

Faculté des sciences

Etude des domaines fonctionnels impliqués dans la catalyse et la formation de complexes nucléoprotéiques chez la transposase de *Tn4430*

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en
Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Auteur : Nicolas Aryanpour
Promoteur : Pr. Bernard Hallet
Lecteurs : Pr. Patrice Soumillon et Dr. Emilien Nicolas
Encadrante : Claire Stulemeijer

Année académique 2019-2020

Remerciements

A travers ces quelques lignes je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce mémoire.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, Pr. Bernard Hallet, pour m'avoir accordé sa confiance et accueilli dans son équipe. Son enthousiasme et son dévouement pour le projet resteront pour moi un exemple à suivre.

Ensuite, merci bien sûr à mon encadrante, Claire Stulemeijer, pour m'avoir accompagné durant cette année. Ton attitude résolument positive, tes nombreux conseils et ta grande disponibilité m'ont permis d'évoluer sereinement au cours de ce projet. On aurait difficilement pu rêver mieux comme encadrante. (Merci aussi d'avoir passé l'été à 4°C à purifier des mutants pour qu'on puisse commencer les tests au plus tôt, c'était vraiment cool).

Merci à tous les membres de l'équipe BGM qui participent à maintenir en permanence une ambiance positive et agréable dans le laboratoire. En particulier, merci à Ophélie pour son prêt de matériel (clef USB crocodile) et à Gérome, Adri, Stefano, Jason et tous les autres pour leurs conseils et leur bonne humeur.

Merci à mes co-mémorants de BGM, Alex et Morgane. Ce fut un plaisir de partager avec vous les joies et aussi (surtout) les frustrations quotidiennes de la vie en laboratoire.

Enfin merci à tous les camarades biologistes aux côtés desquels j'ai passé ces merveilleuses années d'étudiant en biologie. C'est formidable de pouvoir cotoyer au quotidien des gens qui partagent la même curiosité et la même passion.

J'ai été absolument ravi d'apporter ma modeste contribution à ce projet de longue haleine qu'est l'étude de la transposition.

Abstract

Within a host cell, a "transposon" is a particular DNA sequence that can be moved or copied by insertion into a target DNA molecule during a process called transposition. This reaction takes place in the transpososome, a nucleoproteic complex which includes the transposon ends, the target DNA and the protein responsible for transposition : the transposase.

Amongst the different transposon types, the Tn3 family of replicative transposons has a significant impact on living organisms because of its implication in the spread of antibiotics resistances in bacteria. Despite this, the mechanisms underlying Tn3 transposition and, in particular, the functional organisation of its transposase and the architecture of its transpososome are still poorly understood.

During the past decade, the Tn4430 transposon has been used as a model to investigate Tn3 family transposition and has yielded some valuable insight into the different steps involved in the process. In order to perform transposition, the transposase (TnpA) has to reach an activated state to specifically bind both transposon ends forming a "Paired End Complex" (PEC) inside which the ends are cleaved. The transposase then has to contact a target sequence where it inserts the transposon. During this step, a mechanism of repulsion called "immunity" also mediated by TnpA prevents multiple insertions into the same locus.

In a previous work attempting to link these activities to particular functional domains of TnpA, a library of TnpA mutant was built through pentapeptide scanning mutagenesis. The pentapeptidomutants were then characterized through *in vivo* and *in vitro* essays for their ability to perform transposition, bind the transposon ends and bind the target.

In this work we complete the study of these pentapeptidomutants by testing their catalytic activity *in vitro* and comparing it to their profile of nucleoproteic complex formation. We compare these activities to those of the previously described TnpA^{WT} and to some deregulated mutants that show higher PEC formation and enhanced catalytic activity.

In parallel to this work, another team is trying to uncover the 3D structure of TnpA by Cryo-EM. In the future, we aim to compare our findings on the relationship between sequence and fonction of the TnpA to its 3D structure in order to build a complete model for Tn3 family transposase fonctionnal organisation.

Résumé

Au sein d'une cellule hôte, un "transposon" est une séquence d'ADN déterminée qui est susceptible d'être déplacée ou copiée et insérée dans une molécule d'ADN cible par transposition. Cette réaction a lieu dans le transpososome, un complexe nucléoprotéique qui contient les extrémités du transposons, la cible et la protéine responsable de la transposition : la transposase.

Parmi les différentes classes de transposons, la famille des transposons réplcatif représentée par Tn3 a un impact majeur sur le monde vivant de par son rôle dans la dissémination de résistances antibiotiques chez les bactéries. Malgré cela, les mécanismes régissant la transposition de Tn3 et, en particulier, son organisation fonctionnelle et l'architecture de son transpososome sont mal connus.

Ces dernières années, le transposon Tn4430 a été utilisé comme modèle pour étudier la transposition chez la famille de Tn3 et a permis des avancées significatives dans la compréhension de son mécanisme. Lors de la transposition, la transposase (TnpA) doit atteindre un état actif pour lier spécifiquement les extrémités du transposon formant ainsi un *Paired End Complex* (PEC) dans lequel les extrémités sont coupées. TnpA contacte également la cible dans laquelle elle procède au transfert. Durant cette étape, un mécanisme de répulsion appelé "immunité" également médié par la TnpA, empêche les insertions multiples dans un même locus.

Pour tenter de relier ces activités à des domaines fonctionnels de la TnpA, un précédent travail a mené une approche de mutagenèse par balayage via la technique de pentapeptidogénèse. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont ensuite permis de caractériser ces mutants pour leur activité de transposition et de liaison aux extrémités et à la cible.

Dans ce travail nous avons complété l'étude de ces pentapeptidomutants en testant leur activité catalytique *in vitro* et en la comparant à leur profil de formation de complexe nucléoprotéique. Nous avons comparé ces activités à celles de la TnpA^{WT} et à celles de deux mutants dérégulés montrant une formation de PEC et une activité catalytique accrue.

En parallèle à ce travail, une autre équipe tente actuellement de révéler la structure 3D de la TnpA par Cryo-EM. À terme, nous avons pour but de comparer nos observations sur la relation séquence-fonction de la TnpA à sa structure 3D afin de construire un modèle complet de l'organisation fonctionnelle des transposases de la famille de Tn3.

Table des Matières

I. INTRODUCTION	13
I.1 CLASSIFICATION DES TRANSPOSONS	15
I.1.1 SELON L'INTERMEDIAIRE DE TRANSPOSITION	16
I.1.2 SELON LE MECANISME DE TRANSPOSITION ET LA TRANSPOSASE	17
I.1.2.1 Transposases à motif HUH	17
I.1.2.2 Transposases à Tyrosine	17
I.1.2.3 Transposases à Sérine	18
I.1.2.4 Casposases	18
I.1.2.5 Transposases à motif DDE(D)	18
I.2 DIVERSITE DES TRANSPOSASES A MOTIF DDE	20
I.2.1 TRANSPOSITION NON-REPLICATIVE	20
I.2.2 TRANSPOSITION REPLICATIVE	21
I.3 ANATOMIE DES TRANSPOSASES A MOTIF DDE(D)	24
I.3.1 DOMAINE CATALYTIQUE RNASE H	24
I.3.2 DOMAINE DE LIAISON A L'ADN	25
I.4 TRANSPOSOSOME ET REGULATION	27
I.4.1 ASSEMBLAGE DU COMPLEXE SYNAPTIQUE	27
I.4.2 INTERVENTION DE PROTEINES ENDOGENES	28
I.4.3 RECRUTEMENT DE LA CIBLE	29
I.4.4 CIBLAGE ET IMMUNITE DE TRANSPOSITION	30
I.4.4.1 Tn7	30
I.4.4.2 Bactériophage Mu	32
II. CONTEXTE ET OBJECTIFS	35
II.1 LA FAMILLE DE Tn3	35
II.2 Tn4430 COMME MODELE DE LA FAMILLE DE Tn3	36
II.2.1 STRUCTURE DE LA TRANSPOSASE TNPA	36
II.2.2 MODELE DU <i>REPLISOME HIJACKING</i>	39
II.2.3 DECOUPLAGE DES ACTIVITES DE TRANSPOSITION ET D'IMMUNITE	42
II.2.4 ASSEMBLAGE ET ACTIVATION DU TRANSPOSOSOME	42
II.2.5 BIBLIOTHEQUE DE MUTANTS CONSTRUITE PAR PENTAPEPTIDOGENESE	43
II.2.6 OBJECTIFS	47
III. RESULTATS	51
III.1 CONSTRUCTION D'UN MUTANT CATALYTIQUE DE LA TRANSPOSASE DEREGULEE TNPA^{3X}	51
III.2 PURIFICATION DES TRANSPOSASES	54
III.3 MISE AU POINT D'UN TEST DE COUPURE AU NIVEAU DES EXTREMITES 3' DE Tn4430	56
III.3.1 CONTRAIREMENT A LA COUPURE EN 3', LA COUPURE EN 5' DE L'IR N'AFECTE PAS LA LIAISON DE TNPA	57
III.3.2 VALIDATION DU TEST DE COUPURE AVEC TNPA ^{WT} ET LES MUTANTS T+/I- TNPA ^{S911R} ET TNPA ^{3X}	60
III.3.3 VERIFICATION DE L'ACTIVITE DES MUTANTS ALEATOIRES	62
III.3.4 LA TNPA ^{WT} PURIFIEE EST ACTIVE	63
III.3.5 CARACTERISATION DES PENTAPEPTIDOMUTANTS	66

III.3.6 LE GLYCÉROL Promeut la formation de complexes nucléoprotéiques d'ordre supérieur et l'activité de clivage chez la TnpA ^{WT}	68
III.3.7 LES EFFETS DU GLYCÉROL SUR LES DIFFÉRENTS MUTANTS ALÉATOIRES SONT VARIABLES	70
IV. DISCUSSION.....	73
IV.1 LE GLYCEROL STIMULE L'ACTIVITE DE LA TnpA <i>IN VITRO</i>.....	75
IV.2 ACTIVITE DE CLIVAGE DE LA TnpA.....	76
VI.3 FORMATION DU COMPLEXE SYNAPTIQUE	77
VI.3.1 CERTAINS MUTANTS ONT PERDU LA CAPACITE DE FORMER DU PEC.....	77
V.3.2 CERTAINS MUTANTS MONTRENT UNE FORMATION DE PEC ACCRUE	79
IV.4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	82
V. MATERIEL ET METHODES	83
V.1 CREATION DU VECTEUR PGINA001	85
V.1.1 PCR MUTAGENISANTE.....	85
V.1.2 RESTRICTION.....	85
V.1.3 LIGATION.....	85
V.2 PURIFICATION DE LA TRANSPOSASE.....	85
V.2.1 VECTEUR D'EXPRESSION	85
V.2.3 INDUCTION.....	86
V.2.4 LYSE	86
V.2.5 PURIFICATION	87
V.2.6 EVALUATION DE LA PURIFICATION PAR SDS PAGE	87
V.2.7 RECONCENTRATION DES PROTEINES	88
V.2.8 DOSAGE DES PROTEINES	88
V.3 RETARD SUR GEL.....	88
V.3.1 PREPARATION DU SUBSTRAT OLIGONUCLEOTIDIQUE SYNTHETIQUE	89
V.3.1.1 Marquage des oligonucléotides au γ - ³² P	89
V.3.1.2 Annealing	89
V.3.1.3 Purification	90
V.3.1.4 Réaction de Liaison et Clivage.....	90
VI. BIBLIOGRAPHIE	93

I. Introduction

Vers la fin des années 1940, la cytogénéticienne Barbara McClintock tente d'expliquer les variations de couleurs apparaissant à la surface des grains de maïs chez *Zea mays*. Ces variégations avaient précédemment été attribuées à des mutations instables de nature inconnue. McClintock observe en effet des modifications structurales au niveau du chromosome 9. Elle décrit alors le locus Ds (*Dissociation*) qui est un point de cassure du chromosome et dont l'activité semble pouvoir être *transposée* d'une position à une autre sur le chromosome. Elle observe en outre que l'activité de Ds est dépendante d'un autre locus Ac (*Activator*), dont l'activité peut également se déplacer au sein du génome. McClintock émet alors l'hypothèse que ces phénomènes sont causés par la *transposition d'hétérochromatine* (McClintock 1950). La présentation de ces résultats en 1951 laisse la communauté scientifique sceptique durant de nombreuses années. Cependant la découverte de loci semblables dans d'autres organismes et les avancées majeures dans le domaine de la génétique moléculaire durant les 30 années qui suivent, supportent et prouvent finalement son hypothèse, ce qui lui vaut d'être le récipient du prix Nobel de Médecine et de Physiologie de 1983 pour sa découverte des "Eléments génétiques mobiles" (Döring and Starlinger 1984; Fedoroff, Wessler, and Shure 1983). En effet, ses découvertes publiées en 1951 ont posé les bases de la compréhension des phénomènes de transposition en décrivant les deux premiers éléments transposables connus : Ac et Ds. Les éléments génétiques capables de transposition sont aujourd'hui regroupés sous le nom de "transposons". Au sein d'une cellule hôte, un élément transposable est défini comme une séquence d'ADN déterminée susceptible d'être déplacée ou copiée par insertion dans une molécule d'ADN cible, sans nécessiter la présence d'une séquence homologue.

A ce titre, les éléments transposables font donc partie des Eléments Génétiques Mobiles (EGM), tout comme les plasmides et bactériophages. En plus de leur capacité à se déplacer, les EGM partagent également une organisation modulaire. Ils peuvent en effet être décomposés en modules génétiques fonctionnels. Chaque module est constitué d'une série de gènes et autres séquences liées à une fonction particulière. Ils peuvent

être groupés en 3 classes selon leur fonction. L'intérêt de cette classification réside dans le fait que pour une fonction donnée, les EGM de nature différentes utilisent des modules au mécanismes semblables. Parmi les trois classes, les modules de stabilité assurent la persistance de l'EGM au sein de son hôte, les modules de mobilité intercellulaire permettent le transport de l'EGM vers un nouvel hôte et les modules de mobilité intracellulaire permettent le déplacement de l'EGM au sein de son hôte (Toussaint and Merlin 2002). Un élément transposable est ainsi composé au minimum d'un module génétique de mobilité intragénomique. Parmi les transposons en général, on distingue d'une part les éléments transposables autonomes comme Ac, dont le module est constitué de séquences délimitantes et du gène responsable de la mobilité : la transposase. D'autre part, il existe des éléments transposables non-autonomes comme Ds, dont le module de mobilité se constitue uniquement des séquences délimitantes (Fedoroff et al. 1983). Outre ce module minimal les transposons peuvent également transporter des modules de stabilité tels que des gènes de résistance aux antibiotiques. La mobilité intracellulaire du transposon leur donne la possibilité de profiter de la mobilité extracellulaire d'autres EGM (Touchon and Rocha 2007) et favorise donc leur dispersion au-delà du génome de l'hôte dans le cas des transposons prokaryotes.

Cette mobilité exceptionnelle a permis aux éléments transposables de connaître un succès particulier en tant que séquences génétiques. Des analyses génomiques effectuées sur plus de 10 millions de gènes classés selon leur rôles fonctionnels chez des eucaryotes, archées, bactéries et virus ont désigné les gènes de transposase comme étant à la fois la fonction la plus ubiquitairement encodée parmi les organismes vivants mais aussi le type de séquence généralement le plus abondant dans un génome donné (Aziz, Breitbart, and Edwards 2010). Chez les eucaryotes par exemple, on estime que les séquences dérivées d'éléments transposables constituent jusqu'à 50% du génome humain (Smit 1999; Yoder, Walsh, and Bestor 1997) et 90% du génome du maïs *Zea mays* (SanMiguel et al. 1996).

L'abondance de séquences mobiles dans un génome entraîne un réarrangement constant de son architecture (Mahillon and Chandler 1998). En effet, l'insertion d'un élément transposable dans un locus fonctionnel, qu'il s'agisse d'une séquence régulatrice ou génique, conduit en général à l'inactivation de cette fonction. Par la suite,

son excision d'un tel locus peut éventuellement réactiver cette fonction. Les observations de McClintock en sont un exemple typique. Les évènements de transposition de Ac et Ds causaient des mutations instables qui provoquaient des variations de couleurs au sein d'une même lignée cellulaire (Döring and Starlinger 1984). Par ailleurs, les transposons sont susceptibles d'acquérir des gènes passagers suite à des évènements de recombinaison ou à la formation de transposon composites par exemple. Dans ce cas, la multiplication du transposon peut augmenter le nombre de copies de certains gènes de l'hôte et son déplacement peut entraîner l'insertion de séquences régulatrices en amont de gènes et provoquer un changement de leur expression (Chuong, Elde, and Feschotte 2017). A ce titre, les transposons confèrent donc aux génomes une plasticité importante et constituent une force motrice de l'évolution (Frost et al. 2005).

Les transposons ont également un impact significatif sur le monde bactérien. Ils sont en effet un acteur majeur du transfert horizontal chez les procaryotes grâce à leur capacité à déplacer des séquences d'ADN entre les différents réplicons. Le déplacement de séquences depuis le chromosome vers un élément génétique à mobilité intergénomique comme un plasmide conjugatif leur permet de profiter du transfert horizontal. Par la suite, le déplacement de séquences nouvellement acquises depuis un réplicon instable vers le chromosome augmente sa stabilité et ses chances de transfert vertical. De ce fait, les transposons sont notamment impliqués dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques et autres facteurs de virulence (Partridge et al. 2018).

I.1 Classification des transposons

Les transposons forment un groupe d'éléments génétiques extrêmement diversifié. Ils varient notamment par leurs tailles (Arkhipova, Yushenova, and Angert 2019), leurs hôtes et leurs mécanismes de transposition. Depuis leur découverte, plusieurs méthodes de classification ont été proposées afin de faciliter leur description (Piégu et al. 2015). En fonction des différents critères utilisés, la classification simplifie la compréhension et la description des relations phylogéniques ou du mécanisme de transposition des éléments qu'elle contient.

I.1.1 Selon l'intermédiaire de transposition

Une des premières méthodes de classification des éléments transposables proposée pour les eucaryotes se base sur leur intermédiaire de transposition. Il désigne l'état transitoire adopté par la séquence transposée avant son insertion dans une cible (Finnegan 1989). Selon cette méthode, les transposons sont séparés en deux classes contenant d'une part ceux dont l'intermédiaire est une molécule d'ARN appelés transposons de Classe I, et d'autre part, ceux dont l'intermédiaire est composé d'ADN appelés transposons de Classe II. Les différences de mécanisme de transposition entre ces deux groupes sont évidemment reflétées dans la composition de leur module de mobilité (Wicker et al. 2007).

Le module de mobilité intragénomique des transposons de classe I, ou retrotransposons, contient des séquences délimitantes, une transcriptase inverse et une transposase. Lors de la transposition, la séquence transposable est transcrite en ARN puis retrotranscrite en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse. Cet ADNc est ensuite inséré dans un nouveau locus chromosomique. On distingue les retrotransposons délimités par des Long Terminal Repeats (LTR) qui produisent leur ADNc dans des particules virales et les retrotransposons non-LTR qui synthétisent leur ADNc directement au site d'insertion (Beauregard, Curcio, and Belfort 2008; Eickbush and Jamburuthugoda 2008).

Le module de mobilité intragénomique des transposons de classe II se compose au minimum de séquences délimitantes souvent sous la forme de séquences inversées répétées (*Inverted Repeats*, IR) de longueur et de structure variable et d'un gène de transposase. Parmi les transposons de classe II on distingue les transposons non-réplicatifs, dont la séquence transposable est d'abord excisée puis insérée dans la cible par la transposase et les transposons réplicatifs, dont la séquence transposable est répliquée par la machinerie de réplication de l'hôte avant ou après son insertion dans la séquence cible par la transposase (Mizuuchi 1992).

Pour compléter et préciser ce système, une classification supplémentaire basée sur le mécanisme de transposition et la transposase a été proposé en 2003 par Curcio et Derbyshire (Curcio and Derbyshire 2003).

I.1.2 Selon le mécanisme de transposition et la transposase

Le déplacement de séquences d'ADN au sein d'un génome implique nécessairement le l'insertion d'un segment d'ADN dans une cible et donc la rupture et la formation de liens phosphodiester. Le terme "transposase" (Heffron et al. 1979) désigne en général la protéine responsable de la catalyse de ces réactions. Le mécanisme de catalyse est fréquemment utilisé pour classer les transposases en 5 familles distinctes qui se caractérisent par les résidus d'acides aminés impliqués dans la réaction, la formation éventuelle d'un intermédiaire covalent protéine-ADN et l'implication éventuelle de cofacteurs ions métalliques (Hickman and Dyda 2015). En général, un nucléophile est utilisé pour attaquer un phosphore de l'armature phosphate-désoxyribose de l'ADN. Ce nucléophile peut être une molécule d'eau activée par des ions métalliques liés à l'enzyme, un groupement hydroxyle à l'extrémité 3' d'un montant d'ADN (transestérification) ou un groupement hydroxyle porté par un des acides aminés du site catalytique de la transposase.

I.1.2.1 Transposases à motif HUH

Les transposases HUH catalysent les réactions de coupure et de transfert de liaisons dans l'ADN simple brin. Elles présentent un domaine catalytique comprenant une triade de résidus 2 résidus Histidine conservés séparés par un résidu hydrophobe (HUH) et une (Y1) (Ronning et al. 2005) ou deux (Y2) tyrosines nucléophiles (Koonin and Ilyina 1993). Leur mécanisme de réaction implique la présence d'un ion métallique divalent et la formation d'une liaison intermédiaire covalente protéine-ADN (Chandler et al. 2013).

I.1.2.2 Transposases à Tyrosine

Les transposases à Tyrosine (Goodwin and Poulter 2001) sont utilisées notamment par les transposons conjugatifs qui s'excisent sous forme circulaire (Curcio and Derbyshire

2003). En plus de leur module de mobilité intragénomique, ces transposons possèdent un module de mobilité intergénomique qui permet à leur intermédiaire circulaire d'être transféré d'une bactérie à une autre par conjugaison. Les réactions de transestérification médiées par les Y-transposases impliquent la formation d'un intermédiaire covalent 3'-phosphotyrosine et ne nécessitent pas de cofacteur (Grindley, Whiteson, and Rice 2006).

1.1.2.3 Transposases à Sérine

Les transposases à Sérine partagent une grande partie de leur mécanisme catalytique avec les résolvas et recombinaisons à Sérine (Grindley et al. 2006) mais fonctionnent sans nécessiter d'homologie entre les sites de recombinaison. La réaction ne nécessite pas de cofacteur ions métalliques (Boocock and Rice 2013).

1.1.2.4 Casposases

Les casposons utilisent une intégrase homologue de l'endonuclease Cas1 du système CRISPR. En effet dans certains génomes de bactéries et archées, le gène *cas1* est présent dans des séquences délimitées par des répétition inverses presque identiques ainsi que des répétitions directes, sans être associé au d'autres gènes *cas* ou d'un locus CRISPR (Krupovic et al. 2014). Le site catalytique utilise la triade EHE et opère selon un mécanisme semblable à celui des transposases à motif DDE(D) (Hickman and Dyda 2015).

1.1.2.5 Transposases à motif DDE(D)

La plupart des transposons de classe II et les transposons de classe I de type LTR codent pour une transposase à motif DDE/(D) avec un repliement de type Ribonucléase H (*RNase H fold*) définissant une super-famille d'endonucléases hydrolytiques chez les eucaryotes, les bactéries et les archées. Au lieu du substrat ARN des RNase H, les transposases à motif DDE(D) catalysent des réactions d'hydrolyse et de transesterification dans l'ADN. Elles se démarquent des trois premières familles par l'absence d'intermédiaire covalent durant la transposition (Hickman, Chandler, and Dyda 2010).

Le mécanisme de réaction se déroule comme suit. D'abord, lors de l'étape de clivage, les trois résidus acides (D, D et [E/D]) coordonnent deux ions métalliques divalents (Mg^{2+}) avec phosphate scissile du substrat. Le phosphate subit ensuite une attaque nucléophile par un ion hydroxyle et forme un intermédiaire pentavalent planaire avant de rompre sa liaison phosphodiester, libérant ainsi l'extrémité 3' OH⁻ du substrat. Ensuite Lors de la réaction de transfert de brins, un phosphate de la cible subit une attaque nucléophile par le groupement 3' OH⁻ de l'extrémité coupée du transposon pour rompre la liaison phosphodiester ciblée et former une nouvelle liaison entre l'ADN donneur et receveur (Fig. 1) (Hickman et al. 2010).

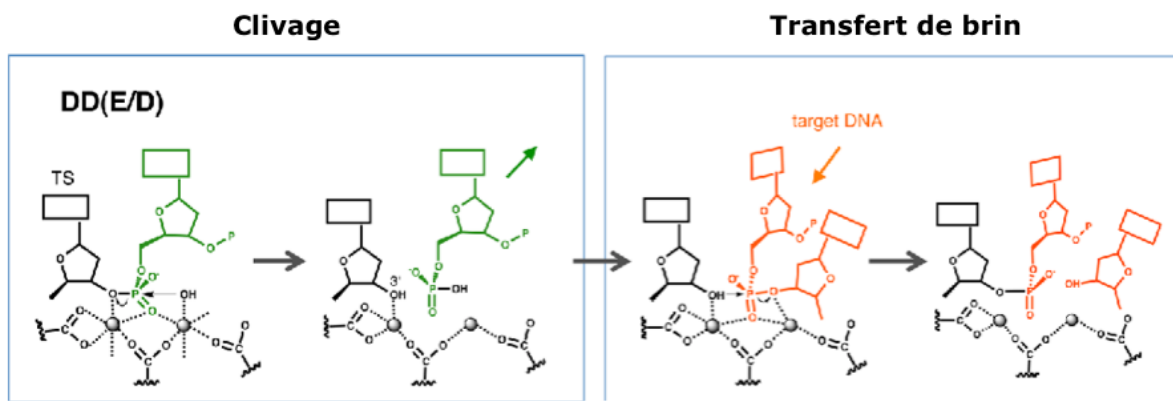


Figure I.1.2.5 : Mécanismes chimiques catalysés par les transposons à ADN. L'ADN vert représente les dinucléotides clivés et l'ADN orange représente la cible. Les boules grises représentent des ions métalliques divalents. Tirée de *Mechanisms of DNA Transposition*; Hickman and Dyda 2015 (Hickman and Dyda 2015).

I.2 Diversité des transposases à motif DDE

Si les transposases à motif DDE(D) utilisent un mécanisme commun pour couper et souder l'ADN, le nombre et la succession des réactions catalysées par la transposase dépendent du mode de transposition utilisé par les différentes familles d'éléments.

A ce jour, quelques travaux ont permis de décrire le mécanisme d'action de certaines transposases à motif DDE. Comme référence pour les transposases eucaryotes, nous utiliserons les transposons Mos1 de *Drosophila mauritania* de la famille des Tc1/mariner (Singer et al. 2019) et Hermes de *Musca domestica* de la famille hAT (hermes/Transposons d'Anthirrinum)(Hickman et al. 2018). Ensuite, comme modèle pour la transposition chez les bactéries, nous utiliserons principalement Tn5 (Reznikoff 2008), Tn7 (Peters 2014) et le bactériophage Mu (Montaño, Pigli, and Rice 2012).

