

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Les supresseurs de la mutation ksgA

BELOT, Nathalie

Award date:
1994

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.

301194



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

Les supresseurs de la mutation ksgA

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

Nathalie Belot
1994-1995

Les supresseurs de la mutation *ksgA*

BELOT Nathalie

Résumé

La biogénèse du ribosome implique des méthylations de l'ARNr. Une seule de ces modifications est universellement conservée chez les procaryotes et chez les eucaryotes: la diméthylation $m^6_2Am^6_2A$ de l'extrémité 3' du petit ARNr, chez *E.coli* aux positions 1518 et 1519.

Chez *E.coli*, l'existence d'un mutant *ksgA*- dépourvu des diméthyles des deux adénines de l'ARNr 16S, et résistant à la kasugamycine, a permis l'isolement du gène *ksgA* responsable de la diméthylation et la mise en évidence d'un rôle- non essentiel- de celle-ci dans le processus dit de "Shine-Dalgarno" à l'initiation de la traduction.

chez *S.cerevisiae*, le gène *DIMI* a été cloné par transformation d'une banque génomique *URA3* de levure, dans une souche *ksgA-pyrF-*, et recherche d'un phénotype de restauration de sensibilité. Son essentialité a récemment été démontrée au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994)

Parmi 10 000 transformants, trois clones sensibles à la kasugamycine ont été isolés.

L'un d'entre s'est révélé contenir un plasmide (pGIDL31.42) codant pour la diméthylase attendue.

En effet, l'ARNr 16S du clone contenant ce plasmide, s'est révélé, après analyse en HPLC, posséder les diméthyles des deux adénines 1518 et 1519.

Les deux autres clones (contenant les plasmides pGIDL103 et pGIDL179) ne possédaient pas ces diméthylations.

La question se posait alors, de savoir si un mécanisme alternatif pouvait expliquer la restauration de sensibilité à l'antibiotique, sans restaurer la diméthylation des adénines de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S.

Pour comprendre ce mécanisme, des tests phénotypiques complémentaires ainsi que le séquençage partiel des deux plasmides ont été réalisés.

Les tests phénotypiques ont indiqué que les deux plasmides portent des gènes différents. En effet, les phénotypes observés pour la souche mutante transformée par chacun d'eux, en présence de kasugamycine à diverse concentrations étaient différents.

La comparaison de la séquence partielle du plasmide pGIDL103, avec les séquences contenues dans la banque de données de l'EMBL, a révélé son homologie avec des séquences codantes de méthylène tétrahydrofolate réductases.

Les pourcentages de similarité sont de +/- 50%, les pourcentages d'identité sont de 30%.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : J. Vandenhaute

Co-promoteur : J.-Delcour

Remerciements

Je remercie le professeur Vandenhoute de m'avoir accueillie dans son laboratoire et suivie tout au cours de l'année.

Je remercie les membres du jury, J-P. Cassart, X.Debolle, M.Jadot, M. Raes d'avoir lu mon mémoire.

Je remercie Jean-Pol pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie Xavier de m'avoir aidée et conseillée.

Je remercie Rose-Marie, Thierry, Monique, Jean-Marc, Mme Libion, Dominique , Matthieu et Françoise ainsi que Denis.

Je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle qui m'a suivie tout au long de mon mémoire, pour sa patience, sa générosité, et sa gentillesse.

Je voudrais également remercier mon père pour son aide, ma mère, ma soeur Michèle, et Jean-Marc pour leur soutien moral.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I.....Les principes de l'approche génétique d'une question biologique	2
I.1.....Introduction	2
I.2.....La suppression	3
II..... Complémentation et suppression appliquée à une situation hétérologue	6
II.1..... Le ribosome et sa structure	6
II.2..... Le gène ksgA d' E.coli	6
II.3..... Le mutant ksgA- d' E.coli	7
II.4.....Le clonage du gène DIM1, par complémentation hétérologue.	8
 RESULTATS	 11
I..... Caractérisation des deux clones supresseurs de la mutation ksgA-	11
I.1..... Historique des deux clones :	11
I.2.....Confirmation du phénotype de sensibilité de la souche mutante DL101 d'E.coli, transformée par les plasmides pGIDL103 et 179.....	12
I.3..... Cartes de restriction des deux plasmides.	13
I.4..... Tests phénotypiques supplémentaires	14
I.4.1.....Introduction	14
I.4.2Tests phénotypiques sur milieux augmentant la perméabilité cellulaire.....	15
I.4.2.1.....Introduction	15
I.4.2.2.....Résultats.	16
I.4.2.2.1.... Tests sur des milieux contenant du CaCl ₂	16
I.4.2.2.2. Tests sur des milieux contenant de l' EDTA	17
I.4.2.3..... Conclusion.	17
I.4.3Test phénotypiques sur milieux contenant de la kasugamycine à différentes concentrations.....	17
I.4.3.1.....Introduction.	17
I.4.3.1.1..... Résultats.	18
I.4.3.2..... Conclusion	18
I.4.4Tests sur des milieux contenant de l'érythromycine à différentes concentrations.....	19
I.4.4.1.....Introduction	19
I.4.4.2.....Résultats	19
I.4.4.3..... Conclusion	20
I.4.5..... Conclusions générales	20
II..... Localisation des gènes dans les deux inserts par sous-clonage.	20
II.1.....Clone pGIDL103	20
II.1.1.....Sous-clonage pour délimiter le gène	20
II.1.1.1..... Sous-clone pGINB600	21
II.1.1.2..... Sous-clones pGINB601 et 602	21
II.1.1.2.1..... Tests Phénotypiques	22
II.2.....Clone pGIDL179	23

II.2.1	Constructions	23
II.2.1.1	Sous-clone pGINB 700	23
II.2.1.2	Sous-clone pGINB701	23
II.2.1.2.1.....	Tests phénotypiques	24
III.	Séquençage	25
III.1.....	Transferts des inserts dans des matrices différentes en vue du séquençage.....	25
III.1.1.....	Le pGIDL103	25
III.1.1.1.....	Sous-clone pGINB603	25
III.1.1.2.....	Sous-clone pGINB605	25
III.1.1.3.....	Sous-clone pGINB607	26
III.1.1.4.....	Sous-clone pGINB608	26
III.1.2.....	Le pGIDL179	27
III.1.2.1.....	Sous-clone pGINB703	27
III.2.....	Analyse des résultats de séquence	28
III.2.1.....	Le pGIDL179	28
III.2.2.....	Le pGIDL103	28
III.2.2.1.....	Séquençage autour du site KpnI	28
III.2.2.2.....	Séquençage autour du site XhoI	28
I.....	Qu'est-ce que la méthylène tétrahydrofolate réductase?(MTR)	32
II.....	Comment expliquer la restauration du phénotype de sensibilité?	32
RESUME, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES		33
MATERIEL ET METHODES		36
I.....	Tampons et solutions.	36
I.1	Tampons.	36
I.2	Solutions.	39
II.....	Souches et plasmides	41
II.1.....	Souches bactériennes utilisées	41
II.1.1	La souche DL101 est KsgA- et PyrF-	41
II.1.2	La souche JM101 est une souche sauvage d'E.coli	41
II.1.3	Souche Xl1 Blue d'E.coli	41
II.2.....	Plasmides.	42
III.....	Milieux de culture.	43
III.1.1.....	Milieux riches.	43
III.1.2.....	Milieux minimum.	43
IV.....	Techniques relatives à l'ADN.	45
IV.1.....	Constructions génétiques.	45
IV.1.1	Principe général.	45
IV.1.2	Restrictions.	45
IV.1.2.1	En pratique:	46
IV.1.3	La ligation.	46
IV.2.....	Electrophorèse analytique sur gel d'agarose.	47
IV.2.1	Critères de séparation des fragments d'ADN.	47
IV.2.2	Visualisation de l'ADN sur le gel.	47
IV.2.3	Estimation de la taille des fragments.	47
IV.2.4	Estimation de la quantité des fragments.	48
IV.2.5	Mise en oeuvre.	48

IV.3...Electrophorèse préparatrices et purification de fragments d'ADN	48
IV.3.1	Récupération sur papier 48
IV.3.1.1	Préparation des filtres Whatman DE81: 48
IV.3.1.2	Récupération de la bande 49
IV.3.1.3	Récupération du DNA 49
IV.4.....	Transformation. 49
IV.4.1	Electroporation 49
IV.4.1.1	Caractéristiques du choc électrique 50
IV.4.1.2	Protocole: 50
IV.4.2	Choc thermique 51
IV.4.2.1	Préparation de cellules compétentes au CaCl ₂ . 51
IV.4.2.2	Transformation 52
IV.4.2.3	Contrôles de transformation. 52
IV.4.3	Méthodes de sélection des transformants et des recombinants. 52
IV.5.....	Préparation de vecteur d'ADN. 53
IV.5.1	Minipréparation d'ADN plasmidique 53
IV.5.1.1	Culture 53
IV.5.1.2	Récupération et lyse des cellules 53
IV.5.1.3	Récupération des plasmides 53
IV.5.2	Midipréparation d'ADN plasmidique (Nucleobond AX100). 54
IV.5.2.1	Culture 54
IV.5.2.2	Récupération et lyse des cellules 54
IV.5.2.3	Mise sur colonne 54
IV.6.....	Purification et préparation de l'ADN 54
IV.6.1	Extraction au phénol-chloroforme 54
IV.7.....	Le Séquençage. 56
IV.7.1	Principe du séquençage. 56
IV.7.2	Réactions de séquençage. 56
IV.7.2.1	Dénaturation 56
IV.7.2.2	Annealing (Hybridation) 57
IV.7.2.3	Labelling (marquage radioactif) 57
IV.7.2.4	Préparation du gel 57
IV.7.2.5	Fabrication du gel de sequençage 57
IV.7.2.6	Mise sur gel 58
IV.7.2.7	Après la migration 58

BIBLIOGRAPHIE.....

Abreviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN de transfert
Br.Eth.	Bromure d'éthidium
DO	Densité optique
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	Gramme
Kb	Kilobase
l	Litre
LSU	Grande sous-unité
mg	Milligramme
ml	Millilitre
µl	Microlitre
mM	Milli-molaire
M	Molaire
nm	Nanomolaire
pb	paire de bases
PM	Poids moléculaire
SAM	S-adenosyl-méthionine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SSU	Petite sous-unité
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
V	Volt
UV	Ultra-violet

Introduction

Introduction

I. Les principes de l'approche génétique d'une question biologique

I.1 Introduction

Le clonage et la caractérisation structurelle et fonctionnelle des gènes sont des étapes importantes et inévitables dans la compréhension du vivant.

Pour cela, deux voies se présentent:

- Soit on dispose d'un mutant pour une fonction quelconque; la transformation de celui-ci suivie d'une restauration du phénotype sauvage permet d'isoler l'ADN responsable qui demande à être étudié.
- Soit on dispose d'ADN dont la fonction est inconnue, en créant alors un mutant pour ce gène, on pourra découvrir sa fonction.

Dans le premier cas, on passe du phénotype au génotype, alors que l'inverse est vrai dans le second cas.

Une situation intermédiaire à ces deux cas peut se présenter.

En effet, lorsqu'on cherche à cloner de l'ADN par restauration d'un phénotype sauvage, chez un mutant (complémentation) (fig.4.1), on peut se trouver confronté à un exemple de **suppression**.

L'allèle sauvage du gène muté peut bien entendu compléter la mutation (récessive), mais d'autres gènes peuvent restaurer un phénotype sauvage, par ce qu'on appelle une suppression de la mutation.

Il ne s'agit pas ici d'interactions alléliques, comme celles en jeu dans la complémentation, mais d'interactions **géniques**.

Le supprimeur apporte donc une fonction qui n'est pas sa fonction cellulaire propre.

Soit le supprimeur est un allèle muté, soit son taux d'expression cellulaire est anormalement élevé, par un effet du nombre de copies du gène normal (dosage génique).

Dans la suppression directe, le produit du gène muté A est restauré dans sa structure et sa fonction est (quasi) normale. On parle de suppression indirecte si le résultat est obtenu grâce à un effet induit par la protéine B, soit sur la protéine A mutée, qu'elle pourrait "réhabiliter" par une interaction moléculaire; soit sur une voie biochimique rétablissant la fonction perdue.

(c) frameshift suppression

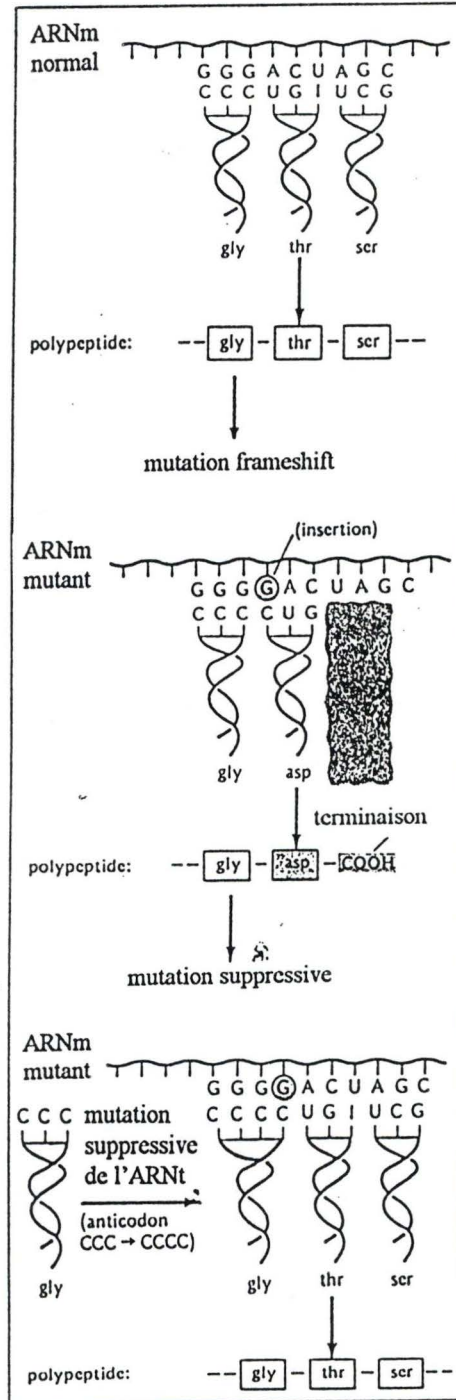


Figure 1: suppression d'une mutation "frameshift"

L'ARNt porteur d'un anticodon (CCCC) peut s'apparier avec l'ARNm mutant. Cette suppression permet la correction de la phase de lecture, dans le cas d'une mutation "frameshift" +1 (insertion d'un nucléotide)

1.2 La suppression

1. Les exemples de suppression les plus connues sont les suppressions directes extragéniques: (Lewin, 1990)

Une mutation "**frameshift**" est une mutation due à une insertion ou à une délétion d'un nucléotide, induisant un changement de phase de lecture et empêchant la production d'une protéine normale. Les supprimeurs de cette mutation ("**frameshift**" +1) sont des ARN de transfert (ARNt) avec un anticodon de quatre nucléotides au lieu de trois, anticomplémentaire de la mutation qui permettent ainsi la restauration de la bonne phase (fig.1).

Une mutation "**nonsense**", est une mutation induisant l'apparition d'un stop (mutation ambre) et provoquant la synthèse d'une protéine tronquée (fig.2).

Cette mutation peut être supprimée par un ARNt porteur d'un anticodon complémentaire de la mutation, et permettant l'insertion d'un acide aminé dans la protéine.

Une mutation "**misense**", est une mutation qui provoque l'échange d'un acide aminé dans la protéine, (ces mutations ne sont évidemment remarquées que lorsque la fonction de la protéine est perturbée). Celle-ci peut être supprimée par un ARNt porteur d'un anticodon complémentaire de la mutation, mais réincorporant le bon acide aminé, ou un acide aminé similaire (fig.3) .

Toutes ces suppressions sont dites directes, parce que la protéine, du moins sa fonction est restaurée .

2. D'autres types de suppressions, très différentes des premières sont les suppressions indirectes, dans ce cas, la protéine A reste altérée et B "compense" pour son altération fonctionnelle (Guarente, 1993).

Dans l'hypothèse où les produits des gènes A et B **interagissent**, si le gène B est lui-même muté, les deux mutations peuvent être **compensatoires**; la mutation de B compense celle de A, les deux protéines peuvent à nouveau interagir.

L'activité normale du complexe protéique formé par les deux protéines mutées A et B est restaurée.(fig.4.2)

La suppression peut aussi résulter d'une modification du niveau d'expression du gène B (normal).

La modification de son taux cellulaire peut changer un complexe protéique dans lequel intervient la protéine défectueuse A, et restaurer de ce fait, totalement ou en partie la fonction de celle-ci (**effet de dosage génique**).

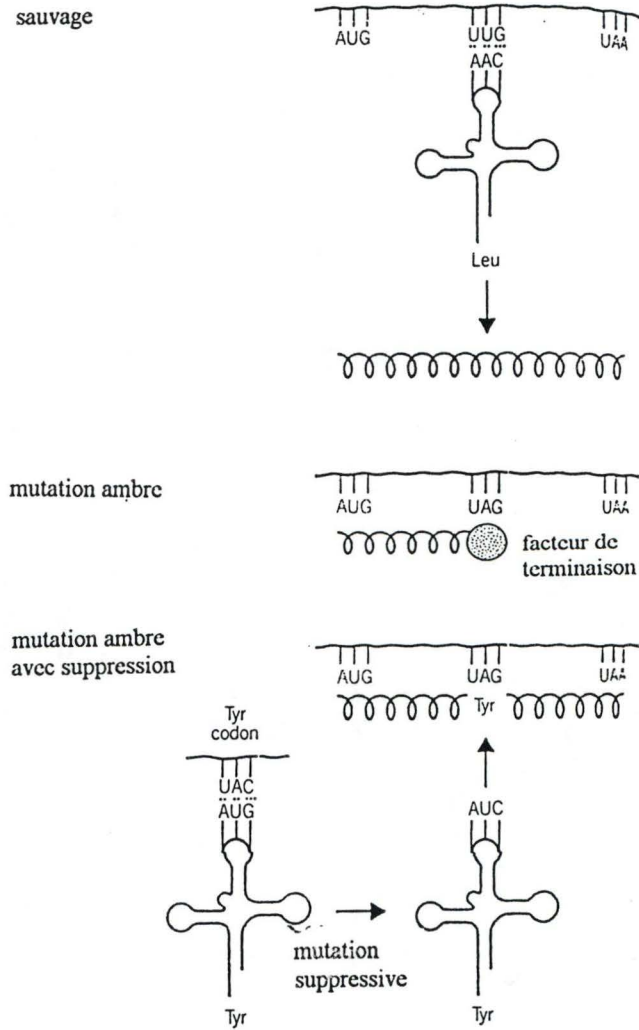


Figure 8.11. Nonsense mutations can be suppressed by a tRNA with a mutant anticodon.

Figure 2: Suppression d'une mutation "nonsense"

La mutation de l'anticodon de l'ARNt lui permet de s'apparier avec la mutation ambre, et supprime l'effet de la mutation "nonsense".

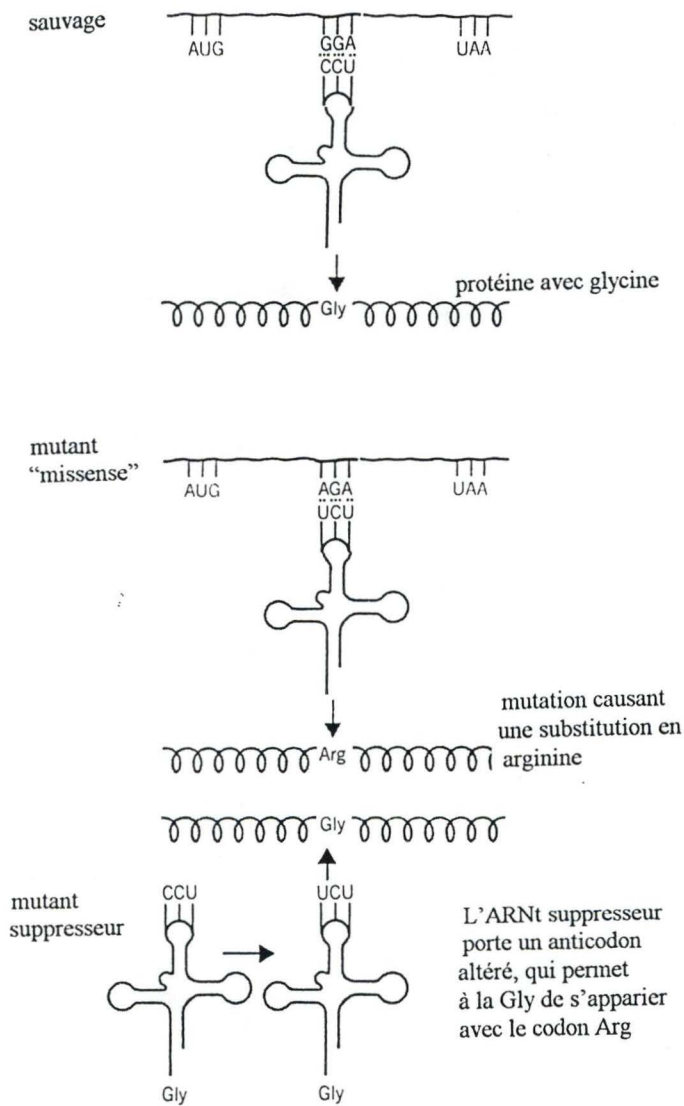


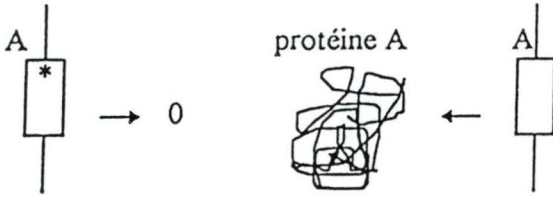
Figure 8.12
Missense suppression occurs when the anticodon of tRNA is mutated so that it responds to the "wrong" codon.

Figure 3: Suppression d'une mutation "missense"

L'anticodon de l'ARNt muté lui permet de s'apparier avec le "mauvais" codon.

Figure 4: Complémentation et suppression

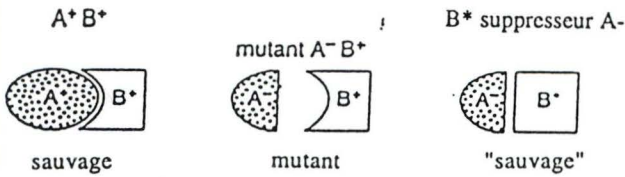
1) Complémentation



Soit une cellule dont le gène A est muté (*).
L'introduction d'un gène A normal, permet la complémentation; la protéine A normale est synthétisée.

Suppressions

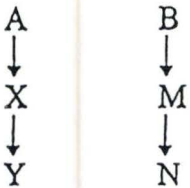
2) Mutations compensatoires:



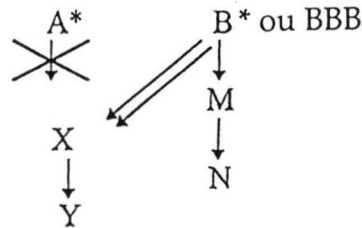
La mutation de la protéine A empêche l'interaction des protéines A et B. La mutation de B compense exactement celle de A, et restaure l'interaction des deux protéines

3) A et B interviennent dans des voies métaboliques différentes mais semblables

Situation normale:



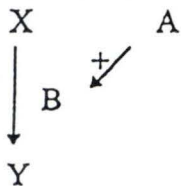
Situation où A est muté :



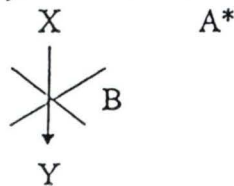
B, protéine jouant un rôle semblable à celui de A, peut compenser sa mutation.

4) A est un activateur de B

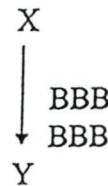
1) situation normale:



2) situation mutée:



3) Suppression:



A est mutée, la protéine B n'est plus activée. Sa surexpression la rend indépendante de A.

Dans le cas où A et B **n'interagissent pas** structurellement, mais seulement sur le plan du phénotype résultant, plusieurs cas peuvent être imaginés: Une **surexpression** du gène B peut lui conférer un **rôle différent** ou similaire à sa fonction première. A titre d'exemple, si les deux gènes A et B encodent des déshydrogénases intervenant dans des voies métaboliques différentes, une surexpression ou une mutation de B **altérerait sa spécificité**, et pourrait faire que la fonction modifiée de B se substitue au déficit de A et supprime l'effet de la mutation (fig.4.3).

Un autre exemple de suppression peut se présenter dans une voie métabolique où le produit du gène A est un **activateur** de la protéine B. La mutation de A empêche l'activation de B. Si celui-ci est muté, ou surexprimé, il peut devenir **indépendant** de l'action de A, et agir malgré la mutation de l'activateur (fig.4.4).

Dans la pratique courante du clonage par complémentation, la restauration phénotypique d'un caractère sauvage, par transformation d'une banque "multicopy" sauvage dans un haploïde de levure, par exemple porteur d'une mutation (récessive), permet d'isoler non seulement l'allèle sauvage (complémentation), mais aussi des clones **suppresseurs**.

La suppression dite par "dosage génique" d'une mutation identifie des gènes non allèles.

L'étude du gène B, obtenu via la suppression de l'effet de la mutation de A, s'avère très intéressante. Tout d'abord du point de vue de l'interaction entre les deux gènes, ou les deux produits issus de ceux-ci. Il peut s'agir de gènes apparentés dont les fonctions sont partiellement supplétives, ou de gènes appartenant à un réseau de gènes en interaction. Alternativement, les produits protéiques de ces gènes peuvent être en interaction physique. Ensuite, parce que même si l'effet suppresseur obtenu n'est vraisemblablement pas relevant de la fonction normale exercée *in vivo*, par B, cette fonction propre du gène ainsi que sa structure peut être découverte.

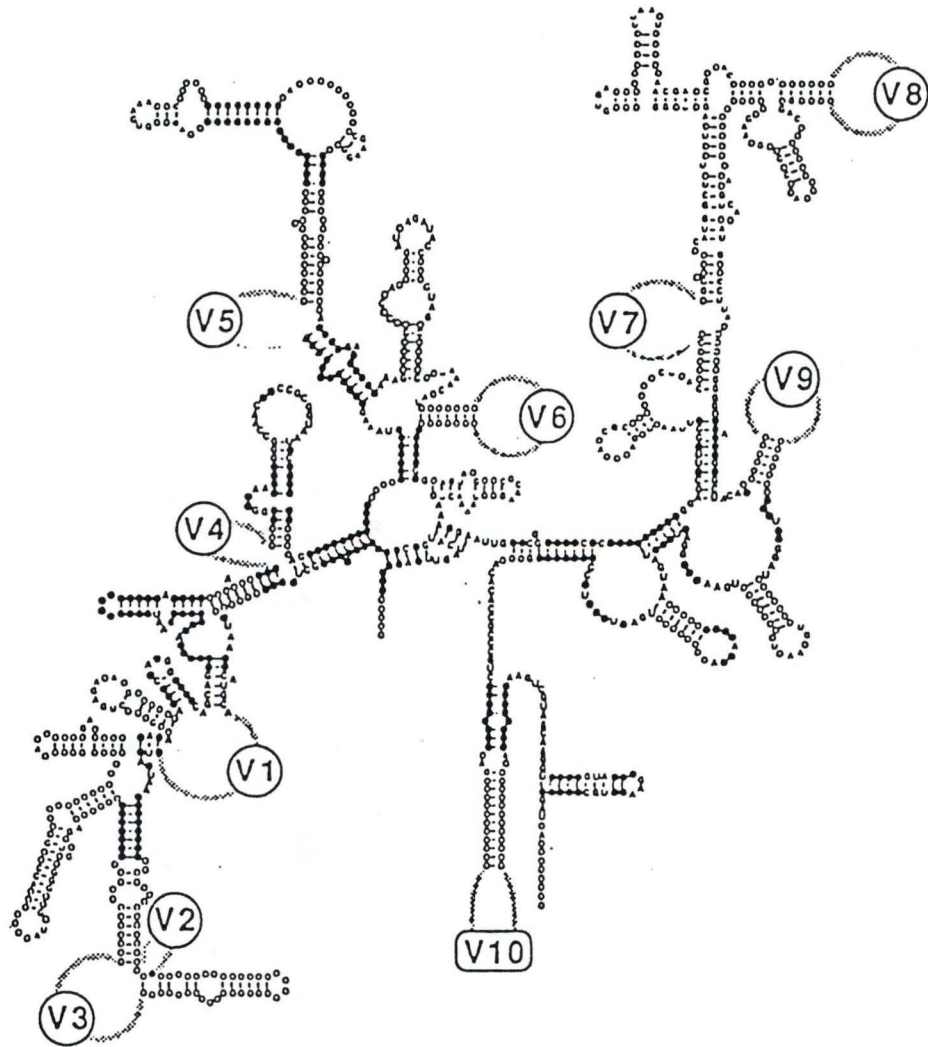


Figure 5: Structure secondaire de l'ARNr de la petite sous-unité du ribosome

- Le core minimal, correspondant aux régions conservées de l'ARNr , de toutes les classes ribosomiques, est représenté par des cercles noirs.
- les cercles blancs représentent les régions conservées de toutes les classes ribosomiques, excepté les mitoribosomes.
- Les nucléotides hautement conservés sont indiqués par leur initiale.
- Les 10 régions variables sont représentées schématiquement par un V numéroté de 1 à 10.

II. Complémentation et suppression appliquée à une situation hétérologue

II.1 Le ribosome et sa structure

Le ribosome est une particule multienzymatique intervenant dans la traduction.

Il est composé de deux sous-unités contenant chacune des protéines(ribosomales) et de l'ARN (ribosomique).

En s'intéressant à la petite sous-unité du ribosome, on remarque que la structure secondaire de l'ARNr est relativement bien conservée (fig.5) (Raué *et al.*, 1989).

L'ARN ribosomique est soumis à des modifications post-transcriptionnelles, et principalement des méthylations. Une seule de ces modification est universellement conservée: la diméthylation en position N⁶ des deux adénines contigües, au sommet de l' "hairpin" à l'extrémité 3' de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique.

L'universalité de cette diméthylation suggère qu'elle joue un rôle fonctionnel important.

Le gène *ksgA* d'*E.coli*, responsable de cette diméthylation a été cloné.

II.2 Le gène *ksgA* d' *E.coli*

Ce gène encode l'enzyme responsable de la diméthylation des deux adénines en position 1518 et 1519 de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (fig.6).

