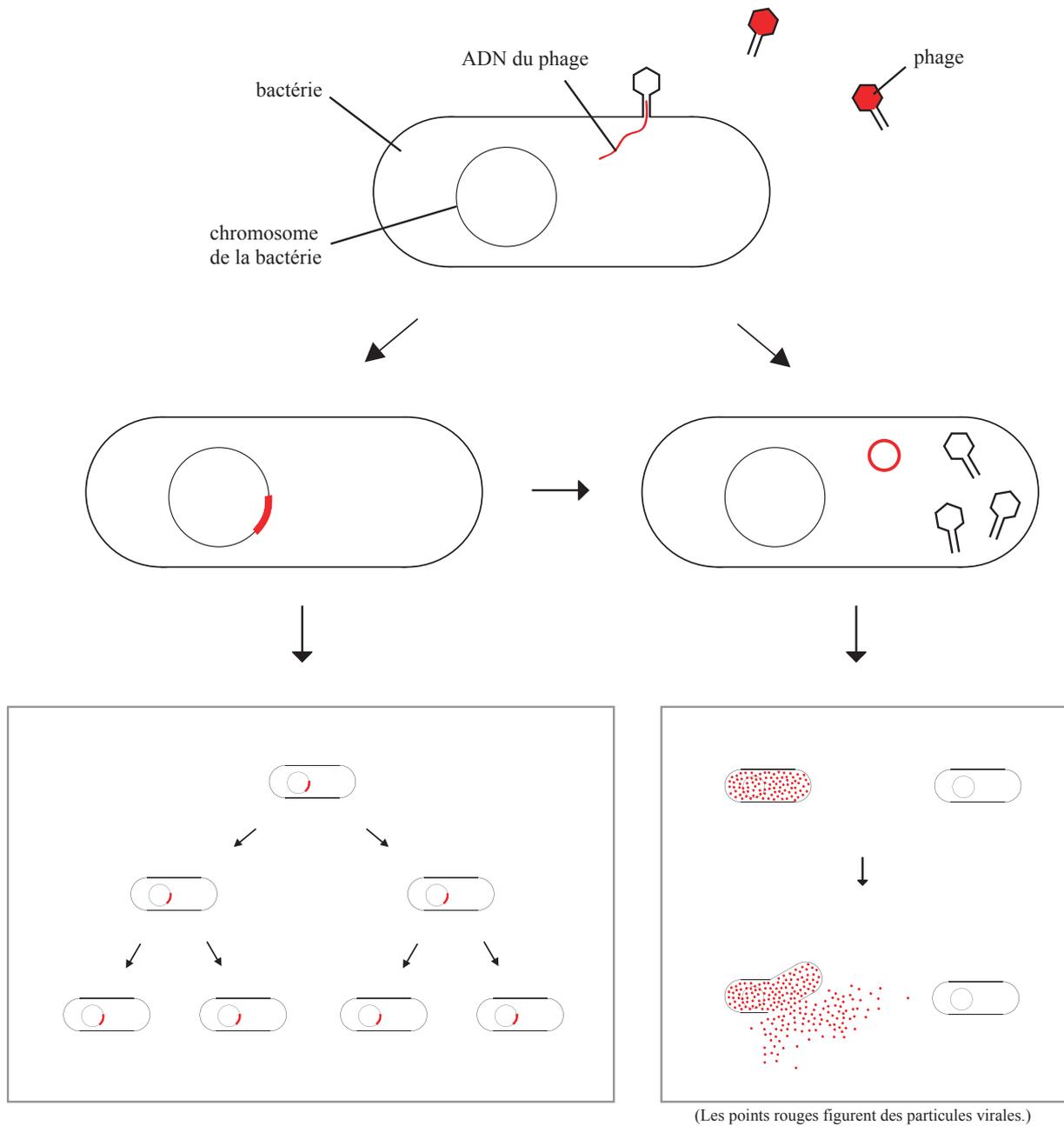


Figure I.7.A. Le phage Lambda infecte E.coli en lui injectant son ADN. Une fois à l'intérieur de la bactérie l'ADN du phage peut intégrer le chromosome, auquel cas il sera reproduit en même temps que la bactérie. Ou alors il peut commander à la machinerie cellulaire de la bactérie de produire des phages (une centaine de particules virales par cellule hôte), puis des enzymes qui vont détruire la paroi cellulaire et libérer de nouveaux phages qui pourront infecter d'autres bactéries.

I.8. Les enzymes de restriction

Pour se protéger des attaques de bactériophages certaines bactéries ont développé des mécanismes pour reconnaître et éliminer spécifiquement l'ADN étranger. Elles synthétisent des enzymes de restriction (endonucléases) qui coupent l'ADN à des endroits définis par une courte séquence appelée site de restriction.

Pour éviter que son propre ADN ne soit également coupé, la bactérie le modifie en ajoutant un groupe méthyle sur certaines bases des séquences cible. Cette méthylation permet aux endonucléases de distinguer l'ADN de la cellule et l'ADN étranger.

(Un autre système de méthylation autorise la correction d'éventuelles erreurs de copie en permettant de reconnaître le brin d'ADN fraîchement synthétisé et le brin d'ADN qui a servi de modèle lors de la réplication.)

Presque toujours, une bactérie qui synthétise une endonucléase, synthétise aussi une méthyltransférase correspondante pour protéger son propre ADN. (Cette combinaison est appelée système de restriction-modification.)

I.9. La recombinaison homologue

Une recombinaison homologue est un processus au cours duquel une portion d'ADN est échangée contre une autre, leurs extrémités étant identiques.

(Ces extrémités sont appelées régions d'homologie.) – Figure 1.9.A.

I.10 Génotype et phénotype

Le génotype est l'ensemble des mutations qui distingue une souche particulière.

Le phénotype est l'ensemble des caractéristiques d'un individu.

Prenons un exemple : le génotype de la souche Top10 comprends une mutation du gène rpsL ce qui se traduit au niveau de son phénotype par le fait que cette bactérie est résistante à la streptomycine.

La recombinaison homologue

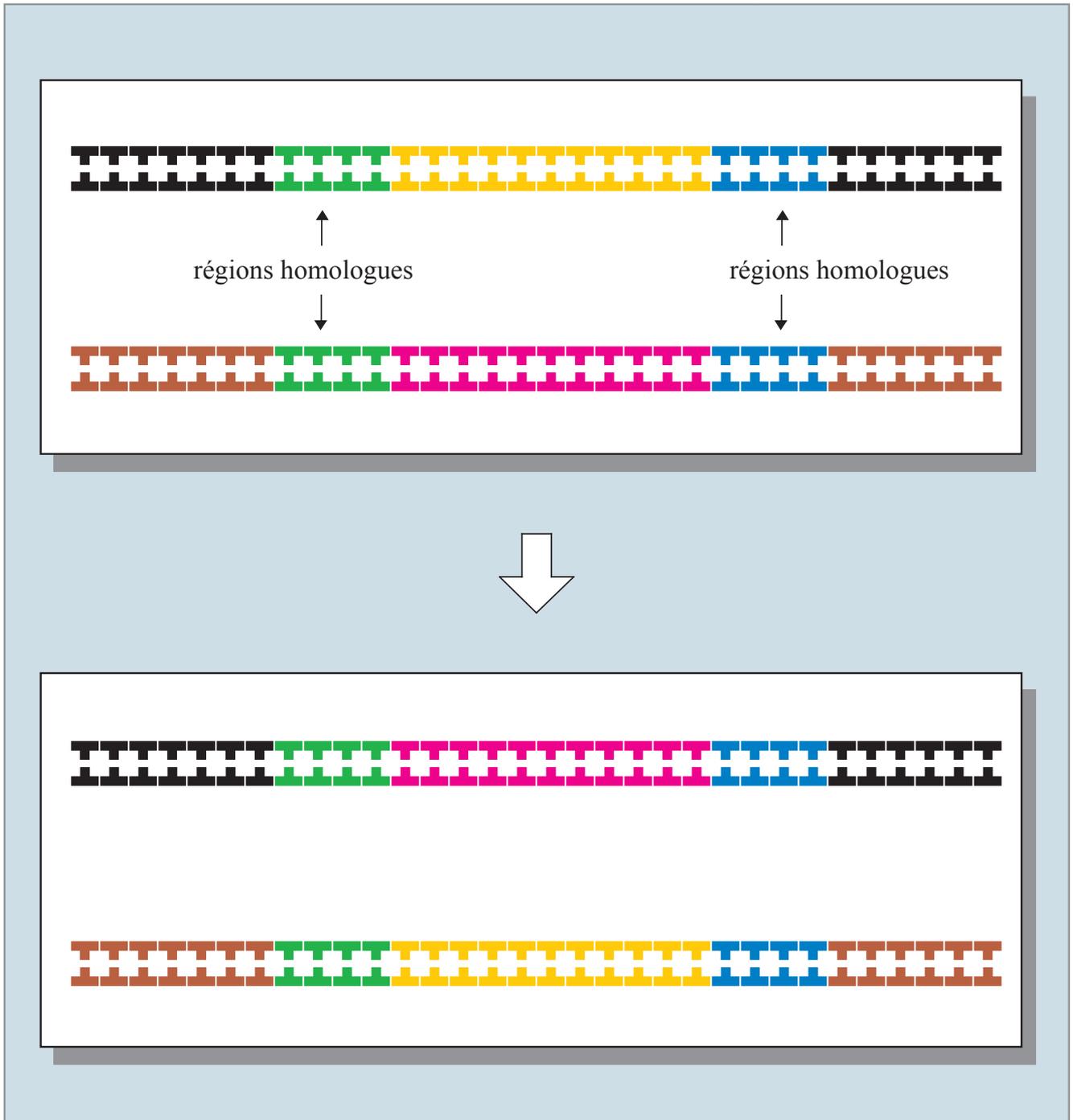


Figure I.9.A. Au cours du processus de recombinaison homologue une portion d'ADN est échangée contre une autre, leurs extrémités étant identiques. Ces extrémités sont appelées des régions d'homologie.

I.11. La variabilité phénotypique

Le fait que des cellules soient génétiquement identiques ne signifie pas qu'elles soient physiquement identiques. Le patrimoine génétique d'une bactérie détermine les protéines qu'elle est capable de synthétiser ainsi que la manière dont leur expression est régulée. Mais le niveau d'expression de ces protéines peut varier d'une cellule à l'autre.

Ces variations s'expliquent en partie par le fait que les cellules s'adaptent à leur environnement. Ainsi le comportement des bactéries change en fonction des conditions de culture (température, composition du milieu).

Cependant même au sein d'une population monoclonale cultivée dans des conditions de culture données, les cellules individuelles sont différentes les unes de autres. C'est ce qu'on appelle la variabilité phénotypique. (Maloney & Rotman, 1973 - Spudich JL, Koshland, 1976 - Elowitz & al., 2002)

Le fait que des cellules génétiquement identiques soient différentes lorsque les conditions de culture sont différentes vient de ce que l'expression génétique est régulée.

Le fait que des cellules génétiquement identiques soient différentes alors que les conditions de culture sont identiques montre que l'expression génétique présente un caractère stochastique. Ce caractère stochastique s'explique par le faible nombre de molécules impliquées dans le mécanisme d'expression génétique. (Kepler & Elston, 2001 - Ozbudak & al., 2002)

Par exemple, il y a en moyenne une dizaine de répresseurs par cellule dans le cas de l'opéron lactose. (cours de microbiologie générale en ligne M.A. Gilles-Gonzalez, Ohio State University, USA)

Chapitre II

Principe de l'expérience

Principe de l'expérience

L'objet de cette thèse est la mesure cellule par cellule du nombre de plasmides chez *Escherichia coli*. Il s'agit de 'prendre' les bactéries une par une et de 'compter' le nombre de plasmides qu'elles contiennent.

II.1. Mesures cellule par cellule

En pratique nous nous servons d'un dispositif constitué de réservoirs de 5mm de diamètre reliés entre eux par un canal de 5 μ m de large. Après avoir déposé dans l'un des réservoirs une goutte de liquide contenant les bactéries, on utilise une différence de hauteur de liquide et on applique une tension électrique entre les réservoirs pour faire passer les bactéries d'un réservoir à l'autre, une par une, devant l'objectif d'un microscope inversé. – Figure 2.1.A. (Chou & al., 1999 - Fu & al., 1999)

II.2. Détermination du nombre de plasmides dans une cellule

Le nombre de plasmides dans la bactérie est mesuré de façon indirecte.

Les plasmides que nous étudions portent tous un gène codant une protéine fluorescente verte et lorsqu'une bactérie passe devant l'objectif du microscope nous mesurons la fluorescence de la cellule.– Figure 2.2.A. (Løbner-Olesen 1999)

Notre expérience repose sur l'hypothèse que le niveau d'expression est le même pour chaque copie du gène : la fluorescence de la cellule est alors proportionnelle au nombre de copies du plasmide.

Nous avons construit une souche bactérienne dont le chromosome porte 'le même' gène mais codant une protéine fluorescente rouge. (Zhang & al., 1998 - Muyers & al.,2000)

Lorsque la bactérie passe devant l'objectif du microscope, nous mesurons à la fois l'intensité de fluorescence 'dans le rouge' et l'intensité de fluorescence 'dans le vert'.

Comme le gène codant pour la protéine fluorescente rouge est présent à un seul exemplaire, le rapport des intensités de fluorescence nous donne le nombre de plasmide dans la cellule.

Cependant, nous devons encore tenir compte de la manière dont la fluorescence de la cellule reflète le nombre de copies du gène.

Les étapes intermédiaires que constituent la transcription, la traduction, le repliement et surtout la maturation des protéines fluorescentes introduisent un retard de la fluorescence par rapport à l'expression du gène. La fluorescence d'une bactérie à un moment donné est le fait de gènes exprimés plus tôt.

Par ailleurs, ces protéines ont une durée de vie élevée. Elles vont donc s'accumuler dans la cellule.

Nous devons également avoir à l'esprit que pendant le temps où les protéines fluorescentes sont exprimées, la bactérie peut synthétiser de nouveaux plasmides ou même se diviser.

Les intensités de fluorescence que nous mesurons correspondent donc à une sorte de moyenne qui dépend du nombre de gènes et de leur niveau d'expression, mais aussi de la durée d'expression des gènes ainsi que des temps de maturation et des temps de vie des protéines fluorescentes.

Par ailleurs l'expression génétique présente un caractère stochastique. Deux cellules qui comptent le même nombre de gènes n'ont pas exactement la même fluorescence.

Le recours simultané aux trois stratégies suivantes nous permet de limiter ces effets :

1) L'acide nalidixique (un antibiotique) permet d'inhiber la réplication de l'ADN. Nous pouvons donc figer le nombre de plasmides pendant que les protéines fluorescentes sont exprimées. (Goss & al., 1964 - Goss & al., 1965 - Hawkey, 2003)

2) L'utilisation du mécanisme de régulation de l'opéron lactose nous permet d'induire l'expression des protéines fluorescentes sur commande.

Pour cela, nous avons construit deux opérons lactose modifiés dans lesquels les gènes régulés (*lacZ*, *lacY* et *lacA*) sont remplacés soit par le gène de la protéine fluorescente rouge, soit par celui de la protéine fluorescente verte.

Les bactéries sont cultivées dans un milieu qui ne contient pas de lactose, de sorte que la synthèse des protéines fluorescentes est inhibée.

Lorsqu'on veut mesurer le nombre de plasmides, on induit l'expression des gènes en ajoutant dans le milieu de culture de l'IPTG (un analogue de l'allolactose que la bactérie n'est pas capable de digérer). La cellule synthétise alors les protéines fluorescentes.

Pour profiter d'un niveau d'expression basal faible (en l'absence d'induction) nous avons introduit dans le chromosome de la bactérie la mutation *lacI^{Q1}* : une mutation qui conduit à un niveau d'expression cent fois plus important du répresseur de l'opéron lactose. (Carlos & Miller, 1981)

Pour profiter d'un niveau d'expression élevé nous avons placé les gènes codant les protéines fluorescentes sous le contrôle d'un promoteur *tac* : un promoteur hybride qui combine le mécanisme de répression de l'opérateur lactose et une efficacité de transcription dix fois plus importante due à une partie de sa séquence empruntée au promoteur tryptophane. (De Boer & al., 1983 - Hawley & McClure, 1983 - Harley & Reynolds, 1987)

Le fait d'induire complètement et durant un temps assez long les gènes codant les protéines fluorescentes permet de gommer le bruit d'expression. (Kierzek & al., 2001 - Elowitz & al., 2002 - Hasty & Collin, 2002 - Ozbudak & al., 2002)

3) Le chloramphénicol (un antibiotique également) nous permet d'inhiber la synthèse des protéines. Nous pouvons donc contrôler la durée d'expression des gènes.

En pratique on fait croître une population de bactéries dans des conditions de culture définies. Puis, à un moment donné, on ajoute de l'acide nalidixique au milieu de culture. Le nombre de plasmides est alors fixé et les cellules ne se divisent plus.

On ajoute ensuite de l'IPTG. Les gènes codant les protéines fluorescentes sont alors exprimés.

Après un certain temps, on ajoute du chloramphénicol. La synthèse des protéines est terminée.

On resuspend alors les cellules dans un tampon contenant de l'acide nalidixique et du chloramphénicol et on les laisse reposer. Après quelques heures, les protéines fluorescentes arrivent à maturation et nous pouvons effectuer les mesures.

Principe de l'expérience

Mesure cellule par cellule

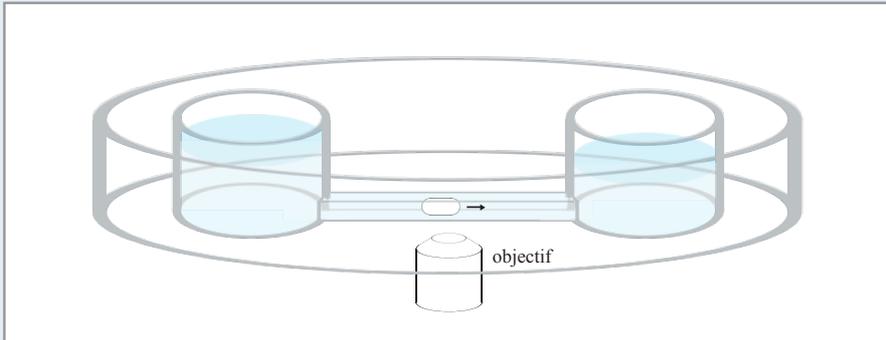
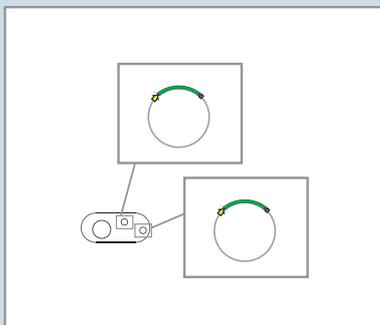
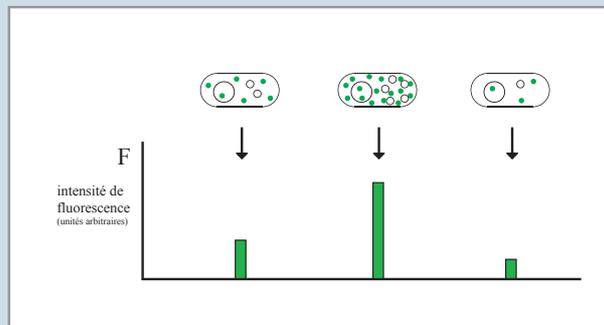


Figure II.1.A. Pour observer les bactéries une à une nous utilisons un dispositif constitué de réservoirs de 5 millimètres de diamètre reliés entre eux par un canal de 5 microns de large. Une différence de hauteur de liquide entre les deux réservoirs permet de faire passer les bactéries une par une devant l'objectif d'un microscope inversé.

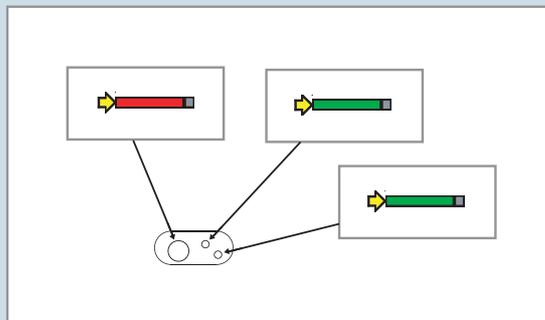
Mesure du nombre de plasmide dans la cellule



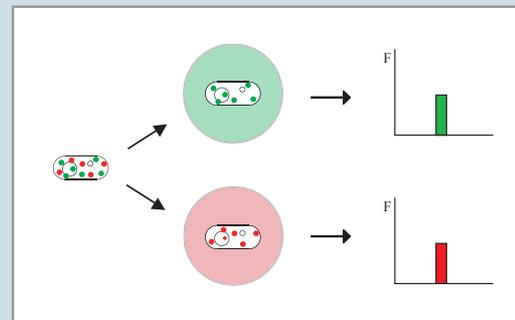
Chaque copie du plasmide porte le même gène codant pour la protéine fluorescente verte.



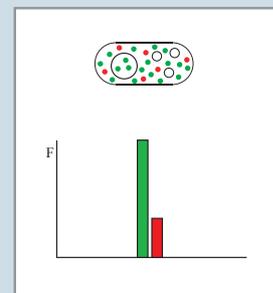
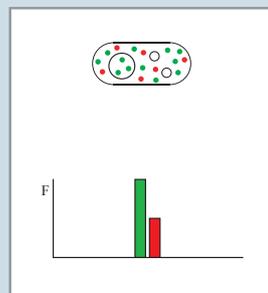
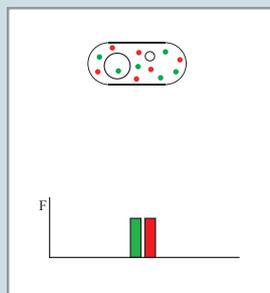
La fluorescence de la cellule reflète le nombre de copies du gène



Nous avons introduit dans le chromosome 'le même gène' mais codant la protéine fluorescente rouge. Il pourra servir de référence.



On utilise des filtres pour mesurer séparément la fluorescence dans le vert et la fluorescence dans le rouge.



L'intensité de fluorescence dans le vert nous donne le nombre de copies de plasmide.

Figure II.2.A. Nous avons choisi une stratégie de mesure indirecte du nombre de plasmides dans la bactérie : chaque copie du plasmide porte le même gène codant la protéine fluorescente verte. La fluorescence de la cellule reflète le nombre de copies du gène, donc le nombre de copies du plasmide.

II.3. Commentaires

Du fait du contrôle des conditions de culture et du temps durant lequel les gènes sont exprimés, nos expériences seront reproductibles. Mais l'idée selon laquelle le nombre de protéines fluorescentes synthétisées par la cellule est proportionnel au nombre de copies du gène appelle un certain nombre de commentaires :

II.3.1. Niveau d'expression et localisation du gène

Le niveau d'expression d'un gène change en fonction des conditions de culture, mais également en fonction de la structure de la molécule d'ADN qui porte le gène et peut être aussi en fonction de la localisation du gène dans la cellule. (Biek & Strings, 1995 - Gordon & al., 1997 - Lemon & al., 1998 - Koppes & al., 1999 - Rine, 1999 - Rodionov & al., 1999 - Gordon & Wright, 2000 - Lemon & Grossman, 2000 - Yarmolinsky, 2000 - Pogliano & al., 2001 - Sawitzke & Austin, 2001 - Ho & al., 2002 - Pogliano, 2002 - Swain & al., 2002 - Gordon & al., 2004)

Donc le niveau d'expression d'un gène porté par un plasmide est généralement différent d'un plasmide à un autre.

II.3.2. Niveau d'expression et nombre de copies du gène

L'idée directrice de notre expérience est que des plasmides identiques sont tous dans le même état, et que la cellule joue le rôle d'un réservoir en ce qui concerne les ARN polymérase et les ribosomes (de sorte que leur nombre n'est pas un facteur limitant). Le niveau d'expression des protéines fluorescentes est alors proportionnel au nombre de copies du gène.

II.3.3. Étalonnage du niveau d'expression

Cependant le niveau d'expression d'un gène, même porté par le chromosome, n'est pas nécessairement le même selon que la bactérie contient ou non des plasmides.

(Diaz-Ricci & al., 1995)

C'est pour pouvoir quantifier cette différence que nous avons construit une souche bactérienne dont le chromosome porte un gène 'identique' mais codant une protéine fluorescente rouge. Nous l'avons placé à côté du terminus de réplication pour qu'il soit présent dans la cellule en un seul exemplaire. Ce gène se trouve donc à un endroit défini dans la cellule et on peut penser qu'il se trouve également dans un état donné.

II.3.4. Critère de validation

Pour savoir si nous avons réellement accès au nombre de plasmides par cellule, nous devons représenter nos données expérimentales sous la forme d'un histogramme. La présence de 'marches d'escalier' sur le graphique montrerait que nos mesures correspondent effectivement à la distribution du nombre de plasmides par cellule.

Chapitre III

Techniques utilisées au cours de cette thèse

Les principales techniques expérimentales auxquelles nous avons fait appel au cours de cette thèse sont regroupées en trois paragraphes et présentées dans l'ordre suivant :

- 1) Techniques de biologie moléculaire et cellulaire
- 2) Techniques de micro-lithographie
- 3) Techniques de microscopie de fluorescence

Techniques de biologie moléculaire et cellulaire

III.1. Techniques de biologie moléculaire et microbiologie

III.1.1. PCR (Polymerase chain reaction)

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est une technique de répllication *in vitro* qui permet de réaliser un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN.

Nous avons utilisé cette technique pour synthétiser les gènes codant les protéines fluorescentes verte et rouge. – Figures III.1.1.A. et III.1.1.B.

III.1.2. Utilisation d'enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont couramment utilisées comme des 'ciseaux moléculaires' pour couper des molécules d'ADN à des endroits bien définis et pour générer des extrémités franches, ou le plus souvent des extrémités cohésives.

L'intérêt de ces extrémités cohésives est qu'elles permettent de liguer facilement deux molécules d'ADN.

Pour réaliser cette ligation, nous avons utilisé la ligase du phage T4 qui recrée la liaison que l'endonucléase avait détruite. – Figure III.1.2.A.

III.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est une technique qui permet de séparer les molécules d'ADN en fonction de leur taille. (Sambrook & al., 1989) – Figures III.1.3.A.

Elle consiste à appliquer un champ électrique pour faire migrer l'ADN à travers un gel d'agarose; plus une molécule d'ADN est grande, plus elle migre lentement.

Un composé fluorescent qui s'intercale entre les bases de l'ADN (le bromure d'éthidium) permet d'observer et de quantifier l'ADN (on parle alors de quantification sur gel d'agarose). Une fois les molécules séparées selon leur taille, on peut découper le gel pour en extraire uniquement des molécules d'une taille donnée. (C'est ce qu'on appelle une purification sur gel d'agarose).

III.1.4. Culture de bactéries en milieu liquide

Des bactéries cultivées en milieu liquide dans des conditions de culture données, se comportent toujours de la même manière. – Figure III.1.4.A.

En d'autres termes, l'état d'une population de bactéries est déterminé par les conditions de culture - et pour obtenir à plusieurs reprises une population de bactéries dans un état donné, il suffit de reproduire les conditions de culture.

Nous pouvons donc effectuer une expérience plusieurs fois.

