



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Séquençage du gène de B-galactosidase de *Kluyveromyces var. marxianus* par une stratégie transpositionnelle

Bostaille, Benoit

Award date:
1993

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.



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

**Séquençage du gène de β -galactosidase de
Kluyveromyces var. marxianus par une
stratégie transpositionnelle.**

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

**BENOIT BOSTAILLE
93-94**

**Séquençage du gène de β -galactosidase de
Kluyveromyces var. marxianus par une stratégie
transpositionnelle**

BOSTAILLE Benoit

Résumé

Des travaux précédents, réalisés au laboratoire, établissaient par la comparaison d'une carte physique sommaire et d'une courte séquence de 300 nucléotides, la possibilité d'une identité entre le gène de la β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* (LACF) et le gène correspondant chez *Kluyveromyces marxianus var. lactis* (LAC4).

Notre travail consistera à mettre en oeuvre un système de séquençage par transposition, afin de poursuivre l'analyse de la séquence et de lever tout doute sur cette possible identité.

L'utilisation de deux outils transpositionnels nous a permis, par un screening phénotypique, d'isoler 11 mutants LACF⁻ disruptés par un transposon.

Des réactions de séquençage ont dès lors pu être initiées à partir des extrémités connues des transposons.

La séquence obtenue nous a confirmé l'identité des deux gènes issus de deux variétés distinctes.

La suite du travail s'attachera à expliquer l'origine de cette identité.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : J. Vandenhaute

Co-Promoteur : J. Delcour

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier les professeurs J. Vandenhoute et J. Delcour de m'avoir accueilli et suivi tout au long de l'année.

Je remercie également tous les membres du laboratoire d'avoir participé d'une manière ou d'une autre à rendre cette année agréable.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Mademoiselle Isabelle Knott, et Messieurs P. Van cutsem, A. Goffinet et J-P. Cassart, qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à J-P pour son aide et ses conseils, merci à Xavier pour son enthousiasme, merci à tous ceux qui m'ont épaulé pendant cette année.

Merci à tous,

ABREVIATIONS:

3'-OH	: groupements 3'-hydroxyle.
5'-P	: groupements 5'-phosphate
AA	: acide aminé.
ADN	: acide désoxyribonucléique.
Amp ^r	: résistance à l'ampicilline.
ARN	: acide ribonucléique.
ARN ^m	: ARN messenger.
CAP	: protéine de l'activation catabolique.
Chl ^r	: résistance au chloramphénicol.
DO	: densité optique.
DR	: séquence répétée en orientation directe.
FIS	: facteur de stimulation de l'inversion.
HIF	: facteur d'intégration.
IPTG	: isopropyl β-D-thiogalactopyranoside.
IR	: séquence répétée en orientation inverse.
IS	: séquence d'insertion.
Kan ^r	: résistance à la kanamycine.
Kb	: 10 ³ paires de bases
nt	: nucléotide.
pb	: paire de base.
SMC	: site multiple de clonage.
Tn	: transposon.
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indoloyl-β-Dgalactopyranoside.

I. INTRODUCTION:

1. PROBLEMATIQUE GENERALE DU TRAVAIL	1
2. LA LEVURE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>	2
3. LE LOCUS DE LA β -GALACTOSIDASE DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> VAR <i>MARXIANUS</i>	3
4. LES ELEMENTS TRANSPOSABLES ET LEUR UTILISATION DANS LE SEQUENCAGE	3
4.1 Description générale	3
4.1.1 Structure générale	3
4.1.1.1 Les séquences d'insertion (IS).	4
4.1.1.2 Les transposons composites	4
4.1.1.3 Les transposons non composites	5
4.1.2 Les mécanismes de recombinaison transpositionnelle	5
4.1.2.1 Les acteurs de la transposition	6
a.La transposase	6
b.Les facteurs d'hôte	6
4.1.2.2 La réaction de transposition	7
a.Clivages et transfert de brins	7
b. Transposition conservative et transposition réplivative	7
4.1.2.3 La régulation de la transposition	8
a. Contrôle de la production de transposase	
<i>Contrôle transcriptionnel</i>	9
<i>Contrôle traductionnel</i>	9
b.Contrôle de la réaction de transposition	10
<i>Régulateurs encodés par l'élément</i>	10
<i>Régulateurs encodés par l'hôte</i>	10
4.2 Description du Tn4430 et du Tn5: outils dans le séquençage	11

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL:

13

III. RESULTATS:

1. PRODUCTION D'UNE BATTERIE DE TRANSPOSANTS.	14
1.1 Production de transposants par le Tn4430	15
1.1.1 Isolement des transposants en répression glucose	15
1.1.1.1 Sélection des transformants	15
1.1.1.2 Sélection des transposants	15
1.1.1.3 Screening phénotypique des transposants	16
1.1.1.4 Hypothèse concernant le faible niveau d'expression de β -galactosidase	17
1.1.2 Isolement des transposants au départ d'une souche lacZ ⁻	18
1.1.2.1 Screening phénotypique des transposants	18
1.1.2.2 Localisation des transposants	19
1.2 Production de transposants par le Tn5	22
1.2.1 Sélection des transposants	22
1.2.2 Screening phénotypique des transposants	23
2. PREPARATION DES TRANSPOSANTS AU SEQUENCAGE	23
3. SEQUENCAGE DE LACF A PARTIR DES TRANSPOSANTS	24
4. ANALYSE DE LA SEQUENCE	25
5. ANALYSE DE L'IDENTITE ALLELIQUE PAR SOUTHERN BLOTTING	26

IV.DISCUSSION: 30

V.PERSPECTIVES: 33

IV. MATERIEL ET METHODES

1. MUTAGENESE PAR TRANSPOSITION	34
1.1 Mutagenèse par le Tn4430	34
1.1.1 Matériels biologiques	34
1.1.2 Mise en oeuvre du protocole recourant à la répression glucose	35
1.1.3 Mise en oeuvre du protocole de screening dans une souche lacZ-	35
1.1.3.1 Approche dite " par événement dépendant "	35
1.1.3.2 Approche dite " par événement indépendant "	36
1.2 Mutagenèse par Tn5	37
2. SOUCHES ET PLASMIDES	
2.1 Souches bactériennes	39
2.1.1 Souches vectrices de transposons	39
2.1.2 Production de β -galactosidase	39
2.1.2.1 La régulation du gène lacZ	40
2.1.2.2 Souches productrices	41
2.1.2.3 Souches non productrices	41
2.2 Plasmides	42
3. TECHNIQUES D'ADN RECOMBINANTS	43
3.1 Construction génétique	43
3.2 Electrophorèse analytique en gel d'agarose	46
3.3 Electrophorèse préparatives et purification de fragments d'ADN	48
3.4 Transformation bactérienne	50
3.4.1 Electroporation	50
3.4.2 Transformation au CaCl ₂	52
3.5 Préparation de l'ADN	53
3.6 Purification de l'ADN	57
3.6.1 Par extraction phénol-chloroforme	57
3.6.2 Par fixation de l'ADN sur des diatomées	58
3.7 Séquençage	59
3.8 Southern blotting	65
4. MILIEUX DE CULTURE.	68
5. SOLUTIONS ET TAMPONS.	69

I. INTRODUCTION.

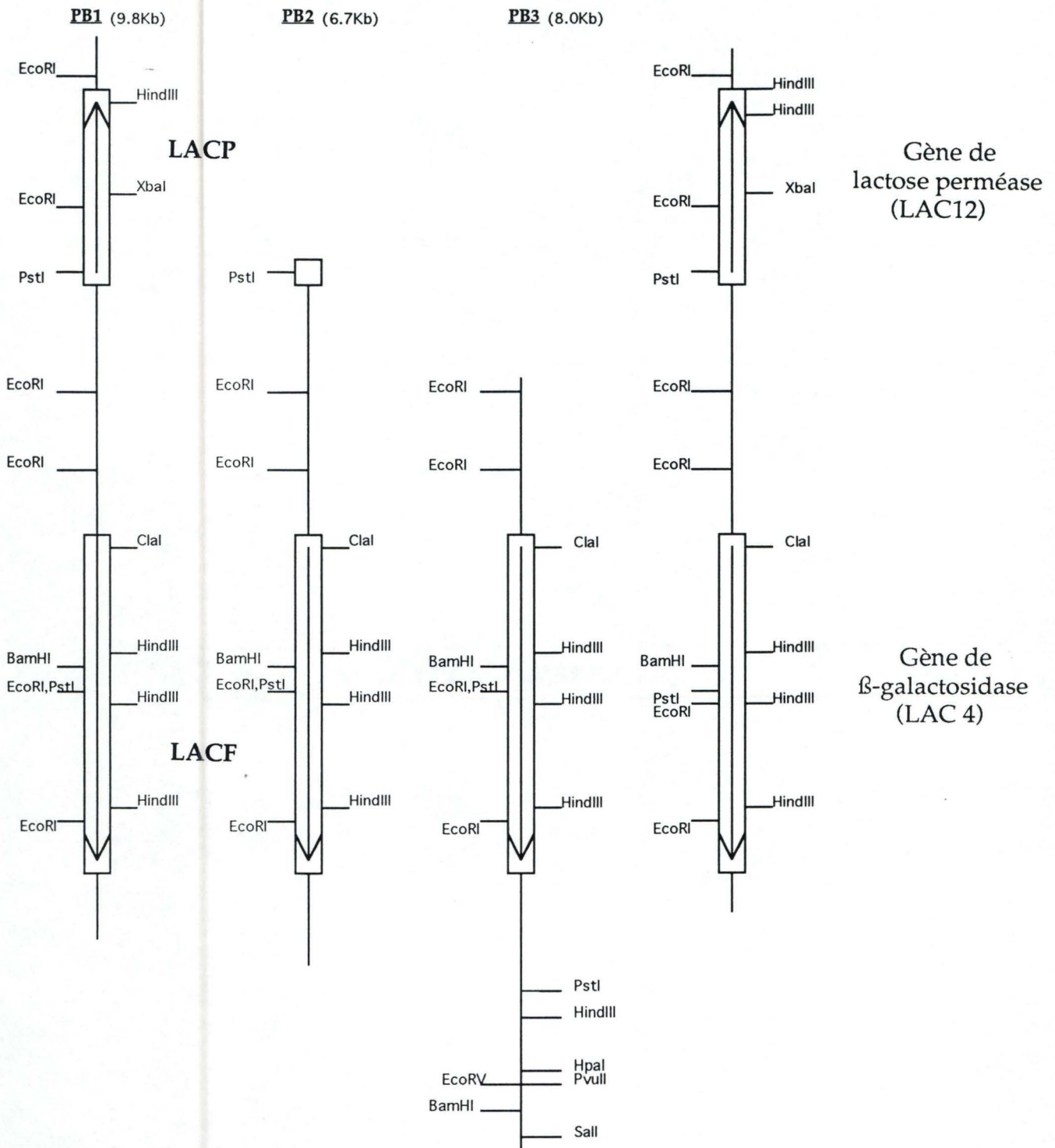


Fig.1.1: Représentation de l'alignement des cartes de restriction des 3 clones isolés (pB1, pB2, pB3) chez *Kluyveromyces marxianus* var.*marxianus* avec la région correspondante chez *Kluyveromyces marxianus* var.*lactis*.

