

Université des Sciences et Technologies de Lille

-

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE DE DOCTORAT

en Génétique Microbienne

Présentée par

Mathieu DUCATEZ

Nouvel aperçu dans l'évolution du métabolisme des polysaccharides de réserve chez les Archaeplastides

*Dirigée par le Pr Christophe COLLEONI
et soutenue le 16 décembre 2015*

Les membres du jury :

Gilbert Greub, Professeur au CHUV Lausanne
Agathe Subtil, Directrice de Recherche Institut Pasteur Paris
Francisco Javier Florencio, Professeur Université de Séville
Steven Ball, Professeur de l'Université Lille1
Christophe Colleoni, Professeur de l'Université Lille1
Christophe D'hulst, Professeur de l'Université Lille1

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Président

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, au laboratoire de l'UGSF (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle) UMR 8576 du CNRS, dans l'équipe de Génétique Microbienne du Professeur Steven Ball.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Steven Ball de m'avoir fait confiance dès le master et de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie également pour les discussions passionnantes sur l'évolution, mais aussi sur bien d'autres sujets (y compris le nucléaire !) que j'ai pu partager avec lui ou encore d'avoir su accepté mon humour pas toujours très facile à appréhender.

Je souhaite ensuite remercier le Professeur Christophe Colleoni de m'avoir accompagné tout au long de ces années comme directeur de thèse, et de m'avoir enseigné tant de choses et le tout toujours avec une bonne humeur sans égale. (J'aimerais rajouter, m'avoir supporté en tant que très « gros râleur ».) Une gentillesse et un calme pareil, ça n'a pas de prix !

Je remercie le Docteur Agathe Subtil d'avoir accepté de compter parmi les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que pour tous les judicieux conseils disséminés au cours des CST.

I would like to thank Professor Francisco Javier Florencio to have accepted to take part of my jury for this thesis manuscript.

Je remercie évidemment le Professeur Gilbert Greub, d'une part de m'avoir accueilli dans son laboratoire au CHUV et d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse, mais également de m'avoir permis de réaliser que la recherche pouvait rester une passion sans prétention et pleine d'intelligence (j'espère que tu comprendras cette phrase).

J'en profite pour remercier toute l'équipe du CHUV pour sa bonne humeur, son accueil et sa gentillesse. Je pense surtout à Séb qui m'a plus qu'aidé dans mon travail, et avec qui j'ai pu partagé de « bonnes » blagues Franco-Suisse, sans oublier Trestan et Seydina qui m'ont montré ce que la bioinfo avait de géniale, Carole pour son aide précieuse, Linda du Tessin pour sa bonne humeur et ses inventions de mots farfelus d'Italo-francese, Marie pour son soutien belge à un français nordiste perdu en Suisse et en manque de bonnes bières belges, et Ludo pour l'excellente détente de « Frouzes » et les discussions endiablées autour de bons verres.

Je remercie aussi le professeur Thierry Soldati de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Université de Genève, ainsi que Xuezhi pour son aide précieuse dans la manipulation de *Dictyostelium*. Thanks a lot Xuezhi !

Je remercie également le Professeur Andreas Weber pour son accueil dans son laboratoire, ainsi que toute l'équipe de la Heinrich Heine Universität. Merci spécialement à Fabio et Sam, qui même pour un court laps de temps, mal organisé et plein de rebondissements ont été capables d'un accueil extraordinaire ! Danke Fabio und Sam, das war toll (aber kurz) mit ihnen zuarbeiten. Ihr seid super nett!

Je remercie également Cathy, pour sa bonne humeur permanente, ainsi que pour toute la montagne de mutagenèse qu'elle a réalisée et qui m'a permis d'effectuer le travail sur CLg1.

Je ne pouvais pas écrire ces remerciements sans parler d'Ugo, sans qui bien des fois j'aurais mis un terme à beaucoup de choses. Merci beaucoup pour ton amitié qui continu encore aujourd'hui malgré le fait que tu sois un peu plus loin dans le « Grand Nord ». Merci pour ton humour, ta débilité partagée (amplement) et ta crédibilité dans la recherche !

Évidemment un grand merci également à Malika, ma « maman » pour beaucoup de choses et mon image râleuse pour le reste (je te vois déjà rire en lisant ça). Merci de nous soutenir quand ça va, mais aussi quand ça ne va pas !

Je voudrais évidemment remercier Justin avec qui j'ai partagé une bonne partie de mes études à la fac, jusqu'à être presque dans le même labo. Merci de m'avoir supporté tout ce temps sans broncher, et essaie de conserver la tête froide (mais aussi pleine d'humour). Je sais que tu comprendras.

Merci aussi à Sylvain que j'ai connu lorsqu'il a commencé sa licence, puis qui a gravi les échelons pour arriver jusqu'à la thèse : nos bières du jeudi souvent qu'à deux, ainsi que les parties de jeux de société un peu partout resteront dans nos mémoires (du moins dans la mienne au minimum) !

Il me reste à remercier toutes ces personnes qui ont partagé, partagent et partageront encore un bout de vie avec moi, qui me supportent et me soutiennent de bien des manières : Pierre, Alex, Alissa, Lapinou, DJ, Séb, Jeab, Yon, Camille... (je suis sûr que j'en oublie...) Encore désolé à tous de ne sûrement pas avoir été suffisamment disponible pour vous !

Passons aux choses sérieuses, Laura, la femme qui partage ma vie, mes tristesses, mes ras-le-bol, brave le froid et la pluie du Nord (pour une Réunionnaise ce n'est pas banal), mais aussi, et surtout les bons moments, le soleil venu d'ailleurs, les frites, la vie et ma folie : Merci. Tu es à mon sens la personne la plus courageuse et la plus innocente au monde. Merci d'avoir été là, d'être là et même plus que présente ! Je n'aurais jamais fait tout ça si tu n'y avais pas participé amplement. Je t'aime.

Je finis en remerciant ma famille, sans qui je n'en serais pas arrivé là non plus. Une pensée à ma maman qui nous manque à tous, à mon papa ainsi qu'à Simon et Mariette, que j'aime tous les trois très fort !

ABBREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
ADP-Glucose	Adénosine diphosphoglucose
Am	Amylose
Amp	Ampicilline
AMP	Adénosine monophosphate
Ap	Amylopectine
AS0	Artificial Sea Water
ASNIII	Artificial Sea water Nitrogen
ATP	Adénosyl tri phosphate
BET	Bromure d'éthidium
BLD	Beta Limit Dextrin
Cml	Chloramphénicol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DP	Degré de polymérisation
DTT	1,4-dithiothréitol
FPLC	Fast protein liquid chromatography
G1P	Glucose-1-Phosphate
GBSS	Granule-bound Starch synthase
GlgA/GlgA1/GlgA2	Amidon/glycogène synthétase
GlgB	Enzyme de débranchement
GlgP	amidon/glycogène phosphorylase
GlgX	enzyme de débranchement
Gly	Glycogène
HPAEC PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
iDBE	Enzyme de débranchement indirect
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycine
LB	Luria-Bertani
LGT	Transfert latéral de gène
MalQ ou D enzyme	Enzyme disproportionnante
NADP/NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
psi	Pound-force per square inch
P/V	Poids/volume
Tris	Tris-(hydrométhyl)-aminométhane
UDP	Uridine diphosphate
UDP-glucose	Uridine diphosphoglucose
UV	Ultra-Violet
WSP	Water soluble polysaccharide
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Résumé

Plusieurs indices suggèrent aujourd'hui que les Archaeplastides, un superphylum contenant les plantes et algues vertes, les algues rouges et les glaucophytes, sont apparus il y a environ 1,6 milliard d'années lorsqu'une cellule eucaryote hétérotrophe a établi une relation symbiotique avec deux autres organismes: une cyanobactérie diazotrophe et une bactérie pathogène intracellulaire obligatoire appartenant à l'ordre des chlamydiales. Durant le processus d'endosymbiose, la cyanobactérie a évolué après transfert endosymbiotique de gènes vers un organe spécialisé appelé plaste, tandis que les chlamydiales ont laissé pour empreintes dans le génome actuel des Archaeplastides une cinquantaine de gènes. De manière intéressante et probablement en réponse à l'acquisition de l'appareil photosynthétique, les Archaeplastides ont substitué leur biosynthèse de glycogène, la forme la plus répandue de polysaccharide de réserve dans le monde vivant, par une nouvelle forme semi-cristalline, appelée Amidon. Si le rôle de la cyanobactérie ancestrale est plutôt évident dans l'émergence de la lignée des Archaeplastides, qu'en est-il des bactéries parasites? Dans les cellules animales et d'amibes, les chlamydiales sont connues pour pirater le métabolisme carboné de l'hôte par la sécrétion d'effecteurs durant le cycle d'infection. Un de ces effecteurs décrits récemment correspond à l'activité de la glycogène synthase (GlgA), responsable de la synthèse de liaison O-glucosidique α -1,4 dans le cytosol de la cellule infectée. Il est intéressant de noter que la glycogène synthase de l'hôte est strictement contrôlée par des modifications post-traductionnelles et par la présence de glycogénine. Cette dernière étant une protéine synthétisant des glucanes courts, absolument nécessaires pour l'activité d'élongation de la glycogène synthase de l'hôte. De manière intéressante, des analyses phylogénétiques nous signalent que les isoformes d'amidon synthases III/IV (SSIII/SSIV) ont probablement évolué à partir d'une GlgA provenant d'une chlamydiale. Chez les plantes, ces isoformes sont impliquées dans l'architecture et la synthèse d'une amorce de glucanes responsable de l'initiation du grain d'amidon. Se basant sur ces observations, nous avons formulé l'hypothèse que l'activité GlgA des chlamydiales possède une propriété biochimique unique expliquant pourquoi celle-ci a été sélectionnée dans la lignée des Archaeplastides. Dans ce manuscrit, nous avons premièrement rapporté la caractérisation de la mutation d'une souche de cyanobactérie, impactant la synthèse de l'amidon, mais conservant la capacité à synthétiser une quantité normale de glycogène. Ce phénotype est corrélé avec une déficience dans l'isoforme GlgA2 appartenant à la même famille que les SSIII/IV des plantes. Ces résultats suggèrent que GlgA2 définit un facteur déterminant dans la synthèse d'amidon chez *Cyanobacterium* sp. CLg1. A cause des relations phylogénétiques entre les SSIII/IV des plantes et les GlgA chlamydiennes, nous nous sommes également occupés de caractériser biochimiquement des activités d'élongation de différentes espèces de chlamydiales. De manière intéressante nous avons montré que l'activité GlgA de *C.trachomatis* et de *P.acanthamoebae* était capable d'utiliser les deux nucléotides sucres : ADP-glucose et UDP-glucose. Ces derniers sont requis dans la synthèse du glycogène des bactéries et des eucaryotes respectivement. Ces résultats démontrent que l'activité GlgA de certaines chlamydiales a évolué pour détourner de manière plus efficace le stockage des carbohydrates de la cellule infectée.

Abstract

New insight of the evolution of storage polysaccharide metabolism in the Archaeplastida lineages.

Today, several lines of evidence suggest that the Archaeplastida, a superphylum containing plants/green alga, red alga and Glaucophyte lineage, appear approximately 1.6 billion years ago when a heterotrophic eukaryote cell established a symbiotic relationship with two partners: a unicellular diazotrophic cyanobacterium and obligatory intracellular bacteria belonging to Chlamydiae order. During the endosymbiosis process, the cyanobacterium has evolved through endosymbiotic gene transfer to specialized organelles named plastids, while chlamydial bacteria have left in the actual genomes of Archaeplastida a fingerprint of 50 genes. Interestingly, probably in response to the acquirement of photosynthetic apparatus, Archaeplastida lineages have substituted the glycogen biosynthesis, the widest form of storage polysaccharide in the living world by a novel form of semi-crystalline storage polysaccharide, named starch. If the role of ancestral cyanobacteria is pretty obvious in the emergence of Archaeplastida lineages, what about those parasitic bacteria? In animal and amoeba cells, Chlamydiales are well known to hijack the host carbohydrate metabolism through the secretion of effectors during infection cycle. One of those effectors, recently described, corresponds to glycogen synthase activity (GlgA) responsible for synthesizing α -1,4 O-glycosidic linkages into the cytosol of infected cell. It is interesting to stress out that host glycogen synthase is strictly controlled by post-translation modification and by the presence of glycogenin. The latter is a priming protein, which synthesizes short glucan absolutely requires for the elongation activity of host glycogen synthase. Interestingly, phylogenetic analyses point out that starch synthase III/IV isoforms (SSIII/IV) have probably evolved from GlgA of chlamydial bacteria. In Plants, those isoforms are involved in the architecture and in the synthesis of glucan primer responsible for the initiation of starch granule. Based on these observations, we hypothesize that GlgA activity of chlamydial species displays unique biochemical properties that could explain why this activity has been selected in the Archaeplastida lineages.

In this manuscript, we, first, report the characterization of mutant strain of cyanobacterium strain, which is impaired in the starch synthesis but retains the capability to synthesize a normal amount of glycogen. This phenotype is correlated with a defect in the GlgA2 isoform, which belongs to the same family of SSIII/IV of plants. Altogether, results suggest that GlgA2 defines another determinant in the biosynthesis starch in the Cyanobacterium sp. CLg1. Because of phylogenetic relationship between SSIII/IV of plant and GlgA of chlamydiales, we also carry out the biochemical characterization of elongation activities of different chlamydial species. Interestingly, we show that GlgA activities of *C.trachomatis* and *Parachlamydia* are able to use as substrate both nucleotide-sugars: ADP-glucose and UDP-glucose. The latter are required in the glycogen biosynthesis of bacteria and eukaryote, respectively. These results stress out that GlgA activities of some chlamydial species have evolved to be more efficient to hijack the carbohydrate storage of infected cell.

Mots clefs:

Chlamydiale ; Evolution ; Cyanobactérie ; Endosymbiose ; Plaste ; Glycogène synthase ; Amidon ; Glycogène

Key Words:

Chlamydiale ; Evolution ; Cyanobacterium ; Endosymbiosis ; Plastid ; Glycogen synthase ; Starch ; Glycogen

Table des matières

Remerciements	2
ABREVIATIONS	4
Résumé	5
Organisation générale du manuscrit de thèse :	12
Introduction	16
<i>A) Les polysaccharides de réserve</i>	16
1) Généralité sur les polysaccharides de réserve	16
2) La structure des polysaccharides de réserve de type α -glucan	16
a) Le glycogène :	16
b) L'amidon :	17
3) Métabolisme de deux polysaccharides de réserve : le glycogène et l'amidon	18
a) Anabolisme du glycogène et de l'amidon	18
b) Catabolisme d'un polysaccharide de réserve	21
<i>B) L'origine du plaste</i>	24
1 : L'endosymbiose primaire du plaste	24
a) « une endosymbiose bipartite ? »	24
b) L'établissement d'une symbiose tripartite à l'origine de l'endosymbiose du plaste	25
i) la mise en place de l'endosymbiose entre la cyanobactérie ancestrale et l'hôte eucaryote	25
ii) la mise en place de la symbiose tripartite à l'origine du plaste	26
iii) L'apparition d'un nouveau polysaccharide de réserve : l'amidon	30
2) L'unique autre endosymbiose primaire de plaste	30
<i>C) Cyanobacterium sp. CLg1</i>	33
1) La fixation d'azote et la photosynthèse : une combinaison difficile pour la cyanobactérie	33
2) L'isolation spatiale ou temporelle des mécanismes de photosynthèse et de diazotrophie : une stratégie cyanobactérienne	34
3) L'apparition de l'amidon chez les cyanobactéries et chez les archaeplastides : deux événements indépendants	35
<i>D) Généralités sur les Chlamydiales</i>	37
1) Classification des chlamydiales	37
2) Cycle de développement	39
a) La phase EBs	39
b) La première différenciation	40
c) L'entrée en phase RB et la décondensation des « chromosomes »	40
d) Le déroulement de la post-infection	40
e) La différenciation secondaire	40
3) Le système de sécrétion de type III	41
a) Origine du système de sécrétion de type 3	41
b) Les protéines sécrétées par le TTSS chez les chlamydiales	42
4) Comparaison entre les chlamydiaceae et chlamydiae-like	43
a) Comparaison entre les Chlamydiaceae et les « chlamydiae-like »	43
b) Le métabolisme des polysaccharides de réserve des chlamydiales	44
Matériels et Méthodes	47
Les milieux de culture	47
Observation en microscopie électronique à transmission de CLg1	49
Extraction d'ADN génomique des souches de CLg1	49
Génotypage du mutant 187G11 de CLg1	50
Clonage des produits de PCR	52
Extraction de plasmides	52
Construction des vecteurs d'expression pour les protéines de CLg1	53
	8

Construction des vecteurs d'expression pour les protéines de Chlamydiales	53
Purification des protéines recombinantes étiquetées 6Histidine	55
Analyses quantitatives des polysaccharides solubles et insolubles	55
Purification et analyse des polysaccharides solubles	56
Extraction des protéines	56
Expression des protéines recombinantes	56
Les gels d'activités ou « zymogrammes »	57
Analyses en Western-blot	58
Dosage de l'activité glycogène/amidon synthase pour CLg1	58
Dosage de l'activité glycogène/amidon synthase pour les Chlamydiales	59
Purification et identification de l'activité synthétase apparaissant sur le gel d'activité	59
Les enzymes recombinantes GlgA1 et GlgA2	60
Complémentation de mutant <i>E. coli</i> JW 3392-1 Δ glgA	61
Arbres phylogénétiques	61
Résultats	63
A) <i>Cyanobactéries</i>	63
Résultats	63
1) Sélection de 187G11, un mutant de <i>Cyanobacterium</i> CLg1 dépourvu d'amidon	63
2) 187G11 produit une quantité normale et une structure légèrement altérée de glycogène	64
3) La souche 187G11 est spécifiquement déficiente pour la glycogène/amidon synthase majeure	66
4) Caractérisation d'une mutation de glycogène/amidon synthase dans le génome 187G11	69
5) La caractérisation biochimique de la glycogène/amidon synthase dans les souches sauvages et mutantes de la cyanobactérie	71
6) L'activité GlgA2 est sélectivement liée à l'amidon de <i>Cyanobacterium</i> sp. CLg1 et peut initier la synthèse des polysaccharides	73
7) L'analyse phylogénétique des glycogène/amidon synthases SSIII-IV-GlgA2	75
Discussion	77
L'origine cyanobactérienne des sous-familles SSIII-IV-GlgA2 des glycogène/amidon synthase GT5	80
B) <i>Chlamydiales</i>	82
Résultats	83
1) Microscopie électronique	83
2) Complémentation d'une souche Δ GlgA par les synthases chlamydiennes	84
a) Complémentation sur milieu Kornberg	85
b) Dosage des polysaccharides solubles produits par les souches d' <i>E. coli</i> complémentées par les synthases chlamydiales en milieu M9 + Maltose.	86
3) Activité des glycogènes synthase chlamydiennes	87
a) Gel d'activité (Zymogramme) de toutes les synthases clonées	87
b) Purification et dosages radioactifs des activités synthases des chlamydiales	89
c) Zymogramme comparatif <i>C. trachomatis</i> et <i>E. coli</i>	93
d) Cas particulier de <i>W. chondrophila</i> avec une enzyme de branchement fusionnée à la glycogène/amidon synthase	95
5) Conclusion	96
Conclusion générale	98
Références	103
ANNEXES	111
<i>Arbres phylogénétiques</i>	111
<i>Travaux initiés au cours de ma thèse</i>	118
A) <i>Dictyostelium discoideum</i> , partenaire d'une future symbiose tripartite in vitro ?	118
1) Introduction	118
Production de mutants de <i>Dictyostelium discoideum</i> et étude phénotypique du métabolisme du glycogène dans les souches sauvages et mutantes de cet organisme.	119
2) Matériels et Méthodes	120
Extraction d'ADN	120

Construction des vecteurs KO pour <i>D. discoideum</i>	120
Transfection de <i>D. discoideum</i>	121
Isolation d'un clone	122
Infection d'une amibe par une chlamydiale	122
3) Résultats	123
4) Perspectives	125
B) Les transporteurs de nucléotides sucre	128
1) Introduction	128
Le transporteur de carbone photosynthétique ancestral, mis en œuvre lors de l'endosymbiose primaire du plaste.	128
2) Matériels et Méthodes	132
Souches et plasmides	132
Milieus de culture	132
Extraction d'ADN	133
Clonage des gènes de transporteurs	133
Isolation de membrane cellulaire	134
Vérification de la présence de la protéine d'intérêt dans la membrane par Western-blot	134
3) Résultats	134
4) Perspectives	136
C) Les phosphorylases chlamydiennes : GlgP ou MalP, eucaryotes ou procaryotes ?	138
Un évènement phylogénique de grande importance : l'origine des phosphorylases	140

Organisation générale du manuscrit de thèse :

Nous nous intéressons ici au fonctionnement du métabolisme de l'amidon, mais aussi à son histoire évolutive. De manière inattendue, la reconstruction de cette histoire révèle que ce métabolisme aurait joué un rôle central dans l'émergence des organismes eucaryotes photosynthétiques (i.e. Archaeplastides : plantes, algues rouges et glaucophytes). En effet, le lien symbiotique unissant la cellule eucaryote hétérotrophe et la cyanobactérie ancestrale lors de l'endosymbiose primaire du plaste, reposerait sur l'incorporation dans les réserves de glycogène de la cellule eucaryote du carbone photosynthétique généré par la cyanobactérie. Les études phylogénétiques montrent que parmi les enzymes de ce métabolisme, majoritairement d'origine eucaryote, seules quatre enzymes témoignent d'une origine procaryote. Parmi elles, l'ADP-glucose pyrophosphorylase qui est responsable de la synthèse de l'ADP-glucose. Cette enzyme, dont l'activité est étroitement dépendante de l'activité photosynthétique, contrôle le flux carboné chez les cyanobactéries, mais également chez les plantes. C'est donc sans surprise que les études phylogénétiques entérinent une origine cyanobactérienne de cette enzyme. En revanche, les activités d'élongation ou amidon/glycogène synthases, qui allongent les chaînes de glucose à partir de l'ADP-glucose, se sont avérées être d'origine chlamydienne. L'implication de pathogènes intracellulaires de type chlamydiale dans l'endosymbiose plastidiale avait déjà été soupçonnée lors de précédentes études phylogénétiques. Par ailleurs, la récente démonstration que l'activité glycogène synthase soit un facteur de virulence secrété par le système de sécrétion de type trois chez les chlamydiales conforte l'idée d'une contribution probable de ces bactéries pathogènes dans l'établissement de l'endosymbiose. Dans le modèle du « ménage à trois », les chlamydiales fournissent des enzymes intervenant dans le même flux métabolique, permettant l'utilisation du carbone photosynthétique, l'ADP-glucose, en l'incorporant sous forme de réserve à la future algue eucaryote. Il est à noter que l'ADP-glucose n'est absolument pas synthétisé par les cellules eucaryotes et que les glycogènes synthases sont exclusivement UDP-glucose dépendantes. La sécrétion de la glycogène synthase chlamydienne dans le cytosol de la cellule eucaryote a probablement participé à l'établissement d'un réseau métabolique et à l'établissement de l'endosymbiose (Figure 1).

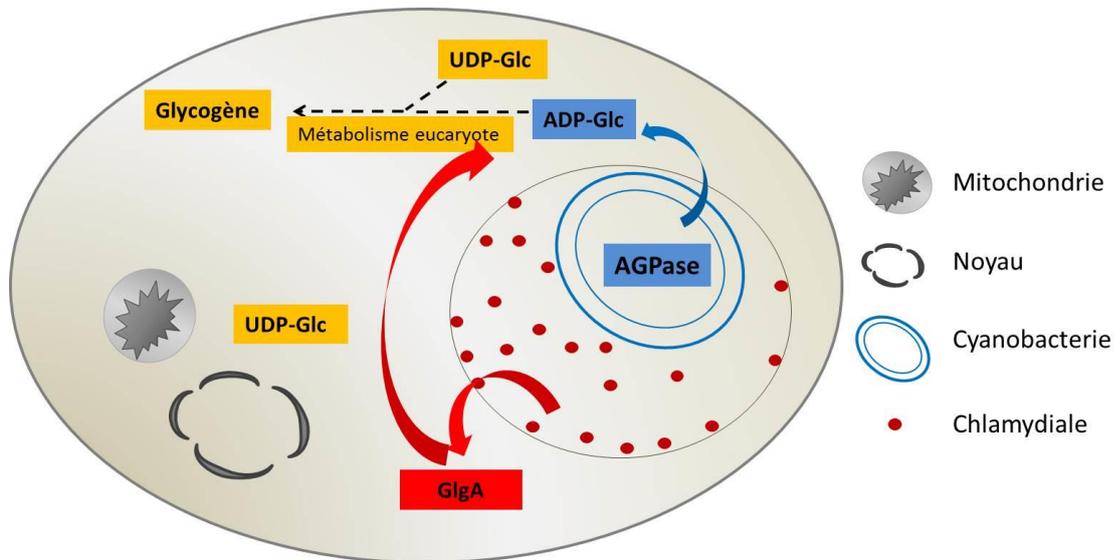


Figure 1 : Reconstitution du lien symbiotique établie lors de l'endosymbiose tripartite ou « ménage à trois ». En rouge l'intervention chlamydiale, en bleu l'intervention cyanobactérienne et en orange l'intervention eucaryote.

Le glycogène agirait donc comme une réserve tampon indispensable aux problèmes de synchronisation entre la demande et l'apport de carbone des différents organismes alors en symbiose.

Dans ce contexte, je me suis intéressé essentiellement à l'histoire évolutive du gène *glgA* codant pour l'enzyme au cœur de ce « ménage à trois ». Une retranscription de la phylogénie non enracinée de cette enzyme est représentée en figure 2 (schématisée à partir de Ball *et al.* (2013)).

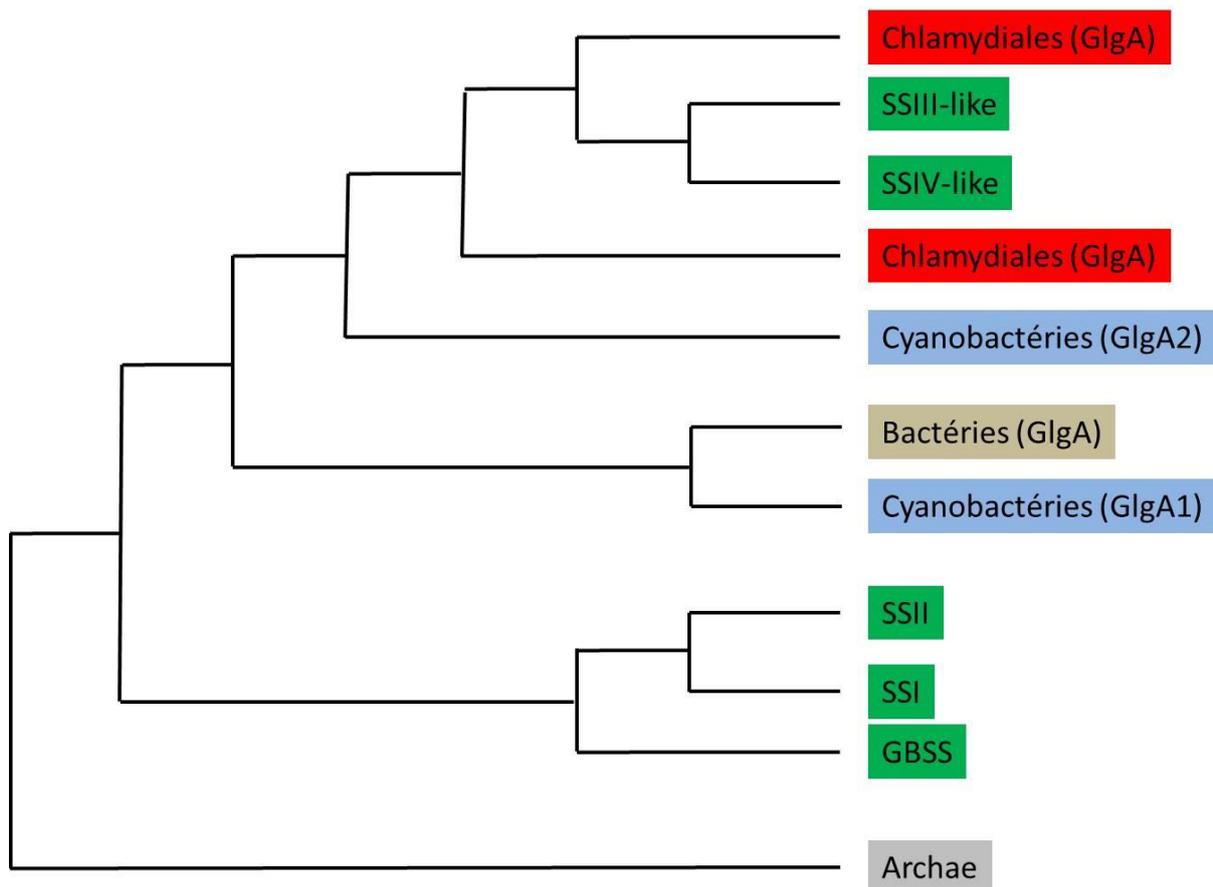


Figure 2 : Phylogénie des glycogène/amidon synthases, avec en vert la lignée verte (plantes/algues vertes), en bleu les cyanobactéries, en rouges les chlamydiales, en marron les autres bactéries, et en gris les Archae. « SS » est pour « Starch Synthase », « GBSS » est pour « Granule Bound Starch Synthase ».

L'érosion du signal phylogénique ne permet malheureusement pas d'enraciner cet arbre au sein de la diversité des autres glycogènes synthases bactériennes. Observons que malgré cela la phylogénie suggère que le gène codant cette enzyme a été transféré aux Archaeplastides dans toutes les topologies d'enracinement possibles (Figure 2), à la seule exception d'une topologie montrant les Archaeplastides donateurs du gène.

La Figure 2 suggère que deux groupes seulement de bactéries, les chlamydiales et les cyanobactéries montrent une certaine congruence entre la diversification du groupe entier et la phylogénie de GlgA. Nous nous sommes logiquement intéressés à la fonction de l'enzyme chez ces deux groupes. Dans le cas des cyanobactéries mon laboratoire disposait de modèles permettant de conduire la sélection de mutants aléatoires tandis que chez les chlamydiales nous avons voulu aborder cette question en retraçant l'évolution des propriétés cinétiques de cette enzyme dans le groupe entier.

La première partie de ce travail de thèse fut initiée au cours de la deuxième année de Master 2 recherche, avec la caractérisation d'une souche mutante de *Cyanobacterium* sp. CLg1 appartenant à l'ordre des Chroococcales. Ce mutant, nommé 187G11, est déficient pour la

synthèse de grain d'amidon, mais accumule une quantité normale de glycogène. Nous avons démontré que ce phénotype corrèle avec une mutation dans le gène *glgA2* qui appartient à la même famille des glycogènes synthases de chlamydiales et des amidons synthases III/IV de plantes (Figure 2). L'ensemble des données indique que la fonction principale de l'activité GlgA2 soit la synthèse de longues chaînes de glucose indispensable à l'apparition des grappes d'amylopectine et par conséquent à l'architecture du grain d'amidon.

La seconde partie se tourne naturellement vers l'étude des enzymes du métabolisme du glycogène chez les chlamydiales, et plus particulièrement, sur la caractérisation des glycogène synthases. Le clonage et l'expression de protéines recombinantes GlgA fut entrepris sur les espèces communément étudiées, *Chlamydia trachomatis*, *Parachlamydia acantamoeba* et *Protochlamydia acanthamoebae* et sur des espèces moins courantes en laboratoire telles que *Simkania negevensis*, *Estrella lausanensis* et *Waddlia chondrophila*. A travers cette caractérisation, nous montrons que toutes les glycogènes synthases utilisent l'ADP-glucose comme nucléotide-sucré, mais que cette spécificité est moins stricte pour les espèces pathogènes pour les animaux (i.e *Chlamydia trachomatis* et *Parachlamydia acanthamoebae*). Ce résultat surprenant révèle le caractère virulent des activités glycogènes synthases chlamydiennes, dont la pression de sélection a conduit à l'apparition de glycogène synthases mieux adaptées à un environnement cellulaire reposant sur l'utilisation de l'UDP-glucose.

Des travaux préliminaires et incomplets réalisés au cours de ma thèse sont regroupés en annexe de ce mémoire. Pour des raisons de clarté, j'ai souhaité les présenter sous la forme d'article comprenant une introduction, un matériel et méthodes et une partie résultats-discussion. Un premier travail porte sur la caractérisation de transporteurs humains et de levures, phylogénétiquement proche du transporteur de nucléotide-sucré ancestral. Un second volet concerne la production de mutants knock-out de *Dictyostelium discoideum* dépourvus des activités glycogène synthases. Ce travail s'inscrit dans un projet plus ambitieux qui consiste à reproduire une endosymbiose tripartite expérimentale. Une troisième partie porte sur une initiation de la caractérisation des phosphorylases chlamydiennes en les comparants à celles d'*E.coli*.

Introduction

A) Les polysaccharides de réserve

1) Généralité sur les polysaccharides de réserve

Il existe différentes formes de stockage de l'énergie dans le monde vivant. Les lipides et les polysaccharides sont les principales énergies carbonées et ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Par exemple, le stockage de l'énergie carbonée sous forme de gouttelettes lipidiques est un gain de place conséquent pour la cellule, en revanche sa métabolisation est plus longue mais son stockage durable. La métabolisation des polysaccharide est quant à elle beaucoup plus rapide, mais l'espace nécessaire à l'emmagasiner est plus grand (Chapman *et al.*, 2013).

Les polysaccharides sont une grande famille de molécules, mais les polysaccharides dits « de réserve » sont principalement composés d'homopolymères de glucoses, comme les beta-glucanes ou encore les α -glucanes. Les deux principaux homopolymères de glucose de type α -glucan sont le glycogène, que l'on retrouve chez les bactéries et la plupart des eucaryotes, des champignons aux animaux, et l'amidon, que l'on retrouve chez les organismes issus de l'endosymbiose primaire du plaste : les Archaeplastides (Rhodophytes, Chlorophytes, Glaucophytes).

2) La structure des polysaccharides de réserve de type α -glucan

Les homopolymères de glucose de type α -glucan sont composés de chaînes de glucoses liés en position α -1,4 et branchées en position α -1,6. Le glycogène et l'amidon qui sont tous deux des α -glucanes, ont exactement la même formule brute, à savoir $(C_6H_{12}O_6)_n$, et sont constitués des mêmes catégories de liaisons. Ils ont pourtant une structure radicalement différente.

a) Le glycogène :

Le glycogène est une molécule hydrosoluble et d'une taille théorique de 42 à 50 nm maximum, selon le modèle informatique proposé par (Meléndez *et al.*, 1998). D'après cette représentation, une molécule de glycogène est arrangée selon une croissance spiralee : les

chaînes de glucanes liées en α -1,4 et branchées en α -1,6 sont peu nombreuses au centre, et s'encombre fortement vers l'extérieur. Cette disposition engendre un encombrement spatial à la périphérie de la molécule réduisant la possibilité d'y ajouter davantage de glucose. Même si la capacité de stockage du glycogène est faible, sa conformation permet une métabolisation très rapide du carbone (Meléndez *et al.*, 1997).

b) L'amidon :

L'amidon est un granule semi-cristallin, insoluble dans l'eau, avec une taille théoriquement illimitée. L'organisation particulière de ses chaînes de glucose évite un encombrement stérique et permet cette croissance illimitée du grain. Deux constituants en sont à la base: l'amylose, minoritaire, et l'amylopectine, majoritaire.

L'amylopectine constitue 70 à 80 % du poids sec du grain d'amidon, et possède un taux de ramification, c'est-à-dire de liaisons α -1,6 d'environ 5 % en fonction des organismes la produisant. Ce pourcentage de branchement engendre la formation de grappes (French *et al.*, 1972). Différentes chaînes d'amylopectine nommées en fonction de leur position dans la molécule existent (Robin *et al.* 1974). Les chaînes A sont les plus externes et les plus courtes, elles ne possèdent pas de ramification. Les chaînes B sont de deux types, B1 et B2. Les chaînes B1 supportent les chaînes A et ne sont que sur une grappe. Les chaînes B2 supportent à la fois les chaînes A et d'autres chaînes B2, et relient deux grappes. Enfin, les chaînes C (ou B3) soutiennent l'ensemble des grappes et possèdent l'extrémité réductrice de l'amylopectine. On observe dans la molécule d'amylopectine une alternance de couches amorphes, zones dans lesquelles sont rassemblées les points de branchements, et de couches cristallines, zones où les chaînes suffisamment longues se condensent en hélices. Cette alternance de couches amorphes/cristallines expliquerait le caractère semi-cristallin de l'amidon (Hizukuri, 1986) (Figure 3).

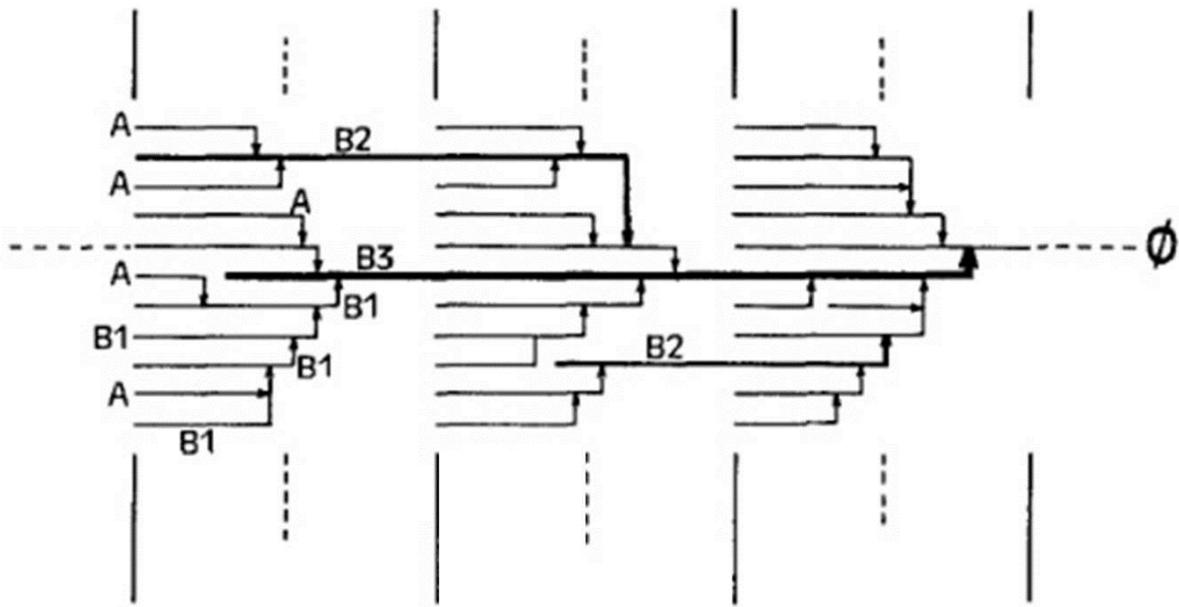


Figure 3 : Modèle de Hizukuri représentant les couches successives de l'amidon. Les chaînes A et les plus courtes chaînes B (B1) forment des grappes reliées entre elles par les plus longues chaînes B (B2) et les chaînes C (ou B3). Cet arrangement explique la disposition en couches amorphes et cristallines de l'amidon. Le signe « Ø » correspond à l'extrémité réductrice de la chaîne, les lignes continues symbolisent les chaînes de glucanes (au sein desquelles les glucoses sont reliés entre eux par des liaisons α -1,4) et les flèches représentent les liaisons α -1,6. (Figure adaptée de Hizukuri *et al.* 1986)

Un autre modèle existe pour expliquer le caractère semi-cristallin de l'amidon (Bertoft *et al.* 2011). Ce modèle s'appuie sur une analyse mathématique et sur la comparaison de la distribution des longueurs de chaînes de divers amylopectines et suggère que les chaînes les plus courtes (de type A) ne peuvent participer à la formation de la couche cristalline entraînant une toute autre représentation de la molécule d'amylopectine.

L'amylose, l'autre composant de l'amidon, constitue 20 à 30 % du poids sec du grain d'amidon et est peu branché (environ 1 % de point de branchement). Son rôle dans la structure et la cristallisation est mal compris.

Malgré leurs différences structurales, les métabolismes du glycogène et de l'amidon mettent en jeu des activités enzymatiques proches voire identiques.

3) Métabolisme de deux polysaccharides de réserve : le glycogène et l'amidon

a) Anabolisme du glycogène et de l'amidon

La synthèse du glycogène et de l'amidon débute par la production d'un nucléotide sucre

(NDP-Glucose) servant de précurseur indispensable à la formation puis à l'élongation des chaînes de glucose. L'enzyme permettant de synthétiser ce NDP-Glucose a pour nom NDP-Glucose-pyrophosphorylase.



En fonction de l'organisme synthétisant le précurseur, le NTP utilisé est soit de l'ATP soit de l'UTP (dans le nom de l'enzyme, la mention « NDP » est alors substituée en fonction du NTP utilisée par cette dernière). Chez les bactéries par exemple qui stockent du glycogène comme polysaccharide de réserve, c'est une ADP-Glucose-pyrophosphorylase qui synthétise le précurseur à partir d'ATP.

Par la suite, certains organismes tels que les levures ou les mammifères nécessitent une ou plusieurs glycoénine(s) pour amorcer l'élongation à partir d'un précurseur. Cette enzyme permet la synthèse *de novo* d'une courte chaîne de glucoses liés en α -1,4 à partir de plusieurs UDP-Glucose. Cette amorce ainsi créée peut ensuite être allongée par la glycogène synthase (pour revue: Lomako *et al.*, 2004; Smythe et Cohen, 1991 ; Cheng *et al.*, 1995). D'autres organismes, comme les bactéries pour la formation du glycogène, mais également les plantes pour la formation de l'amidon, ne nécessitent pas de glycoénine et utilisent directement une (ou plusieurs) glycogène/amidon synthase(s) (Ugalde *et al.*, 2003).



Par conséquent, la synthèse d'une chaîne de glucose est donc, soit catalysée d'abord par une glycoénine suivie de l'action d'une synthase, soit directement par une ou plusieurs glycogène/amidon synthase(s).

Les synthases (Figure 4) sont également appelées α -1,4 glycosyltransférase car elles transfèrent un résidu glucose en position α -1,4 d'une chaîne de glucoses avec le même type de liaison (GT3 et GT5 dans la classification CAZy). Après l'obtention de chaînes de glucoses liés en α -1,4, celles-ci se retrouvent ramifiées grâce à l'effet des enzymes de branchement.

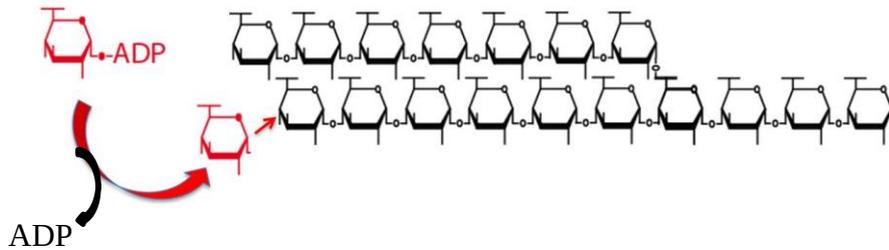
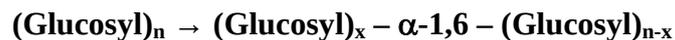


Figure 4 : Schématisation de l'action de la synthase. Cette dernière utilise l'ADP-glucose pour venir fixer un glucose sur l'extrémité non-réductrice d'une chaîne de glucoses en formation.

L'enzyme de branchement coupe tout d'abord une liaison α -1,4 d'une chaîne (Glucosyl) $_n$ (qui devient (Glucosyl) $_{n-x}$), pour ensuite y fixer en α -1,6 le morceau de chaîne qu'elle a découpé préalablement : (Glucosyl) $_x$. Ce transfert peut se faire sur la chaîne à l'origine du fragment (branchement intrachaine) ou sur une autre chaîne proche (branchement interchaîne).



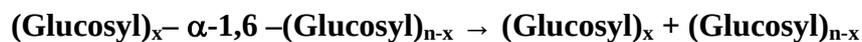
A ce stade, le polysaccharide obtenu est hydrosoluble et hyperbranché.

Lors de la synthèse de l'amidon, une enzyme de débranchement entre en jeu à cette étape et débranche les chaînes branchées en α -1,6 qui sont en excès. Consécutivement, les chaînes proches peuvent s'enrouler les unes aux autres, deux par deux pour former une hélice et chasser l'eau présente auparavant entre-elles. Cet épissage permet la formation de grappes d'amylopectine, hydrophobes et semi-cristallines. (Ball *et al.*, 1996) (Figure 5)

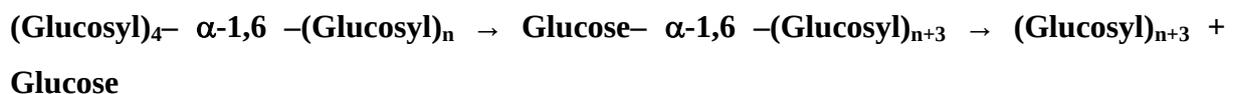
Elles coupent les liaisons α -1,4 en consommant du phosphate inorganique (Pi). Les résidus glucoses sont détachés un par un ce qui entraîne la production de Glucose-1-Phosphate. L'enzyme cesse d'agir lorsqu'il reste 4 résidus glucose en amont du point de branchement le plus proche.



