

Chapitre 4

Marquage de filaments et système *in vitro*

Dans ce chapitre, nous tournons notre attention vers un aspect complètement différent de celui abordé dans les chapitres précédents. Ces travaux portent sur le fonctionnement du moteur rotatif situé à la base de chaque filament, plutôt que sur le processus d'assemblage des filaments. L'étude du moteur flagellaire comporte de nombreux aspects intéressants. Plusieurs décennies de travaux en génétique, microbiologie, biophysique ou microscopie électronique par exemple nous ont appris beaucoup sur l'assemblage de ce moteur, ses différentes constituantes, sa source d'énergie, ses caractéristiques physiques, les facteurs qui influencent sa rotation, etc. [11, 12, 13, 14, 15, 20, 21]. Le moteur flagellaire est une machine nanométrique à la fois d'une étonnante complexité et assez simple pour qu'on puisse espérer en comprendre un jour le fonctionnement au niveau fondamental. Le système *in vitro* décrit dans ce chapitre vise justement à mieux contrôler l'environnement autour du moteur pour mieux comprendre son fonctionnement. Deux aspects sont particulièrement visés : le mécanisme du changement de direction dans la rotation du moteur et les pas discrets dans sa rotation. L'étude de ces deux sujets comportent plusieurs défis importants qui seront abordés dans ce chapitre. En premier lieu, une description du système *in vitro* utilisé pour prendre contrôle du moteur flagellaire est donnée. Ensuite, les essais réalisés pour obtenir une sonde robuste pour mesurer précisément la rotation des filaments à l'aide de microbilles seront abordés. Ce type de sonde est nécessaire pour l'étude des deux aspects du moteur flagellaire mentionnés plus haut. Finalement, certaines expériences à l'aide du système *in vitro* concernant les changements de direction du moteur ainsi que les pas dans la rotation sont décrites.

L'idée originale du système *in vitro* fut développée par le groupe de recherche du Dr. Howard C. Berg à l'université Harvard[73]. Lors de son doctorat à l'Université Laval, Dr Mathieu Gauthier a apporté des améliorations au principe de base du montage en introduisant l'utilisation d'impulsions laser femtosecondes pour perméabiliser la membrane, plutôt qu'un antibiotique

comme l'avait fait Fung et Berg[73]. Lors de ces travaux, Mathieu a réussi à contrôler la vitesse de rotation du moteur flagellaire à l'aide d'un voltage extérieur, ce qui ouvre la porte à un monde de nouvelles possibilités pour en étudier le fonctionnement. Ce système *in vitro* a donc donné des résultats très novateurs et prometteurs, mais j'ai tenté au début de mon doctorat d'apporter certaines améliorations visant spécifiquement à étudier les pas discrets et les changements de direction dans la rotation du moteur. Ce chapitre décrira en détails nos efforts dans cette direction.

4.1 Adaptation du *patch-clamp* pour une utilisation sur les bactéries

Le système *in vitro* est en quelques sorte une adaptation de la technique du patch-clamp utilisée couramment en électrophysiologie pour une utilisation sur des bactéries. Le *patch-clamp* conventionnel consiste à aspirer une partie de la membrane d'une cellule (habituellement eucaryote) dans une micropipette de verre. Tout l'art de cette technique consiste à créer un joint le plus étanche possible entre le verre et la membrane cellulaire afin d'obtenir une résistance électrique élevée (plusieurs dizaines de gigaohms) entre l'intérieur et l'extérieur de la micropipette. Il est alors possible de mesurer les minuscules courants électriques qui traversent la membrane, par exemple au travers d'un ou quelques canaux ioniques. Il est par contre difficile d'appliquer cette technique aux bactéries en raison de leur petite taille. De plus, comme la membrane de cellules eucaryotes ne possède pas de peptidoglycane [1], elle est plus souple, ce qui permet ce type de manipulations. Il est possible d'éliminer la couche de peptidoglycane à l'aide d'antibiotiques déformant ainsi la membrane de bactéries jusqu'à une taille d'environ 10 μm (la bactérie est alors appelé *sphéroplaste*), ce qui permettrait alors l'utilisation du *patch-clamp* conventionnel [74]. Cependant, comme la couche de peptidoglycane joue un rôle important dans l'ancrage et la fonction de certaines protéines constituant le moteur flagellaire[6], la destruction de cette couche à l'aide d'antibiotiques serait un énorme désavantage pour l'étude de ce système.

L'approche choisie pour contourner ces difficultés est l'utilisation de l'antibiotique céfalexine lors de la phase de culture exponentielle. Cet antibiotique inhibe partiellement la formation de paroi cellulaire lors de la division cellulaire¹, ce qui a comme résultat des bactéries ayant le même diamètre (1 μm) mais une longueur allant de 50 à 100 μm après 3 à 3h45 d'incubation. Cette bactérie, dite filamenteuse, est ensuite aspirée en partie à l'intérieur d'une micropipette possédant une constriction d'un diamètre intérieur de 1 μm se retrouvant à quelques micromètres de la pointe. Le scellé se produit par la proximité de la membrane externe et la paroi de la pipette ainsi que l'interaction membrane/verre. Des impulsions laser femto-secondes sont alors focalisées sur la membrane à l'intérieur de la pipette afin de localement

1. La céfalexine inhibe plus précisément la formation de la paroi cellulaire servant à former le septum permettant la division cellulaire. Le septum est le mur qui se forme à la séparation de deux bactéries.

percer la membrane sans endommager d'autres structures dans la cellule (en particulier les moteurs flagellaires). Le trou ainsi créé donne un accès direct à l'intérieur de la bactérie.

