



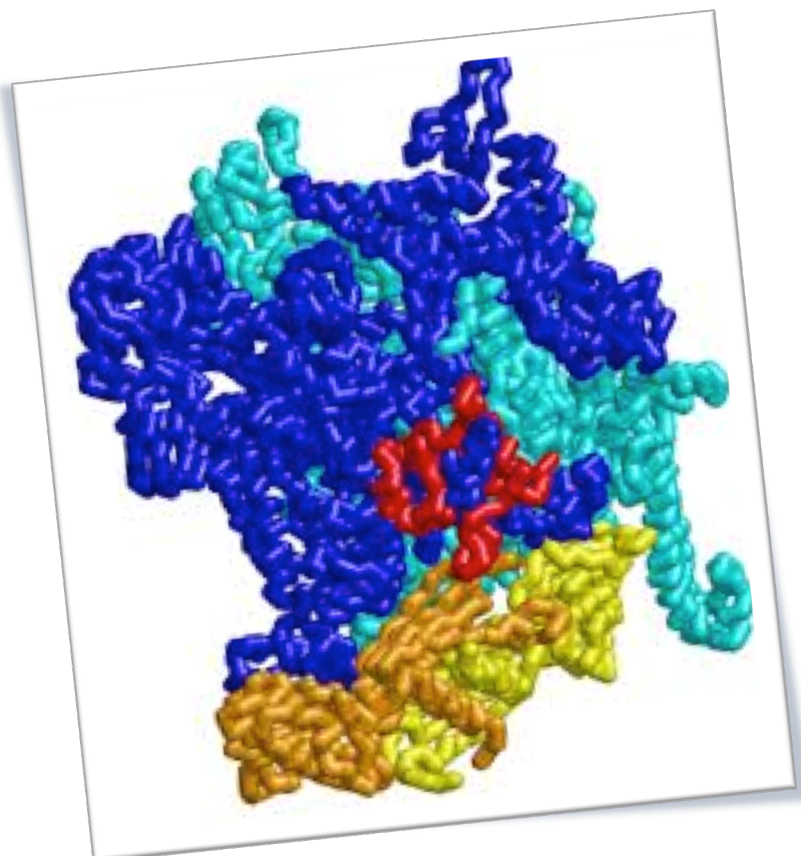
L'OPÉRON *rpoBC* : UNE RÉGULATION TRADUCTIONNELLE DÉPENDANTE DE LA CONCENTRATION EN ARN POLYMÉRASE.

PAUTRÉ Pierre

Master 2 PHED de l'Université Joseph Fourier Année 2012-2013

Laboratoire d'accueil : LAPM UMR 5163 CNRS

Maitre de stage : Hans GEISELMANN



E. coli, ARN polymerase. Image credit: PDB file [3LUO](#) rendered with RasMol

Remerciements

Je tiens à remercier toute l'équipe du CEG pour son soutien et son aide. Merci Corinne pour tes conseils toujours très avisés. Merci Caroline pour ton aide et pour ta technique magique de clonage. Sans ça, je n'aurais peut être jamais réussi à développer mes souches. Stéphane quoi te dire... sans ton aide pour mes rapports et mes présentations je ne sais pas si j'en serais là aujourd'hui. Et je n'oublie pas non plus nos discussions autour d'un verre souvent enrichissantes et toujours passionnantes.

Merci Hans pour tout ce soutien que tu m'apportes depuis maintenant deux ans, te rencontrer à radicalement changer mon opinion sur les études et la recherche. Merci à toi Adeline. Sans ton aide ce rapport n'aurait pas cette forme... Word et moi ne sommes pas amis.

Merci Papa, merci Maman, merci Zoé d'avoir continué à croire en moi et à me soutenir tout au long de mon parcours étudiant et je sais à quel point cela a du être fatigant.

Et merci à toi Laurette, tu m'a apporté force et courage pour toujours continuer d'avancer et surtout merci de m'avoir supporté pendant cette période où j'avais la tête ailleurs, toujours un peu au labo avec mes bêtes, jamais vraiment présent.

J'en oublie sûrement mais le cœur y est !

À vous tous Merci

Table des matières

1	Introduction	2
2	Objectifs	3
3	Matériels et méthodes	4
3.1	Construction des souches	4
3.1.1	Protocole de recombinaison homologue sur le chromosome	4
3.1.2	Rapporteurs plasmidiques	4
3.2	Suivi de fluorescence et de croissance.....	4
3.3	Traitement des données	5
4	Résultats	6
4.1	Construction de la fusion traductionnelle <i>rpoC ::mCherry</i>	6
4.2	La concentration en IPTG détermine le taux de croissance en contrôlant la production de la sous unité β'	7
4.2.1	L'opéron <i>rpoBC</i> est surexprimé en phase stationnaire	8
4.3	L'activité des promoteurs est fonction de la concentration en ARN polymérase	9
4.3.1	Sélections des gènes	10
4.3.1	Cinétiques de l'activité des promoteurs de <i>crp</i> et <i>ompW</i>	10
4.3.1.1	<i>crp</i> : un gène actif en phase exponentielle	10
4.3.1.2	<i>ompW</i> : un gène actif en phase stationnaire	11
4.4	Un type de promoteur indépendant de la concentration en polymérase : les protéines ribosomales	12
5	Discussion.....	13
5.1	Régulation de l'expression des gènes ribosomaux	13
5.2	Régulation de l'expression de l'opéron <i>rpoBC</i>	14
5.3	Modèle du contrôle de la croissance	15
5.3.1	Comportement du système en présence de nutriments	15
5.3.2	Évolution du système en absence de nutriments.....	16
5.4	Les bactéries s'adaptent à la disponibilité en nutriment en modulant l'expression de leur machinerie génique centrale	16
5.5	Les bactéries se préparent à reprendre leur croissance pendant la phase stationnaire. .	17
6	Perspectives	17
7	Bibliographie	19

1 Introduction

Les bactéries poussent dans différents milieux et maximisent leur taux de croissance en fonction de nutriments disponibles. Pour un environnement donné, les bactéries optimisent donc l'allocation des ressources vers différents processus cellulaires, tels que la production de la machinerie cellulaire ou le métabolisme qui converti les nutriments en précurseurs pour la biosynthèse des composants cellulaires. La proportion de la masse cellulaire, constituée de protéine, ADN et ARN, varie donc en fonction du taux de croissance. [1]. Nous nous focalisons ici sur le rôle de la transcription dans l'allocation des ressources.

L'efficacité de la première étape de l'expression génique, la transcription, est déterminée par l'occupation du promoteur transcrit par l'ARN polymérase, et la concentration libre de l'ARN polymérase dans la cellule. L'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur peut éventuellement être modulée par des activateurs ou répresseurs. [2]. L'enzyme cœur de l'ARN polymérase se compose de quatre sous-unités (α I, α II, β , β'). Sur cette enzyme cœur viennent se fixer différents facteurs σ en fonction des conditions de croissance (σ^{70} en phase exponentielle de croissance, σ^S en phase stationnaire de croissance par exemple). [3-4]

Dans le but de modifier l'allocation des ressources aux différentes fonctions majeures de la cellule, Jérôme Izard [5] a développé une souche (R) dans laquelle l'opéron en charge de la production des sous-unités β et β' (codées par les gènes *rpoB* et *rpoC* [6]) est mis sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité dépend de la concentration en IPTG. (Fig. 1). L'IPTG est un analogue de l'allolactose. Comme l'allolactose il se fixe à LacI et lève la répression exercée par celui-ci sur les opérateurs *lacO* et permet l'activation de la transcription [7]. Mais contrairement à l'allolactose il n'est pas métabolisé et il diffuse. Cela permet le travail à concentration constante de l'inducteur pendant toute la durée de l'expérience.