Amplification d'ADN par PCR

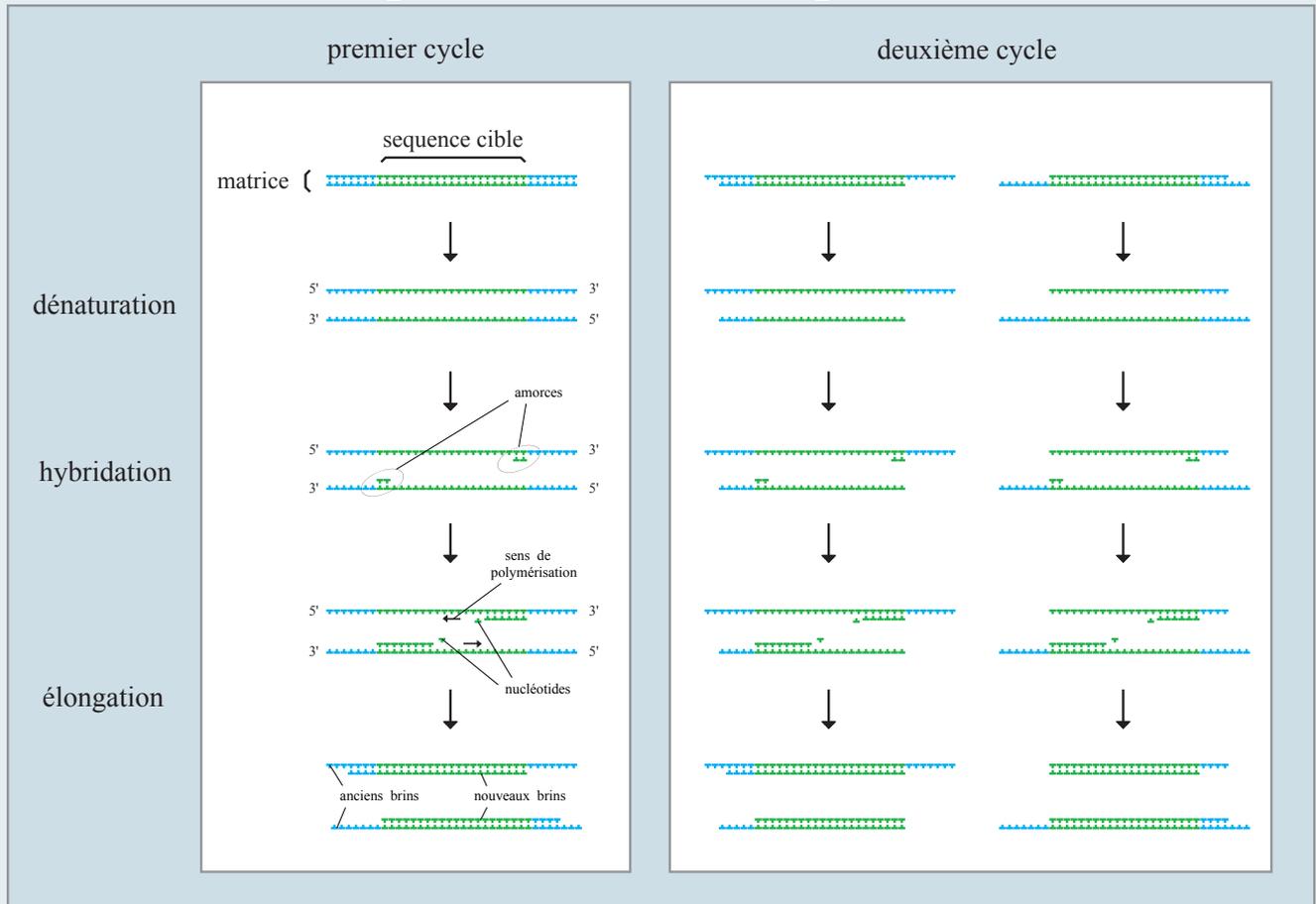


Figure III.1.A. Pour effectuer une PCR, on met en présence un fragment d'ADN comprenant la séquence à amplifier, les quatre déoxyribonucléotides qui vont constituer les nouvelles molécules d'ADN, deux amorces (oligonucléotides) à partir desquelles vont se faire les réactions de polymérisation et une ADN polymérase qui va copier le brin d'ADN à amplifier à partir des amorces. Le mélange réactionnel est placé dans un appareil programmable (thermocycleur) qui effectuera un certain nombre de cycles (typiquement une vingtaine) au cours desquels le tube sera porté successivement à trois températures différentes pendant des durées pré-définies. Au cours de chaque cycle le tube est d'abord chauffé jusqu'à une température de 94°C pour séparer les brins d'ADN. C'est l'étape de dénaturation. La température est ensuite abaissée entre 50°C et 65°C pour permettre l'appariement des amorces qui ont des séquences complémentaires à celles des extrémités de la séquence cible. C'est l'étape d'hybridation. Enfin la température est portée à 72°C et l'ADN polymérase synthétise les brins complémentaires de ceux de la matrice par ajouts successifs de déoxyribonucléotides de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' en partant des amorces hybridées. C'est l'étape d'élongation. Les copies produites à chaque cycle constituent des matrices pour les cycles suivants de sorte que l'amplification est exponentielle.

PCR avec extrémités pendantes

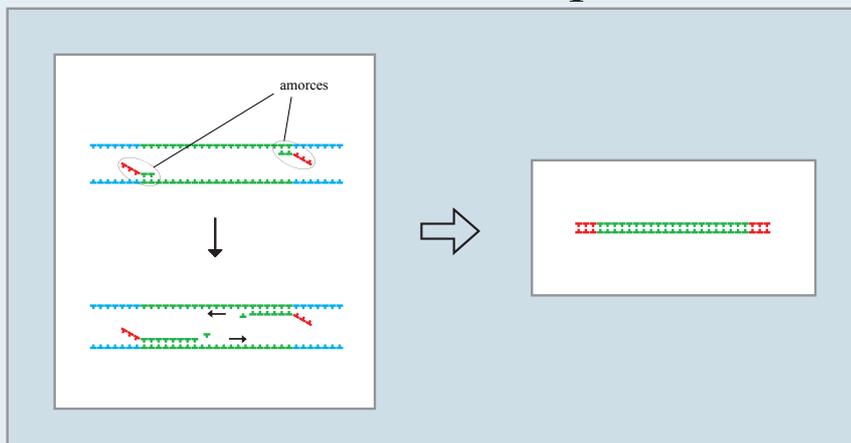
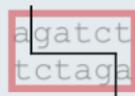
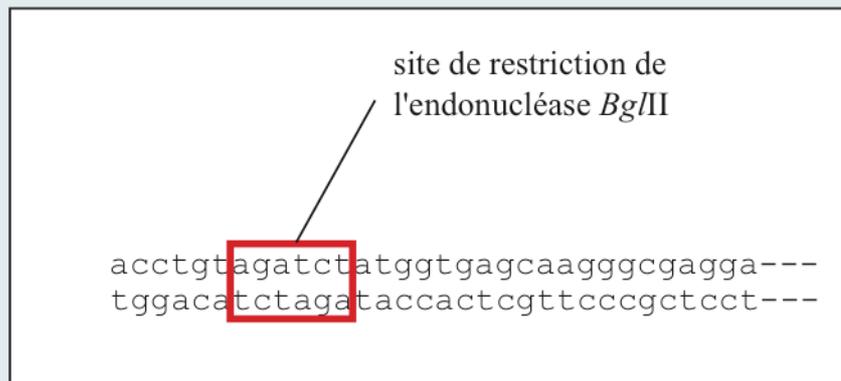
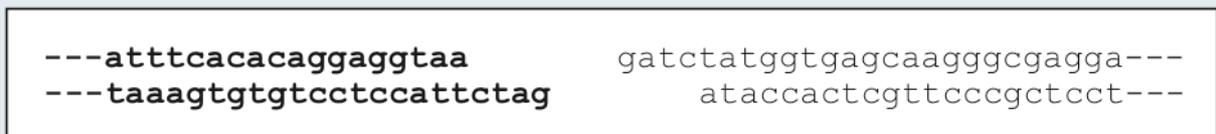
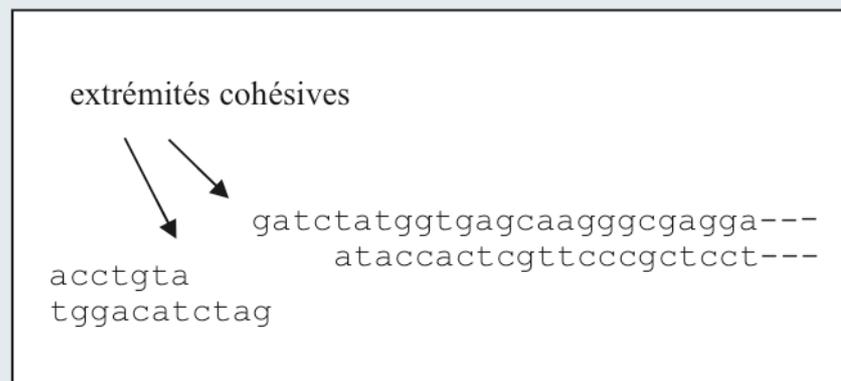


Figure III.1.A. La PCR avec extrémités pendantes est une variante qui consiste à utiliser des amorces dont seule l'extrémité 3' correspond à la séquence à amplifier. Les molécules obtenues sont des copies de la séquence cible flanquées des extrémités pendantes.

Utilisation des enzymes de restriction



digestion par l'endonucléase *Bg*/III

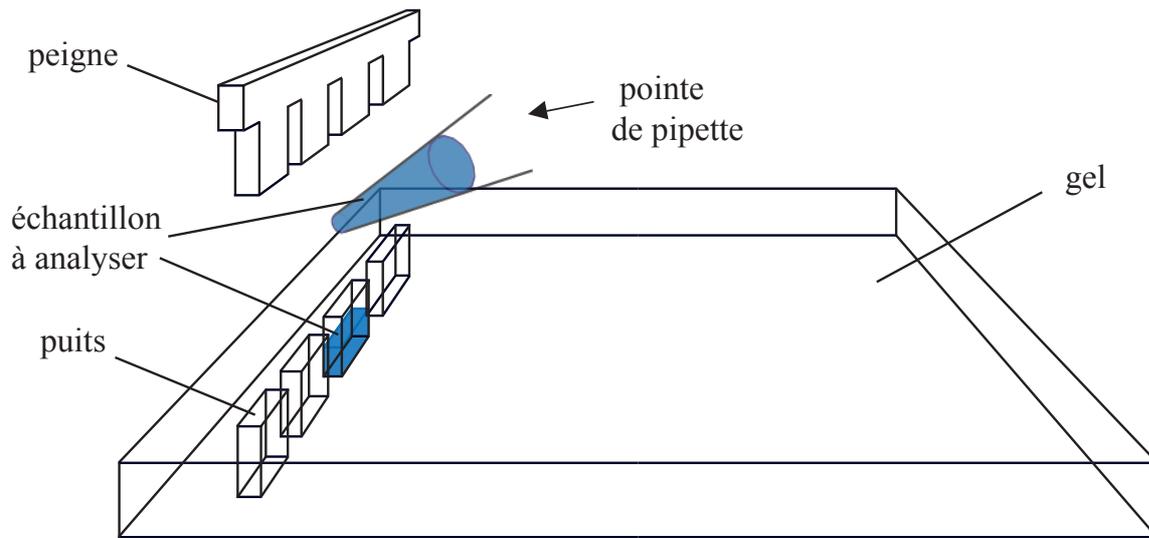


ligation

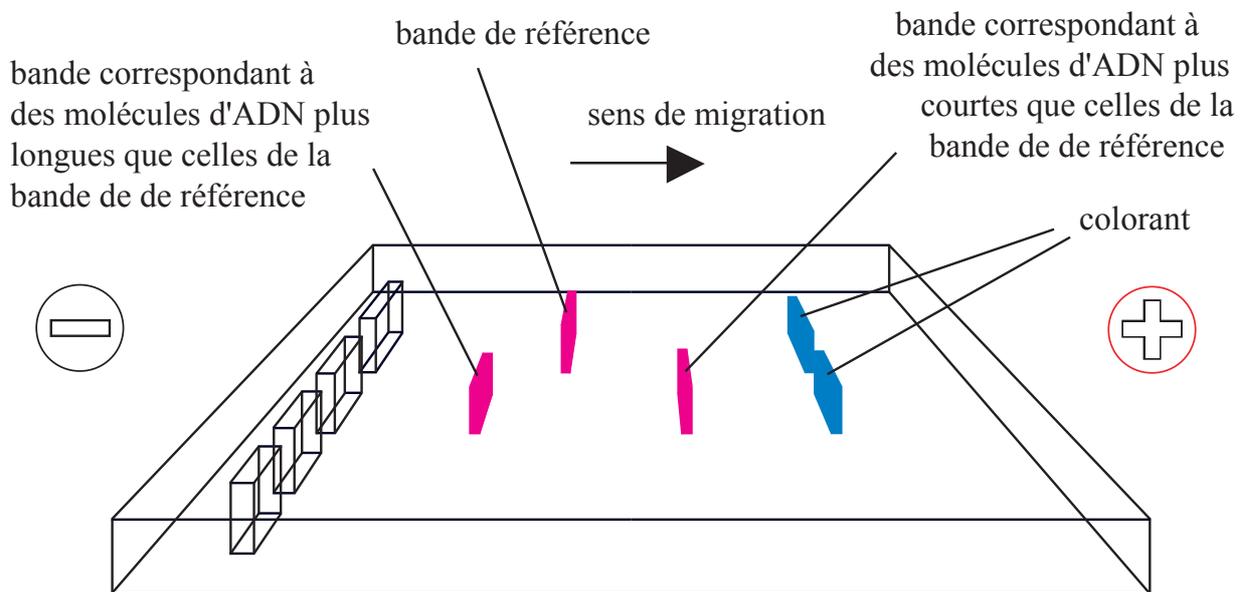


Figure III.1.2.A. Les enzymes de restriction sont couramment utilisées comme des 'ciseaux moléculaires' pour couper des molécules d'ADN à des endroits bien définis et générer des extrémités cohésives. Ces extrémités cohésives permettent de liguer facilement deux molécules d'ADN. Une autre enzyme (dans notre cas la ligase du phage T4) permet réaliser cette ligation - la ligase recrée la liaison que l'endonucléase avait détruite.

L'électrophorèse



L'agarose est un polymère extrait d'une algue (*Gracilaria sp.*). Il se présente sous la forme d'une poudre blanche. Pour en faire un gel, on en ajoute une dizaine de grammes à un litre de tampon salin (TAE) et on fait bouillir jusqu'à dissoudre complètement l'agarose. On coule alors le gel en utilisant un 'peigne' pour former des 'puits' dans lesquels on injectera les échantillons à analyser. Une fois durci, le gel est démoulé puis immergé dans le tampon salin. On retire alors le peigne et on charge les puits. Au préalable, on a ajouté du glycérol à l'échantillon d'ADN (pour augmenter sa densité et lui permettre de tomber dans le puits), et du bleu de bromophénol (un colorant qui permet de contrôler visuellement que le liquide qui contient l'ADN tombe bien dans le puits et non à côté, et qui permettra également de visualiser l'état d'avancement du gel). La teneur du gel en agarose est choisie en fonction de la taille des molécules d'ADN à séparer.



L'électrophorèse consiste à appliquer un champ électrique (typiquement 1V/cm) pour faire migrer l'ADN (qui est chargé négativement) à travers le gel d'agarose. Plus un fragment d'ADN est long, plus il migre lentement. Pour détecter l'ADN on utilise du bromure d'éthidium, un composé fluorescent sous ultraviolets qui s'intercale entre les bases de l'ADN. La détermination de la taille et de la concentration d'un fragment d'ADN est effectuée en faisant migrer des molécules de tailles et de concentrations connues (marqueurs) en parallèle avec l'échantillon à analyser. La taille du fragment se déduit de sa position dans le gel, et la quantité d'ADN est proportionnelle à l'intensité de fluorescence. (Les mesures d'intensité de fluorescence sont effectuées à l'aide d'une caméra CCD relié à un ordinateur muni d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'image.) Une fois les molécules séparées selon leur taille, on peut découper dans le gel une bande correspondant à des molécules d'une taille donnée pour en extraire ensuite l'ADN. C'est ce qu'on appelle une purification sur gel d'agarose.

Figure III.1.3.A. L'électrophorèse permet de séparer des molécules selon leur taille.

III.1.5. Électroporation

L'électroporation est une technique qui permet d'introduire de l'ADN dans une cellule.

Nous l'avons utilisée pour introduire dans des bactéries différents plasmides ou des fragments d'ADN linéaire destinés à être intégrés dans le chromosome.

Cette technique est à la fois très efficace et très simple à mettre en œuvre. Les bactéries sont d'abord cultivées en milieu liquide, puis centrifugées et resuspendues dans de l'eau pure. (Les bactéries sont alors électro-compétentes.) L'ADN est ensuite ajouté et les cellules en suspension sont transférées dans une cuvette d'électroporation. Un choc électrique va alors rendre l'enveloppe cellulaire perméable et permettre à l'ADN d'entrer dans la bactérie. On ajoute ensuite du milieu de culture pour leur permettre de 'récupérer' du choc électrique, et après une heure d'incubation (le temps pour les cellules d'exprimer leur nouveau phénotype), les bactéries sont étalées sur boîte de milieu sélectif. – Figure III.1.5.A.

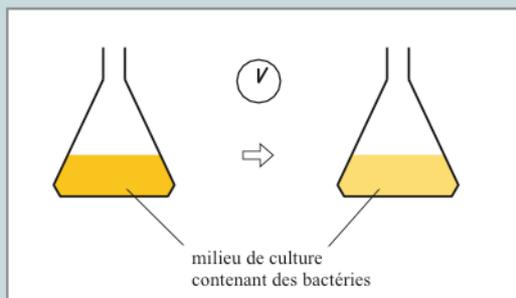
III.1.6. Utilisation de milieux sélectifs - isolation d'une population monoclonale

La plupart des plasmides utilisés en biologie moléculaire portent un gène de résistance à un antibiotique. Pour sélectionner les bactéries transformées (c'est à dire celles qui ont 'adopté' un plasmide), on étale les cellules sur un milieu nutritif solide auquel on a ajouté de l'antibiotique.

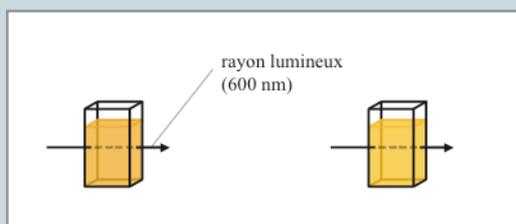
Le principe de sélection est basé sur le fait que l'antibiotique tue les bactéries (ou au moins bloque leur croissance), et seules les bactéries qui auront acquis un gène de résistance vont pouvoir se développer.

Si au moment de l'étalement les bactéries résistantes sont suffisamment éloignées les unes des autres (suffisamment diluées), les cellules auxquelles elles vont donner naissance par divisions successives vont former des îlots de cellules génétiquement identiques appelés colonies. – Figure III.1.4.A.

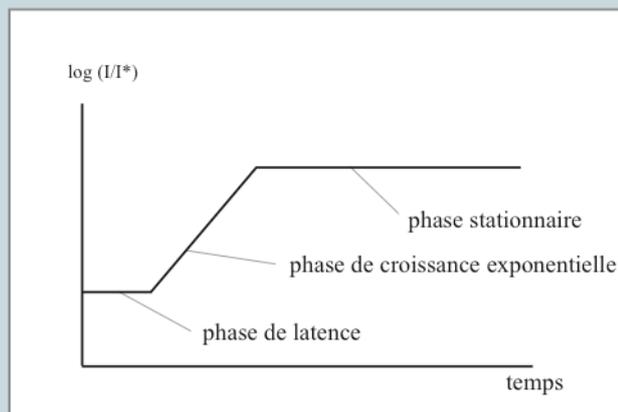
Culture de bactéries en milieu liquide



Tandis que le nombre de bactéries en culture augmente, le liquide devient de plus en plus trouble.



On peut mesurer le nombre de cellules dans le milieu de culture en le plaçant sur le trajet d'un rayon lumineux. Un appareil appelé spectrophotomètre permet de comparer l'intensité de la lumière transmise par le milieu de culture seul et l'intensité transmise par le milieu de culture lorsqu'il contient des bactéries. Comme l'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules en suspension, on peut en déduire le nombre de bactéries dans le milieu de culture..



Lorsque des bactéries sont inoculées dans un milieu de culture liquide, dans un environnement fermé, le schéma de croissance des cellules présente trois phases. Les bactéries observent d'abord une phase de latence qui correspond à une période d'adaptation de leur métabolisme à leur nouvel environnement. Elles entrent ensuite dans une phase de croissance exponentielle caractérisée par une valeur constante de la vitesse spécifique de croissance. (Le temps de doublement est constant au cours de la phase de croissance exponentielle, mais dépend de la souche bactérienne et des conditions de culture ; c'est à dire de la température, de la composition du milieu de culture et de l'aération.) Lorsque les nutriments sont épuisés ou que trop de produits de dégradation se sont accumulés dans le milieu de culture, les bactéries entrent dans une phase stationnaire.

Figure III.1.4.A. Des bactéries cultivées en milieu liquide dans des conditions de culture données, présentent toujours le même schéma de croissance.

Transformation et sélection

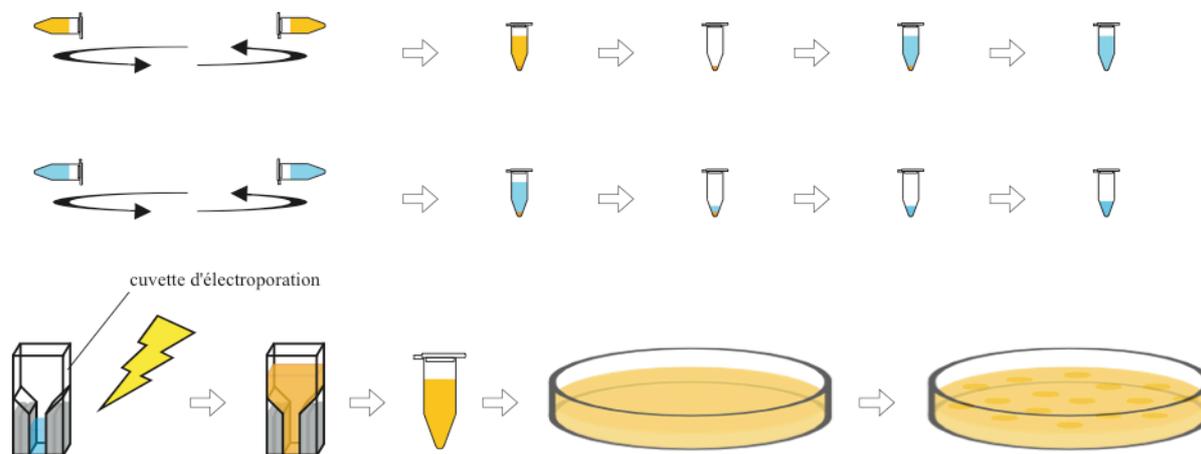


Figure III.1.5.A. L'électroporation est une technique qui permet d'introduire de l'ADN dans une cellule. Les bactéries sont d'abord cultivées en milieu liquide, puis centrifugées et resuspendues dans de l'eau pure. L'ADN est ensuite ajouté et les cellules en suspension sont transférées dans une cuvette d'électroporation. Un choc électrique va alors rendre l'enveloppe cellulaire perméable et permettre à l'ADN d'entrer dans la bactérie. On ajoute ensuite du milieu de culture pour leur permettre de 'récupérer' du choc électrique, et après une heure d'incubation (le temps pour les cellules d'exprimer leur nouveau phénotype), les bactéries sont étalées sur boîte de milieu sélectif.

III.1.7. Transformation chromosomique

III.1.7.1. Définition

Une transformation chromosomique consiste à introduire une modification dans le chromosome de la bactérie.

III.1.7.2. Transformation chromosomique par recombinaison homologue avec utilisation d'une stratégie de sélection/contre-sélection

Nous avons utilisé une technique de transformation chromosomique par recombinaison homologue pour introduire notre gène d'intérêt à un endroit bien précis du chromosome d'*Escherichia coli*. Figure III.1.7.A.

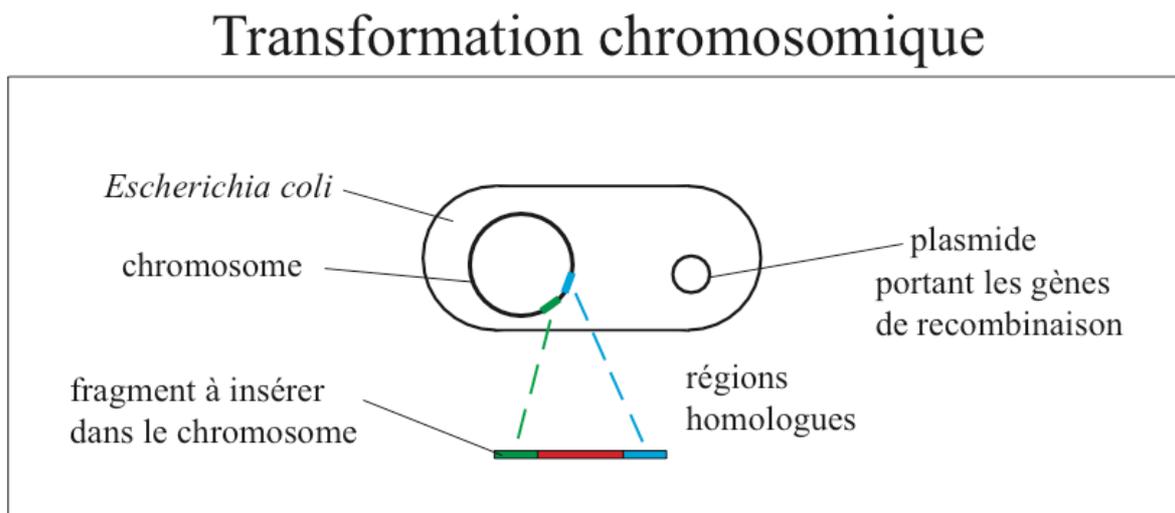


Figure III.1.7.A. L'utilisation d'une technique de recombinaison homologue permet d'introduire une modification à un endroit bien défini du chromosome.

Pour cela, nous nous sommes servi d'une cassette de sélection-contre-sélection et d'un plasmide portant les gènes de recombinaison du phage lambda placés sous le contrôle d'un promoteur arabinose. (Counter-selection BAC modification kit - Gene Bridges)

Ce plasmide est thermosensible et se propage à 30°C en présence de tétracycline. Il sera perdu si les bactéries sont cultivées à 37°C en l'absence de tétracycline.

Pour induire l'expression des gènes de recombinaison, il suffit d'ajouter dans le milieu de culture un sucre particulier : du L-arabinose.

La cassette de sélection-contre-sélection est constituée d'un gène de résistance à la kanamycine et d'un gène qui rend la bactérie sensible à la streptomycine. On l'utilise avec une souche résistante à la streptomycine et sensible à la kanamycine.

La cassette de sélection-contre-sélection et le fragment d'ADN à insérer dans le chromosome sont amplifiés par PCR avec extrémités pendantes de façon à obtenir des molécules dont les extrémités correspondent à celles de la région du chromosome d'*Escherichia coli* dans laquelle on veut introduire la modification.

On utilise alors de l'arabinose pour induire l'expression des gènes de recombinaison portés par le plasmide, puis on électropore les bactéries avec la cassette de sélection-contre-sélection. Les bactéries qui intègrent la cassette dans leur chromosome deviennent résistantes à la kanamycine et sensibles à la streptomycine. On les sélectionne en les cultivant sur un milieu contenant de la kanamycine (15µg/ml).

De la même manière, les bactéries qui intégreront le fragment d'ADN à la place de la cassette redeviendront résistantes à la streptomycine et sensibles à la kanamycine, et seront sélectionnées au moyen de la streptomycine (50µg/ml). (Une telle sélection dont le critère correspond à l'absence d'un gène est appelée contre-sélection.)

L'utilisation d'une technique de recombinaison homologue permet d'introduire une modification à un endroit bien défini du chromosome. La stratégie de sélection-contre-sélection permet de sélectionner les cellules transformées sans qu'aucun marqueur ne soit présent à l'étape finale du clonage.