I.2.1 Transposition non-répllicative

La transposition non-répllicative implique le transfert physique de la séquence d'ADN double-brin du transposon depuis un locus donneur vers un locus cible ce qui lui vaut aussi le nom de transposition "*Cut and Paste*". Durant la première étape du transfert, les quatre liaisons phosphodiester aux extrémités du transposon sont rompues pour l'exciser complètement du donneur. En principe, l'excision totale d'un segment d'ADN génère une cassure double-brin de l'ADN donneur et constitue donc une étape dangereuse pour l'hôte car des erreurs ou des manquements dans la réparation de ces coupures peuvent mener à des réarrangements génomiques ou à la mort cellulaire. En général, la recombinaison homologue permet de réparer ces cassures tout en restaurant une copie du transposon au site initial. Toutefois, chez les eucaryotes, Le mécanisme *de non-homologous end-joining* (NHEJ) intervient très souvent pour ressouder les extrémités de la cassure sans générer de nouvelle copie de l'élément. Durant l'intervalle de temps entre l'excision et l'insertion du transposon dans la cible, les formes intermédiaires des molécules d'ADN impliquées varient. Certains intermédiaires prennent la forme d'épingles à cheveux, augmentant ainsi leur stabilité jusqu'à l'insertion.

Lors de l'excision, certaines transposase catalysent d'abord une réaction d'hydrolyse à chaque extrémité du transposon. Elles utilisent ensuite les extrémités libres ainsi créées pour catalyser une réaction de transestérification intramoléculaire et former un intermédiaire en épingle à cheveux au niveau de la molécule donneuse ou au niveau de la séquence transférée (Fig. I.2).

Chez Tn10 et Tn5, la réaction d'hydrolyse à lieu au niveau de l'extrémité 3' de chaque séquence délimitante du transposon. Elle est suivie par une réaction de transestérification ciblant l'extrémité 5' située en vis-à-vis de façon à former une épingle à cheveux aux bords de l'élément excisé. Cet intermédiaire doit alors être résolu par une nouvelle réaction d'hydrolyse au niveau de chaque extrémité pour permettre l'intégration du transposon dans la cible (Fig. I.2) (Bischerour and Chalmers 2009).

Chez le transposon eucaryote Hermès, la transposase clive les extrémités au niveau des brins situés en 5'. Ce sont ensuite les extrémités 3' libres de la molécule donneuse qui attaquent le brin opposé pour former une épingle à cheveux au niveau des séquences adjacentes du donneur, tandis que les extrémités transposon excisé sont à nu (Fig. I.2) (Hickman et al. 2018).

Chez Tn7, La transposase active est un hétéromère de deux protéines différentes : la transposase à motif DDE(D) (TnsB) et une endonucléase (TnsA). Durant la transposition, chaque extrémité du transposon subit 2 réactions d'hydrolyse successives menant à son excision complète. Dans un premier temps, TnsB catalyse le clivage des extrémités en 3'. Ensuite, TnsA permet la réaction de clivage en 5' (Fig. I.2). Par ailleurs, il a également été démontré que TnsB est capable de catalyser un mécanisme de transposition de type réplcatif semblable à celui de MuA lorsque l'hétéromère comporte une TnsA inactive (May and Craig 1996).

I.2.2 Transposition réplcative

Comme son nom l'indique, le processus de transposition réplcative implique la création d'une nouvelle copie du transposon par réplcation c'est pourquoi il est aussi appelé "*Copy-paste*". Contrairement aux mécanismes non réplcatifs de type "*cut and paste*", il

n'implique le clivage que de deux liaisons phosphodiester aux extrémités du transposon au lieu de 4, et n'occasionne donc pas de cassure double-brin au niveau du donneur.

Chez l'élément transposable IS911, la transposase catalyse une seule réaction d'hydrolyse à l'une des extrémités en 3' du transposon. Le 3'OH libre est ensuite utilisé pour une réaction de transestérification qui circularise le brin clivé du transposon. Cet intermédiaire est résolu par le passage de la machinerie de réplication. Elle permet la réparation de la séquence donneuse et la création d'un intermédiaire circulaire double brin du transposon composé du brin initialement circularisé et d'un brin nouvellement synthétisé. Cet intermédiaire circulaire subit ensuite deux clivages en 3' pour libérer les extrémités du transposon et permettre leur transfert dans la cible (Fig. I.2) (Chandler et al. 2015). Ce mode de transposition de type "*copy-out-paste-in*" semble assez répandu étant utilisé par plusieurs familles de transposons pro- et eucaryotes.

Dans le mode de transposition de type "*copy in*" ou "*paste-and-copy*" du bactériophage Mu, la transposase MuA catalyse une réaction de coupure simple-brin par hydrolyse en 3' de chaque extrémité du transposon. Les extrémités 3'OH libres du transposon sont alors utilisées pour effectuer une réaction de transestérification au niveau de la molécule cible. Chaque brin du transposon est donc lié à la fois au donneur par son extrémité 5' et au receveur par son extrémité 3' créant une structure semblable aux fourches de réplifications de chaque côté du phage. Cet état est appelé intermédiaire de transfert de brin et est résolu par la machinerie de réplication de l'hôte afin de dupliquer l'élément (Fig. I.2) (Mizuuchi 1992; Shapiro 1979). La transposition intermoléculaire par ce type de mécanisme génère un produit de transposition appelé "cointégrat" où les molécules donneuses et receveuses se trouvent liées l'une à l'autre par deux copies de l'élément. Ce type de mécanisme est également utilisé par les transposons de la famille Tn3 (Nicolas et al. 2015).

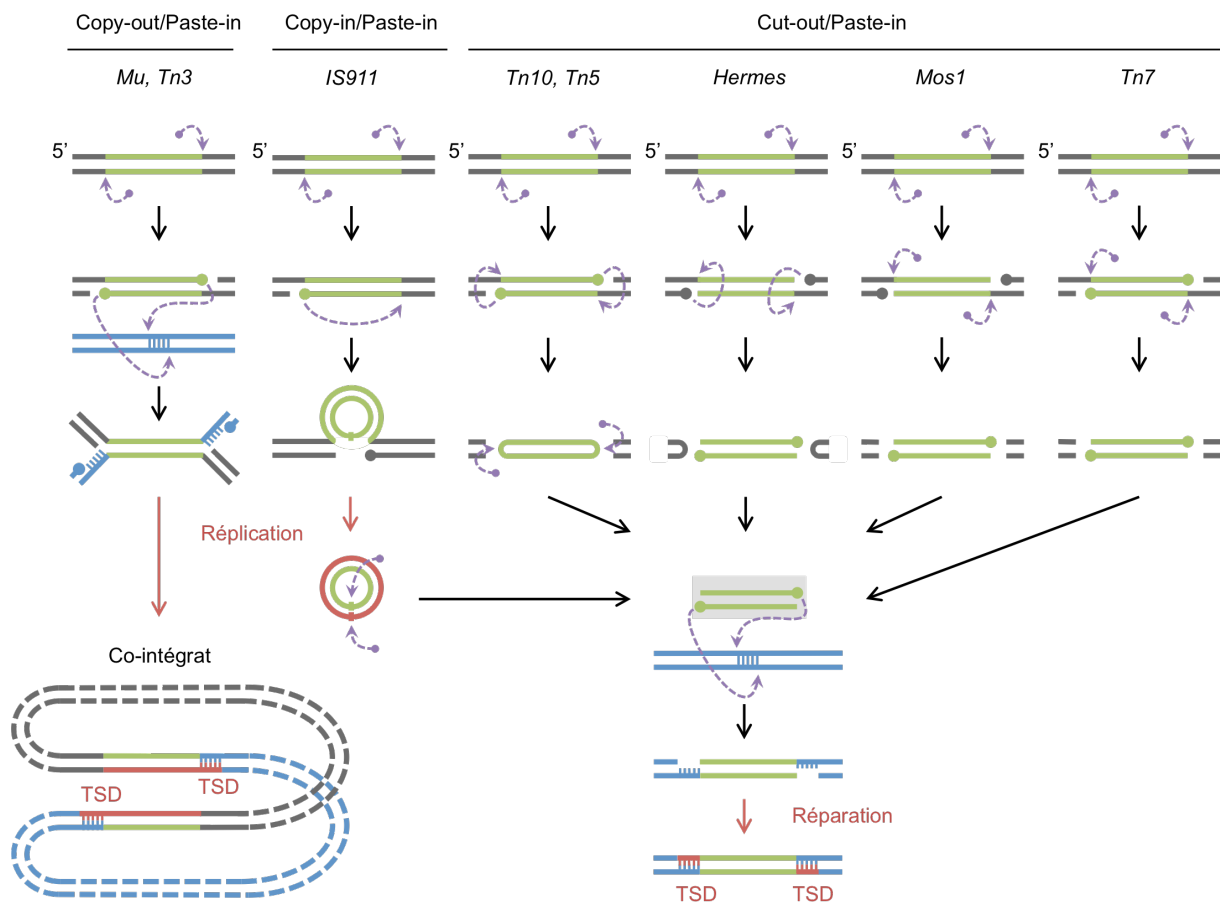


Figure I.1 : Mécanismes de transposition de la famille des Transposases à motif DDE(D). Le transposon est représenté en vert. L'ADN donneur est en gris. La cible est en bleu. L'ADN issu d'un événement de réplication est en rouge. Les points mauves représentent des molécules d'eau. Les points verts et gris représentent des groupements 3'OH. Les flèches en pointillés mauves représentent une attaque nucléophile. Les réactions de transposition provoquent la duplication de la séquence comprise entre les sites d'insertion des deux extrémités aussi appelée *Target Site Duplication* (TSD). La transposition de type *Copy-out/Paste-in* mène à la formation d'un co-intégrat où les molécules donneuses et receveuses sont liées par deux copies du transposon. Adaptée de *Hickman et Dyda 2015* (Hickman and Dyda 2015)

I.3 Anatomie des transposases à motif DDE(D)

Comme nous venons de l'illustrer, les transposases à motif DDE(D) supervisent des mécanismes de transposition variés. Cependant, malgré leur diversité, ils nécessitent les mêmes types d'interactions et les transposases DDE(D) se divisent donc généralement en domaines de fonction semblable même si leur architecture moléculaire est très différente d'une famille à l'autre (Fig. I.3). D'abord, elles sont définies par leur domaine catalytique de type RNase H. Les réactions d'hydrolyse et de transestérification qu'il catalyse se font au niveau des extrémités, reconnues de manière spécifique grâce à l'interaction avec un ou plusieurs domaines de liaison à l'ADN. En général, la transposase catalyse et coordonne ces réactions au sein d'un complexe nucléoprotéique appelé transpososome. Dans sa configuration minimale appelée complexe synaptique ou *Paired-End-Complex* (PEC), il est constitué des extrémités rassemblées par leur liaison à un multimère de transposase. Des domaines spécifiques à la multimérisation sont donc parfois identifiés. Enfin, pour réaliser le transfert de brin, le transpososome assemble le *Strand Transfer Complex* (STC) dans lequel la transposase contacte la cible via un domaine de liaison à l'ADN. Ce contact peut également être régulé par l'intermédiaire d'autres protéines auxiliaires à la transposition, auquel cas la transposase possède des domaines dédiés à ces interactions.

I.3.1 Domaine catalytique RNase H

Les transposases à motif DDE(D) partagent toutes la triade catalytique de résidus acides carboxylique D, D et E (ou D) comprise dans le repliement de type RNase H. Par contre, les autres acides aminés du domaine catalytique ne sont pas conservés. Le domaine RNase H présente une architecture formée d'un feuillet de 5 brins β entourés d'hélices α . Les différentes structures secondaires suivent généralement la séquence $\beta 1\text{-}\beta 2\text{-}\beta 3\text{-}\alpha 1\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 2/3\text{-}\beta 5\text{-}\alpha 4\text{-}\alpha 5$ et la position des acides aminés à fonction carboxylique au sein de ce domaine est conservée. Les deux résidus aspartates sont situés sur les brins $\beta 1$ et $\beta 4$ et le glutamate sur ou juste en amont de l'hélice $\alpha 4$ (Hickman et al. 2010). Chez la plupart des transposases de structure connue, le domaine RNase H est interrompu par une séquence plus ou moins longue appelée "domaine d'insertion" entre le brin $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 4$. Sa fonction varie selon les familles de transposons, elle a notamment été

attribuée à la formation de structures en épingles à cheveux (Davies et al. 1999, 2000; Hickman et al. 2005) ou encore à la liaison de GTP (Fig. I.3) (Ghanim et al. 2019; Rice 2019).

I.3.2 Domaine de liaison à l'ADN

Chaque transposon est délimité par des motifs qui lui sont propres et dont l'organisation est commune au sein de sa famille comme par exemple les IR chez Tn5, Hermes et Tn3. Le domaine de liaison à l'ADN de la transposase lui permet de reconnaître ces séquences avec spécificité, souvent via des motifs de type hélice-tour-hélice (HTH) comme c'est le cas chez Tn5, Mos1, l'élément P et Tn3.

En général, chaque monomère de transposase n'est capable de lier qu'une seule extrémité et le transpososome contient donc toujours au minimum un dimère de transposase mais il peut aussi prendre des formes plus complexes comme celui de Mu ou de Hermes qui sont constitués d'un tétramère et d'un octamère respectivement.

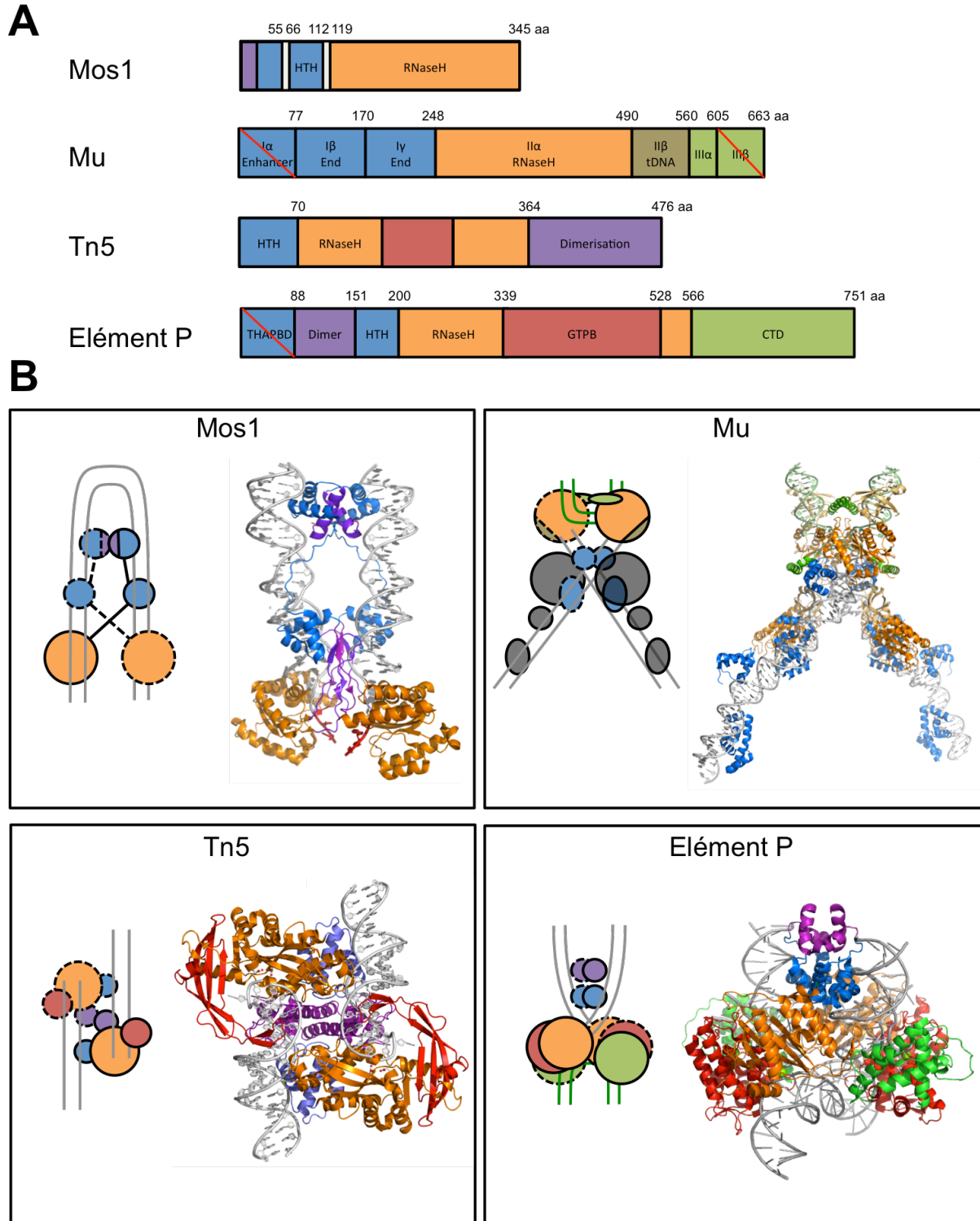


Figure 1.2 : Structure et transpososome des transposons à motif DDE(D) : (A) et (B) Le domaine RNaseH est en orange; chez Tn5 et l'Elément P il est interrompu par un domaine d'insertion en rouge. Les domaines de liaison aux extrémités sont en bleu. Les domaines responsables de la dimérisation sont en mauve. Les domaines barrés en rouge sont ceux qui ne sont pas représentés dans les structures 3D en B. **(A)** Domaines fonctionnels des transposases de Mos1, Mu, Tn5 et de l'Elément P. **(B)** Structures 3D des transpososomes de Mos1, Mu Tn5 et de l'Elément P. Pour Mu et l'Elément P, il s'agit des complexes de transfert de brin. Les extrémités synthétiques sont en gris, la cible est représentée en vert.

I.4 Transpososome et Régulation

L'assemblage du transpososome est généralement considéré comme une étape importante dans la régulation de la transposition. En effet, l'activité de catalyse des transposases n'est souvent déclenchée qu'après avoir réuni les différents partenaires de la réaction de façon à coordonner les réactions et éviter les événements de transposition abortifs ou incomplets qui peuvent être dommageables pour la cellule hôte. Cette concertation est notamment possible parce que les réactions d'hydrolyse se font souvent *en trans*. C'est-à-dire que le domaine RNase H chargé de cliver une extrémité appartient au monomère de transposase dont le domaine de liaison à l'ADN est en interaction avec l'autre extrémité (Fig. I.4C) (Hickman et al. 2010).

I.4.1 Assemblage du complexe synaptique

Une étape obligée pour la formation du transpososome est le rassemblement des deux extrémités du transposon par la transposase pour former le complexe synaptique. En fonction de son état oligomérique en solution, la transposase peut assembler le complexe synaptique de deux manières différentes.

Les transposases bactériennes de Tn5, Tn10 et MuA, monomériques en solution, n'oligomérisent qu'en présence de leur substrat. Dans un premier temps, chaque extrémité est contactée par un monomère de transposase pour former du *Single-End-Complex*. Ensuite, le PEC est formé par multimérisation (*Synapsis by Protein Dimerization* : S-PD). Les extrémités sont donc recrutées de manière simultanée (Fig. I.4B) (Blundell-Hunter, Tellier, and Chalmers 2018).

Les transposases eucaryotes de Mos1 et Hermes en revanche, sont présentes sous forme d'oligomères en solution et suivent le mécanisme de *Synapsis by Naked End Contact* (S-NEC). Dans un premier temps, un oligomère contacte une extrémité pour former du SEC. Puis, il contacte la seconde extrémité pour former du PEC. Les extrémités sont donc recrutées de manière séquentielle (Fig. I.4A) (Blundell-Hunter et al. 2018).

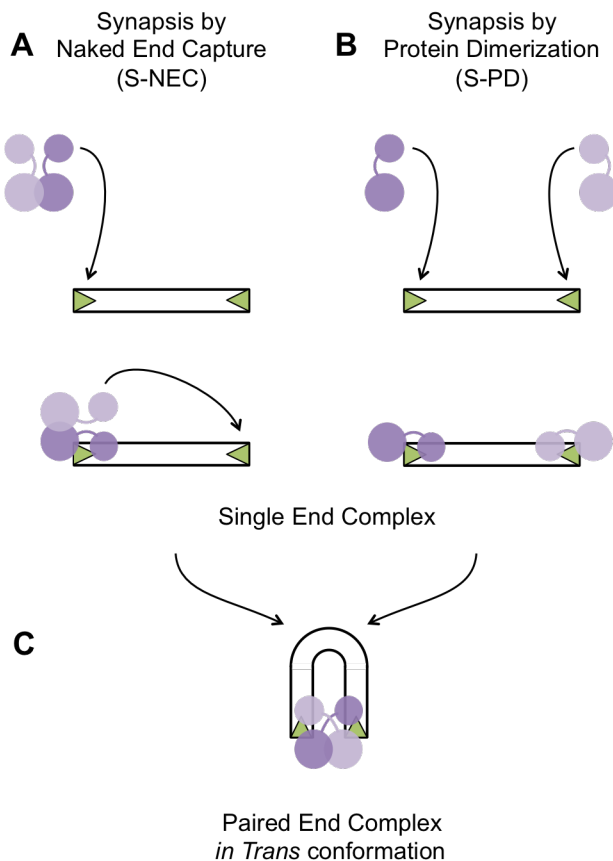


Figure I.3 : Deux mécanismes d'assemblage du transpososome. Les monomères de transposase sont représentés en mauve et mauve pâle. Les extrémités du transposon sont représentées par des triangles verts. **(A)** Un multimère de transposase contacte d'abord une extrémité du transposon puis recrute la deuxième extrémité nue pour former le Paired End Complex. **(B)** Un monomère de transposase se lie à chaque extrémité du transposon puis le Paired End Complex est formé par dimérisation. **(C)** Le transpososome est organisé *en trans*. Chaque extrémité du transposon est en interaction avec le domaine catalytique du monomère lié à l'extrémité opposée. *Adapté de* Blundell-Hunter et al. (2018).

I.4.2 Intervention de protéines endogènes

Certaines transposases bactériennes requièrent la présence de protéines de l'hôte pour l'assemblage du transpososome. Ces protéines font généralement partie de la famille des *Histone Like Proteins*, des protéines capables de lier et déformer l'ADN (Lavoie and Chaconas 1993; Whitfield, Wardle, and Haniford 2009).

Ces modifications de la géométrie de l'ADN facilitent le rapprochement des deux extrémités du transposon lors de la formation du transpososome (Haniford, Ellis, and Chandler 2015).

I.4.3 Recrutement de la cible

Le complexe final permettant l'intégration du transposon dans la cible est appelé *Strand Transfer Complex* (STC). Il contient au moins les extrémités du transposon, la transposase sous forme oligomérique et la cible.

Le recrutement de la cible dans le complexe de transposition constitue en lui-même une étape de régulation majeure. Il peut avoir lieu à différents moments du processus de transposition. Chez certains transposons, la capture de la cible est nécessaire à la formation du transpososome actif (Peters 2014). Dans d'autre cas, la cible est le dernier élément recruté avant la réaction de transfert (Sakai and Kleckner 1997).

Chaque transposase manifeste certaines préférences concernant ses sites d'insertion. Généralement, le biais d'insertion peut être décrit par une séquence consensus, souvent palindromique. Chez les éléments de la famille ITM par exemple, l'insertion se fait au niveau d'un dinucléotide AT au sein d'une séquenc palindromique. Cependant il semble que les biais d'insertion dépendent moins d'interactions sépcifiques avec la séquence exacte de nucléotides que des propriétés mécaniques et structurales de l'ADN (Craig 1997).

En particulier, la flexibilité du brin d'ADN semble être une caractéristique importante pour la sélection de la cible comme le montrent les structures 3D des STC de plusieurs transposons (Ghanim et al. 2019; Montaña et al. 2012; Morris et al. 2016). Cette disposition structurale suscite probablement le déplacement de l'extrémité hors du site catalytique de la transposase après la réaction de transfert, assurant ainsi son irréversibilité (Montaña et al. 2012).

I.4.4 Ciblage et immunité de transposition

Les transposons Tn7, Mu et Tn3 possèdent un mécanisme de régulation particulièrement complexe en ce qui concerne la sélection de la cible. Sa conséquence principale est le phénomène d'immunité de cible qui décourage les insertions multiples d'un transposon dans un même locus. Ce phénomène constitue probablement un avantage considérable pour la stabilité et la propagation du transposon. D'une part, une insertion de l'élément transposable à l'intérieur de lui-même a de fortes chances d'inactiver sa mobilité. D'autre part, la proximité de deux séquences de transposons homologues peut entraîner des délétions par recombinaison homologue (Mahillon and Chandler 1998). Enfin, le fait de privilégier l'insertion distale du transposon permet de promouvoir sa dispersion entre les différents réplicons présents dans la cellule.

Les mécanismes les mieux connus sont ceux de Tn7 et du bactériophage Mu qui nécessitent tous les deux l'intervention de protéines auxiliaires à la transposition encodées par le transposon. En revanche, le mécanisme de Tn3, encore incomplètement décrit, ne semble nécessiter aucune autre protéine que la transposase (Lambin et al. 2012a).

I.4.4.1 Tn7

Tn7 encode 5 protéines différentes (TnsA, B, C, D, E) qui lui permettent une régulation particulièrement fine de ses événements de transposition. Il se base d'abord sur les protéines de ciblage TnsD et TnsE qui décident respectivement de l'insertion du transposon dans l'ADN génomique ou dans un plasmide conjugatif. Dans le premier cas, TnsD se lie de manière spécifique à une site particulier *attTn7* présent chez la bactérie hôte. Ensuite, la protéine TnsC qui est une ATPase de type AAA (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) permet le recrutement de la transposase hétéromérique de Tn7, composée de TnsA et TnsB, liée aux extrémités de Tn7. Le transfert médié par TnsD favorise donc la stabilité du transposon en assurant sa présence dans le chromosome et donc sa transmission verticale (Fig. I.4.4.1B). Dans l'autre cas, c'est TnsE qui sélectionne la cible en reconnaissant les structures caractéristiques de la répllication des plasmides conjugatifs lors de leur entrée dans la cellule, notamment le facteur de processivité. Par

ce biais, TnsE favorise la transposition dans des éléments génétiques mobiles et donc la dissémination de Tn7 par transfert horizontal (Fig. I.4.4.1A).

Le phénomène d'immunité se base sur la capacité de TnsB de dissocier les complexes TnsCD et TnsCE et donc d'empêcher le recrutement du transpososome. Ce phénomène dépend de la concentration locale en TnsB, sa probabilité augmente donc si la cible est à proximité de sites de liaisons spécifiques pour TnsB telles que les extrémités de Tn7. Cet effet est contrebalancé par l'activité de TnsA qui est capable de stabiliser les complexes TnsC-TnsD/E-Cible et de les protéger contre le désassemblage par TnsB (Fig. I.4.4.1) (Arciszewska, Drake, and Craig 1989; Peters 2014).