La protéine est monomérique et utilise le S-adénosylméthionine comme donneur de méthyle. Elle ne peut exercer son activité que sur la sous-unité 30S, et pas sur de l'ARNr seul; ceci indiquant une intervention probable des protéines ribosomiales dans l'activité de l'enzyme elle-même, ou dans la liaison de l'enzyme (Poldermans *et al.* , 1979c).

Elle se lie fortement à la particule 30S et empêche l'association des deux sous-unités du ribosome.

Une fois que la S-adénosylméthionine est ajoutée, les deux adénines sont diméthylées et l'affinité de la diméthylase pour la sous-unité 30S méthylée diminue; la sous-unité 50S peut alors venir se fixer.

Les deux adénines diméthylées, situées à l'interface des deux sous-unités, provoquent l'apparition d'une poche hydrophobe sur la sous-unité 30S où d'importantes interactions ont lieu, notamment la liaison du facteur IF3.

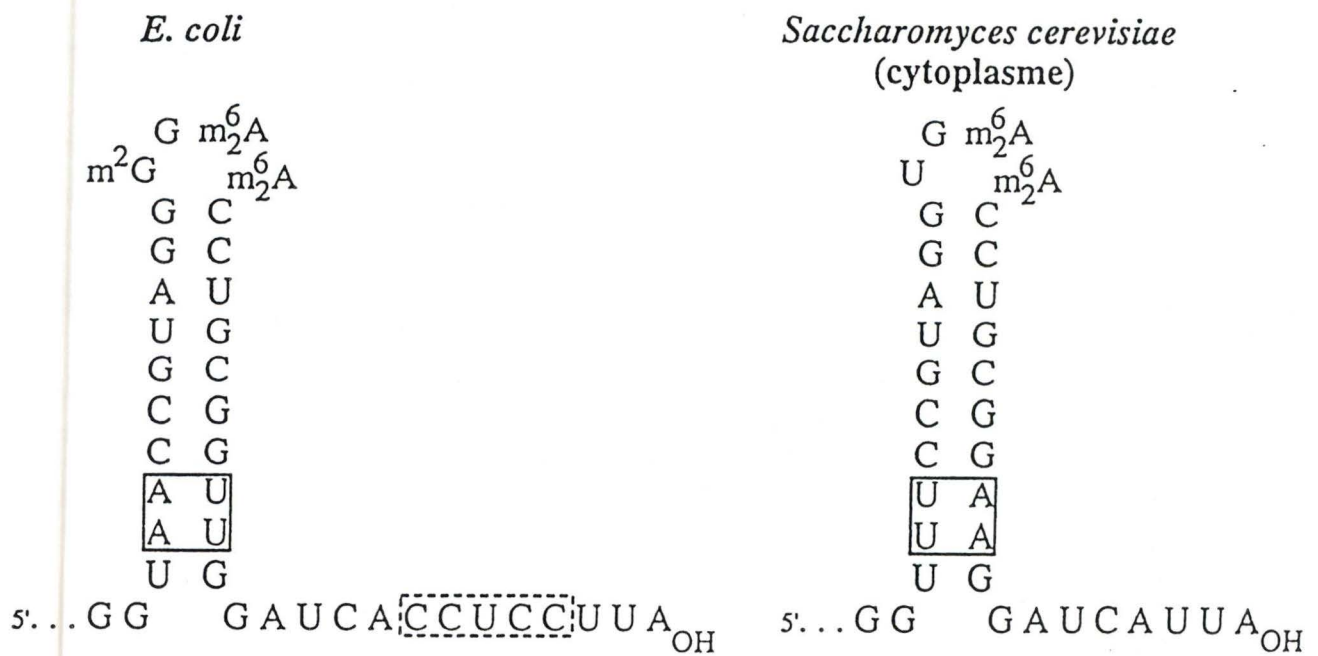


Figure 6: L' "hairpin" à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S.

La méthylation des deux adénines 1518 et 1519 (numérotation propre à *E. coli*) est universellement conservée.

La séquence anti-complémentaire " Shine -Dalgarno" est uniquement présente chez *E. coli* (représentée en encadré pointillé).

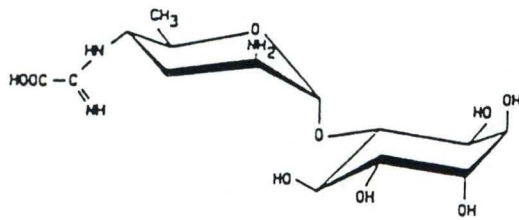


Figure 7: Structure de la kasugamycine: (Van Gemen, 1989)

La kasugamycine est un antibiotique qui appartient au groupe des aminoglycosides.

Il a été isolé de *Streptomyces kasugaensis*.

Son effet, bactériostatique (Helser et Davies, 1972) ne s'exerce qu'à des concentrations relativement élevées. (>50µg/ml)

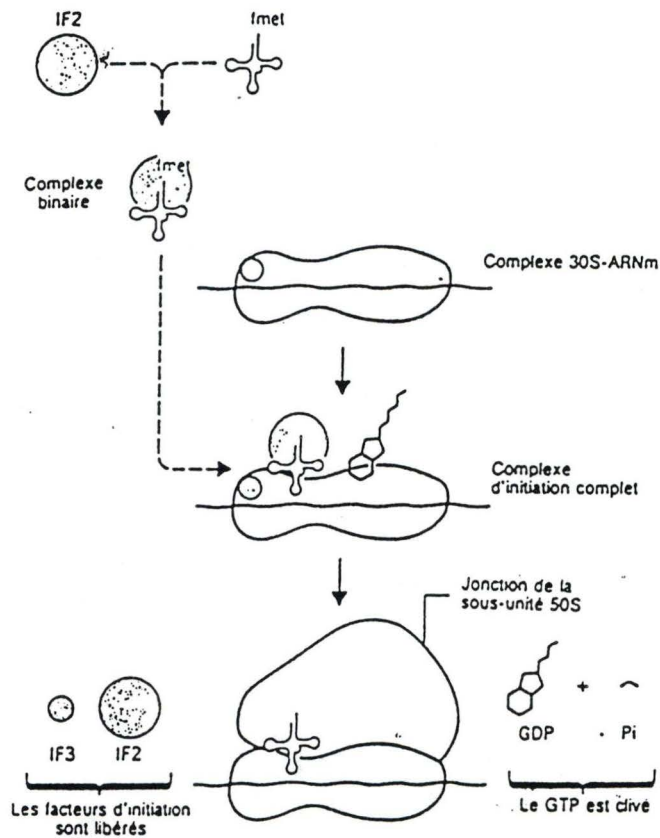


figure 8: Initiation de la traduction chez les procaryotes.

La sous-unité 30S est associée à l'ARN messenger, ainsi qu'au facteur IF3.

L'association entre l'ARN ribosomique et l'ARNm maintient la sous-unité 30S dans une position conduisant au positionnement direct du codon d'initiation dans le site P.

Le complexe binaire formé par l'ARNt initiateur et par le facteur IF2 vient se lier à leur tour sur la sous-unité 30S. Le complexe d'initiation est complet; du GTP est hydrolysé, les deux facteurs d'initiation sont libérés.

La grande sous-unité rejoint ce complexe et la traduction continue.

II.3 Le mutant *ksgA*- d' *E.coli*

La souche bactérienne *ksgA*- est mutée dans le gène codant pour la diméthase des deux adénines en position 1518 et 1519 situées à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S.

Cette mutation lui confère un phénotype de résistance à un antibiotique: la **kasugamycine**. (fig.7)

Cet antibiotique, isolé de *Streptomyces kasugaensis*, fait partie de la famille des macrolides.

Pour comprendre ses effets sur *E.coli*, il faut s'intéresser à l'initiation de la traduction chez les procaryotes.(fig.8)

La kasugamycine inhibe la liaison du fMet-ARNt (initiateur de la traduction) sur la sous-unité 30S du ribosome, cela, chez les deux types de ribosome (mutant et sauvage).

Lorsque les ribosomes sont complets, une différence apparaît entre le mutant et le sauvage: la kasugamycine n'a pas d'effet sur le mutant, par contre elle inhibe l'initiation de la traduction du sauvage (Poldermans *et al.*, 1979).

L'antibiotique induit également la libération du codon initiateur (le fMet-ARNt), s'il se trouve déjà sur la sous-unité 30S du ribosome, cela uniquement pour les ribosomes sauvages.

A part le phénotype de résistance à la kasugamycine, d'autres effets ont pu être attribués à l'absence de la double diméthylation:

- Le ribosome mutant a besoin de plus de facteurs d'initiation IF3 en l'absence du facteur IF1.
- L'affinité des sous-unités 30S mutantes pour la sous-unité 50S est moins grande que chez le sauvage.(Poldermans *et al*, 1979)

Lorsque le mutant *ksgA*- est transformé par la copie normale d'un gène *ksgA*, la restauration du phénotype de sensibilité est observée.

L'érythromycine est un antibiotique se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome, son site d'action est une adénine de l'ARNr 23S (position 2058).

Cette adénine, lorsqu'elle est méthylée, confère une résistance à l'érythromycine, comme chez la bactérie *Streptococcus pyogenes* qui possède le gène codant pour l' *Erm* méthylase.

La bactérie *E.coli*, ne possède pas cette enzyme, ne présente pas de méthylation de l'ARNr 23S, et est sensible à l'érythromycine, comme le mutant *ksgA*-.

Si le gène *ermR* est introduit chez le mutant *ksgA*-, une résistance à l'érythromycine apparaît, ainsi qu'une diminution de résistance à la kasugamycine; diminution due à la méthylation de l'adénine de l'ARNr de la grande sous-unité (Suvorov *et al.*, 1988).

L'hypothèse tirée de ces résultats serait que les sites d'action des deux antibiotiques sont probablement physiquement proches, une méthylation

de l'ARNr 23S restaurerait partiellement le site d'action de la kasugamycine, ou provoquerait une transconformation du ribosome rendant le site d'action de la kasugamycine accessible, et expliquerait la diminution de résistance.

II.4 Le clonage du gène DIM1, par complémentation hétérologue.

Le clonage d'un gène de levure peut se faire, soit par criblage d'une banque génomique avec une sonde homologue au gène, synthétisée à partir de la séquence de la protéine elle-même, ou à partir du gène homologue d'une autre espèce; soit par complémentation d'une fonction pour laquelle on dispose d'un mutant bactérien.

Le gène *DIM1* de *Saccharomyces cerevisiae* a été obtenu récemment au laboratoire, par transformation d'une banque génomique de levure dans le mutant *ksgA-* d'*E.coli*, et recherche de clones cellulaires sensibles à la kasugamycine (Lafontaine *et al* 1994), c'est-à-dire, par complémentation hétérologue.

La restauration de la sensibilité à la kasugamycine (phénotype sauvage) a eu lieu pour trois clones contenant trois plasmides différents.

La diméthylation des deux adénines, montrée par une analyse en HPLC de l'ARN ribosomique 16S isolé d'un des clones (contenant le pGIDL31.42) a prouvé l'existence d'une complémentation pour la fonction de diméthylation, et le clonage du gène *DIM1* de levure.

Les deux autres clones (contenant respectivement les plasmides pGIDL103 ou 179), restaurant également la sensibilité à la kasugamycine, ne présentent pas cette diméthylation, et sont des "suppresseurs".

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes attachés à caractériser ces deux plasmides "suppresseurs".

But du travail

La transformation d'une banque génomique de levure dans le mutant *ksgA*-d'*E.coli* a permis le clonage du gène *DIM1* de *S.cerevisiae*, par complémentation hétérologue.

Deux clones "suppresseurs" du phénotype de résistance à la kasugamycine ont également été isolés. Il a été démontré que la méthylation des deux adénines en position 1518 et 1519 de l'ARNr 16S n'était pas restaurée dans ces deux clones.

Le objectif de ce mémoire est de tenter de comprendre le mécanisme moléculaire inconnu, différent de celui engendré par la diméthylase *DIM1*, responsable de la suppression phénotypique observée dans chaque cas.

Dans ce but, deux approches sont suivies:

D'une part, une série d'expériences exploratoires soumettant la mutant transformé ou non par le suppresseur, à des conditions de milieu particulières. Si dans un tel test phénotypique, l'effet d'un agent particulier était contrecarré par un suppresseur, cela fournirait une indication quant au mécanisme potentiel de la suppression en jeu.

D'autre part, le séquençage des inserts portés par les plasmides suppresseurs sera entrepris, afin de tenter, par comparaison des séquences protéiques connues dans les banques de données, d'identifier les gènes responsables de la suppression.

Résultats

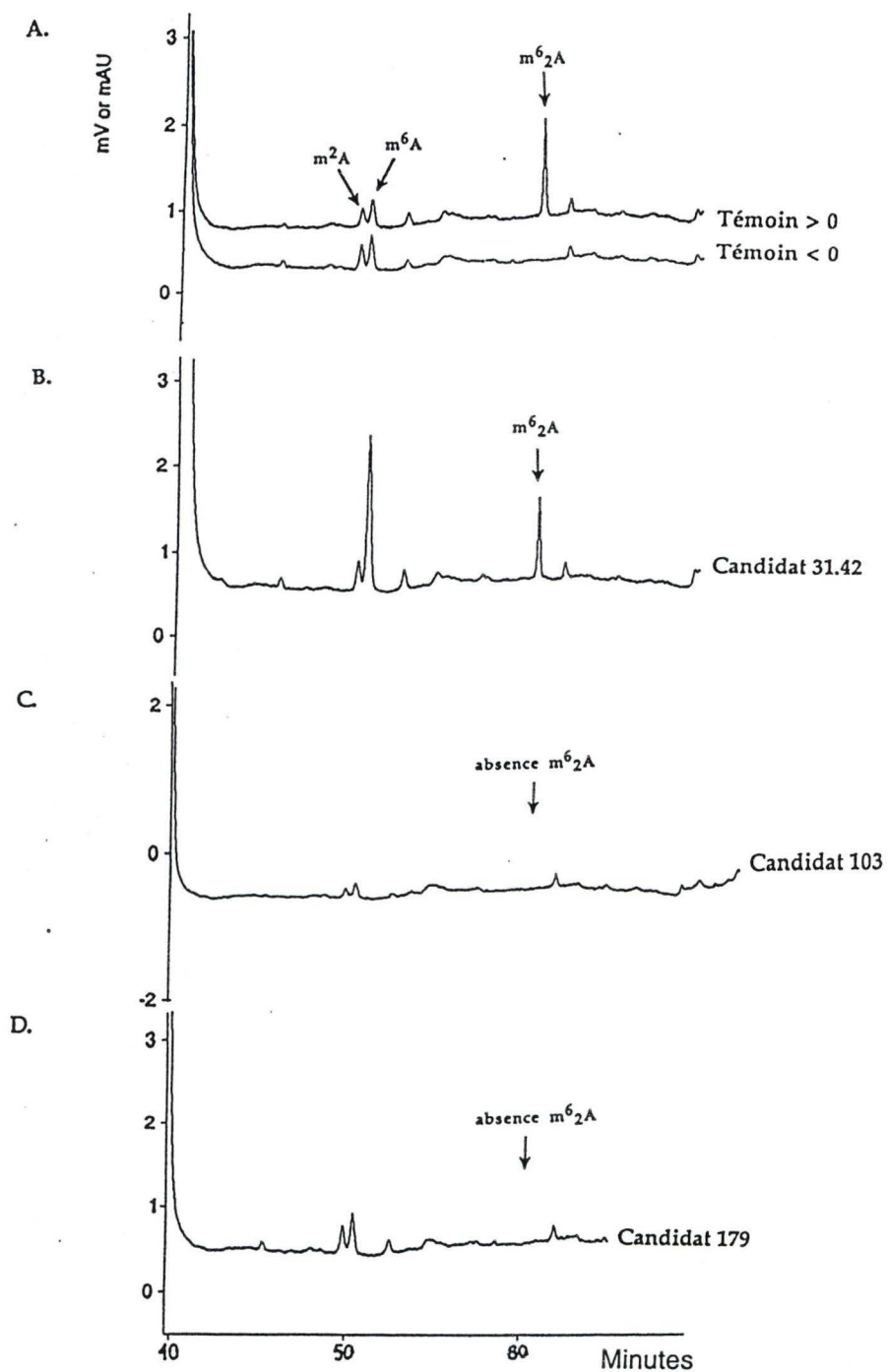


Figure 1: Occurrence de la modification m^6_2A

-A: Chez le témoin positif, JM101 sauvage et chez la témoin négatif, DL101 KsgA-.
 -B-C-D: Chez les trois clones pGIDL31.42, pGIDL103 et pGIDL179

RESULTATS

I. Caractérisation des deux clones suppresseurs de la mutation ksgA-

I.1 Historique des deux clones :

Le gène *ksgA* d'*Escherichia coli* code pour l'enzyme responsable de la diméthylation des deux adénines (positions 1518 et 1519) de l' "hairpin" située à l'extrémité 3' de l'ARN ribosomique 16S (cf fig.5 de l'introduction). Le mutant *ksgA-* (DL101), disrupté dans le gène de la diméthylase est viable, et présente une résistance à l'antibiotique kasugamycine.

Le gène homologue *DIM1* de *Saccharomyces cerevisiae*, responsable de la diméthylation des deux adénines contigües de l'hairpin située à l'extrémité 3' de l'ARN ribosomique 18S a été cloné récemment au laboratoire, par complémentation du mutant *ksgA-* d' *E.coli* avec une banque d'ADN génomique de *S.cerevisiae*, et sélection des candidats restaurant la sensibilité à la kasugamycine (Lafontaine *et al.*, 1994).

Trois clones candidats ont été sélectionnés, desquels les plasmides pGIDL31.42, pGIDL103 et pGIDL179 ont été isolés.

L'analyse en HPLC de l'ARN ribosomique 16S du mutant *ksgA-* d' *E.coli*, transformé respectivement par chacun des clones a été réalisée; seul le mutant contenant le candidat pGIDL31.42 présente une diméthylation des deux adénines 1518 et 1519 (fig. 1).

L'insert de levure du plasmide pGIDL31.42 porte donc un homologue fonctionnel du gène *ksgA* d'*E.coli*. Il s'agit là d'une complémentation dite hétérologue.

La comparaison de la séquence de la protéine *ksgA* et de la protéine *DIM1* révèle qu'il existe entre ces deux protéines un pourcentage d'identité de 25.8%, ainsi qu'un pourcentage de similarité de 47.8%. Cette comparaison révèle que les gènes d' *E. coli* et de *S. cerevisiae* sont évolutivement proches, c'est-à-dire homologues au sens strict.

L' ARNr 16S des clones cellulaires contenant les plasmides pGIDL103 et pGIDL179, suppresseurs du phénotype de résistance à la kasugamycine, ne présente pas la double diméthylation des deux adénines de l'extrémité 3' (fig.1).

Dans le cadre de ce mémoire, nous sommes attachés à caractériser ces deux plasmides "suppresseurs."

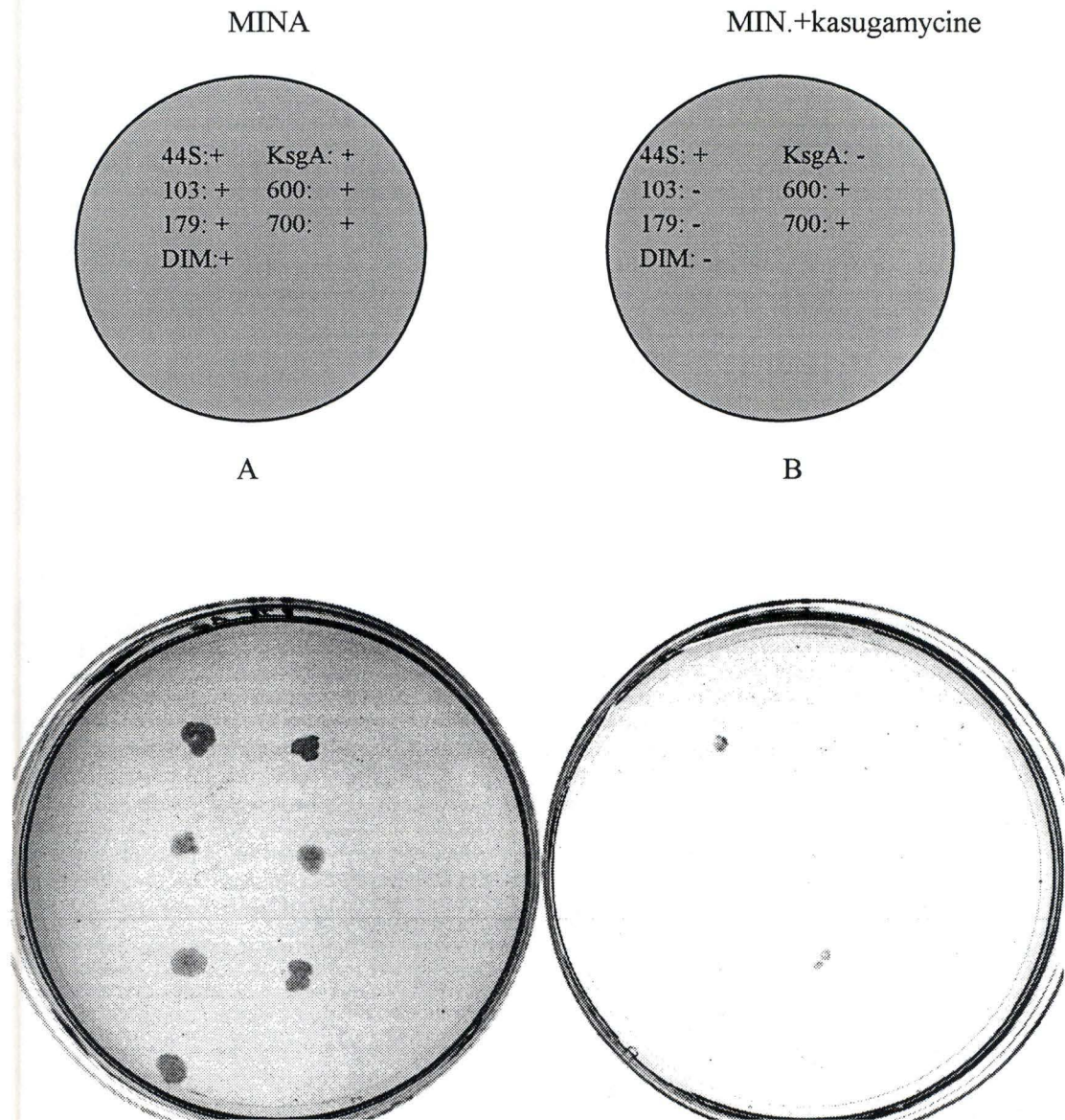


Figure 2: Analyse du phénotype de la souche DL101 (*ksgA*- *pyrF*-) transformée par les plasmides "suppresseurs": le pGIDL103 et 179

Des gouttes sont déposées sur un milieu MIN+ ampicilline (A) et sur un milieu MIN+ kasugamycine (B).

-La souche DL101, transformée par le contrôle négatif, pFL44S est résistante à la kasugamycine

-La souche DL101, transformée par les contrôles positifs, pGIDL301 et pGIDL31.42, est sensible à la kasugamycine.

-La souche DL101 transformée par les deux plasmides candidats est sensible dans les deux cas.

-La construction et le phénotype des sous-clones pGINB600 et 700 seront détaillées au point II.1.1 des résultats.

1.2 Confirmation du phénotype de sensibilité de la souche mutante DL101 d'*E.coli*, transformée par les plasmides pGIDL103 et 179

La restauration de la sensibilité à la kasugamycine, du mutant *ksgA*- d'*E.coli* transformé par les plasmides pGIDL103 ou 179 est illustrée à la figure 2.

La souche DL101 d'*E.coli* est mutante pour le gène *ksgA* et disruptée pour le gène responsable d'une des étapes de la synthèse d'uracile, *pyr F*.

L'auxotrophie *pyr F*- pour l'uracile est complémentable par le marqueur hétérologue *URA3* de levure.

La souche DL101 est transformée par les plasmides d'intérêt: pGIDL103 et pGIDL179 (fig.3).

Deux types de contrôles sont effectués:

- Un contrôle négatif avec la souche DL101 transformée par la matrice pFL44S seule, qui ne restaure pas la sensibilité à la kasugamycine, car elle ne contient aucun gène.
- Deux contrôles positifs avec la souche DL101 transformée soit par le pGIDL 301 porteur du gène *KsgA* d'*E.coli*, soit par le pGIDL31.42 porteur du gène *DIM1* de *S.cerevisiae*, qui vont tous les deux compléter la mutation *ksgA*-, et restaurer le phénotype de sensibilité à la kasugamycine.

Tous les plasmides sont porteurs du marqueur *URA3* qui complète la mutation *pyrF* et permet une sélection sur milieu MIN. (matériel et méthodes).

Les transformants sont resuspendus dans 100µl d'eau stérile, et des gouttes de 5µl sont déposées, d'une part sur milieu MIN.+Ampicilline (MINA), et d'autre part, sur milieu MIN.+kasugamycine (50µg/ml).

Le test phénotypique a lieu sur MIN.+kasugamycine; la boîte MINA sert de contrôle de croissance des cellules (toutes les cellules poussent).

Les résultats attendus sont présentés en résumé dans le tableau ci-dessous et observés à la figure 2:

Un + signifie croissance, et donc résistance.

Un - signifie non croissance, et sensibilité.

DL101 transformée par:	MINA	MIN.+kasugamycine
pFL44S	+	+
pGIDL301 (<i>ksgA</i>)	+	-
pGINB103	+	-
pGINB179	+	-
pGIDL31.42 (<i>DIM1</i>)	+	-

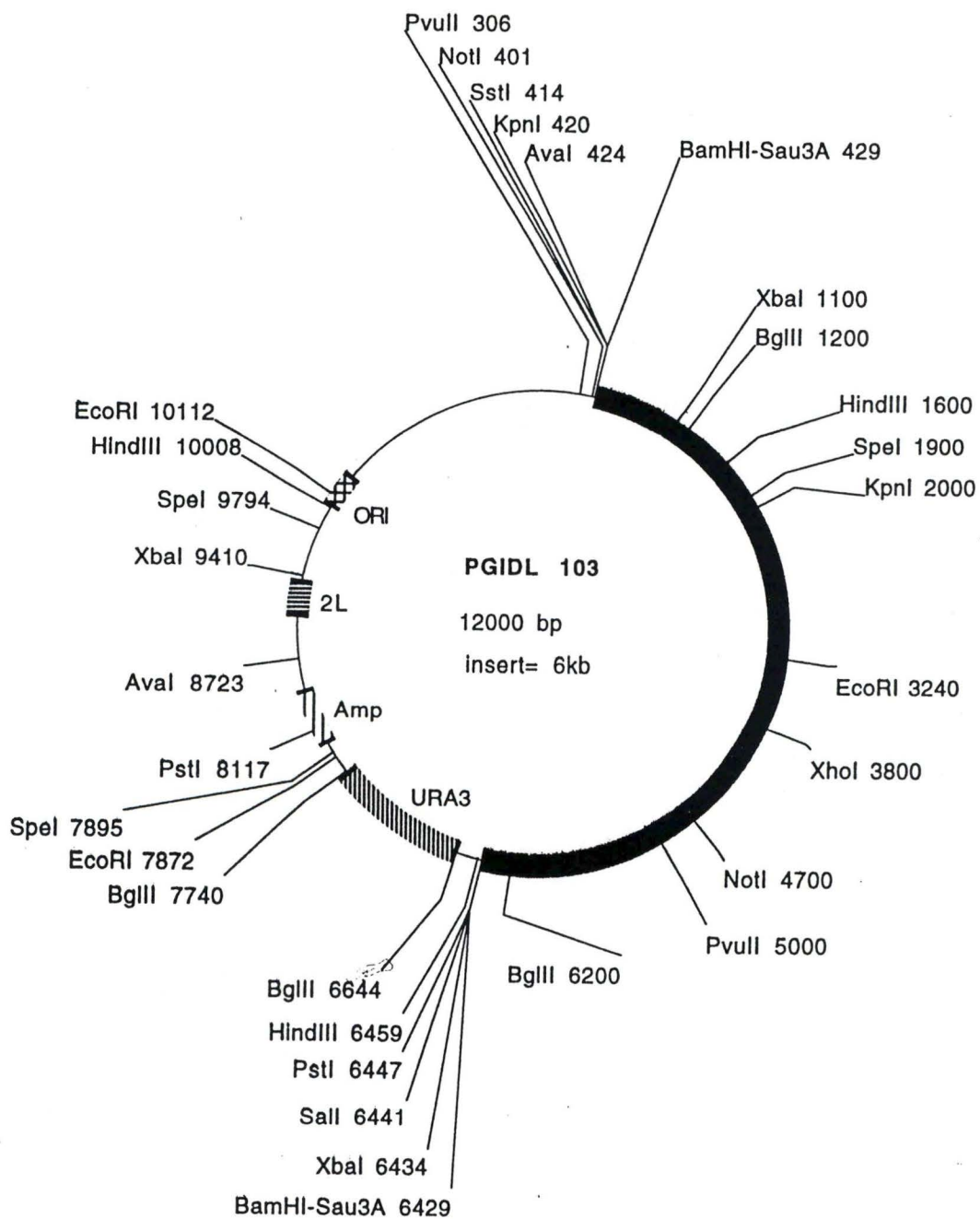


Figure 3A; Carte de restriction du pGIDL103

1.3 Cartes de restriction des deux plasmides.

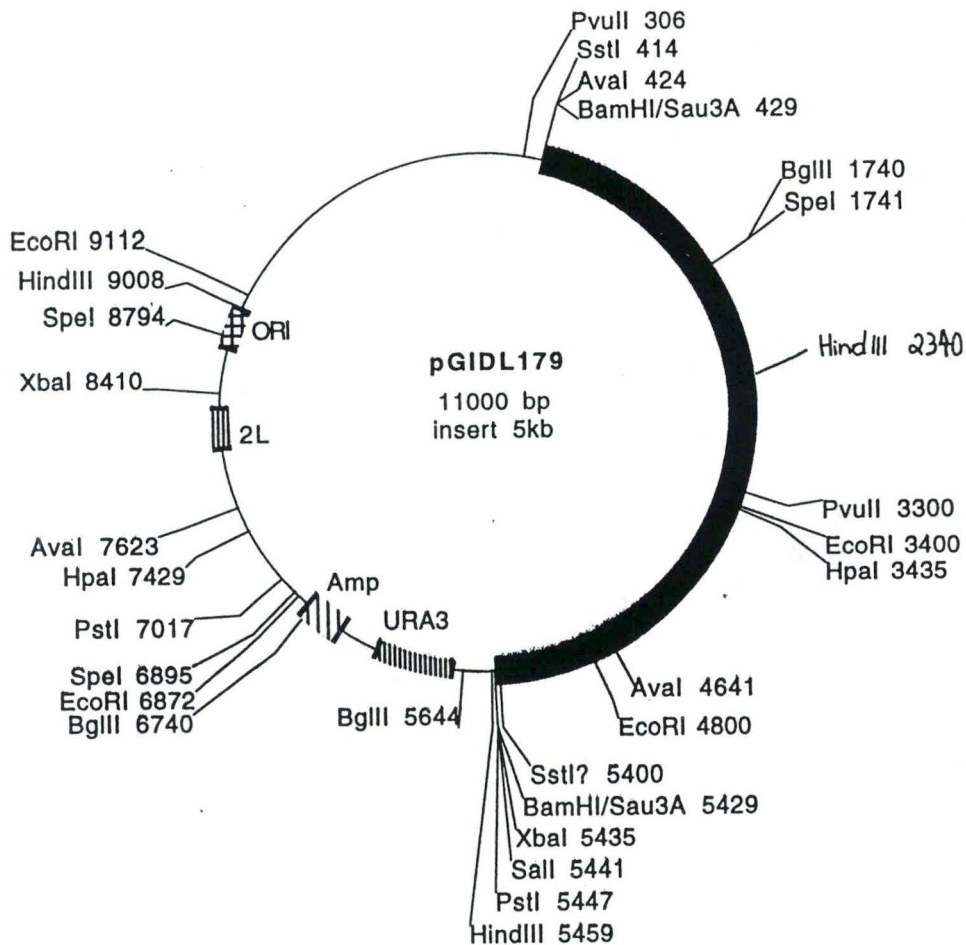
Les cartes de restriction des deux plasmides pGIDL103 et 179 ont été réalisées. Celles-ci sont présentées à la figure 3 a et b.