Les phosphorylases limites dextrines ainsi produites par l'action des phosphorylases sont le substrat des enzymes de débranchement. Ces dernières peuvent avoir une action directe ou indirecte. Dans le cas de débranchement direct, il y a une simple hydrolyse de la liaison α -1,6 et la libération d'un maltopolysaccharide.



En revanche, les enzymes de débranchement indirects (existant chez les eucaryotes) possèdent deux activités : une activité de débranchement (α -1,6 glucosidase) et une activité transférase (α -1,4 glucanotransférase). Ces enzymes n'agissent spécifiquement que sur des limite-dextrines (quatre résidus glucoses branchés sur une autre chaîne de glucoses). Le mécanisme est le suivant : l'enzyme clive la liaison α -1,4 de l'avant-dernier glucose d'une limite-dextrine, libérant trois résidus glucoses qui sont ensuite transférés sur l'extrémité non-réductrice d'une chaîne voisine et le dernier résidu glucose est alors libéré par l'activité α -1,6 glucosidase de cette même enzyme.



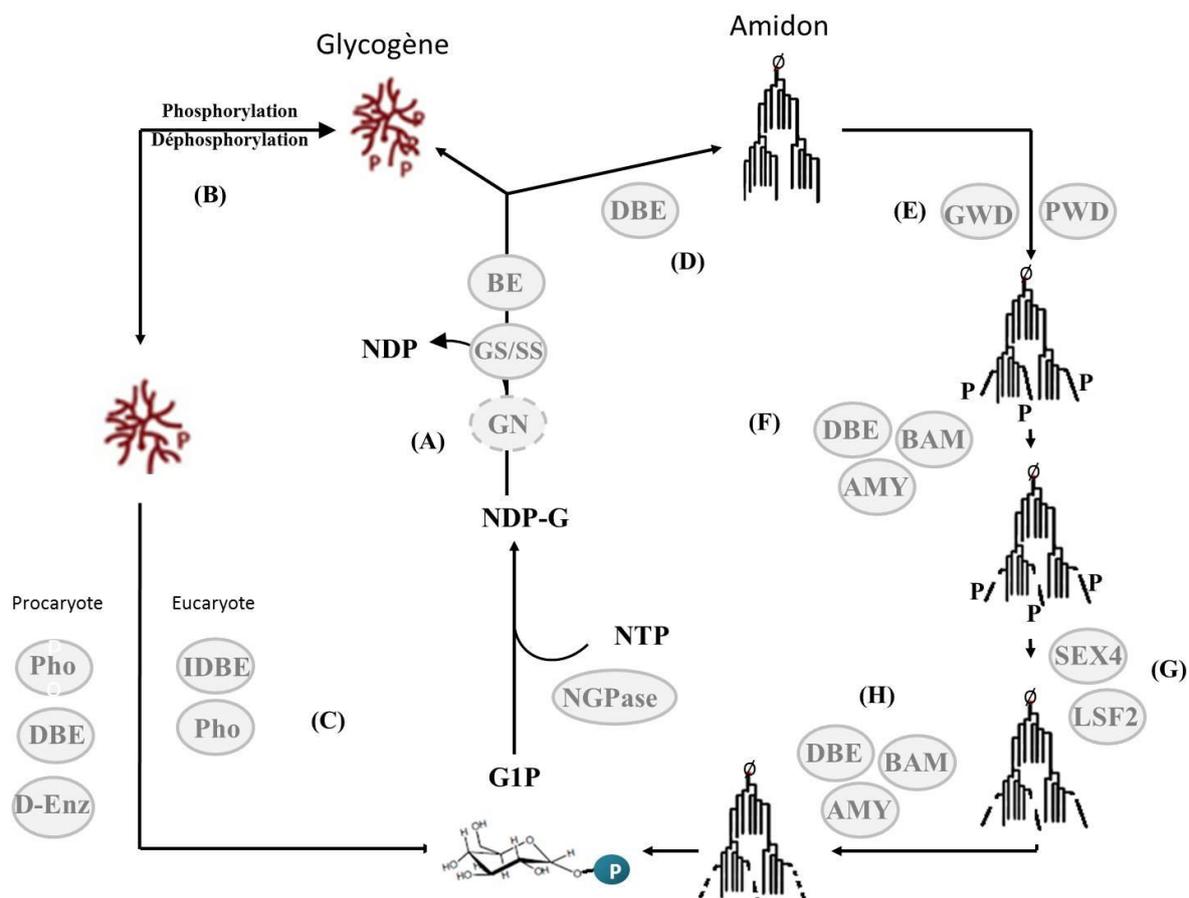


Figure 6 : Schéma simplifié de la synthèse et de la dégradation des deux principaux polysaccharides de réserve : le glycogène (sur la gauche) et l'amidon (sur la droite). Au centre du schéma, à partir d'un nucléotide sucre précurseur (NDP-G) provenant de la réaction catalysée par la NDP-glucose-pyrophosphorylase (NGPase) (qui utilise du glucose (G1P) et du NTP), les synthèses (GS et SS) (A), avec l'aide la dans certains cas de la glycogénine (GN) produisent et allongent des chaînes liées en α -1,4. S'en suit l'action des enzymes de branchement (BE) qui permet la formation d'un polysaccharide hydrosoluble. Dans le cas du polysaccharide de type glycogène (B), une action de phosphorylation/déphosphorylation prépare sa dégradation (C). Chez les procaryotes, les phosphorylases (Pho), les enzymes de débranchements (DBE) et l'enzyme disproportionnante (D-Enz) réalisent cette dégradation. Chez les eucaryotes, cette dégradation est faite par les phosphorylases (Pho) et les enzymes de débranchement indirect (IDBE). Ces dégradations redonnent du glucose (G1P). Dans le cas du métabolisme d'un polysaccharide de type amidon, après l'étape (A), l'action des enzymes de débranchement (DBE) (D) permet une réorganisation des chaînes et la formation de l'amylopectine insoluble et semi-cristalline. La phosphorylation (E) de la molécule par les kinases (GWD) et (PWD) débute sa dégradation et permet une première action des enzymes hydrolytiques (DBE), (AMY) et la Beta-amylase (BAM) avant de nécessiter une déphosphorylation (G) par SEX4 et LSF2 dans le but de terminer la dégradation (H) avec les enzymes précédentes. A l'issu du catabolisme de l'amidon, du glucose (G1P) est également disponible.

B) L'origine du plaste

Chacun des eucaryotes découverts à ce jour possède soit une mitochondrie, soit un mitosome, soit un hydrogénosome. Lorsqu'une cellule eucaryote possède un mitosome ou un hydrogénosome, celle-ci renferme également dans son noyau des traces de gènes transférés originaire d'une mitochondrie. De ce que l'on sait aujourd'hui, c'est que si une cellule eucaryote ne contient pas de mitochondrie cela signifie que celle-ci a été perdue, ou que sa transformation a conduit à l'apparition d'un mitosome ou d'un hydrogénosome.

Certains eucaryotes ont également un ou plusieurs organites que l'on appelle « plaste(s) ». Ces plastes sont présents exclusivement chez les eucaryotes photosynthétiques et se déclinent en plusieurs sous-catégories en fonction de l'organisme. Par exemple, les algues et plantes vertes possèdent un ou des chloroplaste(s) qui sont composés de pigments chlorophylliens. Il existe aussi les rhodoplastes chez les algues rouges, et les cyanelles chez les glaucophytes. Ainsi, selon le type de plaste présent, les Archaeplastides se divisent en trois lignées cellulaires : les algues rouges ou Rhodophytes, les algues et plantes vertes ou Chloroplastidae, et les Glaucophytes. Ces trois lignées sont issues d'un même ancêtre commun apparu il y a environ 1,6 milliard d'années suite à un événement endosymbiotique à l'origine du plaste (Yoon *et al.*, 2004).

Si, comme expliqué précédemment les mitochondries (en tant qu'organite ou comme traces de celles-ci) sont communes à tous les eucaryotes et que les plastes n'existent que chez certaines cellules eucaryotes, l'acquisition du plaste semble postérieure à l'endosymbiose à l'origine de la mitochondrie. En effet si l'acquisition du plaste avait été antérieure ou contemporain à cet événement, tous les eucaryotes posséderaient un plaste ou en conserveraient une trace.

1 : L'endosymbiose primaire du plaste

a) « une endosymbiose bipartite ? »

L'ancêtre commun qui donne naissance aux trois lignées des Archaeplastides résulte d'une endosymbiose dite « primaire » entre une cyanobactérie et une cellule hôte eucaryote.

Le type d'organisme unicellulaire eucaryote existant à l'époque de l'endosymbiose existe encore de nos jours et ses plus proches parents sont très probablement ce qu'on appelle aujourd'hui des amibes. Les amibes pratiquent la phagocytose comme moyen de subsistance, c'est-à-dire qu'elles se nourrissent de bactéries en commençant par les endocyter.

Les connaissances sur le cycle de vie des cyanobactéries ont immédiatement permis de

suspecter leur ancêtre comme étant cet endosymbionte. En effet, les cyanobactéries sont des procaryotes susceptibles d'être phagocytés et elles sont également capables de produire de l'énergie à l'aide de la photosynthèse oxydative, même mécanisme qui aurait été conféré par la cyanobactérie ancestrale à son héritier endosymbiotique.

L'ancêtre commun des Archaeplastides est hypothétiquement le résultat de la phagocytose disfonctionnelle d'une cyanobactérie par une amibe. Au lieu de s'en nourrir, la cellule eucaryote (l'amibe) se serait servie de la cyanobactérie comme source d'énergie en détournant les produits de sa photosynthèse.

Lorsque peu de génomes séquencés étaient encore disponibles, l'origine du plaste fut même donnée à une cyanobactérie du genre *Synechocystis* (Andersson *et al.*, 1998) (Brinkman *et al.*, 2002). La théorie de l'endocytose d'une cyanobactérie par un hôte eucaryote a finalement été globalement acceptée (Bhattacharya *et al.*, 2004) grâce à l'émergence de nouvelles études phylogéniques et à la comparaison de génomes.

Cependant une symbiose bipartite entre une cyanobactérie ancestrale et un eucaryote ancestral ne semblait pas suffisante pour expliquer l'origine des plastes.

La question du nombre d'endosymbiose et du nombre d'intervenant dans l'événement à l'origine des plastes s'est posée. Deux hypothèses se sont alors affrontées : celle de multiples endosymbioses successives (Whatley, 1981) et celle d'un événement unique (Gibbs, 1981) (avec un nombre de participant indéterminé intervenant lors d'un épisode unique).

Les éléments obtenus par le séquençage haut débit ainsi que par l'émergence de la phylogénie tendent à soutenir la thèse de l'événement unique (Moreira *et al.*, 2000 ; Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2005). Pour retracer une histoire de l'endosymbiose à l'origine du plaste qui soutient l'hypothèse de l'événement unique mais qui ne peut pas être expliqué par l'intervention de deux partenaires uniquement, une symbiose à trois partenaires, dite « tripartite » est suggérée.

b) L'établissement d'une symbiose tripartite à l'origine de l'endosymbiose du plaste

i) la mise en place de l'endosymbiose entre la cyanobactérie ancestrale et l'hôte eucaryote

L'endosymbiose du plaste, de la même manière que pour l'endosymbiose de la mitochondrie, s'est accompagnée d'un transfert massif de gènes.

Ces gènes massivement transférés du génome du plaste vers celui de l'hôte eucaryote (Timmis *et al.*, 2004) codent pour des protéines pour la plupart actives uniquement dans le plaste. La cellule eucaryote doit donc pouvoir rediriger ces protéines vers le plaste pour qu'elles puissent y être utilisées. Aujourd'hui les archaeplastides possèdent un système

d'adressage des protéines vers le plaste qui s'est progressivement mis en place et a participé de manière centrale au lien symbiotique naissant entre les deux partenaires.

Voici les deux mécanismes successifs connus de transfert de gènes de l'endosymbionte vers le génome de son hôte et qui ont engendré les prémices de l'endosymbiose.

Le premier transfert de gènes s'est fait lorsque ce système d'adressage n'était pas encore existant. Certains gènes ne codant pas pour des protéines immédiatement utiles au plaste mais pouvant coder pour des protéines à fonctions utiles pour l'eucaryote sont restés dans le noyau de l'hôte. Mais la plupart des autres gènes transférés ont été perdus, car dans l'impossibilité d'apporter un réel avantage à l'hôte. En effet ces gènes qui codent majoritairement pour des protéines étant utilisées par le plaste mais qui ne peuvent pas être utilisés par l'hôte et ne peuvent pas non plus être redirigées vers le plaste, sont par conséquent progressivement perdus.

Pour conserver les gènes des protéines utiles au plaste dans son génome, la cellule eucaryote hôte a dû développer un système d'adressage afin que les protéines du plaste traduites à partir de son génome remodelé soient exportées vers le plaste. Autrement, il n'y aurait eu aucune raison que ces gènes soient maintenus dans le génome de l'hôte.

Progressivement, ce mécanisme d'adressage, composé d'un étiquetage des protéines à diriger vers le plaste et d'un transporteur de protéines à travers les membranes du plaste s'est mis en place.

Un second transfert de gènes de l'endosymbionte vers le plaste a eu lieu une fois le système d'adressage des protéines mis en place. Lors de ce transfert, beaucoup plus de gènes nouvellement intégrés dans le génome nucléaire y sont restés. Cependant, les gènes transférés, redondants avec les gènes encore présents dans le génome plastidial sont par conséquent perdus par le plaste entraînant une régression du génome de l'organite rendant ce dernier d'autant plus dépendant à la cellule eucaryote. L'endosymbiose entre l'ancienne cyanobactérie (devenue un organite à part entière) et la cellule eucaryote est désormais définitivement établi.

Un problème persiste cependant, le carbone photosynthétique de l'organite ne peut être utilisé par la cellule eucaryote en l'état et nécessite l'intervention d'un troisième partenaire.

ii) la mise en place de la symbiose tripartite à l'origine du plaste

La synthèse d'un polysaccharide de réserve d'origine photosynthétique

En général les organismes vivants accumulent des polysaccharides comme source d'énergie (glycogène, amidon, beta-glucanes,...). Ce sont des polymères de carbone composés de longues chaînes de monosaccharides reliées entre eux par des liaisons glycosidiques. Les plus

grandes différences entre les polysaccharides sont leur organisation, mais aussi le type de liaisons utilisées ainsi que les monosaccharides qui les composent.

Nous avons vu précédemment (c.f. Paragraphe sur les polysaccharides de réserve) que lors de la synthèse d'un polysaccharide de type alpha-glucane, un nucléotide-sucres précurseur est nécessaire à l'élongation des chaînes de glucane. Le plus souvent, ce nucléotide-sucres est soit de l'ADP-glucose, soit de l'UDP-glucose. Cela sous-entend que pour synthétiser son polysaccharide, l'organisme possède les enzymes adaptés à la fois à la production de l'un ou l'autre des nucléotides-sucres, mais également à son utilisation.

Tous les eucaryotes (dont les Glaucophytes et les Rhodophytes) utilisent uniquement l'UDP-Glucose comme précurseur, à l'exception des Chloroplastidae qui utilisent l'ADP-glucose. Cela suggère qu'avant l'endosymbiose primaire du plaste, tous les eucaryotes consécutivement à leur origine commune utilisaient l'UDP-glucose comme précurseur.

Pour expliquer la spécificité des Chloroplastidae pour l'ADP-glucose nous devons revenir sur la genèse de l'endosymbiose à l'origine du plaste (maintient d'une cyanobactérie internalisée par un hôte eucaryote). Il est important de se focaliser sur l'utilité de cette endosymbiose pour l'hôte eucaryote. Ce dernier se sert de la capacité de la cyanobactérie à produire du carbone photosynthétique. Pour être capable d'utiliser ce carbone photosynthétique, il doit y avoir accès et être capable de l'incorporer dans son propre métabolisme de production de polysaccharide de réserve. Or dans un cas typique de prédation, la cyanobactérie endocytée ne transmet pas son carbone photosynthétique au cytosol de l'hôte. De plus la cellule hôte eucaryote utilise de l'UDP-glucose pour la synthèse du glycogène alors que la cyanobactérie ancestrale synthétise de l'ADP-glucose.

De récentes études parlent de l'origine eucaryote d'un transporteur de nucléotides sucres localisé sur la membrane du plaste (Weber *et al.*, 2006 ; Colleoni *et al.*, 2010). L'hôte pourrait ainsi accéder à l'ADP-glucose de la cyanobactérie internalisée s'il fournit un transporteur de nucléotide-sucres à son endosymbionte permettant à l'ADP-glucose d'être exporté dans le cytosol de l'hôte. (Une partie complète sera consacrée à ce transporteur en annexe).

La capacité d'utilisation de l'ADP-glucose par un eucaryote exclusivement consommateur d'UDP-glucose s'explique par la présence d'une glycogène synthase à ADP-glucose lors de l'endosymbiose.

De manière générale, une glycogène synthase est capable d'allonger des chaînes de glucoses liés en alpha-1,4 à l'aide d'un nucléotide sucres précurseur de type NDP-glucose. Comme dit précédemment la synthase de l'eucaryote est UDP-glucose dépendante. Or l'enzyme que l'on retrouve chez les archaeplastides est ADP-glucose dépendante et n'est ni d'origine

cyanobactérienne, ni d'origine eucaryote, elle trouve de manière surprenante son origine chez les chlamydiales. Pour justifier la provenance chlamydienne de la synthase nécessaire à l'intégration de l'ADP-glucose cyanobactérien, une explication est fournie par la phylogénie.

Les chlamydiales, troisième partenaire de l'endosymbiose primaire du plaste

On a constaté que certains gènes des Archaeplastides ont une autre origine que celle de la cyanobactérie ancestrale ou celle de l'hôte ancestrale. Déjà très tôt, un parasite intracellulaire obligatoire est suspecté d'avoir joué un rôle dans l'endosymbiose primaire du plaste (Douglas, 1998). Et il s'agit probablement d'une chlamydiale puisque les trois lignées des Archaeplastides partagent certains gènes des organismes de cet ordre (Tyra *et al.*, 2007 ; Huang and Gogarten, 2007 ; Moustafa *et al.*, 2008).

Or les chlamydiales n'ont pas d'hôte connu chez les archaeplastides (la paroi cellulaire de ces derniers ne permettant pas aux chlamydiales de les infecter), les archaeplastides n'ont donc pas pu récupérer ces gènes à l'issue de transferts latéraux. Cela signifie que l'acquisition de ces gènes a eu lieu avant la séparation des trois lignées des archaeplastides, et donc simultanément à l'endosymbiose primaire du plaste. Les chlamydiales ont donc probablement contribué à cette endosymbiose. Et par conséquent, l'endosymbiose à l'origine du plaste n'est pas bipartite mais est très sûrement tripartite. (Figure 7 et Figure 8).

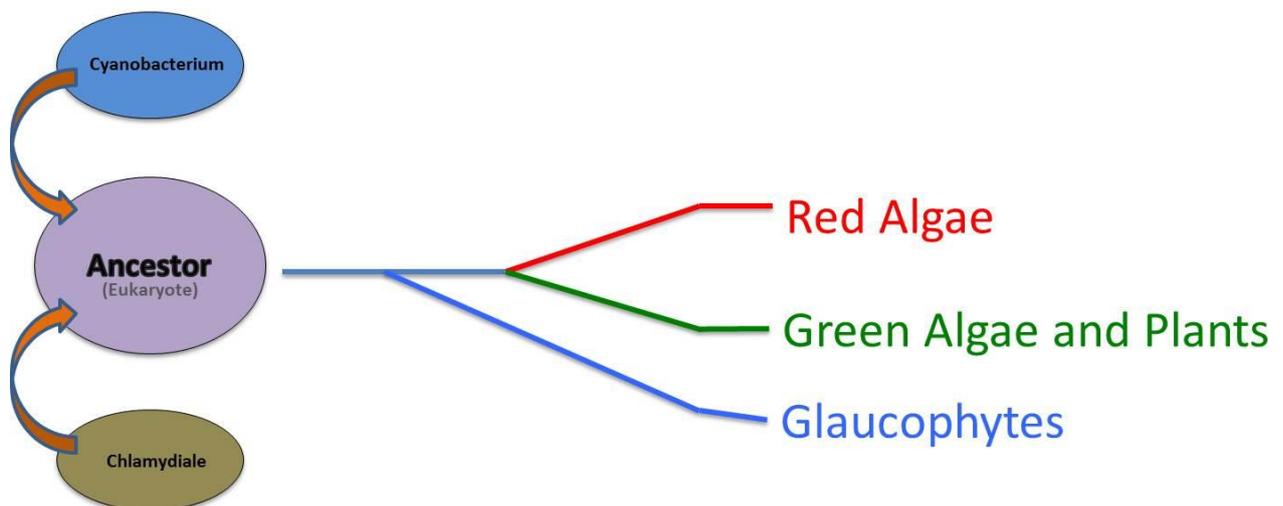


Figure 7 : Modèle de l'endosymbiose tripartite à l'origine des Archaeplastides: l'ancêtre eucaryote a internalisé à la fois une cyanobactérie et une chlamydiale, ce qui a donné la lignée des Archaeplastides, avec une première différenciation vers les Glaucophytes, puis une autre donnant les algues rouges et les algues et plantes vertes.

De fait, le gène codant pour l'amidon/glycogène-synthase des archaeplastides fait partie des gènes d'origine chlamydiale. La protéine GlgA (codant pour la glycogène/amidon-synthase) des chlamydiales, utilisant l'ADP-glucose a du être excrétée par le système de sécrétion de

type trois durant l'infection de la cellule hôte par une chlamydiae alors qu'était présent une cyanobactérie phagocytée. Ceci a permis à la cellule eucaryote ancestrale d'acquérir la capacité à métaboliser la source d'ADP-glucose provenant de cette cyanobactérie internalisée (Lu *et al.*, 2013 ; Ball *et al.*, 2013).

Un autre gène, codant l'ATP/ADP-translocase (*tlc*) du plaste (transporteur de nucléotides), encore appelé NTT (Nucleotide transporter) a également une origine chlamydienne (Greub and Raoult, 2003). Ce gène de translocase n'est retrouvé que chez les Rickettsia (bactéries parasites intracellulaires obligatoires), les chlamydiae ainsi que chez les plastes de plantes et d'algues vertes. Et il semblerait que les Rickettsia, aient reçu ce gène des chlamydiales par un transfert horizontal (Schmitz-Esser *et al.*, 2004). En revanche, son absence chez les glaucophytes suggère, soit que l'acquisition par les lignées rouges et vertes de ce transporteur de nucléotides s'est faite après la divergence de la lignée des Glaucophytes avec les lignées des Chloroplastidae et des Rhodophytes et avant la formation de la paroi cellulaire (et donc postérieurement à l'endosymbiose à l'origine des plastes chez les Archaeplastides) ou soit que la lignée des Glaucophytes ait perdu rapidement ce gène au cours de l'évolution.

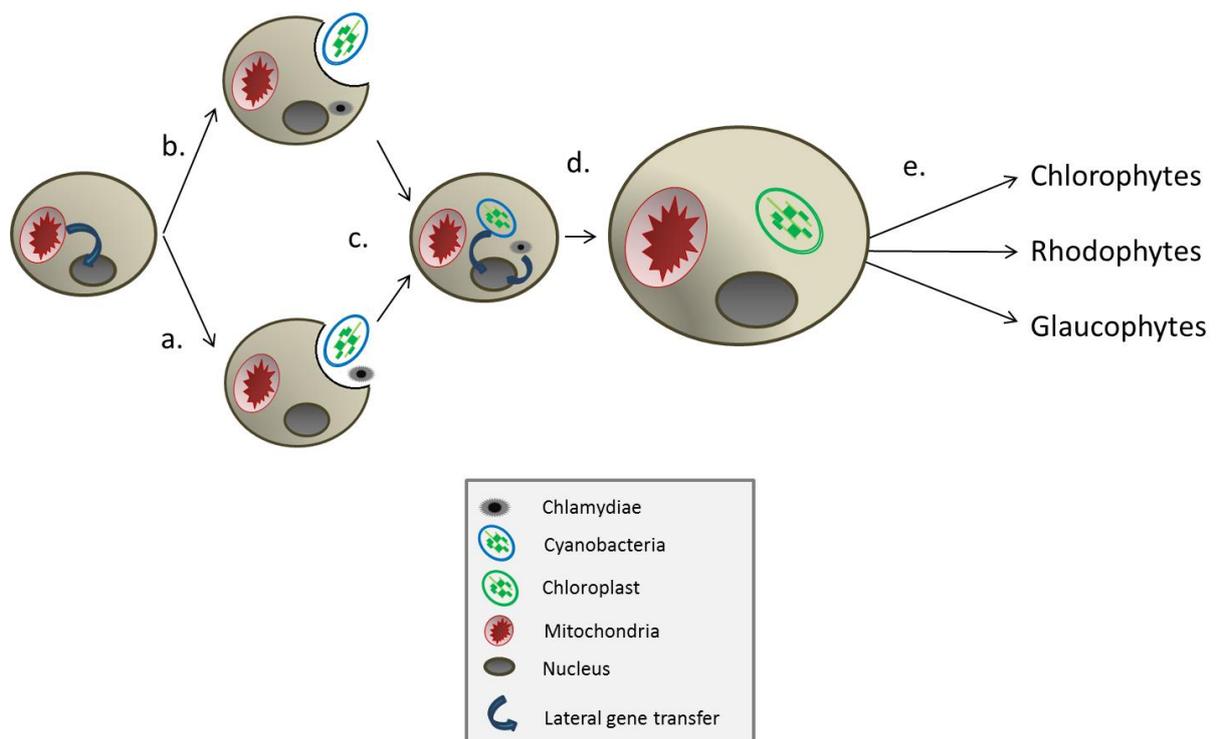


Figure 8. Histoire hypothétique de la mise en place du plaste chez les Archaeplastides.

Après l'endosymbiose à l'origine de la mitochondrie, soit (a) la cyanobactérie et la chlamydiale sont phagocytés au même moment par l'hôte eucaryote, soit (b) la chlamydiale était déjà dans le cytoplasme de l'hôte lors de la phagocytose de la cyanobactérie. (c) Certains transferts de gènes se font entre la cyanobactérie et le noyau et entre la chlamydiae et le noyau, facilité potentiellement ou non par ceux de la mitochondrie en premier lieu. (d) après la réduction du génome cyanobactérien, celle-ci devient ce qu'on connaît aujourd'hui comme le plaste, et la chlamydiale disparaît. (e) La différenciation des Archaeplastides a lieu après l'internalisation du plaste.

iii) L'apparition d'un nouveau polysaccharide de réserve : l'amidon

C'est en parallèle de toutes ces étapes de transfert de gènes (entre la cyanobactérie ancestrale et l'eucaryote ancestral (i), et entre la chlamydia et l'eucaryote ancestral (ii)) qu'une évolution des polysaccharides de réserve est apparue : l'amidon.

On considère que l'équilibre entre la production et la consommation de polysaccharide de réserve entre trois partenaires a été permis/aidé par la formation de l'amidon, autorisant une consommation asynchrone entre les organismes sans pour autant entraver la production de polysaccharides.

A priori, aucun organisme connu non issu de l'endosymbiose plastidiale n'accumule de l'amidon. Cependant, une cyanobactérie appartenant à l'ordre des Chroococcales, *Cyanobacterium* sp. CLg1 accumulant du glycogène mais également de l'amidon, a été découverte (Deschamps *et al.*, 2008) (de plus amples détails sur cette cyanobactérie sont fournis plus bas). Sa découverte aurait pu contester le lien entre l'accumulation de l'amidon et l'endosymbiose. Il a pourtant finalement été prouvé que l'apparition de l'amidon chez cet organisme était une évolution parallèle et non pas issue de l'ancêtre des cyanobactéries (Cenci *et al.*, 2013 ; Cenci *et al.*, 2014). L'amidon est donc bien apparu chez cette cyanobactérie et chez les archaeplastides de manière analogue et non pas homologue.

Par la suite, des études phylogéniques supplémentaires ont permis de déterminer que les premiers Archaeplastides à diverger ont été les glaucophytes (Reyes-Prieto and Bhattacharya, 2007), les algues rouges et algues vertes ayant divergé plus tard (Martin *et al.*, 1998). (Figure 7)

2) L'unique autre endosymbiose primaire de plaste

Paulinella chromatophora est une amibe. Elle est la seule espèce connue qui a acquis un organite photosynthétique indépendamment de l'endosymbiose primaire à l'origine des plastes chez les Archaeplastides (que nous avons évoqué dans le Paragraphe précédent). Cet organite photosynthétique est appelé cyanelle. On a longtemps pensé que la cyanelle de *P. chromatophora* était une cyanobactérie vivant en symbiose à l'intérieur de son hôte, l'amibe. Cependant, la cyanelle n'est pas entourée d'une vacuole membranaire d'origine amibienne, est libre dans le cytosol de l'amibe et n'est pas cultivable en dehors de son hôte comme le serait un simple symbionte (Kies and Kremer, 1979). Ainsi, la cyanelle de *P. chromatophora* est bien un endosymbionte acquis suite à une endosymbiose primaire.

Des études phylogéniques ont permis d'identifier une origine commune entre la cyanelle de *P. chromatophora* et les espèces de cyanobactéries *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, et plus spécialement *Synechococcus* sp. WH5701 (Yoon *et al.*, 2006).

L'acquisition d'un tel organite par *P. chromatophora*, qui n'est pas un membre du groupe des archaeplastides peut être expliquée par l'étude d'un autre membre appartenant au même genre que *P. chromatophora* : *Paulinella ovalis*. *P. ovalis* est un prédateur actif des cyanobactéries, mais est dépourvu de plaste (Johnson *et al.*, 1988). *Paulinella chromatophora* avait probablement soit le même mode de vie que *P. ovalis* avant l'endosymbiose à l'origine de la cyanelle, ou bien vivait en symbiose avec les cyanobactéries avant qu'elles deviennent finalement des endosymbiontes (Bhattacharya *et al.*, 2012). Cette endosymbiose à l'origine de la cyanelle chez *P. chromatophora* est parallèle à l'endosymbiose à l'origine du plaste chez les Archaeplastides et a en revanche eu lieu sans l'intervention de chlamydiae.

Afin de relier les phénomènes d'endosymbiose, à l'origine des plastes aux connaissances actuelles et générales sur l'apparition de la vie, j'invite le lecteur à regarder la figure 9. Cette figure présente une échelle de temps relative de l'évolution des eucaryotes et l'arbre des origines de la vie (tree of life) correspondant. Les informations de ce diagramme sont les plus récentes à ce jour (Hinchliff *et al.*, 2015) et sont régulièrement mis à jour en accès libre sur le lien open-source suivant : <http://opentreeoflife.org/>

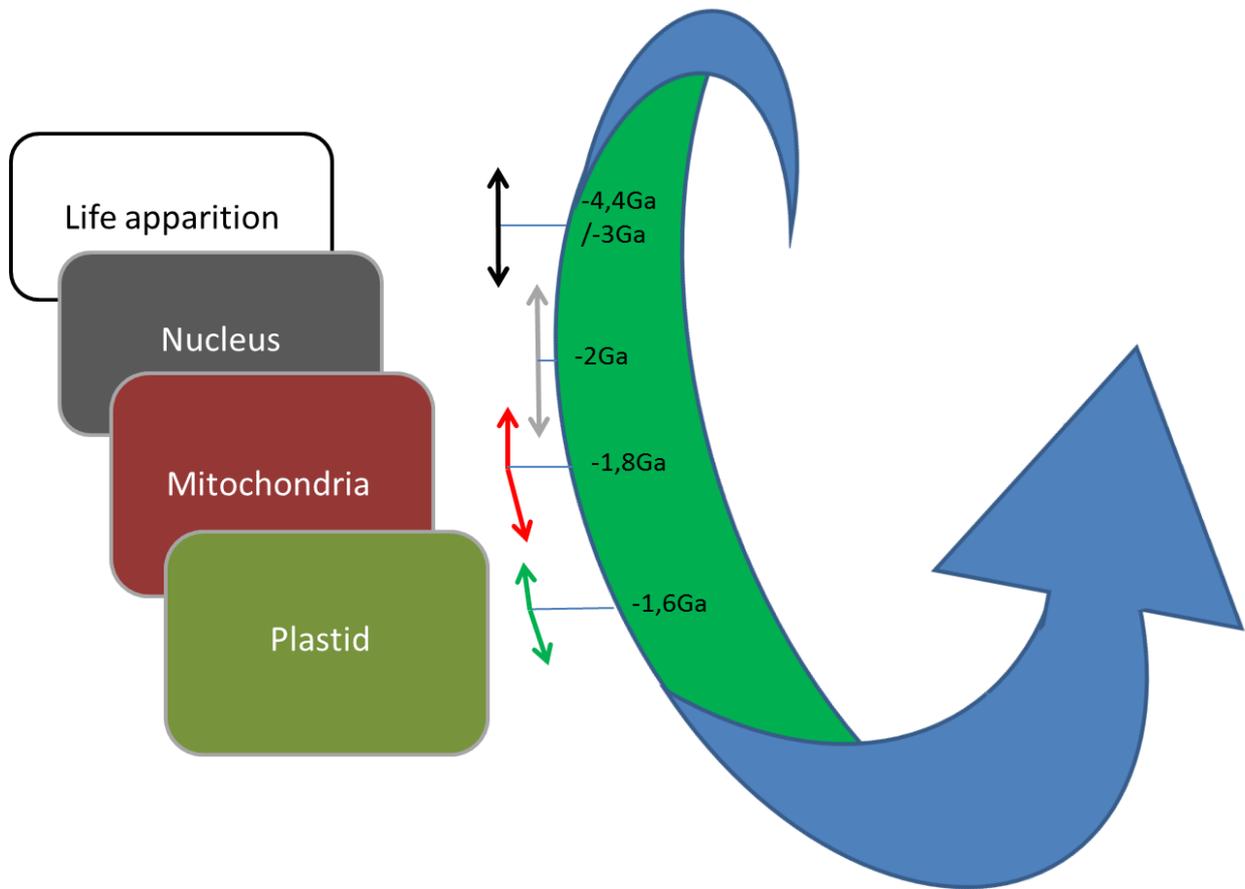


Figure 9 : Echelle du temps des différentes étapes importantes de l'évolution des eucaryotes, avec l'apparition de la vie, du noyau, de la mitochondrie et finalement du plaste. Les flèches colorées correspondant respectivement aux encadrés de la même couleur et signifient que l'échelle de temps reste encore approximatif même si on est capable de situer les événements les uns par rapport aux autres.

C) *Cyanobacterium* sp. CLg1

Les cyanobactéries constituent un groupe de bactéries unicellulaires ou filamenteuses réalisant la photosynthèse oxygénique, c'est-à-dire génératrice d'oxygène.

Il y a environ 2,5 milliards d'années, le dégagement d'oxygène, qui suit la photolyse de l'eau pendant la photosynthèse oxygénique, a eu des conséquences majeures sur la composition de l'atmosphère terrestre et a entraîné le passage d'un environnement réducteur à celui d'une atmosphère permettant l'apparition des organismes aérobies qui sont capables de faire la phosphorylation oxydative (réalisée par exemple par nos cellules lors de la respiration mitochondriale) (Kopp *et al.*, 2005). Les cyanobactéries jouent encore aujourd'hui un rôle important dans la production primaire (production de matière organique à partir d'énergie, ici via la photosynthèse) et le cycle de l'azote dans les océans.

C'est lors de l'endosymbiose primaire du plaste, par transferts de gènes, que les cyanobactéries ont transmis leur capacité à réaliser la photosynthèse oxygénique à un de leurs prédateurs phagotrophes : les eucaryotes hétérotrophes. Cet événement unique, daté à 1,6 milliard d'années a permis d'allier la puissance du métabolisme cyanobactérien (photosynthèse) à la capacité de différenciation cellulaire eucaryotes (Yoon *et al.*, 2004).

L'endosymbiose du plaste dite « primaire » constitue l'évènement fondateur qui a conduit à l'émergence des archaéplastides (anciennement appelé Règne Végétal) composés de trois lignées formées respectivement par les glaucophytes, les algues rouges (Rhodophyceae) et les algues vertes et plantes terrestres (Chloroplastida). Cette symbiose a permis aux plastes des archaéplastides de coloniser des environnements qui leur étaient interdits, très acides ou les espaces terrestres et aériens, maximisant par-là la production primaire, et permettant l'explosion de la vie animale.

1) La fixation d'azote et la photosynthèse : une combinaison difficile pour la cyanobactérie

Outre la capacité de pratiquer la photosynthèse oxygénique (productrice d'énergie carbonée et d'oxygène), les cyanobactéries jouent un rôle de premier plan dans la fixation de l'azote atmosphérique et sa réduction. Deux enzymes cyanobactériennes se trouvent à la source du cycle du carbone et du cycle de l'azote. La Rubisco qui fixe le CO₂ en le greffant sur le ribulose biphosphate et la nitrogénase responsable de la réduction de l'azote atmosphérique en azote assimilable.

Plusieurs milliards d'années d'évolution n'ont cependant pas permis l'émergence de formes

tolérantes de ces deux enzymes à l'oxygène. Tout au plus, une évolution des formes sophistiquées de limitation de l'action néfaste de l'oxygène sur la Rubisco ont été mis en place. Il s'agit des différents processus de concentration du carbone inorganique permettant d'enrichir sélectivement en CO₂ l'environnement immédiat de la Rubisco, et réduisant, de ce fait, l'accès de l'oxygène au site catalytique de l'enzyme (pour revue, Badger and Price, 2003). En ce qui concerne la nitrogénase, cette dernière étant inactivée de manière irréversible par des traces d'oxygène, des mécanismes protecteurs très efficaces ont dû inévitablement être sélectionnés.

Malgré ces obstacles, les cyanobactéries représentent les organismes fixateurs d'azote les plus importants de la biosphère. Ceci est d'autant plus étonnant que leur métabolisme énergétique repose sur la photolyse de l'eau et donc le dégagement d'oxygène qui s'en suit.

2) L'isolation spatiale ou temporelle des mécanismes de photosynthèse et de diazotrophie : une stratégie cyanobactérienne

Les cyanobactéries ont évolué de manière à exploiter le maximum de la Rubisco et de la nitrogénase par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts : l'isolation spatiale et le confinement temporel.

En effet, un ensemble important de cyanobactéries ont évolué en formes filamenteuses, regroupant plusieurs cellules à la fois autonomes et collaboratives. Des cellules spécialisées aux parois épaisses les isolant de l'air ambiant devenues hétérotrophes et appelées hétérocystes sont alimentées en ATP et en pouvoir réducteur par les cellules voisines restées photoautotrophes (isolation spatiale).

D'autres cyanobactéries unicellulaires n'ont pu séparer physiquement la photosynthèse oxygénique de la fixation d'azote. Elles contournent cette difficulté en cantonnant cette dernière à la phase obscure permettant de la séparer dans le temps de la photosynthèse activée par définition le jour (isolation temporelle). Dans ce cas de découplage temporel, la source nécessaire d'ATP et de pouvoir réducteur (obtenus par la photosynthèse) n'est plus disponible pour la nitrogénase. La mise en réserve d'une grosse quantité de carbone pendant la journée est donc nécessaire pour qu'il soit utilisable pendant la nuit par l'enzyme. La respiration de ces réserves la nuit a permis d'abaisser localement la teneur en oxygène par sa consommation, et rendu possible l'anoxie requise par la nitrogénase. L'organisation de ce confinement temporel a également nécessité l'acquisition d'une horloge circadienne chez les cyanobactéries.

3) L'apparition de l'amidon chez les cyanobactéries et chez les archaeplastides : deux événements indépendants

Les grandes quantités de réserves requises simultanément pour la division cellulaire et pour la diazotrophie ont conduit à une évolution de certaines cyanobactéries vers l'accumulation d'une nouvelle forme de polysaccharide, agrégeant plus de glucose, sous une forme hydrophobe et semi-cristalline que ne l'autoriserait le glycogène hydrosoluble. Cette forme de réserve est appelée « amidon »..

Or comme mentionné dans le paragraphe sur l'endosymbiose plastidiale, les archaeplastides accumulent également de l'amidon à la suite de cet événement unique.

Cependant, la capacité de synthèse de cet amidon par certaines cyanobactéries n'a pas été transmise aux ancêtres des eucaryotes photosynthétiques. L'acquisition de l'amidon par certaines cyanobactéries et l'acquisition de l'amidon chez les archaeplastides sont deux événements indépendants.

La transition du glycogène cytosolique à l'amidon s'est effectuée de deux façons. Chez les cyanobactéries, l'évolution sélective d'une nouvelle famille d'enzyme permet le métabolisme de polymères cristallins. Chez les Archaeplastides à la fois par le recrutement simultané d'enzymes d'origine parasitaire données par un organisme de type Chlamydiale, l'évolution d'enzymes et également l'acquisition de certains gènes des cyanobactéries par transfert de gènes permet également l'apparition d'amidon.

Les cyanobactéries n'auraient donné par transfert latéral de gènes (LGT) au génome nucléaire de l'hôte ancestral lors de l'endosymbiose primaire du plaste que deux fonctions clés : l'ADP-glucose pyrophosphorylase, responsable de la synthèse du nucléotide sucre initiant la synthèse de l'amidon dans la lignée verte, et la GBSSI (granule-bound starch synthase), seule enzyme capable de travailler sur la forme agrégée semi-cristalline des polysaccharides constituée par le grain d'amidon. La GBSSI synthétise de l'amylose (forme non branchée de l'amidon), au sein même du grain d'amidon, mais n'est pas requise pour la formation du grain.

Malgré l'indépendance observée de l'apparition de l'amidon chez les archaeplastides et les cyanobactéries, il semble pourtant que ce soit le groupe de cyanobactéries unicellulaires diazotrophes accumulatrices d'amidon appartenant à l'ordre des Chroococcales (qui synthétise du glycogène) qui définit aujourd'hui les candidats les plus plausibles comme ancêtre du plaste eucaryote.

Ces cyanobactéries nous offrent donc la possibilité d'examiner comment la transition du métabolisme du glycogène à celui de l'amidon s'est réalisée avant l'endosymbiose primaire

du plaste (plus de deux milliards d'années).

Dans ce contexte de l'histoire évolutive des polysaccharides de réserves, une étude bioinformatique des contenus en gènes des génomes des cyanobactéries qui synthétise de l'amidon montre un métabolisme proche de celui mis en œuvre chez les entérobactéries (comme par exemple *Escherichia coli*) qui synthétise du glycogène (Figure 10). Ainsi, on compte par exemple, chez la cyanobactérie marine *Cyanobacterium* sp. CLg1 appartenant à l'ordre des Chroococcales, 3 activités amidon synthèses (formation des liaisons α -1,4), 4 enzymes de branchement (introduction des liaisons α -1,6) et 4 enzymes de débranchement. (Figure 10). Cette multiplicité de formes enzymatiques qui peut être corrélée à la taille importante des génomes de ces bactéries (> 5Mbp) est exceptionnelle chez les bactéries.

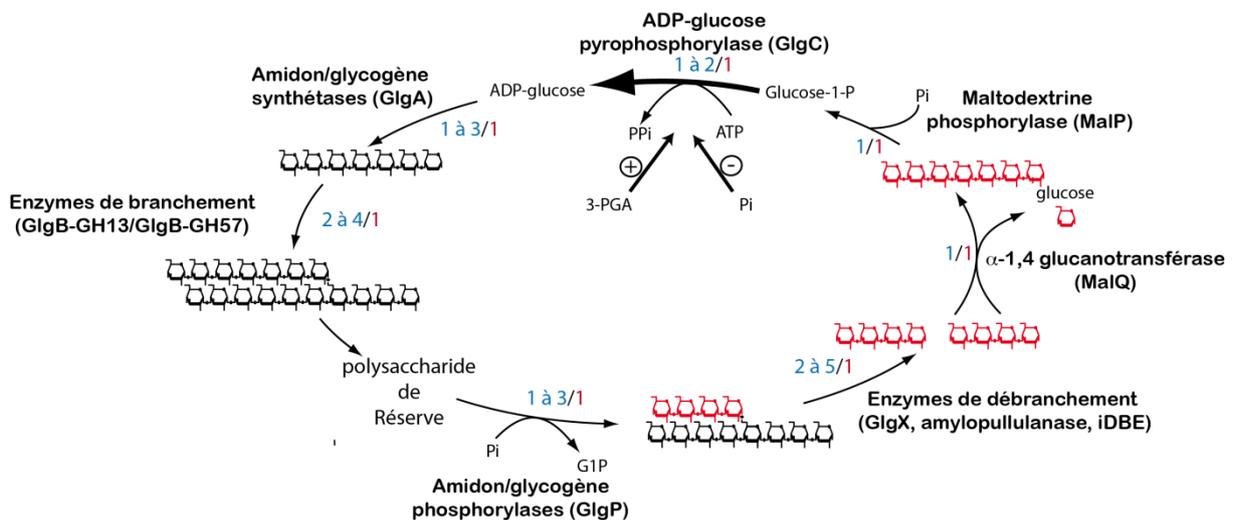


Figure 10 : Métabolisme des polysaccharides de réserves chez les cyanobactéries. Les chiffres en bleu et en rouge indiquent respectivement le nombre d'isoformes observées chez les cyanobactéries et *Escherichia coli*. L'ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC) est l'enzyme clef du métabolisme de l'amidon. Chez les cyanobactéries, elle est activée par le 3-phosphoglycerate (3PGA) et inhibée par l'orthophosphate (Pi). Elle est responsable de la synthèse du nucléotide-sucré précurseur: ADP-glucose. Ce dernier est pris en charge par les amidon-synthétases (GlgA) qui transfèrent le résidu de glucose du nucléotide sucre sur l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucose. Les points de branchement sont introduits par les enzymes de branchement qui clivent une liaison α -1,4, puis transfèrent l'oligosaccharide sur une chaîne voisine en position α 1,6 (GlgB -GH13 et GLgB-GH57). Au cours du catabolisme, les liaisons α -1,4 sont hydrolysées depuis les extrémités non-réductrices des chaînes de glucose par les amidon/glycogènes phosphorylases (GlgP). Ces activités libèrent du glucose-1-phosphate (G1P) puis s'arrêtent 4 résidus de glucose avant le point de branchement (résidus en rouge). Les liaisons α -1,6 sont ensuite hydrolysées par les différentes activités de débranchement (GlgX, Amylopullulanase, l'enzyme de débranchement indirecte iDBE). Les maltooligosaccharides en rouge sont disproportionnés à l'aide de l' α -1,4 glucanotransférase (MalQ) afin d'être métabolisés par la malto-dextrine phosphorylase (MalP).