Les genes LAC12 et LAC4 de *K.lactis* correspondent respectivement aux genes LACP et LACF présents sur les clones isolés de la banque de *K.marxianus* .

```

GAATTCGTTCACCGCAAAGTTCAGGGTGCTCTGGTGGGTTTCGGTGGTCTTTGCTTGCCTTCTCC - 602
                                     T
CTTGTCTTGCATGTTAATAATAGCCTAGCCTGTGAGCCGAAACTTAGGGTAGGCTTAGTGTGGAACGTACATATGTATC - 522
ACGTTGACTTGGTTTAACCAAGCGACCTGTACCAGCCATACCCACACACAGTTTTTTGTATCTTCAGTATAGTTGTGAA - 442
                                     G           G
AAGTGTAGCGGAAATTTGTGGTCCGAGCAACAGCGTCTTTTTCTAGTAGTGCGGTCTACTTGGTTGACATTGGTATT - 362
TGGACTTTGTTGCTACACCATTCACTACTTGAAGTCGAGTGTGAAGGGTATGATTTCTAGTGGTGAACACCTTTAGTTAC - 282
GTAATGTTTTTCATTACTGTTTTACTTGAGATTTGCGATTGAGAAAAAGGTATTTAATAGCTCGAATCAATGTGTTATCATT - 202
GTGAAGATGTTCTTCCCTAACTCGAAAGGTATATGAGGCTTGTGTTTCTTAGGAGAATTATTATTCTTTTGTATGTTGC - 122
GCTTGTAGTTGGAAAAGGTGAAGAGACAAAAGCGCTTAACACTTGAAATTTAGGAAAGAGCAGAATTTGGCAAAAAAAT - 42
AAAAAAAAAATAAACACACATACTCATCGAGAAGTAAAAGATATGTCCTTGCCTTATTCCTGAGAATTTAAGGAACCCCAA - 38

```

Fig. 1.2: Alignement des 300 nucléotides séquencés en amont de LACF avec la région correspondante en amont de LAC4.

Comme l'identité entre les deux séquences est très grande, les régions séquencées chez LACF sont noircies sur la séquence de LAC4 (Breunig *et al* , 1984) et les quelques différences observées sont indiquées en dessous. Le début de l'ORF est signalé par un encadrement de la séquence.

Différences observées entre *K. marxianus* var. *marxianus* et *K. marxianus* var. *lactis*.

Croissance sur inuline (absence de croissance pour *K. marxianus* var. *lactis*), critère le plus courant (Sidenberg & Lachance, 1986).

Optimum de température pour la croissance (33°C pour *K. marxianus* var. *lactis* et 37 à 42°C pour *K. marxianus* var. *marxianus*) (Sidenberg & Lachance, 1986).

Pattern d'électrophorèse de 7 isoenzymes (Sidenberg & Lachance, 1986).

Electrophorèse de chromosome en gel d'agarose (ou "chromoblots") (Sor & Fukuhara, 1989).

Polymorphisme de restriction de l'ADN mitochondrial (Sor & Fukuhara, 1989).

Tableau 1.1: Ce tableau reprend une série de différences permettant de distinguer *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*.

En effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence une série de différences entre ces deux variétés. L'ensemble de ces données a même amené la plupart de ces auteurs à proposer d'élever ces deux variétés au rang d'espèce.

I. INTRODUCTION.

1. PROBLEMATIQUE GENERALE DU TRAVAIL

Dans le cadre d'un travail antérieur (LALOUX *et al* 1990), trois clones contenant le gène codant pour la β -galactosidase (LACF) de *Kluyveromyces marxianus var marxianus* ont été isolés par complémentation du caractère lac^- de la souche X11Blue d' *E.coli* , au départ d'une banque génomique de la souche sauvage (ATCC12424) établie dans le vecteur Yep351. Une carte physique sommaire des inserts fut établie et une courte région de 300 nucléotides en amont du gène fut séquencée (figure 1.1 et 1.2). Ces données furent comparées avec la carte physique et la séquence correspondante du gène LAC 4 codant pour la β -galactosidase de la variété *lactis* (Breunig *et al* 1984) suggérant une identité de la région génomique isolée de la variété *marxianus* avec le locus correspondant chez la variété *lactis*.

Par ailleurs, au plan taxonomique, de multiples données physiologiques et cytogénétiques (tableau 1.1) indiquent qu'il s'agit bien de deux entités différentes considérées comme variétés distinctes, *marxianus* et *lactis* , de l'espèce *Kluyveromyces marxianus*)

Au plan moléculaire, plusieurs données récentes de notre laboratoire corroborent ce point de vue. En effet, la banque de *K. marxianus var. marxianus* a fourni non seulement le gène de l'inulinase, fonction propre à l'entité *Kluyveromyces marxianus var marxianus* et absent chez *Kluyveromyces marxianus var lactis* mais aussi une série de gènes d'ADH (Ladrière *et al* 1992) également clairement distincts , quoique apparentés (identité de séquence de l'ordre de 60%) aux gènes isolés par ailleurs de *K.lactis* (Saliola *et al* , 1990).

L'absence totale, à première, de divergence au locus LAC pour les deux variétés est donc extrêmement intrigante et nous a interpellé; il s'agit donc avant tout d'établir ce point.

Dans ce but, nous avons choisi d'éprouver l'identité entre les deux souches par séquençage en adoptant une méthode particulière dite de " séquençage par transposition ".

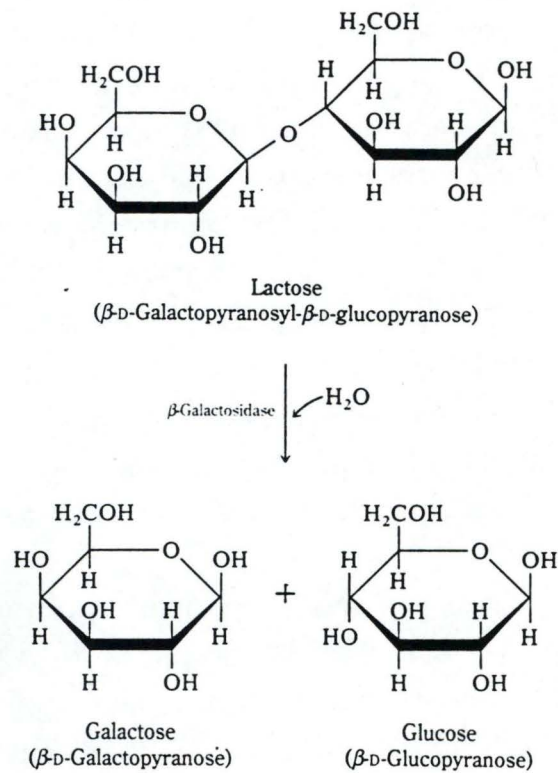


Fig. 1.3: La β -galactosidase clive le lactose en glucose et en galactose (source RAWN, 1990).

2. LA LEVURE *Kluyveromyces marxianus*

Cette levure présente de nombreuses caractéristiques intéressantes qui expliquent son utilisation croissante dans des processus industriels. Entre autres elle présente un taux de croissance fort élevé et appartient à un petit groupe de levures thermotolérantes capables de croître à 45°C (Grootwassig and Fleming, 1980). Contrairement à *S. cerevisiae*, elle est capable d'utiliser le lactose du fait de la synthèse d'une lactase. Etant reconnue par l'United States FDA comme une "food yeast", les enzymes qui en dérivent peuvent être utilisées dans des systèmes alimentaires. C'est ainsi qu'elle est utilisée commercialement pour la production de l'enzyme lactase (β -galactosidase) utilisable dans l'industrie pour hydrolyser le lactose du lait en glucose et galactose et ainsi produire un lait pauvre en lactose.

Les souches de *Kluyveromyces* , comme de nombreux autres microorganismes peuvent se trouver sous forme haploïde ou diploïde. La conversion entre les deux états résulte d'une part entre une fusion des états haploïdes pour donner un diploïde et d'autre part, par une sporulation des états diploïdes pour donner la forme haploïde. Toutes les souches *Kluyveromyces* utilisées dans le cadre de ce travail sont diploïdes.

3. LE LOCUS DE LA β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* VAR. *marxianus*:

Kluyveromyces marxianus var *marxianus* est une des cinq levures qui produisent une β -galactosidase (*K.marxianus* var *marxianus*, *K.marxianus* var *lactis*, *Cryptococcus laurentii*, *Debromyces hansenii* et *Pichia polymorpha*.).

Celle-ci (aussi appelée lactase) est une enzyme qui clive le lactose en ses deux constituants: le glucose et le galactose (figure 1.3). Le gène de la β -galactosidase (LACF) est associé avec une autre séquence codant pour la lactose perméase (LACP), une protéine responsable de l'entrée de lactose dans la cellule (figure 1.1).

4. LES ELEMENTS TRANSPOSABLES ET LEUR UTILISATION DANS LE SEQUENCAGE

4.1 Description générale

Les éléments génétiques transposables porteurs de résistances à certains antibiotiques se sont révélés être des outils particulièrement utiles en génétique dans de nombreuses applications (Berg & Berg, 1983).

Dans le cadre de notre travail, ils vont être mis à profit afin de baliser un gène en vue de le séquencer. En effet, les insertions de transposons répartis aléatoirement tout au long du gène permettent de démarrer les réactions de séquençage à partir d'une même amorce dérivée d'une des extrémités connues du transposon.

Cette approche est particulièrement intéressante dans la mesure où elle nous rend totalement indépendant de la connaissance des sites de restriction et des nombreuses étapes de sous-clonage qui visent à préparer un long fragment d'ADN au séquençage.

Cette introduction sur les transposons sera divisée en deux grandes sections: un aperçu général sur les transposons, suivi par une analyse plus détaillée des deux transposons qui seront utilisés dans le cadre de ce travail, le Tn4430 et le Tn5.

4.1.1 Structure générale

Les éléments transposables sont des segments d'ADN capables de se déplacer par eux-mêmes dans le génome. Ils se retrouvent largement distribués au sein des différents groupes d'espèces procaryotes et eucaryotes. Leur mobilité au sein des hôtes qui les hébergent va entraîner des réarrangements qui vont pouvoir contribuer d'une certaine manière à une plasticité génique. Cette plasticité permet un accroissement de la diversité génétique par laquelle l'espèce peut répondre aux fluctuations de son environnement.