Les enzymes *KpnI* et *XhoI* coupant le pGIDL103, respectivement aux positions 2000 et 3800, ne coupent pas dans l'insert du pGIDL179.

EcoRI coupe deux fois dans l'insert du pGIDL179, en générant un fragment de 1400pb, par contre dans le pGIDL103, cet enzyme ne coupe qu'une seule fois.

Ces deux exemples montrent que les deux clones sont différents concernant leurs sites de restrictions.

Figure 3B: carte de restriction du pGIDL179



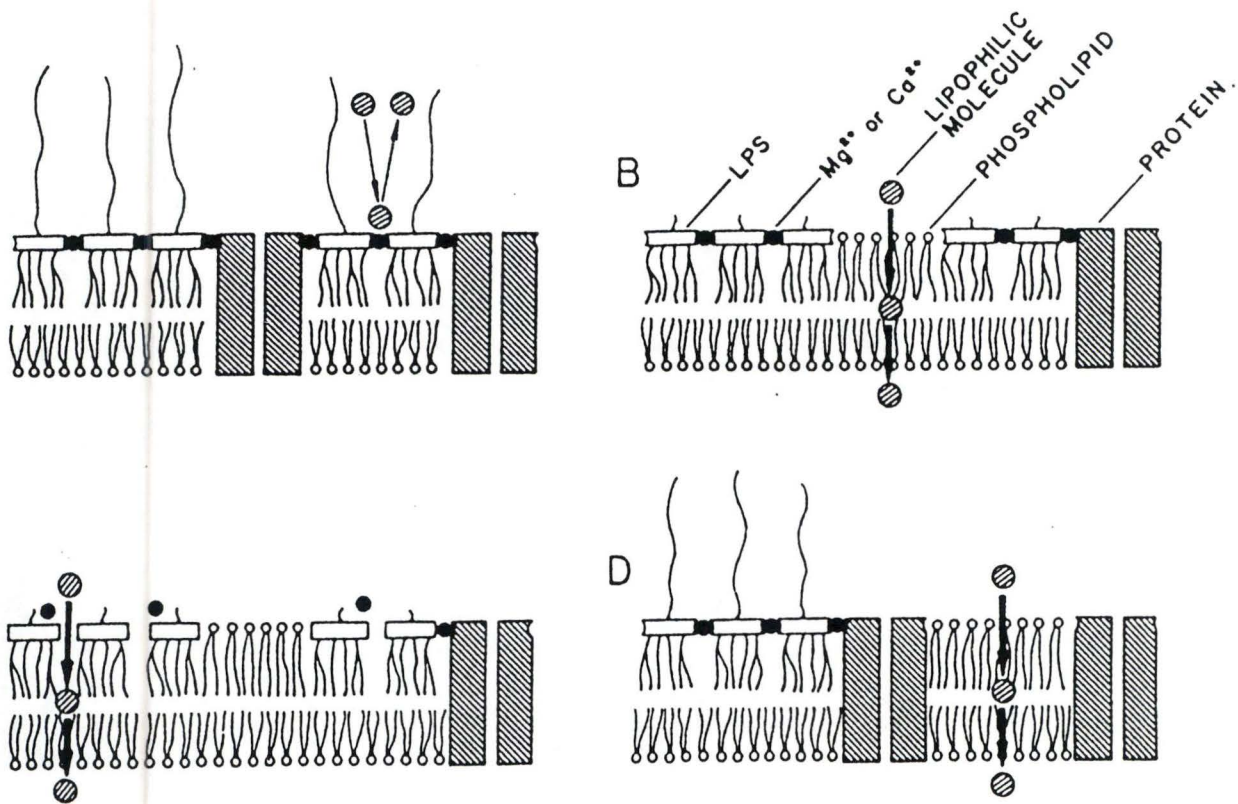


Figure .4 Description de la membrane externe d'*E. coli*.

A. Cellule sauvage dont la membrane externe est entièrement composée de lipopolysaccharides (LPS) et de phospholipides.

B. Mutant dont la membrane externe contient moins de LPS, l'espace libéré est occupé par des phospholipides. Les molécules hydrophobes pénètrent dans la cellule au niveau des phospholipides.

C. Mutant dont la structure membranaire est la même que dans le cas B. Dans ce cas-ci, les molécules lipophiles entre dans la cellule à travers des LPS, profitant de la plus faible interaction de ceux-ci.

D. Cellules traitées à l'EDTA. Les phospholipides remplissent l'espace laissé par la libération des LPS.

I.4 Tests phénotypiques supplémentaires

I.4.1 Introduction

Le mécanisme sous-jacent de suppression de la mutation *ksgA-*, c'est-à-dire, la restauration du phénotype de sensibilité à la kasugamycine, nous est inconnu.

Néanmoins, quelques explications de cette suppression se présentent à nous.

La présence des plasmides dans la souche mutante DL101 (*ksgA-*, *pyrF-*) pourrait augmenter la perméabilité cellulaire, d'une façon ou d'une autre, en créant un canal dans la membrane, en déplaçant des polysaccharides, ... En augmentant la perméabilité cellulaire, les deux "suppresseurs" favoriseraient l'entrée de la kasugamycine dans la cellule et abaisseraient le seuil de sensibilité. Pour une concentration extérieure donnée, où le mutant est normalement résistant, il y aurait une concentration interne telle que, malgré l'absence de diméthyles, une interaction avec le ribosome s'établit et entraîne son dysfonctionnement.

Les "suppresseurs" pourraient également coder pour des méthylases; celles-ci, surexprimées dans le transformant, méthyleraient de manière aspécifique leur propre substrat ou un autre.

Ces méthylations pourraient restaurer un site d'action de la kasugamycine et expliquer la sensibilité conférée par les "suppresseurs" à la souche mutante.

Pour tenter de comprendre ce mécanisme de suppression, différents tests ont été réalisés, sur des milieux:

- augmentant la perméabilité cellulaire.
- contenant de la kasugamycine à différentes concentrations.
- contenant de l'érythromycine.

L'érythromycine est un antibiotique se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome, son site d'action est l'adénine 2058 de l'ARNr 23S.

Chez la bactérie *Streptococcus pyogenes*, qui possède le gène codant pour l'*Erm* méthylase, cette adénine est méthylée et confère une résistance à l'érythromycine.

La bactérie *E.coli*, et donc le mutant *ksgA-*, ne possèdent pas cette enzyme, ne présentent pas de méthylation de l'ARNr 23S, et sont sensibles à l'érythromycine.

Le mutant *ksgA-*, transformé par le gène *ermR* présente une résistance à l'érythromycine et une diminution de résistance à la kasugamycine (Suvorov *et al.*, 1988). Ce phénotype est dû à la méthylation de l'adénine 2058 de l'ARNr 23S, en effet, on a vérifié que l'ARNr 16S n'était pas "re-méthylé". Dans cet exemple, la sensibilité à la kasugamycine est due à un mécanisme différent de ce qu'on observe suite à la diméthylation des deux adénines voisines de l'ARNr 16S.

I.4.2 Tests phénotypiques sur milieux augmentant la perméabilité cellulaire

I.4.2.1 Introduction

Les milieux testés contiennent du CaCl_2 , ou de l'EDTA à différentes concentrations.

Pour comprendre leurs effets, il faut, au préalable, s'intéresser brièvement à la membrane cellulaire d' *E.coli* (Nikaido *et al.*, 1987):

La membrane externe est composée d'une bicouche lipidique. La distribution des lipides est asymétrique, la plupart des lipopolysaccharides (LPS) sont localisés dans la partie externe de la bicouche (fig.4).

Par contre, les phospholipides se retrouvent dans la partie interne de la bicouche. (Il y en a peu ou pas dans la partie externe).

Les interactions entre les LPS sont très fortes, et sont consolidées par la présence de cations divalents, qui neutralisent les répulsions électrostatiques de ces molécules polyanioniques.

Les LPS forment une barrière fortement imperméable aux molécules hydrophobes (pas totalement).

La figure 4 illustre deux explications possibles d'une augmentation de la perméabilité chez les mutants :

- soit des phospholipides, perméables aux molécules hydrophobes, sont présents sur la face externe de la bicouche;
- soit l'interaction entre les lipopolysaccharides est moins forte.

-L'effet de l'EDTA:

Les traitements avec de l'EDTA sont connus pour provoquer une libération d'une partie importante des lipopolysaccharides.

En fait, l'EDTA capte les cations qui neutralisent les polyanions et stabilisent l'interaction entre les liposaccharides.

C'est ainsi que l'EDTA provoquerait la libération de lipopolysaccharides. Si des phospholipides viennent prendre leur place, cela a pour conséquence d'augmenter la perméabilité de la membrane aux molécules hydrophobes.

- L'effet des cations divalents :

Ils stabilisent l'interaction entre les liposaccharides. Ces derniers ont une grande affinité pour le Ca^{++} . Cependant, des concentrations trop élevées en Ca^{++} pourraient disrupter localement la membrane.

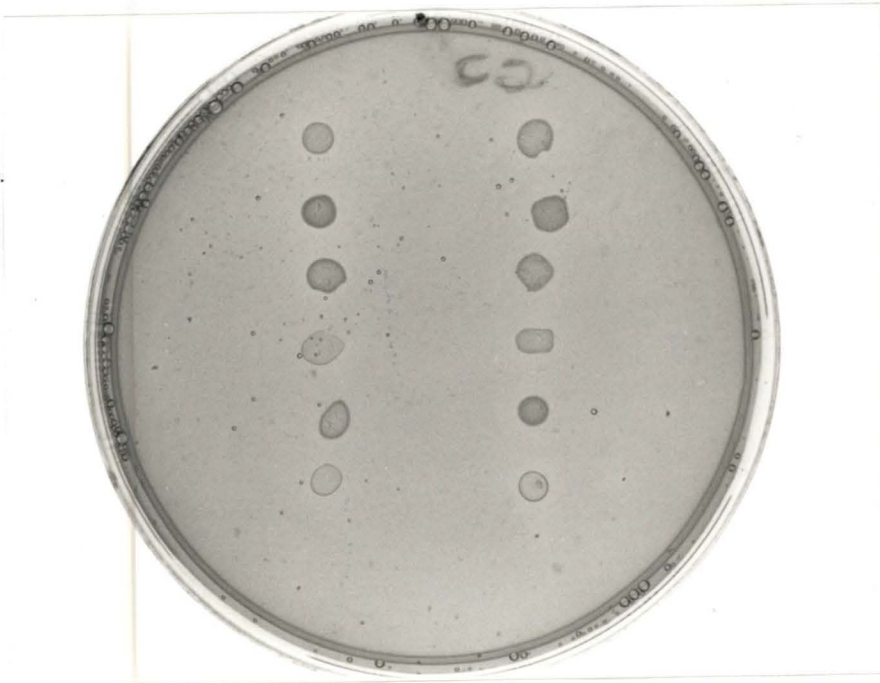
Les tests ont été réalisés à une température de 37°C.

Dilution

1x

10x

Souches



JM101
DL101 + pFL44S
DL101 + pGIDL301
DL101 + pGIDL31.42
DL101 + pGIDL103
DL101 + pGIDL179

Figure 5: Analyse phénotypique de la souche sauvage JM101 et du mutant DL101 transformé par les plasmides pFL44S, pGIDL301 (porteur du gène *ksgA*), pGIDL31.42 (porteur du gène *DIM1*), pGIDL103 et pGIDL179, sur milieu MIN. + CaCl₂ à la concentration de 37.5 µM/ml.

I.4.2.2 Résultats.

I.4.2.2.1 Tests sur des milieux contenant du CaCl₂

La souche JM101 est une souche sauvage (matériel et méthode).

La souche DL101 est transformée par les plasmides suivants:

- Le pFL44S est une matrice sans insert, porteuse du marqueur *URA3*.
- Le pGIDL301 est un plasmide contenant le gène *KsgA* de bactérie.
- Le pGIDL31.42 est un plasmide contenant le gène *DIM1* de levure.
- Les pGIDL103 et 179 sont les plasmides d'intérêt.

Procédure de gouttes:

Une colonie est resuspendue dans 200µl d'eau stérile (dilution 1X) , 10µl sont prélevés de cette suspension et mélangés à 190µl d'eau stérile (dilution 10X).

Ensuite, des gouttes de 5µl sont déposées sur les différents milieux.

Un contrôle de quantité de cellules est effectué sur milieu MINA, où toutes les cellules poussent.

Les résultats obtenus pour différentes concentrations en CaCl₂ sont résumés dans le tableau ci-dessous.

CaCl ₂	JM101		DL101 + pFL44S		DL101 + pGIDL301		DL101+ pGIDL 31.42		DL101 + pGIDL103		DL101 + pGIDL179	
	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x
10µM/ml	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
12.5µM/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25µM/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37.5µM/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50µM/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125µM/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

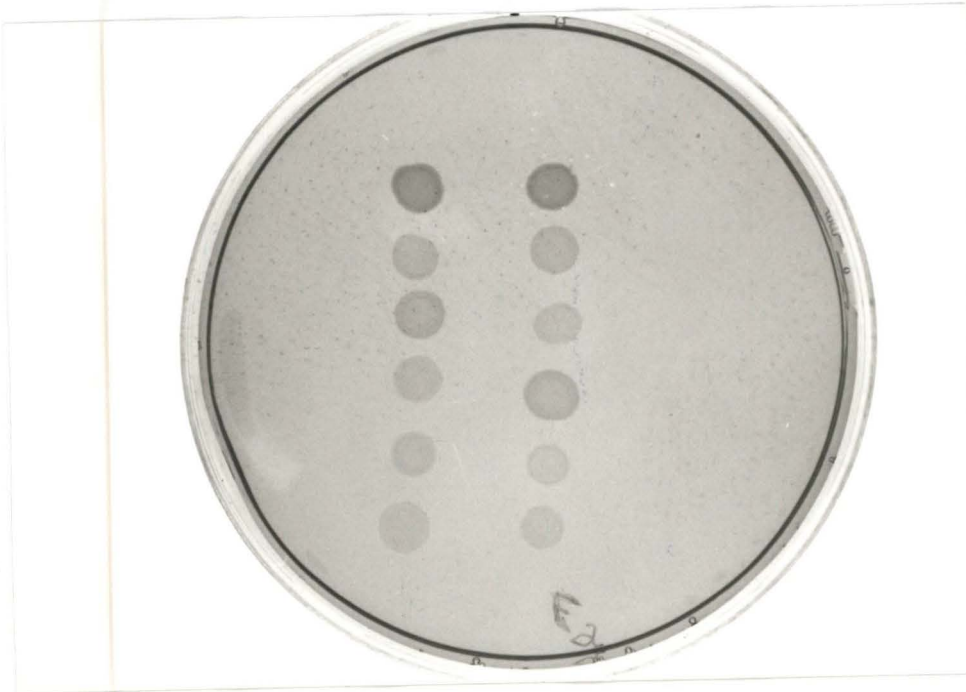
La figure 5 présente les phénotypes obtenus sur milieu MIN contenant du CaCl₂ à une concentration de 37.5 µg/ml. Les phénotypes obtenus aux concentrations de 50µM/ml, et 125µM/ml ne sont pas présentés, en effet, aucun clone cellulaire ne pousse.

Dilution

1x

10x

Souches



JM101
DL101 + pFL44S
DL101 + pGIDL301
DL101 + pGIDL31.42
DL101 + pGIDL103
DL101 + pGIDL179

Figure 6: Analyse phénotypique de la souche sauvage JM101 et du mutant DL101 transformé par les plasmides pFL44S, pGIDL301 (porteur du gène *ksgA*), pGIDL31.42 (porteur du gène *DIM1*), pGIDL103 et pGIDL179, sur milieu MIN. + EDTA à la concentration de 0.375 μ M/ml.

I.4.2.2.2 Tests sur des milieux contenant de l' EDTA

Les résultats obtenus pour différentes concentrations en EDTA sont résumés dans le tableau ci-dessous.

EDTA	JM101		DL101 + pFL44S		DL101 + pGIDL301		DL101+ pGIDL31.42		DL101 + pGIDL103		DL101 + pGIDL179	
	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x
0.25µM/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.375µM/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5µM/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5µM/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La figure 6 présente les phénotypes obtenus sur milieu MIN contenant de l'EDTA à une concentration de 0.375µM/ml. Les résultats obtenus aux concentrations de 0.5µM/ml et 2.5 µM/ml ne sont pas présentés, car aucun clone cellulaire ne pousse.

I.4.2.3 Conclusion.

Les résultats obtenus pour les deux "suppresseurs" et les différents contrôles ne présentent pas de différence.

Dans les deux types de tests, on constate un effet "tout ou rien" pour toutes les cellules en même temps. A partir de la concentration seuil de 50 µM/ml pour le CaCl₂ et de 0.5 µM/ml pour l'EDTA, les cellules ne poussent plus. Nous n'avons pas pu montrer, par ces expériences, que la présence des deux plasmides transformés dans le mutant DL101 induisait une augmentation de la perméabilité cellulaire.

I.4.3 Test phénotypiques sur milieux contenant de la kasugamycine à différentes concentrations

I.4.3.1 Introduction.

Le test phénotypique ayant permis le clonage du gène *DIM1*, et l'isolement des deux suppresseurs a eu lieu à une concentration de 50µg/ml.

D'autres concentrations ont été testées : 12.5µg/ml, 25µg/ml et 100µg/ml.

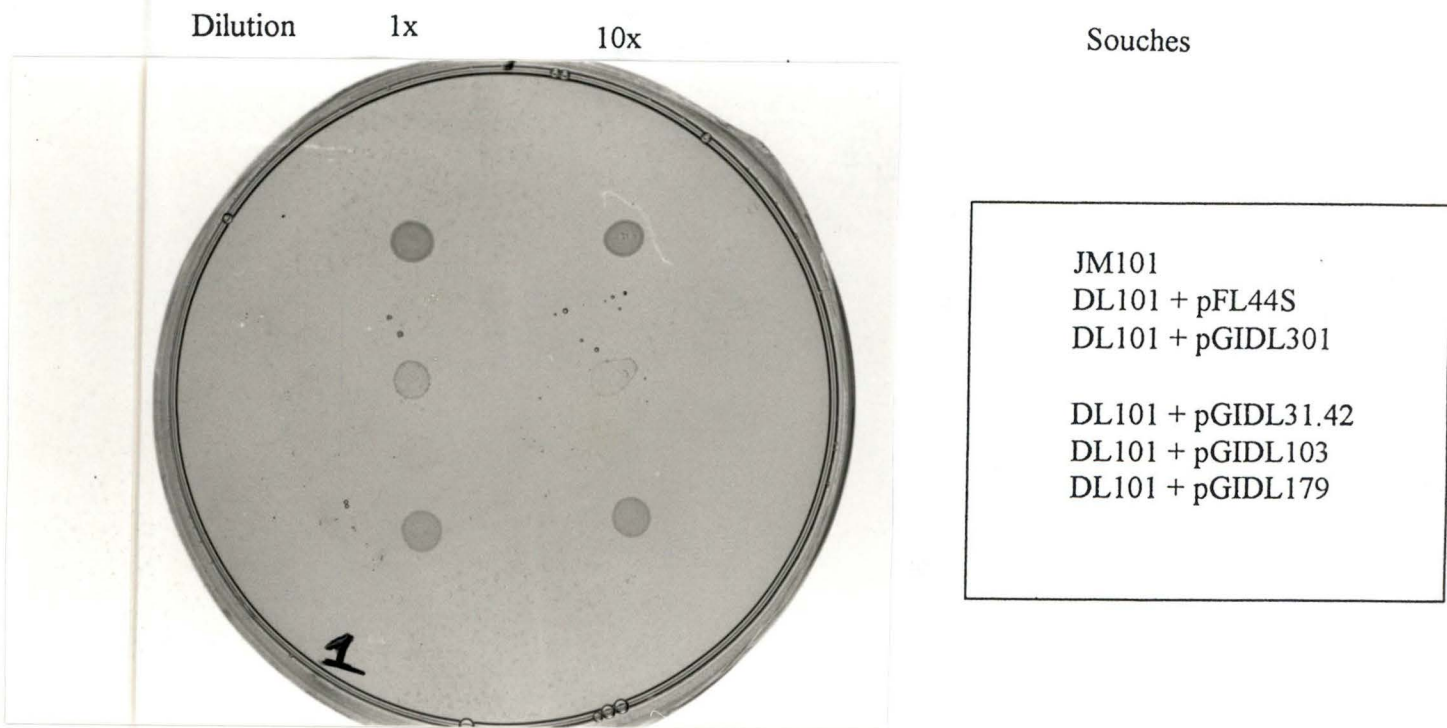


Figure 7: Analyse phénotypique de la souche sauvage JM101 et du mutant DL101 transformé par les plasmides pFL44S, pGIDL301 (porteur du gène *ksgA*), pGIDL31.42 (porteur du gène *DIM1*), pGIDL103 et pGIDL179, sur milieu MIN. + kasugamycine à la concentration de 12.5 µg/ml. Le mutant transformé par le pFL44S, par le pGIDL 31.42 et par le pGIDL179 présente un phénotype de croissance. Les autres clones sont sensibles.

Dilution

1x

10x

Souches



JM101

DL101 + pFL44S

DL101 + pGIDL301

DL101 + pGIDL31.42

DL101 + pGIDL103

DL101 + pGIDL179

Figure 8: Analyse phénotypique de la souche sauvage JM101 et du mutant DL101 transformé par les plasmides pFL44S, pGIDL301 (porteur du gène *ksgA*), pGIDL31.42 (porteur du gène *DIM1*), pGIDL103 et pGIDL179, sur milieu MIN. + kasugamycine à la concentration de 25 µg/ml. Le mutant transformé par le pFL44S et par le pGIDL179 présente un phénotype de croissance. Les autres clones sont sensibles.

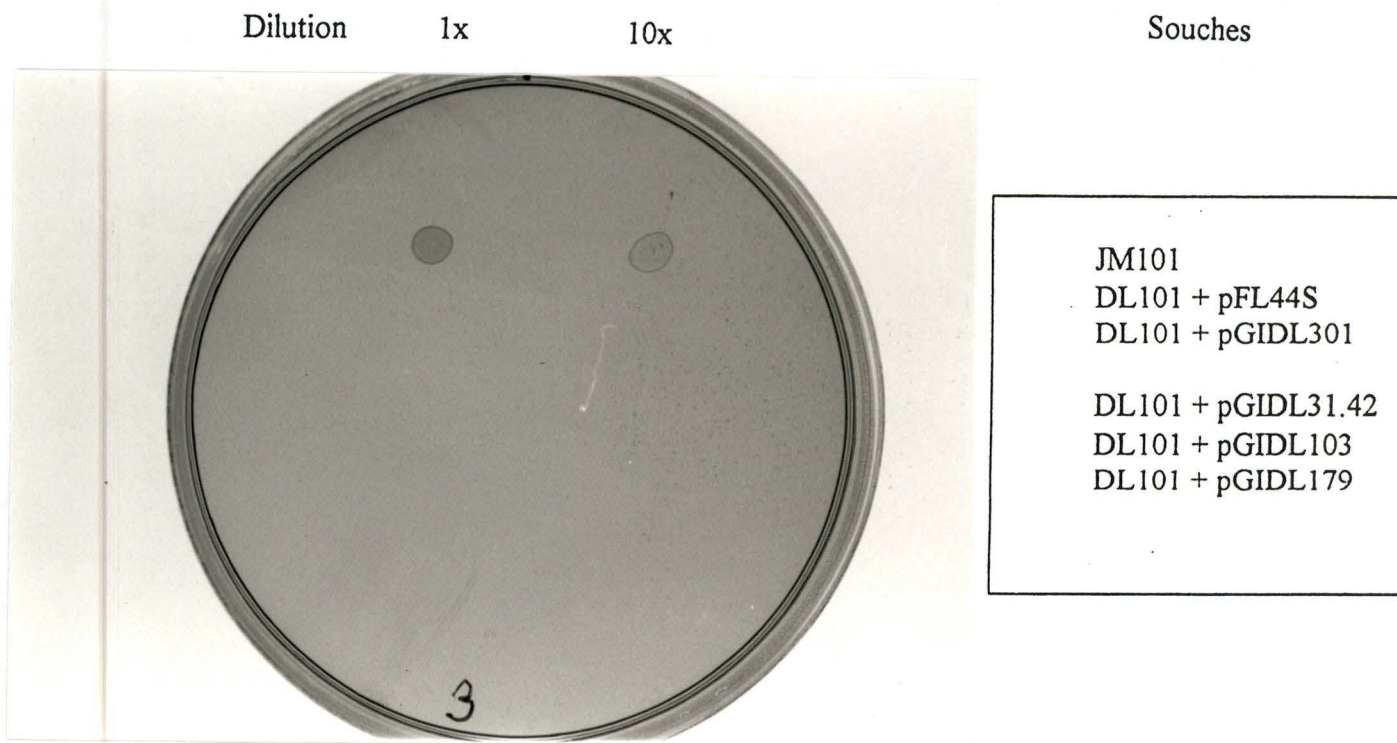


Figure 9: Analyse phénotypique de la souche sauvage JM101 et du mutant DL101 transformé par les plasmides pFL44S, pGIDL301 (porteur du gène *ksgA*), pGIDL31.42 (porteur du gène *DIM1*), pGIDL103 et pGIDL179, sur milieu MIN. + kasugamycine à la concentration de 50 µg/ml. Seul le mutant transformé par le pFL44S présente un phénotype de croissance. Les autres clones sont sensibles.

I.4.3.1.1 Résultats.

Les résultats obtenus pour les différentes concentration en kasugamycine, sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Les zones grisées soulignent les différences de phénotype du mutant DL101, transformé soit par le pGIDL103, soit par le pGIDL179.

Kasug. 37°C	JM101		DL101 + pFL44S		DL101 + pGIDL301		DL101+ pGIDL31.42		DL101 + pGIDL103		DL101 + pGIDL179	
	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x
12.5µg/ml	-	-	+	+	-	-	+	+/-	-	-	+	+
25µg/ml	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
50µg/ml	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
100µg/ml	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La souche DL101 transformée par le plasmide pGIDL301 codant pour la diméthylase d'*E.coli* ne pousse à aucune concentration testée; la complémentation homologue du mutant DL101 par le gène *ksgA* restaure bien le phénotype sauvage. Par contre, la diméthylase de *S. cerevisiae* portée par le pGIDL31.42 et transformée dans la souche DL101, entraîne une légère croissance à plus faible concentration; la complémentation hétérologue n'est donc pas aussi efficace.

Le clone cellulaire contenant le pGIDL103 présente un phénotype de sensibilité à toutes les concentrations, comme la souche sauvage, ou le mutant DL101 transformé par le gène *ksgA*.. Le moyen de suppression emprunté dans ce cas, semble plus efficace que la complémentation hétérologue. Par contre, le clone cellulaire contenant le pGIDL179 pousse toujours aux plus faibles concentrations (12.5 et 25 µg/ml).

Les résultats phénotypiques sont présentés aux figures 7, 8 et 9.

I.4.3.2 Conclusion

A la température de 37°C, la souche DL101 présente des différences de croissance en fonction de la concentration en kasugamycine, selon qu'elle est transformée par le pGIDL103 ou pGIDL179. Les phénotypes obtenus sont différents et montrent que les gènes portés par les deux plasmides sont probablement différents.

I.4.4 Tests sur des milieux contenant de l'érythromycine à différentes concentrations

I.4.4.1 Introduction

Rappelons que l'introduction du gène *ermR* dans le mutant *ksgA*- induit une résistance à l'érythromycine et une diminution de résistance à la kasugamycine (Suvorov *et al* 1988). Ceci étant dû à la méthylation de l'adénine 2058 de l'ARNr 23S et non d'une méthylation de l'ARNr 16S. Le phénotype du mutant DL101 transformé par les deux plasmides candidats va être analysé pour différentes concentrations en érythromycine, dans le but de mettre en évidence un mécanisme d'action semblable à celui de l'introduction du gène *ermR* dans le mutant *ksgA*-.

Rappel des souches et de leur phénotype en présence des deux antibiotiques:

Antibiotique	kasugamycine	érythromycine
Souches:		
<i>E.coli</i> sauvage diméthylation des 2 A (1518 et 1519) de l'ARNr 16S	sensible	sensible
<i>E.coli</i> mutante <i>ksgA</i> - pas de diméthylation des 2 A (1518 et 1519) de l'ARNr 16S	résistante	sensible
<i>E.coli</i> <i>ksgA</i> - + <i>ermR</i> méthylation de l'A 2058 de l'ARNr 23S	résistance diminuée	résistante

I.4.4.2 Résultats

Les résultats obtenus pour les différentes concentrations en érythromycine, sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Erythromycine	JM101		DL101 + pFL44S		DL101 + pGIDL301		DL101+ pGIDL31.42		DL101 + pGIDL103		DL101 + pGIDL179	
	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x	1x	10x
75µg/ml	+	-	+	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
100µg/ml	+	-	+	-	+	-/+	+	-	-	-	-	-
150µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I.4.4.3 Conclusion

La souche sauvage d' *E.coli* (JM101) est sensible à l'érythromycine. La concentration à laquelle il faut s'attacher est celle où l'on observe ce phénotype, c'est-à-dire, la concentration de 100µg/ml.