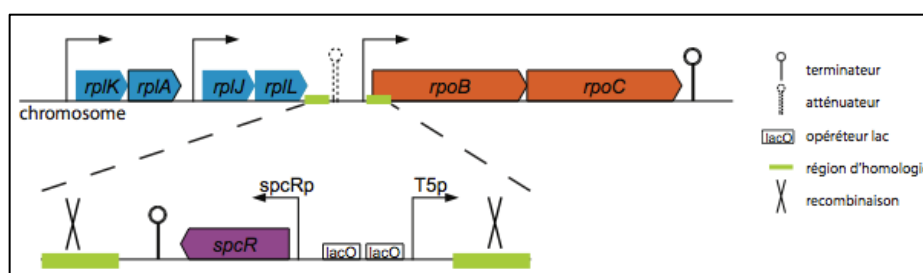


figure 1 . Remplacement du promoteur naturel de l'opéron *rpoBC* par un promoteur IPTG dépendant par recombinaison homologue sur le chromosome d'*E.coli*. Le promoteur naturel de l'opéron *rpoBC* ainsi que la région inter-génique entre *rplL* et *rpoB* ont été remplacés par recombinaison homologue. Un terminateur est inséré de façon à isoler l'opéron de l'activité des promoteurs se trouvant en amont, un gène de résistance est inséré et le promoteur naturel de l'opéron est remplacé par un promoteur synthétique dépendant de la concentration en IPTG.

Il a démontré, avec cette souche, que le taux de croissance est directement lié à la concentration d'IPTG et donc à la concentration de l'ARN polymérase. (figure 2). Il a aussi

observé que l'activité de transcription de la bactérie varie en fonction de la concentration en ARN polymérase, en analysant des résultats de séquençage d'ARN totaux dans la souche sauvage ainsi que dans la souche R pour trois concentrations d'IPTG différentes (0, 30 et 1000 μ M).

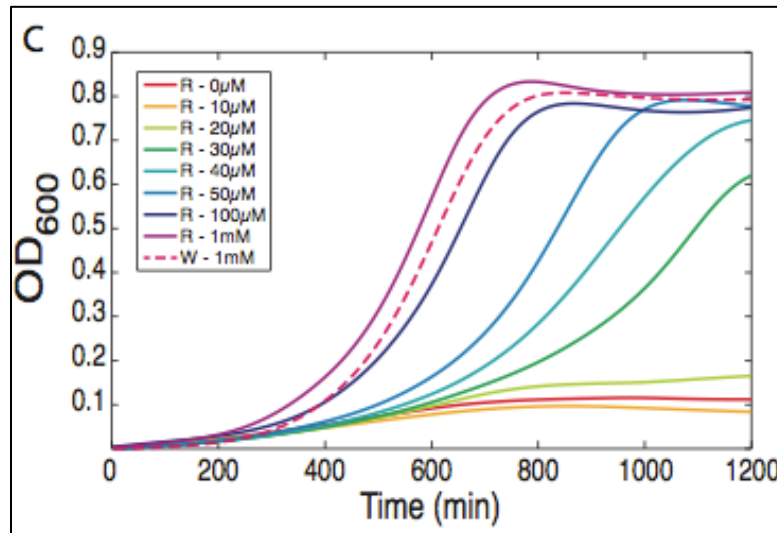


figure 2 . Croissance de la souche R en M9 0,2% de glucose en fonction de la concentration en IPTG.

Le taux de croissance de la souche R change en fonction de la concentration d'IPTG ajouté au milieu. (ref). La figure montre les courbes de croissance (OD600) de cultures qui ont été inoculés dans un milieu minimum M9 glucose contenant différentes concentrations d'IPTG. La préculture contenait une forte concentration en IPTG. La concentration intracellulaire de l'ARN polymérase est donc haute au début de la croissance dans toutes les conditions.

2 Objectifs

Mon travail s'inscrit dans la continuité du développement et de l'étude de cette souche (R). Afin de comprendre les conséquences d'une modification de la concentration en ARN polymérase sur la physiologie de la bactérie, j'ai décidé de caractériser la dynamique de l'expression génique de quelques gènes cibles sélectionnés en parallèle avec une mesure dynamique de la concentration intracellulaire de l'ARN polymérase. Les résultats préliminaires de RNAseq donnent des indications sur les gènes différemment transcrits entre la souche sauvage et la souche R aux différentes concentrations en IPTG. Cependant, ces mesures ont été faites à un moment particulier de la croissance et ne peuvent donc pas refléter les changements dynamiques de l'expression génique. Je me suis demandé comment l'ARN polymérase est régulée en fonction de la disponibilité en nutriments, et comment sa disponibilité peut moduler le taux de croissance et l'expression des quelques gènes représentatifs de différentes fonctions cellulaires.

3 Matériels et méthodes

3.1 Construction des souches

3.1.1 Protocole de recombinaison homologue sur le chromosome

Pour faire la recombinaison sur le chromosome j'ai utilisé le protocole de Shyam K Sharam *et al.* Je me suis servi du plasmide pSIM5 [8] permettant la recombinaison sur chromosome. Ce plasmide contient trois gènes de recombinaisons du phage λ : *gam*, *bet* et *exo*.

Le gène *gam* inhibe le système de dégradation des brins simple d'ADN d'*E. coli* : RecBCD, le gène *bet* code pour la protéine beta qui se fixe sur les brins simples d'ADN et permet la recombinaison homologue. Le gène *exo* code pour une exonucléase 5'-3' qui agit sur les doubles brins d'ADN (Fig 3 .).

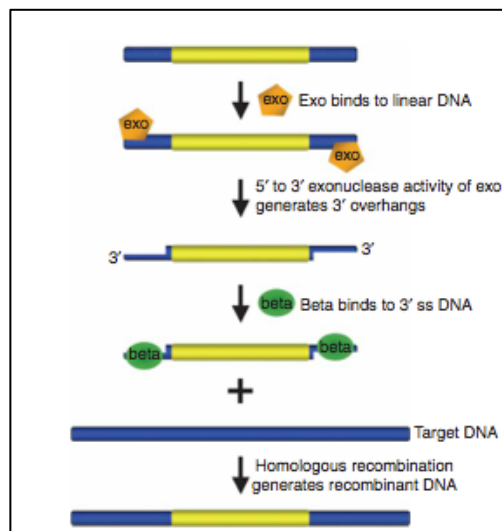


figure 3 . Résumé du système de recombinaison du bacteriophage λ utilisé pour la recombinaison homologue. Exo a une activité exonucléase 5'-3' sur les doubles brins d'ADN et génère des extrémités 3' simples brins sur le fragment d'ADN linéaire. Beta vient se fixer sur ces extrémités et en favorisant la fixation entre brin simple permet la recombinaison.

3.1.2 Rapporteurs plasmidiques

Dans le but de suivre l'expression et l'activité des promoteurs de différents gènes, je me suis servi de la collection construite et décrite par Zaslaver *et al.* [9]. Dans cette collection de rapporteurs plasmidiques nous retrouvons les régions régulatrices des gènes d'*E. coli* contrôlant l'expression d'une Gfp. J'ai transformé les souches avec les plasmides contenant les régions promotrices des gènes sélectionnés grâce aux résultats de RNAseq de Jérôme Izard.[5]

3.2 Suivi de fluorescence et de croissance

Dans le but de quantifier la croissance, la production de la sous-unité β' et l'expression de certains gènes, j'ai suivi l'augmentation de l'OD à 600nm, la fluorescence de la mCherry

(excitation 585 nm, émission 610nm) et de la Gfp (excitation : 485 nm, émission : 520 nm) à l'aide d'un lecteur de plaque automatique (Perkin fusion FT Alpha).