Les pipettes sont fabriquées à l'aide de tubes capillaires qui sont tirés après avoir été chauffés. Une microforge fabriquée maison est utilisée pour former une constriction à quelques micromètres de la pointe de la pipette à l'aide de filaments chauffés. Le diamètre intérieur de la pipette est mesuré par une analyse d'images automatique utilisant une routine maison dans LabView. Cette technique permet une mesure plus robuste, une fabrication beaucoup plus précise ainsi qu'une grande flexibilité dans les grandeurs possibles de diamètres. La microforge fut mise sur pied initialement par Dr. Gauthier et s'opérait de façon manuelle. L'automatisation fut réalisée par Ismaël Duchesne lors de son doctorat.

4.2 Microbilles et nanoparticules

Pour réaliser les expériences prévues, la méthode utilisée pour visualiser la rotation des filaments, invisibles en microscopie en champs clair (et même en contraste de phase), a dû être améliorée. Notre groupe de recherche a utilisé jusqu'à maintenant un marquage avec des fluorophores externes pour visualiser les filaments et mesurer leur vitesse de rotation. Cependant, l'analyse des données obtenues est très laborieuse, est difficile à automatiser et requiert une assistance manuelle. De plus, le temps d'observation est limité par le photoblanchiment des fluorophores.

4.2.1 Billes de polystyrène

Pour faciliter l'analyse, les fluorophores ont été remplacés par des microbilles fixées sur le filament. Cette technique a plusieurs avantages et a permis une mesure plus robuste de la vitesse de rotation des moteurs. L'utilisation de microbilles comme marqueurs permet aussi d'observer des changements dans la direction de rotation.

Le marquage des bactéries requiert qu'elles soient préparées comme pour les expériences de coupe de filaments (voir section 2.7.1). Ces bactéries sont ensuite insérées dans une lame tunnel maison et reposent durant environ 5 minutes. Après avoir rincé les cellules toujours en suspension, une solution de billes est introduite dans la lame tunnel durant 5 à 10 minutes. L'excédent de billes est ensuite rincé avec 200 μ l de milieu de motilité (*motility buffer*, MB). Des filaments plus courts permettent une rotation plus stable de la bille.

Des billes de 1 μ m ont été utilisées avec une illumination en champs clair et des billes de 200 nm ont été utilisées en fluorescence. Cette technique a mené à de bons résultats, sans toutefois arriver à marquer une proportion importante d'un tapis de bactéries. En effet, bien que des billes en rotation peuvent être facilement observées lorsque des centaines de bactéries sont déposées sur une lamelle de microscope, une trop petite proportion était marqué pour

pouvoir tenter l'expérience avec le système *in vitro*, i.e., avec des cellules filamenteuses. En effet, lorsqu'une culture exponentielle de bactéries filamenteuses est produite, il y a de 100 à 200 fois moins de cellules en suspensions. Nous devons donc obtenir un taux de succès élevé si nous voulons trouver une cellule vivante pouvant être aspirée à l'intérieur de la pipette. J'ai modifié certains paramètres comme le temps d'exposition des billes et la concentration de sel en solution avec les billes pour obtenir le plus grand nombre de cellules ayant une ou plusieurs billes attachées, ce qui a permis d'observer des rotations de billes de 200 nm allant jusqu'à 175 Hz (voir section 4.3). Cependant, le taux de succès restant relativement bas par rapport à nos besoins, d'autres voies ont dû être explorées.

Une autre raison nous amenant à abandonner les billes de 200 nm est que nous devons utiliser la souche KAF95 pour ce type de marquage. Cette souche comprend plusieurs mutations génétiques modifiant le flagelle. Elles modifient la protéine FliC qui compose le filament ayant pour effet de le rendre collant pour des surface de verre ou du polystyrène. Comme ils sont collants, il est possible d'obtenir des filaments plus courts en faisant passer les bactéries dans un tube capillaire à plusieurs reprises (*shearing*)². Ces filaments plus courts permettent une rotation plus stable de la bille, celle-ci ayant moins tendance à coller et s'accrocher sur la surface de verre ou le corps de la bactérie. Cette mutation du FliC aide donc grandement au marquage lorsque les cellules sont collées sur la lamelle, mais empêche les bactéries de nager adéquatement. Nous pensons que cette absence de motilité résulte du fait que les filaments se collent entre eux lorsqu'ils se rassemblent derrière la bactérie lors de la nage et ne sont donc pas capables de bien tourner et propulser la bactérie. Ceci nous empêche donc de marquer des filaments toujours en rotation sur cette souche lorsque les bactéries sont libres de nager, ce qui est nécessaire pour le système *in vitro*.

