



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Clonage de la D-LDH de *Lactobacillus delbruckei*

Bourguignon, Patricia

*Award date:*  
1990

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1990



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

**Clonage de la D-LDH de  
*Lactobacillus delbruckei*.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par

**BOURGUIGNON Patricia.**  
1989 - 1990.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la paix.**

**FACULTE DES SCIENCES.**

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR.

Tél. 081/72.41.11. - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

## **Clonage de la D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii*.**

BOURGUIGNON Patricia.

### **Résumé**

Notre travail vise à cloner le gène de la D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii*

Comme étape préliminaire, nous avons construit une banque génomique de *Lactobacillus delbrueckii* dans la souche XL1-blue d' *Escherichia coli* par insertion de fragments d'ADN de 5 à 10 kb (obtenus par digestion partielle Sau 3A) dans le site Bam HI du plasmide Yep 351.

Le nombre de clones recombinants obtenu (8000), ainsi que l'aspect sur gel d'agarose des plasmides extraits à partir de 48 clones de la banque ont confirmé la validité de celle-ci.

Enfin, une tentative de criblage du gène de la D-LDH de la banque génomique a été réalisée. La stratégie consiste à compléter une souche d' *E. coli* (FMJ 144) mutante pour la LDH et la PFL avec l'ADN de la banque génomique. Du fait de ces 2 mutations, la souche ne pourra croître sur milieu glucose en anaérobie qu'en présence d'un de ces deux gènes. Une première tentative n'a pas encore permis d'isoler le gène de la LDH et de nouvelles expériences sont en cours.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques.

Juin 1990.

**Promoteur :** Professeur J. Vandenhaute.

**Copromoteur :** Professeur J. Delcour.

*Ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans l'aide et l'expérience d'un certain nombre de personnes auxquelles je tiens à exprimer ma plus vive reconnaissance :*

*Les professeurs J. Vandenhautte et J. Delcour, qui m'ont accueillie dans leur laboratoire et ont bien voulu assurer la direction de ce mémoire.*

*Le Dr. Daniel Clark du Department of Microbiology, Southern Illinois University, qui nous a aimablement procuré la souche FMJ 144 d'E. coli.*

*Merci à Deborah, Anne, Geneviève, Rose-Marie, Monique, Jean-Pol, Jean-Marc, Pascal et plus particulièrement Olivier et Dominique pour leurs conseils judicieux et surtout pour la bonne humeur qui accompagne leur travail.*

*Je tiens également à remercier les personnes qui ont accepté de lire ce mémoire.*

*Toute ma reconnaissance va à Marc qui a su user de patience et de compréhension et à mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études.*

PLAN.	1
1. INTRODUCTION.	4
1.1. La stéréospécificité	5
1.1.1. L'isomérisation optique.	5
1.1.2. Importance de la stéréospécificité.	5
1.2. Les lactate déshydrogénases.	6
1.3. Les lactate déshydrogénases bactériennes.	6
1.3.1. Classification des LDH bactériennes.	6
1.3.2. Les gènes de LDH.	7
1.3.3. Structure tridimensionnelle et séquence en acides aminés.	8
1.3.3.1. Structure primaire.	8
1.3.3.2. Structure tridimensionnelle.	8
1.3.4. Mécanismes réactionnels.	9
1.4. La D-LDH de <i>Lactobacillus delbruckei</i>	10
1.4.1. Les caractéristiques de l'espèce et son utilisation.	10
1.4.2. Caractéristiques d'intérêt particulier de la LDH de <i>L. delbruckei</i> .	11
1.5. Objectif et stratégie du travail.	12
1.5.1. Construction de la banque génomique.	12
1.5.2. Le sondage ("screening") de la banque génomique.	13
2. MATERIEL ET METHODES.	13
2.1. Les souches utilisées.	15
2.1.1. Les souches bactériennes.	15
2.1.1.1. <i>Lactobacillus delbruckei</i> .	15
2.1.1.2. <i>E. coli</i> XL1 blue.	15
2.1.1.3. <i>E. coli</i> TG1.	16
2.1.1.4. <i>E. coli</i> FMJ 144.	16
2.1.2. La souche de levure : GRF 18.	17
2.2. Les plasmides utilisés.	17
2.2.1. Le plasmide Bluescript SK <sup>+</sup> .	17
2.2.2. Le plasmide Yep 351.	19

2.3. Les milieux de culture utilisés.	14
2.3.1. Milieux pour bactéries.	14
2.3.2. Milieux pour levures.	21
2.4. Techniques de l'ADN recombinant.	21
2.4.1. Préparation d'ADN.	21
2.4.1.1. Préparation d'ADN génomique.	21
2.4.1.2. Préparation de plasmides en petite et moyenne quantité (mini et midiprep).	24
2.4.2. Extraction de l'ADN au phénol et précipitation des acides nucléiques à l'éthanol.	26
2.4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.	27
2.4.3.1. Electrophorèse analytique.	27
2.4.3.2. Electrophorèse préparative.	29
2.4.4. Réaction de restriction.	30
2.4.5. Réaction de ligation.	31
2.4.6. Traitement à la phosphatase alcaline d'un plasmide linéarisé.	32
2.4.7. Transformation de souches compétentes.	33
2.4.7.1. Transformation de souches bactériennes.	33
2.4.7.2. Transformation de levure.	34
2.5. Dosage de l'activité de la LDH.	35
3. RESULTATS ET DISCUSSION.	36
3.1. Mise au point de la construction de la banque génomique à partir de la forme monocellulaire.	36
3.1.1. Détermination des conditions au départ du protocole de lyse de Scheirlinck.	36
3.1.1.1. Lyse de la paroi bactérienne.	37
3.1.1.2. Restriction partielle de l'ADN génomique.	39
3.1.1.3. Récupération des fragments d'ADN de 5-10 kb.	40
3.1.1.4. Préparation du vecteur plasmidique.	40
3.1.1.5. Ligation "ADN génomique-SK+" et transformation.	42
3.1.1.6. Conclusions.	44
3.1.2. Détermination des conditions au départ du protocole de lyse	43
3.1.2.1. Préparation de l'ADN génomique.	45
3.1.2.2. Restriction partielle de l'ADN génomique.	45
3.1.2.3. Récupération des fragments de 5-10 kb.	45
3.1.2.4. Ligation "fragments d'ADN-vecteur" et transformation.	45
3.1.1.5. Conclusion et discussion.	46

3.2. Mise au point de la construction de la banque à partir de la forme filamenteuse.	46
3.2.1. Détermination des conditions au départ du protocole de lyse de Scheirlinck modifié.	47
3.2.1.1. Préparation de l'ADN génomique.	47
3.2.1.2. Restriction partielle par Sau 3A.	47
3.2.1.3. Récupération des fragments de 5-10 kb.	47
3.2.1.4. Ligation "ADN génomique - plasmide" et transformation.	48
3.2.1.5. Conclusion.	48
3.2.2. Contrôle de l'effet plasmide et effet souche.	49
3.2.3. Conclusion.	49
3.3. Réalisation définitive de la banque à partir de la forme filamenteuse.	50
3.3.1. Construction de la banque génomique.	50
3.3.2. Estimation de la qualité de la banque.	51
3.3.2.1. Estimation du nombre de clones attendus.	51
3.3.2.2. Vérification de la taille attendue des inserts.	51
3.4. Criblage ou "screening" de la banque.	52
3.4.1. Extraction des plasmides recombinants de la souche XL1 blue.	52
3.4.2. Estimation du taux de transformation de la souche FMJ rendue compétente.	52
3.4.3. Transformation de FMJ par les plasmides recombinants en conditions anaérobiques.	53
3.4.4. Conclusion et discussions.	54
4. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.	57
5. BIBLIOGRAPHIE.	61

### **Liste des abréviations utilisées.**

- aa : acide aminé.  
ADN : Acide Désoxyribonucléique.  
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique.  
ARN : Acide Ribonucléique.  
ARNm : Acide Ribonucléique messenger.  
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique.  
bp : paire de base (base pairing).  
*E. coli*: *Escherichia coli*.  
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate.  
FAD : Flavine adénine Dinucléotide.  
H<sup>+</sup>/H<sup>-</sup> : Proton/Hydrure.  
kb : kilobase.  
LDH M4 : Lactate déshydrogénase de muscle.  
MCS : Site Multiple de Clonage (Multiple Cloning site).  
µg : microgramme.  
NADPH : Nicotinamide Dinucléotide.  
nm : nanomètre.  
PM : Poids Moléculaire.  
rpm : tour par minute (round per minute).  
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.



# **INTRODUCTION.**

-----

## 1. INTRODUCTION.

Le problème central de la biologie moléculaire vise à établir la relation existant entre la structure des molécules biologiques et leur fonction. Cette relation se base généralement sur l'étude des corrélations existant entre les modifications structurelles de ces molécules biologiques et l'observation des altérations de leurs propriétés .

Dans le cas particulier des protéines, ces modifications peuvent être produites chimiquement, en agissant sur les acides aminés, ou génétiquement, en changeant les nucléotides des gènes par mutagenèse dirigée.

L'approche génétique ou plus spécialement rétrogénétique permet non seulement de modifier la région codante du gène, altérant ainsi la protéine produite en des sites définis, mais également d'explorer les régions flanquant les séquences codantes afin d'étudier leur rôle dans l'expression de ce gène (transcription, maturation, traduction).

Au cours de l'évolution, la nature elle-même a procédé à des essais. La comparaison des séquences d'ADN (codantes ou "de service") ou des protéines, donne des indications précieuses sur leurs relations phylogénétiques. Sur base de cette comparaison, on pourra ainsi émettre des hypothèses fécondes quant à l'origine de leur spécificité tant sur le plan fonctionnel que sur le contrôle de leur expression.

C'est dans ce contexte d'étude des relations entre la structure des protéines et leurs propriétés que s'inscrivent les recherches d'ingénierie protéique développées au laboratoire. Une protéine modèle choisie est la lactate déshydrogénase (LDH). Le déterminisme moléculaire qui préside à la conformation tétramérique de certaines LDH d'une part et les bases moléculaires de la stéréospécificité d'autre part sont étudiés, par une approche rétrogénétique ayant recours à la mutagenèse dirigée et par la prédiction de structures moléculaires se basant sur la modélisation (collaboration avec le laboratoire de Biologie quantitative).

Le but de notre travail est de cloner le gène d'une lactate déshydrogénase de stéréochimie D présente chez *Lactobacillus delbrueckii*. La caractérisation d'un tel gène fournira le terme de comparaison attendu pour émettre des hypothèses quant aux mécanismes déterminant la stéréospécificité observée et dès lors permettra de définir, sur une base

Fig. 1.1 : Représentation de la réaction stéréospécifique de la LDH. Attaque du carbone tertiaire soit au-dessus, soit en-dessous du plan pour donner du D- ou L-lactate.

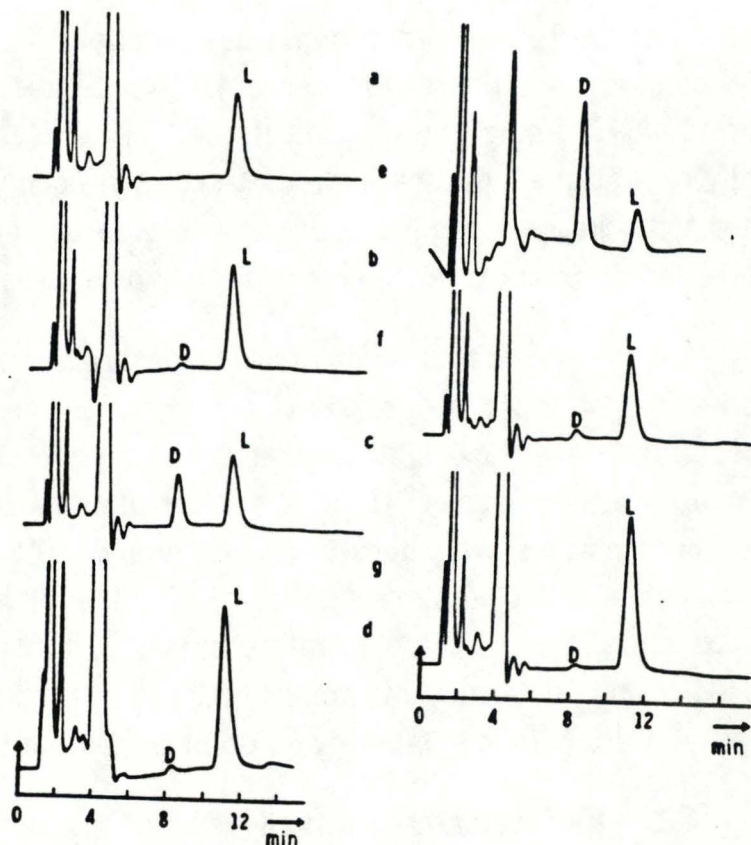
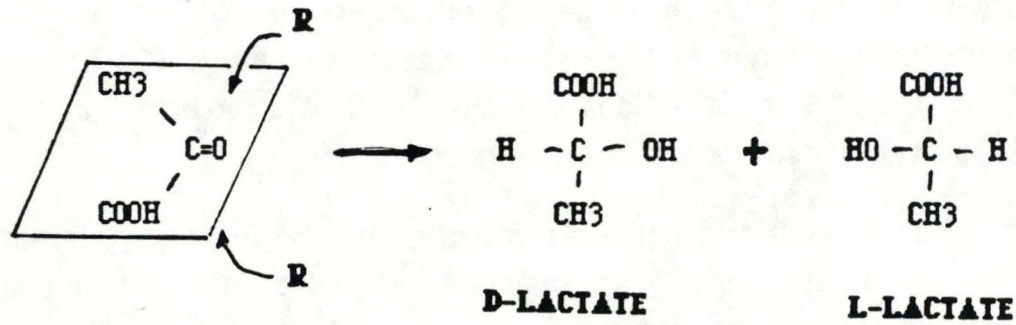


Fig. 1.2 : Analyse de forme D et L lactate dans des produits alimentaire de fermentation par HPLC. a) "quark"; b) lait écrémé; c) yogurt; d) biogarde; e) kéfir; f) crème acide; g) "umer".

rationnelle, les expériences de mutagenèse visant à les éprouver. La réalisation de ce clonage nécessite la construction d'une banque représentative du génome de *Lactobacillus delbrueckii*, le screening de clones candidats porteurs du ou des gène(s) de LDH, leur caractérisation et la vérification de leur authenticité.

### 1.1. La stéréospécificité.

La stéréospécificité des enzymes résulte en des produits de propriétés différant selon l'énantiomère obtenu. Ceux-ci peuvent avoir un impact important sur l'organisme. Avant de détailler ceci, il serait utile de rappeler quelques notions d'isomérisation optique.

#### 1.1.1. L'isomérisation optique (1).

Il est notoire que certaines molécules naturelles ont la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière dans un sens ou dans l'autre. Ces molécules, qui ont la même formule chimique et des propriétés physiques identiques (telles le point de fusion ou la solubilité), mais qui font dévier le plan de la lumière polarisée différemment sont appelées des *énantiomères*. Ces énantiomères sont images spéculaires l'une de l'autre et non superposables (telles la main gauche et la main droite).

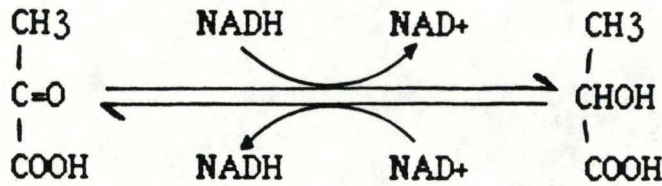
Un signe L (pour lévogyre) a été attribué aux molécules déviant la lumière polarisée vers la gauche et un signe D (pour dextrogyre) pour l'énantiomère déviant cette lumière polarisée vers la droite.

Dans le cas nous intéressant, à savoir la réaction catalysée par la LDH (fig. 1.1), l'attaque du carbone tertiaire du pyruvate peut s'effectuer par-dessus ou par-dessous le plan, suivant la spécificité de l'enzyme. En conséquence, le produit résultant sera d'une forme ou de l'autre.

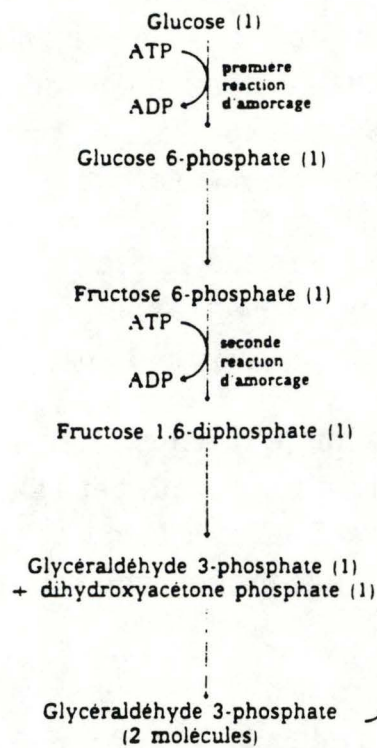
#### 1.1.2. Importance de la stéréospécificité.

Il est bien connu que deux énantiomères d'une même substance permettent d'avoir des propriétés fonctionnelles totalement différentes. Ainsi un des énantiomères peut être un médicament actif pour l'organisme alors que l'autre est inactif, voire toxique (ce fut le cas de la thalidomide) (2).

Fig. 1.3: Interconversion du pyruvate en lactate avec oxydation ou réduction concomitante du système NADH/NAD<sup>+</sup>.



Phase 1 : Phosphorylation du glucose et sa conversion en glyceraldéhyde 3-phosphate



Phase 2 : Transformation du glyceraldéhyde 3-phosphate en lactate et formation couplée d'ATP

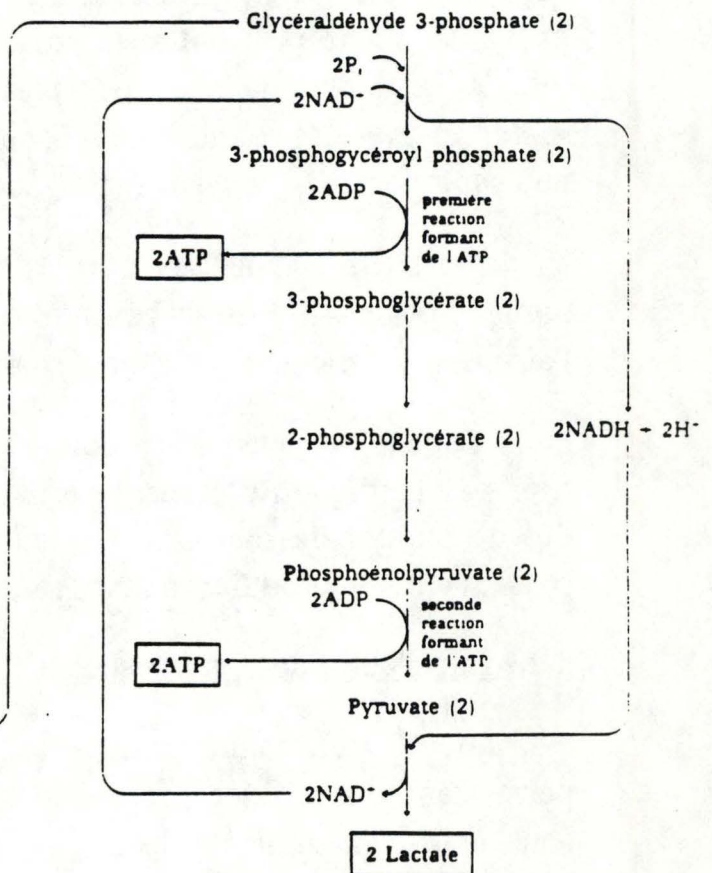


Fig. 1.4 : Les deux phases de la glycolyse en anaérobie. Les numéros après les intermédiaires à 3 C indiquent que 2 molécules de chacun d'eux subissent la réaction indiquée.

Il en va de même, dans une moindre mesure, pour le lactate qui sous sa forme D n'est pas toujours bien métabolisé, et dans certaines circonstances peut s'accumuler dans le sang. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommanda en 1966 une prise quotidienne de D-lactate inférieure à 100 mg/kg de masse corporelle. Cependant en 1974, cette limitation a été uniquement recommandée pour les enfants âgés de moins de 3 ans (3). Cet isomère se retrouve principalement dans le *Kéfir* (fig. 1.2).

## **1.2. Les lactates déshydrogénases.**

La lactate déshydrogénase réalise l'interconversion du pyruvate en lactate avec oxydation ou réduction concomitante du système NADH/NAD<sup>+</sup> (fig. 1.3).

Le rôle physiologique de cette enzyme est de catalyser la dernière étape de la glycolyse en régénérant le NAD<sup>+</sup> en conditions d'anaérobiose. Cette fonction se réalise principalement dans les tissus musculaires des vertébrés (4). La lactate déshydrogénase est également une enzyme hautement représentative dans le règne bactérien. En effet, le lactate (du latin *lac* pour lait) est un important produit final de la fermentation bactérienne du glucose ou d'autres hydrates de carbone (fig. 1.4) (5).

## **1.3. Les LDH bactériennes.**

### **1.3.1. Classification des LDH bactériennes (5).**

Les bactéries lactiques sont classées en deux groupes, les bactéries homofermentaires (conversion du glucose en lactate par la voie "Embden-Meyerhof") et hétérofermentaires (conversion du glucose en lactate, CO<sub>2</sub>, acétate,...). Elles régénèrent dans la dernière étape le NAD<sup>+</sup> à partir du NADH formé lors de la glycolyse. Chez les bactéries lactiques, cette régénération, vitale, est permise, entre autre, grâce à la présence d'une LDH cytoplasmique NAD-dépendante (nLDH).

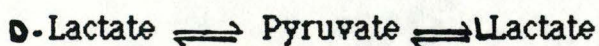
Un autre type de LDH n'utilisant pas le NAD<sup>+</sup>/NADH comme coenzyme et appelé LDH-NAD<sup>+</sup> indépendante (iLDH), se retrouve chez certaines bactéries. Elle possède une autre fonction à savoir convertir le lactate en pyruvate. Dans ce cas, l'accepteur d'hydrogène n'est pas toujours

Taxon	aLDH			iLDH		Lactate racemase
	Forming D(-)-lactate	Forming L(+)-lactate	FDP-activated, forming L(+)-lactate	Forming D(-)-lactate	Forming L(+)-lactate	
<b>Lactobacillus</b>						
<i>L. acidophilus</i>	+	+		+	+	
<i>L. bulgaricus</i>	+			+		
<i>L. delbrueckii</i>	+			+		
<i>L. jensenii</i>	+				+	
<i>L. jugurti-helveticus</i>	+	+		+		
<i>L. lactis</i>	+			+		
<i>L. leichmannii</i>	+			+		
<i>L. salivarius</i>		+			+	
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>						+
<i>L. curvatus</i>			+			+
<i>L. sake</i>						+
<i>L. plantarum</i>	+	+		+	+	
<i>L. brevis</i>	+	+		+	+	
<i>L. buchnerii</i>	+	+				
<i>L. cellobiosus</i>	+	+				
<i>L. confusus</i>	+	+		+	+	
<i>L. fermentum</i>	+	+				
<i>L. veriforme</i>	+	+			+	
<i>L. uridicensis</i>	+	+		+	+	
<b>Leuconostoc</b>						
<i>L. cremoris</i>	+					
<i>L. dextranicum</i>	+					
<i>L. lactis</i>	+					
<i>L. mesenteroides</i>	+	+		+	+	
<i>L. paramesenteroides</i>	+			+	+	
<i>L. oenos</i>	+					
<b>Streptococcus</b>						
<i>S. agalactiae</i>		+	+			
<i>S. dysgalactiae</i>			+			
<i>S. uberis</i>			+			
<i>S. bovis</i>		+	+			
<i>S. faecalis</i>			+			
<i>S. faecium</i>			+			
<i>S. lactis/S. cremoris</i>	+		+	+	+	
<i>S. raffinolactis</i>			+			
<i>S. acidominimus</i>			+			
<i>S. milleri</i>			+			
<i>S. mutans</i>		+	+			
<i>S. mitis</i>			+			
<i>S. salivarius</i>			+			
<i>S. sanguis</i>			+			
<i>S. thermophilus</i>		+	+			
<b>Pediococcus</b>						
<i>P. acidilactici</i>	+	+				
<i>P. damnosus</i>	+	+				
<i>P. dextranicus</i>			+			
<i>P. halophilus</i>		+				
<i>P. inopinatus</i>	+	+				
<i>P. pentosaceus</i>	+	+		+		
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		+	+			
<b>Aerobacter</b>						
<i>A. aerogenes</i>	+			+	+	
<i>A. cloacae</i>				+	+	
<b>Escherichia</b>						
<i>E. coli</i>	+			+	+	
<i>E. freundii</i>				+	+	
<i>Hafnia</i> sp				+	+	
<i>Klebsiella</i> sp				+	+	
<i>Salmonella typhimurium</i>				+	+	
<i>Proteus vulgaris</i>				+	+	
<i>Serratia</i> sp				+	+	
<i>Acetobacter peroxidans</i>				+	+	
<b>Pseudomonas</b>						
<i>P. aeruginosa</i>				+	+	
<i>P. putrefaciens</i>				+	+	
<i>Propionibacterium pentosaceum</i>						
<b>Staphylococcus</b>						
Various species	+	+				
<i>S. aureus</i>	+	+		+	+	
<i>S. epidermidis</i>			+			
<i>S. ureae</i>						+
<i>Acholeplasma laidlawii</i>			+			
<b>Mycoplasma</b>						
Various species	+	+				
<i>M. gallisepticum</i>					+	
<b>Bacillus</b>						
<i>B. caldolyticus</i>		+				
<i>B. subtilis</i>		+				
<b>Clostridium butylicum</b>						
<i>Butyrivibrio rafterii</i>	+			+	+	+
<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>			+			
<i>Selenomonas ruminantium</i>	+	+				
<i>Actinomyces viscosus</i>			+			
<i>Rothia dentocariosa</i>			+			

Tableau 1.1 : Liste des différentes LDH bactériennes.

connu (souvent le FAD). Si chez les bactéries lactiques, les iLDH sont cytoplasmiques, chez d'autres types de bactéries elles sont fréquemment associées à des particules ou sont intégrées dans la membrane des cellules tel chez *E. coli*. Les différents types de LDH bactériennes sont présentés dans le tableau 1.1.

Suivant le type d'enzymes stéréospécifiques, le pyruvate sera transformé en L ou D lactate. Les organismes supérieurs et la majorité des bactéries ne possèdent que la forme L et très peu de microorganismes possèdent la D-LDH seule; on la retrouve plus généralement en association avec la L-LDH. Dans ce dernier cas, il y aura formation d'un mélange des deux énantiomères (= mélange racémique) qui, sous l'action d'une racémase, peuvent être transformés vers une forme ou l'autre selon le schéma suivant (6) :



Parmi les L-nLDH, deux catégories peuvent être distinguées : les L-nLDH qui sont activées par le fructose 1,6 diphosphate (formé dans une étape antérieure de la glycolyse) et celles qui ne le sont pas. Les enzymes de la première catégorie (régulées par le FDP) se retrouvent principalement chez les espèces *Streptococales*, *Bacilli* et quelques unes chez les *Lactobacilli* (notamment *L. casei*). Un seul cas de D-nLDH contrôlée par du FDP pourrait exister (cas de *Butyrivibrio*(5)).

### 1.3.2. Les gènes de LDH.

Il existe très peu d'informations sur les gènes de LDH bactériens. Toutefois, le clonage et le séquençage des gènes de LDH de certains *Thermus* (7)(8), *Bacillus* (9)(10)(11) et *Bifidobacterium* (12), ont déjà été réalisés.

Les séquences codantes de la majorité des LDH de bactéries thermophiles (ainsi que des LDH de mammifères) présentent en commun un contenu en GC très élevé ( plus ou moins 71 %) par rapport à l'ADN chromosomique (plus ou moins 65 %). Cette caractéristique se marque d'avantage au niveau de la troisième base constitutive des codons (>90 %). Cependant cette caractéristique n'est pas observée chez les bactéries non thermophiles tels les lactobacilles.