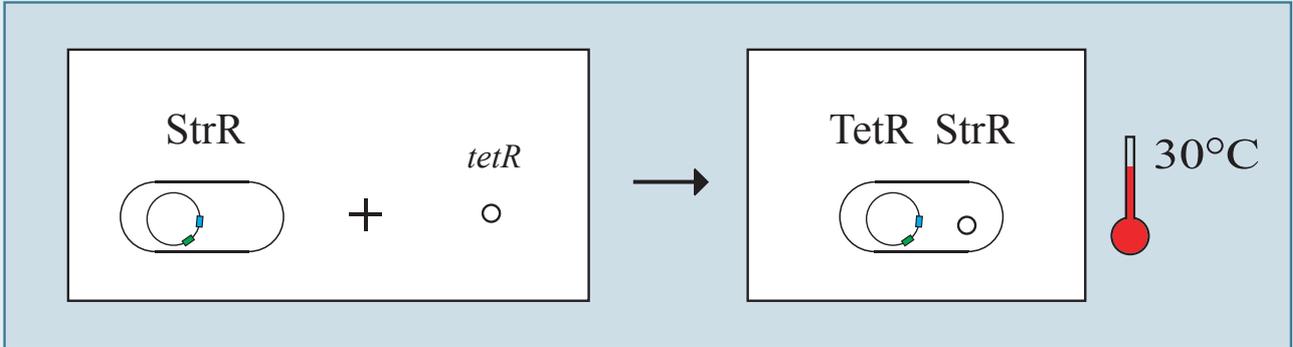
Une fois le clonage effectué, les bactéries sont cultivées à 37°C en l'absence de tétracycline et le plasmide est perdu, de sorte que la bactérie obtenue ne diffère de la bactérie de départ que par la modification qu'on a introduit dans le chromosome.

Transformation chromosomique par recombinaison homologue

Utilisation d'une stratégie de sélection/contre-sélection

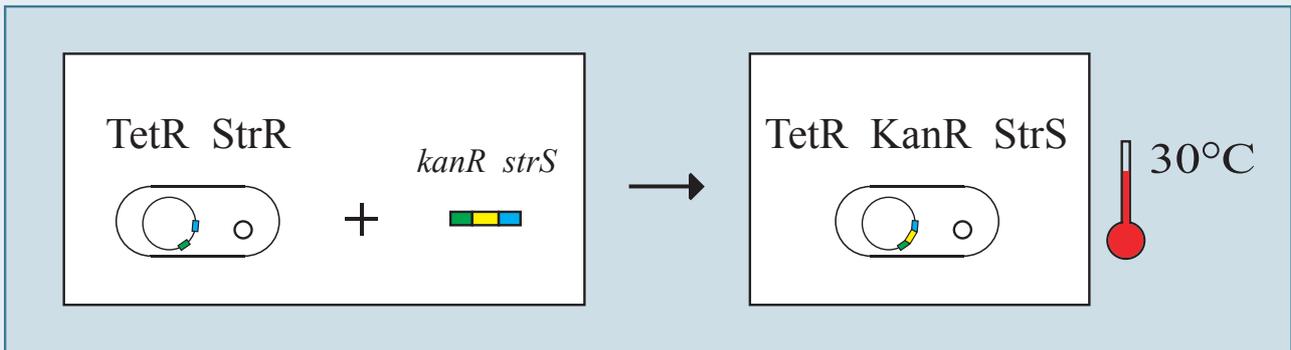
Première étape :

Transformation avec le plasmide portant les gènes de recombinaison



Deuxième étape :

Transformation avec la cassette de sélection/contre-sélection



Troisième étape :

Transformation avec le fragment d'ADN portant la modification

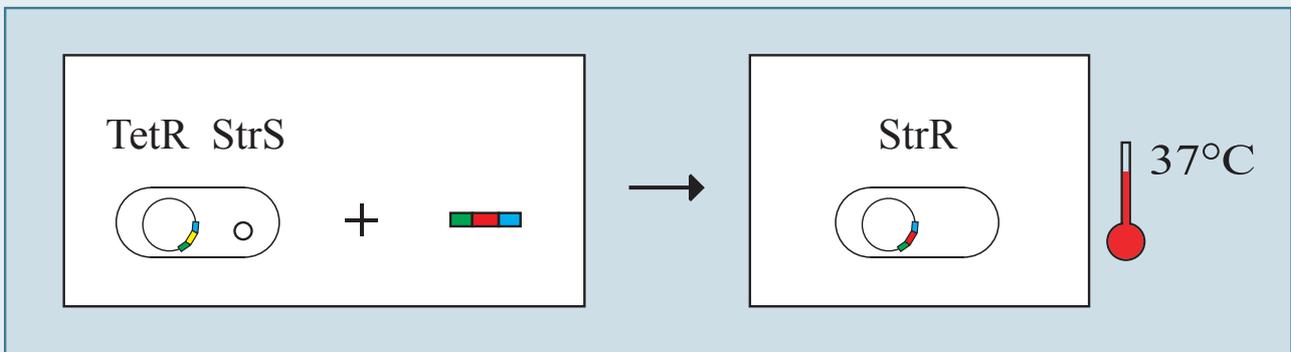


Figure III.1.5.A. La stratégie de sélection-contre-sélection permet de sélectionner les cellules transformées sans qu'aucun marqueur ne soit présent à l'étape finale du clonage. Une fois le clonage effectué, la bactérie obtenue ne diffère de la bactérie de départ que par la modification qu'on a introduit dans le chromosome.

III.1.7.3. Protocole d'introduction d'un fragment d'ADN dans le chromosome d'*Escherichia coli*

Amplifier par PCR avec extrémités pendantes le fragment d'ADN à introduire dans le chromosome de façon à obtenir des molécules dont les extrémités correspondent sur une cinquantaine de bases à celles de la portion du chromosome que le fragment doit remplacer.

Transformer la souche bactérienne avec le plasmide portant les gènes de recombinaison (pSC101-BAD-gbatet) puis étaler sur boîtes de LB agar 15g/l, tétracycline 3µg/ml et laisser pousser 16h à 30°C.

Prélever des cellules d'une colonie isolée pour ensemercer 20ml de LB contenant 3µg/ml de tétracycline. Laisser croître à 30°C dans un tube 50ml en agitant continuellement (200rpm) jusqu'à atteindre la phase stationnaire.

Transférer 400µl de culture saturée dans un tube de 50ml contenant 20ml de LB contenant 3µg/ml de tétracycline à 30°C. Vortexer puis transférer par volumes de 1,4ml dans plusieurs tubes de 1,7ml et laisser croître à 30°C pendant 2 heures avec agitation.

Placer sur glace l'eau milliQ, les cuvettes d'électroporation et les pointes de pipetteman à utiliser après la première centrifugation. (L'efficacité de la transformation dépend de manière critique de la température.)

Placer un aliquot de L-arabinose à 30°C. (Le L-arabinose est dissout à 100mg/ml dans de l'eau milliQ. La solution (stérilisée par filtration) est stockée à -20°C par aliquots de 300µl.)

Une fois les deux heures écoulées, ajouter 20µl de L-arabinose à 30°C et laisser incuber 1h à 37°C.

Pendant ce temps, faire refroidir la centrifugeuse à 0°C.

Une fois l'heure écoulée, centrifuger une minute à 2300g dans la centrifugeuse prérefroidie à 0°C.

Ôter immédiatement le surnageant d'un geste sec de la main. Ajouter 1,4 ml d'eau milliQ à 0°C et resuspendre les bactéries en tapotant délicatement le milieu du tube.

Centrifuger une minute à 2000g et 0°C.

Ôter le surnageant et resuspendre encore une fois dans 1,4 ml d'eau milliQ à 0°C.

Centrifuger une minute à 2000g et 0°C et ôter le surnageant.

Resuspendre les bactéries en tapotant délicatement le milieu du tube.

Ajouter le fragment d'ADN à insérer dans le chromosome (300ng) et transférer immédiatement dans une cuvette d'électroporation de 1mm à 0°C puis électroporer à 1350V, 200Ω et 25μF.

Prendre les cellules dans 150μl de LB et laisser incuber une heure à 37°C, puis étaler sur boîte de milieu sélectif. (Le critère de sélection doit correspondre à un changement de phénotype dû à l'insertion du fragment d'ADN dans le chromosome.

Pour les transformations que nous avons réalisées il s'agissait de la résistance à un antibiotique.)

Pour conserver le plasmide de recombinaison, (en vue d'une nouvelle insertion dans le chromosome) utiliser du milieu sélectif contenant 3μg/ml de tétracycline et cultiver les bactéries à 30°C.

Pour éliminer le plasmide de recombinaison, utiliser du milieu sélectif ne contenant pas de tétracycline et cultiver les bactéries à 37°C.

Techniques de micro-lithographie

III.2. Techniques de micro-lithographie

Ce chapitre détaille les techniques de micro-lithographie utilisées pour la fabrication du dispositif de tri cellulaire qui nous a permis de mesurer la fluorescence des bactéries cellules par cellule.

III.2.1. Exposé du principe

Le dispositif de tri cellulaire est réalisé en trois étapes :

La **première étape** consiste à fabriquer un moule.

Pour cela on étale sur une surface de verre une résine photo-sensible sur une épaisseur de 5 μ m. On pose ensuite sur la résine un masque qui ne laisse passer la lumière qu'aux endroits correspondants au motif à réaliser. On utilise ensuite un développeur pour enlever la résine qui n'a pas été exposée.

La **deuxième étape** consiste à réaliser un moulage du motif.

Pour cela on verse sur le moule une résine de silicone qui une fois durcie et démoulée formera le motif du dispositif de tri cellulaire.

La **troisième étape** consiste à sceller la résine de silicone sur une fine lamelle de verre et à remplir le motif. (A l'aide d'un microscope nous pouvons alors imager les bactéries présentes dans les canaux.)

III.2.2. Protocoles

III.2.2.1. Lithographie optique (réalisation de la matrice)

Nettoyage de la surface

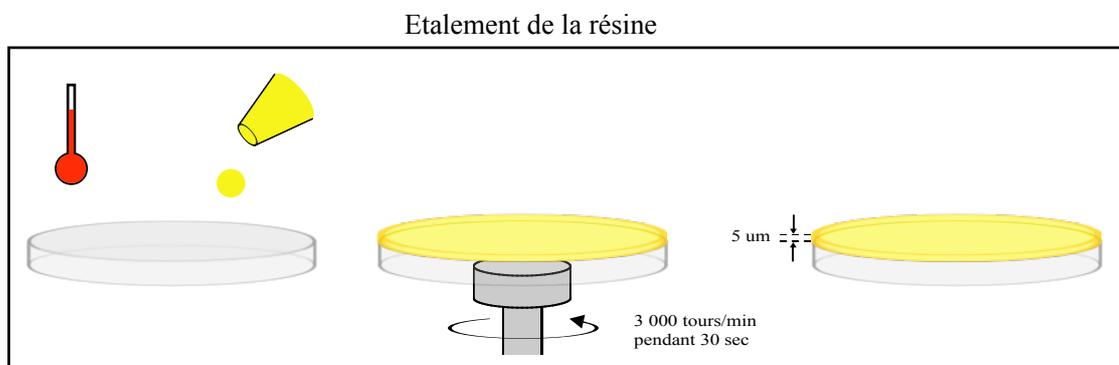
Nettoyer d'abord les disques de verre en utilisant du méthanol et du papier à essuyer, puis les plonger durant vingt minutes dans du toluène dans un bain à ultrason.

Sécher les disques de verre au pistolet à azote et les immerger pendant une demi heure dans un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée ('solution piranha' = $1/3 \text{ H}_2\text{O}_2 + 2/3 \text{ H}_2\text{SO}_4$)

Rincer les disques en les agitant vigoureusement dans cinq bains successifs d'eau milliQ pour ôter complètement l'acide. Sécher au pistolet à azote et poser les disques de verre sur un plateau chauffant à 200 C. Attendre dix minutes et laisser la température descendre à 100 C.

Étalement de la résine

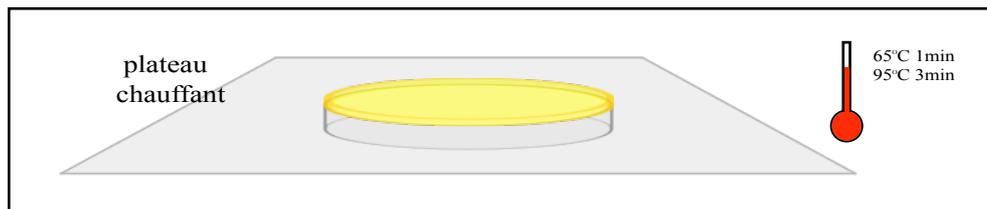
Transférer un disque de verre sur la tournette, déposer 1ml de résine SU8-5 (Microchem) et faire tourner à 3000trs/min pendant 30 secondes pour donner à la résine une épaisseur de 5 microns. Réserver le disque, et étaler la résine sur le disque suivant.



Cuisson

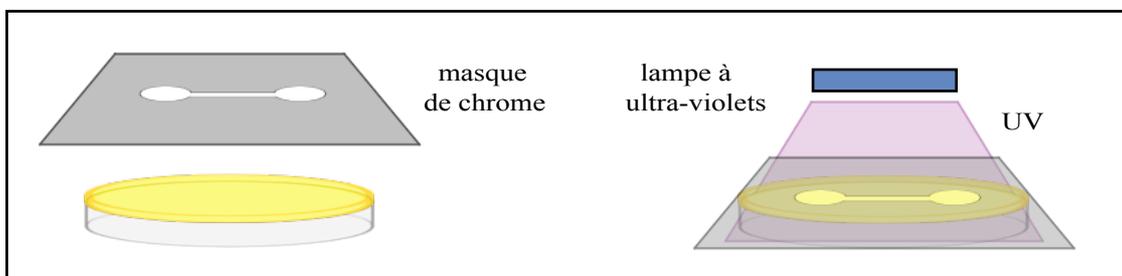
Transférer les disques de verre sur un plateau chauffant porté à 65 °C. Attendre 1 minute puis faire augmenter la température jusqu'à 95 °C. (L'augmentation de température de 65 °C à 95 °C prends une dizaine de minutes.) Une fois cette température atteinte, attendre encore 3 minutes et ôter les disques de verre du plateau chauffant.

(Cette étape a pour but de faire évaporer le solvant pour faire durcir la résine.)



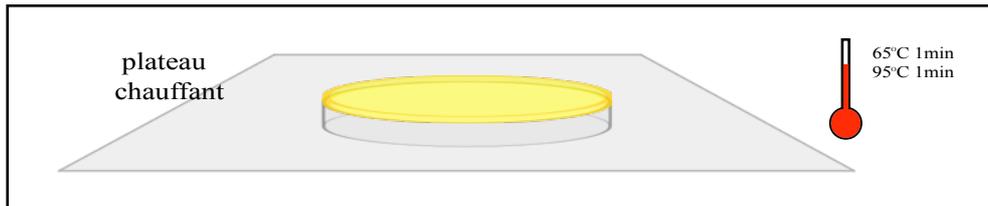
Exposition

Placer un des disques sur une surface noire non réfléchissante et poser le masque sur le disque de sorte que la face chromée soit placée contre la résine. Placer ensuite au dessus du motif un tube noir non réfléchissant (destiné à bloquer les rayons non parallèles) puis insoler à l'aide d'une lampe à ultraviolet placée à une trentaine de centimètres au dessus du motif. Réserver le disque, et recommencer l'opération avec le disque suivant.



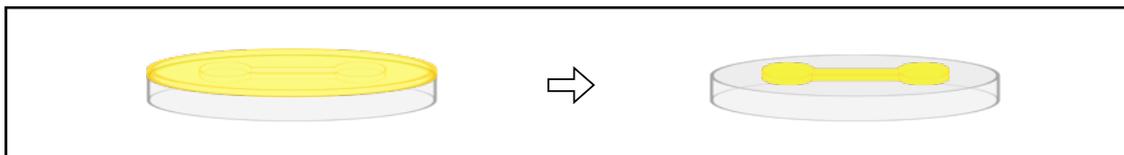
Recuit

Transférer les disques de verre sur un plateau chauffant porté à 65 C. Attendre 1 minute puis faire augmenter la température jusqu'à 95 C. Une fois cette température atteinte, attendre encore 1 minutes et ôter les disques de verre du plateau chauffant. (L'objet de cette étape est de faire réticuler spécifiquement les parties de la résine qui ont été exposées.)



Révélation

A l'aide d'une pincette, plonger le disque dans le développeur et agiter vigoureusement pendant une minute, puis rincer à l'isopropanol et sécher complètement la surface en utilisant un pistolet à azote.



III.2.2.2. Lithographie douce (moulage du motif expérimental)

Préparation du moule

En utilisant du verni à ongles transparent, coller sur le disque un anneau d'aluminium, et à l'endroit de chaque réservoir un cylindre d'aluminium. Attendre une demi-heure que le verni à ongles sèche.

Nous utilisons des disques de verre de 33mm de diamètre et 3mm d'épaisseur de sorte que le moule soit suffisamment solide pour être réutilisé de nombreuses fois.

L'anneau d'aluminium fait 30mm de diamètre, 10mm de hauteur et 2mm d'épaisseur.

Le cylindre d'aluminium fait 5mm de diamètre et 2mm d'épaisseur.

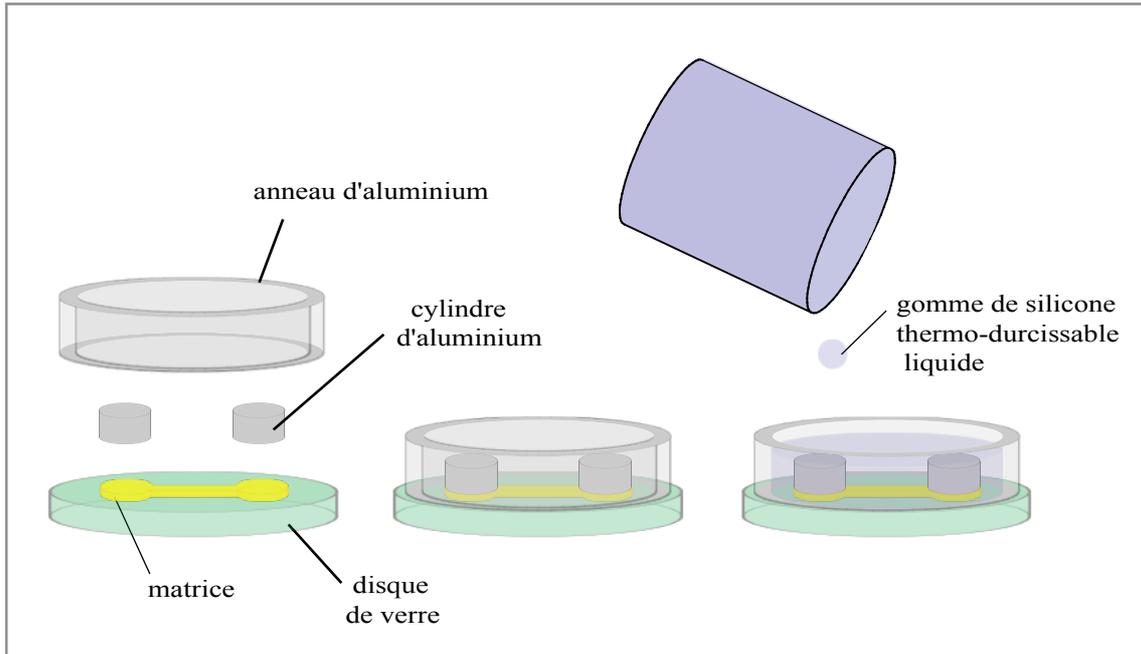
Préparation de la résine de silicone

Dans un tube de 50ml mélanger 20g du composant A et 2g du composant B de la résine RTV615 (GE Bayer Silicones). Centrifuger une minute à 10 000g pour éliminer les bulles.

(La RTV615 est un élastomère bi-composant. Ses deux composants notés A et B sont stockés séparément. Au moment d'utiliser la résine on mélange les deux composants.)

Moulage de la chambre expérimentale

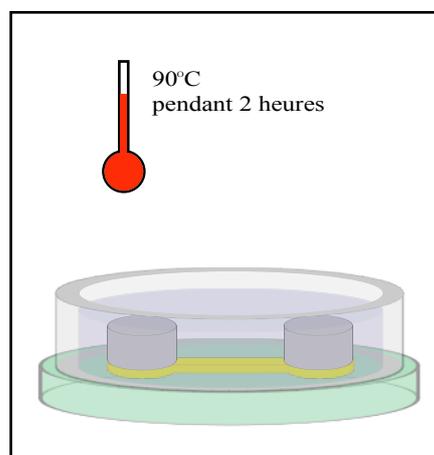
Verser la pâte de silicone dans le moule (doucelement et de façon continue pour éviter la formation de bulles) jusqu'à une hauteur de 5mm.



Cuisson de la résine de silicone

Faire cuire dans une étuve à 90 °C pendant deux heures.

(Une fois les deux composants mélangés, leurs molécules vont réticuler entre elles pour former un élastomère de silicone. La température permet d'accélérer la cinétique de la réaction.)



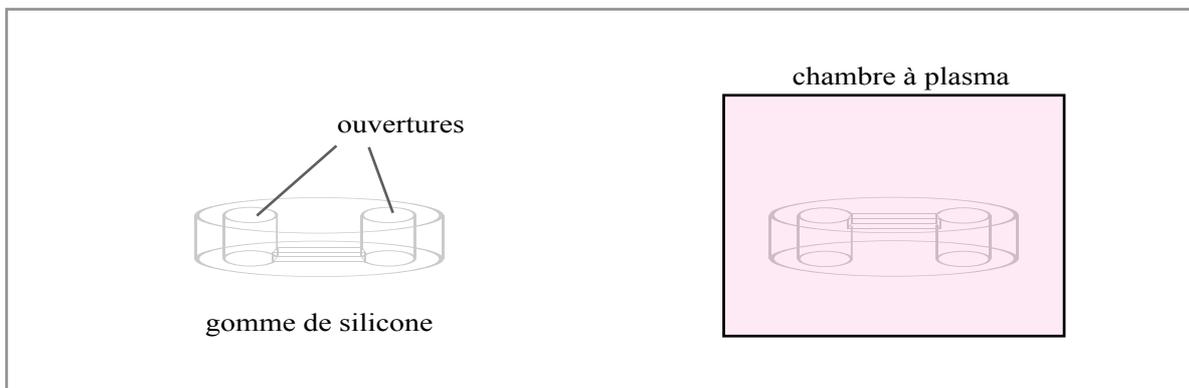
Démoulage

Utiliser une pincette pour décoller les bords, puis la pastille toute entière.

III.2.2.3. Assemblage (construction du dispositif expérimentale)

Ouverture des réservoirs

A l'aide d'un scalpel pratiquer une ouverture dans le silicone à l'endroit des réservoirs.

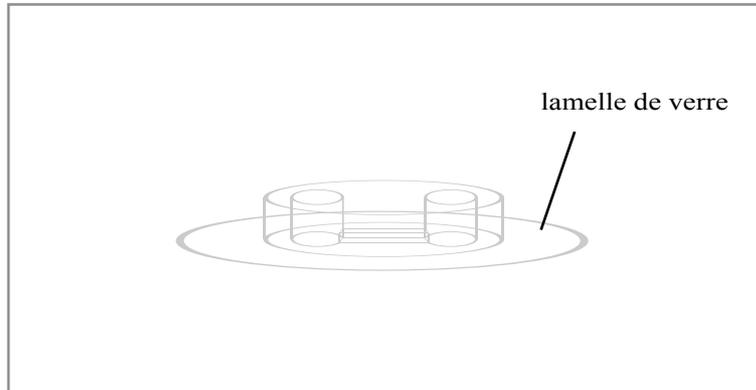


Traitement de la surface

Poser la pastille de résine de silicone sur une lame de verre et transférer dans la chambre à plasma. Faire le vide dans la chambre (0,05 torr) puis ouvrir la valve d'arrivée d'eau. (La pression remonte alors à 1 torr.) Alimenter le générateur de micro-onde et augmenter la tension jusqu'à créer un plasma. Réduire ensuite la tension au maximum mais de façon à maintenir le plasma et laisser la pastille exposée durant dix secondes. Couper alors l'alimentation. Fermer la valve d'arrivée d'eau, puis relâcher le vide et transférer les pastilles de résine de silicone sous hotte. (La résine de silicone est maintenant hydrophile.)

Mise en place de la pastille

Poser la pastille de résine de silicone hydrophile sur une lamelle de verre puis appuyer pour s'assurer que la pastille est bien scellée.

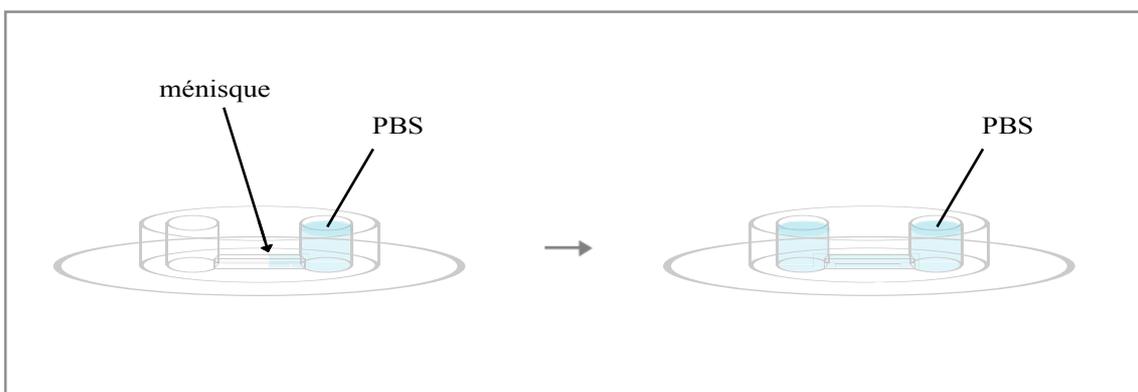


Remplissage du motif

Utiliser une seringue d'1ml portant un filtre de 0,1 μ m et une aiguille pour remplir le motif de PBS. (Vérifier visuellement le bon remplissage des canaux.)

Le PBS (Phosphate Buffer Saline) est un tampon salin.

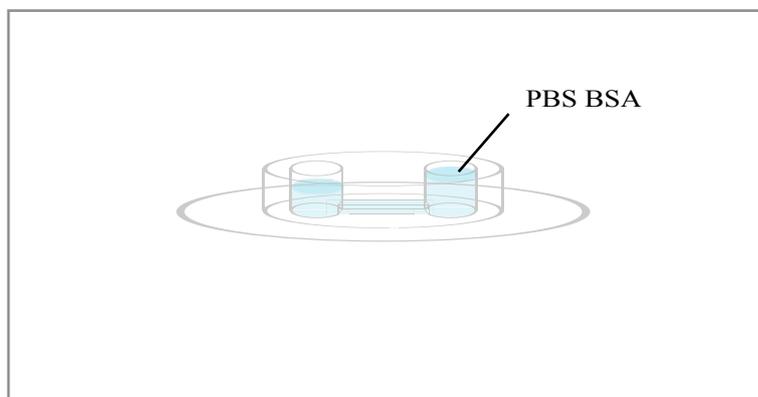
Une fois le motif rempli de PBS, la chambre expérimentale peut être conservée une semaine en l'état à condition de prévenir les problèmes d'évaporation. Pour cela couvrir la pastille à l'aide d'une lame de verre et réserver dans une boîte fermée dont le fond contient de l'eau.



III.2.2.3. Enduit (préparation du dispositif expérimental)

Juste avant d'effectuer une série de mesures vider les réservoirs du PBS qu'ils contiennent et le remplacer par du PBS comprenant 1mg/ml de BSA. En injecter 150! l dans l'un des réservoirs et 50! l dans les autres. Bien mélanger en pipetant plusieurs fois de haut en bas et attendre vingt minutes avant d'introduire les bactéries à étudier.

(La BSA (Bovine Serum Albumin) est une protéine. Nous l'utilisons pour couvrir la surface de verre pour réduire l'adhésion des bactéries.)