4.2.2 Nanoparticules d'or

Dans le but d'obtenir une sonde affectant le moins possible la rotation du moteur, des nanoparticules d'or (~ 10 à 50 nm ainsi que de 200 nm) ont aussi été utilisées au cours de ce projet de doctorat. L'utilisation de telles particules réduit grandement l'influence de la sonde sur la rotation du moteur puisque la résistance due à la viscosité (traînée) dépend du rayon de la particule à cette échelle [75]. Des progrès importants ont été réalisés lors de projets d'été avec des particules sphériques de 50 nm produites dans le laboratoire du Dr. Denis Boudreau par les étudiantes en physique Anne-Marie Roy et Alexia Corcoran, mais les résultats les plus probants ont été réalisés avec des nanoparticules commerciales de 200 nm. Idéalement, ces particules seraient fixées sur les crochets de souches mutantes qui ne produisent pas de filament, mais les résultats ont été obtenus à l'aide de la souche HCB1661.

La base de cette souche est de type sauvage et contient le plasmide pBAD33 contenant le

2. Le *shearing* est possible pour d'autres souches que KAF95, mais le processus est plus facile et requiert moins d'allers-retours que pour une souche de type sauvage.

gène modifié *fliC*(T236C) permettant le marquage par fluorescence. Comme l'expression de ce substrat est contrôlé par le promoteur arabinose, il est possible de contrôler la longueur des filaments en variant la concentration d'arabinose. Il fut ainsi possible d'avoir des bactéries filamenteuses avec de courts filaments sans avoir à les briser mécaniquement (*shearing*)³. Comme les crochets ne sont longs que de 50 nm et n'ont pas de cystéine sur les protéines FlgE les formant, la présence de courts filaments est nécessaire pour le marquage à l'aide de nanoparticules d'or. Le marquage se réalise par l'interaction existant entre les cystéines et l'or [76]. Plus précisément, un groupe sulfhydryle ou thiol est présent dans la cystéine et forme un lien fort avec l'or. Cette propriété est exploitée pour accrocher nos marqueurs spécifiquement au filament. Les résultats furent cependant décevants (voir section 4.3) et nous nous sommes tournés vers la forte interaction entre la biotine et la streptavidine.

4.2.3 Biotine/Streptavidine

La forte interaction non covalente entre la molécule biotine et la protéine bactérienne streptavidine est un outil utilisé depuis les années 70 dans le domaine de la biologie étant un modèle des liens ligand-protéines. La très grande affinité du lien entre ses deux molécules ainsi que sa résilience au changement de pH en font un candidat idéal pour le marquage spécifique des filaments.

Pour obtenir ce marquage, nous avons utilisé une solution de biotine-maléimide commerciale (Sigma) ainsi que des billes de polystyrène de 500 nm recouvertes de façon non covalente par de la streptavidine (Spherotech). Pour que l'extérieur des filaments soient recouverts de biotines, ceux-ci sont marqués avec la solution de biotine-maléimide de la même façon qu'avec les fluorophores (voir section 2.7.2). Bien que l'énergie de liaison entre la biotine et la streptavidine soit moins élevée qu'un lien covalent typique, la spécificité de ce lien ainsi que les multiples sites de liaison sur chaque protéine en font un processus idéal pour cette application.

Les souches utilisées doivent avoir une cystéine sur la protéine du filament pour que ce marquage donne des résultats. Les souches EM800, HCB1661 et HCB1737 ont donc été utilisées. La souche HCB1737 est construite sur une base de type sauvage avec une mutation de la protéine *fliC* pour l'ajout d'une cystéine directement dans le génôme (*fliC_cys* (S219C)). Une fois les filaments marqués avec le biotine-maléimide, le protocole de marquage avec les microbilles et nanoparticules est utilisé avec les billes recouvertes de streptavidine. Dès la première mise en contact des particules avec les filaments marqués, nous avons observé des billes en rotation avec un taux de succès plus important que pour les microbilles de polystyrène. Des exemples de résultats sont disponibles à la section 4.3. Ces expériences ont été réalisées avec l'aide d'Olivier Gagné, étudiant en biochimie.

3. Le *shearing* doit être évité, car il est fatal aux bactéries filamenteuses dû au fait que les cellules sont rendues très fragiles par le traitement à la céphalexine.

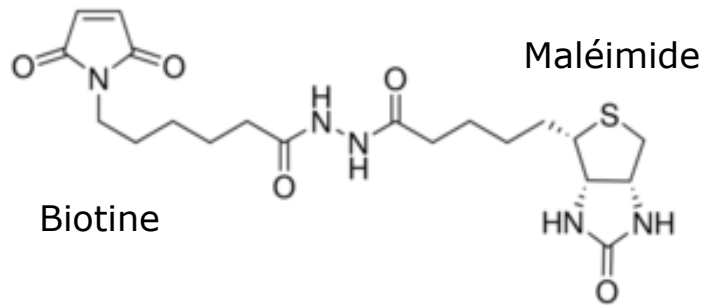


FIGURE 4.1 – Molécule de biotine-maléimide (Sigma)