A cette concentration, les deux clones contenant les plasmides d'intérêt ne poussent déjà plus. La sensibilité à la kasugamycine de la souche transformée par les deux plasmides n'est donc pas à mettre en relation avec une résistance à l'érythromycine, comme dans le cas de l'introduction d'un gène *ermR*.

I.4.5 Conclusions générales

Tous ces tests phénotypiques nous permettent de tirer quelques conclusions concernant les deux plasmides: pGIDL103 et pGIDL179.

- Ils sont différents entre eux, notamment par le phénotype qu'ils confèrent à la souche DL101 sur milieu contenant de la kasugamycine aux concentrations de 12.5 et de 25 µg/ml.
- Nous n'avons pas pu montrer qu'ils contenaient un insert codant pour des gènes en rapport avec une augmentation de la perméabilité cellulaire (Tests sur CaCl₂ et EDTA) ou avec une méthylation de type A2058.

Ni un mécanisme affectant la perméabilité de la membrane, ni une méthylation différente de celle de l'ARNr 16S ne peuvent, à ce stade, être invoqués valablement pour expliquer le mode de suppression des deux plasmides.

Pour poursuivre l'étude de ces deux plasmides, nous allons maintenant nous intéresser à leur séquence, et pour cela les sous-cloner.

II. Localisation des gènes dans les deux inserts par sous-clonage.

II.1 Clone pGIDL103

II.1.1 Sous-clonage pour délimiter le gène

La taille de l'insert du clone pGIDL103 est de +/- 6000 pb.

La première étape a été de délimiter plus précisément le gène dans l'insert, avant d'entreprendre le séquençage.

Pour ce faire, plusieurs étapes de sous-clonage ont été accomplies.

fig. 10: Constructions des sous-clones pGINB600, 601 et 602

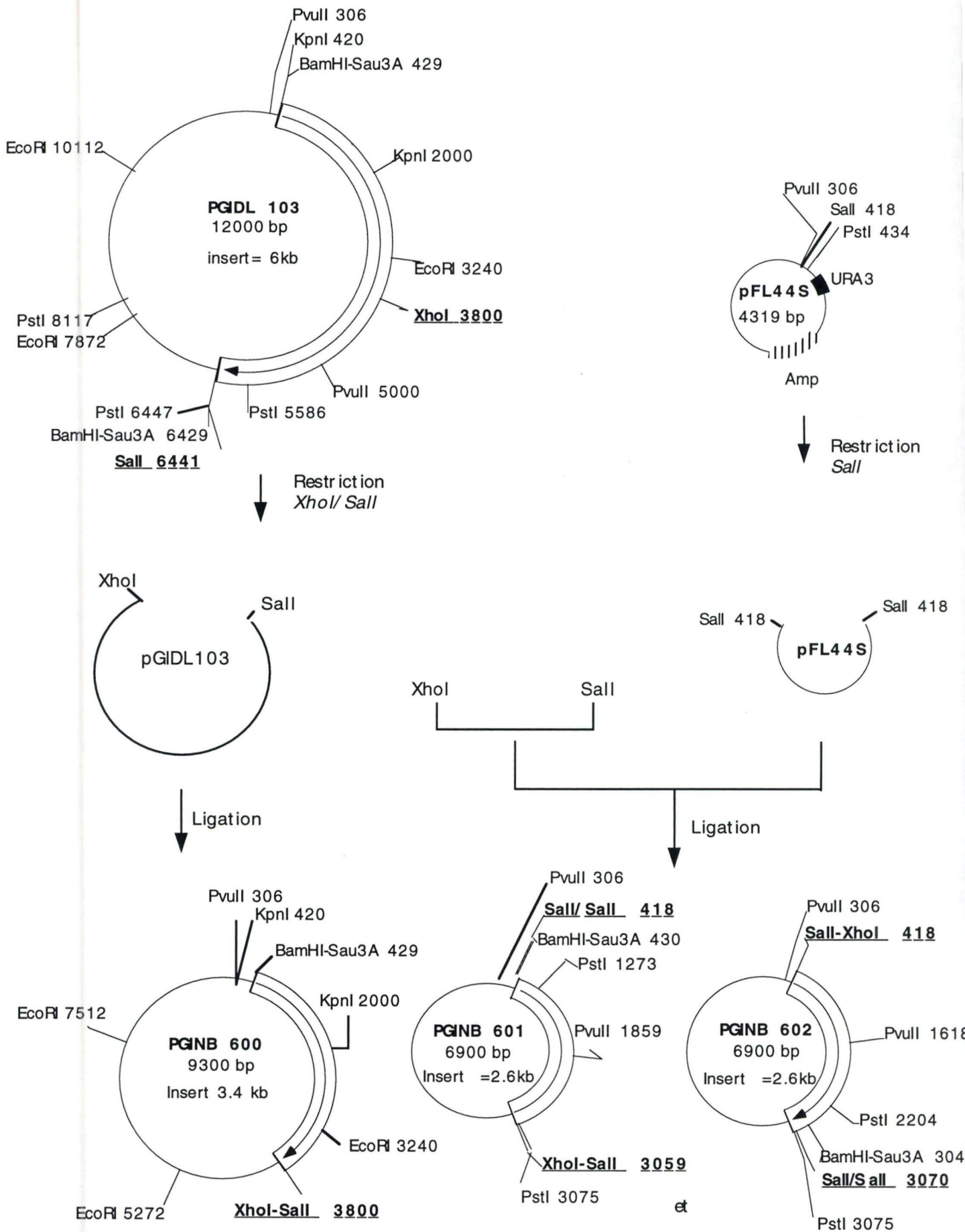
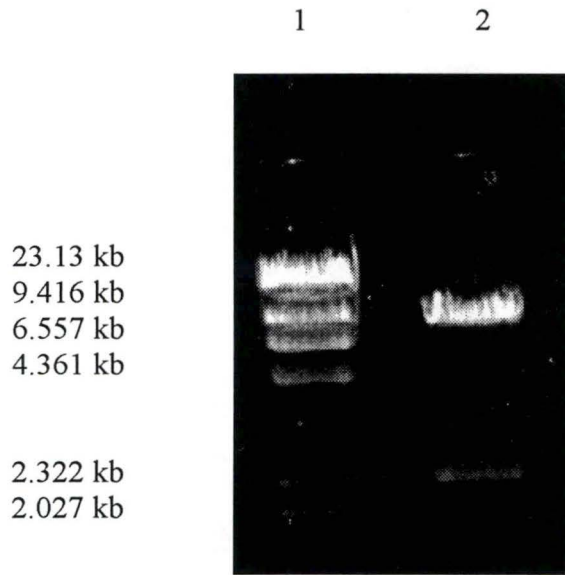


fig 11 : Restriction *XhoI*- *SalI* du pGINB103

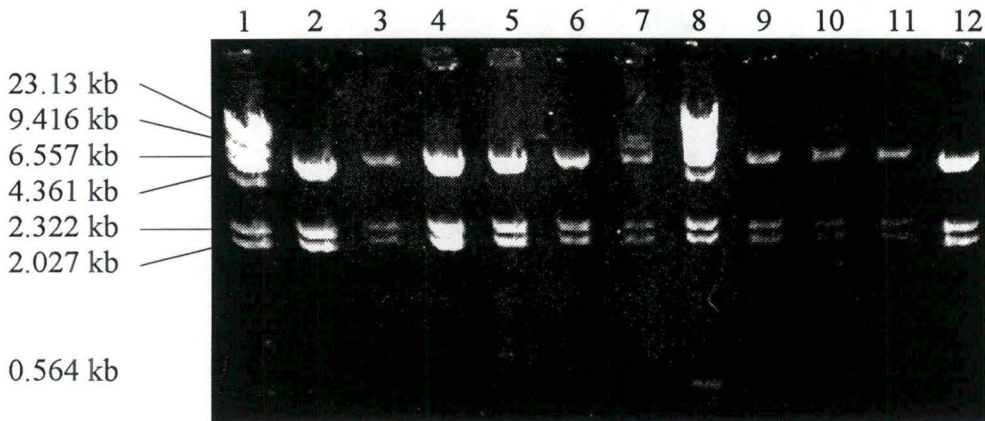


Piste 1 : Marqueur de taille λ *HindIII*

Piste 2 : pGINB103 restreint par *XhoI* et *SalI*

Les fragments de 9 kb et 2 kb sont obtenus.

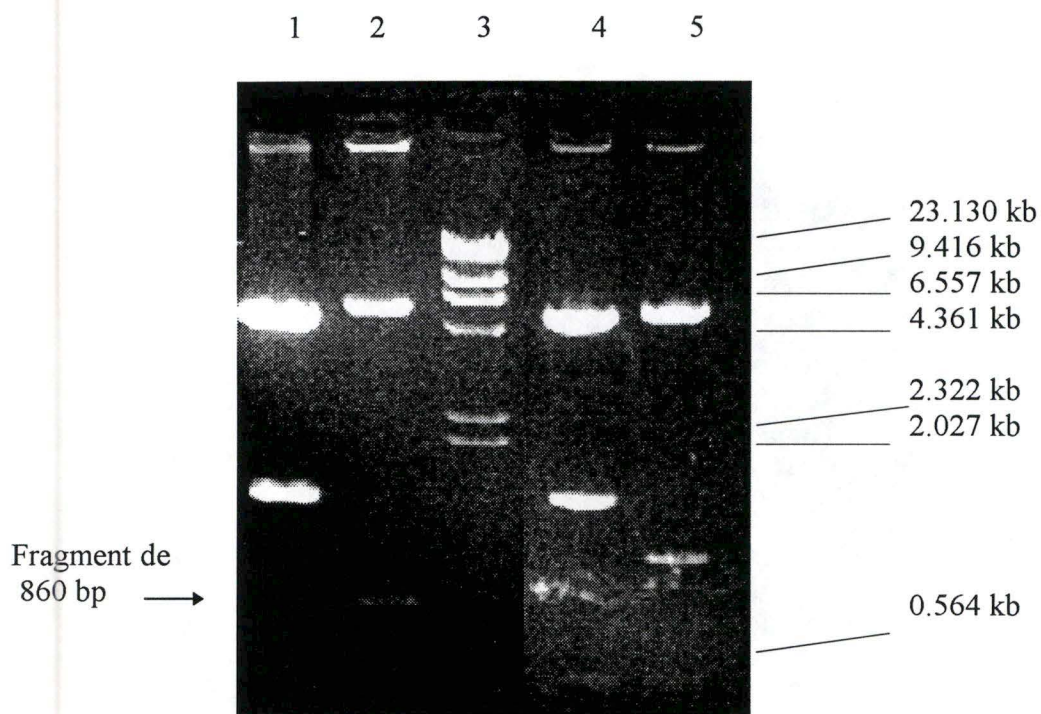
fig 12 : Restrictions diagnostiques des minipréparations pGINB600



Pistes 1 et 8 : Marqueur de taille λ *Hind*III
Pistes 2 à 7 : pGINB600 restreint par *Eco*RI
Pistes 9 à 12 : pGINB600 restreint par *Eco*RI

Les fragments de 5028 pb , 2240 pb, 2032 pb diagnostiques du pGINB600 sont présents dans les pistes 2 à 7 , et dans les pistes 9 à 12. (cf fig 10.)

fig 13 : Restrictions diagnostiques des sous-clones pGINB601 & 602



Piste 1 : pGINB601 restreint par *Pst*I
Piste 2 : pGINB602 restreint par *Pst*I
Piste 3 : Marqueur de taille λ *Hind*III
Piste 4 : pGINB601 restreint par *Pvu*II
Piste 5 : pGINB602 restreint par *Pvu*II

Les fragments attendus, pour chacune des restrictions des deux sous-clones, sont présents.

Les deux fragments d'ADN sont "ligués" pendant une nuit à 14°C , le mélange de ligation est transformé dans la souche bactérienne X11 Blue d'*E.coli*.

Douze colonies sont prélevées et inoculées dans un milieu LB avec ampicilline, pendant une nuit à 37°C.

L'ADN plasmidique de chaque culture est obtenu par minipréparation et restreint .

Dans ce cas-ci, deux types de clones peuvent exister; en effet, les enzymes *XhoI* et *SalI* sont compatibles; le fragment *XhoI-SalI* peut donc se mettre dans un sens ou dans l'autre dans la matrice pFL44S ,ouverte en *SalI*. Pour différencier les deux types de constructions, les enzymes *PvuII* et *PstI* ont été utilisées.

Les tailles des fragments attendues selon qu'il s'agit d'un sous-clone ou de l'autre sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i>
601	5098pb 1802pb	5347pb 1553pb
602	6045pb 855pb	5588pb 1312pb

La photo présentée à la fig.13 montre que les fragments attendus pour les deux types de sous-clones sont bien présents et atteste de la présence des deux sous-clones.

II.1.1.2.1 Tests Phénotypiques

Comme décrit au point I.2, les phénotypes de la souche DL101 transformée par les différents sous-clones, sont testés sur deux types de milieu: MINA et MIN.+kasugamycine, en présence des 3 contrôles: le contrôle négatif: la matrice pFL44S, et les deux contrôles positifs le pGIDL301 et le pGIDL31.42. Les phénotypes des sous-clones obtenus et présentés à la figure 14 sont repris dans le tableau ci-dessous:

DL101 transformée par:	Phénotype sur kasugamycine:
pFL44S	+
pGIDL31.42	-
pGIDL301	-
pGIDL103	-
pGINB600	+
pGINB601	+
pGINB602	+

Un phénotype de résistance est obtenu pour tous les mutants contenant les différents sous-clones (pGINB600, 601 et 602). Le gène est donc disrupté.

	1X	10X
44S	+	+
DIM	+	+
KsgA	+	+
103	+	+
600	+	+
601	+	+
602	+	+

A

	1X	10X
44S	+	+
DIM	-	-
KsgA	-	-
103	-	-
600	+	+
601	+	+
602	+	+

B

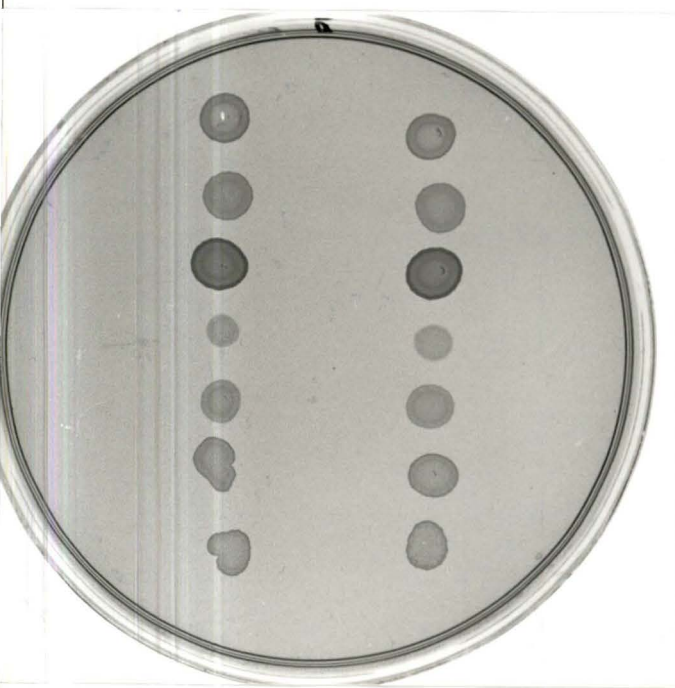


Figure 14.: Analyse du phénotype de la souche DL101, transformée par les sous-clones pGINB600,601 et 602 sur milieu MIN.+kasugamycine.

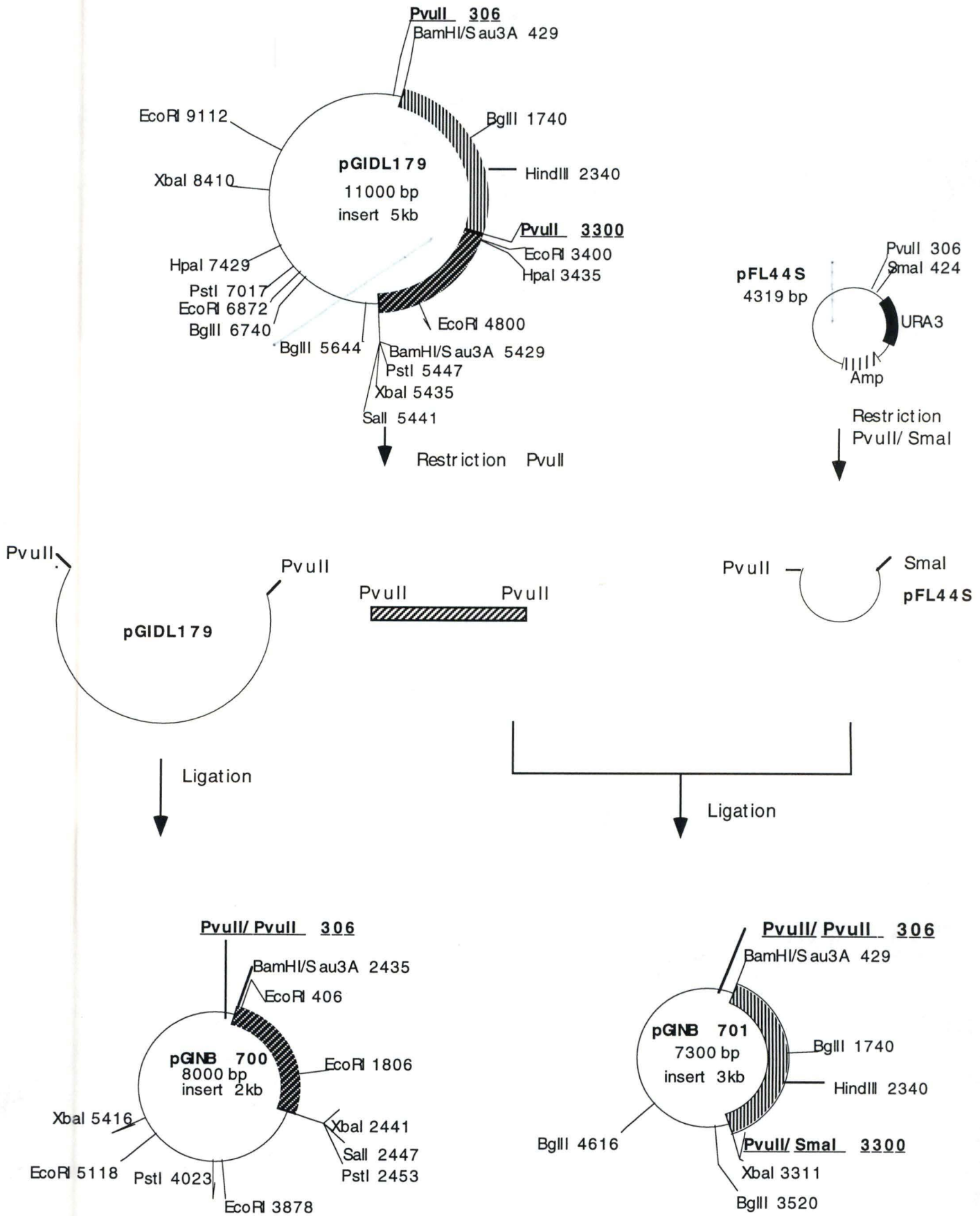
Des gouttes sont déposées sur un milieu MIN.+ampicilline (A) et sur un milieu MIN.+ kasugamycine (B).

-La souche DL101, transformée par le contrôle négatif, pFL44S est résistante à la kasugamycine.

-La souche DL101 transformée par les contrôles positifs, pGIDL301 et pGIDL31.42, est sensible à la kasugamycine.

-La souche transformée par les trois sous-clones (pGINB600, 601 et 602) est résistante à la kasugamycine, le gène est donc disrupté.

fig.15 : Construction des sous-clones pGINB700 et 701



II.2 Clone pGIDL179

II.2.1 Constructions

II.2.1.1 Sous-clone pGINB 700

Le pGIDL 179 est restreint par l'enzyme *PvuII* (fig.15), la matrice de 8000pb est récupéré par la méthode des papiers. La matrice est "liguée" pendant une nuit à 14°C et est ensuite transformée dans la souche XII Blue d' *E.coli*.

Douze colonies sont inoculées une nuit à 37°C dans du milieu LB+ Ampicilline.

Le protocole de minipréparation permet d'isoler l'ADN plasmidique, qui est alors restreint:

	<i>PstI</i>	<i>XbaI</i>
179	9430pb 1570pb	8025pb 2975pb
700	6430pb 1570pb	5025pb 2975pb

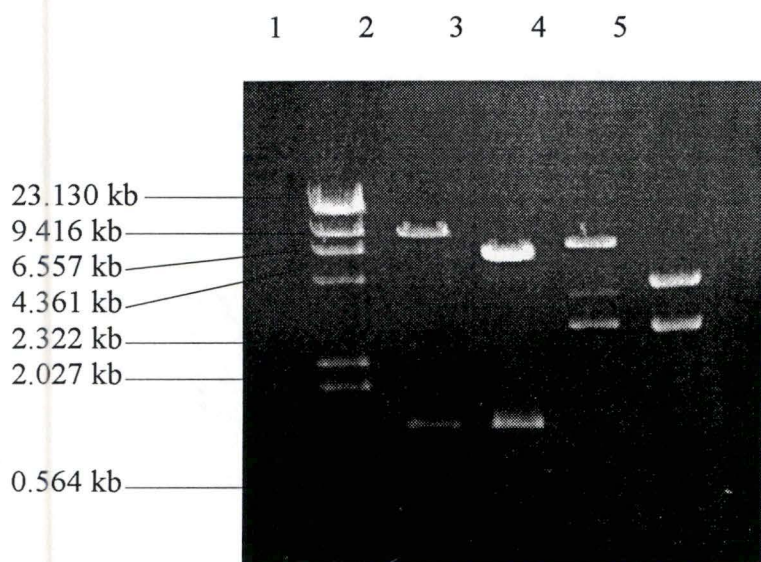
La photo présentée à la fig.16 montre que les fragments attendus sont présents.

II.2.1.2 Sous-clone pGINB701

L'insert de 3000pb, obtenu après restriction *PvuII* du pGIDL179 (fig.15), est récupéré par la méthode des papiers, ainsi que la matrice pFL44S, ouverte en *PvuII-SmaI*.

Les deux fragments d'ADN sont "ligués", puis transformés dans la souche XI1 Blue. Après inoculation de douze colonies, une minipréparation des différentes cultures permet d'obtenir l'ADN plasmidique, qui est alors restreint par *HindIII*

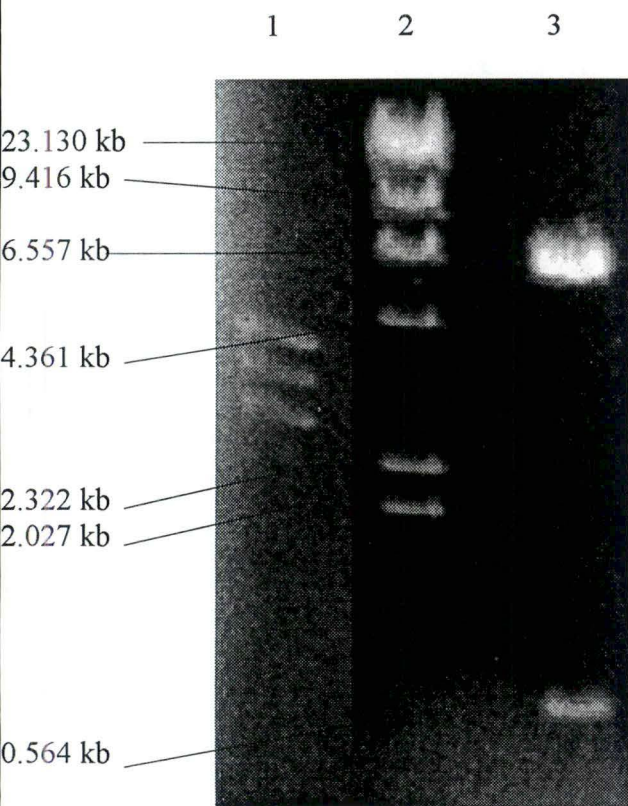
Fig 16 : Restrictions diagnostiques du pGINB700



- Piste 1 : Marqueur de taille λ *Hind*III
Piste 2 : pGINB179 restreint par *Pst*I
Piste 3 : pGINB700 restreint par *Pst*I
Piste 4 : pGIDL179 restreint par *Xba*I
Piste 5 : pGINB700 restreint par *Xba*I

Les fragments diagnostiques de 6430 bp et 1570 bp , pour la restriction *Pst*I et de 5025 pb et 2975 pb , pour la restriction *Xba*I, sont présents dans les pistes 3 et 5.

Fig. 17 : Restriction diagnostique du pGINB701



Piste 1 : pGIDL179 restreint par *Hind*III

Piste 2 : Marqueur de taille λ *Hind*III

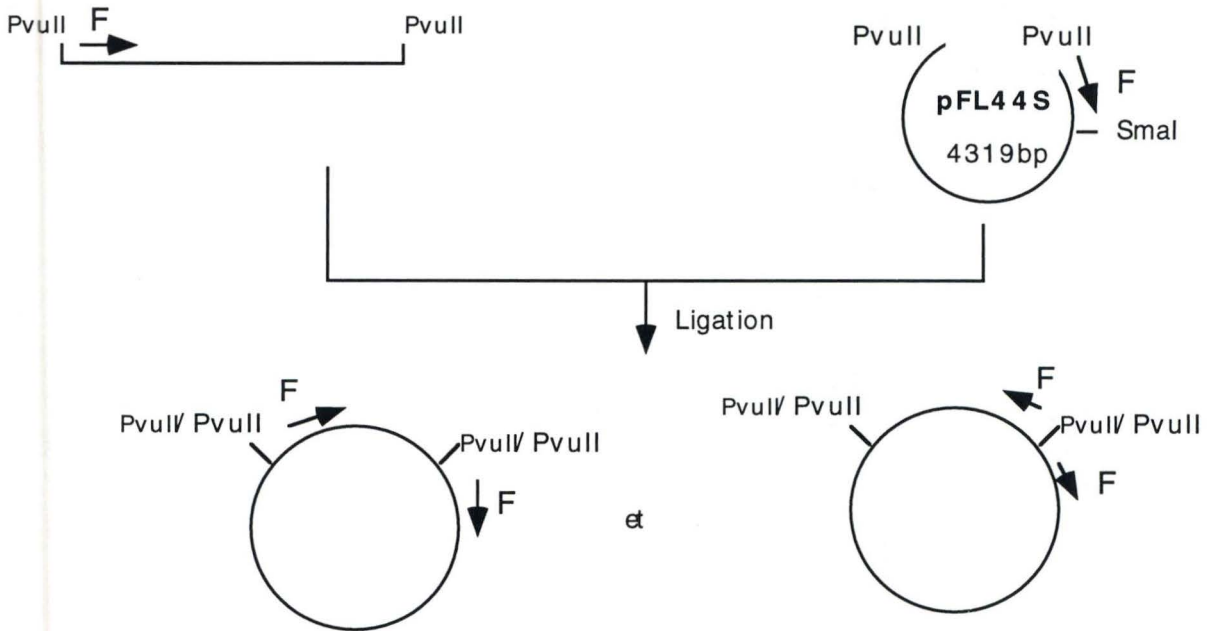
Piste 3 : pGINB701 restreint par *Hind*III

Les fragments de 5800 pb et de 1300 pb diagnostiques du pGINB701, restreint par *Hind*III, sont présents dans la piste 3.

Figure 18: Pourquoi restreindre le pFL44S par *PvuII* et *SmaI*

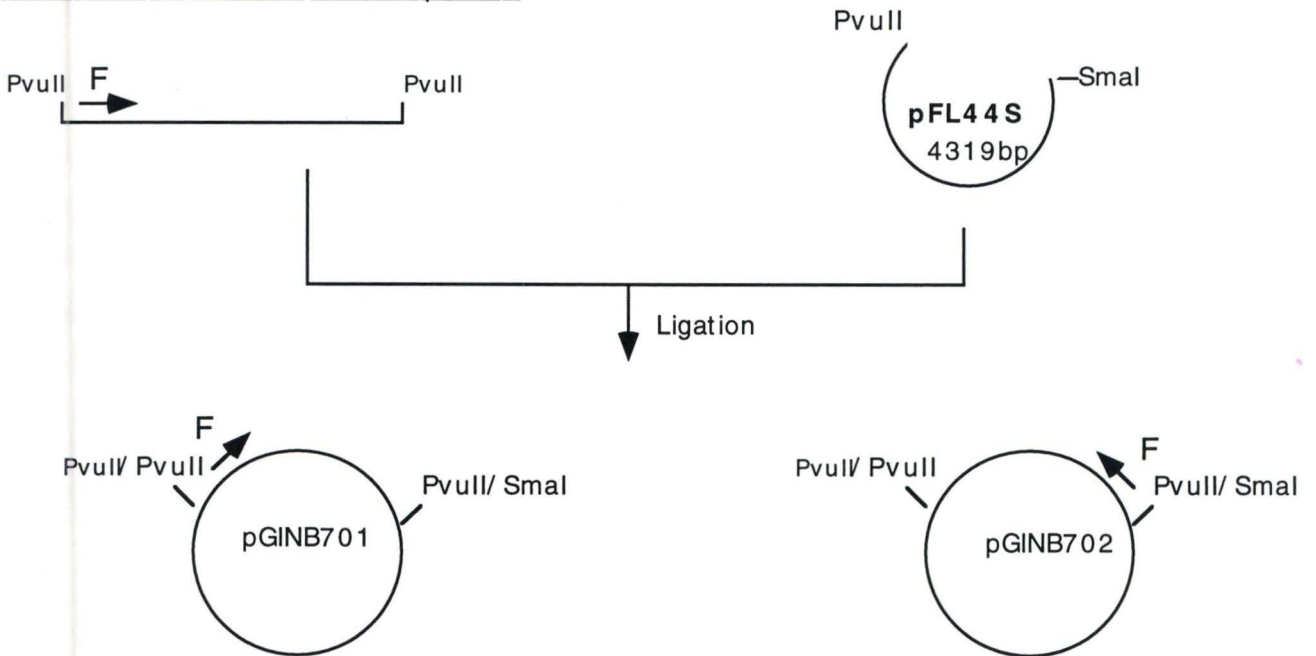


Cas 1: Restriction *PvuII* seule:



La séquence amorcée par les deux primers ne donne pas de séquence lisible

Cas 2: Restriction *PvuII*/*SmaI* du pFL44S



<i>Hind</i> III	
179	4300pb 3549pb 3100pb
701	5800pb 1300pb

La photo présentée à la figure 17 montre que les fragments attendus sont bien présents.