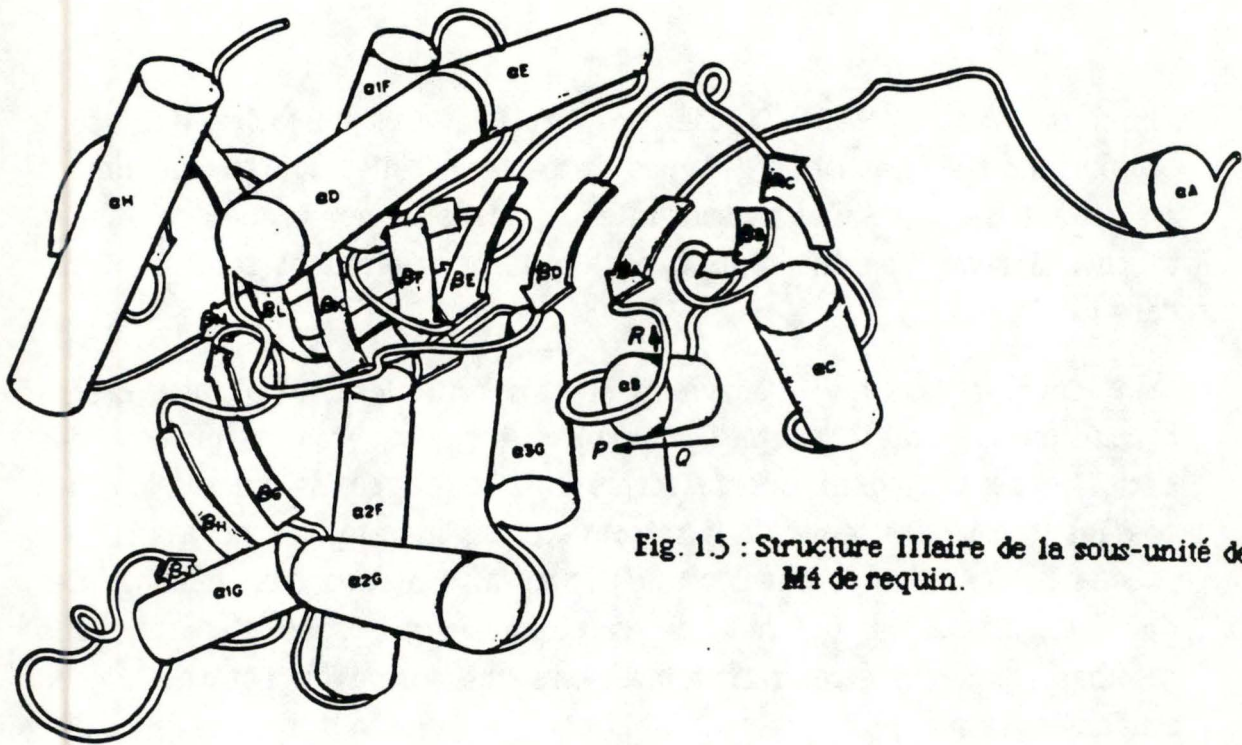


Fig. 1.5 : Structure IIIaire de la sous-unité de l'apo-LDH M4 de requin.

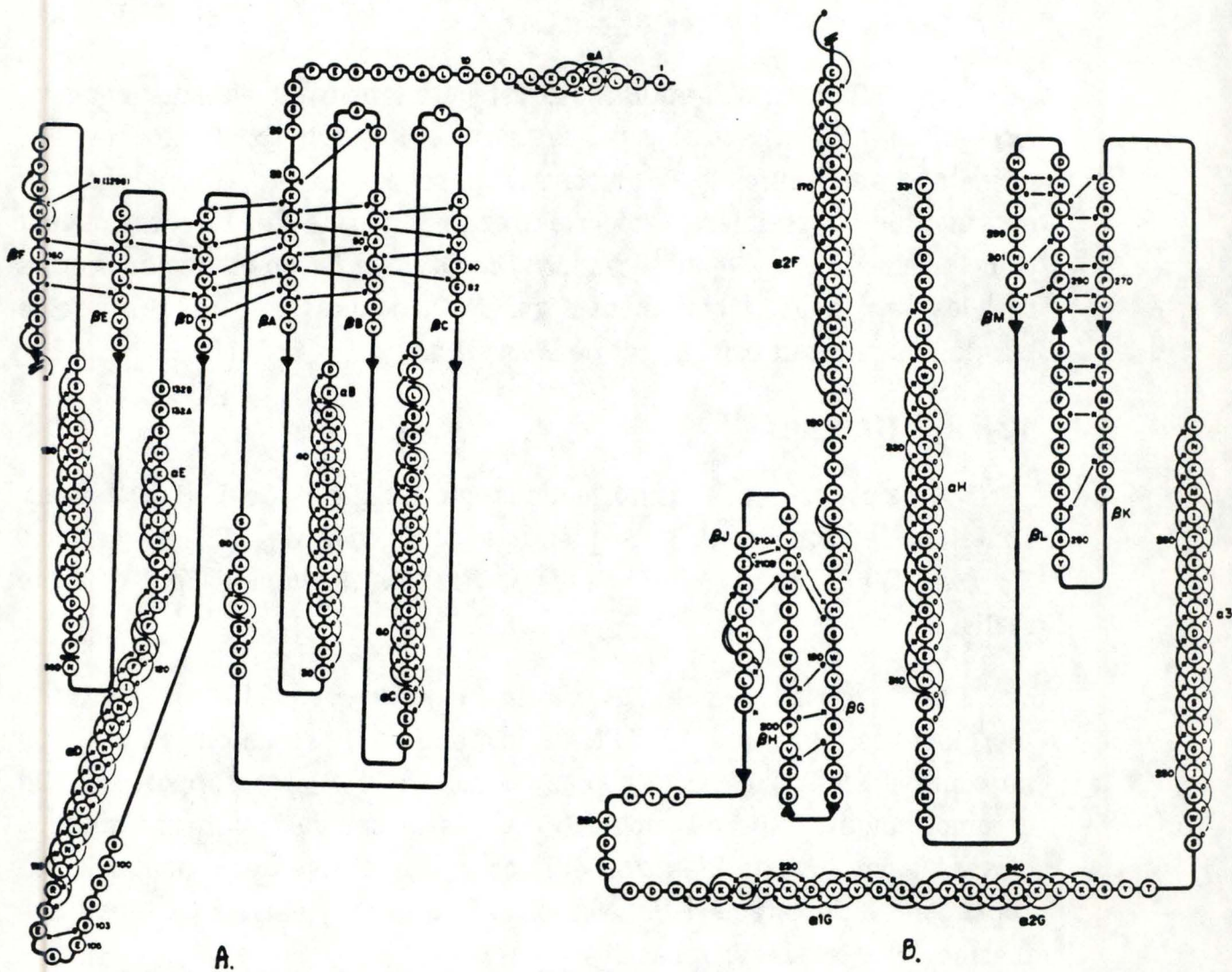


Fig. 1.6 : Structure II aire de la sous-unité de la LDH M4 de requin. A) le site de fixation du NADH

B) le domaine catalytique

### 1.3.3. Structure tridimensionnelle et séquence en acides aminés.

#### 1.3.3.1. Structure primaire.

La structure primaire des LDH est connue chez de nombreux vertébrés et bactéries. Ces enzymes diffèrent tant en séquences qu'en taille(5)(13).

On notera que les nLDH de mammifères ont un contenu en cystéine nettement plus élevé par rapport aux nLDH bactériennes. Ces différences expliquent les différentes réponses à certains inhibiteurs dont les thiols (5).

Les comparaisons de séquences indiquent que les différences de séquence entre les nLDH des vertébrés et les nLDH bactériennes ne sont pas plus importantes que celles trouvées entre les nLDH bactériennes. La diversité des LDH à l'intérieur d'un même genre bactérien pourrait s'expliquer par le fait que les bactéries, vivant dans des milieux variés d'une espèce à l'autre, ont subi des pressions sélectives très différentes, ce qui s'est traduit par une divergence importante.

#### 1.3.3.2. Structure tridimensionnelle.

Certaines LDH bactériennes ont été cristallisées, c'est le cas pour *B. stearothermophilus*, *Bifidobacterium longum* et *L. casei*. Cependant, l'étude aux rayons X est nettement plus avancée dans le cas des LDH de vertébrés (par exemple la LDH M4 de requin (14), du cœur de porc (15),...).

Les études préliminaires concernant l'analyse aux rayons X des cristaux de LDH bactériennes indiquent une grande similitude de la structure tridimensionnelle.

Les LDH sont formées de sous-unités. Leur structure tertiaire permet d'élucider certains aspects fonctionnels de l'enzyme. On peut y distinguer (fig. 1.5) :

- un domaine catalytique, formant une poche accueillant le substrat. Chez certaines bactéries, l'enzyme étant allostérique, on observe un domaine réservé pour la molécule régulatrice, le fructose 1,6 diphosphate (*L. casei*, *B. stearothermophilus* et *B. longum*).
- un domaine de fixation du co-enzyme NAD<sup>+</sup>.

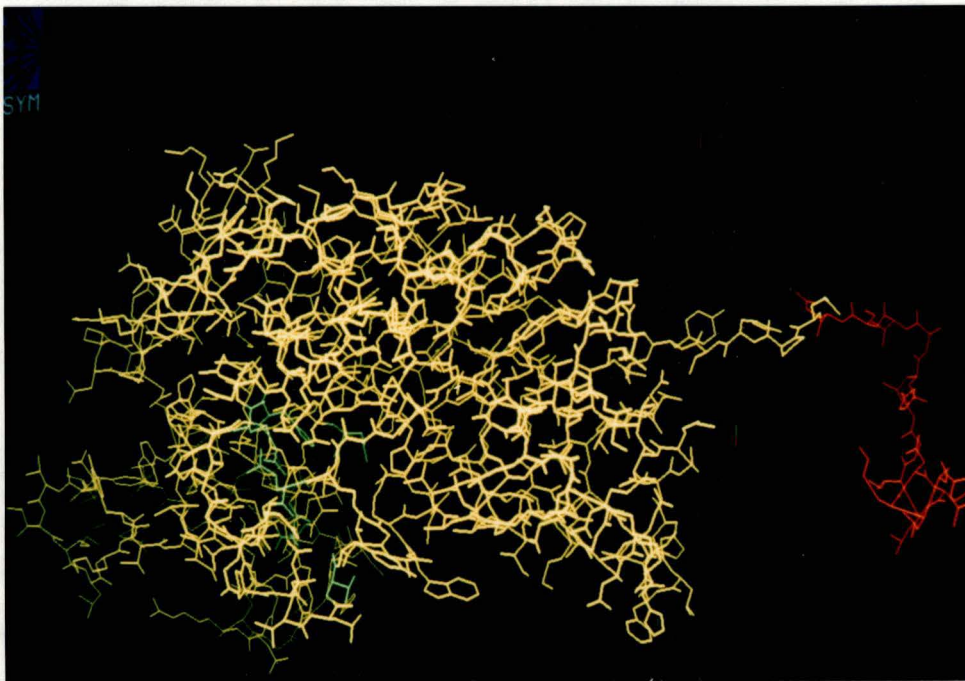


Fig.1.7 : LDH - I de souris. En vert, le domaine catalytique.

Fig.1.8 : Arrangement des monomères de la LDH.  
Représentation de l'axe R et Q.

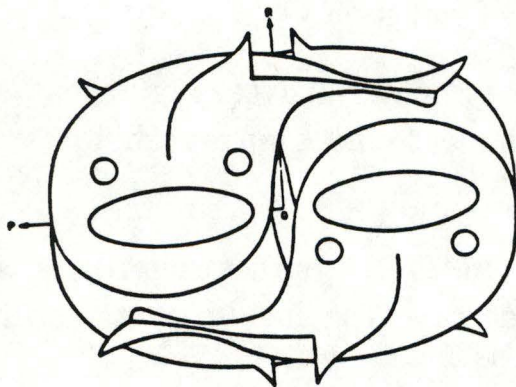
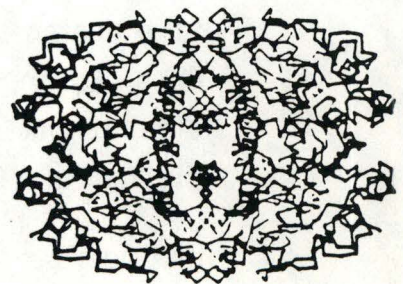


Fig. 1.9 : Structure IV aïre de l'apo-LDH M4 de requin



Ces deux domaines sont formés d'une alternance d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  (fig. 1.6 )(14).

Une différence peut cependant être signalée entre les LDH bactériennes et les LDH d'eucaryotes. En effet, un bras peptidique N-terminal est présent chez toutes les LDH des vertébrés (fig. 1.7)(14). Ce bras peptidique N-terminal "contacte" les quatre sous-unités au travers de l'axe moléculaire R et stabilise ainsi la structure tétramérique (fig. 1.8 ). Chez la LDH de *L. casei*, les douze premiers acides aminés de la partie N-terminale sont manquants (cela varie entre 12 et 15 aa pour les autres bactéries), ceux-ci correspondraient au bras peptidique N-terminal présent chez les LDH des vertébrés. Par contre, sept résidus se retrouvent en supplément à l'extrémité C-terminale par rapport aux LDH d'eucaryotes (16).

Leur structure quaternaire est de deux types (fig. 1.9 ) :

- tétramérique pour les lactates déshydrogénases de stéréochimie L. Les sous-unités ont un PM de 34000 en moyenne.
- dimérique pour les LDH de stéréochimie D rencontrées notamment chez *Lactobacillus delbruckei* (sujet de notre étude), *Lactobacillus plantarum*. Les sous-unités ont un PM de 34000 à 40000.

#### 1.3.4. Mécanismes réactionnels

De nombreux réarrangements internes de la structure protéique sont essentiels pour l'activité catalytique de la LDH. Aussi la fixation des ligands est accompagnée d'une série de changements complémentaires de la structure de la protéine qui stabilisent la liaison du co-enzyme, du substrat et l'état de transition. Ces réarrangements structuraux ont été particulièrement bien étudiés dans le cas de l'enzyme de *Bacillus stearothermophilus* (17). Celle-ci a été cristallisée sous deux formes distinctes correspondant aux formes apo-enzyme (enzyme seule) et complexe ternaire (dans lequel le co-enzyme et le substrat sont liés à l'enzyme). Une différence importante entre ces deux structures cristallographiques consiste en la position d'une courte boucle peptidique (entre l'acide aminé 98 et l'acide aminé 110) qui est étendue dans le cas de l'apo-enzyme mais referme le site actif dans le cas du complexe ternaire (fig. 1.10 )(17)(18 a & b).

Tableau 1.2 : Alignement de séquences en acides aminés de différentes espèces d'eucaryotes et de bactéries. Une grande conservation de certains acides aminés dans le site actif témoigne de leur importance à savoir l' Arg 109, l'His 195, l'Asp 168, l'Arg 171, l'Ile 250, la Thr 246 et Gln 102.

M pour muscles, H pour coeur.

HUMAN, Homme ; CHICK, poulet ; SQUAC requin ; LACCA, Lactobacillus casei ; BACPSY, Bacillus psychrosaccharoïdytycus ; BACSUB Bacillus subtilis ; BACME, Bacillus megaterium ; BACST, Bacillus stearothermophilus ; THECA, Thermophilus caldophilus .

Gap fixed = 10 Gap vary. = 10  
 \* :=> match across all seqs.  
 . :=> conservative substitutions

ID LDH\$HUMAN MATLKEKLIAPVAEEETVPNNKITVVGVGQVGMACAIISILGKSLADELALVDVLEDKLK  
 ID LDH\$CHICK -ATLKEKLITPVAAG-STVPSNKITVVGVGQVGMACAIISILGKGLCDELALVDVLEDKLK  
 ID LDH\$SQUAC -ATLKDKLIGHLATSQEPRSYNKITVVGVGAVGMACAIISILMKDLADEVALVDVLEDKLK  
 ID LDH\$LACCA A---SIT-----DKDHQKVILVGDGAVGSSYAFAMVLQGIAQEIGIVDFKDKTK  
 ID LDH\$BACPSY M---KQR-----NVNRVALIGAGSVGSSYAFALLNQSITEELVIIDLNENKAM  
 ID LDH\$BACSUB M---N-K-----HVNKVALIGAGFVGSSYAFALINQGITDELVVIDLNKEKAM  
 ID LDH\$BACME ;M---KTQF-----TPKTRKVAVIGTGFVGSYAFSMVNQGIANELVLIDMNEKAE  
 ID LDH\$BACST M---KNN-----GGARVVVIGAGFVGASYVFALMNQGIADIVLIDANESKAI  
 ID LDH\$THECA M-----KVGIVGSGMVGSAAYALALLGVAREVVLVDLDRKLAQ

.. . . \* \* \* . . . . . \* . . . . \*

ID LDH\$HUMAN GEMMDLQHGSFLFLQTPKIVADKDYSVTANSKI VVVV TAGVRRQEGESRLNLVQRNVNVFKF  
 ID LDH\$CHICK GEMMDLQHGSFLFLQTHKIVADKDYAVTANSKI VVVV TAGVRRQEGESRLNLVQRNVNVFKF  
 ID LDH\$SQUAC GEMMDLQHGSFLFLHTAKIVSGKDYSVSAGSKLVVITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKF  
 ID LDH\$LACCA GDATDLSNALPFTS-PKKIYSAEYSDAKDADLVVITAGAPQKPGETRLDLVNKNLKI LKS  
 ID LDH\$BACPSY GDAMDLNHGKVFAPNPPTKTWYGTYS DCKDADIVCICAGANQKPGETRLDLVEKNLRI FKG  
 ID LDH\$BACSUB GDVMDLNHGKAFAPQPVKTSYAGTYEDCKDADIVCICAGANQKPGETRLLEVEKNLKI FKG  
 ID LDH\$BACME ;GEARDINHGMPFAT-PMKIWHG DYKDCADADLAVITAGANQAPGETRLDLVEKNV KIFEC  
 ID LDH\$BACST GDAMDFNHGKVFAPKPVDIWHDYDDCRDADLVVICAGANQKPGETRLDLVDKNI AIFRS  
 ID LDH\$THECA AHAEDILHATPFA-HPVWVRAGSYGDLEGARAVVLAAGVAQRPGETRLQLLDRNAQVFAQ

102 103

.. \* . . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \*

ID LDH\$HUMAN IIPQIVKYSPDCIIIVVSNPVDILTYVTWKLSGLPKHRVIGSGCNLDSARFRYLMAEKL  
 ID LDH\$CHICK IIPQIVKYSPNCVILVVSNPVDILTYVTWKLSGLPKHRVIGSGCNLDTARFRYLMAERL  
 ID LDH\$SQUAC IIPNIVKHSPDCIILVVSNPVDVLTVAWKLSGLPMHRIIGSGCNLDSARFRYLMGERL  
 ID LDH\$LACCA IVDPIVDSGFNLI FLVAANPVDILTYATWKLSGFPKNRVVGSGTSLDTARFRQSI AEMVN  
 ID LDH\$BACPSY IVEEIMASGFDGIFLIATNPVDILTYATWKFSGLPKERIIGSGTILDTGRFRFLLGEYFD  
 ID LDH\$BACSUB ;IVSEVMASGFDGIFLIATNPVDILTYATWKFSGLPKERVIGSGTILDSARFRFLLSEYFG  
 ID LDH\$BACME ;IVKDIMNSGFDGIILVATNPVDILYATQKVSGLPNGRVIGSGTILDTARFRYLLSDYFE  
 ID LDH\$BACST IVESVMASGFQGLFLVATNPVDILTYATWKFSGLPHERVIGSGTILDTARFRFLLGEYFS  
 ID LDH\$THECA VVPRVLEAAPEAVLLVATNPVDVMTQVAYRLSALPPGRVVGSGTILDTARFRALLAEHLR

163 171

.. . . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \*

ID LDH\$HUMAN IHPSSCHGWILGEHGDSSVAVWVG VAVG VSLQELNPEMGTDNDSENWKEVHKM VVESAY  
 ID LDH\$CHICK IHPTSCHGWILGEHGDSSVAVWVG VAVG VSLQQLDPAMGTDKDSENWKEVHKQ VVESAY  
 ID LDH\$SQUAC VHSCSCHGWVIGE HGDSPVSVWSGMUNA---LKE LHPELGTNKDKQDWKKLHKD VVDSAY  
 ID LDH\$LACCA VDARSVHAYIMGEHGDTEFPVWSHANIGGVTIAEWVKAHP-EIKEDKLVKMFEDVRDAAY  
 ID LDH\$BACPSY IAPANVHAYIIGE HGDTELPVWSHANIGGVTIELIKRNP-EYTKMDLDELFINVRDAAY  
 ID LDH\$BACSUB AAPQNVHAYIIGE HGDTELPVWSHANVGGVPSVSELVEKND-AYMKELDQIVDDVKNAAY  
 ID LDH\$BACME ;VDSRNVHAYIMGEHGDTEFPVWSHAQIGGVKLEHFINTAA-IEKEPDMQHLFEQTRDAAY  
 ID LDH\$BACST VAPQNVHAYIIGE HGDTELPVWSQAYIGVMPIRKLVESKG-EEAQKDLERIFVNVVRDAAY  
 ID LDH\$THECA VAPQSVHAYVLGEHGDSEVLVSSAQVGGVPLLEFAEARGRPLSPEDRARIDEGVRRAAAY

195

.. \* . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \*

ID LDH\$HUMAN EVIKLKG YTNWAIIGLSVADLIESMLK NLSRIHPVSTMVKMGYGIENEVFLSLPCILNARG  
 ID LDH\$CHICK EVIRLKG YTNWAIIGLSVAELCETMLKNLYRVHSVSTLVKGTYGIENDVFLSLPCVLSASG  
 ID LDH\$SQUAC EVIKLKG YTSWAIIGLSVADLAETIMKNLCRVHPVSTMVKDFYGIKDNVFLSLPCV LNDHG  
 ID LDH\$LACCA EIIKLGATFYGIATALARISKAILNDENAVLPLSVYMDGQYGIN-DLYIGTPAVINRNG  
 ID LDH\$BACPSY QIIIEKKGATFYGIAMGLARITKAILNNENSVLTVSTYLDGQYGE-DVYMGVPAV VNRNG  
 ID LDH\$BACSUB TIIIEKKGATYYGVAMSLARITKAILHNENSILTVSTYLDGQY GAD-DVYIGVPAV VNRGG  
 ID LDH\$BACME ;HIINRKGATYYGIAMGLVRITKAILDDENSILTVSALLEGQYGIS-DVYIGVPAI INKNG  
 ID LDH\$BACST QIIIEKKGATYYGIAMGLARVTRAILHNENAILTVSAYLDGLYGER-DVYIGVPAVINRNG  
 ID LDH\$THECA RIIIEKKGATYYGIGAGLARLVRAILTDEKGVYTVSFTPEVEGV L-EVSLSLPRILGAGG

246 250

\* \* \* . . . . . \* . . . . \* . . . . \* . . . . \*

ID LDH\$HUMAN LTSVINQKLDDEVAQLKKSADTLWDI-----QKDLKD-Lxxx  
 ID LDH\$CHICK LTSVINQKLDDEVAQLKKSADTLWSI-----QKDLKD-Lxxx  
 ID LDH\$SQUAC ISNIVKMKLKPDEEQQLKKSATTLWDI-----QKDLK--Fxxx  
 ID LDH\$LACCA IQNILEIPLTDHEEESMQKSASQLKKV-LTDAFAKNDIETRQxxx  
 ID LDH\$BACPSY IREIVE LTLNEQERQQFKHSANVLKEI-LAPNFKE-----Qxxx  
 ID LDH\$BACSUB IAGITELNLNEKEKEQFLHSAGVLKNI-LKPHFVN-----xxx-  
 ID LDH\$BACME ;VRQIIELNLT PHEQQQLHSASILKQT-RDRAFX-----xx--  
 ID LDH\$BACST IREVIEIELNDDEKNRFHSAATLKS V-LARAFT-----Rxxx  
 ID LDH\$THECA VEGTVYPSLSPEEREALRRSAEILKEAFAALGFxxx-----

. . . \* . . . \* . . . . \*

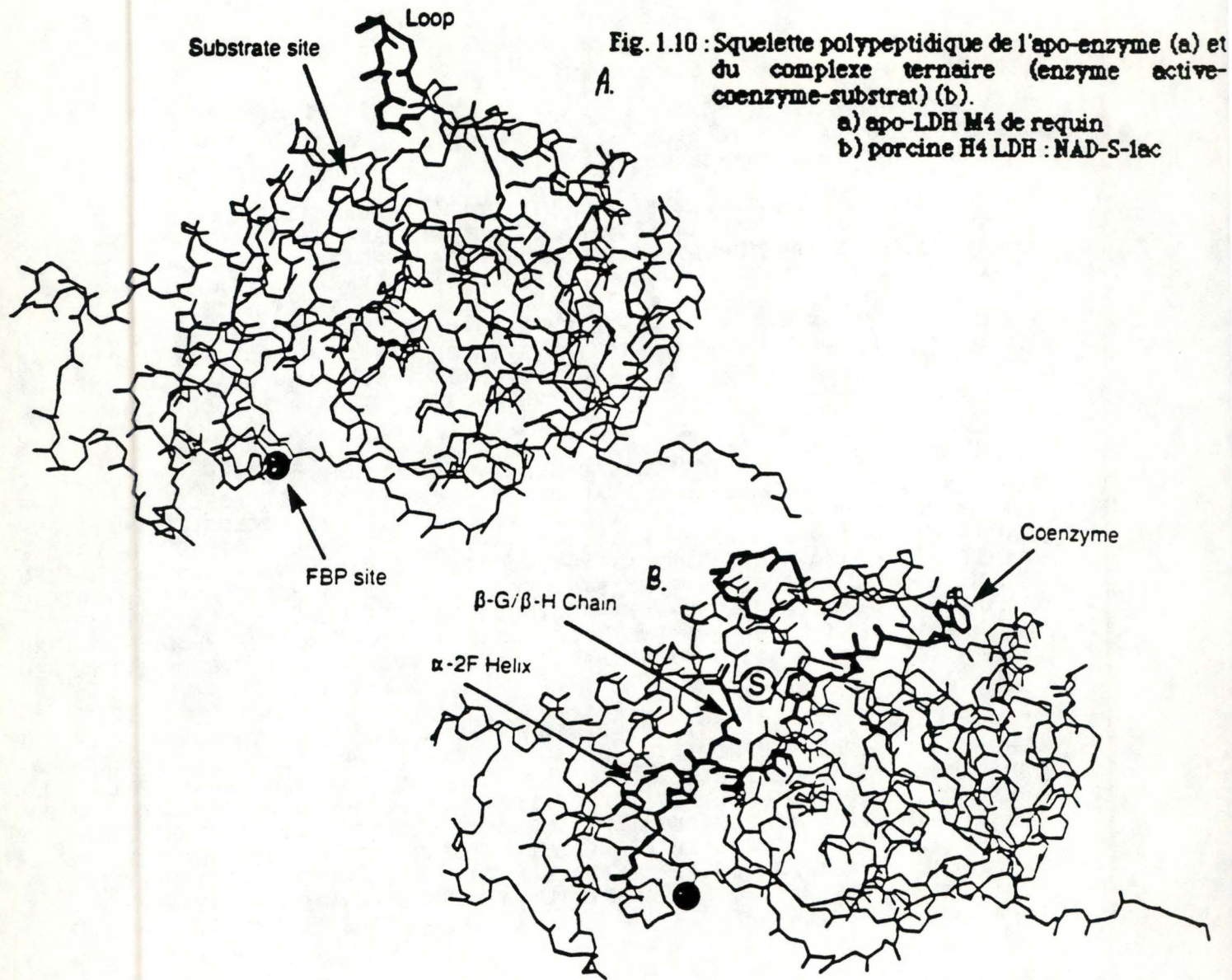
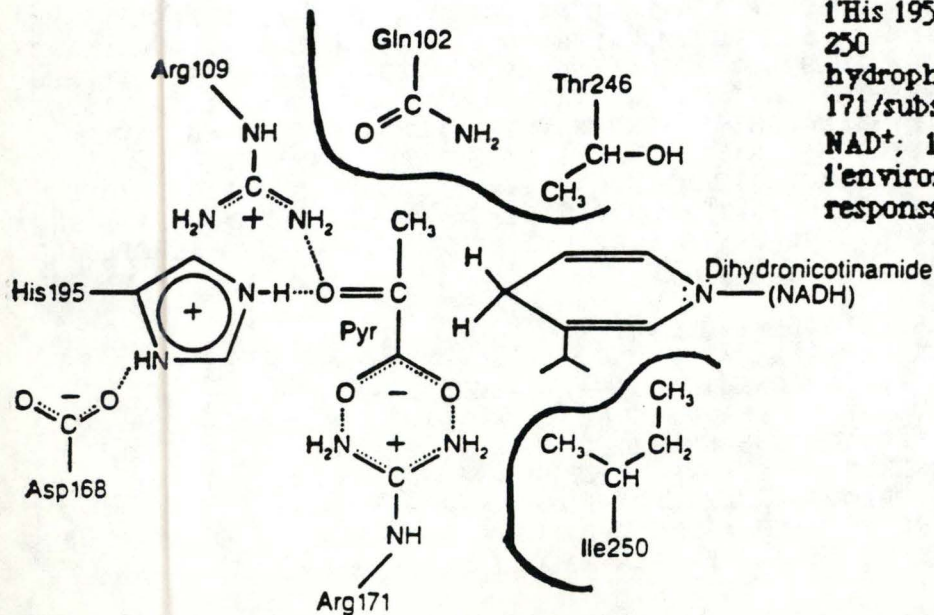


Fig. 1.11 : Résumé des fonction des résidus du site actif : l'Arg 109 sert à polariser la liaison carbonyle du céto-acide; l'Arg 171 provoque une interaction forte (2 ponts hydrogène) avec le groupement carboxylique du substrat assurant une orientation efficace de celui-ci; l'His 195 est le donneur/accepteur de  $H^+$  dans l'étape rédox; quand le substrat est lié, l'Asp 168 interagit avec l'His 195 pour stabiliser la forme protonée; l'Ile 250 provoque un environnement hydrophobique qui renforce l'interaction Arg 171/substrat et stabilise le NADH par rapport au  $NAD^+$ ; le Gln 102 et la Thr 246 forment l'environnement du substrat en partie responsable de la discrimination de celui-ci.