Quelques problèmes sont cependant présents. En premier lieu, la solution a tendance à former des agrégats de plusieurs billes malgré des passages de cette solution au vortex. Nous pourrions utiliser un bain sonore, mais, comme la streptavidine est attachée de façon électrostatique aux nanoparticules, les protéines auraient tendance à se décrocher. Un agrégat fixé à un filament se produit donc régulièrement, ce qui est loin d'être idéal lorsqu'on veut suivre précisément la rotation du filament. Deuxièmement, il arrive aussi d'obtenir un même filament avec 2 ou 3 nanoparticules fixées. Comme nous cherchons une sonde influençant le moins possible la rotation, le fait d'avoir plusieurs billes sur un filament ajoute une charge non négligeable au moteur. Malgré ces quelques désavantages, cette technique est la plus prometteuse en terme de rendement.

4.3 Détection de la vitesse de rotation

Pour mesurer précisément la rotation du moteur flagellaire, quelques méthodes sont disponibles. Deux techniques ont été utilisées pour mesurer la position d'une microbille attachée sur un filament : une caméra EMCCD rapide et une photodiode avalanche.

4.3.1 Caméra EMCCD

La technique la plus flexible consiste à enregistrer une séquence vidéo de l'image fournie par le microscope avec une caméra EMCCD rapide (> 500 fps). Une fois l'acquisition terminée, un programme Matlab applique une régression gaussienne en deux dimensions sur la tache de lumière engendrée par la microbille, que ce soit en champ clair ou en fluorescence. Cette analyse permet de déterminer avec une précision supérieure à la taille d'un pixel⁴ la position en x et en y d'une bille de polystyrène. Pour déterminer la fréquence de rotation, une transformée de Fourier est appliquée sur le signal de la position en fonction du temps pour obtenir un spectre de fréquences.

4. Chaque pixel ($24 \mu\text{m}$) correspond à environ 240 nm dans le plan de l'échantillon pour la caméra utilisée lors de ces expériences (*Andor Technology*, iXon+ DU-860).

Lorsque la détection de la particule est faite par fluorescence, un photoblanchiment des billes peut toutefois se produire lors de longues expositions. De plus, la lumière proche du bleu agit comme une menace pour la cellule causant des changements de direction de rotation incessants [77]. Nous essayons donc, autant que possible, de choisir des fluorophores excitables à de plus grandes longueurs d'onde. La figure 4.2 montre un exemple de résultats intéressants obtenus à l'aide de la caméra EMCCD et de la régression gaussienne d'une bille fluorescente de 200 nm. On peut voir que la bille attachée sur un flagelle tournait à une vitesse d'environ 175 Hz en plus d'une giration périodique du flagelle autour de l'axe du moteur d'environ 2-3 Hz.

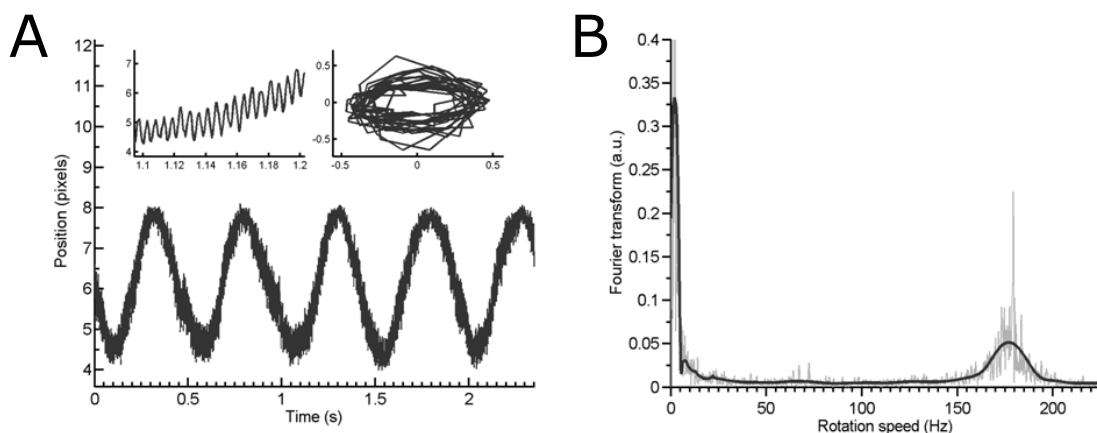


FIGURE 4.2 – (A) Position de la bille pour sur un axe en fonction du temps. Fenêtre supérieure gauche : agrandissement d'une partie de la position dans le temps. Fenêtre supérieure droite : position en pixel en y en fonction de x pour les oscillations rapides lorsque l'oscillation lente est retirée. (B) Spectre de fréquences de rotation obtenu par une transformée de Fourier de la position en fonction du temps.

4.3.2 Photodiode avalanche

Les résultats de la figure 4.2 n'ont cependant pas été la norme. Certaines difficultés techniques ont fait en sorte que le rendement de données intéressantes n'était pas très élevé. Le photoblanchiment des billes limitait la durée des expériences en raison de la perte d'intensité avec le temps. Comme il était difficile d'observer un signal stable et robuste pour des billes de 200 nm, nous avons aussi mis en place une méthode de détection basée sur une photodiode avalanche (*Avalanche photodiode*, APD) avec des billes de 1 μm de diamètre.