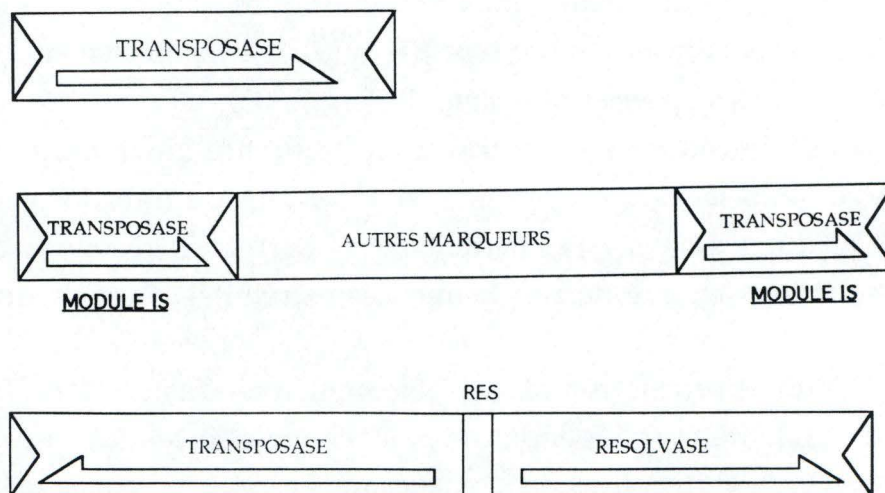


Fig.1.4: Illustration des différents types d'éléments transposables.

(A). Les modules IS ont de courtes répétitions inversées qui flanquent une région centrale contenant le gène de transposition.

(B). Un transposon composé possède une région centrale contenant des gènes sans rapport avec la transposition

(comme les résistances à certains antibiotiques) flanqués de part et d'autre par des IS.

(C). Les transposons non composites ont des répétitions inversées qui bordent les régions codant pour la transposase et la resolvase ainsi qu'un site *res* interne.

Les éléments transposables trouvés chez les procaryotes présentent une grande diversité de structure.

Historiquement, deux classes d'éléments transposables bactériens ont été définis sur base de critères structuraux et fonctionnels: les séquences d'insertion (IS) et les transposons composites d'une part et les transposons non composites d'autre part.

4.1.1.1. Les séquences d'insertion (IS).

Les transposons les plus simples sont appelés séquences d'insertion (IS); ce sont des unités autonomes car chacune d'entre elles code seulement pour les protéines nécessaires à leur propre transposition (figure 1.4).

Les IS sont généralement délimitées par de courtes séquences répétées en ordre inverse appelée IR, leur région centrale codant pour l'enzyme nécessaire à la transposition.

Quand un élément IS transpose, une séquence de l'ADN hôte est dupliquée en ordre direct (DR) au site cible d'insertion. La longueur dupliquée est déterminée par la distance séparant les points de clivage sur la cible et est propre à chaque élément (figure 1.5).

En résumé, l'IS transposon le plus simple se reconnaît par une structure caractéristique dans laquelle ses extrémités sont identifiées par les répétitions terminales inversées alors que les extrémités adjacentes de l'ADN bordant sont caractérisées par de courtes répétitions directes.

4.1.1.2. Les transposons composites.

Lorsque deux séquences d'insertion se trouvent sur une même molécule, elles peuvent transposer de concert, emportant le segment d'ADN qui les sépare (figure 1.4). Elles définissent ainsi un transposon composite qui est constitué d'une région centrale qui peut ainsi porter divers gènes dont des marqueurs de résistance à certaines drogues, bordées par des "bras" constitués par des IS.

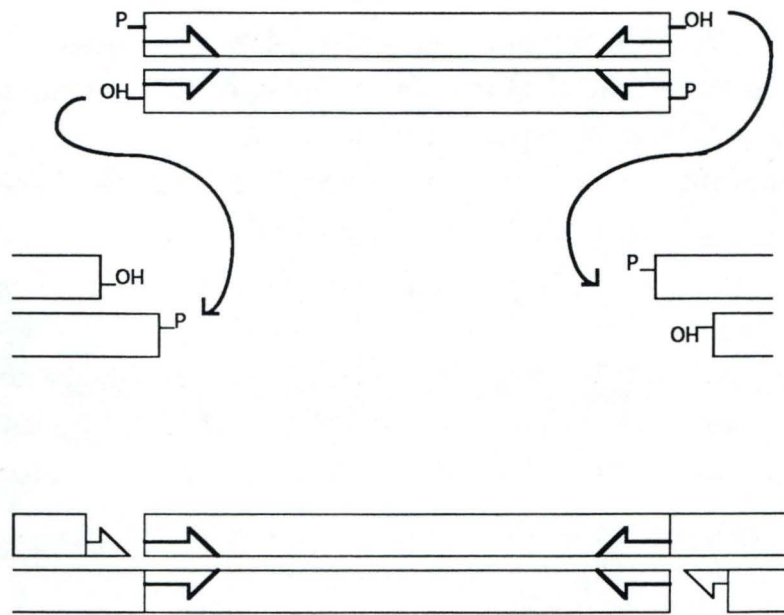


Fig. 1.5: La réaction de clivage en chicane du site cible génère des extrémités protrudentes qui sont par la suite comblées par une synthèse réparatrice qui génère une duplication du site cible (DR) de part et d'autre de l'élément inséré.

Un tel événement peut se produire quand un élément IS transpose à un site receveur proche du site donneur. Tout d'abord identiques, les modules peuvent demeurer inchangés mais peuvent aussi diverger. Dans le cas du Tn5 par exemple (paragraphe 4.2.2) seul l'IS50R est capable de transposer indépendamment du transposon composite, les gènes de transposase d'IS50L étant défectifs.

4.1.1.3 Les transposons non composites

Les transposons non composites sont appelés transposons cointégratifs car leur transposition s'accompagne de la formation d'une structure spécifique nommée cointégrat qui résulte de la fusion entre la molécule donneuse et la molécule cible de transposition. Lors de la transposition, l'élément est dupliqué et se trouve répété en ordre direct aux jonctions entre le donneur et la cible. Le cointégrat est par la suite résolu par une recombinaison site-spécifique s'opérant entre des sites *res* portés par les deux copies du transposon (figure 1.6).

Ces transposons sont délimités par des IR de 35 à 48 pb dont la séquence est hautement conservée et ils génèrent des duplications de 5 pb au niveau de leur site d'insertion. Ils encodent la transposase responsable de leur mobilité ainsi que la resolvase qui assure la résolution de la structure cointégrée. De plus ils encodent une série de protéines permettant la résistance à différentes drogues.

4.1.2 Les mécanismes de recombinaison transpositionnelle

Un événement de transposition correspond au transfert d'un segment d'ADN délimité, le transposon, d'un site donneur vers un site cible. La réaction de transposition met en jeu quatre partenaires au niveau de l'ADN (Weinreich and Reznikoff, 1992):

- (1) L'élément lui-même qui code pour la transposase catalysent la réaction de transfert de l'ADN.
- (2) Une séquence d'ADN spécifique à l'extrémité du transposon.
- (3) Des facteurs d'hôte qui stimulent la réaction.
- (4) Le site cible.

4.1.2.1. Les acteurs de la transposition

a. la transposase

Des études *in vitro* ont montré que la transposase était indispensable à la transposition. De plus, les mutants de ce gène sont difficilement complétés en *trans* par un autre élément de type sauvage, indiquant que la transposase agit préférentiellement en *cis*; l'enzyme ne fonctionne donc efficacement qu'avec la matrice d'ADN à partir de laquelle elle a été transcrite et traduite.

Soit la transposase se lie à l'ADN tellement vite après la synthèse protéique qu'elle a une faible probabilité de diffuser, soit la transposase est si instable que les molécules ne se liant pas rapidement (et donc le plus proches du site de synthèse) n'ont aucune chance de devenir actives.

Les transposases sont des protéines complexes qui doivent posséder un domaine de fixation aux extrémités de l'élément et un ou des sites catalytiques. Ceux-ci sont respectivement responsables de l'induction d'une courbure de l'ADN nécessaire à la réaction et au clivage du transposon et de son transfert au site d'insertion (Mizuuchi, 1992a;1992b).

b. les facteurs d'hôte

Les fonctions de l'hôte qui par leurs actions influencent directement ou indirectement la transposition sont vraisemblablement très nombreux mais encore largement inconnus à ce jour.

Les facteurs d'hôte participeraient d'une part à l'élaboration de complexes nucléoprotéiques nécessaires à l'exécution de la réaction de transposition, et donc à la coordination spatiale de la réaction. D'autre part, ils rempliraient des fonctions de régulation de la transposition, et participeraient ainsi à la coordination temporelle de la réaction.

4.1.2.2. La réaction de transposition (figure 1.6).

a. Clivages et transfert de brins

Comme d'autres réactions qui requièrent l'agencement de différents partenaires protéiques et nucléiques dans l'espace (réplication, transcription, splicing recombinaison site-spécifique), la transposition nécessite une orientation relativement précise des sites à associer, la participation de protéines spécifiques et de protéines de l'hôte (Stark et al, 1989; 1992; Van de Putte and Goosen, 1992).

La première étape de la transposition consiste en des clivages au niveau des sites donneurs et receveurs. La molécule donneuse est clivée à l'une et l'autre des extrémités du transposon et la molécule cible, au niveau de sites décalés de 5 ou 9 pb.

La seconde étape est définie par le transfert de l'intermédiaire clivé sur la cible. Les extrémités 3' OH de l'intermédiaire clivé sont transférés sur les groupements 5' P de la cible.

La liaison de ces extrémités conduit à une structure en forme de Chi, maintenue réunie par l'intermédiaire du transposon double brin.

Le devenir de cette structure détermine deux modes de transposition: la transposition conservative et transposition réplivative.

b. Transposition conservative et transposition réplivative.

Dans la transposition conservative, des coupures sont réalisées sur les brins donneurs intacts au niveau de la structure Chi.

Les régions monobrins engendrées par les coupures décalées doivent être comblées par une synthèse réparatrice qui génère des répétitions en ordre direct (DR) de part et d'autre de l'élément (figure 1.5)

Le transposon a donc été transféré du site donneur au site cible; le devenir de la molécule donneuse après excision du transposon reste encore inconnu. Le site donneur pourrait subir une dégradation partielle et être par la suite reconstitué par un mécanisme de réparation de brèches bicaténares ("double strand gap repair").

Ce mode de transposition est propre aux transposons de type IS simples et composites (IS1, IS5, Tn5, Tn10....).

Fig. 1.6: MECANISME DE RECOMBINAISON TRANSPOSITIONNELLE:

(A). *Formation de la structure en Chi.*

1. Des coupures monobrins sont effectuées aux extrémités du transposon et du site cible.
2. Les extrémités 3' coupées du transposon s'unissent aux extrémités 5' de la cible.