Les souches sont mises en préculture sur la nuit dans du milieu minimum M9 [10] supplémenté avec 0,3% glucose et 1 mM d'IPTG. Le lendemain, les cultures sont lavées deux fois dans du M9 sans IPTG par centrifugation 5 min à 4000 rpm. Je normalise les DO en diluant les cultures. Les différentes cultures ont alors la même DO. J'inocule ces cultures dans du M9 0,3% glucose à différentes concentrations d'IPTG en les diluant environ au 1/100 de façon à obtenir une absorbance de 0,05 en début de cinétique. L'absorbance, ainsi que la fluorescence, sont mesurées en alternance toutes les trois minutes et la plaque est agitée entre chaque mesure.

3.3 Traitement des données

L'activité des promoteurs est calculée à partir de mesures dynamiques de l'expression de gènes rapporteurs fluorescents. Chaque série de mesures consiste d'un peu plus de cent valeurs d'absorbance et de fluorescence mesurés pendant la croissance d'environ dix heures en microplaque. Ces données sont ensuite analysées à l'aide de scripts sous Matlab® selon la méthode décrite par de Jong *et al.* [11-12]. Les étapes principales sont les suivantes : les données brutes d'absorbance sont corrigées en soustrayant l'absorbance du milieu. Les mesures de fluorescence sont corrigées par l'autofluorescence des cellules, déterminée à l'aide d'une culture contrôle de bactéries qui ne contiennent pas le plasmide rapporteur ou qui contiennent le plasmide rapporteur sans promoteur. La fluorescence relative, F , est calculée en divisant la fluorescence corrigée totale par l'absorbance corrigée de la culture : $F = \frac{F_{corr}}{A_{corr}}$

Les données corrigées sont ensuite interprétées selon le modèle très général d'expression génique : $\frac{dF}{dt} = k \cdot p(t) - (\gamma + \mu) \cdot F(t)$, où F est la fluorescence relative, k est une constante qui représente la force du promoteur, p est l'activité du promoteur en fonction du temps, γ est le taux de dégradation du rapporteur fluorescent et μ est le taux de croissance de la culture. Le taux de croissance est calculé à partir des mesures de l'absorbance corrigée :

$$\mu = \frac{d \ln(A_{corr})}{d(t)}.$$

Puisque toutes les variables, sauf k et p , sont mesurées expérimentalement, nous pouvons calculer $k \cdot p(t)$, que nous appelons activité du promoteur (en unités arbitraires de RFU/min).

4 Résultats

4.1 Construction de la fusion traductionnelle *rpoC* ::*mCherry*

Dans le but de mesurer la concentration en ARN polymérase dans la bactérie sous différentes concentrations en IPTG, j'ai construit une fusion traductionnelle *rpoC* ::*mCherry*. *mCherry* est une protéine fluorescente émettant de la lumière rouge. Je me suis basé sur la construction de Cabrera *et al.* [13] en remplaçant le gène codant la Gfp par celui codant la *mCherry*.

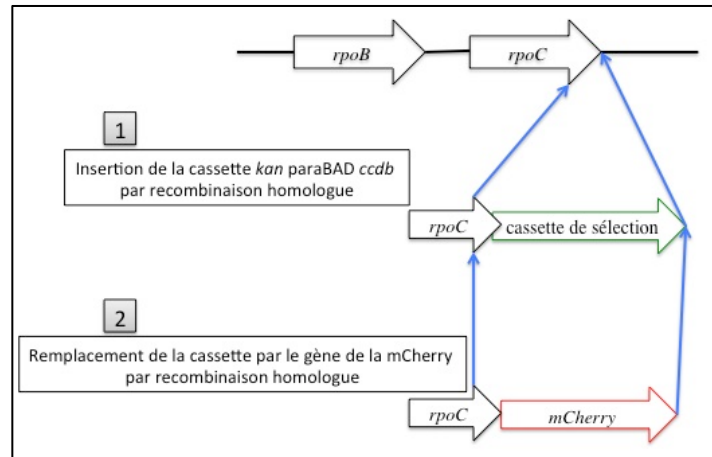


figure 4 . Insertion du gène de la *mCherry* par recombinaison homologue sur le chromosome en deux étapes. La première étape (1) consiste à amplifier la cassette de sélection par PCR en lui ajoutant en 5' et en 3' des régions homologues à la région du chromosome où elle sera insérée. J'électropore ce fragment et le système de recombinaison va permettre l'insertion sur le chromosome. Pour la seconde étape (2), la méthode est la même, mais cette fois ci c'est le gène que je veux insérer que j'amplifie et que j'électropore. La cassette contient un marqueur de contresélection qui permet d'assurer que la cassette ait été remplacé par l'ADN cible.

Pour construire la fusion traductionnelle *rpoC* ::*mCherry*, j'ai utilisé un protocole de recombinaison en deux étapes qui permet, grâce à une cassette de sélection positive et négative, de cibler le lieu où le gène va être inséré (Fig. 4). Cette cassette de sélection contient un gène de résistance à la kanamycine et un gène « suicide » : *ccdB* sous le contrôle du promoteur *paraBAD* inductible à l'arabinose. Cette construction confère aux bactéries une sensibilité à l'arabinose. Après l'étape (1) d'insertion de la cassette, je sélectionne les bactéries résistantes à la kanamycine et sensibles à l'arabinose. Après l'étape (2) de remplacement de la cassette de sélection par le gène *mCherry*, je sélectionne les bactéries sensibles à la kanamycine et résistantes à l'arabinose. Les constructions sont ensuite vérifiées par séquençage.

J'ai ainsi obtenue deux souches :

- Une souche « sauvage » dans laquelle la production des sous-unités β et β' est régulée par son promoteur naturel : PP1.
- Une souche dans laquelle la production de ces sous-unités est régulée par le promoteur dépendant de la concentration en IPTG : PP2.

4.2 La concentration en IPTG détermine le taux de croissance en contrôlant la production de la sous unité β'

Grâce à ces deux souches, PP1 et PP2, je peux suivre la production de mCherry qui reflète directement la production et la concentration de la sous unité β' .

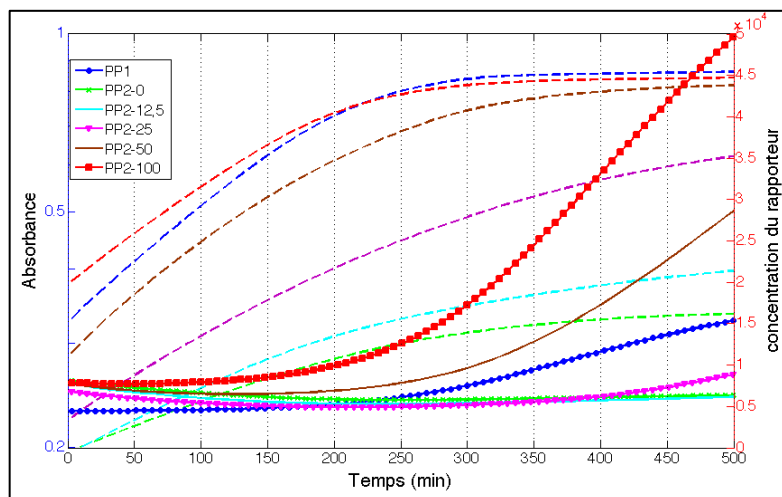


figure 5 . Cinétique de l'expression de l'opéron *rpoBC*. Les pointillés correspondent à l'absorbance en fonction du temps (échelle logarithmique) et les traits pleins à la production de fluorescence au cours du temps. Les différentes couleurs correspondent à des croissances dans différentes concentrations d'IPTG. Le taux de croissance ainsi que la fluorescence augmentent avec la concentration en IPTG. À partir de 50 μ M la croissance de PP2 est semblable à celle de la souche sauvage (PP1). À partir de 25 μ M, la fluorescence est dépendante de la concentration d'IPTG. La fluorescence augmente en phase stationnaire.