D) Généralités sur les Chlamydiales

1) Classification des chlamydiales

Les infections humaines à chlamydiales semblent avoir une histoire très ancienne. La première connue à ce jour dans l'histoire de l'humanité a eu lieu probablement il y a 8000 ans avant J.-C. en Australie (Webb, 1990). Des ossements abîmés y ont été trouvés et témoignent d'une telle infection. Ensuite, d'autres traces des chlamydiae sont mentionnées dans la médecine Chinoise en 2500 av. J.C. (Taborisky, 1952), ou encore dans des écrits tels que le papyrus d'Ebers, un des plus grands vestiges de remèdes égyptiens de l'époque qui fait état (entre autre) d'un traitement pour une maladie à chlamydiae à travers les symptômes qui y sont décrits (Tower, 1963).

C'est pourtant en 1907 que la découverte des chlamydiale est définitivement confirmée par Halberstaedter et von Prowazek (1907) avec leur observation de la transmission d'un trachome d'un homme à un orang-outang.

Les chlamydiales sont en fait des bactéries parasites intracellulaires obligatoires, appartenant au domaine des bactéries, au phylum des Chlamydiae, à la classe des Chlamydiae et à l'ordre des Chlamydiales (Bavoil *et al.*, 2013).

En 1980, l'ensemble des chlamydiales recensées était au nombre de deux, classées en une seule famille (Chlamydiaceae) et un seul genre (Chlamydia) : *Chlamydiae trachomatis* et *Chlamydiae psittaci*.

L'espèce *C. psittaci* jusqu'alors très hétérogène et possédant plusieurs sous-espèces est finalement réorganisée. Et deux nouvelles espèces sont créées en 1989 et 1992 parmi le genre Chlamydia. Il s'agit respectivement de *C. pneumoniae* et de *C. pecorum* qui se distinguent principalement de *C. psittaci* par la composition de leur ADN.

Vers 1995, pour la première fois trois bactéries apparentées aux Chlamydiaceae par leur cycle de vie ainsi que par leur ARNr 16S sont identifiées : il s'agit du « micro-organisme Z » (qui deviendra la famille des Simkaniaceae), de *Candidatus parachlamydia acanthamoebae* et d'une souche appelée WSU 86-1044 qui par la suite est baptisée famille des Waddliaceae.

En 1999, successivement à toutes ces découvertes, Everett *et al.*, (1999) annoncent la constitution de quatre familles, regroupées sous l'ordre des Chlamydiales : Les Chlamydiaceae, les Parachlamydiaceae, les Simkaniaceae et les Waddliaceae (ces dernières en réalité nommées plus tard par Rurangirwa *et al.* en 1999).

Les différences entre l'espèce *C.trachomatis* et les autres espèces ont entraîné temporairement la création d'un second genre au sein de la famille des chlamydiaceae : les Chlamytophila. Ainsi, la famille des chlamydiaceae comprenait le genre Chlamydiae avec pour membre *C.trachomatis* et le genre Chlamytophila qui comprenait toutes les autres espèces de Chlamydiaceae. Cette classification a aujourd'hui disparu pour ne garder que le genre Chlamydiae regroupant toutes les espèces de Chlamydiae connues. Au fil des années, d'autres chlamydiales ont été découvertes pour aboutir à la classification que nous avons aujourd'hui (Figure 11).

Le premier génome de chlamydiale séquencée dans son intégralité a été celui de *C.trachomatis*, réalisé par (Stephens *et al.*, 1998).

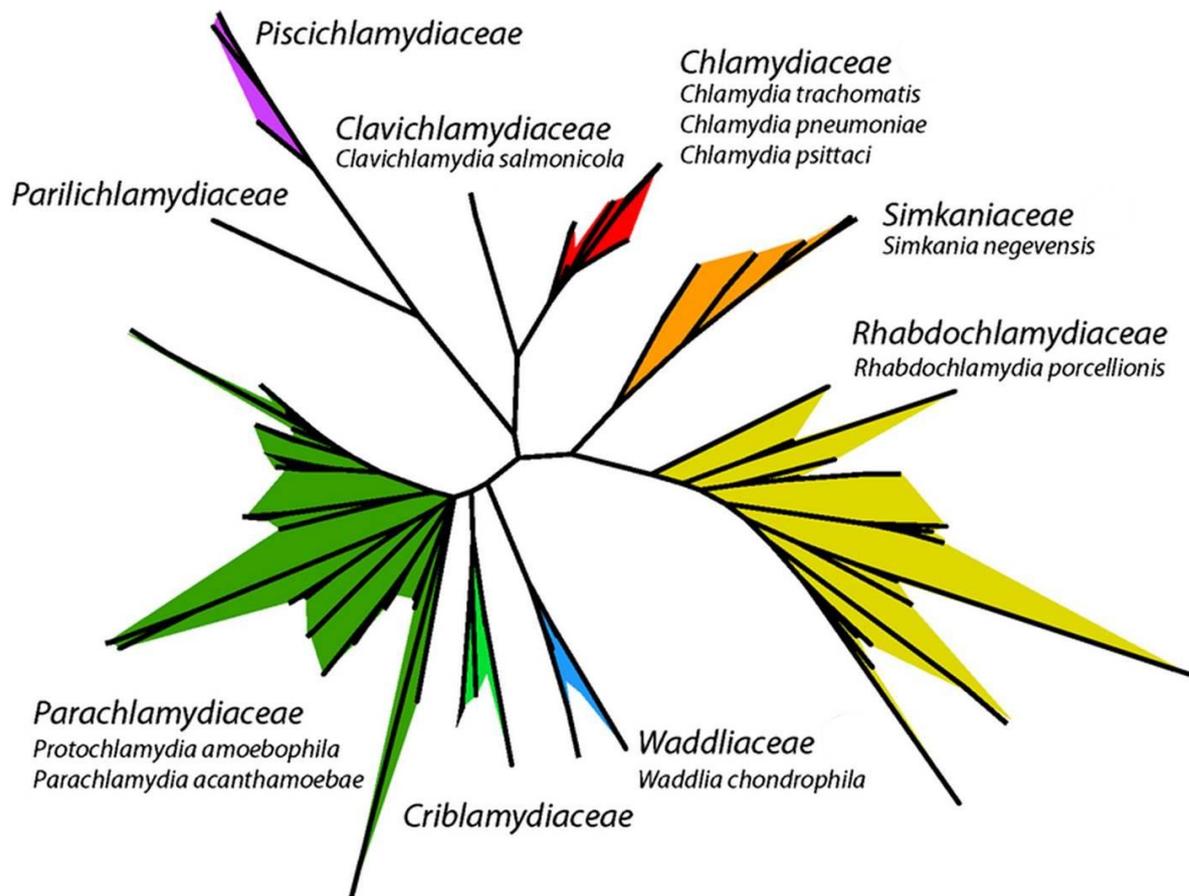


Figure 11 : Arbre non enraciné représentant l'ensemble des familles de chlamydiales. (Modifié d'Omsland *et al.* 2014). Les différentes couleurs correspondent aux différentes familles des chlamydiales. Pour un arbre phylogénétique plus exhaustif, voir en annexe l'arbre classifiant toutes les chlamydiae selon leur ARN 16S disponible sur le site internet opentreeoflife.org.

Les chlamydiales étant des bactéries parasitaires intracellulaires obligatoires. Leur isolement et leur étude n'est de ce fait pas aisée car elles nécessitent un hôte pour proliférer, et aucune

méthode à ce jour ne nous permet de les cultiver directement sur boîte de Pétri. Elles sont donc difficilement détectables par les méthodes conventionnelles. Des protocoles d'isolements ont dû être mis en œuvre (Jacquier *et al.*, 2013).

Cependant en dehors des pathogènes humains avérés, peu sont encore détectable par PCR actuellement, rendant difficile le diagnostique clinique. En effet, seules les chlamydiales infectant des cellules humaines sont fortement étudiées à but thérapeutique. On peut noter la mise au point récemment par le Professeur G. Greub (Goy *et al.* 2009) de la qPCR permettant d'identifier *Waddlia* chez un patient.

En outre, leur mode développement originales (en deux phases distinctes) leur confère un trait spécifique dans le monde des bactéries, et offre un moyen de les identifier parmi d'autres pathogènes. Le cycle de développement des chlamydiae s'alterne entre EB (Elementary Body ou corps élémentaires) et RB (Reticular Body ou corps réticulés).

On retrouve les EB en zone extracellulaire et ils sont responsables de l'infection de par leur capacité à s'attacher et à envahir certaines cellules. Après la fixation sur la cellule hôte, les EBs sont internalisés dans une vacuole appelée membrane d'inclusion. A partir de ce moment se fait la première différenciation. Les EBs se transforment en RBs qui sont métaboliquement plus actifs (Omsland *et al.* 2012).

2) Cycle de développement

a) La phase EBs

La reconnaissance et l'attachement de la bactérie à l'hôte se fait en deux étapes (Hackstadt *et al.*, 1999). Premièrement une interaction électrostatique non spécifique et réversible. Deuxièmement une fixation irréversible, avec un récepteur qui n'est à ce jour pas identifié. Immédiatement après l'attachement à l'hôte, il y a sécrétion par le TTSS de la protéine Tarp (Translocated Actin-Recruiting Phosphoprotein). En recrutant l'actine, la protéine Tarp permet la formation de la vésicule d'inclusion (Clifton *et al.*, 2004) (plus de détails dans le paragraphe concernant le TTSS plus bas).

L'utilisation de ce système de sécrétion par les EBs alors qu'ils sont métaboliquement peu actifs, suggère que la production des protéines formant le TTSS doit se faire lors de la phase RBs, juste avant la différenciation en EBs. Ainsi consécutivement à l'association en complexe des protéines du TTSS (notamment nécessaire à la sécrétion de la protéine Tarp) l'adhésion ainsi que l'entrée dans la cellule hôte est possible. La cellule hôte est alors infectée par la

chlamydia.

b) La première différenciation

Une fois dans l'hôte, la décondensation des chromosomes des EBs a lieu. Durant cette étape, la cellule recrute des protéines histone-like, HctA et HctB (Hackstadt *et al.*, 1991) qui compactent l'ADN des EBs. Les EBs se différencient en RBs. Les EBs apparaissent alors de taille réduite comparativement aux RBs.

c) L'entrée en phase RB et la décondensation des « chromosomes »

Lors de l'internalisation du corps élémentaire (EB) par la cellule hôte, la chlamydia entre en phase RB et la post-infection (PI) débute. De nouvelles protéines (à partir d'ARN déjà présent dans les EBs) sont synthétisées dès les quinze premières minutes et au bout d'une heure, de nouveaux ARN sont à leur tour produits (Abdelrahman and Belland, 2005). L'ADN est progressivement déroulé et le volume des RBs s'agrandit.

d) Le déroulement de la post-infection

La post-infection (PI) peut durer jusqu'à 48h. Une à deux heures après l'infection, la cellule se situe à un stade précoce (« early cycle »), entre trois et dix-huit heures se déroule le stade intermédiaire ou « mid-cycle » et finalement le stade tardif (« late cycle ») a lieu après 20 à 48h de PI.

Pendant le stade intermédiaire (entre 6h et 8h de PI), une transcription intense se met en place. Ainsi tout au long de la post-infection, des protéines sont excrétées par le TTSS en fonction des besoins de la cellule chlamydiennne et influence le cycle apoptotique de la cellule hôte (Byrne and Ojcius, 2004).

Puis au début de la phase tardive (de 16h à 24h de PI) la division cellulaire commence. Les chlamydiae ne possèdent pas le gène *ftsZ* jouant habituellement un rôle très important dans le processus de division cellulaire chez les bactéries mais des pistes sur la nature des peptidoglycanes qui composent la membrane cellulaire des chlamydias devraient permettre à l'avenir de mieux comprendre ce phénomène de division (Jacquier *et al.*, (2015).

e) La différenciation secondaire

En fin du stade tardif, lorsque la division cellulaire débute, des « gènes tardifs » sont traduits pour préparer la future infection. Et, à l'issue de cette division cellulaire, chaque corps réticulés (RB) obtenus devient un corps élémentaire (EB). On parle de différenciation secondaire. Seuls les EBs sont assez résistants pour vivre hors de l'hôte (le temps nécessaire pour qu'une

cellule à infecter se présente).

Les protéines de compaction de l'ADN, HctA et HctB et les protéines du système de sécrétion de type 3 (TTSS) font parties des protéines de « gènes tardifs » produites en fin de phase RB et qui restent en dormance dans les corps élémentaires. Comme il a été précisé précédemment, elles sont nécessaires aux premières étapes de l'infection.

3) Le système de sécrétion de type III

a) Origine du système de sécrétion de type 3

Les gènes à l'origine de l'injectisome, ou système de sécrétion de Type 3 (TTSS) ont été transmis tardivement et de manière horizontale dans l'évolution des bactéries (Gophna *et al.*, 2003). Par conséquent, il est présent aujourd'hui à la fois chez des bactéries Gram négatif symbiotes, chez certaines pathogènes ou encore chez d'autres simplement environnementales. La séquence des gènes codant pour le TTSS est très proche de celles des protéines codant pour le système flagellaire bactérien. Une évolution à partir de gènes de ce flagelle est une des hypothèses pour expliquer l'apparition de ce système de sécrétion. Cette dernière a été finalement invalidée car la phylogénie des protéines codant pour le TTSS montre qu'elles appartiennent à un ancêtre trop ancien pour qu'elles aient des origines communes avec celles du flagelle (Gophna *et al.*, 2003).

Le premier injectisome à avoir été mis en évidence est celui de *Yersinia* qui est un autre type de pathogène animal (Michiels *et al.*, 1990). D'autres ont ensuite été trouvés, tels que ceux de *Pseudomonas*, *Shigella* et *Salmonella* (pour revue (Gophna *et al.*, 2003)). Même certains pathogènes de végétaux comme *Erwinia* et *Pseudomonas* peuvent posséder un système de sécrétion proche de celui retrouvé chez les pathogènes animaux.

Finalement aujourd'hui sept familles d'injectisomes ont été définies. Cinq appartiennent à des bactéries pathogènes dont une est présente chez les Chlamydiales et une autre chez les Rhizobiales (SPI-1, SPI-2, Ysc, une Chlamydiale et une Rhizobiale), et les deux dernières appartiennent à des phytopathogènes (Hrp1 et Hrp2). (Troisfontaines et Cornelis, 2005).

Le TTSS permet l'injection de facteurs de virulence protéiques en provenance de la bactérie et à destination du cytosol de la cellule hôte. Dans ses principales fonctions jusqu'ici étudiées, on peut noter sa capacité à faciliter l'internalisation de la bactérie dans sa cellule hôte (Zychlinsky and Sansonetti, 1997), à entraîner l'induction de l'apoptose chez les macrophages de l'hôte (Mills *et al.*, 1997), ainsi qu'à induire la formation de pores lorsque l'hôte est une cellule végétale (Lee *et al.*, 2001). Le mécanisme de fonctionnement du TTSS n'est pas

parfaitement connu, mais on sait que chez les bactéries pathogènes animales, celui-ci est codé par 20 à 25 gènes très conservés.

Les bactéries possédant un injectisome sont pour la plupart facilement cultivables, à l'exception des Chlamydiales. L'étude du TTSS chez ces dernières n'en est par conséquent que plus compliquée.

b) Les protéines sécrétées par le TTSS chez les chlamydiales

Le système de sécrétion de type 3 est utilisé par les chlamydiales à deux moments clef lors de l'infection. Avant la formation de la vésicule d'inclusion, il sécrète des protéines à travers la membrane de l'hôte directement dans son cytosol, puis après lors de l'infection, il sécrète des protéines dans le cytosol de l'hôte à travers la membrane de la vésicule.

Le rôle sécrétoire du TTSS chez les chlamydiales est visible très tôt lors de l'infection : il permet la sécrétion de protéines dont « Inc » qui se situe sur la membrane d'inclusion (Subtil *et al.*, 2001 ; Fields *et al.*, 2003). Les protéines Inc sont très différentes entre elles, mais possèdent toutes en commun une cinquantaine d'acides aminés hydrophobes. Comme nous l'avons précédemment mentionné, parmi les protéines sécrétées par le TTSS chez les Chlamydiales, il y a aussi Tarp, qui recrute les filaments d'actine utiles pour la formation de la vésicule, mais également la protéine CADD (« Chlamydia protein Associating with Death Domain »), qui sert à moduler l'apoptose de la cellule hôte.

De plus, le TTSS permet la sécrétion de protéines du métabolisme du glycogène. Chez *Parachlamydia acanthamoebae* et *Protochlamydia amoebophila*, seule la sécrétion par le TTSS de certaines enzymes a été testée (Ball *et al.* 2013) (tableau 1). En résumé, la littérature fait état de la sécrétion de GlgA, GlgC et une des GlgP de *P.acanthamoebae*, ainsi que de la sécrétion de GlgX et MalQ de *P.amoebophila*.

La glycogène synthase de *C.trachomatis* qui est capable d'allonger une chaîne de glucose liée en α -1,4 à partir d'une plus petite chaîne et qui est sécrétée dans le cytosol de l'hôte (Lu *et al.*, 2013) est également soupçonnée d'être sécrétée par le TTSS bien que les auteurs ne démontrent pas la relation directe avec ce transporteur. Ainsi en plus d'être important pour pénétrer la membrane cellulaire de l'hôte, le TTSS est indispensable pour détourner les mécanismes de la cellule hôte.

	GlgA	GlgB	GlgC	GlgP	GlgX	MalQ
<i>P.acanthamoebae</i>	+	-	+	+	?	-
<i>P.amoebophila</i>	?	-	?	?	+	+

Tableau 1 : Récapitulatif des enzymes sécrétées par le TTSS chez *P.acanthamoebae* et *P.amoebophila*. Les « + » signifie que l'enzyme est sécrétée, les « - » qu'elle ne l'est pas, et les « ? » signifient que la sécrétion de l'enzyme n'a pas été testée.

4) Comparaison entre les chlamydiaceae et chlamydiae-like

Les espèces de l'ordre des Chlamydiales reconnues pathogènes animales sont les suivantes : *Chlamydia trachomatis*, *C. muridarum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. caviae* et *C. suis*. Elles appartiennent toutes à la famille des Chlamydiaceae. Cependant, d'autres espèces de l'ordre des Chlamydiales sont potentiellement pathogènes, même si elles ne sont pas forcément unanimement reconnues comme telles, il s'agit de *Waddlia chondrophila* (de la famille des Waddliaceae) et *Parachlamydia acanthamoebae* (de la famille des Parachlamydiaceae) (Pilloux *et al.*, 2015), mais aussi *Piscichlamydia salmonis* et *Clavochlamydia salmonicola* qui ont été isolées chez le saumon. En revanche, toutes les Chlamydiales n'appartenant pas à la famille des Chlamydiaceae et qui vivraient en « symbiose » avec leurs hôtes et non pas selon une relation hôte/pathogène sont considérées comme des « chlamydia-like » ou des « chlamydiales environnementales » par certains auteurs (Horn *et al.*, 2004) (*P.acanthamoebae*, *S.negevensis*,...).

a) Comparaison entre les Chlamydiaceae et les « chlamydiae-like »

Le classement des bactéries appelées « chlamydiae-like » n'a pas été sans mal car de nombreuses différences les éloignent de la famille des Chlamydiaceae (Stephens *et al.*, 1998 ; Azuma *et al.*, 2006 ; Read *et al.*, 2000 ; Schöfl *et al.*, 2011).

(i) Le génome des Chlamydiales dites classiques ou pathogènes est environ deux fois plus petit que celui des chlamydias dites environnementales ou « chlamydiae-like ». Une des raisons est la répétition d'une partie du contenu du génome des chlamydias dites environnementales. La présence d'éléments mobiles absents chez les Chlamydiaceae apporte une explication supplémentaire quant à cette différence. De plus, les chlamydiaceae possèdent des lacunes dans de nombreux métabolismes essentiels, tels que celui des acides aminés, des nucléotides, des cofacteurs tandis que les « chlamydiae-like » conservent davantage de fonctions métaboliques.

Mais indépendamment de la taille du génome, des différences métaboliques existent entre ces Chlamydiales, toutes les chlamydiales qui sont des bactéries aérobies utilisent du G6P, du

glutamate et du 2-oxo-glutarate comme source de carbone. Cependant, les Protochlamydia ainsi que Waddlia (qui sont des « chlamydia-like ») utilisent une glucokinase pour la phosphorylation initiale des sucres alors que les chlamydiaceae importent directement le G6P via le transporteur UhpC, car elles ne possèdent pas de glucokinase.

(ii) Le cycle de développement est sensiblement le même chez toutes les chlamydiales, avec des changements mineurs dans la rythmique du cycle, la composition de la membrane bactérienne et dans la composition de la membrane d'inclusion.

(iii) Il y a un seul type de plasmide à faible copie d'environ 7.5kb chez les pathogènes et il est impliqué dans la virulence. Il n'existe pas de plasmide contenant des résistances aux antibiotiques chez les Chlamydiaceae. Chez les environnementales, la taille du plasmide varie entre 15 et 132kb et est de type-F chez la famille Simkaniaceae (Collingro *et al.*, 2011), et de type faible copie chez celle des Waddliaceae (Goy *et al.*, 2008) (Kebbi-Beghdadi *et al.*, 2011). Le plasmide des Simkaniaceae rend la chlamydiale capable de s'adapter à l'hôte et permet une infection qui n'est pas au dépend de ce dernier.

(iv) Certaines chlamydiales environnementales possèdent en plus du TTSS, un système de sécrétion de type 4 (TFSS). On le retrouve chez *P.acanthamoebae*, *P.amoebophila* et *S.negevensis*. Il est absent des Waddliaceae et Chlamydiaceae. Ce système de sécrétion servirait potentiellement à des transferts horizontaux de gènes.

L'ensemble de ces différences entre les chlamydiaceae et les autres chlamydiales a permis de retracer la phylogénie des chlamydiales en fonction de ces pertes et de ces gains (Subtil *et al.*, 2014).

b) Le métabolisme des polysaccharides de réserve des chlamydiales

Tous les parasites de l'ordre des Chlamydiales possèdent des enzymes du métabolisme du glycogène (tableau 2), ce qui est rare. Habituellement, un parasite se sépare rapidement de son métabolisme de synthèse d'énergie carbonée pour utiliser celui de leur hôte (Henrissat *et al.*, 2002). La présence de glycogène dans les vésicules d'inclusion a d'ailleurs longtemps été utilisée dans les techniques de diagnostic d'infection à *C.trachomatis* (Ripa, 1982).

	<i>glgC</i>	<i>galU</i>	<i>glgA</i>	<i>glgB</i>	<i>glgX</i>	<i>glgP</i>	<i>MalQ</i>
<i>Simkania negevensis</i> Z	1	1	1	1	1	2	2
<i>Chlamydia trachomatis</i> A/HAR-13	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydophila abortus</i> S26/3	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/CX	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydia trachomatis</i> E/150	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydia trachomatis</i> L2b/UCH-1/proctitis	1	1	1	1	1	1	1
<i>Estrella lausannensis</i>	0	1	1 tronquée	1 + 1tronquée	2	1	1
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> str. Hall's coccus	1	1	1	1	2	2	1
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV-7	1	1	1	1	1	2	1
<i>Protochlamydia amoebophila</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Protochlamydia naegleriophila</i>	1	1	1	1	4	1	1
<i>Chlamydophila caviae</i> GPIC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Waddlia chondrophila</i> 2032/99	0	1	1 fusion <i>glgB</i>	1 +1fusion <i>glgA</i>	1	1	1
<i>Waddlia chondrophila</i> WSU 86-1044	0	1	1 fusion <i>glgB</i>	1 +1fusion <i>glgA</i>	1	1	1
<i>Chlamydophila felis</i> Fe/C-56	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydia muridarum</i> Nigg	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydophila pecorum</i> E58	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> AR39	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> LPCoLN	1	1	1	1	1	1	1
<i>Chlamydophila psittaci</i> 6BC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Criblamydia sequanensis</i>	0	1	1 fusion <i>glgB</i>	1 +1fusion <i>glgA</i>	2	1	1

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de la présence des enzymes du métabolisme des polysaccharides de réserve chez les chlamydiales. Le chiffre correspond au nombre de gènes retrouvé dans le génome correspondant à l'enzyme. En revanche, la présence du gène ne signifie pas forcément que l'enzyme est produite ou active.

Matériels et Méthodes

Les milieux de culture

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés figurent dans le tableau 3. Les bactéries sont cultivées à 37°C (*Escherichia coli*) sous agitation à 120 rpm en milieu LB (Lysogeny Broth) supplémenté selon la souche cultivée avec des antibiotiques (Kanamycine (Kan) 50µg/mL ; Ampicilline (Amp) 100 µg/mL). Les tests de complémentation de mutant d'*E.coli* nécessitent l'utilisation d'un milieu minimum M9 limité en azote pour stresser la bactérie et donc lui permettre l'accumulation de glycogène. Le milieu M9 est composé de 0,4% de Casamino Acids, 0.1mM de CaCl₂, 0.2% de MgSO₄ · 7H₂O, 0.6% de Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, et 0.1% de NH₄Cl. Ce milieu est complémenté par du mannitol ou du maltose à 2 % (P/V). Les tests de complémentation de mutants d'*E.coli* sur milieu solide nécessitent l'utilisation d'un milieu Kornberg. Ce milieu est composé de 1,1 % de K₂HPO₄, 0,85 % de KH₂PO₄, 0,6 % d'extrait de levure et 1,5 % d'agar et est complémenté par du maltose, mannitol ou glucose à 1%.

Les chlamydiales étant des parasites intracellulaires obligatoires, leur culture s'effectue en présence d'amibes, ici *Acanthamoebae castelanii* en milieu PYG (peptone yeast-extract glucose (PYG), 100 g de proteose peptone (Difco, Sparks, Md.), 10 g d'extrait de levure, 4.9 g de MgSO₄ · 7H₂O, 5 g de citrate de sodium, 2H₂O, 0.1 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 H₂O, 1.7 g de KH₂PO₄, 1.97 g de Na₂HPO₄ · 7H₂O, 45 g de glucose, et 0.295 g de CaCl₂ dans 5L d'eau distillée). Les cellules d'amibes sont cultivées 24h en flasque de 10mL, puis 10⁵ cellules de chlamydiales sont ajoutées par flasque, en prenant soin de conserver une flasque d'*A.castelanii* non-infecté qui servira pour continuer à alimenter les cultures de chlamydiales. Les différents passages de ces cultures cellulaires dans du milieu propre se font tous les trois jours.

Ces cultures cellulaires servent à l'extraction d'ADN des différentes chlamydiales. Après infection des amibes sur 48h, la culture cellulaire est filtrée à l'aide de filtre de 0,45µm (pour éliminer les amibes restantes). L'extraction d'ADN se fait à l'aide du kit « Wizard ® Genomic DNA Purification Kit » de Promega.

La culture des cyanobactéries s'effectue en milieu ASN III (Artificial Sea water Nitrogen : avec azote) et ASO (sans azote). Ces milieux synthétiques reconstituent l'eau de mer (428 mM NaCl ; 14.2 mM MgSO₄ ; 9.8 mM MgCl₂ ; 6.7 mM KCl ; 3.4 mM CaCl₂ ; 0.09 mM

K_2HPO_4 ; 0.014 mM acide citrique ; 0.015 mM citrate ammonium-FeIII ; 46 μM H_3BO_3 ; 9.2 μM $MnCl_2$; 1.6 μM Na_2MoO_4 ; 0.77 μM $ZnSO_4$; 0.17 μM $Co(NO_3)_2$; 0.32 μM $CuSO_4$). La source d'azote est apportée sous la forme de nitrate de sodium (0.88 mM) dans le milieu ASNIII. Les milieux liquides (300 mL de milieu/Erlen-1L) et les milieux gélosés (0.8% d'agar noble) sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Les cellules sont cultivées à 22°C dans une chambre de culture placée en cycle jour/nuit (12h/12h). Le flux lumineux est de 0.12 μmol de photon. $m^{-2}.s^{-1}$ pendant le jour. Les cellules sont réensemencées tous les 7 à 14 jours.

Souches		
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139$ $\Delta(araleu)7697 galU galK rpsL$ (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
Δ CAP	<i>DE3</i> $\Delta glgCglgAglgP$	Dr Javier-Posueta (Université de Séville)
K12	K-12 BW25113	
JW3392-1 $\Delta glgA$	F-, $\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda', \Delta glgA762::kan, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$	<i>E. coli</i> genetic stock center
XL10-Gold	Tetr $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$ [F' <i>proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r</i>]	Stratagene
<i>Klebsiella aerogenes</i>		
<i>Klebsiella aerogenes</i>		Laboratoire T.Soldati, UNIG (Genève)
CLg1		
CLg1 WT		notre laboratoire
187G11	<i>glgA1439</i>	notre laboratoire
Chlamydiales		
<i>Estrella lausanensis</i>		CHUV (Lausanne)
<i>Waddlia chondrophila</i>		CHUV (Lausanne)
<i>Parachlamydia Hall's coccus</i>		CHUV (Lausanne)
<i>Protochlamydia amoebophila</i>		CHUV (Lausanne)
<i>Simkania negevensis</i>		CHUV (Lausanne)
<i>Chlamydia trachomatis D/UW-3/CX</i>		Pasteur Paris
Levures		
<i>S.cerevisiae InvSc1</i>	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i> <i>MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen

Amibes

<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 Kay	Laboratoire T.Soldati, UNIG (Genève)
<i>Acanthamoebae castellanii</i>	CHUV (Lausanne)

Plasmides

pJET	KanR	Thermoscientific
pDONR221 Gateway	KanR	Invitrogen
pet15b	AmpR	Invitrogen
pet15b Gateway	Promoteur T7 pour la transcription; AmpR; Tag-Histidine en position N-ter	M. de Barsy (Université de Bruxelles)
pBBR1 MCS1 Gateway	CmlR	M. de Barsy (Université de Bruxelles)
pBBR1 MCS4 Gateway	AmpR	M. de Barsy (Université de Bruxelles)
pYES2.1/V5-His Topo	Promoteur P-GAL1; AmpR; Tag-Histidine en position C-ter	Invitrogen
pKOSG-IBA-dicty1		Iba-lifesciences

Tableau 3 : souches et plasmides utilisés dans cette étude**Observation en microscopie électronique à transmission de CLg1**

Les cyanobactéries sont cultivées en milieu AS0 (sans azote) dans un volume de 50mL, puis récoltées par centrifugation (5minutes à 4000g à 4°C) après deux semaines de culture. Les cellules sont fixées avec du glutaraldehyde, post-fixées avec du tetroxide d'osmium et incluses dans de la résine Epon. Des sections de 70nm sont coupées avec la lame en diamant d'un microtome UC6 Leica, et colorées avec de l'acide periodique thiosemicarbazide au protéinate d'argent (PATAg). Les coupes sont ensuite déposées sur des micro-grilles de cuivre, puis séchées après coloration avec 2% d'acétate d'uranyle. Les échantillons sont alors observés au microscope électronique à transmission (TEM) Philips CM200 80kV, et les images enregistrées sur des films Kodak SO163.

Extraction d'ADN génomique des souches de CLg1

Les souches mutantes 187G11 et sauvage de CLg1 sont cultivées dans 50 mL de milieu ASNIII sans agitation dans une chambre de culture placée en cycle jour/nuit (12/12). Après 11 jours de culture, les cellules sont récoltées par centrifugation à 3600g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot cellulaire (30-40 µL) est resuspendu dans 200 µL de TE (50mM Tris/10mM EDTA pH8) et 50 µL de lysozyme (25mg/mL). Après une heure d'incubation à 37°C,

50 µL de SDS 10% et 3 µL de protéinase K (20 mg/mL) sont ajoutés puis incubés une heure à 60°C. De l'acétate de potassium glacial (300 µL à 5 M à pH5.5) est ensuite mélangé à l'échantillon par retournement, puis centrifugé 10 minutes à 10000g à 20°C. Un volume du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique tamponné à pH 7.4 (25/24/1) est ajouté à un volume de surnageant (300mL). Après deux lavages, l'ADN génomique est précipité avec 1 mL d'isopropanol. Le culot d'ADN génomique est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70%, puis séché et resuspendu avec 50 µL d'eau stérile. La pureté et la quantité d'ADN génomique sont estimées au Nanodrop.

L'Extraction d'ADN des Chlamydiales se fait selon le protocole du kit «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» après une infection de 2 jours et filtration des cellules d'amibes mortes et éclatées pour les chlamydiales).

Génotypage du mutant 187G11 de CLg1

Les gènes *glgA1*, *glgA2*, *gbss* (amidon-synthétases), *glgX1*, *glgX2*, *glgX3* (enzymes de débranchement), *apu1*, *apu2* (amylopullulanases), *idbe* (enzyme de débranchement indirecte) et les *glgB1*, *glgB2*, et *glgB3* (enzymes de branchement) sont amplifiés par PCR (Taq KAPA HiFi HotStart de KAPABIOSYSTEMS) à partir de l'ADN génomique de la souche mutante 187G11. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 4. Les réactions de séquençage sont effectuées à l'aide d'amorces internes additionnelles permettant de couvrir l'entièreté du gène.

gènes	amorces	séquences
amylopullulanases	<i>apu1</i> For	F : GCATCCATATATAAAATGATCGCTAAGG
	<i>apu1</i> Rev	R : TTCGTCCTTCGTCCTCGTCCTT
	<i>apu1</i> For interne 1	F : GGTAATCGAGCTTTACCGAAAT
	<i>apu1</i> Rev interne 2	R : TCAAGATCTTCTCCTGCTACCGTTA
	<i>apu1</i> For interne 3	F : CAGCTAACCCAGTTAAATTTACTTGC
	<i>apu1</i> Rev interne 4	R : GATTGAAATTCGGTAAAGCTCGAT
	<i>apu2</i> For	F : GGAGATCTTCTGCCCTCTTTCA
	<i>apu2</i> Rev	R : AAAATAGCCAATAAACAGAAGCGA
	<i>apu2</i> For interne 1	F : ACGAACTGCGAACCCAGAACTCC
	<i>apu2</i> Rev interne 2	R : ACCCAATCCCCTGCCTTCGCAT
	<i>apu2</i> For interne 3	F : GGCATATCAAAGGTACTCGTCATGG
	<i>apu2</i> Rev interne 4	R : AGGTAAAGACAGGGGCTGTCAA
Enzyme de débranchement indirecte	<i>idbe</i> For	F : TCAATTATAAGTAGGGGTAGGAGA
	<i>idbe</i> Rev	R : ATGCTGAAAAAATCGTCCAAA
	<i>idbe</i> For interne 1	F : CACAACTCTGATAACAGCCTCAA
	<i>idbe</i> Rev interne 2	R : GTACACCTGACTCACCACCGTAA
	<i>idbe</i> For interne 3	F : GATTGGCATATCAAAGGTACTCG
<i>idbe</i> Rev interne 4	R : ACCGCCTAGATAATGAGATTGGAT	

Enzymes de branchement	<i>glgB1</i> Rev	R : TGACCATCCCATTGGCTCCTA
	<i>glgB1</i> For	F : GTGGTTTAGGCAACTACGACGGTACA
	<i>glgB1</i> Rev interne 1	R : CGTTACGTATCATGGAACATAATT
	<i>glgB1</i> For interne 2	F : CCAGGTGCGCCGATGATTTT
	<i>glgB1</i> Rev interne 3	R : TCGCCCTGAATGATGATATAAAT
	<i>glgB2</i> For	F : TCGGAAAAGATGTCTTGCTATGCT
	<i>glgB2</i> Rev	R : TCCACTCAGTCAAGTGTGAATCAA
	<i>glgB3</i> For	F : TGAACAGTCAGACAAGTTTTCCGT
<i>glgB3</i> Rev	R : TCCCGAACTGAGGTTAAGTATTGA	
Enzymes de débranchement	<i>glgX1</i> Rev	R : TAATTAGTGGTTTTTAGTACTACTAACG
	<i>glgX1</i> For	F : ATGTTAATGGGAGATGAATCTATGA
	<i>glgX1</i> Rev interne 1	R : ACGTCGTTGCTGATTGCGTA
	<i>glgX1</i> For interne 2	F : AGCAGTGGTAGTCGACGAATCT
	<i>glgX1</i> Rev interne 3	R : AAGCCGGCAAATGTTCCCTCGTA
	<i>glgX1</i> For interne 4	F : GTAACCTCTGGCGTGGCGAAA
	<i>glgX2</i> Rev	R : CTATTTTGCCATTAATAAAATGCAAC
	<i>glgX2</i> For	F : ATGAACCATAAAACGTTACCTG
	<i>glgX2</i> Rev interne 1	R : TCATCGGTGTACCTTGAGCGAGT
	<i>glgX2</i> For interne 2	F : TCGGATTCCTCTTGCTTCAACCGT
	<i>glgX2</i> Rev interne 3	R : CCACGATGGGGTGCAAAGAAACT
	<i>glgX2</i> For interne 4	F : ATGAAGCTAATGGTGAAGAGAACCGA
Amidon-synthétases	<i>gbss</i> For	F : TCCTCATGAATTGGTGACATAGTATGTT
	<i>gbss</i> Rev	R : CAGATACAGGTGAAAATCGTAACGC
	<i>gbss</i> For interne 1	F : AAAACGCCCTGGAAAGCAATA
	<i>gbss</i> Rev interne 2	R : GCAATAGTCAGCACCAGCCGTGATA
	<i>gbss</i> For interne 3	F : TTTATCACGGCTGGTGCTGACT
	<i>glgA1</i> For	F : AATTGTTAACAAAAGTGGGGAGAGAAA
	<i>glgA1</i> Rev	R : GATAACGATCGTGATAACTTTAAGGTA
	<i>glgA1</i> For interne 1	F : GCTCTGCAACATATGACTTGGTGTCTGTA
	<i>glgA1</i> Rev interne 2	R : CCATAATAACGAGCCGCAAATTCTGCTA
	<i>glgA2</i> For	F : AAGTGAATCAACTGAATGAAAACGA
	<i>glgA2</i> Rev	R : CGGGTATCTGTAATCTAGAACTCCTCA
	<i>glgA2</i> For interne 1	F : ATGATTGGCAAACCTGGATTGATCCCTGTA
	<i>glgA2</i> Rev interne 2	R : ACCACCAACACGAACTACAGGTACT
	<i>glgA2</i> For interne 3	F : TTAACCGGAATTGATTACAATACTTGGGA
<i>glgA2</i> Rev interne 4	R : TGGAATAGACAATACCACCTTTCA	
BamHI <i>glgA1</i> pGEX For	F : <u>GGATCC</u> ATTCCCTCTGAGTCTGTGTGGCAGGCAA	
XhoI <i>glgA1</i> pGEX Rev	R : <u>CTCGAG</u> TTAAATAATTCCATCGATCGCATCTTGATAC	
EcoRI <i>glgA2</i> pGEX For	F : <u>GAATTC</u> TATATAGTTCAAATTGCCTCCGAATGTCCT	
XhoI <i>glgA2</i> pGEX Rev	R : <u>CTCGAG</u> TTACTTATCTCTTAAAAAATCATATAATTCA	
NcoI <i>glgA1</i> pET15 For	F : AGTT <u>CCATGG</u> GCAAATATTATTTGTGGCGGCAGAAGCATC	
XhoI <i>glgA1</i> pET15 Rev	R : ATT <u>CTCGAG</u> TTAAATAATTCCATCGATCGCATCTTGATAC	

Tableau 4 : liste des amorces utilisées. Les nucléotides soulignés représentent les sites de restriction introduits pour la construction des plasmides d'expression.

La température optimale d'hybridation ($T^{\circ}m$) est déterminée pour chaque gène à l'aide d'un gradient de température compris entre 55°C et 65°C. La PCR s'effectue sur 30 cycles suivant ce programme:

95°C-5 min ; 95°C-20 sec. ; 55°C à 65°C-30 sec. ; 72°C (1kb/min) ; 72°C-5 min. Les produits de la PCR sont analysés sur gel d'agarose 1% (P/V) et 0,5% BET tamponné avec du TAE (40 mM Tris/acétate/1mM EDTA pH8.3) à 90V à 110V pendant une heure.

Clonage des produits de PCR

Les amplifiats sont purifiés du gel d'agarose à l'aide des kits Wizard[®] SV Gel et PCR Clean-Up System (Promega). La solubilisation du morceau de gel d'agarose contenant l'amplifiat est réalisée à 55°C en présence de la solution « Membrane binding buffer » (100 µL/mg de gel d'agarose : 4.5 M guanidine isothiocyanate, 0.5 M potassium acétate pH 5). L'échantillon est ensuite déposé sur une micro-colonne DEAE puis centrifugé 1min à 16000g. Après deux lavages avec la solution « Membrane Wash Solution » (10 mM acétate de potassium pH 5, 80% éthanol, 16.7 mM EDTA pH 8), le produit de PCR est élué avec 30 µL d'eau stérile, puis quantifié au Nanodrop.

L'amplifiat est cloné dans le vecteur Topo (Invitrogen) à l'aide du kit Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen). 4 µL d'ADN précédemment purifiés sont mélangés à 1 µL de solution saline, 0.5 µL d'eau stérile ainsi que 0.5 µL de vecteur Topo. Après incubation 10min à température ambiante, 3 µL d'échantillon sont utilisés pour transformer 50 µL de cellules TOP10 thermo-compétentes. Ces dernières sont incubées 30 min dans la glace en présence du vecteur avant de réaliser le choc thermique (42°C pendant 30 secondes puis immédiatement dans la glace). Les cellules transformées sont incubées avec 250 µL de milieu SOC (2% tryptone ; 0.5% extrait de levure ; 0.05% de chlorure de sodium ; 0.25% de chlorure de potassium 1 M ; 0.054% de chlorure de magnésium ; 0.12% de sulfate de magnésium ; 1% glucose 2 M ; pH 7) pendant une heure à 37°C. La sélection des transformants s'effectue sur du milieu LB gélosé contenant 50 µL/mL de Kanamycine et en présence de X-Gal (16 µL/boîte). Les colonies blanches sont isolées, puis mises en culture afin d'extraire les plasmides.

Extraction de plasmides

L'extraction des plasmides s'effectue à l'aide du kit NucleoSpin[®] Plasmid et selon les recommandations de MACHEREY-NAGEL. Brièvement, 5 à 10 mL de culture sont centrifugés à 4000 g pendant 10min. Les culots cellulaires sont repris avec 250 µL de tampon contenant de l'ARNase puis avec 250 µL de tampon de lyse contenant du SDS. Après éclaircissement de la suspension, les protéines sont précipitées. Après centrifugation 10 min à 11000g, le surnageant, délicatement placé sur une micro-colonne DEAE, est éliminé en centrifugeant rapidement l'échantillon 1min à 11000g. Les plasmides retenus sur la colonne sont lavés une fois avec 600 µL tampon de lavage (25 mM Tris/EDTA pH8.3 ; 80% d'éthanol)

puis ils sont élués avec 30 à 50µL d'eau stérile. La concentration finale en plasmide est ensuite estimée au Nanodrop. La présence de l'insert est vérifiée à l'aide d'enzyme de restriction: 5µl de Tampon 10X (en fonction de l'enzyme utilisée), 5µl du Plasmide, 1µl de l'Enzyme1, 1µl de l'Enzyme2, 39µl d'eau stérile. Après une heure d'incubation à 37°C, les échantillons sont analysés sur un gel d'agarose 1%. Les plasmides contenant un insert sont envoyés en séquençage.

Construction des vecteurs d'expression pour les protéines de CLg1

Les vecteurs d'expression, le vecteur pGEX (GEhealthcare) et le vecteur pET15 (Novagène) sont ouverts à l'aide de deux enzymes de restriction différentes favorisant ainsi l'orientation de l'insertion dans le vecteur. Le vecteur pGEX est digéré avec les enzymes de restriction BamHI /XhoI pour l'insertion du gène *glgA1* et avec EcoRI/XhoI pour l'insertion du gène *glgA2*. Le vecteur pET15 est digéré avec les enzymes de restriction NcoI/XhoI. Parallèlement, les vecteurs TOPO contenant les gènes *glgA* bordés des sites de restriction introduit au cours la PCR sont digérés par les mêmes couples enzymes de restriction, utilisés pour les vecteurs d'expression. Ces digestions sont réalisées selon le protocole suivant : 5µl de Tampon 10X , 5µl du Plasmide, 1µl de BamHI, EcoRI ou NcoI, 1µl de XhoI, 38µl d'eau stérile.. Après une heure à 37°C, les produits de digestion sont déposés sur un gel d'agarose 1% dans du tampon TEA. Après migration à 90V, les plasmides ouverts et les gènes *glgA* sont purifiés à l'aide du kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) et quantifiés au Nanodrop. La réaction de ligation s'effectue à l'aide de la T4 DNA ligase (Fermentas), selon les conditions de ligation données par le fournisseur. Pour une quantité de plasmide donnée comprise entre 20 et 100ng, la quantité d'insert est déterminée en appliquant la formule suivante : $(\text{ng de plasmide} \times \text{taille de l'insert}) / (\text{taille du plasmide})$. Plusieurs ratios de plasmide/insert de 1/1, 1/3 et 1/5 sont testés, ainsi qu'un contrôle négatif (absence d'insert). La transformation des cellules compétentes s'effectue selon le même protocole que décrit ci-dessus.