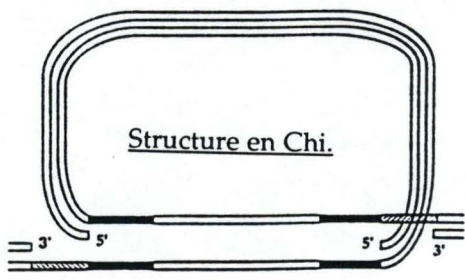
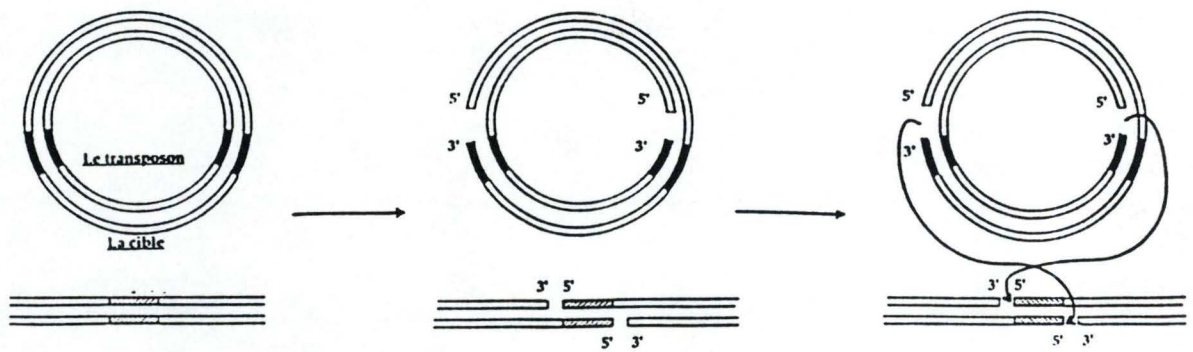
(B). *Transposition répllicative.*

3. Une réplication d'ADN est initiée au départ des groupements 3' libres de la cible, engendrant une duplication du transposon.
4. La recombinaison site-spécifique (res) entre les transposons résout la structure co-intégrée et libère d'une part un transposon sur la molécule donneuse d'origine et un transposon bordé par une répétition en ordre direct (DR) du site cible.

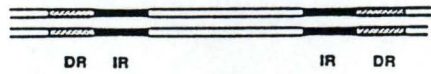
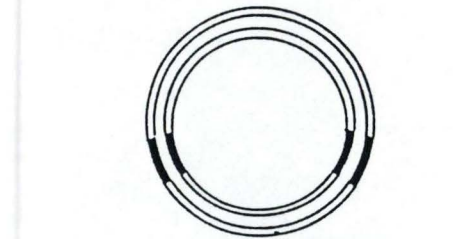
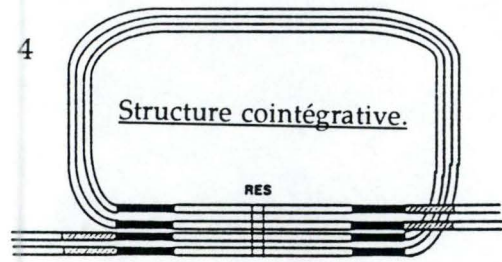
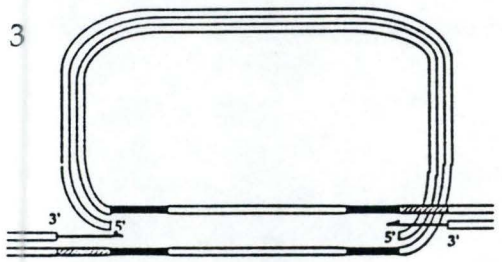
(C). *Transposition conservative.*

5. Les brins donneurs intacts sont coupés.
6. Les mécanismes de réparation génèrent des répétitions en ordre direct (DR) de part et d'autre de l'élément inséré.
7. Le devenir de la molécule donneuse après escission reste inconnu.

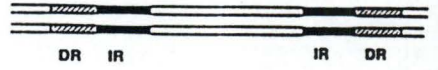
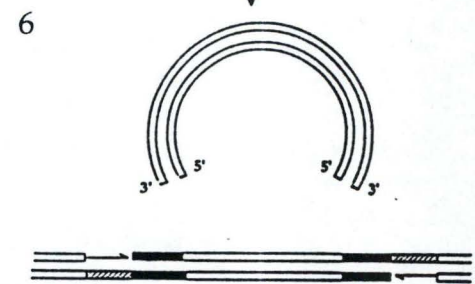
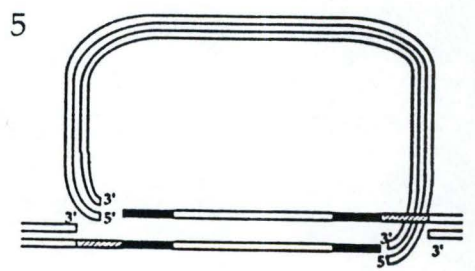
(A).



(B).



(C).



Dans la transposition réplivative, la structure Chi fournit une région simple brin à chacune des extrémités en chicane du site cible. Ces régions sont des pseudo-fourches de réplication fournissant ainsi une matrice pour la synthèse d'ADN, cette réplication entraînera la duplication du transposon et la création de copies aux sites donneurs et cibles. Cette étape de réplication est très probablement assurée par des fonctions codées par l'hôte.

A ce stade, la structure formée est une structure cointégrée qui possède des répétitions directes du transposon à la jonction entre les réplicons.

Une recombinaison spécifique de sites entre les deux copies du transposon peut régénérer le réplicon donneur d'origine, créant un réplicon cible qui a acquis un transposon bordé de courtes répétitions directes de la séquence cible hôte. Cette réaction est appelée résolution et est dépendante de la résolvasse, codée par les transposons de type cointégratif.

La résolvasse est impliquée dans la recombinaison entre les répétitions directes dans le cointégrat. Une structure cointégrée pourrait être en principe résolue par recombinaison homologue entre toute paire correspondante dans les deux copies du transposon, mais la réaction de résolution ne peut s'effectuer qu'à un site interne spécifique *res* qui est reconnu par la résolvasse et permet la séparation des deux partenaires nucléotidiques; le site donneur conserve donc une copie du transposon et une copie répliquée se retrouve au niveau de la cible.

Ce mode de transposition est particulier au transposon non composite ou de type cointégratif (Tn3, Tn1, Tn4430...).

4.1.2.3 La régulation de la transposition.

Bien que l'hôte puisse d'une certaine manière tirer un avantage de la présence du transposon grâce à la plasticité génique que celui-ci peut introduire ou par l'apport de résistance à certaines drogues véhiculées par les transposons, de trop nombreux événements transpositionnels au sein d'un hôte peuvent néanmoins être préjudiciables à l'expression de toute une série de gènes et être incompatibles avec la survie de l'hôte.

En réalité, les mécanismes de transposition sont des mécanismes hautement contrôlés à deux niveaux distincts, la synthèse de la transposase et la réaction de transposition elle-même.

a. Contrôle de la production de transposase.

Contrôle transcriptionnel

Le taux de transposition d'un élément est directement dépendant de la quantité de transposase synthétisée. (Kleckner, 1989)

Il apparaît que les promoteurs de transcription dirigeant l'expression des gènes de transposase sont généralement très faibles (Galas and Chandler, 1989), généralement localisés à proximité des IR, les protéines qui se fixeraient sur ces IR réprimerait ces promoteurs; c'est ainsi que la transposase autorégulerait sa propre synthèse.

La dam méthylation est une fonction de l'hôte qui modifie l'adénine dans la séquence GATC sur un brin nouvellement synthétisé, engendré par la réplication. Après le passage d'une fourche de réplication, l'ADN est donc transitoirement méthylé sur un seul brin d'ADN (hémiméthylé).

On observe des sites de méthylation dam au niveau des promoteurs des gènes de transposase (Roberts *et al* , 1985; Mc Commas and Syvanen, 1988). La méthylation de ces sites réprime l'activité des promoteurs, de sorte que l'expression de la transposase ne peut se faire qu'aussitôt après le passage d'une fourche de réplication (Kleckner, 1989).

De cette manière, la capacité de transposition est dépendante du cycle de réplication.

Contrôle traductionnel

L'expression de la transposase peut être limitée au niveau de la traduction par la synthèse d'ARNm du gène de transposase présentant une stabilité réduite (McCommas and Syvanen, 1988) ou par le manque d'efficacité des signaux d'initiation de la traduction.

b. Contrôle de la réaction de transposition.

La mobilité d'un transposon est également dépendante de la réaction de transposition elle-même. L'instabilité de la transposase de même que son action préférentielle en *cis* limite la fréquence de transposition. Il existe un certain nombre de facteurs encodés par l'hôte ou bien par le transposon lui-même qui interviennent au niveau de la régulation de cette réaction.

Régulateurs encodés par l'élément

Certains transposons codent pour des protéines inhibitrices qui moduleraient la transposition par interaction directe avec la transposase ou par fixation compétitive sur le site d'activité de la transposase. C'est le cas du Tn5 par exemple que nous verrons plus en détail dans le paragraphe qui lui est consacré.

On parle d'immunité transpositionnelle lorsqu'une molécule contenant une copie d'un élément n'est plus utilisée comme cible pour la transposition.

Cette immunité transpositionnelle est spécifique et n'empêche pas aux autres types de transposons de s'insérer dans la molécule. Il a été proposé que la présence d'un IR sur une cible potentielle interférerait avec la formation d'un complexe nucléoprotéique impliquant la transposase, les IR et la cible (Kans and Casadaban, 1989). L'immunité pourrait dépendre de la fixation de la transposase sur l'IR présente sur la cible (Amemura *et al* , 1990).

Régulateurs encodés par l'hôte

Comme nous l'avons vu précédemment, la dam méthylation module l'expression de la transposase, mais elle intervient également dans la régulation en *cis* de la réaction de transposition.

	<u>Tn5</u>	<u>Tn4430</u>
<u>Répétitions directes aux sites cibles.</u>	9pb	5pb
<u>Caractéristiques</u>	Transposon <u>composite</u> constitué par deux IS50	Transposon <u>cointégratif</u>
<u>Taille</u>	5800 pb	5638 pb
<u>Mode de transposition</u>	Mode conservatif	Mode réplicatif
<u>Résistances</u>	Kanamycine Streptomycine Bleomycine	Kanamycine
<u>Fréquence de transposition</u>	5×10^{-5} cell./générat.	$1,4 \times 10^{-5}$ cell./générat.
<u>Fréquence de résolution</u>	-	4×10^{-2} cell./générat.
<u>Origine</u>	Le phage porteur du Tn5 fut initialement isolé chez un facteur R de <i>Klebsiella</i> (Berg <i>et al</i> , 1975)	Le Tn4430 initialement trouvé associés avec d'autres éléments d'insertions aux gènes de toxine de <i>bacillus Thurnigensis</i> . (Mahillon <i>et al</i> , 1985) à été modifié afin de lui conférer une résistance à la kanamycine. (Mahillon &Lereclus, 1988)

Tableau 1.2: Tableau comparatif reprenant l'ensemble des caractéristiques principales des deux transposons utilisés (le Tn4430 et le Tn5).

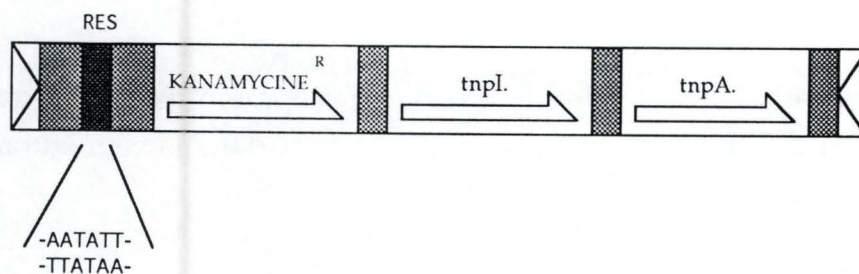


Fig. 1.7: La séquence de 5638 pb du Tn4430 contient des IR de 38 pb, un gène de resolvase (tnpI), un gène de transposase (tnpA), un site *res* interne et un gène de résistance à la kanamycine.