Les réarrangements internes de la structure protéique accompagnant le mécanisme réactionnel de la conversion du pyruvate en lactate peuvent se résumer comme suit : le NADH se lie à l'apo-enzyme qui est sous forme inactive et dont la boucle est relevée. Ceci forme donc un complexe binaire E-NADH (19) qui est alors capable de fixer le pyruvate provoquant la fermeture de la boucle. L'importance de certains acides aminés, à savoir l'Arg 109 (20), l'His 195 (21), l'Asp 168 (21), l'Arg 171 (22), a été démontrée par divers travaux de mutagenèse dirigée. Une grande conservation de ceux-ci, observée lors de l'alignement de séquences primaires de différents espèces, confirme leur importance (tableau 1.2). Leur rôle principal est résumé dans la figure 1.11 (18). Il s'agit là d'un remarquable exemple de changement de conformation induit par le substrat. Dans un environnement adéquat (23), la réaction se poursuit par la réduction du groupement carboxylique du substrat et cela par l'intermédiaire d'un hydrure ( $H^-$ ) fourni par le NADH et d'un proton ( $H^+$ ) provenant de la protéine (fig. 1.12 et 1.13) (18).

Après cette étape d'oxydo-réduction, la boucle se relève du site actif, le  $NAD^+$  et le lactate se dissocient du site et la LDH se relaxe en une structure inactive. Ces dernières étapes ont une vitesse relativement plus élevée (24).

Chez beaucoup de bactéries, l'activité de la LDH est régulée par le fructose 1,6 diphosphate (tableau 1.1). Cette activation entraîne un changement dans l'association des sous-unités composant l'enzyme (dimère ou tétramère). En conséquence l'affinité pour le substrat, la structure des sous-unités et la fixation de l'effecteur (NADH) en sont affectées. Remarquons que la forme dimérique de l'enzyme a une faible affinité pour le substrat comparé à la structure tétramérique (fig. 1.14) (25).

#### **1.4. La D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii***

##### **1.4.1 Les caractéristiques de l'espèce et son utilisation.**

Cette bactérie lactique, proche parente de *Lactobacillus leishmanii*, *Lactobacillus lactis* et *Lactobacillus bulgaricus* (90 à 100 % d'homologie estimée par hybridation ADN-ADN)(26), présente des caractéristiques physiologiques et stéréochimiques qui rendent son étude intéressante.



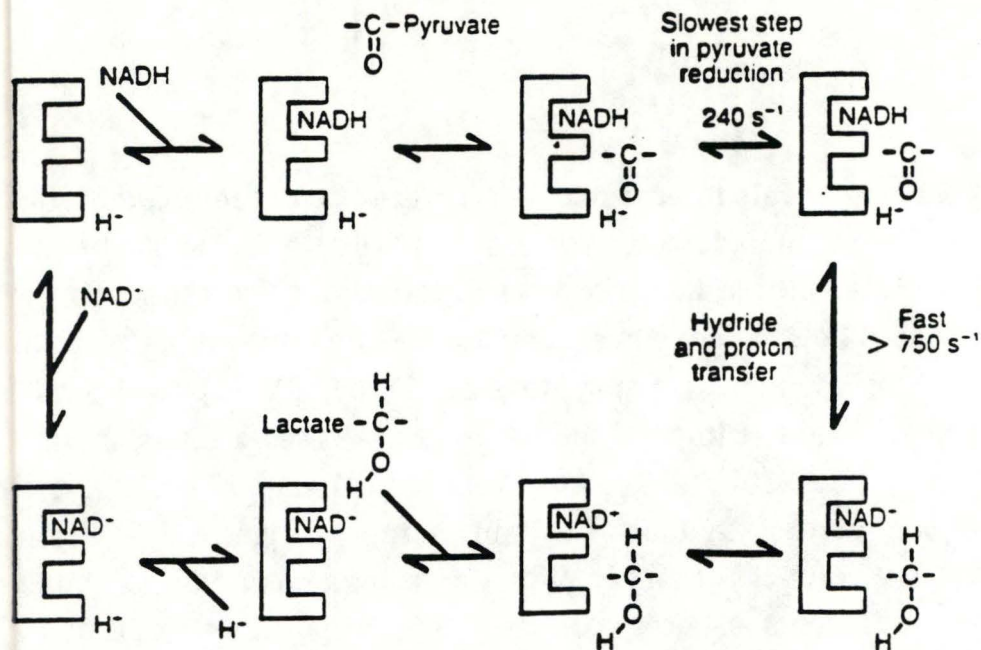


Fig. 1.12: Cycle catalytique de la LDH. Les 8 intermédiaires cinétiques par lesquels l'enzyme passe durant la catalyse sont représentés schématiquement. Le complexe E-coenzyme et l'apo-enzyme sont protonés. Le proton est donné par l'His 195 de l'enzyme.

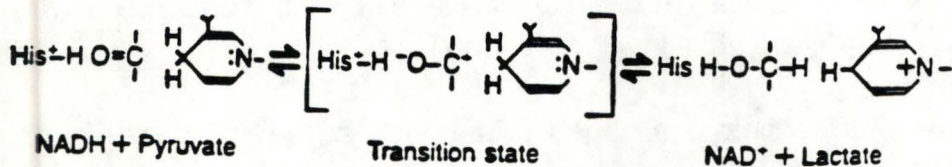


Fig. 1.13 : Transfert du proton dans la réaction d'oxydo-réduction du NADH/NAD<sup>+</sup>

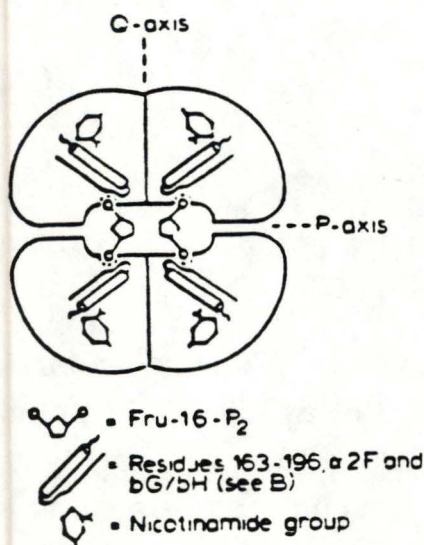


Fig. 1.14 : Les connections entre les sites de fixation de l'anion et les sites de fixation du substrat. Schéma du tétramère vu de l'axe R. Les 2 molécules de FDP relient l'axe P avec leurs groupes phosphate et donc stabilisent le tétramère. En absence de l'activateur, l'interface des sous-unité dans l'axe P est moins stable et la protéine se dissocie le long de l'axe R et P pour donner les dimères. La communication entre la liaison de l'activateur et la liaison du pyruvate se fait dans les régions des aa 163-195.

*Lactobacillus delbruckei* se présente sous forme de bâtonnets non mobiles, souvent disposés en chaîne. Cette espèce possède une caractéristique particulière; sa morphologie varie selon les conditions du milieu (température, pH, composition,...)(fig. 1.15 ) (27). La paroi de cette bactérie est caractéristique des Gram +. Les peptidoglycanes constituant la paroi sont de type L-Lys-D-Asp (28).

*Lactobacillus delbruckei* est classée dans les bactéries lactiques homofermentaires c'est-à-dire que le produit final de fermentation en anaérobiose est uniquement du lactate (voie Embden-Meyerhof). Cette bactérie est anaérobie facultative et a une température de croissance optimale d'environ 45°C-48°C.

Elle ne contient ni cytochrome, ni catalase, ni peroxydase. *Lactobacillus delbruckei* comme les autres lactobacilles est une bactérie présentant beaucoup d'auxotrophies, ce qui lui confère une grande exigence vis-à-vis du milieu qui doit être riche en de nombreux facteurs tels que des aa, vit B12,...

*Lactobacillus delbruckei* ssp *delbruckei* se retrouve principalement dans les végétaux tels que les pommes de terre. *Lactobacillus delbruckei* est une espèce de choix pour effectuer une acidification lactique du "yeast mashes" car

- sa température de croissance optimale (45-48°C) permet l'inhibition des bactéries mésophiles (t° de croissance optimale de 20-37°C) et psychrotrophes (30-35°C)(26).
- elle ne libère pas de produits finis volatils qui pourraient affecter la qualité du "mash".

#### 1.4.2. Caractéristiques d'intérêt particulier de la LDH de *L. delbruckei*

Parmi les bactéries exprimant des D-LDH, *Lactobacillus delbruckei* présente une stéréospécificité stricte. En effet, *Lactobacillus delbruckei* est une des rares bactéries à produire le lactate sous forme de l'énantiomère D, ce qui offre l'intérêt, pour un biochimiste, de ne pas séparer les deux enzymes.

En outre, dans le contexte de l'étude des bases moléculaires de la stéréospécificité des protéines par approche génétique fondée sur le clonage et la comparaison des L- et D-LDH, l'existence du seul isozyme D

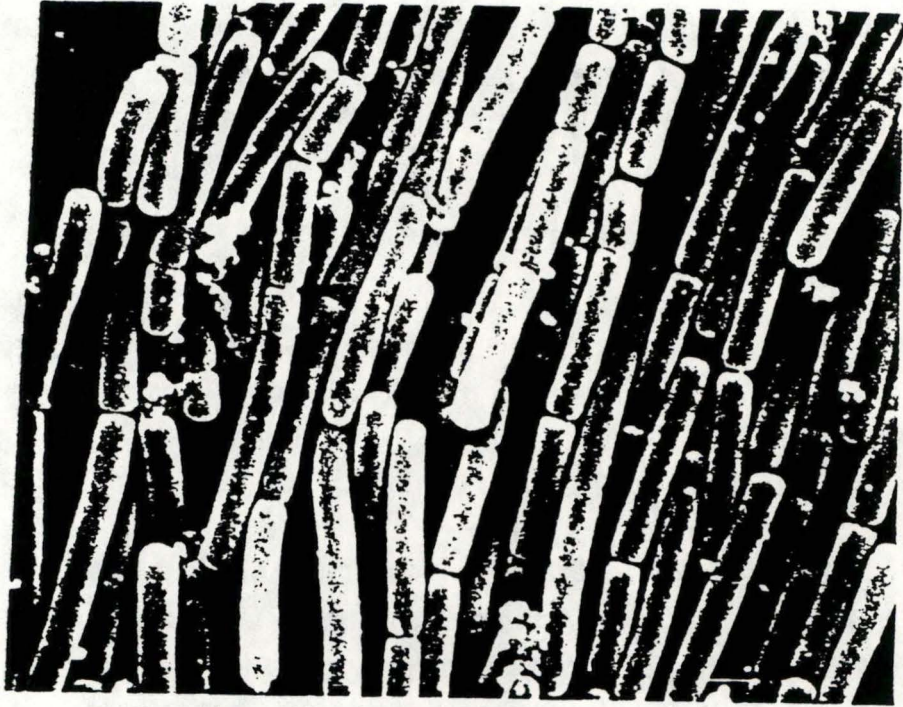


Fig. 1.15 : Morphologie de *L. delbruckei bulgaricus* (7000X). Culture en milieu MRS.

chez *L. delbruckei* devrait constituer un atout majeur. En effet, dans l'hypothèse d'un clonage par complémentation qui, comme nous le verrons est la voie "royale" du clonage, il n'y aurait pas lieu de discriminer parmi des clones à phénotype LDH<sup>+</sup> isolés à partir d'une banque génomique de *L. delbruckei* ceux porteurs de l'un ou l'autre isozyme.

### 1.5. Objectifs et stratégie du travail.

La construction d'une banque génomique, étape préliminaire à tout clonage, constitue le premier objectif de notre travail. Le terme "banque génomique" est souvent défini comme étant une collection de plasmides contenant des fragments d'ADN génomique générés de façon aléatoire et recouvrant le génome entier. La recherche du ou des clones porteurs du gène de la D-LDH de *L. delbruckei* ("screening" de la banque) sera notre second objectif.

#### 1.5.1. Construction de la banque.

Cette construction nécessite dans un premier temps la mise au point des conditions expérimentales des différentes étapes (préparation de l'ADN génomique, restriction partielle, ligation,...). Une fois optimisées, ces conditions permettront la réalisation d'une **bonne banque**, c'est-à-dire qu'elle devra contenir les séquences d'ADN représentant le génome entier sous une forme stable et avec des recouvrements partiels. La qualité de la banque peut s'exprimer sur base du nombre de clones. La formule de Clarke et Carbon (1976) nous permet d'établir le nombre de clones nécessaires pour avoir 99 % de chance qu'une séquence quelconque du génome soit représentée au moins une fois dans la banque :

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

p = probabilité = 0.99

f = proportion du génome contenue par recombinant.

taille des inserts / taille du génome

Ce nombre est fonction de la taille du génome mais également de la taille des fragments à cloner. Nous avons choisi de construire la banque avec des inserts compris entre 5 et 10 kb . La taille choisie résulte d'un

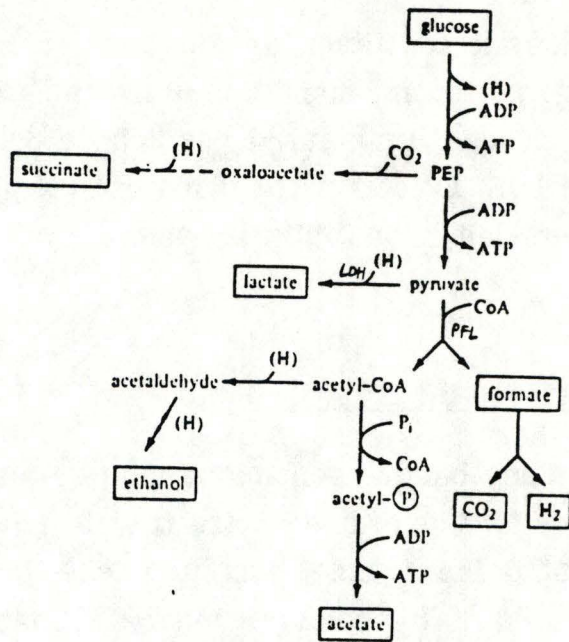


Fig. 1.16 : Fermentation du glucose en conditions anaérobiques.

compromis entre la nécessité d'obtenir le gène entier et le fait de ne pas avoir des fragments trop grands susceptibles de comporter plusieurs gènes et qui pourraient, en outre, engendrer des problèmes dans la transformation bactérienne, la caractérisation, etc ...

La taille du génome de *Lactobacillus delbrueckii* (inconnue à l'heure actuelle) a été estimée approximativement à  $5 \cdot 10^3$  kb (*Bacillus subtilis*  $3 \cdot 10^3$ ; *E. coli*  $4.2 \cdot 10^3$  kb). En remplaçant ces valeurs dans la formule de Clarke, nous obtenons un nombre N d'environ 3000 clones.

### 1.5.2. Le sondage ("screening") de la banque génomique.

Une fois sélectionnés, les transformants sont placés dans des conditions où la présence du gène recherché se traduit par l'apparition d'un phénotype aisément détectable.

Le clonage par complémentation est une voie "royale", préférée aux autres méthodes quand il est réalisable. Il assure, puisque la sélection est opérée en fonction d'un phénotype, que l'insert sélectionné contienne, à l'état fonctionnel, le gène que l'on recherche.

La stratégie du screening peut être résumée comme suit (fig.1.16)(29). En conditions d'anaérobiose, les sucres sont fermentés (glycolyse). Lors de la glycolyse, il y a production de pyruvate et de NADH. La régénération du  $\text{NAD}^+$  à partir du NADH par des bactéries peut se réaliser selon deux voies principales. La voie la plus complexe implique la transformation du pyruvate en acétyl coenzyme A et en acide formique et cela par l'intermédiaire de la pyruvate formate lyase (PFL). L'acétyl coenzyme A est ensuite converti en un mélange d'éthanol et d'acide acétique. L'alternative, plus simple, est la conversion directe du pyruvate en acide lactique, en une seule étape, catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH). En conditions d'aérobiose, ces bactéries utilisent la respiration et le pyruvate est converti en  $\text{CO}_2$ .

Nous disposons de la souche d'*E. coli* FMJ144. Cette souche étant mutante pour le gène de la lactate déshydrogénase et pour celui de la pyruvate formate lyase, est incapable de fermenter et ne peut donc croître en anaérobiose sur un milieu contenant du glucose. En la transformant par les plasmides de la banque, seuls les transformants ayant reçu le gène de la LDH ou de la PFL pourront croître en conditions d'anaérobiose.

Le dosage de l'activité enzymatique de ces clones confirmera la complémentation. En présence de pyruvate, la LDH ou la PFL transformeront celui-ci tout en oxydant le NADH. La mesure de l'absorbance à 340 nm permettra de suivre la diminution de la concentration en NADH.

La discrimination entre les 2 gènes pourra se faire de deux manières : d'une part par la mesure du lactate produit chez les clones positifs (détection par HPLC); d'autre part par le traitement de ces clones au viologène de benzyl (BV), un réactif virant au violet en présence d'une activité PFL (30).

Cette stratégie, nous devrait nous permettre d'obtenir le gène de la D-LDH ouvrant ainsi diverses voies d'études génétiques, biochimiques et conformationnelles.

**MATERIEL ET METHODES.**





## 2. MATERIEL ET METHODES.

### 2.1. LES SOUCHES UTILISEES.

#### 2.1.1. Les souches bactériennes.

##### 2.1.1.1. *Lactobacillus delbruckei*

*Lactobacillus delbruckei* subsp. *delbruckei*, LMG 6412 <sup>T</sup> = ATCC 9642 = NCIB 8130, milieu 66 (MRS), 37°C.

- \* Taxonomie :
  - Eubactéries non-photosynthétiques
  - Bactériales Gram +
  - Lactobacillacées
  - *Lactobacillus delbruckei delbruckei*
  
- \* Caractéristiques : *Lactobacillus delbruckei* se présente sous forme de bâtonnets non mobiles, souvent en chaîne. Il s'agit d'un anaérobie facultatif et thermophilique (40-45°C). Il ne contient ni cytochrome, ni catalase, ni peroxydase. Sa capacité de synthèse est peu développée, ce qui lui confère une grande exigence vis-à-vis de son milieu qui doit être riche en de nombreux facteurs tels que des aa, vitamines B12,... Elle est classée dans les bactéries lactiques homofermentaires ce qui signifie que le produit final de fermentation en anaérobiose est uniquement du lactate (voie Embden-Meyerhof).

##### 2.1.1.2. *E. Coli XL1-blue*

La souche XL1-blue d'*Escherichia coli* est commercialisée par la firme Stratagène. Son génotype est repris dans le tableau 2.1.

Parmi les particularités intéressantes de son génotype citons :

- Rec A1 : ce caractère réduit les recombinaisons entre l'ADN exogène et endogène.
  
- end A1 : améliore le rendement et la qualité des préparations de ADN plasmidique à petite échelle en raison du faible taux d'endonucléases.

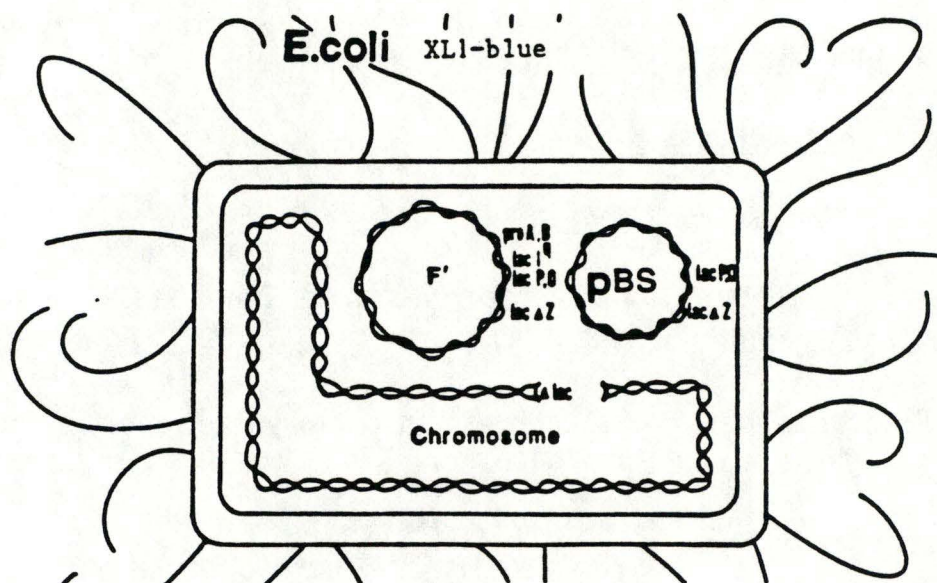


Fig. 2.1 : Marqueurs présents dans une bactérie de la souche XL1-blue hébergeant un plasmide Bluescript.

Tableau 2.1 : Description du génotype des souches *E. coli XL1 Blue*, *TG1* et *FMJ 144*.

SOUCHES	GENOTYPE
<i>E. coli XL1 Blue</i>	rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, Sup E 44, rel A1,1-, (Lac-), { F', pro AB, lac I <sup>q</sup> ZAM15, Tn 10 (tet <sup>R</sup> ) }
<i>E. coli TG1</i>	K12, Δlac pro, Sup E, thi/F', traD36, pro AB, Lac I <sup>q</sup> , ZAM15.
<i>E. coli FMJ 144</i>	Aldh, pfl::cam, trp A, trp R, his-29 (am), pro-2, arg-427, deo B ou C, ts X, lac Y.

$\Delta lac$  : le chromosome est délété au niveau de l'opéron lactose et donc la bactérie est incapable de métaboliser le lactose.

F' : présence d'un épisome codant pour les pili sexuels présents à la surface de la bactérie (fig. 2.1.).

tet<sup>R</sup> : contient un marqueur de résistance à la tétracycline.

lacIq : mutation augmentant la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

ZAM15 : gène de la  $\beta$ -galactosidase délété de la partie N-terminale et produisant une protéine inactive.

N.B. : la nomenclature utilisée pour désigner les souches est celle de Demerer et Coll. (1966).

#### 2.1.1.3. *E. coli* TG1

Son génotype est repris dans le tableau 2.1. Détaillons quelques caractéristiques :

$\Delta lac pro$  : le chromosome bactérien est délété au niveau de l'opéron proline.

pro AB : l'épisome F' porte l'opéron proline sous sa forme intacte, entraînant le caractère prototrophe pour la synthèse de la proline. Cette prototrophie permet la sélection des bactéries TG1 portant le facteur F' sur des milieux de culture ne comprenant pas cet acide aminé.

#### 2.1.1.4. *E. coli* FM1144

Cette souche de *E. coli* est une double mutante pour le gène de la lactate déshydrogénase et la pyruvate formate lyase. Du fait de ces deux mutations ( $ldh^{-} pfl^{-}$ ) elle ne peut croître en anaérobiose sur un milieu glucose.

Son génotype est repris dans le tableau 2.1.

ldh : la souche comprend une large délétion dans le gène codant pour la lactate déshydrogénase.

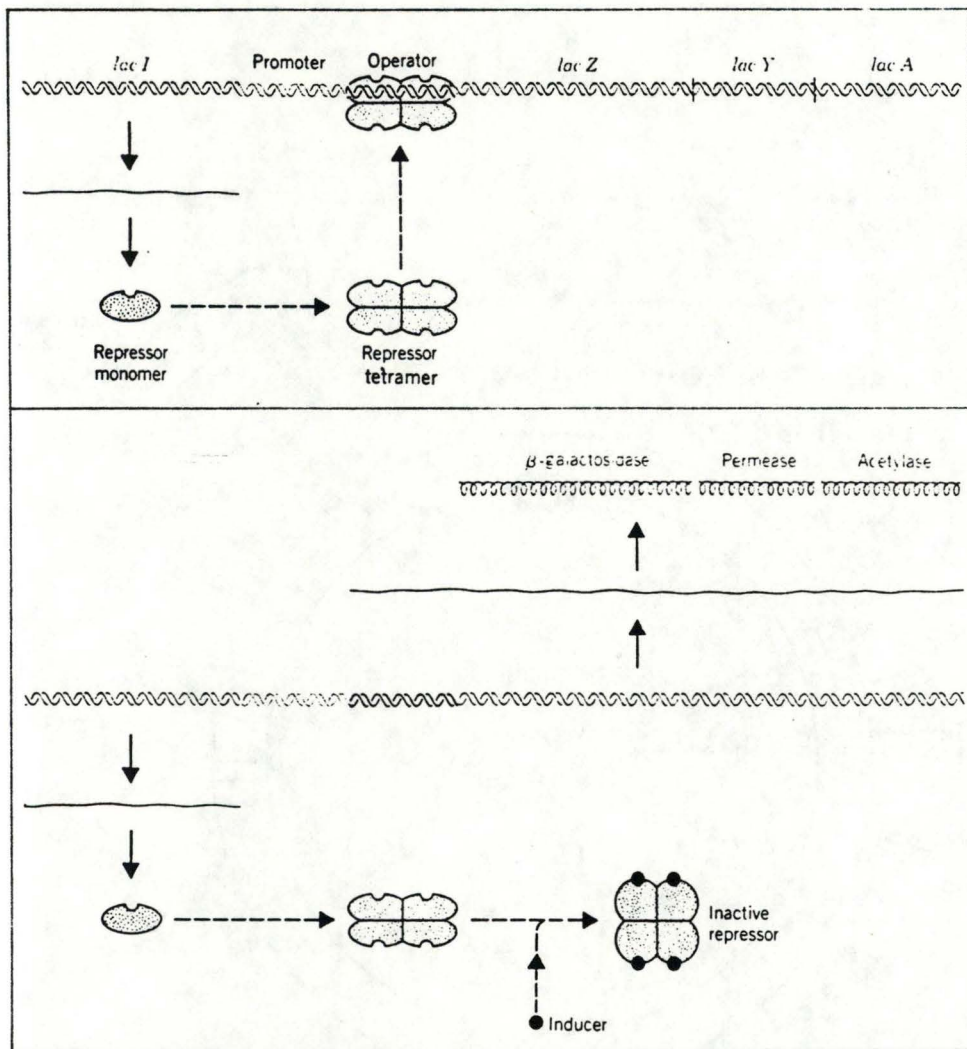


Fig. 2.3 : Contrôle de base de l'opéron lactose :  
 - en haut : contrôle négatif  
 - en bas : contrôle positif.

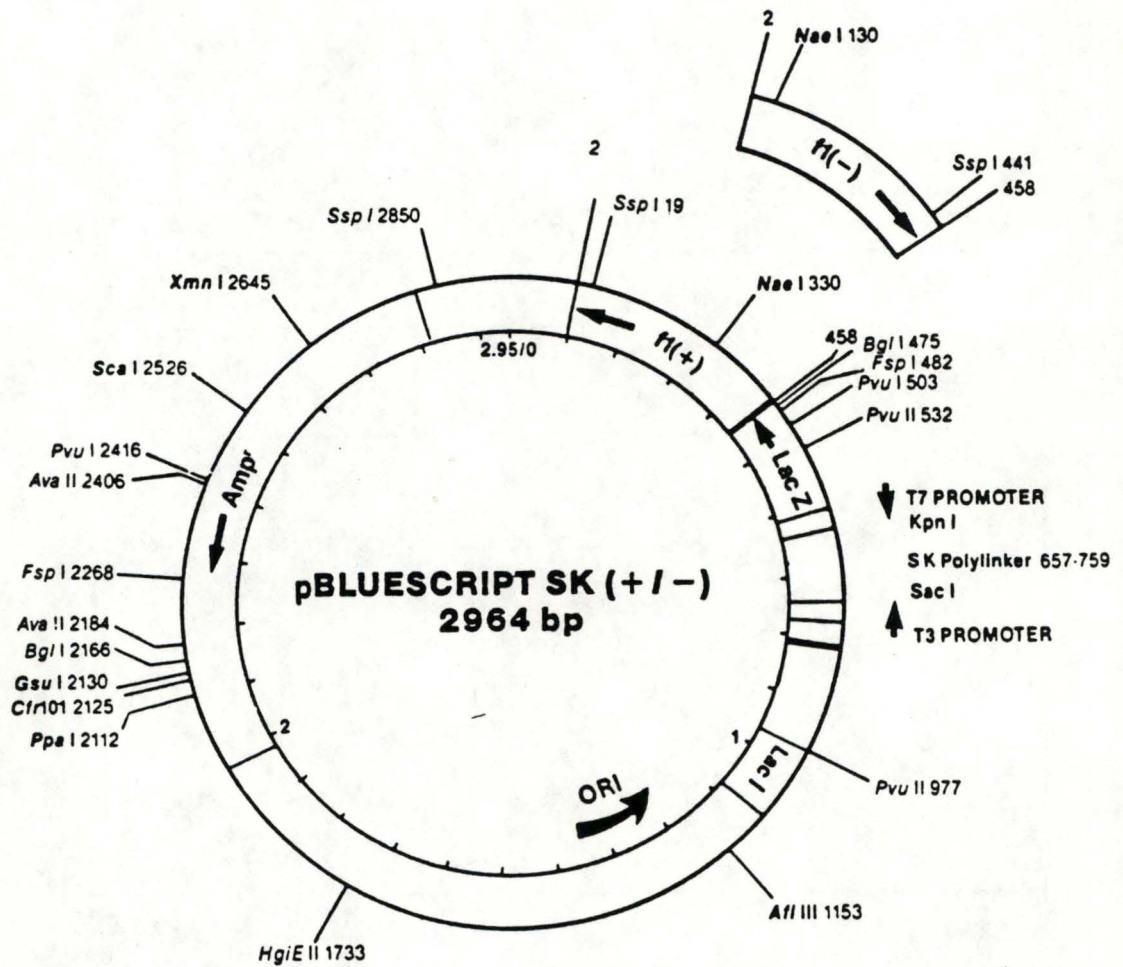


Fig. 2.2 : Plasmide Bluescript : forme sk.