Construction des vecteurs d'expression pour les protéines de Chlamydiales

Les plasmides d'expression de type Gateway sont construits à l'aide du kit d'Invitrogen « Gateway[®] Technology with Clonase[®] II ». A partir d'une PCR sur l'ADNg de la chlamydiale, amplifiant le gène d'intérêt (les amorces sont dans le tableau 5), on utilise la BP clonase pour l'insérer dans le plasmide pDONR, puis après sélection et vérification par séquençage, ce même insert est transféré du pDONR vers le vecteur de destination (pet15b, pBBR1-MCS1, pBBR-MCS4) à l'aide de la LR Clonase.

<i>C.trachomatis</i>	<i>glgC_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGGCTGGTAGACGGACGA
	<i>glgC_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAATACGTAATTATCTGGGATTG
	<i>glgP/malP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGTATTTCCGATCGGACAAAGATCA
	<i>glgP/malP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAGAAGTTGGTCGGGAAACA
	<i>malQ_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGCCATCATTATCCCAATCC
	<i>malQ_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAATAGAGCCTCAAGTAAAGAA
<i>P.acanthamoebae</i>	<i>glgC_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGTCTTTGTTAACACACCCCATG
	<i>glgC_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATAATAAAAACCATCCGGCAAG
	<i>glgA_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGCATATTATTCATATCGCAGCA
	<i>glgA_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTATGCTCGAGTTGTTTTGT
	<i>glgP/malP_A_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGAGTACATTAGCGGATTTGC
	<i>glgP/malP_A_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCAAATTTTCCCGAAT
	<i>glgP/malP_B_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGACGCAACCAGCACCC
	<i>glgP/malP_B_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAATATATCCGACACCGGTCTT
<i>malQ_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGACAACTTTTTTCTGCAGCA	
<i>malQ_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCCGTTAAAGTTTTTCATG	
<i>P.amoebophila</i>	<i>glgC_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTGATAGTCTTTGCTTTTAAATAAAA
	<i>glgC_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATAAAAATAATCCGTCTGGAAGG
	<i>glgA_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGCACATCATTCATATAGCCTCA
	<i>glgA_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAATTTTTGCTGAGATAGCTTGA
	<i>glgP/malP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTGGTAACTAGTTTTGAATTTTTCT
	<i>glgP/malP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGCATCGATTGTGCGCT
	<i>malQ_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGATAGATCCTACTTTCTTACTTC
<i>malQ_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAATAATAAGTTGTTGCATAAGGTAGG	
<i>W.chondrophila</i>	<i>glgA_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGACCGTTTTCCGCCATT
	<i>glgA_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAACCATGATGGACCTCCT
	<i>glgA_F_o.c.</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGTAGGGGTCGAATATGCC
	<i>glgA_R_o.c.</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAACCATGATGGACCTCCTTCA
	<i>glgX_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGTTTCTTGGTGCAAA
	<i>glgX_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCATTGAAGCAATGCAATAC
	<i>glgP/malP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGAACCAGCCGAGCAAAG
	<i>glgP/malP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATCTGAAGTAGGCGTTGACA
	<i>malQ_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGAATAATCTAAGATTTTTCTAT
<i>malQ_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAGAACGAATAGATGAAATTTCC	
<i>E.lausannensis</i>	<i>glgA_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAAAATATTTAATATTGAAAGCAAATG
	<i>glgA_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGCCAAAGATTTTTTTTGATG
	<i>glgA_F_o.c.</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGATTGGAGCTGAGTTTACAGG
	<i>glgA_R_o.c.</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGCCAAAGATTTTTTTTGATG
	<i>glgX_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAGCTACAAATTCAAAACCTGCTG
	<i>glgX_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAATCGCGGAGCGCC
	<i>glgP/malP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGAATCAGGATACCGATCGC
	<i>glgP/malP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTCAAAGCGGCCATAG
<i>malQ_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGACACTGCCCAAAGACCT	
<i>malQ_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATCTCTCTCCCGTAAAACCT	
<i>S.negevensis</i>	<i>glgC_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGGTCAATACGAGAAAAAACC
	<i>glgC_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAGCTTAAAATTATCGGGGATATG
	<i>glgA_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGTATATCGTTTATGTGACAACA
	<i>glgA_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTATCTTGATTTAGCAATGGCTA
	<i>glgX_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAACCCATCCTTTACAACC

	<i>glgX_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAAGAGCTTCTTTTTTCCA
	<i>glgP/malP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGATTATGAGTCAGCATAGAAAGA
	<i>glgP/malP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTTAAAAATAAGCGTTTAAAAACATATT
	<i>malQ_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGGAAAATCTTAAATCACAACTTT
	<i>malQ_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAATCTCGAATGAGTTCTTTTCAT
<i>E.coli</i>	<i>glgA_F_gateway</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGCAGGTTTACATGTATGTTTCAG
	<i>glgA_R_gateway</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTTCAAGCGATAGTAAAGCTCA
	<i>glgA_F</i>	GGATCCCAGGTTTTACATGTATGTTTCAGAGATGTTCCCGCTGCTTA
	<i>glgA_R</i>	CTCGAGCTATTTCAAGCGATAGTAAAGCTCACGGTACGACTT
	<i>glgP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGAATGCTCCGTTTACATATTCA
	<i>glgP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAATCTCACGGATCG
	<i>malP_F</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCACAACCTATTTTAAACGA
	<i>malP_R</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGCGTTTTGCCTGCCAGA

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les différents clonages des enzymes du métabolisme des polysaccharides de réserve chez les chlamydiales et chez *E.coli*.

Purification des protéines recombinantes étiquetées 6Histidine

La purification est réalisée à l'aide du kit Ni-NTA Protein Purification System (#30210, Qiagen)). Les cultures bactériennes sont lysées par Sonication ou par presse de French. Une centrifugation permet de retirer les débris cellulaires. La purification est réalisée à l'aide de billes à haute affinité pour l'étiquette Histidine de la protéine recombinante. Les colonnes de purification sont chargées avec 1mL de billes (Ni-NTA Agarose) et rincée avec 3 mL d'eau ultrapure puis 3 mL de tampon de lavage [NaH₂PO₄, 2H₂O (50 mM) + NaCl (300 mM) + Imidazole (30 mM)]. 1 mL d'extrait protéique est déposé dans les colonnes avec les billes qui incubent 1H sous agitation à 4°C, puis les fractions « Non-retenues » sont récupérées. Les billes sont lavées trois fois avec 1 mL de tampon de lavage. Puis 4 éluions avec 1 mL de tampon d'éluion [NaH₂PO₄, 2H₂O (50 mM) + NaCl (300 mM) + Imidazole (250 mM)].

Analyses quantitatives des polysaccharides solubles et insolubles

Les polysaccharides solubles (wsp) et insolubles (amidon) sont extraits de cellules carencées en azote (milieu ASO) d'une culture de 14 jours. Les cellules sont centrifugées à 3500g pendant 15 minutes à 4°C, puis elles sont lysées à la presse de French. L'extrait cellulaire est centrifugé à 16100g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contient les polysaccharides solubles et les protéines, tandis que le culot contiendra les débris cellulaires et le polysaccharide insoluble. Ce dernier est solubilisé à 99°C dans un volume de 500µl de DMSO 90% pendant 30 minutes. Les quantités de polysaccharides solubles et insolubles sont déterminées par voie enzymatique. Une amyloglucosidase hydrolyse les liaisons glucosidiques α-1,4 et α-1,6 des polysaccharides. Les molécules de glucose ainsi libérées sont ensuite phosphorylées en posi-

tion 6 par une hexokinase. Le glucose-6-phosphate produit est ensuite oxydé en gluconate-6-phosphate par une glucose-6-phosphate déshydrogénase, cette réaction est couplée à la réduction de NADP en NADPH,H⁺ qui permet son suivi à 365nm.

Purification et analyse des polysaccharides solubles

Les polysaccharides solubles sont préparés comme il a été décrit ci-dessus. Les pigments et les protéines présents avec les polysaccharides solubles sont retenus grâce à une résine échangeuse d'anions DOWEX 50 X 8 (5mL de résine pour 20 mL d'échantillon). Après lyophilisation, les polysaccharides sont resuspendus dans 1mL de DMSO 10% puis déposés sur une colonne de tamisage moléculaire de type TSK HW 55 équilibrée dans du DMSO 10% (H= 64 cm; diamètre= 1,2cm; débit=0,5 ml/min). Pour chaque fraction (1ml), la quantité de polysaccharide, exprimée en équivalent glucose/fraction est déterminée grâce à un dosage au phénol sulfurique (20µl d'échantillon, 20µl de phénol 5% et 100µl d'acide sulfurique sont incubés 30 min à 80°C, et l'absorbance est mesuré à 490 nm). Les polysaccharides présents dans le volume d'exclusion sont ensuite analysés afin d'établir la distribution en longueur de chaînes. Toutes les liaisons α -1,6 sont hydrolysées avec des enzymes de débranchement commerciales (1U/mL isoamylase et 1U/mL pullulanase). Les chaînes de glucose libérées sont ensuite séparées en fonction de leurs degrés de polymérisation sur une chromatographie échangeuse d'anions (colonne PA200) à haute performance couplé à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC PAD). L'élution s'effectue par un gradient linéaire d'acétate de sodium 1M de 0 à 45%.

Extraction des protéines

Après 9 jours de culture en milieux ASNIII pour CLg1 ou une nuit de culture en milieu LB pour les protéines recombinantes chlamydiennes, les cellules sont récoltées au milieu de la journée par centrifugation à 3500g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu avec 15 mL de tampon A (25mM Tris/acétate pH 7,5 ; 5 mM de DTT, cocktail antiproteases Sigma). Les cellules sont ensuite lysées à la presse de French (deux fois à 1250 psig). Après centrifugation à 16 100g pendant 15min à 4°C, le surnageant (extrait brut) est congelé à -80°C.

Expression des protéines recombinantes

Une culture d'une nuit en milieu LB induite à l'IPTG (0,5mM) est centrifugée puis resuspendue dans du tampon Tris-acétate pH7,5 avec du DTT. L'échantillon est passé à la Presse de French ou soniqué, centrifugé, et le surnageant est congelé à -80°C ou déposé sur gel.

La séparation sur gel de polyacrylamide en condition non dénaturante s'effectue à l'aide du

système d'électrophorèse MiniProtean II (BioRad). Les gels de séparation et de concentration respectivement à 9% et à 4% d'acrylamide-bisacrylamide (37.5 :1 acrylamide/Bis-acrylamide) sont tamponnés respectivement avec 375 mM Tris/HCl à pH 8.8 et 125 mM Tris/HCl à pH 6.8. La migration à 15V.cm⁻¹ s'effectue dans le tampon de migration (25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 1mM DTT) à 4°C pendant 1h30. Après migration, les protéines sont électro-transférées pendant 2 heures à 200 mA sur des gels de polyacrylamide à 9% contenant du glycogène de foie de lapin. Après transfert, les gels de glycogène sont incubés dans un tampon permettant l'activité des amidons synthétases (70 mM glycyl-glycine pH9 ; 135 mM de (NH₄)₂SO₄; 8 mM MgCl₂; 0,7 mg de BSA ; 67 mM de β-mercaptoéthanol ; 1,2mM d'ADP-glucose). Après une nuit d'incubation à 30°C, les gels de glycogènes sont colorés avec une solution d'iode (1% KI, 0,1% I₂). Les activités amidon-synthétases sont mises en évidence sous la forme de bande d'activité brune qui témoigne de l'élongation des chaînes externes du glycogène.

Les gels d'activités ou « zymogrammes »

L'équivalent de 15 mL d'extrait protéique de la souche sauvage et de la souche mutante sont préalablement purifiés sur une colonne échangeuse d'anion HitrapQ (GEhealthcare) de 1mL préalablement équilibrée dans du tampon A. Cette étape permet d'améliorer la séparation des protéines en éliminant des pigments qui interfèrent avec la migration et de concentrer les activités enzymatiques mineures. Les protéines retenues par la colonne sont éluées à l'aide d'un gradient NaCl (tampon B : Tampon A+ 1M NaCl) en 5 volumes colonnes (20%/fraction de 1mL). Toutes les fractions sont rassemblées (5 mL) puis concentrées à 1mL avec un système d'ultrafiltration Millipore de 30kD (seuil de coupure). Les protéines semi-purifiées sont dosées selon la méthode de Bradford (BioRad). La concentration protéique est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de sérum-albumine bovine comprise entre 0 à 8µg. Les techniques de numération cellulaire ne peuvent pas être appliquées à la souche CLg1, ce dosage nous permet ainsi de comparer les résultats entre eux. Les échantillons sont aliquotés (200 µL/tube) et congelés à -80°C.

La séparation sur gel de polyacrylamide en condition non dénaturante s'effectue à l'aide du système d'électrophorèse MiniProtean II (BioRad). Les gels de séparation et de concentration respectivement à 9% et à 4% d'acrylamide-bisacrylamide (37.5 :1 acrylamide/Bis-acrylamide) sont tamponnés respectivement avec 375 mM Tris/HCl à pH 8.8 et 125 mM Tris/HCl à pH 6.8. La migration à 15V.cm⁻¹ s'effectue dans le tampon de migration (25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 1mM DTT) à 4°C pendant 1h30. Après migration les protéines sont électro-transférées pendant 2 heures à 200 mA sur des gels de polyacrylamide à 9% contenant

différents polysaccharides à 0,6% (p/v) tels que le glycogène de foie de lapin, la Beta limite dextrine, l'amylopectine (2%), le Red pullulan, ou l'amidon de pomme de terre. Après transfert, les gels de glycogène sont incubés soit dans un tampon permettant l'activité des phosphorylases dans le sens synthèse (25 mM Tris/acétate pH 7.5, 5mM DTT, 20mM de glucose 1 phosphate), soit dans un tampon permettant l'activité des amidons synthétases (70 mM glycyl-glycine pH9 ; 135 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8 mM MgCl_2 ; 0,7 mg de BSA ; 67 mM de β -mercaptoéthanol ; 1,2mM d'ADP-glucose), soit dans un tampon permettant la révélation des activités sur les différents substrats (25mM Tris/acétate pH 7,5 ; 5 mM de DTT ; MgCl_2). Après une nuit d'incubation à 30°C, les gels de glycogènes sont colorés avec une solution d'iode (1% KI, 0,1% I_2). Les activités phosphorylasiques et amidon-synthétases sont mises en évidence sous la forme de bande d'activité brune qui témoigne de l'élongation des chaînes externes du glycogène. Quant aux activités hydrolytiques, elles sont révélées sur des gels contenant de l'amidon ou de la β limite dextrine incubés dans du tampon A (25 mM Tris/acétate pH 7.5, 5mM DTT). Les activités enzymatiques sont ensuite révélées avec une solution d'iode.

Analyses en Western-blot

Des analyses Western-blot ont été réalisées sur les protéines recombinantes purifiées par billes "MagneGSTTM protein purification system" (Promega) GST-GlgA1 et GST-GlgA2 de CLg1 ainsi que sur les protéines liées au grain de CLg1. Ces dernières ont été extraites en dénaturant 1mg de grains d'amidon purifié dans 50 μL de tampon SDS// β -mercaptoethanol durant 10 minutes à 95°C. Après centrifugation 10 minutes à 1000g, les protéines attachées spécifiquement aux grains se retrouvent dans le surnageant. Les protéines recombinantes ainsi que les protéines liées au grain ont été mises à migrer sur un gel SDS-PAGE à 9%, puis transférées sur une membrane PVDF. Le protocole suivie ensuite pour ces Western-blot est celui de (Ral *et al.* 2006). Les anticorps primaires polyclonaux dirigés contre, le tag Histidine (dilution 1 :3000), le tag GST (dilution 1 :3000) ou GlgA1 et GlgA2 de *Synechocystis* PCC6803 (dilution 1 :1000) puis les anticorps secondaires (dilution 1 :20000) ont été mis en contact avec la membrane PVDF. Les immunocomplexes ont été révélés par chimioluminescence, suivant le protocole du kit « ECLTM prime western blotting reagent kit (GE healthcare) »

Dosage de l'activité glycogène/amidon synthase pour CLg1

L'activité des glycogène-synthases est mesurée dans le sens synthèse. Avant de faire varier le temps, la quantité d'enzyme et de nucléotides-sucres, des essais ont été réalisés: 15 min à

35°C avec 40µL de préparation enzymatique et 60µL d'un mélange contenant: 50 mM HEPES-NaOH pH 7, 10 mg.mL⁻¹ glycogène, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM Dithiothreitol, 0.5 mg.mL⁻¹ sérum-albumine bovine, 3 mM d'ADP-Glucose et 2 µM ADP-¹⁴C-[U]-Glc. Après l'incubation à 35°C, le glycogène est précipité par 1mL de méthanol-KCl (75%v/v; 1%v/v) à -20°C pendant 10 min, centrifugé 5 min (3000g à 4°C) et resuspendu avec 200µL d'eau distillée. Cette précipitation est répétée deux fois avant que le culot ne soit resuspendu dans 200µL d'eau et est mélangé à 2,5mL de liquide de scintillation. La radioactivité incorporée dans le glycogène est déterminée par comptage. Les valeurs de Km et Vm apparentes ont été déterminées avec le logiciel GraphPad Prism.

Dosage de l'activité glycogène/amidon synthase pour les Chlamydiales

Les activités des glycogène-synthases de Chlamydiales et d'*E.coli* sont mesurées dans le sens synthèse de la même manière que celles de CLg1, excepté la composition du mélange réactionnel : HEPES-NaOH (50mM; pH 7), glycogène (10 mg.mL⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (100 mM), Dithiothreitol (10 mM), sérum-albumine bovine (0,5 mg.mL⁻¹), MgCl₂ (8 mM), UDP-Glucose ou ADP-Glucose (3 mM) and UDP-[¹⁴C]Glc or ADP-[¹⁴C]Glc (2 µM).

Purification et identification de l'activité synthétase apparaissant sur le gel d'activité

Les cellules cultivées en milieu ASNIII sont récoltées, puis lysées avec la presse de french. Après centrifugation à 16 100 g à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant est passé à travers un filtre 0,22 µm avant d'être déposé sur une colonne préparatoire échangeuse d'anions de type HiTrap Q de 5mL (GeHealthcare) équilibrée avec le tampon A (tris/acétate 25mM pH 7,5 10mM DTT) à 5mL/min. Un gradient NaCl de 0 à 100% réalisé avec le tampon B (Tris/acétate 25mM pH 7,5 1M NaCl) permet l'élution des protéines. Les fractions (1 mL) contenant l'activité amidon-synthétase sont rassemblées. On ajoute alors directement du sulfate d'ammonium afin d'obtenir une concentration finale de 1M. L'échantillon est déposé sur une colonne hydrophobe de type Butyl-sepharose de 1mL (GE healthcare) équilibrée avec le tampon C (Tris/acétate 25mM pH 7.5 10mM DTT ; 1M sulfate d'ammonium) à 1mL/min. Un gradient sans sulfate d'ammonium est réalisé avec le tampon A (0 à 100%) sur 10 volumes de colonne. Les fractions (1mL) contenant l'activité amidon-synthétase sont rassemblées, puis dessalées par chromatographie de tamisage moléculaire (sepharose 200) équilibrée avec le tampon A. Les protéines dessalées sont ensuite chargées sur une colonne échangeuse d'anions très résolutive de type Mono Q, HR5/5 1mL), puis éluées avec un gradient de NaCl₂ réalisé avec le tampon B. Les fractions (0,5 mL) contenant l'activité amidon-synthétase sont concentrées par ultrafiltration (30kD système millipore) afin d'obtenir un volume final de 200

µL. Les polypeptides sont dénaturés en présence d'un mélange β-mercaptoéthanol/SDS 20% (v/v) pendant 10 min à 95°C puis séparés sur un gel de polyacrylamide contenant 0.1 % de SDS. Les protéines sont colorées une nuit sous agitation au bleu de coomassie à l'aide du Roti Blue (ROTH : pour la préparation de 50 ml : 10 ml Roti blue + 10 ml méthanol, + 30 ml d'eau milli Q). Après lavage avec du méthanol 25%, les polypeptides sont découpés à l'aide d'un scalpel et mis dans un tampon ACN 60%, additionné de Bicarbonate d'ammonium. La réalisation de la carte peptidique de la protéine est faite suivant la méthode décrite dans l'article de Gurcel (2008). Les peptides obtenus sont analysés à l'aide de l'appareil de spectrométrie de masse : nano LCMS-MS et les résultats sont traités et analysés grâce à la base de données Mascot. (Gurcel *et al.*, 2008).

Les enzymes recombinantes GlgA1 et GlgA2

La souche d'*E.coli* ΔCAP (voir tableau 3) est délétée dans les gènes *glgC*, *glgA* et *glgP* correspondant, respectivement, à l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase, glycogène synthétase et phosphorylase. Ces cellules ne synthétisent donc pas de glycogène. Des cellules chimio-compétentes ont été préparées afin de les transformer avec les plasmides d'expression pGEX-GlgA1, pGEX-GlgA2 et pET-15-GlgA1. Pour ce faire, 200 mL de milieu Psi Broth stérile (0.5% d'extrait de levure ; 2% de bacto tryptone ; 0.5% de MgSO₄ ; pH 7.6) sontensemencés avec 2 mL pré-culture. La croissance est régulièrement suivie à 600 nm. A une DO_{600nm} de 0.4, les cellules sont récoltées et lavées avec 20 mL de tampon Tfb I stérile (acétate de potassium 0.3% ; chlorure de rubidium 1.21% ; chlorure de calcium 0.147% ; chlorure de magnésium 1% ; glycérol 15% ; pH 5.8) puis avec 10 mL de tampon Tfb II stérile (MOPS 0.21% ; chlorure de calcium 1.1% ; chlorure de rubidium 0,121% ; glycérol 15% ; pH 6.5). Pour terminer, le culot cellulaire est resuspendu avec 2 mL de Tfb II. Les cellules thermo-compétentes sont réparties dans des tubes de 1.5 mL stériles et rapidement congelées dans l'azote liquide. Les cellules sont ensuite stockées au congélateur à -80°C.

Une colonie isolée est utilisée pour ensemercer une pré-culture de 10mL de milieu LB contenant 100 mg/mL d'ampicilline incubée une nuit à 37°C. Des cultures de 200mL de milieu LB et 100 µg/mL d'ampicilline (Erlenmeyer de 1L) sontensemencées avec 5 mL de pré-culture. Au milieu de la phase exponentielle, 10 mL de suspension bactérienne sont prélevés avant l'induction avec l'IPTG (5mM finale). Les cultures sont placées sous agitation une nuit à température ambiante. Les cellules sont centrifugées à 4000g pendant 10 min à 4°C. Les culots cellulaires sont resuspendus avec 10 mL dans du tampon A (tris/acétate 25mM pH 7,5 10mM DTT) puis lysées à la presse de French. L'induction des protéines

recombinantes est vérifiée sur un gel SDS-PAGE à 9% et une coloration au bleu de Coomassie des échantillons prélevés avant et après induction. L'activité des enzymes recombinantes (amidon-synthétase GlgA1 et GlgA2) est analysée sur un zymogramme incubé dans un tampon permettant la visualisation de l'activité amidon-synthétase.

Complémentation de mutant *E. coli* JW 3392-1 Δ glgA

Les cellules JW3392-1 (Δ glgA) sont rendues chimio-compétentes selon le protocole décrit ci-dessus (voir paragraphe, les protéines recombinantes GlgA1 et GlgA2). On transforme ensuite ces cellules avec les vecteurs pGEX-*glgA1* et pGEX-*glgA2*. Les bactéries transformées sont mises en culture sur milieu M9 complété par 2,5% de, maltose ou mannitol. La présence ou non de glycogène est détectée en inondant la boîte de Pétri avec une solution d'iode et en comparant la couleur avec la souche contrôle transformée avec le plasmide pGEX vide (coloration jaune-citron). En parallèle un dosage du glycogène est déterminé selon la méthode suivante : les bactéries transformées sont mises en culture liquide de milieu M9 toute la nuit, on les centrifuge 10 minutes à 4000g, le culot est resuspendu dans 2mL de H₂O stérile. Les cellules sont lysées par sonication 3 fois 30 secondes dans la glace. Après centrifugation à 4°C, 10 min. à 13000g, la quantité de glycogène et la quantité de protéine sont mesurées dans le surnageant. Les résultats sont exprimés en mg de WSP.mg⁻¹ de protéine totale.

Arbres phylogénétiques

Les homologues de GlgA ont été identifiés dans GenBank ou d'autres sources en utilisant BLASTp et en alignant les séquences avec MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). L'alignement a été réagencé manuellement utilisant SeA1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>) et les blocs de données manquantes dans certains taxons ou régions à faible identité ont été enlevés manuellement. Cet alignement réduit a été analysé par "maximum likelihood" (ML). Le meilleur modèle de comparaison d'acides aminés a été sélectionné selon les critères informatifs d'Akaike avec ProtTest utilisant les valeurs par défaut (Abascal *et al.* 2005). Le modèle LG (Le *et al.*, 2008) avec une distribution de taux de gamma hétérogène (heterogeneous gamma rate) entre les sites (+G) a été sélectionné par ProtTest pour ces données protéiques. Les paramètres du modèle LG ont été utilisés sous RAxML v.7.2.8 (Stamatakis, 2006) pour la recherche d'arbres ML. La stabilité des groupes monophylétiques a été évaluée en utilisant RAxML avec 1000 bootstraps en réplicats.

Résultats

A) Cyanobactéries

Résultats

1) Sélection de 187G11, un mutant de *Cyanobacterium* CLg1 dépourvu d'amidon

Une collection d'environ 90 mutants a été générée par mutagenèse UV, suivi par au minimum 4 cycles de sous-clonages (Cenci *et al.* 2013). Suivant le premier cycle de criblage, les mutants sélectionnés pour leur différence de coloration par rapport à la souche sauvage lors d'un crible à l'iode de plage cellulaire ont été sous-clonés pour vérifier la ségrégation complète du phénotype mutant. Après trois ans de ségrégation et de criblage phénotypique, nous avons sélectionné 7 souches définissant la classe C de mutants, contenant une quantité de polysaccharides solubles similaire à celle de la souche sauvage, mais avec une quantité d'amidon significativement plus faible. 6 de ces 7 mutants ont été précédemment cités par Cenci *et al.* 2013, mais l'explication biochimique pour le phénotype mutant n'a pas encore été révélée. Le septième, 187G11, affiche un phénotype très sévère, qui se définit par l'absence de coloration de ses plages cellulaires aux vapeurs d'iode. (Figure 12)

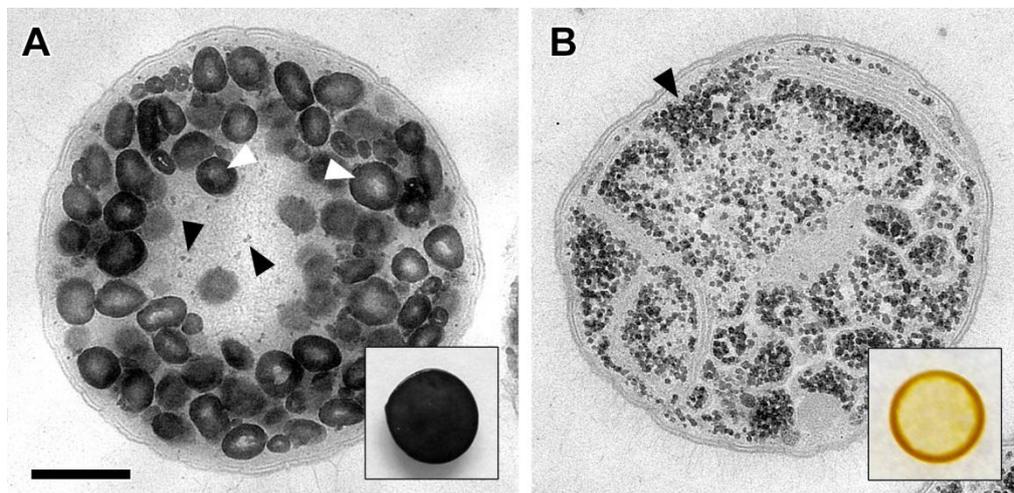


Figure 12. Observation au microscope électronique à transmission de coupes fines de la souche sauvage (A) et de la souche mutante 187G11 (B) après une coloration PATAg révélatrice (en noir) des polysaccharides. Les grains d'amidon visibles dans la souche sauvage, WT (flèches blanches) sont absents dans la souche mutante 187G11. En revanche, les particules de glycogènes (flèches noires) se retrouvent dans les deux souches. La barre correspond à 500 nm. Les plages cellulaires (encadrées en bas à droite) sont obtenues en déposant 50 μ l de culture liquide, pour chacune des souches, sur du milieu ASNIII gélosé. Les plages cellulaires sont ensuite incubées pendant un mois dans les conditions normales de culture (voir matériels et méthodes) pour être finalement colorées par vaporisation à l'iode, permettant ainsi de révéler la déficience d'accumulation d'amidon chez la souche 187G11.

Ce phénotype est corrélé par une absence totale d'amidon (descendant sous la barre de détection : <0.5 % du niveau du sauvage), et une quantité normale de polysaccharides soluble (0.34 +/- 0.04 mg de WSP.mg⁻¹ de protéines) en comparaison avec la souche sauvage (0.26 +/- 0.04 mg de WSP.mg⁻¹ de protéines) (Figure 13).

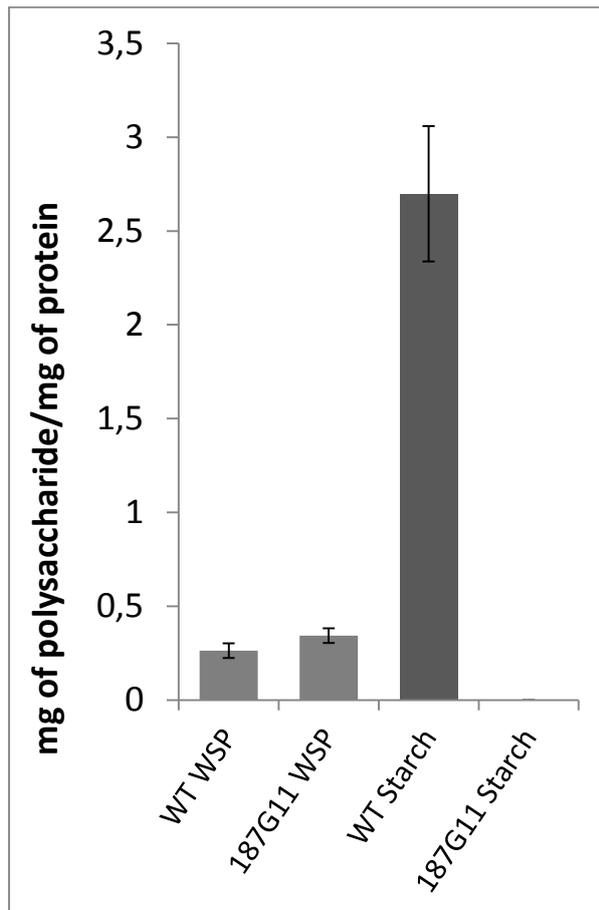


Figure 13 : Quantités de polysaccharides solubles (WSP) et d'amidon mesurées dans la souche sauvage et la souche mutante 187G11 en mg de polysaccharide/mg de protéine. 187G11 possède sensiblement la même quantité de WSP que la souche sauvage (WT), mais ne produit plus du tout d'amidon.

Néanmoins, à l'inverse des mutants dépourvus en glycogène de *Synechocystis PCC6803* (Gründel et al., 2012), ce mutant est capable de croître en condition 12/12h (jour/nuit), avec toutefois un doublement du temps de génération (de 60 h à 120h).

2) 187G11 produit une quantité normale et une structure légèrement altérée de glycogène

Afin de caractériser le polysaccharide soluble accumulé par le mutant 187G11, celui-ci a été

purifié, fractionné par chromatographie de tamisage moléculaire (TSKHW55) et comparé à celui de la souche sauvage. (Figure 14 A et B).

Ces polysaccharides ont également été examinés par microscopie électronique à transmission (TEM) (Figure 14 E et F), et débranchés par des enzymes de débranchement puis les chaînes de polysaccharides ont été séparées par HPAEC-PAD (Chromatographie échangeuse d'anions haute performance avec détection ampérométrique de champ pulsé). L'analyse de la distribution en longueur de chaînes et les observations TEM (Figure 14 C et D) suggèrent que les polysaccharides solubles de 187G11 sont composés de chaînes de glucanes hautement branchées capables d'exclure les molécules d'acétate d'uranyle de la même manière que les polysaccharides solubles de la souche sauvage. L'ensemble des résultats suggère que la souche 187G11 contient une quantité normale de polysaccharides solubles, branchés et de distribution de longueur de chaînes comparable à la souche sauvage, mais est dénuée d'amidon.

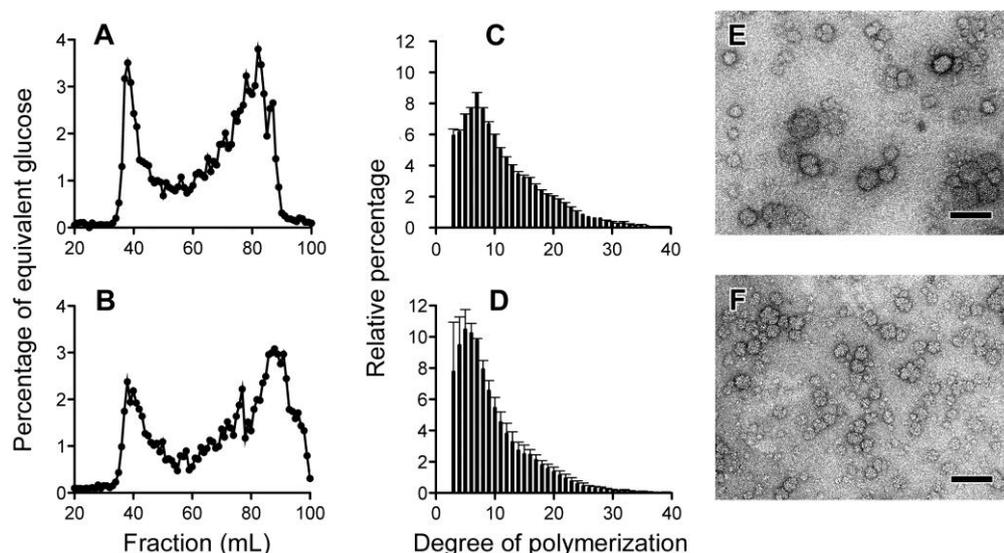


Figure 14. Analyses structurales des polysaccharides solubles produits par la souche sauvage (A) et la souche mutante 187G11 (B). Les polysaccharides solubles ont été analysés en chromatographie de tamisage moléculaire de type TSK-HW55. Les polysaccharides sont détectés et quantifiés (% équivalent de glucose/fraction) avec la méthode du phénol-sulfurique. Le volume d'exclusion (40 mL) et le volume total (80 mL) de la colonne TSKHW 55 sont déterminés à l'aide du glycogène de foie de lapin et du glucose. Les fractions contenant les polysaccharides solubles de la souche sauvage et de la souche mutante sont rassemblées, puis concentrées afin de déterminer la distribution en longueur de chaînes de glucose (voir matériel et méthodes). Après incubation avec une isoamylase commerciale, les chaînes linéaires de glucose formant les WSP produits par la souche sauvage (C) et la souche mutante (D) sont séparées en fonction de leur degré de polymérisation (DP) par HPAEC-PAD. Les résultats, exprimés en pourcentage relatif de chaque chaîne de glucose, sont une moyenne de 3 extractions indépendantes. Les images en MET suggèrent que le WSP de la souche sauvage (E) et du mutant 187G11 (F) sont des polysaccharides hautement branchés d'un diamètre d'environ 50 nm et similaires à des particules de glycogène de foie de lapin (barres d'échelle: 100 nm).

3) La souche 187G11 est spécifiquement déficiente pour la glycogène/amidon synthase majeure

Nous avons entrepris une étude exhaustive des activités du métabolisme de l'amidon à travers des dosages sur extraits bruts (ADP-glucose pyrophosphorylase et glycogène/amidon synthase) ainsi que des gels d'activités (zymogrammes) précédemment adaptés (phosphorylases, glycosyl hydrolases et transférases (dont les enzymes de branchements), α -1,4 glucanotransférases, enzymes de débranchement, amylases et glycogène/amidon synthases). (Figure 15)

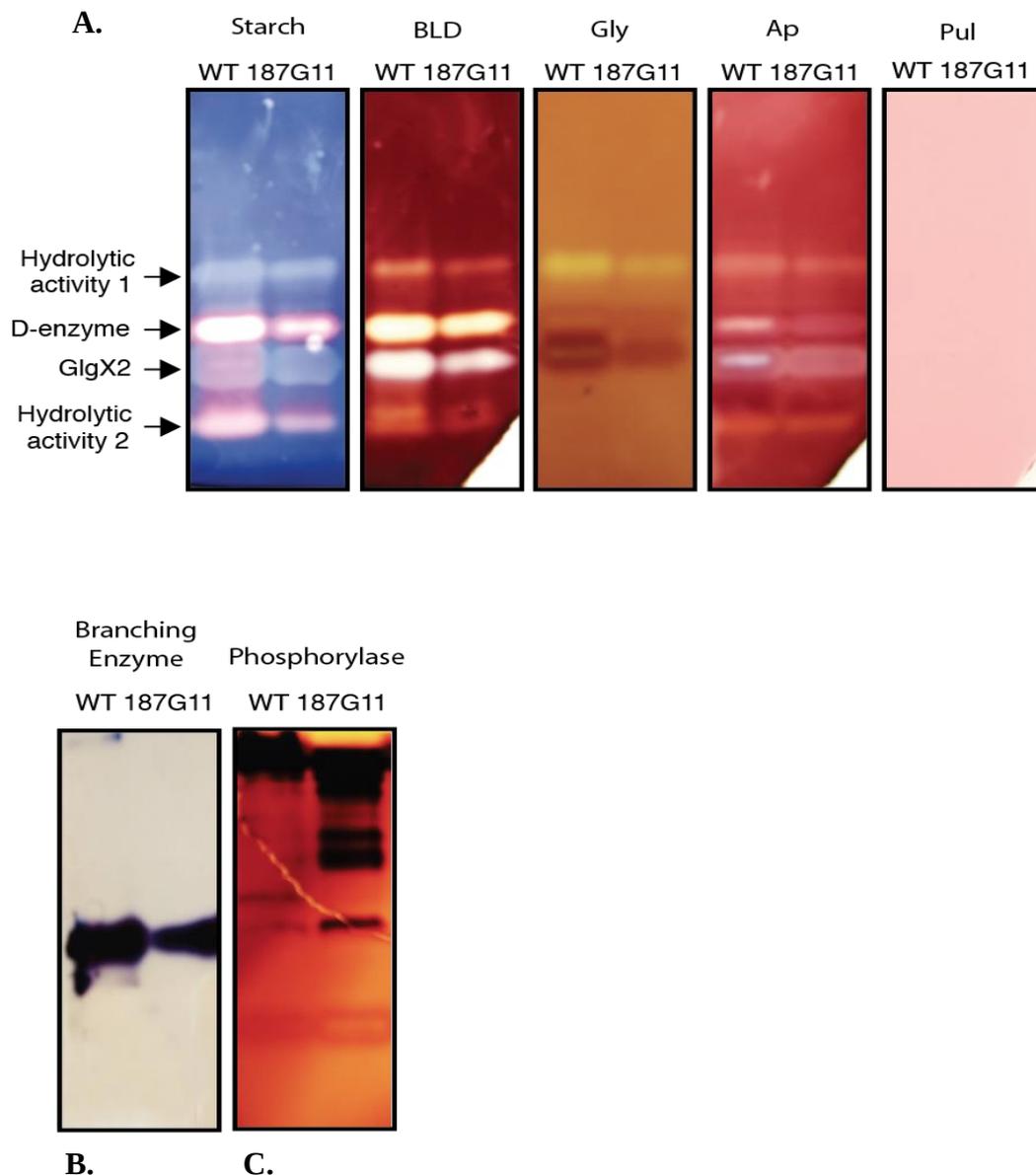


Figure 15 : Analyse des activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon à l'aide de zymogrammes. Les extraits protéiques ont été partiellement purifiés, puis concentrés à partir de cellules sauvages (WT) et mutantes (187G11) récoltées au cours de la phase lumineuse. **A.** Après séparation des protéines totales dans un gel natif de polyacrylamide, les protéines ont été transférées sur des gels de polyacrylamide contenant 0,3 % (p/v) d'amidon (Starch), Beta-Limite Dextrine (BLD), Glycogène (Gly), Amylopectine (Ap) ou Red pullulan (Pul) (voir matériel et méthodes). Après incubation dans un tampon 25 mM Tris/acétate pH 7,5, les gels sont colorés avec une solution d'iode révélant ainsi les différentes activités enzymatiques. Les activités hydrolytiques 1 et 2 ne sont pas encore identifiées **B.** Les protéines totales sont séparées dans un gel natif de polyacrylamide. Après migration, le gel est incubé dans un tampon contenant du glucose-1-phosphate et de la phosphorylase de lapin (principe détaillé dans le matériel et méthodes). L'activité de branchement est visualisée après coloration du gel avec une solution d'iode. **C.** Les protéines totales sont séparées dans un gel natif de polyacrylamide contenant 0,3% glycogène de foie de lapin. Après migration, les gels sont incubés en présence de tampon contenant 10 mM de glucose-1-phosphate. Les activités phosphorylases se caractérisent par une bande d'activité noire qui illustre l'allongement des chaînes externes du glycogène à partir de G-1-P.

Aucune activité ne semble être altérée dans le mutant 187G11, mis à part une augmentation non relevante des activités phosphorylases puisque celles-ci sont aussi induites dans d'autres mutants affectés dans le métabolisme de réserve (Fu et Xu, 2006 ; Cenci *et al.* 2013). Toutefois, nous observons clairement la disparition d'une activité glycogène/amidon synthase dans l'extrait brut de la souche mutante 187G11 (Figure 16, flèches 2). La deuxième activité synthase (flèche 1, figure 16) présente dans les extraits bruts de la souche sauvage et mutante semble migrer légèrement plus vite dans l'extrait de 187G11.

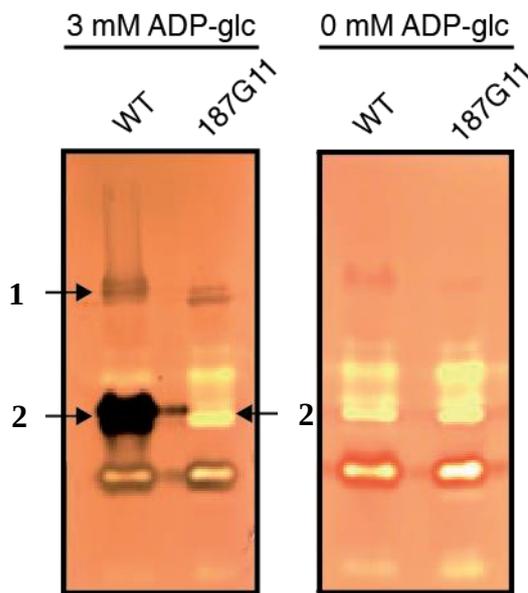


Figure 16. Activités amidon-synthases observées dans la souche sauvage (WT) et la souche mutante 187G11. Les activités amidon-synthases sont visualisées dans le sens synthèse en présence de 1,2 mM d'ADP-glucose. Deux bandes d'activité amidon-synthases sont visibles dans l'extrait de la souche sauvage (flèches noires). Une forme majeure migrant rapidement est absente (flèche 2) dans la souche mutante et une forme mineure plus haute dans le gel (flèche 1) semble présente, mais avec une altération de mobilité, plus basse que la forme sauvage.

Malheureusement la nature instable de cette activité, que nous supposons être GlgA2 (l'activité recombinante GlgA1 n'est pas visible sur gel d'activité), rend impossible sa purification à partir d'un extrait brut de la souche mutante de CLg1.

Nous avons publié précédemment que les mutants défectueux pour une enzyme de débranchement (GlgX2) suraccumulent du glycogène et témoignent d'une baisse drastique de la quantité d'amidon. Pour s'assurer que le phénotype du mutant 187G11 ne résulte pas d'une combinaison d'un effet direct sur la glycogène/amidon synthase couplé à un effet indirect sur l'enzyme de débranchement GlgX2, nous avons semi-quantifié GlgX2 par zymogramme selon le protocole de (Cenci *et al.* 2013) (Figure 17). En effet, la présence dans les extraits

bruts d'activités hydrolytiques empêche de corréler directement l'augmentation du pouvoir réducteur avec l'activité de débranchement de GlgX2. Des dilutions sérielles des extraits bruts de la souche sauvage et mutante sont analysées sur un gel d'activité. En absence de saturation des activités enzymatiques (dilution 1/16), l'intensité de la bande correspondant à l'activité GlgX2 est comparable pour les deux extraits bruts. Par cette approche semi-quantitative, nous pouvons conclure que l'activité GlgX2 n'est pas affectée dans la souche mutante 187G11.