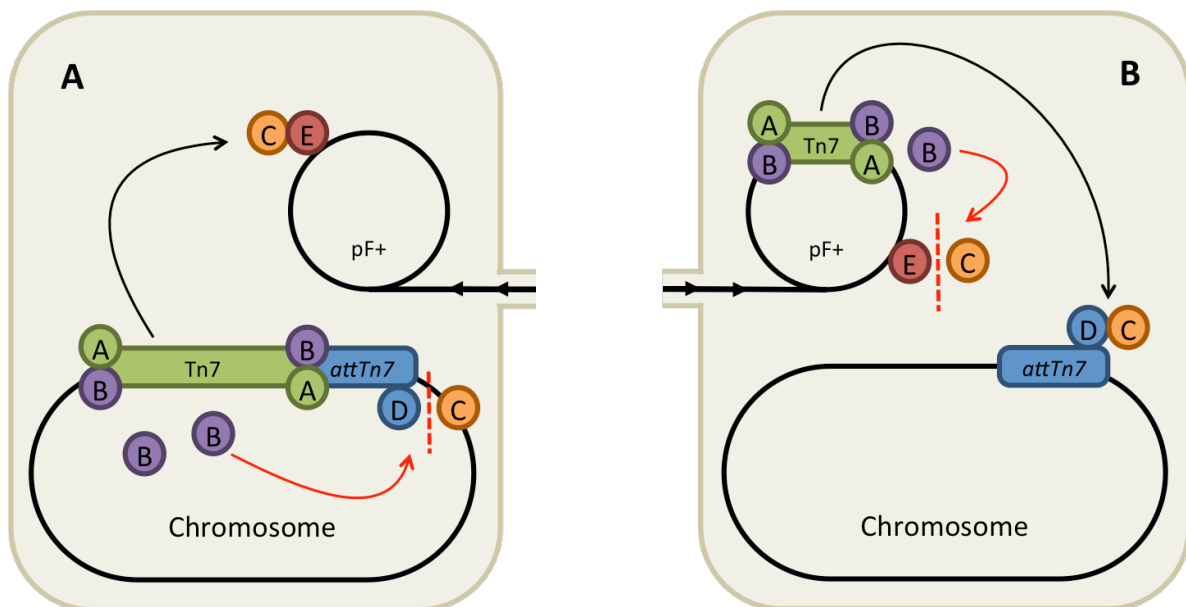


Figure I.4.4.1 : Transposition et immunité de Tn7. Les boules représentent les protéines encodées par Tn7 : L'endonuclease TnsA en vert ; La transposase à motif DDE(D) TnsB en mauve ; Le médiateur TnsC en orange ; Les protéines de ciblage TnsD et TnsE en bleu et rouge respectivement. **(A) et (B)** L'immunité est médiée par TnsB qui, en concentration importante aux abords de Tn7, dissocie les complexes formés par TnsC et TnsD ou TnsE (flèches rouges). **(A)** Transposition médiée par TnsE. TnsE interagit avec le facteur de processivité présent au niveau de plasmides conjugatifs lors de leur arrivée dans un nouvel hôte. TnsC permet le recrutement des extrémités du transposon liées à l'hétéromère de transposase TnsAB. **(B)** Transposition médiée par TnsD. TnsD se lie à la séquence *attTn7* sur le chromosome de l'hôte. TnsC permet le recrutement des extrémités du transposon liées à l'hétéromère de transposase TnsAB.

1.4.4.2 Bactériophage Mu

Outre la transposase MuA, la transposition du bactériophage Mu nécessite la protéine à activité ATPase associée MuB. En présence d'ATP, MuB se lie aux séquences d'ADN avec une préférence pour les sites AT et oligomérisse (Adzuma and Mizuuchi 1991; Eric C. Greene and Mizuuchi 2002). Ce sont ensuite les interactions entre MuA et MuB qui permettent la sélection de la cible par le transpososome (Fig. 1.4.4.2C) (Baker, Mizuuchi, and Mizuuchi 1991; Chaconas et al. 1985).

Chez le bactériophage Mu, deux phénomènes d'immunité aux mécanismes différents ont été rapportés (Ge, Lou, and Harshey 2010). Le premier type d'immunité appelé "immunité *en cis*" (Fig. 1.4.4.2B) est semblable à celui observé chez Tn7. L'insertion du phage est découragée dans un rayon de 5kDa autour de ses extrémités. Ce mécanisme se base sur des interactions entre MuA et MuB. Lorsque MuA en contact avec les extrémités de Mu, interagit avec des protéines MuB proches (i.e., liées à la même molécule d'ADN), elle suscite leur activité ATPase et provoque leur dissociation de l'ADN (Greene and Mizuuchi 2002; Han and Mizuuchi 2010). L'ADN ainsi dégagé ne constitue plus un bon site d'insertion (Baker et al. 1991; Chaconas et al. 1985). Le rayon d'action de ce type d'immunité (5kb) ne permet pas d'expliquer comment la séquence entière du phage (37kb) est protégée contre l'auto-insertion. En effet, de par sa nature de phage, Mu est amené à effectuer de nombreuses réactions de transposition durant sa phase lytique afin de multiplier sa séquence. Il amplifie son génome d'un facteur 100x et peut, en fin de phase lytique, constituer jusqu'à la moitié de l'ADN cellulaire. Sans mécanisme d'immunité protégeant la totalité de son génome, Mu serait exposé à de multiples auto-insertions, perturbant son propre fonctionnement et compromettant sa propagation.

C'est probablement la raison pour laquelle Mu possède un deuxième mécanisme appelé immunité génomique (Fig. 1.4.4.2A) qui protège toute sa séquence. Contrairement à l'immunité *en cis*, l'immunité génomique est le résultat d'une forte présence de MuB le long de la séquence du transposon. Le profil de liaison de MuB diffère entre le génome du phage et celui de l'hôte. Il a été proposé que cette différence isole le génome du phage en un domaine chromosomique indépendant inaccessible au transpososome (Ge et al. 2010).

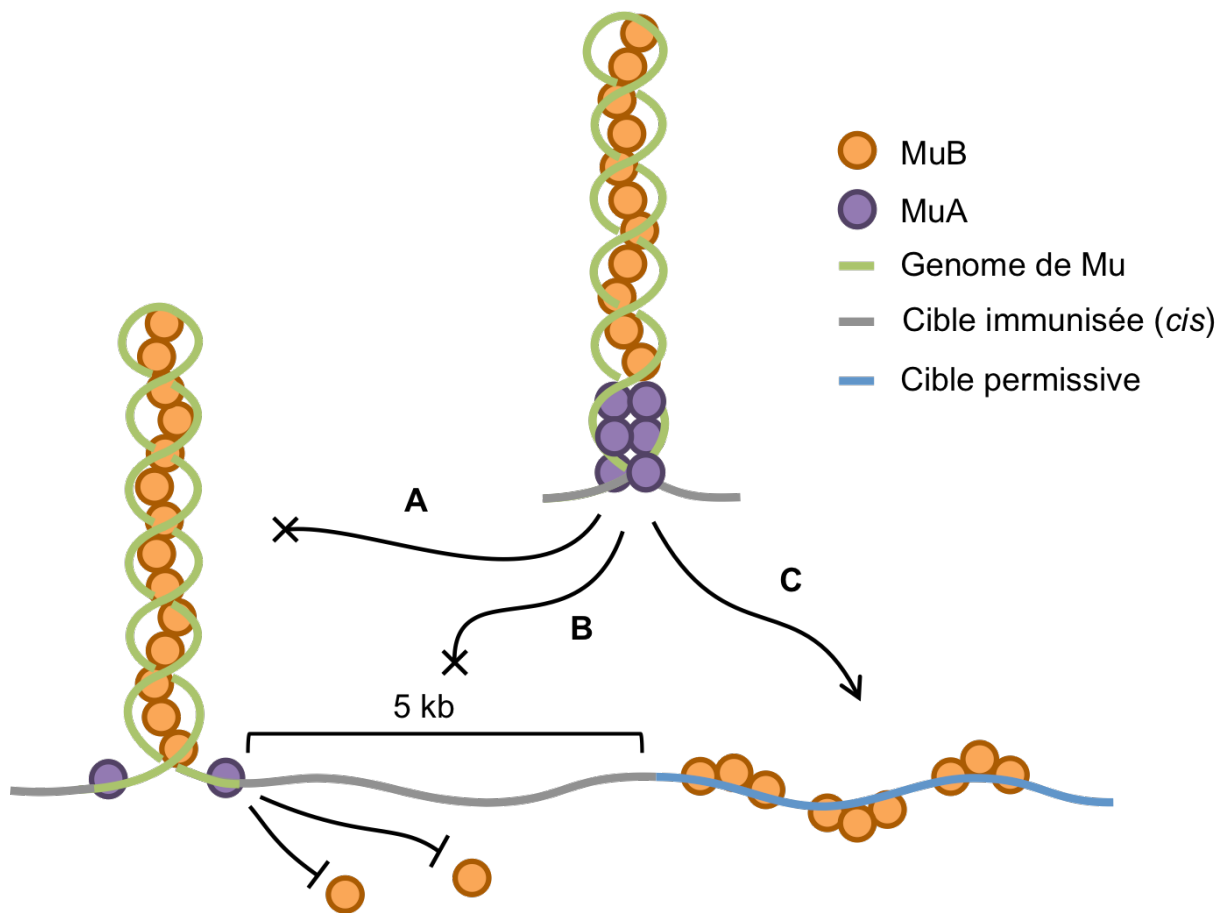


Figure I.4.4.2 : Immunité de transposition du bactériophage Mu. (A) Immunité génomique. Sous forme de polymère, MuB participe à la ségrégation du génome de Mu en un domaine distinct et inaccessible à la transposition (B) Immunité *en cis*. MuA liée aux extrémités de Mu en tant que monomère suscite l'activité ATPase de MuB et provoque sa dissociation de l'ADN dans une région de 5kb de part et d'autre du génome (C) Insertion dans une cible permissive. Le transpososome de Mu interagit avec des polymères de MuB et permet son insertion. *Adapté depuis Harshey 2015 (Harshey 2015).*

II. Contexte et objectifs

II.1 La famille de Tn3

Tn3 est l'archétype d'une famille de transposons réplicatifs présents dans presque tous les phyla bactériens. Ils sont impliqués dans la propagation des résistances aux agents antimicrobiens (Nicolas et al. 2015; Partridge and Hall 2005) et notamment les antibiotiques de derniers recours comme les carbapenems (He et al. 2016; Nordmann, Dortet, and Poirel 2012).

Les transposons de la famille Tn3 s'organisent en 3 types de modules fonctionnels. Leur module de mobilité intragénomique est constitué d'une transposase à motif DDE(D) et de séquences IR de 28 pb. En plus, ils peuvent contenir un module de résolution du co-intégrat composé d'une résolvasse et d'une séquence de recombinaison interne (IRS). La résolvasse peut être soit une recombinase à Sérine (Grindley 2002; Nicolas et al. 2015) soit une recombinase à Tyrosine (Vanhooft et al. 2006). Enfin, certains d'entre eux contiennent des modules passagers.

Comme Tn7 et Mu, Tn3 présente un phénotype d'immunité de cible qui empêche les insertions multiples du transposon dans une même région. Le phénomène est médié par les IR et la transposase (Lambin et al. 2012a; Lee, Bhagwat, and Heffron 1983; Nicolas, Lambin, and Hallet 2010). La présence d'une seule IR est suffisante pour immuniser une cible potentielle. Cette immunité est spécifique à chaque membre de la famille Tn3 (Arthur et al. 1984).

L'aspect par lequel les transposons de la famille Tn3 se distinguent le plus des modèles les mieux connus est sans doute leur transposase. Les transposases de la famille Tn3 sont largement plus grandes (950 -1020 acides aminés) que celles des autres familles de transposases DDE(D)représentées par les modèles tels que Mos1 (345 acides aminés), Mu (663 acides aminés) ou Tn7 (702 acides aminés). De plus, dans la famille de Tn3, la

transposase est la seule protéine codée par le transposon qui soit nécessaire et suffisante à la réaction de transposition. Elle régule également seule le phénomène d'immunité de cible contrairement à MuA et TnsB qui interagissent avec MuB et TnsC respectivement pour reconnaître une cible immunisée dans le cas de Mu et Tn7. La taille exceptionnelle des transposases de la famille Tn3 explique peut-être leur apparente autonomie dans les processus de transposition. Cependant, la structure 3D des transposases de la famille Tn3 n'a pas encore pu être déterminée avec précision et leur mécanisme d'action est donc encore mal connu.

Malgré leur importance, leur particularité et l'ancienneté de leur découverte, les transposons de la famille Tn3 et le fonctionnement de leur transposase est donc encore biochimiquement et structurellement mal connu.

II.2 Tn4430 comme modèle de la famille de Tn3

L'utilisation du transposon Tn4430 comme modèle a permis de nombreuses avancées dans la compréhension du mécanisme de transposition de la famille de Tn3. Tn4430 est un transposon de la famille de Tn3, découvert chez *Bacillus thuringiensis* mais complètement fonctionnel chez *Escherichia coli* (Lereclus et al. 1986). Sa séquence, longue de 7770pb, est délimitée par des IR de 38pb et comporte deux séquences géniques codant respectivement pour la transposase TnpA et l'intégrase à Tyrosine TnpI (Mahillon and Lereclus 1988). Elle comporte également une séquence IRS. Il ne contient pas de gènes passagers. Cependant, sa présence est nécessaire pour permettre à *B. thuringiensis* d'atteindre sa virulence maximale (Wang, Steggles, and Ellar 2008). En formant des structures en co-intégrats entre différents plasmides, il permet la dispersion de facteurs de virulence contre les insectes entre différentes souches de *B. thuringiensis* (Green, Battisti, and Thorne 1989).

II.2.1 Structure de la transposase TnpA

Comme les autres transposases de la famille Tn3, la TnpA est particulièrement grande (987 aa) pour une transposase de la superfamille DDE(D). A ce jour, sa structure précise n'a pas pu être déterminée par cristallisation mais une collaboration avec l'équipe de Ruslan Efremov et Alexander Shkumatov (VIB-VUB, Be) tente actuellement de l'obtenir

par microscopie cryo-électronique (cryo-EM). En attendant, les premières analyses structurales et biochimiques *in vitro* sont devenues possibles grâce à la purification d'une forme soluble et active de la TnpA (Lambin et al. 2012a). Des analyses *in silico* et des tests de protéolyse ont ensuite mis en évidence trois domaines structuraux dans la protéine (Fig. II.2.1.1).

Le domaine N-terminal de 151 aa est nécessaire à la liaison des IR. Les prédictions indiquent un repliement semblable au domaine de liaison à l'ADN de la protéine centromérique humaine CENB-P sous la forme de deux motifs hélice-tour-hélice (HTH).

Le domaine C-terminal (27kDa) est constitué des résidus d'acides aminés 682 à 987 et contient la triade catalytique DDE (Asp679 Asp751 et Glu881). Les prédictions de structure secondaire indiquent que ce domaine est susceptible d'adopter le repliement de type RNase H typique de la superfamille des transposases DDE(D). Il contient également un domaine d'insertion de 90 acides aminés dont la fonction reste inconnue.

Le domaine central (63kDa) de 530 aa ne présente de similarités avec aucun domaine protéique connu. Sa fonction est encore inconnue.

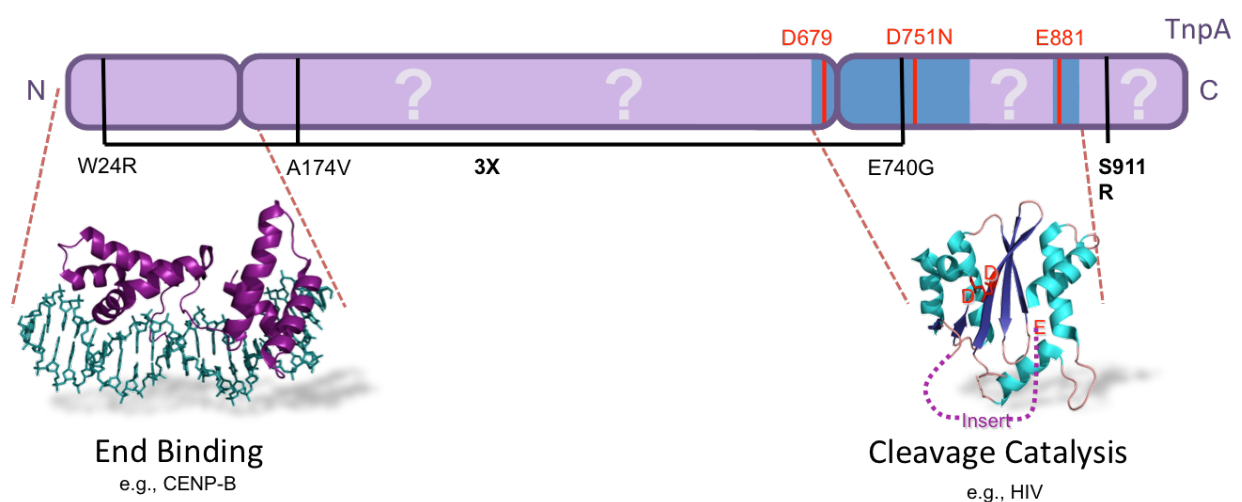


Figure II.2.1.1 : Organisation structurale de la transposase TnpA. La séquence est représentée en mauve, séparée en trois domaines. La partie bleue représente le domaine de type RNase H. Les résidus indiqués en rouge constituent la triade catalytique DDE. La mutation D751N permet de supprimer l'activité de clivage. Les résidus indiqués en noir correspondent aux sites de mutation des deux mutants T+/I- utilisés dans ce travail. Les prédictions de structures du domaine de liaison à l'ADN (DBD) et du domaine catalytique sont illustrées en dessous.

Les premiers résultats de microscopie cryo-électronique ont montré une symétrie d'ordre 2 dans la structure 3D préliminaire de la TnpA indiquant une dimérisation de la TnpA (Oger 2018). Finalement, cette année, Alexander Shkumatov a pu démontrer par plusieurs techniques différentes que la transposase est bien un dimère en solution (A Shkumatov, comm. pers.). De plus, malgré le fait que le modèle atomique soit encore en construction, il a également pu obtenir une structure 3D préliminaire décrivant l'organisation générale de la transposase et une partie de ses structures secondaires en présence et en absence de substrat composé d'IR synthétiques (A Shkumatov, comm. pers.). Ces données montrent que la liaison du substrat implique un changement de conformation important qui inclut le déploiement des domaines de liaison à l'ADN pour former un "V" dans lequel les sites de coupure des deux extrémités du transposon sont rassemblés au cœur du complexe, proche des sites catalytiques. Le changement de conformation provoque également la formation d'une cavité centrale, fermée par deux hélices α , probablement destinée à la capture de la cible (Fig. II.2.1.2).

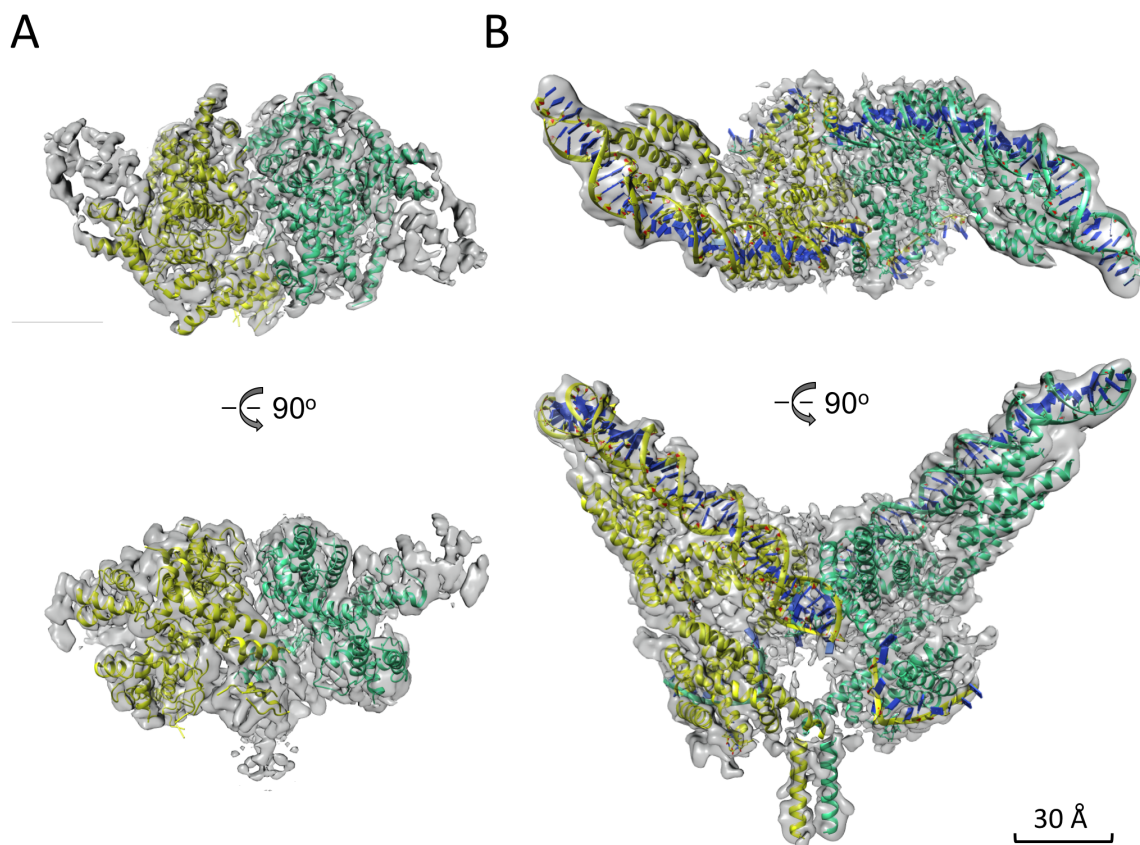


Figure II.2.1.2 : Structure 3D préliminaire de TnpA L'organisation dimérique est visible, les monomères sont représentés en jaune et en vert **(A)** Conformation libre **(B)** Conformation en *Paired end complex* (PEC) ou le dimère de transposase contacte deux IR.

II.2.2 Modèle du *Replisome hijacking*

L'étude du ciblage de Tn4430 a également conduit à reconsidérer le mécanisme de transposition répllicative de type "paste-in" proposé pour le bactériophage Mu (Cf. section I.2.2). En effet, Tn4430 montre une préférence d'insertion pour certaines des régions génomiques où les fourches de réplication sont susceptibles d'être ralenties, arrêtées ou en cours de re-démarrage (Nicolas 2011; Oger 2019; O. d'Udekem d'Acoz, résultats non publiés). De plus, des expériences réalisées avec des molécules d'ADN dont l'initiation de la réplication peut être bloquée ont montré que la réplication de l'ADN cible est absolument nécessaire à la transposition. Enfin, la TnpA montre une forte affinité pour les substrats synthétiques en forme de fourche de réplication *in vitro* et est capable d'utiliser ces substrats comme cible pour l'intégration des extrémités de

Tn4430 (Nicolas 2011; Oger 2019). Ces observations ont mené au développement d'un modèle de transposition appelé "*replisome hijacking*" selon lequel la fourche de réplication serait directement prise pour cible par le transposon (Fig. II.2.2) (Oger 2018).

Ce ciblage peut se faire par reconnaissance de la structure particulière des fourches mais éventuellement aussi par interaction avec une des protéines du réplisome. Le mécanisme proposé à l'avantage de rendre la réaction d'insertion irréversible étant donné que le réplisome résout directement l'intermédiaire de transfert de brin au moment de l'insertion et lie donc le transposon à la cible de manière permanente. De plus elle profite directement de la présence du réplisome et ne nécessite pas d'en recruter un nouveau contrairement au processus décrit chez Mu.

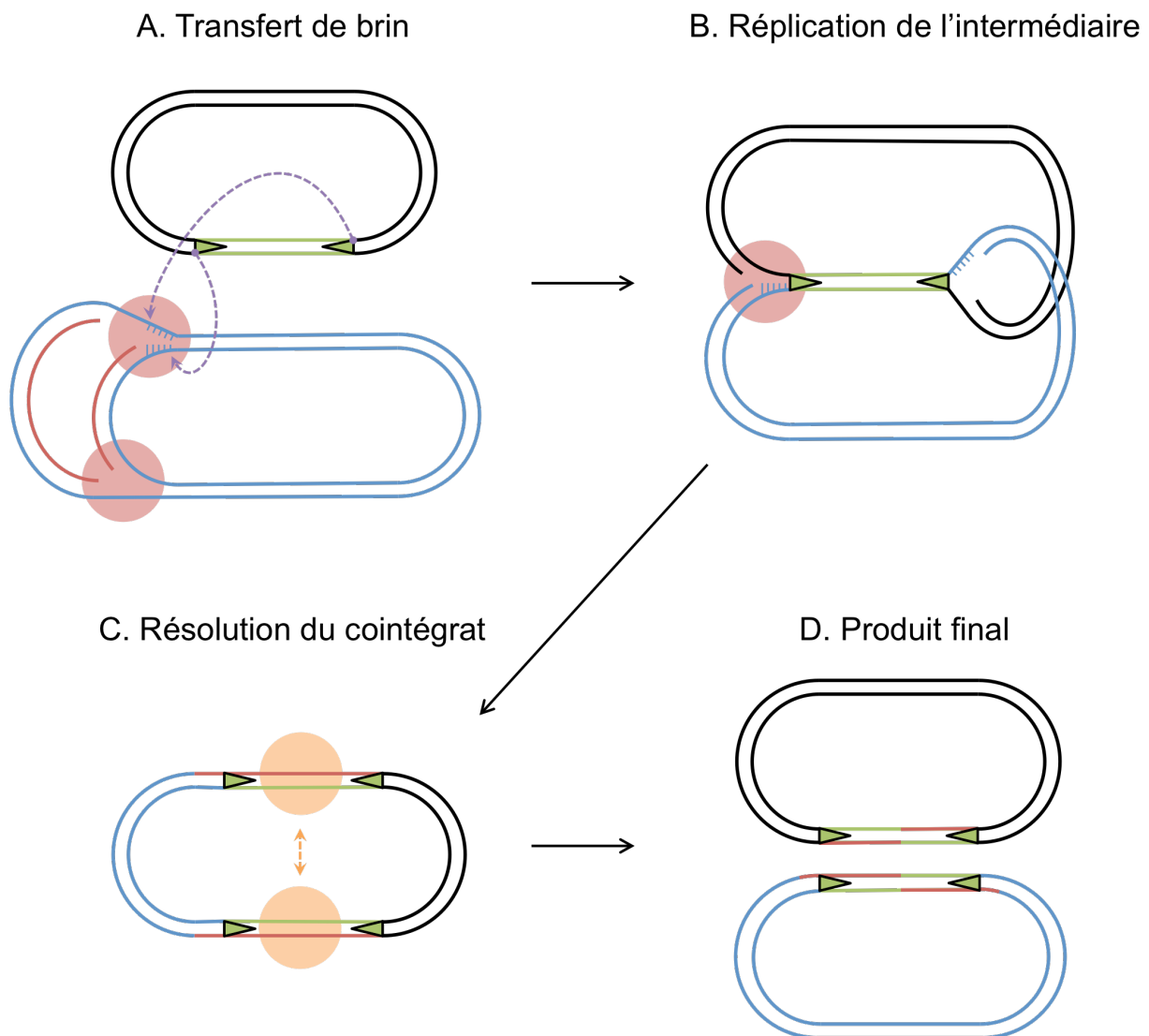


Figure II.2.2 : Modèle de transposition par *Replisome Hijacking*. Le Tn3 est en vert ; ses IR sont représentées par des triangles. La cible en cours de réplication est en bleu, les fourches de réplication sont entourées d'un cercle rouge et l'ADN nouvellement synthétisé est en rouge **(A)** Les réactions de transestérification médiées par la TnpA (flèches mauves) ont lieu en face de la fourche de réplication, à 5pb de distance l'une de l'autre **(B)** La fourche de réplication est utilisée pour dupliquer la séquence du transposon et résoudre l'intermédiaire de transfert de brin en formant un cointégrat visible en C. Cette étape de réplication entraîne également la formation de répétitions directes ou *Target Site Duplication* (TSD) **(C)** Le cointégrat est résolu par la recombinase (orange) **(D)** Le produit final inclut le donneur et la cible contenant chacun une copie du transposon.