Pourquoi avoir fait une restriction *Pvu*II-*Sma*I du pFL44S et non une restriction *Pvu*II seule ? (fig.18)

Dans l'insert *Pvu*II-*Pvu*II, une partie de la matrice pFL44L est emportée, comprenant le site de fixation du primer Forward (F).

Une restriction *Pvu*II-*Sma*I du pFL44S a été réalisée, pour enlever le site de fixation du primer F sur cette matrice. Après ligation de la matrice pFL44S et de l'insert *Pvu*II-*Pvu*II, un seul site de fixation du primer F est présent, et le séquençage est possible.

Le morceau *Pvu*II-*Pvu*II pouvait se mettre dans les deux sens, car les sites *Pvu*II et *Sma*I sont compatibles. Une seule des deux possibilités a été obtenue (sous-clone pGINB701).

II.2.1.2.1 Tests phénotypiques

Les sous-clones pGINB700 et 701, ainsi que le pGIDL179 et les différents contrôles sont transformés dans la souche DL101, resuspendus dans de l'eau stérile. Des gouttes de 5µl, de ces suspensions sont déposées sur milieu MINA et sur milieu MIN.+kasugamycine.

Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C ; les résultats obtenus sont présentés à la figure 19:

Les sous-clones pGINB700 et 701 sont résistants à la kasugamycine. Le gène est donc disrupté.

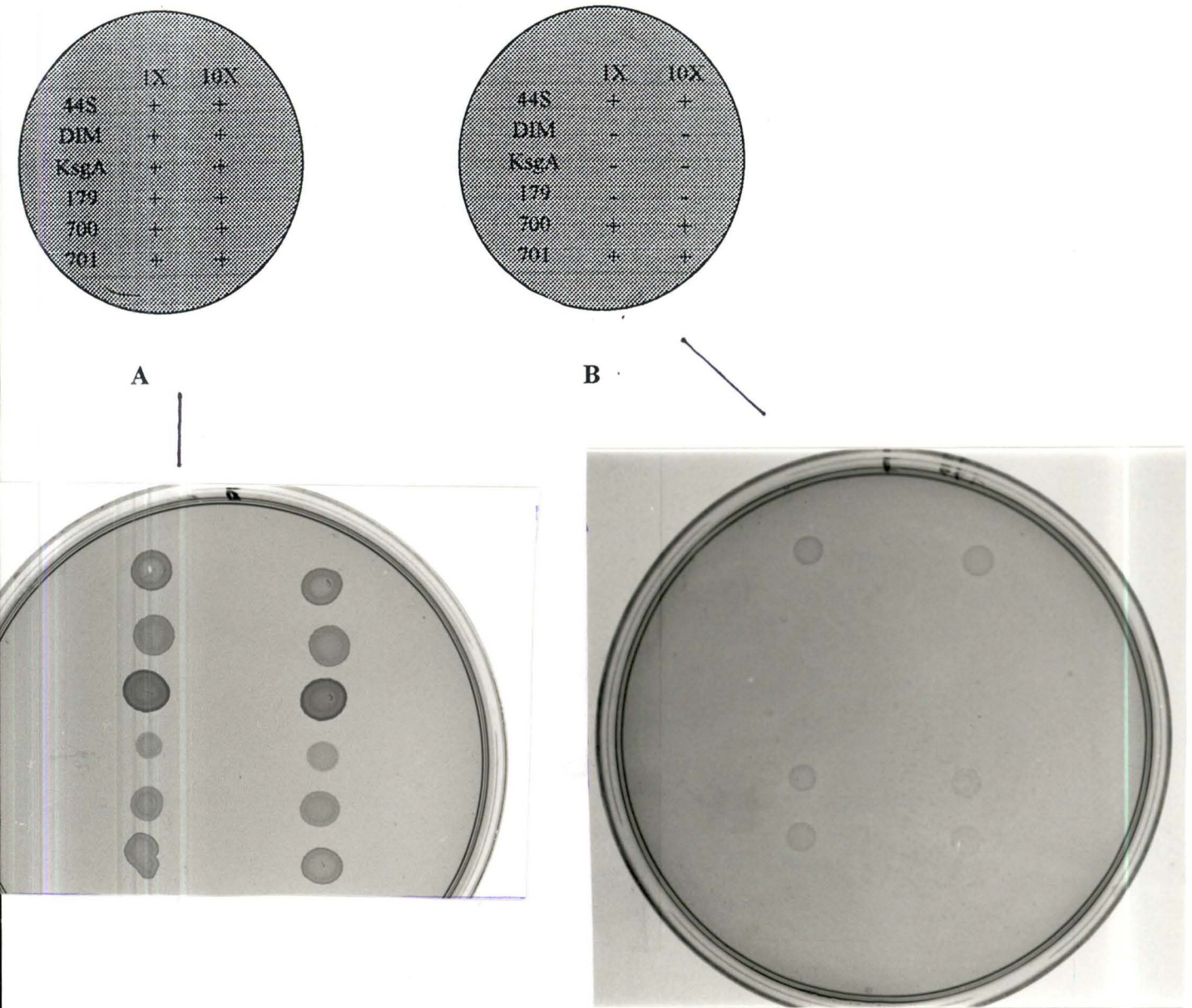
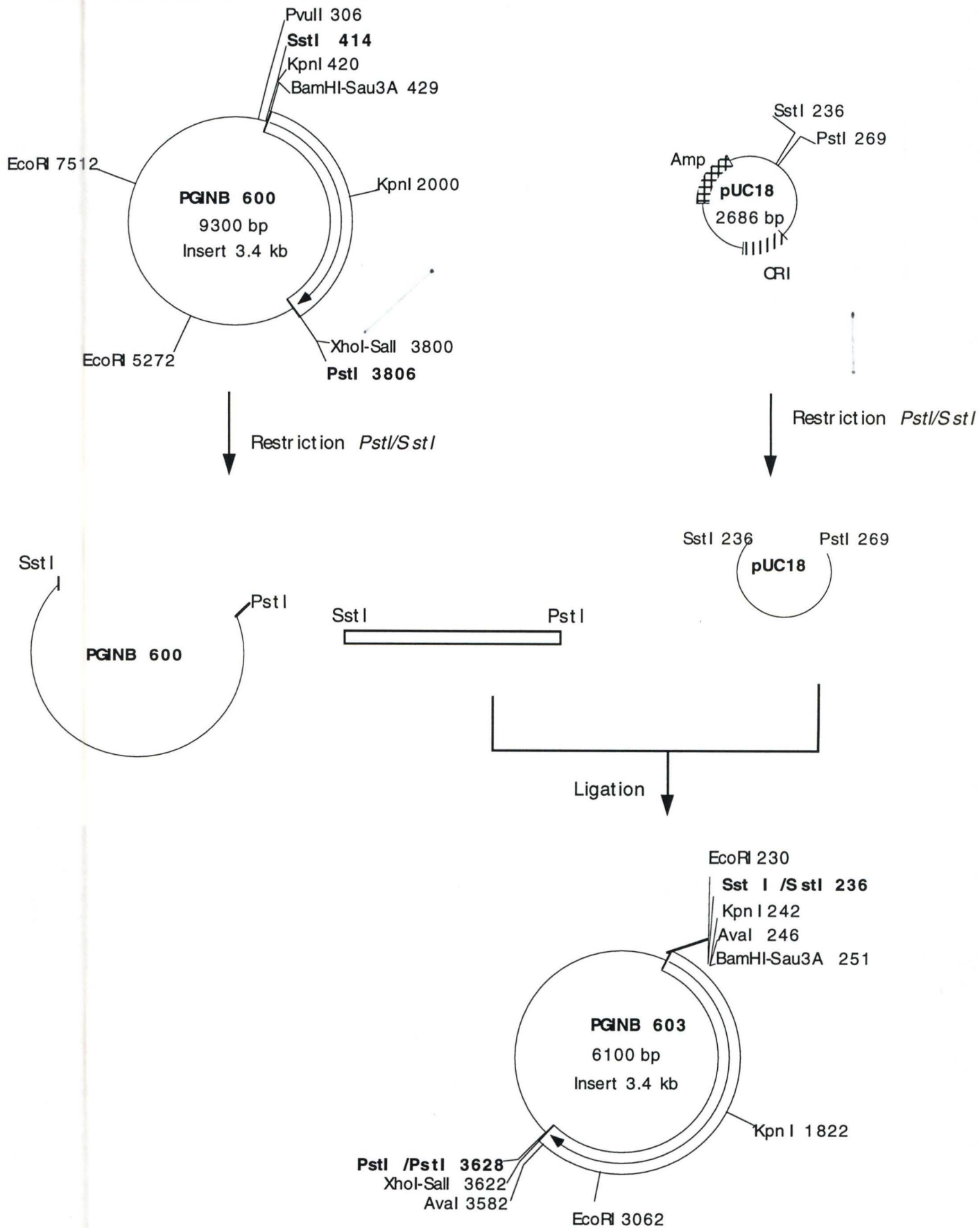


Figure 19: Analyse du phénotype de la souche DL101, transformée par les sous-clones pGINB700 et 701.

Des gouttes sont déposées sur un milieu MIN.+ampicilline (A) et sur un milieu MIN.+ kasugamycine (B).

- La souche DL101, transformée par le contrôle négatif, pFL44S est résistante à la kasugamycine.
- La souche DL101 transformée par les contrôles positifs, pGIDL301 et pGIDL31.42, est sensible à la kasugamycine.
- La souche DL101, transformée par les sous-clones pGINB700 et 701 est résistante dans les deux cas, le gène est donc disrupté.

Fig.20: Construction du sous-clone pGINB603



III. Séquençage

III.1 Transferts des inserts dans des matrices différentes en vue du séquençage

III.1.1 Le pGIDL103

III.1.1.1 Sous-clone pGINB603

Le schéma de la construction est présenté à la figure 20.

Une restriction *PstI-SstI* du pGINB600 est tout d'abord réalisée, ainsi qu'une restriction *PstI-SstI* du PUC18 .

L'insert *PstI-SstI* et la matrice pUC 18 sont récupérés par la méthode des papiers; ils sont alors "ligués" ensemble et transformés dans la souche bactérienne XII Blue d' *E.coli*.

Dans ce cas-ci, le test blanc-bleu peut-être appliqué (matériel et méthodes); les colonies blanches sont inoculées dans du LB+ampicilline à 37°C pendant une nuit.

Une restriction *AvaI* des matériels plasmidiques obtenus après minipréparations , devrait donner les fragments suivants:

	<i>AvaI</i>
603	3336pb 2742pb

Les fragments attendus, comme la photo, présentée à la figure 21 le montre, sont bien présents .

L'insert du sous-clone **pGINB603** correspond à celui du **pGINB600**.(cf schéma général reprenant toutes les constructions)

III.1.1.2 Sous-clone pGINB605

Ce sous-clone est obtenu après restriction du pGINB603 par l'enzyme *KpnI*.(fig.22)

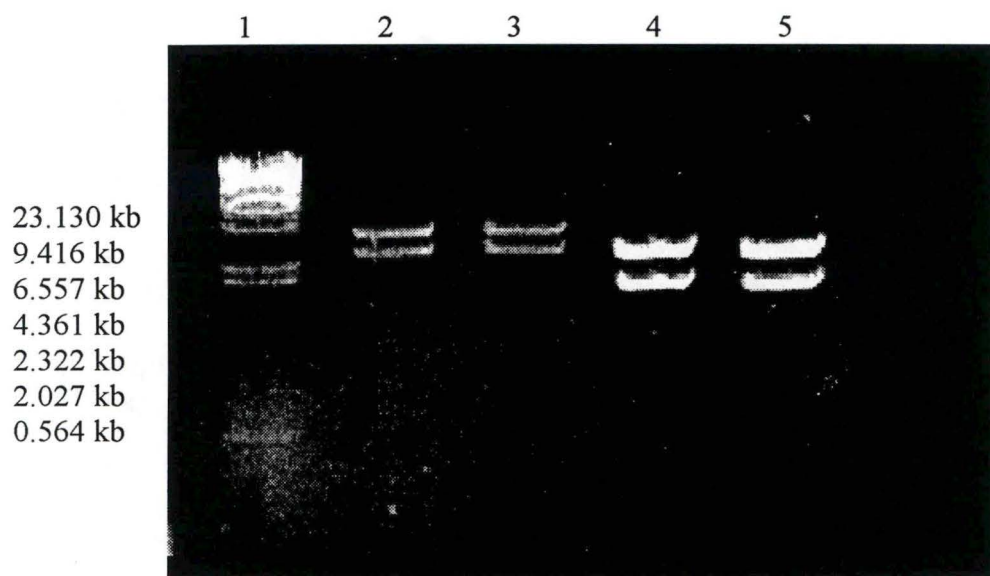
La matrice est récupérée et "reliquée" sur elle-même. Le mélange de ligation est transformé dans la souche XII Blue d' *E.coli*; des colonies blanches sont inoculées dans du LB+ampicilline pendant une nuit à 37°C. Les cultures sont soumises au protocole de minipréparation, leur ADN est soumis à des restrictions diagnostiques: *EcoRI* et *KpnI*.

Les fragments attendus sont:

	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>
605	3248pb 1252pb	4500pb

La photo présentée à la figure 23 montre que les fragments attendus sont bien présents.

fig 21 : Restrictions diagnostiques des sous-clones 603 & 703



Piste 1 : Marqueur de taille λ HindIII
Pistes 2 & 3 : Restriction *AvaI* du pGINB603
Pistes 4 & 5 : Restriction *EcoRI* du pGINB703

Les fragments de 3336 pb et 2742 pb diagnostiques du pGINB603 sont présents dans les pistes 2 et 3.

Les fragments de 3164 bp et 1400 bp diagnostiques du pGINB703 sont présents dans les pistes 4 et 5.

Figure 22: Construction des sous-clones pGINB605 et 607.

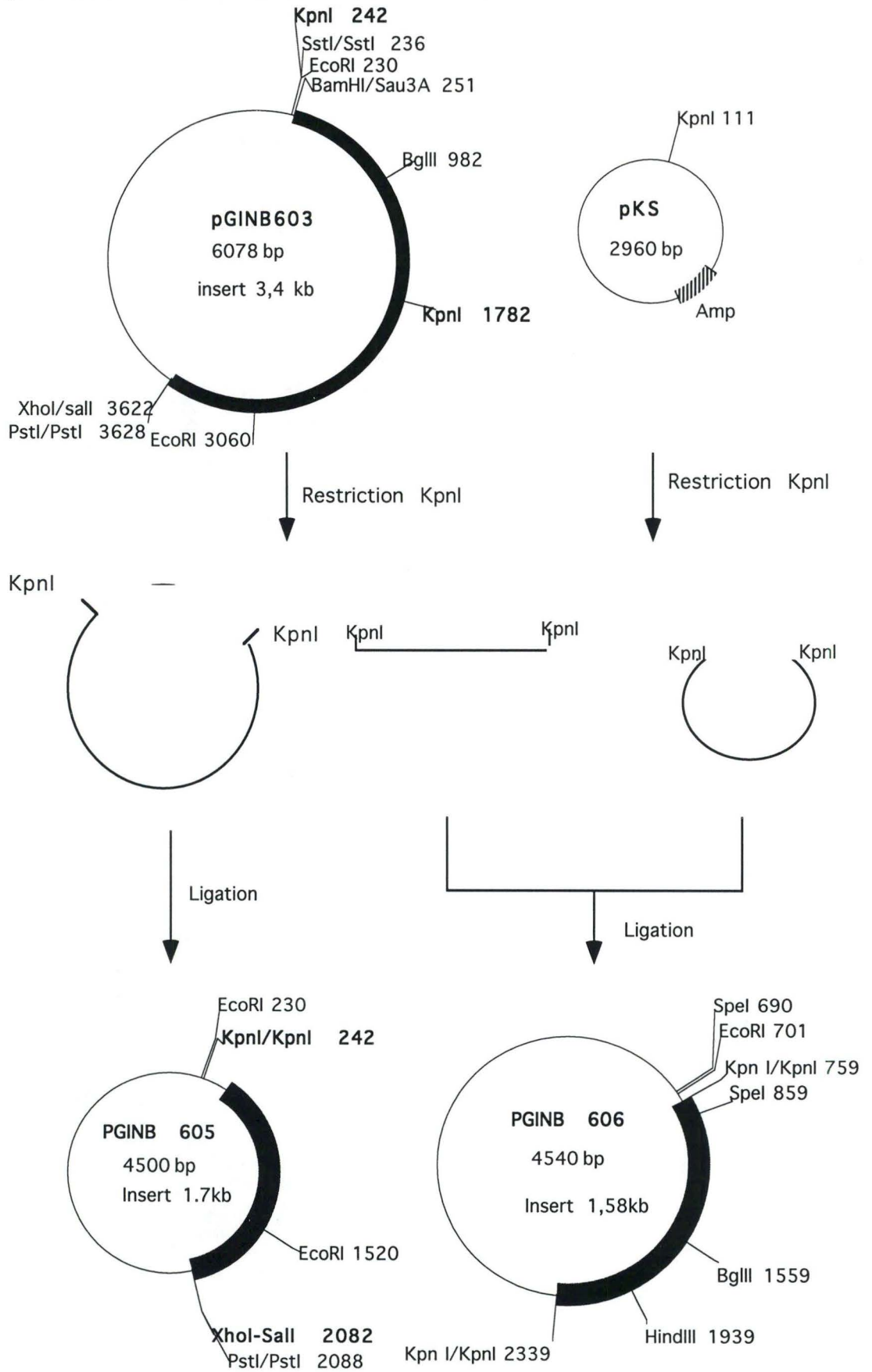
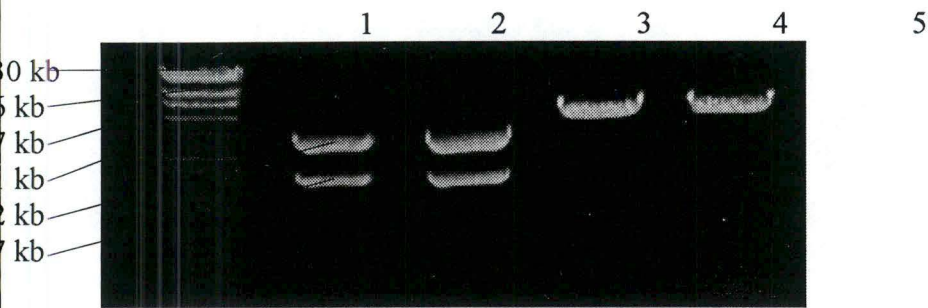


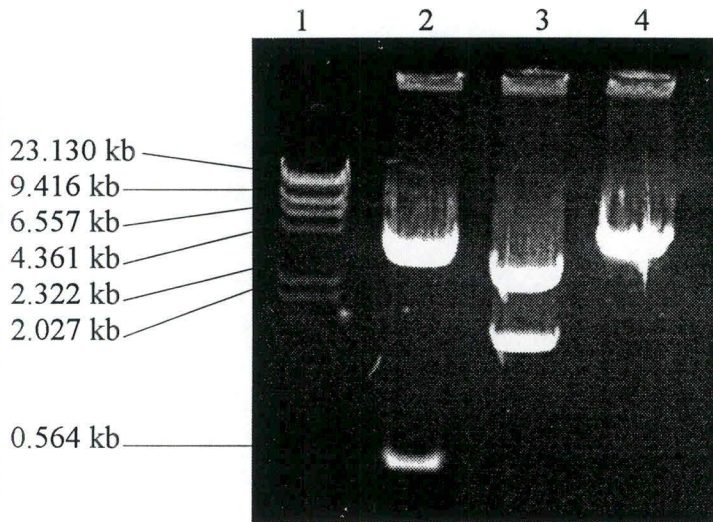
fig 23 : Restrictions diagnostiques du PGINB 605



Piste 1 : Marqueur de taille λ *HindIII*
Pistes 2 et 3 : Restriction *EcoRI* du pGINB605
Pistes 4 et 5 : Restriction *KpnI* du pGINB605

Les fragments attendus, pour diagnostiquer le pGINB605, sont présents sur les pistes 2 à 5.

fig 24 : Restrictions diagnostiques du pGINB607



Piste 1 : Marqueur de taille λ *HindIII*

Piste 2 : pGINB607 restreint *BglII/EcoRI*

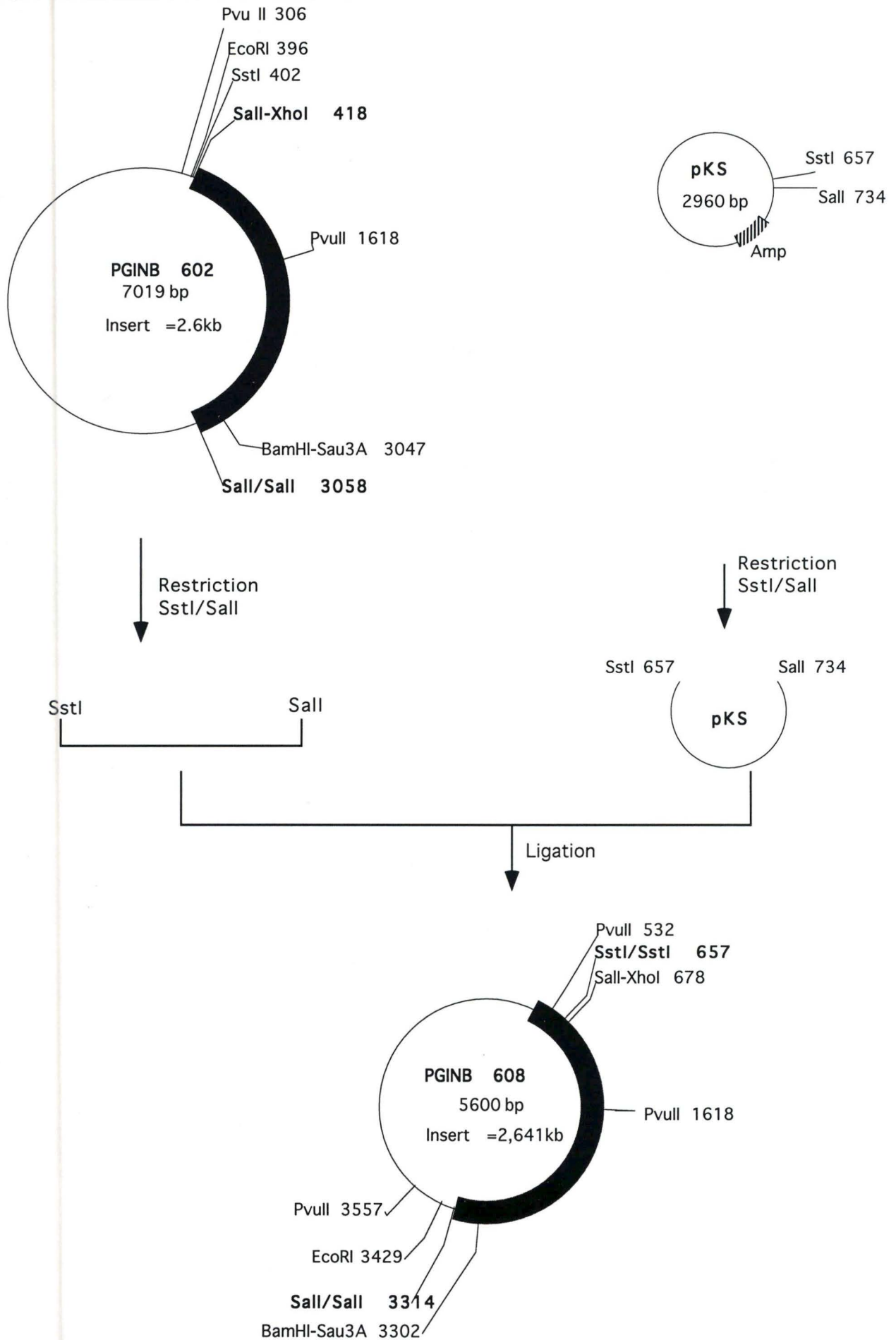
Piste 3 : pGINB607 restreint *KpnI*

Piste 4 : pGINB607 restreint *SpeI*

Les fragments obtenus dans les trois restrictions diagnostiques montrent que le sous-clone obtenu est le pGINB607.

Les fragments de 3686 pb et de 852 pb, obtenus pour la restriction *BglII/EcoRI*, de 2940 pb et de 1600 pb, obtenus pour la restriction de *KpnI*, de 4364 pb, obtenus pour la restriction *SpeI*, diagnostiques du pGINB607, sont présents aux pistes 2, 3 et 4.

fig.25: Construction du sous-clone pGINB608



III.1.1.3 Sous-clone pGINB607

L'insert de 1600 pb obtenu après restriction *KpnI* du pGINB603 et la matrice pKS ouverte en *KpnI* sont récupérés par la méthode des papiers et "ligués". La ligation est transformée dans la souche Sure (matériel et méthodes) d'*E.coli*.

Deux types de constructions peuvent se présenter: l'insert pouvant se mettre dans les deux sens et donner pGINB606 et 607.(fig.22)

Pour identifier les sous-clones, des restrictions sont effectuées:

	<i>BglIII/EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	<i>SpeI</i>
606	3686pb 852pb	2940pb 1600pb	3564pb 976pb
607	3686pb 852pb	2940pb 1600pb	4364pb 176pb

La figure 24 montre que les fragments obtenus sont ceux correspondant au sous-clone pGINB607.

III.1.1.4 Sous-clone pGINB608

Une restriction *SstI-SalI* du pGINB602, ainsi que du pKS ont permis cette construction.(fig.25)

L'insert et la matrice pKS sont récupérés, "ligués" et transformés dans la souche Sure d'*E. coli*.

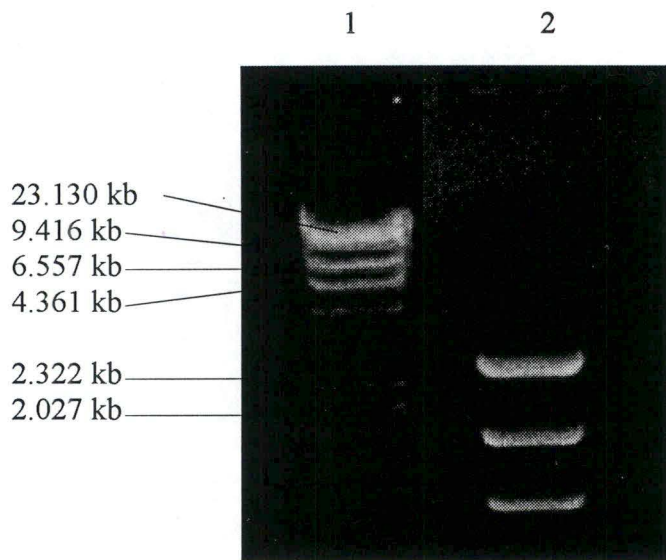
L'ADN obtenu après minipréparation est soumis à la restriction *PvuII*:

	<i>PvuII</i>
608	2575pb 1939pb 1086pb

La photo présentée à la figure 26 montre que les fragments attendus sont bien présents.

L'insert du sous-clone pGINB608 correspond à celui du pGINB602.

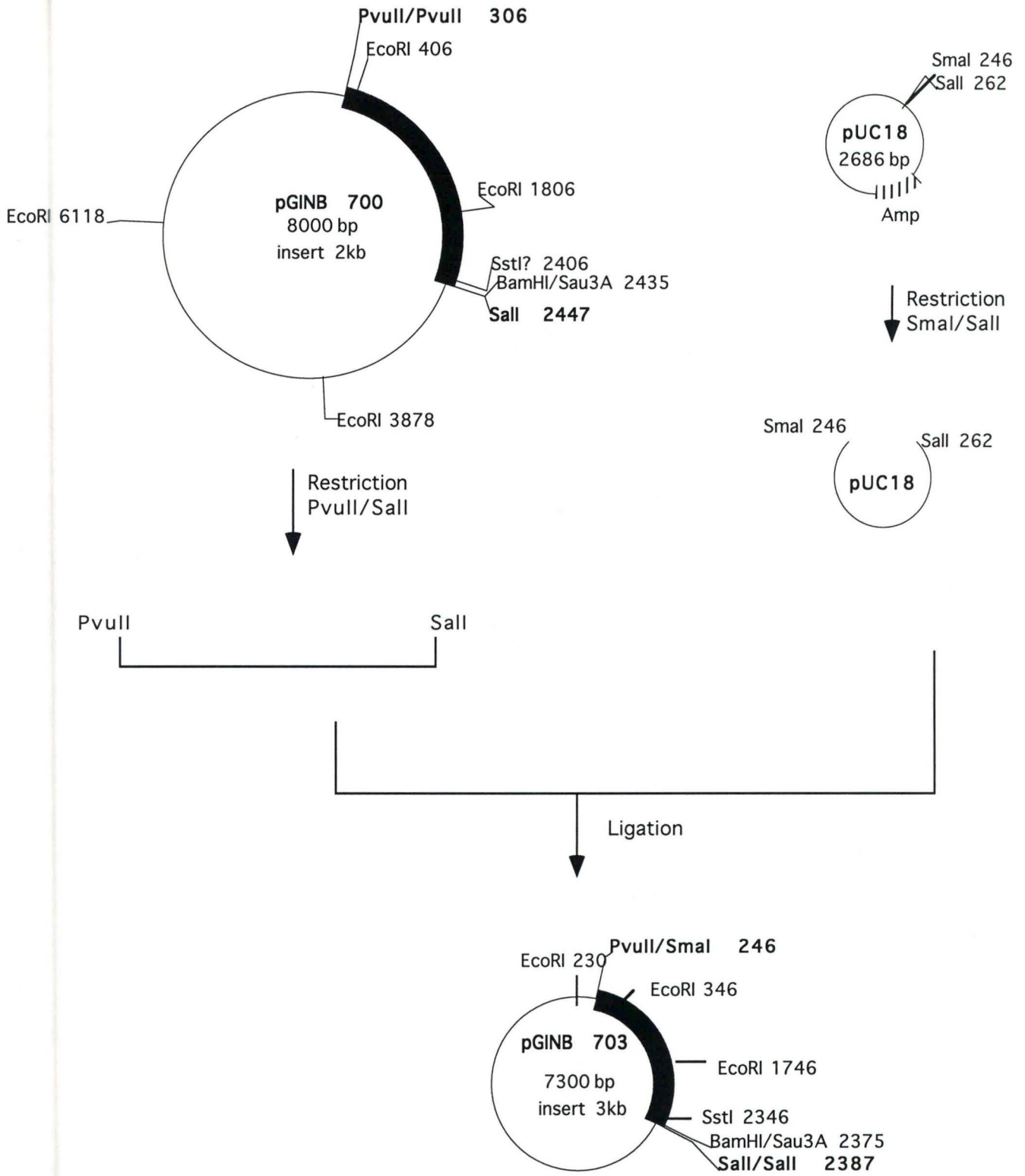
fig 26 : Restrictions diagnostiques du pGINB608



Piste 1 : Marqueur de taille λ *HindIII*
Piste2 : pGINB608 restreint *PvuII*

Les fragments de 2090 bp, 1970 pb, et 1630 pb présents dans la piste 2, prouvent l'existence du pGINB608.