Certains IR présentent des sites de dam méthylation qui, lorsqu'ils sont méthylés interfèrent avec la fixation de la transposase à cet endroit (McCommas and Syvanen, 1988). La transposase dont la synthèse est favorisée après le passage d'une fourche de réplication ne pourra interagir qu'avec les IR activés (c.a.d hémiméthylés) de l'IS au départ duquel elle a été synthétisée, mais pas au niveau d'extrémités d'autres copies de l'IS qui ne sont pas activées. Dès lors la régulation par la méthylation dam accentue le phénomène de *cis* préférence.

La protéine F.IS impliquée dans de nombreuses réactions telle l'excision du phage lambda, peut se fixer au niveau d'une séquence spécifique des IS qui recouvre les sites DAM et engendre une diminution de l'activité de transposition de l'IS (Weinreich and Reznikoff, 1992).

L'effet de certains facteurs protéiques, de l'instabilité des ARNm et de la dam méthylation vont contribuer par leurs actions à une régulation fine du mécanisme de transposition. Cependant, pour la majorité des transposons étudiés à ce jour, la plupart des facteurs intervenant afin de favoriser ou limiter la transposition restent inconnus.

4.2 Description du Tn4430 et du Tn5: outils dans le séquençage

Voyons maintenant de façon plus détaillée et plus spécifique les caractéristiques des deux transposons qui vont être utilisés dans ce travail.

Un tableau comparatif (tableau 1.2) donne les caractéristiques principales de ces deux transposons.

4.2.1 Le Tn4430

Le Tn4430 (figure 1.7) est un transposon dont la transposition s'effectue en deux étapes suivant un mode cointégratif. La transposition de cet élément engendre des duplications de 5pb chez la cible.

D'une taille de 5638pb, délimité par des IR de 38pb, il présente trois phases ouvertes de lecture; le gène APHIII conférant la résistance à la Kanamycine a été introduit artificiellement en amont des deux ORF initiales qui codent respectivement pour la transposase (TnpA) et la résolvasse (TnpI) (Mahillon and Lereclus, 1988)

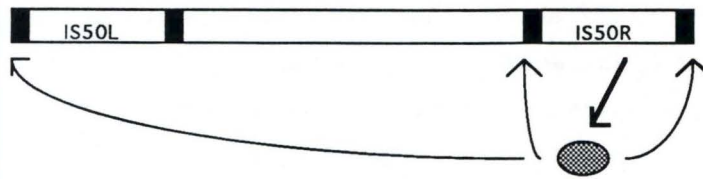
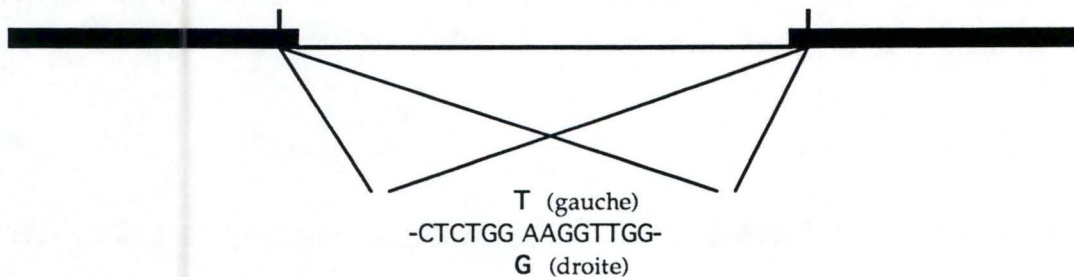


Fig. 1.8: Cette figure illustre la capacité qu'a la protéine 1 (transposase) de médier la transposition de l'élément IS50R seul ou celui du transposon complet.

(A)



(B)

UAA (gauche)
... CUC UGC GGU UGG ...
GAA (droite)

STOP (gauche)
... LEU TRP GLY TRP ...
Glu (droite)

Fig. 1.9: Représentation schématique du Tn5.

(A). Séquence nucléotidique des extrémités internes des IS gauche et droite, la simple paire de base non homologues entre les deux IS est indiquée en caractère gras.

(B). Séquence peptidique codante des extrémités internes des IS gauche et droite, le codon UAA sur l'IS gauche génère un codon STOP là où l'IS droite génère un codon GAA (Glu).

(C). Le changement de cette simple paire de base dans l'ISL entraîne, la terminaison prématurée des protéines 1 et 2 et, la création d'un promoteur pour la transcription des gènes responsables de la résistance aux antibiotiques aminoglycosidiques.

La région en amont des trois gènes présente un site *res* nécessaire à la réaction de recombinaison site-spécifique médiée par la résolvasse.

4.2.2. Le Tn5

Ce transposon de 5800pb possède des régions répétées de 1533pb qui bordent une région unique de 2752pb codant pour les résistances à la Kanamycine, la bléomycine et la streptomycine. Ces régions répétées sont constituées par deux IS50.

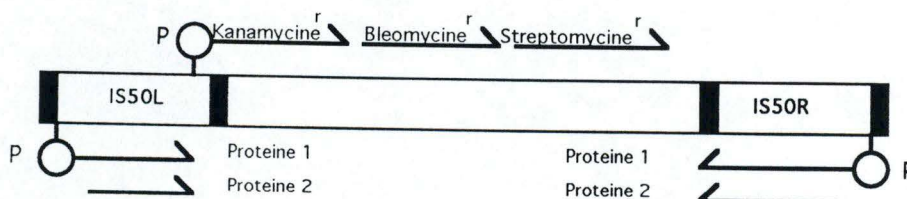
L'IS50R est fonctionnelle et produit à partir du même cadre de lecture deux protéines d'une différence de taille de 40 aa (protéine 1 et protéine 2). La transposase (protéine 1) permet le mouvement de l'IS seul ou du transposon complet (figure 1.8). La protéine 2 inhibe la transposition par compétition avec la protéine 1 pour la fixation sur son site de reconnaissance ou par la formation d'un complexe oligomérique inactif avec celle-ci.

L'IS50L est non fonctionnelle pour la transposition et produit deux protéines tronquées du coté C-terminal.

Les différences fonctionnelles observées sont générées par une simple substitution d'une paire de bases entre les deux extrémités internes des deux IS. A cette position, la répétition gauche présente un T-A, là où la répétition droite présente un G-C (Rothstein and Reznikoff, 1981), créant un codon ochre sur l'IS50L (figure 1.9).

Ceci entraîne d'une part, la terminaison prématurée de la traduction des protéines 1 et 2 créant des protéines tronquées non fonctionnelles pour la transposition et, d'autre part, engendre la création d'un promoteur pour la transcription de la région centrale (Berg and Berg, 1983).

(C).



II. OBJECTIFS.

II.OBJECTIFS DU TRAVAIL.

L'objectif de ce travail vise à éprouver l'hypothèse d'une identité des locus de la β -galactosidase dans deux organismes: *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* et *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* généralement considérés comme variétés distinctes.

Pour répondre à la question de façon définitive, nous allons séquencer le gène de la variété *marxianus* pour le comparer au gène connu de la variété *lactis*. Nous adoptons pour ce faire une stratégie transpositionnelle.

Les résultats obtenus devraient éclairer les problèmes des relations phylogénétiques entre les deux organismes.

III. RÉSULTATS.

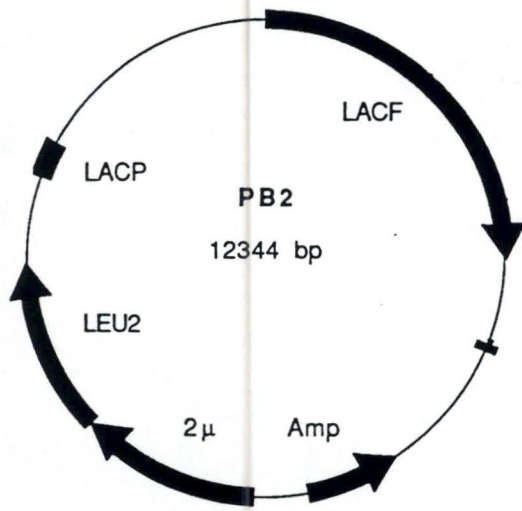


Fig. 3.1: Les différentes mutagenèses transpositionnelle ont été réalisées sur le pB2 qui est constitué d'une matrice YEp351 (5644pb) dans laquelle est inséré un fragment de 6.7 Kb contenant l'entièreté du gène LACF (3Kb) et un fragment du gène LACP (voir figure 1.1).

<u>Conditions de culture</u>	<u>phénotype des colonies</u>
<u>NK6702</u>	● a.
LB + Chl + X-gal LB + Chl + X-gal + 2% glucose.	○ b.
<u>NK6702 + pB2</u>	● c.
LB + Chl + Amp + X-gal LB + Chl + Amp + X-gal + 2%glucose	● d.

Fig. 3.2: Contrôles effectués afin de vérifier l'effet de la répression catabolique sur l'expression de lacZ d'E.coli et sur le gène LACF introduit.

En absence de glucose; la β -galactosidase d'E.coli est activée et les colonies présentent une coloration bleues sur X-gal (a et c).

En présence de glucose; il y a répression de la β -galactosidase d'E.coli et les colonies présentent une coloration blanche (b), la présence dans ces cellules du gène LACF non soumis à la répression engendre une coloration bleue (d).

Le test blanc-bleu va donc nous permettre de tester l'activité de la β -galactosidase de *K. var. marxianus* dans une souche d' E.coli ($lacZ^+$) soumis à la répression catabolique.

III.RESULTATS.

1.PRODUCTION D'UNE BATTERIE DE TRANSPOSANTS.

Cette étape consistera à créer une batterie de "transposants" à des sites multiples de l'insert contenant le gène de β -galactosidase (LACF) (figure 3.1). Le screening des transposants s'effectuera sur base du phénotype résultant de la disruption du gène LACF par un transposon. Le gène de β -galactosidase de *K. var. marxianus* ,est exprimé en une enzyme active chez *E.coli* (Laloux *et al* ,1990) et se prête donc au test blanc-bleu (voir matériels et méthodes, section 5.1) dans une souche d'*E.coli* phénotypiquement lacZ⁻.

Deux approches sont alors possible afin de réaliser ce "screening":

La première consiste à réprimer l'activité de la β -galactosidase d'*E.coli* chez une souche (lacZ⁺), afin d'y tester l'expression du gène introduit. (on parlera de screening en répression glucose).

En effet, chez *E.coli*, le gène de β -galactosidase est dérprimé par la présence de molécules inductrices (le lactose ou l'IPTG) et soumis à la répression catabolique en présence de glucose (voir matériels et méthodes, section 2.1.2).

En l'absence d'inducteur et en présence de glucose (2%) et de X-gal, les bactéries lacZ⁺ forment des colonies blanches.

Il a d'autre part été montré que le gène de β -galactosidase de *K. var. marxianus* ne subit pas la répression par le glucose chez *E.coli* (Laloux *et al* ,1990)

Des contrôles ont, de plus été, effectués afin de vérifier si ces propriétés sont applicables aux souches utilisées (figure 3.2).