II.2.3 Découplage des activités de transposition et d'immunité

Les mécanismes et interactions biochimiques régulant l'immunité chez les transposons de la famille Tn3 sont encore mal connus. Cependant, il a été démontré pour Tn4430 que l'activité d'immunité peut être découplée de celle de transposition (Lambin et al. 2012a). En effet, plusieurs mutants produits par *error prone PCR* dans la transposase TnpA ont été identifiés pour leur capacité à catalyser la réaction d'insertion dans des cibles immunisées. Ces mutants sont appelés T+/I- car ils ont conservé leur capacité de transposition mais ont perdu leur phénotype d'immunité. Différentes mutations étalées tout le long de la séquence de la TnpA peuvent engendrer ce phénotype (Lambin et al. 2012). Étonnamment, en plus de perdre le phénotype d'immunité, deux mutants en particulier montrent les signes d'une activité catalytique accrue (Nicolas et al., 2017). L'un d'eux contient la mutation S911R et l'autre est appelé 3X car il cumule trois mutations (W24R, A174V et E740G) (Fig. II.2.1.1).

II.2.4 Assemblage et activation du transpososome

Ces mutants ont ensuite été utilisés dans des tests *in vitro* visant à représenter les différentes étapes de la transposition et notamment l'assemblage du transpososome. Des expériences de retard sur gel ont permis de mettre en évidence la formation de deux complexes de mobilité différente lorsque la TnpA est mise en présence d'un substrat d'ADN synthétique contenant la séquence d'une IR du Tn4430. Ces complexes sont constitués d'un dimère de transposase lié à une ou deux IR, formant ainsi des structures homologues au *single end complex* (SEC) et au *paired end complex* (PEC) formés par d'autres transposases durant l'assemblage du transpososome. En présence de substrat linéaire, la TnpA WT forme essentiellement du SEC tandis que les mutants T+/I- dérégulés forment une majorité de PEC. En revanche, en présence d'un substrat d'IR synthétique imitant la coupure par la TnpA, la TnpA WT montre un profil de liaison semblable aux mutants dérégulés avec une majorité de PEC. Ces informations désignent le PEC comme un état d'activation supérieur qui est plus facilement atteint par des formes dérégulées de TnpA ou en présence de substrat déjà coupé par la transposase (Nicolas et al. 2017).

Enfin des tests de clivage *in vitro* ont également été réalisés. L'étude *in vitro* de l'activité catalytique de la transposase nécessite un contrôle négatif. Ce contrôle est obtenu par l'introduction de la mutation D751N dans les versions de transposase étudiées. L'aspartate 751 fait partie de la triade catalytique DDE de Tn4430 et sa mutation en asparagine supprime cette activité (Draime 2012). Les tests de clivage ont révélé une corrélation positive entre la formation de PEC et l'activité catalytique confortant l'idée que le PEC est un complexe activé.

La reproduction *in vitro* des différentes étapes de la transposition a donc permis de caractériser la WT et deux mutants dérégulés. Ces deux types d'activité peuvent désormais constituer un point de comparaison pour étudier d'autres mutants.

II.2.5 Bibliothèque de mutants construite par pentapeptidogénèse

Afin d'obtenir des informations sur la fonction des différents domaines de la TnpA et de mieux comprendre la régulation de son activité, une bibliothèque de mutants couvrant toute la séquence de la protéine a été préparée par pentapeptidogénèse.

La méthode de pentapeptidogénèse permet la création de mutants à la structure perturbée par une insertion de 5 acides aminés. Elle utilise le Tn4430 comme outil d'insertion.

Dans un premier temps, le Tn4430 est inséré aléatoirement dans la séquence d'intérêt par transposition (Fig. II.2.5.1A). Cette insertion provoque la création d'une répétition directe de 5pb au niveau du site cible (Fig. II.2.5.1B). Le Tn4430 contient un site de restriction KpnI à 5pb de l'extrémité de ses IR (Fig. II.2.5.1C). L'endonucléase est utilisée pour exciser le transposon mais les 5pb provenant de l'extrémité de chaque IR subsistent dans cible (Fig. II.2.5.1D). Après religation, la séquence cible possède une cicatrice de 15bp composée de la duplication du site cible (TSD) et des extrémités des IR du Tn4430 (Fig. II.2.5.1E). Cette insertion contient toujours au moins un codon Proline, un acide aminé rigide qui permet de perturber la structure de la protéine de manière locale (Hallet, Sherratt, and Hayes 1997).

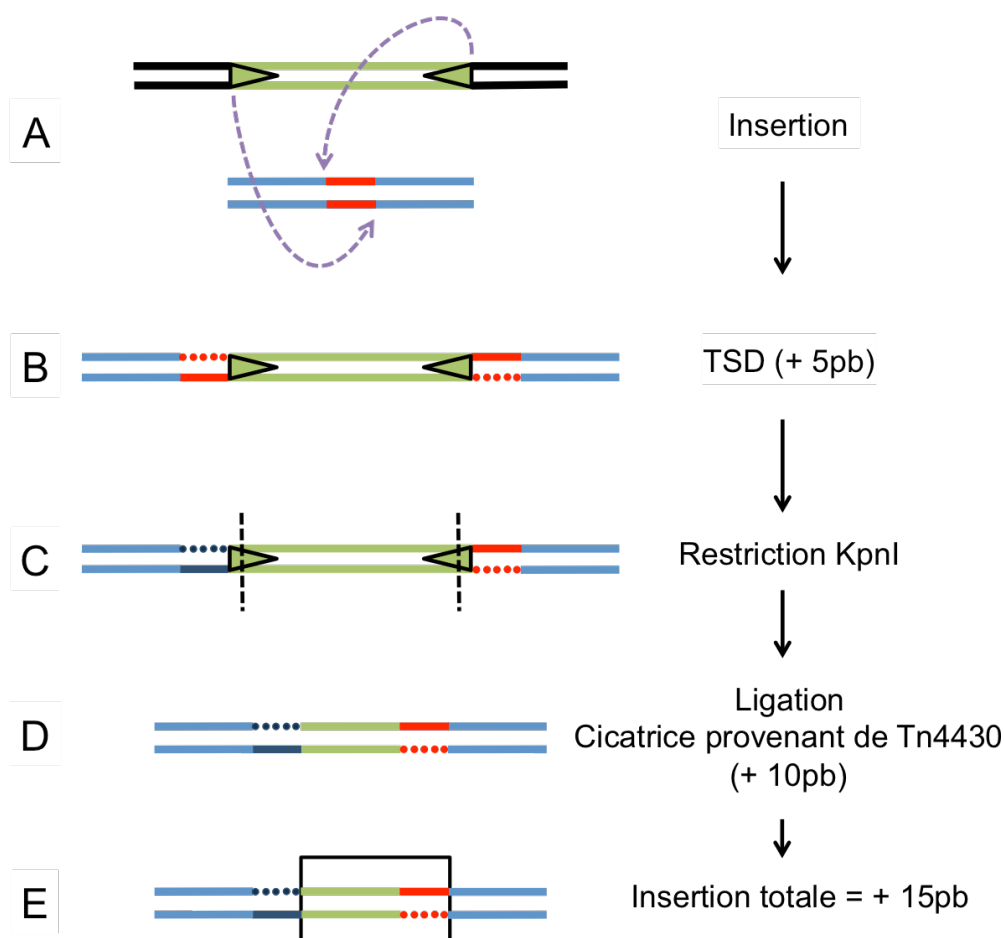


Figure II.2.5.1 : Pentapeptidogénèse. La séquence du transposon est en vert. Les triangles verts sont les IR. La séquence dupliquée est en rouge. Les flèches mauves représentent les attaques nucléophiles médiées par la TnpA durant l'insertion. Les lignes pointillées noires représentent la digestion par KpnI **(A)** Le Tn4430 s'insère dans la cible permissive via 2 réactions de transestérification distantes de 5pb. **(B)** L'insertion provoque une duplication de 5pb au niveau du site cible aussi appelée *Target Site Duplication* (TSD) **(C)** Le produit de transposition est restreint par l'enzyme KpnI à 5pb à l'intérieur des extrémités en répétition inverses. **(D)** La religation du produit de coupure conserve 5pb provenant des extrémités du transposon. **(E)** La cible originale est restaurée avec une insertion de 15pb au niveau du site d'intégration.

Cette technique a donc permis de créer une bibliothèque de 33 TnpA mutantes dont les sites de mutation couvrent toute la longueur de la séquence. Des tests *in vivo* ont d'abord été effectués sur ces transposases mutantes afin de caractériser leur activité de transposition et d'immunité. Ils ont été triés en différentes catégories en fonction de leurs caractéristiques, puis 17 de ces mutants, ont été choisis pour être purifiés et caractérisés *in vitro* (Fig. II.2.5.2). pour leur capacité à lier la séquence IR de Tn4430

(formation du SEC), des IR pré-coupés (formation du PEC) et une cible en forme de fourche de réplication (Marchese 2016).

Ces analyses ont permis de mettre en évidence 5 mutants permissifs, donc capables d'effectuer la transposition *in vivo*. Étonnamment, parmi eux, TnpA^{p209} ne montre aucune activité *in vitro*. Les quatre autres (TnpA^{p203}, TnpA^{p205}, TnpA^{p213} et TnpA^{p786}) ont une activité *in vitro* proche de la WT.

Les autres mutants ont tous perdu leur capacité de transposition *in vivo*. Leur caractérisation *in vitro* devait préciser l'origine de leur dysfonctionnement. En reliant ainsi la perte d'une fonction de la transposase à un locus précis de sa séquence on espère mieux comprendre son organisation structurale.

Parmi eux, l'inactivité de TnpA^{p103} et TnpA^{p184} s'explique par leur incapacité à lier les IR *in vivo*. Ces deux mutations sont proches du domaine N-terminal de liaison à l'ADN de la TnpA. Le mutant TnpA^{p184} conserve cependant toutes ses capacités de liaison *in vitro* (IR et ADN cible) tandis que TnpA^{p103} ne conserve que la capacité de liaison à une fourche synthétique.

Les mutants TnpA^{p298} et TnpA^{p620}, TnpA^{p636} et TnpA^{p637} ont perdu la capacité de lier des IR pré-clivées. La liaison à ces structures permet la formation de complexes activés chez la WT. Il semble donc que ces versions de la TnpA aient été mutées dans un locus nécessaire à l'activation et à la formation de PEC.

Les mutants TnpA^{p690} et TnpA^{p437} présentent seulement une activité diminuée pour la liaison à la fourche.

Enfin 3 mutants (TnpA^{p564}, TnpA^{p672} et TnpA^{p736}) se montrent performants pour tous les tests *in vitro* mais pas pour la transposition *in vivo*.

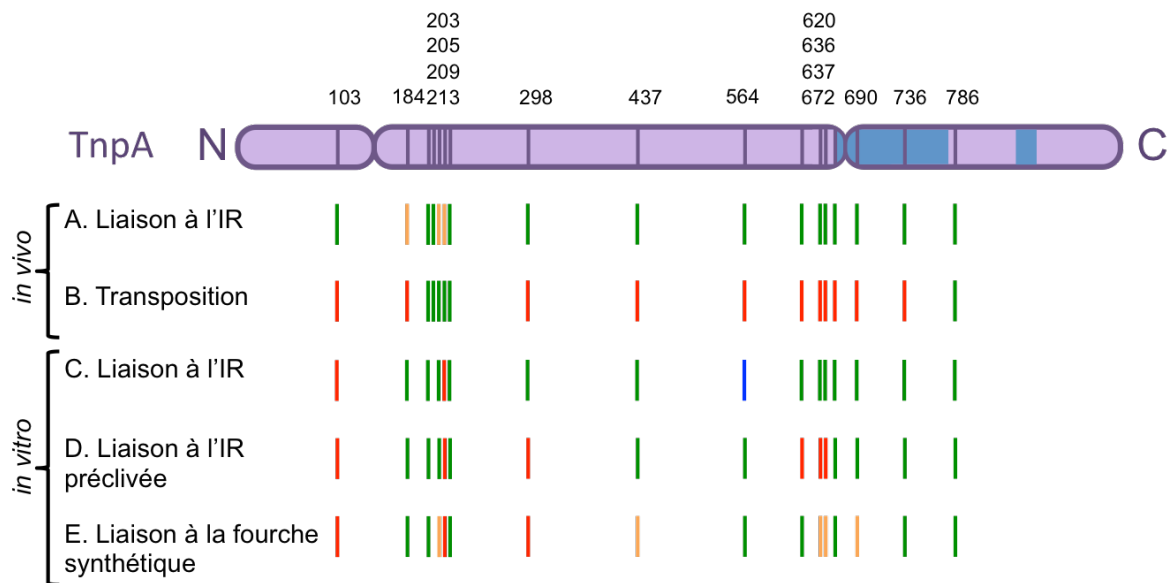


Figure II.2.5.2 : Activité des mutants pentapeptidogéniques : Cette image représente les résultats fournis par Damien Marchese. La structure primaire de la transposase divisée en ses trois domaines prédits est représentée en mauve. Le domaine susceptible d'adopter un repliement de type RNase H est en bleu. Les bandes mauves et les valeurs chiffrées représentent la position de l'insertion de 5 acides aminés chez chaque mutant. Les traits verts indiquent une activité semblable à celle de la transposase sauvage. Les traits oranges indiquent une activité inférieure à celle de la sauvage. Les traits rouges indiquent une perte d'activité. Les traits bleus indiquent une activité semblable à celle des mutants T+/I-dévrouillés. A. Liaison à l'IR *in vivo*; B. Transposition *in vivo*; C. Liaison à l'IR *in vitro*; D. Liaison à l'IR préclivée *in vitro*; E. Liaison à la fourche synthétique *in vitro*; Adaptée depuis (Marchese 2016).

II.2.6 Objectifs

Les transposons de la famille de Tn3 ont un impact significatif sur le monde vivant notamment via leur implication dans la dissémination de résistances antibiotiques. Pourtant, en comparaison avec d'autres familles de transposons pour lesquels l'organisation de la transposase et l'architecture du complexe de transposition (transposome) ont été décrites, on connaît encore mal les relations structure-fonction qui régissent le fonctionnement des transposases de la famille de Tn3. Celles-ci font partie de la superfamille de transposases à motif DDE(D) mais s'en distinguent par leur taille exceptionnelle (~1000 aa). De plus elles ont peu de similitudes avec d'autres protéines connues.

Dans notre équipe, c'est le transposon Tn4430 et sa transposase TnpA qui sont utilisés comme modèles pour l'étude de la famille de Tn3. A ce jour les seules données disponibles sur l'organisation fonctionnelle de TnpA proviennent de prédictions de structures secondaires et ne couvrent pas toute la séquence protéine. Elle possède pourtant de multiples activités. En effet, lors de la réaction de transposition elle doit se lier spécifiquement aux IR de Tn4430 et les rassembler dans un complexe appelé Paired End Complex (PEC) pour pouvoir catalyser une réaction de coupure à leur extrémité 3'. Elle doit également capturer une cible dans laquelle elle transfère les extrémités coupées mais cette dernière étape est régulée par un mécanisme d'immunité qui empêche les insertions multiples de Tn4430 dans un même locus. Les bases moléculaires de ce mécanisme de répulsion restent pratiquement inexplorées.

Au cours d'un travail précédent, notre équipe a entrepris d'identifier les domaines responsables de ces différentes activités en menant une approche de mutagenèse par balayage basée sur la technique de "pentapeptidogénèse". Une bibliothèque de TnpA mutantes contenant l'insertion de 5 acides aminés en phase à différentes positions a été construite et caractérisée *in vivo* et *in vitro* pour l'activité de transposition et la liaison aux IR et à la cible.

L'objectif de ce travail est de poursuivre l'étude de ces mutants en caractérisant leur activité catalytique pour la coupure en 3' des extrémités. L'activité des mutants sera comparée à celles de la TnpA sauvage et aux mutants T+/I- dérégulés (TnpA^{3X} et TnpA^{S911R}) qui sont affectés dans le processus d'immunité. Ces mutants ont montré une formation de PEC et une activité catalytique accrue par rapport à la TnpA sauvage.

Une étape préalable à ce travail sera la construction d'un mutant catalytique du variant dérégulé TnpA^{3X} afin de compléter la panoplie de protéines qui seront utilisées dans les expériences contrôles de l'étude. Ces protéines de références seront ensuite utilisées pour mettre au point un test *in vitro* permettant de détecter l'activité de coupure des extrémités de Tn4430 par la TnpA. Ce test se base sur l'utilisation d'un substrat d'ADN radiomarqué contenant la séquence IR du Tn4430 avec une interruption simple brin en vis-à-vis du site de coupure de la TnpA. De cette manière, la coupure catalysée par la TnpA libère un segment d'ADN facilement identifiable par électrophorèse et autoradiographie. Une sélection de 17 pentapeptidomutants seront ensuite purifiés afin de déterminer leur capacité à lier le substrat modifié, à former le PEC et à introduire une coupure en 3' de la séquence IR. L'interprétation des résultats fournira des informations sur les régions de la protéine impliquées dans la formation du PEC et l'activité de coupure. A terme, les résultats pourront également être confrontés aux données de structure 3D obtenues par Cryo-EM sur le complexe de transposition et son fonctionnement.

III. Résultats

III.1 Construction d'un mutant catalytique de la transposase dérégulée TnpA^{3X}

Il est essentiel pour valider l'activité d'une enzyme de disposer de mutants catalytiques pouvant servir de contrôles négatifs aux expériences. Des mutants inactifs de TnpA sauvage et du mutant T+/I- TnpA^{S911R} ont été créés précédemment par mutation de l'aspartate D751 de la triade catalytique DDE en asparagine (TnpA^{D751N} et TnpA^{S911R-D751N}). Afin de compléter ces contrôles, une première mission de ce travail a été de construire un mutant équivalent de la transposase dérégulée TnpA^{3X} par PCR mutagénisante (Fig. III.1).

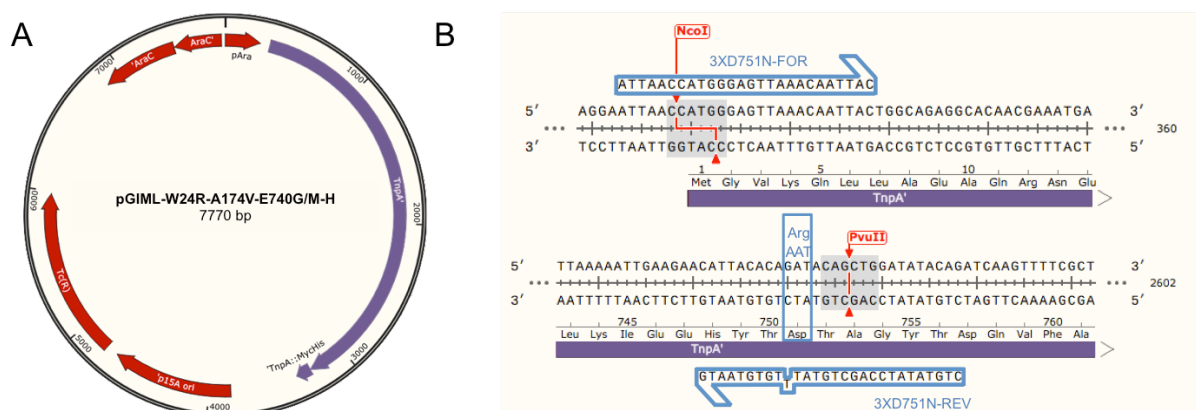


Figure III.4.1 : Vecteur et amorces utilisés pour la construction du mutants TnpA^{3X-D751N}. Le gène de la TnpA^{3X} est en mauve **(A)** Vecteur d'expression de la TnpA^{3X}. **(B)** Régions du vecteur hybridées avec les amorces mutagénisantes. L'amorce 3XD751N Forward contient un site de restriction NcoI couvrant l'ATG initiateur du gène tnpA (en rouge). L'amorce 3XD751N Reverse contient un site de restriction PvuII (en rouge), ainsi que la mutation D751N.

Pour cela, le vecteur pGIML-W24R-A174V-E740G/M-H exprimant la TnpA^{3X} étiquetée par un tag de type (His)₆ sous le contrôle du promoteur inductible pAra a été purifié et utilisé comme matrice (Fig.III.1.1A). Deux amorces ont été conçues pour la PCR mutagénisante (Fig. III.1.1B). L'amorce 3XD751N-Forward (26bp) est parfaitement

complémentaire au brin non-codant et s'hybride au début de la séquence *tnpA* au niveau du site de restriction *NcoI* recouvrant le codon initiateur ATG du gène. L'amorce *3XD751N-Reverse* contient une substitution par rapport au brin codant de manière à remplacer le codon GAT de l'Aspartate 751 par un codon Asparagine AAT. Cette amorce contient également un site de restriction *PvuII* naturellement présent dans la séquence de *tnpA*, à proximité du codon Asp751. L'amplification de l'ADN au moyen de ces deux amorces permet donc de générer un fragment interne du gène de *tnpA* (2258 pb) contenant la substitution D751N (Fig. III.1.1B).

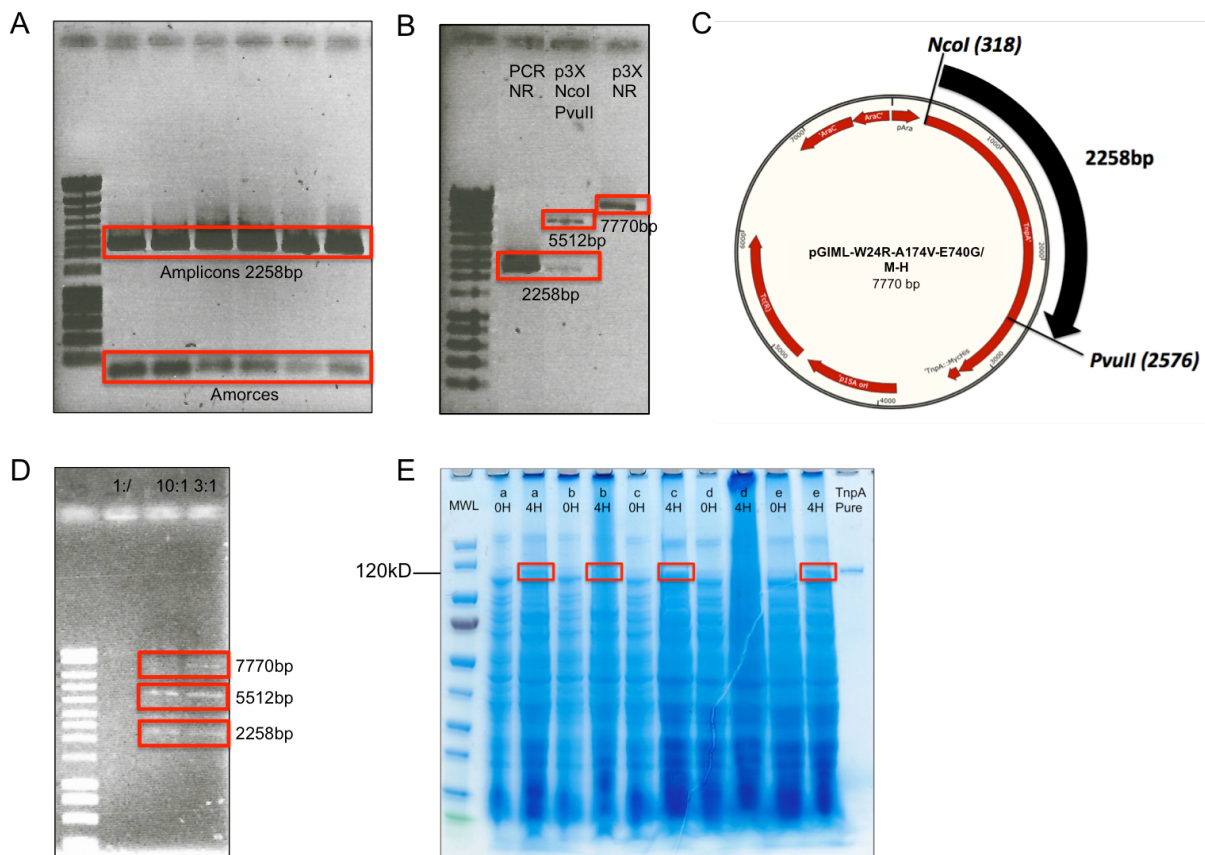


Figure III.1.2 : Contrôles par électrophorèses sur gel d'agarose. (A) Electrophorèse du produit de PCR mutagénisantes **(B)** Electrophorèse du produit de la PCR mutagénisante non restreint (NR) et du vecteur restreint par *NcoI* et *PvuII* (p3XNcoI *PvuII*) ou non restreint (p3XNR) **(C)** Produits de restriction attendus en (B) **(D)** Electrophorèse du produit de ligation avec des proportions différentes d'insert : plasmide ; "1/" contient juste l'insert. **(E)** SDS PAGE contenant la production protéique des 5 clones D751N (a, b, c, d, e) avant et après 4H d'induction.

Les résultats de la PCR mutagénisante chargés sur gel d'agarose montrent la présence d'un fragment d'une longueur équivalente à celle du fragment NcoI-PvuII du vecteur de départ comme attendu (Fig. III.1.2A). Le vecteur pGIML-W24R-A174V-E740G/M-H et l'amplicon ont ensuite été digérés avec les enzymes NcoI et PvuII afin de permettre l'insertion de l'amplicon muté à la place de la séquence initiale de la TnpA^{3X} par ligation. La restriction du vecteur donne des bandes attendues correspondants au fragment à remplacer (2258 pb) et à la matrice (5512 pb) (Fig. III.1.2B et C). La matrice du plasmide receveur a préalablement été purifiée sur gel d'agarose afin d'éviter sa religation avec la séquence non mutée initiale. L'efficacité de la ligation a été vérifiée pour deux proportions d'insert vs matrice (Fig. III.1.2D). Le résultat de l'électrophorèse montre comme attendu la présence de l'insert (2258 pb) et du plasmide receveur (5512 pb) de départ, ainsi que plusieurs bandes de plus grandes tailles provenant de la soudure des deux fragments.

Le produit de ligation a ensuite été transformé par électroporation dans une souche *E. coli* TOP10 F- compétente. Un séquençage partiel réalisé à l'aide de l'amorce Tn -2 s'hybridant à 150 nt en amont du site de mutation a permis de montrer que la substitution D751N était présente chez 5 des 7 clones analysés.

Afin de vérifier l'intégrité de la transposase TnpA^{3X-D751N} mutante, les 5 clones ont subi une induction de 4h à l'arabinose et les extraits protéiques ont été analysés par SDS PAGE. Quatre des 5 échantillons montrent clairement l'induction d'une bande au même niveau que la protéine pure (Fig. III.1.2E). Enfin, le séquençage complet d'un de ces clones a confirmé la présence du vecteur d'expression du mutant TnpA^{3X-D751N} baptisé pGINA001.