*pfl:cam* : un gène de résistance au chloramphénicol est inséré à la place de la délétion du gène codant pour la pyruvate formate lyase.

### 2.1.2. La souche de levure : GRF18

La souche *GRF18* présente les mutations *his 3* et *leu 2* rendant celle-ci auxotrophe pour l'histidine et la leucine.

## 2.2. LES PLASMIDES UTILISES.

### 2.2.2. Le plasmide bactérien Bluescript SK<sup>+</sup>

Ce plasmide est commercialisé par la firme Stratagène (fig.2.2). Il s'agit en fait d'un "phagemide", c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage portant une origine de répllication pour *E.coli* (col E1 ORI) et l'origine de répllication phagienne f1. Sa taille est de 2964 bp.

Caractéristiques de Bluescript :

*Amp<sup>R</sup>* : gène codant pour la  $\beta$ -lactamase, enzyme conférant à la bactérie porteuse du plasmide la résistance à l'ampicilline. Ceci permet la sélection des colonies possédant le vecteur.

*Lac Z* : portion de l'opéron lactose. Cette portion comprend le promoteur "lac", l'opérateur, l'extrémité amino-terminale de la  $\beta$ -gal (peptide donneur  $\alpha$ ).

### Régulation du gène lac Z :

La  $\beta$ -galactosidase est codée par un gène, *lac Z*, placée à la fois sous contrôle positif et sous contrôle négatif.

Le contrôle négatif de l'opéron est assuré par une protéine répresseur codée par le gène *lacI*. En se liant à l'ADN en un site opérateur, ce répresseur empêche l'initiation de la transcription de l'opéron (fig.2.3).

Le gène *lacIq* porté par l'épisome F' de la souche *EL1-blue* est caractérisé par la force de son promoteur. La synthèse du répresseur est augmentée d'un facteur 10. La répression peut ainsi s'exercer sur toutes les copies de Bluescript présentes dans la bactérie. Cette répression empêche une

```

Promoteur T7
SacI (
BstXI ) 3'
SacII (
( EagI
) NotI
5' ( XbaI
) SpeI
( BamHI

SmaI ( FRANC
central ( PstI
) EcoRI
EcoRV ( FRANC
( HindIII
) ClaI
( SalI
5' ) HincII
) AccI
( XhoI
) DraII
ApaI ( 3'
KpnI )
Promoteur T3

```

Fig. 2.4 : Batterie des sites de clonage de Bluescript sk.

surexpression de lac Z due au dosage génique qui constituerait un fardeau mortel pour la bactérie.

La répression est levée en présence d'un inducteur (allolactose en conditions naturelles), celui-ci se lie au répresseur formant un complexe qui ne peut plus se lier à l'opérateur. Cette dérèpression permet l'initiation de la transcription au promoteur. En laboratoire un inducteur non dégradable, l'IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyrannoside), est utilisé en routine.

Il existe aussi un mécanisme de régulation positive basé sur une protéine de régulation : la protéine CAP.

Ce système agit au niveau des opérateurs dérèprimés en activant le promoteur qui leur est associé par la fixation juste en amont de celui-ci, du couple CAP-AMPC. La présence ou l'absence de cette protéine CAP est contrôlée par la quantité de glucose dans le milieu :

- s'il y a peu de glucose, la quantité d'AMPC augmente et la protéine CAP est produite. Le couple CAP-AMPC augmente alors la force du promoteur "lac" d'un facteur 10.
- s'il y a beaucoup de glucose, la concentration en AMPC diminue, de sorte qu'il n'y a pas de CAP produit, et donc pas d'activation du promoteur.

Sachant cela, en intervenant sur la présence d'inducteur (variation du nombre d'opérateurs bloqués par le répresseur) et sur la quantité de glucose dans le milieu (activation possible des promoteurs) on peut moduler l'induction du gène lac Z et dès lors l'expression de la  $\beta$ -galactosidase.

L'activité de la  $\beta$ -galactosidase peut être mise en évidence par un simple test coloré, en présence de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indobyl- $\beta$ -D-galactopyrannoside), substrat artificiel non inducteur de l'enzyme donnant après hydrolyse un dérivé coloré bleu. Dans ces conditions (sur milieu solide contenant du X-gal), les bactéries ayant l'activité  $\beta$ -gal donneront des colonies bleues, les autres donnant des colonies blanches.

A l'intérieur de l'extrémité N-terminale du gène lac Z' a été introduite une batterie de sites de clonage (oligonucléotide synthétique) où sont localisés 21 sites de restriction uniques (fig.2.4 ).



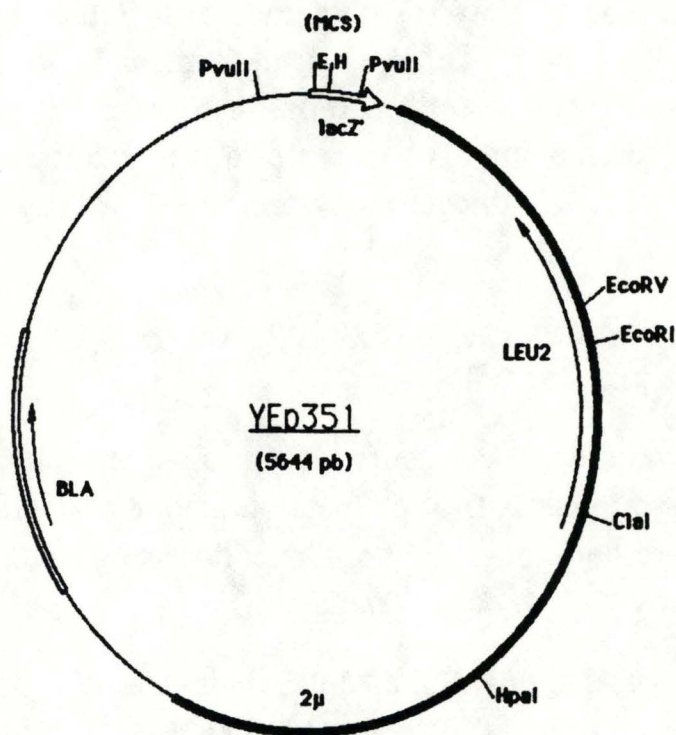
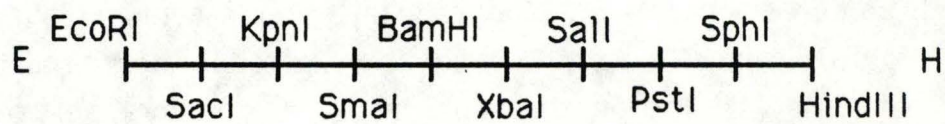


Fig. 2.5 : Plasmide YEP 351.

(MCS) -



Carte de restriction du plasmide YEp351

Lors de l'insertion d'un fragment d'ADN étranger dans un des sites de restriction (créant un plasmide "recombinant"), le gène lac Z est interrompu ("disrupté") entraînant l'absence de production du peptide  $\alpha$  : la complémentation n'ayant plus lieu, les bactéries ne peuvent produire de la  $\beta$ -galactosidase active et donnent donc des colonies blanches sur milieu contenant du X-gal.

### 2.2.2. Le plasmide Yep351.

Le plasmide Yep351, vecteur navette *E.coli* - levure, est un plasmide bactérien pUC18 comportant une origine de réplication ORI, un gène de résistance à l'ampicilline et le gène lac Z, et un segment du plasmide  $2\mu$  de *Saccharomyces cerevisiae* portant une origine de réplication pour cette levure. Il contient de surcroît le gène Leu 2 complétant l'auxotrophie pour la leucine chez *S. cerevisiae* (fig 2.5).

## 2.3. LES MILIEUX DE CULTURE UTILISES.

### 2.3.1 Milieux pour bactéries.

#### 2.3.3.1. Milieu riche pour *E.coli*

* LB liquide	Bacto tryptone	1%
	Yeast extract	0.5%
	NaCl	0.5%

Les cultures liquides de 5 ou 10 ml se font à 37°C dans des bouteilles "universelles" avec agitation.

* LB solide	Bacto tryptone	1%
	Yeast extract	0,5%
	NaCl	0,5%
	Agar	2%

Si la culture doit se faire en conditions sélectives, l'antibiotique (ampicilline) sera ajouté à raison de 100  $\mu$ g/ml final (0.01%).

Tout milieu est stérilisé avant usage. L'ampicilline est ajoutée au milieu autoclavé une fois que sa température est inférieure à 60°C.

### 2.3.1.2. Milieu minimum pour *E.coli* : M9.

Le milieu minimum ne contient que des sels minéraux et une source de carbone. Il est utilisé comme milieu sélectif solide pour la souche double mutante FMJ144 transformée.

#### a) Milieu M9 de base

##### Pour 400ml

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g
NaCl	0,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,4 g
Casamino acid	0,8 g
Agar	8,0 g

Ajuster à pH 7.8 et autoclaver.

#### b) MgSO<sub>4</sub> 1M

#### c) CaCl<sub>2</sub> 1M

Effectuer les mélanges suivants :

100 ml de a)
0.2 ml de b)
0.01ml de c)

La source de carbone est alors ajoutée :

soit 20 ml de lactate 10%

soit 15 ml d'H<sub>2</sub>O + 5 ml de glucose 40%

### 2.3.1.3. Milieu MRS pour *Lactobacillus*.

Milieu solide pour 1 litre :	- peptone	10 g
	- meat extract	5 g
	- yeast extract	5 g
	- glucose	20 g
	- tween 80	1 ml
	- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	2 g
	- CH <sub>3</sub> COONa	5 g
	- Mg SO <sub>4</sub>	0.2g
	- Mn SO <sub>4</sub>	38mg
	- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 gr

- agar 12 gr
- H<sub>2</sub>O distillée jusqu'à 1 l
- pH 6.5

Milieu liquide pour 1 litre :	- bact. protéase peptone	3	10 g
	- bact. beef extract		10 g
	- bact. yeast extract		5 g
	- bact. dextrose		20 g
	- tween 80		1 g
	- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub>		2 g
	- Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O		0.1 g
	- Mn SO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O		0.05 g
	- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		2 g
	- CH <sub>3</sub> COONa. 3H <sub>2</sub> O		5 g

### 2.3.2. Milieu pour levures.

Le milieu riche pour la souche *GRF18* est le milieu YPD (Yeast-Peptone- Dextrose).

Yeast extract	1%
Peptone	2%
Dextrose	2%

Le pH du milieu est porté, avant passage à l'autoclave, à 4.8 par adjonction d'HCl.

## 2.4. TECHNIQUES D'ADN RECOMBINANT.

### 2.4.1. Préparation d'ADN.

#### 2.4.1.1. Préparation d'ADN génomique.

##### - Méthode 1 (31) :

- Une colonie sert à ensemercer une préculture de milieu MRS. L'incubation est réalisée à 44 °C avec agitation faible.
- La préculture sert à ensemercer une culture de 500 ml de MRS. La croissance est menée jusqu'à une A<sub>660</sub> égale à 0.7 (Beckman).
- La culture est répartie dans des flacons de 200 ml.
- Centrifugation 10 min. à 6000 rpm à 4°C.

- Après décantation, le culot est resuspendu dans 25 ml de S1.
- Centrifugation 10 min. à 6000 rpm à 4°C.
- Le culot est resuspendu dans 10 ml d'une solution S2.
- Le lysozyme est ajouté à une concentration finale de 10 mg/ml.
- Incuber 30 min. à 37°C.
- Choc thermique : 10 min. à 50°C.
- Ajouter 500 µl de SDS 10%
- Effectuer une extraction de l'ADN au phénol saturé en TE suivi d'une précipitation à l'éthanol (cf point 2.4.2).

S1 : - 100 mM EDTA pH 8  
 - 150 mM NaCl

S2 : - 100 mM EDTA pH 6.9  
 - 150 mM NaCl

- **Méthode 2** (Institut Pasteur, Didier Lereclus, communication personnelle) :

- 100 ml de culture jusqu'à une DO A<sub>660</sub> égale à 45 (Klett).
- Centrifugation 10 min. à 6000 rpm à 4°C.
- Laver le culot avec une solution TEN.
- Centrifugation 10 min. à 6000 rpm à 4°C.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de TEN.
- Ajouter le lysozyme à une concentration finale de 10 mg/ml.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Incuber 15 min. à -20°C suivi de 15 min. à 80°C.
- Ajouter une solution de RNase à une concentration finale de 50 µg/ml, une solution de protéinase K à une concentration finale de 100 µg/ml et une solution SDS 1% final.
- Incuber à 65°C jusqu'à une clarification de la phase supérieure maximale.
- Ajuster le volume à 12 ml avec une solution de TEN.
- Ajouter 2 ml de NaClO<sub>4</sub> 5 M (ou 3.3 ml de NaClO<sub>4</sub> 3 M).
- Ajouter environ 10 ml de SEVAG.
- Agiter pour mélanger les deux phases.
- Centrifuger 5 min. à 12000 rpm.
- Répéter l'extraction au SEVAG 3 fois.
- Le surnageant est transvasé dans un cylindre 100 ml.

- Ajouter de façon délicate l'éthanol 100 % froid jusqu'au moment de la précipitation de l'ADN.
- 15 min. à -70°C.
- Centrifuger 30 min. à 4 °C.
- Sécher le culot sous vide et resuspendre dans une solution TE.

TEN :     - 10 mM Tris-HCl pH 8  
           - 10 mM EDTA  
           - 15 mM NaCl

TE :       - 10 mM Tris-HCl pH 7.2  
           - 1 mM EDTA

SEVAG : Chloroforme/Alcool isoamylique 24:1

**- Méthode 1 modifiée:**

- Culture dans 100 ml de milieu MRS à 37°C jusqu'à la phase exponentielle (DO de 1.1 à 540 nm au Beckman)
- Centrifugation 10 minutes à 6000 rpm à 4°C
- Le culot est lavé avec 10 ml d'une solution S1
- Centrifugation 10 minutes à 6000 rpm à 4°C
- Le culot est resuspendu dans 2 ml d'une solution S2
- Le lysozyme est ajouté à une concentration finale de 10 mg/ml.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Choc thermique : 15 min. à -20°C suivi de 15 min. à 80°C
- Ajouter une solution de RNase à une concentration finale de 50 µg/ml, une solution de protéinase K à une concentration finale de 100 µg/ml et une solution SDS 1% final.
- Incuber à 65°C jusqu'à une clarification de la phase supérieure maximale.
- Ajouter une solution 0.5 M final de NaCl
- Effectuer une extraction de l'ADN au phénol-TE suivi d'une précipitation à l'éthanol (cf point 2.4.2 ).
- Récupération de l'ADN filamenteux par des baguettes ( pipettes Pasteur dont l'extrémité est recourbée à la flamme). L'ADN est enroulé autour de ces baguettes et séché près d'une flamme quelques minutes.
- Casser l'extrémité de la baguette dans un Eppendorf
- Ajouter 400 µl de T.E.
- Laisser une nuit à 4°C
- retirer les morceaux de verre.

S1 :       - 100 mM EDTA pH 8  
           - 150 mM NaCl

S2 :       - 100 mM EDTA pH 6.9  
           - 150 mM NaCl

#### 2.4.1.2. Préparation de plasmides en petite et moyenne quantité (mini et midiprep).

##### \* Miniprep :

- Une colonie sert à ensemercer une culture de 5 ml de milieu LB-Amp. L'incubation est réalisée une nuit à 37°C.
- 1.5 ml de culture est placé dans un Eppendorf et centrifugé de 2 à 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter denouveau 1.5 ml de la culture et recentrifuger 2 à 5 min. Le culot obtenu provient ainsi de 3 ml de culture.
- Ajouter 300 µl de tampon P1.
- Resuspension douce du culot à la pipette.
- Ajouter 300 µl de tampon P2 et mélanger doucement.
- Incuber 5 min. à t° ambiante.
- Ajouter ensuite 300 µl de tampon P3 et mélanger doucement.
- Centrifuger 15 min. à 4°C.
- Récupérer le surnageant et lui ajouter 0.8 volume d'isopropanol .
- Centrifuger 15 min. à t° ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 300 à 500 µl d'éthanol 70 % froid.
- Laisser l'Eppendorf 10 min. à 4°C.
- Centrifuger 10 min. à 4°C.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous-vide.
- Resuspendre le culot de plasmides dans 10 à 20 µl de TE.

##### \* Midiprep :

- Une colonie sert à ensemercer une culture de 50 ml de LB-Amp pendant une nuit à 37°C.
- Centrifuger les cellules (corex de 30 ml) à 9000 rpm pendant 1 à 2 min.
- Ajouter 4 ml de tampon P1 et resuspendre le culot à la pipette.
- Ajouter 4 ml de tampon P2, mélanger doucement.
- Incuber 5 min. à t° ambiante.

- Ajouter 4 ml de tampon P3, mélanger très doucement.
- Centrifuger 30 min. à 13000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant.
- Equilibrer la colonne Quiagen avec 2 ml de tampon QB.
- Quand tout le tampon QB est passé, chasser de l'air dans la colonne et ajouter ensuite le surnageant.
- Quand le surnageant arrive au niveau du gel de la colonne, ajouter 4 ml de tampon QC, répéter une fois l'opération.
- Quand tout le tampon QC est passé, ajouter 2 ml de tampon QF.
- Récupérer ce qui sort de la colonne dans un corex de 15 ml.
- Ajouter 0.8 volume d'isopropanol.
- Centrifuger 30 min. à 11000 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter délicatement 2 à 3 ml d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 30 min. à 11000 rpm.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous-vide.
- Resuspendre le culot dans 200 à 500 µl de TE.

\* Tampons utilisés :

- Tp P1 - 50 mM Tris-HCl      pH 7.4  
 - 10 mM EDTA      pH 8  
 - Ajuster le pH à 8 par adjonction de NaOH  
 - Avant utilisation, ajouter de la RNase ( 400µg/ml final)
- Tp P2 - 200 mM NaOH  
 - 1 % SDS
- Tp P3 - 2.55 M KAc      pH 4.8  
 - 1/2 volume d'acide acétique concentré.
- Tp QB - 750 mM NaCl      pH 7  
 - 50 mM MOPS  
 - 15 % éthanol
- Tp QC - 1 M NaCl      pH 7  
 - 50 mM MOPS  
 - 15 % éthanol
- Tp QF - 1.2 M NaCl      pH 8  
 - 50 mM MOPS  
 - 15 % éthanol



Ces tampons peuvent être stockés à 4°C ou à t° ambiante.

#### 2.4.2. Extraction de l'ADN au phénol et précipitation des acides nucléiques à l'éthanol.

L'extraction au phénol assure l'élimination des protéines d'une solution d'acides nucléiques et permet dès lors l'inactivation d'enzymes avant de passer à une étape suivante.

##### \* Extraction :

- mélanger la solution d'ADN avec un même volume de phénol
- agiter au vortex
- centrifuger 4 min. à 12000 rpm pour séparer la phase organique de la phase aqueuse
- récupérer la phase aqueuse (supérieure) qui contient l'ADN dans un autre tube stérile.

N.B. : Si la solution aqueuse est encore fort trouble, on répète l'extraction.

##### \* Élimination du phénol par de l'éther saturé en H<sub>2</sub>O distillée stérile.

- Ajouter à la phase aqueuse récupérée un triple volume d'éther saturé d'eau
- Agiter au vortex pendant 20 sec.
- Centrifuger 1 min. à 12000 rpm pour séparer les deux phases
- Éliminer la phase supérieure contenant l'éther
- Réaliser ces opérations 3 ou 4 fois.

##### \* Précipitation de l'ADN à l'éthanol.

- Ajouter 1/10 du volume d'acétate de sodium 3 M pH 7.2 et 2,5 fois le volume total d'éthanol 100 % froid
- Mélanger et laisser 15 min. à -70°C
- Centrifuger 15 à 30 min. à 4°C à 12000 rpm
- Éliminer le surnageant
- Sécher le culot sous vide et le resuspendre ensuite dans du TE.

N.B. : Afin d'éliminer les protéines qui seraient éventuellement liées à l'ADN, on peut, préalablement à l'extraction au phénol, ajouter une solution de NaCl 0,5 M final à la solution d'ADN. L'extraction au phénol sera ensuite réalisée classiquement, suivie d'une

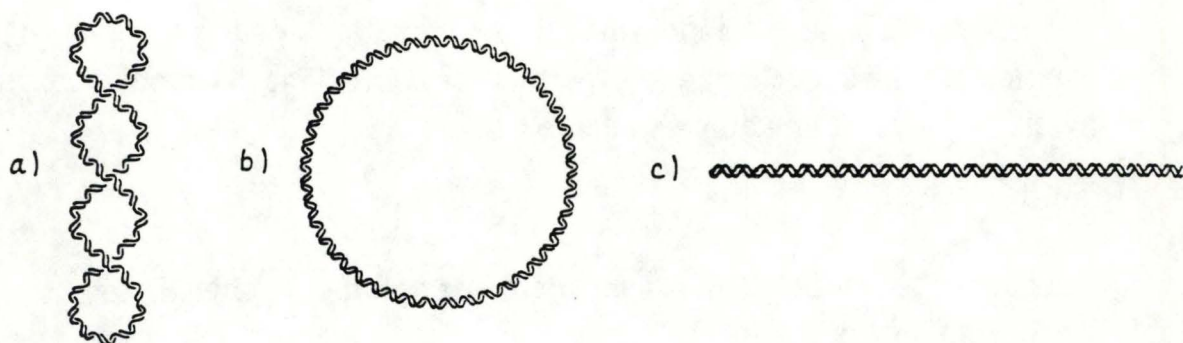


Fig. 2.6 : L'ADN plasmidique se présente sous trois configurations différentes :

- a) forme ccc (covalently closed circular) : forme superenroulée
- b) forme oc (open circular) : un brin est coupé (nick)
- c) forme L (linéaire) : un deuxième nick s'est produit à proximité du premier mais sur l'autre brin de l'hélice.

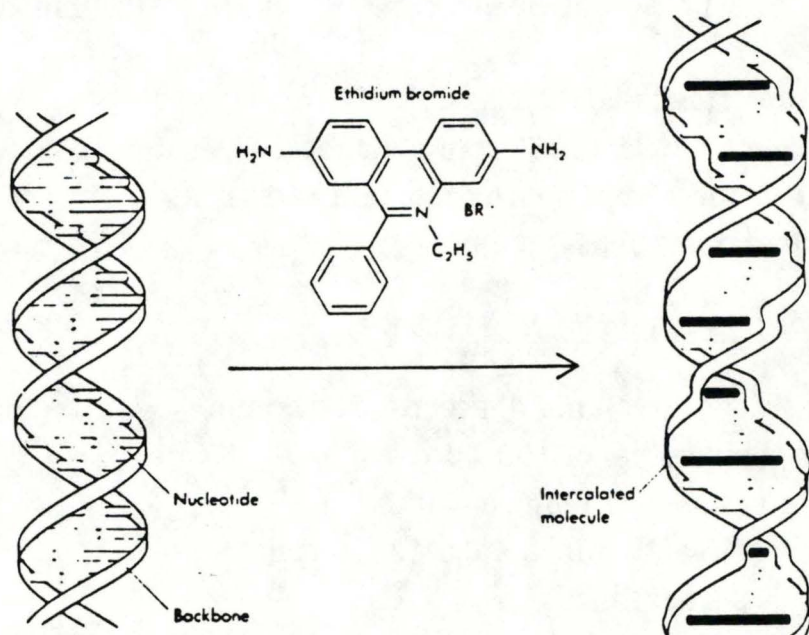


Fig. 2.7 : Représentation schématique : les molécules de bromure d'éthidium s'intercalent entre les bases azotées de la double hélice.

précipitation à l'éthanol pour laquelle on omettra cependant l'addition d'acétate de sodium 3 M vu la présence de NaCl en forte concentration.

### 2.4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.

#### 2.4.3.1. Electrophorèse analytique.

L'électrophorèse analytique en gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN en fonction de leur taille et l'estimation de leur quantité.

#### \* Principe :

Une molécule chargée placée dans un champ électrique migre vers l'électrode de signe opposé à une vitesse, ou mobilité électrophorétique, fonction du champ électrique et de la charge nette de la molécule. De plus, la mobilité électrophorétique est inversement proportionnelle au coefficient de friction de la molécule qui lui, est fonction de la taille et de la forme de la molécule. La vitesse de migration de l'ADN en gel d'agarose dépend principalement des quatre paramètres suivants :

- la conformation de l'ADN (fig 2.6 ). Les formes superenroulée (Covalently closed circular), circulaire cassée sur un seul brin (Open Circular) et linéaire d'un même plasmide migrent à des vitesses différentes. Généralement la forme CCC migre le plus rapidement, suivie de la forme linéaire, puis de l'OC. D'autres bandes peuvent apparaître, correspondant aux formes multimériques du plasmide.
- le poids moléculaire de l'ADN : les molécules linéaires de l'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur PM.
- la concentration en agarose du gel
- le courant appliqué : à voltage faible, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. Mais, lorsque le voltage s'accroît, l'efficacité de la séparation décroît.

#### \* Protocole :

Une solution d'agarose est chauffée jusqu'à ébullition, refroidie à 50°C et coulée sur une plaque à électrophorèse à l'extrémité de laquelle est disposé un peigne formant des puits dans le gel où l'échantillon sera déposé. Lorsque le gel est solidifié, le peigne est retiré. Les échantillons,

préalablement mélangés à une solution de bromophénol-sucrose, sont alors déposés dans les puits formés par le peigne. Le sucrose joue un rôle d'alourdisseur qui entraînera directement l'échantillon dans le fond du puits, tandis que le bleu de bromophénol servira d'indicateur du front de migration.

Le gel est alors immergé dans un bac à électrophorèse rempli d'un tampon TBE ou TAE. L'appareillage est raccordé à une source de tension. La migration s'effectue pendant environ deux heures à 70-100 volts.

Une fois la migration terminée, habituellement lorsque le bleu de bromophénol atteint l'extrémité du gel, la détection des bandes correspondant aux différentes molécules d'ADN se fait par coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (1 mg/ml) durant 30 minutes minimum. La fluorescence du complexe ADN-BrEt (intercalé entre les bases) est ensuite stimulée aux U.V. (302 nm) (fig.2.7).

Tp TBE pour électrophorèse :

- 0.089 M tris borate
- 0.089 M acide borique
- 0.002 M EDTA

Tp TAE (utilisé pour la récupération des fragments d'ADN)

- 0.04 M Tris-acétate
- 0.002 M EDTA

Solution d'agarose - 0.6 % ou 0.8 % d'agarose en poids/Vol TBE


Solution d'alourdisseur, colorant 5 fois

- 0.25 % bleu de bromophénol
- 40 % (poids/volume) de sucrose dans H<sub>2</sub>O

N.B. : Estimation de la taille et de la quantité des molécules d'ADN.

L'ADN de référence est généralement celui du phage  $\lambda$  restreint par l'enzyme Hind III dont les morceaux sont de taille connue. Il est aisé de mesurer les distances de migration des différents morceaux de  $\lambda$  de poids moléculaires connus. Disposant dès lors, pour le  $\lambda$ , de couples de valeurs (distance de migration-log PM), il suffira de tracer la droite de régression exprimant le logarithme du PM en fonction de la distance de migration.

$\lambda$  DNA-Hind III digest

Séparation électro- phorétique	Fragment number	Number of base pairs
	1	23,13
	2	9,416
	3	6,557
	4	4,361
	5	2,322
	6	2,027
	7	0,564*
	8	0,125*

\*:rarement ou  
jamais visible.

Fig. 2.8 : Fragments du marqueur de taille  $\lambda$  DNA-Hind III digest.

Cette courbe permet d'estimer la taille d'un fragment de taille inconnue sur base de sa distance de migration (fig.2.8). La quantité des différents morceaux du  $\lambda$  étant connue, il est possible d'estimer la quantité d'une molécule d'ADN par référence à la fluorescence des bandes du  $\lambda$ .

#### 2.4.3.2. Electrophorèse préparative.

Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose à l'aide du kit "Gene clean" commercialisé par la firme Stratagene Cette méthode permet, après séparation électrophorétique des différents fragments contenus dans une mixture de restriction, de récupérer le ou les fragments d'ADN de taille souhaitée.

##### \*Protocole:

- Migration de la solution d'ADN en gel d'agarose 0.8 % dans un tampon TAE.
- L'électrophorèse ayant séparé les fragments en fonction de leur taille, inciser le gel devant et derrière la bande à récupérer.

Remarque : il est important de ne pas exposer la préparation trop longtemps aux U.V. afin de minimiser les risques de cassures de l'ADN.