En suivant le protocole de cinétique, je confirme que le taux de croissance des bactéries dépend de la concentration en IPTG (Fig. 5). Les courbes en pointillés montrent la croissance des bactéries. Entre 0 et 250 minutes, pour les souches sauvages et PP2 poussant dans du milieu suppléé d'au moins 50 μ M d'IPTG, nous observons une phase de croissance exponentielle. À partir de 250 minutes, nous observons un plateau (absence de croissance) : la phase stationnaire. Ce type de croissance reflète un comportement « normal ». Lorsque la concentration en IPTG est inférieure à 25 μ M il n'y a pas de croissance. L'augmentation de l'absorbance observée ici pour les concentrations 12,5 et 0 μ M d'IPTG est expliquée par le fait que je lance les cinétiques avec des cultures sur la nuit qui ont poussées en présence de 1mM d'IPTG, et donc avec une concentration intracellulaire forte en ARN polymérase. La protéine se dilue ensuite au cours des premières générations.

La fluorescence est dépendante de la concentration en IPTG (traits pleins) et elle commence à augmenter à partir de 25 μ M d'IPTG. Nous observons aussi cette augmentation dans la souche « sauvage » (PP1). Le niveau absolu d'expression de l'opéron *rpoBC* est plus faible par rapport à la souche PP2. Le promoteur naturel est moins fort que le promoteur de surexpression contrôlé par l'IPTG de la souche PP2. Il est très surprenant que la fluorescence, qui indique la concentration de β' , commence à augmenter lorsque les cellules entrent en

phase stationnaire étant donné que l'activité transcriptionnelle diminue fortement dans cette phase de croissance. Cette augmentation est observée dans les deux souches (PP1 et PP2).

4.2.1 L'opéron *rpoBC* est surexprimé en phase stationnaire

Pour être certains que cette augmentation est due à une augmentation de l'activité des promoteurs et non pas à un arrêt de la croissance (comme il n'y a plus de division cellulaire, il n'y a plus l'effet dilution observable en phase exponentielle), j'ai déduits des mesures de fluorescence l'activité des promoteurs qui transcrivent *rpoBC* (Fig. 6).

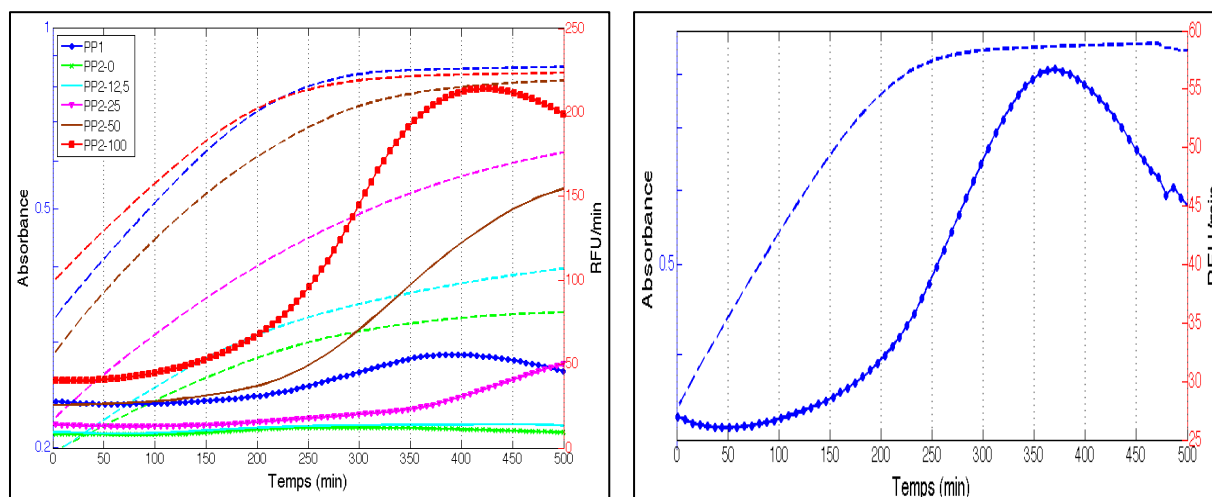


figure 6 . Le promoteur de l'opéron *rpoBC* est activé en phase stationnaire. Les pointillés correspondent à l'absorbance en fonction du temps et les traits pleins à l'activité des promoteurs (WT : bleu foncé) et IPTG dépendant) au cours du temps. Les différentes couleurs correspondent à des croissances dans différentes concentrations d'IPTG. Le taux de croissance ainsi que l'activité des promoteurs augmentent avec la concentration en IPTG. L'activité des promoteurs est bien dépendante de la concentration d'IPTG. La valeur à partir de laquelle nous observons une augmentation de l'activité du promoteur se trouve autour de 25 μ M. Le profil d'activation du promoteur de la souche sauvage a le même profil que l'activation du promoteur IPTG dépendant. Pour plus de clarté, la courbe de droite présente de l'activité du promoteur de l'opéron *rpoBC* de la souche WT seul sur une échelle plus adaptée.

A travers ces cinétiques (Fig. 6) nous voyons une activation du promoteur de l'opéron *rpoBC* au moment de la transition vers la phase stationnaire de croissance (traits pleins). Cette augmentation d'activité est observable chez PP2 pour les concentrations d'IPTG $\geq 25 \mu$ M ainsi que chez la souche sauvage (PP1) (Fig. 6 courbe de droite). L'activité du promoteur est dépendante de la concentration en IPTG :

- Il n'y a pas d'activité (ou une très faible) pour 0 et 12,5 μ M d'IPTG.
- Pour 25 μ M le facteur d'activation est d'environ 3 (augmentation de l'activité entre les deux phases de croissance).
- Pour les deux autres concentrations (50 et 100 μ M) ce facteur monte à environ 5.

L'activation du promoteur IPTG dépendant en phase stationnaire pourrait s'expliquer par une production de LacY, le transporteur du lactose, à ce moment. En effet, ce promoteur est réprimé par la présence de glucose. Je travaille dans un milieu où la seule source de carbone est le glucose. En phase stationnaire il n'y a plus de glucose, la transcription de ce gène n'est plus inhibée et le transporteur du lactose est exprimé. [7-14].

Pour tester cette hypothèse, J'ai construit un mutant KO de *lacY* (j'ai suivi le protocole de transduction décrit par Lynn C. Thomason *et al.* [15] pour inclure un gène de résistance à un antibiotique à la place du gène *lacY*). Les mesures cinétiques comparant les KO (PP1 et PP2) aux souches exprimant ce gène ne montrent aucun défaut de croissance. De plus, nous retrouvons le même profil d'activité des promoteurs entre ces quatre souches (données non montrées). J'en conclus que l'activation des promoteurs, ainsi que la production de la mCherry, sont dues à un autre type de régulation.

La fluorescence mesurée représente la concentration de la protéine fusion RpoC-mCherry. Le signal ne renseigne donc pas uniquement sur l'activité des promoteurs (régulation transcriptionnelle) mais tient aussi compte des possibles régulations traductionnelles. Ici, les promoteurs régulant la transcription de l'opéron *rpoBC* sont différents entre la souche sauvage (PP1) et la souche PP2. Cependant, nous observons une fluorescence et une cinétique d'activation des promoteurs similaire. Le signal observé prend en compte à la fois les régulations transcriptionnelles et traductionnelles. Puisque les signaux sont similaires, mais les régulations transcriptionnelles sont différentes, nos résultats suggèrent que l'accumulation de RpoC en phase stationnaire soit due à une même régulation traductionnelle.