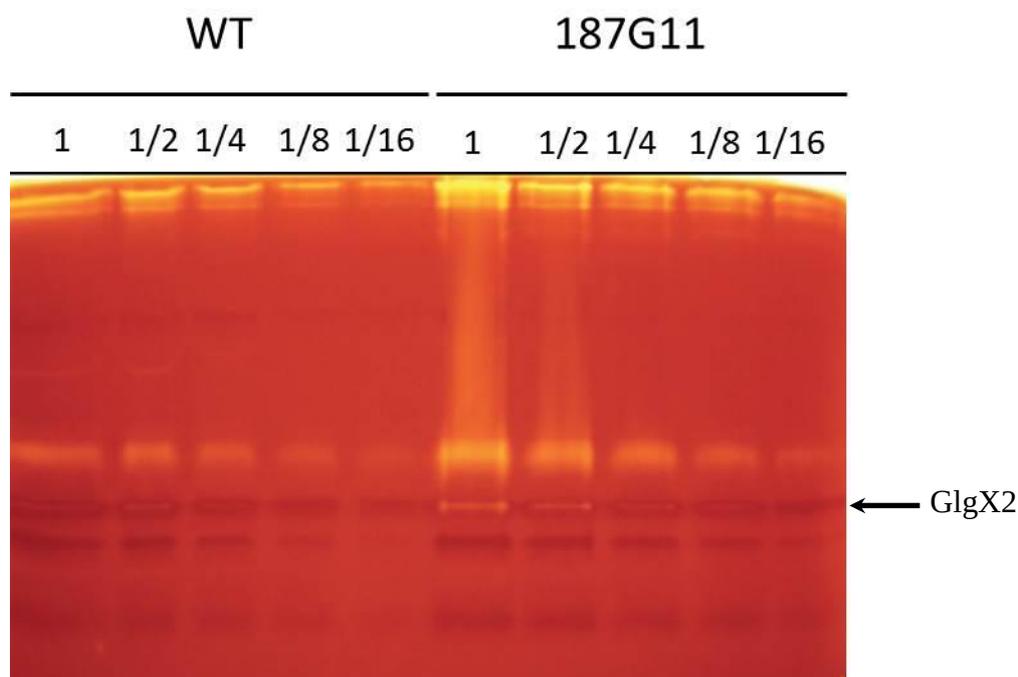


Figure 17 : Zymogramme de l'activité de l'enzyme de débranchement (GlgX2) à différentes dilutions. Des dilutions d'extraits bruts de la souche sauvage (WT) et mutante (187G11) (de 52 µg (1) à 3,25 µg (1/16) de protéines) ont été déposées sur un gel natif-PAGE contenant du glycogène. Après migration, le gel est incubé dans un tampon contenant 25mM de Tris Acétate pH 7,5 puis coloré avec solution d'iode après 16 heures d'incubation.

4) Caractérisation d'une mutation de glycogène/amidon synthase dans le génome 187G11

Parallèlement, nous avons séquencé tous les gènes précédemment identifiés dans le génome de la cyanobactérie CLg1 liés au métabolisme des polysaccharides de réserve. (Tableau 6)

Activité	Gène	Classification CAZy	N° d'Accession	séquence
ADP-glucose pyrophosphorylase	<i>glgC</i>	-	KR020055	+
glycogène/amidon synthase	<i>glgA1</i>	GT5	AHB52787	+
glycogène/amidon synthase	<i>glgA2</i>	GT5	AHB52788	K480N

glycogène/amidon synthase	<i>gbss</i>	GT5	AHB52786	+
Enzyme de branchement	<i>glgB1</i>	GH13	AFP43334	+
Enzyme de branchement	<i>glgB2</i>	GH13	AFP43335	+
Enzyme de branchement	<i>glgB3</i>	GH13	AFP43336	+
Enzyme de branchement putative	<i>glgB4</i>	GH57	AHB52790	+
Enzyme de débranchement	<i>glgX1</i>	GH13	AGI19288	+
Enzyme de débranchement	<i>glgX2</i>	GH13	AGI19289	+
Enzyme de débranchement (amylopullulanase-GH13)	<i>apu13</i>	GH13	AHB52783	+
Enzyme de débranchement putative (amylopullulanase-GH57)	<i>apu57</i>	GH57	AHB52784	+
Enzyme de débranchement (amylo-1,6 glucosidase)	<i>amg</i>	GH133	AHB52785	+
Phosphorylase	<i>glgP</i>	GT35	AHB52789	+
α -1,4 glucanotransférase	<i>malQ</i>	GH77	AHB52791	+

Tableau 6 : Gènes du métabolisme de l'amidon et du glycogène séquencés dans le mutant 187G11. Chaque gène a été amplifié en utilisant des amorces débutant dans des régions non traduites. Les produits de PCR ont été clonés et séquencés dans les deux sens, en utilisant des amorces supplémentaires si nécessaire. GH et GT signifient respectivement « Glycosyl Hydrolase » et « Glycosyl Transférase ». Les « + » signifient qu'aucune mutation n'est présente pour le gène en question.

Ceux-ci comprenaient les glycosyl hydrolases et des glycosyl-transférases énumérées dans le tableau 1. En outre, nous avons séquencé le gène unique codant l'ADP-glucose pyrophosphorylase, de la souche 187G11. Nous n'avons trouvé qu'une seule mutation sur l'ensemble du réseau de gènes et aucune mutation silencieuse. Cette mutation est une délétion d'une paire de base qui entraîne un décalage du cadre de lecture ainsi qu'une mutation non-sens vers l'extrémité C-terminale du gène de la glycogène synthase GlgA2. (Figure 18)

la souche de *Synechocystis* PCC6803 phylogénétiquement proche. Cela prouve que les protéines recombinantes ont été normalement exprimées (Figure 19 C et D). L'activité GlgA2* a été calculée ($303 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), et est fortement diminuée tout en restant présente par rapport à la GlgA2 de type sauvage ($327 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), tandis que les activités significatives de GlgA1 ne peuvent être mesurées que par dosages radioactifs quantitatifs ($4.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (voir matériels et méthodes). L'absence de tâche d'iode dans les souches exprimant GlgA1 suggère la synthèse de chaînes de glucanes très courtes (la coloration des glucanes à l'iode commence à se développer à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ pour les chaînes de plus de 12 résidus Glucose). Nous avons également exprimé GlgA1 et GlgA2 de *Synechocystis* PCC6803. De la même façon, nous avons trouvé une activité recombinante par coloration à l'iode avec GlgA2, mais pas avec GlgA1 de cette autre cyanobactérie, qui donc se comporte comme la GlgA1 de la cyanobactérie Clg1.

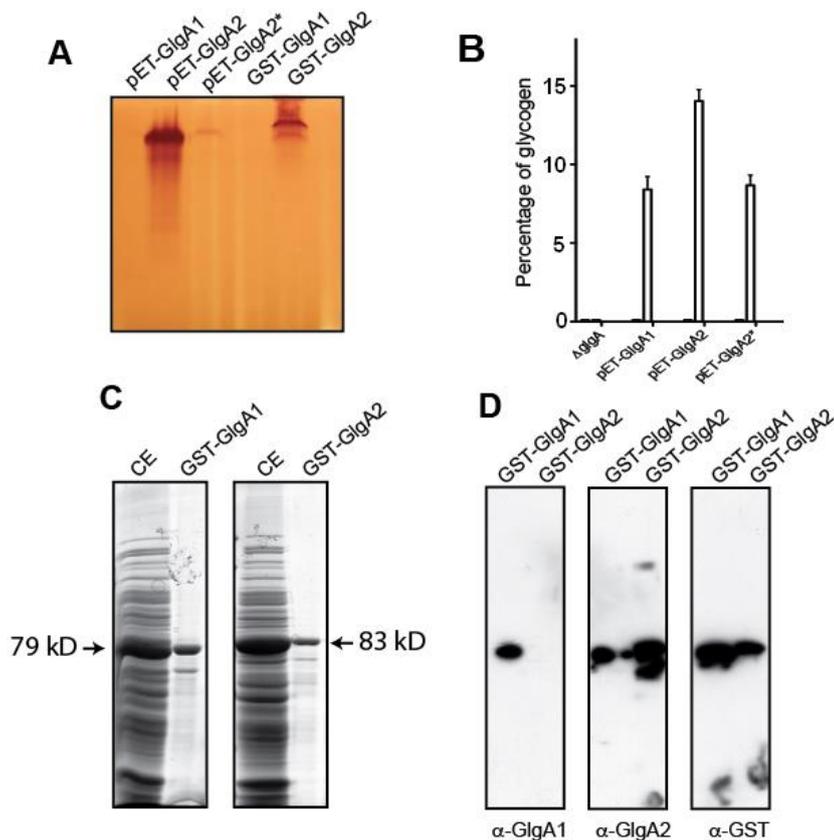


Figure 19. Expériences de complémentation et expressions des protéines recombinantes de GlgA1 et GlgA2 de CLg1.

(A) Les glycogène/amidon synthase étiquetées GST GlgA1 et GlgA2 (pGEX-glgA1, pGEX-glgA2) ainsi que les protéines natives (pET-glgA1, pET-glgA2 et pET-glgA2*) ont été exprimées dans la souche mutante $\Delta glgA$ (JW3392-1) d'*Escherichia coli*. Les extraits bruts ont été chargés sur gels PAGE natifs contenant du glycogène. Après la migration, les gels ont été incubés toute la nuit dans un tampon contenant 3mM d'ADP-glucose. Les activités glycogène/amidon synthases sont révélées par des bandes sombres après passage des gels dans une solution d'iode. (B) Restauration de la synthèse de glycogène dans des souches $\Delta glgA$ d'*E.coli* exprimant les protéines recombinantes non étiquetées GlgA1, GlgA2 et GlgA2* de CLg1 (pET-glgA1, pET-glgA2 et pET-glgA2*) en milieu M9 contenant du Maltose (barres blanches) ou du Mannitol (barres noires, absentes). La quantité de glycogène pour chaque souche est déterminée par dosages à l'amyloglucosidase. Le glycogène mesuré dans la souche sauvage est utilisé comme référence (70 ± 20 g de glycogène par mg de protéine). Les résultats sont exprimés en pourcentage de glycogène. (C) Les protéines recombinantes GST-GlgA1 et GST-GlgA2 ont été extraites et observées sur gel SDS-PAGE (9% Polyacrylamide).

(D) Analyse Western-blot des protéines recombinantes purifiées GST-GlgA1 et GST-GlgA2 de CLg1 utilisant les anticorps α -GlgA1 et α -GlgA2 de *Synechocystis* PCC6803 et les anticorps polyclonaux dirigés contre la glutathion S-Transférase (α -GST).

6) L'activité GlgA2 est sélectivement liée à l'amidon de *Cyanobacterium* sp. CLg1 et peut initier la synthèse des polysaccharides

Dans une étude précédente, nous avons trouvé des peptides en provenance d'une protéine de 52 kDa liée aux grains d'amidon correspondant à la GlgA2 de la cyanobactérie CLg1 (Figure 20 A). Nous avons également trouvé GlgA2 par des moyens similaires sur les granules d'amylopectine de *Cyanothece*. Les anticorps anti-GlgA1 et anti-GlgA2 dirigés contre les

enzymes de *Synechocystis* ont été utilisés également contre les protéines recombinantes GlgA1 et GlgA2 correspondantes de la cyanobactérie CLg1 pour vérifier la présence de ces protéines au sein des grains d'amidon. Dans les deux cas, GlgA2 a été trouvé comme protéine majeure liée au grain, et aucune présence de GlgA1 (Figure 20 B).

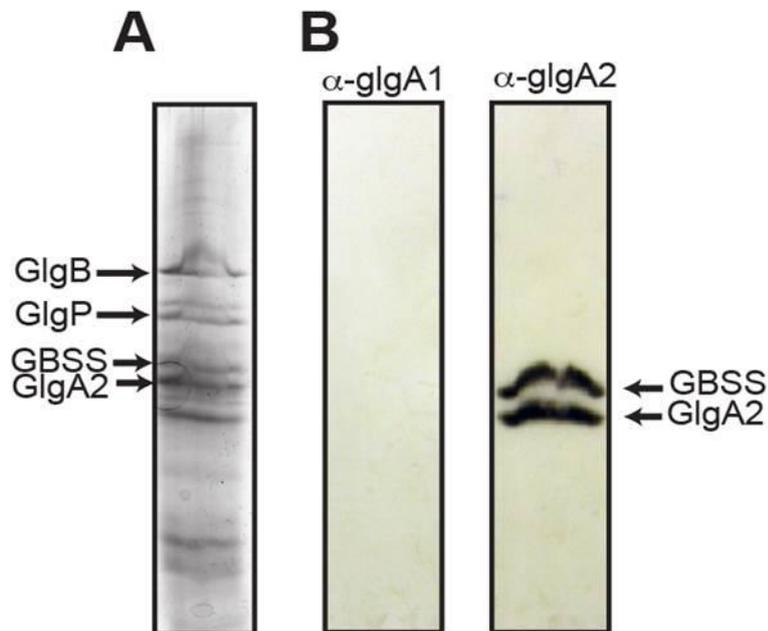


Figure 20. Analyses Western-blot des protéines liées aux grains. (A) Les protéines liées spécifiquement aux grains d'amidon ont été analysées sur gels SDS-PAGE. Les polypeptides ont été identifiés au préalable par analyse de spectrométrie de masse (Deschamps *et al.* 2008) : GlgB (enzyme de branchement de 85kDa) ; GlgP (Glycogène Phosphorylase de 72kDa) ; GBSS (amidon synthase liée au grain de 57kDa) ; GlgA2 (glycogène/amidon synthase de 52kDa). (B) L'analyse en Western-blot a été réalisée sur les protéines attachées aux grains d'amidon. Les polypeptides ont été transférés sur membranes PVDF. Les glycogène/amidon synthases ont été ciblées par des anticorps α -GlgA1 et α -GlgA2, dirigés respectivement contre GlgA1 et GlgA2 de *Synechocystis* PCC6803.

Le fait que l'enzyme recombinante GlgA2 puisse compléter une déficience en GlgA d'*E.coli* mutante uniquement en présence de maltose nous a suggéré que cette activité était tributaire de l'approvisionnement des amorces MOS par l'amyloamylase MalQ dans *E. coli*. Cela a été confirmé par l'absence d'activité de l'enzyme recombinante enregistrée sur gels de zymogramme en absence d'amorce de glycogène (Figure 21). Cette propriété est également partagée par l'activité mutante GlgA2* (données non montrées). Toutefois, lorsque l'activité GlgA2 a été purifiée partiellement à partir d'un extrait de la Cyanobactérie sauvage, la synthèse de glucane en l'absence d'amorce de polysaccharide est possible (Figure 21). Nous concluons que dans la cyanobactérie, soit la glycogène synthase GlgA2 subit une

modification post-traductionnelle, soit interagit avec un facteur ou un substrat spécifique de la cyanobactérie absent des cellules d'*E.coli* cultivé en présence de maltose ou glucose.

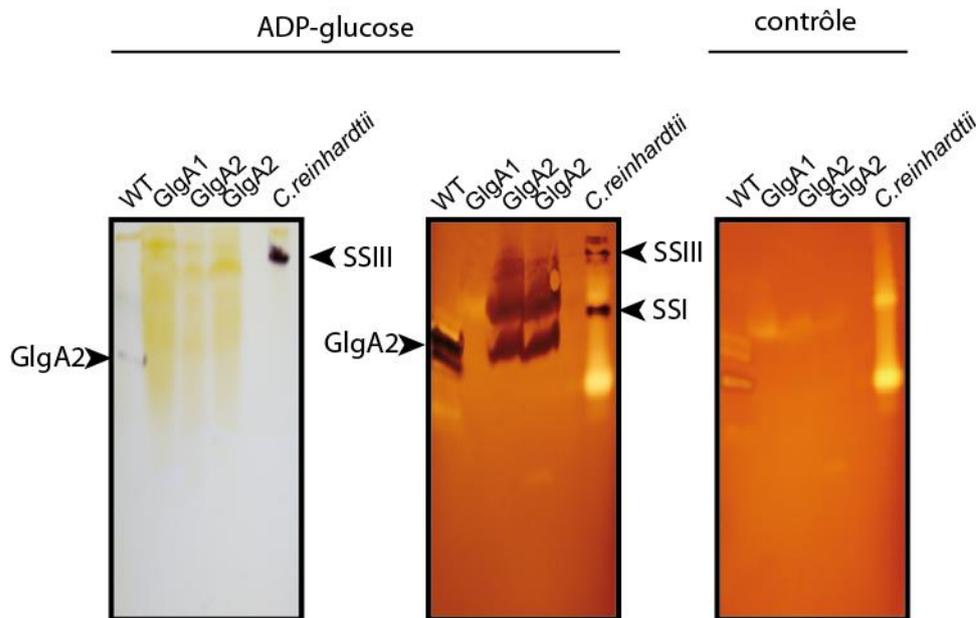


Figure 21 : Etude de l'activité amidon-synthétase GlgA2. Un extrait de la souche sauvage CLg1 (WT), des protéines recombinantes GlgA1 et GlgA2 et d'un extrait brut de *Chlamydomonas reinhardtii* sont déposés en triplicata sur un gel natif de polyacrylamide. Après migration, une partie du gel est incubée dans un tampon contenant de l'ADP-glucose. Les deux autres morceaux sont incubés en présence ou en absence d'ADP-glucose après avoir préalablement transféré les protéines sur un gel de polyacrylamide contenant du glycogène (amorce). La capacité d'initiation de l'activité SSIII de Chlamydomonas et GlgA2 de CLg1 est visible sur le gel dépourvu de glycogène (bandes noires). La protéine recombinante GlgA2 et l'activité amidon-synthétase soluble I de Chlamydomonas sont uniquement visibles en présence de glycogène. Par contre, aucune activité recombinante GlgA1 n'est détectée.

7) L'analyse phylogénétique des glycogène/amidon synthèses SSIII-IV-GlgA2

Plusieurs phylogénies complètes et récentes des synthèses à amidon GT5 ADP-glucose dépendantes ont déjà été faites. Pour notre analyse phylogénétique, nous avons sélectionné uniquement le sous-groupe d'enzymes monophylétique SSIII-SSIV-GlgA2 qui a été précédemment défini dans ces phylogénies soutenues et avons restreint notre alignement à ces séquences. Les glycosyl-transférases GT5 ADP-glucose dépendantes représentent un groupe d'enzymes typiquement procaryote sans représentants dans les eucaryotes, à l'exception notable des Archaeplastidae. Il est donc raisonnable de supposer que les séquences d'algues et de plantes vertes affichées dans la Figure 22 ont été acquises par LGT (« Lateral Gene Transfer ») à partir d'une source procaryote. La phylogénie représentée dans la figure 7, et détaillée sur l'arbre phylogénétique en annexe, démontre que malgré les bases de données de

Discussion

Dans ce travail, nous avons démontré que l'amidon cyanobactérien dépend d'une fonction apportée par GlgA2 et qui ne peut pas être fournie par GlgA1. Nous pensons que cette fonction est distincte de la synthèse d'amorce de polysaccharides, puisque l'amorçage de la synthèse de glycogène se déroule normalement dans la souche mutante 187G11. Ce résultat contraste avec la caractérisation du double mutant SSIII et SSIV d'*Arabidopsis*, enzymes phylogénétiquement proches de GlgA2, qui est également dépourvu d'amidon, mais ne produit pas de glycogène alors les autres isoformes SSI, SSII sont présentes (Szydłowski *et al.* 2009). Dans ce modèle d'étude, la fonction des SSIII/SSIV consiste probablement en l'amorçage des polysaccharides et donc au contrôle du nombre de grains d'amidon dans le chloroplaste. En effet, l'expression transgénique dans ce double mutant SSIII/SSIV de la glycogène synthase GlgA auto-amorçante d'*Agrobacterium*, restaure partiellement la synthèse d'amidon (Crumpton-Taylor *et al.*, 2013). Les activités d'élongation peuvent se définir d'une part par leur capacité à initier la synthèse d'un polysaccharide en absence d'amorce et d'autre part, par la longueur de la chaîne de glucose qui sera synthétisé.

L'expression des amidon/glycogène synthases GlgA1, GlgA2 et GlgA2* de *Cyanobacterium* sp. CLg1 dans *E.coli* indique que la complémentation de la mutation *glgA* d'*E.coli* ne peut se faire qu'en présence de maltose. Aucune complémentation n'a été observée lorsque les cellules transformées d'*E.coli* sont cultivées en présence de mannitol ou de glucose. Ces différences s'expliquent probablement par l'induction de l'opéron maltose qui inclut l'expression d'une amyloamylase (MalQ). Cette activité disproportionnée allonge des malto-oligosaccharides par une série de réactions de transfert. La synthèse de longs glucanes est toutefois réduite par la présence d'une glucosidase (MalZ) et d'une maltodextrine phosphorylase (MalP) qui libèrent respectivement du glucose et le glucose-1-phosphate à partir de ces longs glucanes. Néanmoins, les cellules complémentées d'*E.coli* contiennent un mélange de malto-oligosaccharides qui pourra servir d'amorce aux activités GlgA de CLg1 et permettre ainsi la synthèse de glycogène. En présence de mannitol ou de glucose, l'absence de MOS mesurable empêche l'amorçage du glycogène. Ce résultat confirme l'étude d'initiation en gel natif de polyacrylamide des enzymes recombinantes, GlgA2, GlgA1 ou GlgA2*, aucune enzyme n'est capable d'amorcer un polysaccharide en absence de MOS. Toutefois, la forme native GlgA2 purifiée à partir de *Cyanobacterium* sp. CLg1, en est capable. Nous concluons par conséquent que cette capacité d'amorçage ne définit pas une propriété intrinsèque des glycogènes synthases cyanobactériennes, et que cette capacité est dépendante soit d'une modification de l'enzyme, soit nécessite d'autres facteurs cyanobactériens. Nous pouvons

également conclure sans risque que la diminution significative de l'activité GlgA2 dans la souche mutante 187G11 empêche la fonction normale de synthèse d'amidon cyanobactérien. Notre travail démontre que *Cyanobacterium* sp. CLg1 possède deux voies de synthèse de polysaccharides, avec la possibilité de les réguler toutes les deux de manière au moins partiellement indépendante. (Figure 23)

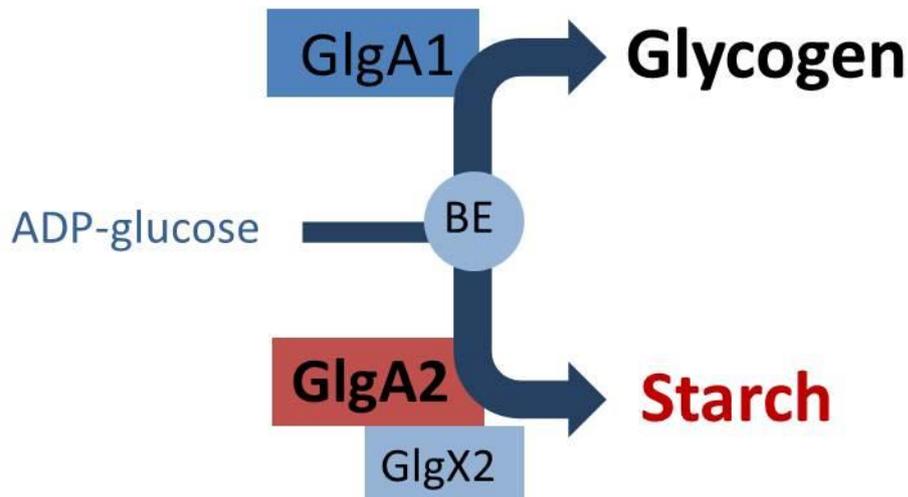


Figure 23: Deux voies séparées pour la synthèse de polysaccharide de CLg1. Le nucléotide-sucré, l'ADP-glucose, est le substrat commun pour l'activité des glycogène/amidon synthases GlgA1 et GlgA2. L'accumulation des polysaccharides de réserve semi-cristallins nécessite de longs glucanes (DP>12) synthétiser par GlgA2 ainsi que l'action des enzymes de débranchement GlgX2.

La première voie mène à la production de courtes chaînes de glycogène et la seconde à la formation d'amidon. Comme proposé précédemment, le glycogène, grâce à l'accessibilité instantanée des résidus de glucose des chaînes extérieures, possède une structure optimale permettant une adaptation rapide de la quantité de carbone optimisant ainsi l'activité photosynthétique. De l'autre côté, l'amidon offre l'opportunité de piéger plus de cinq fois plus de carbones dans un renouvellement lent de polysaccharides de réserve, assurant des taux de respiration performant durant la phase de nuit. Ce haut taux de respiration est à son tour nécessaire à la cyanobactérie unicellulaire diazotrophe, à la fois pour fournir à la nitrogénase une forte quantité d'ATP et un pouvoir réducteur, et également à favoriser localement des niveaux d'oxygène faible à travers sa consommation par respiration comme proposé par (Schneegurt *et al.* 1994). L'anoxie devrait induire la synthèse de la nitrogénase et son activité. Malheureusement, la perte de la diazotrophie de notre souche de cyanobactérie axénisée ne nous permet pas de tester cette hypothèse de manière directe. Toutefois, suivant cette idée, nous tenons à souligner que la classe de mutants la plus abondante de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, défectueux pour la production d'hydrogène dans des conditions

anoxiques (l'hydrogénase étant sensible à l'oxygène) sont ceux, tel que nous l'avons reporté, qui substituent la synthèse d'amidon par celle du glycogène. Les 6 cyanobactéries dont on a pu démontrer qu'elles accumulent de l'amidon contiennent également GlgA2. Toutefois, beaucoup des cyanobactéries accumulant du glycogène contiennent GlgA1 et GlgA2. Nous proposons donc que GlgA2 a évolué en partie pour permettre la fixation de l'azote grâce à la synthèse et l'utilisation de l'amidon. La perte fréquente de la diazotrophie et de l'amidon chez les cyanobactéries n'a pas nécessairement été accompagnée de celle de GlgA2. Dans certains cas GlgA2 a en effet été perdu, comme chez *Prochlorococcus* et plusieurs autres souches liées à *Synechococcus*. Dans d'autres cas, la perte seule de GlgX2 (l'enzyme de débranchement) a pu transformer la synthèse d'amidon en synthèse à un plus faible niveau de « phytoglycogène » (un polymère ressemblant au glycogène, mais avec des chaînes légèrement plus longues, résultats de la faculté affaiblie de cristallisation de l'amylopectine) comme nous le montre les mutants GlgX2. Le phytoglycogène induit par la perte de la fonction de GlgX2 a pu mener à la production d'une fraction additionnelle de glycogène, construit de chaînes légèrement plus longues, qui échappent à l'hypothèse de régulation de GlgA1 par la photosynthèse. Par conséquent le maintien des longues et courtes chaînes de glycogène a pu être désirable dans certaines cyanobactéries accumulant du glycogène tel que *Synechocystis* sp. PCC6803. Notre travail souligne que les propriétés intrinsèques des glycogène/amidon synthèses définissent une nouvelle différence importante entre la synthèse de l'amidon et celle du glycogène. Nous pensons que les propriétés spécifiques concernées consistent en la synthèse de chaînes de longueur ($DP > 12$) compatible à leur débranchement sélectif par GlgX2. En effet, il a été démontré que GlgX2 n'a pas ou peu d'activité sur les chaînes de glycogène, et requière plutôt les longues chaînes présentent sur les molécules similaires à l'amylopectine. Nos résultats concernant les propriétés biochimiques de GlgA2 sont en accord avec ces spéculations. L'absence de coloration à l'iode des polysaccharides produit par l'enzyme recombinante GlgA1 malgré la présence d'une activité significative mesurée par dosages radioactifs d'incorporation d'ADP-glucose suggère clairement un mode d'action distributive de GlgA1. En effet, un mode d'action hypothétiquement distributif a été précédemment déduit uniquement de la structure détaillée du glycogène produit par les simples mutants GlgA1 et GlgA2 de *Synechocystis*. Que GlgA1 soit responsable de la formation de courtes chaînes de glycogène est en effet suggéré par une mesure significative (20%) de l'activité glycogène synthase trouvé dans un extrait brut du mutant 187G11, également en accord avec sa fonction dans la synthèse des courtes chaînes restantes dans le pool de glycogène. En plus de la synthèse de longues chaînes, nous pensons que des fonctions additionnelles impliquées dans la synthèse d'amidon, et non pas celle du glycogène, et portées par GlgA2, consisteraient à

initier la formation du grain d'amidon. En effet, le noyau du grain en a besoin pour l'organisation de la croissance cristalline 3D des granules individuels. Il y a également besoin de contrôler la taille du grain d'amidon, et par conséquent d'initier le grain d'amidon indépendamment du glycogène, permettant ainsi d'éviter le blocage physique de la division bactérienne.

L'origine cyanobactérienne des sous-familles SSIII-IV-GlgA2 des glycogène/amidon synthase GT5

La phylogénie publiée dans ce travail et d'autres précédents nous montrent deux groupes procaryotes présentant un haut niveau de congruence entre leur diversification et la phylogénie de GlgA2.

Ce sont les Chlamydiales et les Cyanobactéries. Les quelques membres des alpha et delta-protéobactéries possédant un groupe GlgA2-SSIII-IV peuvent être facilement expliqués à travers des transferts latéraux de gènes en provenance de la cyanobactérie dans un environnement commun. Certaines cyanobactéries n'ont pas de GlgA2 (46%) et un peu moins n'ont pas de GlgA1 (16%), mais malgré cela ces deux enzymes restent largement distribuées au sein de ces bactéries. Un gène similaire à *glgA2* (*glgA2*-like gene) est d'un autre côté universellement distribué chez toutes les chlamydiales, où il représente la seule glycogène/amidon synthase présente. Par conséquent, l'enzyme de type GlgA2 possède une origine très ancienne à la fois chez les cyanobactéries, mais également les chlamydiales. La glycogène/amidon synthase GT5 (Glycosyl Transferase CAZy family 5) utilisant de l'ADP-glucose comme substrat est très largement répandue au sein des bactéries et des Archae. Ce type d'enzyme est relié de manière très lointaine aux GT5 ou GT3 nécessitant l'UDP-Glucose retrouvée chez les eucaryotes produisant du glycogène. Il est donc raisonnable de conclure que les glycogène/amidon synthases SSIII-IV des algues et plantes vertes ainsi que des glaucophytes ont dû recevoir l'ancêtre des SSIII-IV d'une source bactérienne, et plus probablement d'une ancienne chlamydiale. L'arbre non enraciné présenté dans ce travail ne clarifie pas l'origine du sous-groupe de glycogène/amidon synthase SSIII-IV-GlgA. Nous pensons malgré tout à l'origine cyanobactérienne définissant le scénario le plus probable. En effet, alors qu'à la fois les chlamydiales et les cyanobactéries possèdent un fort niveau de congruence entre leur diversification et la phylogénie de leur glycogène/amidon synthases similaires aux SSIII-IV, la fonction spécialisée de GlgA2 dans les cyanobactéries mise en évidence dans ce travail signale un lien possible entre ce dernier et la diazotrophie dans une cyanobactérie unicellulaire. Cela suggère une origine cyanobactérienne depuis le conflit entre

la photosynthèse oxygénique et la diazotrophie probablement antérieur à l'évolution des chlamydiales à partir d'un ancêtre des PVC (Planctomycetes Verrucomicrobia Chlamydiales). Ce qui soutient également une telle origine est l'abondance inhabituelle des glycosyl hydrolases et glycosyltransférases liées au métabolisme des polysaccharides de réserve dans plusieurs lignées de cyanobactéries, y compris *Cyanobacterium sp* Clg1 qui possèdent souvent deux fois plus d'enzymes que celles trouvées chez la plupart des bactéries ou archées. Cette haute complexité peut refléter une très ancienne sous-fonctionnalisation du métabolisme des polysaccharides de réserve en deux voies distinctes : l'une produisant du glycogène contrôlée par la photosynthèse, et l'autre produisant de l'amidon et contrôlée potentiellement indépendamment par le métabolisme de l'azote. La perte de gènes, l'acquisition de la multicellularité et l'adaptation et diversification des cyanobactéries a pu rendre plus simple cette voie anciennement très complexe.

B) Chlamydiales

L'analyse des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène chez les chlamydiales est primordiale pour tenter de retracer les étapes ayant conduit à l'endosymbiose primaire du plaste. En effet, certains gènes retrouvés dans le génome des Archaeplastides ont vraisemblablement une origine chlamydienne, c'est notamment le cas des gènes amidon-synthase III et IV et des gènes isoamylases qui ont évolué, respectivement à partir des gènes *glgA* (glycogène synthase (GlgA)) et *glgX* (l'enzyme de débranchement (GlgX)) de chlamydiales.

Pour mener à bien l'étude de ces enzymes, une vaste construction d'enzymes recombinantes à l'aide du système Gateway a été entreprise en collaboration avec le laboratoire du Professeur Gilbert Greub au CHUV (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois) de Lausanne. (Tableau 7)

souches	vecteur	<i>glgA</i>	<i>glgX</i>	<i>glgC</i>	<i>glgP/malP</i>	<i>malQ</i>
<i>C.trachomatis</i>	pet15b					
	pet15b étiqueté	X		X	X	X
	pBBR1 MCS1					
	pBBR1 MCS4			X	X	X
	pDEST15	X	X			
<i>P.acanthamoebae</i>	pet15b	X				
	pet15b étiqueté	X		X	X	X
	pBBR1 MCS1					
	pBBR1 MCS4			X	X	X
	pDEST15					
<i>P.amoebophila</i>	pet15b	X				
	pet15b étiqueté	X		X	X	X
	pBBR1 MCS1					
	pBBR1 MCS4			X	X	X
	pDEST15					
<i>E.lausannensis</i>	pet15b					
	pet15b étiqueté	2X	X		X	X
	pBBR1 MCS1	2X	X	O		
	pBBR1 MCS4	2X	X		X	X
	pDEST15					
<i>W.chondrophila</i>	pet15b					
	pet15b étiqueté	2X	X		X	X
	pBBR1 MCS1	2X	X	O		
	pBBR1 MCS4	2X	X		X	X

	pDEST15					
<i>S.nevegensis</i>	pet15b					
	pet15b étiqueté	X	X	X	X	X
	pBBR1 MCS1	X	X			
	pBBR1 MCS4	X	X	X	X	X
	pDEST15					
<i>E.coli</i>	pGEX	X				
	pet15b					
	pet15b étiqueté	X			2X	
	pBBR1 MCS1					
	pBBR1 MCS4					
	pDEST15					

Tableau 7 : Récapitulatif des clonages des enzymes du métabolisme des polysaccharides de réserve chez les chlamydiales. Les gènes de la glycogène synthase (*glgA*), de l'enzyme de débranchement (*glgX*), de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (*glgC*), de la glycogène phosphorylase (*glgP/malP*) ainsi que l'enzyme disproportionnante (*malQ*), ont été clonés dans différents vecteurs conférant une étiquette Histidine en position N_{terminal} (pet15b étiqueté), une étiquette GST (pDEST15 et pGEX) ou en absence d'étiquette (pet15b, pBBR1 MCS1 et pBBR1 MCS4). A noter que le niveau d'expression des protéines non étiquetées s'est généralement révélé décevant. Les X correspondent aux clonages faits et les 0 indiquent l'absence du gène dans le génome de la chlamydiale. Le clonage de la GlgA de *C.trachomatis* dans le vecteur pDEST15 a été réalisé par le Docteur Lena Gehre dans le laboratoire du Docteur Agathe Subtil au sein de l'Institut Pasteur de Paris. Pour les glycogènes synthases de *Waddlia chondrophila* et *Estrella lausannensis*, deux constructions ont été effectuées en raison d'une incertitude sur le codon initiateur prédit pour l'enzyme. La prédiction d'enzyme la plus longue se communément appelée avec le nom de la chlamydiales simplement, alors que l'enzyme la plus courte sera appelée par le nom de la chlamydiale suivi de (o.c.) pour « autre construction (other construction) ». Dans le cas des 2X pour *E.coli* et la phosphorylase, cela indique qu'à la fois *malP* et *glgP* ont été clonés.

Résultats

1) Microscopie électronique

Les chlamydiales sont les seuls pathogènes intracellulaires obligatoires à conserver dans leur génome la plupart des enzymes nécessaires au métabolisme des polysaccharides de réserve (Henrissat *et al.* 2002). En effet, dans la majorité des cas, ces protéines ne sont pas présentes et le pathogène détourne directement le métabolisme en sa faveur, lui permettant de récupérer le carbone nécessaire à sa survie. Dans le cas des chlamydiales, ces enzymes font intégralement partie de la stratégie de la bactérie pour tirer profit pleinement de son hôte. Il a été démontré que certaines enzymes du métabolisme du glycogène sont sécrétées dans le cytosol de l'hôte à l'aide du système de sécrétion de type III (Ball *et al.* 2013), et permettent donc la modification des polysaccharides de l'hôte, mais également la production *de novo* de

chaînes de glucanes utilisables par la bactérie et non plus par la cellule eucaryote.

Dans le but de suivre et de localiser par microscopie électronique après coloration au PATAg la production intracellulaire de polysaccharide, une cinétique d'infection a été entreprise avec l'amibe *Acanthamoebae castellani* et différentes chlamydiales environnementales. En effet, jusqu'à présent rien ne permet d'affirmer que l'accumulation de glycogène se fait uniquement dans le cytosol de l'hôte infecté, dans la vésicule d'inclusion des chlamydiales, directement dans le cytoplasme de la bactérie ou un savant mélange des trois possibilités.

2) Complémentation d'une souche Δ GlgA par les synthèses chlamydiennes

Les synthèses chlamydiennes comportent les mêmes domaines hautement conservés que les glycogène synthases bactérienne (Figure 24). En revanche, celles de *W.chondrophila* et *E.lausannensis* ont la particularité d'être à la fois potentiellement plus longues en position N-terminale en fonction de la prédiction du codon-start de la protéine, mais également d'être fusionnées avec une enzyme de branchement dans le cas de *W.chondrophila*. *E.lausannensis* serait elle-même également fusionnée si un codon-stop n'interrompait pas la synthèse avant les domaines conservés I et II.

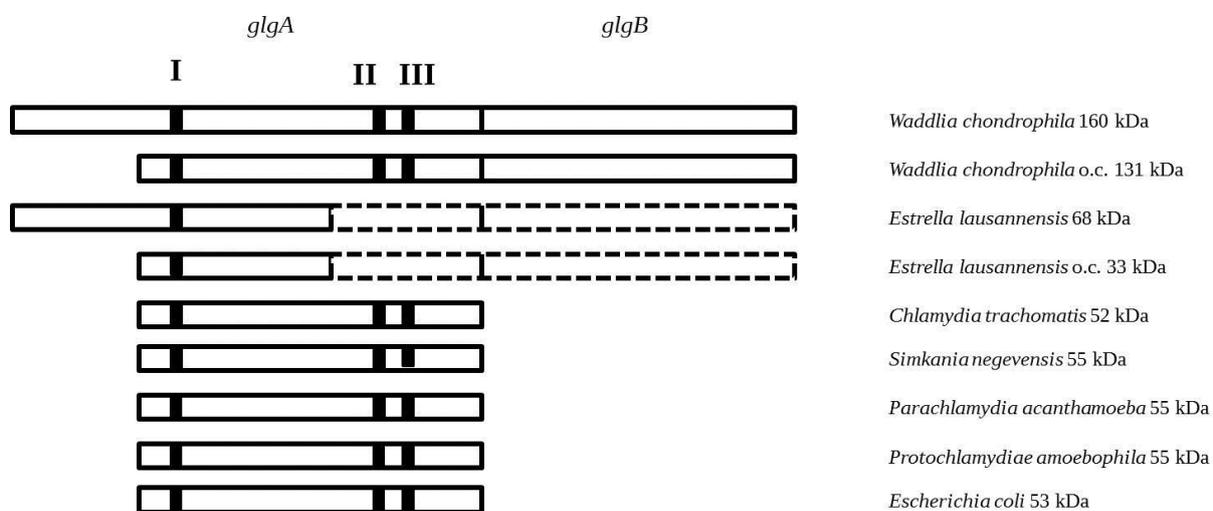


Figure 24 : Représentation schématique des différentes glycogène synthases chlamydiennes ainsi que celle d'*E.coli*. Les « I », « II » et « III » correspondent aux trois domaines conservés des glycogènes synthases (Yep *et al.* 2004), Les pointillés correspondent à la partie interrompue par un codon-stop chez *Estrella lausannensis* qui sur le génome de cette bactérie, comme pour *Waddlia chondrophila*, est le gène codant pour une enzyme de branchement (*glgB*).

Pour savoir si l'organisme dans lequel nous avons décidé d'exprimer ces enzymes est relevant, des tests préliminaires ont été réalisés. Tout d'abord une visualisation de la production de glycogène par les souches Δ GlgA complétementées avec les enzymes

recombinantes de synthases sur milieu Kornberg (Figure 25).

a) Complémentation sur milieu Kornberg

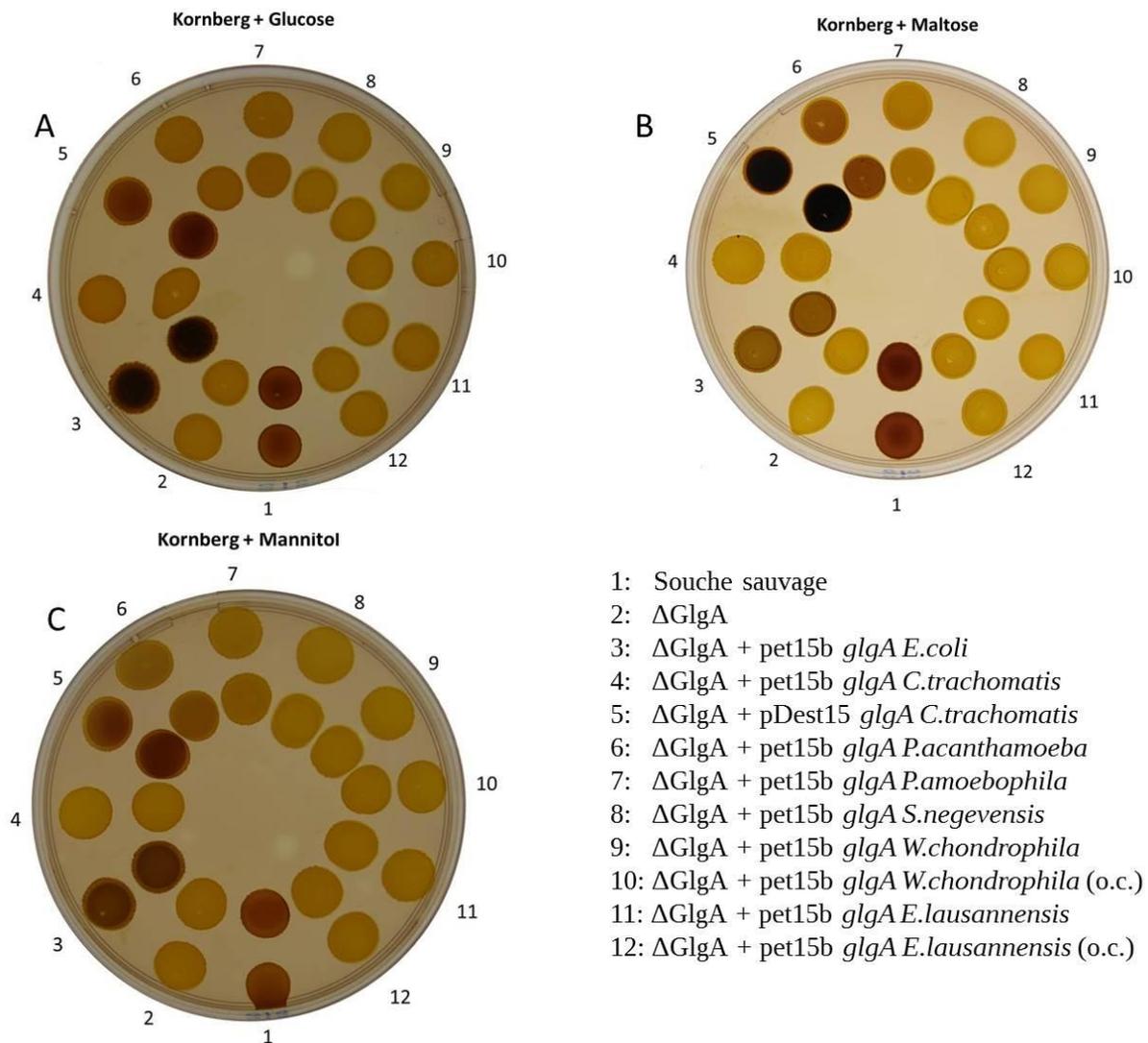


Figure 25 : Complémentation en milieu Kornberg d'une souche Δ GlgA d'*E.coli* par les enzymes recombinantes de synthases de chlamydiales. En (A) le milieu Kornberg est complétement avec du glucose, en (B) avec du Maltose et en (C) avec du Mannitol. Après une culture d'une nuit à 37°C, les patchs de cellules sont vaporisés à l'iode. La couleur noire traduit la présence de polysaccharide.