La seconde consiste à effectuer le screening directement dans une souche d'*E.coli*, dépourvue de β -galactosidase (lacZ⁻) par disruption ou déletion de son locus lac (on parlera de screening chez une souche lacZ⁻).

Disposant ainsi d'un test phénotypique simple, nous allons développer ces deux approches afin de mettre en oeuvre la mutagenèse par transposition.

1.1 Production de transposants par le Tn4430

1.1.1. Isolement des transposants en répression glucose

Le Tn4430 qui porte le marqueur de résistance à la Kanamycine (Mahillon & Lereclus, 1988) a été inséré sur le dérivé de facteur conjugatif, pox38. Celui-ci a ensuite été introduit dans la souche HB101 d'*E.coli* en lui apportant la résistance à la kanamycine et la capacité de conjugaison (F⁺). (voir matériel et méthodes, section 2.2)

1.1.1.1. Sélection des transformants

La transformation par le pB2 de la souche HB101 modifiée lui apporte la résistance à l'Ampicilline et va nous permettre de sélectionner les transformants HB101 sur un milieu contenant du LB + Amp + Kan.

Au sein de ces transformants, le Tn4430 va transposer avec une faible fréquence de $1,4 \times 10^{-5}$ par génération (Mahillon and Lereclus , 1988).

1.1.1.2. Sélection des transposants

Parmi ces événements transpositionnels, nous ne voulons sélectionner que ceux qui s'effectuent sur le pB2, et parmi ceux-ci, nous ne nous intéresserons qu'à ceux qui disruptent le gène LACF présent dans l'insert.

Pour ce faire, nous utilisons les propriétés de transposition du Tn4430 et de conjugaison du pox38.

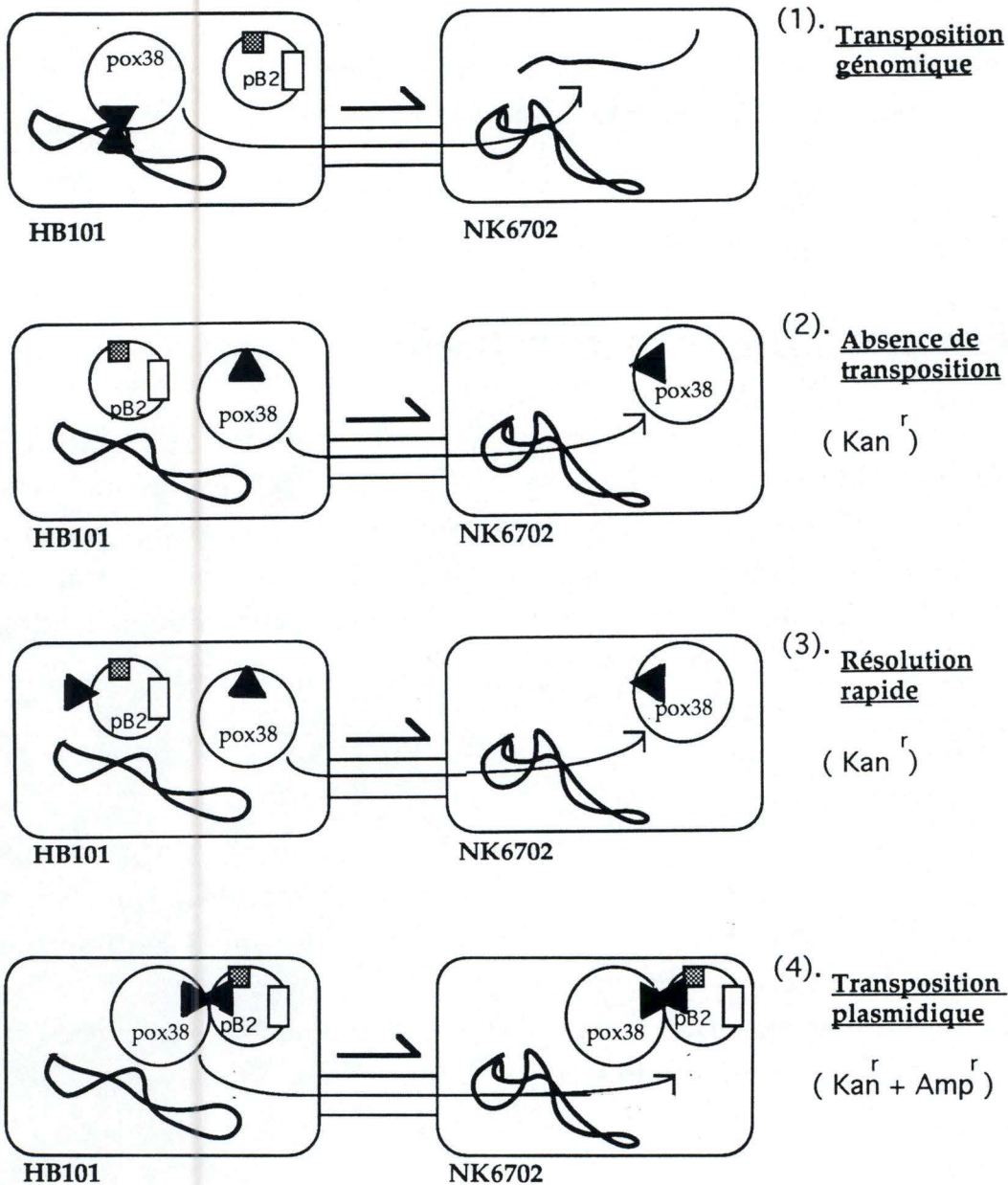


Fig. 3.3: Les événements de conjugaison réalisés entre la souche HB101 transformée (F⁺, Kan^r, Amp^r) et la souche NK6702 (F⁻, Chl^r) vont nous permettre de sélectionner uniquement les événements de transposition se réalisant dans le pB2.

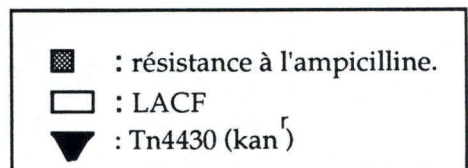
(1). Une transposition génomique ne sera pas sélectionnée par absence de conjugaison complète.

(2). En cas d'absence de transposition, le pox38 conjugue seul et n'apporte pas la résistance à l'Amp dans la souche NK6702, cet événement n'est pas sélectionné.

(3). En cas de résolution rapide dans HB101, le pB2 est séparé du pox38 et celui-ci conjugue sans apporter la résistance à l'Ampicilline nécessaire pour la sélection.

(4). Lors d'une transposition plasmidique, le cointégrat conjugue en apportant la résistance à la Kanamycine et à l'Ampicilline nécessaires à la sélection.

Seuls ces derniers événements seront sélectionnés dans NK6702.



Rappelons à cet effet que le Tn4430 est un transposon de type cointégratif dont la transposition passe par une structure appelée cointégrat, au niveau de laquelle le transposon établit un lien entre le site donneur et le site cible (figure 1.6) avant d'être résolu par une recombinaison site - spécifique.

La réalisation d'un événement de conjugaison entre la souche HB101 transformée et la souche NK6702 (F⁻, lacZ⁺, Chl^R) nous permettra, par le passage du cointégrat, (pox38 :: Tn4430 (Kan^R) + pB2 (Amp^R)) de sélectionner uniquement les événements de transposition plasmidiques. (figure 3.3). Le pB2 ne pouvant conjuguer par lui-même, le transfert de la résistance à l'ampicilline dans la souche NK6702 ne peut s'expliquer que par une transposition du Tn4430 sur le pB2.

Pour ce faire, on mélange les 2 souches (HB101 et NK6702) qu'on laisse 5h sur milieu LB (pour permettre la conjugaison). Ensuite, on strie les cellules sur un milieu LB + Amp + Kan + Chl + 2% glucose + X-gal, pour isoler les divers types de transposants plasmidiques.

L'immunité tranpositionnelle assure la stabilité des transposants isolés.

1.1.1.3. Screening phénotypique des transposants

Sur base des contrôles effectués (figure 3.2) nous pouvions effectivement espérer screener les différents transposants par le test blanc-bleu.

Les résultats montrent (tableau 3.1) qu'après striage, toutes les colonies présentent un phénotype uniformément blanc. Après 10 jours à 4°C, ces mêmes cellules, comme les contrôles non transformés, présentent une légère coloration bleue. Ceci pourrait s'expliquer, soit par une perte de la répression catabolique du gène lacZ d'E.coli, soit encore par la présence de LACF non disrupté.

Quant au phénotype uniformément blanc après striage des colonies isolées, il pourrait résulter d'une production d'activité β -galactosidase en - dessous du seuil de détection du test.

	Coloration des colonies après striage.	Coloration des colonies après 10 jours.
Colonies NK6702 + pB2::Tn4430 (500 colonies)	○	●
Colonies NK6702 en répression glucose	○	●
Colonies NK6702 sans répression glucose	●	●

Tableau 3.1: Ce tableau reprend les résultats des expériences réalisées lors de l'isolement des transposants en répression glucose, et de leurs striages sur boîtes LB + Amp + Kan + Chl + glucose + X-gal. Les résultats des contrôles de répression catabolique (cfr fig. 3.2) sont également repris.

1.1.1.4. Hypothèse concernant le faible niveau d'expression de β -galactosidase

Nous avons pu exclure, en répétant les expériences qu'un des constituants tant biologiques (souches, plasmides), que sélectifs (antibiotiques) et discriminatifs (X-gal, glucose) puisse être en cause.

Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle le transposon aurait transposé à 100% dans LACF est également à exclure comme nous le montrent les expériences réalisées ultérieurement (Résultats 1.1.2).

L'hypothèse, que nous privilégions, est que le taux faible de β -galactosidase reflèterait la faible proportion de transcrits produits. Bien que les mécanismes moléculaires exacts intervenant dans l'expression hétérologue du gène LACF chez *E.coli* ne soient pas connus, il est néanmoins fort probable qu'elle dépende du nombre de copies de ce gène. Alors que ce nombre de copies atteint une quantité de 500 à 700 copies par cellule pour le pB2, le dérivé conjugatif pox38 atteint seulement 1 ou 2 copies par cellule.

La présence d'une structure cointégrative dans la souche NK6702 entre le pB2 et le pox38::Tn4430 génère une molécule d'ADN fusionnée d'une taille de 74Kb contenant deux origines de répllication différentes. Les plasmides générés par fusion contenant plus d'un réplicon, n'en ont qu'un seul actif (Sambrook and Fritsch,1989)

Il est donc possible que la réalisation d'un cointégrat soit, de par sa taille et/ou de par l'interaction entre les deux origines de répllication différentes, défavorable à la propagation d'un nombre élevé de copies dans la cellule. La transcription du gène LACF serait alors réduite à néant ou à un seuil indétectable par le screening phénotypique utilisé.

Quoiqu'il en soit, ces résultats nous obligent à conclure que le test est inopérant dans les conditions utilisées. Nous orientons alors notre travail vers l'utilisation de la seconde approche (III.1).

1.1.2. Isolement des transposants au départ d' une souche lacZ⁻

Dans cette approche, toutes les étapes de sélection des transformants et des transposants sont identiques à celles décrites dans l'approche précédente, la seule différence réside dans l'utilisation de la souche X11Blue d'*E.coli* (lacZ⁻).