Comme la magnification de l'objectif utilisé est de 100x, le détecteur de la photodiode avalanche d'une grandeur de 50 μm correspond à 0,5 μm dans le plan de l'échantillon. Au lieu d'obtenir une position qui varie dans le temps (comme avec la caméra), une acquisition avec l'APD donne simplement une intensité lumineuse variant dans le temps à un point fixe. L'utilisation de cette technique a comme avantage une mesure très précise et sensible de l'intensité. Cette précision vient du fait que la photodiode est capable de détecter des photons jusqu'à

une fréquence de 20 MHz (temps mort entre 2 photons de 40 ns). Une routine LabView fut développée pour extraire du signal de la photodiode l'intensité lumineuse mesurée en nombre de photons par intervalle de temps. Cet intervalle de temps peut être modifié selon les besoins. Lorsque la zone de détection est placée dans le trajet de la bille qui tourne, cette intensité lumineuse va varier à la même fréquence que la rotation du filament.

On peut voir sur la figure 4.3 les oscillations d'une billes de 1 μm mesurées avec la photodiode avalanche. Cette oscillation est beaucoup moins rapide (~ 20 Hz) que lors des essais avec des billes de 200 nm dû à la traînée visqueuse plus importante pour des grosses billes. Certaines harmoniques apparaissent dû au fait qu'une partie de la bille passait devant le détecteur à deux reprises à chaque rotation. Le fait de travailler avec des billes plus grosses permet ici d'utiliser le champ clair pour l'illumination.

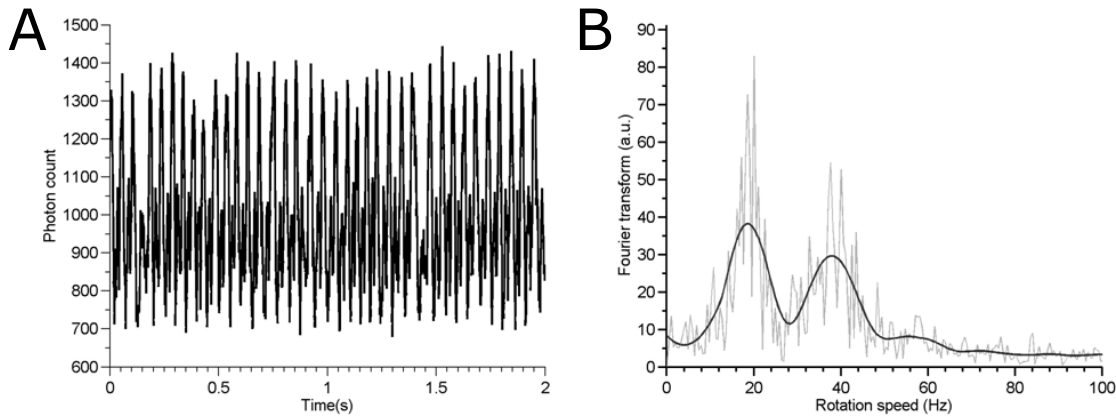


FIGURE 4.3 – (A) Intensité en champ clair variant dans le temps pour une bille de 1 μm obtenue avec l'APD. (B) Spectre de fréquences de rotation obtenu par une transformée de Fourier.

4.4 Possibilités futures

L'obtention d'un protocole robuste pour obtenir une nanoparticule fixée sur un crochet de flagelle dans le système *in vitro* fut l'objectif principal lors des premières années de ce doctorat. Nous avons réussi à développer des méthodes alternatives au marquage avec fluorophores qui ont grandement amélioré notre capacité à mesurer la rotation des flagelles. Le taux de marquage n'a malheureusement pas atteint le niveau de rendement espéré requis pour un déroulement efficace des expériences prévues. En effet, le rendement de ces marquages doit être assez élevé pour palier au fait que le système *in vitro* est un système très complexe qui requiert de nombreuses étapes qui doivent fonctionner lors de la même journée. En plus de devoir obtenir un marquage robuste sur une bactérie filamenteuse, celle-ci doit être aspirée dans la micropipette encore vivante pour ensuite percer la bactérie à l'aide du laser femtoseconde focalisé dans un volume d'environ 1 μm^3 . Une fois la bactérie morte, on doit s'assurer que

le scellé électrique reste important pour ensuite contrôler la rotation à l'aide de la technique du *patch-clamp* tout en mesurant la vitesse de rotation de la bille à haute fréquence. Si pour chaque marquage nous ne trouvons que quelques bactéries parfaites, il y a beaucoup de chances que la journée se solde par une absence de résultat. Un bon rendement nous aurait donné un outil important pour l'étude du moteur flagellaire.