III.2 Purification des transposases

Dans un second temps, ce travail a nécessité la purification de tous les variants de TnpA c'est-à-dire la TnpA^{WT}, les mutants T+/I- TnpA^{3X} et TnpAS911R, leurs homologues portant la mutation D751N les rendant incapables de catalyser la réaction de coupure et enfin les 17 pentapeptidomutants. Nous disposons de vecteurs d'expression pour chacun de ces mutants, dans lesquels le variant du gène *tnpA* se trouve en fusion traductionnelle avec un Tag MycHis₆ en aval d'un promoteur pAra inducible par l'arabinose. Dans un premier temps, les souches d'E. coli contenant ces vecteurs ont été cultivées en présence de benzyl-alcool pour induire la production de chaperonnes qui augmentent la proportion de protéines solubles et correctement repliées dans la cellule. La production des variants de TnpA est ensuite induite par culture en présence de L-arabinose durant 4h. Le succès de l'induction est ensuite confirmé par SDS PAGE lorsqu'une bande de 120kD apparaît (Fig. III.2). Après lyse cellulaire, la transposase est purifiée par rétention sur une colonne de nickel grâce à son Tag MycHis₆. Elle est finalement éluée suite au lavage de la colonne avec un tampon contenant des concentrations croissantes d'imidazole. La présence de TnpA dans les fractions d'élutions est ensuite confirmée par SDS-PAGE dénaturante (Fig. III.2). Pour terminer, les protéines sont reconcentrées pour atteindre les concentrations décrites dans le Tableau III.2 puis stockées à -80°C.

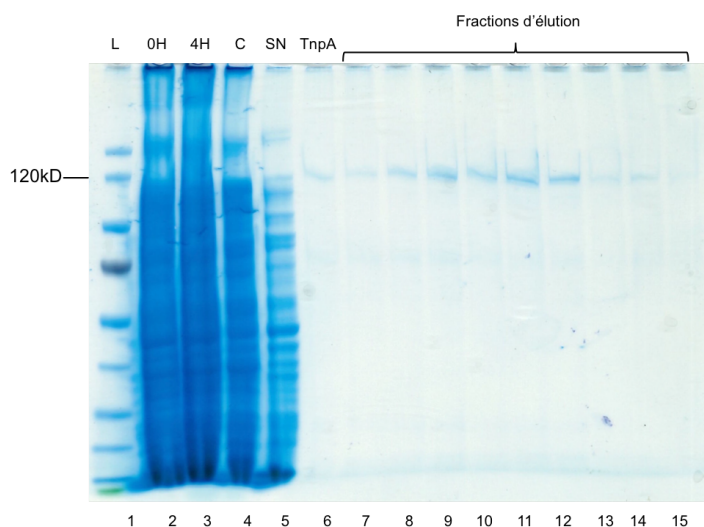


Figure III.2 : Purification de TnpA^{3X-D751N} par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. SDS-PAGE en conditions dénaturantes. **L** : Marqueur de taille moléculaire **0H** : Contrôle avant induction **4H** : Contrôle après 4h d'induction; **C** : Culot; **SN** : Surnageant; **TnpA** : Contrôle positif.

Table III.2 : Résultats des purifications et reconcentrations de variants de TnpA

Protéine	Concentration (µg/ml)	Concentration (nM)
TnpA ^{WT}	437	3846
TnpA ^{D751N}	216,272704	1903,138895
TnpA ^{S911R}	51,35714286	451,9085121
TnpA ^{S911R-D751N}	37,63636446	331,1894092
TnpA ^{3X}	98	862,33
TnpA ^{3X-D751N}	60,27777749	530,4274682
TnpA ¹⁰³	15,25	134
TnpA ¹⁸⁴	62,9	554,35
TnpA ²⁰²	256,25	2254,927842
TnpA ²⁰⁵	34,58333333	304,323595
TnpA ²⁰⁹	120,4166667	1059,632758
TnpA ²¹³	69,58333333	612,3137393
TnpA ²⁹⁸	142,0833333	1250,293324
TnpA ⁴³⁷	209,5833333	1844,274317
TnpA ⁵⁶⁴	60,62	533
TnpA ⁶²⁰	87,49	769
TnpA ⁶³⁶	43,12	379
TnpA ⁶³⁷	61	539
TnpA ⁶⁷²	167,9166667	1477,619383
TnpA ⁶⁹⁰	52,08333333	458,3186671
TnpA ⁷³⁶	57,53846609	506,3222992
TnpA ⁷⁸⁶	37,08333333	326,322891

III.3 Mise au point d'un test de coupure au niveau des extrémités 3' de Tn4430

Les protéines de référence TnpA^{WT}, TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} et leurs mutants catalytiques respectifs (TnpA^{WT-D751N}, TnpA^{S911R-D751N} et TnpA^{3X-D751N}) ont été purifiées et utilisées pour mettre au point un test biochimique permettant de visualiser facilement la coupure catalysée par la TnpA au niveau des extrémités 3' de Tn4430. Le principe du test repose sur l'utilisation d'une molécule d'ADN linéaire radiomarquée (100 pb) contenant la séquence IR (38 pb) du transposon. Le substrat est assemblé par hybridation de 3 oligonucléotides complémentaires de façon à contenir une interruption simple-brin en 5' du bord externe la séquence IR (Fig. III.3A, Cf section V.3.1.2 du chapitre "Matériel et méthodes"). Dès lors, la coupure du brin opposé catalysée par la TnpA au niveau de l'extrémité 3' de l'IR génère une cassure double-brin, libérant ainsi 2 segments d'ADN de taille inférieure au substrat de départ, facilement différenciables dans un gel d'électrophorèse (Fig. III.3B). Le marquage radioactif (P³²) réalisé du côté 5' du brin hydrolysé par la TnpA permet en outre d'augmenter la sensibilité de détection du produit de coupure

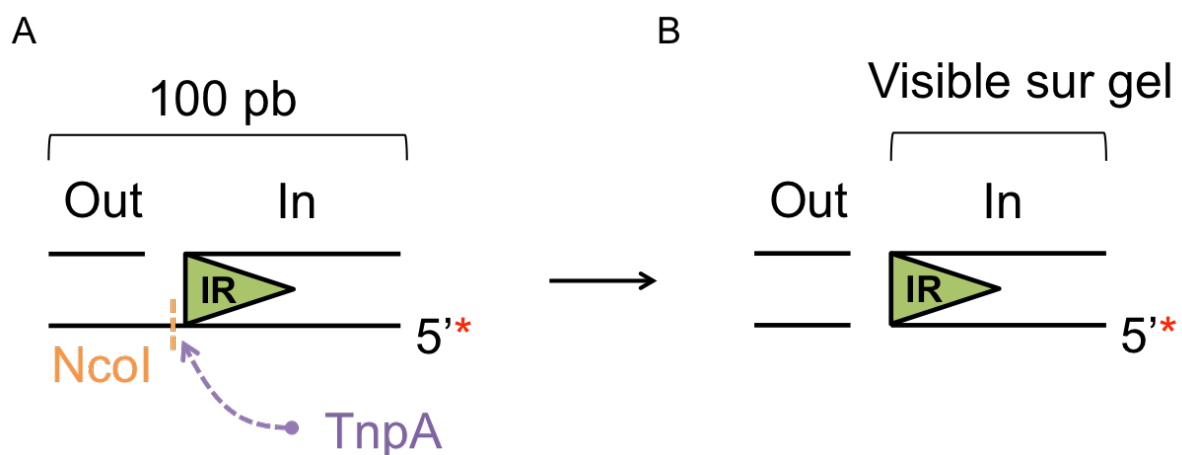


Figure III.3 : Substrat IR synthétique. (A) Le substrat long de 100 pb contient les 38pb de l'IR de Tn4430 représentée par le triangle vert. Il est marqué par un phosphate radioactif (étoile rouge) à son extrémité 5' interne. Il contient une interruption simple-brin (*nick*) de sa séquence en 5' du côté externe de l'IR. La flèche mauve représente l'hydrolyse médiée par la transposase en face du *nick*. Un site de coupure reconnu par l'enzyme NcoI a été introduit afin qu'elle coupe au même endroit que la TnpA **(B)** Résultat du clivage. Seule la partie interne du substrat est visible sur les gels grâce à son phosphate radioactif.

III.3.1 Contrairement à la coupure en 3', la coupure en 5' de l'IR n'affecte pas la liaison de TnpA

Une étude précédente a montré que la présence d'une cassure simple-brin (*nick*) imitant la coupure du substrat par la TnpA en 3' externe de l'IR synthétique favorise la formation du complexe nucléoprotéique d'ordre supérieur (PEC) (Nicolas et al. 2017). L'effet de cette modification sur le substrat peut être due à sa ressemblance avec un substrat déjà hydrolysé par la TnpA mais on ignore si d'autres facteurs comme la flexibilité ou la structure générale du segment clivé jouent également un rôle. Il est donc possible que la présence d'un *nick* en 5' externe de l'IR modifie sensiblement la formation de complexes par rapport à une IR intacte. L'objectif de ce mémoire étant notamment d'évaluer le rapport entre la nature des complexes nucléoprotéiques formés par différentes TnpA et leur activité de clivage, il était préalablement nécessaire de caractériser l'effet de l'utilisation du substrat préclivé en 5' sur la formation de ces complexes. Pour cela, les complexes formés par la TnpA^{WT} et les mutants T+/I- avec le substrat préclivé en 3' (Fig. III.3.1A) et celui préclivé en 5' (Fig. III.3.1B) ont été comparés par EMSA, dans les mêmes conditions, à deux concentrations différentes de TnpA. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus pour la fixation des IR intactes dans les travaux de Nicolas et al. (2017).

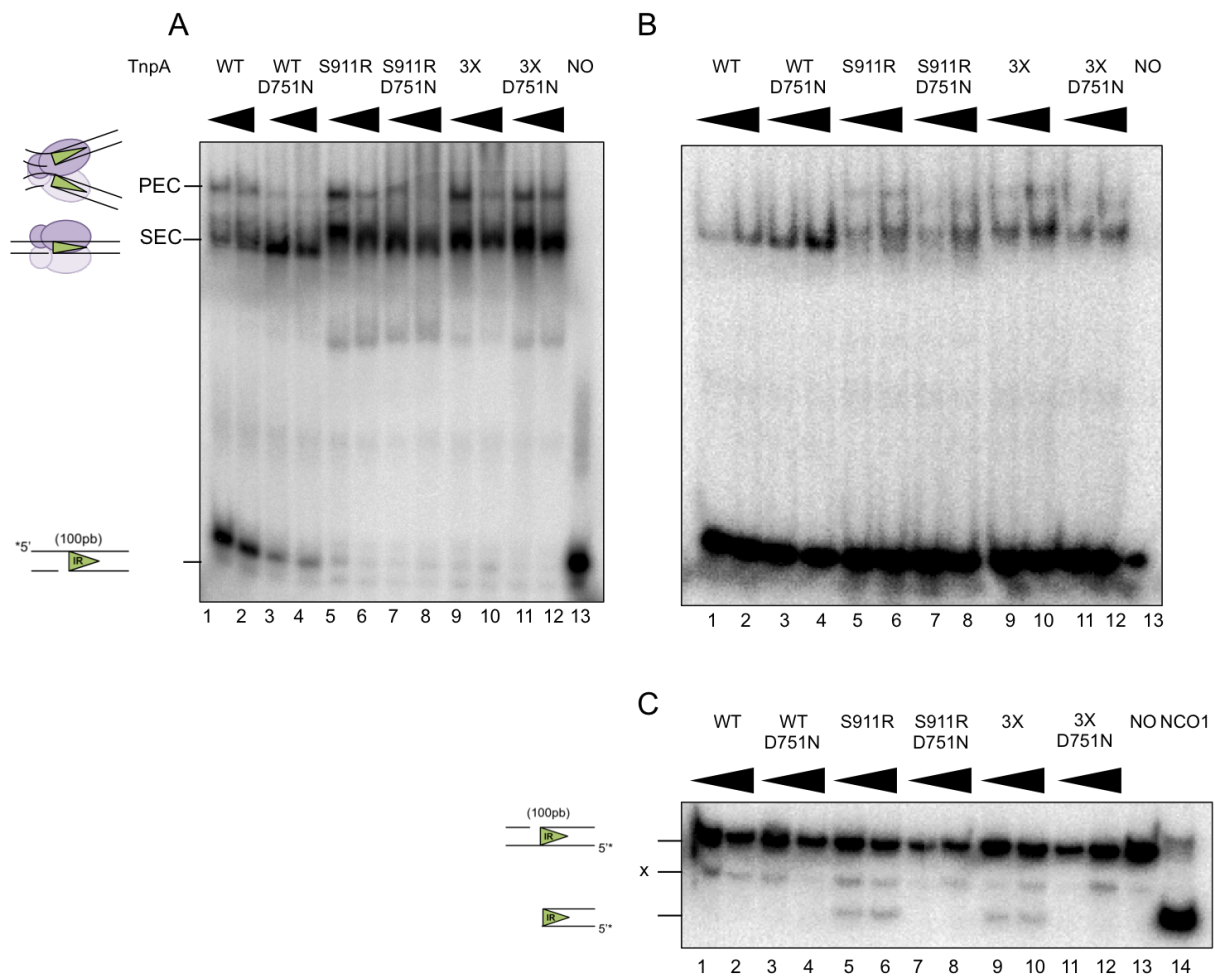


Figure III.3.1 : TnpA liant les deux types d'extrémités IR préclivées *in vitro*. EMSA effectuée avec un segment d'ADN de 100pb radiomarké en 5' contenant la séquence IR de 38pb de Tn4430 et 20 ou 40nM de TnpA WT ou T+/I- (3X et S911R) ou de leur mutants catalytiquement inactifs (D751N) en présence du cofacteur MnCl₂. **(A)** Le substrat utilisé est préclivé en 3' externe de l'IR. **(B)** Le substrat utilisé est préclivé en 5' externe de l'IR. La liaison au substrat d'ADN donne différents ratios d'un complexe à migration rapide (SEC) et lente (PEC). **(C)** Le substrat B a été incubé 4h à 34°C avec la TnpA pour permettre à la réaction de coupe de se dérouler. **NcoI** : Substrat clivé par l'enzyme de restriction NcoI. **No** : Contrôle en absence de TnpA. **x** : bande artéfactuelle provenant de la dénaturation du substrat.

La liaison des différents variants de TnpA au substrat pré-clivé en 3' de l'IR (Fig. III.3.1A) donne deux complexes retardés. Le complexe inférieur correspond au SEC où le dimère de TnpA est lié à une seule extrémité du transposon, tandis que le complexe de mobilité plus réduite correspond au PEC contenant deux extrémités appariées. Un profil comparable est observé pour les variants actifs de TnpA et leurs mutants catalytiques respectifs ce qui confirme les données antérieures indiquant que la présence ou

l'absence des résidus conservés du site actif, et du résidu l'Asp 751 en particulier, ne semblent pas participer de façon majeure au changement de conformation qui converti le complexe SEC en complexe PEC activé (Nicolas et al. 2017). Ce changement de conformation ne nécessite pas non plus la présence du cofacteur (Mn^{2+} ou Mg^{2+}) et serait donc indépendant de l'activité catalytique de TnpA (Nicolas et al. 2017).

Aux concentrations utilisées dans l'expériences, les mutants TnpA^{S911R}, TnpA^{S911R-D751N}, TnpA^{3X} et TnpA^{3X-D751N} présentent une complexation quasi complète du substrat pré-clivé en 3' de l'IR (Fig. III.3.1A, pistes 5 à 12), alors qu'une certaine proportion de substrat libre reste observable dans les réactions réalisées avec les dérivées "sauvages" TnpA^{WT} et TnpA^{WT-D751N} (Fig. III.3.1A; pistes 1 à 4). Ce résultat suggère qu'en plus de former plus facilement le PEC, les mutants dérégulés T+/I- présentent une affinité accrue pour l'ADN. Par ailleurs, l'incubation du substrat avec des concentrations croissantes en protéines donne lieu à une diminution du rapport entre le PEC et le SEC (Fig. III.3.1A, comparer les profils obtenus avec 20 et 40nM de protéines). Cette diminution s'explique par le fait que même si la formation du PEC est hautement coopérative, en condition de saturation, les protéines entrent en compétition pour le substrat, conduisant à la dissociation du PEC au profit du SEC (Nicolas et al., 2017).

La liaison des variants dérégulés TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} (ainsi que leur dérivés D751N inactifs) au fragment IR pré-clivé en 5' donne un profil similaire à celui obtenu pour le substrat pré-clivé en 3' avec la production d'un mélange de SEC et de PEC (comparer Fig. III.3.1B et III.3.1A, pistes 5 à 12). Par contre, TnpA^{WT} et TnpA^{WT-D751N} ne semblent plus former que le complexe SEC contenant une seule extrémité (Fig. III.3.1B, pistes 1 à 4). Ce profil rappelle donc celui observé avec l'IR intacte, non processée par TnpA (Nicolas et al. 2017) et montre que contrairement à la coupure en 3', la coupure ectopique réalisée en 5' de l'IR ne permet pas de contourner la barrière énergétique nécessaire à l'assemblage du PEC. Le substrat synthétique utilisé dans notre test de coupure devrait donc permettre d'évaluer la capacité d'activation des mutants de TnpA (formation du PEC ou non) ainsi que leur activité catalytique (formation des produits de coupure ou non).

III.3.2 Validation du test de coupure avec TnpA^{WT} et les mutants T+/I- TnpA^{S911R} et TnpA^{3X}

En parallèle à la comparaison des complexes nucléoprotéiques formés en présence des différents substrats pré-coupés, l'activité de coupure de la transposase a été évaluée une première fois. En effet, dans un premier temps, La TnpA^{WT} et les dérivés des mutants T+/I- ont été choisis comme contrôles afin de valider le test de clivage basé sur le substrat coupé en 5' et de caractériser les profils de liaison et de clivage des IRs par les mutants aléatoires. La TnpA^{WT} représente l'activité standard de la protéine tandis que les mutants TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} servent de référence pour la capacité à former le complexe activé PEC et à catalyser la réaction de coupure des IR. Les mutants contenant la substitution D751N représentent des versions catalytiquement inactives de la transposase capables de former le SEC et/ou le PEC et constituent donc un contrôle négatif pour l'activité de coupure proprement dite.

En pratique, les transposases purifiées et le substrat radiomarqué ont été incubés en présence d'ions Mn²⁺ agissant comme cofacteur de la réaction. Ce dernier a été utilisé en routine car les travaux antérieurs ont montré qu'il augmentait l'activité catalytique de TnpA par rapport au cofacteur physiologique Mg²⁺ (Nicolas et al. 2017). Après une incubation de 15 minutes, la moitié des réactions a été chargée sur un gel natif de polyacrylamide 4% afin d'analyser les complexes nucléoprotéiques formés entre les différents variants de TnpA et le substrat IR (Fig. III.3.1B). Pour pouvoir corrélérer la formation des complexes (SEC et/ou PEC) avec l'activité catalytique des protéines, l'autre moitié des réactions a été incubée durant 4h supplémentaires avant d'être déprotéinisées et analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 8%. L'autoradiographie du gel permet de détecter les produits de coupure générés par la transposase formant une bande radioactive en dessous du substrat de départ (Fig. III.3.1C). Cette bande correspond au produit de digestion du substrat par l'enzyme de restriction NcoI dont le site coupure coïncide avec celui de TnpA (Fig. III.3.1C, piste 14; voir aussi Fig. III.1)

Comme observé auparavant, la TnpA^{WT} et son homologue D751N forment uniquement du SEC, tandis que les dérivés de TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} forment un mélange de SEC et de PEC (Fig. III.3.1A). Malgré l'absence de saturation du substrat, la quantité de PEC formé

au cours de cette expérience est toutefois relativement faible par rapport aux données publiées (Nicolas et al., 2017). Cela suggère que les conditions de liaison à l'ADN n'étaient peut-être pas optimales

Malgré cela, un produit de coupure est clairement visible dans les réactions réalisées avec les mutants TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} (Fig. III.3.1C, pises 5-6 et 9-10). Ce produit n'est pas observé avec les mutants TnpA^{S911R-D751N} et TnpA^{3X-D751N}, ce qui démontre qu'il provient bien de l'activité catalytique de la transposase (Fig. III.3.1C, pistes 7-8 et 11-12). [Cependant, cette activité reste relativement faible par rapport à celle rapportée précédemment où plus de la moitié du substrat était coupé par TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} après 4h d'incubation (Nicolas et al., 2017)]. La bande de produit n'est pas non-plus présente dans les réactions réalisées avec TnpA^{WT}, suggérant que la protéine purifiée est inactive ou qu'elle possède une activité trop faible pour être détectée dans les conditions du test (Fig. III.3.1C, pistes 1-2). Des bandes supplémentaires (notées x dans la figure III.3.1C) apparaissent également à une position intermédiaire du gel. La nature exacte de ces bandes n'est pas connue, mais il s'agit très vraisemblablement d'artéfacts provenant de la dénaturation partielle du substrat de départ.

III.3.3 Vérification de l'activité des mutants aléatoires

Malgré la faible activité enregistrée au cours de l'expérience précédente, les conditions ont été utilisées pour une première tentative de caractérisation des mutants obtenus par pentapeptidogénèse. Pour cela, leur activité de liaison à l'IR et de coupure de l'ADN a été comparée à celle obtenue pour TnpA^{WT} et TnpA^{3X} (Fig. III.3.3).

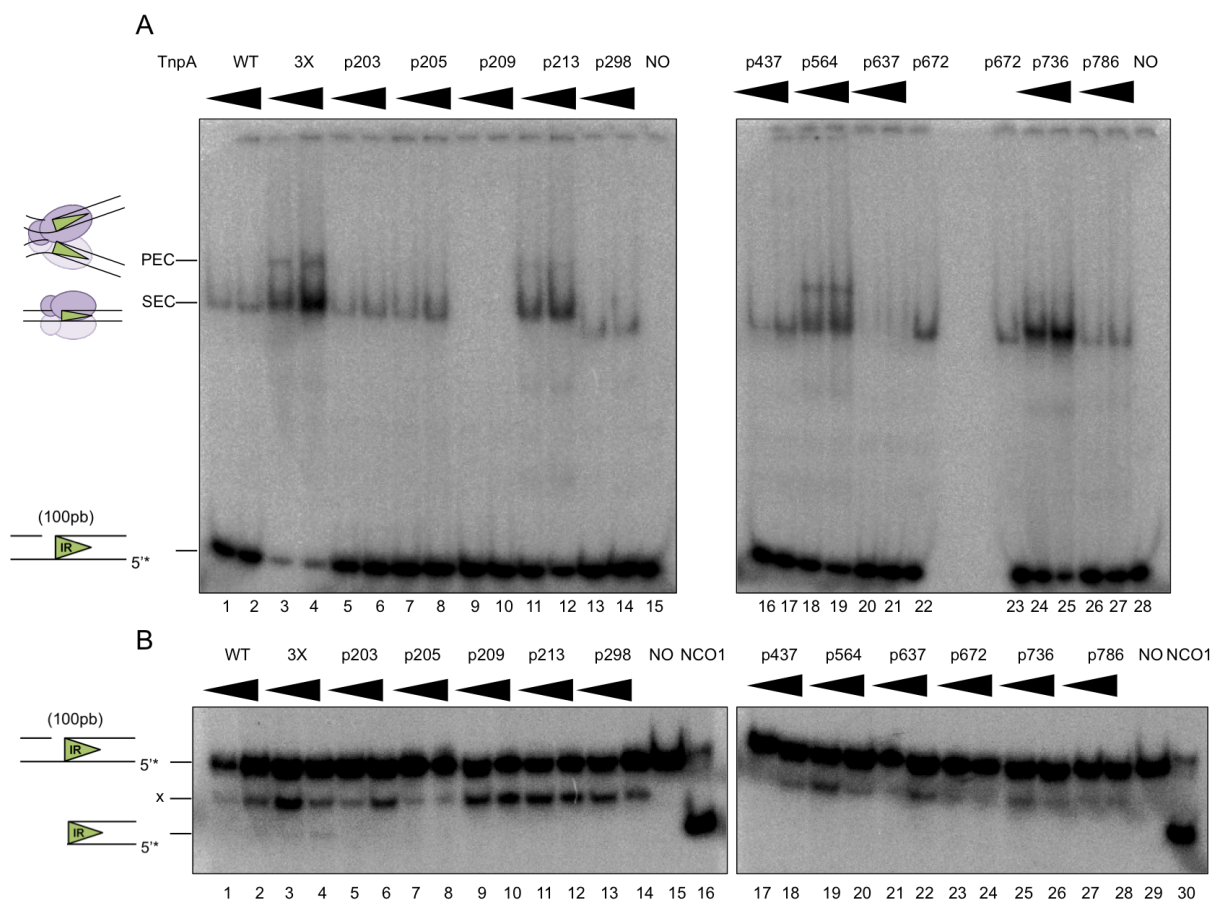


Figure III.3.3 : Liaison et clivage de l'IR par les pentapeptidomutants de TnpA. EMSA effectuées avec un segment d'ADN de 100pb radiomarqué en 5' contenant la séquence IR de 38pb de Tn4430 préclivée en 5' externe et 20 ou 40nM de TnpA en présence du cofacteur MnCl₂. **(A)** Le substrat a été incubé 15 minutes à 37°C avec la TnpA. La liaison au substrat d'ADN donne différents ratios d'un complexe à migration rapide (SEC) et lente (PEC). **(B)** Profil de clivage après incubation 4h à 34°C. **NcoI** : Substrat clivé par l'enzyme NcoI. **No** : Contrôle en absence de TnpA. **x** : bande artéfactuelle provenant de la dénaturation du substrat.

Le résultat montre qu'à l'exception du mutant TnpA^{p209}, tous les mutants purifiés sont capables de se lier à l'IR de Tn4430 (Fig. III.3.3A). Le mutant TnpA^{p637} montre cependant une affinité plus faible que celle de la transposase sauvage TnpA^{WT} (Fig. III.3.3A, comparer pistes 1, 2 et 20, 21). Pour certains mutants comme TnpA^{p298} et TnpA^{p437}, la mobilité du complexe SEC semble être altérée par rapport celle observée pour TnpA^{WT} et d'autres mutants (Fig. III.3.3A, pistes 13, 14 et 16, 17). Cela suggère que la géométrie du complexe formé par ces transposase mutante est différente. De façon intéressante, trois mutants, TnpA^{p213} TnpA^{p564} et TnpA^{p736} présentent une affinité accrue pour l'extrémité IR et sont capables d'assembler un certain niveau de PEC (Fig. III.3.3A, pistes 11, 12 ; 18, 19 et 24, 25). Le profil de liaison de ces mutants se rapproche donc de celui observé pour le mutant dérégulé TnpA^{3X} (Fig. III.3.3A, pistes 3, 4). Cependant, seul ce dernier montre un signal faible correspondant à l'activité de coupure de la transposase. Aucune coupure spécifique n'est détectée pour TnpA^{WT} ainsi que pour les autres mutants, y compris ceux qui semblent capables de former le PEC (Fig. III.3.3B, pistes 3, 4).

III.3.4 La TnpA^{WT} purifiée est active

Le faible niveau de coupure observé pour les mutants T+/I- et l'absence de signal détectable pour TnpA^{WT} pose un problème de sensibilité pour la caractérisation des mutants de pentapeptidogénèse au moyen du test choisi. Selon l'endroit de l'insertion des acides aminés, le mutant pourrait montrer une perte ou une diminution d'activité qu'il serait difficile de mettre en évidence sans un meilleur seuil de détection.