Grâce à ces deux souches (PP1 et PP2), j'ai confirmé que la production de la sous unité β' est bien dépendante de la concentration d'IPTG dans la souche PP2. Par ailleurs les résultats expérimentaux montrent une régulation traductionnelle de cet opéron. Une question se pose maintenant : quel est l'impact d'une diminution de la concentration en ARN sur l'expression d'autres gènes de la bactérie ?

4.3 L'activité des promoteurs est fonction de la concentration en ARN polymérase

Dans le but d'étudier l'adaptation de la bactérie à une pénurie d'ARN polymérase, j'ai décidé de suivre l'activité de différentes classes de gènes. Je me suis intéressé à trois classes de gènes : les gènes exprimés en phase exponentielle de croissance, les gènes exprimés en phase stationnaire de croissance et les gènes codant pour les protéines ribosomales. Ces protéines interviennent dans la seconde partie de la régulation génique : la traduction.

4.3.1 Sélections des gènes

Au cours de sa thèse, Jérôme Izard a étudié l'activité transcriptionnelle globale de la bactérie en fonction de la disponibilité en ARN polymérase. Il a ainsi réalisé une étude sur les ARN totaux par RNAseq. Les ARN totaux ont été extraits en milieu de phase exponentielle, c'est à dire après trois heures de cultures. Les résultats du séquençage ont mis en évidence des gènes différemment exprimés entre les différentes conditions (WT, R dans 0 μ M d'IPTG, R dans 30 μ M d'IPTG et R dans 1000 μ M d'IPTG) [5].

Ces résultats m'ont aidé à sélectionner une vingtaine de gènes montrant des profils d'expression différents entre ces conditions, et dont les plasmides sont disponible dans la collection de rapporteurs plasmidiques [9]. J'ai pu mesurer l'expression des gènes sélectionnés de façon dynamique au cours du temps dans différente concentration en IPTG. Je présente ici les cinétiques de trois gènes *crp*, *ompW* et *rpsM*, chacun représentant une classe différente de gènes.

4.3.1 Cinétiques de l'activité des promoteurs de *crp* et *ompW*

Parmi les gènes sélectionnés, certains sont actif en phase exponentielle, d'autre sont actifs en phase stationnaire. Je présente ici un gène actif en phase exponentielle, *crp*, et un autre gène, actif en phase stationnaire, *ompW*.

Pour étudier l'expression de ces gènes, j'applique le même protocole que celui que j'ai utilisé pour étudier l'expression de l'opéron *rpoBC*. De cette manière, je peux directement comparer la concentration d'ARN polymérase dans la cellule (indiqué par la fluorescence rouge, cf Fig. 5) et le niveau d'expression des gènes cibles (fluorescence verte).

4.3.1.1 *crp* : un gène actif en phase exponentielle

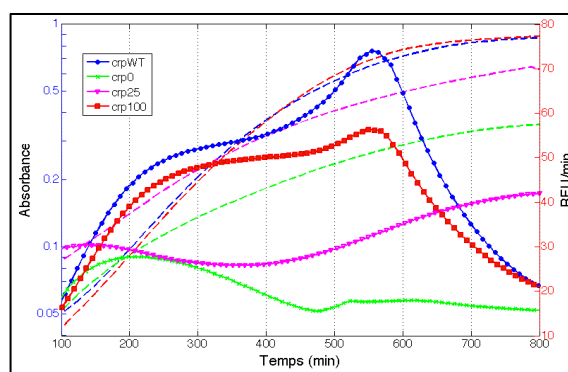


figure 7 . Le promoteur de *crp* est activé en phase exponentielle. Les pointillés correspondent à l'absorbance en fonction du temps et les traits pleins à l'activité du promoteurs au cour du temps. Les différentes couleurs correspondent à des croissances dans différentes concentrations d'IPTG. Le taux de croissance ainsi que l'activité du promoteur augmentent avec la concentration en IPTG. L'activité du promoteur est dépendante de la concentration d'IPTG. Le promoteur est activé à partir de concentrations en IPTG se situant entre de 25 μ M et 50 μ M (donnés non montrée identique à 100 μ M). Pour le WT et les fortes concentrations en IPTG (50 et 100 μ M), le promoteur est actif en phase exponentielle de croissance puis inhibé en phase stationnaire. Pour les faibles concentrations (<50 μ M) nous n'observons pas de pic d'activité.

Au travers de cette cinétique nous observons deux choses (Fig.7) :

- *crp* est exprimé (son promoteur est actif) en phase exponentielle. L'activité augmente jusqu'à environ 200 min puis reste stable.
- Son activité baisse aux alentours de 550 min, après la transition en phase stationnaire.
- Pour les faibles concentrations en IPTG, le promoteur de ce gène est peu actif.

Le promoteur de ce gène (*crp*), représentatif de la classe des gènes exprimés en phase exponentielle de croissance, présente une activité dépendante de la concentration en IPTG et donc de la concentration en ARN polymérase.

4.3.1.2 *ompW* : un gène actif en phase stationnaire

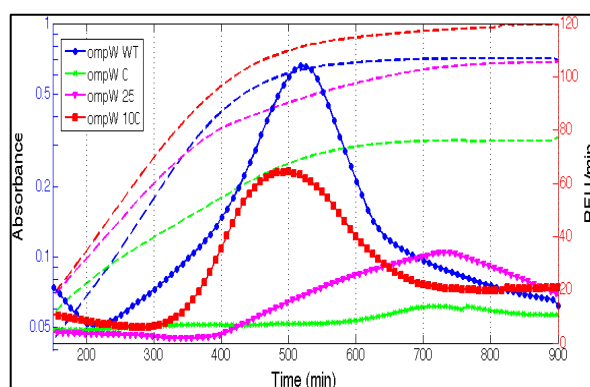


figure 8 . Le promoteur de *ompW* est activé en phase stationnaire. Les pointillés correspondent à l'absorbance en fonction du temps et les traits pleins à l'activité du promoteurs au cour du temps. Les différentes couleurs correspondent à des croissances dans différentes concentrations d'IPTG. Le taux de croissance ainsi que l'activité du promoteur augmentent avec la concentration en IPTG. L'activité du promoteur est bien dépendante de la concentration d'IPTG. À partir de 25µM le promoteur de *ompW* est actif (faiblement) en phase stationnaire Pour le WT et les fortes concentrations en IPTG (50 et 100 µM), le promoteur est actif en phase stationnaire de croissance. Pour les faibles concentrations (<25 µM) nous n'observons pas de pic d'activité.

Cette cinétique sur *ompW* (Fig. 8) nous indique que :

- *ompW* est exprimé en phase stationnaire. L'activité du promoteur est nulle jusqu'à environ 450 min (moment de transition entre les deux phase de croissance).
- Le promoteur présente ensuite un pic de croissance pour la souche sauvage et pour les concentrations supérieures à 50 µM d'IPTG.
- Le promoteur ne présente pas de pic d'activité ou un pic bien plus faible à des faibles concentrations d'ARN polymérase (25 µM). De plus, pour cette concentration, le pic d'expression est déplacé dans le temps. Ce qui montre qu'à cette concentration la bactérie pousse mais plus lentement et qu'elle atteint la phase stationnaire bien plus tard (environ 700 min après le début de la cinétique).

Le promoteur de ce gène (*ompW*), représentatif de la classe des gènes exprimés en phase stationnaire, présente une activité dépendante de la concentration en IPTG et donc de la concentration en ARN polymérase.