En particulier, l'observation de changements de direction dans la direction de rotation est possible avec une microbille alors que pratiquement impossible à l'aide de marquages fluorescents. En effet, le temps d'exposition doit être très court et l'illumination est intense pour détecter ces événements rapides, ce qui contribue à un photoblanchiment rapide ainsi qu'une intensité lumineuse détectée faible. De plus, la courte profondeur de champs d'un objectif à haute ouverture numérique provoque une projection en deux dimensions de la forme en hélice du filament au plan de l'image. L'utilisation de billes nous aiderait à contourner ces difficultés. Combiné à un marquage sur un crochet ou un filament très court, ce type de marquage ouvrirait aussi la porte à l'observations de pas discrets dans la rotation du moteur. Ces différentes expériences possibles lorsque le marquage sera maîtrisé sont discutées dans cette section.

4.4.1 Changements de direction du moteur

Le moteur flagellaire est une fascinante machine qui peut tourner jusqu'à 300 Hz. Ce qui le rend encore plus intéressant est sa capacité à changer de direction de rotation très rapidement (en moins de 1 ms). Ceci donne la possibilité à la bactérie de modifier sa trajectoire afin de se déplacer vers des milieux plus favorables. Lorsque tous les flagelles tournent dans le sens anti-horaire ou CCW (tel que vu du bout du filament vers le moteur), les filaments se regroupent en un paquet (*bundle*) et propulsent la bactérie en ligne droite. Cette partie du mouvement est appelé course. Lorsqu'un ou plusieurs moteurs changent de direction et tournent en sens horaire (CW), le ou les filaments quittent le *bundle* et entraînent la bactérie dans une culbute qui fait changer la bactérie de direction. Une fois que tous les moteurs sont revenus en sens CCW, la bactérie reprend une autre course, mais dans une direction différente. Cette alternance de courses et culbutes produit une marche aléatoire en 3 dimensions [78].

On pourrait penser que cette marche aléatoire n'est d'aucune utilité pour la bactérie, mais, par un processus biochimique relativement simple appelée chimiotaxie, la bactérie est capable de biaiser sa marche aléatoire pour se diriger vers un endroit plus profitable pour son développement. Ceci lui donne un avantage certain sur des potentiels compétiteurs pour une source de nutriments ou pour échapper à des prédateurs [78]. Ce processus est somme toute bien compris, mais la chimiotaxie demeure un sujet de recherche très riche et excitant.

Il est connu que ce mécanisme se produit par l'action de récepteurs se trouvant à la surface des bactéries sur la kinase qui est responsable de phosphorylation de la protéine CheY. L'interaction de la forme phosphorylée de CheY (CheY-P) avec la protéine FliM du moteur

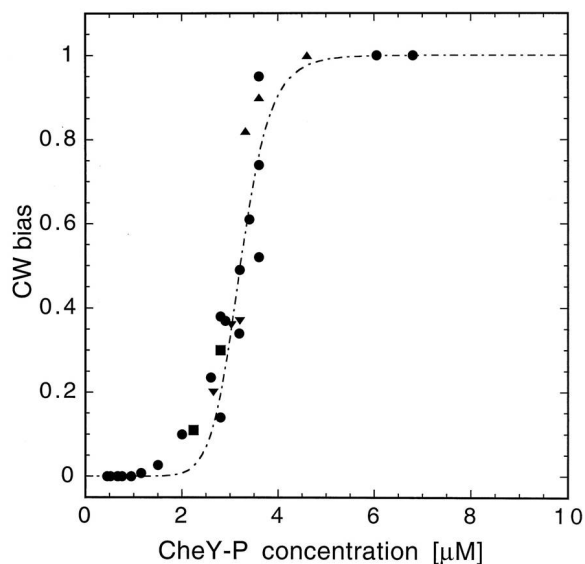


FIGURE 4.4 – Proportion du temps passé par le moteur en rotation horaire (*CW bias*) en fonction de la concentration de la protéine CheY-P [79]

provoque un changement de direction [6]. La probabilité qu'un changement de direction se produise dépend donc directement de la concentration de CheY-P. Cette dépendance a même été mesurée par Cluzel et *al.* en 2000 (voir figure 4.4) [79]. Selon Barak et Eisenbach, la présence de CheY sans phosphorylation peut aussi amener un changement de direction, mais avec une probabilité au moins 100 fois moindre que lors de la présence de CheY-P. Cependant, la présence de CheY-P ne serait pas suffisante ; certaines autres composantes du cytoplasme seraient aussi nécessaires [80].

Utilisation du CheY**

Un avantage unique du système *in vitro* est qu'il nous permet un accès direct à l'intérieur de la bactérie. Il nous serait donc possible d'observer la fréquence des changements de direction en fonction de la concentration de CheY-P présente dans la bactérie. Cependant, la version phosphorylée de CheY est instable et ne peut être purifiée. La protéine CheY** consiste en une protéine CheY qui a subi 2 mutations et qui se comporte de la même façon que CheY-P [81]. Cette version modifiée de CheY-P peut être purifiée et nous en avons en notre possession grâces à l'élégance du laboratoire de Birgit Scharf à Virginia Tech. La première expérience qui pourrait être réalisée est de mettre en contact une bactérie se trouvant dans le montage *in vitro* avec une solution contenant du CheY**. Comme la cellule est sous pression lorsqu'elle est vivante, le contenu est éjecté lorsque la membrane est percée par ablation laser, et remplacé par la solution présente à l'intérieur de la micropipette. Ceci nous permet donc de remplacer les protéines contenues dans le liquide intra-cellulaire par une solution de notre choix. L'idéal serait de pouvoir échanger rapidement la solution à l'extrémité de la micropipette, un projet

sur lequel quelques étudiants d'été ont travaillé dans notre laboratoire.