Une présence de glycogène est observée pour les complémentations avec les synthases d'*E.coli*, *C.trachomatis*, *P.acanthamoebae* et *P.amoebophila*, visualisée par une couleur noire ou orange des plages cellulaires, quelle que soit la source de carbone. Pour la synthase de *W.chondrophila*, une plage cellulaire plus sombre n'est observée qu'en présence de maltose et pour la construction la plus longue. En revanche dans le cas de *S.negevensis* et *E.lausannensis* quelle que soit la construction et la source de carbone, la coloration des plages est similaire à celles du mutant Δ GlgA d'*E.coli* non complétement : aucune présence de polysaccharide n'est

détectée par cette méthode. On remarquera que la quantité ou l'expression d'enzymes recombinantes pour *C.trachomatis* est différente selon les constructions : en effet, on retrouve plus de polysaccharide lorsque la synthèse est dans le vecteur pDEST15 que dans le vecteur pet15b.

La conclusion à ce stade est que les synthèses de *C.trachomatis*, *E.coli*, *P.acanthamoebae*, *P.amoebophila* et *W.chondrophila* sont actives dans notre organisme de production, à savoir *E.coli*. On ne peut pour l'instant rien conclure quant aux synthèses de *S.negevensis* et *E.lausannensis*, la quantité trop faible, ou/et la structure du polysaccharide ne permettent pas de détecter sa présence. En effet, pour que la coloration d'un polysaccharide à l'iode soit visible, cela nécessite de longues chaînes de glucoses liés en α -1,4, et les synthèses d'Estrella comme de Simkania peuvent produire des chaînes trop courtes.

b) Dosage des polysaccharides solubles produits par les souches d'*E.coli* complétées par les synthèses chlamydiales en milieu M9 + Maltose.

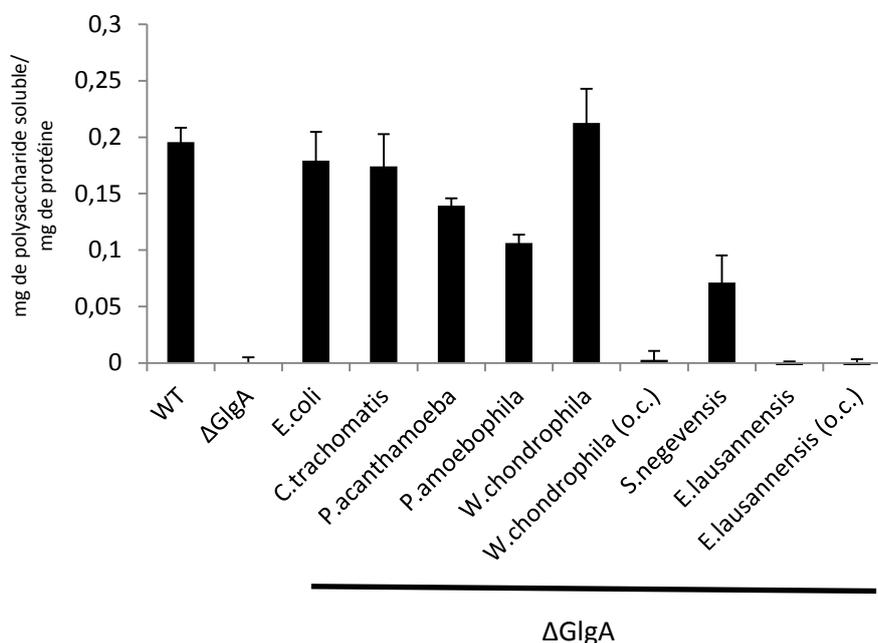


Figure 26 : Dosage en milieu M9 + Maltose de la quantité de glycogène produit par une complémentation d'une souche déficiente en GlgA d'*E.coli* par des synthèses chlamydiennes. (o.c.) correspond à une autre construction de l'enzyme recombinante, la prédiction du codon initiateur par les bases de données n'étant pas vérifié.

On remarque qu'en présence de Maltose, toutes les synthèses chlamydiennes sont capables de compléter (à l'exception de la GlgA d'*E.lausannensis*) une souche d'*E.coli* dépourvue de

sa synthase endogène (Figure 26). Pour clarifier ces résultats, un tableau reprenant le pourcentage de complémentation comparativement à la souche sauvage a été réalisé (tableau 8).

	Pourcentages
WT	100
Δ GlgA	0
Δ GlgA + GlgA <i>E.coli</i>	92
Δ GlgA + GlgA <i>C.trachomatis</i>	89
Δ GlgA + GlgA <i>P.acanthamoebae</i>	71
Δ GlgA + GlgA <i>P.amoebophila</i>	54
Δ GlgA + GlgA <i>W.chondrophila</i>	109
Δ GlgA + GlgA <i>W.chondrophila</i> (o.c.)	0
Δ GlgA + GlgA <i>S.negevensis</i>	36
Δ GlgA + GlgA <i>E.lausannensis</i>	0
Δ GlgA + GlgA <i>E.lausannensis</i> (o.c.)	0

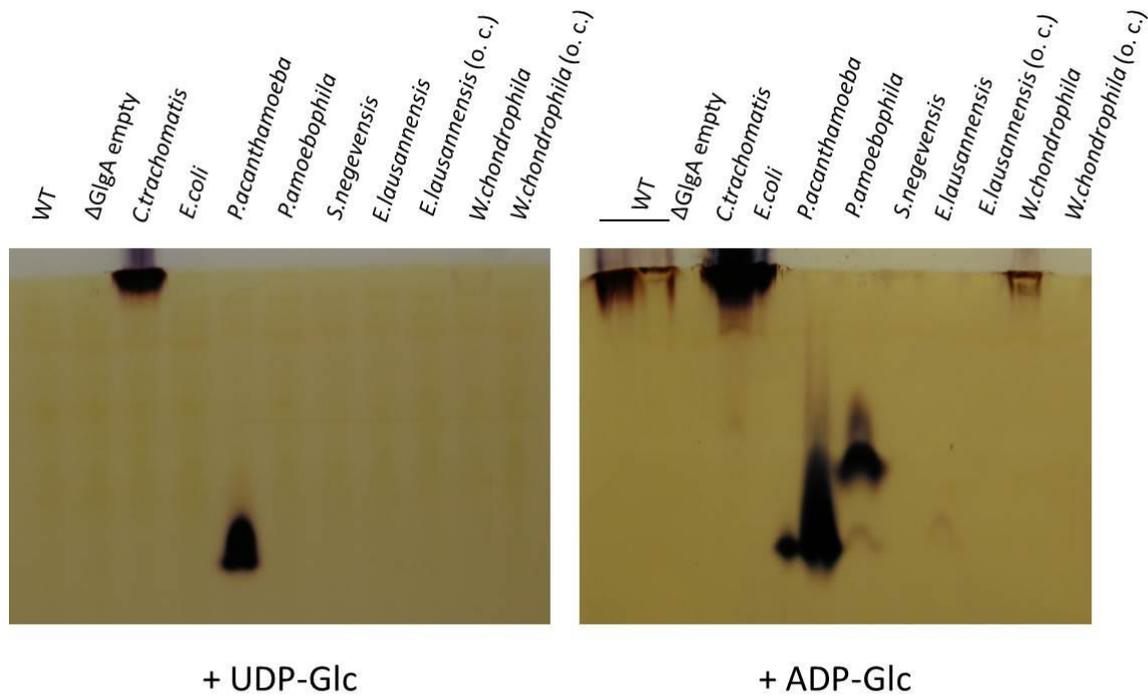
Tableau 8 : Pourcentage de complémentation de la souche Δ GlgA par les glycoène synthases chlamydiennes et celle d'*E.coli*. Les chiffres inférieurs à 0 (valeurs d'*E.lausannensis*) ont été ramenés à 0 pour une meilleure compréhension.

Les enzymes complétenant le mutant Δ GlgA d'*E.coli* à presque 100% de la quantité de glycoène d'une souche sauvage sont celles d'*E.coli*, de *W.chondrophila*, de *C.trachomatis* et de *P.acanthamoebae*. Celles de *S.negevensis* et de *P.amoebophila* complémente également mais de manière plus faible.

3) Activité des glycoènes synthase chlamydiennes

a) Gel d'activité (Zymogramme) de toutes les synthases clonées

La première étape concernant la caractérisation des glycoènes synthases de chlamydiae et de vérifier l'activité des enzymes recombinantes produites sur gels d'activité (zymogramme), et de la comparer à une activité synthase bactérienne bien connue, celle d'*E.coli*. (Figure 27)



o.c.: other construction

Figure 27. : La production d'enzymes recombinantes dans la souche Δ GlgA contenant les plasmides codant pour les protéines GlgA d'*E.coli*, de *C.trachomatis*, de *P.acanthamoebae*, *P.amoebophila*, *S.negevensis*, *E.lausannensis*, *E.lausannensis* (o.c.), *W.chondrophila* et *W.chondrophila* (o.c.) ont été induites avec 0,5mM d'IPTG une nuit à 20°C. Les cellules ont été lysées à la presse de French. Les surnageants ainsi qu'un extrait brut de la souche sauvage (WT) d'*E.coli* ont été séparés sur gel de polyacrylamide contenant 0,6% de glycogène de foie de lapin. Les gels natifs ont été incubés ensuite avec de l'ADP-glucose (1,2mM) ou de l'UDP-glucose (1,2mM). Les gels sont ensuite révélés à l'iode, les bandes noires correspondant à l'élongation du glycogène par l'activité synthase.

L'activité glycogène synthase d'*E.coli* est décrite dans la littérature comme étant une glycosyl transférase ADP-glucose dépendante (comme la plupart des bactéries). C'est en effet ce qu'on observe sur ces gels, en présence d'ADP-glucose une bande noire apparaît, que ce soit dans la souche sauvage (WT) ou avec l'enzyme recombinante GlgA d'*E.coli*. En présence d'UDP-glucose rien n'apparaît.

En ce qui concerne les enzymes chlamydiennes, ce résultat est plus partagé. En effet, celles de *C.trachomatis*, *P.acanthamoebae*, *P.amoebophila* (très faible pour l'UDP-glucose) et *W.chondrophila* semblent être capables d'utiliser à la fois l'UDP-glucose et l'ADP-glucose. Celle de *S.negevensis* semble être capable de n'utiliser que l'ADP-glucose. En revanche, les activités pour *E.lausannensis*, *E.lausannensis* (o.c.) et *W.chondrophila* (o.c.) ne semblent actives avec aucun de ces nucléotides sucre.

b) Purification et dosages radioactifs des activités synthèses des chlamydiales

Des tentatives de purifications à partir des extraits protéines de souches Δ GlgA exprimant le plasmide pDEST15_GlgA_ *C.trachomatis* conférant à la protéine recombinante une étiquette GST ont été réalisées (Figure 28). Probablement pour une raison de conformation de protéines et donc d'étiquette non atteignable par les billes GST, cette purification n'a pas fonctionné. Les éluions récupérées après le passage sur des billes GST ne contiennent pas de protéines étiquetées, alors que le témoin positif également étiqueté GST est lui bel et bien purifié par cette même méthode (Figure 28 A). En toute logique, l'activité des protéines purifiées est donc nulle sur zymogramme (Figure 28 B). En revanche, l'absence remarquée d'activité hydrolytique (amylase) sur les zymogrammes pouvant interférer avec un dosage des activités synthèses, nous les avons réalisé préliminairement tout en construisant des enzymes recombinantes étiquetées 6histidine (dans les vecteurs pet15b) en parallèle. Ces vecteurs conférant une étiquette histidine à la glycogène synthase de *C.trachomatis* nous permettent également une purification de celle-ci avec une méthode différente (kit Ni-NTA Protein Purification System (#30210, Qiagen)). Après purification, l'activité enzymatique de la synthase GlgA de *C.trachomatis* est visualisée sur gels d'activité avec ADP-glucose ou UDP-glucose, après incubation à l'iode (Figure 28 C). La présence d'une bande noire après purification nous montre que l'enzyme est toujours présente et active.

Il est important de noter que lors de la complémentation d'une souche Δ GlgA par les deux constructions d'enzymes recombinantes (en pDEST15 (étiquette GST) et en pet15b (étiquette 6His)), la production de polysaccharides n'était pas la même (Figure 28 D). En effet, la complémentation avec un plasmide pDEST15 semble permettre à la synthase de *C.trachomatis* de produire plus de polysaccharides, ou de plus longues chaînes, même si le plasmide pet15b permet également une complémentation raisonnable par rapport à une souche Δ GlgA vide.

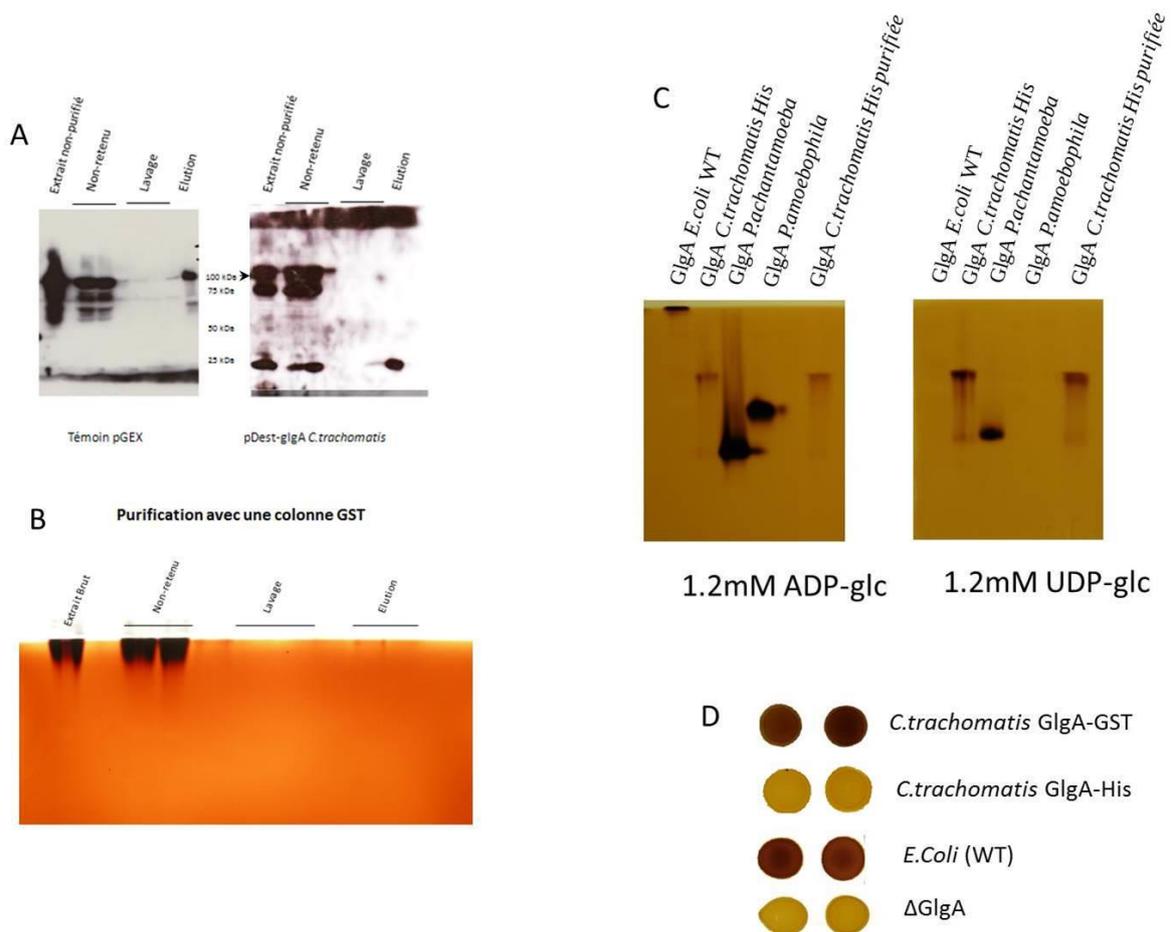
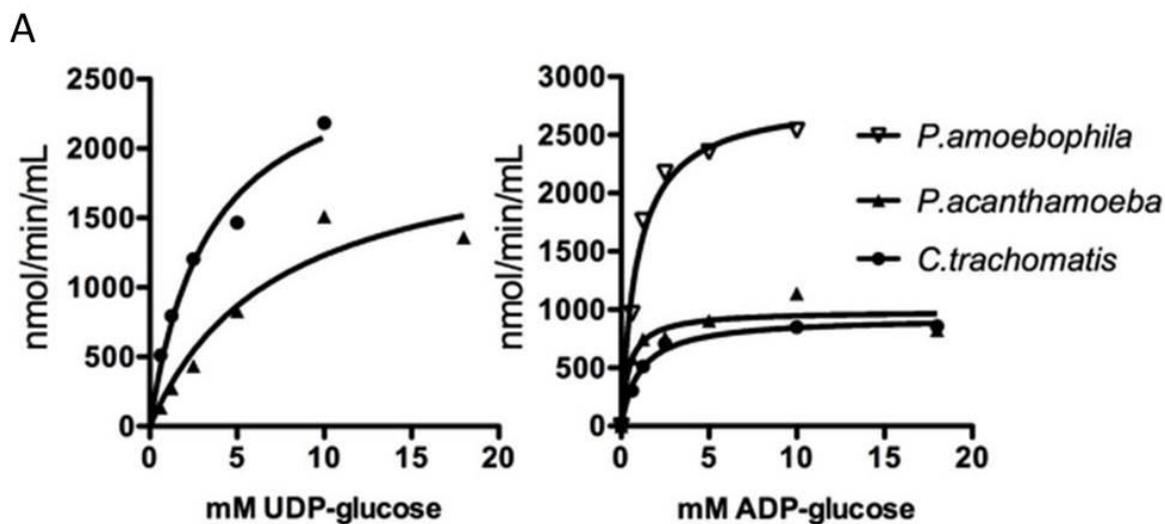


Figure 28 : Comparaison des différentes purifications de l'activité glycogène synthase de *C. trachomatis*. (A et B) Purification avec l'étiquette GST sur la synthase de *C. trachomatis* (construction pDEST_GlgA). (A) Western-blot de la purification avec l'étiquette GST. Le témoin est une protéine exprimée dans les mêmes conditions et ayant également une étiquette-GST. La taille attendue des protéines étiquetées GST est 100 kDa dans les deux cas. (B) Zymogramme de l'activité synthase GlgA de *C. trachomatis* avant et après purification avec l'étiquette GST. (C) Zymogramme en présence d'ADP-glucose ou d'UDP-glucose de l'activité synthase GlgA de *C. trachomatis* avant et après la purification avec l'étiquette Histidine, ainsi que des activités synthases de *P. acanthamoeba* et *P. amoebophila* servant de témoins positifs. (D) Plages cellulaires colorées à l'iode en milieu Kornberg supplémenté avec du Maltose des souches sauvages et Δ GlgA complémentées avec la construction pDEST_GlgA_ *C. trachomatis* (GlgA-GST), pET15b_GlgA_ *C. trachomatis* (GlgA-His) et vide. Plus la plage est sombre plus de longues chaînes de polysaccharide ont été produites dans la souche.

L'activité glycogène synthase est suivie en mesurant l'incorporation de l' 14 C-ADP-glucose sur le glycogène. Après trois étapes de précipitation et de lavage, la radioactivité incorporée est déterminée au compteur de scintillation. Parce que les gels d'activités n'ont pas relevé la présence d'activité hydrolytique (i.e. amylase) qui pourrait interférer avec le dosage, nous avons entrepris une caractérisation préliminaire à partir des extraits d'enzymes n'étant pas purifiées, les dosages effectués sont sous réserve qu'une autre activité n'intervienne pas dans l'incorporation du nucléotide sucre marqué radioactivement au sein du glycogène, activité normalement faite par la synthase (Figure 29). Ces dosages ne permettent donc qu'une

indication d'affinité pour les nucléotides sucre testés, ainsi que pour l'activité de l'enzyme recombinante.



B

	Km UDP-glucose (mM)	Km ADP-glucose (mM)
<i>C.trachomatis</i>	3,4	1
<i>C.trachomatis</i> *	2,319	8,531
<i>P.acanthamoeba</i>	7,3	0,91
<i>P.amoebophila</i>	N.D.	0,45
<i>E.coli</i>	N.D.	1,043

Figure 29 : Détermination des paramètres cinétiques Km et Vm des glycogènes synthases en présence d'ADP ou UDP-glucose de *C.trachomatis*, *E.coli*, *P.acanthamoebae* et *P.amoebophila*. (A) Incorporation d'ADP ou UDP-glucose marqué au ¹⁴C en fonction de la concentration en nucléotide sucre. L'incorporation d'UDP-glucose pour la synthase de *P.amoebophila* étant trop lente pour avoir un résultat exploitable, c'est la raison pour laquelle il n'y a pas de courbe la représentant. (B) Km apparent pour les différentes synthase.

« * » correspond au même extrait de GlgA *C.trachomatis*, mais congelé au -80°C avant le dosage. Les autres extraits sont des extraits bruts, mais frais. « N.D. » est pour « non-déterminé ».

En revanche les enzymes n'étant pas purifiées, même si l'expression s'est faite dans une souche ΔGlgA (dépourvu de l'activité synthase endogène), les Km de ces enzymes ne sont qu'apparents et informatifs, en raison des interférences possibles avec d'autres protéines présentes dans ces extraits. Nous pouvons malgré cela confirmer et compléter les observations en zymogramme précédentes.

Les synthases de *C.trachomatis* et de *P.acanthamoebae* sont capables d'utiliser à la fois l'UDP et l'ADP-glucose, avec une efficacité plus forte envers l'UDP-glucose pour celle de

C.trachomatis et une efficacité vraisemblablement égale pour celle de *P.acanthamoeba*.

En revanche, la synthase de *P.amoebophila* qui était semble-t-il capable d'utiliser sur zymogramme de l'ADP-glucose ou de l'UDP-glucose (très faiblement), présente une très nette préférence pour l'ADP-glucose au cours de ces dosages, avec une incorporation de l'UDP-glucose quasi nulle.

Sans surprise la synthase d'*E.coli* n'est efficace qu'en présence d'ADP-glucose. En revanche, il est intéressant de noter que la glycogène synthase de *C.trachomatis* est altérée après congélation au -80°C : en effet, elle perd de son activité comme en atteste les dosages.

Pour comprendre également si les activités synthase de *Simkania negevensis* et *Estrella lausannensis* absentes sur gels zymogrammes sont effectivement inactives, des tests préliminaires d'incorporation d'ADP et d'UDP-glucose marqués ont été réalisés.

Ci-dessous sont donc représentés des dosages préliminaires de l'activité synthase non purifiée des différentes chlamydiales (Figure 30).

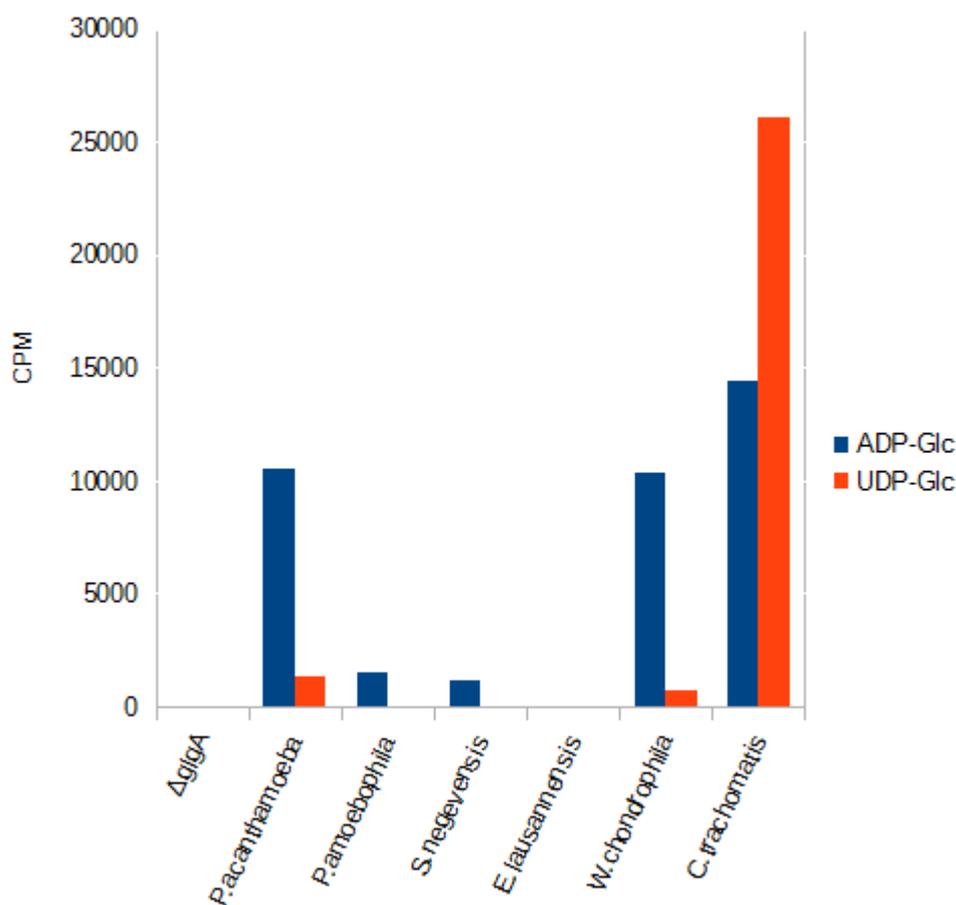


Figure 30 : Incorporation de ^{14}C -glucose sur du glycogène à partir d'ADP- ^{14}C -glucose (bleu) ou d'UDP- ^{14}C -glucose (orange) par les différentes synthases de chlamydiales. Le temps d'incorporation est de 15min en présence de 15mM de nucléotide sucre.

Ces observations permettent à la fois de confirmer les tests de complémentation sur boîte et en milieu M9, ainsi que les zymogrammes précédents, mais également de visualiser une activité pour *S.negevensis* jusqu’alors absente sur gel d’activité. En effet, en présence d’ADP-glucose la synthèse de cette Simkaniaceae est capable d’allonger des chaînes de glucoses. En revanche, l’activité de la synthase d’*E.lausannensis* est toujours bien absente, quel que soit le nucléotide sucre utilisé.

La capacité des glycogènes synthases chlamydiales à utiliser à la fois l’ADP-glucose comme l’UDP-glucose est résumée dans le tableau suivant. (Tableau 9)

	ADP-Glc	UDP-Glc
<i>C.trachomatis</i>	Oui	Oui
<i>W.chondrophila</i>	Oui	Oui
<i>P.acanthamoebae</i>	Oui	Oui
<i>P.amoebophila</i>	Oui	Non
<i>S.negevensis</i>	Oui	Non
<i>E.lausannensis</i>	Non	Non
<i>E.coli</i>	Oui	Non

Tableau 9 : Capacité d’utilisation (Oui) ou pas (Non) du nucléotide sucre par la glycogène/amidon synthase de la bactérie.

c) Zymogramme comparatif *C.trachomatis* et *E.coli*

Pour se faire une meilleure idée de l’activité de la glycogène synthase de *C.trachomatis* à quantité de protéine égale comparativement à celle d’*E.coli*, des zymogrammes ajustés ont été réalisés. (Figure 31)

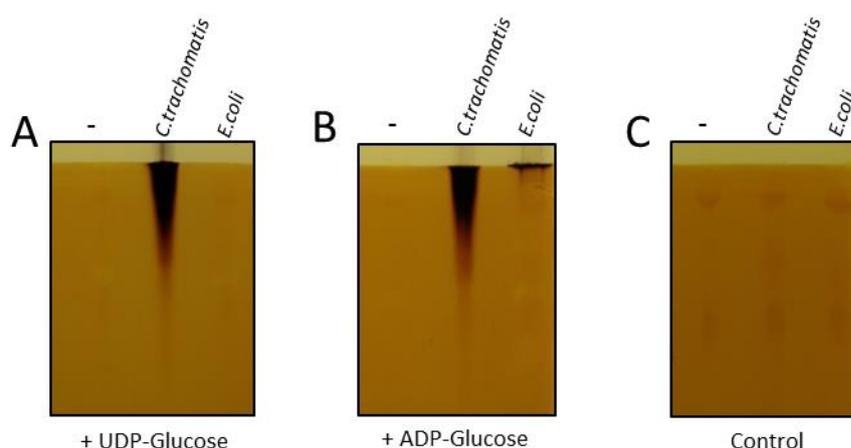


Figure 31 : Des extraits bruts de Δ GlgA contenant soit la synthase de *C.trachomatis*, soit celle d’*E.coli* soit vide ont été fait migré sur gel de polyacrylamide contenant du glycogène, puis mis en présence d’un tampon contenant soit de l’ADP-glucose (A), soit de l’ADP-glucose (B) soit sans nucléotide sucre (C). Les gels sont ensuite révélés à l’iode, les bandes noires correspondant à l’élargissement du glycogène par l’activité synthase.

Ce gel permet de comparer plus clairement les activités synthèses d'*E.coli* et *C.trachomatis* : Celle d'*E.coli* n'utilise que de l'ADP-glucose alors que celle de *C.trachomatis* est capable d'utiliser à la fois l'UDP et l'ADP-glucose.

Un ajustement en termes d'activité (suite aux dosages précédents) a été réalisé et des dilutions permettant de pallier une saturation de la visualisation de l'activité sur gel a également été faite. (Figure 32)

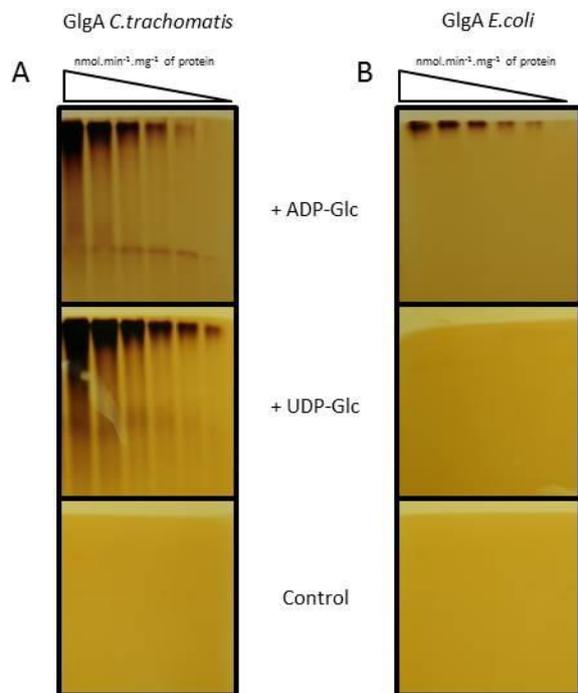


Figure 32 : Analyse en gel d'activité des glyco-gène-synthase d'*E.coli* et *C.trachomatis*.

Des dilutions dans le but d'obtenir une activité spécifique comprise entre 20 et 0,625 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ des protéines totales (A) de Δ GlgA contenant le pDEST15 codant pour la GlgA de *C.trachomatis* ou (B) de Δ GlgA contenant pGEX codant pour la protéine GlgA d'*E.coli* ont été séparées sur gel de polyacrylamide contenant 0,6% de glyco-gène de foie de lapin. Les gels natifs ont été incubés ensuite avec de l'ADP-glucose (1,2mM), de l'UDP-glucose (1,2mM) ou sans nucléotide sucres.

Comme précédemment on remarque la très forte activité de GlgA de *C.trachomatis* en présence d'UDP-glucose. A tel point que même aux plus faibles dilutions l'activité est toujours présente, alors qu'en présence d'ADP-glucose à la dernière dilution l'activité ne semble plus être suffisante pour allonger des chaînes de glyco-gène et que ça soit visible après coloration à l'iode.

En revanche, l'activité en présence d'ADP-glucose des deux synthèses, celles d'*E.coli* et de *C.trachomatis* semblent similaires. En effet, même si l'activité de *C.trachomatis* semble plus importante, car plus étalée, cela signifie uniquement que cette synthase a potentiellement une affinité moins importante pour le glyco-gène, tout en restant très active : à la plus faible dilution l'activité a disparu pour les deux synthèses alors que la dilution précédente cette activité était toujours présentes des deux côtés.

d) Cas particulier de *W.chondrophila* avec une enzyme de branchement fusionnée à la glycogène/amidon synthase

Les activités glycogène synthases des chlamydiales, en fonction du spectre d'hôte qu'elles infectent sont capables d'utiliser à la fois l'UDP-glucose et l'ADP-glucose pour certaines, et uniquement l'ADP-glucose, à la manière générale des autres bactéries pour d'autres.

En revanche, de manière intéressante, les activités synthases d'*Estrella lausannensis* (et des Criblamydiaeae en général) et de *Waddlia chondrophila* se ressemblent énormément en terme de structure primaire, à savoir que la synthase est en réalité fusionnée avec une enzyme de branchement (les deux chlamydiales possèdent également une autre enzyme de branchement (GlgB) dans leur génome, mais aucune autre GlgA). Or il s'avère que la synthase d'*Estrella lausannensis* est en fait interrompue en plein milieu par un codon-stop (Figure 33) rendant l'enzyme incomplète et donc inactive (au moins sous forme recombinante). Celle de *Waddlia* en revanche est active avec cette fusion GlgA-GlgB.

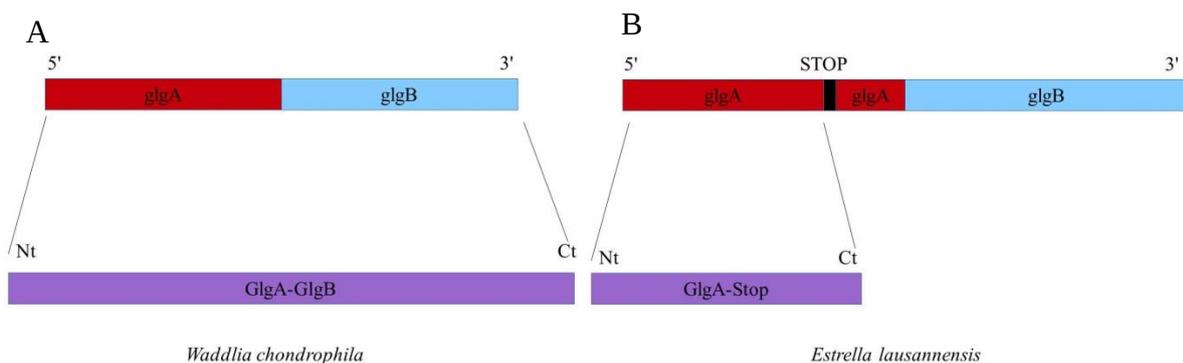


Figure 33 : comparaison schématique des génomes puis protéines de synthase à glycogène de *W.chondrophila* (A) et *E.lausannensis* (B). Le gène *glgA* est dans les deux cas fusionné sur le génome avec une *glgB*, mais en terme de protéine, la présence d'un codon-stop prématuré chez *Estrella* empêche la formation ne serait-ce que d'une synthase complète, alors que celle de *Waddlia* conduit à la production d'une protéine fusionnée parfaitement active du point de vue α -1,4 glycosyltransférase.

Il est donc important de comprendre le comportement de cette enzyme, et donc de vérifier si cette activité de branchement est belle et bien active.

L'expression de l'enzyme dans une souche d'*E.coli* Δ GlgB (dépourvu de l'activité de branchement), comparé à la souche sauvage va pouvoir nous permettre de répondre à cette question. Des tests zymogrammes ainsi que des dosages de l'activité de branchement sont les prochaines étapes de ces expériences.

5) Conclusion

Comme nous l'avons expliqué plus tôt, notre hypothèse principale est que l'endosymbiose primaire du plaste fut tripartite. Celle-ci repose en partie sur le fait que les synthèses des Archaeplastides ont une origine commune, chlamydienne. En effet, lors de l'endosymbiose primaire du plaste, la seule solution avec les informations que nous disposons actuellement pour que l'hôte puisse utiliser l'ADP-glucose fourni alors par la cyanobactérie alors que lui-même n'est capable d'utiliser que l'UDP-glucose, est qu'il se serve de l'enzyme de la chlamydiale, qui elle, en tant que bactérie, est capable de le métaboliser.

Nos résultats montrent que l'utilisation de cet ADP-glucose reste indéniable par les synthèses chlamydiennes (mis à part celle d'*Estrella lausannensis* qui reste inactive, car tronquée). En plus de cette observation, nous avons pu mettre en évidence l'utilisation par certaines synthèses d'une autre source de carbone : l'UDP-glucose.

Cette utilisation ne se fait pas dans le cas de toutes les chlamydiales : uniquement *C.trachomatis*, *W.chondrophila* et *P.acanthamoebae*. Ces chlamydiales ont toutes les trois été plus ou moins reconnues comme pathogène animal, voire humain. L'intérêt de la capacité d'utilisation de l'UDP-glucose est facilement compréhensible ici : l'hôte infecté ne produit que de l'UDP-glucose, sécréter une synthase n'utilisant que de l'ADP-glucose est inutile dans ce cas. La stratégie de sécrétion parasitaire semble incorrecte et même incomplète dans un tel cas. En effet, il a été démontré que la GlgA de *P.acanthamoebae* et celle de *C.trachomatis* sont effectivement sécrétées dans le cytosol de l'hôte eucaryote, s'il y a impossibilité de l'utiliser tout de suite, l'intérêt est mineur lors d'une infection. La glycogène synthase a probablement dû évoluer en fonction des hôtes possibles qu'elle rencontrait, et sa stratégie de sécrétion d'enzyme également. De plus, l'enzyme ne devait pouvoir utiliser ancestralement que l'ADP-glucose, mais l'évolution de l'efficacité de parasitisme et donc la sécrétion par le TTSS de la synthase chez certaines chlamydiales, a permis un meilleur contrôle du métabolisme de l'hôte et donc une meilleure compétition au niveau de l'évolution. A tel point que dans le cas de *C.trachomatis*, la synthase a développé une nette préférence pour l'UDP-glucose, lui permettant un contrôle plus rapide de l'hôte, sa capacité à utiliser l'ADP-glucose n'intervenant que plus tard pour utiliser celui produit par sa propre ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC).

En revanche, chez *P.amoebophila*, la synthase ne semble utiliser que l'ADP-glucose. Cette chlamydiale infecte pourtant des hôtes eucaryotes comme les amibes qui n'utilisent que de l'UDP-glucose. Sa sécrétion ne semble pas être un atout, du moins en début d'infection, la présence d'ADP-glucose étant nulle tant que son ADP-glucose pyrophosphorylase n'a pas

fourni d'ADP-glucose.

Par opposition, dans le cas de *Waddlia chondrophila*, l'absence d'ADP-glucose pyrophosphorylase rend la capacité de la synthase à utiliser de l'UDP-glucose indispensable, ne pouvant produire son propre nucléotide sucre de type ADP-glucose. L'activité ADP-glucose dépendante peut tout de même s'expliquer par une activité ancienne, pas encore perdue avec l'évolution.

Estrella lausannensis reste tout de même un mystère quant à l'utilisation des enzymes du métabolisme des polysaccharides de réserve : elle ne possède pas d'ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC) et a dans son génome une synthase inactive, potentiellement pseudo-gène. Une expérience future de suivi par qPCR et microscopie à fluorescence avec des anticorps dirigés contre cette glycogène synthase devrait nous en apprendre plus sur la réelle nature de ce gène, pseudo-gène ou protéine exprimée malgré tout.

Les glycogènes synthases des chlamydiales semblent avoir une origine complexe. Il nous est en effet à ce jour impossible de déterminer si celle-ci est mono ou polyphylétique (arbres en annexe). Les synthases des Chlamydiaceae sont constamment regroupées, celles des Parachlamydiaceae également, mais pas toujours ensemble avec les Chlamydiaceae. En ce qui concerne les Waddliaceae, la construction de leur synthase étant différente des autres avec cette fusion d'une GlgA avec une GlgB, leurs positions dans les arbres phylogénétiques faits jusqu'à aujourd'hui restent incertaines, avec des valeurs de nœuds insuffisantes. Malgré ces incertitudes, la tendance actuelle pencherait pour une origine monophylétique avec une divergence évolutive très importante.

Conclusion générale

Les principaux polysaccharides de réserves accumulés par les êtres-vivants sont le glycogène et l'amidon. En effet, la majorité des enzymes nécessaires à la synthèse et la dégradation de ces deux polysaccharides sont similaires. L'amidon nécessite malgré tout plusieurs enzymes supplémentaires ou parfois des utilisations différentes d'enzymes communes. Parmi celle-ci, une enzyme de débranchement est nécessaire pour la réorganisation des chaînes de glucanes et la cristallisation de l'amidon, et une activité synthase différente est également nécessaire pour former des chaînes suffisamment longues permettant la formation de l'amylopectine.

Le glycogène étant le plus largement répandu, on se pose donc la question de comment l'amidon est apparu. Il s'avère que ce dernier est retrouvé uniquement dans les lignées des Archaeplastides (algues rouges, algues et plantes vertes, et glaucophytes) ainsi que chez un très petit nombre de cyanobactéries. L'hypothèse générale concernant leur lien est que l'amidon est un dérivé du glycogène.

Sachant que l'hypothèse la plus courante concernant l'apparition des Archaeplastides consiste en l'endosymbiose entre une cyanobactérie et une cellule eucaryote, la logique voudrait que la cyanobactérie ait fourni la possibilité à l'eucaryote de produire de l'amidon. Or des études phylogénétiques récentes ont démontré que l'origine des enzymes de débranchement et activité synthase SSIII/SSIV chez les Archaeplastides n'était pas cyanobactériennes. De plus, l'absence de transporteur de nucléotides sucre sur la membrane de la cyanobactérie exclue une origine cyanobactérienne du transport dans le cytosol eucaryote de l'ADP-glucose, le carbone photosynthétique représentant le chaînon indispensable à l'endosymbiose. Ajouté à cela, l'hôte eucaryote utilisait de l'UDP-glucose comme précurseur pour son glycogène, la cyanobactérie de l'ADP-glucose, et la synthase de l'eucaryote n'était donc vraisemblablement pas capable d'utiliser cet ADP-glucose dans le but d'alimenter son propre pool de glycogène : vu sous cet angle l'endosymbiose était compromise.

Il s'avère que les activités synthases des Archaeplastides sont d'origine chlamydienne, que l'ADP-glucose chez les Archaeplastides retrouvés aujourd'hui est toujours produit dans le cytosol du plaste (la cyanobactérie ancestrale), et que cet ADP-glucose est toujours transmis dans le cytosol de la cellule. Cette transmission se fait via un transporteur de nucléotide sucre, qui lui semble avoir une origine eucaryote et non cyanobactérienne.

L'étude des transporteurs de nucléotides sucres proches phylogénétiquement de celui présent

sur le plaste nous permettra de mieux comprendre l'endosymbiose (voir en annexe le début de cette étude), et l'étude des activités synthèses chlamydiales nous a permis d'établir un schéma de l'importance de l'intervention de la chlamydiale à l'époque de l'endosymbiose primaire du plaste.

Toutes les activités synthèses chlamydiales sont capables d'utiliser l'ADP-glucose (excepté celle d'*E.lausannensis* qui n'est pas fonctionnelle). En revanche, les activités synthèses de chlamydiales pathogènes, ou potentiellement pathogènes sont capables de fonctionner à la fois avec de l'ADP-glucose, mais également avec de l'UDP-glucose. Cette dernière capacité semble être apparue suite à une évolution de l'efficacité de l'infection des chlamydiales. En effet, en générale l'infection par des chlamydiales s'accompagne par la sécrétion par le système de sécrétion de type 3 de certaines des enzymes du métabolisme du glycogène de cette bactérie. La glycogène synthase, ainsi que l'ADP-glucose pyrophosphorylase font partie des protéines sécrétées lors de l'infection, décrits chez *C.trachomatis* mais également chez *P.acanthamoebae*. La capacité à utiliser l'UDP-glucose prend alors tout son sens, l'enzyme arrivant dans le cytosol de l'hôte ne rencontre, du moins en début d'infection, que de l'UDP-glucose, le seul nucléotide sucre produit par l'eucaryote. Elle peut donc malgré l'absence d'ADP-glucose, commencer à synthétiser des chaînes de glucanes. Par la suite, la sécrétion de l'ADP-glucose pyrophosphorylase change la donne, en permettant la présence d'ADP-glucose également dans ce même cytosol. Dans le cas des chlamydiales incapables d'utiliser l'UDP-glucose avec leur synthase, la sécrétion de cette dernière semble inutile en début d'infection, l'ADP-glucose n'ayant pas été synthétisé, et inutile tout simplement si l'ADP-glucose pyrophosphorylase n'est pas sécrétée dans le cytosol. C'est le cas pour *S.negevensis* et pour *P.amoebophila*, dont ces informations de sécrétion ne sont pas encore disponibles, mais dont on sait que la glycogène synthase utilise exclusivement l'ADP-glucose.