- Déposer le fragment dans un Eppendorf préalablement pesé et placé dans la glace. Le poids d'agarose ne peut excéder 0.4 g. Si nécessaire, le fragment d'agarose sera coupé en morceaux et réparti dans plusieurs Eppendorfs.
- Ajouter 2.5 à 3 volumes de NaI (environ 1 ml). Le NaI permet la dissolution de l'agarose.
- Placer l'eppendorf à 50°C durant 1 à 2 minutes.
- Agiter et réincuber 5 min.
- Si **tout** l'agarose n'est pas dissous, réincuber à 50°C, mais ne pas dépasser 15 min. au total.
- Ajouter le Glass Milk® (solution fournie par le kit). 5  $\mu$ l pour 5  $\mu$ g d'ADN et 1  $\mu$ l de plus par 0.5  $\mu$ g supplémentaire. Bien agiter.
- Bain de glace pendant 15 min. et mélanger toutes les 2 à 5 min. Cette étape permet l'accrochage de l'ADN sur les billes de silice.
- Centrifugation 10 sec. à la centrifugeuse de table.
- Eliminer le surnageant.
- Laver le culot 3 fois avec une solution New Wash® (fournie par le kit) :
  - ajouter plus ou moins 500  $\mu$ l de New Wash®
  - resuspendre le culot par plusieurs va et vient à la pipette.

- centrifuger 10 sec.
- éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 5 à 10 µl de TE pH 7.2.
- Incuber pendant 2 à 3 min. dans un bain marie de 50°C. La chaleur permet ici le décrochage de l'ADN qui se resolubilise dans la solution TE
- Centrifuger 30 sec. à 1 min. et récupérer le surnageant. Répéter l'opération.

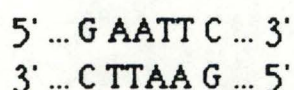
Le rendement de cette méthode est de 90%, et l'ADN récupéré est dans un état de pureté satisfaisant pour des réactions enzymatiques ultérieures (restriction, ligation...).

#### 2.4.4. Réaction de restriction.

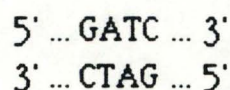
Les endonucléases de restriction de type II sont des enzymes qui reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN double brin. Ces séquences de reconnaissance sont généralement constituées de 4 à 6 nucléotides et présentent un axe de symétrie : la molécule, à cette endroit, forme un "palindrome". Le clivage s'effectue à l'intérieur ou près de la séquence palindromique reconnue.

Pour la réalisation de la banque nous utilisons:

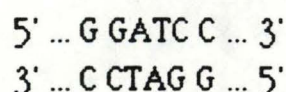
- Eco RI



- Sau 3A.



- BamHI



Ces trois enzymes forment des extrémités anti-complémentaires en simple brin appelés aussi "bouts collants".

La réaction s'effectue de la façon suivante :

x  $\mu$ l de solution d'ADN à couper  
 2.5  $\mu$ l de tampon de restriction 10 fois concentré  
 y  $\mu$ l d'enzyme (une unité par microgramme d'ADN à couper).  
 z  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O stérile pour arriver à 25  $\mu$ l.

---

25  $\mu$ l

N.B. : Une unité enzymatique coupe 1  $\mu$ g d' en une heure à 37°C. En jouant sur le temps et le quantité d'enzyme, la restriction pourra être partielle ou totale.

L'enzyme est, après réaction de restriction, inactivée de deux façons: soit en plaçant les tubes à 60°C pendant 20 minutes; soit en ajoutant de l'EDTA pH7.5 à une concentration finale de 10 mM. Si l'ADN doit subir d'autres activités enzymatiques, il est nécessaire de faire une extraction au phénol et de précipiter l'ADN à l'éthanol (cf point 2.4.2.).

Chaque type d'enzyme nécessite l'utilisation d'un tampon de restriction approprié. Les tampons les plus couramment utilisés sont :

	<u>Low</u> (mM)	<u>Medium</u> (mM)	<u>High</u> (mM)
Na Cl	0	50	100
Tris-HCl pH 7.5	10	10	50
Mg Cl <sub>2</sub>	10	10	10
DTT	1	1	1

Remarque: les enzymes de restriction sont stables à -20°C dans un tampon contenant 50 % de glycérol, mais s'inactivent très vite à température ambiante.

#### 2.4.5. Réaction de ligation.

La ligation, *in vitro* ou *in vivo*, soude par action de la ligase les extrémités des molécules d'ADN linéaires par formation de ponts phosphodiester entre l'hydroxyle 3' et le phosphate 5'.



La réaction de ligation se fait comme suit :

- a ng d'ADN étranger
- b ng de plasmides linéarisés
- x/5 µl de tampon 5 fois
- 1 µl de ligase
- c µl H<sub>2</sub>O stérile pour arriver à x µl final

---

x µl

$$\text{Ce volume de ligation final } x = \frac{\mu\text{g inserts} + \mu\text{g plasmides}}{\text{Concentration finale en ADN}}$$

La concentration finale en ADN pour des fragments (inserts) de 5 à 10 kb est de 25 µg / ml

La ligation s'effectuera à 14°C durant une nuit ou 2 heures à 37°C.

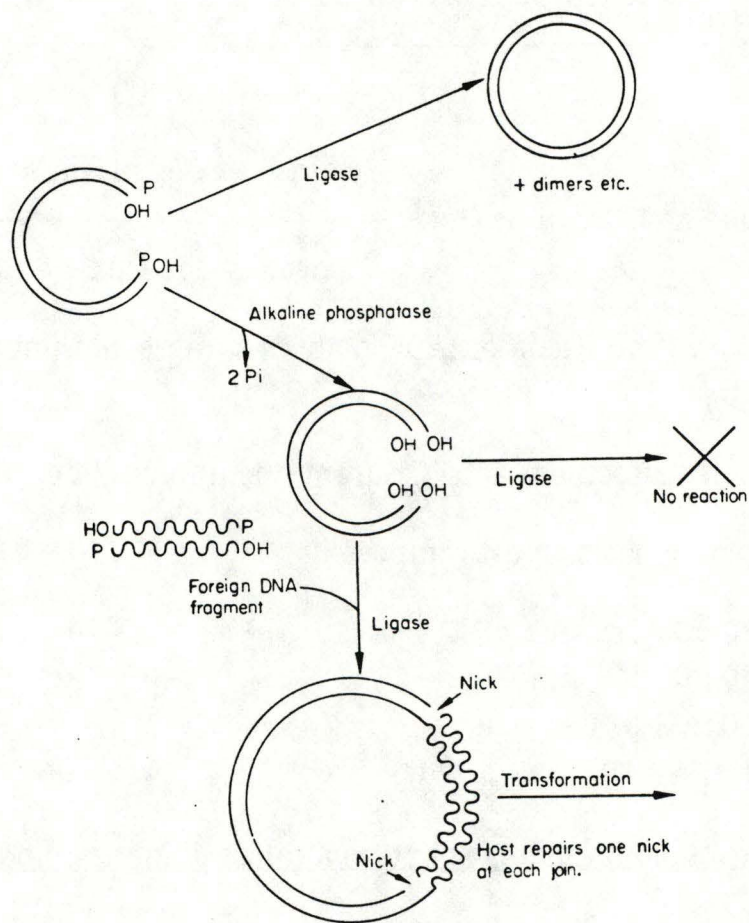
Le tampon de ligation est composé de :

- 20 mM Tris-HCl pH 7.4
- 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>
- 10 mM DTT
- 1 mM ATP

#### 2.4.6. Traitement à la phosphatase alcaline d'un plasmide linéarisé.

##### \* Principe :

Pour empêcher la recircularisation du plasmide lors d'une ligation avec l'ADN étranger, on peut supprimer les phosphates 5' des deux extrémités du plasmide préalablement linéarisé. Cette opération peut être réalisée grâce à une phosphatase alcaline bactérienne (BAP) ou à une phosphatase intestinale de veau (CIP). Une fois les phosphates enlevés, les extrémités du plasmide ne peuvent plus former de pont phosphodiester entre elles. La recircularisation du plasmide phosphatasé ne sera possible que par l'insertion d'un fragment d'ADN étranger non traité qui apportera des groupements phosphates aux extrémités ce qui conduit à un clonage forcé de ce fragment. Les plasmides recombinants obtenus présentent toutefois deux cassures ("nick") de part et d'autre de l'insert. Après



**Fig. 2.10 : Traitement à la phosphatase alcaline (BAP) d'un plasmide linéarisé.**

transformation dans la bactérie hôte, les mécanismes de réparation de celle-ci vont reconstituer le duplex intact (fig. 2.10).

\* Protocole :

- Pour 10 µg de plasmides linéarisés, ajouter 2.5 µl de BAP
- Incuber pendant 1 heure à 60°C
- L'inactivation de l'enzyme se réalise de la façon suivante :
  - + SDS à une concentration finale de 1 %
  - + protéinase K à une concentration finale de 10 µg/µl
  - 30 minutes à 37°C
- Réaliser une extraction au phénol suivie d'une précipitation à l'éthanol (cf point 2.4.2)
- Resuspendre le culot dans un volume adéquat de TE

2.4.7. Transformation de souches compétentes

2.4.7.1. Transformation de souches bactériennes.

\* Préparation des cellules compétentes au RbCl (*FL1 Blue* et *FMJ 144*) :

- Une colonie sert à ensemercer une préculture de milieu Fb. L'incubation est réalisée à 37°C jusqu'à une DO de 0.3 à 550 nm.
- Inoculer une culture de 1 litre de Fb avec 10 ml de préculture. La croissance est menée jusqu'à une DO de 0.48 à 37°C avec agitation.
- Répartir la culture dans des flacons de 200 ml.
- Incuber 15 minutes dans la glace afin d'arrêter la croissance bactérienne.
- Centrifuger 5 min. à 5000 rpm à 4°C.
- Décantier complètement puis resuspendre le culot dans 1/3 du volume de TFBI.
- Incuber 10 min. dans la glace.
- Centrifuger 5 min. à 5000 rpm à 4°C.
- Décantier puis resuspendre le culot dans 1/25 du volume initial de TFBII.
- Incuber 10 min. dans la glace.
- Répartir en aliquots de 1 ml et congeler à -70°C.

Fb     - 2 % Difco Bacto Tryptone  
           - 0.5 % Yeast extract            pH 7.6 avec KOH  
           - 10 mM NaCl  
           - 20 mM MgCl<sub>2</sub>

TFBI   - 100 mM RbCL

- 50 mM MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O      pH 5.8
- 35 mM Acétate de sodium
- 15 % Glycérol

- TFBII - 10 mM MOPS
- 10 mM RbCl      pH 6.8 via KOH
  - 7.5 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 15 % Glycérol

\* Transformation proprement dite :

x µl d'ADN (correspond à 100-200 ng au maximum)  
200 µl de cellules compétentes (dégelées dans la glace)

- 45 min. dans la glace
- 2 min. à 42°C
- Ajouter 1 ml de milieu LB
- Incuber 1 heure à 37°C
- Etalement sur milieux sélectifs solides

2.4.7.2. Transformation de levures.

Le protocole ci-dessous s'applique à la quantité de cellules d'une culture de 10 ml, quantité habituellement engagée dans une expérience de transformation.

- Culture des cellules dans un milieu YPD jusqu'à une croissance de  $1.2 \cdot 10^7$  cell/ml ( $A_{600} = 1$ ).
- Centrifuger 10 min. à 6000 rpm à 20°C.
- Décanter rapidement et resuspendre le culot dans 5 ml d'H<sub>2</sub>O / tube.
- Centrifuger 10 min. à 6000 rpm à 20°C.
- Décanter et laver le culot avec 2 ml de TE LiOAc/tube. Répartir les cellules dans deux Eppendorfs.
- Centrifuger 10 min. à la centrifugeuse de table à t° ambiante.
- Décanter et resuspendre le culot dans 100 µl de TE LiOAc.
- Incuber 1 heure à 30°C avec agitation.
- Ajouter 50 µg d'ADN "porteur" (ADN de thymus de veau par exemple) par Eppendorf. Cet ADN "porteur" facilite l'entrée de l'ADN plasmidique.
- Ajouter ensuite l'ADN plasmidique ( $\leq 10$  µl).
- Incuber 30 min. à 30°C avec agitation.
- Ajouter 700 µl de TE LiOAc-PEG.
- Mélanger. On obtient une solution à aspect pelucheux.

- Incuber 1 heure à 30°C suivi de 5 min. à 42°C.
- Centrifuger 1 min.
- Resuspendre le culot dans 200 µl H<sub>2</sub>O.
- Etaler ensuite sur des milieux sélectifs solides.

## **2.5. DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA LDH.**

- Une colonie sert àensemencer 5 ml de culture.
- Centrifuger les cellules à la centrifugeuse de table.
- Laver le culot avec 1 ml de tampon phosphate.
- Centrifuger à la centrifugeuse de table.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon phosphate.
- Ajouter 150 µl de lysozyme (4mg/ml)
- Incuber 30 min. à 0°C.
- Vortex.
- Prélever différentes quantités de lysat auxquelles on ajoute du tampon phosphate pour arriver à 600 µl, suivi de 200 µl NADH (7mg /10ml H<sub>2</sub>O).
- Incuber 20 min. à 0°C.
- Mesurer à 340 nm l'activité des enzymes présentes dans la bactéries utilisant le NADH.
- Quand l'activité est nulle, ajouter 100 µl de fructose 1,6 diphosphate 50 mM si la LDH est allostérique et 100 µl de pyruvate ( 11 mg / 10 ml H<sub>2</sub>O).
- Mesurer l'activité de la LDH à 340 nm.

**RESULTATS ET DISCUSSIONS.**



# BANQUE GENOMIQUE

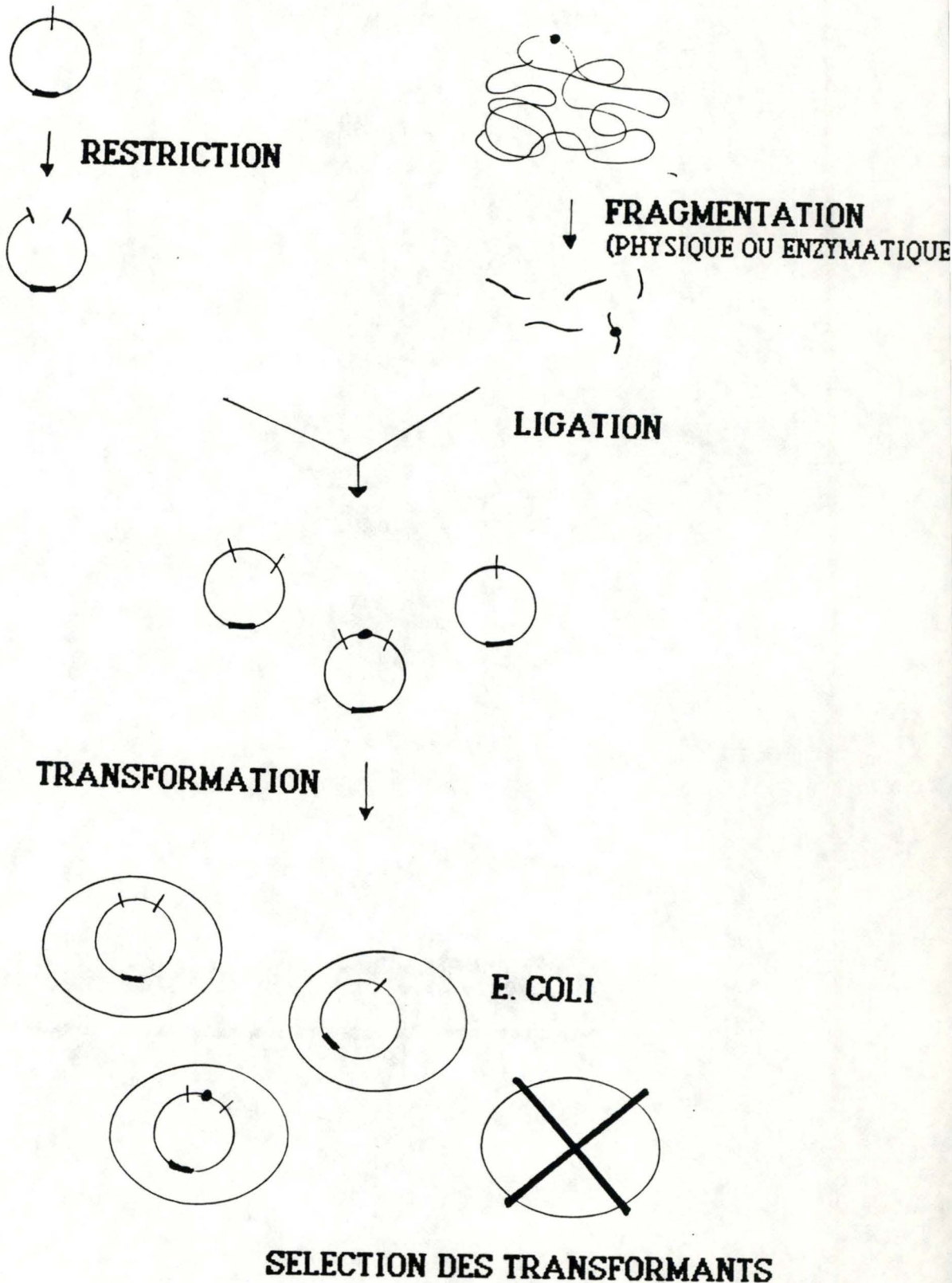


Fig. 3.1 : Schéma représentant les différentes étapes principales de la construction d'une banque génomique.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION.

#### 3.1. Mise au point de la construction de la banque génomique à partir de la forme monocellulaire.

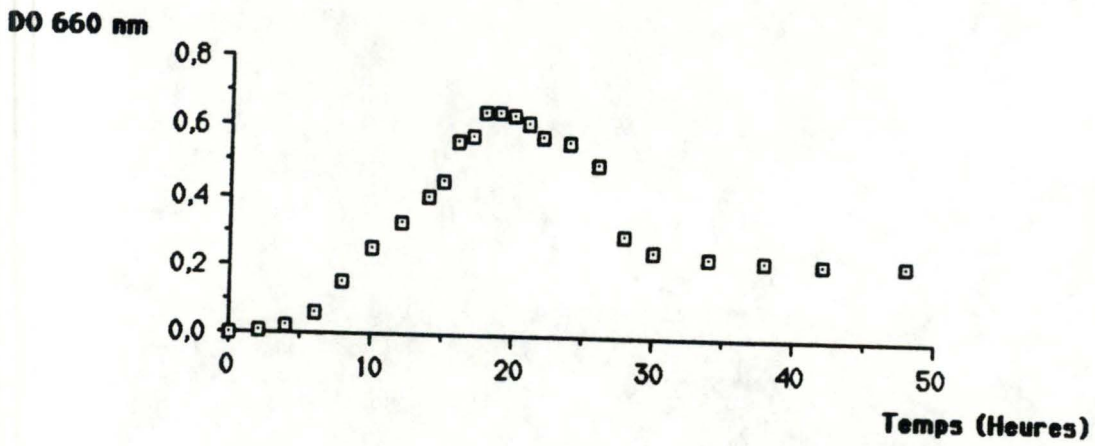
L'étape préliminaire à tout clonage d'un gène à partir de l'ADN génomique total d'un organisme consiste en la construction d'une banque génomique. Celle-ci est souvent définie comme étant une collection de plasmides contenant des fragments d'ADN génomique générés de façon aléatoire et recouvrant le génome entier .

Les principales étapes sont reprises dans la figure 3.1 : la première étape consiste en la préparation d'ADN génomique à savoir la lyse de la paroi bactérienne suivie de l'extraction et purification d'ADN. La construction d'une banque nécessite une préparation d'ADN de grande taille qui sera ensuite restreint partiellement par une enzyme de restriction. Le critère de grande taille est important. En effet, les conditions de travail lors d'une préparation de l'ADN génomique peuvent causer des cassures physiques des filaments. Dans ces conditions, l'ADN génomique de petite taille obtenu engendrera, après restriction, des fragments ne présentant pas les deux extrémités cohésives (*Sma*I, *Bam*HI) compatibles avec le site de clonage (*Bam*HI) du vecteur. Les fragments d'ADN restreint sont ensuite insérés dans un plasmide linéarisé, produisant ainsi un plasmide recombinant. L'étape suivante consiste à faire pénétrer le plasmide recombinant, par un procédé appelé transformation, dans la bactérie hôte où il sera répliqué. Après étalement des transformants sur boîte de Pétri et divisions de ceux-ci, des colonies ou clones apparaissent. Chaque clone est formé de millions de cellules identiques et l'ensemble de tous ces clones constitue la banque génomique. Celle-ci peut être stockée sous la forme de clones cellulaires congelés à -70°C ou sous forme moléculaires (plasmides recombinants). L'étape suivante consistera à isoler les clones contenant le fragment que l'on recherche, dans le cas présent, le gène de la D-LDH.

##### 3.1.1. Détermination des conditions au départ du protocole de lyse de Scheirlinck (31).

Peu de travaux ont appliqué les techniques de l'ADN recombinant aux lactobacilles au contraire d'autres microorganismes tels *E. coli*, *S. cerevisiae*,... Dès lors les techniques à adopter pour la construction d'une banque génomique, en particulier aux étapes de lyse et d'extraction d'ADN, devront être mises au point.





### Courbe de croissance

Fig. 3.2 : Courbe de croissance de *L. delbrueckii*. Une colonie a servi à ensemercer une culture de 50 ml de milieu MRS. La croissance bactérienne est menée à 44°C et suivie par des mesures de la DO à 660 nm.

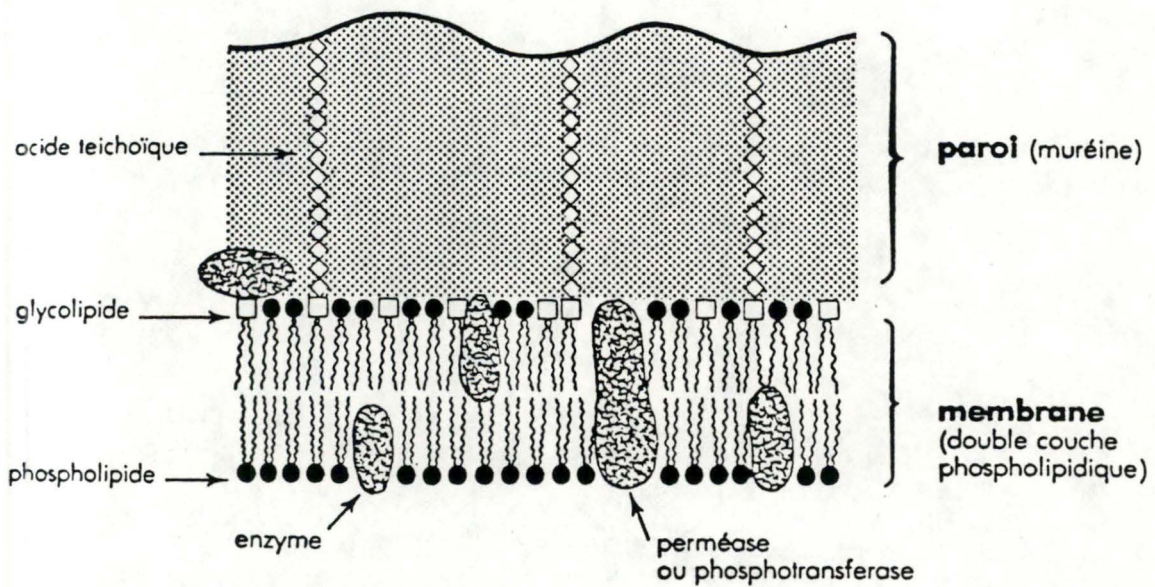
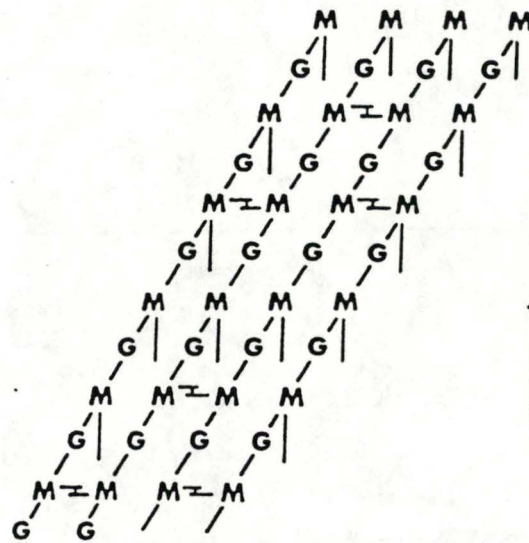


Fig. 3.3 : Représentation schématique de la structure de l'enveloppe des bactéries lactiques Gram + (D'après VAN DRIEL, 1971).



Organisation du peptidoglycane avec dans une dimension les chaînes de polymères glycosidiques - (G-M)<sub>n</sub> - reliées dans une autre dimension par des chaînes peptidiques (M≠M).

Fig. 3.4 : Structure du peptidoglycane constituant la muréine de la paroi bactérienne.

G = N-acétylglucosamine

M = acide N-acétylmuramique.

(D'après GHUYSEN, 1968).

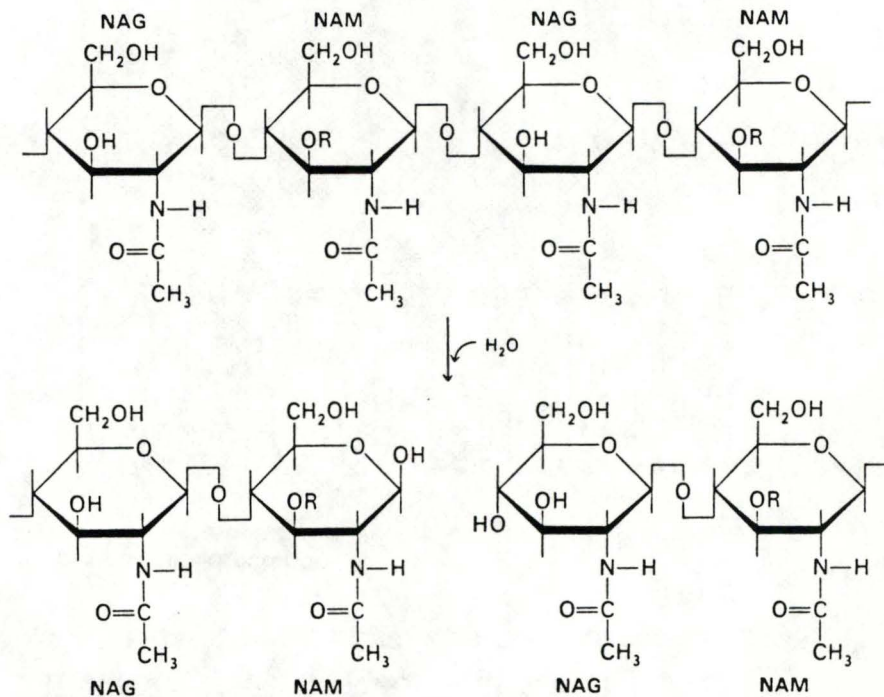


Fig. 3.5 : Hydrolyse des ponts glycosidiques entre les molécule NAM (acide N-acétylmuramique) et NAG (N-acétylglucosamine) par l'action du lysozyme.

Il est notoire que les cultures de *Lactobacillus delbruckei* peuvent évoluer en deux sens, sous forme, soit monocellulaire, soit filamenteuse, mais l'explication de cette évolution n'est pas encore claire. Nous avons choisi de travailler sur la forme monocellulaire qui semble à priori similaire à celle des bactéries classiques utilisées en laboratoire. Les cultures de *Lactobacillus delbruckei*, réalisées dans un milieu MRS à 44°C, sont menées en phase stationnaire pour la préparation de l'ADN génomique (fig.3.2).

### 3.1.1.1. Lyse de la paroi bactérienne.

Les lactobacilles ont une paroi de type Gram +. Pour comprendre les mécanismes de lyse, il est nécessaire de se rappeler quelques notions théoriques concernant la structure de la paroi bactérienne (fig. 3.3).

#### A. Rappel sur la structure de la paroi bactérienne Gram + (28).

L'enveloppe d'une bactérie lactique est constituée de deux structures principales :

- la membrane cytoplasmique d'épaisseur de 7 à 9 nm, est souple et isole le cytoplasme. Elle constitue une barrière sélective vis-à-vis du milieu. Elle est formée d'une double couche phospholipidique.
- la paroi cellulaire est une enveloppe externe ( $\approx$  20 nm) perméable à l'eau, aux sels et aux métabolites. Celle-ci confère à la bactérie sa forme et sa résistance mécanique (elle permet à la bactérie de supporter une pression osmotique interne de 15 à 20 bars). Elle est composée de deux couches :
  - \* Une couche interne constituée essentiellement de muréine. La muréine résulte de la synthèse intracellulaire de précurseurs glycoprotéiques, suivie de leur polymérisation à l'extérieur de la cellule par des enzymes situées à la surface externe de la membrane. La structure du peptidoglycane obtenu est représenté à la figure 3.4. La muréine de *L. delbruckei* est constituée de peptidoglycanes de type L-Lys-D-Asp. Cette couche interne contient également de l'acide téchoïque.
  - \* Une monocouche, superposée à la couche interne, constituée de protéines (ou glycoprotéines) agit comme barrière fonctionnelle contrôlant l'entrée d'éléments extérieurs et la sortie de produits cellulaires internes.