Fig.27:Construction du pGINB703



III.1.2 Le pGIDL179

III.1.2.1 Sous-clone pGINB703

Le sous-clone pGIDL700 est restreint par les enzymes *PvuII* et *Sall*; la matrice pUC18 est restreinte par *Sall* et *SmaI*.(fig.27)

Les deux fragments d'ADN sont récupérés par la méthode des papiers, "ligués" pendant une nuit à 14°C, et la ligation est ensuite transformée dans la souche XII Blue d'*E.coli*.

Le test blanc-bleu est effectué (matériel et méthodes).

Douze colonies blanches, obtenues sur milieu AXI (matériel et méthodes) sont inoculées dans du LB+ampicilline pendant une nuit.

Un volume de 1.5ml de chaque culture est soumis au protocole de minipréparation.

L'ADN plasmidique obtenu est restreint, et les fragments à obtenir sont présentés dans le tableau ci-dessous:

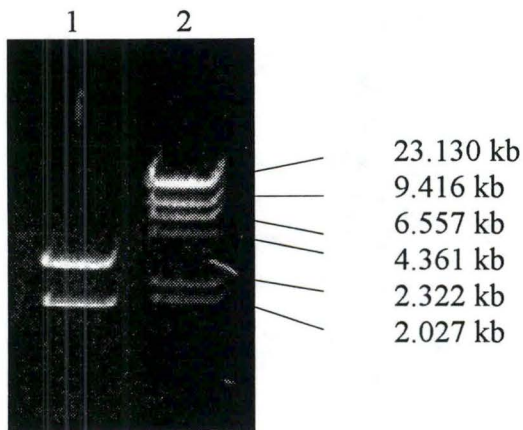
	<i>EcoRI</i>	<i>SstI</i>
pGINB703	3164pb	2686pb
	1400pb	1984pb
	116pb	

La photo présentée à la figure 21 montre que les fragments attendus pour la restriction *EcoRI* du pGINB703 sont obtenus.

La figure 28 présente la restriction *SstI* de ce sous-clone et montre que les fragments attendus sont bien obtenus.

L'insert du sous-clone pGINB703 correspond à celui du pGINB700.

fig 28 : Restriction du pGINB703

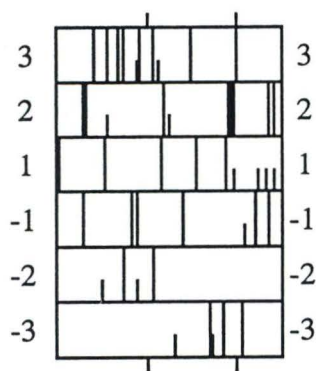
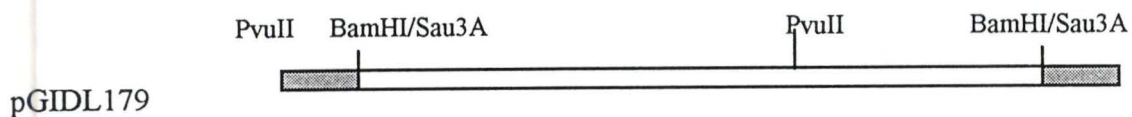


Piste 1 : Restriction SstI du pGINB703

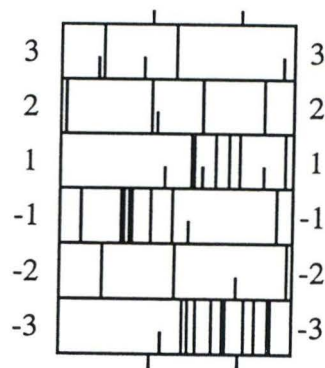
Piste 2 : Marqueur de taille λ HindIII

Les fragments de 2686 pb, et de 1984 pb, sont présents dans la piste 1, et prouvent l'existence du pGINB703.

Figure 29: Le plasmide pGIDL179 et la stratégie de séquençage



A.



B.

Figure 30. Représentation des phases ouvertes de lectures présentes dans les 6 phases de potentielles traduction des fragments séquencés.

A. les 250 pb séquencées pour le pGINB701

B. les 260 pb séquencées pour le pGINB703

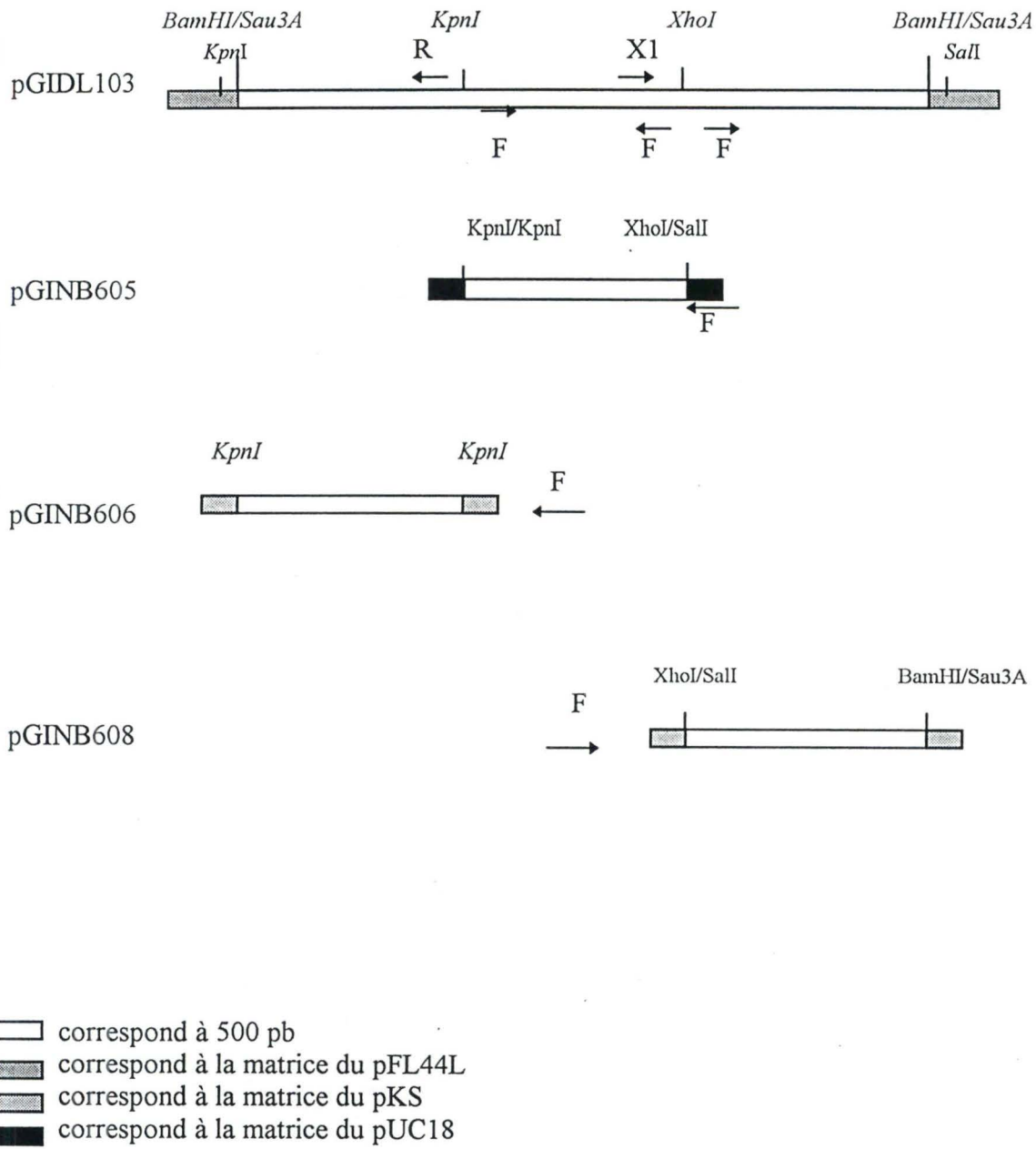


Figure 31: Le plasmide pGIDL103, ses sous-clones et la stratégie de séquençage

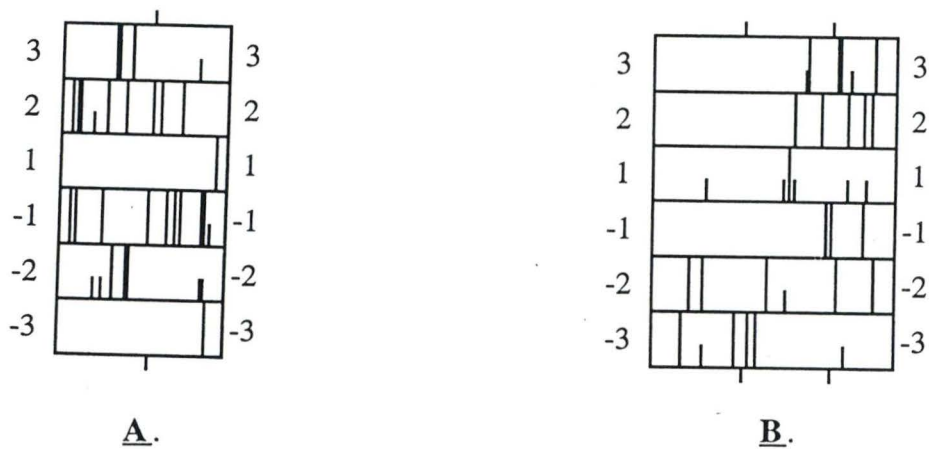


Figure 32. Représentation des phases ouvertes de lectures présentes dans les 6 phases potentielles de traduction des fragments séquencés.

- A. les 184 pb séquencées pour le sous-clone pGINB605
- B. les 271 pb séquencées pour le sous-clone pGINB607

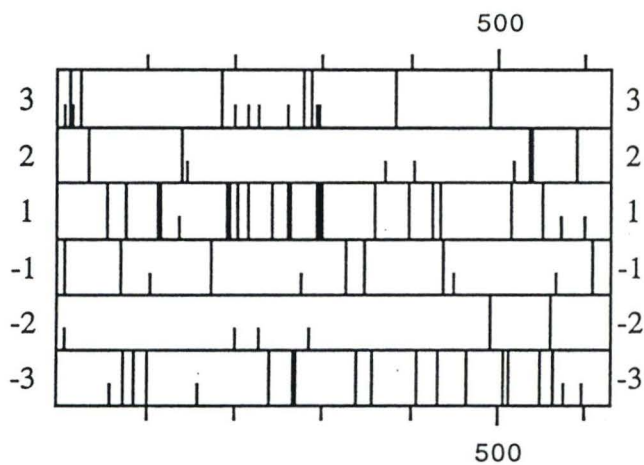


Figure 33. Représentation des phases ouvertes de lectures présentes dans les 6 phases potentielles de traduction du fragment d'ADN autour du site *Xho*I de l'insert du pGIDL103

III.2 Analyse des résultats de séquence

III.2.1 Le pGIDL179

En ce qui concerne le plasmide pGIDL179, le séquençage des sous-clones pGINB701 et 703 a été partiellement réalisé.

Le sous-clonage en vue du séquençage est représenté à la figure 29. La représentation des phases ouvertes de lecture obtenues à partir du séquençage partiel des deux sous-clones pGINB701 et 703, est présentée à la figure 30.

Les séquences protéiques et nucléiques ont été comparées avec toutes les séquences actuellement disponibles de la banque de données de l'EMBL. Aucune homologie n'a été révélée par ces comparaisons; cette séquence partielle est inconnue, le séquençage de l'insert devra être poursuivi.

III.2.2 Le pGIDL103

La figure 31 présente l'insert d'ADN génomique de levure contenu dans le pGIDL103, ainsi que la manière dont le séquençage a été entrepris, autour des sites *KpnI* et *XhoI*.

III.2.2.1 Séquençage autour du site *KpnI*

Les séquences partielles des sous-clones pGINB605 et pGINB607, du côté du site *KpnI*, ont été obtenues en utilisant les primers universels R pour le pGINB605 et F pour le pGINB607.(fig.31) Leurs phases ouvertes de lecture sont présentées à la figure 32 .

Les séquences nucléiques, ainsi que les 6 phases protéiques mises à la suite l'une de l'autre (fonction pepdata du package GCG) ont été comparées avec les séquences de la banque de données de l'EMBL. Aucune homologie n'a été mise en évidence.

III.2.2.2 Séquençage autour du site *XhoI*

Les séquences partielles des sous-clones pGINB605 et pGINB608 ont été obtenues en utilisant le primer universel F (fig.31). Le site de fixation de ce "primer" se situe sur le plasmide. En utilisant ce "primer", on séquence donc partiellement la matrice, juste en bordure de l'insert.

Nous avons obtenu deux séquences , comprenant chacune une partie de matrice; cela nous a permis situer le début de l'insert dans les deux cas, et de pouvoir réunir les deux séquences.

Pour s'assurer de la fusion correcte de ces deux séquences, un "primer" (X1) , dont la séquence est complémentaire à un fragment de séquence du pGINB605, a été utilisé pour séquencer la région autour du site *XhoI* de l'insert d'ADN du plasmide pGIDL103.

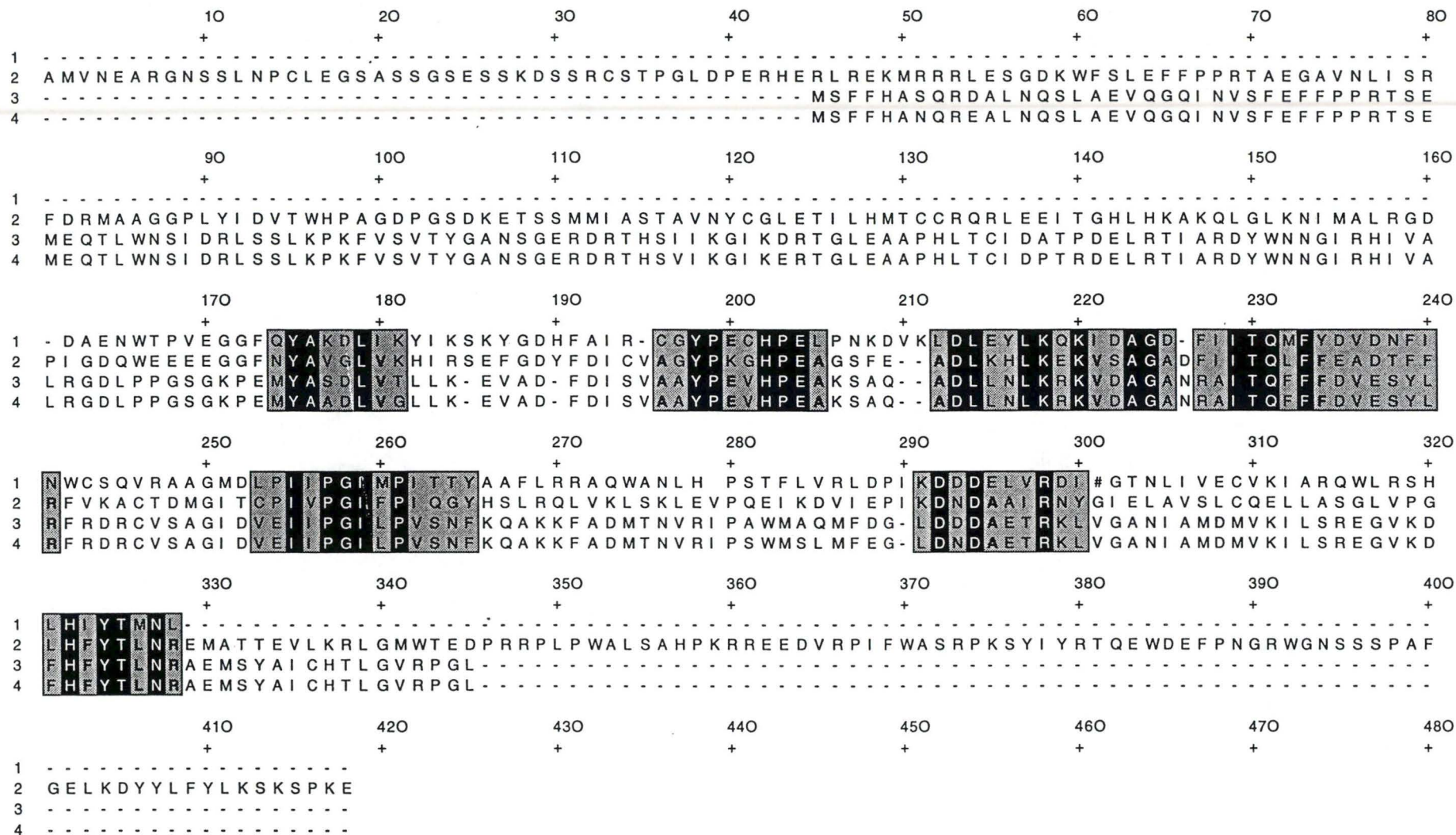


Figure 34. Aligement MATCHBOX des séquences MTF SCER (1), HSU (2), MTEFCOLI (3) et METFSALTY (4)

Le logiciel matchbox met en évidence des séquences en acides aminés structurellement conservées entre les 4 protéines.

Les acides aminés représentés en noir sont identiques.

Les acides aminés représentés en gris sont similaires.

La carte des phases ouvertes de lecture obtenue avec la fusion des deux séquences partielles des plasmides pGINB605 et 608, est présentée à la figure 33.

Les traductions en acides aminés de la phase 2 et de la phase -2 ont été comparées aux séquences contenues dans la banque de données de l'EMBL. Deux séquences protéiques de méthylènetétrahydrofolate réductases présentent un pourcentage d'homologie et d'identité élevé avec la traduction en acide aminés de la phase -2 de l'insert du plasmide pGIDL103, soit la **MTF SCER**.

La protéine d'*E.coli* (METFCOLI, code d'accès dans la banque de données de l'EMBL = P00394) présente une homologie de 52.4% et un pourcentage d'identité de 30.6% avec la séquence MTF SCER.

La méthylènetétrahydrofolate réductase de *Salmonella typhimurium* (code d'accès dans la banque de données= P11003) présente un pourcentage d'homologie de 51.9% et un pourcentage d'identité de 27.2% avec la séquence MTF SCER.

Pour s'assurer que ces pourcentages ne sont pas dus au hasard, nous avons été rechercher les séquences d' *E.coli* et de *Salmonella typhimurium* dans la banque (fonction fetch du programme GCG), pour les recomparer avec la séquence, après un mélange aléatoire de celle-ci (fonction shuffle et gap du programme GCG).

Les pourcentages d'identité et de similarité, obtenus après mélange de la séquence sont inférieurs et montrent que les résultats obtenus ne sont pas dus au hasard

Des séquences de méthylènetétrahydrofolates réductases disponibles dans la banque de données de l'EMBL ont été recherchées (fonction stingsearch du package GCG), pour effectuer une comparaison multiple et rechercher d'éventuelles séquences consensus entre les protéines.

La comparaison a été effectuée entre la séquence MTF SCER (*S. cerevisiae*), et trois séquences de méthylènetétrahydrofolate réductases , à savoir METFCOLI (*E.coli*), HSU (human), ainsi que METFSALTY (*Salmonella typhimurium*)

Le logiciel MATCHBOX a été utilisé. Ce logiciel tient compte des caractéristiques physico-chimiques des acides aminés des différentes séquences comparées et regroupe en "box" les acides aminés formant une région structurale conservée (fig.34).

Il est clair que le plasmide pGIDL103 code vraisemblablement pour une méthylène tétrahydrofolate réductase!

**Résumé
Discussion
Perspectives**

Résumé

Deux clones "suppresseurs" de la mutation *ksgA*- d'*E.coli* ont été isolés, dans le cadre du clonage du gène *DIM1* de *S. cerevisiae*. (Lafontaine *et al.*, 1994)

Ils restaurent la sensibilité à la kasugamycine, chez le mutant d'*E.coli*, sans pour autant restaurer la diméthylation des deux adénines en position 1518 et 1519 de l'ARNr 16S.

Dans le but d'éclaircir le mécanisme responsable de la suppression du phénotype de résistance, des tests de perméabilité cellulaire et de résistance à la kasugamycine et à l'érythromycine ont été accomplis. Ils ont montré que les deux plasmides procuraient un phénotype différent au mutant *ksgA*-.

Pour localiser le gène dans les deux inserts, plusieurs sous-clones ont été construits, puis testés pour leur capacité à restaurer ou non *in vivo* la sensibilité du mutant *ksgA*- à l'antibiotique.

Les analyses des séquences partielles du pGIDL179 (250 et 260pb) n'ont pas révélé de similitude significative avec les séquences contenues dans la banque de données de l'EMBL. Le séquençage demande à être poursuivi. Par contre, une homologie entre une ORF de 450pb du pGIDL103 et des méthyltétrahydrofolates réductases est apparue. Un mécanisme biochimique est suggéré, qui rend compte de la suppression phénotypique de la résistance à la kasugamycine par le plasmide pGIDL103.

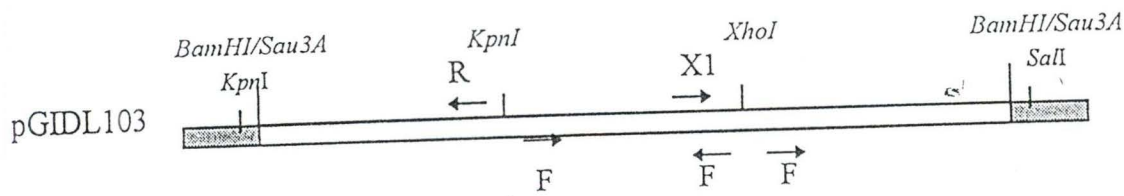


Fig 1: Le plasmide pGIDL103 et la stratégie de séquençage

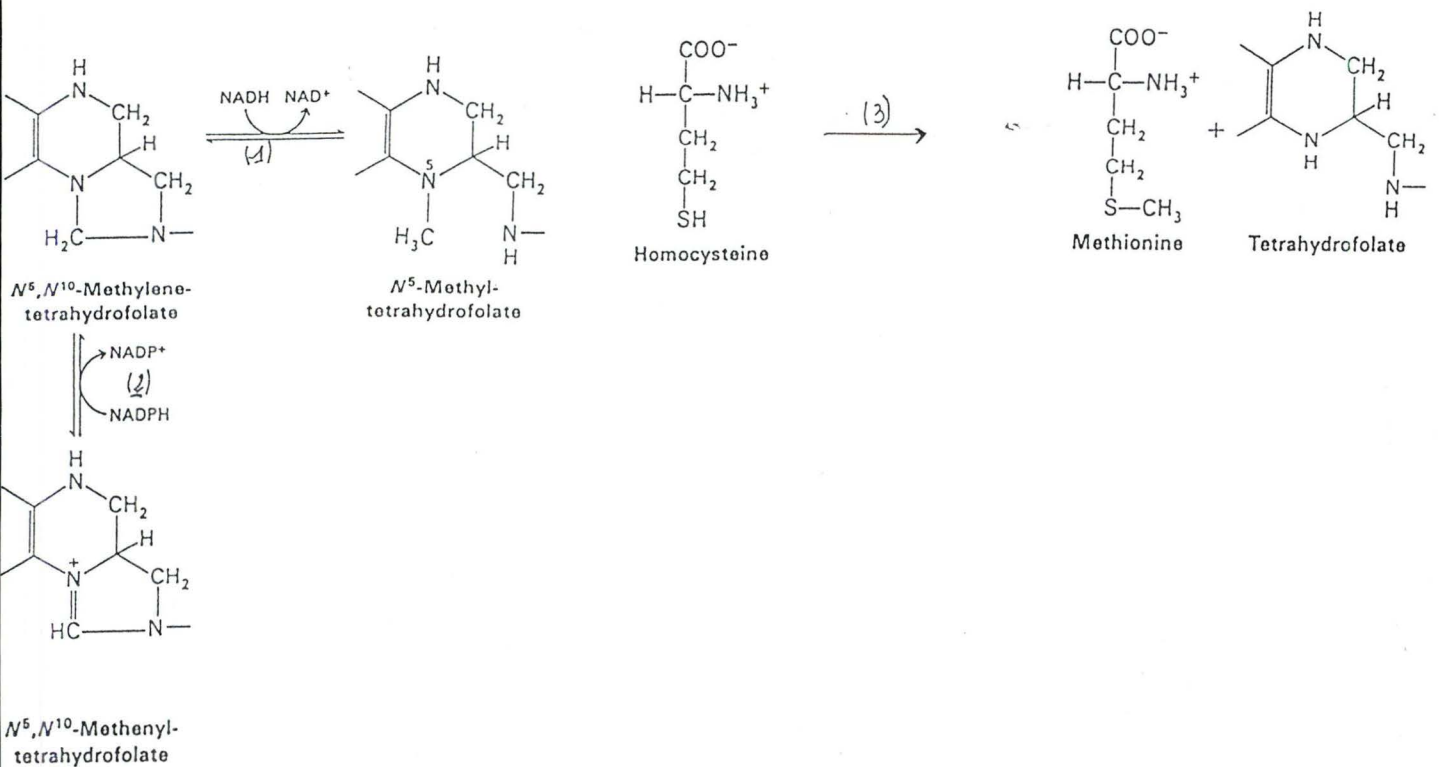


Figure 2 :

Le N5N10 méthylène tétrahydrofolate peut être oxydé en N5N10 méthényl tétrahydrofolate (2), ou réduit en N5-méthyltétrahydrofolate (1). La méthylène tétrahydrofolate réductase est responsable de cette réaction. Le méthyl tétrahydrofolate permet la synthèse de la méthionine, par transfert du groupement CH3 du N5-méthyl tétrahydrofolate sur l'homocystéine (3). Cette réaction est catalysée par une homocystéine méthyl transférase.

Discussion

L'analyse des résultats du séquençage partiel du clone pGID103 a révélé une première ORF, située autour du site *XhoI* (fig.1), présentant une forte homologie avec des séquences de méthylène-tétrahydrofolate réductases, ainsi qu'une deuxième ORF, située à 1800pb de la première, autour du site *KpnI* (fig.1), mais ne présentant aucune homologie avec les séquences contenues dans la banque de données de l'EMBL.

I. Qu'est-ce que la méthylène-tétrahydrofolate réductase?(MTR)

Ces enzymes interviennent dans la synthèse de la méthionine. Elle catalyse la réaction de synthèse du N⁵-méthyl-tétrahydrofolate à partir du N⁵N¹⁰-méthylène-tétrahydrofolate. Ce N⁵-méthyl-tétrahydrofolate est lui-même un précurseur de la méthionine (fig.2) (Saint Girons *et al.*, 1983) Le tétrahydrofolate est un porteur de carbone à différents étages d'oxydation. Le groupement carboné porté par la molécule est lié à un de ses atomes d'azote (5 ou 10, ou les deux).

II. Comment expliquer la restauration du phénotype de sensibilité?

La MTR est une méthyltransférase intervenant dans la synthèse de la méthionine, précurseur de S-adenosylméthionine (SAM) , elle-même donneur de méthyle de la diméthyltransférase.

A priori l'effet suppresseur pourrait résulter d'une méthylation aspécifique induite par la MTR sur les adénines cibles de la diméthylation authentique. Ceci n'est pas le cas, comme montré lors du profil en HPLC de l'ARNr 16S issu des mutants *ksgA*- contenant les plasmides "suppresseurs" (fig.1 des résultats).

On peut proposer que la MTR surexprimée, pourrait augmenter le "pool" de SAM, ce qui secondairement induirait des méthylation non spécifiques de diverses autres méthylases sur le ribosome, le transconformant de telle sorte que le site d'action de la kasugamycine est, dans une certaine mesure, restauré, et dès lors le sensibilise à cet antibiotique.

Le genre de mécanisme de transconformation ribosomique, modifiant un même site ribosomique donné via l'interaction d'agents dont l'action spécifique particulière est distincte est concevable et a été reconstruit:

l'introduction d'un gène *ermR* chez le mutant *ksgA*- de *E.coli* (Suvorov *et al.*, 1988).

Pour rappel, l'introduction de gène diminuait sensiblement la résistance pour la kasugamycine, cette diminution de résistance étant due à une méthylation de l'ARNr 23S.

Ajoutons qu'on ne peut exclure qu'un autre gène que MTR présent dans l'insert du pGIDL103 intervienne dans la suppression phénotypique. Cette intervention n'est cependant pas suffisante pour obtenir une suppression. En effet, le pGINB600, contenant complètement la deuxième ORF autour du site *KpnI*, ne restaure pas le phénotype de sensibilité (point II.1.1.1).

Perspectives

Les études supplémentaires porteront sur le pGIDL103.

1) Poursuite du travail chez *E.coli*

La vérification d'un effet additionnel possible d'une deuxième ORF de l'insert du pGIDL103 devra être réalisée:

D'une part, par la création d'un sous-clone, amputé du fragment *KpnI-KpnI* de l'insert du pGIDL103. Si le plasmide, transformé dans le mutant *ksgA-* d'*E.coli* restaure toujours la sensibilité à la kasugamycine, c'est que la deuxième séquence n'a pas d'effet additionnel.

En parallèle, la finalisation du séquençage du gène de MTR de *S.cerevisiae*, suivie de son sous-clonage, ainsi que de sa transformation dans le mutant *ksgA-* d'*E.coli*, permettra de découvrir si cette ORF suffit à restaurer le phénotype de sensibilité du mutant.

2) Chez *S.cerevisiae*:

Après sporulation du mutant diploïde *dim1::URA3/DIM1; ura3/ura3* (disponible au laboratoire (Lafontaine *et al.*, 1994)), l'analyse des tétrades révèle que deux spores, contenant l'allèle *DIM1* sont viables; les deux autres contiennent le gène *dim1* disrupté et ne sont pas viables.