Au moment d'effectuer les mesures vider le réservoir contenant les 150! l de PBS et y placer les bactéries à étudier resuspendues dans du PBS comprenant 1mg/ml de BSA. En injecter 150! l de liquide dans le réservoir et bien mélanger en pipetant plusieurs fois de haut en bas. Placer les électrodes et attendre une ou deux minutes que les bactéries passent devant l'objectif du microscope.

Ajuster la tension pour que les bactéries passent à une cadence d'environ une par seconde.

Sur les figures précédentes les schémas de la chambre expérimentale ont été simplifiés pour plus de clarté. En réalité le dispositif expérimental comprend trois branches et permet de séparer les bactéries en deux sous populations.

Techniques de microscopie de fluorescence

Un générateur de signaux fixe la fréquence à laquelle le compteur recense le nombre de photons détectés par les photodiodes.

Deux électrodes de platine reliées à un transformateur permettent d'établir une différence de potentiel électrique entre les réservoirs.

La collecte des données est effectuée à l'aide des logiciels Labview 6.1 et IMAQ 6. (National Instruments)



Figure III.3.1.A. Photographie du montage expérimental

Montage expérimental

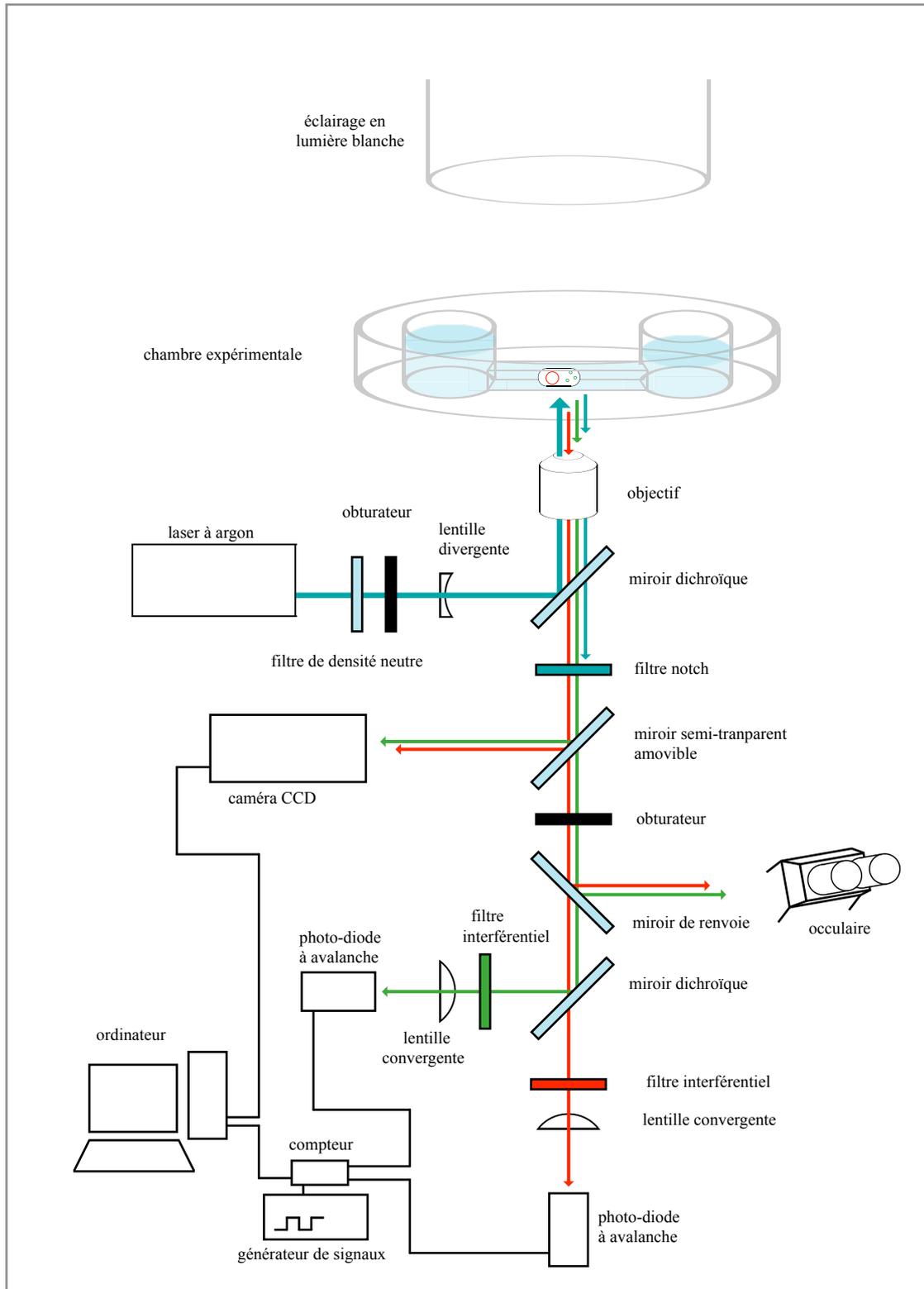


Figure III.3.1.B. Schéma du montage expérimental

III.3. Techniques de microscopie de fluorescence

III.3.1. Présentation du montage

Figures III.3.1.A. et III.3.1.B.

La chambre expérimentale est placée sur une platine motorisée montée sur un microscope inversé. L'excitation de la fluorescence est réalisée au moyen d'un laser à argon.

Le faisceau laser est dirigé vers la chambre expérimentale au moyen d'un miroir dichroïque qui réfléchit la longueur d'onde d'excitation et transmet les longueurs d'onde d'émission.

Une lentille divergente placée sur le chemin du faisceau laser permet d'obtenir dans le plan focal de l'objectif du microscope une tache de dimension contrôlée

Le faisceau passe ensuite par un objectif qui va permettre d'imager les cellules.

Placé au dessus de la chambre expérimentale, un éclairage en lumière blanche d'intensité réglable et muni d'un obturateur permet d'effectuer la mise au point en champ clair.

Un filtre notch placé derrière le miroir dichroïque élimine la longueur d'onde du faisceau laser.

Un miroir semi-transparent amovible permet de diriger la moitié de la lumière collectée vers une caméra numérique (Micromax - Roper Scientific). Un second miroir amovible permet de diriger la lumière soit vers les oculaires, soit vers les photodiodes.

Un deuxième miroir dichroïque (XF2037 - Omega Optical) réfléchit la longueur d'onde d'émission de la protéine fluorescente verte vers une photodiode à avalanche et transmet la longueur d'onde d'émission de la protéine fluorescente rouge vers une seconde photodiode à avalanche.

Un filtre interférentiel placé devant chaque photodiodes à avalanche sélectionne spécifiquement la longueur d'onde correspondant soit à l'émission de la protéine fluorescente rouge (XF3083 - Omega Optical), soit à celle de la protéine fluorescente verte (XF3003 - Omega Optical).

Une lentille convergente (AC254-030-A1 - Thorlabs) placée entre chaque photodiode et le filtre interférentiel correspondant agrandit l'image.

III.3.2. Réglages

Centrage et optimisation de l'homogénéité du faisceau d'excitation

Mettre en marche le laser et la caméra. Laisser le laser chauffer et la caméra refroidir pendant une demi-heure.

Avant de placer la lentille divergente, utiliser une solution de fluorescéine à 20nM placée entre deux lamelles pour centrer le faisceau laser en imageant l'émission de fluorescéine.

Introduire la lentille divergente et utiliser la solution de fluorescéine d'abord pour centrer le faisceau puis pour trouver une région où le faisceau est aussi homogène que possible. (La fonction 'profil de ligne' permet de voir à quel point l'éclairage est homogène.)

Définir comme région d'intérêt un carré de vingt pixels de côté (8 μ m) correspondant à la région où le faisceau est homogène.

Centrage des photodiodes

Introduire entre deux lamelles une solution de billes fluorescentes diluées 107 fois.

Après une dizaine de minutes, trouver une bille isolée sur la lamelle inférieure et la placer au centre du carré défini précédemment. Utiliser la platine motorisée pour effectuer un balayage horizontal et visualiser le centrage des diodes et l'homogénéité du faisceau laser. Retoucher alors les vis de centrage des diodes, puis effectuer un nouveau balayage.

(Commencer par des balayages de dix pas sur dix, d'abord avec des pas de 4 μ m, puis une fois que les diodes sont presque alignées, avec des pas de 2 μ m.)

Calibration

Effectuer une acquisition en utilisant des billes standardisées (diluées 105 fois dans du PBS contenant 1mg/ml de BSA) en remplacement des bactéries. Ces données permettent de calibrer l'intensité du laser et par la suite de comparer des résultats expérimentaux obtenus des jours différents.

III.3.3. Acquisition

Placer une chambre expérimentale sur le porte-échantillon. Vérifier visuellement que les canaux ne sont pas obstrués puis remplacer le PBS par du PBS contenant 1mg/ml de BSA. Mélanger en pipettant plusieurs fois et attendre vingt minutes. Pendant ce temps mélanger 60µl de PBS-BSA 10mg/ml et 540µl des bactéries préparées la veille (resuspendues à une absorbance de 0,1 dans du PBS contenant de l'acide nalidixique, et du chloramphénicol). (Après ces vingt minutes, la surface de verre est couverte de BSA.)

Remplacer les 150µl de PBS-BSA par 150µl de solution contenant les bactéries et mélanger en pipettant plusieurs fois. Placer les électrodes dans les réservoirs. Appliquer une tension de 10V et vérifier visuellement que les bactéries entrent dans le canal.

Placer la partie étroite du canal devant l'objectif et effectuer une mise au point automatique. (L'obturateur placé entre le condenseur et la source de lumière blanche se ferme alors automatiquement.) Fermer (manuellement) l'obturateur situé devant le miroir de renvoi.

Placer un couvercle noir opaque sur la chambre expérimentale et bloquer le rayon laser. Brancher les photodiodes. Ré ouvrir alors l'obturateur en basculant le miroir de renvoi de façon à diriger la lumière sur les photodiodes. Et enfin, ouvrir l'obturateur du faisceau laser. Utiliser la caméra pour vérifier visuellement que les bactéries passent bien au milieu de la zone d'intérêt puis lancer une acquisition de trente secondes pour vérifier que les pics de fluorescence sont bien plats (et suffisamment séparés les uns des autres).

Ajuster le voltage de sorte qu'une bactérie passe devant l'objectif toutes les 50 milli-secondes environ. Basculer le miroir de renvoi semi transparent de sorte que la totalité de la lumière aille vers les photodiodes.

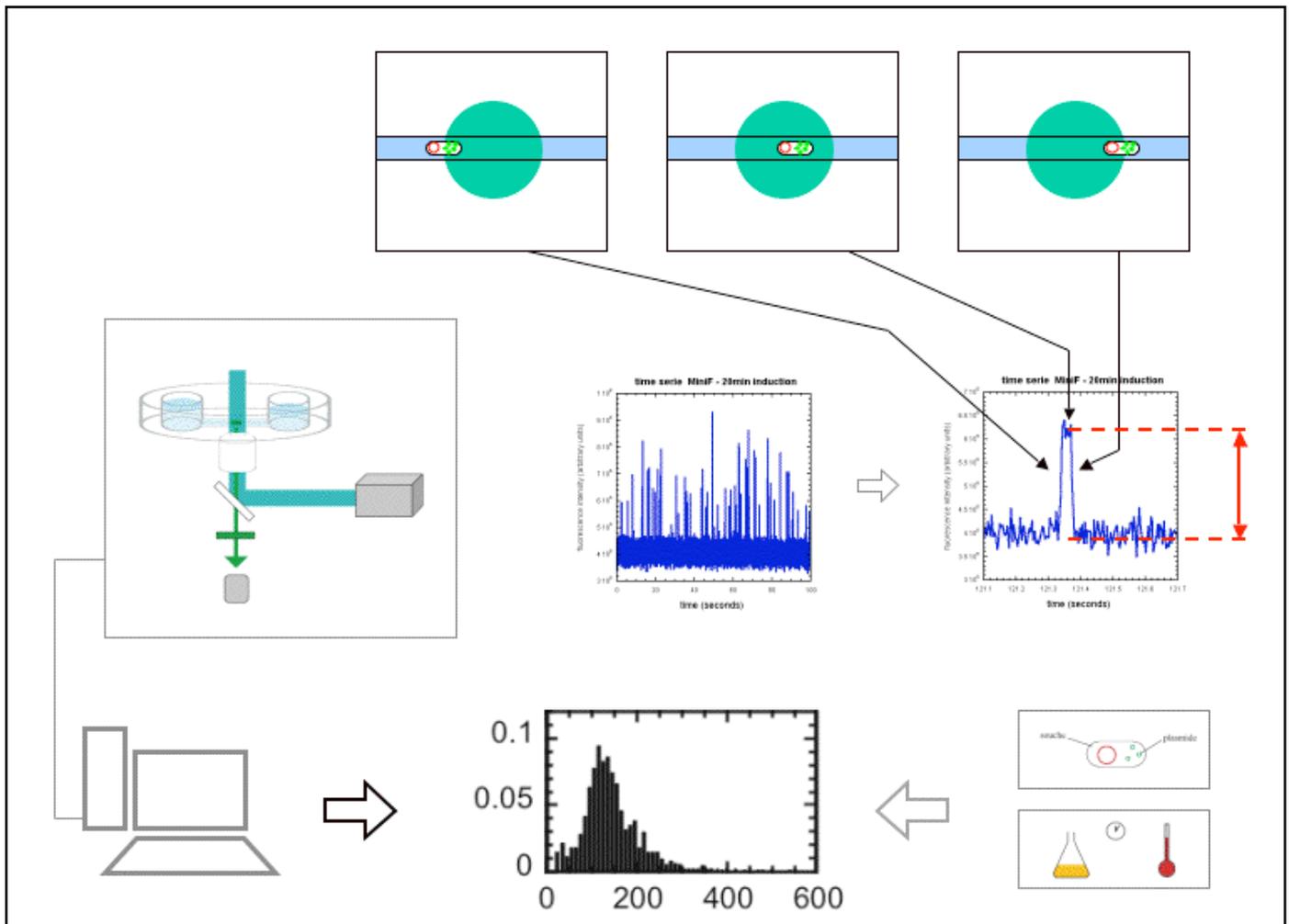
Régler le programme de sorte qu'une acquisition dure 500 secondes.

Entre chaque acquisition basculer le miroir de renvoi semi transparent vers la caméra et vérifier la focalisation. La rajuster au besoin puis re-basculer le miroir de renvoi et lancer une nouvelle acquisition.

III.3.4. Traitement des données

Une fois l'acquisition terminée, on utilise un second programme informatique qui détecte les pics et note leur hauteur pour présenter le résultat sous la forme d'un histogramme.

– Figure III.3.4.A.



Figures III.3.4.A. L'expérience consiste à mesurer l'intensité de fluorescence en fonction du temps.

Les pics correspondent au passage des bactéries devant l'objectif du microscope.

Les hauteurs des pics sont présentées sous la forme d'un histogramme dont la forme est caractéristique du plasmide, de la souche bactérienne et de la manière dont les bactéries sont préparées.

Chapitre IV

Constructions

Constructions

IV.1. Présentation générale

IV.1.1. Choix des plasmides

Nous avons choisi d'étudier trois plasmides : le pZC320, le pOAR64 et le pOU82.

Le plasmide **pZC320** est un dérivé du plasmide F qui est présent à une copie par cellule. Il nous a été donné par David Lane. (Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, CNRS, Toulouse, France)

Les plasmides **pOAR64** et **pOU82** sont deux plasmides thermosensibles dérivés du plasmide R1. Ces plasmides ne diffèrent entre eux que par la présence ou l'absence d'un système de partition et leur nombre de copies par cellule augmente avec la température. Ils nous ont été donnés par Oleg Rodionov et Michael Yarmolinsky. (Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, Bethesda, USA)

Nous envisageons également d'étudier un plasmide présent à une vingtaine de copies par cellule : le **pBR322**. Ce plasmide nous a été donné par Charles Plessy. (Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France)

IV.1.2. Choix des souches bactériennes

Nous avons construit deux séries de souches bactériennes. La première nous a permis de vérifier le bon fonctionnement du dispositif expérimental. La deuxième est destinée à la réalisation de nos expériences de mesure cellule par cellule du nombre de copies de plasmide.

Dans un premier temps nous avons choisi d'utiliser la souche DH5 α PRO parce que son chromosome porte un gène qui exprime fortement le répresseur de l'opéron lactose. (Lutz & al. 1997) Mais cette souche bactérienne est résistante à l'acide nalidixique.

Nous avons donc construit une deuxième série de souches bactériennes à partir de la souche Top10. Cette souche est sensible à l'acide nalidixique et nous l'avons modifiée de manière à ce qu'elle présente elle aussi un fort niveau d'expression de répresseur. Nous avons également construit une nouvelle série de plasmides en utilisant un promoteur *tac* dont les régions -35 et -10 sont espacées de 17 paires de bases, ce qui a pour effet d'augmenter encore le niveau de transcription.

IV.1.3. Vue d'ensemble des constructions

Les gènes codant la protéine fluorescente verte ont été insérés dans les différents plasmides par restriction-ligation (comme décrit dans le paragraphe III.1.2.).

La souche Top10 a été modifiée par recombinaison homologue (comme décrit dans le paragraphe III.1.7.).

Construction des plasmides

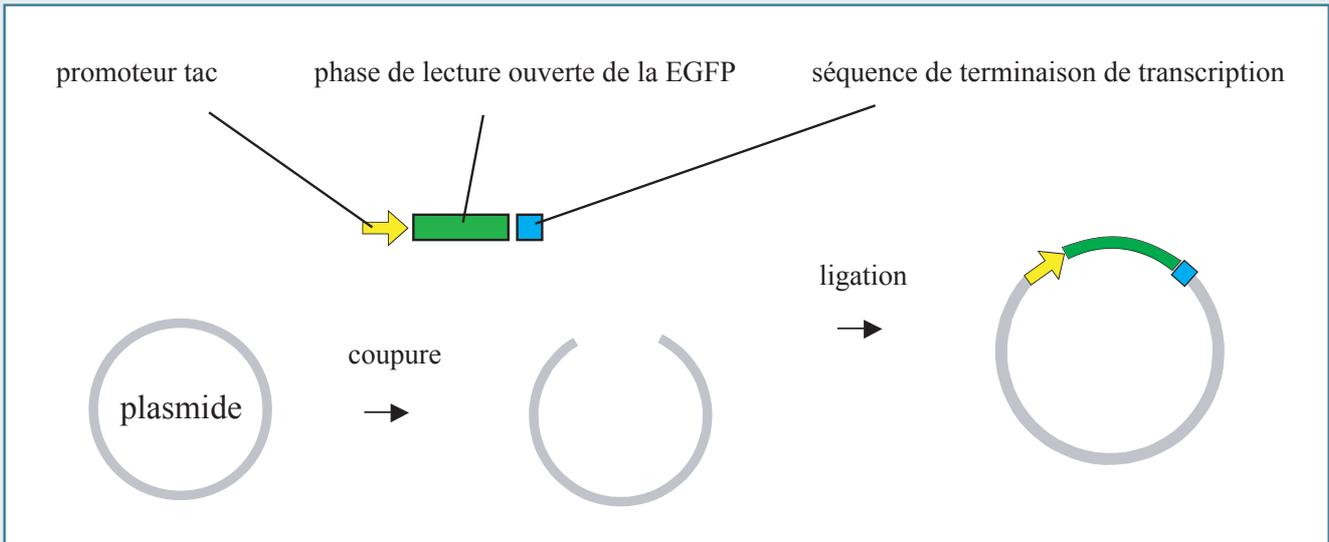


Figure IV.1.A. Les gènes codant la protéine fluorescente verte ont été insérés dans les différents plasmides par restriction-ligation.

Construction des souches bactériennes

Première série de constructions

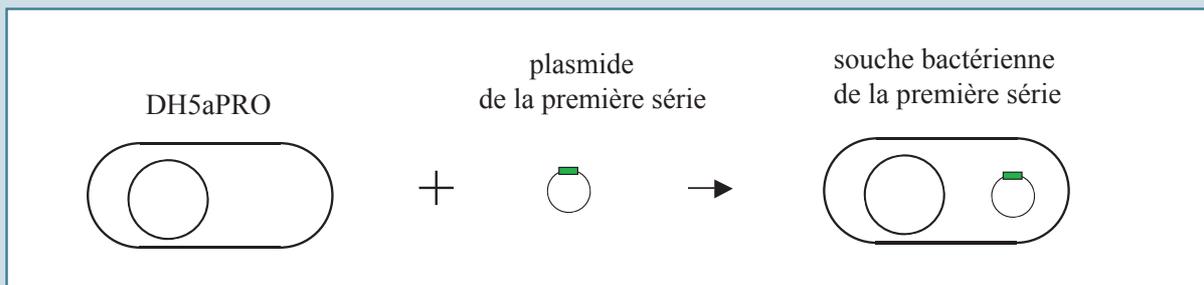


Figure IV.1.B. La première série de souches bactériennes a été construite à partir de la souche DH5aPRO.

Deuxième série de constructions

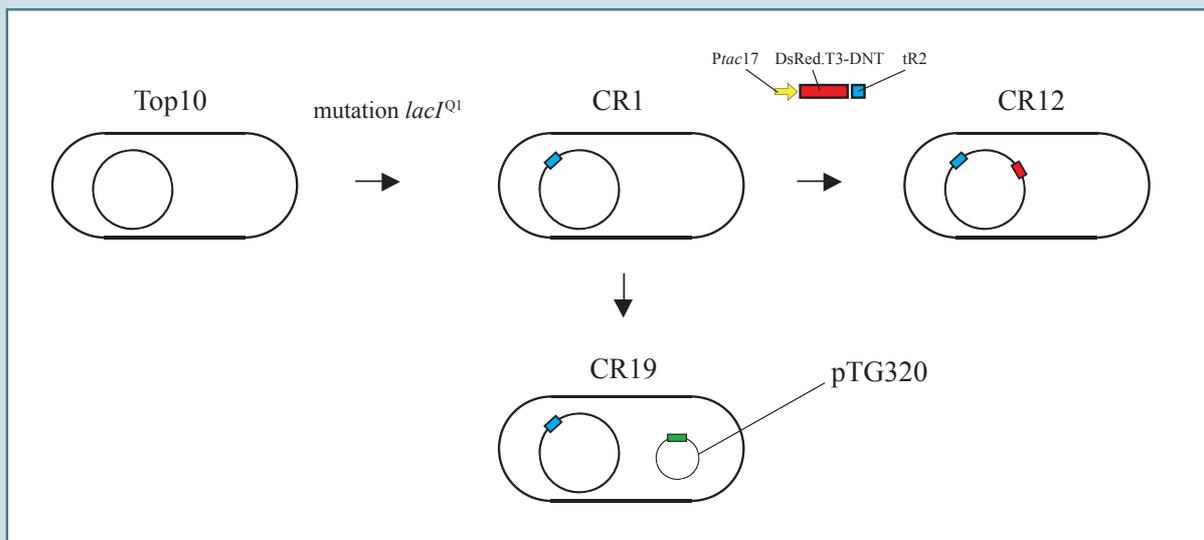


Figure IV.1.C. La deuxième série de souches bactériennes a été construite à partir de la souche Top10.

Tableaux récapitulatifs

Première série de constructions	<i>P_{lac}16</i> EGFP T1 	pROLar	pBR322	pOU82	pOAR64	pZC320
		pTG1	pTG2	pTG3	pTG4	pTG5
Deuxième série de constructions	<i>P_{lac}17</i> EGFP tR2 		pTG322	pTG82	pTG64	pTG320

Plasmides	pTG2	pTG3	pTG4	pTG5
Souches dérivées de DH5aPRO	RP2	RP3	RP4	RP5

IV.2. Première série de constructions

Nous avons construit un premier plasmide portant le gène de la protéine fluorescente verte : le plasmide pTG1.

Le gène codant la protéine fluorescente verte a ensuite été ‘copié’ par PCR pour construire les quatre autres plasmides : pTG2, pTG3, pTG4 et pTG5.

IV.2.1. Construction du plasmide pTG1

(figure IV.2.A.)

Pour profiter d’un niveau d’expression élevé nous avons placé le gène codant la protéine fluorescente verte sous le contrôle d’un promoteur *tac* (un promoteur hybride qui combine le mécanisme de répression de l’opérateur lactose et une efficacité de transcription dix fois plus importante due à une partie de sa séquence empruntée au promoteur tryptophane).

Le promoteur *tac* (Ptac16) a été reconstitué en appariant deux molécules d’ADN simple brin obtenues par synthèse chimique (oligos Ptac16-A et Ptac16-B). La molécule d’ADN double brin ainsi obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l’endonucléase *HindIII*. La phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte (EGFP) a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pEGFP de Clontech. (oligos EGFP-Hi et EGFP-No). La molécule ainsi obtenue porte un site de restriction *HindIII* à une de ses extrémités (celle de codon initiateur) et un site de restriction *NotI* à l’autre (celle du codon stop).

La phase de lecture ouverte a été digérée par l’enzyme de restriction *HindIII*, puis liguée au promoteur. Après avoir été purifié sur gel d’agarose, le fragment correspondant a été amplifié par PCR (oligos tac16-AaNcEc5 et EGFP-No) puis digéré par les enzymes *AatII* et *NotI*.

Parallèlement, le plasmide pROLar.A122 a été digéré avec les enzymes *AatII* et *NotI*, puis purifié sur gel d’agarose.

Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac* et la phase de lecture ouverte codant la protéine fluorescente verte d'une part, et le plasmide coupé d'autre part ont alors été quantifiés sur gel d'agarose et ligués entre eux pour former le plasmide **pTG1**.

(Le succès de l'insertion a été vérifié par séquençage.)

IV.2.2. Construction des plasmides pTG2, pTG3, pTG4 et pTG5

(figures IV.2.B., IV.2.C., IV.2.D. et IV.2.E.)

Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac*, la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte et la séquence de terminaison de transcription T1 a été amplifiée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pTG1 (oligos tac16-AaNcEc5 et T1-EcAv). Les molécules ainsi obtenues portent des sites de restriction *AatII* et *NcoI* à une de leurs extrémités (celle du promoteur) et un site de restriction *EcoRI* à l'autre (celle du site de terminaison de transcription).

Le fragment 'Ptac16-EGFP-T1' et le plasmide pBR322 ont été digérés par les endonucléases *AatII* et *EcoRI* puis quantifiés sur gel d'agarose et ligués entre eux pour former le plasmide **pTG2**.

Le fragment 'Ptac16-EGFP-T1' et le plasmide pOU82 ont été digérés par les endonucléases *EcoRI* et *NcoI* puis quantifiés sur gel d'agarose et ligués entre eux pour former le plasmide **pTG3**.

Le fragment 'Ptac16-EGFP-T1' et le plasmide pOAR64 ont été digérés par les endonucléases *EcoRI* et *NcoI* puis quantifiés sur gel d'agarose et ligués entre eux pour former le plasmide **pTG4**.

Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac*, la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte et la séquence de terminaison de transcription T1 ont été amplifiés par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pTG1 (oligos tac16-AaNc et T1-BaXhEc5). Les molécules ainsi obtenues portent un site de restriction *AatII* à une de leurs extrémités (celle de promoteur) et un site de restriction *XhoI* à l'autre (celle du site de terminaison de transcription). Le plasmide pZC320 hormis la région du gène du *lacZ* a été amplifié par PCR avec extrémités pendantes de façon à obtenir un plasmide linéarisé qui présente un site de restriction *AatII* à une de ses extrémités et un site de restriction *XhoI* à son autre extrémité (oligos F-Aa et F-Xh). Ce plasmide linéarisé et le fragment 'Ptac16-EGFP-T1' ont été digérés avec les enzymes *AatII* et *XhoI* puis quantifiés sur gel d'agarose et enfin ligués pour former le plasmide **pTG5**.

(Le succès des insertions à été vérifié par séquençage.)