Tableau 3.1 : Décroissance de la DO à 650 nm : les différentes étapes de la lyse ont été suivies par mesure de la DO en diluant 30  $\mu$ l de la solution de lyse dans un ml de tampon de lyse.

Départ	823
Après action du lysozyme	386
Après choc thermique	346
Après SDS	93

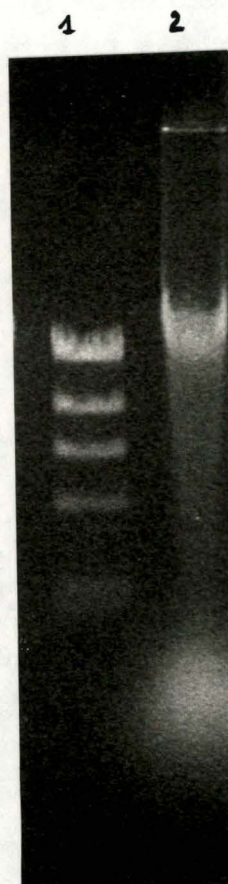


Fig. 3.6 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.6% de :

Piste 1 : ADN de  $\lambda$  HindIII

Piste 2 : Un échantillon de la solution d'ADN récupéré a migré pendant une heure à 100 volts. L'ADN est ensuite coloré au bromure d'éthidium et visualisé sous lumière UV.

## B. Principe des protocoles de lyse.

La méthode de lyse alcaline que nous avons adaptée (rapporté dans M&M p 21) est, selon Scheirlinck (31), spécifique des lactobacilles. Comme les méthodes classiques utilisées pour *E. coli*, elle reprend l'action de divers agents qui vont déstabiliser la membrane et la paroi. Ces agents sont d'une part de type enzymatique tel le lysozyme qui hydrolyse les liens glycosidiques entre les C1 des molécules d'acide N-acétyl muramique et les C2 des molécules de N-acétyl glucosamine constituant la paroi ce qui entraîne la déstabilisation de cette paroi (fig.3.5)(32); d'autre part de type chimique tel le SDS, détergent qui déstabilise la membrane cellulaire. Le suivi de ces différentes étapes de lyse peut se faire par mesure de la décroissance de la DO dans le tampon de lyse au spectrophotomètre à 650 nm.

La lyse est suivie de traitements destinés à purifier l'ADN obtenu, à savoir un traitement au phénol (élimination des protéines de la solution d'ADN) suivi d'une précipitation de l'ADN à l'éthanol, rapporté dans M&M p23.

La quantité d'ADN récupéré peut être estimée de deux manières différentes : la première consiste en une électrophorèse sur gel d'agarose d'un aliquot d'ADN, avec comme référence l'ADN du phage  $\lambda$  restreint par *HindIII* dont la taille et la quantité des fragments sont connus (rapporté dans M&M p 27). La seconde méthode se base sur l'absorption de l'ADN à 254 nm. En sachant que 50  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN bicaténaire donne une absorbance d'une unité mesurée à 254 nm, il sera donc possible d'estimer la quantité d'ADN obtenu.

Lors d'une préparation d'ADN génomique, une importante quantité d'ARN peut contaminer celle-ci. Son élimination nécessite un traitement à la RNase dépourvue d'activité ADNasique.

## C. Mise au point des conditions.

Au regard des critères usuels de la qualité d'une lyse, le protocole décrit ci-dessus a été retenu après sept essais. La décroissance de la DO, reprise dans le tableau 3.1 confirme l'efficacité de ce protocole.

La quantité d'ADN récupéré a été estimée par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel, présenté à la figure 3.6, montre une bande au-dessus de

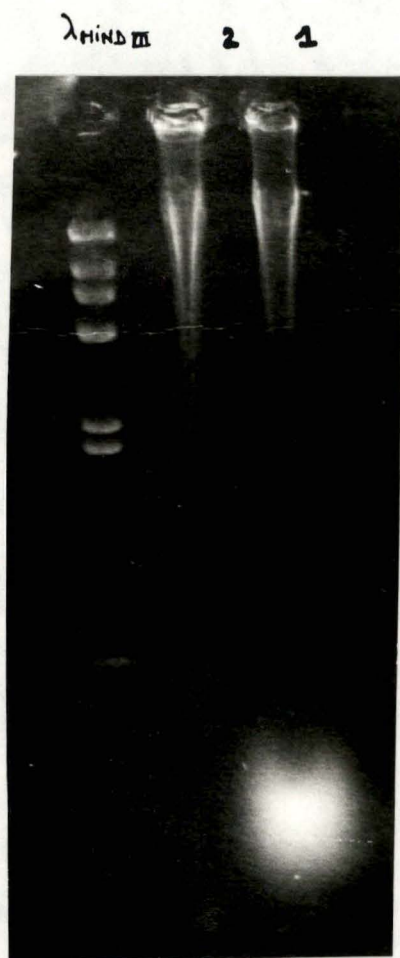


Fig. 3.7 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.6% de :

Piste 1 : Echantillon de 5  $\mu$ l de la solution d'ADN correspondant à 9.5  $\mu$ g non traité (contrôle).

Piste 2 : Echantillon de 5  $\mu$ l de la solution d'ADN génomique (9.5  $\mu$ g) traitée à la RNase (à une concentration finale de 20  $\mu$ g de RNase/ $\mu$ l d'ADN).

20 kb correspondant à l'ADN génomique, ainsi qu'une certaine quantité d'ARN extrait en même temps que l'ADN. Par comparaison au marqueur de taille  $\lambda$  *HindIII*, la quantité d'ADN récupéré a été estimée à  $\pm 1.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de solution. Une mesure de 0.391 unité d'absorbance a été lue à 254 nm, correspondant ainsi à  $1.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ces deux mesures ont permis d'estimer la quantité d'ADN totale récupéré à  $360 \mu\text{g}$ .

La solution d'ADN récupéré a subi ensuite un traitement à la RNase. L'examen du gel (fig. 3.7) montre bien la disparition de la bande d'ARN pour l'échantillon d'ADN traité.

### 3.1.1.2. Restriction partielle de l'ADN génomique.

Le résultat de la fragmentation de l'ADN génomique en morceaux clonables dans le vecteur de transformation d'*E. coli* doit répondre à plusieurs critères. Les fragments doivent avoir une taille suffisante pour contenir un gène entier et présenter des recouvrements partiels. De plus, pour que chaque gène ait une égale possibilité d'être représenté entier dans la banque, la fragmentation devra être aléatoire. Ceci se réalise habituellement de manière satisfaisante en restreignant l'ADN génomique avec une enzyme dont l'occurrence des sites de restriction est très élevée (par exemple *SauI*, enzyme à site de reconnaissance tétranucléotidique dont la fréquence de clivage attendue est de  $1/256$ ). Mais dans des conditions de digestion incomplète, à laquelle fait suite une sélection de taille des fragments, la restriction partielle avec cette enzyme engendrera des fragments de 5 kb (si les coupures se font tous les 20 sites en moyenne) et présentant en plus des recouvrements partiels. Le choix de cette enzyme s'est porté sur *SauI* parce que cette enzyme reconnaît un site de restriction constitué de 4 bp, ce qui est en accord avec les conditions désirées (taille et recouvrements); elle coupe habituellement bien et est compatible avec *BamHI*, enzyme pour laquelle il existe un site de restriction dans le plasmide SK<sup>+</sup>.

La concentration de l'enzyme ainsi que le temps de restriction ont été adaptés afin d'obtenir une restriction partielle.

#### A. Restriction partielle en fonction de la concentration en *SauI*

Des aliquots de  $7.6 \mu\text{g}$  d'ADN ont été soumis à diverses concentrations de *SauI* (8, 4, 1.6, 0.8 U/ $\mu\text{g}$ ) pendant une heure à  $37^\circ\text{C}$ . Une concentration finale de 20 mM d'EDTA a été ajoutée aux différents aliquots après restriction afin d'inactiver l'enzyme. Un échantillon de chaque aliquot est

Fig. 3.8 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.6 % :

Piste 1 : Echantillon d'ADN restreint partiellement par Sau3A  
(1.6 unité/mg d'ADN).

Piste 2 : Echantillon d'ADN non traité correspondant au  
contrôle.

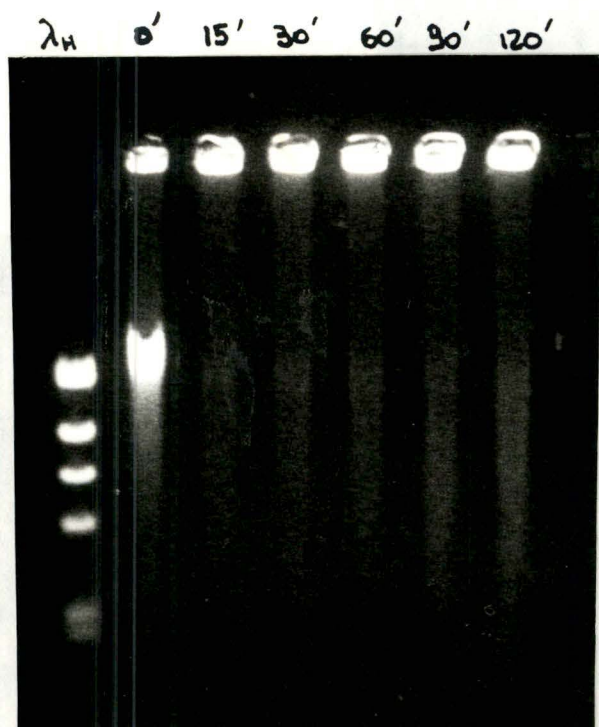


Fig. 3.9 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.6 % d'un échantillon de 4  $\mu\text{g}$   
prélevé à partir de 53  $\mu\text{g}$  d'ADN restreints par Sau3A (1.6 U/ $\mu\text{g}$ )  
pendant 15, 30, 60 et 120 minutes. L'enzyme est inactivée par  
une solution EDTA 20 mM final.



Fig. 3.10 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% dans un tampon TAE d'un échantillon de 2  $\mu\text{g}$  d'ADN génomique restreints une heure par Sau3A (1.6 U/  $\mu\text{g}$ ). Comme attendu, l'ADN restreint se situe principalement en-dessous de 10 kb. ↓

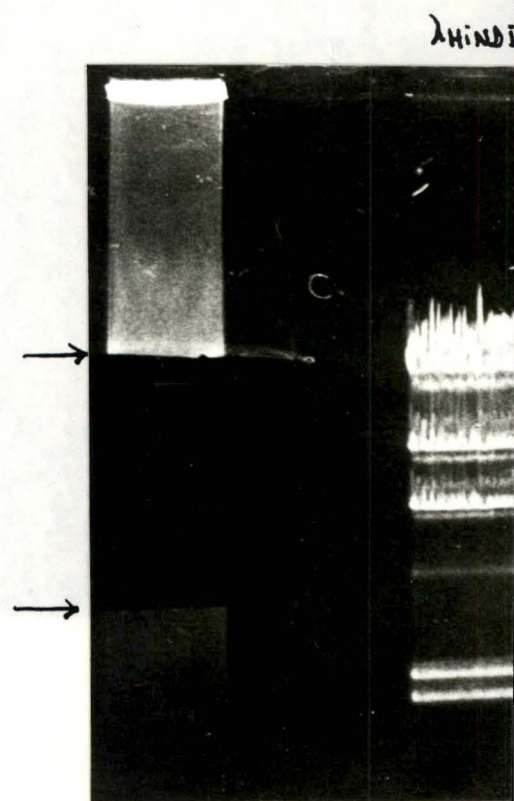
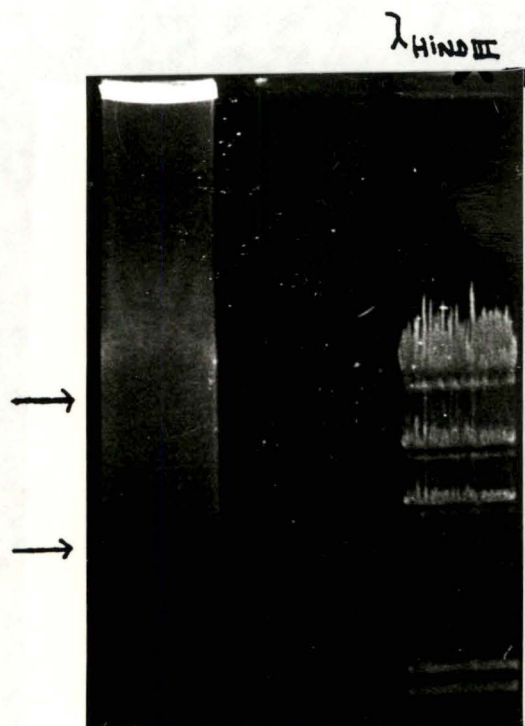


Fig. 3.11 : Excision d'un morceau de gel compris entre 5-10 kb.

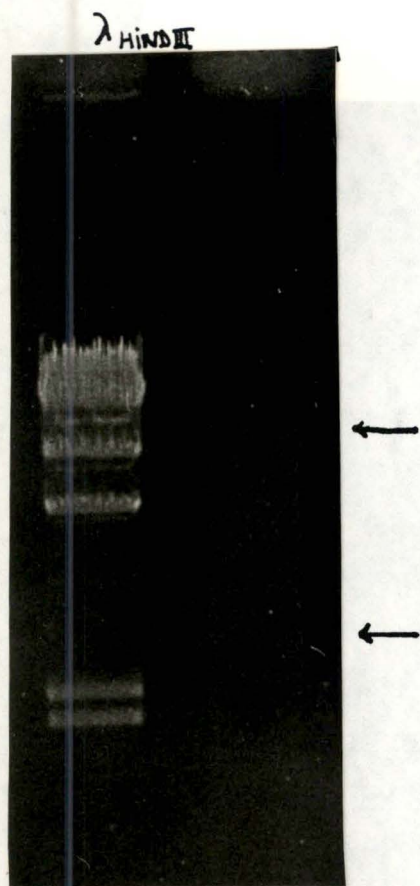


Fig. 3.12 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% dans un tampon TAE d'un dixième du volume final des fragments d'ADN récupérés. Une bande de 5-10 kb s'observe comme attendu.

soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0.6%. Après coloration au bromure d'éthidium, les fragments d'ADN sont visualisés par illumination aux UV. La concentration de 1.6 unités enzymatiques /  $\mu\text{g}$  d'ADN a été retenue. En effet, l'observation du gel (fig.3.8) montre une longue trainée témoignant du caractère partiel de la digestion donnant lieu à des fragments de taille comprise entre quelques centaines de bases et 10 kb.

#### B. Restriction partielle en fonction du temps

Une fois cette concentration déterminée, à savoir 1.6 U/ $\mu\text{g}$  d'ADN, la restriction a été menée en des temps de plus en plus longs et ce, afin d'améliorer encore les conditions de la digestion (fig.3.9).

La concentration de  $\lambda$  et le temps de restriction retenus sont respectivement 1.6 U/ $\mu\text{g}$  ADN et deux heures, ce qui donne des fragments d'ADN de taille attendue (5-10 kb) dans les proportions les plus élevées.

#### 3.1.1.3. Récupération des fragments d'ADN de 5-10 kb.

La récupération de fragments d'ADN peut se réaliser suivant deux méthodes : soit par un gradient de sucrose, méthode basée sur les vitesses de sédimentation différentes en fonction des tailles des fragments d'ADN ; soit par migration des fragments sur un gel d'agarose, dont la vitesse varie en fonction de la taille des fragments. Le développement de nouvelles techniques permettant une récupération simple, rapide et efficace de l'ADN de bandes de gel d'électrophorèse a guidé notre choix vers cette seconde méthode.

La récupération des fragments restreints compris entre 5-10 kb a été réalisée par la technique d'extraction proposée par le kit "Gene clean" commercialisé par la firme Stratagene (décrite dans M&M p 29) (fig.3.10 ; 3.11 ; 3.12).

Par comparaison au marqueur de taille  $\lambda$  *Hind III*, la quantité d'ADN récupéré a été estimée à plus ou moins 1  $\mu\text{g}$ . Ces fragments seront, par la suite, ligés aux plasmides SK<sup>+</sup> linéarisés et phosphatés.

#### 3.1.1.4. Préparation du vecteur plasmidique.

##### A. Choix du plasmide.

Le plasmide Bluescript SK<sup>+</sup> présente des caractéristiques remarquables qui en font un des vecteurs de clonage les plus utilisés

Sau 3A.	BamHI
5' ... G GATC C ... 3'	5' ... GATC ... 3'
3' ... C CTAG G ... 5'	3' ... CTAG ... 5'

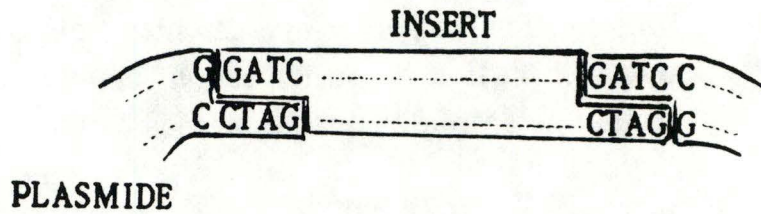


Fig. 3.13 : Compatibilité des sites de restriction des deux enzymes Sau3A (pour le fragment d'ADN génomique) et BamHI (pour le plasmide).

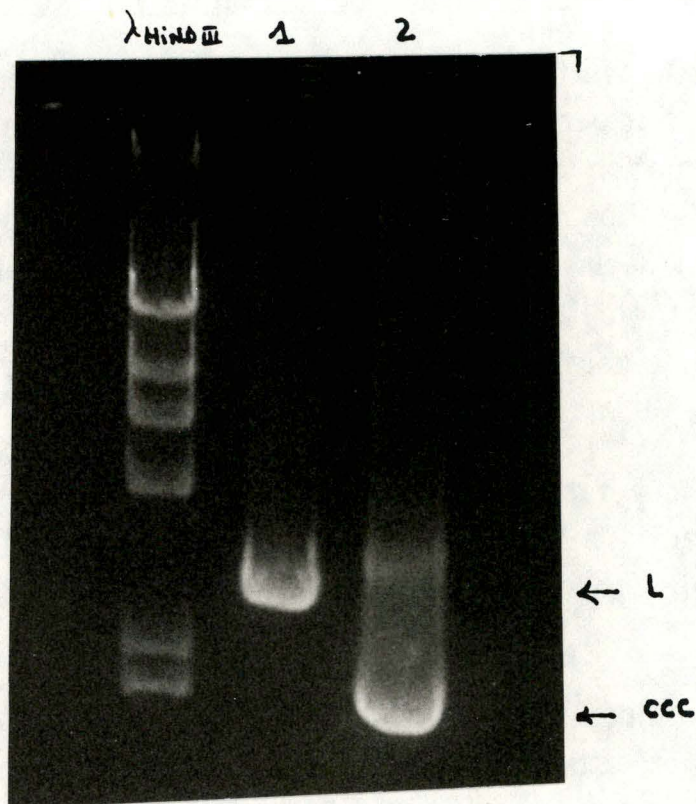


Fig. 3.14 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% du plasmide sk<sup>+</sup> coupé par BamHI.

20 µg de plasmides sk<sup>+</sup> ont été restreints avec 40 unités de BamHI pendant une heure à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée à la chaleur par incubation à 60°C pendant 20 min. Un échantillon d'ADN plasmidique restreint a alors été analysé sur gel d'agarose 0,8% (piste 1). Un échantillon d'ADN plasmidique non restreint sert de contrôle en piste 2.

actuellement, notamment par son extrême versatilité. En tant que phagemide (contenant une origine de répllication pour *E.coli*, et une pour le phage  $\phi 1$ ), il combine les avantages du plasmide et du phage. Il permet l'obtention de formes monocaténaïres + ou - selon le type de SK utilisé. Le marqueur de résistance à l'ampicilline et lac Z permettent la sélection des transformants sur un milieu LB-ampicilline d'une part et celle des recombinants pour le test bleu-blanc en présence d'Xgal-IPTG d'autre part. Les promoteurs placés de part et d'autre du site multiple de clonage (comportant le site *BamHI* requis pour la compatibilité avec les bouts collants *Sau3A* des inserts) permettent la transcription de l'un ou l'autre gène de l'insert. La petite taille du plasmide (2964 bp) devrait constituer un autre avantage pour la construction d'une banque génomique dans la mesure où le clonage de fragments de l'ordre de 5 kb par exemple, conduit à des plasmides recombinants dont les tailles restent en principe compatibles avec une excellente efficacité de transformation (fig. 3.13).

#### B. Préparation du plasmide SK<sup>+</sup> linéarisé.

Après restriction du plasmide SK<sup>+</sup> par *BamHI* pendant une heure à 37°C, l'enzyme est ensuite inactivée à la chaleur par incubation à 60°C pendant 20 min. Un échantillon, soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, nous permet d'observer, comme attendu une bande à  $\pm 3$  kb correspondant au vecteur linéarisé (rapporté dans M&M p 27) (fig. 3.14).

#### C. Déphosphorylation du plasmide SK<sup>+</sup> linéarisé.

Lors d'une ligation d'un fragment d'ADN avec un plasmide linéarisé, on observe généralement un grand nombre de plasmides recircularisés sur eux-mêmes, ce qui diminue les chances d'obtenir un plasmide recombinant. Un traitement à la phosphatase alcaline bactérienne (BAP) diminue les probabilités de cette recircularisation. En effet, cette enzyme enlève les phosphates 5' des deux extrémités du plasmide préalablement linéarisé empêchant dès lors la formation de ponts phosphodiester entre les extrémités traitées. Dans ce cas, la recircularisation du plasmide phosphatasé ne sera possible que moyennant l'insertion d'un fragment d'ADN étranger non traité apportant des groupements phosphates. Les plasmides recombinants présentent toutefois deux cassures ("nick") de part et d'autre de l'insert, facilement réparables *in vivo* par les mécanismes présents chez la bactérie hôte (fig. 3.15).

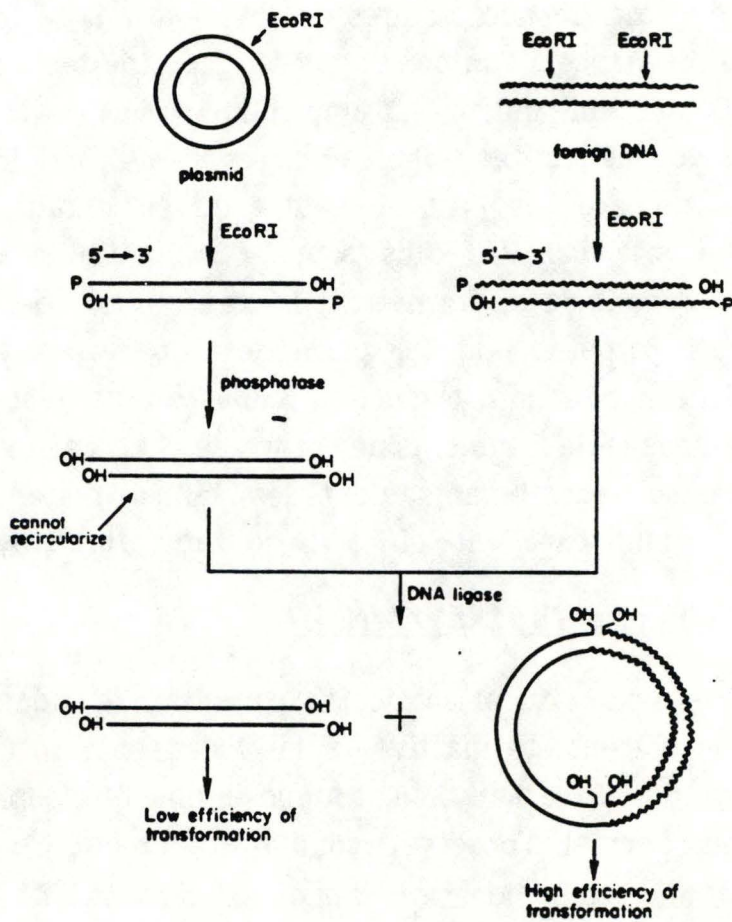


Fig.3.15 : Schéma récapitulatif d'une déphosphorylation alcaline d'un plasmide linéarisé.

10 µg de plasmides SK<sup>+</sup> linéarisés ont été traités par 500 unités de BAP (M&M p 32) pendant une heure à 60°C. L'inactivation de l'enzyme s'est faite par du SDS 0.1% final et l'action d'une protéinase K 10 µg/ml final. Le plasmide traité à la BAP est purifié et récupéré par un traitement au phénol suivi d'une précipitation à l'éthanol (M&M p 26).

Le contrôle de l'efficacité de la réaction de déphosphorylation consiste à transformer la souche XL1-blue avec un plasmide traité et non traité ayant subi l'action d'une ligase. En effet, seul le plasmide circulaire peut se répliquer et dès lors se maintenir dans la cellule hôte, donnant donc lieu à des clones bleus. La transformation de la souche XL1-blue par un mélange de ligation des plasmides traités à la phosphatase, suivie d'un étalement de celle-ci sur un milieu LB-Amp-XGal-IPTG, n'a donné que 32 colonies bleues. Par contre, dans les mêmes conditions expérimentales, on a dénombré, comme attendu, plus de 10000 colonies bleues pour le contrôle (plasmides non traités à la phosphatase). Ce rapport 32/10000 confirme donc bien l'efficacité du traitement à la phosphatase.

Parallèlement à ce test expérimental, deux contrôles ont été réalisés avec la souche XL1-blue. Celle-ci a été étalée d'une part sur un milieu LB servant de contrôle positif (viabilité de la souche), et d'autre part sur un milieu LB-Amp, permettant un contrôle négatif (absence du phénotype "résistance à l'ampicilline" chez la souche non transformée).

Rem. : De petites colonies blanches sont observées autour des bleues. Il s'agit de colonies "satellites". En effet, les colonies bleues dégradent l'ampicilline sur une certaine distance en périphérie. Des cellules dépourvues de plasmide pourront croître dans ce halo périphérique déficient en ampicilline et former des petites colonies blanches.

### 3.1.1.5. Ligation "ADN génomique-SK<sup>+</sup>" et transformation.

1 µg d'ADN génomique de 5-10 kb est ajouté à 1 µg de plasmides SK<sup>+</sup> linéarisés au site BamH1 et déphosphorylés. Ce mélange est soumis à l'action d'une unité de ligase pendant une nuit à -14°C. 4 µl de ce mélange de ligation (correspondant à 200 ng d'ADN) sont alors utilisés pour transformer la souche XL1-blue. Ces transformations sont étalées sur des boîtes de milieu LB-Amp-XGal-IPTG. Après une nuit d'incubation à 37°C, l'observation de ces boîtes ne permet de détecter aucun transformant. D'autre part, les contrôles positif et négatif de la souche non transformée réalisés comme précédemment, se sont avérés concluants.

Ces résultats nous ont amenés à poser l'hypothèse d'une inefficacité de l'opération de ligation pouvant provenir de la ligase elle-même ou de la qualité du plasmide après traitement à la phosphatase ou encore de l'ADN génomique lui-même.

#### A. Vérification de la validité de la ligase.

La recircularisation d'un plasmide, précédemment linéarisé, en présence de la ligase servira de contrôle.

1 µg de SK<sup>+</sup> non phosphatasés restreints en *BamHI* sont soumis à l'action d'une unité de ligase pendant une nuit à 14°C. Ce mélange de ligation sert ensuite à la transformation de cellules XL1-blue compétentes. Après étalement sur boîtes contenant un milieu LB-Amp-XGal-IPTG, suivi d'une incubation à 37°C pendant une nuit, ± 10 000 colonies bleues ont été observées, ce qui confirme d'une part la validité de l'enzyme et d'autre part l'intégrité des bouts collants *BamHI* du plasmide SK<sup>+</sup> non phosphaté.

#### B. Examen de la ligabilité du plasmide SK<sup>+</sup> phosphaté.

La non-recircularisation en présence de ligase des plasmides traités à la BAP (contrôle négatif) a été vérifiée précédemment (p 40 ). Il serait cependant intéressant d'effectuer un contrôle positif, à savoir vérifier la ligabilité du plasmide phosphaté avec un fragment d'ADN non phosphaté servant d'insert (fragments d'ADN provenant de la restriction totale du plasmide SK<sup>+</sup> par *Sau3A*). En effet, lors du traitement à la phosphatase, une altération des extrémités du plasmide peut éventuellement se produire, ce qui pourrait expliquer une incompatibilité entre les extrémités à "bout collant" du plasmide traité et celles du fragment d'ADN étranger non traité rendant de ce fait toute ligation impossible.

5 µg de plasmides SK<sup>+</sup> sont restreints totalement par 5 unités de *Sau3A* pendant une heure à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée par incubation à 60°C pendant 20 min. 1 µg de fragments *Sau3A* sont ajoutés d'une part à 1 µg de plasmides SK<sup>+</sup> linéarisés en *BamHI* et d'autre part à 1 µg de plasmides SK<sup>+</sup> linéarisés et phosphatasés. Ces deux mélanges sont soumis à l'action d'une unité de ligase pendant une nuit à 14°C et sont ensuite utilisés pour transformer des cellules *XL1-blue* compétentes. Après étalement sur boîtes contenant un milieu LB-Amp-XGal-IPTG et une incubation une nuit à 37°C, on observe 5000 colonies blanches/100 colonies

bleues pour le mélange "plasmide traité - fragment  $\lambda$ gT1" contre 100 colonies blanches/10 000 colonies bleues pour le mélange "plasmide non traité - fragment  $\lambda$ gT1".