La transformation du mutant de levure par le pGIDL103, suivie de l'analyse des tétrades permettra de savoir si le gène codant pour la MTR est supprimeur du phénotype de la mutation *dim1::URA3*.

Une disruption du gène de MTR chez la levure nous informera sur son essentialité.

La recherche de partenaires éventuels pourra également être réalisée par la technique du double hybride (Fields and Sternglanz, 1994; Plessis et Camonis, 1994).

Matériel et méthodes

Matériels et méthodes

I. Tampons et solutions.

Toutes les solutions et milieux ne contenant pas d'éléments thermolabiles sont autoclavés (20 minutes à 120°C). Les solutions non mentionnées sont celles dont la composition n'est pas détaillée dans les kits commerciaux.

I.1 Tampons.

High salt buffer:

TrisHCl pH 7,5	20 mM
EDTA (Merck)	1 mM
NaCl (Merck)	1,5 M

PBS 10X:

KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,2%
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (Merck)	1,44%
NaCl (Merck)	8%
KCl (UCB)	0,2%

Ajuster à pH 7,4 avec NaOH ou KOH.

Tampon de ligation 5 x (BRL):

TrisHCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM

Tampon N2 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	0.9 M

pH 6.3

Tampon N3 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1.15 M

pH 6.3

Tampon N5 (Nucleobond):

Tris / H ₃ PO ₄	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1 M

pH 8.5

Tampon S1 (Nucleobond):

TrisHCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

Autoclaver et ajouter une solution de RNaseA à une concentration finale de 400 µg/ml.

Tampon S2 (Nucleobond):

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Ne pas autoclaver.

Tampon S3 (Nucleobond):

KAc pH 5.2	2.8 M
------------	-------

Ne pas autoclaver.

Tampon TBE:

TrisHCl	108 gr
acide borique	55 gr
EDTA 0,5M	40 ml

Porter à 1l pour TBE 10X.

Porter à 10l pour TBE 1X.

Tampons de restriction

1) Tampons BOEHRINGER:

Composants	Concentration (mM/l)				
	A	B	L	M	H
Tris acétate	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50
Mg-acétate	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K-acétate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
Dithioerythritol(DTE)	-	-	1	1	1
Dithiothreitol(DTT)	0.5	-	-	-	-
2-Mercaptoethanol	-	1	-	-	-
pH à 37°C	7.9	8.0	7.5	7.5	7.5

2) tampons BRL

N° du tampon	Composants (concentration (mM/l))			
	Tris-HCl	MgCl ₂	NaCl	Kcl
1	50, pH 8.0	10	-	-
2	50, pH 8.0	10	50	-
3	50, pH 8.0	10	100	-
4	20, pH 7.4	5	-	50
5	10, pH 8.2	8	-	-
6	50, pH 7.4	6	50	50
7	50, pH 8.0	10	50	50
8	20, pH 7.4	10	-	-
9	50, pH 8.5	5	-	-
10	100, pH 7.6	10	150	-
11	10, pH 9.0	12	-	100

I.2 Solutions.

Agarose (BRL): 0,8%; 1 ou encore 2% dans du TBE 1X.

Antibiotiques: stocker à -20°C

Ampicilline 10%(Boehringer) 100 mg/ml dans de l'eau distillée,
à diluer 1000 X.

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm.

Kasugamycine (Boehringer) 50µg/ml final
Ajouter directement au milieu encore liquide.

Tétracycline (Sigma)

12.5 mg/ml dans 50% d'eau distillée et 50% d'éthanol 100%.

Pas de stérilisation, à diluer 1000 X

Erythromycine

Ajouter la concentration désirée au milieu encore liquide.

Ne pas ajouter les antibiotiques à des températures supérieures à
50-60°C.

IPTG (Isopropyl,b-D thiogalactopyranoside) (Boehringer):

100 mM dans de l'eau distillée.

Stériliser par filtration sur filtre 0,22µm et conserver à -20°C.

Xgal (5Bromo-4chloro-3indolyl,β-D galactopyranoside).

(Boehringer)

2% dans du N-N diméthylformamide.

Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22µm et conserver à -20°C.

Solution stock de bromure d'éthidium: 1, 2 ou 10 mg/ml dans de l'eau.

Solution d'alourdisseur / colorant pour gel d'agarose:

Bleu de bromophénol	0,25%
EDTA	25 mM
Glycérol	50%

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Solution de fixateur (pour gel de séquençage):

Acide acétique	10%
Méthanol	10%

Solution de persulfate d'ammonium (BRL):

-10 % (p/v) dans de l'eau pour les gels de séquençage.

-1% (p/v) dans de l'eau pour les gels de protéines.

Solution d'acrylamide:

Acrylamide	40 %
Bisacrylamide	0.8 %

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée et filtrer sur un filtre plissé.

Stocker à 4°C.

Solution de phénol-Chloroforme:

Phénol	50 ml
Hydroxyquinoline	0.05 g
alcool isoamylique	2 ml
Chloroforme	50 ml

Saturer avec 100 ml de TE, centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
(Rotor GSA Sorvall).

Éliminer le TE et recommencer deux fois sans éliminer le dernier volume
de TE.

RNAse A (Boehringer): 10 mg/ml

Incuber 15 minutes à 100°C

Aliquoter et stocker à -20°C

SOB:

Bactotryptone	2 %
Yeast Extract	0.5 %
NaCl	10 mM
Kcl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM

Après autoclave, ajouter 10 mM de MgSO₄ (solution 1M filtrée)

SOC:

Ajouter 20 mM de glucose à la solution de SOB

TB (Transformation Buffer)

PIPES ou HEPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

Ajuster le pH à 6.7, ensuite ajoutet 55 mM de MnCl₂.

La solution est stérilisée par filtration à travers un filtre de 0.45 µm, et stockée à 4°C.

II. Souches et plasmides

II.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches de bactéries utilisées dans le cadre du travail sont reprises et caractérisées dans les tableaux.

Les caractéristiques génotypiques qui seront directement utilisées dans le travail vont être détaillées de façon plus complète.

II.1.1 La souche DL101 est *KsgA*⁻ et *PyrF*⁻

La souche DL101 d'*E.coli* est mutante pour le gène *KsgA*, elle ne porte pas de groupement diméthyles sur ces adénosines 1518 et 1519, ce qui lui confère la résistance à la kasugamycine. Cette souche est également *PyrF*⁻. Cette auxotrophie pour l'uracile permet de sélectionner la souche transformée par un plasmide porteur du gène *URA3* sur milieu minimum. Elle a été construite dans le cadre du clonage du gène de la diméthylase chez *S.cerevisiae* (Lafontaine *et al.*, 1994).

II.1.2 La souche JM101 est une souche sauvage d'*E.coli*

II.1.3 Souche Xl1 Blue d'*E.coli*

Cette souche possède certaines caractéristiques génomiques:

Rec A1: locus encodant une ATPase "DNA dependent" de 352 acides aminés essentielle à la recombinaison chez *E.Coli*. Les souches mutantes *Rec A1* présentent un taux de recombinaison mille fois inférieur à celui des non mutantes, ce qui permet d'une part de minimiser les recombinaisons entre l'ADN endogène et exogène, d'autre part de propager des plasmides à l'état monomérique.

thi: mutation dans le gène codant pour la vitamine B1. L'addition de thiamine au milieu est donc indispensable pour ces souches.

end A1: mutation entraînant une diminution du taux d'endonucléase, ce qui améliore le rendement et la qualité de l'ADN plasmidique.

D(lac-proAB): délétion de l'opéron lactose et des gènes voisins encodant les protéines nécessaires à la biosynthèse de la proline.

traD36: mutation supprimant le transfert du facteur F lors de la conjugaison bactérienne.

Les caractéristiques suivantes sont présentes sur l'épisome F', plasmide naturel de 93 kb présent 1 à 2 fois par cellule et codant pour les protéines responsables de la formation des pilis sexuels nécessaires au phénomène parasexuel de conjugaison.

Notons que la présence de cet épisome est un des éléments indispensables à la sélection des bactéries porteuses d'un plasmide recombinant par le test colorimétrique (blanc/bleu).

Tn10: marqueur de résistance à la tétracycline permettant de sélectionner les bactéries possédant F'.

proAB: la région du chromosome bactérien qui code pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la proline est souvent portée par l'épisome F'. Il peut alors compléter l'auxotrophie pour la proline des souches portant la délétion chromosomique D(lac-proAB), de cette façon son maintien est assuré sur milieu dépourvu de proline.

lacZDM15: le gène *lac Z* est délété dans la portion N-terminale de la β -galactosidase (voir 2.3.1.4.3).

lac I^q: mutation pour le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose, ce qui entraîne sa surproduction d'un facteur dix.

II.2 Plasmides.

Trois caractéristiques fondamentales se retrouvent chez la plupart des vecteurs utilisés: une origine de répllication (*ori*), un ou plusieurs marqueurs de sélection et un site multiple de clonage (MCS)

L'origine de répllication contrôle le nombre de copies d'un plasmide.

Chez *E.coli*, la plupart des plasmides portent le réplicon du plasmide pMB1 ou col E1, assurant un nombre de copies minimal de 15 à 20 par cellule. Remarquons que ces deux origines de répllication sont compatibles avec celle du plasmide naturel F'.

Ces plasmides ne nécessitent aucunement l'expression de gènes plasmidiques pour se répliquer. Ils utilisent les différentes polymérases, enzymes à longue, que lui fournit la cellule hôte. Ainsi, même si la protéosynthèse est inhibée par l'utilisation d'antibiotiques comme le

chloramphénicol ou la spectinomycine, ce qui entraîne un arrêt de la multiplication cellulaire, la réplication plasmidique se poursuit. Chaque bactérie porte alors un nombre beaucoup plus élevé de plasmides. Ce phénomène est utilisé pour amplifier la production plasmidique de la souche.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, c'est l'origine de réplication du plasmide de levure 2 μ qui assure la présence en "multicopy" d'un plasmide.

La plupart du temps, chez *E.coli*, les marqueurs de sélection sont des gènes conférant la résistance à un antibiotique.

Enfin, le MCS est un polylinker contenant une série de sites uniques de restriction permettant l'insertion aisée d'ADN exogène.

pKS+: Ce vecteur a été utilisé pour la caractérisation et le séquençage des inserts. Il possède:

Un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection du plasmide.

Un site multiple de clonage.

Une origine de réplication chez *E.coli*.

Une origine f1(+) de réplication de phage.

III. Milieux de culture.

III.1.1 Milieux riches.

LB liquide (Luria-Bertani):

Tryptone (Oxoïd)	1%
Yeast Extract (Oxoïd)	0,5%
NaCl (Merck)	0,5%

LB solide (Luria-Bertani):

Ajouter 2% d'agar (Oxo•d).

III.1.2 Milieux minimum.

Milieu minimum WO:

Yeast nitrogen base w/o AA (Difco)	0,67%
Glucose (Merck)	2%

Milieu minimum M9:

Solution M9 (10x):

-Na ₂ HPO ₄ (Merck)	6%
-KH ₂ PO ₄ (Merck)	3%
-NH ₄ Cl	1%
-NaCl (Merck)	0,5%

Milieu M9 liquide:

-H ₂ O	360ml
-Solution M9 (10x)	40ml
-MgSO ₄ 1M	0,4ml
-CaCl ₂ 0,1M	0,4ml
-Glucose 20%	4ml

Milieu M9 solide:

Ajouter 2% d'agar (Oxo•d).

Ajouter au besoin: 1ml / l de thiamine HCl 1M (stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm).

Milieu MIN.

Pour 400ml: 10 gr d'agar + 360 ml d'eau

Autoclaver, laisser un peu refroidir et ajouter:

Solution M9 10 X	40 ml
MgSO ₄ 1M	400 µl
CaCl ₂ 0.1M	400 µl
Thiamine Hcl 1M	800 µl
Glucose 20 %	8 ml
Casamino acids 20% (DIFCO)	4 ml

Milieu MINA:

Ajouter 50µg/ml d'ampicilline

Milieu MIN.+ Kasugamycine

Ajouter 20 mg de kasugamycine au milieu MIN. (concentration de 50 µg/ml)

Milieu MIN.+CaCl₂:

Ajouter du CaCl₂ au milieu MIN., pour obtenir la concentration désirée.

Milieu MIN. + EDTA:

Ajouter de l'EDTA au milieu MIN., pour obtenir la concentration désirée.

Milieu MIN.+ Erythromycine:

Ajouter de l'érythromycine au milieu MIN., pour obtenir la concentration désirée.

Milieu synthétique complet

Glucose 2 %

2.7 gr de Yeast Nitrogen base + NH₄SO₄ sans acides aminés.

Porter à 380 ml et autoclaver.

Ajouter ensuite le mélange d'acides aminés suivant les besoins du milieu.

Figure 1: Restriction générant des bouts collants compatibles:

XhoI

5'...CTCGAG...3'

3'...GAGCTC...5'



TCGAG...3'
C...5'

SalI

5'...GTCGAC...3'

3'...CAGCTC...5'



5'...G
3'...CAGCT

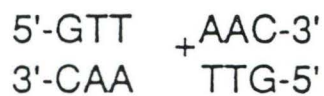
+



5'...GTCGAG...3'
3'...CAGCTC...5'

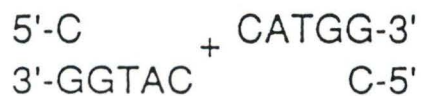
Figure 2: Types d'extrémités générées par restriction

***Hpa* I:**



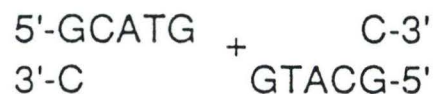
Enzyme de restriction clivant l'ADN en générant des extrémités franches.

***Nco* I:**



Enzyme de restriction clivant l'ADN en générant des extrémités collantes 5' protrudentes.

***SpH* I:**



Enzyme de restriction clivant l'ADN en générant des extrémités collantes 3' protrudentes.

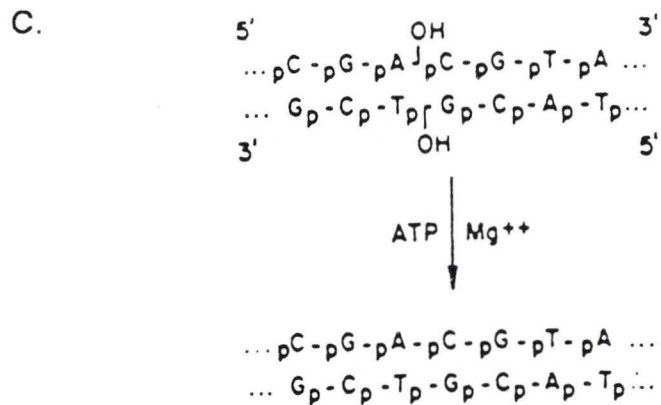
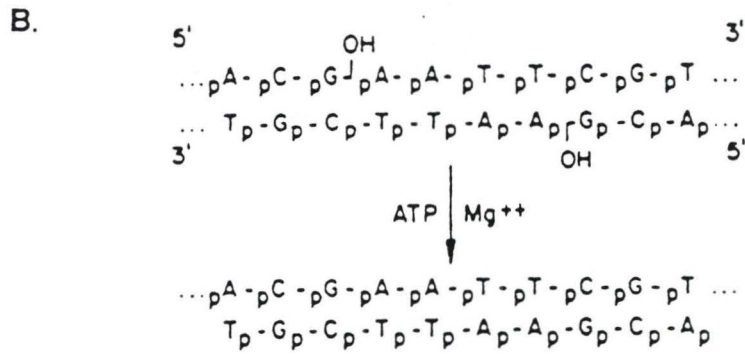
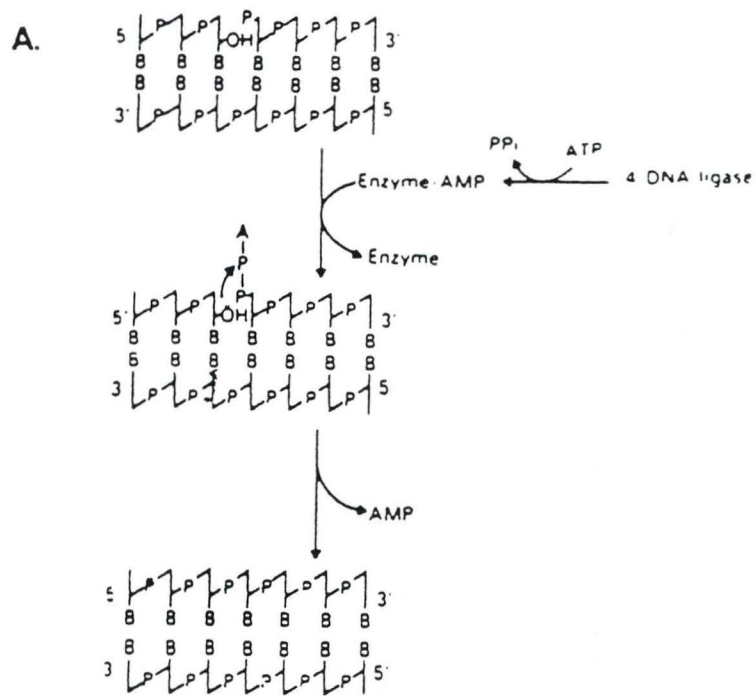


Figure 3: Mode d'action de la T4 DNA ligase:

A: La ligase du bactériophage T4 catalyse la formation de liens phosphodiesters entre des groupements 3'-OH et 5'-P adjacents.

B: Ligation d'extrémités cohésives

C: Ligation de bouts francs.

IV. Techniques relatives à l'ADN.

IV.1 Constructions génétiques.

IV.1.1 Principe général.

La plupart des techniques utilisées en génie génétique sont basées sur l'existence de plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires et autorépliquatives, sur lesquelles il est possible d'effectuer une série d'opérations. Celles-ci sont la restriction, la ligation et la transformation.

Les plasmides sont restreints à l'aide d'enzymes de restriction diverses reconnaissant un site spécifique sur l'ADN (souvent une séquence palindromique de 4 à 6 pb). Le nombre de fragments générés dépend de la fréquence d'occurrence du site dans la molécule d'ADN.

Ces fragments peuvent ensuite être "ligués" à l'aide de la T4 DNA ligase. Pour autant que les extrémités des morceaux que l'on désire assembler soient compatibles (figure 1).

Deux cas peuvent se présenter: soit l'enzyme clive l'ADN en générant des extrémités à bouts francs (cas de *Hpa* I), soit en générant des bouts collants. S'il génère des bouts collants, ils seront 5' protrudents (ex: *Nco* I), ou 3' protrudents (ex: *Sph* I) (figure 2)

Tous les fragments qui se terminent par des bouts francs sont compatibles entre eux. Par contre, ceux dont les extrémités sont des bouts collants doivent, pour être compatibles, présenter des extrémités protrudentes de même longueur et de séquence nucléotidique complémentaire.

Les constructions ainsi élaborées sont introduites par transformation dans une souche de bactérie ou de levure afin d'être amplifiées ou d'observer les phénotypes auxquels elles donnent naissance.

IV.1.2 Restrictions.

Après restriction, les fragments obtenus possèdent un groupement phosphate du côté 5' terminal et un groupement -OH du côté 3' terminal.

IV.1.2.1 *En pratique:*

La réaction de restriction s'effectue dans un volume de 20 à 50 μ l.

Placer dans un Eppendorf

- ADN à restreindre.
- 1/10 du volume final de tampon de restriction 10X.
- Enzyme de restriction (le plus souvent une unité).
- Porter à volume avec de l'eau stérile.
- Incuber une heure à 37°C.

Remarquons que le nombre d'unités d'enzymes de restriction à investir dans une réaction est déterminée en prenant en compte la fréquence d'occurrence du site ainsi que la quantité de matériel à digérer.

Après la réaction, les enzymes peuvent être inactivés par passage à 65°C, à -20°C ou par une extraction au phénol.

Le volume d'enzyme ne doit pas dépasser le dixième du volume final de la réaction car les enzymes sont stockés dans du glycérol susceptible à forte concentration d'inactiver ou de conférer une activité "star". Un enzyme présente une activité "star" lorsqu'il restreint en des sites qui ne lui sont pas spécifiques.

IV.1.3 **La ligation.**

La ligase du phage T₄ est utilisée pour catalyser la formation de liens phosphodiesters entre un groupement hydroxyle en 3' et un groupement phosphate en 5'. Pour être active, l'enzyme requiert la présence d'ATP et de Mg²⁺ (fig .3).

En pratique:

Placer dans un Eppendorf:

- le vecteur linéarisé.
- le ou les fragments à insérer.
- 1 Unité de T₄ DNA ligase.
- 1/5 du volume final de tampon de ligation 5X.
- Porter à volume avec de l'eau stérile si nécessaire.

L'incubation une nuit à 14°C est idéale pour les bouts collants car à cette température on favorise la formation des ponts hydrogènes. Dans le cas des bouts francs, une incubation de 3 heures à température ambiante est préférable car dans ces conditions l'activité de l'enzyme est plus importante (la formation de ponts H n'étant pas requise).

Quand les deux types d'extrémités sont présentes, les deux incubations sont successivement réalisées.

La stoechiométrie vecteur / insert est de 1:1, si le clonage est forcé (une seule possibilité d'insertion), elle est de 1:3 ou 1:4, si un ou plusieurs sites à bouts francs sont présents.

Figure 4: Schéma de l'intercalation du bromure d'éthidium dans un molécule d'ADN

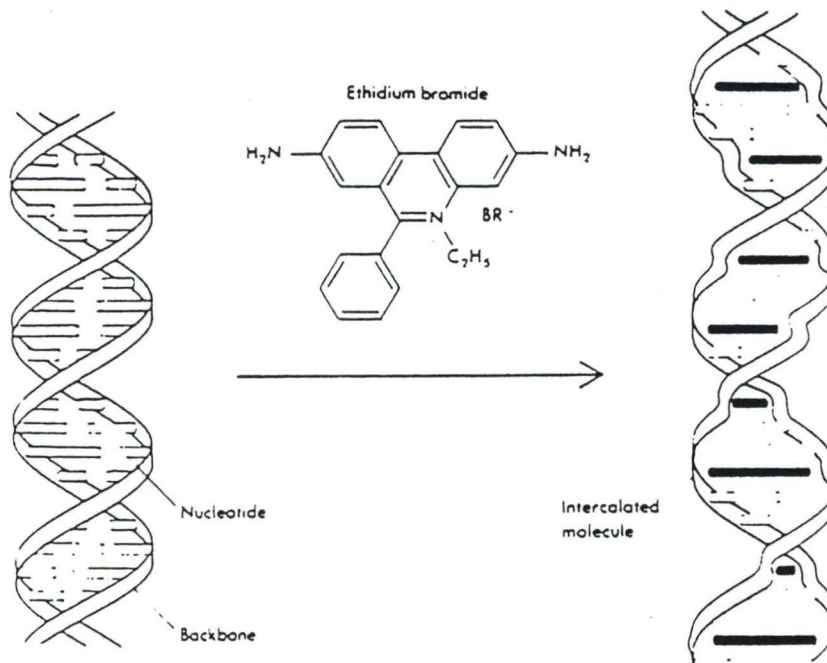
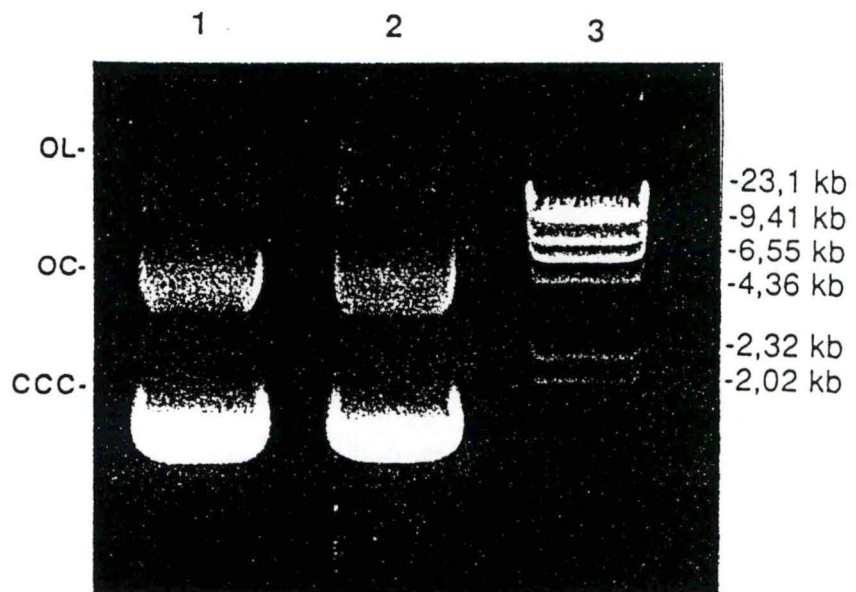
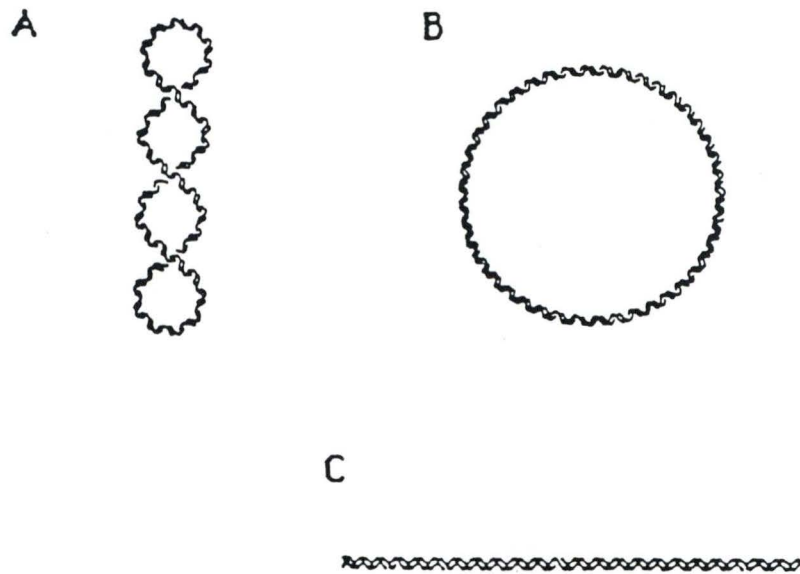


Figure 5: Les trois conformations de l'ADN: (A) CCC, (B) OC, (C) OL.
 Migration des trois conformations (sur gel d'agarose 1%): pistes 1 et 2;
 piste 3= marqueur de taille λ restreint par *HindIII*.



IV.2 Electrophorèse analytique sur gel d'agarose.

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer des fragments d'ADN, estimer leur taille, leur concentration et l'état de pureté d'une préparation (absence de protéines et d'ARN).

IV.2.1 Critères de séparation des fragments d'ADN.

Une molécule chargée, placée dans un champ électrophorétique, migre vers l'électrode de signe opposé à sa charge. L'ADN étant chargé négativement (groupements phosphates), il se déplace vers l'anode.

Différents paramètres influencent la migration de l'ADN dans le champ. Il s'agit de la conformation, du poids moléculaire (PM), de la concentration en agarose du gel et de l'ampérage appliqué à la cuve d'électrophorèse.

Les molécules d'ADN existent sous trois conformations différentes. La conformation la plus abondante est la forme CCC (Covalently Closed Circular). Si cette forme présente un nick (absence de lien phosphodiester) sur un des deux brins, on obtient la conformation OC (Open Circular).

Enfin, la forme linéaire présente un nick sur chacun des deux brins.

La forme CCC migre plus vite que la forme OL qui migre elle-même plus vite que la forme OC (fig.5).

Les molécules d'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur PM. Du haut vers le bas, on trouvera donc des fragments de PM de plus en plus petit.

La concentration en agarose (par ex: 0,8-1-2%) est également déterminante pour la mobilité de l'ADN. On peut augmenter cette concentration afin de séparer plus efficacement des fragments de petite taille.

Quand le voltage appliqué à la cuve est faible, la vitesse de migration est linéaire. Elle augmente proportionnellement en fonction du voltage appliqué.

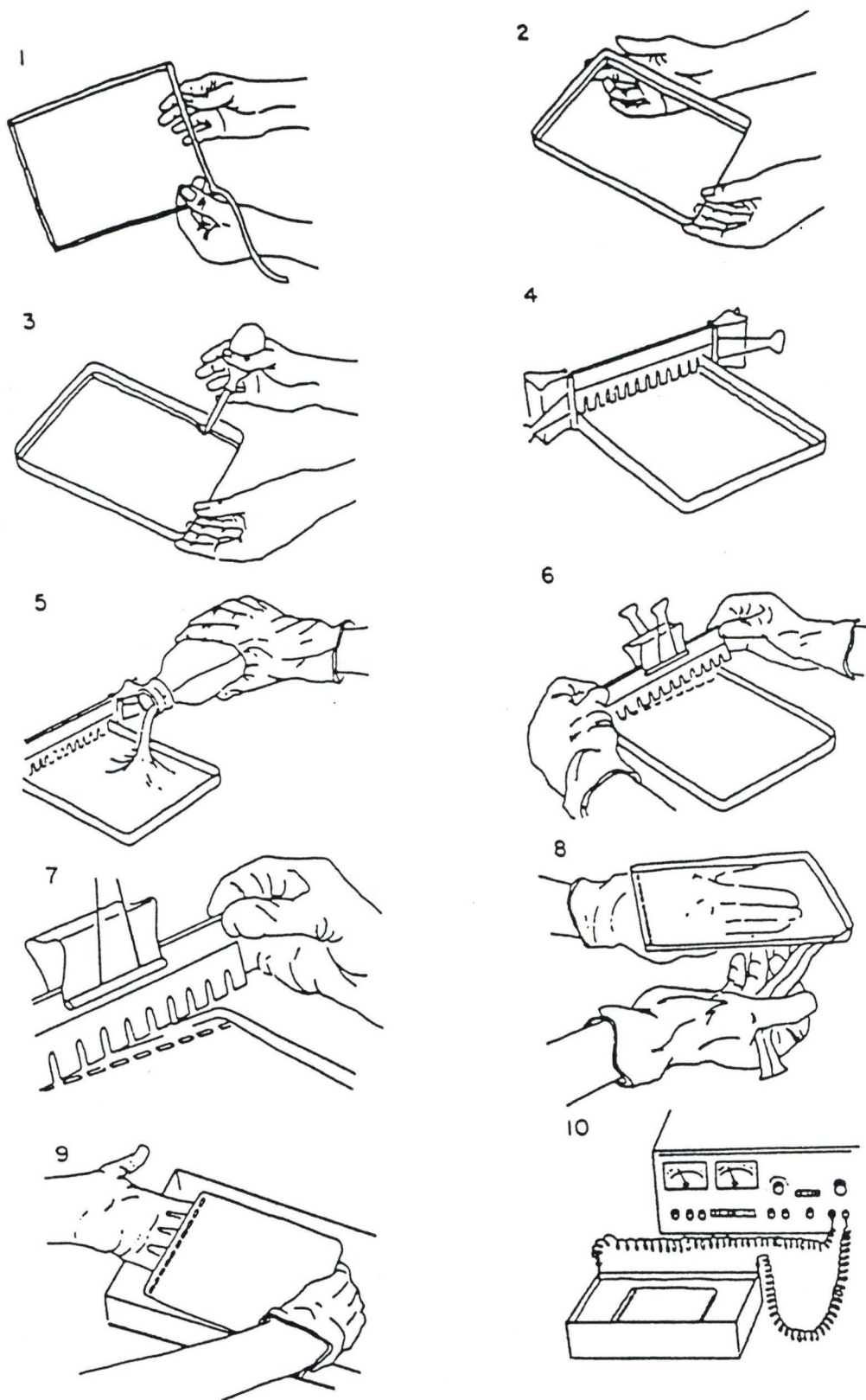
IV.2.2 Visualisation de l'ADN sur le gel.