Grâce à ces deux exemples, qui reflètent le comportement de la vingtaine de gènes sélectionnés et étudiés, j'observe que l'expression des gènes est dépendante de la concentration en ARN polymérase. Il n'y a pas ou très peu d'activité des promoteurs pour les concentrations $< 25\mu\text{M}$ d'IPTG.

4.4 Un type de promoteur indépendant de la concentration en polymérase : les protéines ribosomales

Je me suis ensuite intéressé aux gènes qui codent pour les protéines ribosomales. J'ai étudié l'expression de trois d'entre eux : *rpsM*, *rpsT* et *rpsU*.

L'étude de ces gènes est d'autant plus intéressante et révélatrice d'un mécanisme de régulation que l'on retrouve, dans ces opérons, les gènes codant pour d'autres sous unités de l'ARN polymérase : *rpoA* (opéron de *rpsM*), ainsi que le facteur sigma 70 (*rpoD*, opéron de *rpsU*) [6]. Les cinétiques sur ces opérons indiquent que la bactérie module son activité traductionnelle en fonction de la concentration en ARN polymérase disponible au cours du temps. Elles apportent des indices sur la régulation de l'autre sous-unité (α) de l'ARN polymérase et sur la régulation du facteur sigma majoritairement exprimé en phase exponentielle : σ^{70} (*rpoD*).

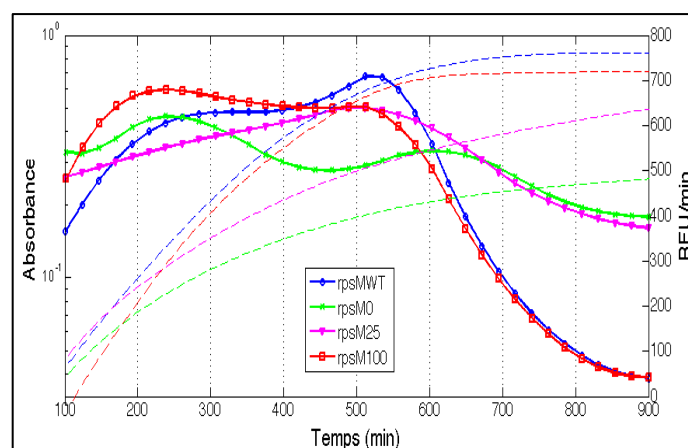


figure 10 . Le promoteur de *rpsM* est actif en phase exponentielle. Les pointillés correspondent à l'absorbance en fonction du temps et les traits pleins à l'activité du promoteurs au cour du temps. Les différentes couleurs correspondent à des croissances dans différentes concentrations d'IPTG. L'activité du promoteur n'est pas dépendante de la concentration d'IPTG. Pour le WT et les fortes concentrations en IPTG (50 μM données non montrées et 100 μM), le promoteur est actif en phase exponentielle de croissance, son activité baisse ensuite fortement à l'entrée en phase stationnaire. Pour les faibles concentrations ($< 50\mu\text{M}$) le promoteur est toujours actif en phase exponentielle. Puisque la croissance est ralentie, la culture n'atteint pas une véritable phase stationnaire et l'activité des promoteurs ne chute pas autant que pour la souche sauvage ou à de forte concentration en IPTG.

Les mesures de la cinétique d'expression de ces gènes (Fig. 9 et 10) montrent que leurs promoteurs ne sont pas affectés par la baisse de concentration en ARN polymérase. Au moment de leurs pics d'activité, ici la phase exponentielle, il n'y a pas de différence entre les faibles concentrations en IPTG (0 et 25 μ M), les fortes (50 et 100 μ M) et la souche sauvage. Par ailleurs, l'expression de ces gènes est fortement diminuée en phase stationnaire (WT et PP2 dans 50 et 100 μ M d'IPTG) dans des conditions de croissance « normale », alors que pour les faibles taux de croissance (faible concentration en ARN polymérase), ils continuent à être exprimés. Cependant, ce n'est pas une véritable phase stationnaire puisque la croissance est ralentie.

Ces données nous indiquent que dans des conditions de pénurie d'ARN polymérase, la bactérie continue de produire des protéines ribosomale (la traduction pallie-t-elle le défaut de transcription ?). Une hypothèse serait : est-ce qu'un défaut de la transcription peut être compensé par des effets de traduction ? Ici, je limite la transcription (en contrôlant le concentration de β'). L'expression génique se déroule en deux étapes : la transcription puis la traduction. Il est possible que la bactérie compense le défaut de transcription par une traduction plus importante.

Ces données nous indiquent qu'au moment de la transition en phase stationnaire ces opérons sont moins exprimés. Grâce à toutes ces cinétiques, je peux maintenant proposer un modèle d'un taux de croissance modulé par la concentration en ARN polymérase.

5 Discussion

La plupart des modèles expliquant le taux de croissance de *E.coli* le définissent en fonction de la disponibilité en nutriments [16]. La qualité et quantité des nutriments ont un effet important sur la traduction (production de la machinerie indispensable pour la traduction : les ribosomes). Je montre ici que la disponibilité en ARN polymérase joue également un rôle primordial pour le contrôle de la croissance de la cellule.

5.1 Régulation de l'expression des gènes ribosomaux

La régulation de l'expression génique, ainsi que le taux de croissance, ne se limitent pas à la seule transcription. La traduction joue un rôle important. Les résultats des cinétiques sur les promoteurs des protéines ribosomales vont dans ce sens : même si le taux de transcription est faible, la bactérie produit des protéines ribosomales. Elle les produit de façon constante même lorsque la concentration en ARN polymérase est faible. La diminution de leur production, en phase stationnaire, dans des conditions de croissance normale, s'explique alors par une

inhibition de leur promoteur à ce moment. Justin J. Lemke *et al* [17] montrent une régulation transcriptionnelle des opérons codant pour les protéines ribosomales. Les promoteurs de ces opérons (contenant *rpoA* et *rpoD*) sont inhibés par le couple DksA-ppGpp. Lorsque la bactérie est privée d'acides aminés ou de nutriments, les tRNA libres induisent la production des protéines RelA et SpoT qui vont synthétiser une molécule signal : le ppGpp. Cette alarme va ensuite se coupler à DksA et inhiber de nombreux promoteurs, dont les promoteurs des protéines ribosomales.

Mes données confirment ce modèle : les souches sauvages comme les souches poussant dans une forte concentration en IPTG (50 et 100 μ M) possèdent un fort taux de croissance. Ici la seule source de carbone est le glucose. La baisse d'activité des promoteurs des opérons des protéines ribosomales, à l'entrée en phase stationnaire, s'explique par une privation en glucose (nutriment). Par ailleurs, les souches poussant dans des conditions de faible concentration en ARN polymérase ont un taux de croissance moindre et consomment donc moins rapidement le glucose disponible. Dans ces conditions, le plateau de croissance que nous observons ne représente pas une vraie phase stationnaire due à un stress en glucose, mais un défaut de croissance dû à une pénurie d'ARN polymérase. Parmi tous les promoteurs étudiés, seuls les promoteurs des protéines ribosomales sont indépendants de la concentration en ARN polymérase. Mes observations prédisent que ces promoteurs possèdent une forte affinité pour l'ARN polymérase *in vivo*. Cette hypothèse pourra être testée facilement, du moins *in vitro*.

5.2 Régulation de l'expression de l'opéron *rpoBC*

Geoffrey Ralling et Thomas Linn (1984) [18] ont étudié la régulation transcriptionnelle de l'opéron *rplKAIJrpoBC*. Ils expliquent que les différents promoteurs de cet opéron ont des activités variables, mais n'ont pas réussi à mettre en évidence un promoteur pour *rpoBC*. Ils démontrent la présence d'un atténuateur entre *rplL* et *rpoBC*, ce qui explique la faible transcription de l'opéron comparé au promoteur fort de surexpression que j'ai utilisé dans la souche PP2, mais laisse penser qu'il a tout de même un promoteur propre.