Ces résultats, confirmant la qualité de la ligase, permettent de tirer deux conclusions. Premièrement, le faible taux de colonies bleues obtenues par la recircularisation des plasmides traités à la phosphatase alcaline bactérienne (100) par rapport au contrôle (10000 bleues) confirme l'efficacité de celui-ci. Deuxièmement, la "ligabilité" des plasmides traités avec un insert ne peut plus être mise en doute puisqu' on observe un taux de colonies blanches 50 fois plus grand par rapport aux colonies bleues.

### C. Vérification de la ligabilité des fragments d'ADN génomique.

Les fragments d'ADN génomiques peuvent s'avérer "inligables" pour différentes raisons : présence de protéines liées à l'ADN, présence d'impuretés diverses et surtout cassures physiques survenues lors de la lyse ou de la récupération des fragments de 5-10 kb comme énoncé précédemment (voir p 36 ).

Pour éprouver ces hypothèses, 7.6  $\mu$ g d'ADN génomique sont restreints totalement par  $\lambda$ gT1. La vérification de cette restriction est réalisée par migration électrophorétique d'un aliquot d'ADN restreint sur gel d'agarose. 1  $\mu$ g de ces fragments de  $\pm$  256 bp sont ligués à 1  $\mu$ g plasmides SK+ phosphatasés d'une part et non phosphatasés d'autre part. Ces deux mélanges sont ensuite utilisés pour transformer de cellules XL1-blue compétentes. Après étalement sur boîtes contenant un milieu LB-Amp-XGal-IPTG et incubation une nuit à 37°C, la transformation par SK+ non phosphatasés recombinants a donné 10 colonies blanches et 3000 bleues tandis que par SK+ traités, nous avons observé 50 blanches et 25 bleues. Le peu de colonies blanches obtenues par rapport au test de vérification de la ligabilité du plasmide phosphatasé précédent (100 blanches pour SK+ non phosphatasés et 5000 blanches pour SK+ traités ) souligne le problème de ligabilité de l'ADN.

#### 3.1.1.6. Conclusions.

La qualité de la ligase et la ligabilité du plasmide SK+ phosphatasé avec un insert étranger étant mises hors cause, l'échec de la ligation doit être attribué à l'ADN génomique lui-même et donc à la méthode de préparation de celui-ci. Pour éprouver cette dernière hypothèse et



Fig.3.16 : Extraction d'ADN génomique.

100 ml d'une culture arrivée en phase stationnaire (DO de 0.65 à 650 nm) ont été lysés suivant le protocole décrit dans M&M à la page 19.

5  $\mu$ l de la solution d'ADN obtenue en finale a migré pendant une heure à 100 volts dans un gel d'agarose 0.6% (piste 1). La quantité d'ADN récupéré a été estimée à 0.075  $\mu$ g/ $\mu$ l en comparaison au  $\lambda$  Hind III.

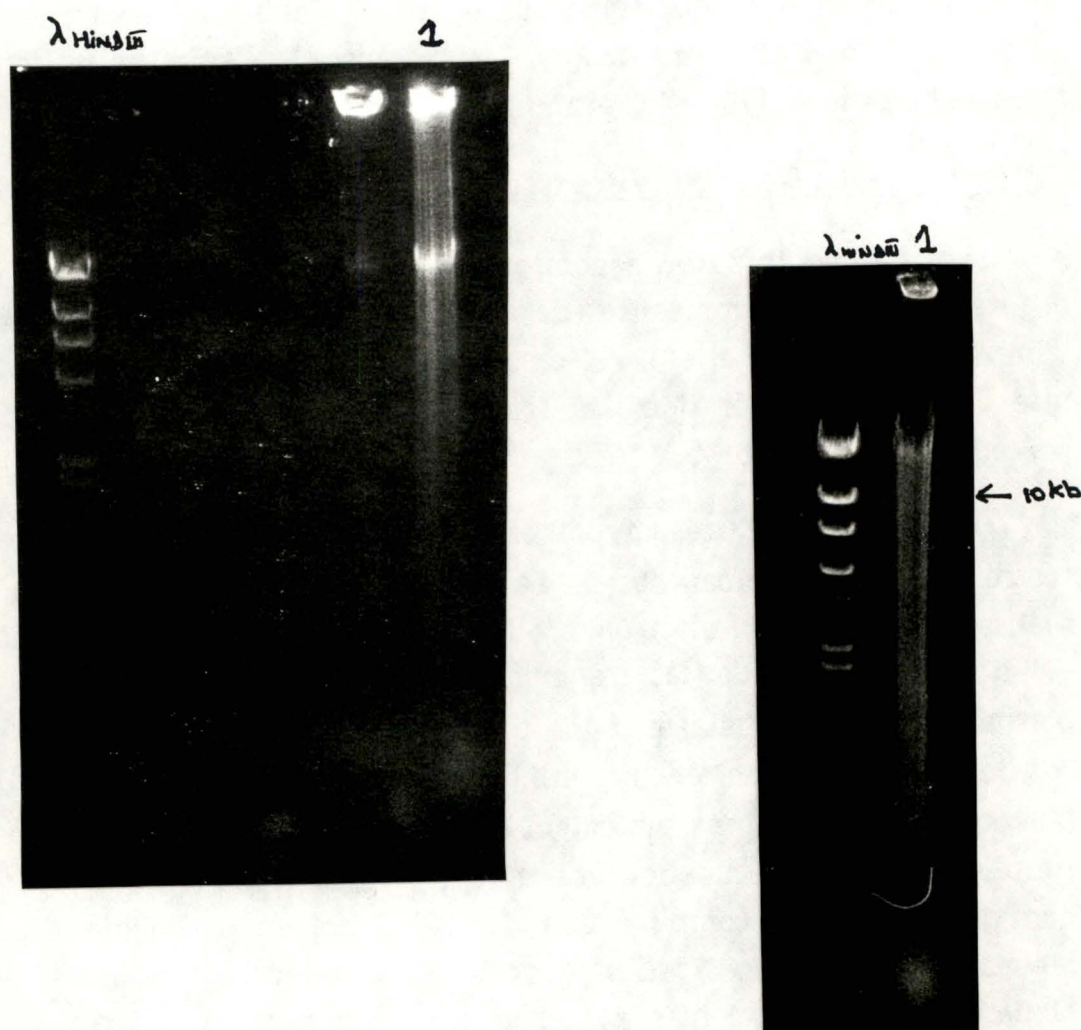


Fig3.17 : Restriction partielle de l'ADN génomique récupéré.

Les 15  $\mu$ g d'ADN génomique récupérés sont restreints avec 6.4 unités de Sau3A pendant une heure à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée à la chaleur par incubation à 60°C pendant 20 min. Un échantillon d'ADN génomique restreint est alors déposé sur gel d'agarose 0.6%. Après migration et coloration nous observons, comme attendu, que les fragments d'ADN se situent principalement entre 5-10 kb (piste 1).

contourner cet obstacle, une seconde méthode de lyse (décrite dans M&M p 19) a alors été mise en oeuvre.

### 3.1.2. Détermination des conditions au départ du second protocole de lyse.

#### 3.1.2.1. Préparation de l'ADN génomique.

Cette seconde méthode, ressemble à la première à l'exception du tampon de lyse différent, d'un choc thermique plus important, d'un traitement supplémentaire à la protéinase K et d'une purification de l'ADN non plus au phénol mais par une solution SEVAG (chloroforme/alcool isoamylique).

Les différentes étapes de la lyse ont été suivies comme précédemment par mesure de la DO à 650 nm. Par migration électrophorétique sur gel d'agarose d'un échantillon de la solution d'ADN récupéré, la quantité de celui-ci a pu être estimée à 0.075 µg/µl de solution correspondant à 15 µg (fig.3.16), quantité nettement plus faible par rapport au premier protocole de lyse (1.9 µg/µl).

#### 3.1.2.2. Restriction partielle de l'ADN génomique.

Dans les mêmes conditions que précédemment (1.6 unités/µg et une heure de restriction), la restriction partielle de l'ADN génomique récupéré a donné, comme attendu, des fragments d'ADN se situant principalement entre 5-10 kb (fig.3.17).

#### 3.1.2.3. Récupération des fragments de 5-10 kb.

Par le même protocole que celui appliqué précédemment (méthode "Gene clean"), les fragments de 5-10 kb ont été récupérés. La quantité d'ADN a été estimée à ± 1 µg.

#### 3.1.2.4. Ligation "fragments d'ADN-vecteur" et transformation.

Un µg d'ADN génomique récupéré précédemment est ajouté à 1 µg de plasmide SK<sup>+</sup> linéarisé au site *BamHI* et déphosphorylé. Ce mélange est soumis à l'action d'un unité de T4 ADN ligase pendant une nuit à 14°C. 8 µl de ce mélange de ligation (correspondant à 200 ng d'ADN) sont alors utilisés pour transformer des cellules XL1 blue compétentes. Des étalements sont réalisés sur des boîtes de milieu LB-Amp-X Gal-IPTG. Après incubation à 37°C durant une nuit, aucun transformant n'a pu être

observé sur ces boîtes. Les contrôles habituels positifs et négatifs de la souche non transformée ont été réalisés.

### 3.1.1.5. Conclusion et discussion.

Les résultats obtenus par les deux méthodes de lyse décrites ci-dessus n'ont pas conduit à la ligation de l'ADN génomique dans le vecteur Bluescript SK+. L'hypothèse d'un facteur protéique ou autre, copurifié avec l'ADN et inhibant l'activité de la ligase, a déjà été évoquée. La pureté de l'ADN obtenu par les protocoles de type "Gene clean" est réputée comparable à celle fournie par des protocoles plus exigeants faisant appel par exemple au chlorure de césium. De plus, on a montré, dans un cas de figure semblable, que l'ADN de *Lactobacillus plantarum* purifié par un gradient de chlorure de césium est non ligable (Benoît Kamerer, Stasbourg; Dominique Guarmin, LLN, communication personnelle). Il semble donc que la pureté de l'ADN ne soit pas en cause. De surcroît, il serait illusoire de se débarrasser d'inhibiteurs éventuels par les moyens de purification habituels. Une seconde hypothèse peut cependant être émise. L'ADN génomique, tel que nous le préparons à partir des cultures de *Lactobacillus delbruckei*, ne répondrait pas, pour des raisons inhérentes à sa structure, aux critères de "ligabilité". Rappelons qu'un critère important est la taille de l'ADN extrait. Elle doit être suffisante pour que la restriction fournisse une majorité d'inserts pourvus de deux extrémités cohésives. On ne peut exclure que l'état morphologique et physiologique de la souche au stade où nous extrayons l'ADN, soit défavorable à cet égard. Sachant que les cultures de *Lactobacillus delbruckei* évoluent en fonction de paramètres mal contrôlés, vers des formes circulaires (appelées monocellulaire) ou filamenteuses, nous avons décidé d'utiliser également ces formes filamenteuses comme source d'ADN pour la construction d'une banque.

### 3.2. Mise au point de la construction de la banque à partir de la forme filamenteuse.

Il s'est avéré que *Lactobacillus delbruckei* sous forme filamenteuse présentait une croissance optimale à 37°C (au lieu de 44°C) nettement supérieure (150 au Klett contre 40 au Klett pour la forme monocellulaire en milieu MRS). Les cultures ultérieures ont dès lors été incubées à 37°C.



Fig.3.18 : Restriction partielle de l'ADN génomique récupéré.

4  $\mu$ g d'ADN génomique récupérés sont restreints avec 3.2 unités de Sau3A pendant une heure à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée à la chaleur par incubation à 60°C pendant 20 min. La migration d'un échantillon d'ADN génomique restreint sur gel d'agarose 0,6% indique que les fragments d'ADN se situent principalement entre 5-10 kb (piste 1). En piste 2 on retrouve l'échantillon d'ADN génomique non restreint servant de contrôle.

### 3.2.1. Détermination des conditions au départ du protocole de lyse de Scheirlinck modifié.

#### 3.2.1.1. Préparation de l'ADN génomique.

Nous avons mis au point une méthode de lyse très efficace en apportant quelques modifications à la première méthode (méthode de Scheirlinck) (choc thermique plus important, un traitement à la RNase et à la protéinase K éliminant le RNA et les protéines respectivement). En effet, lors de la précipitation des acides nucléiques à l'éthanol, de longs filaments glaireux correspondant à l'ADN génomique et témoignant de la grande taille de l'ADN, sont bien visibles et sont récupérés à la baguette (pipette Pasteur dont l'extrémité est recourbée). Un échantillon de la solution d'ADN récupéré est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,6% dans un tampon TEA. Après coloration au bromure d'éthidium et visualisation sous lumière UV, la quantité d'ADN récupéré a été estimée à 100 µg.

#### 3.2.1.2. Restriction partielle par *Sau 3A*.

4 µg d'ADN génomique récupéré ont été restreints par 3,2 unités de *Sau 3A* (0,8 unités par µg d'ADN au lieu de 1,6 unités par µg pour les 2 méthodes précédentes). Une moindre quantité d'enzyme *Sau 3A*, suffisante pour obtenir des fragments de taille attendue (5 à 10 kb). L'ADN filamenteux obtenu serait dépourvu de certains contaminants inhibant la restriction de l'ADN. La qualité de l'ADN préparé à partir de la forme filamenteuse serait donc supérieure et par conséquent cet ADN se prête mieux à la construction de la banque. La vérification de la restriction est réalisée par migration électrophorétique d'un échantillon d'ADN restreint d'une part et non traité d'autre part, sur gel d'agarose 0,6% suivie d'une coloration du gel au bromure d'éthidium et visualisation par illumination aux U.V. (fig.3.18).

#### 3.2.1.3. Récupération des fragments de 5-10 kb.

La récupération des fragments d'ADN compris entre 5 et 10 kb a été réalisée, comme précédemment, par la méthode "Gene clean". Notons cependant que la piste du gel contenant l'ADN génomique a été excisée, et seule la piste correspondant au  $\lambda$  *Hind III* a été colorée au bromure d'éthidium. Le morceau de gel compris entre 5-10 kb découpé n'a donc subi ni la coloration au bromure d'éthidium, ni l'exposition aux UV. Un

échantillon du mélange récupéré, est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose et la quantité d'ADN récupéré est estimée à  $\pm 1 \mu\text{g}$ .

#### 3.2.1.4. Ligation "ADN génomique - plasmide" et transformation.

La ligation des fragments d'ADN génomique avec le plasmide SK+ phosphatasé et la transformation de XL1-blue par ce mélange ont été réalisées dans des conditions identiques. Après étalements de ces transformants sur des boîtes de milieu LB-Amp-XGal-IPTG, on a observé 54 colonies blanches sont dénombrées ce qui correspond à un taux de transformation de 270 colonies recombinantes par  $\mu\text{g}$  d'ADN. Cependant, le nombre de clones s'avère trop faible par rapport au nombre théorique (un minimum de 3000 clones sont en effet nécessaires pour constituer une banque représentative du génome).

#### 3.2.1.5. Conclusion.

Ces résultats soulignent que la ligabilité de l'ADN génomique préparé à partir de la forme filamenteuse est bien supérieure à celle de l'ADN obtenu à partir de la forme monocellulaire. Par ailleurs, cette ligabilité pourrait s'expliquer par le fait que l'ADN n'a pas subi de traitement au bromure d'éthidium, ni d'illumination aux UV. En effet, il est démontré que le taux de ligation d'un fragment d'ADN avec le plasmide diminue d'un facteur 10 lorsque ce fragment est coloré au BrEt puis exposé aux UV.

Cependant, même si nous avons pu accroître le nombre de transformants, le nombre de clones recombinants est encore beaucoup trop faible pour permettre l'obtention d'une banque représentative.

Pour rendre compte de cette observation, nous avons émis l'hypothèse qu'il y aurait "perte" du plasmide à haute fréquence. Cette perte pourrait résulter selon CHEN (33), d'une influence néfaste du niveau de transcription de gènes portés par le plasmide sur sa réplication et donc sa stabilité. CHEN observe en effet que le clonage de certains promoteurs forts de *Streptococcus pneumoniae* dans un vecteur de type pUC entraîne une grande instabilité du plasmide qui serait due à la transcription excessive de gènes de la matrice pUC tombés sur le contrôle de ces promoteurs. Alternativement, l'expression de certains gènes de *Lactobacillus delbrueckii* clonés dans *E. coli* pourrait induire la production de protéines toxiques ou constituerait simplement un fardeau intolérable pour l'hôte.

Tableau 3.2 : Résultats obtenus pour la vérification de l'effet souche et l'effet plasmide.

	<u>SK+</u>	<u>YEP 351</u>
<u>XLI blue</u>	9 blanches 50 bleues	22 blanches 0 bleues
<u>TG1</u>	4 blanches 3 bleues	/
<u>GRF 18</u>	/	6 colonies

Pour éprouver ces hypothèses, des tests de ligation des fragments d'ADN génomique ont été réalisés avec le plasmide SK<sup>+</sup> et avec le plasmide YEP 351. Ces vecteurs recombinants ont servi à transformer XL1-blue, une autre souche de *E. coli* (TG1) ainsi que la souche GRF 18 de *Saccharomyces cerevisiae*. Le plasmide YEP a été choisi pour diverses raisons. Il s'agit d'un vecteur navette *E. coli*-levure. Si l'hypothèse de la force des promoteurs du gène cloné jouant sur la stabilité du plasmide s'avérait exacte, la protection des promoteurs étrangers par les gènes lac Z et Leu 2 du plasmide YEP 351 constituerait un atout pour la construction de la banque. De plus, le nombre de copies de ce plasmide est inférieure à celui du plasmide SK<sup>+</sup> ce qui, dans l'éventualité d'une toxicité du produit formé pour l'hôte, pourrait contrecarrer cette tare.

### 3.2.2. Contrôle de l'effet plasmide et effet souche.

En pratique 1 µg de fragments d'ADN restreints (5 à 10 kb) ont été ajoutés d'une part à 1 µg de plasmide SK<sup>+</sup> linéarisé par BamH1 et phosphatasé, et d'autre part à 1 µg de plasmide YEP 351 linéarisé par BamH1 et phosphatasé. Ces deux mélanges ont ensuite subi l'action d'une unité de ligase pendant deux heures à 37°C. 200 ng d'ADN de chaque mélange a servi à transformer des cellules XL1 blue, TG1 et la levure GRF 18. Ces 3 transformations ont été étalées sur des boîtes de milieu LB-Amp-X Gal-IPTG pour les souches bactériennes, et sur milieu minimum pour levure (cfr MM) dans le cas de GRF 18. Les bactéries sont incubées une nuit à 37°C et la levure 2 jours à 30°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.2. Les 22 colonies blanches obtenues pour la transformation de XL1-blue par le plasmide YEP351 recombinant nous ont conduits à envisager l'utilisation de ce plasmide et de cette souche pour la construction de notre banque.

### 3.2.3. Conclusion.

Au vu de ces résultats nous avons choisi dorénavant de travailler avec le plasmide YEP 351 et la souche XL1-blue afin de construire la banque proprement dite.



### 3.3. Réalisation définitive de la banque à partir de la forme filamenteuse.

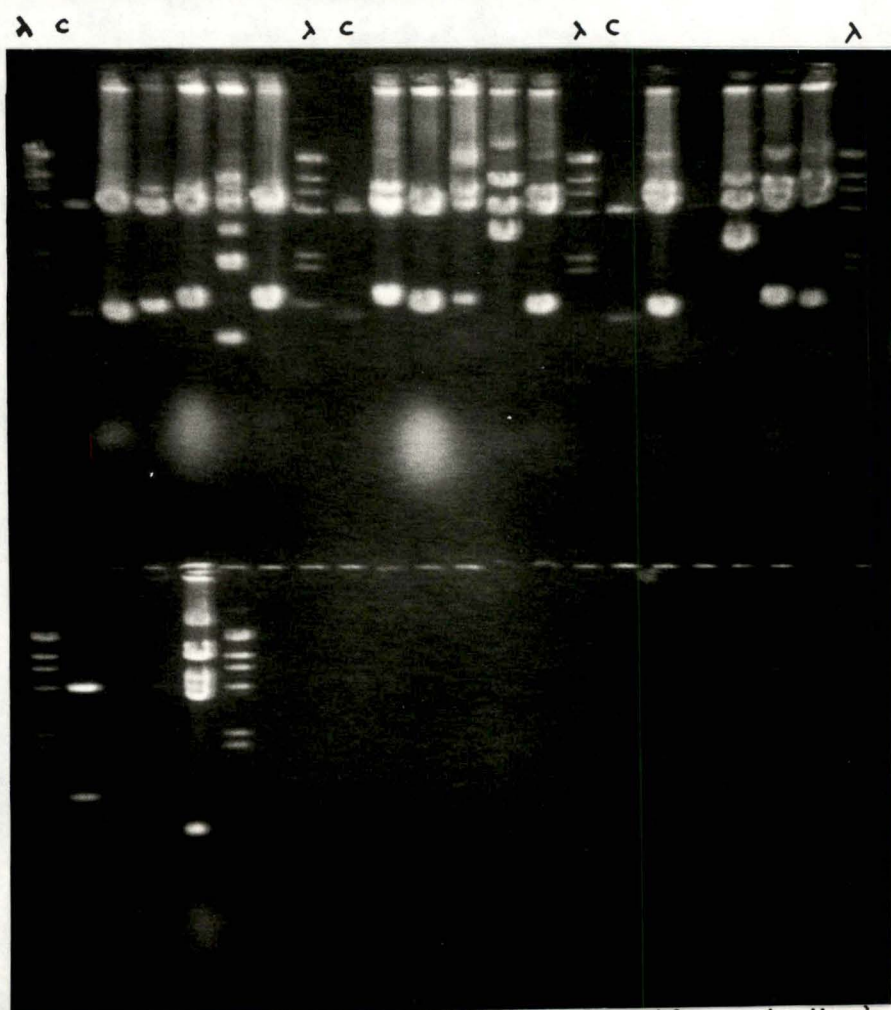
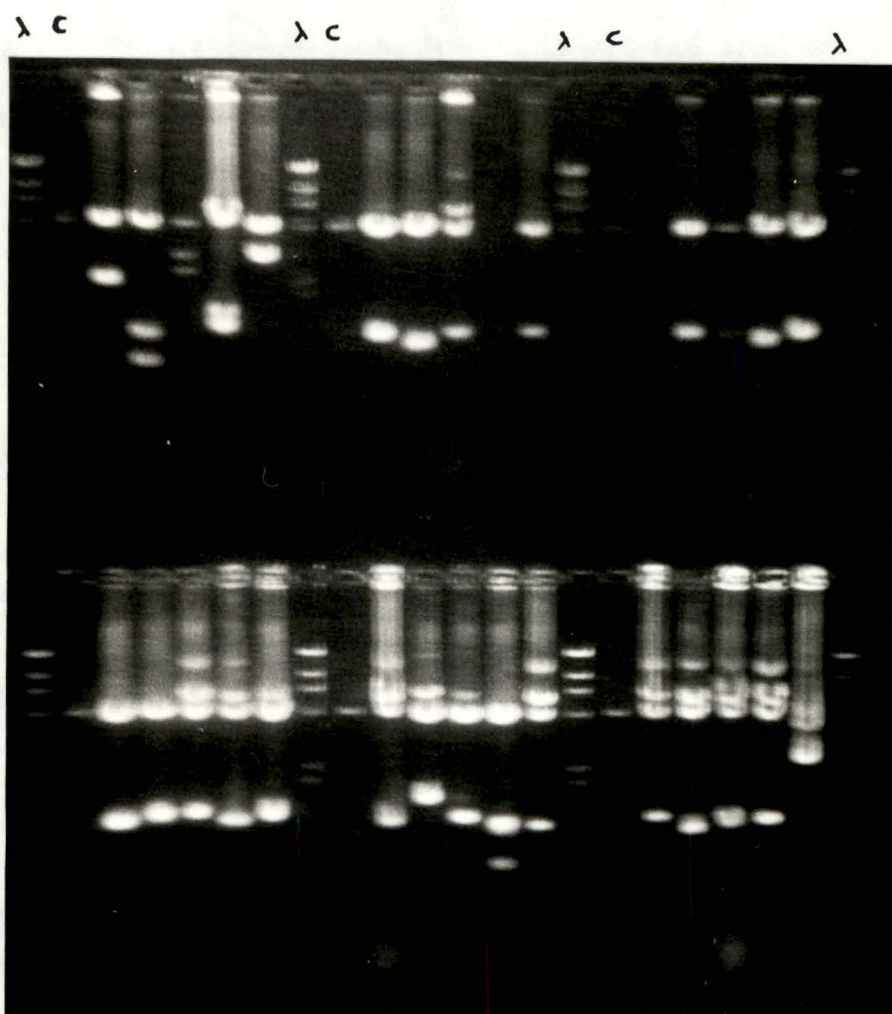
#### 3.3.1. Construction de la banque génomique.

La construction de la banque a été réalisée comme suit : 1 L de culture de la souche *L. delbrueckei* sous forme filamenteuse incubée à 37°C et arrivée en phase stationnaire (DO de 150 au Klett) a servi à la préparation d'ADN n° 3 (expliqué dans M&M p 23). De longs filaments glaireux correspondant à l'ADN génomique ont été récupérés à la baguette (pipette Pasteur dont l'extrémité est recourbée). La quantité d'ADN récupérée, en utilisant ce principe, a été estimée à 40 µg.

10 µg d'ADN génomique récupérés ont été restreints par 8 unités de *Sau 3A* pendant une heure à 37°C et l'enzyme a été inactivée ensuite par incubation à 60°C pendant 20 min. La vérification de la restriction est réalisée par migration électrophorétique d'un échantillon d'ADN sur gel d'agarose 0.6% TAE. Comme attendu, les fragments d'ADN se situent entre 5-10 kb.

Les fragments d'ADN restreint partiellement ont été récupérés par la méthode du kit "Gene clean" (décrite dans M&M p 29). Notons que la piste du gel contenant l'ADN génomique a été excisée, et seule la piste correspondant au marqueur de taille  $\lambda$  *Hind III* a été colorée au bromure d'éthidium. La quantité des fragments d'ADN récupérés a été estimée à 6 µg, après migration d'un échantillon dans un gel d'agarose 0.6 % et par comparaison au marqueur de taille  $\lambda$  *Hind III*.

Ces 6 µg d'ADN génomique récupérés ont été alors ajoutés à 6 µg de plasmide YEP 351 linéarisé au site *BamHI* et déphosphorylé. Le mélange est soumis à l'action d'une unité de ligase pendant une nuit à 14°C. 50 transformations de la souche XL1 blue ont été réalisées, chacune avec 200 ng d'ADN. Les mélanges de la transformation ont été étalés sur des boîtes de milieu LB-Amp-XGal-IPTG. Après une nuit d'incubation à 37°C, environ 18000 colonies ont été dénombrées parmi lesquelles 8000 étaient recombinantes (apparaissant blanches sur milieu X Gal-IPTG). La réaction de déphosphorylation n'a donc pas été totale (plus de 50% de colonies bleues), mais le nombre de clones recombinants (8000 blanches) est largement suffisant. Parallèlement, les contrôles habituels de viabilité et de sensibilité à l'ampicilline de la souche non transformée ont été réalisés.



C : Echantillon des plasmides  
YEP 351 restreints par *EcoRI*

Fig. 3.20 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des plasmides extraits à partir de 48 colonies prélevées au hasard et restreints par *EcoRI*

### 3.3.2. Estimation de la qualité de la banque.

#### 3.3.2.1. Estimation du nombre de clones attendus.

La formule de Clarke et Carbon (1976) nous permet d'établir le nombre de clones nécessaire pour avoir 99 % de chance qu'une séquence quelconque du génome soit représentée au moins une fois dans la banque. Ce nombre est de 3000 clones. Avec 8000 colonies recombinantes obtenues, nous pouvons donc considérer que la banque est représentative du génome de *L. delbruckei*.

#### 3.3.2.2. Vérification de la taille attendue des inserts.

La validité de la banque ne pourra être confirmée que si les inserts des clones recombinants ont bien la taille attendue (5-10 kb) et que si ces clones sont bien indépendants.

48 colonies blanches ont été prélevées au hasard dans la banque et ont servi à ensemercer chacune 5 ml de milieux de culture LB-Amp. Les plasmides extraits de chacune de ces cultures par la méthode "Miniprep P1 P2 P3" (expliquée dans M&M p 25), ont ensuite été restreints par 10 unités d'*EcoRI* pendant une heure à 37°C. Ils ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. L'examen du gel (fig. 3.20) nous montre que plus de 60% des plasmides sont recombinants. Sachant que le plasmide YEP 351 possède deux sites de restriction *EcoRI* et que sa taille est de 5644 bp, la somme des différentes bandes obtenues après restriction, donnera pour chaque clone la taille du plasmide recombinant et dès lors, après décompte des 5644 bp de la matrice, la taille de l'insert. La taille des inserts est en moyenne de 6.5 kb ce qui correspond à notre attente. La taille des inserts et les profils de restriction varient d'un clone à l'autre, démontrant ainsi que les clones sont bien indépendants. Ces informations confirment donc la validité de la banque.