Construction du plasmide pTG1

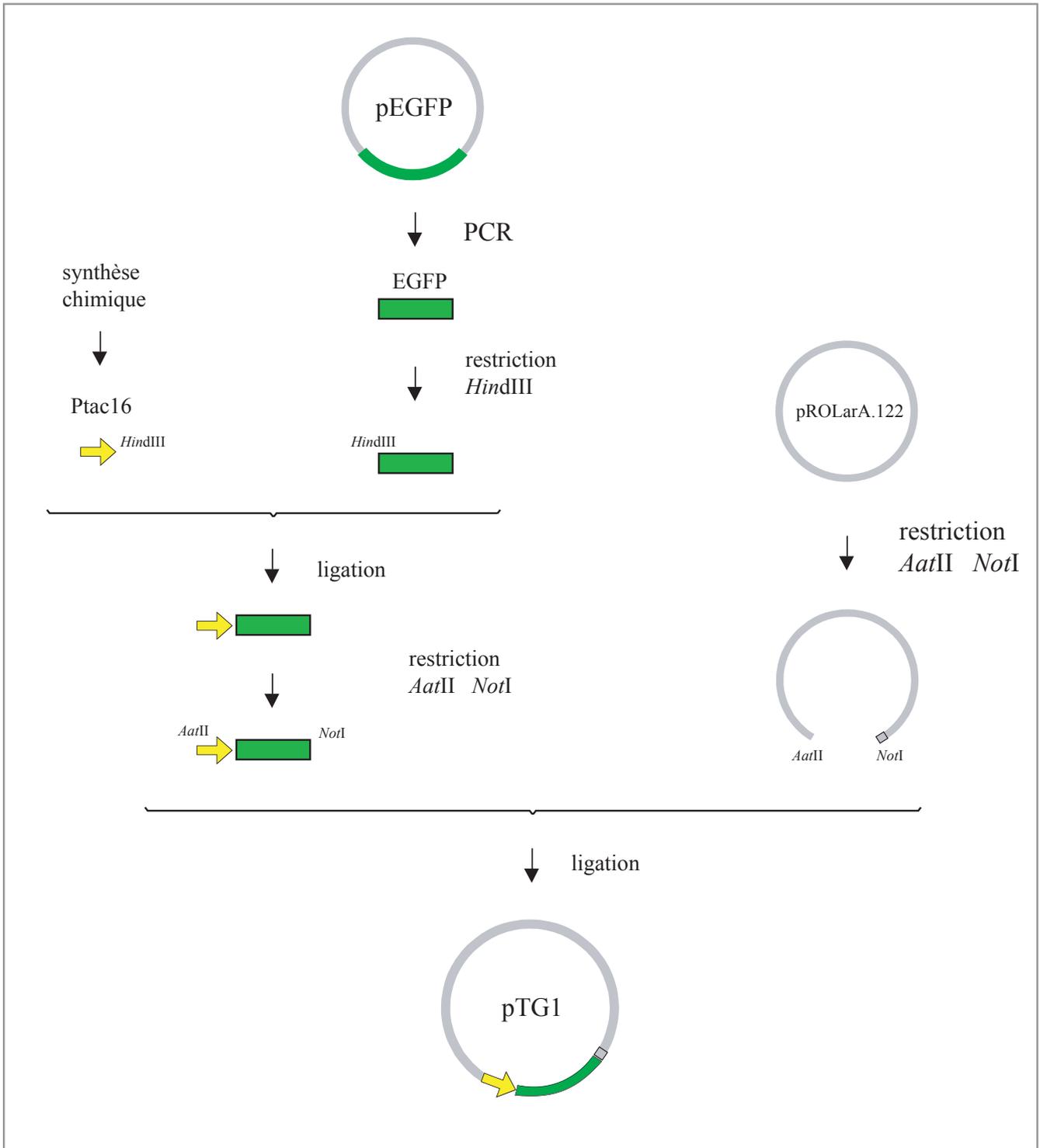


Figure IV.2.A. Le promoteur *tac* (*Ptac16*) a été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohesive correspondant à une coupure par l'endonuclease *HindIII*. La phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte (EGFP) a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pEGFP.

Après digestion par l'endonuclease *HindIII*, la phase de lecture ouverte a été liguée au promoteur.

Le plasmide pROLar.A122 et le fragment d'ADN portant la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente ont été digérés par les enzymes *AatII* et *NotI*, puis ligués entre eux pour former le plasmide pTG1.

Construction du plasmide pTG2

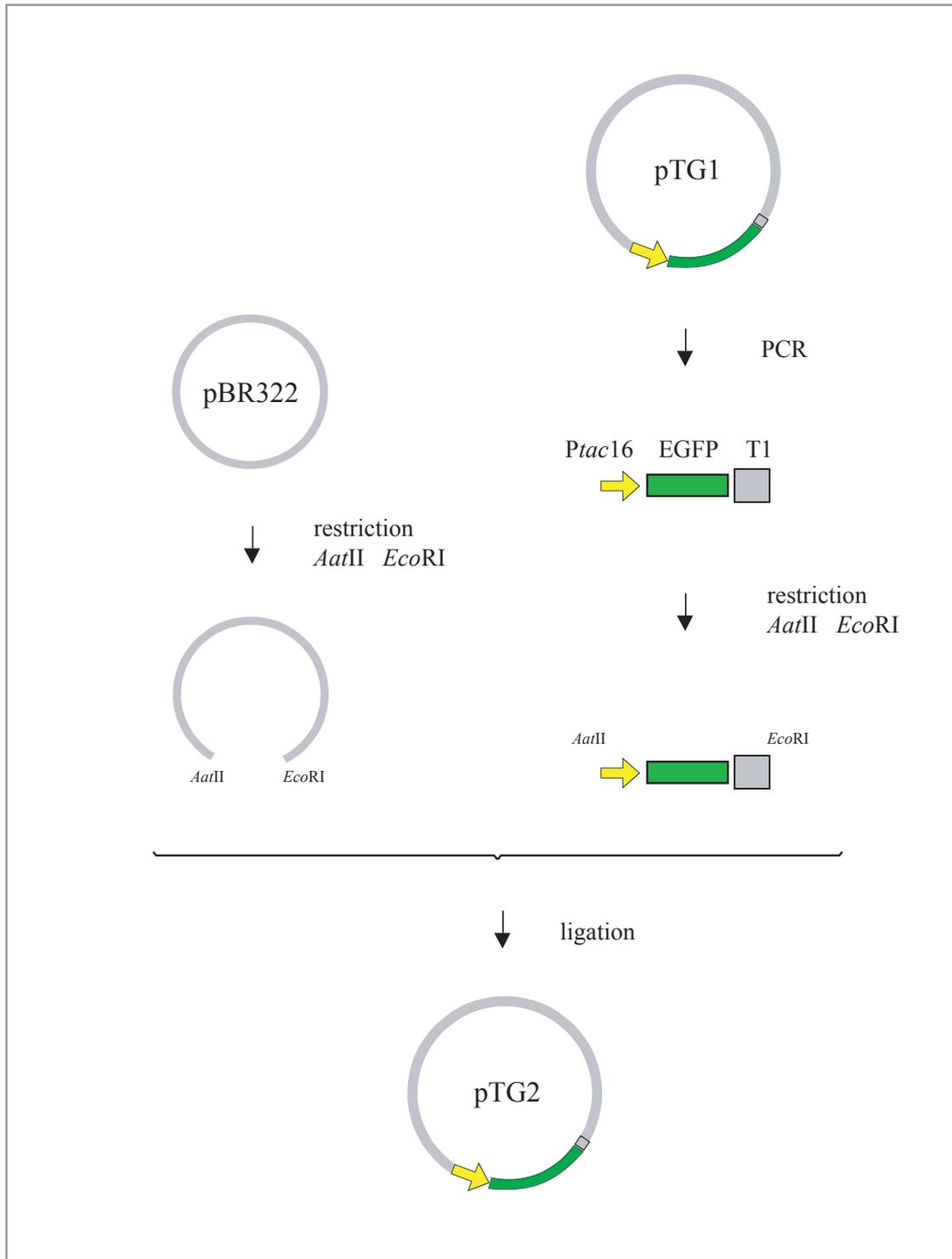


Figure IV.2.B. Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac*, la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte et la séquence de terminaison de transcription T1 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pTG1. Le fragment '*Ptac16*-EGFP-T1' et le plasmide pBR322 ont été digérés par les endonucléases *AatII* et *EcoRI*, puis ligués entre eux pour former le plasmide pTG2.

Construction du plasmide pTG3

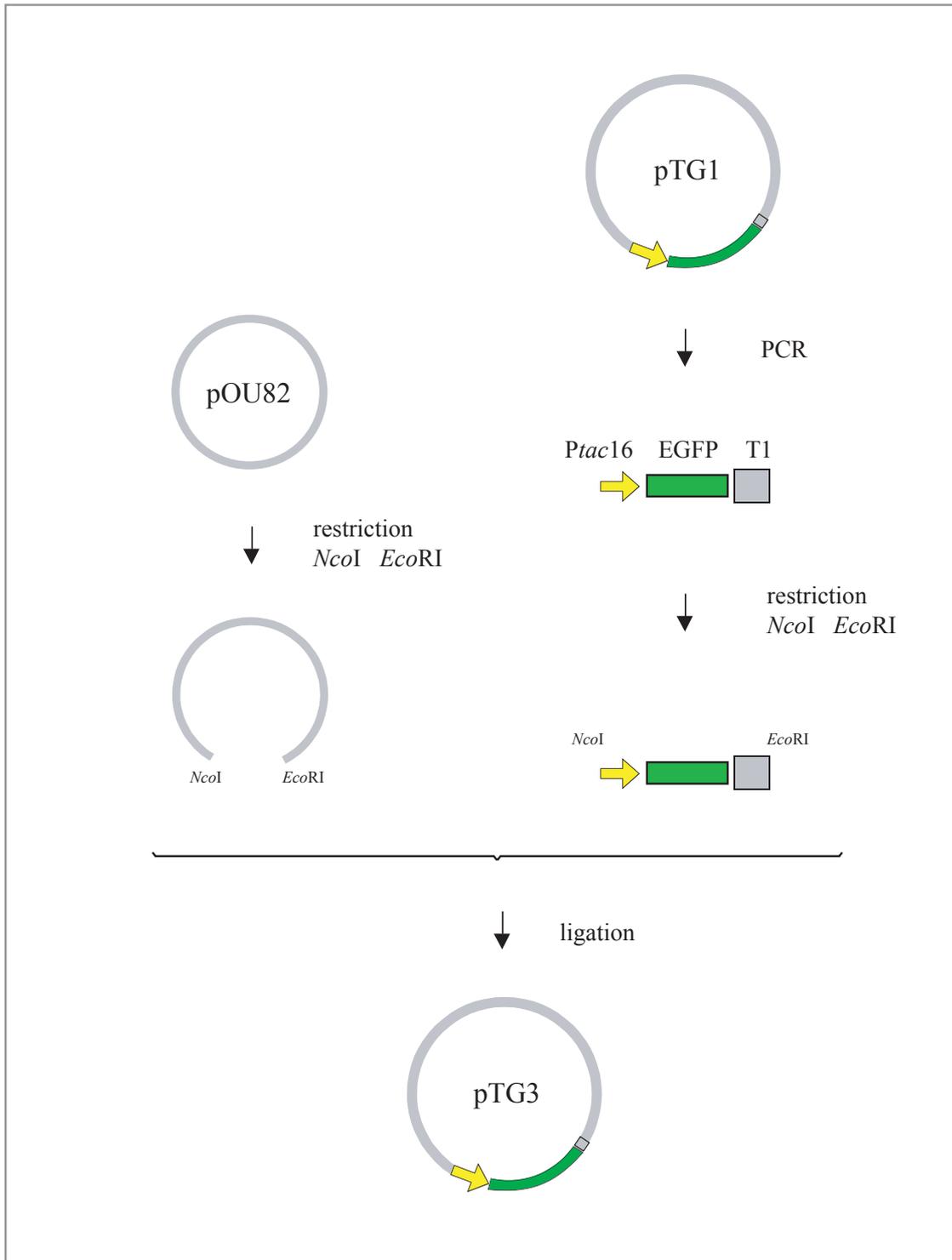


Figure IV.2.C. Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac*, la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte et la séquence de terminaison de transcription T1 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pTG1. Le fragment '*Ptac16-EGFP-T1*' et le plasmide pOU82 ont été digérés par les endonucléases *NcoI* et *EcoRI*, puis ligués entre eux pour former le plasmide pTG3.

Construction du plasmide pTG4

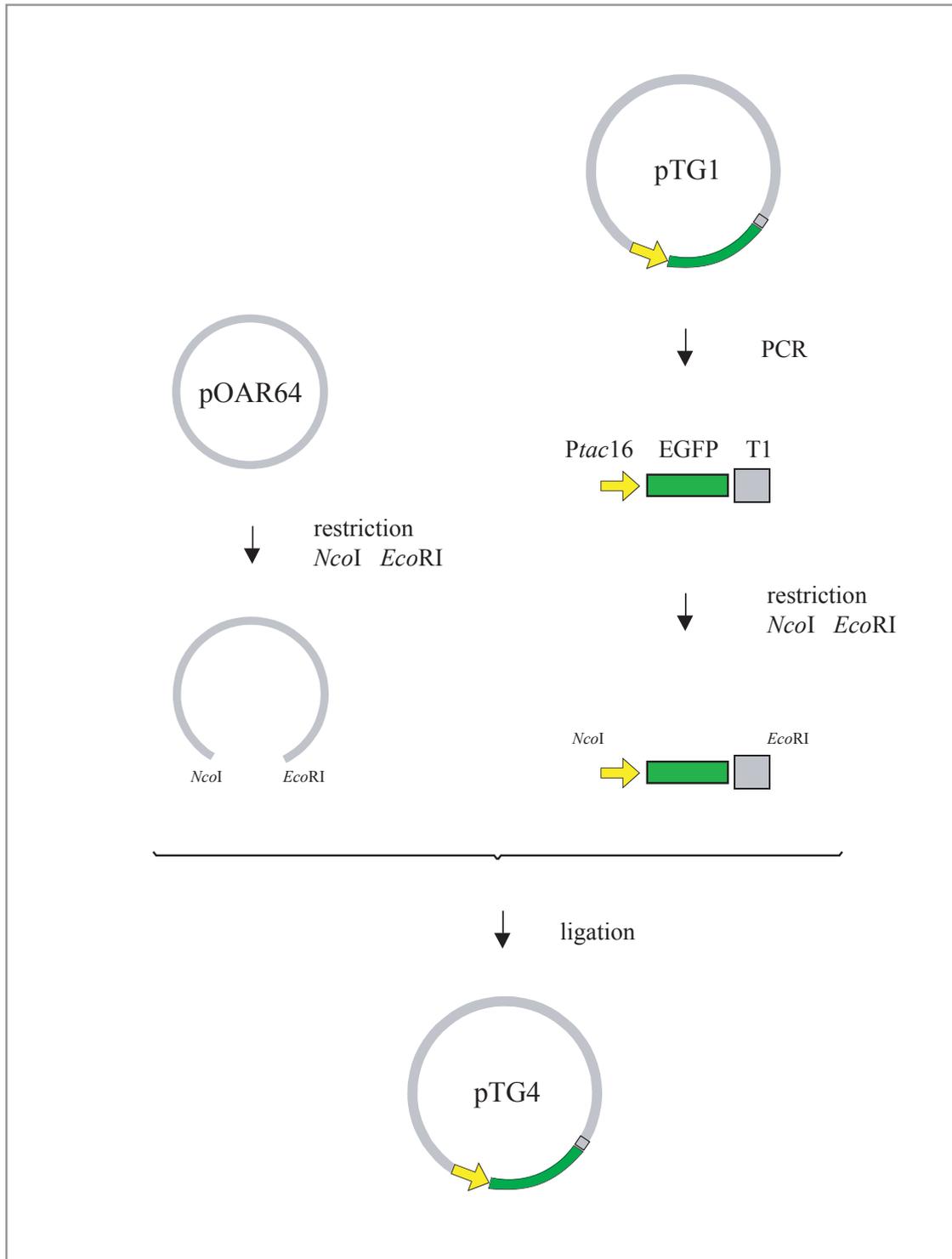


Figure IV.2.D. Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac*, la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte et la séquence de terminaison de transcription T1 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pTG1. Le fragment '*Ptac16*-EGFP-T1' et le plasmide pOAR64 ont été digérés par les endonucléases *NcoI* et *EcoRI*, puis ligués entre eux pour former le plasmide pTG4.

Construction du plasmide pTG5

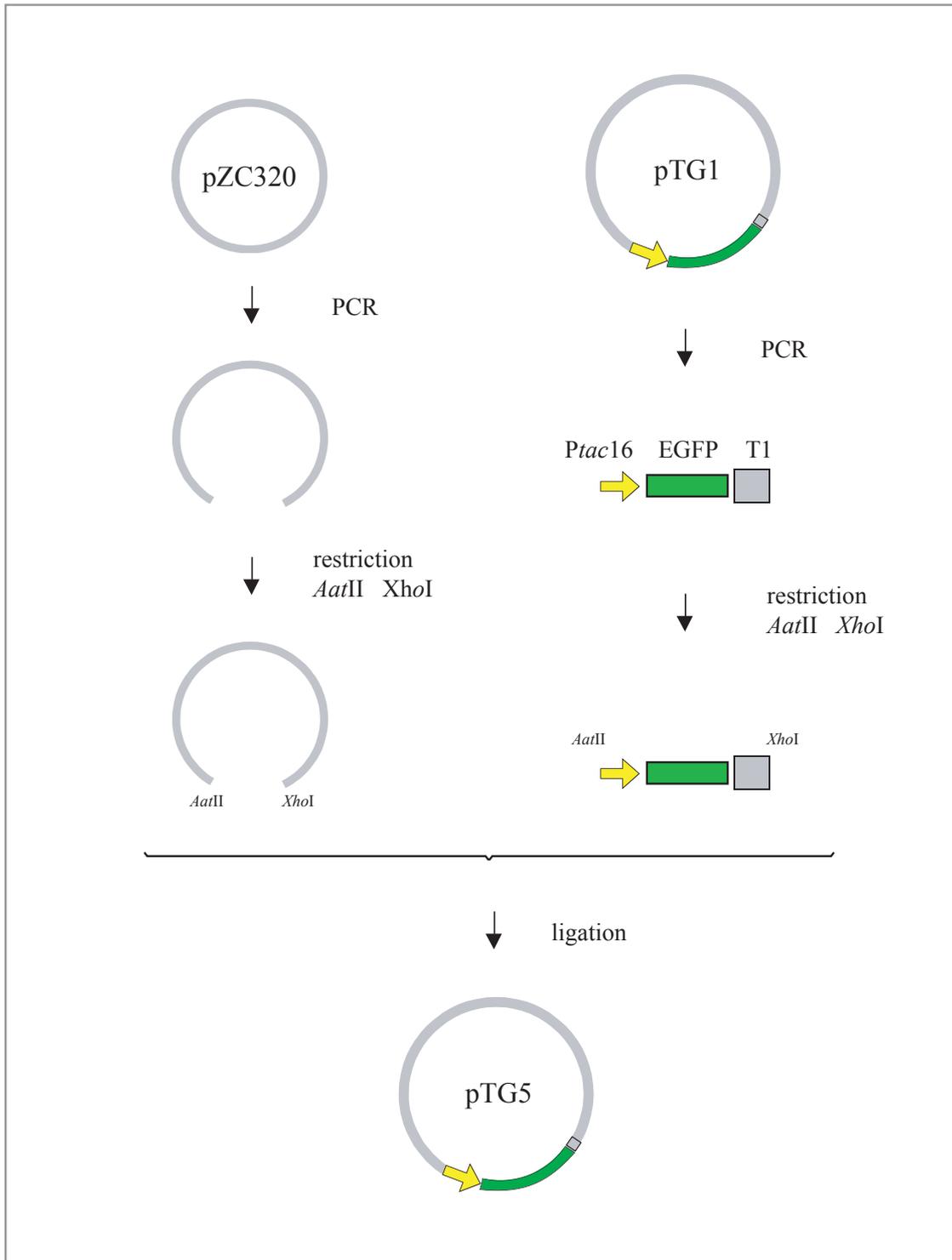


Figure IV.2.E. Le fragment d'ADN portant le promoteur *tac*, la phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte et la séquence de terminaison de transcription T1 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pTG1. Le plasmide pZC320 hormis la région du gène du *lacZ* a été amplifié par PCR avec extrémités pendantes de façon à obtenir un plasmide linéarisé qui présente un site de restriction *AatII* à une de ses extrémités et un site de restriction *XhoI* à son autre extrémité. Les deux fragments ont été digérés par les endonucléases *AatII* et *XhoI* puis ligués pour former le plasmide pTG5.

Première série de constructions

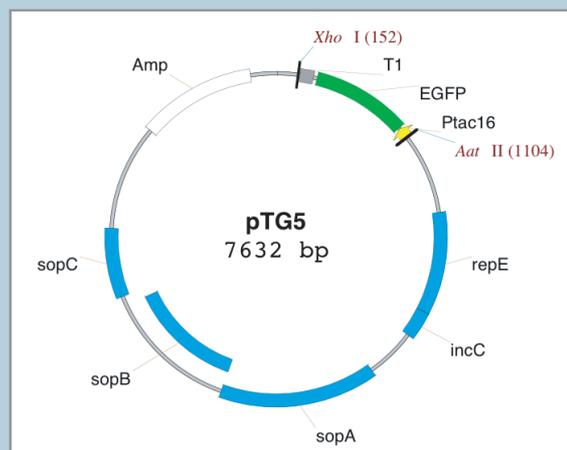
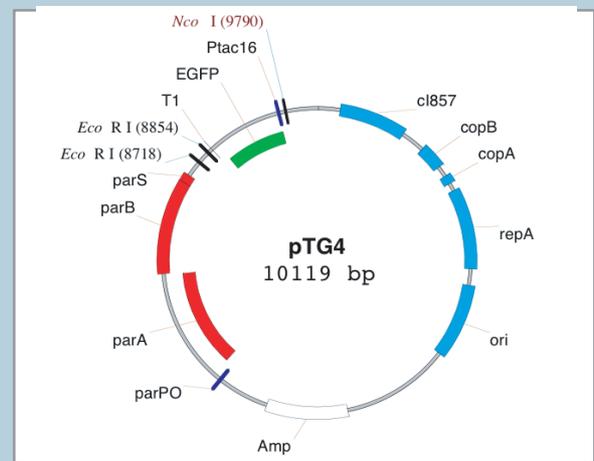
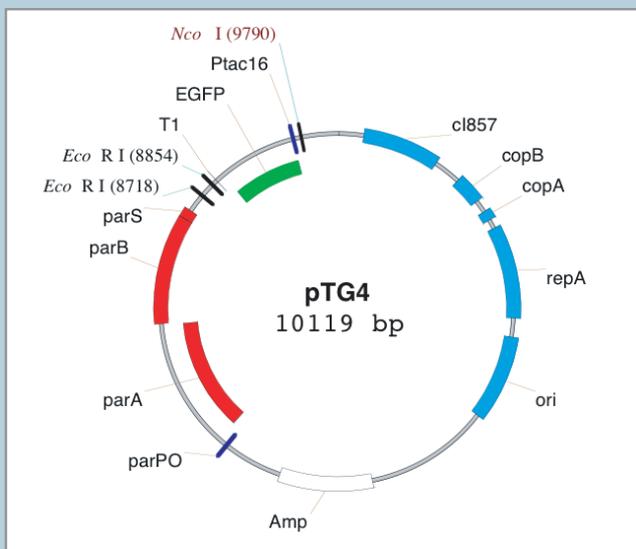
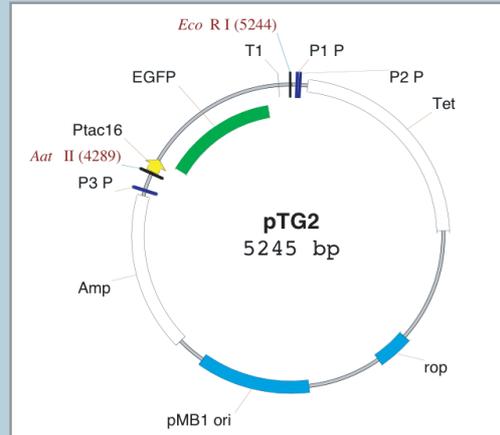
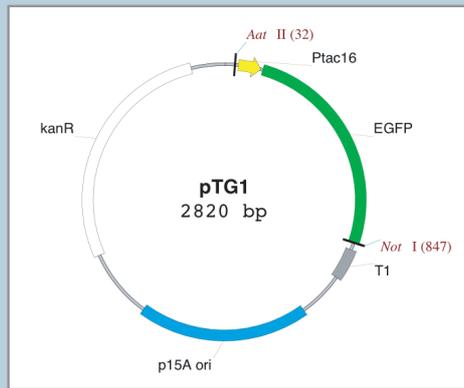


Figure IV.2.F. Cartes des plasmides de la première série de constructions

IV.2.3. Construction des souches RP2, RP3, RP4 et RP5

La souche DH5 α PRO a été transformée avec les plasmides pTG2, pTG3, pTG4 et pTG5 pour donner respectivement les souches **RP2**, **RP3**, **RP4** et **RP5**.
(figure IV.2.F.)

IV.3. Deuxième série de constructions

Nous avons d'abord construit les gènes des protéines fluorescentes verte et rouge. Puis nous les avons 'copié' par PCR pour construire les quatre plasmides : pTG322, pTG82, pTG64 et pTG320 et la souche CR12.

IV.3.1. Construction des gènes codant pour les protéines fluorescentes

Pour profiter d'un niveau d'expression encore plus élevé nous avons placé le gène codant pour la synthèse de la protéine fluorescente verte et le gène codant pour la synthèse de la protéine fluorescente rouge sous le contrôle d'un promoteur *tac* amélioré (dont les régions -10 et -35 sont espacées de 17 paires de bases).
(Mulligan & al., 1985)

Le **promoteur *tac*** (Ptac17) a été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique (oligos Ptac17-A et Ptac17-B). La molécule d'ADN double brin ainsi obtenue présente d'une part une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *BgIII*, et d'autre part, les sites de restriction des endonucléases *EcoRI* et *XhoI*.

La **séquence de terminaison de transcription tR2** (Gusarov & Nudler, 1999) a été reconstituée en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique (oligos TR2-A et TR2-B). La molécule d'ADN double brin ainsi obtenue présente d'une part une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *HindIII*, et d'autre part, les sites de restriction des endonucléases *AatII* et *NcoI*.

Les **phases de lecture ouverte des protéines fluorescentes vertes et rouges** ont été synthétisées par PCR avec extrémités pendantes respectivement à partir des plasmides pEGFP et pQE60-NA, (oligos (Bg-EGFP et EGFP-Hi) et (Bg-DsRed.T3_DNT et DsRed.T3_DNT-Hi)). Les molécules ainsi obtenues portent un site de restriction *BgIII* à une de leurs extrémités (celle de codon initiateur) et un site de restriction *HindIII* à l'autre (celle du codon stop).

Le plasmide **pEGFP** a été acheté chez Clontech.

Le plasmide **pQE60-NA** qui porte le gène de la DsRed.T3-DNT nous a été donnée par Benjamin Glick et Daniel Strongin (Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, USA).

Les molécules portant les phases de lecture ouverte ont été digérées par les enzymes de restriction *BgIII* et *HindIII*, puis liguées à celles portant le promoteur et la séquence de terminaison de transcription pour former deux gènes 'identiques' mais codant l'un pour la protéine fluorescente rouge, l'autre pour la protéine fluorescente verte. (Après la ligation, les fragments d'ADN correspondants ont été purifiés sur gel d'agarose.)

IV.3.2. Construction des plasmides pTG322, pTG82, pTG64 et pTG320

(Figures IV.3.A., IV.3.B., IV.3.C., IV.3.D. et IV.3.E.)

Le plasmide pBR322 et le fragment d'ADN portant le gène codant la protéine fluorescente verte ont été digérés avec les enzymes *AatII* et *EcoRI* puis quantifiés sur gel d'agarose, et enfin ligués pour former le plasmide **pTG322**.