1.1.2.1 Screening phénotypique des transposants

Dans les conditions expérimentales utilisées, la souche X11 Blue d'*E.coli* transformée par le pB2 est strictement lacZ⁻ (puisque disruptée au locus chromosomique lac) et incapable d'effectuer la complémentation intragénique (absence de synthèse d'une β -galactosidase d'*E.coli* active).

En effet, le plasmide pB2 est disrupté dans le région (LACZ') codant pour la sous-unité α nécessaire à cette complémentation (matériels et méthodes, section 2.1.2.3) par l'insert contenant le gène LACF.

Notre screening reposera donc, en l'absence de synthèse de β -galactosidase endogène, sur la détection de clone lac⁻ résultant de transposition disruptive dans le gène LACF.

Pour ce faire, nous prélevons une colonie isolée par stries NK6702 et nous repiquons l'ensemble des colonies sur une boîte LB + Amp + Kan + Chl. Ce repiquage nous permet de rassembler sur une même boîte, des clones ayant subi des événements de transposition différents (la fréquence de transposition étant très faible, il est fort probable que chaque strie ne contienne que très peu d' événements de transposition différents).

Par la suite, nous râclons la boîte avec du LB et préparons l'ADN plasmidique avec lequel nous transformons la souche X11Blue (cette approche est dite par "événement dépendant")

La sélection des transformants et le screening des transposants se fait sur un milieu LB + Amp + Kan + X-gal.

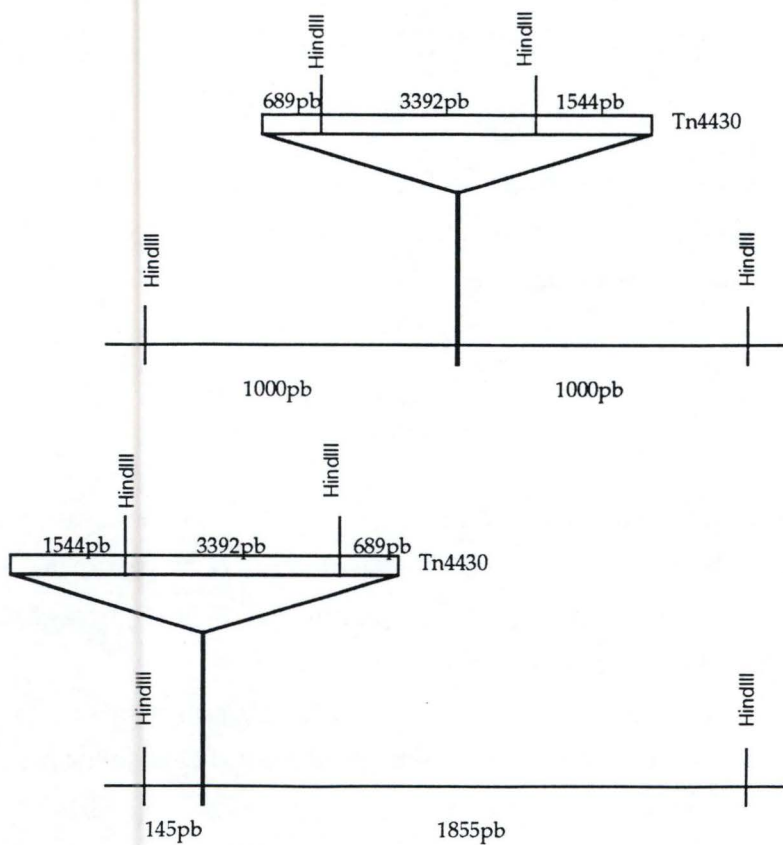


Fig.3.6: L'utilisation de sites diagnostiques asymétriques sur le transposon (tel HindIII) ne nous permet pas de déterminer la localisation précise du Tn. Celui-ci peut en effet s'insérer dans les deux sens et compliquer le diagnostic.

Cette figure illustre comment, dans un cas particulier, le Tn4430 inséré dans deux régions distantes de 850pb peut générer dans les deux cas 3 fragments identiques de 3392pb (fragment interne du Tn), 2544pb, 1689pb lors d'une restriction.

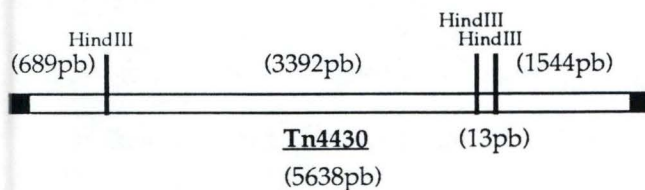
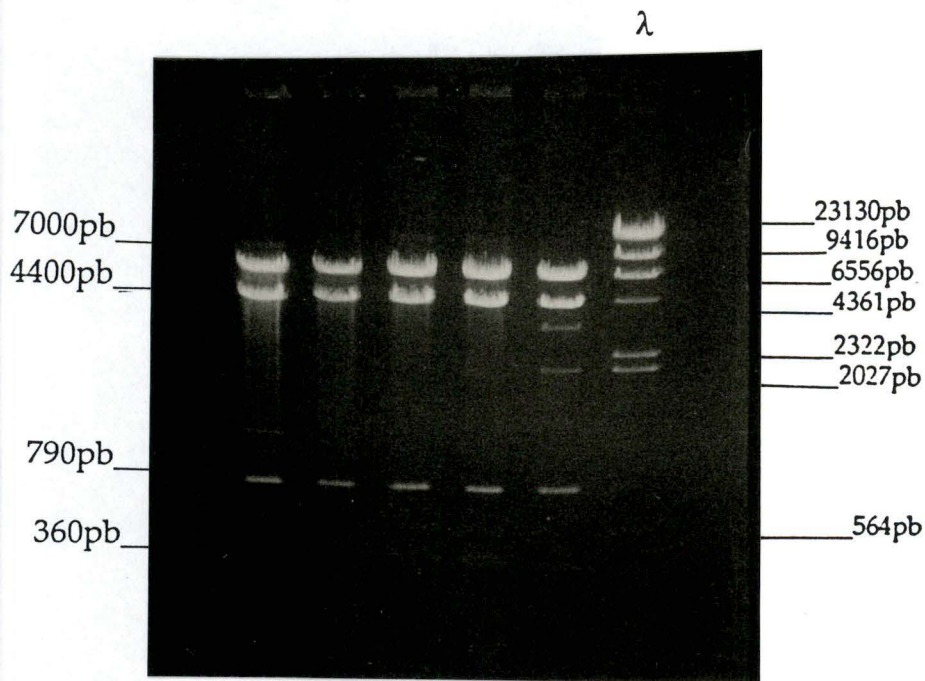


Fig. 3.4: Localisation des sites de restriction HindIII sur le Tn4430. On peut observer le fragment de 3392pb interne au Tn.

1.



2.

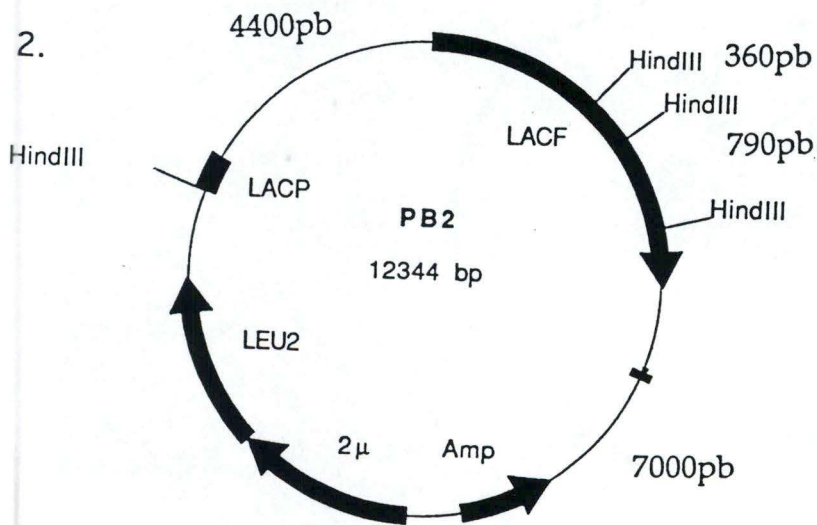


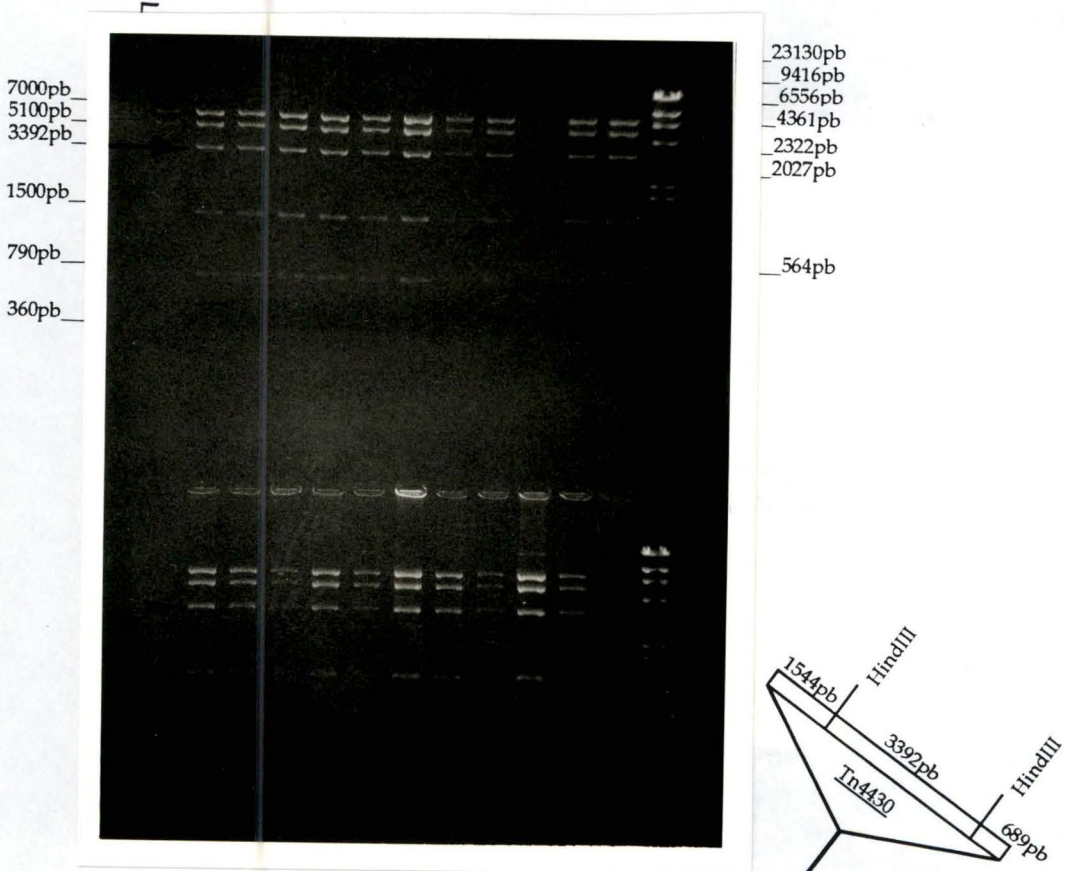
Fig. 3.5:

(1). Photo d'un gel d'agarose correspondant à la restriction du pB2 par l'enzyme de restriction HindIII, on observe 4 fragments bien distincts de 7000pb, 4400pb, 790pb et 360pb. L'étalon est constitué par l'ADN du phage λ restreint par HindIII.