La sécrétion de cette activité d'élongation dans le cytosol de l'hôte eucaryote a également tout son sens à l'époque de l'endosymbiose primaire. En effet, sa capacité à utiliser l'ADP-glucose est importante pour l'incorporation de l'ADP-glucose photosynthétique fourni par la cyanobactérie, dans le métabolisme des polysaccharides de l'hôte. Les chlamydiales environnementales étant soupçonnées d'être les plus proches de l'ancêtre chlamydien ayant été internalisé lors de l'endosymbiose, l'information quant à son utilisation de l'ADP-glucose par sa synthase n'en est que plus importante. (Figure 34)

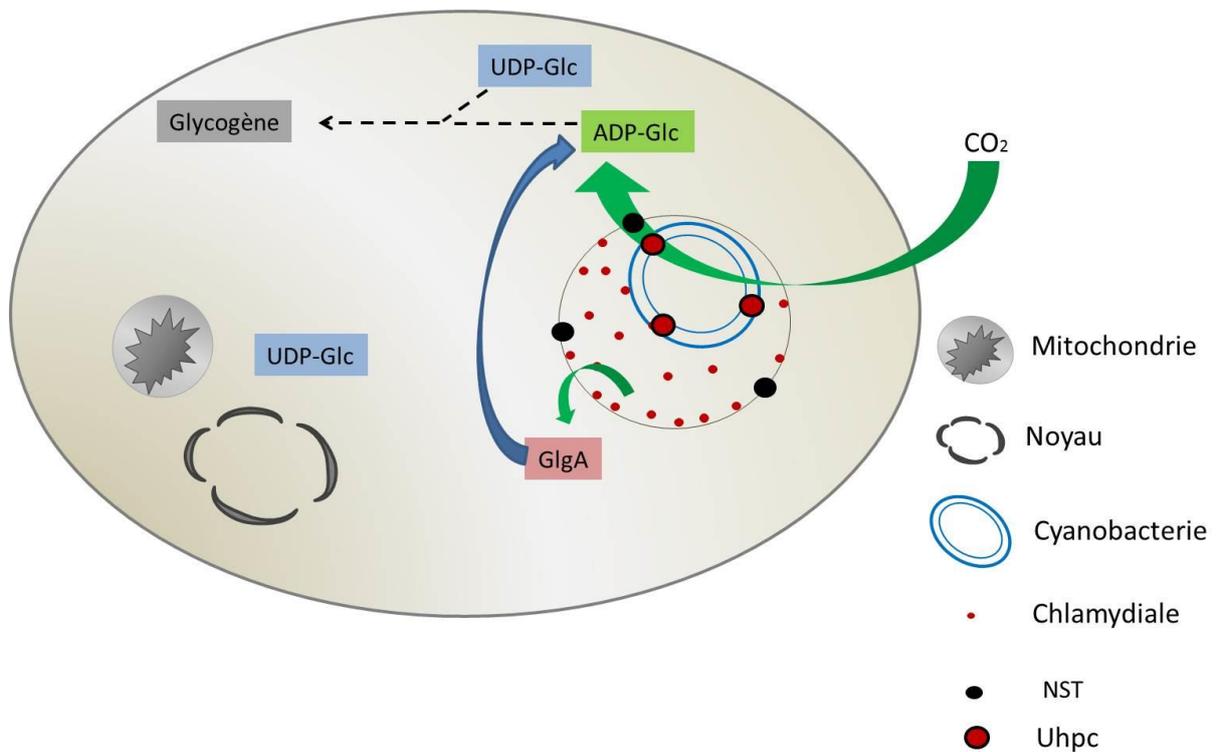


Figure 34 : Hypothèse de l'endosymbiose tripartite entre la cellule eucaryote, la cyanobactérie et la chlamydiale. Les chlamydiales ont favorisé le maintien de la cyanobactérie dans la même vésicule d'inclusion. La cyanobactérie ancestrale a quant à elle, contribué à la survie de l'amibe en apportant une source énergétique supplémentaire sous la forme de carbone photosynthétique, ADP-glucose. Cet équilibre fut maintenu suffisamment longtemps pour permettre des transferts latéraux de gène et établir ainsi le lien symbiotique. Les flèches vertes correspondent aux sécrétions (dans le cas de la chlamydiale) de la glycogène synthase (GlgA) utilisant l'ADP-glucose, ou au transport de l'ADP-glucose de la cyanobactérie dans le cytosol eucaryote. Les flèches bleues correspondent à l'utilisation de l'ADP-glucose par la synthase chlamydiale puis à son incorporation dans le pool de glycogène eucaryote : le lien symbiotique est créé.

L'étude d'un mutant impliqué dans la synthèse de l'amidon chez la cyanobactérie CLg1 nous a permis de découvrir le rôle cruciale d'une des deux glycogène synthase de cet organisme dans la formation de l'amidon. GlgA2 est capable d'initier la synthèse du polysaccharide, mais également nécessaire pour produire des chaînes de glucanes suffisamment longues pour soutenir toute la structure de l'amylopectine. Sans cette activité synthase, CLg1 ne produit plus que du glycogène. Sa présence n'est malgré tout pas suffisante pour la production d'amidon, car d'autres cyanobactéries la possédant n'en produisent pas.

Elle possède une origine commune avec la GlgA des chlamydiales, l'enzyme de ces dernières étant à l'origine de celles des Archaeplastides. C'est une information non négligeable permettant de faire le lien entre la présence d'une telle enzyme et la formation de l'amidon. (Figure 35)

Si l'enzyme ayant un lien phylogénétique avec les synthases chlamydiales avait été GlgA1,

cette dernière incapable de fournir des chaînes suffisamment longues pour l'amidon, le lien de l'enzyme chlamydienne et de l'amidon n'aurait pas été absent, mais pas pour autant conforté comme il l'est dans ce cas-ci.

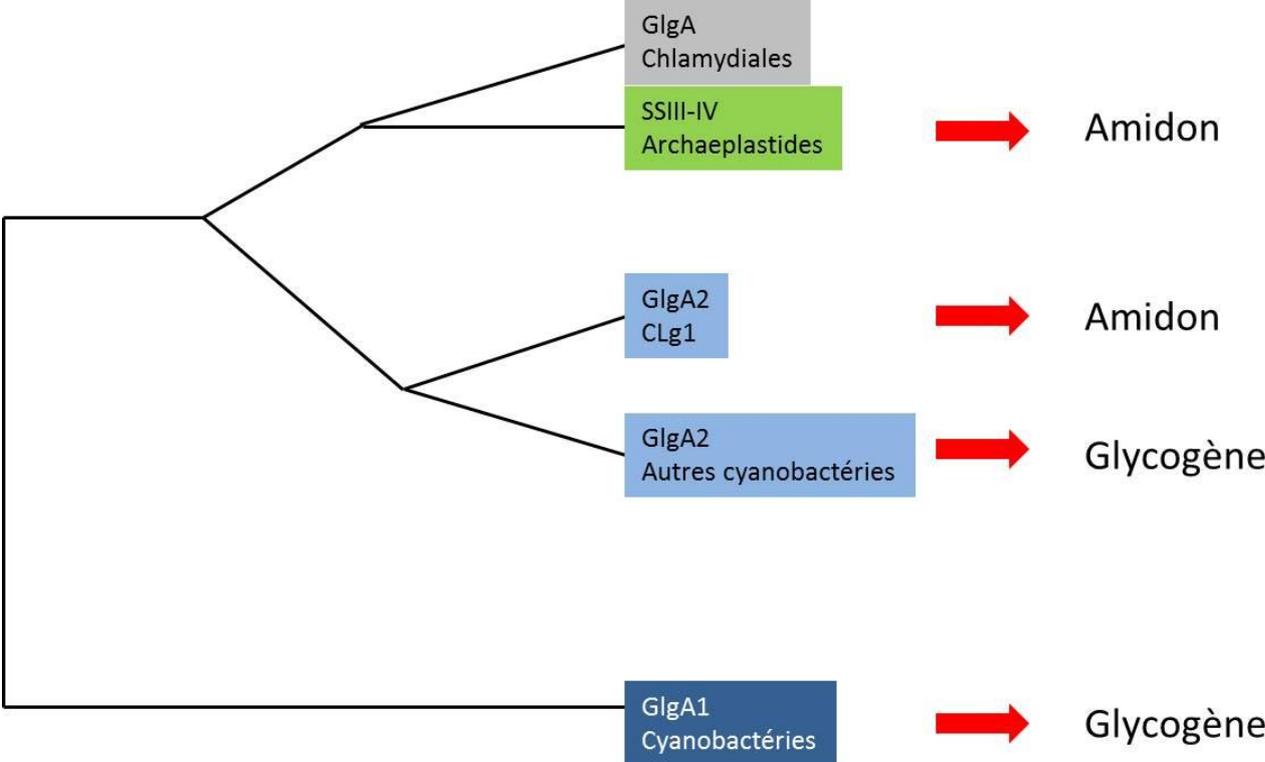


Figure 35 : Schématisation de la provenance des synthèses, ainsi que de la nature du polysaccharide produit avec leur aide.

Références

- Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 2104–2105.
- Abdelrahman, Y.M., and Belland, R.J. (2005). The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 949–959.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133–140.
- Azuma, Y., Hirakawa, H., Yamashita, A., Cai, Y., Rahman, M.A., Suzuki, H., Mitaku, S., Toh, H., Goto, S., Murakami, T., et al. (2006). Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydomyces felis*. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 13, 15–23.
- Badger, M.R., and Price, G.D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54, 609–622.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., and Preiss, J. (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86, 349–352.
- Ball, S.G., Subtil, A., Bhattacharya, D., Moustafa, A., Weber, A.P.M., Gehre, L., Colleoni, C., Arias, M.-C., Cenci, U., and Dauvillée, D. (2013). Metabolic effectors secreted by bacterial pathogens: essential facilitators of plastid endosymbiosis? *Plant Cell* 25, 7–21.
- Bavoil, P., Kaltenboeck, B., and Greub, G. (2013). In *Chlamydia veritas*. *Pathog. Dis.* 67, 89–90.
- Bertoft, E., Laohaphatanalert, K., Piyachomkwan, K., and Sriroth, K. (2010). The fine structure of cassava starch amylopectin. Part 2: building block structure of clusters. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 325–335.
- Bertoft, E., Källman, A., Koch, K., Andersson, R., and Aman, P. (2011). The building block structure of barley amylopectin. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 900–909.
- Bhattacharya, D., Yoon, H.S., and Hackett, J.D. (2004). Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 50–60.
- Bhattacharya, D., Price, D.C., Yoon, H.S., Yang, E.C., Poulton, N.J., Andersen, R.A., and Das, S.P. (2012). Single cell genome analysis supports a link between phagotrophy and primary plastid endosymbiosis. *Sci. Rep.* 2, 356.
- Brinkman, F.S.L., Blanchard, J.L., Cherkasov, A., Av-Gay, Y., Brunham, R.C., Fernandez, R.C., Finlay, B.B., Otto, S.P., Ouellette, B.F.F., Keeling, P.J., et al. (2002). Evidence that plant-like genes in *Chlamydia* species reflect an ancestral relationship between *Chlamydiaceae*, cyanobacteria, and the chloroplast. *Genome Res.* 12, 1159–1167.
- Brock, D.A., Douglas, T.E., Queller, D.C., and Strassmann, J.E. (2011). Primitive agriculture

in a social amoeba. *Nature* 469, 393–396.

Byrne, G.I., and Ojcius, D.M. (2004). Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 802–808.

Cenci, U., Chabi, M., Ducatez, M., Tirtiaux, C., Nirmal-Raj, J., Utsumi, Y., Kobayashi, D., Sasaki, S., Suzuki, E., Nakamura, Y., et al. (2013). Convergent evolution of polysaccharide debranching defines a common mechanism for starch accumulation in cyanobacteria and plants. *Plant Cell* 25, 3961–3975.

Cenci, U., Nitschke, F., Steup, M., Minassian, B.A., Colleoni, C., and Ball, S.G. (2014). Transition from glycogen to starch metabolism in Archaeplastida. *Trends Plant Sci.* 19, 18–28.

Chapman, K.D., Dyer, J.M., and Mullen, R.T. (2013). Commentary: why don't plant leaves get fat? *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 207, 128–134.

Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M.G., and Roach, P.J. (1995). Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6632–6640.

Clifton, D.R., Fields, K.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Carabeo, R.A., and Hackstadt, T. (2004). A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10166–10171.

Colleoni, C., Linka, M., Deschamps, P., Handford, M.G., Dupree, P., Weber, A.P.M., and Ball, S.G. (2010). Phylogenetic and biochemical evidence supports the recruitment of an ADP-glucose translocator for the export of photosynthate during plastid endosymbiosis. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2691–2701.

Collingro, A., Tischler, P., Weinmaier, T., Penz, T., Heinz, E., Brunham, R.C., Read, T.D., Bavoil, P.M., Sachse, K., Kahane, S., et al. (2011). Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3253–3270.

Crumpton-Taylor, M., Pike, M., Lu, K.-J., Hylton, C.M., Feil, R., Eicke, S., Lunn, J.E., Zeeman, S.C., and Smith, A.M. (2013). Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during *Arabidopsis* leaf expansion. *New Phytol.* 200, 1064–1075.

Dascher, C., Ossig, R., Gallwitz, D., and Schmitt, H.D. (1991). Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily. *Mol. Cell. Biol.* 11, 872–885.

Deschamps, P., Colleoni, C., Nakamura, Y., Suzuki, E., Putaux, J.-L., Buléon, A., Haebel, S., Ritte, G., Steup, M., Falcón, L.I., et al. (2008). Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. *Mol. Biol. Evol.* 25, 536–548.

Douglas, S.E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 655–661.

Everett, K.D., Bush, R.M., and Andersen, A.A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each

containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, 415–440.

Fields, K.A., Mead, D.J., Dooley, C.A., and Hackstadt, T. (2003). Chlamydia trachomatis type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. *Mol. Microbiol.* 48, 671–683.

French, D., Smith, E.E., and Whelan, W.J. (1972). The structural analysis and enzymic synthesis of a pentasaccharide alpha-limit dextrin formed from amylopectin by *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Carbohydr. Res.* 22, 123–134.

Fu, J., and Xu, X. (2006). The functional divergence of two glgP homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 201–209.

Gibbs, S.P. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361, 193–208.

Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312, 151–163.

Goy, G., Croxatto, A., and Greub, G. (2008). *Waddlia chondrophila* enters and multiplies within human macrophages. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 10, 556–562.

Goy, G., Croxatto, A., Posfay-Barbe, K.M., Gervaix, A., and Greub, G. (2009). Development of a real-time PCR for the specific detection of *Waddlia chondrophila* in clinical samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 28, 1483–1486.

Greub, G., and Raoult, D. (2003). History of the ADP/ATP-translocase-encoding gene, a parasitism gene transferred from a Chlamydiales ancestor to plants 1 billion years ago. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5530–5535.

Gründel, M., Scheunemann, R., Lockau, W., and Zilliges, Y. (2012). Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiol. Read. Engl.* 158, 3032–3043.

Gurcel, C., Vercoutter-Edouart, A.-S., Fonbonne, C., Mortuaire, M., Salvador, A., Michalski, J.-C., and Lemoine, J. (2008). Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 2089–2097.

Hackstadt, T., Baehr, W., and Ying, Y. (1991). Chlamydia trachomatis developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3937–3941.

Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., and Fischer, E.R. (1999). The Chlamydia trachomatis InCA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell. Microbiol.* 1, 119–130.

Halberstaedter, L., von Prowazek, S. (1907). Zur Ätiologie des Trachoms. *Dtsch. Med. Wschr.* 33 1285–1287

Henrissat, B., Deleury, E., and Coutinho, P.M. (2002). Glycogen metabolism loss: a common marker of parasitic behaviour in bacteria? *Trends Genet. TIG* 18, 437–440.

- Hinchliff, C.E., Smith, S.A., Allman, J.F., Burleigh, J.G., Chaudhary, R., Coghill, L.M., Crandall, K.A., Deng, J., Drew, B.T., Gazis, R., et al. (2015). Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201423041.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* 147, 342–347.
- Horn, M., Collingro, A., Schmitz-Esser, S., Beier, C.L., Purkhold, U., Fartmann, B., Brandt, P., Nyakatura, G.J., Droege, M., Frishman, D., et al. (2004). Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 304, 728–730.
- Huang, J., and Gogarten, J.P. (2007). Did an ancient chlamydial endosymbiosis facilitate the establishment of primary plastids? *Genome Biol.* 8, R99.
- Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J., and Greub, G. (2013). Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. *J. Vis. Exp. JoVE* e51055.
- Jacquier, N., Viollier, P.H., and Greub, G. (2015). The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 262–275.
- Johnson, P.W., Hargraves, P.E., and Sieburth, J.M. (1988). Ultrastructure and Ecology of *Calycomonas ovalis* Wulff, 1919, (Chrysophyceae) and Its Redescription as a Testate Rhizopod, *Paulinella ovalis* N. Comb. (Filosea: Euglyphina)1. *J. Protozool.* 35, 618–626.
- Kebbi-Beghdadi, C., Bertelli, C., and Greub, G. (2012). Insights in the biology of *Chlamydiae*. *Transworld Research Network.* 121-145. ISBN : 978-81-7895-547-6.
- Kebbi-Beghdadi, C., Cisse, O., and Greub, G. (2011). Permissivity of Vero cells, human pneumocytes and human endometrial cells to *Waddlia chondrophila*. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 13, 566–574.
- Kies, L., and Kremer, B.P. (1979). Function of cyanelles in the thecamoeba *Paulinella chromatophora*. *Naturwissenschaften* 66, 578–579.
- Kopp, R.E., Kirschvink, J.L., Hilburn, I.A., and Nash, C.Z. (2005). The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11131–11136.
- Lamoth, F., Pilonel, T., and Greub, G. (2015). *Waddlia*: An emerging pathogen and a model organism to study the biology of chlamydiae. *Microbes Infect. Inst. Pasteur.*
- Lee, J., Klusener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Nöller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., et al. (2001). HrpZ(PspH) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 289–294.
- Lienard, J., Croxatto, A., Prod'hom, G., and Greub, G. (2011). *Estrella lausannensis*, a new star in the Chlamydiales order. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 13, 1232–1241.
- Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (2004). Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1673, 45–55.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts

for PCR-based applications. *BioTechniques* 50, 325–328.

Lu, C., Lei, L., Peng, B., Tang, L., Ding, H., Gong, S., Li, Z., Wu, Y., and Zhong, G. (2013). *Chlamydia trachomatis* GlgA is secreted into host cell cytoplasm. *PloS One* 8, e68764.

Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., and Kowallik, K.V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162–165.

Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., and Cascante, M. (1997). How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.* 45, 446–455.

Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J., and Cascante, M. (1998). Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. *Biophys. J.* 75, 106–114.

Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M., and Cornelis, G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect. Immun.* 58, 2840–2849.

Mills, S.D., Boland, A., Sory, M.P., van der Smissen, P., Kerbouch, C., Finlay, B.B., and Cornelis, G.R. (1997). *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12638–12643.

Moreira, D., Le Guyader, H., and Philippe, H. (2000). The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* 405, 69–72.

Mouille, G., Maddelein, M.L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S. (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* 8, 1353–1366.

Moustafa, A., Reyes-Prieto, A., and Bhattacharya, D. (2008). *Chlamydiae* has contributed at least 55 genes to *Plantae* with predominantly plastid functions. *PloS One* 3, e2205.

Nakamura, Y., Takahashi, J.-I., Sakurai, A., Inaba, Y., Suzuki, E., Nihei, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Miyashita, H., Ikemoto, H., et al. (2005). Some Cyanobacteria synthesize semi-amylpectin type alpha-polyglucans instead of glycogen. *Plant Cell Physiol.* 46, 539–545.

Omsland, A., Sager, J., Nair, V., Sturdevant, D.E., and Hackstadt, T. (2012). Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 19781–19785.

Omsland, A., Sixt, B.S., Horn, M., and Hackstadt, T. (2014). Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 779–801.

Ossig, R., Dascher, C., Trepte, H.H., Schmitt, H.D., and Gallwitz, D. (1991). The yeast SLY gene products, suppressors of defects in the essential GTP-binding Ypt1 protein, may act in endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2980–2993.

Pilloux, L., Casson, N., Sommer, K., Klos, A., Stehle, J.-C., Pusztaszeri, M., and Greub, G. (2015). Severe pneumonia due to *Parachlamydia acanthamoebae* following intranasal inoculation: a mice model. *Microbes Infect. Inst. Pasteur.*

- Ral, J.-P., Colleoni, C., Wattebled, F., Dauvillée, D., Nempont, C., Deschamps, P., Li, Z., Morell, M.K., Chibbar, R., Purton, S., et al. (2006). Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* *142*, 305–317.
- Read, T.D., Brunham, R.C., Shen, C., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., White, O., Hickey, E.K., Peterson, J., Utterback, T., Berry, K., et al. (2000). Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1397–1406.
- Reyes-Prieto, A., and Bhattacharya, D. (2007). Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 2358–2361.
- Ripa, K.T. (1982). Microbiology Diagnosis of chlamydia trachomatis infection. *Infection* *10 Suppl 1*, S19–S24.
- Roach, P.J. (2015). Glycogen phosphorylation and Lafora disease. *Mol. Aspects Med.*
- Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., and Tagliabracci, V.S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.* *441*, 763–787.
- Robin JP, Mercier C, Charbonniere R, Guilbot A. Lintnerized starches. (1974). Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.* *51*:389–406.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H., and Lang, B.F. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol. CB* *15*, 1325–1330.
- Rurangirwa, F.R., Dilbeck, P.M., Crawford, T.B., McGuire, T.C., and McElwain, T.F. (1999). Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *49 Pt 2*, 577–581.
- Schmitz-Esser, S., Linka, N., Collingro, A., Beier, C.L., Neuhaus, H.E., Wagner, M., and Horn, M. (2004). ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to Chlamydiae and Rickettsiae. *J. Bacteriol.* *186*, 683–691.
- Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., and Sherman, L.A. (1994). Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* *176*, 1586–1597.
- Schöfl, G., Voigt, A., Litsche, K., Sachse, K., and Saluz, H.P. (2011). Complete genome sequences of four mammalian isolates of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Bacteriol.* *193*, 4258.
- Shaulsky, G., and Kessin, R.H. (2007). The cold war of the social amoebae. *Curr. Biol. CB* *17*, R684–R692.
- Silver, D.M., Kötting, O., and Moorhead, G.B.G. (2014). Phosphoglucan phosphatase function sheds light on starch degradation. *Trends Plant Sci.* *19*, 471–478.
- Smythe, C., and Cohen, P. (1991). The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem. FEBS* *200*, 625–631.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses

with thousands of taxa and mixed models. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 22, 2688–2690.

Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., et al. (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282, 754–759.

Subtil, A., Parsot, C., and Dautry-Varsat, A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol.* 39, 792–800.

Subtil, A., Collingro, A., and Horn, M. (2014). Tracing the primordial Chlamydiae: extinct parasites of plants? *Trends Plant Sci.* 19, 36–43.

Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldán, I., Montero, M., Muñoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., et al. (2009). Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *Plant Cell* 21, 2443–2457.

Taborisky, J. (1952). Historic and ethnologic factors in the distribution of trachoma. *Am. J. Ophthalmol.* 35, 1305–1311.

Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., and Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5, 123–135.

Tower, P. (1963). The history of trachoma: its military and sociological implications. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 69, 123–130.

Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R. (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiol. Bethesda Md* 20, 326–339.

Tyra, H.M., Linka, M., Weber, A.P.M., and Bhattacharya, D. (2007). Host origin of plastid solute transporters in the first photosynthetic eukaryotes. *Genome Biol.* 8, R212.

Ugalde, J.E., Parodi, A.J., and Ugalde, R.A. (2003). De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10659–10663.

Webb, S.G. (1990). Prehistoric eye disease (trachoma?) in Australian aborigines. *Am. J. Phys. Anthropol.* 81, 91–100.

Weber, A.P.M., Linka, M., and Bhattacharya, D. (2006). Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in *Plantae* from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryot. Cell* 5, 609–612.

Whatley, J.M. (1981). Chloroplast evolution--ancient and modern. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361, 154–165.

Williamson BD, Favis R, Brickey DA, Rutherford CL. (1996). Isolation and characterization of glycogen synthase in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet* 19:350–364
Wilson, W.A., Roach, P.J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Eydallin, G., Viale, A.M., and Pozueta-Romero, J. (2010). Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 952–985.

Yep, A., Ballicora, M.A., Sivak, M.N., and Preiss, J. (2004). Identification and characterization of a critical region in the glycogen synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 8359–8367.

Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., and Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 809–818.

Yoon, H.S., Reyes-Prieto, A., Melkonian, M., and Bhattacharya, D. (2006). Minimal plastid genome evolution in the *Paulinella* endosymbiont. *Curr. Biol. CB* 16, R670–R672.

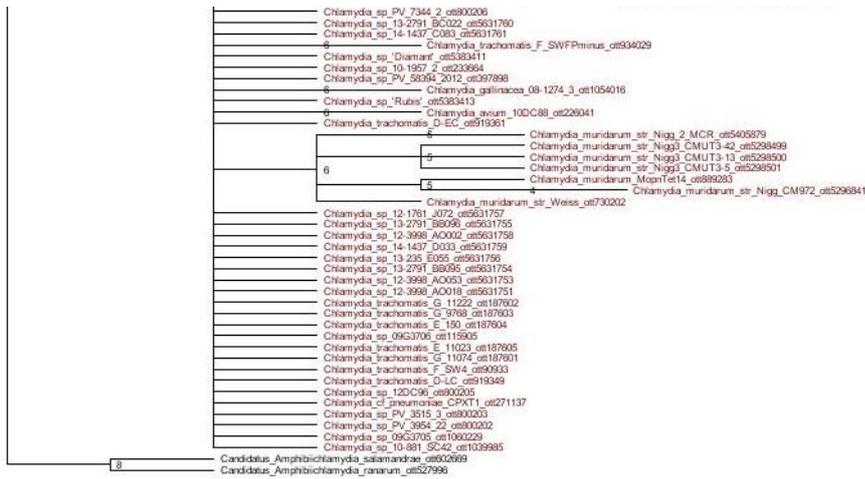
Zychlinsky, A., and Sansonetti, P.J. (1997). Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol.* 5, 201–204.

ANNEXES

Arbres phylogénétiques

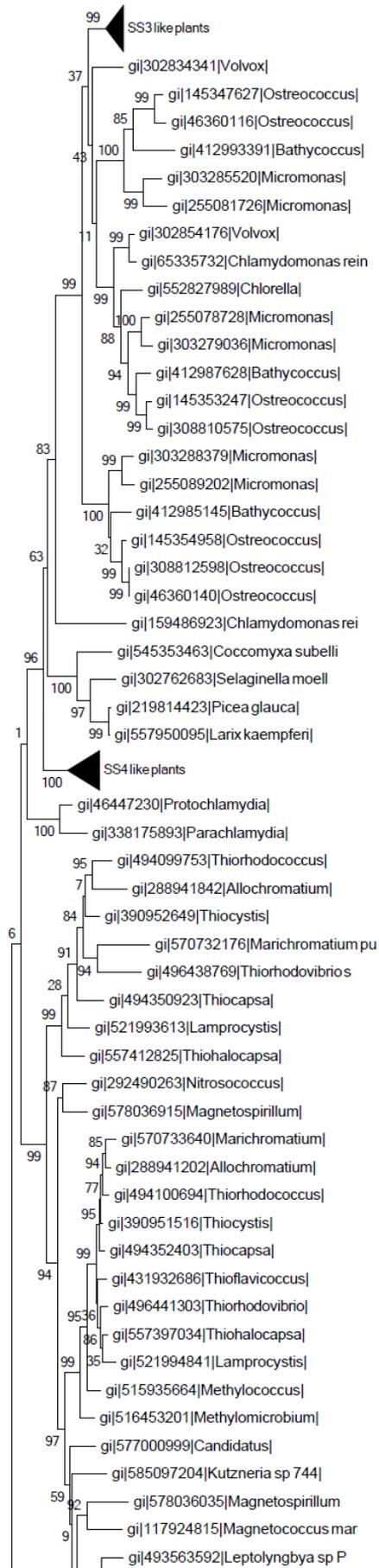


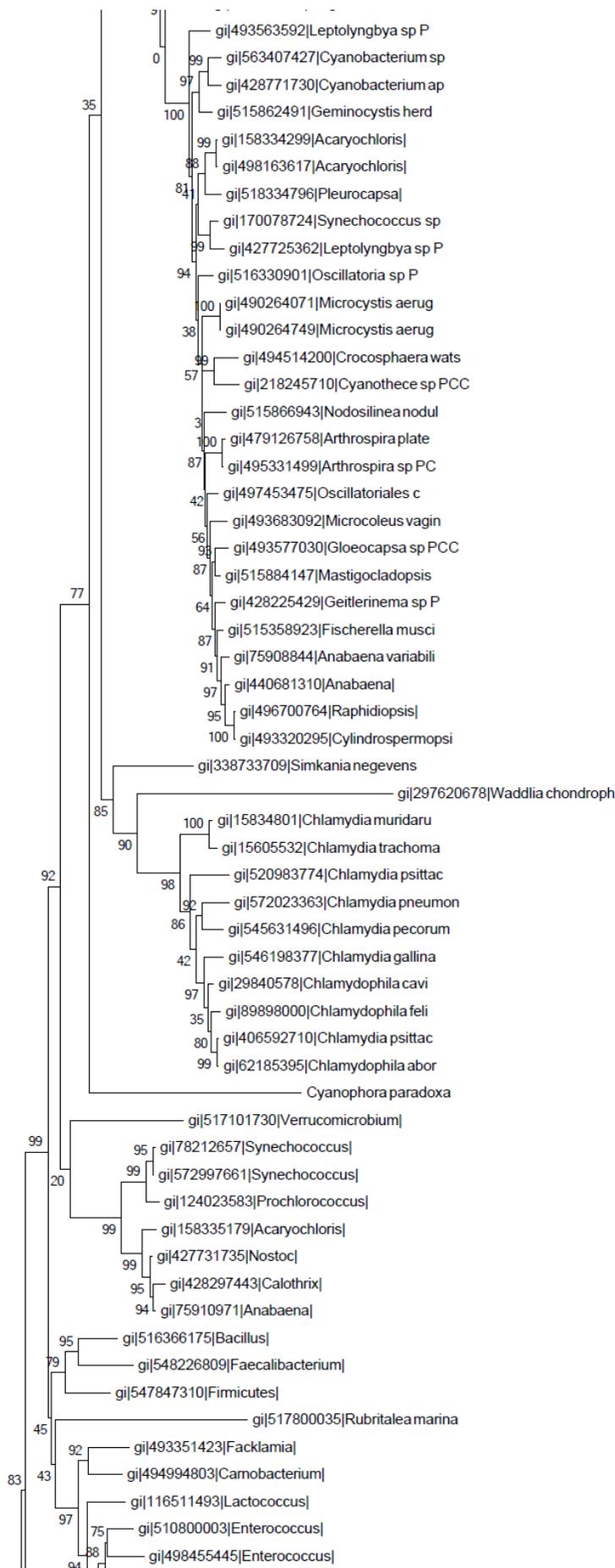




1.1

Figure annexe : Classification complète des chlamydiales, réalisée avec la phylogénie suivant leur ARN 16S. (Sources : opentreeoflife.org)





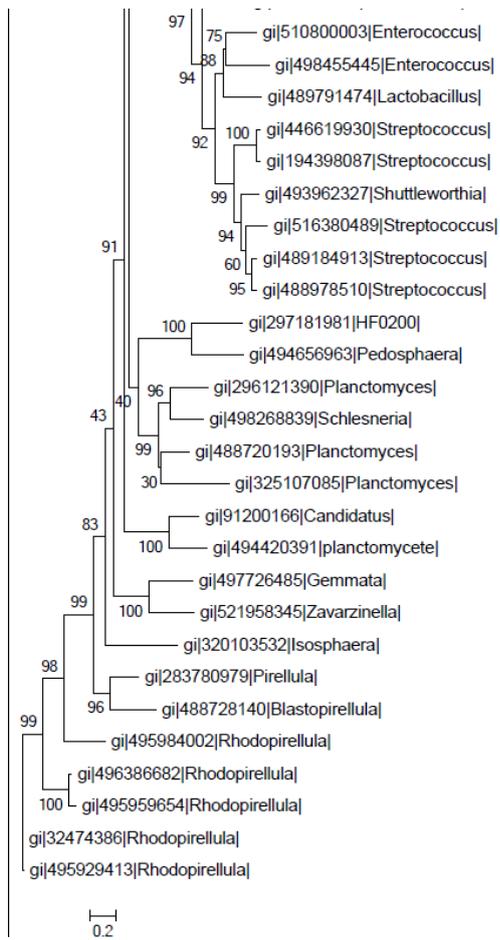


Figure annexe : représentation phylogénétique des glycogène/amidon synthases incluant les chlamydiales.

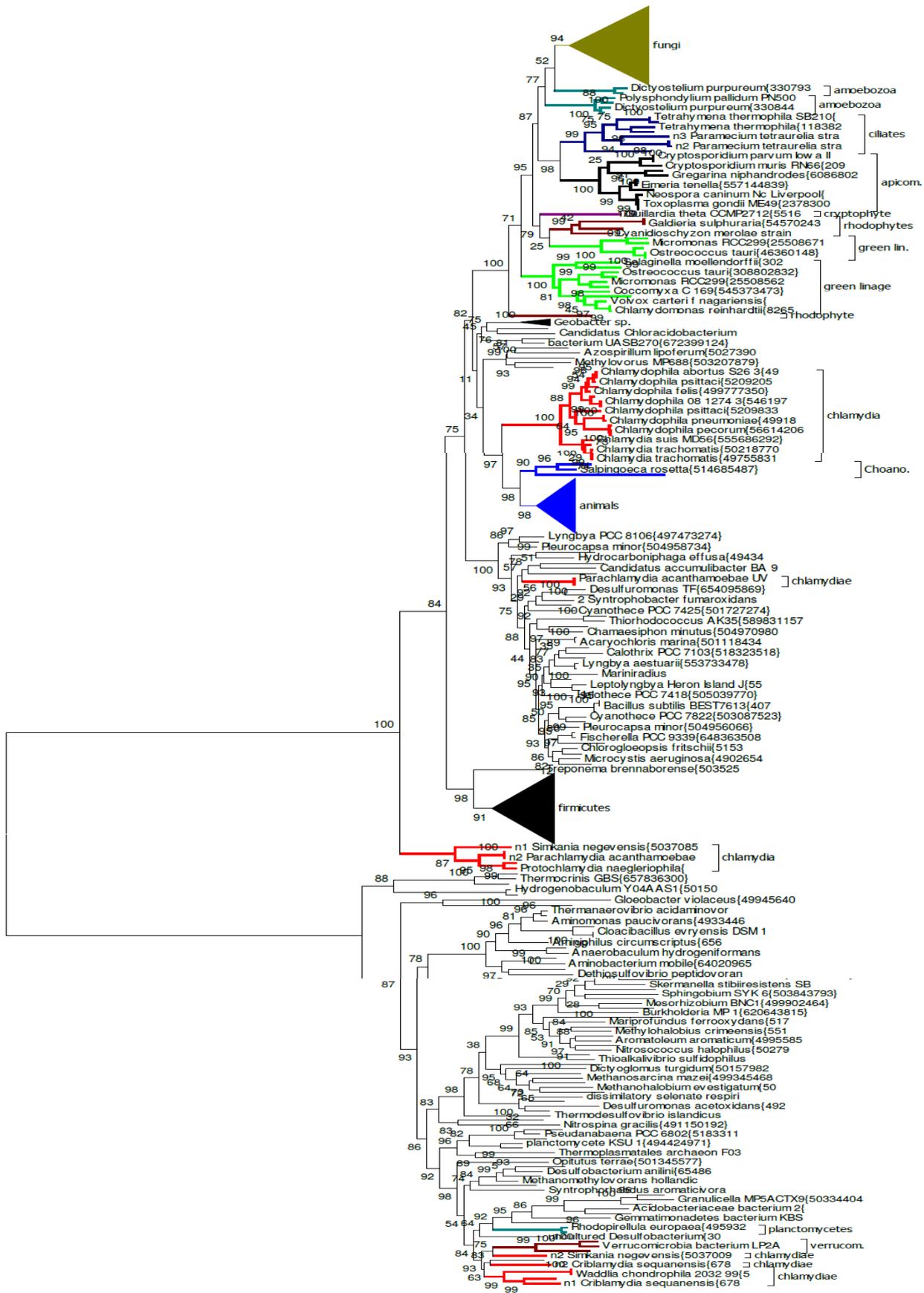


Figure annexe : représentation phylogénétique des phosphoryases, attestant de l'origine polyphylétique des phosphorylases de chlamydiales.

Travaux initiés au cours de ma thèse

A) *Dictyostelium discoideum*, partenaire d'une future symbiose tripartite in vitro ?

1) Introduction

La possibilité de réaliser une symbiose en laboratoire regroupant tous les éléments de l'endosymbiose primaire du plaste, une cellule eucaryote hétérotrophe, une cyanobactérie ainsi qu'une chlamydiale, permettrait de répondre à nombre de questions encore non résolues. *Dictyostelium discoideum* est un eucaryote appartenant aux Amoebozoae, aussi appelée amibe sociale en raison de ses différents cycles de reproduction. C'est un organisme modèle. Cette amibe prolifère en se nourrissant de bactéries. Cela se traduit en laboratoire par la culture de cet organisme sur boîte de Pétri recouverte d'un tapis de bactéries. L'absence de croissance de *D. discoideum* permet de déterminer la pathogénicité de cette bactérie.

Cette amibe a un cycle de vie très particulier. Il possède trois voies : végétative, sexuée et sociale. (Figure 36)

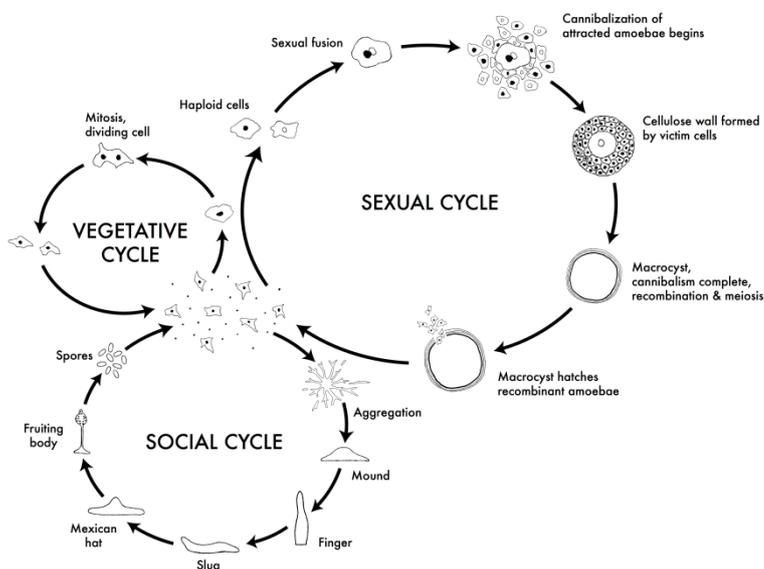


Figure 36: Les différents cycles de vie de *Dictyostelium discoideum*.

CC Creative Commons Attribution – Share Alike 3.0, David Brown & Joan E. Strassmann

Au cours du cycle sexué, comme chez d'autres organismes, des amibes haploïdes possédant des polarités sexuelles opposées (mat A et mat a) fusionnent. Le diploïde obtenu attire d'autres amibes pour les « cannibaliser ». Ces dernières forment une épaisse paroi

cellulosique autour du diploïde, appelée alors Macrokyste, qui entre en méiose. Le cycle se termine par scission du Macrokyste et sortie des amibes haploïdes nouvellement formées.

Le cycle végétatif quant à lui est tout simplement la division mitotique des cellules après la formation de kystes (sorte de protection).

Le dernier cycle possible pour ces cellules est une forme de résistance lorsque les conditions extérieures ne sont plus favorables. *D.discoideum* sécrète un chimio-attractant, l'AMPC, qui permet d'attirer d'autres cellules autour d'elle et cette agrégation permet une sécrétion encore plus importante d'AMPC, attirant d'autant plus d'amibes. Cette agrégation déclenche la formation d'un pseudo-plasmode puis d'un sporocarpe : le corps fructifiant, visible à l'œil nu. Ce dernier est constitué d'une tige terminée par une boule d'amibes. Les amibes composant la tige ne survivront pas alors que celles de la boule, quand les conditions redeviendront favorables, se différencient à nouveau en spores viables. (Shaulsky and Kessin 2007)

Un détail important à noter également est que *D.discoideum* est capable de « cultiver » des bactéries. (Brock *et al.* 2011) Elle est en effet capable d'incorporer des bactéries dans le corps fructifiant, pour ensuite pouvoir ensemercer une source de nourriture déjà prête à l'endroit de la dispersion des spores.

Dictyostelium discoideum étant un organisme modèle, celle-ci est manipulable génétiquement avec une banque de donnée assez conséquente (<http://www.dictybase.org>). Il s'avère qu'elle est capable de cultiver/de se faire infecter par une chlamydiale récemment découverte : *Estrella lausannensis* (Lienard *et al.*, 2011). L'idée est d'utiliser cette propriété pour créer une symbiose expérimentale entre la Chlamydiale et l'amibe, l'une complétant une déficience de l'autre.

Production de mutants de *Dictyostelium discoideum* et étude phénotypique du métabolisme du glycogène dans les souches sauvages et mutantes de cet organisme.

La production de mutant de *D.discoideum* a été initiée dans le laboratoire du professeur Thierry Soldati de la faculté des sciences de Genève (Suisse). Des mutants knock-out d'une des synthases (la GT5) ainsi que de la glycogénine ont été obtenus et isolés, vérifiés par extraction d'ADN puis séquençage. Le mutant *glcS*- (glycogène synthase GT3 déjà étudié par d'autres équipes) (Williamson *et al.* 1996) ainsi que les doubles mutants combinés de ces trois protéines restent également à produire. Il s'avère en fait qu'un mutant *glcS*- existe déjà dans les banques de mutants de Dictybase.org, mais la souche utilisée (AX4) est différente de celle que nous avons employée dans cette étude (AX2), et n'est apparemment pas axénisée correctement. Les études concernant les synthases à glycogène n'ont pour l'instant été reportées que pour le gène *glcS*, et ont conclu que l'enzyme était UDP-glucose dépendante.

Tenant compte de cette observation, il faudra utiliser une chlamydiale (et donc sa synthase) à condition que celle-ci est capable à la fois de croître dans *D.discoideum*, mais également d'utiliser l'UDP-glucose. *Waddlia chondrophila* ou *Chlamydia trachomatis* peuvent être des candidats efficaces si *Estrella lausannensis* ne répond pas à tous ces critères *in vivo*.

Dans nos expériences précédentes, nous avons pu démontrer que la glycogène synthase d'*E.lausannensis* était tronquée, et ne présentait aucune activité sur gel. Malgré cela, nos expériences sur *D.discoideum* sont restées sur l'expression d'*E.lausannensis* dans *D.discoideum*, mais la preuve de culture de *W.chondrophila* (Lamoth *et al.* 2015) dans cette amibe va nous faire changer de chlamydiale.

L'étude phénotypique de la souche sauvage ainsi que des mutants se fera dans le laboratoire du professeur Steven Ball. Une caractérisation du glycogène produit par *D.discoideum* sera réalisée, ainsi que la visualisation (tant que faire se peut) des activités des enzymes du métabolisme du glycogène, notamment par gel d'activité (ou zymogramme).

2) Matériels et Méthodes

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN de *D.discoideum* se fait selon le protocole du kit « Wizard® Genomic DNA Purification Kit » à partir d'une culture d'amibes à 80 % confluente.

Construction des vecteurs KO pour *D.discoideum*

Les amorces ayant permis la construction des KO de *D.discoideum* sont dans le tableau 10.

Dicty_glcS_F_PCR1	AGCGCGTCTCCAATGGGTACCTGGTTGTCATTTTTCAATTTCC
Dicty_glcS_R_PCR1	AGCGCGTCTCCGTTGAATGTTGAATTTGGTGTTCC
Dicty_glcS_F_PCR2	AGCGCGTCTCCCTTCACAACAGCAACACCAACACC
Dicty_glcS_R_PCR2	AGCGCGTCTCCTCCCGGTACCTTGGCATTTCATTGGTTACCTTGG
Dicty_gtr2_F_PCR1	AGCGCGTCTCCAATGGGTACCAAAAAGTTGGCCAGTGTTGG
Dicty_gtr2_R_PCR1	AGCGCGTCTCCGTTGTGGTATTGTTGGTGATGATGG
Dicty_gtr2_F_PCR2	AGCGCGTCTCCCTTCCTGTTGTTGCTGAAGCTTGG
Dicty_gtr2_R_PCR2	AGCGCGTCTCCTCCCGGTACCGGGTGTGTGCAAGAAATTTGG
Dicty_gtr3_F_PCR1	AGCGCGTCTCCAATGGGTACCTTTGTTACCCACATTCTCTACC
Dicty_gtr3_R_PCR1	AGCGCGTCTCCGTTGTTGGGTGTCTATTGTTTGTGG
Dicty_gtr3_F_PCR2	AGCGCGTCTCCCTTCGCCGGTCTAAAAGAATTACCAAAACC
Dicty_gtr3_R_PCR2	AGCGCGTCTCCTCCCGGTACCCCTTTTTCAATCCATGATACACC

Tableau 10 : Amorces pour les Knock-Out de *D.discoideum*

Les KO de gènes chez *D.discoideum* se font à l'aide du kit Stargate pKOSG-IBA-dicty1 (Figure 37)

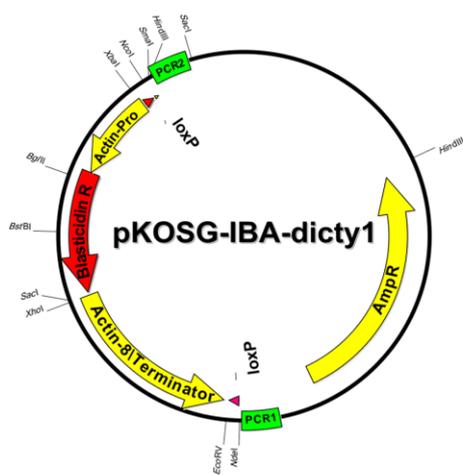


Figure 37 : Carte du plasmide pKOSG-IBA-dicty1 permettant la réalisation des mutants KO de *D.discoideum* par recombinaison homologue. PCR1 et PCR2 correspondent à la localisation des fragments amplifiés situés en amont et en aval du gène à enlever.