Nous avons donc décidé de tenter d'augmenter les concentrations en TnpA utilisées lors du test afin d'augmenter la quantité de produit de clivage et de faciliter sa détection. Le risque est qu'à des concentrations élevées, la TnpA est susceptible de saturer son substrat et de favoriser alors la formation de SEC comme c'était le cas dans la section III.3.1 (Fig. III.3.1 A, pistes 5 à 12). Dans ce cas on peut s'attendre à une diminution de l'activité de coupure puisque celle-ci a lieu dans le PEC. L'activité de la TnpA^{WT} a donc été caractérisée à différentes concentrations de protéines selon un gradient allant de 20 à 200nM afin de trouver la concentration se prêtant le mieux au test.

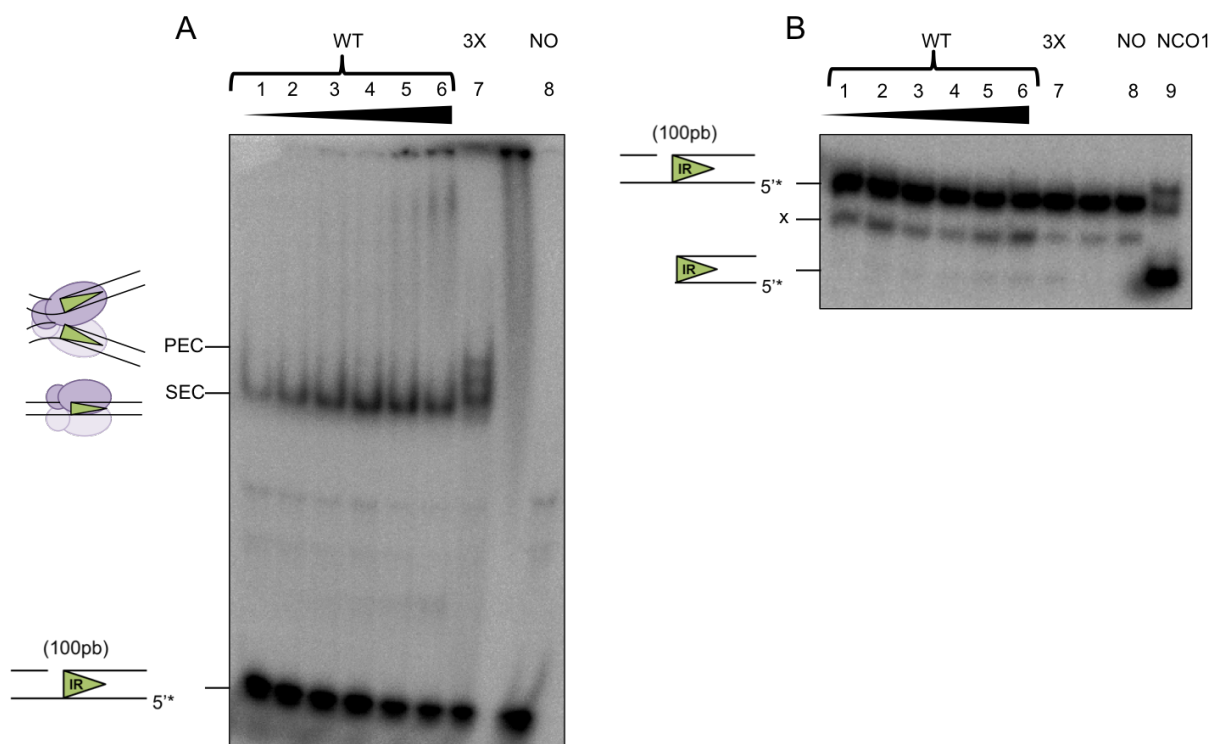


Figure III.3.4 : Liaison et clivage des IR par la TnpA^{WT} *in vitro* en fonction de sa concentration : EMSA effectuées avec un segment d'ADN de 100pb radiomarqué en 5' contenant la séquence IR de 38pb de Tn4430 préclivée en 5' externe et un gradient de TnpA^{WT} (20 à 200nM) ou 40nM du mutant T+/I- (3X) en présence du cofacteur MnCl₂. **(A)** Le substrat a été incubé 15 minutes à 37°C avec la TnpA. La liaison au substrat d'ADN donne différents ratios d'un complexe à migration rapide (SEC) et lente (PEC). **(B)** Le reste des échantillons utilisés en A, a été incubé 4h à 34°C. **NCOI** : Substrat clivé par l'enzyme NCOI. **NO** : Contrôle en absence de TnpA. **x** : bande artéfactuelle provenant de la dénaturation du substrat.

Selon nos résultats, la TnpA^{WT} présente une activité de clivage détectable à partir de 40nM. L'activité de clivage de la TnpA^{WT} à 160nM et 200nM est comparable à celle de la TnpA^{3X} à 40nM (Fig. III.3.4B, comparer piste 5-6 et 7). Cette activité s'accompagne d'une faible formation de PEC pour des concentrations de 80 à 160nM de TnpA^{WT} mais celle-ci reste largement inférieure à la quantité de PEC formée par la TnpA^{3X} (Fig. III.3.4A pistes 3, 4, 5). Malgré les concentrations en TnpA supérieures à celles utilisées dans les tests précédents on n'observe pas de saturation du substrat. La protéine est donc bien active dans les conditions testées et l'utilisation de concentrations plus élevées peut nous permettre de détecter la présence de son produit de clivage.

III.3.5 Caractérisation des pentapeptidomutants

Etant donné que le produit de coupure de la TnpA^{WT} a pu être détecté en augmentant les concentrations de protéines utilisées lors des tests, nous avons tenté une deuxième fois de caractériser l'activité des pentapeptidomutants.

Le test de liaison nous permet de confirmer et d'affiner les observations effectuées au point III.3.4. Les pentapeptidomutants présentent quatre types de profils distincts (Fig. III.3.5A). Plusieurs d'entre eux ont un niveau de formation de complexes inférieur à celui de la TnpA^{WT} notamment TnpA^{p103} et TnpA^{p209} qui se montrent incapables de se lier aux IR (Fig. III.3.5A pistes 5, 6) mais également TnpA^{p298} et TnpA^{p437} qui ne forment aucun PEC et dont la mobilité du SEC est inférieure à celle des autres protéines (Fig. III.3.5A pistes 11, 12). En revanche, les mutants TnpA^{p213}, TnpA^{p564} et TnpA^{p736} forment une quantité de complexe supérieure à la TnpA^{WT} (Fig. III.3.5A comparer pistes 10, 13, 16 à la piste 1). De plus, TnpA^{p564} et TnpA^{p736} en particulier forment une proportion de PEC comparable à celle des mutants dérégulés. Enfin, les autres mutants présentent un profil similaire à celui de la TnpA^{WT}.

Les résultats du test de coupure montrent une bande de vitesse de migration inférieure au produit de coupure, présente dans tous les échantillons notée "y" (Fig. III.3.5B). Etant donnée sa présence dans le puits sans TnpA (No) il s'agit sans doute d'un artéfact.

A nouveau, malgré le fait que nous ayons augmenté les concentrations de variants de TnpA, seul les mutants T+/I- dérégulés TnpA3X et TnpAS911R montrent un produit de clivage. Aucune coupure spécifique n'est détectée pour TnpA^{WT} ainsi que pour les autres mutants, y compris ceux qui semblent capables de former le PEC (Fig. III.3.5B).

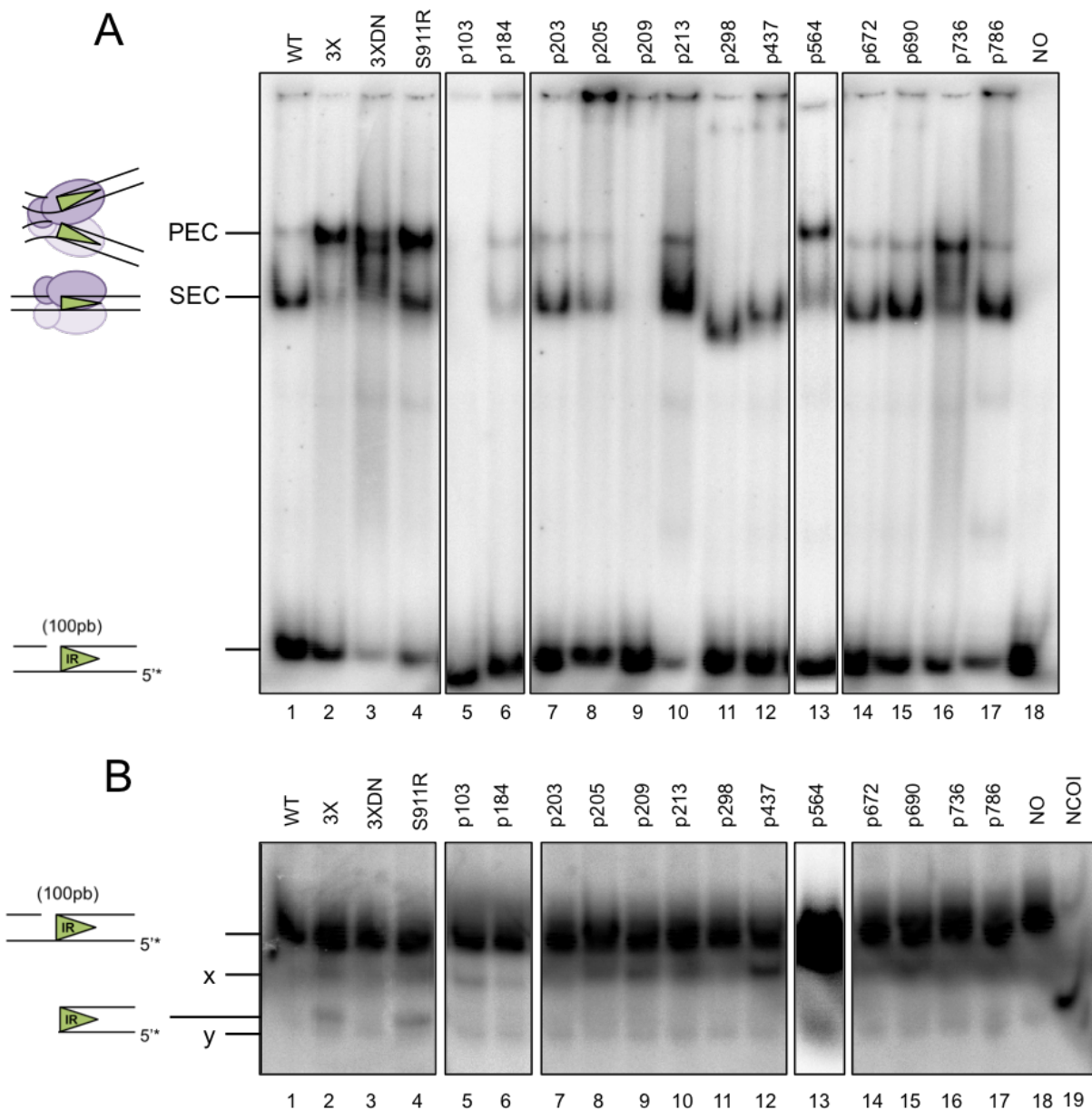


Figure III.3.5 : Liaison et clivage de l'IR *in vitro* par les mutants aléatoires de la TnpA. EMSA effectuées avec un segment d'ADN de 100pb radiomarqué en 5' contenant la séquence IR de 38pb de Tn4430 préclivée en 5' externe avec 200nM de TnpA (ou 160nM pour les mutants p103 et p184) en présence du cofacteur MnCl₂. **(A)** Le substrat a été incubé 15 minutes à 37°C avec la TnpA. La liaison au substrat d'ADN donne différents ratios d'un complexe à migration rapide (SEC) et lente (PEC). **(B)** Le reste des échantillons utilisés respectivement pour le gel A a été incubé 4h à 34°C. **NcoI** : Substrat coupé par l'enzyme NcoI. **No** : Contrôle en absence de TnpA. **x et y** : Bandes artéfactuelles provenant de la dénaturation du substrat.

III.3.6 Le glycérol promeut la formation de complexes nucléoprotéiques d'ordre supérieur et l'activité de clivage chez la $TnpA^{WT}$

Le glycérol est connu pour son effet solvophobique qui lui permet de stabiliser les protéines en solution et parfois d'augmenter leur activité comme cela a été démontré pour certaines transposases (Leschziner, Griffin IV, and Grindley 1998; Moelbert, Normand, and De Los Rios 2004). Nous avons donc testé l'effet d'un gradient de glycérol sur l'activité de la $TnpA^{WT}$. De plus, pour maximiser les chances de détecter une activité de coupure, les réactions ont été incubées durant 16h au lieu de 4h. Les expériences contrôles ont été réalisées avec $TnpA^{3X}$ et $TnpA^{3XD751N}$ en absence de glycérol.

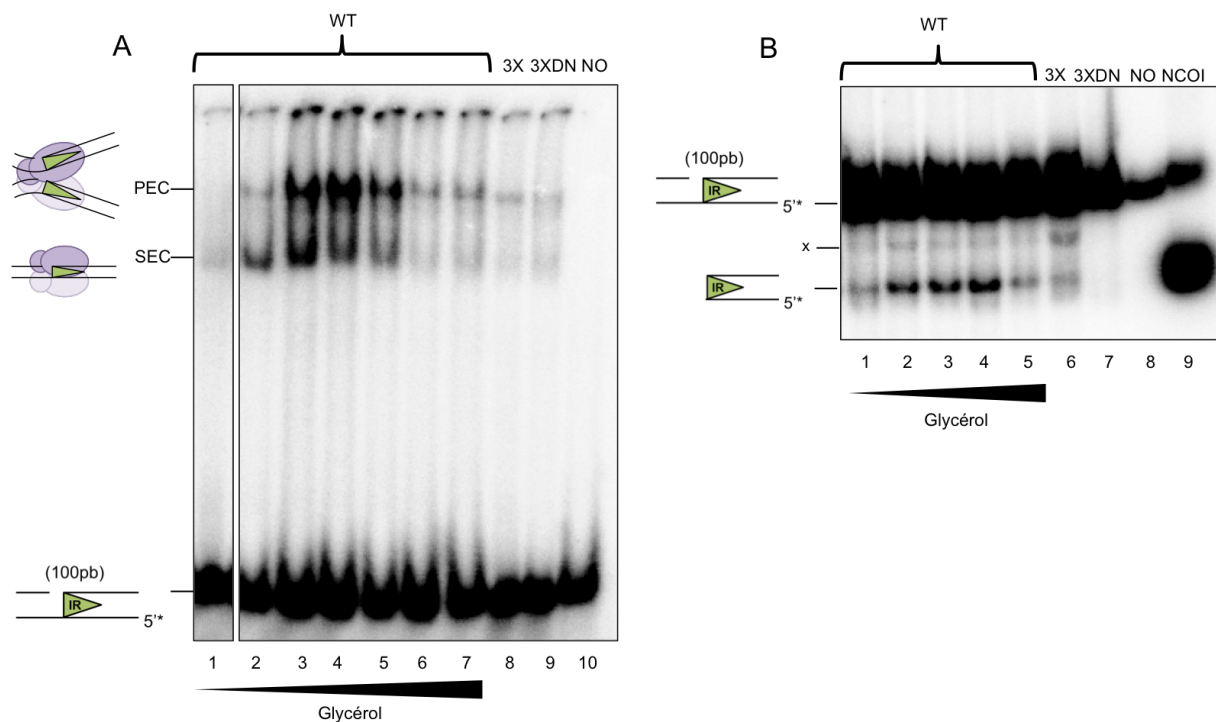


Figure III.3.6 : Liaison et clivage de l'IR *in vitro* par la $TnpA^{WT}$ en présence d'un gradient de Glycérol. EMSA effectuées avec un segment d'ADN de 100pb radiomarké en 5' contenant la séquence IR de 38pb de Tn4430 préclivée en 5' externe et 75nM $TnpA^{WT}$ ou 50nM du mutant T+/I- (3X) en présence du cofacteur $MnCl_2$ avec une concentration de 0 à 30% de glycérol. **(A)** Le substrat a été incubé 15 minutes à 37°C avec la $TnpA$. La liaison au substrat d'ADN donne différents ratios d'un complexe à migration rapide (SEC) et lente (PEC). **(B)** Le reste des échantillons utilisés en A, a été incubé 16h à 34°C. **NcoI** : Substrat clivé par l'enzyme NcoI. **No** : Contrôle en absence de $TnpA$. **x** : Bande artéfactuelle provenant de la dénaturation du substrat.

On observe un effet marqué du glycérol sur le profil de liaison de TnpA^{WT} avec un enrichissement du rapport PEC/SEC. En effet, comme observé précédemment, en absence de glycérol, TnpA^{WT} forme essentiellement du SEC tandis que TnpA^{3X} et TnpA^{3XD751N} forment une majorité de PEC (Fig. III.3.6A, pistes 1, 8, 9). En revanche, en présence de glycérol la TnpA^{WT} forme toujours du PEC. De plus, le rapport PEC/SEC augmente avec la concentration en glycérol (Fig. III.3.6A, pistes 1 à 8). Cet effet est similaire à celui observé en présence d'un substrat pré-coupé en 3' de l'IR imitant la coupure par la TnpA (Nicolas et al. 2017).

En ce qui concerne l'activité catalytique, un produit de coupure est clairement visible pour tous les échantillons de TnpA^{WT} et en particulier pour les échantillons contenant 10 à 25% de glycérol dont le signal est supérieur à celui du mutant TnpA^{3X} dérégulé (Fig. III.3.6B, comparer pistes 2, 3, 4 et 6).

Ces résultats suggèrent que la présence de glycérol, probablement via son effet solvophobique, promeut la formation de PEC ainsi que l'activité de coupure de la TnpA^{WT}. Nous avons donc décidé d'utiliser le glycérol dans le test *in vitro* suivant sur les pentapeptidomutants.

III.3.7 Les effets du glycérol sur les différents mutants aléatoires sont variables

Pour déterminer si la présence de glycérol permet effectivement d'affiner et nuancer la caractérisation des pentapeptidomutants de TnpA l'activité de liaison et de clivage du substrat clivé en 5' a été évaluée pour tous les variants de la TnpA utilisés dans ce travail en présence de 25% de glycérol.

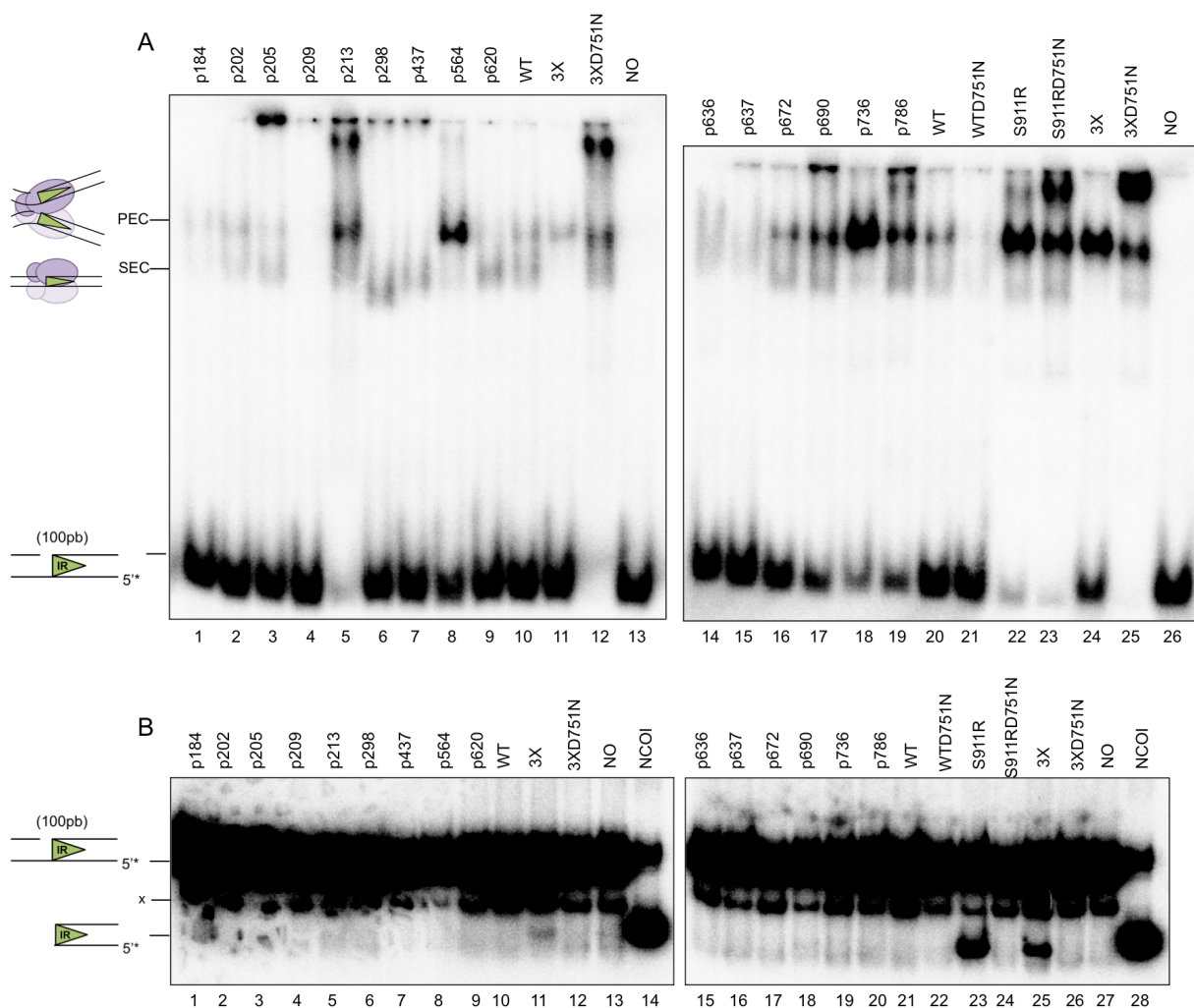


Figure III.3.7 : Liaison et clivage de l'IR *in vitro* par les mutants aléatoires de la TnpA en présence de glycérol. EMSA effectuées avec un segment d'ADN de 100pb radiomarké en 5' contenant la séquence IR de 38pb de Tn4430 préclivée en 5' externe et 75nM de TnpA en présence du cofacteur MnCl₂ dans un tampon contenant 25% de glycérol. **(A)** Le substrat a été incubé 15 minutes à 37°C avec la TnpA. La liaison au substrat d'ADN donne différents ratios d'un complexe à migration rapide (SEC) et lente (PEC). **(B)** Le reste des échantillons utilisés respectivement pour les gels A et B a été incubé 4h à 34°C. **NcoI** : Substrat clivé par l'enzyme NcoI. **No** : Contrôle en absence de TnpA.

De manière générale, le glycérol semble favoriser la formation de PEC. Chez les protéines de référence et la majorité des variants, le PEC est formé en quasi exclusivité donnant ainsi un profil semblable à celui des mutants dérégulés en conditions standards (Fig. III.3.7A pistes 1, 5, 8, 11, 12 et 16 à 25). En revanche, les mutants TnpA^{p298}, TnpA^{p437}, TnpA^{p636} et TnpA^{p637} forment exclusivement du SEC (Fig. III.3.7A, pistes 6, 7, 14, 15). Il est intéressant de noter que parmi eux, TnpA^{p298}, TnpA^{p636} et TnpA^{p637} s'étaient également montrés incapables de former du PEC en présence de substrat pré-coupé en 3' de l'IR imitant l'activité de coupure par la TnpA dans un travail précédent (Marchese 2016). Enfin les mutants TnpA^{p202} et TnpA^{p205} semblent peu affectés et comme dans les tests précédents, le mutant TnpA^{p209} ne forme aucun complexe (Fig. III.3.7A pistes 2, 3 et 4).

A nouveau, malgré la stabilisation du PEC, un signal de clivage n'est clairement visible que dans les réactions réalisées avec les mutants T+/I- (Fig. III.3.7B, pistes 11, 23, 25). Un faible signal semble cependant discernable dans les pistes contenant la TnpA^{WT} et les variants TnpA^{p690} et TnpA^{p736} (Fig. III.3.7B, pistes 18, 19 et 21).

IV. Discussion

La famille de transposon Tn3 est répandue à travers presque tous les phyla bactériens. Son impact principal sur la vie humaine est probablement son implication dans la propagation des résistances aux carbapénems qui ont une importance majeure dans le domaine médical (He et al. 2016).

Malgré son importance, le mécanisme de transposition de cette famille est mal compris, en particulier l'organisation fonctionnelle de sa transposase, l'architecture de son transpososome et la régulation de son assemblage. La clef de ces mécanismes et l'une des particularités principales de la famille Tn3 est leurs transposases. Elle font partie de la superfamille transposases à motif DDE(D) mais s'en distinguent par leur taille importante et par le fait qu'elles sont suffisantes pour médier la réaction de transfert de brin et le phénomène d'immunité à elle seules. Elle ne nécessitent pas d'interactions avec d'autres protéines encodées par le transposon (Nicolas et al. 2015).

La majorité des informations disponibles sur la structure et le fonctionnement des transposases de la famille de Tn3 proviennent du modèle Tn4430 et sa transposase TnpA (987 acides aminés). Si certaines données structurales sur la TnpA sont actuellement disponibles, elles ne permettent cependant pas encore de définir ses domaines fonctionnels avec précision (Lambin et al. 2012a).

Dans notre laboratoire, la mise en place du transpososome par la TnpA a été étudiée *in vitro* par l'intermédiaire de tests de retard sur gel. Le comportement de la TnpA^{WT} a été étudié par comparaison avec celui des mutants TnpA^{S911R} et TnpA^{3X} qui présentent un phénotype dérégulé *in vivo* qui leur permet de mener à bien la transposition même dans une cible immunisée (Lambin et al. 2012a).

Deux complexes nucléoprotéiques de mobilité différente sont formés *in vitro*. Le *single end complex* (SEC) contient un dimère de transposase lié à une IR. Le *paired end complex* (PEC) a une mobilité inférieure car il contient un dimère de transposase lié à deux IR. *In vitro*, la TnpA^{WT} forme une majorité de SEC et parfois une faible quantité de PEC. Elle a

une activité de clivage faible. En revanche, dans les mêmes conditions, les mutants T+/I- dérégulés forment une majorité de PEC et montrent une activité de clivage importante. La TnpA^{WT} est capable d'adopter un profil similaire lorsqu'elle est mise en présence de substrat synthétique pré-clivé en 3' externe de l'IR pour imiter l'activité de la transposase (Nicolas et al. 2017).

Le fait que les mutants T+/I- soient capables d'atteindre un état (PEC) qui n'est accessible à la TnpA sauvage que dans des conditions particulières semble indiquer la présence d'une étape de régulation. De plus la formation de PEC est positivement corrélée avec l'activité de clivage. Des expériences supplémentaires de footprinting et de microscopie cryo-électronique suggèrent en plus que le passage au *paired-end complex* implique un changement de conformation de la TnpA (Nicolas et al. 2017; A Shkumatov, comm. pers.).

Ces résultats ont poussé l'équipe à postuler que le SEC correspond à un état inactif et verouillé du transpososome qui nécessite un signal régulateur encore inconnu pour contacter une seconde IR et former du PEC en changeant de conformation. Dans cette conformation "déverouillée" la transposase est catalytiquement active. On suppose qu'une barrière d'activation empêche la majorité de la TnpA^{WT} de former ce complexe *in vitro*. En revanche, chez les mutants T+/I-, les mutations ^{S911R} et ^{3X} ont modifié la structure secondaire de la protéine et augmenté sa stabilité dans la conformation active, diminuant la barrière d'activation. Enfin, la liaison d'IR préclivées pousse la TnpA^{WT} à adopter sa conformation active.