Les plasmides pOU82 et pOAR64 et le fragment d'ADN portant le gène codant la protéine fluorescente verte ont été digérés avec les enzymes *EcoRI* et *NcoI* puis quantifiés sur gel d'agarose.

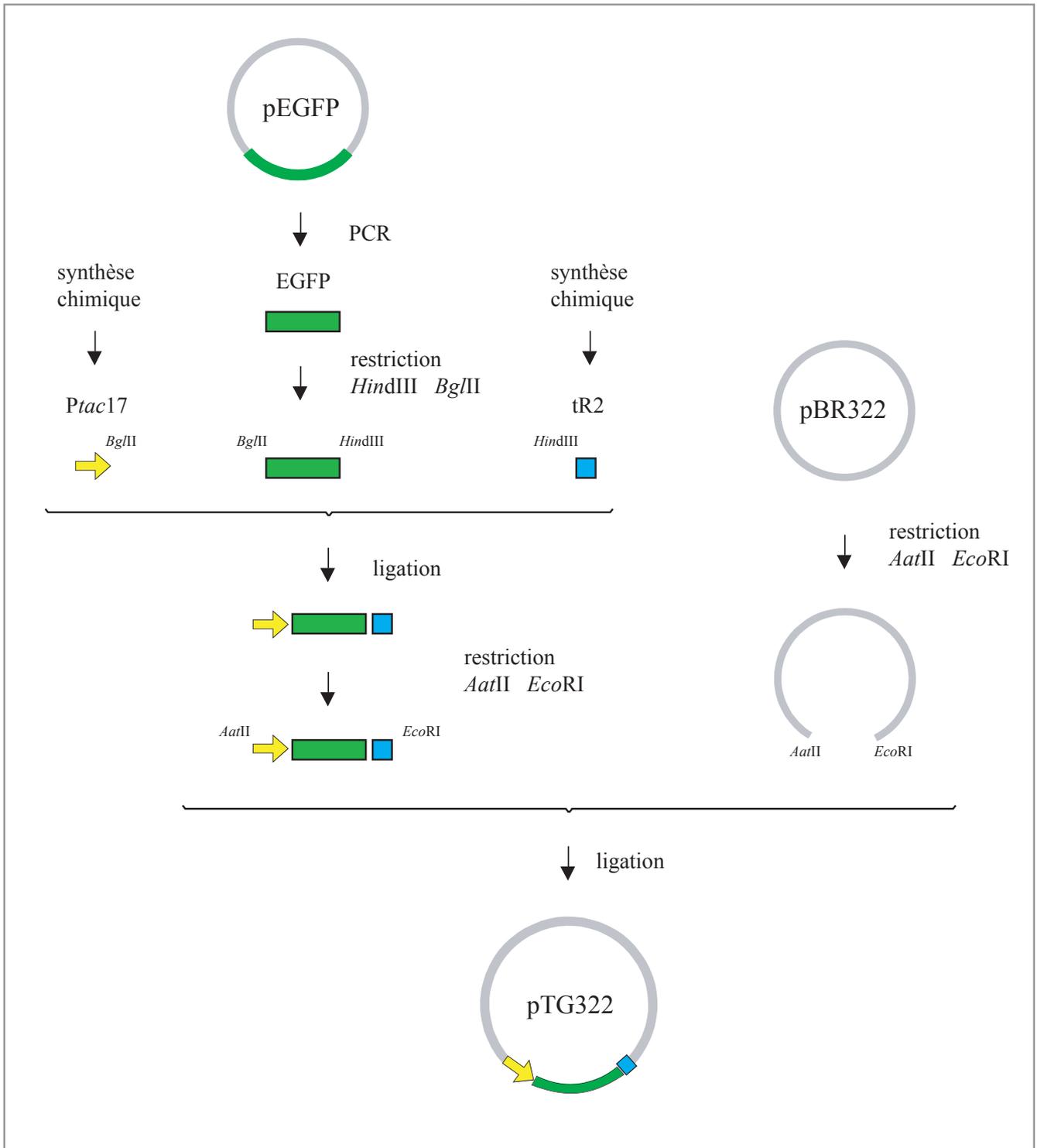
Le gène de la protéine fluorescente verte a alors été ligué d'une part avec le fragment de pOU82 pour former le plasmide **pTG82**, et d'autre part avec le fragment de pOAR64 pour former le plasmide **pTG64**.

Le plasmide pZC320 hormis la région du gène du *lacZ* a été amplifié par PCR avec extrémités pendantes de façon à obtenir un plasmide linéarisé qui présente un site de restriction *AatII* à une de ses extrémités et un site de restriction *XhoI* à son autre extrémité (oligos F-Aa et F-Xh).

Ce plasmide linéarisé et le fragment d'ADN portant le gène codant pour la protéine fluorescente verte ont été digérés avec les enzymes *AatII* et *XhoI* puis quantifiés sur gel d'agarose et enfin ligués pour former le plasmide **pTG320**.

Le succès des insertions a été vérifié par séquençage.

Construction du plasmide pTG322

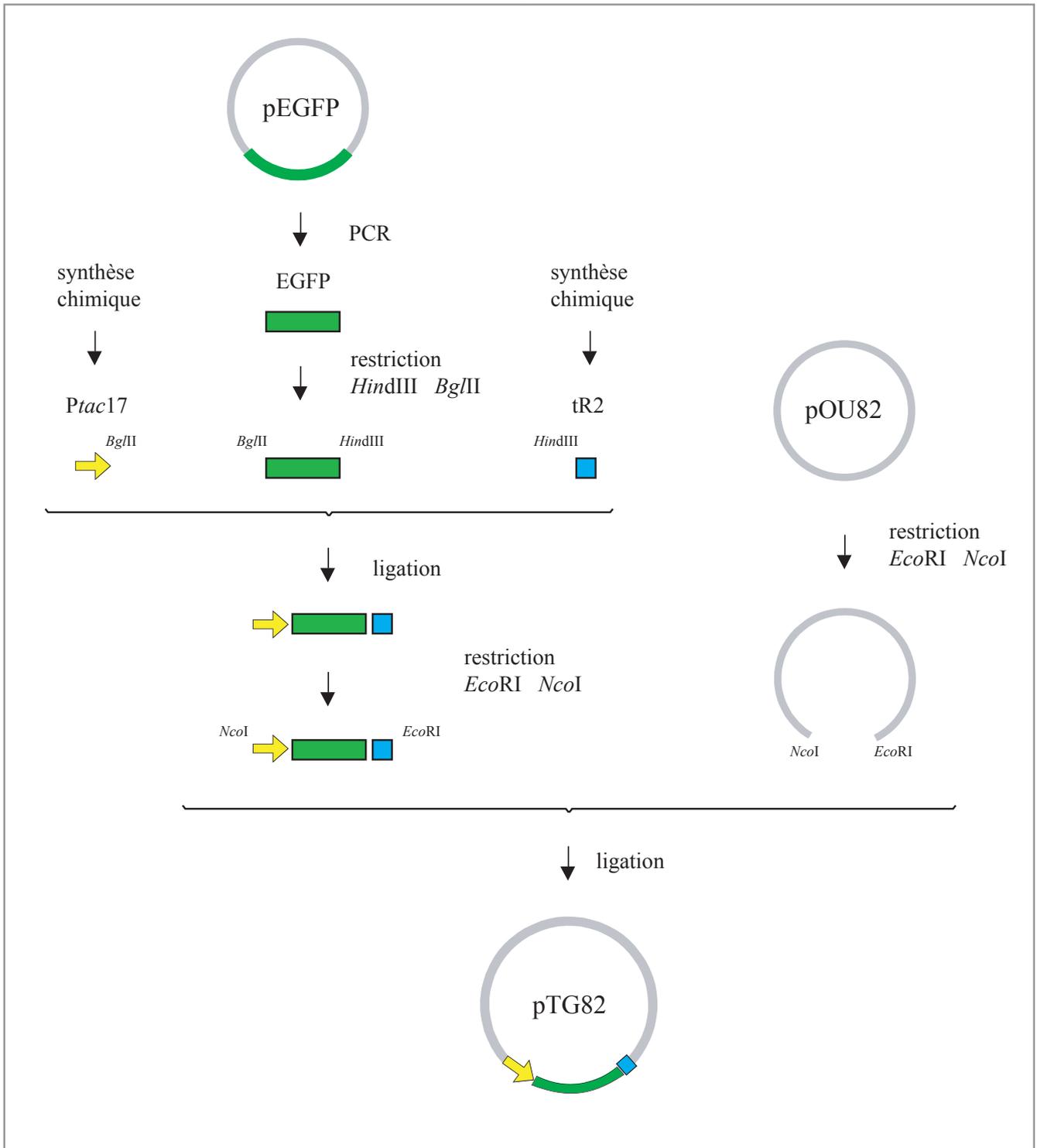


Figures IV.3.A. Le promoteur *tac* (*Ptac17*) à été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *BglII*. La séquence de terminaison de transcription tR2 a été reconstituée en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *HindIII*. La phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pEGFP. Les molécules ainsi obtenue portent un site de restriction *BglII* à une de leurs extrémités (celle du codon initiateur) et un site de restriction *HindIII* à l'autre (celle du codon stop).

La molécule portant la phase de lecture ouverte a été digérée par les enzymes de restriction *HindIII* et *BglII*, puis liguée à celles portant le promoteur et la séquence de terminaison de transcription pour former le gène codant la protéine fluorescente verte.

Le plasmide pBR322 et le fragment d'ADN portant le gène codant la protéine fluorescente verte ont été digérés par les enzymes *AatII* et *EcoRI* puis ligués pour former le plasmide pTG322.

Construction du plasmide pTG82

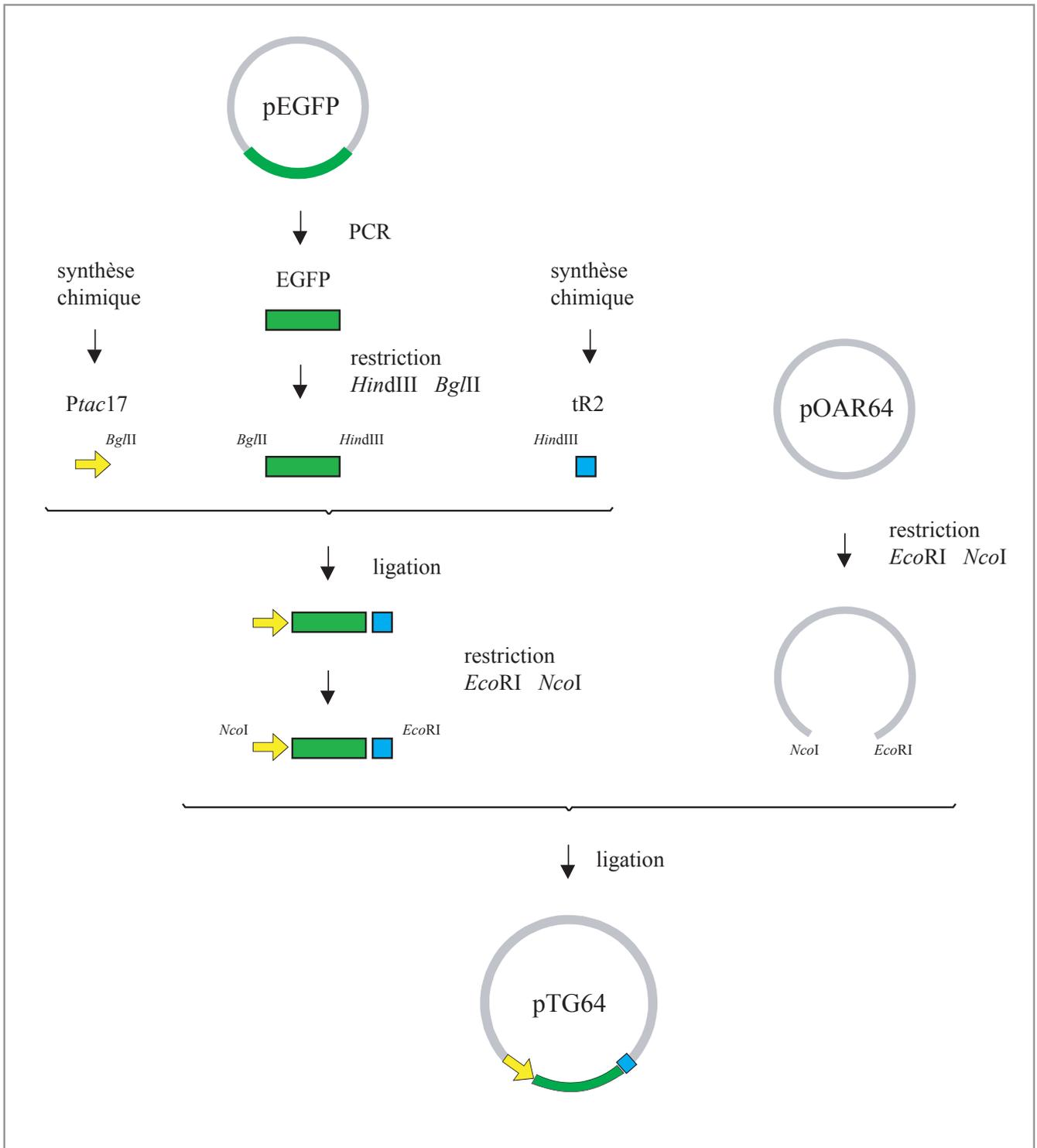


Figures IV.3.B. Le promoteur *tac* (*Ptac17*) à été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *BglII*. La séquence de terminaison de transcription *tR2* a été reconstituée en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *HindIII*. La phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pEGFP. Les molécules ainsi obtenue portent un site de restriction *BglII* à une de leurs extrémités (celle du codon initiateur) et un site de restriction *HindIII* à l'autre (celle du codon stop).

La molécule portant la phase de lecture ouverte a été digérée par les enzymes de restriction *HindIII* et *BglII*, puis liguée à celles portant le promoteur et la séquence de terminaison de transcription pour former le gène codant la protéine fluorescente verte.

Le plasmide pOU82 et le fragment d'ADN portant le gène codant la protéine fluorescente verte ont été digérés par les enzymes *EcoRI* et *NcoI* puis ligués pour former le plasmide pTG82.

Construction du plasmide pTG64

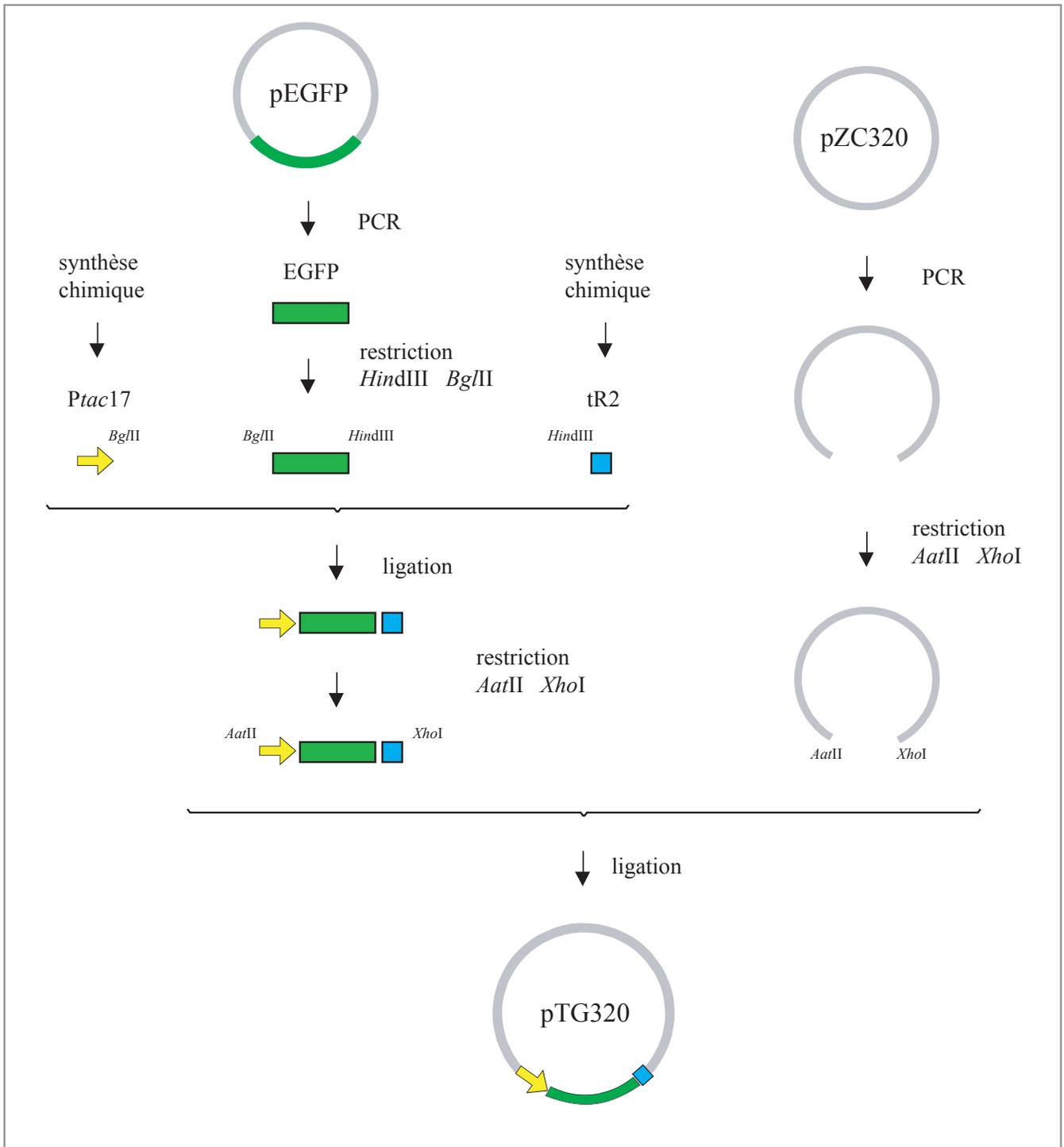


Figures IV.3.C. Le promoteur *tac* (*Ptac17*) à été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *Bgl*III. La séquence de terminaison de transcription tR2 a été reconstituée en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *Hind*III. La phases de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pEGFP. Les molécules ainsi obtenue portent un site de restriction *Bgl*III à une de leurs extrémités (celle du codon initiateur) et un site de restriction *Hind*III à l'autre (celle du codon stop).

La molécule portant la phase de lecture ouverte a été digérée par les enzymes de restriction *Hind*III et *Bgl*III, puis liguée à celles portant le promoteur et la séquence de terminaison de transcription pour former le gène codant la protéine fluorescente verte.

Le plasmide pOAR64 et le fragment d'ADN portant le gène codant la protéine fluorescente verte ont été digérés par les enzymes *Eco*RI et *Nco*I puis ligués pour former le plasmide pTG64.

Construction du plasmide pTG320



Figures IV.3.D. Le promoteur *tac* (*Ptac17*) à été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *Bgl*III. La séquence de terminaison de transcription tR2 a été reconstituée en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *Hind*III. La phases de lecture ouverte de la protéine fluorescente verte a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pEGFP. Les molécules ainsi obtenue portent un site de restriction *Bgl*III à une de leurs extrémités (celle du codon initiateur) et un site de restriction *Hind*III à l'autre (celle du codon stop).

La molécule portant la phase de lecture ouverte a été digérée par les enzymes de restriction *Hind*III et *Bgl*III, puis liguée à celles portant le promoteur et la séquence de terminaison de transcription pour former le gène codant la protéine fluorescente verte.

Le plasmide pZC320 hormis la région du gène *lacZ* a été amplifié par PCR avec extrémités pendantes de façon a obtenir un plasmide linéarisé qui présente un site de restriction *Aat*II à une de ses extrémités et un site de restriction *Xho*I à son autre extrémité.

Ce plasmide linéarisé et le fragment d'ADN portant le gène codant pour la protéine fluorescente verte ont été digérés par les enzymes *Aat*II et *Xho*I puis ligués pour former le plasmide pTG320.

Deuxième série de constructions

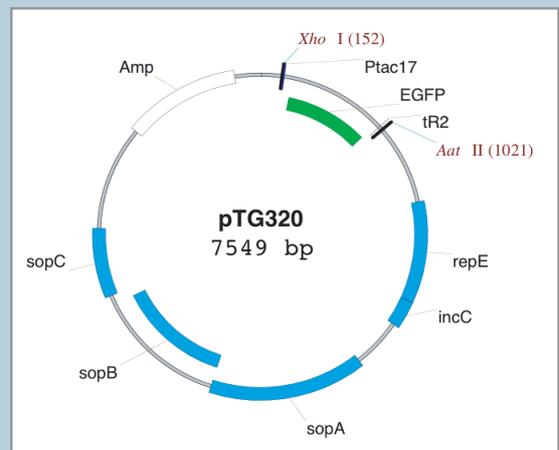
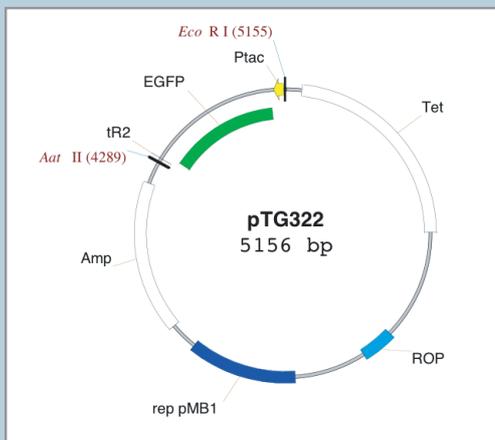
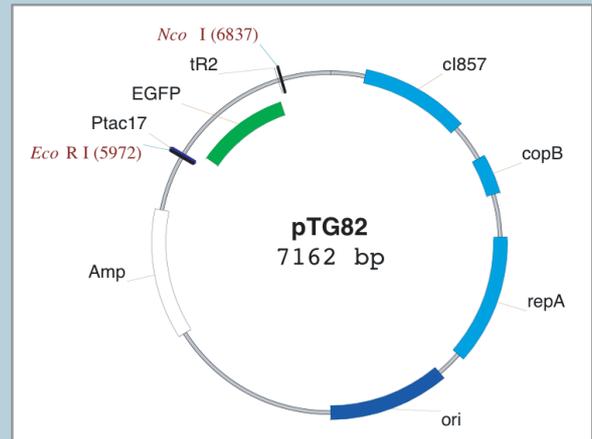
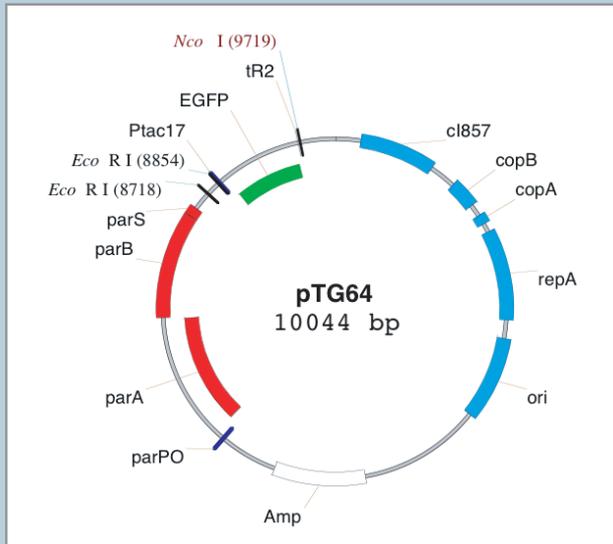


Figure IV.3.E. Cartes des plasmides de la deuxième série de constructions

IV.3.3. Construction des souches CR1, CR12 et CR19

(Figures IV.3.F. et IV.3.G.)

Pour bénéficier d'un niveau d'expression basal faible, nous avons construit la souche **CR1** en introduisant dans la souche Top10 la mutation *lacI^{Q1}*. (Une mutation qui conduit à niveau d'expression cent fois plus important du répresseur de l'opéron lactose.) (Carlos & Miller, 1981)

Pour cela nous avons utilisé la technique de recombinaison homologue décrite précédemment.

Le fragment d'ADN portant la mutation *lacI^{Q1}* du chromosome d'*Escherichia coli* a été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique (oligos IQ1mut-A et IQ1mut-B).

La cassette de sélection/contre-sélection a été amplifiée par PCR avec extrémités pendantes de sorte que la molécule obtenue présente de part et d'autre des séquences de soixante bases correspondant à des régions situées au niveau du promoteur du gène *lacI* sur le chromosome d'*E.coli* (oligos IQK7-1 et IQK7-2).

La cassette a été insérée dans le chromosome de la souche Top10, puis remplacée par le fragment d'ADN portant la mutation *lacI^{Q1}*.

Le succès de l'insertion a été vérifié par séquençage.

Pour que le gène codant la protéine fluorescente rouge ne soit présent dans la bactérie qu'à un seul exemplaire, nous l'avons introduit dans la dernière partie du chromosome à être répliquée avant la division cellulaire (entre les gènes *yciM* et *pyrF*).

La cassette de sélection/contre-sélection et le gène codant pour la protéine fluorescente rouge ont été amplifiés par PCR avec extrémités pendantes de sorte que les molécules obtenues présentent de part et d'autre des séquences de soixante bases consécutives sur le chromosome d'*Escherichia coli* (oligos (pyrK7-1 et pyrK7-2) et (H2-Ptac17 et H1-tR2)).

La cassette a été insérée dans le chromosome de la souche CR1, puis remplacée par le fragment portant le gène codant pour la protéine fluorescente rouge pour donner la souche **CR12**.

Le succès de l'insertion a été vérifié par séquençage.

La souche CR1 a été transformée avec le plasmide pTG320 pour donner la souche **CR19**.

Construction de la souche CR1

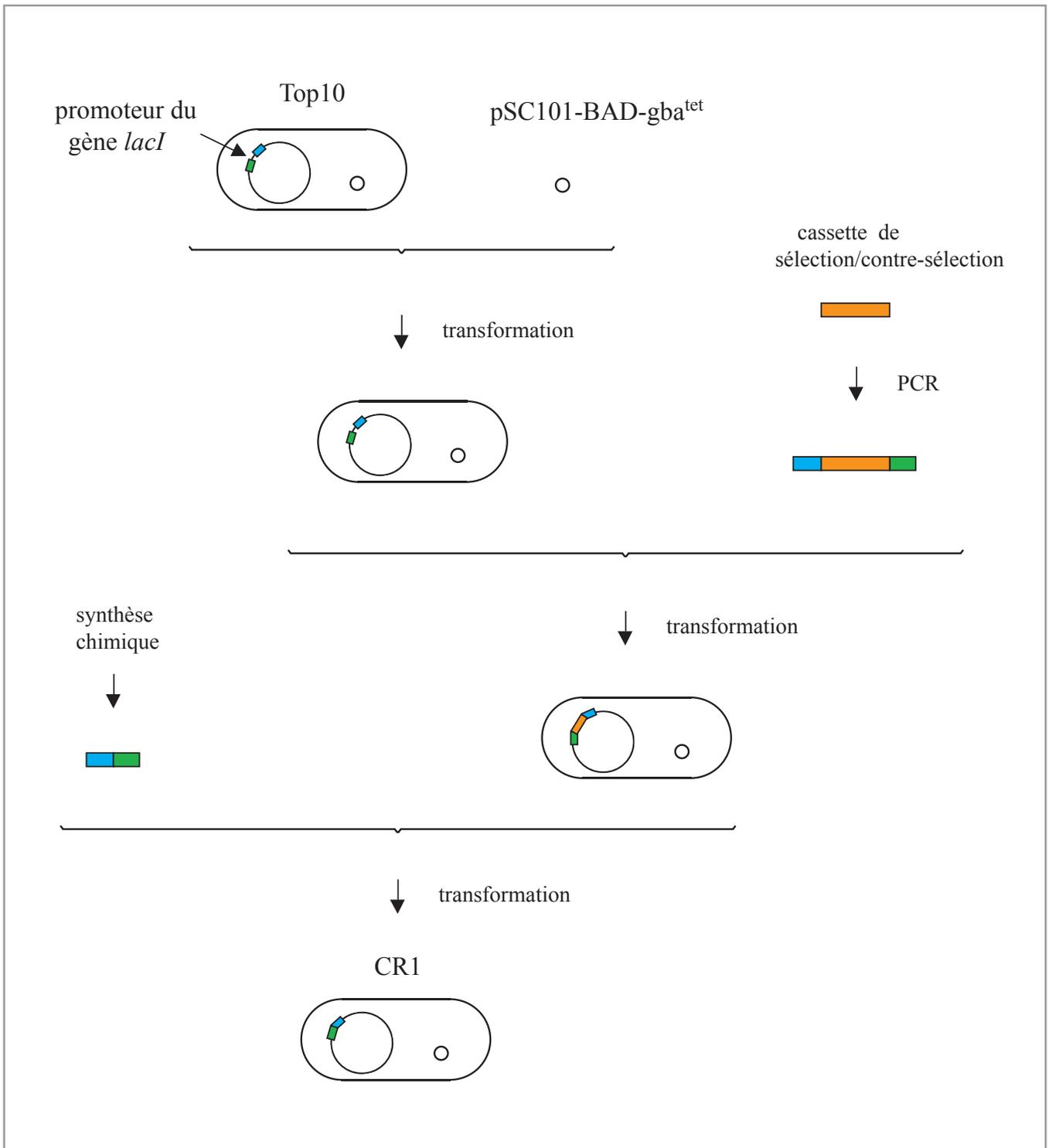


Figure IV.3.F. La souche Top10 a été transformée avec un plasmide qui porte les gènes de recombinaison du phage lambda. Le fragment d'ADN portant la mutation *lacI* du chromosome a été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La cassette de sélection/contre-sélection a été amplifiée par PCR avec extrémités pendantes de sorte que la molécule obtenue présente de part et d'autre des séquences de soixante bases correspondant à des régions situées au niveau du promoteur du gène *lacI* sur le chromosome d'*Escherichia coli*. La cassette a été insérée dans le chromosome de la souche Top10, puis remplacée par le fragment d'ADN portant la mutation *lacI*^{Q1}.