La souche KAF95 pourrait être utilisée avec des billes de 0.5 ou 1 μm . L'utilisation de cette souche et ces tailles de billes se justifie par la facilité relative des manipulations expérimentales. Une illumination en champ clair est nécessaire pour bien observer la rotation, ce qui rend l'analyse plus facile. De plus, des mesures de rotations précises ont déjà été réalisées avec cette souche. Finalement comme cette souche ne produit pas de CheY, ses moteurs ne changent pas de direction naturellement rendant les changements observés directement liés à ce qui serait ajouté dans le milieu cellulaire à l'aide de la micropipette.

Reproduction de la courbe «*bias*»

Dépendamment du résultat de l'expérience (observation de changements de direction ou non), différentes voies peuvent être empruntées. Advenant l'observation direct de changements de direction avec l'ajout de la protéine CheY** seulement, la courbe de la figure 4.4 (courbe «*bias*») pourrait être reproduite. Deux raisons nous motivent à vouloir reproduire cette courbe.

Premièrement, cette courbe a été réalisée sur des cellules vivantes et donc tous les paramètres influençant la rotation du moteur n'étaient pas contrôlés. Notre système permet d'enlever les autres variables de la rotation (concentration d'ions de part et d'autre de la membrane, autres protéines ou composantes présentes dans le cytoplasme, etc.) et ainsi établir l'influence de CheY uniquement sur les changements de direction. Deuxièmement, la concentration de CheY présente dans la bactérie était régulée par un inducteur lors de la culture et calibrée par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Notre système nous permettrait de connaître plus directement le taux présent dans la cellule.

La reproduction de cette courbe dans des conditions expérimentales si différentes est en soit très intéressante scientifiquement étant donné son importance : elle est en effet au coeur du fonctionnement (et de tous les modèles) de la chimiotaxie bactérienne qui s'avère elle-même être un système modèle pour la signalisation intracellulaire. Ces résultats jetteraient possiblement aussi un éclairage nouveau sur les points de la courbe qui ne semblent pas suivre la tendance. Ils pourraient confirmer les modèles établis concernant la chimiotaxie ainsi que le mécanisme de changement de direction. Ceci nous donnerait une meilleure compréhension des paramètres requis aux changements de direction par la bactérie.

Nécessité d'autres composantes du cytoplasme

Advenant le cas qu'aucun changement de direction ne soit observé lors de la présence de CheY**, d'autres composantes présentes normalement dans le cytoplasme (par exemple YcgR, fumarate, etc.) pourraient être ajoutées. Ces composantes seraient ajoutées une à une pour déterminer la ou lesquelles sont nécessaires pour l'obtention de changements de direction.

Lorsque ces composantes auront été déterminées, la courbe de la figure 4.4 pourra être repro-

duite sous des conditions contrôlées précisément. Cette capacité de «reconstruire» artificiellement la cellule est unique au système *in vitro* et ces expériences pourraient avoir un impact important sur la compréhension du système de chimiotaxie.

4.4.2 Pas dans la rotation du moteur

Comme décrit à la section 1.1, le moteur flagellaire est construit de protéines formant un stator, un rotor ainsi que d'un mécanisme de roulement. Il fut longtemps proposé que le passage d'un proton dans le complexe MotA/MotB fait bouger celui-ci d'une place sur la périphérie du rotor. Ce déplacement appliquerait une force d'étirement sur le lien entre le complexe et la membrane cellulaire. Lorsque de la relaxation de ce lien, le filament devrait tourner d'un incrément fixe (pas)[6]. La rotation d'un tel type de moteur se ferait donc par un enchaînement de pas discrets à très haute vitesse empêchant donc leur observation.

En 2005, le groupe de R. Berry a réussi à observer des pas discrets dans la rotation du moteur flagellaire. Cependant, ces observations ont été réalisées sur des bactéries *E.coli* ayant des moteurs chimériques, c'est-à-dire que les complexes MotA/MotB formant les unités génératrices de couple ont été remplacés par des complexes PomA/PomB tirés de bactéries marines [7]. L'avantage de ce changement est que les chimères fonctionnent grâce au gradient d'ions Na^+ qui est facile à contrôler en variant la concentration de sel présente dans la solution ambiante. En ralentissant le moteur en abaissant la concentration de sel, des pas ont pu être observés. Ces pas ne sont cependant pas observable en présence d'une charge élevée sur le moteur (microbille ou filament complet par exemple). En effet, lorsque cette charge devient importante, le mouvement du filament est donc une version filtrée des mouvements du moteur dû à la flexibilité du crochet. Le temps entre 2 pas est donc plus court que le temps pris par le filament pour parcourir la distance nécessaire. La rotation semble alors continue. En réduisant la charge ainsi qu'en ralentissant la rotation, on peut alors observer les pas discrets dans la rotation du moteur. Pour parvenir à cet objectif, il est nécessaire d'avoir une sonde très petite sur un crochet ou un filament le plus court possible. La justification derrière l'utilisation de ce type de marquage est la charge pratiquement inexistante qu'une nanoparticule de 200-500 nm applique sur le moteur lors de la rotation d'un crochet ou d'un très court filament. Cependant, en utilisant des particules si petites, le moteur aura la possibilité de tourner jusqu'à 175 Hz. À cette vitesse, la visualisation de pas devient un défi énorme.