On ignore cependant avec quelle fidélité les observations *in vitro* représentent les évènements *in vivo*. Chez la TnpA^{WT}, le passage à un état catalytique activé nécessite peut être un facteur régulateur supplémentaire absent dans nos tests. L'existence d'un tel facteur hypothétique a déjà été discutée dans d'autres travaux sous le nom de "facteur X". Il pourrait s'agir d'un cofacteur, d'une protéine encodée par l'hôte ou bien de la cible elle-même.

Il est également possible qu'aucune interaction avec un facteur supplémentaire ne soit nécessaire et que ces observation soient juste le résultat du niveau d'activité

naturellement faible de la TnpA^{WT} *in vivo* (Mahillon and Lereclus 1988). Un tel niveau d'activité permet d'éviter une trop grande fréquence de transposition dans l'hôte. Une grande fréquence de transposition augmente le risque d'erreur, d'insertion dans une séquence vitale et de délétions par recombinaison entre les copies du transposon, des évènements qui peuvent tous diminuer le *fitness* de l'hôte.

Ce travail s'est basé sur une bibliothèque de mutants créés par pentapetidogénèse pour explorer plus en détail la relation entre la séquence de la transposase et la formation de son transpososome *in vitro*. Ces mutants avaient été préalablement caractérisés pour leur activité *in vivo* et pour leur capacité de liaison au substrat et à la cible *in vitro* (Marchese 2016). C'est la relation entre la formation de complexes nucléoprotéiques et l'activité de clivage de ces différents mutants qui a été le principal sujet d'investigation de ce travail. Cette question a été accompagnée d'une démarche d'optimisation des tests de coupure.

IV.1 Le glycérol stimule l'activité de la TnpA *in vitro*

Le défi majeur que nous avons rencontré lors de la caractérisation du fonctionnement de la TnpA est son activité catalytique *in vitro* particulièrement faible, préfigurée par sa fréquence de transposition *in vivo* qui est inférieure à 10^{-4} (Mahillon and Lereclus 1988).

Pour y remédier, nous nous sommes intéressés à l'impact potentiel du glycérol sur l'activité suite aux observations de Leschziner, Griffin et Grindley qui décrivent que des concentrations supérieures à 25% de glycérol stimulent fortement les réactions de transfert de brin *in vitro* chez le transposon Tn552 (Leschziner et al. 1998). Dans les conditions de réactions *in vitro* établies dans les travaux précédents de l'équipe, la concentration en glycérol n'est pas soulignée et se trouve généralement à hauteur de 10%.

Nos résultats montrent que la présence de glycérol dans les tests *in vitro* semble influencer la formation de complexes de la même manière que la présence de substrat pré-clivé en 3'. En effet, chez la TnpA^{WT}, la présence de glycérol provoque la formation d'une majorité de PEC couplée à une augmentation de l'activité catalytique de coupure,

lui donnant un profil similaire à celui des mutants dérégulés en présence d'IR intactes. Une fois de plus, la formation de PEC et l'activité de clivage sont positivement corrélés (Cf. section III.3.6).

Il est possible que le glycerol, par ses propriétés physicochimiques, stabilise la formation du complexe nucléoprotéique actif de la TnpA. En effet, il est connu comme agent stabilisant des protéines en solution. Il empêche leur aggrégation et leur dénaturation. Cet effet est dû à sa nature d'agent kosmotropique en solution aqueuse. En tant que co-solvant, il augmente l'ordre de la solution en stabilisant et en structurant les interactions entre les molécules d'eau. En présence de protéines, les propriétés du glycérol produisent un effet dit "solvophobique" qui augmente la force d'exclusion des résidus hydrophobes et provoque une isolation individuelle et une compaction des protéines (Moelbert et al. 2004).

Ces observations sont compatibles avec notre modèle. Par effet solvophobique, le glycérol permet de surmonter la barrière d'activation nécessaire pour former du PEC chez la TnpA^{WT}. La transposase est forcée de prendre une conformation active et son activité catalytique est donc stimulée malgré l'absence de l'éventuel "facteur X". Dès lors, le glycérol peut être utilisé comme clef pour déverrouiller l'activité de la transposase *in vitro* et observer son activité catalytique.

Cet effet mérite probablement d'être étudié et caractérisé plus en détails. Il serait intéressant de mesurer son impact sur la liaison avec la cible et sur les réactions de transfert de brin *in vitro*.

IV.2 Activité de clivage de la TnpA

Dans ce travail, nous avons également pu observer une activité de coupure de la TnpA^{WT} en augmentant les concentrations de protéine utilisées (Cf. section III.3.4). Cependant, l'activité de clivage de la TnpA^{WT} s'est chaque fois montrée indétectable dans les tests incluant les pentapeptidomutants et ce malgré la formation de SEC et de PEC (Cf. sections III.3.3, III.3.5 et III.3.7). Or, la TnpA^{WT} devait servir de contrôle positif représentant un niveau d'activité de coupure standard dans ces tests. Ce contrôle est

particulièrement important étant donné que plusieurs des pentapeptidomutants ont perdu la capacité de catalyser la réaction de transposition *in vivo* et que certains sont incapables de lier le substrat ou de former du PEC même en présence de substrat pré-clivé (Marchese 2016). Il ne serait donc pas surprenant d'observer une activité de coupure réduite voire inexistante chez ces mutants.

Dès lors, en l'absence d'un signal de coupure détectable pour la TnpA^{WT}, on ne peut donc pas exclure la possibilité qu'une absence de coupure observée chez les pentapeptidomutants ne soit due à un manque de sensibilité du test ou à des conditions de coupure suboptimales.

Aucune activité de clivage n'a pu être observée chez les pentapeptidomutants. Ces résultats peuvent indiquer que dans les conditions testées, les mutants ne sont pas capables de catalyser la réaction d'hydrolyse du substrat. On s'attendait en effet à ce que certains mutants aient perdu cette activité. En particulier le mutant TnpA^{p209} puisqu'il est incapable de lier les IR *in vitro* et les mutants incapables de former du PEC. Cependant, une activité de clivage était attendue chez les mutants permissifs (TnpA^{p203}, TnpA^{p205}, TnpA^{p213} et TnpA^{p786}). Ces mutants sont capables de réaliser la transposition *in vivo* et conservent donc nécessairement leur activité catalytique mais peut être que les conditions *in vitro* utilisées ne permettent pas de l'observer.

En revanche, chaque test présente une activité de clivage significative en provenance des mutants T+/I- ce qui indique donc qu'aucun des pentapeptidomutants ne possède une activité catalytique comparable.

VI.3 Formation du complexe synaptique

VI.3.1 Certains mutants ont perdu la capacité de former du PEC

Les travaux précédents ont permis de mettre en évidence un substrat favorisant la formation de PEC chez la TnpA WT. Ce substrat imite le produit de clivage en portant une coupure simple brin à l'extrémité 3' externe de la séquence IR (Nicolas et al. 2017). Les travaux de Damien Marchese ont permis d'observer cet effet chez plusieurs mutants

de la bibliothèque de pentapeptidogenèse également. Cependant ils ont également mis en évidence quatre pentapeptidomutants (TnpA^{p298}, TnpA^{p620}, TnpA^{p636} et TnpA^{p637}) qui ont conservé la capacité de former du SEC mais se montrent incapables de former du PEC même en présence de substrat pré-clivé. Ces mutants sont également incapables de transposer *in vivo* (Marchese 2016) (Fig. IV).

Ce travail a permis de mettre en évidence que la présence de certaines concentrations de glycérol produit un effet similaire à celui du substrat préclivé. Il augmente la quantité de PEC formé par la TnpA^{WT}. On a donc testé son effet sur les pentapeptidomutants et observé des résultats similaires. La présence de glycérol favorise la formation de PEC chez les mutants sauf chez TnpA^{p209} qui est incapable de former des complexes *in vitro*, TnpA^{p437} et les quatres mutants TnpA^{p298}, TnpA^{p620}, TnpA^{p636} et TnpA^{p637} (Cf. section III.3.7) (Fig. IV).

Les mutants TnpA^{p298}, TnpA^{p620}, TnpA^{p636} et TnpA^{p637} ont donc perdu la capacité de former du PEC même dans des conditions hautement favorables pour la TnpA^{WT} (i.e. en présence de substrat pré-clivé en 3' et en présence de glycérol).

Il est intéressant de souligner que parmi eux, 3 des mutations ont eu lieu dans la même région d'une vingtaine d'acides aminés, à l'extrémité N terminale du domaine central. Cela peut indiquer que cette région est cruciale pour la liaison à la deuxième IR et le changement de conformation qu'elle nécessite.

Par ailleurs, le mutants TnpA^{p298} forme un SEC de mobilité inférieure aux autres qui indique qu'il contient la transposase dans une conformation différente.

Le cas du mutant TnpA^{p437} est interessant car il est capable de former du PEC en présence de substrat pré-clivé en 3' mais pas en présence de glycérol. Le substrat pré-clivé en 3' semble donc avoir un effet stabilisant sur le PEC plus important que celui du glycérol. On peut supposer que le PEC formé par la TnpA change de conformation lors de la réaction d'hydrolyse des IR et qu'il y gagne en stabilité. Peut-être que le PEC en conformation pré-clivage est instable et contient une quantité d'énergie dont une partie est utilisée pour catalyser la réaction d'hydrolyse. La catalyse et la libération d'énergie

s'accompagne d'un changement vers une conformation post-clivage plus stable dans laquelle il reste lié aux IR désormais clivées en 3'.

Les mutants ayant perdu la capacité de former du PEC en présence de glycérol ont tous également perdu la capacité de transposer *in vivo*. Cela souligne l'importance du PEC dans le déroulement de la réaction de transposition.

Selon notre modèle et nos observations qui lient la formation de PEC à l'activité de clivage, on s'attend à observer une inhibition de l'activité catalytique. Des tests de clivage supplémentaires devraient permettre de vérifier cette hypothèse.

V.3.2 Certains mutants montrent une formation de PEC accrue

Trois mutants (TnpA²¹³, TnpA⁵⁶⁴ et TnpA⁷³⁶) montrent un profil de formation de complexes similaire à celui des mutants T+/I- (Cf. sections III.3.3 et III.3.5) (Fig. IV) . Il est intéressant de souligner le fait que chacune de ces trois mutations pentapeptidogéniques a eu lieu dans un des 5 foyers décrits par Lambin et al. en 2012, où des mutations de substitution ont causé la perte de l'immunité chez le mutant. Les insertions chez TnpA⁵⁶⁴ et TnpA⁷³⁶ en particulier sont très proches du site de substitution chez les mutants T+/I- R553G et E740G respectivement (Lambin et al. 2012b).

Il est toutefois important de rappeler que type de mutation induite dans les deux bibliothèques est différent. La méthode de pentapeptidogénèse provoque l'insertion de 5 acides aminés dont une proline qui est un disrupteur des structures secondaires, tandis que les mutants T+/I- utilisés ici et les autres identifiés dans Lambin et al. ont été produits par *error prone PCR* et présentent jusqu'à 3 substitutions d'acides aminés. Les mutations pentapeptidogéniques sont donc plus susceptibles de perturber la structure de la protéine et son fonctionnement.

Effectivement, quelles que soient les conditions testées et malgré la formation d'une quantité significative de PEC, l'activité de clivage des mutants TnpA²¹³, TnpA⁵⁶⁴ et

TnpA⁷³⁶ reste indétectable et donc largement inférieure à celle des mutants T+/I- (Cf. section III.3.3 et III.3.5).

Des tests supplémentaires devront être effectués pour déterminer si ils ont conservé une activité de clivage ou non. Le mutant TnpA²¹³, conserve sa capacité de transposer *in vivo* et on s'attend donc à ce que ce soit le cas. En revanche, une perte de l'activité catalytique permettrait d'expliquer pourquoi TnpA⁵⁶⁴ et TnpA⁷³⁶ ont perdu leur capacité de transposition *in vivo*.

L'insertion pentapeptidogénique de TnpA⁷³⁶ en particulier à eu lieu à seulement 14 acides aminés de distance de l'aspartate 751 appartenant à la triade catalytique DDE. Elle pourrait donc avoir le même effet que la mutation D751N utilisée comme contrôle négatif inactif de la transposase.

Dans le cas contraire, si TnpA⁵⁶⁴ et TnpA⁷³⁶ ont conservé leur activité catalytique, aucun des tests effectués ne permettrait d'expliquer leur incapacité de transposition *in vivo*. Il serait alors particulièrement intéressant de les soumettre au test de transfert de brin *in vitro* afin de déterminer l'origine de leur dysfonctionnement.

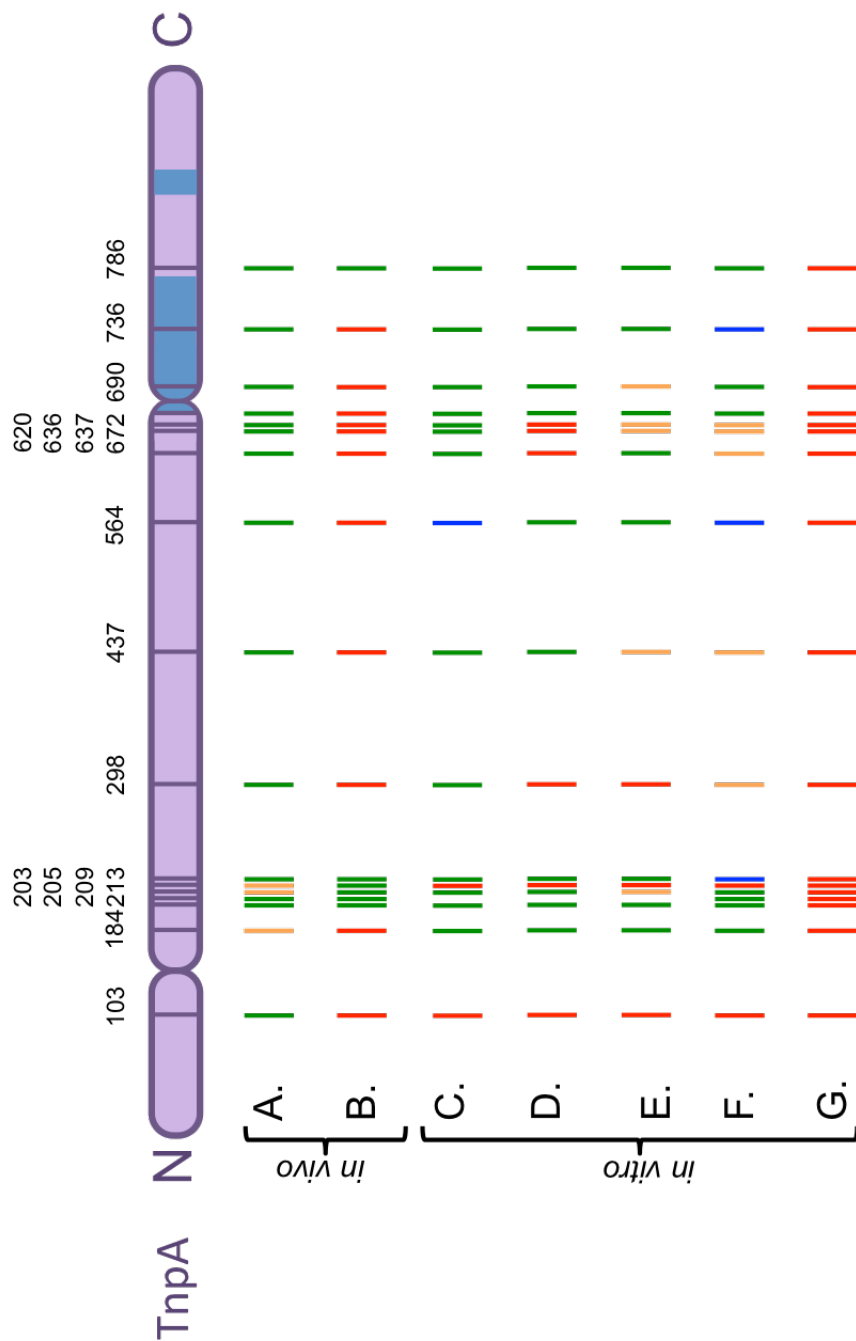


Figure IV : Activités des pentapeptidomutants : Cette image représente une synthèse des résultats fournis par Damien Marchese et de ceux obtenu durant ce travail. La structure primaire de la transposase divisée en ses trois domaines prédits est représentée en mauve. Le domaine susceptible d'adopter un repliement de type RNase H est en bleu. Les bandes mauves et les valeurs chiffrées représentent la position de l'insertion de 5 acides aminés chez chaque mutant. Les bandes vertes indiquent une activité semblable à celle de la transposase sauvage. Les bandes orange indiquent une activité inférieure à celle de la sauvage. Les bandes rouges indiquent une perte d'activité. Les bandes bleues indiquent une activité semblable à celle des mutants dérivés. A. Liaison à l'IR *in vivo*; B. Transposition *in vivo*; C. Liaison à l'IR préclivée *in vitro*; D. Liaison à la fourche synthétique *in vitro*; E. Liaison à l'IR en présence de glycérol *in vitro*; F. Clivage de l'IR *in vitro* telle qu'elle a pu être observée jusqu'à maintenant.

IV.4 Conclusion et Perspectives

Cette étude apporte des outils et informations supplémentaires pour la compréhension du transpososome de Tn4430. Elle a permis de confirmer et préciser les profils de formation de complexes nucléoprotéiques des pentapeptidomutants caractérisés précédemment. Elle a également mis en évidence l'effet solvophobique du glycérol sur la TnpA et souligné son potentiel comme outil d'investigation. Pour continuer ce travail, la caractérisation des pentapeptidomutants devra être complétée par la conduite de tests de clivage supplémentaires et de tests de transfert de brin.

D'autres approches peuvent également nous aider à intégrer les informations obtenues sur les mutants à notre modèle. La résolution de la structure 3D du transpososome de Tn4430 par microscopie cryoélectronique constituera une avancée majeure dans notre effort de compréhension de son fonctionnement. Elle permettra de vérifier les prédictions de structures pour les domaines N et C terminaux et révélera l'organisation du domaine central. Grâce aux informations obtenues via l'étude des pentapeptidomutants, nous pourrions mettre en lien les changements phénotypiques observés avec l'interruption de sous-domaines précis et tenter de comprendre le fonctionnement de la TnpA. Cette approche apportera une idée précise de la structure et des interactions au sein du transpososome dans un état figé.

Pour construire un modèle complet de la dynamique de formation du complexe de transfert de brin, la caractérisation biochimique de l'activité de la transposase semble également être une perspective intéressante. Les techniques de fluorescence telles que le FRET pourraient être employées afin de générer des mesures de cinétique et d'affinité lors de la formation de complexes nucléoprotéiques par la transposase. Une comparaison empirique de son affinité pour le substrat et pour la cible dans différentes conditions pourrait apporter des informations sur l'ordre des étapes de mise en place du transpososome.

V. Matériel et Méthodes

Table 1 : Amorces PCR utilisées

Amorce PCR	Séquence (Orientation 5' vers 3')	Utilisation
3XD751N-Forward	ATTAACCATGGAGTTAAACAATTAC	PCR mutagénisante
3XD751N-Reverse	GTAATGTGTTTATGTGCGACCTATATGTC	PCR mutagénisante

Table 2 : Vecteurs d'expressions utilisés

Vecteur	TnpA	Origine
pGIML3X/M-H	3X	M. Lambin
pGINA001	3XD751N	Ce travail
pGIAD003	WT	A. Draime
pGIAD005	WTD751N	A. Draime
pGIAD002	S911RD751N	A. Draime
pGIML007	S911R	M. Lambin

Ces vecteurs permettent l'expression de TnpA-myc-His6 sous le contrôle du promoteur pAra et sont exprimés dans la souche TOP10 F- [mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZM15 Δ lacX74 Invitrogen nupG araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL endA1 λ -].

Table 3 : Solutions utilisées

Solution	Composition
Bleu de Coomassie	Ethanol 50%, acide acétique 7%, bleu de Coomassie 0,2% Crack
Crack 5X	Tris HCl 0,25M pH6,5, SDS 0,1%, bleu de bromophénol 0,2%, glycérol 50%, β -mercaptoéthanol 15% en volume
Milieu de culture LB	Tryptone 10g/L, extraits de levure 5g/L, NaCl 5g/L
Milieu de culture LB-agar	Tryptone 10g/L, extraits de levure 5g/L, NaCl 5g/L, agar 20g/L
Orange G	Bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, glycérol 30%
STE 10X	Tris-HCl 100mM, NaCl 1M, EDTA 10mM, pH8
Tampon A	Tris 50mM pH8, NaCl 1M, glycérol 10%, imidazole 20mM Tampon
Tampon B	Tris 50mM pH8, NaCl 1M, glycérol 10%, imidazole 500mM
Tampon de lyse	Tris 50mM pH8, NaCl 1M, glycérol 10%
Tampon de Binding + Clivage 1	Tris HCl pH8 60mM, DMSO 10%, NaCl 5M, $MnCl_2$
Tampon de Binding + Clivage 2	Hepes pH8 60mM, NaCl 5M, $MnCl_2$, 5mM
Tampon STOP	SDS 0,2%, EDTA 20mM, pH8
Tampon TBE	88mM Tris base, 88mM acide ortho-borique, 2mM EDTA, pH8
Tampon TE	Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM
TN	Tris 10mM pH8, NaCl 100mM
Tampon Hepes pH8	Hepes 500mM, NaCl 2M, L-arginine 1M

V.1 Création du vecteur pGINA001

Le vecteur d'expression pGINA001 a été créé dans le cadre de ce travail. Il est identique au vecteur pGIML-W24R-A174V-E740G/M-H à l'exception d'une paire de bases qui lui confère la mutation D751N.

V.1.1 PCR mutagénisante

Les résultats de 6 amplifications PCR mutagénisantes ont été rassemblés. Ces réactions se sont déroulées avec une étape d'hybridation à 60°C ou 62°C, en présence de 1,6 ; 16 ou 40ng de pGIML-W24R-A174V-E740G/M-H, 10µl de Tampon Q5 et 0,5µl de Polymérase Q5.

V.1.2 Restriction

Toutes les réactions de restriction se sont déroulées à 37°C durant 2h avec 1/50V d'enzyme HF, 1/10V de tampon CutSmart et 100ng de substrat.

V.1.3 Ligation

Deux proportions différentes (3:1 et 10:1) de l'amplicon muté et le *backbone* restreints par NcoI et PvuII ont été utilisées pour la ligation. Les échantillons contenant donc 50ng ou 20ng de *backbone* et 60ng ou 80ng d'amplicon respectivement ont incubé O/N dans 1/20V de ligase T4 et 1/10V de tampon ligase T4. Le contrôle sans amplicon contenait 100ng de *backbone*.

V.2 Purification de la transposase

V.2.1 Vecteur d'expression

Les différents mutants de la TnpA ainsi que la TnpA WT ont été produites à partir de souche TOP10 F- d'*E. coli*. Les souches utilisées contiennent un vecteur d'expression composé d'un promoteur P-ARA inductible au L-arabinose en amont duquel à été

insérée la séquence de la TnpA en fusion traductionnelle avec un Tag MycHis₆. Ils contiennent aussi un gène de résistance à la tétracycline.

V.2.3 Induction

La TnpA étant peu soluble et instable à 37°C, un protocole d'induction par ajout de benzyl alcool est utilisé. Après la phase d'induction, la TnpA est maintenue à 4°C durant toute la durée du protocole de purification.

Les souches *E. coli* TOP10 contenant les vecteurs d'intérêts sont striées sur des boîtes de LB Agar avec 10µM de tétracycline et incubées à 37°C "overnight". Pour chaque souche utilisée, une colonie isolée est sélectionnée pour inoculer une pré-culture liquide de 30ml de milieu LB 10µM tétracycline à 30°C "overnight". La pré-culture est utilisée pour inoculer une culture de 750ml LB contenant de la tétracycline (10µM) et du Benzyl Alcool (10µM). Une densité optique initiale minimale de 0,04 est requise et évaluée à partir d'1ml de la culture lors de l'ajout de la préculture. La culture est incubée à 37°C avec une agitation de 100rpm et sa densité optique est évaluée régulièrement à partir d'1ml de culture. Lorsque la DO atteint entre 0,5 et 0,7, la culture est refroidie jusqu'à une température de 20°C. 1ml est récupéré et lavé 2X dans 1ml TN puis stocké à -20°C comme contrôle pré-induction. Ensuite, l'induction du promoteur P-ARA est déclenchée par ajout d'1ml de L-arabinose (20%). Après 2h d'incubation à 22,5°C à une agitation de 100rpm, 1ml de L-arabinose (20%) est encore ajouté avant de continuer l'incubation 2h supplémentaires. Après un total de 4h d'induction, 1ml est récupéré et lavé 2X dans 1ml TN puis stocké à -20°C comme contrôle puis la culture est centrifugée durant 10 minutes à 4°C, 4000rpm. Le culot est ensuite lavé par resuspension dans 100ml de tampon de lyse et centrifugé à nouveau durant 10 minutes à 4°C, 4000rpm. Le culot est conservé à -80°C dans son tube de centrifugation.

V.2.4 Lyse

Le culot est dégelé sur glace puis pesé et resuspendu dans 1ml de Tampon A par gramme de culot. Ce Tampon A contient une pastille de cOmplete EDTA-free (proteases inhibitor)/30ml.

La lyse cellulaire est effectuée par centrifugation avec des billes de verre. La solution est répartie dans des tubes de 2ml contenant 200µl de billes de verre et centrifugée 2 fois à 6.0m/s durant 25 secondes. Les échantillons sont conservés sur glace entre chaque étape. Les différentes phases du lysat sont séparées par centrifugation durant 15 minutes à 4°C 13000rpm. Le surnageant est ensuite récupéré et centrifugé à nouveau durant 15 minutes à 4°C 13000rpm. Le surnageant est finalement transféré dans une seringue et passé à travers un filtre de mailles 0,45µm et conservé à 4°C en attendant la purification.

V.2.5 Purification

Le principe de purification utilisé se base sur l'affinité du Tag MycHis₆ N-terminal pour une colonne de nickel. Le protocole est réalisée à 4°C à l'aide d'une Äkta Prime. Toutes les solutions utilisées avec l'Äkta Prime ont été préalablement filtrées et dégazées. Après un cycle de lavage à l'eau de la machine, la colonne est équilibrée avec du tampon de lyse et une solution de NiSO₄ 0,1M. Le lysat est chargé sur la colonne puis la colonne est lavée avec un mélange de tampon A et B avec une proportion croissante de tampon B créant ainsi un gradient de concentration d'imidazole dont la concentration croît progressivement de 20mM à 500mM. Les liaisons aspécifiques entre protéines et colonne sont déplacées par de faibles concentrations d'imidazoles tandis que l'élution de la TnpA recombinante fixée par son Tag MycHis₆ nécessite des concentrations plus importantes permettant ainsi sa séparation. L'élution des protéines du lysat est suivie par spectrophotométrie ce qui permet la détection du pic d'élution correspondant à l'élution de la TnpA.

V.2.6 Evaluation de la purification par SDS PAGE

Les échantillons de culture avant et après 4 heures d'induction ainsi que les échantillons des différentes phases du lysat sont comparés aux fractions d'élution de la purification sur un gel SDS PAGE dénaturant. Les différents échantillons sont suspendus dans un mélange de Crack et d'H₂O et chauffés durant 10 minutes à 95°C. Les échantillons sont

ensuite chargés sur un gel pré-casté 4-10% et soumis à un courant de 120V durant 50 minutes. Le gel est ensuite révélé par immersion dans l'Instant Blue.