De manière à diminuer le nombre de plasmides sans inserts (colonies bleues) de notre banque, les 8000 colonies blanches ont été repiquées sur un milieu LB-Amp et, après une nuit d'incubation à 37°C, celles-ci ont été raclées, rassemblées et stockées dans du LB-glycérol 15%. Une partie a été soumise à un protocole d'extraction plasmidique en vue d'obtenir la banque sous forme d'ADN plasmidique.

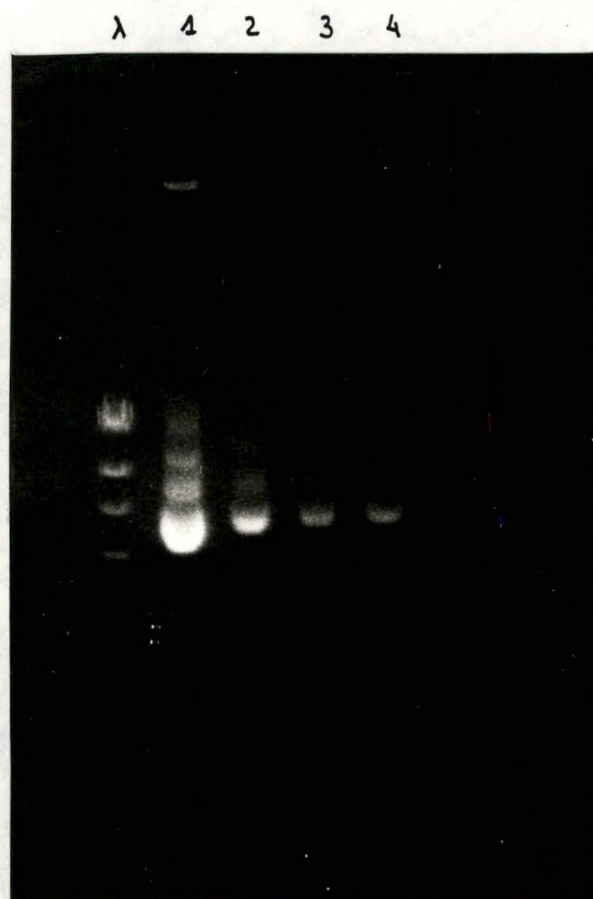


Fig. 3.21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% de :

Piste 1 :	5 $\mu$ l d'ADN plasmidique	extrait de la banque.
Piste 2 :	1 $\mu$ l	- - -
Piste 3 :	1 $\mu$ l dilué 2 fois	- - -
Piste 4 :	1 $\mu$ l dilué 10 fois	- - -

### 3.4. Criblage ou "screening" de la banque.

La stratégie du screening, résumée à la page 13, se base sur la complémentation(29). La souche d'*E. coli* FMJ144, mutante pour le gène de la lactate déshydrogénase et celui de la pyruvate formate lyase, est incapable de fermenter et ne peut donc croître en anaérobiose sur un milieu contenant du glucose. Les plasmides recombinants de la banque serviront à transformer cette souche double mutante. Seuls les transformants complémentés par le gène de la LDH ou de la PFL pourront croître en conditions anaérobies.

#### 3.4.1. Extraction des plasmides recombinants de la souche XL1 blue.

27,5 ml de LB-glycérol 15% contenant les colonies raclées sont utilisés comme matériel de départ pour l'extraction plasmidique. Les plasmides de ces cellules sont extraits par la méthode "Midiprep P1 P2 P3" (décrite dans M&M p 24 ). Ces trois tampons correspondent respectivement au tampon de lyse, de précipitation des protéines et d'extraction de l'ADN plasmidique. Un échantillon des plasmides extraits est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%. L'examen du gel (fig. 3.21) montre une bande diffuse apparaissant comme prévu dans la zone de 5 kb, correspondant aux plasmides sous forme superenroulée. En comparaison avec le marqueur  $\lambda$  *HindIII*, la quantité de plasmides a été estimée à un total de 400  $\mu$ g (0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l).

#### 3.4.2. Estimation du taux de transformation de la souche FMJ rendue compétente.

20 ng, 100 ng et 500 ng ont servi à transformer 200  $\mu$ l de cellules FMJ rendues compétentes au RbCl (décrit dans M&M p31). Ces trois mélanges de transformation ont ensuite été étalés sur un milieu LB-Amp. Après une nuit à 37°C en conditions aérobies, les colonies sont comptées et le taux de transformation (nombre de transformants/ $\mu$ g d'ADN) estimé :

- avec 20 ng de plasmides à 3600 transformants/ $\mu$ g
- avec 100 ng à 4500 transformants/ $\mu$ g
- avec 500 ng à 21000 transformants/ $\mu$ g.

Ces résultats soulignent donc la transformabilité de la souche double mutante FMJ 144.

### 3.4.3. Transformation de FMJ par les plasmides recombinants en conditions anaérobies.

Les mêmes concentrations que précédemment (20 ng, 100 ng et 500 ng de plasmides extraits) ont servi à transformer des cellules FMJ 144 rendues compétentes au RbCl. 24, 12 et 12 transformations ont été réalisées pour les trois concentrations respectives. Les cellules transformées ont été étalées sur un milieu LB-Amp-X Gal-IPTG. D'autre part, 200 ng de plasmide YEP 351 et 200 ng de plasmide pKK contenant le gène de la LDH de lapin ont servi à transformer 200 µl de la souche FMJ. Ces deux plasmides constituent les contrôles négatif et positif respectivement. Après 4 jours d'incubation à 37°C en conditions anaérobies, les résultats suivants ont été observés :

- \* Contrôle - : la transformation du plasmide YEP dans la souche FMJ 144 étalée sur milieu LB-Amp donne 130 colonies en conditions aérobies (soit un taux de transformation de  $\pm 15000$  transformants/µg de l'ADN) alors qu'aucune colonie ne croît en anaérobiose.
- \* Contrôle + : la transformation du plasmide pKK porteur du gène de la LDH de lapin étalée sur milieu LB-Amp-X Gal-IPTG donne 134 colonies en aérobiose et 280 colonies en anaérobioses.

Les résultats obtenus pour ces deux contrôles démontrent la validité de la méthode utilisée pour le screening de la banque.

- \* Transformation avec les plasmides de la banque: 9 petites colonies poussant en anaérobioses, et donc présentant le phénotype attendu, ont été détectées.

Cependant, sachant que la souche FMJ 144 possède un gène conférant la résistance au chloramphénicol, nous avons repiqué ces 9 clones sur un milieu LB solide contenant cet antibiotique et sur un milieu LB-Amp et LB-AMP-Chlo. Après incubation de ces bactéries à 37°C en aérobiose, les 9 clones ont confirmé à se multiplier ce qui indique qu'il s'agit bien de la souche FMJ et non d'un contaminant.

Un contrôle supplémentaire a été réalisé. Les 9 clones poussés sur le milieu LB-Amp-Chlo ont été repiqués sur un

milieu LB-Chlo et incubés à 37°C en conditions anaérobies. Après 4 jours d'incubation, aucune colonie n'est apparue. Par contre, dans les mêmes conditions, les bactéries contenant le gène de la LDH de lapin ont donné des petites colonies.

#### 3.4.4. Conclusion et discussions.

Les résultats non concluants de cette complémentation pourraient s'expliquer par divers arguments :

##### 3.4.4.1. Les conditions de sélection.

La sélection des clones, simultanément par l'ampicilline et par les conditions d'anaérobiose, pourrait s'avérer trop stringente et diminuer la viabilité du clone recherché.

Il serait intéressant de réaliser le criblage de la banque en deux temps. Les transformants qui se multiplient en conditions anaérobies sur un milieu riche LB pourraient être repiqués dans un second temps, sur un milieu LB-Amp en conditions aérobies.

##### 3.4.4.2. Le taux de glucose dans le milieu.

Le contenu en glucose dans le milieu LB pourrait être trop faible pour permettre une production suffisante de lactate, empêchant dès lors la complémentation de la mutation du gène LDH de la souche double mutante.

Cette hypothèse expliquerait ainsi le fait que les transformants contenant le gène de la LDH de lapin ont formé de petites colonies. Pour remédier à cet obstacle, les cellules de la souche FMJ 144 transformées par les plasmides recombinants de la banque pourraient être étalées sur un milieu synthétique dont la teneur en glucose serait élevée.

##### 3.4.4.3. L'expression insuffisante du gène de la D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii* dans *E. coli*

La faible expression du gène de LDH dans *E. coli* pourrait s'expliquer de différentes manières :

##### A. Compatibilité imparfaite entre les signaux d'expression.

Un rappel de ces différents signaux permet de mieux cerner le problème.

### - Les promoteurs bactériens

Chez les bactéries, la transcription de l'ADN est catalysée par l'ARN polymérase. Cette synthèse d'ARN provenant d'ADN bicaténaire, nécessite la fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN. La spécificité de cette fixation est assurée par l'interaction des sous-unités  $\sigma$  de l'ARN polymérase avec une séquence d'ADN, appelée promoteur. L'existence de différents types de promoteurs implique des spécificités différentes et donc des promoteurs de force variable (34)(35). L'étude comparative de promoteurs bactériens a permis de déterminer les composantes du signal, à savoir l'existence de deux boîtes hexanucléotidiques, l'une située autour de la position -10 par rapport au nucléotide +1 (premier nucléotide de transcription) appelée boîte "Pribnow" et l'autre située à la position -35. La séquence, la distance entre ces boîtes ainsi que la distance de celles-ci par rapport au nucléotide +1, influence la force du promoteur.

A l'encontre de cette hypothèse, selon laquelle le promoteur du gène de LDH serait faiblement reconnu chez *E. coli*, notons que les promoteurs présumés des gènes de LDH de certains bacilles (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis*) présentent très peu de divergences avec le promoteur végétatif d'*E. coli*. Cependant, nous n'avons aucune information concernant les promoteurs de *Lactobacillus delbrueckii* et dès lors nous ne pouvons présumer du taux d'expression chez *E. coli*.

Remarquons, qu'en fonction de son orientation par rapport au promoteur lac Z le gène de LDH de *Bacillus megaterium* présente un taux d'expression différent (60 mg de LDH par g de cellules fraîches lorsque le promoteur est orienté dans le sens de lac Z et 1 mg de LDH par g dans le cas d'une orientation opposée) (36).

### - Site d'initiation de la traduction : séquence de Shine-Dalgarno (SD)

La traduction nécessite la mise en phase par rapport au premier codon (AUG ou GUG) de la séquence codante. Cette mise en phase est réalisée par l'interaction entre la sous-unité 30 S du ribosome (ARNr 16 S de cette sous-unité) et l'ARNm. La comparaison de séquence d'ARNm bactériens a permis la mise en évidence de deux caractéristiques communes : le codon d'initiation se trouve à une distance de 8 à 13 bp d'une séquence complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARNr 16 S, appelée séquence SD ; cette séquence est riche en purines et sa longueur varie de 3 à 9 bp (34)(35). Une comparaison entre la séquence SD de *B. subtilis* (Gram



- a) 1. HO-AUUCCUCCA  
 2. HO-UCUUCCUCCACUAG
- b) Séquence Distance entre la Phase de lecture  
 Shine-Dalgarno SD et le 1<sup>er</sup> codon
- <--- 3 à 9 b ---><----- 8 à 13 bases ----->
- 5'--AGGAGG ----- AUG ou GUG ---- 3' ARNm

Fig. 3.22 : A. Région 3' terminale de ARNr 16S

1) d'*E. coli* (35).

2) de *B. subtilis* (39).

B. Caractéristiques générales des signaux de traduction déterminés par analyse comparative d'ARNm. Ex. : signal d'*E. coli* dont la SD est complémentaire à la séquence soulignée en A1.

+) et *E. coli* (Gram -) met en évidence une divergence entre ces deux séquences (Fig.3.22). En effet, la taille de la séquence SD de *Bacillus subtilis* est relativement plus grande et dès lors l'hybridation avec l'ARNr 16S sera plus exigeante. Cette observation tendrait plutôt à démontrer que les signaux de traduction (SD) des Gram+ sont fonctionnels chez *E. coli*.

Comme nous l'avons déjà signalé pour les signaux de transcription, les signaux de traduction intrinsèques de *Lactobacillus delbruckei* n'ont pas été déterminés fonctionnellement et peuvent par conséquent diverger des signaux connus chez les autres espèces dont les Gram +.

#### B. Une fréquence d'utilisation des codons différentes entre *Lactobacillus delbruckei* et *E. coli*.

Ce problème est classique lors de l'expression de gènes d'eucaryote chez une bactérie et inversement.

Dans la lignée de cette hypothèse, signalons que le taux en AT est plus élevé chez les lactobacilles que chez les autres bactéries.

Cependant, l'expression hétérologue des gènes de LDH chez *E. coli* a été observée pour diverses espèces de bacilles : *B. stearothermophilus*, *B. caldolicus*, *B. caldotenax* (37) et *B. psychrosaccharolyticus* (38) dont les gènes sont exprimés en une protéine active. De plus, Minowa a montré que l'expression du gène de LDH de *Bifidobacterium longum* est plus faible de 5 % dans *E. coli* par rapport à l'expression de celui-ci dans l'hôte d'origine. Mais aucune donnée ne permet d'affirmer que la quantité de LDH produite permettrait une complémentation de la mutation de ce gène dans la souche FMJ 144 en conditions anaérobies.

Si la complémentation du gène de LDH de *Lactobacillus delbruckei* s'avérait inefficace dans la souche hôte FMJ 144, deux alternatives pourraient être envisagées :

- criblage par une sonde oligonucléotidique synthétisée sur base du séquençage partiel de l'enzyme.
- criblage par hybridation avec une sonde hétérologue. Nous disposons en effet, du gène de la LDH de *Bacillus stearothermophilus*.

**CONCLUSION GENERALE**

-----

**ET PERSPECTIVES .**

-----

#### 4. CONCLUSION GENERALE.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une banque génomique de *Lactobacillus delbruckei*, étape préliminaire à tout clonage, en vue de cloner le gène de la D-LDH. Des fragments d'ADN de 5-10 kb, générés de façon aléatoire par restriction partielle avec l'enzyme *Sau3A*, ont été ligués à un plasmide YEP351 (vecteur navette coli-levure) linéarisé en BamHI et phosphatasé. Peu de travaux ont appliqué les techniques de l'ADN recombinant aux Lactobacilles, ce qui nous a amené à la mise au point en particulier aux étapes de lyse, de restriction et de ligation.

Sachant que les cultures de *L. delbruckei* peuvent évoluer en deux sens, soit sous forme monocellulaire, soit filamenteuse, nous avons choisi dans un premier temps de travailler sur la forme monocellulaire qui, a priori, semble la plus proche de celle des bactéries classiques utilisées en laboratoire.

Les résultats obtenus par deux méthodes de lyse (Scheirlinck, méthode spécifique des lactobacilles et une méthode dérivée de l'Institut Pasteur (communication personnelle) n'ont pas conduit à la ligation d'ADN génomique dans le vecteur Bluescript SK+. Différents contrôles réalisés (qualité de la ligase, ligabilité du plasmide SK+ phosphatasé et ligabilité de l'ADN génomique lui-même), nous ont amenés à l'hypothèse de l'existence d'un ADN génomique ne répondant pas aux critères de "ligabilité" pour des raisons inhérentes à sa structure.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons décidé d'utiliser la bactérie sous forme filamenteuse comme source d'ADN. De ce fait, les résultats obtenus ont mis en évidence une ligabilité supérieure de l'ADN préparé à partir de cette forme bien qu'étant encore trop faible pour permettre l'obtention d'une banque génomique.

Pour rendre compte de cette observation, nous avons émis l'hypothèse que les fragments d'ADN cloné porteraient des promoteurs forts. Ces promoteurs forts provoqueraient des interférences au niveau de la transcription des gènes portés par le plasmide (à savoir le gène de résistance à l'ampicilline ou les gènes impliqués dans la répllication) et donc sur sa stabilité. Dans cette hypothèse, nous avons décidé d'effectuer des tests de ligation de ces fragments d'ADN génomique avec différents plasmides suivis de transformation de ces mélanges de ligation dans différentes souches tant bactérienne que lévurienne. En effet, dans le cas

de promoteurs forts entraînant une instabilité du plasmide dans *E. coli*, il serait intéressant de tester leur stabilité de ce plasmide dans un microorganisme très différent et relativement aisé à manipuler, en l'occurrence *S. cerevisiae* (souche GRF18). Parmi les différents essais, la combinaison vecteur YEP351-*E. coli* souche XL1 blue a permis d'obtenir un nombre suffisant de plasmides recombinants pour réaliser la banque génomique. Nous pensons que les gènes lac Z et leu 2 assurent une protection contre les promoteurs forts. Cette protection permet au gène de résistance à l'ampicilline et aux gènes assurant la réplication, de s'exprimer normalement permettant ainsi la survie des transformants.

Disposant d'une banque, il est nécessaire dans un second temps, d'estimer la qualité de celle-ci. La banque sera représentative si le nombre de clones obtenus est au minimum de 3000 (nombre théorique calculé par la formule de Clark pour avoir 99% de chance qu'une séquence quelconque soit représentée dans la banque). Les 8000 clones recombinants obtenus ont confirmé la représentativité de la banque. De plus, par extraction de l'ADN plasmidique de 48 colonies recombinantes prélevées aléatoirement dans la banque nous ont permis de vérifier la présence d'insert dans les clones recombinants. Ces inserts sont bien de taille attendue (en moyenne 6.5 kb) et diffèrent bien d'un clone à l'autre démontrant ainsi l'indépendance des clones entre-eux.

Dans un troisième temps, une tentative de criblage du gène de la D-LDH de la banque génomique a été réalisée. La stratégie de criblage choisie consiste à compléter une souche d'*E. coli* (FMJ 144) mutante pour la LDH et la PFL avec l'ADN de la banque génomique. Du fait de ces 2 mutations, la souche ne pourra croître sur milieu glucose en anaérobiose qu'en présence d'un de ces deux gènes.

Une première tentative n'a pas encore permis d'obtenir le gène de la LDH. La validité de cette stratégie est cependant étayée par les contrôles négatifs (après transformation de la souche par le plasmide YEP 351 et croissance en anaérobiose aucun transformant n'est apparu) et positifs (après transformation de la souche par un plasmide porteur du gène de la LDH de lapin et croissance en anaérobiose de nombreux transformants sont apparus).

L'échec de cette première tentative pourrait s'expliquer par différentes raisons: conditions de sélection trop stringentes, taux de glucose trop faible dans le milieu, expression insuffisante du gène dans la souche de *E. coli*, voire l'absence du gène dans la banque. Toutes ces raisons, ainsi

que les moyens d'y remédier ont été développés dans la discussion précédente (p ). De nouvelles expériences de criblage , définies en fonction de ces différents paramètres, seront donc entreprises prochainement. Au cas où celles-ci s'avèreraient infructueuses les expériences de complémentation seraient abandonnées au profit de stratégies plus classiques reposant sur les techniques d'hybridation de sondes nucléotidiques

### PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, 3 catégories d'expériences peuvent être envisagées.

- Une première catégorie comprend toutes les expériences destinées à discriminer le LDH de la PFL et vérifier la présence d'un plasmide recombinant responsable du phénotype recherché dans le clone candidat.

\* La discrimination des 2 gènes peut se faire à partir de 3 types d'expériences:

- par dosage de l'activité LDH en mesurant le NADH à 340 nm et cela dans les 2 sens de la réaction si cette enzyme s'avère être réversible.

- par dosage du lactate formé lors de la fermentation du glucose en conditions d'anaérobie, et cela par les techniques d'HPLC.

- par une méthode de coloration spécifique de l'activité PFL basée sur l'utilisation du viologène de benzyl.

\* La présence d'un plasmide recombinant dans le clone peut être vérifiée par extraction de son ADN plasmidique et examen par électrophorèse en gel d'agarose. De plus la présence sur ce plasmide du gène de la LDH pourra être vérifiée par transformation "en retour" de la souche mutante FMJ 144 avec le plasmide candidat, et examen du phénotype des transformants en anaérobie.

- Une seconde catégorie d'expériences consistera à caractériser tant le gène de la LDH que la protéine elle-même.

\* La caractérisation biochimique fournira des informations plus complètes sur l'activité enzymatique de la LDH:  $k_m$ , réversibilité, allostérie éventuelle (régulation par le FDP).

\* La caractérisation génétique est basée sur le séquençage du gène qui permettra d'obtenir la séquence nucléotidique du gène et, par là, la séquence primaire de la protéine.

- Un troisième d'expérience s'intéressera enfin à l'étude des relations existant entre la structure tridimensionnelle des protéines et leur fonction grâce aux techniques de mutagenèse et à la modélisation, en collaboration avec laboratoire de Biologie quantitative.

**BIBLIOGRAPHIE.**

-----



## 5. BIBLIOGRAPHIE.

1. ALLINGER N., CAVA M., JONHSON C., LEBEL N., et STEVENS C. (1985) Structure des molécules. Chimie organique. Ed. Universitaire, Vol 1, pp. 47-57.
2. SICSIC S. (1987) Enzymes et Chimie fine. La Recherche. 188, 626-630.
3. OLIEMAN C. and DE VRIES E.S (1988) Determination of D- and L-lactic acid in fermented dairy products with HPLC. Neth. Milk Dairy J. 42, 111-120.
4. HOLBROOK L.J., LILJAS A., STEINDEL S.J., and ROSSMAN M.G. (1975) Lactate dehydrogenase in Boyer P.D. (Ed.) The Enzymes, Academic Press N.Y. Vol 11, p. 191-292.
5. GARVIE E. (1980) Bacterial lactate dehydrogenases Microbiological Reviews, 44, 106-139.
6. DENNIS D. and KAPLAN N.O. (1960) D- and L-lactic acid dehydrogenases in *Lactobacillus plantarum*. J. Biol. Chem. 235, 810-818.
7. KUNAI K., MACHIDA M. MATSUZAWA H. and OHTA T. (1986) Nucleotide sequence and characteristics of the gene for L-lactate dehydrogenase of *Thermus caldophilus* GK24 and the deduced amino-acid sequence of the enzyme. Eur. J. Biochem. 160, 433-440.
8. ONO M. MATSUZAWA H., and OHTA T. (1990) Nucleotide sequence and characteristics of the gene for L-lactate dehydrogenase of *Thermus aquaticus* YT-1 and the deduced amino-acid sequence of the enzyme. J. Biochem. 107, 21-26.
9. BARSTOW D.A., CLARKE A.R., CHIA W.N., WIGLEY D., SHARMAN A.F., HOLBROOK J.J., ATKINSON T., and MINTON N.P. (1986) Cloning, expression and complete nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase gene. Gene 46, 47-55.
10. ZULLI F., WEBER H., and ZUBER H. (1987) Nucleotide sequences of lactate dehydrogenase genes from the thermophilic bacteria *Bacillus stearothermophilus*, *B. cladohydroticus* and *B. caldotenax* Biol. Chem. Hoppe-Zeyler. 368, 1167-1177.
11. WALDVOGEL S., WEBER H., and ZUBER H. (1987) Nucleotide sequences of lactate dehydrogenase gene from the mesophilic bacterium *Bacillus*

- megaterium*. Preparation and properties of a hybrid lactate dehydrogenase comprising moieties of the *B. megaterium* and *B. stearothermophilus* enzymes. Biol. Chem. Hoppe-Zeyler. 368, 1391-1399.
12. MINOWA T., IWATA S., SAKAI H., MASAKI H., and OHTA T. (1989) Sequence and characteristics of the *Bifidobacterium longum* gene encoding L-lactate dehydrogenase and the primary structure of the enzyme: a new feature of the allosteric site. Gene 85, 161-168.
  13. HENSEL R., MAYR U., FUJIKI H., and KANDLER O. (1977) Comparative studies of lactate dehydrogenases in lactic acid bacteria. Amino-acid composition of an active-site region and chemical properties of the L-lactate dehydrogenase of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. Eur. J. Biochem. 80, 83-92.
  14. ABAD-ZAPATERO, GRIFFITH J.P., SUSSMAN J.L., and ROSSMAN M.G. (1987) Refined crystal structure of dogfish M<sub>4</sub> apo-lactate dehydrogenase. J. Mol. Biol. 198, 445-467.
  15. GRAU U.M., TROMMER W.E., and ROSSMAN M.G. (1981) Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with  $\beta$ -lac-NAD at 2.7 Å resolution. J. Mol. Biol. 151, 289-307.
  16. HENSEL R., MAYR U., and YANG C. (1983) The complete primary structure of allosteric L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. Eur. J. Biochem. 134, 503-511.
  17. WALDMAN A.D.B., HART K.W., CLARKE A.R., WIGLEY D.B., BARSTOW D.A., ATKINSON T., CHIA W.N., and HOLBROOK J.J. (1988) The use of a genetically engineered tryptophan to identify the movement of a domain of *B. stearothermophilus* lactate dehydrogenase with the process which limits the steady-state turnover of the enzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications, 180, 752-759.
  - 18a CLARKE A.R., ATKINSON T., and HOLBROOK J.J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. TIBS 14, 101-105.

- 18b. CLARKE A.R., ATKINSON T., and HOLBROOK J.J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II. TIBS 14, 145-146.
19. FEENEY R., CLARKE A.R., and HOLBROOK J.J. (1990) A single amino acid substitution in lactate dehydrogenase improves the catalytic efficiency with an alternative coenzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications, 166, 667-672.
20. CLARKE A.R., WIGLEY D.B., CHIA W.N., BARSTOW D.A., ATKINSON T., and HOLBROOK J.J. (1986) Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. Nature 324, 699-702
21. CLARKE A.R., WILKS H.M., BARSTOW D.A., ATKINSON T., CHIA W.N., and HOLBROOK J.J. (1988) An investigation of the contribution made by the carboxylate group of an active site histidine-aspartate couple to binding and catalysis in lactate dehydrogenase. Biochemistry, 27, 1617-1622.
22. HART K.W., CLARKE A.R., WIGLEY D.B., CHIA W.N., BARSTOW D.A., ATKINSON T., and HOLBROOK J.J. (1987) The importance of arginine 171 in substrate binding by *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 146, 346-353.
23. WIGLEY D.B., CLARKE A.R., DUNN C.R., BARSTOW D.A., ATKINSON T., CHIA W.N., MUIRHEAD H., and HOLBROOK J.J. (1987) The engineering of a more thermally stable lactate dehydrogenase by reduction of the area of a water-accessible hydrophobic surface. Biochimica et Biophysica Acta. 916, 145-148.
24. CLARKE A.R., WALDMAN A.D.B., HART K.W., and HOLBROOK J.J. (1985) The rates of defined changes in protein structure during the catalytic cycle of lactate dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta. 829, 397-407.
25. CLARKE A.R., EVINGTON J.R.N., DUNN C.R., ATKINSON T., and HOLBROOK J.J. (1986) The molecular pathway by which fructose 1,6-biphosphate induces the assembly of a bacterial lactate dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta. 870, 112-126.

26. LARPENT J.P. (1987) Microorganismes intervenant dans la fabrication et la maturation des fromages. Leur rôle sur les propriétés organoleptiques. Actualités des Industries Alimentaires et Agro-Industrielles, 535-546.
27. BOTTAZZI V. (1988) An introduction to rod-shaped lactic acid bacteria. Biochimie, 70, 303-315.
28. DE ROISSART H. (1986) Les bactéries lactiques dans Luquet F. (Ed.) Laites et Produits laitiers, Lavoisier Scientifique, tome III, pp. 343-414.
29. MAT-JAN F., ALAM K.Y., and CLARK D.P. (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. Journal of Bacteriology, 171, 342-348.
30. CHIPPAUX M., CASSE, and PASCAL M.C. (1972) Isolation and phenotypes of mutants from *Salmonella typhimurium* defective in formate hydrogenlyase activity. Journal of Bacteriology 110, 766-768.
31. SCHEIRLINCK T., MAIHILLON J., JOOS H., DHAESE P., MICHIELS F. (1989), Integration and expression of  $\alpha$ -amylase and endoglucanase genes in the lactobacillus plantarum chromosome. Appl. Environ. Microbio., 55, 2130-2136.
32. STRYER L. (1985), La biochimie de Flammarion Medecine-science.
33. CHEN J.D. and MORRISSON D. (1987), Cloning of Streptococcus pneumoniae DNA fragments in E. coli requires vectors protected by strong transcriptional terminators. Gene, 55, 179-187.
34. DARNELL J., LODISH H. and BALTIMORE D. (1986), Molecular cell biology. Scientific American Book inc., New York.
35. LEWIN B. (1987) GENES III. John Wiley & Sons, New York.
36. WALDVOGEL S., WEBER H. and ZUBER H. (1987), Nucleotide sequence of lactate dehydrogenase genes from the mesophilic bacterium B. megaterium. Preparation and properties of a hybrid lactate dehydrogenase comprising moieties of the B. megaterium
37. ZÜLLI F., WEBER H. and ZUBER H. (1987), Nucleotide sequence of lactate dehydrogenase genes from the thermophilic bacterium

*Bacillus stearothermophilus*, *B. caldolyticus* and *B. caldotenax*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 368, 1167-1177.

38. VCKOVSKI V., SCHLATTER D. and ZUBER H. (1990), Identification, isolation and nucleotide sequence of two L-lactate dehydrogenase genes of the Psychrophilic bacterium *Bacillus psychrosaccharolyticus*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 371, 103-110.