Pour créer les plasmides permettant par la suite de réaliser les KO des gènes d'intérêts il est nécessaire de réussir deux PCR correspondant à 1000pb chacune sur les zones situées en amont et en aval de ce gène. Or l'organisme possède un génome AT riche, et ce d'autant plus dans les régions intergéniques, ce qui ne facilite pas les PCR. Diverses méthodes doivent donc être testées pour l'amplification de chaque gène.

En général ce qui fonctionne le mieux est une température d'hybridation pas trop haute (<55°C), un temps d'élongation plus long que celui prédit par le fournisseur de Taq, une température d'élongation basse (~62°C), une quantité maximale de Mg²⁺ permise par la Taq, deux bases G ou C en 3' de chaque amorce, pas de DMSO dans le mix PCR et l'utilisation d'une Taq PHUSION.

En revanche il faut tout de même souvent tester les différentes options pour adapter en fonction de la zone à amplifier.

Insertion des deux fragments PCR dans le plasmide pKOSG-IBA-dicty1, vérification par PCR puis séquençage des deux inserts.

Transfection de *D. discoideum*

Centrifuger une culture à 80% confluente de *D.discoideum*, laver le culot dans du tampon EP (10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 50mM Saccharose, pH 6.2) froid, et resuspendre dans du tampon EP++ (10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 50mM Saccharose, 1mM MgSO₄, 1mM NaHCO₃, 1mM ATP, 1μM CaCL₂, pH 6.2). Ajout de 10μg d'ADN plasmidique linéarisé. Electroporation en cuvette : 300V ; 2ms x 5 cycles (soit 5 secondes d'impulsion avec 1 impulsion par seconde). Laisser dans la glace 10 minutes puis ajouter 1mL de milieu HL5c à répartir ensuite dans 3 boîtes de 10mL. Incuber une nuit à 22°C puis appliquer la sélection à la blastocydin (3, 5 ou 7

µg/mL). Incuber 2 à 5 jours en fonction de la croissance des cellules puis ajouter la pression de sélection.

Isolation d'un clone

Préparer une préculture de *Klebsiella aerogenes* en milieu SM/2 (KH₂PO₄ (0,44%), Na₂HPO₄ (0,2%), MgSO₄.7H₂O (0,1%), Glucose (0,75%), Bacto-peptone (1%), Agar (1,5%)) liquide (une nuit à 37°C). Mélanger 100µL de cette culture avec une dilution des cultures de *D.discoideum* sélectionnées contenant 100 à 200 cellules, étaler sur du milieu solide SM/2. Incuber en milieu humide à 22°C le temps de voir apparaître des plages de lyse distinctes (2-10 jours). Récupérer les clones de *D.discoideum* (extérieur de la plage de lyse) et remettre en culture en milieu HL5c avec blastocytin. Quand la culture arrive à 80 % de confluence, faire un stock en azote liquide et extraire l'ADN pour vérifier le Knock-Out.

Infection d'une amibe par une chlamydiale

Les cellules d'amibes sont cultivées 24h en flasque de 10mL, puis on place 10⁵ cellules dans chaque puits de plaque 24 puits (dans lesquels sont placés préalablement des lamelles de verre dans le cas d'une immunofluorescence).

A partir d'une culture d'amibes préalablement infectées par des chlamydiales sur 48h, filtrée à 0,45µm pour enlever les débris cellulaires d'amibes tout en conservant les bactéries, diluer au 1/1000 et mettre dans les puits pour obtenir environ une bactérie par cellule. Centrifugation des plaques 24 puits 1700g 10 min (inoculation par centrifugation).

A différents temps, laver au PBS et récupérer directement les cellules en grattant les puits pour une qPCR, ou mettre à -20°C en présence de méthanol puis fixer dans du blocking buffer (PBS, 10% FCS, 0,1% saponine, 0,04% azide).

Dans le cas d'une immunofluorescence, les lamelles de verre sont rincées au PBS + saponine 0,1%, pour ensuite être mises en contact 2h avec les anticorps primaires dirigés contre les cellules de la chlamydia (spécifique pour *Estrella lausannensis*, produit chez la souris et fourni par Carole Kebbi-Beghdadi), rincées, et mises en contact avec les anticorps secondaires + Concanavane (révélation des cellules d'amibes) + Dapi (coloration de l'ADN en général) pendant 1h. Après rinçage, fixation sur lame au Möwel (verniss).

Les observations se font au microscope à fluorescence.

3) Résultats

La première étape de la reconstitution d'une symbiose entre une amibe et une chlamydiale était de vérifier qu'une coculture était bien réalisable.

Pour ce faire, en premier lieu la culture d'*E.lausannensis* dans *D.discoideum* a été de nouveau réalisée en laboratoire (Lausanne), et l'infection sur 24h de *D.discoideum* par *E.lausannensis* a été suivie par qPCR (Figure 38) ainsi que par immunofluorescence (Figure 39) avec des anticorps dirigés contre *E.lausannensis* (en vert) et contre *D.discoideum* (en rouge).

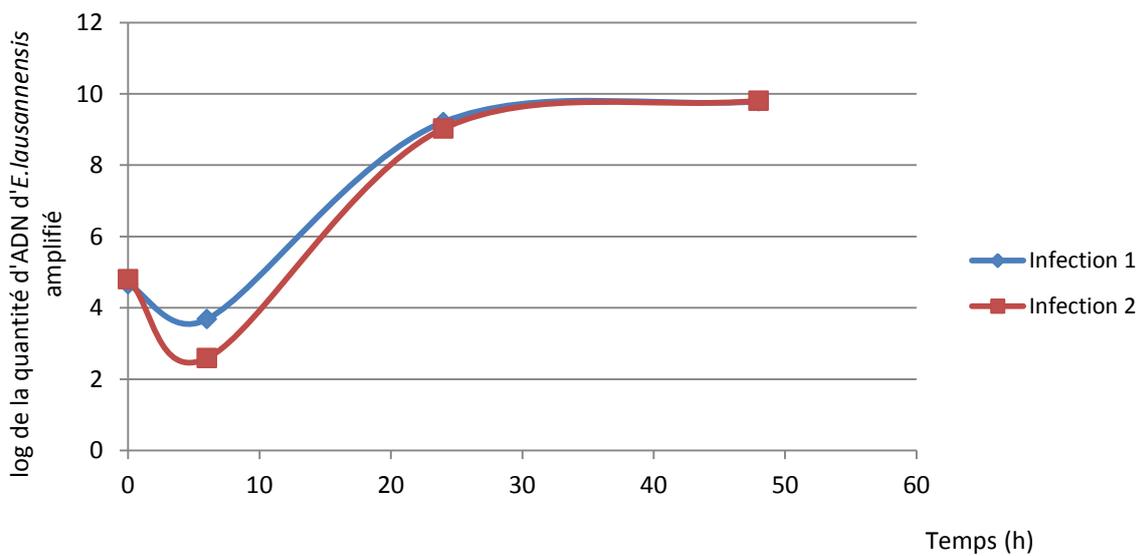


Figure 38 : Quantité d'*E.lausannensis* en fonction du temps lors d'une infection chez *D.discoideum*.

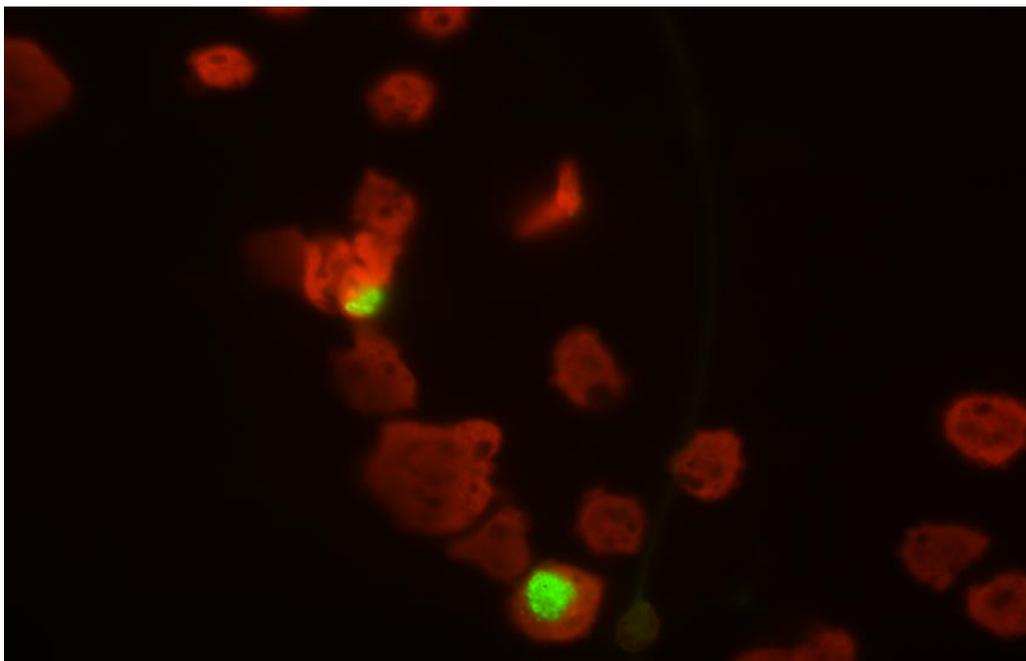


Figure 39 : immunofluorescence d'une infection de *D.discoideum* par *E.lausannensis* après 24h. Les amibes sont en rouge et les bactéries en vert. (Grossissement X100)

Les bactéries sont bien capables de croître en présence de *D.discoideum*, et sont bien localisées à l'intérieur des cellules d'amibes, ce qui nous permet d'entamer la seconde phase des expériences avec *D.discoideum*, à savoir l'obtention de mutants synthase (*glcS* et *gtr2*) et glycogénine (*gtr3*) dans le but de les compléter avec une enzyme chlamydieuse puis par une infection de chlamydia elle-même.

Mutants chez *D.discoideum* :

Les résultats des produits de PCR obtenus ainsi que les plasmides de KO produits sont dans le tableau 11.

	PCR1	PCR2	Plasmide KO
<i>glcS</i> (synthase GT3)	OK	NON	NON
<i>gtr2</i> (synthase GT5)	OK	OK	OK
<i>gtr3</i> (glycogénine)	OK	OK	OK

Tableau 11 : Etat d'avancement des mutants knock-out de *Dictyostelium discoideum*

La production de 2 mutants de *D.discoideum* a été réalisée, l'un pour le gène *gtr2* et l'autre pour le gène *gtr3*. Les cellules transfectées avec les différents plasmides de KO ont tout d'abord été sélectionnées à la blastocystine, puis après obtention d'une culture confluente à 80%, 100 cellules de chaque ont été déposées sur une boîte de Pétri en présence en excès d'une culture de *K.aeruginosa*. Des clones isolés ont été obtenus (sélectionnés par plages de lyse après culture en milieu minimum et en présence de *K.aeruginosa* pour substrat) (Figure 40), stockés en azote liquide. L'ADN a été extrait de ces cellules et la présence de l'insert conférant les mutations KO a été vérifiée en séquençage.

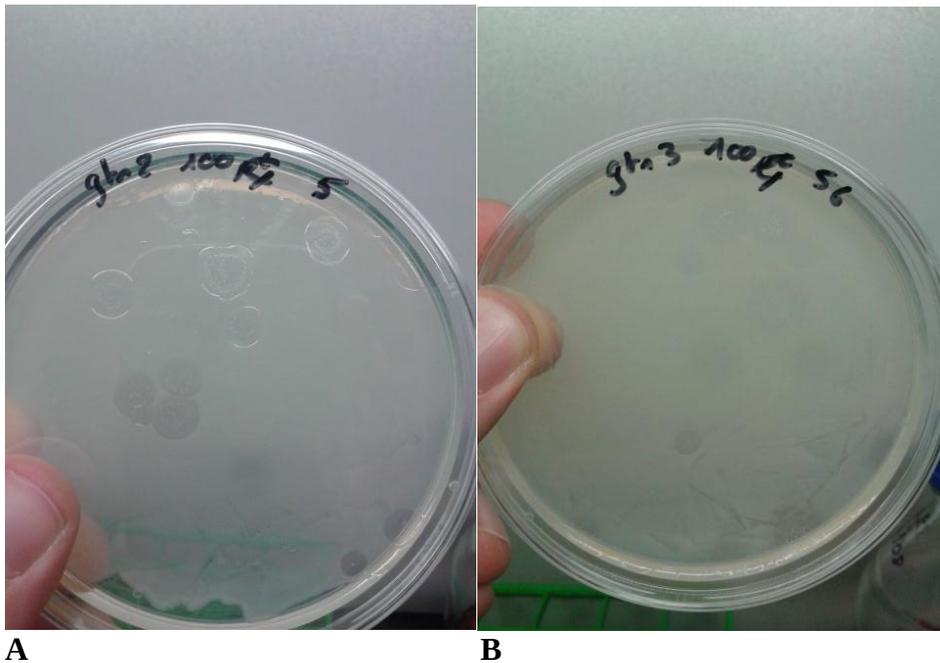


Figure 40 : Plages de lyse formées par des clones isolés de *D.discoideum* dans un tapis bactérien (*K.aeruginosa*). A : plages de lyse obtenues pour le mutant KO *gtr2*⁻. B : plages de lyse obtenues pour le mutant KO *gtr3*⁻

4) Perspectives

Les KO réalisés, il est nécessaire d'avoir une différence de phénotype facilement observable entre ces mutants et la souche sauvage pour nous permettre d'être en mesure de repérer aisément une complémentation.

L'obtention d'une plage de lyse avec une cellule isolée de la souche sauvage prend entre 2 et 3 jours, alors que pour les deux mutants elle est de 7 à 9 jours (Figure 41). On peut envisager à ce stade-là de pouvoir repérer une complémentation en fonction du temps de formation de la plage de lyse.



Figure 41 : Formation de plages de lyse de *K.aeruginosa* mangé par *D.discoideum* sauvage (WT) et muté en *gtr2* et *gtr3*.

La complémentation de *D.discoideum* va pouvoir être réalisée à l'aide de nouvelles constructions de vecteur permettant l'expression d'enzymes recombinantes chez *D.discoideum*. Une complémentation potentielle du phénotype d'apparition lente de plage de lyse permettra de conclure que l'amibe est capable d'utiliser la synthase à glycogène d'*Estrella lausannensis* pour compléter sa mutation.

Dictyostelium étant une amibe se nourrissant de bactéries, le développement des plages de lyse se faisant sur un tapis de culture de *K.aerogenes*, il est logique de se poser la question de savoir si elle est capable de se développer en présence de cyanobactéries uniquement. Une des expériences préliminaires à réaliser avant d'atteindre la symbiose tripartite est donc de tenter la croissance de l'amibe sur un tapis cellulaire de différentes cyanobactéries.

Les cyanobactéries disponibles dans notre laboratoire sont *Synechocystis* PCC 6803 (organisme modèle pour les cyanobactéries) ainsi que *Cyanobacterium* sp. CLg1, il est donc logique de débiter par là.

Une fois cette croissance avérée, ainsi que la complémentation des mutants de *D.discoideum* réussit, la suite de l'expérimentation pourra continuer : Faire croître *D.discoideum* muté, complémenté par une synthase de chlamydiales, sur un tapis cellulaire de cyanobactéries.

La dernière étape sera de réaliser cette expérience avec les cellules mutées de *D.discoideum*, mais cette fois-ci en présence d'*Estrella lausannensis* directement, en trouvant un moyen de limiter sa croissance (un petit peu à la manière de corps aberrant de Chlamydiales

responsables d'infection chronique) pour que la synthèse de la bactérie puisse être utilisée sans que l'amibe ne soit lysée trop rapidement. Le but étant toujours d'observer cette complémentarité sur plages de lyse de cyanobactéries.

B) Les transporteurs de nucléotides sucre

1) Introduction

Le transporteur de carbone photosynthétique ancestral, mis en œuvre lors de l'endosymbiose primaire du plaste.

Notre laboratoire a proposé au cours de la reconstitution du réseau métabolique de l'amidon dans le cytosol de l'ancêtre commun des archaeplastides que le lien symbiotique unissant la cellule hôte et la cyanobactérie s'est mis en place par l'exportation du nucléotide-sucre, ADP-glucose, synthétisé par la cyanobactérie ancestrale. Ce métabolite, issu de l'activité photosynthétique de la cyanobactérie, est exclusivement impliqué dans la synthèse de polysaccharide de réserve. Ce point est important puisqu'il autorise une fuite de métabolite sans entraîner une perte de viabilité pour la cellule. Toutefois, cette hypothèse entraîne deux conditions : d'une part le maintien de l'ADP-glucose pyrophosphorylase dans le cytosol de la cyanobactérie et d'autre part, la présence d'un transporteur de nucléotide-sucre capable d'exporter ce dernier dans le cytosol de la cellule hôte. Parallèlement, le transfert massif de gènes de la cyanobactérie vers le génome de la cellule hôte permet l'émergence de nouvelles fonctions métaboliques dont les enzymes du métabolisme de l'amidon autorisant l'incorporation de l'ADP-glucose au niveau du polysaccharide de réserve de la cellule. Rappelons que l'ADP-glucose n'est pas métabolisable dans les cellules animales et fongiques. Il n'existe aucun gène dans les génomes d'eucaryotes codant pour des enzymes capables de synthétiser et d'utiliser ce nucléotide-sucre. Comment l'ADP-glucose fut-il exporté vers le cytosol la cellule hôte ancestrale après l'internalisation de la cyanobactérie? L'étude phylogénique des transporteurs localisés au niveau des plastes des plantes et des algues rouges offre un nouvel éclairage sur leur histoire évolutive. En effet, il apparaît que les principaux transporteurs de carbone d'hexoses-phosphates, de triose-phosphates (TPT) dériveraient tous d'un transporteur de nucléotide-sucre (NST) provenant de la cellule hôte (Weber *et al.*, 2006). Ces NST transportent les nucléotide-sucres à travers la membrane de l'appareil de Golgi nécessaire à la glycosylation des protéines. Parce que le GDP-mannose et l'ADP-glucose sont tous les deux constitués d'une base purique et que la spécificité des transporteurs repose sur la nature de cette dernière, nous avons voulu tester, par la reconstitution de liposomes, que les transporteurs de GDP-man, Vrg4 de levure et GONST1 d'*Arabidopsis* sont capables de transporter de manière significative de l'ADP-glucose. Le résultat fut sans appel, bien que ces derniers ne soient pas phylogénétiquement les plus

proches du transporteur ancestral, nous avons pu montrer que la cellule hôte ancestrale possédait des transporteurs endogènes capables d'exporter l'ADP-glucose au niveau de la membrane plasmique de la cyanobactérie (Colleoni *et al.*, 2010).

Il existe aujourd'hui une autre hypothèse concernant l'origine de ces transporteurs. La découverte sur la membrane des cyanelles des Glaucophytes d'un transporteur de type UhPC tel que celui que l'on retrouve chez les bactéries (régulateur osmotique chez *E.coli*, mais transporteur chez les Chlamydiales), attesterait d'une origine pour ce transporteur plutôt chlamydiales. (Figure 42)

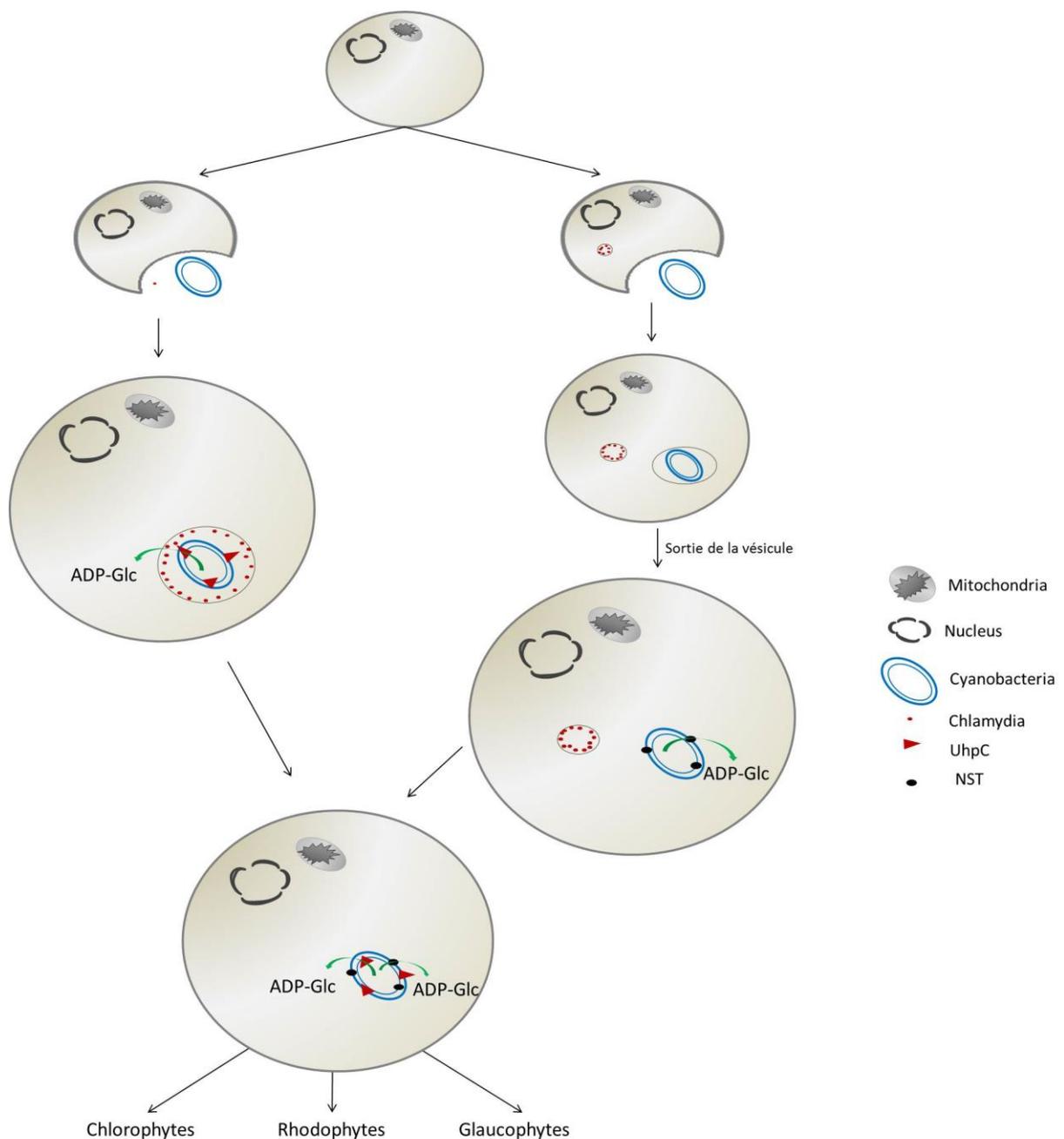


Figure 42 : Histoire hypothétique de l'origine du plaste ainsi que du transporteur de carbone photosynthétique ayant permis le maintien du lien symbiotique entre la cyanobactérie et la cellule hôte eucaryote. La voie de gauche correspond au cas où la cyanobactérie et la chlamydiale ont été endocytées en même temps. Cela conduit à la formation d'une seule vésicule et la sortie d'ADP-glucose de la cyanobactérie vers le cytosol de la vésicule puis celui de l'hôte par le transporteur UhpC produit par la chlamydiale. La voie de droite représente l'internalisation de la cyanobactérie alors que la chlamydiale infectait déjà l'hôte. Cela engendre donc une troisième membrane entourant directement la cyanobactérie dont elle a dû s'échapper (« sortie de la vésicule ») au cours de l'évolution. Le transporteur NST provenant de l'hôte eucaryote est alors directement impliqué pour faire sortir l'ADP-glucose de la cyanobactérie.

L'objectif est donc de caractériser des transporteurs plus proches phylogénétiquement du transporteur ancestral en suivant les indications de nouvelles données phylogénétiques (Figure 43).

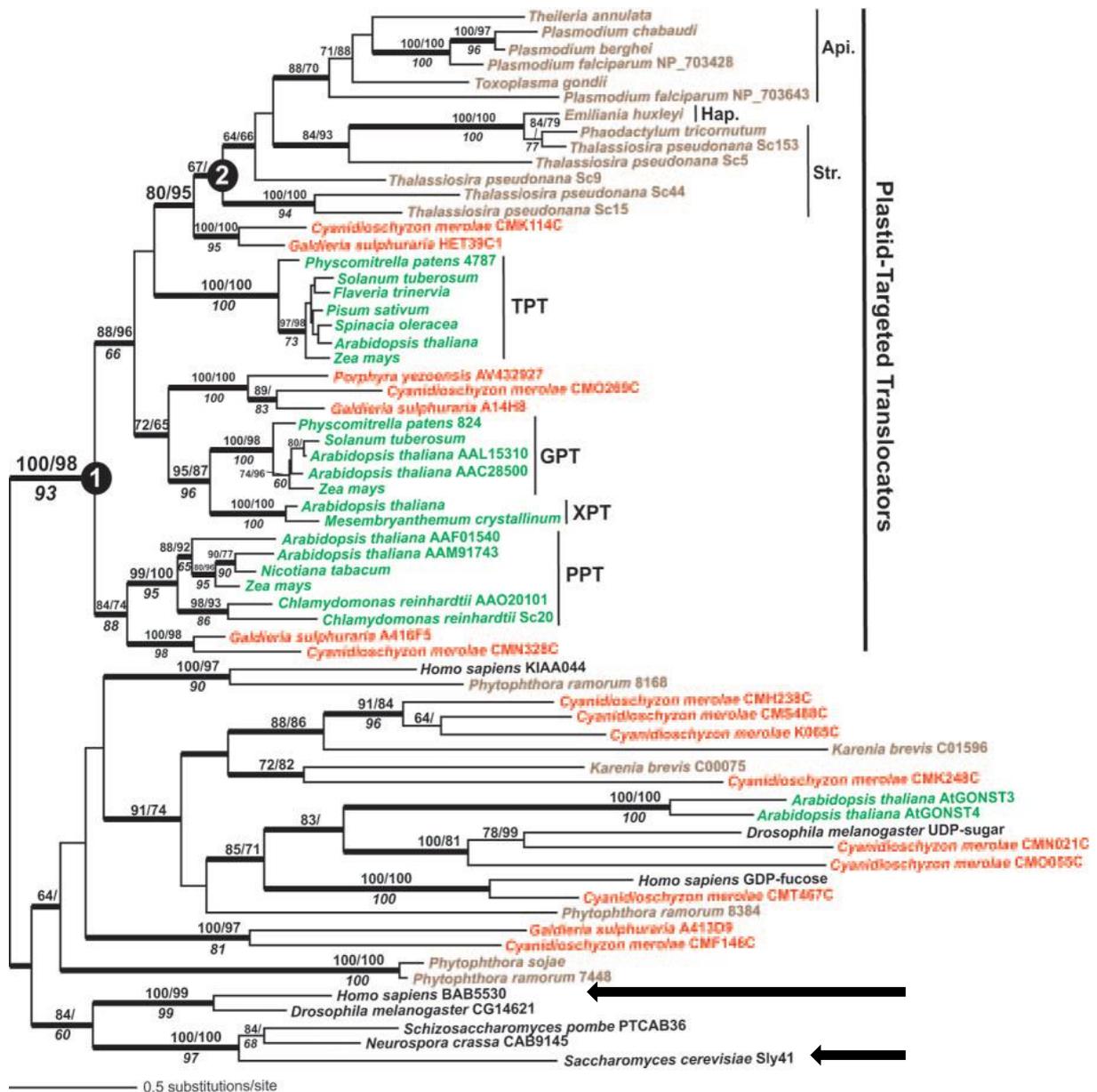


Figure 43 : Arbre phylogénétique des translocateurs de sucres, proches du transporteur d'ADP-glucose sur les plastides. Il apparaît que les principaux transporteurs de carbone d'hexoses-phosphates, de triose-phosphates (TPT) dérivent tous d'un transporteur de nucléotide-sucres (NST) provenant de la cellule hôte. Ces NST transportent les nucléotide-sucres à travers la membrane de l'appareil de Golgi nécessaire à la glycosylation des protéines. Les flèches noires correspondent aux deux transporteurs que nous étudions dans ce manuscrit.

Notre attention s'est portée sur les transporteurs Sly41p des mycètes et NST3-PTh-KR de l'Homme. Cette sous-famille de transporteur n'a fait pour l'instant l'objet d'aucune caractérisation biochimique. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Sly41p constitue, avec Sly12p,

Sly1-20p et Sly2p un groupe de suppresseur de la mutation Ypt1 (Dascher *et al.*, 1991 ; Ossig *et al.*, 1991). La protéine YPT1 appartient à la famille des protéines RAS. Elle est impliquée dans le trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.

Le but est d'exprimer les transporteurs mentionnés précédemment afin de déterminer leur propriété cinétique pour les nucléotide-sucres. La méthode est pour l'instant à l'épreuve avec le transporteur Sly41p (*S. cerevisiae*) et NST3-Pth-KR (humain), mais également GONST1, et en fonction du succès de cette manœuvre, l'expérience sera réitérée avec d'autres transporteurs.

Pour l'instant la méthode est éprouvée en produisant les transporteurs Sly41p et NST3-Pth-KR dans la souche de levure INVSc1 (Invitrogen *S.cerevisiae*) avant de réitérer l'expérience avec d'autres transporteurs (en fonction du succès de cette manœuvre). Chez *S.cerevisiae*, l'absence d'intron autorise une amplification directe du gène SLY41 à partir de l'ADN génomique puis le clonage de l'amplifiat directement dans le vecteur d'expression de levure pYES 2.1. En ce qui concerne NST3-Pth-KR, transporteur humain, il a été produit sous la forme de gène synthétique directement cloné dans le vecteur d'expression de levure INVSC1 par LifeTechnologies.

2) Matériels et Méthodes

Souches et plasmides

Levures		
<i>S.cerevisiae InvSc1</i>	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen
<i>S.cerevisiae BW4743</i>		ATCC:201390
Plasmide		
pYES2.1/V5-His Topo	Promoteur P-GAL1; AmpR; Tag-Histidine en position C-ter	Invitrogen

Tableau 12 : Souches et plasmides utilisés

Milieux de culture

Les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sont cultivées à 30°C sous agitation à 120 rpm en milieu YPD (Yeast extract, Pectone, Dextrose). Les transfusions de levures se font en milieu SC-U (milieu S0 complété avec du Glucose à 2 % (P/V) ou du Galactose à 2 % (P/V) pour induire la production d'enzymes recombinantes, auquel on ajoute tous les acides aminés nécessaires à la croissance de la levure excepté l'Uracile permettant de voir si la transfection a bien fonctionné).

Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN de *S.cerevisiae* en vue d'une utilisation pour amplifier un gène par PCR s'est faite suivant la méthode de (Lõoke *et al.*, 2011) à partir d'une colonie. La colonie est resuspendue dans 100µL d'une solution contenant 200mM LiOAc et 1 % (P/V) de SDS. Après une incubation de 5minutes à 70°C, 300µL d'éthanol 100 % sont ajoutés. L'ADN et les débris cellulaires sont culotés par centrifugation 3minutes à 15000g. Le culot est nettoyé par de l'éthanol à 70 %. L'ADN contenu dans le culot est alors solubilisé dans 100µL d'H2O, et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 15 secondes à 15000g. La quantité d'ADN est estimée au Nanodrop.

Clonage des gènes de transporteurs

Le gène Sly41p est amplifié par PCR (Taq KAPA HiFi HotStart de KAPABIOSYSTEMS) à partir de l'ADN génomique de la souche InvSC1 de *S.cerevisiae*. Deux stratégies suivant le protocole d'Invitrogen pour le Kit pYES2.1 : rajouter une glycine (GGG) après la méthionine d'initiation dans le cas de la construction F2, permettant une meilleure traduction par la levure du gène d'intérêt, ou ne pas en rajouter dans le cas de la construction F3. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Amorces PCR :

F_Sly41_F2: ACCATGGGGATTCAAACGCAAAGTACAGCGATCAA

F_Sly41_F3: ACCATGATTCAAACGCAAAGTACAGCGATCAA

R_Sly41: TGCCTGACGTCCATCTTTTT

Le gène humain NST3-PTh-KR a été commandé en tant que gène synthétique pour augmenter les chances d'expression dans la levure auprès de la société Lifesciences ® et directement cloné dans le vecteur pYES2.1. En effet, l'utilisation des codons étant différente chez l'homme et chez la levure avec certains codons plus rares que d'autres (voir non-utilisés), le gène synthétique optimisé pour l'expression chez la levure permettait de palier à ce problème. Les amorces ayant permis de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide sont les suivantes :

Amorces de séquençage :

F_NST_human: ATGGCTGCTGCTGCTGTT

R_NST_human: GACATCGTATCTGTTCAAAGAGT

Le plasmide contenant le gène *gonst1* de l'étude de (Colleoni *et al.* 2011) provient de notre laboratoire.

Isolation de membrane cellulaire

Une culture de cellulaire de *S.cerevisiae* (InvSc1 ou BW4743) en milieu SC-U de 50mL en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=0,5-1$) est centrifugée puis resuspendue dans du tampon de lyse (Phosphate de sodium pH7.5 à 50mM, EDTA à 1mM et Glycérol 5%) contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF à 100mM) pour obtenir une DO_{600} de 50 à 100. On y ajoute un volume égal de microbilles (0,4-0,6 mm size; Sigma Cat.No. G8772). Les cellules sont lysées dans un « TissueLyser II ®Qiagen » préalablement refroidit avec les réglages suivants : 2 fois 2 minutes à une fréquence de 30Hz. Les lysats ainsi que les billes sont alors transvasés dans des falcons de 15mL et le volume est ajusté à 10mL avec du tampon de lyse froid. Le mélange est centrifugé 1minute à 2200g à 4°C et le surnageant est alors transféré dans des tubes d'ultracentrifugation que l'on fait tourner à 100000g pendant 45minutes à 4°C. Le culot contenant les débris de membrane et donc les protéines membranaires est resuspendu dans du tampon Hepes 50mM pH 7.5 (KOH) contenant 5mM de $MgCl_2$. L'échantillon est alors prêt pour vérifier la présence des protéines membranaires voulues par analyse en western-blot, et également pour produire les membranes lysosomes. On peut conserver ces échantillons au -80°C pour une utilisation future (vérification par Western-blot entre autres).

Vérification de la présence de la protéine d'intérêt dans la membrane par Western-blot

Après extraction, les protéines membranaires sont mises à migrer sur gel SDS-PAGE 9%. Le Western-blot a été réalisé avec des anticorps primaires anti-6histidines produits chez la souris et dilué au 1 :3000 (6x-His Epitope Tag Antibody ThermoScientific ®), qui sont eux-mêmes reconnu par des anticorps anti-souris dilués au 1 :20000. La révélation se fait par ECL (enhanced chemiluminescent).

3) Résultats

Chez *S.cerevisiae*, l'absence d'intron autorise une amplification directe du gène SLY41 à partir de l'ADN génomique puis le clonage du produit de PCR directement dans le vecteur d'expression de levure pYES 2.1 (Invitrogen). Le séquençage du vecteur pYES-SLY41-6his confirme l'absence de mutation et l'orientation correcte de l'insert, et après transfection de ce vecteur dans la levure, la présence de la protéine au niveau membranaire a été révélée par Western-blot grâce à des anticorps dirigés contre la queue histidine en position carboxy-terminale après isolement des membranes de levure. La reconstitution des liposomes et les mesures cinétiques ont débuté dans le laboratoire d'Andreas Weber à l'université Heinrich-

Heine de Düsseldorf.

Les premiers tests d'expression des protéines Sly41p ont été réalisés dans la levure *S.cerevisiae* BW4743, induite au Galactose. Après expression des protéines puis extraction des membranes de la souche de levure, ces extraits ont été déposés sur gel SDS-PAGE puis transférés sur Western-blot permettant de reconnaître les protéines étiquetées histidine (le plasmide pYES2.1 conférant cette étiquette). Les résultats observés sont sur la Figure 44.

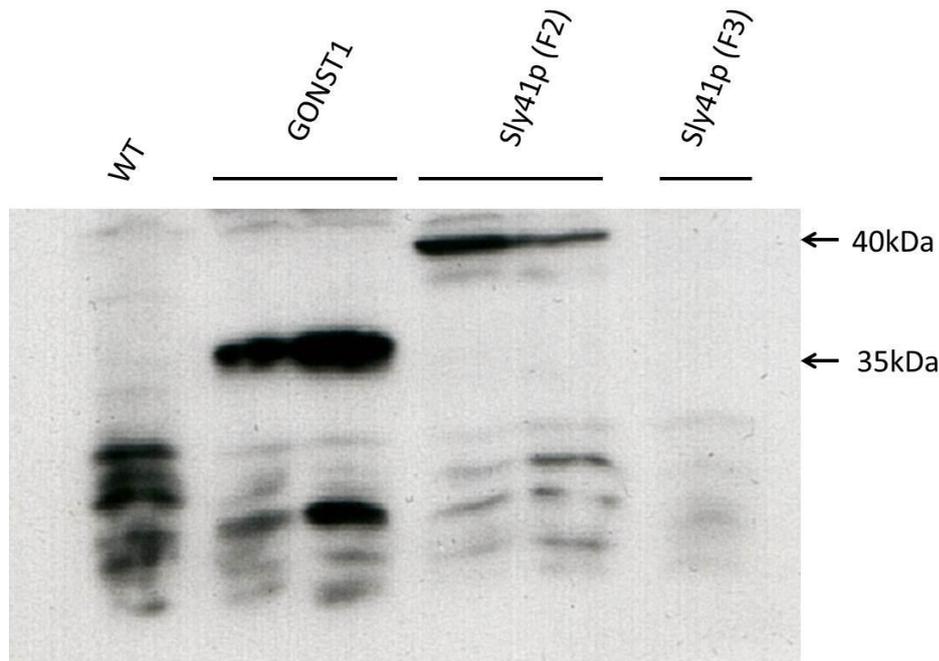


Figure 44 : Western-blot des extraits de protéines membranaires de la souche BW4743 de *S.cerevisiae* exprimant GONST1, Sly41p construction F2, Sly41p construction F3 ainsi que la souche sauvage sans insert (WT). Les constructions de GONST1 et F2 de Sly41p produisent bien la bonne protéine à la taille attendue alors que la construction F3 de Sly41p ne produit rien.

La construction de Sly41p sans la glycine supplémentaire (construction F3), exprimé dans la souche de levure BW4743 induite au Galactose ne s'exprime pas, il a donc été décidé de revenir à une souche InvSc1 connue dans la littérature pour bien exprimer les transporteurs. Ces nouvelles expressions ont été refaites dans le laboratoire du professeur Andreas Weber à l'Université Heinrich-Heine de Düsseldorf. (Figure 45). Même résultat pour la construction F3, mais cela nous a permis de tester également la production du transporteur NST3-PTh-KR.

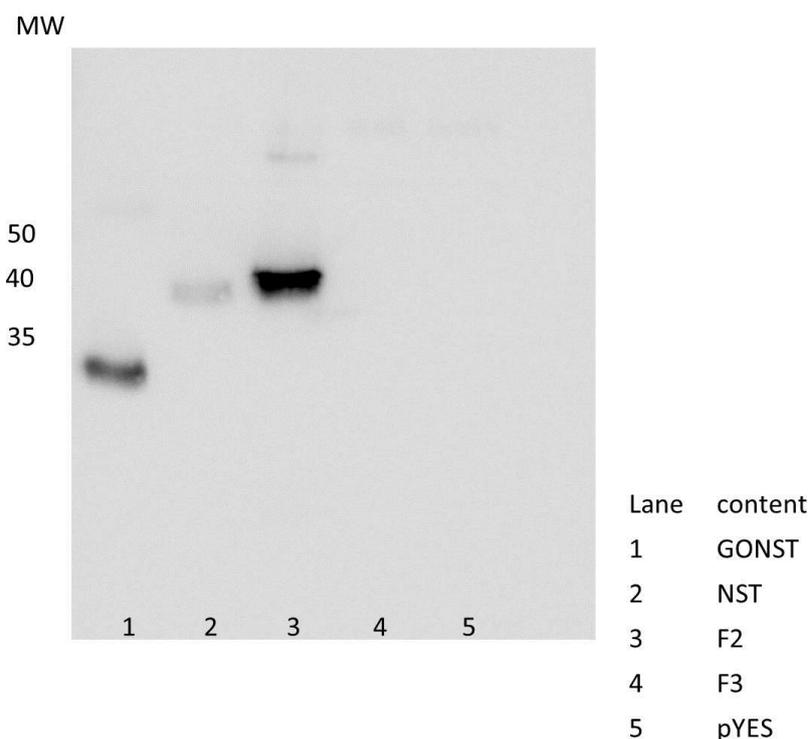


Figure 45 : Western-blot réalisé dans le laboratoire d'Andreas Weber (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) des extraits de protéines membranaires de la souche InvSc1 de *S.cerevisiae* exprimant (1)GONST1, (2)NST3-PTh-KR, (3)Sly41p construction F2, (4) Sly41p construction F3 et (5) le vecteur pYES2.1 vide. Les constructions de GONST1, NST3-PTh-KR et F2 de Sly41p produisent bien des protéines avec une taille attendue alors que la construction F3 de Sly41p ne produit rien.

Les Western-blot permettent de mettre en évidence la présence des protéines membranaires recombinantes de transporteur chez *S.cerevisiae*. Les constructions qui seront utilisées par la suite pour créer des liposomes permettant de tester le transport des nucléotides sucres seront donc, tout d'abord comme témoin positif GONST1, et ensuite la construction F2 de Sly41p, mais pas la construction F3, ainsi que la construction de NST3-PTh-KR.

4) Perspectives

Cette sous-famille de transporteur n'a fait pour l'instant l'objet d'aucune caractérisation biochimique. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Sly41p constitue, avec Sly12p, Sly1-20p et Sly2p un groupe de suppresseur de la mutation Ypt1- (Dascher *et al.*, 1991)(Ossig *et al.*, 1991). La protéine YPT1 appartient à la famille des protéines RAS. Elle est impliquée dans le trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.

Après avoir tenté de démontrer la capacité de Sly41p et NST3-PTh-KR à transporter des nucléotides sucres, ou même simplement du GTP (important pour les protéines G), l'idée est de voir si le transporteur humain, exprimé chez le mutant de levure Ypt1- est capable de supprimer la mutation de la même manière que Sly41p.

C) Les phosphorylases chlamydiennes : GlgP ou MalP, eucaryotes ou procaryotes ?

La phylogénie des phosphorylases impliquées dans le métabolisme des polysaccharides semble plus complexe en raison probablement d'une origine polyphylétique (arbre en annexe). En effet, on retrouve des phosphorylases chlamydiennes proches des eucaryotes et plus particulièrement des animaux (celles appartenant à la famille des Chlamydiaceae), et d'autres proches des bactéries et plus particulièrement des PVC (hors Chlamydiaceae). Certaines chlamydiales possèdent même deux phosphorylases, et celles-ci ne se positionnent différemment dans l'arbre: c'est le cas notamment de *Simkania negevensis*, l'une se rapprochant des bactéries et l'autre se situant légèrement à l'écart.

Il existe chez *E.coli* deux activités phosphorylases distinctes : GlgP et MalP.

Les activités phosphorylases sont généralement décrites dans la littérature en fonction de leur capacité à utiliser les malto-oligosaccharides ou les polymères branchés de glucose. Les premières sont appelées maltodextrines phosphorylase (MalP) et les secondes les glycogènes phosphorylases (GlgP).

Des tests préliminaires d'expression et d'activité des protéines recombinantes GlgP/MalP des chlamydiales ont été entrepris avec l'aide de Sylvain Laurent. Le premier but avoué étant de trouver quel type d'activité avait en réalité ces enzymes, MalP ou GlgP, voire l'activité des deux combinée, et ensuite de savoir si leur activité se rapproche plus d'une phosphorylase eucaryote (animal) ou procaryote (bactérie). En attendant d'avoir la réponse, les phosphorylases des chlamydiales seront appelées GP (glycogène phosphorylase), terme regroupant à la fois les MalP et les GlgP. Dans ce but, des western-blots (Figure 47) pour vérifier l'expression de ces enzymes dans une souche Δ CAP d'*E.coli* (dépourvu de *glgC*, *glgA* et *glgP*) ainsi que des zymogrammes (Figure 48) ont été réalisés.

nature de l'enzyme.

L'absence d'activité sur gel zymogramme pour la GP de *S.negevensis* s'explique par l'absence d'expression de cette enzyme révélée par Western-blot. En revanche, la GP de *C.trachomatis* est bien exprimée alors qu'elle est inactive sur gel zymogramme.

D'autres tests devront être réalisés, notamment des dosages de ces enzymes. On sait que certains effecteurs tels que l'AMP ou certains sels ont un effet activateur sur les phosphorylases de bactéries, ces paramètres devront être inclus dans les futures expériences.

Un évènement phylogénique de grande importance : l'origine des phosphorylases

En effet, retrouver les glycogène phosphorylases des Chlamydiaceae avec celles des animaux (mais pas des champignons et autres eucaryotes), alors que les phosphorylases des autres chlamydiales semblent dispersées traduit une origine polyphylétique de cette enzyme.

Une étude sur les introns des phosphorylases animales nous permettra peut-être de déterminer qui est le donneur : les chlamydiaceae ou les animaux. Dans les différents cas, les chlamydiaceae les ont-elles récupérées pour pouvoir plus aisément infecter leur hôte, ou est-ce une stratégie de l'hôte pour tenter d'avoir un contrôle de l'infection ? Encore des questions sans réponse.