Construction de la souche CR12

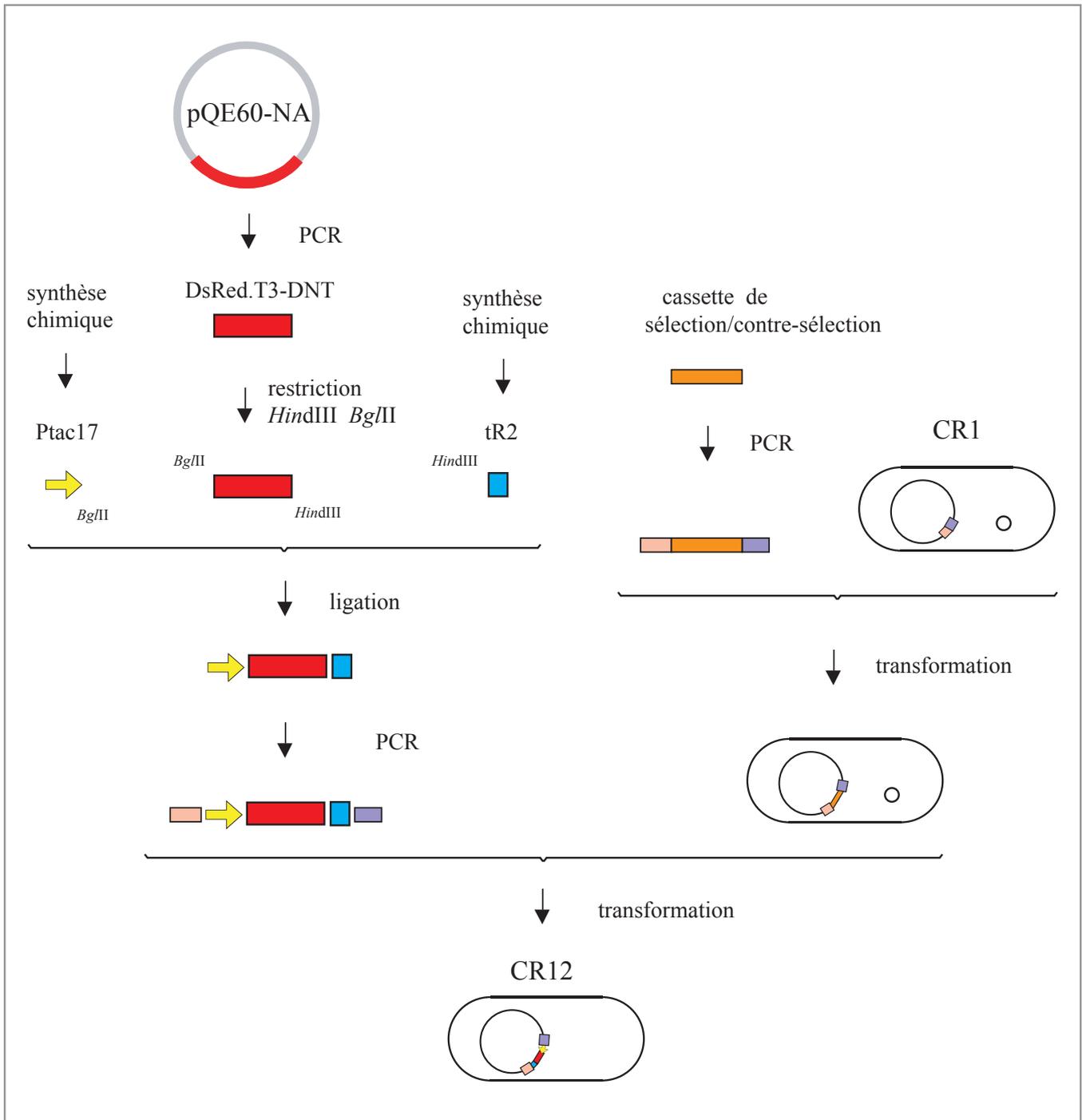


Figure IV.3.F. Le promoteur *tac* (Ptac17) a été reconstitué en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *Bgl*II. La séquence de terminaison de transcription tR2 a été reconstituée en appariant deux molécules d'ADN simple brin obtenues par synthèse chimique. La molécule d'ADN double brin obtenue présente une extrémité cohésive correspondant à une coupure par l'endonucléase *Hind*III. La phase de lecture ouverte de la protéine fluorescente rouge a été synthétisée par PCR avec extrémités pendantes à partir du plasmide pQE60-NA. Les molécules ainsi obtenues portent un site de restriction *Bgl*II à une de leurs extrémités (celle de codon initiateur) et un site de restriction *Hind*III à l'autre (celle du codon stop). La molécule portant la phase de lecture ouverte a été digérée par les enzymes de restriction *Hind*III et *Bgl*II, puis liguée à celles portant le promoteur et la séquence de terminaison de transcription pour former le gène codant la protéine fluorescente rouge. La cassette de sélection-contre-sélection et le gène codant la protéine fluorescente rouge ont été amplifiés par PCR avec extrémités pendantes de sorte que les molécules obtenues présentent de part et d'autre des séquences de soixante bases consécutives sur le chromosome d'*Escherichia coli*. La cassette a été insérée dans le chromosome de la souche CR1, puis remplacée par le fragment portant le gène codant pour la protéine fluorescente rouge pour donner la souche CR12.

IV.4. Séquences des oligonucléotides

(les séquences des oligonucléotides sont données dans le sens 5'-3'.)

Ptac16-A :

gagctggtgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaattt
cacactaaggagga

Ptac16-B :

agcttcctccttagtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattatacgagccgatg
attaattgtcaacagctc

EGFP-Hi :

gaaaagcttcatggtgagcaagggcgaggagctgttcacc

EGFP-No :

tccgcgccgcttacttgtacagctcgtccatgccgagagt

tac16-AaNcEc5 :

attgacgtccatggatatcgagctggtgacaattaatcatcggctcgtg

tac16-AaNc :

attgacgtccatggagctggtgacaattaatcatcggctcgtg

T1-BaXhEc5 :

tatgatatctcgaggatcctctagggcggcggatttgtcctactcagga

T1-EcAv :

attcctaggaattctagggcggcggatttgtcctactcagga

Ptac17-A :

acctgtgaattctcgagctggtgacaattaatcatcaagctagtataatgtgtggaattgtg
agcggataacaatttcacacaggaggtaa

Ptac17-B :

gatcttacctcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattatactagcttgat
gattaattgtcaacagctcgagaattcacaggt

tR2-A :

agcttgaacaggcctgctggtaatcgcaggcctttttatthttggtaccatggacgtcactggt

tR2-B :

accagtgacgtccatggtaccaataaaaaggcctgcgattaccagcaggcctggtca

Bg-EGFP :

acctgtagatctatgggtgagcaagggcgaggagctgttcacc

EGFP-Hi :

aggactaagcttaattaattacttgtacagctcgtccatgccgagagt

Bg-DsRed.T3_DNT :

acctgtagatctatggacaacaccgaggacgtcatcaaggag

DsRed.T3_DNT-Hi :

aggactaagcttaattaattactacaggaacaggtggtggcgccctcggt

F-Aa :

ataataaagacgtcacgatcatcgtgcgaggaggc

F-Xh :

tattatthctcgagcccagtggtgacataagcctgttcggtt

IQ1mut-A :

caccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataaccgcgaaaggtggtgtcaacgt

aatgcatgccgcttcgccttccggccaccagaatagc

IQ1mut-B :

gctattctggtggccggaaggcgaagcggcatgcatttacggtgacaccacctttcgcggtta

tggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcaggggtg

IQK7-1 :

tgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataaccgcgaaaggttttgcgccctggtgat

gatggcgggatcg

IQK7-2 :

tgggtggccggaaggcgaagcggcatgcatttacggtgacaccatcgaatggtcagaagaact

cgtcaagaaggcg

pyrK7-1 :

actaattattaatgttccattgtgctccggcaacgacggcgcagaaaaagcctgccaggggg
cctggtgatgatggcgggatcg

pyrK7-2 :

aacaggtaaacggcgcgagcattctacccgtggaaataaaaaattaacagttgcgatttctctc
agaagaactcgtcaagaaggcg

H2-Ptac17 :

ggtaaacggcgcgagcattctacccgtggaaataaaaaattaacagttgcgatttctcctcgag
ctggtgacaattaatcatcaagctagtataatgtgtgg

H1-tR2 :

actaattattaatgttccattgtgctccggcaacgacggcgcagaaaaagcctgccagggac
cagtgacgtccatggtaccaaataaaaaggcctgcgat

sq322-1 :

gcttatcgatgataagctgtcaaac

sq322-2 :

cgcgcacatttccccgaaaagtgcc

sq82&64 :

cccggcgtcgaccgctctgccggtg

sq82 :

gccctcattcgtgcgctctaggatc

sq64 :

acgcgaataaccagaatcgtattgca

sq320-1 :

gcgcgtaatacgcactcactatagggcggcc

sq320-2 :

gacggccagtgagcgcgcccggatccacgtg

sqlQ1-1 :

cggcgctacaacgggtagcaaacagatcg

sqlQ1-2 :

tgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagc

sq-near_pyrf-1 :

ccattaaaccgattcgcggtcttgatggcc

sq-near_pyrf-2 :

tgaccagaccttcttgatgatgggcaccgg

Chapitre V

Résultats

Résultats

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre expérience nous avons préparé de la même manière des populations monoclonales issues des trois souches bactériennes RP3, RP4 et RP5. Le protocole de préparation est décrit dans le paragraphe V.1.

Les conclusions que nous tirons des mesures sont présentées dans le paragraphe V.2.

V.1. Préparation des bactéries

À partir du stock de cellules conservées à -70°C , des clones ont été isolés sur des boîtes de Petri contenant $50\mu\text{g/ml}$ de spectinomycine et $50\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. Une fois les colonies formées les boîtes ont été placées à 4°C .

400ml de LB contenant $50\mu\text{g/ml}$ de spectinomycine et $50\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline ont été préparés pour servir de milieu de culture.

Pour chaque expérience, un tube de 50ml contenant 30ml de milieu de culture a étéensemencé avec des cellules issues d'une colonie isolée. Deux tubes supplémentaires ont également été préparés de sorte que les trois tubes correspondent à des dilutions successives d'un facteur dix.

Les trois tubes de culture plus un quatrième tube qui ne contenait que du milieu de culture ont été placés dans un incubateur-agitateur et maintenus à une température donnée jusqu'à ce que l'une des cultures atteigne une densité optique de 0,1 (à 600nm).

300 μl de cette culture ont alors été ajoutés dans le quatrième tube (soit une dilution d'un facteur cent) et cette nouvelle culture a été incubée jusqu'à une densité optique de 0,2.

30 μl d'IPTG ont alors été ajoutés (de façon à obtenir une concentration de 1mM), et la culture a été incubée durant 20min supplémentaires.

200µl de chloramphenicol ont alors été ajoutés (de façon à obtenir une concentration de 170µg/ml). Immédiatement, les bactéries ont été rincées et resuspendues dans du PBS contenant 170µg/ml de chloramphenicol.

Les cellules ont alors été filtrées à l'aide d'un filtre de 5µm, et leur concentration a été ajustée à une densité optique de 1. (En pratique, elle est ajustée de sorte qu'après une dilution d'un facteur dix, la densité optique soit de 0,1.)

Les bactéries ont été transférées dans un tube de 1,5ml et laissées toute la nuit sur une roue tournante à température ambiante.

La BSA a été ajoutée juste avant d'effectuer les mesures, de façon à avoir une concentration de 1mg/ml.

V.2. Résultats des mesures

Grâce aux mesures faites sur ces bactéries nous sommes parvenus à une première série de conclusions :

La souche DH5αPRO est particulièrement difficile à manipuler. Pour obtenir un culot bactérien il faut monter à des vitesses de centrifugation élevées (10000g pendant 10min), et surtout une fois les bactéries sédimentées il est impossible de les resuspendre complètement. C'est la raison pour laquelle nous sommes obligés de filtrer les bactéries pour éviter qu'un amas de cellules ne vienne boucher le canal.

Au contraire, la souche Top10 est facile à manipuler. On peut facilement la faire sédimenter (2000g pendant 1min) et facilement la resuspendre.

Notre dispositif de tri cellulaire nous a permis de mesurer la fluorescence de plusieurs milliers de bactéries à une cadence de plusieurs cellules par seconde. Cette limite vient de ce que des turbulences apparaissent à l'entrée du canal lorsque la vitesse est trop élevée.

Le signal que nous mesurons lorsque la bactérie passe devant l'objectif du microscope est largement au dessus du bruit et le programme de traitement de données discrimine parfaitement le signal correspondant au passage d'une bactérie.

Par ailleurs, du fait du contrôle des conditions de culture et du temps durant lequel les gènes sont exprimés, nos expériences devraient être reproductibles. Et en effet, les histogrammes de fluorescence correspondants à des bactéries de la même souche préparées de la même manière se superposent.

Nous pouvons donc conclure que notre montage expérimental est au point, et que le gène de la EGFP placé sous le contrôle du promoteur *tac* nous donne un signal suffisant même dans le cas d'un plasmide à faible nombre de copies.

Le fait que les distributions de fluorescence se superposent montre que les mutations sont bien suffisamment rares pour qu'on puisse considérer que les bactéries sont toutes identiques.

Nous avons mesuré les distributions d'intensité de fluorescence correspondant à trois plasmides différents. L'un d'entre eux est un dérivé du plasmide F dont le nombre de copies par cellule est de l'ordre de l'unité. (Shi & Biek, 1995)

Les deux autres sont des plasmides dont le nombre de copies dépend de la température et qui ne diffèrent l'un de l'autre que par la présence ou l'absence d'un système de partition. (Ehrenberg & Sverredal, 1995 - Bignell & Thomas, 2001)

Nous avons réalisé ces mesures pour différentes températures, et nous avons observé un décalage progressif des courbes qui correspond au fait que le nombre de copies de ces plasmides augmente avec la température. – figure V.2.A. et V.2.B.

Distributions de l'intensité de fluorescence pour différentes températures

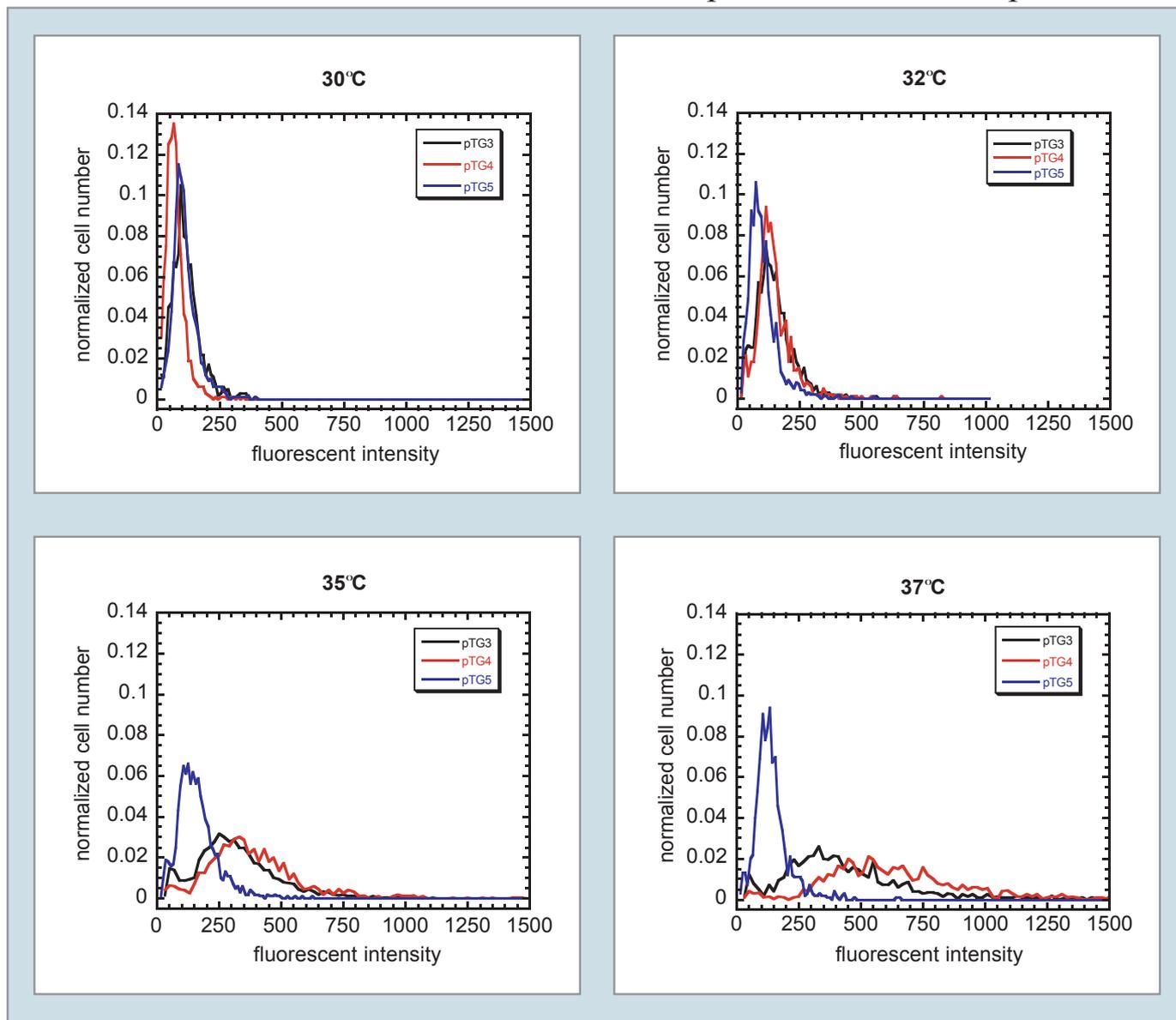


Figure V.2.A. Le plasmide pTG5 est dérivé du plasmide F qui est présent à une copie par cellule. Les plasmides pTG4 et pTG3 sont des plasmides thermosensibles qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'un système de partition. En comparant les résultats obtenus pour différentes températures, on observe un décalage progressif des courbes qui correspond au fait que le nombre de copies de plasmides pTG3 et pTG4 augmente avec la température. (Les graphiques ont été normalisés de manière à ce que l'aire sous la courbe vaille 1.)

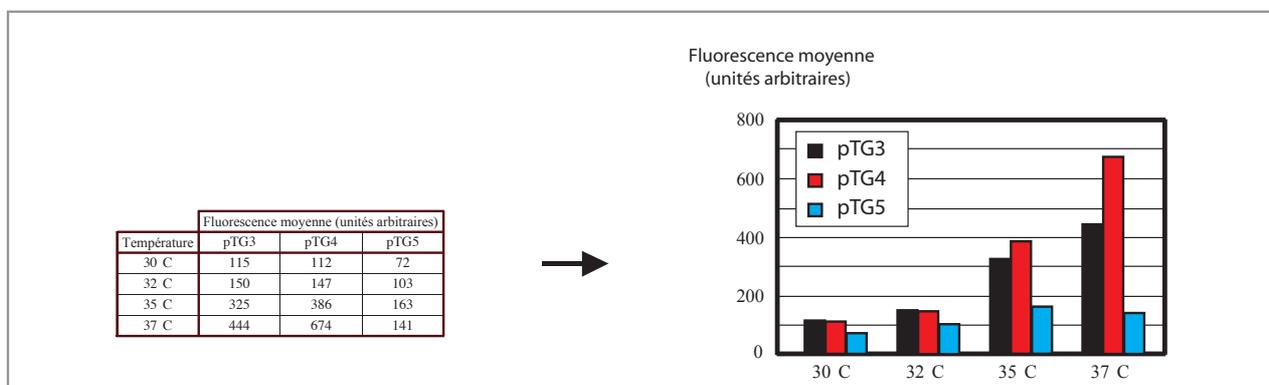


Figure V.2.B. L'augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne correspond au fait que le nombre de copies des plasmides pTG3 et pTG4 augmente avec la température.

Comme discuté dans le paragraphe II.3. l'information sur la distribution du nombre de copies de plasmide est essentiellement portée par la forme de la courbe.

Mais, pour toutes les séries de données, le rapport entre la moyenne et l'écart quadratique moyen est à peu près identique ($\Delta/M \sim 0,5$). En d'autres termes, la forme de la courbe est la même.

L'expression des protéines fluorescentes a été induite durant vingt minutes (ce qui correspond à un tiers du temps de doublement à 30°C) et pendant ce temps la bactérie peut synthétiser de nouveaux plasmides ou même se diviser.

'Malheureusement' ces bactéries issues de la souche DH5 α PRO sont résistantes à l'acide nalidixique. Nous ne pouvons donc pas utiliser l'acide nalidixique pour figer le nombre de plasmide pendant la synthèse des protéines fluorescentes. La courbe que nous obtenons à partir de nos mesures reflète donc la distribution du nombre de copies de plasmide 'moyenné' durant le temps d'induction.

C'est pour cette raison que nous avons construit une deuxième série de souches bactériennes en partant cette fois de la souche Top10.

Nous avons construit les souches CR1 en introduisant dans le chromosome de la souche Top10 la mutation *lacI*^{Q1}. Puis nous avons construit la souche CR12 en introduisant dans le chromosome de la souche CR1 un gène codant pour la synthèse de la protéine fluorescente rouge. Nous avons vérifié par séquençage le succès des différentes étapes.

Cependant pour des raisons encore inconnues la souche CR12 ne présentait pas de fluorescence.

Nous avons construit la souche CR19 en transformant la souche CR1 avec le plasmide pTG320, un plasmide dérivé du plasmide F qui porte un gène codant la protéine fluorescente verte. Avec cette construction nous devrions pouvoir vérifier si notre stratégie d'utilisation de l'acide nalidixique permet d'accéder à la distribution du nombre de copies de plasmides par cellule.

V.3. Épilogue

Cette thèse a été effectuée au sein du Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes qui est un laboratoire de physique. Mais cette thématique de mesure cellule par cellule se situe à l'interface physique-biologie et elle était alors complètement nouvelle. Pour cette thèse il a donc fallu acquérir un minimum de culture en biologie moléculaire et cellulaire ainsi qu'un certain nombre de techniques expérimentales.

De plus notre idée initiale était d'essayer à la fois de compter et de visualiser la position de certaines molécules situées à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Pour cela avons mis au point d'autres stratégies de mesure, réalisé d'autres montages de microscopie de fluorescence et construit un certain nombre de souches bactériennes.

V.3.1. Une deuxième stratégie de mesure du nombre de copies de plasmides

Pour mesurer simultanément le nombre de copies de plasmide et la position des plasmides dans la cellule, nous avons mis au point une stratégie de mesure inspirée des travaux de Robinett et al. (1996) et Gordon et al. (1997).

Ils ont réalisé une fusion entre le répresseur de l'opéron lactose et une protéine fluorescente et ils ont introduit une suite de 256 exemplaires de l'opérateur *lac* dans les molécules d'ADN qu'ils voulaient observer. Avec ce système les plasmides sont visibles dans les bactéries comme des points fluorescents dans des cellules elles même fluorescentes.

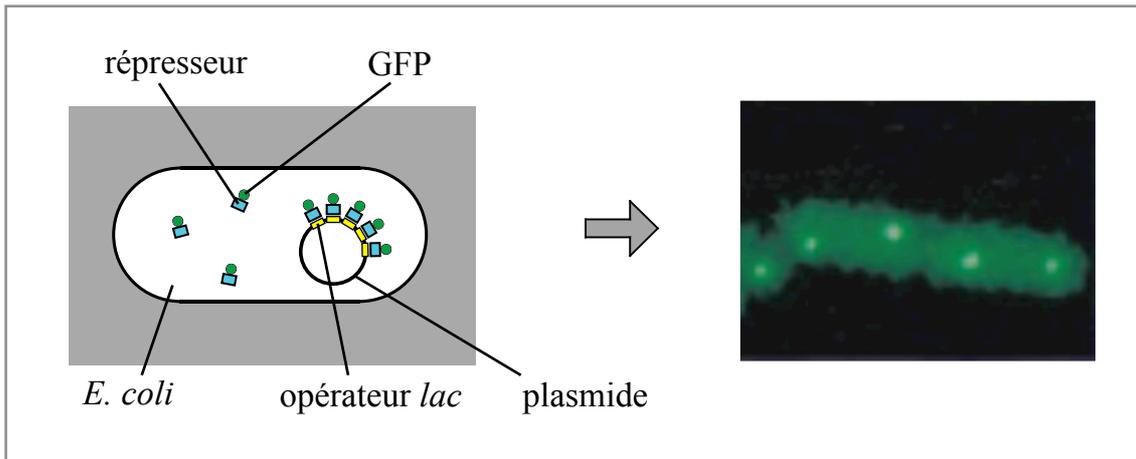


Figure V.3.1.A. Une fusion entre le répresseur de l'opéron lactose et une protéine fluorescente permet de visualiser les plasmides comme des points fluorescents à l'intérieur de la cellule.

Cette expérience permet de voir la position des molécules d'ADN dans la cellule. Mais à cause de la limite de résolution et du fait que les copies d'un même plasmide sont regroupées à l'intérieur de la cellule, cette stratégie permet de localiser les plasmides mais pas de les compter.

Pour pouvoir à la fois visualiser les plasmides et mesurer leur nombre nous avons placé un gène codant pour une fusion entre le répresseur de l'opéron lactose sous le contrôle d'un promoteur *lac* (faible). Ces protéines vont alors réprimer leur propre synthèse, ce qui aura pour effet de limiter leur nombre dans la cellule ; parallèlement les répétitions de l'opérateur *lac* vont jouer le rôle de pièges. (Sadler & al., 1983 - Bell & al., 2001)

Les plasmides vont donc encore apparaître comme des points fluorescents dans les bactéries, mais la fluorescence de la cellule va correspondre au nombre de plasmides qu'elle contient.

Nous avons donc construit plusieurs souches bactériennes pour réaliser cette expérience. Mais faute de temps nous avons abandonné ce projet.