L'ajout de bromure d'éthidium (BrEth) dans le polymère d'agarose, permet à ce celui-ci de s'intercaler entre les bases de l'ADN (fig.4). Lorsque ce composé est excité par des U.V (302 nm), il devient fluorescent.

IV.2.3 Estimation de la taille des fragments.

Pour estimer la taille des fragments, on utilise un marqueur de référence. Le génome du phage Lambda (50 Kb total), digéré par l'enzyme *HindIII* est utilisé le plus souvent dans le cas des gels 0,8%.

Figure 6: Illustration du montage d'un gel d'agarose



La migration du marqueur de taille permet d'établir une abaque exprimant le logarithme de la taille des fragments en fonction de leur distance de migration. On peut alors dans un second temps reporter la distance de migration des fragments de l'échantillon et estimer leur PM.

IV.2.4 Estimation de la quantité des fragments.

Pour estimer la concentration d'un fragment donné, on se réfère de nouveau au marqueur de taille. On connaît la concentration correspondant à chacune des bandes de ce marqueur.

En comparant visuellement l'intensité de la bande que l'on considère avec celles du marqueur de taille, on estime de façon approximative la concentration en ADN de celle-ci.

IV.2.5 Mise en oeuvre.

- Dissoudre la quantité appropriée d'agarose dans du tampon TBE 1X en chauffant.
- Laisser refroidir à 50°C.
- Ajouter le BrEth (concentration finale 0,5 µg / ml), mélanger.
- Couler le gel dans un support en plexiglas et y ajouter un peigne.(fig.6)
- Enlever le peigne lorsque le gel est polymérisé.
- Placer le gel dans une cuve à électrophorèse et immerger dans du tampon TBE 1X.

Avant le dépôt de l'échantillon d'ADN, et pour faciliter celui-ci, on ajoute aux échantillons une solution dense et colorée (bleu de bromophénol).

IV.3 Electrophorèse préparatrices et purification de fragments d'ADN

Après avoir réalisé une électrophorèse préparatrice, il est possible de récupérer un fragment particulier sur le gel. Le but est de ne soumettre à la ligation que les fragments que l'on désire voir s'assembler, ce qui ne fait que diminuer le nombre de constructions possibles et donc faciliter le criblage. La méthode utilisée consiste à inciser le gel sous la bande d'intérêt afin d'y introduire un morceau de papier filtre (DEAE cellulose / Whatman DE81). On remet le gel à migrer et au bout de 10 minutes, le fragment d'intérêt a été transféré du gel sur le papier Whatman.

IV.3.1 Récupération sur papier

IV.3.1.1 Préparation des filtres Whatman DE81:

- Découper à la taille désirée.
- Laisser tremper 30 minutes dans du NaCl 2,5 M.
- Laver plusieurs fois à l'eau froide.
- Conserver dans du tampon TBE 1X.

IV.3.1.2 *Récupération de la bande*

- Couper le gel avec une lame de scalpel juste en dessous et au-dessus de la bande à récupérer et y glisser les papiers.
- Faire migrer 10 minutes à 100 volts.

IV.3.1.3 *Récupération du DNA*

- Rincer le papier avec de l'eau froide pour enlever le TBE et poser le papier sur un filtre.
- Placer le papier dans un Eppendorf dans lequel se trouve 400 µl de High Salt Buffer (tampon d'élution).
- Mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte.
- Incuber 2 heures à 37°C ou overnight à 4°C en agitant de temps en temps.
- A l'aide d'une épingle chauffée faire un petit trou dans le fond de l'eppendorf.
- Enfoncez cet Eppendorf dans un second non troué.
- Quick spin à 13000 rpm (Janetzki).
- Ajouter 2 volumes de N-butanol saturé en eau à la phase aqueuse récupérée (élimination du BrEth).
- Vortexer 30 secondes
- Centrifuger 5 minutes.
- Eliminer la phase supérieure (butanol).
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu, mélanger.
- Placer 10 minutes à -80° ou une nuit à -20°C.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décanter.
- Laver le culot avec 300 µl d'éthanol 90% (élimination des sels).
- Recentrifuger quelques minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Sécher 10 minutes sous vide.
- Resuspendre dans 10 µl d'eau stérile.

IV.4 *Transformation.*

IV.4.1 *Electroporation*

Lorsque l'on soumet une membrane biologique à un champ électrique, celle-ci subit une compression locale aboutissant à la formation de pores. Cette lésion physique est associée à une augmentation réversible jusqu'à un certain point de la perméabilité de la membrane plasmique.

Dans le cas de chocs de haut voltage et de longue durée, la taille des pores peut être suffisante pour permettre le passage d'un plasmide. (Langridge *et al*, 1987)

L'appareil utilisé au laboratoire pour l'électroporation est le "GENE PULSEUR" commercialisé par la firme Bio-Rad.

Il délivre, par la décharge d'un condensateur, un choc électrique à décroissance exponentielle dans une cuvette pourvue d'électrodes en contact avec le mélange cellules à transformer - plasmides.

IV.4.1.1 Caractéristiques du choc électrique

La capacitance (C)

Nous avons vu précédemment que pour permettre le passage des plasmides, il est nécessaire de soumettre les cellules à un choc de haut voltage et de longue durée. Nous avons donc choisi d'effectuer nos chocs directement à la capacitance maximale permise par l'appareil dont nous disposons c.-à-d. 25 microfarads. En vertu de l'équation $t = RC$, nous obtenons un choc de longue durée. La valeur t est une constante qui exprime la rapidité de la décroissance exponentielle du voltage, en d'autres termes, elle se définit comme étant le temps nécessaire pour que le voltage atteigne 37% du V_0 ($V_0 = V_{\text{initial}}$).

Le voltage (V)

Lors de la détermination du voltage, il est nécessaire d'atteindre un équilibre délicat entre le besoin de créer des pores dans la membrane cellulaire et la nécessité que le phénomène soit réversible pour permettre la survie et la croissance des transformants.

La résistance (R)

La résistance du système correspond à la résistance électrique de la solution contenue dans la cuvette d'électroporation.

IV.4.1.2 Protocole:

Un préliminaire à l'électroporation est la préparation de stocks de cellules électrocompétantes.

Préparation des cellules

- Inoculer une préculture de 5 ml de LB avec la souche voulue
- Laisser pousser une nuit à 37°C
- Inoculer 200 ml de LB avec la préculture
- Incuber à 37°C jusqu'à une D.O de 0.5-0.8
- Refroidir la culture sur glace pendant 15 minutes
- Centrifuger la culture à 4°C pendant 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 200 ml d'eau froide stérile
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 100 ml d'eau stérile froide
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 4 ml de glycérol 10 %
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot dans 400 µl de glycérol 10 %
- Aliquoter 100 µl par eppendorf
- Les cellules peuvent se conserver à -80°C pendant une période pouvant aller jusqu'à 6 mois

Electroporation en elle même

- Placer la cuvette d'électroporation dans la glace

- Placer dans un eppendorf 40 à 100 µl de cellules compétentes et 1 à 2 µl d'ADN plasmidique.
- Mélanger et placer la solution une minute sur glace
- Transférer dans la cuvette d'électroporation le contenu de l'eppendorf
- Placer la cuvette dans l'électroporteur
- Régler l'appareil sur : 25 µF
200 Ohms
2.2 Kv
- Faire le choc électrique
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC
- Transférer dans un eppendorf et laisser une heure à 37°C
- Étaler sur boîte et laisser pousser une nuit à 37°C

IV.4.2 Choc thermique

Les bactéries soumises à une solution hypotonique de chlorure de calcium prennent l'aspect de sphéroplastes. Le calcium, en se liant à l'ADN plasmidique, forme à proximité de la paroi bactérienne un complexe résistant aux DNAses. Un choc thermique permet à ce complexe de pénétrer dans la cellule. Une incubation de une demi-heure à 37°C est nécessaire pour que les bactéries régénèrent leur paroi.

IV.4.2.1 Préparation de cellules compétentes au CaCl₂.

- Réaliser une préculture dans 10 ml de SOB.
- Inoculer 100 ml de SOB avec 5 ml de la préculture.
- Incuber sous agitation à 20°C jusqu'au moment où la croissance atteint une D.O de 0,6 à 540 nm (phase exponentielle).
- Placer la culture dans la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Resuspendre le culot dans 80 ml de TB froid (glacé).
- Incuber 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm et 4°C (rotor GSA Sorvall).
- Décantier le surnageant.
- Resuspendre doucement dans 20 ml de TB, et ajouter du DMSO à une concentration finale de 7%, en mélangeant doucement.
- Incuber 10 minutes dans la glace.
- Aliquoter par 300 µl dans des Eppendorfs préalablement refroidis .
- Stocker à -80°C ou utiliser .

IV.4.2.2 Transformation

- Placer dans un Eppendorf: 200 à 300 µl de cellules compétentes et 1 à 100 ng d' ADN plasmidique.
- Incuber 30 minutes sur glace.
- Réaliser un choc thermique de 30 secondes à 42°C.
- Ajouter stérilement 1 ml de LB.
- Incuber 1 heure à 37°C, avec agitation vigoureuse.
- Étaler 100 à 200 µl de cellules sur boîtes contenant le milieu sélectif approprié.

IV.4.2.3 Contrôles de transformation.

Généralement, on obtient $5 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^7$ transformants par µg de plasmide CCC transformant.

On peut effectuer différents contrôles:

-Contrôle + (Viabilité): étaler 200 µl de cellules compétentes non transformées sur milieu non sélectif.

-Contrôle - (Sensibilité): étaler 200 µl de cellules compétentes non transformées sur milieu sélectif.

-Transformabilité: la capacité qu'ont les cellules compétentes à transformer est vérifiée en utilisant un vecteur très efficace pour la transformation (ex: un pUC, ou pKS).

IV.4.3 Méthodes de sélection des transformants et des recombinants.

L'ampicilline permet de sélectionner les bactéries qui ont été transformées par un plasmide porteur du marqueur AMP^r. Ce gène encode la protéine β-lactamase qui, excrétée dans l'espace périplasmique, dégrade l'ampicilline.

Les bactéries de la souche XL1-blue qui portent un plasmide recombinant sont sélectionnées par un test colorimétrique (blanc / bleu).(fig.5)

La souche est délétée dans son chromosome pour l'opéron lactose (*lac -*), mais une partie de celui-ci est "reporté" sur l'épisome F' de ces bactéries. Il s'agit de la portion *lac Z*DM15 codant pour la partie C-terminale inactive a' de la β-galactosidase .

Le reste de l'opéron est présent sur des vecteurs comme le pBluescriptKS et du pUC18. En effet, le pKS est porteur d'un fragment non opérationnel *lac I*, le gène régulateur de l'opéron, et d'un fragment *lac Z'* qui contient le promoteur de *lac* , l'opérateur et la portion du gène *lac Z* codant pour l'extrémité N-terminale de la β-galactosidase, c' est à dire le peptide a inactif.

La complémentation intragénique consiste en l'assemblage des peptides a et a', ce qui génère une enzyme β -galactosidase fonctionnelle. Cette dernière clive le Xgal en un chromogène bleu et en galactose.

Par construction, le site multiple de clonage du pKS a été inséré en phase dans une région peu importante pour l'activité β -gal. La présence de ce MCS n'entraînant pas de "frameshift", il n'empêche pas la restauration de l'activité par complémentation intragénique.

Par contre, lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans ce MCS, l'ORF de la portion *lac Z'* est disruptée, et le peptide a n'est plus synthétisé.

Les bactéries transformées par de tels vecteurs (dits recombinants), donneront naissance à des colonies blanches, alors que celles transformées par des matrices qui se sont religuées sur elles-même donneront des colonies bleues.

IV.5 Préparation de vecteur d'ADN.

IV.5.1 Minipréparation d'ADN plasmidique

Ce protocole permet d'obtenir de l'ADN plasmidique rapidement et en quantité suffisante que pour être diagnostiqué par restriction.

IV.5.1.1 Culture

- Inoculer une colonie dans 5 ml de LB+5 μ l d'ampicilline
- Incuber une nuit à 37° C

IV.5.1.2 Récupération et lyse des cellules

- Récupérer 1.5 ml dans un eppendorf
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Décanter le surnageant
- Resuspendre le culot dans 300 μ l de P1 RNase
- Ajouter 300 μ l de P2 et mélanger
- Attendre 5 minutes
- Ajouter 300 μ l de P3 et mélanger
- Centrifuger 15 minutes

IV.5.1.3 Récupération des plasmides

- Récupérer le surnageant
- Ajouter 700 μ l d'isopropanol pour précipiter l'ADN plasmidique
- Centrifuger 15 minutes à 4° C ou à température ambiante
- Décanter le surnageant (le culot contient l'ADN)
- Ajouter 100 μ l d'éthanol 70 % froid pour laver le culot
- Centrifuger 5 minutes
- Enlever l'éthanol
- Sécher au speedvack

- Resuspendre dans 20 µl d'eau

IV.5.2 Midipréparation d'ADN plasmidique (Nucleobond AX100).

IV.5.2.1 *Culture*

- Inoculer une préculture dans 200 ml de LB + 200 µl d'ampicilline.
- Incuber une nuit à 37° C avec agitation

IV.5.2.2 *Récupération et lyse des cellules*

- Récupérer le tout dans bouteille Sorval 250 ml
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Décanter le surnageant
- Resuspendre le culot dans un corex de 30ml avec 4 ml de P1 RNase
- Ajouter 4 ml de P2 et mélanger
- Attendre 5 minutes
- Ajouter 4 ml de P3 et mélanger
- Centrifuger 30 minutes à 13.000 rpm
- Récupérer le surnageant dans corex 30ml et recentrifuger si le surnageant n'est pas clair

IV.5.2.3 *Mise sur colonne*

- Mettre 2 ml de buffer n°2 pour équilibrer la colonne
- Ajouter le surnageant à filtrer
- 2 x 4 ml de buffer n°3 pour laver
- 2 ml de n°5 pour éluer
- Récupérer le DNA élué dans un corex 15
- Ajouter 1.4 ml d'isopropanol pour précipiter le DNA plasmidique purifié
- Centrifuger 30 minutes à 13.000 rpm
- Décanter le surnageant (le culot contient 1 ' ADN)
- Ajouter 1 ml d'ethanol 70 % froid pour laver le culot
- Centrifuger 5 minutes
- Enlever l'ethanol
- Sécher au speedvack
- Resuspendre dans 100 µl d'eau

IV.6 Purification et préparation de l'ADN

IV.6.1 **Extraction au phénol-chloroforme**

Cette opération a pour objet d'enlever les sels et les protéines. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont différents.

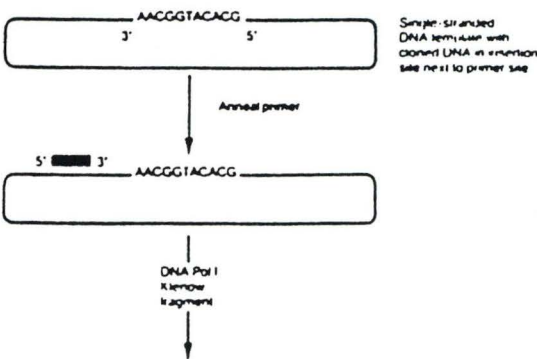
- Porter le volume à 100 µl avec de l'eau.

- Ajouter un volume de phénol / TE ou phénol / chloroforme.
- Vortexer.
- Centrifuger 2 à 3 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Prendre la phase aqueuse supérieure et la placer dans un nouvel Eppendorf.
- Ajouter 500 µl d'éther saturé en eau.
- Centifuger quelques secondes.

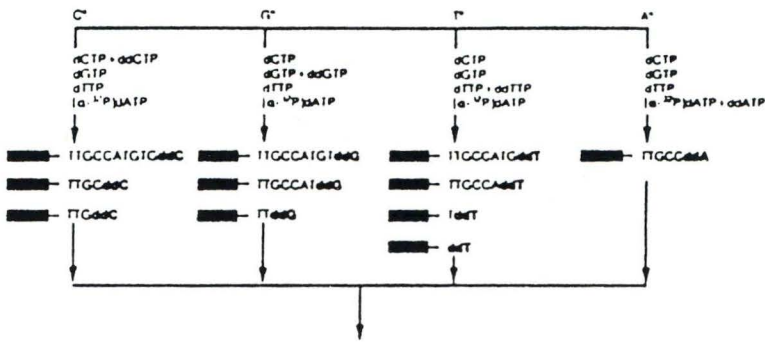
- Eliminer la phase supérieure

Figure 7: Principe de la réaction de séquençage (Sanger et al, 1977)

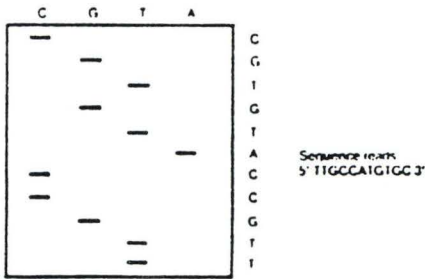
The annealing reaction



The sequencing reaction



Gel electrophoresis and autoradiography



- Ajouter: -2,5 volumes d'éthanol 100% froid.
-0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2.
- Incuber 15 minutes à -80°C.
- Culotter l'ADN en centrifugeant 20 minutes à 13000 rpm et 4°C(Janetzki).
- Décantier.
- Laver le culot à l'éthanol 90%
- Sécher 10 minutes sous vide puis resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile.

IV.7 Le Séquençage.

(T77Sequencing™ kit Pharmacia.27-1682-01)

IV.7.1 **Principe du séquençage.**

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. (Sanger *et al.*, 1977).(fig.7)

Cette méthode consiste à faire synthétiser par une polymérase un brin complémentaire à celui que l'on désire séquencer. Cette polymérase requiert une matrice simple brin et une amorce lui fournissant un groupement 3'-OH libre. Le fragment à séquencer est cloné dans un plasmide .

Le primer utilisé est un oligonucléotide synthétique dont la séquence est complémentaire à celle qui borde l'insert sur le vecteur utilisé.

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didésoxyribonucléotide, un analogue de désoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3', interrompt l'élongation.

Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point (fig 8).

Quatre tampons d'élongation sont utilisés. Ils contiennent les quatre désoxyribonucléotides usuels (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont un est marqué radioactivement ([α -S³⁵] dATP). Par contre, ils ne contiennent qu'un des quatre didésoxyribonucléotides.

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé.

La migration concomitante des quatre mélanges réactionnels sur gel de polyacrylamide permet une lecture de la séquence .

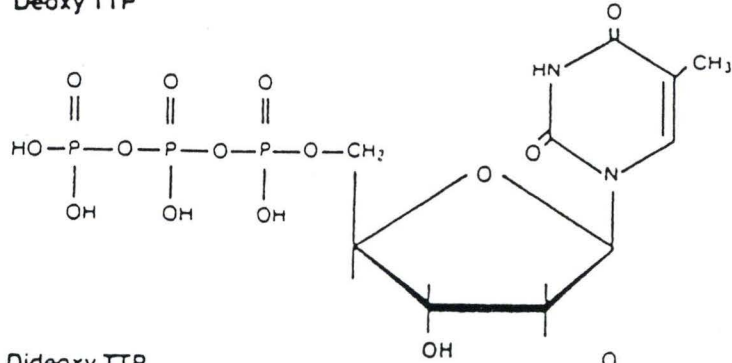
IV.7.2 **Réactions de séquençage.**

IV.7.2.1 *Dénaturation*

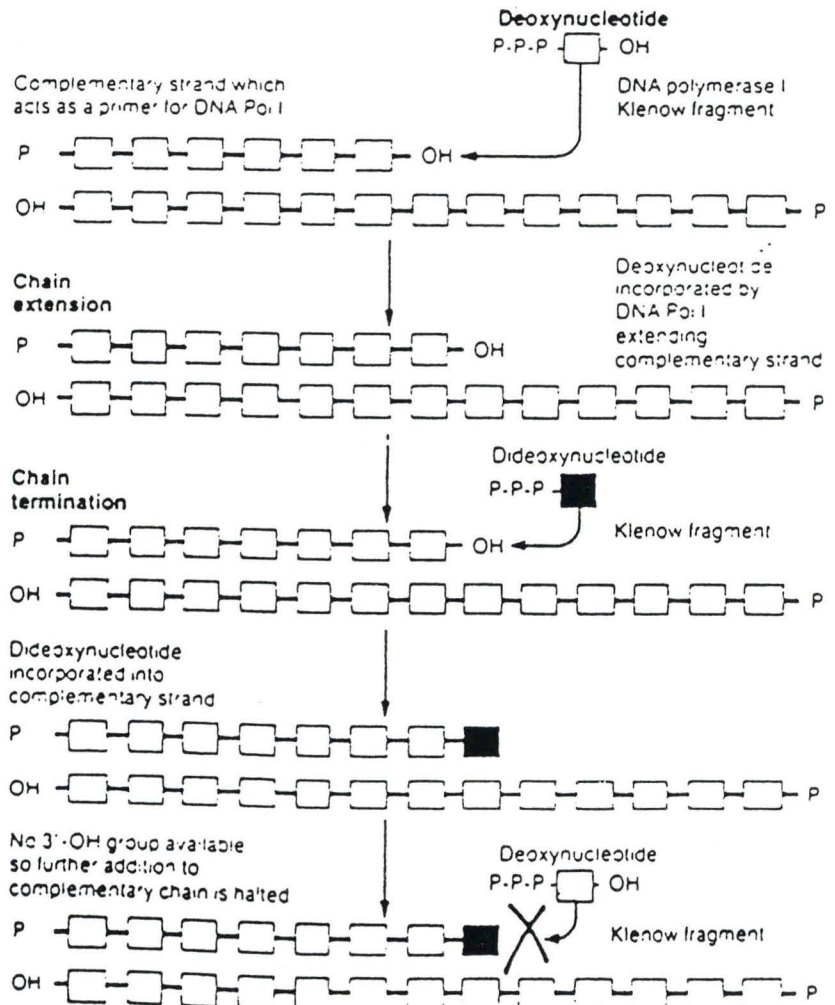
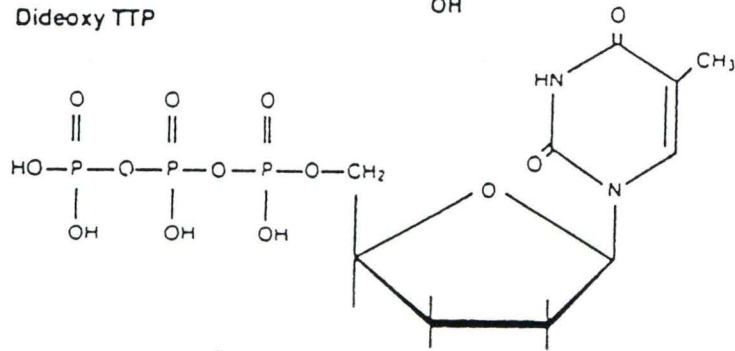
- Utiliser volume de DNA représentant 4 mg de DNA
- Ajouter x ml eau de façon à ce que volume de DNA + volume eau = 8µl.
- Ajouter 2 ml NaOH 2N

Figure 8: Structure d'un déoxyribonucléotide (A) et d'un didéoxyribonucléotide (B); ainsi que le mode d'action du didéoxyribonucléotide.

A Deoxy TTP



B Dideoxy TTP



- Incuber 10 minutes température ambiante
- Ajouter 3 µl NaAc 3M PH 4.5
- Ajouter 7 µl eau
- Ajouter 60 µl EtOH 100 %
- Incuber 10 minutes à - 80° C
- Centrifuger 20 minutes à 15000 rpm
- Retirer l'éthanol 100 % et ajouter 60 µl d'EtOH 70 %
- Centrifuger 10 minutes
- Retirer l'éthanol et sécher

IV.7.2.2 Annealing (Hybridation)

- 10 µl eau sur le DNA
- 2 µl oligo (10 ng/µl) primers utilisés
- 2 µl annealing buffer
- Incuber 20 minutes à 37° C
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Préparer A, C, G, T 2 à 5 µl par eppendorf

IV.7.2.3 Labelling (marquage radioactif)

- Réaction d'annealing + 3 µl labelling buffer
- 1 µl S 35 d'ATP
- 2 µl T 7 (dilution 5 fois dans enzyme buffer)
- Quick spin
- Incuber 5 minutes température ambiante
- 4 à 5 µl de la solution labelling dans A C G T
- Incuber 5 minutes à 37° C
- 5 µl de solution stop
- Eventuellement stocker à - 20°

IV.7.2.4 Préparation du gel

- 42 gr d'urée
- 45 ml d'eau
- 10 ml de TBE 10 X
- 15 ml de solution de polyacrylamide
- Après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78)
- 600 µl de persulfate
- 30 µl de Temed

IV.7.2.5 Fabrication du gel de séquençage

- Nettoyer les plaques avec eau de ville - eau distillée - ethanol
- Coater la petite plaque avec 10 ml de dimethyl dichloro silane (silicone)
- Placer les spacers
- Refermer les plaques sceller au tape jaune (s'aider des pinces)
- Couler le gel en oblique mais le laisser polymeriser à l'horizontal
- Faire une ligne de base avec deux peignes retournés

- Préchauffer le gel (15' si utilisé tout de suite ou 30' s'il a été mis à 4 ° la nuit)

IV.7.2.6 *Mise sur gel*

- Mettre les bases 3' à 90° pour les dénaturer avant de les charger sur le gel.
- Laisser migrer 3' après chaque chargement de quatre bases pour laisser pénétrer
- Laisser migrer le temps voulu

IV.7.2.7 *Après la migration*

- Retire la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque.
- Mettre solution de fixateur sur le gel pendant 10'
- Mettre un buvard whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus.
- Recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un saran
- Sécher sous vide à 80°C pendant une heure et demie.
- Mettre le gel en cassette avec un film d'autoradiographie pendant 12 heures
- Révéler le film pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Fixer le film pendant 15 minutes
- Rincer à l'eau et sécher

Bibliographie

Boeke J.D., LaCroute F. and Fink G.R.

A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphatase decarboxylase activity in yeast : 5-fluoro-otic acid resistance.

Mol. Gen. Genet. 197 (1984) 345-346.

Durand B.

Le séquençage de l'ADN.

Biofutur, le technoscope Suppl.23 (1988)

Guarente L.

Synthetic enhancement in gene interaction : a genetic tool come of age.

TIGS 2 (1993)

Lafontaine D., Delcour J., Glasser A.-L., Desgrès J. and Vandenhautte J.

The DIM1 gene responsible for the conserved m⁶2a m⁶2a dimethylation in the 3'-terminal loop of 18S rRNA is essential in yeast.

J. Mol. Biol. 241 (1994) 492-497.

Lewin B.

in : Genes V., 1994, Oxford University Press

Poldermans B., Goosen N. and Van Knippenberg P.H.

Studies on the functions of two adjacent N⁶, N⁶-dimethyladenosines near the 3' end of 16S ribosomal RNA of *Escherichia Coli*. I. The effects of kasugamycin on initiation of protein synthesis.

J. Biol. Chem. 254 (1979) 9085-9089.

Poldermans B., Roza L. and Van Knippenberg P.H.

Studies on the functions of two adjacent N⁶, N⁶-dimethyladenosines near the 3' end of 16S ribosomal RNA of *Escherichia Coli*. III. Purification and properties of the methylating enzyme and methylase-30S interactions.

J. Biol. Chem. 254 (1979) 9094-9100.

Poldermans B., Van Buul P.J.J. and Van Knippenberg P.H.

Studies on the functions of two adjacent N⁶, N⁶-dimethyladenosines near the 3' end of 16s ribosomal RNA of *Escherichia Coli*. The effects of the absence of the methyl groups on initiation of protein biosynthesis.

J. Biol. Chem. 254 (1979) 9090-9094.

Raué H.A., Klootwijk J. and Musters W.

Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA.

Prog. Biophys. Molec. Biol. 51 (1988) 77-129.

Sanger F., Nicklen S. and Coulon A.R.

DNA sequencing with chain termination inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467.

Sparling P.F.

Kasugamycin resistance : 30S ribosomal mutation with an unusual location on the *Escherichia coli* chromosome.

Science 167 (1968) 56-58.

Sparling P.F., Ikeya Y. and Elliot D.

Two genetic loci for resistance to kasugamycin in *Escherichia coli*.

J. Bact. 113 (1973) 704-710.

Stryer L.

in : Biochemistry, 1988, W. H. Freeman and company, New York

Suvorov A.N., Van Gemen B. and Van Knippenberg P.H.

Increased kasugamycin sensitivity in *Escherichia coli* caused by the presence of an inducible erythromycin resistance (*erm*) gene of streptococcus pyogenese.

Mol. Gen. Genet. 215 (1988) 152-155.

Thomas D., Rothstein R., Rosenberg N. and Surdin-Kerjan Y.

SAM2 encodes the second methyonine S-adenosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae* : Physiology and regulation of both enzymes.

Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 5132-5139.

Van Buul C.P.J.J., Damm J.B.L. ad Van Knippenberg P.H.

Kasugamycin resistant mutants of *Bacillus Stearothermophilus* lacking the enzyme for the methylation of two adjacent adenosines in 16S ribosomal RNA.

Mol. Gen. Genet. 189 (1983) 475-478.

Van Gemen B., Koets H.J., Plooy C.A.M., Badlaen J. and Van Knippenberg P.

Characterization of the *ksgA* gene of *Escherichia coli* determining kasugamycin sensitivity.

Biochimie 69 (1987) 841-848.