En 1989, Luciano Passador et Thomas Linn [19] mettent en évidence que la région intercistronic entre *rplL* et *rpoBC* est indispensable à la transcription. Ils apportent la preuve que la production de β et β' est autorégulée négativement au niveau de la traduction. Cette régulation s'effectue entre les régions +126 (pb) et +403 (pb) de *rpoC*, donc loin du site de fixation du ribosome (séquence Shine-Dalgarno). Il est possible qu'elle s'effectue au travers

d'un petit ARN interférant. Cette régulation traductionnelle explique les résultats obtenus au cours des cinétique suivant la production de β' (Fig. 5 et 6).

Pendant la phase de croissance exponentielle, la production de l'ARN polymérase est maximale. La production des protéines ribosomales reste la même pour toutes les concentrations d'ARN polymérase (Fig. 9 et 10). La bactérie n'a donc pas intérêt à « sur transcrire » si le reste de la machinerie génique ne suit pas. Elle va maintenir une concentration optimale de l'ARN polymérase en ajustant la production des sous unités β et β' par autorégulation négative. Nous pouvons imaginer que l'ARN interférent qui impose la régulation traductionnelle soit sous le contrôle d'un promoteur qui n'est actif qu'au dessus d'une certaine concentration d'ARN polymérase.

5.3 Modèle du contrôle de la croissance

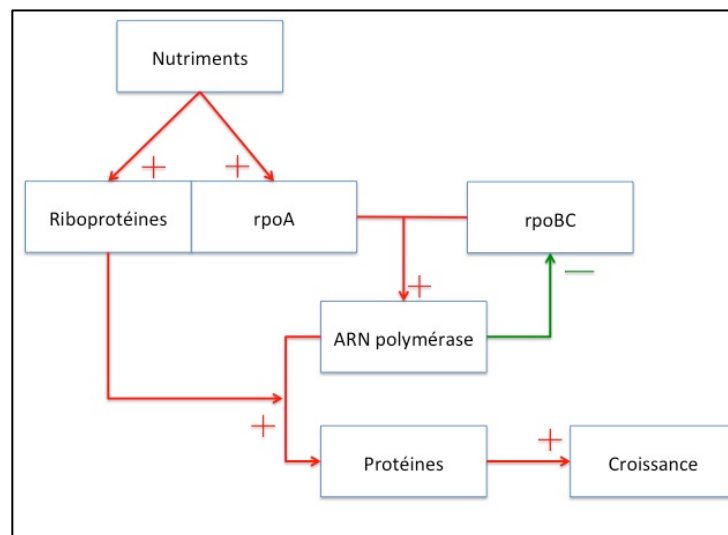


figure 11 . Modèle d'un taux de croissance modulé par la concentration en RNAP. Les flèches rouge indiquent les régulations positives imposées par les différents acteurs et la flèche verte indique la régulation négative de la production de β et β' par l'ARN polymérase. Ce modèle montre que le taux de croissance est régulé par la concentration en ARN polymérase.

5.3.1 Comportement du système en présence de nutriments

Lorsque la bactérie pousse en présence de nutriments, elle va produire des protéines ribosomales de la même façon que RpoA (Fig. 11, flèches rouges). Elle va aussi produire les deux autres sous-unités de l'ARN polymérase, β et β' . Les sous-unités vont se complexer et former l'ARN polymérase. Comme nous l'avons vu, lorsque la concentration en ARN polymérase est élevée, elle exerce un rétro contrôle négatif sur la production des sous-unités β et β' (Fig. 11, flèche verte).

5.3.2 Évolution du système en absence de nutriments

Lorsque les nutriments viennent à manquer, les protéines ribosomales et la sous-unité α ne sont plus produits. La concentration de cette sous-unité diminue entraînant une diminution de la concentration en ARN polymérase. Celle-ci n'exerce plus son rétro contrôle sur la traduction de l'opéron *rpoBC*. Ceci peut expliquer l'augmentation de sa concentration en phase stationnaire. Et bien sûr, comme il n'y a plus de nutriments, le taux de croissance tombe à zéro. Et comme nous l'avons vu, si nous diminuons la disponibilité en ARN polymérase nous faisons chuter le taux de croissance même en présence de nutriments.

5.4 Les bactéries s'adaptent à la disponibilité en nutriment en modulant l'expression de leur machinerie génique centrale

Je propose un modèle qui permet d'expliquer mes données en formalisant les connexions entre le taux de croissance, la disponibilité en nutriments et la disponibilité en ARN polymérase. Dans la souche R nous avons mis la production des sous-unités β et β' sous le contrôle d'un promoteur dépendant à l'IPTG. Nous avons observé le même profil d'activation du promoteur que dans la souche sauvage. Ceci suggère une régulation traductionnelle de l'opéron *rpoBC* dépendant de la concentration en polymérase. D'un autre côté, la production de l'autre sous-unité de la polymérase (*rpoA*), ainsi que celle du facteur σ^{70} , est indépendante de la concentration en polymérase. Ces gènes sont exprimés de la même façon que les protéines ribosomales et sont principalement dépendants de la disponibilité en nutriments.

En présence de nutriments, la bactérie produit suffisamment d'ARN polymérase pour maintenir le bon ratio ARN/protéines ribosomales. Lorsque la source nutritive est épuisée la bactérie ne produit plus de ribosomes, ni de sous-unité α , ou de facteur σ^{70} . La concentration en ARN polymérase diminue et n'exerce plus le rétro contrôle sur l'opéron *rpoBC*. Pour cette raison, j'observe une augmentation de la concentration de β' (Fig. 5,6 et 13) à l'entrée en phase stationnaire. Cette hypothèse va dans le sens des résultats de Stefan Klumpp et Terence Hwa [16] qui proposent un modèle liant la proportion d'ARN polymérase libre directement au taux de croissance. Lorsque la concentration de l'ARN polymérase est à son maximum le taux de croissance est maximal. Celui-ci diminue lorsque la concentration en ARN polymérase diminue. J'apporte une explication à la diminution de la concentration de la ARN polymérase. En fin de phase exponentielle, il n'y a plus de nutriments, nous retrouvons donc une activité transcriptionnelle faible (peu d'ARN polymérase) et une production de protéine faible (moins de ribosome et moins d'ARNm). Le ratio ARN polymérase/protéines ribosomales (transcription/traduction) serait donc le facteur central définissant le taux de croissance. Ce

facteur est défini par la disponibilité en nutriments. En présence de nutriments, la bactérie va adapter ce facteur pour optimiser son taux de croissance. Lorsque la disponibilité en nutriments est moindre, la bactérie va diminuer sa production de protéines en inhibant la production de *rpoA* (la concentration en ARN polymérase va diminuer) et la production des protéines ribosomales. Celles-ci étant stables le ratio ARNm/Protéines va diminuer, entraînant une baisse du taux de croissance.

5.5 Les bactéries se préparent à reprendre leur croissance pendant la phase stationnaire.

L'augmentation de la concentration des sous-unités β et β' lors de l'arrêt de la croissance n'est pas forcément incompatible avec une activité métabolique faible. La cellule met tout en place pour survivre avec peu de nutriments mais se prépare à reprendre sa croissance lorsqu'ils seront à nouveau disponibles. Pendant la phase stationnaire, les ribosomes sont présents (non transcrits mais ce sont des protéines très stables) et une concentration relativement élevée des grandes sous-unités de l'ARN polymérase est disponible. Au moment d'un retour de conditions de croissance favorables, la bactérie n'aura alors plus qu'à produire la sous-unité α , plus petite que les sous-unités β et β' (36kDa contre 150kDa) pour reprendre sa croissance. Les ribosomes disponibles assureront la traduction des gènes exprimés en début de phase exponentielle le temps que la cellule en produise à nouveau. La transcription des protéines ribosomales est avant tout dépendante de la disponibilité en nutriments, ils pourront donc être produits (comme *rpoA* et *rpoD*) rapidement, même avec une faible concentration en ARN polymérase.