Observation de pas sur des moteurs «sauvages»

De tels pas sur une souche ayant des moteurs «sauvages» n'ont pas encore été observés. En effet, pour ralentir le moteur assez pour permettre à une bille accrochée à un crochet d'effectuer une rotation par pas, il faudrait que le pH soit élevé au delà de la limite physiologique permise ($\text{pH} \geq 9$). De cette façon, le temps entre 2 pas serait plus long que le temps de relaxation

du crochet⁵ et des pas deviendraient observables. Le système *in vitro* développé par notre groupe nous permet de réaliser ces expériences sur des souches sauvages de *E.coli*. Comme la bactérie meurt lors de l’ablation laser, il est possible de changer le milieu du bain ambiant pour obtenir une concentration d’ions H^+ très faible, ce qui serait impossible avec une cellule vivante.

Pour pouvoir avoir un temps suffisamment long entre deux pas pour obtenir une mesure précise de la position de la bille, le moteur doit être ralenti pour obtenir plusieurs image à chaque pas. La source d’énergie propulsant la rotation est la force proton-motive. Celle-ci a deux composantes : la tension produite par une différence de potentiel électrique transmembranique et la différence de pH entre l’intérieur et l’extérieur de la membrane[6]. Le système *in vitro* permet de modifier ces 2 composantes de façon indépendantes. En effet, en changeant le pH du milieu interne après l’ablation et de celui du bain ambiant, il est possible de d’obtenir une différence du pH plus grande que pour des cellules vivantes tout en gardant ces valeurs individuelles de pH dans des plages de valeurs proches de celles physiologiques. La tension transmembranique peut évidemment être contrôlée directement par notre système de *patch-clamp*. Le temps entre deux pas serait donc plus long nous donnant de meilleures chance d’observer des pas.

Angle entre 2 pas

Une fois les pas dans la rotation observables, on pourrait même espérer mesurer l’angle entre 2 pas lors d’une rotation. Sowa et *al.* ont réussi a mesurer un angle de 13.7° par pas lors d’une rotation avec une seule unité génératrice de couple (UGC) présente dans le moteur [7]. Il serait intéressant de savoir si des mesures d’angles réalisées sur des moteurs sauvages de *E.coli* donneraient des valeurs semblables.

En plus de pouvoir obtenir le même type de résultat avec un très faible nombre d’UGCs, notre laboratoire a modifié une souche de *E.coli* en y ajoutant un plasmide (bout d’ADN séparé des chromosomes de la cellule) permettant de contrôler l’expression des protéines MotA et MotB formant les UGCs. Il serait alors possible de mesurer la dépendance du nombre de pas avec le nombre d’UGCs présents. L’observation de pas discrets dans la rotation permettrait aussi d’approfondir l’étude de la dynamique des UGCs dans le moteur. Finalement, ces expériences pourraient être répétées avec des types différents de bactéries (*Salmonella*, *Bacillus*, etc.). Il serait alors possible de généraliser le fonctionnement fondamental à d’autres moteurs rotatifs semblables à celui d’*E.coli*.

5. Temps durant lequel le crochet se déplace de sa position initiale autour du rotor à sa nouvelle position après un pas

4.5 Améliorations possibles

Plusieurs techniques ont été tentées pour obtenir une sonde robuste sur un court filament bactérien. Celle qui promet le plus utilise le lien entre la biotine et la streptavidine. L'attachement de bille de 500 nm sur des filaments longs a été démontré et pourrait être utilisé lors d'expériences sur les changement de direction à l'aide de la souche HCB1661. Comme nous pouvons contrôler la longueur des filaments avec cette souche, il serait possible avec certaines améliorations d'obtenir une nanoparticule sur un court filament.

Pour les expériences sur les pas dans la rotation, la première étape serait d'essayer avec les billes avec streptavidine de 500 nm et voir si des sondes de ce diamètre permettraient d'observer ces pas. Advenant l'échec de cette méthode, différents diamètres de billes sont disponibles commercialement jusqu'à 50 nm. La difficulté sera d'imager de si petites particules à l'aide de la microscopie traditionnelle. Une solution serait d'utiliser un microscope droit (*upright*) avec un objectif d'électrophysiologie. Ce type d'objectif a une longue distance de travail donnant accès à l'échantillon avec une pipette de verre. En utilisant un objectif pour l'illumination, nous pourrions utiliser la technique de la microscopie champs sombre (*dark-field microscopy*) facilitant ainsi l'imagerie de nanoparticules.