V.3.2. Un autre trait phénotypique observable : les flagelles

Nous également essayé de mettre au point une expérience de mesure cellule par cellule nombre de flagelles chez *Escherichia coli*. (Berg, 2000)

Les flagelles sont des filaments qui permettent à la bactérie de nager.

Plus précisément un flagelle est composé d'un moteur, d'un crochet et d'un filament dont la longueur représente plusieurs fois celle de la bactérie. (Turner et al., 2000 - Macnab, R.M., 1999)

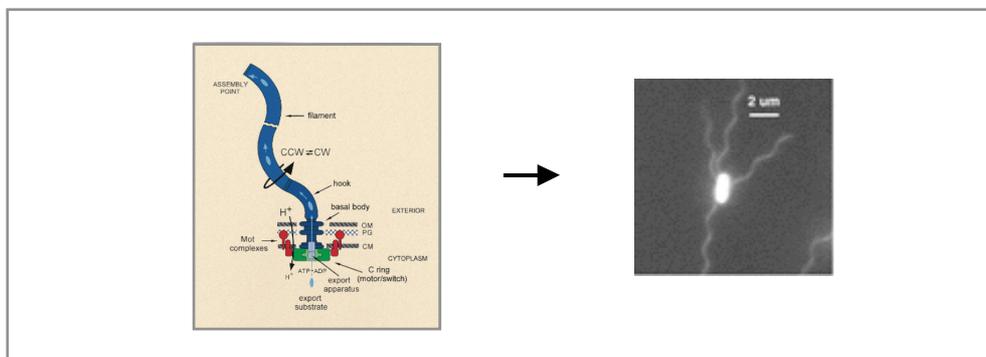


Figure V.3.2.A. Un flagelle est composé d'un moteur, d'un crochet et d'un filament dont la longueur représente plusieurs fois celle de la bactérie.

Ce filament est constitué d'environ 20 000 exemplaires d'une protéine appelée flagelline. Cette protéine polymérise par ses extrémités pour former un tube dont la structure rappelle celle d'une colonne vertébrale. (Namba, 1989)

La partie 'centrale' de la flagelline est très variable et peut être supprimée (Kuwajima, 1988) ou remplacée (Westerlund-Wikström, 2000).

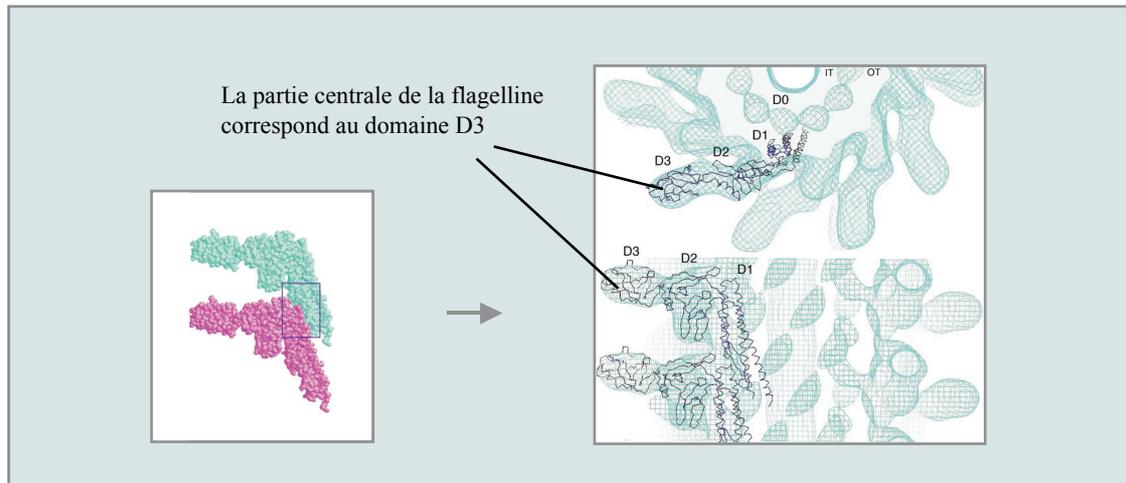


Figure V.3.2.B. La flagelline polymérise par ses extrémités pour former le filament.

Nous avons utilisé la technique de transformation chromosomique décrite dans le paragraphe III.1.7.2. pour remplacer la partie centrale du gène de la flagelline par le gène de la protéine fluorescente verte avec l'idée d'obtenir une souche bactérienne aussi motile que l'originale et dont les flagelles seraient fluorescents.

Nous avons utilisé des images obtenues par cristallographie (Samatey & al., 2001) pour choisir une région de la flagelline (de l'acides aminé 199 à l'acides aminé 278) que nous pourrions remplacer par la phase de lecture ouverte de la EGFP. Le codon start de la EGFP a été ôté et nous avons ajouté cinq glycines de part et d'autre pour encourager un repliement indépendant des parties EGFP et flagelline de la protéine de fusion.

Après la transformation, nous n'avons obtenu que trois clones et aucune de ces souches n'était motile. Par faute de temps, nous avons alors arrêté ce projet.

V.3.3. D'autres expériences de Microscopie de fluorescence

L'expérience de microscopie de fluorescence décrite dans le paragraphe II.1. est en fait la troisième que nous avons réalisée.

Dans notre **première expérience** les bactéries étaient étalées sur une lamelle de verre couverte de PBS contenant 15g/l d'agar. La lamelle de verre était posée sur la platine motorisée de manière à ce que l'objectif du microscope puisse parcourir, région par région, l'espace où se trouvent les bactéries. Nous avons mis au point un programme informatique qui après chaque déplacement effectuait automatiquement la mise au point et grâce à un système d'obturateurs prenait une image en champ clair et une image en fluorescence.

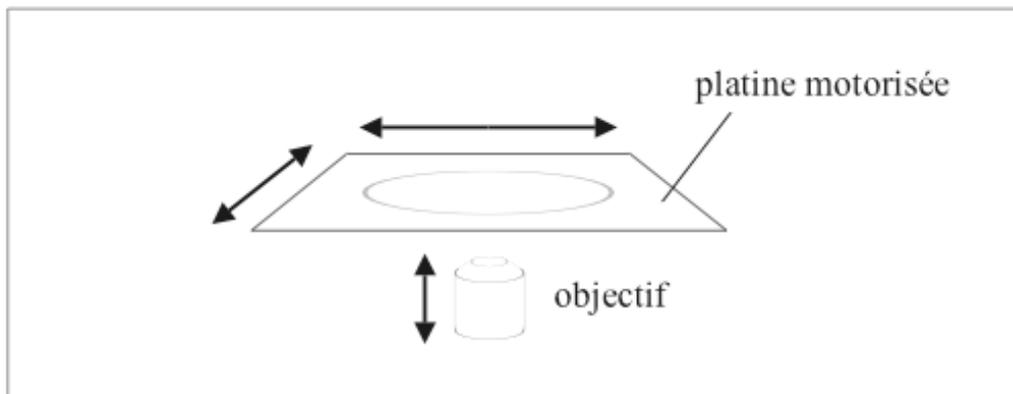


Figure V.3.3.A. L'échantillon est posé sur la platine motorisée de manière à ce que l'objectif du microscope puisse parcourir, région par région, l'espace où se trouvent les bactéries.

Cette expérience fonctionnait parfaitement, mais l'analyse des images nécessitait de sélectionner manuellement les bactéries une par une..

Notre **deuxième expérience** ressemblait beaucoup à la troisième. Une différence de hauteur de liquide et une tension appliquée entre deux réservoirs permettaient de faire passer les bactéries devant l'objectif du microscope. Le canal qui liait les réservoirs se séparait en plusieurs canaux plus fins par lesquels passaient les bactéries. On définissait une région d'intérêt pour chaque canal et on enregistrait l'intensité lumineuse reçue par les pixels correspondant.

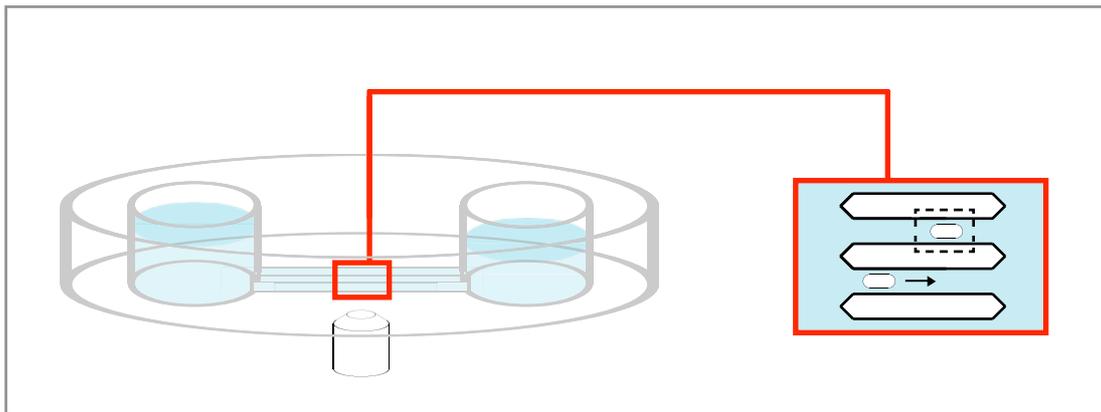


Figure V.3.3.B. Le canal qui relie les réservoirs se sépare en plusieurs canaux plus fins par lesquels passent les bactéries.

Cette deuxième expérience fonctionnait parfaitement elle aussi. Mais puisque nous avons renoncé à étudier la position des plasmides dans la cellule, il n'était plus nécessaire d'utiliser la caméra pour mesurer l'intensité de fluorescence. En utilisant une photodiode à avalanche nous pouvions augmenter à la fois la sensibilité des mesures et la vitesse d'acquisition.

Nous avons donc réalisé une troisième expérience.

Nous n'avons utilisé le **troisième montage expérimental** que pour mesurer des distributions d'intensité de fluorescence, mais nous avons vérifié qu'on pouvait aussi l'utiliser pour trier des cellules selon leur fluorescence.

Conclusion

Conclusion

Les systèmes biologiques sont par nature des systèmes complexes.

Les différents processus qui se déroulent à l'intérieur de la cellule sont fortement interdépendants. De plus le métabolisme des bactéries dépend fortement de leur environnement. Pour que des mesures cellule par cellule aient un sens, il faut donc tenir compte de l'ensemble de ces aspects. C'est dans cette idée que nous avons mis au point notre protocole expérimental.

Plusieurs années de travail auront été nécessaires pour démarrer cette nouvelle thématique, et au final nous n'avons pas eu le temps de mener tous nos projets à leur terme. Cependant l'expérience de mesure d'intensité de fluorescence cellule par cellule que nous avons réalisée fonctionne parfaitement et constitue un outil à la fois très efficace et particulièrement facile à mettre en œuvre une étude quantitative de la variabilité phénotypique au sein d'une population monoclonale.

Løbner-Olesen a utilisé (en 1999) une expérience du même type pour étudier la distribution du nombre de copies de plasmide par cellule.

Nous pensons que deux des particularités qui différencient notre expérience de la sienne pourraient nous permettre d'accéder au détail de la distribution du nombre de copies de plasmide.

Si au moment d'effectuer la mesure on ajoute un antibiotique pour fixer le nombre de plasmides, et qu'alors seulement on induit l'expression des gènes portés par les plasmides, la fluorescence de la bactérie devrait refléter le nombre de copies de plasmide à un instant donné plutôt que le nombre moyen de plasmides pendant le temps d'induction.

Par ailleurs l'utilisation combinée d'un promoteur fort et d'une souche bactérienne qui exprime le répresseur à un haut niveau va diminuer le bruit d'expression génétique et nous permettre d'accéder à d'avantage de détails quand à la distribution du nombre de copies de plasmide. (Ozbudak & al., 2002)

De plus, en rendant le faisceau laser homogène, nous devrions pouvoir mesurer la taille des bactéries en même temps que leur fluorescence. Ce qui nous permettrait de nous faire une image de l'évolution de la distribution du nombre de plasmides par cellule au cours du cycle cellulaire.

Par la suite nous pourrions synchroniser une population de bactéries à l'aide d'une technique d'éluion membranaire et suivre l'évolution de la distribution du nombre de copies de plasmides par cellule au cours du temps. (Helmstetter & al, 1992 - Grover & al., 2001)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H.
Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds
Frontiers in Bioscience 3:43-62. (1998)

Bell, C.E., Lewis, M.
The Lac repressor: a second generation of structural and functional studies
Current Opinion in Structural Biology 11(1):19-25 (2001)

Berg, H.C.
Motile behaviour of bacteria
Physics Today 53(1):24-29 (2000)

Bevis, B.J. and Glick, B.S.
Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed).
Nature Biotechnology 20:83-87. (2002)

Biek, D.P., Strings, J.
Partition functions of mini-F affect plasmid DNA topology in Escherichia coli
Journal of Molecular Biology 246:388-400. (1995)

Bignell, C., Thomas, C.M.
The bacterial ParA-ParB partitioning proteins
Journal of Biotechnology 91:1-34 (2001)

De Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M.
The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters
PNAS USA 80:21-25. (1983)

Carlos, M.P., Miller, J.H.
The DNA sequence change resulting from the *IQI* mutation which greatly increases promoter strength
Molecular and General Genetics 183:559-560. (1981)

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C.
Green fluorescent protein as a marker for gene expression.
Science 263:802–805. (1994)

Chen, J.C., Weiss, D.S., Ghigo, J.M., Beckwith, J.
Septal Localization of FtsQ, an Essential Cell Division Protein in *Escherichia coli*
Journal of Bacteriology vol.181 no.2, 521-530 (1999)

Chou, H.P., Spence, C., Scherer, A., Quake, S.
A microfabricated device for sizing and sorting DNA molecules.
PNAS USA 96:11-13. (1999)

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S.
FACS-optimised mutants of the green fluorescent protein (GFP)
Gene 173:33-38. (1996)

Cooper, S., Keasling, J.D.
Cycle-specific replication of chromosomal and F-plasmid origins
FEMS Microbiology Letters 163:217-222. (1998)

Dai, X., Rothman-Denes, L.B.
Dna structure and transcription
Current Opinion in Microbiology 2:126–130. (1999)

Diaz-Ricci, J., Bode, J., Rhee, J.I., Schügerl, K.
Gene Expression Enhancement due to Plasmid Maintenance
Journal of Bacteriology vol.77 no.22, 6684–6687. (1995)

Diaz-Ricci, J., Hernandez, M.E.
Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism
Critical reviews in Biotechnology 20(2):79-108. (2000)

Ehrenberg, M., Sverredal, A.
A Model for Copy Number Control of the Plasmid R1
Journal of Molecular Biology 246:472–485. (1995)

Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., Swain, P.S.
Stochastic Gene Expression in a Single Cell.
Science 297:1183-1186. (2002)

Falcon, C.M., Matthews, K.S.
Operator DNA sequence variation enhances high affinity binding by hinge helix mutants of lactose repressor protein
Biochemistry 39 (36) , 11074-11083 (2000)

Fu, A.Y., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F.H., Quake, S.R.
A microfabricated fluorescence-activated cell sorter
Nature Biotechnology 17:1109-1111. (1999)

Gerdes, K., Gulyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K., Mikkelsen, N.D.
Antisens RNA-regulated programmed cell death
Annual Review of Genetics 31:1-31. (1997)

Ghigo, J.M., Weiss, D.S., Chen, J.C., Yarrow, J.C., Beckwith, J.
Localization of FtsL to the Escherichia coli septal ring
Molecular Microbiology Vol. 31 Issue 2, Page 725. (1999)

Gordon, G.S., Sitnikov, D., Webb, C.D., Teleman, A., Straight, A., Losick, R., Murray, A.W., Wright, A.
Chromosome and Low Copy Plasmid Segregation in E. coli: Visual Evidence for Distinct Mechanisms
Cell 90:1113–1121. (1997)

Gordon, G.S., A.W., Wright, A.
DNA segregation in bacteria
Annual Review of Microbiology. 54:681–708. (2000)

Gordon, G.S., Rech, J., Lane, D., Wright, A.
Kinetics of plasmid segregation in *Escherichia coli*
Molecular Microbiology 51(2), 461–469 (2004)

Goss, W.A., Deitz, W.H., Cook, T.M.
Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*
Journal of Bacteriology vol.88 no.4, 1112-1118. (1964)

Goss, W.A., Deitz, W.H., Cook, T.M.
Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*
II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis
Journal of Bacteriology vol.89 no.4, 1068-1074. (1965)

Grover, N.B., Coustère-Yakir, C., Helmstetter, C.E.
Synchronous cultures from the baby machine: anatomy of a model
Journal of Theoretical Biology 212:391-398. (2001)

Gusarov, I., Nudler, E.
The Mechanism of Intrinsic Transcription Termination
Molecular Cell 3:495–504. (1999)

Hao, J.J., Yarmolinsky, M.
Effects of the P1 Plasmid Centromere on Expression of P1 Partition Genes
Journal of Bacteriology vol.184 no.17, 4857–4867. (2002)

Harley, C.B., Reynolds, R.P.
Analysis of *E. coli* promoter sequences
Nucleic Acids Res. 15:2343-2361. (1987)

Hasty, J., Collin, J.J.
Translating the noise
Nature Genetetics 31(1):13-4. (2002)

Hawkey, P.M.
Mechanisms of quinolone action and microbial response
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51, Suppl. S1, 29–35. (2003)

Hawley, D.K., McClure, W.R.
Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences
Nucleic Acids Res. 11:2237-2255. (1983)

Helmstetter, C.E., Eenhuis, C., Theisen, P., Grimwade, J., Leonard, A.
Improved bacterial baby machine: application to *Escherichia coli* K-12
Journal of bacteriology vol.174 no.11, 3445-3449. (1992)

Ho, T.Q., Zhong, Z., Aung, S., Pogliano, J.
Compatible bacterial plasmids are targeted to independant cellular locations in *Escherichia coli*
The EMBO Journal vol.21 no.7, 1864–1872. (2002)

Huges, W.W.
The inheritance of differences in growth rate in *Escherichia coli*
J. Gen. Microbiol. 12:265-268. (1955)

Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W., Kitts, P.
The green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization.
BioTechniques 19: 650–655. (1995)

Kepler, T.B., Elston, T.C.
Stochasticity in Transcriptional Regulation: Origins, Consequences, and Mathematical Representations
Biophysical journal 81:3116-3136. (2001)

Kierzek, A.M., Zaim, J., Zielenkiewicz, P.
The Effect of Transcription and Translation Initiation Frequencies on the Stochastic Fluctuations in Prokaryotic Gene Expression
The Journal of Biological Chemistry vol. 276 no.11, 8165–8172. (2001)

Koppes, L.J.H., Woldringh, C.L., Nanninga, N.
Escherichia coli contains a DNA replication compartment in the cell center
Biochimie 81:803-810 (1999)

Kuwajima, G., Asaka, J.L., Fujiwara, T., Node, K., Kondoh, E.
Nucleotide sequence of the hag gene encoding flagellin of *Escherichia coli*
Journal of Bacteriology 168:1479-1483. (1986)

Kuwajima, G.
Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*
Journal of bacteriology 170:3305-3309. (1988)

Lemon, K.P., Grossman, A.D.
Localization of Bacterial DNA Polymerase - Evidence for a Factory Model of Replication
Science 282:1516-1519. (1998)

Lemon, K.P., Grossman, A.D.
Movement of Replicating DNA through a Stationary Replisome
Molecular Cell 6:1321–1330. (2000)

Li, Y., Sergueev, K., Austin, S.
The P1 plasmid is segregated to daughter cells by a ‘capture and ejection’ mechanism coordinated with *Escherichia coli* cell division
Molecular Microbiology 46 (1):63–74. (2002)

- Li, Y., Austin, S.
The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication
Molecular Microbiology 46 (4):985–995. (2002)
- Lin-Chao, S., Bremer, H.
Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*
Molecular and General Genetics 203(1):143-149. (1986)
- Løbner-Olesen, A.
Distribution of minichromosomes in individual *Escherichia coli* cells : implications for replication control.
The EMBO Journal vol.18 no.6, 1712–1721. (1999)
- Lutz, R., Bujard, H.
Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements
Nucleic Acids Research, vol.25 no.6, 1203–1210 (1997)
- Macnab, R.M.
The Bacterial Flagellum: Reversible Rotary Propellor and Type III Export Apparatus
Journal of bacteriology, vol.181 no.23, 7149–7153. (1999)
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A.
Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.
Nature Biotechnology 17:969-973. (1999)
- McAdams, H.H., Arkin, A.
Stochastic mechanisms in gene expression
PNAS USA 94:814-819. (1997)
- Maloney PC, Rotman B.
Distribution of suboptimally induces -D-galactosidase in *Escherichia coli*. The enzyme content of individual cells.
Journal of Molecular Biology 73(1):77-91. (1973)
- Møller-Jensen, J., Jensen, R.B., Gerdes, K.
Plasmid and chromosome segregation in prokaryotes
Trends in Microbiology vol.8 no.7, 313–320. (2000)

Moller-Jensen, J., Jensen, R.B., Löwe, J., Gerdes, K.
Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament
The EMBO Journal vol.21 no.12, 3119–3127. (2002)

Morrison, P.F., Chattorajb, D.K.
Replication of a unit-copy plasmid F in the bacterial cell cycle: a replication rate function analysis
Plasmid 52:13–30 (2004)

Robinett, C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., Belmont, A.
In vivo localization of DNA sequences . and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition
Journal of Cell Biology 135:1685–1700. (1996)

Mulligan, M.E., Brosius, J., McClure, W.R.
Characterization in vitro of the effect of the spacer length in the tac promoter
The Journal of Biological Chemistry vol.260 no6, 3529-3538. (1985)

Muyers, J.P.P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W., Stewart, A.W.
Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination
EMBO Report vol.1 no3, 239-243. (2000)

Namba, K., Yamashita, I., Vonderviszt, F.
Structure of the core and central channel of bacterial flagella
Nature 342:648-654. (1989)

Neidhardt, F.C. & al.
Escherichia coli and salmonella: cellular and molecular biology
ASM Press Washington, DC (1996)

Niki, H., Hiraga, S.
Polar localization of the replication origin and terminus in Escherichia coli nucleoids during chromosome partitioning
Genes and Development 12:1036–1045 (1998)

Nordström, K., Gerdes, K.
Clustering versus random segregation of plasmids lacking a partitioning function: a plasmid paradox ?
Plasmid 50:95-101. (2003)

Onogi, T., Miki, T., Hiraga, S.
Behavior of Sister Copies of Mini-F Plasmid after Synchronized Plasmid Replication in
Escherichia coli Cells
Journal of Bacteriology vol.184 no.11, 3142-3145. (2002)

Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J.
Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein.
Science 273:1392–1395. (1996)

Ozbudak, E.M., Thattai, M. Kurtser, I., Grossman, A.D., van Oudenaarden, A.
Regulation of noise in the expression of a single gene
Nature Genetics 31(1):69-73. (2002)

Paulsson, J., Nordström, K., Ehrenberg, M.
Requirements for Rapid Plasmid ColE1 Copy Number Adjustments: A Mathematical Model
of Inhibition Modes and RNA Turnover Rates
Plasmid 39:215–234. (1998)

Molecular Clocks Reduce Plasmid Loss Rates: The R1 Case
Paulsson, J., Ehrenberg, M. (2000) J. Mol. Biol. 297:179–192.

Paulsson, J., Ehrenberg, M.
Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control
Quarterly Reviews of Biophysics 34:1–59. (2001)

Pogliano, J., Ho, T.Q., Zhong, Z., Helinski, D.R.
Multicopy plasmids are clustered and localized in Escherichia coli
PNAS USA 98:4486-4491. (2001)

Pogliano, J.
Dynamic cellular location of bacterial plasmids
Current Opinion in Microbiology 5:586–590. (2002)

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J.
Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein
Gene 111:229-233. (1992)

- Rine, J.
On the mechanism of silencing in *Escherichia coli*
PNAS USA 96:8309-8311. (1999)
- Rodionov, O., Lobočka, M., Yarmolinsky, M.
Silencing of Genes Flanking the P1 Plasmid Centromere
Science 283:546–549. (1999)
- Sadler, J.R., Sasmor, H., Betz, J.L.
A perfectly symmetric lac operator binds the lac repressor very tightly
PNAS vol.80 no.22, 6785-6789. (1983)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (1989)
- Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M.,
Namba, K.
Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling
Nature 410:331-337. (2001)
- Sawitzke, J., Austin, S.
An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria
Molecular Microbiology 40(4):786–794. (2001)
- Schwartz, A., Rahmouni, A.R., Boudvillain, M.
The functional anatomy of an intrinsic transcription terminator
The EMBO Journal vol.22 no.13, 3385-3394. (2003)
- Sherratt, D.J., Lau, I.F., Barre, F.X.
Chromosome segregation
Current Opinion in Microbiology 4:653–65 (2001)
- Sherratt, D.J.
Bacterial Chromosome Dynamics
Science 301:780-785. (2003)
- Shi, S. Biek, D.P.
A versatile low-copy number cloning vector derived from plasmid F
Gene 164:55-58. (1995)

Snyder, L., Champnes, W.
Molecular Genetics of Bacteria, 2nd Edition
ASM Press (2002)

Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R.
Replication and control of circular bacterial plasmids
Microbiology and Molecular Biology Reviews vol.62 no.2, 434-464. (1998)

Sörensen, M., Lippuner, C., Kaiser, T., MiBlitz, A., Aebischer, T., Bumann, D.
Rapidly maturing red fluorescent protein variants with strongly enhanced brightness in
bacteria
FEBS Letters 552:110-114. (2003)

Spudich JL, Koshland, D.E. Jr.
Non-genetic individuality: chance in the single cell.
Nature 262:467-471. (1976)

Summers, D.
Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability
Molecular Microbiology 29(5):1137-1145 (1998)

Swain, P.S., Elowitz, M., Siggia, E.D.
Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression
PNAS vol. 99 no.20, 12795–12800. (2002)

Thattai, M., van Oudenaarden, A.
Intrinsic noise in gene regulatory networks
PNAS U.S.A. 98:8614. (2001)

Thomas, C.M.
Paradigms of plasmid organisation
Molecular Microbiology 37(3):485-491. (2000)

Turner, L., Ryu, W.S., Berg, H.C.
Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filaments
Journal of Bacteriology vol.182 no.10, 2793-2801. (2000)

Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V. and Remington, S.J.
Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral at 2.0-Å resolution.
PNAS USA 98:462-467. (2001)

Watson, J.D., Crick, F.H.
Molecular structure of nucleic acids
Nature 171:737-738. (1953)

Weitao, T., Dasgupta, S., Nordström, K.
Plasmid R1 is present as clusters in the cells of Escherichia coli
Plasmid 43:200-204. (2000)

Westerlund-Wikström, B.
Peptide display on bacterial flagella: Principles and applications
International Journal of Medical Microbiology 290:223-230. (2000)

Wiehler, J., von Hummel, J., Steipe, B.
Mutants of Discosoma red fluorescent protein with a GFP-like chromophore
FEBS Letters 487:384-389. (2001)

Yang, T. T., Cheng, L., Kain, S. R.
Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the
green fluorescent protein.
Nucleic Acids Research 24(22): 4592–4593. (1996)

Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N.
The molecular structure of green fluorescent protein.
Nature Biotechnology 14:1246–1251. (1996)

Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V., Remington, S.J.
Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution
PNAS U.S.A. 98:462-467. (2001)

Yarmolinsky, M.
A pot-pourri of plasmid paradoxes: effect of a second copy
Molecular Microbiology 38:1-7. (2000)

Yarmolinsky, M.
Transcriptional silencing in bacteria
Current Opinion in Microbiology 3:138–143. (2000)

Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Court, D.L.
An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*
PNAS vol.97 no.11, 5978-5983. (2000)

Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P.P., Stewart, F.A.
A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*
Nature Genetics 20:123-128. (1998)

Zielenkiewicz, U., Ceglowski, P.
Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems
Acta Biochimica Polonica vol.48 no.4, 1003–1023. (2001)