6 Perspectives

Mes résultats et mon modèle conduisent à un certain nombre de prédictions testables. Par exemple, pour valider la régulation traductionnelle de la polymérase en fonction de sa propre concentration, je pourrais placer *rpoA* dans l'opéron *rpoBC* afin de découpler son expression de la régulation exercée par DksA-ppGpp sur son promoteur naturel. L'hypothèse est la suivante : *rpoA* n'est plus transcrit en phase stationnaire, sa concentration devrait donc diminuer, ce qui va entraîner la diminution de la concentration en ARN polymérase et donc lever la régulation traductionnelle appliquée sur *rpoBC*. En le mettant sous le contrôle du promoteur de *rpoBC*, *rpoA* continue à être exprimé en phase stationnaire et la concentration en ARN polymérase ne devrait pas diminuer. Ainsi, je ne devrais plus observer

d'augmentation de la fluorescence à ce moment là. On pourrait s'attendre à une reprise de croissance plus rapide, après transfert d'une culture sur la nuit dans du milieu frais.

Une autre approche serait de se placer, soit dans une souche $\Delta dksA$, soit dans une souche $ppGpp^0$ (ne produisant plus de $ppGpp$) afin de ne plus être dépendant de la répression effectuée par le couple $DksA$ - $ppGpp$ sur les promoteurs de *rpoA* et *rpoD* et de continuer à produire la sous-unité α . La concentration en ARN polymérase restera alors constante, et je ne devrais plus observer l'induction de la production de *rpoBC* en phase stationnaire.

Bien que la répression soit dépendante de la concentration en ARN polymérase, il n'est pas à exclure que le facteur σ^{70} joue lui aussi un rôle dans cette répression. En effet, la répression a lieu au cours de la phase exponentielle de croissance et, bien qu'elle semble être dépendante de la concentration en ARN polymérase, je peux envisager que la production d'un ARN interférent soit sous le contrôle d'un promoteur dépendant du facteur σ^{70} (si effectivement la répression traductionnelle observée est due à un ARN interférent). Deux possibilités sont envisageable pour prouver l'existence d'un tel ARN. Je pourrais envisager de le détecter dans une expérience de RNAseq. Alternativement, je pourrais muter la région cible potentielle (tout en conservant la séquence en acides aminés codé par l'ARNm), l'autorégulation négative devrait disparaître dans la séquence mutée.

7 Bibliographie

- . [1] Stefan Klumpp, Zhongge Zhang, and Terence Hwa. Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria (2009). *Cell*, 139(7):1366–1375.
- . [2] Matthew Scott, Carl W Gunderson, Eduard M Mateescu, Zhongge Zhang, and Terence Hwa. Interdependence of cell growth and gene expression: Origins and consequences (2010). *Science*, 330(6007):1099–1102.
- . [3] Katsuhiko S Murakami and Seth A Darst. Bacterial RNA polymerases: the whole story (2003). *Current opinion in structural biology*, 13(1):31–39.
- . [4] Robert D Finn, Elena V Orlova, Brent Gowen, Martin Buck, and Marin van Heel. *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structure (2000). *The EMBO journal*, 19(24):6833–6844.
- . [5] Izard Jérôme *et al.* Growth control of *Escherichia coli* by the global transcriptional machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Submitted.
- . [6] Ingrid M Keseler, Julio Collado-Vides, Alberto Santos-Zavaleta, Martin Peralta-Gil, Socorro Gama-Castro, Luis Muñoz-Rascado, César Bonavides-Martinez, Suzanne Paley, Markus Krummenacker, Tomer Altman, et al. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology (2011). *Nucleic Acids Research*, 39(suppl 1):D583–D590.
- . [7] Thomas Kuhlman, Zhongge Zhang, Milton H Saier Jr, and Terence Hwa. Combinatorial transcriptional control of the lactose operon of *Escherichia coli* (2007). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14):6043–6048.
- . [8] Shyam K Sharan, Lynn C Thomason, Sergey G Kuznetsov, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering (2009). *Nature protocols*, 4(2):206–223.
- . [9] Alon Zaslaver, Anat Bren, Michal Ronen, Shalev Itzkovitz, Ilya Kikoin, Seagull Shavit, Wolfram Liebermeister, Michael G Surette, and Uri Alon. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli* (2006). *Nature methods*, 3(8):623–628.
- . [10] Tom Maniatis, Edward F Fritsch, Joseph Sambrook, et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*, volume 545. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1982.
- . [11] Frédéric Boyer, Bruno Besson, Guillaume Baptist, Jérôme Izard, Corinne Pinel, Delphine Ropers, Johannes Geiselmann, and Hidde De Jong. WellReader: a MATLAB program for the analysis of fluorescence and luminescence reporter gene data (2010). *Bioinformatics*, 26(9):1262–1263.
- . [12] Hidde De Jong, Caroline Ranquet, Delphine Ropers, Corinne Pinel, and Johannes Geiselmann. Experimental and computational validation of models of fluorescent and luminescent reporter genes in bacteria (2010). *BMC systems biology*, 4(1):55.
- . [13] Julio E Cabrera and Ding J Jin. The distribution of RNA polymerase in *Escherichia*

coli is dynamic and sensitive to environmental cues (2003). *Molecular microbiology*, 50(5):1493–1505.

- . [14] Matt Eames and Tanja Kortemme. Cost-benefit tradeos in engineered lac operons (2012). *Science*, 336(6083):911–915.
- . [15] Lynn C Thomason, Nina Costantino, et al. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction (2007). *Current Protocols in Molecular Biology*, pages 1–17.
- . [16] Stefan Klumpp and Terence Hwa. Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases in bacteria (2008). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51):20245–20250.
- . [17] Justin J Lemke, Patricia Sanchez-Vazquez, Hector L Burgos, Gina Hedberg, Wilma Ross, and Richard L Gourse. Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA (2011). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14):5712–5717.
- . [18] Georey Ralling and Thomas Linn. Relative activities of the transcriptional regulatory sites in the rplKAJLrpoBC gene cluster of *Escherichia coli* (1984). *Journal of bacteriology*, 158(1):279–285.
- . [19] Luciano Passador and Thomas Linn. Autogenous regulation of the RNA polymerase beta subunit of *Escherichia coli* occurs at the translational level in vivo (1989). *Journal of bacteriology*, 171(11):6234–6242.

Résumé

Mon stage de Master 2 s'est déroulé au LAPM au sein de l'équipe CEG. J'ai découvert une approche synthétique de la compréhension de l'expression génique d'*E. coli*. J'ai travaillé sur une souche, dans laquelle la production de deux des quatre sous unités de l'ARN polymérase est sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Grâce à cette souche, nous pouvons réguler le taux de croissance de la bactérie. J'ai étudié comment la bactérie s'adapte à cette régulation. Je me suis intéressé à la régulation de la machinerie globale de l'expression génique (protéines ribosomales et l'ARN polymérase) et l'impact de cette régulation sur l'expression génique ainsi que le taux de croissance. À l'aide mesures cinétiques, de suivi de fluorescence et d'analyse mathématiques, j'ai pu élaborer un modèle de régulation du taux de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration en ARN polymérase. J'ai aussi mis en évidence une auto-régulation étonnante de la production de l'ARN polymérase.