V.2.7 Reconcentration des protéines

Les fractions contenant le meilleur rapport de TnpA/impuretés sont rassemblées par et reconcentrées à l'aide d'AMICON Ultra 4 - 10kDa. L'AMICON contenant les fractions d'intérêt est centrifugé à 4°C 4000g durant 15 à 20 minutes. Le tampon B 500mM Imidazole est ensuite remplacé en rediluant l'échantillon dans du Tampon de Lyse puis en le reconcentrant 4°C 4000g durant 15 à 20 minutes. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C.

V.2.8 Dosage des protéines

Les concentration en TnpA utilisées dans ce travail ont été déterminée par dosage de Bradford. La concentration de 10µl d'échantillon est évaluée via son absorbance après ajout de 40µl de Bradford Dye et 150µl de H₂O. Les valeurs d'absorbance sont comparées à une courbe d'étalonnage pour des concentrations connues de BSA.

V.3 Retard sur Gel

Table 4 : Oligonucléotides utilisés

Oligonucléotide	Séquence (Orientation 5' vers 3')
EN100 1 Long	TTGTATTATTTTGCGCGCTAGCCTAGAG GATCTTAGCGTGGTTTTTTTCCGAAATG CTGGCGGTACCCCATGGATGCATCTC GAGCTAGAGGATCCCCG
EN100 2 Long	CGGGGATCCTCTAGCTCGAGATGCATC CATGGGGGTACCGCCAGCATTTTCGGAA AAAAACCACGCTAAGATCCTCTAGGCT AGCGCGCAAAATAATACAA

EN100 3' 1	TTGTATTATTTTGC GCGCTAGCCTAGAG GATCTTAGCGTGGTTTTTTTCCGAAATG CTGGCGGTACCCC - OH
EN100 3' 2	PO4-CATGGATGCATCTCGAGCTAGA GGATCCCCG
C001	GTACCGCCAGCATTTTCGGAAAAAACC ACGCTAAGATCCTCTAGGCTAGCGCGC AAAATAATACAA - OH
C002	OH-CGGGGATCCTCTAGCTCGAGATGCATC CATGGGG

V.3.1 Préparation du substrat oligonucléotidique synthétique

V.3.1.1 Marquage des oligonucléotides au γ - ^{32}P

Les isotopes γ - ^{32}P sont commandés sous forme d'une solution d'ATP γ - ^{32}P . La Phospho-nucléotide Kinase (PNK) est utilisée pour transférer un groupement phosphate d'une molécule d'ATP γ - ^{32}P sur l'extrémité 5'-OH de l'oligonucléotide d'intérêt. La réaction de transfert a lieu dans un tampon PNK auquel sont ajoutés 5mM de DTT, 5mM de Spermidine, 50pmoles d'oligonucléotide d'intérêt, 1,5 μl d'ATP γ - ^{32}P et 1,5 μl de PNK. La réaction à 37°C durant 2h puis la PNK est inactivée par un passage de 20 minutes à 65°C.

L'ATP γ - ^{32}P excédentaire est éliminé par centrifugation sur Colonne (GE Healthcare illustra™ Microspin™ G-25 Columns) durant 2 minutes à 795g.

V.3.1.2 Annealing

Oligonucléotide EN100-1 Long de 100nt radiomarké est hybridé à ses oligonucléotides complémentaires C001 (66nt) et C002 (34nt) pour former une IR synthétique présentant une coupure à son extrémité 5' externe. L'oligonucléotide marqué est mis en présence de 60pmol de C001 et de C002 dans du tampon STE 1X. L'hybridation des

oligonucléotides est stimulée par un passage de 10 minutes à 95°C suivi d'un refroidissement progressif à température ambiante durant 3 heures.

V.3.1.3 Purification

L'ADN hybridé radiomarké est purifié par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Le gel contient 8% d'acrylamide 19:1 dilué dans du tampon TBE. La polymérisation est catalysée par l'ajout d'ammonium persulfate et de TEMED. Le gel polymérise durant 45 minutes et est placé à travers un courant de 150V durant 30 minutes. Les échantillons ainsi qu'un contrôle ne contenant que l'oligonucléotide radiomarké non-hybridé EN100-1 Long sont chargés dans les puits dans du tampon Orange G et soumis à un courant de 200V durant 2 heures.

Le gel est révélé par autoradiographie. L'apposition du gel sur un film d'autoradiographie (Amersham Hyperfilm™ MP) en absence de lumière durant 15 minutes permet sa révélation.

La bande correspondant à l'ADN radiomarké hybridé est repérée par superposition du gel sur le film autoradiographique et plongée dans du tampon STE 1X à température ambiante durant une nuit pour permettre la diffusion de l'ADN vers le tampon.

Après diffusion, le tampon STE contenant l'ADN radiomarké hybridé est filtré dans une colonne Nanosep (NANOSEP MF 0,45µm PALL) pour éliminer l'acrylamide.

L'ADN radiomarké subit ensuite une précipitation à l'éthanol afin d'être dilué dans un tampon TE jusqu'à l'obtention d'une intensité de radiation = 150 cps/µl.

V.3.1.4 Réaction de Liaison et Clivage

Un mélange réactionnel initial contenant 2µl d'ADN linéaire radiomarké, des concentrations variables de TnpA, le cofacteur 5mM de MnCl₂ et 2mg/ml de BSA dans du tampon de clivage (Tris HCl pH8 60mM, DMSO 10%, NaCl 5M) est incubé à 30°C durant

15 minutes. Une moitié du volume de réaction est incubé 4 heures supplémentaires à 34°C pour permettre à la réaction de clivage d'avoir lieu tandis que l'autre est mélangée à du tampon de loading (Orange G) et chargée sur un gel de polyacrylamide en conditions natives afin d'observer la formation de complexes TnpA-Substrat. Le gel contient 5% de polyacrylamide, 8% de TBE et la polymérisation est déclenchée par addition de 200µl d'APS et 40µl de TEMED. Après 1 heure de polymérisation le gel est immergé dans du tampon TBE et soumis à un courant de 200V durant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont ensuite chargés sur le gel et sont soumis à un courant de 180V durant 5 heures à 4°C. Le gel est ensuite adhérent sur une feuille de papier et emballé dans du papier saran. Le gel est révélé via apposition contre un Phosphorimager (BIORAD Image Screen-K 35x43cm) dans une cassette durant 1 à 3 jours. Le Phosphorimager est un écran radio-luminescent à mémoire qui est ensuite lu par photostimulation laser grâce au Pharos FX Molecular Imager. Les images sont exportées et traitées via le programme QuantityOne.

Après 4 heures d'incubation à 34°C, l'autre moitié de l'échantillon est diluée dans un volume de tampon STOP (SDS 0,2%, EDTA 20mM, pH8) et la TnpA est dégradée par incubation avec 0,6mg/ml de Protéinase K à 37°C durant 30 minutes. Le substrat ADN est ensuite récupéré par extraction au phénol-chloroforme.

Le volume de chaque échantillon est porté à $V = 200\mu\text{l}$ par addition de TE. $V/5$ de NaClO_4 5M et $V/2$ de Phénol équilibré dans du TE pH8 sont ajoutés. Les échantillons sont agités une première fois vigoureusement durant 30 secondes puis, après addition de $V/2$ de Chloroforme Alcool Iso-Amylique 24:1, l'échantillon est agité une seconde fois. Les phases sont séparées par centrifugation à 13 000 rpm durant 5 minutes et la phase aqueuse contenant le substrat ADN est récupérée à la pipette. L'absence de signal radioactif en provenance de la phase phénolique assure le succès de l'extraction. L'ADN extrait est ensuite précipité par addition de 3V d'éthanol et $V/5$ de NaClO_4 5M, incubation à -20°C durant 1 heure et centrifugation à 13 000 rpm durant 30 minutes.

L'ADN précipité est resuspendu dans de l' H_2O et du tampon de loading et puis chargé sur un gel de polyacrylamide afin d'observer la présence d'ADN clivé par la TnpA. Le gel contient 8% de polyacrylamide, 8% de TBE et la polymérisation est déclenchée par

addition de 200µl d'APS et 40µl de TEMED. Après 1 heure de polymérisation le gel est immergé dans du tampon TBE et soumis à un courant de 150V durant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite chargés sur le gel et sont soumis à un courant de 200V durant 2 heures. Le gel est ensuite séché sous vide à 80°C durant 2 heures avec le Model 583 Gel Dryer et la pompe à vide HydroTech™ vacuum pump de BIORAD. Le gel est révélé via apposition contre un Phosphorimager (BIORAD Image Screen-K 35x43cm) dans une cassette durant 1 à 3 jours. Le Phosphorimager est un écran radio-luminescent à mémoire qui est ensuite lu par photostimulation laser grâce au Pharos FX Molecular Imager. Les images sont exportées et traitées via le programme QuantityOne.

VI. Bibliographie

- Adzuma, K. and K. Mizuuchi. 1991. "Steady-State Kinetic Analysis of ATP Hydrolysis by the B Protein of Bacteriophage Mu: Involvement of Protein Oligomerization in the ATPase Cycle." *Journal of Biological Chemistry* 266(10):6159–67.
- Arciszewska, Lidia K., Daniela Drake, and Nancy L. Craig. 1989. "Transposon Tn7. Cis-Acting Sequences in Transposition and Transposition Immunity." *Journal of Molecular Biology* 207(1):35–52.
- Arkhipova, Irina R., Irina A. Yushenova, and Esther Angert. 2019. "Giant Transposons in Eukaryotes: Is Bigger Better?" *Genome Biology and Evolution* 11(3):906–18.
- Arthur, A., E. Nimmo, S. Hettle, and D. Sherratt. 1984. "Transposition and Transposition Immunity of Transposon Tn3 Derivatives Having Different Ends." *The EMBO Journal* 3(8):1723–29.
- Aziz, Ramy K., Mya Breitbart, and Robert A. Edwards. 2010. "Transposases Are the Most Abundant, Most Ubiquitous Genes in Nature." *Nucleic Acids Research* 38(13):4207–17.
- Baker, T. A., M. Mizuuchi, and K. Mizuuchi. 1991. "MuB Protein Allosterically Activates Strand Transfer by the Transposase of Phage Mu." *Cell* 65(6):1003–13.
- Beauregard, Arthur, M. Joan Curcio, and Marlene Belfort. 2008. "The Take and Give Between Retrotransposable Elements and Their Hosts." *Annual Review of Genetics* 42(1):587–617.
- Bischerour, Julien and Ronald Chalmers. 2009. "Base Flipping in Tn10 Transposition: An Active Flip and Capture Mechanism" edited by A.-K. Bielinsky. *PLoS ONE* 4(7):e6201.
- Blundell-Hunter, George, Michael Tellier, and Ronald Chalmers. 2018. "Transposase Subunit Architecture and Its Relationship to Genome Size and the Rate of Transposition in Prokaryotes and Eukaryotes." *Nucleic Acids Research* 46(18):9637–46.
- Boocock, Martin R. and Phoebe A. Rice. 2013. "A Proposed Mechanism for IS607-Family Serine Transposases." *Mobile DNA* 4(1):24.
- Chaconas, George, Elizabeth B. Giddens, Janet L. Miller, and Greg Gloor. 1985. "A Truncated Form of the Bacteriophage Mu B Protein Promotes Conservative

- Integration, but Not Replicative Transposition, of Mu DNA." *Cell* 41(3):857–65.
- Chandler, Michael, Olivier Fayet, Philippe Rousseau, Bao Ton Hoang, and Guy Duval-Valentin. 2015. "Copy-out–Paste-in Transposition of IS911: A Major Transposition Pathway." Pp. 591–607 in *Mobile DNA III*.
- Chandler, Michael, Fernando De La Cruz, Fred Dyda, Alison B. Hickman, Gabriel Moncalian, and Bao Ton-Hoang. 2013. "Breaking and Joining Single-Stranded DNA: The HUH Endonuclease Superfamily." *Nature Reviews Microbiology* 11(8):525–38.
- Chuong, Edward B., Nels C. Elde, and Cédric Feschotte. 2017. "Regulatory Activities of Transposable Elements: From Conflicts to Benefits." *Nature Reviews Genetics* 18(2):71–86.
- Craig, Nancy L. 1997. "Target Site Selection in Transposition." *Annual Review of Biochemistry* 66(1):437–74.
- Curcio, M. Joan and Keith M. Derbyshire. 2003. "The Outs and Ins of Transposition: From MU to Kangaroo." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(11):865–77.
- Davies, Douglas R., Lisa Mahnke Braam, William S. Reznikoff, and Ivan Rayment. 1999. "The Three-Dimensional Structure of a Tn5 Transposase-Related Protein Determined to 2.9-Å Resolution." *Journal of Biological Chemistry* 274(17):11904–13.
- Davies, Douglas R., Igor Y. Goryshin, William S. Reznikoff, and Ivan Rayment. 2000. "Three-Dimensional Structure of the Tn5 Synaptic Complex Transposition Intermediate." *Science* 289(5476):77–85.
- Döring, H. P. and P. Starlinger. 1984. "Barbara McClintock's Controlling Elements: Now at the DNA Level." *Cell* 39(2 PART 1):253–59.
- Draime, Amandine. 2012. "Mécanisme d'activation de La Transposase TnpA Du Transposon Tn4430."
- Eickbush, Thomas H. and Varuni K. Jamburuthugoda. 2008. "The Diversity of Retrotransposons and the Properties of Their Reverse Transcriptases." *Virus Research* 134(1–2):221–34.
- Fedoroff, N., S. Wessler, and M. Shure. 1983. "Isolation of the Transposable Maize Controlling Elements Ac and Ds." *Cell* 35(1):235–42.
- Finnegan, David J. 1989. "Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution." *Trends in Genetics* 5(C):103–7.
- Frost, Laura S., Raphael Leplae, Anne O. Summers, and Ariane Toussaint. 2005. "Mobile

- Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution." *Nature Reviews Microbiology* 3(9):722–32.
- Ge, Jun, Zheng Lou, and Rasika M. Harshey. 2010. "Immunity of Replicating Mu to Self-Integration: A Novel Mechanism Employing MuB Protein." *Mobile DNA* 1(1):8.
- Ghanim, George E., Elizabeth H. Kellogg, Eva Nogales, and Donald C. Rio. 2019. "Structure of a P Element Transposase–DNA Complex Reveals Unusual DNA Structures and GTP-DNA Contacts." *Nature Structural and Molecular Biology* 26(11):1013–22.
- Goodwin, Timothy J. D. and Russell T. M. Poulter. 2001. "The DIRS1 Group of Retrotransposons." *Molecular Biology and Evolution* 18(11):2067–82.
- Green, B. D., L. Battisti, and C. B. Thorne. 1989. "Involvement of Tn4430 in Transfer of Bacillus Anthracis Plasmids Mediated by Bacillus Thuringiensis Plasmid PX012." *Journal of Bacteriology* 171(1):104–13.
- Greene, Eric C. and Kiyoshi Mizuuchi. 2002. "Dynamics of a Protein Polymer: The Assembly and Disassembly Pathways of the MuB Transposition Target Complex." *EMBO Journal* 21(6):1477–86.
- Greene, Eric C. and Kiyoshi Mizuuchi. 2002. "Target Immunity during Mu DNA Transposition: Transpososome Assembly and DNA Looping Enhance MuA-Mediated Disassembly of the MuB Target Complex." *Molecular Cell* 10(6):1367–78.
- Grindley, Nigel D. F. 2002. "The Movement of Tn3-Like Elements: Transposition and Cointegrate Resolution." *Mobile DNA II* 272–302.
- Grindley, Nigel D. F., Katrine L. Whiteson, and Phoebe A. Rice. 2006. "Mechanisms of Site-Specific Recombination." *Annual Review of Biochemistry* 75(1):567–605.
- Hallet, Bernard, David J. Sherratt, and Finbarr Hayes. 1997. "Pentapeptide Scanning Mutagenesis: Random Insertion of a Variable Five Amino Acid Cassette in a Target Protein." *Nucleic Acids Research* 25(9):1866–67.
- Han, Yong Woon and Kiyoshi Mizuuchi. 2010. "Phage Mu Transposition Immunity: Protein Pattern Formation along DNA by a Diffusion-Ratchet Mechanism." *Molecular Cell* 39(1):48–58.
- Haniford, David B., Michael J. Ellis, and Mick Chandler. 2015. "Transposons Tn10 and Tn5." *Microbiol Spectrum* 3(1):3–5.
- Harshey, Rasika M. 2012. "The Mu Story: How a Maverick Phage Moved the Field Forward." *Mobile DNA* 3(1):21.
- He, Susu, Michael Chandler, Alessandro M. Varani, Alison B. Hickman, John P. Dekker,

- and Fred Dyda. 2016. "Mechanisms of Evolution in High-Consequence Drug Resistance Plasmids." *MBio* 7(6).
- Heffron, Fred, Brian J. McCarthy, Hisako Ohtsubo, and Eiichi Ohtsubo. 1979. "DNA Sequence Analysis of the Transposon Tn3: Three Genes and Three Sites Involved in Transposition of Tn3." *Cell* 18(4):1153–63.
- Hickman, Alison B. and Fred Dyda. 2015. "Mechanisms of DNA Transposition." Pp. 531–53 in *Mobile DNA III*.
- Hickman, Alison B., Zhanita N. Perez, Liqin Zhou, Primrose Musingarimi, Rodolfo Ghirlando, Jenny E. Hinshaw, Nancy L. Craig, and Fred Dyda. 2005. "Molecular Architecture of a Eukaryotic DNA Transposase." *Nature Structural and Molecular Biology* 12(8):715–21.
- Hickman, Alison B., Andrea Regier Voth, Hosam Ewis, Xianghong Li, Nancy L. Craig, and Fred Dyda. 2018. "Structural Insights into the Mechanism of Double Strand Break Formation by Hermes, a HAT Family Eukaryotic DNA Transposase." *Nucleic Acids Research* 46(19):10286–301.
- Hickman, Alison Burgess, Michael Chandler, and Fred Dyda. 2010. "Integrating Prokaryotes and Eukaryotes: DNA Transposases in Light of Structure." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45(1):50–69.
- Koonin, Eugene V. and Tatyana V. Ilyina. 1993. "Computer-Assisted Dissection of Rolling Circle DNA Replication." *BioSystems* 30(1–3):241–68.
- Krupovic, Mart, Kira S. Makarova, Patrick Forterre, David Prangishvili, and Eugene V Koonin. 2014. "Casposons: A New Superfamily of Self-Synthesizing DNA Transposons at the Origin of Prokaryotic CRISPR-Cas Immunity." *BMC Biology* 12(1):36.
- Lambin, Michaël, Emilien Nicolas, Cédric A. Oger, Nathan Nguyen, Deborah Prozzi, and Bernard Hallet. 2012a. "Separate Structural and Functional Domains of Tn4430 Transposase Contribute to Target Immunity." *Molecular Microbiology* 83(4):805–20.
- Lambin, Michaël, Emilien Nicolas, Cédric A. Oger, Nathan Nguyen, Deborah Prozzi, and Bernard Hallet. 2012b. "Separate Structural and Functional Domains of Tn4430 Transposase Contribute to Target Immunity." *Molecular Microbiology* 83(4):805–20.
- Lavoie, Brigitte D. and George Chaconas. 1993. "Site-Specific HU Binding in the Mu

- Transpososome: Conversion of a Sequence-Independent DNA-Binding Protein into a Chemical Nuclease." *Genes and Development* 7(12 PART B):2510–19.
- Lee, C. H., A. Bhagwat, and F. Heffron. 1983. "Identification of a Transposon Tn3 Sequence Required for Transposition Immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(22 I):6765–69.
- Lereclus, Didier, Jacques Mahillon, Ghislaine Menou, and Marguerite M. Lecadet. 1986. "Identification of Tn 4430, a Transposon of *Bacillus Thuringiensis* Functional in *Escherichia Coli*." *MGG Molecular & General Genetics* 204(1):52–57.
- Leschziner, Andres E., Thomas J. Griffin IV, and Nigel D. F. Grindley. 1998. "Tn552 Transposase Catalyzes Concerted Strand Transfer in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13):7345–50.
- Mahillon, J. and M. Chandler. 1998. "Insertion Sequences." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62(3):725–74.
- Mahillon, Jacques and Didier Lereclus. 1988. "Structural and Functional Analysis of Tn4430: Identification of an Integrase-like Protein Involved in the Co-Integrate-Resolution Process." *The EMBO Journal* 7(5):1515–26.
- Marchese, Damien. 2016. "Etude Des Domaines Fonctionnels de La Transposase Du Transposon Tn4430."
- May, Earl W. and Nancy L. Craig. 1996. "Switching from Cut-and-Paste to Replicative Tn7 Transposition." *Science* 272(5260):401–4.
- McClintock, Barbara. 1950. "The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maze." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36(6):337–44.
- Mizuuchi, Kiyoshi. 1992. "Transpositional Recombination: Mechanistic Insights from Studies of Mu and Other Elements." *Annual Review of Biochemistry* 61(1):1011–51.
- Moelbert, Susanne, B. Normand, and Paolo De Los Rios. 2004. "Kosmotropes and Chaotropes: Modelling Preferential Exclusion, Binding and Aggregate Stability." *Biophysical Chemistry* 112(1):45–57.
- Montaño, Sherwin P., Ying Z. Pigli, and Phoebe A. Rice. 2012. "The Mu Transpososome Structure Sheds Light on DDE Recombinase Evolution." *Nature* 491(7424):413–17.
- Morris, Elizabeth R., Heather Grey, Grant McKenzie, Anita C. Jones, and Julia M. Richardson. 2016. "A Bend, Flip and Trap Mechanism for Transposon Integration." *ELife* 5(MAY2016).

- Nicolas, Emilien. 2011. "Biochemical Activities of the Transposase TnpA in Transposition and Target Immunity Mediated by the Replicative Transposon Tn4430."
- Nicolas, Emilien, Michael Lambin, Damien Dandoy, Christine Galloy, Nathan Nguyen, Cédric A. Oger, and Bernard Hallet. 2015. "The Tn3-Family of Replicative Transposons." Pp. 693–726 in *Mobile DNA III*.
- Nicolas, Emilien, Michaël Lambin, and Bernard Hallet. 2010. "Target Immunity of the Tn3-Family Transposon Tn4430 Requires Specific Interactions between the Transposase and the Terminal Inverted Repeats of the Transposon." *Journal of Bacteriology* 192(16):4233–38.
- Nicolas, Emilien, Cédric A. Oger, Nathan Nguyen, Michaël Lambin, Amandine Draime, Sébastien C. Leterme, Michael Chandler, and Bernard F. J. Hallet. 2017. "Unlocking Tn3-Family Transposase Activity in Vitro Unveils an Asymmetric Pathway for Transposome Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(5):E669–78.
- Nordmann, Patrice, Laurent Dortet, and Laurent Poirel. 2012. "Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae: Here Is the Storm!" *Trends in Molecular Medicine* 18(5):263–72.
- Oger, Cédric. 2018. "Ends-Synapsis and Target Integration during Replicative Transposition of the Tn 3 -Family Transposon Tn 4430."
- Partridge, Sally R. and Ruth M. Hall. 2005. "Evolution of Transposons Containing BlaTEM Genes [2]." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(3):1267–68.
- Partridge, Sally R., Stephen M. Kwong, Neville Firth, and Slade O. Jensen. 2018. "Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance." *Clinical Microbiology Reviews* 31(4).
- Peters, Joseph E. 2014. "Tn7." Pp. 647–67 in *Mobile DNA III*. Vol. 2 (5). American Society of Microbiology.
- Piégu, Benoît, Solenne Bire, Peter Arensburger, and Yves Bigot. 2015. "A Survey of Transposable Element Classification Systems - A Call for a Fundamental Update to Meet the Challenge of Their Diversity and Complexity." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 86:90–109.
- Reznikoff, William S. 2008. "Transposon Tn 5 ." *Annual Review of Genetics* 42(1):269–86.
- Rice, Phoebe A. 2019. "Structure of the P Element Transpososome Reveals New Twists

- on the DD(E/D) Theme." *Nature Structural and Molecular Biology* 26(11):989–90.
- Ronning, Donald R., Catherine Guynet, Bao Ton-Hoang, Zhanita N. Perez, Rodolfo Ghirlando, Michael Chandler, and Fred Dyda. 2005. "Active Site Sharing and Subterminal Hairpin Recognition in a New Class of DNA Transposases." *Molecular Cell* 20(1):143–54.
- Sakai, J. and N. Kleckner. 1997. "The Tn10 Synaptic Complex Can Capture a Target DNA Only after Transposon Excision." *Cell* 89(2):205–14.
- SanMiguel, Phillip, Alexander Tikhonov, Young Kwan Jin, Natasha Motchoulskaia, Dmitrii Zakharov, Admasu Melake-Berhan, Patricia S. Springer, Keith J. Edwards, Michael Lee, Zoya Avramova, and Jeffrey L. Bennetzen. 1996. "Nested Retrotransposons in the Intergenic Regions of the Maize Genome." *Science* 274(5288):765–68.
- Shapiro, J. A. 1979. "Molecular Model for the Transposition and Replication of Bacteriophage Mu and Other Transposable Elements." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(4):1933–37.
- Singer, Christopher M., Diana Joy, Donald J. Jacobs, and Irina V. Nesmelova. 2019. "Rigidity and Flexibility Characteristics of DD[E/D]-Transposases Mos1 and Sleeping Beauty." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 87(4):313–25.
- Smit, Arian FA. 1999. "Interspersed Repeats and Other Mementos of Transposable Elements in Mammalian Genomes." *Current Opinion in Genetics and Development* 9(6):657–63.
- Touchon, Marie and Eduardo P. C. Rocha. 2007. "Causes of Insertion Sequences Abundance in Prokaryotic Genomes." *Molecular Biology and Evolution* 24(4):969–81.
- Toussaint, Ariane and Christophe Merlin. 2002. "Mobile Elements as a Combination of Functional Modules." *Plasmid* 47(1):26–35.
- Vanhooft, Virginie, Christine Galloy, Hervé Agaisse, Didier Lereclus, Bernard Révet, and Bernard Hallet. 2006. "Self-Control in DNA Site-Specific Recombination Mediated by the Tyrosine Recombinase TnpI." *Molecular Microbiology* 60(3):617–29.
- Wang, Jinhong, James R. Steggles, and David J. Ellar. 2008. "Molecular Characterization of Virulence Defects in *Bacillus Thuringiensis* Mutants." *FEMS Microbiology Letters* 280(1):127–34.
- Whitfield, Crystal R., Simon J. Wardle, and David B. Haniford. 2009. "The Global Bacterial Regulator H-NS Promotes Transpososome Formation and Transposition in the Tn5

System." *Nucleic Acids Research* 37(2):309–21.

Wicker, Thomas, François Sabot, Aurélie Hua-Van, Jeffrey L. Bennetzen, Pierre Capy, Boulos Chalhouh, Andrew Flavell, Philippe Leroy, Michele Morgante, Olivier Panaud, Etienne Paux, Phillip SanMiguel, and Alan H. Schulman. 2007. "A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements." *Nature Reviews Genetics* 8(12):973–82.

Yoder, Jeffrey A., Colum P. Walsh, and Timothy H. Bestor. 1997. "Cytosine Methylation and the Ecology of Intragenomic Parasites." *Trends in Genetics* 13(8):335–40.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté des sciences

Place des sciences, 2 bte L6.06.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | www.uclouvain.be/sc