(2). Représentation du pB2 et localisation des sites HindIII. Il y a trois sites HindIII dans LACF et un site dans le SMC.

(A).

λ



(B).

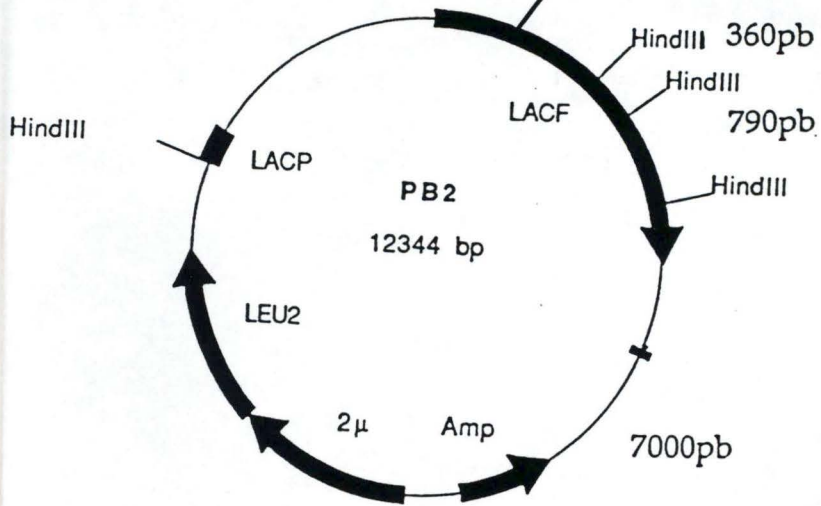


Fig. 3.7:

(A). Photo d'un gel d'agarose correspondant à la migration de 24 transposants blancs prélevés au hasard et restreints par l'enzyme de restriction HindIII. On observe 24 profils identiques générant 6 fragments de 7000pb, 5100pb, 3393pb (fragment interne du Tn4430), 1500pb, 790pb et 360pb.

(B). Représentation de la localisation probable du Tn4430 dans les 24 transposants (cette localisation a été confirmée par le séquençage).

Celui-ci révéla un rapport de 1 colonie blanche pour 40 colonies bleues.

On devrait théoriquement s'attendre à un rapport de 1 colonie blanche pour 2 colonies bleues (25% de la taille du pB2 correspond à LACF; sur les 75% restants, seuls 50% peuvent subir un événement de transposition qui ne soit défavorable ni à la réplication, ni à l'expression du gène de résistance à l'Ampicilline.)

1.1.2.2. Localisation des transposants

Par une restriction diagnostique HindIII, le transposon est localisé dans le gène LACF. Comme attendu, on observe sur les profils de restriction un fragment de 3392pb interne au transposon (figure 3.4, figure 3.7).

La situation des sites HindIII du pB2 a été déterminée lors de l'établissement de la carte physique du gène (De Bolle, 1990) et génère quatre fragments bien distincts de 7000pb, 4400pb, 790pb et 360pb (figure 3.5).

La localisation du transposon au site cible présentera une certaine imprécision (figure 3.6). La localisation plus précise du site d'insertion du transposon sera effectuée par séquençage.

Une restriction diagnostique HindIII réalisée sur 24 colonies blanches prélevées au hasard révéla un profil de restriction identique pour chacun des transposants (figure 3.7).

La localisation approximative de ce transposon a pu être déterminée par l'analyse du profil de restriction HindIII.

Un des 24 transposants, appelé Tn4430(1), est retenu afin de le séquencer. Les résultats concernant le séquençage seront détaillés ultérieurement

La première question qui se pose concerne l'identité des 24 transposants choisis au hasard.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour rendre compte de ce résultat.

1-Les événements de transposition disruptants LACF sont non seulement très rares (1 colonie blanche / 40 colonies bleues) mais lorsqu'ils se produisent c'est toujours à un site particulier (un "spot ").

<u>Coloration des colonies XL1Blue après transformation avec l'ADN plasmidique des colonies NK6702 (pB2 ::Tn4430).</u>	
<u>colonie 1</u>	●
<u>colonie 2</u>	●
<u>colonie 3</u>	●
<u>colonie 4</u>	●
<u>colonie 5</u>	●
<u>colonie 6</u>	●
<u>colonie 7</u>	●
<u>colonie 8</u>	●
<u>colonie 9</u>	●
<u>colonie 10</u>	●
<u>colonie 11</u>	○
<u>colonie 12</u>	●
<u>colonie 13</u>	●
<u>colonie 14</u>	●
<u>colonie 15</u>	●
<u>colonie 16</u>	●
<u>colonie 17</u>	●
<u>colonie 18</u>	●
<u>colonie 19</u>	●
<u>colonie 20</u>	●
<u>colonie 21</u>	●
<u>colonie 22</u>	●
<u>colonie 23</u>	●
<u>colonie 24</u>	●

Fig.3.8: Résultats des 24 transformations indépendantes dans XL1Blue.

Sur les 24 transformations d'XL1Blue avec l'ADN plasmidique de 24 colonies NK6702 provenant des stries (cfr 1.1.1.2) une seule présente un phénotype blanc (colonie 11).

2-Il est également plausible que la transformation des XL1blue par l'ADN plasmidiques préparé à partir des repiquages (NK6702) ne représente pas la variabilité des clones. Par ce biais, qui pourrait être issu d'un nombre de copies de plasmides variables dans NK6702 (dû à des résolutions rapides), XL1Blue serait transformée par un nombre limité de plasmides différents. dans notre situation, un seul plasmide a pu être mis en évidence.

Afin d'infirmer ou de confirmer l'une ou l'autre des possibilités, nous avons refait les expériences en favorisant "l'indépendance entre les événements".

A cette fin, les ADN plasmidiques provenant des colonies NK6702 isolées sont préparés et introduits séparément dans la souche Xl1Blue.

Sur 24 transformations indépendantes, une seule donnera des colonies blanches sur milieu LB + Amp + Kan + X-gal (figure 3.8).

Sur ces bases, nous confirmons les résultats précédents et excluons la seconde hypothèse concernant la possibilité de sélectionner un transposant particulier aux

dépens d'une population au départ variée.

Une restriction diagnostic HindIII réalisée sur ce nouveau clone blanc appelé Tn4430(2) (figure 3.9) révèle un profil différent de celui du premier clone Tn4430(1) isolé.

Nous effectuons une tentative de localisation du Tn dans ce clone et le localisons dans une région différente de celle du Tn4430(1).

Nous pouvons donc également exclure la première hypothèse concernant la transposition dans un site particulier.

La seconde question posée par ces résultats concerne le très faible nombre de transposants blancs obtenus.

Les résultats obtenus par cette nouvelle expérience, nous indiquent que sur 24 événements de transposition indépendants, 23 s'effectuent en dehors de LACF (23 colonies bleues/ 1 colonie blanche).

Nous devons donc orienter notre recherche vers une hypothèse permettant d'expliquer cette faible fréquence de transposition dans LACF.



(C).

N° transposon	Nombre de fragments	Taille des fragments (en pb)
Tn4430(1)	6	7000 1500
		5100 790
		3392 360
Tn4430(2)	6	7000 1800
		4400 790
		3392 360

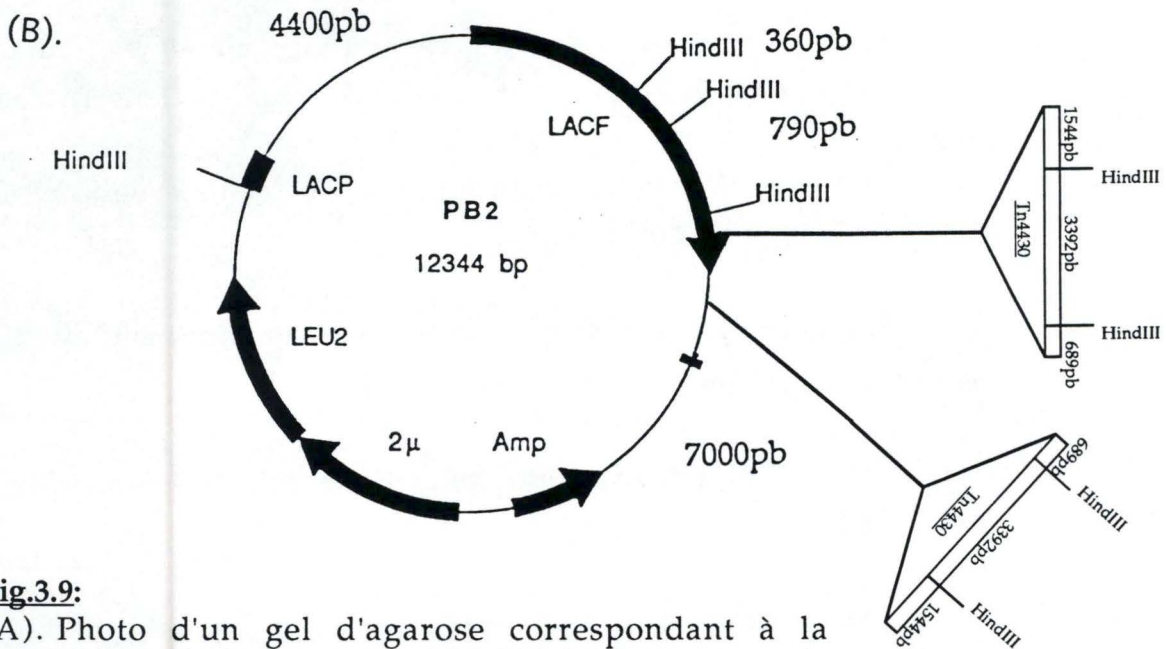


Fig.3.9:

(A). Photo d'un gel d'agarose correspondant à la restriction HindIII du clone Tn4430(2) (piste 2) comparée à la restriction HindIII sur le clone Tn4430(1) (piste1); le standard de taille correspond à l'ADN du phage λ restreint par HindIII.

(B). Représentation des deux localisations possibles du Tn4430 dans le clone Tn4430(2).

(C). Ce tableau reprend le nombre et la taille des fragments de restriction des clones Tn4430 restreint par HindIII.

1 2 3 4 5 6 7 Tn4430(2)
Tn4430(2) Tn4430(1) λ



Fig. 3.10: Photo d'un gel d'agarose d'une restriction diagnostique HindIII réalisée sur 7 colonies X11Blue bleues prélevées au hasard. Les profils de restriction sont différents pour chacun des clones et permettent d'exclure un "HOT SPOT" dans la matrice (piste 1 à 7). Les pistes (8,9) et (10) correspondent respectivement aux clones Tn4430(2) et Tn4430(1) restreints par HindIII. La piste 11 contient le standard de taille λ .

Le choix d'un site cible particulier reflète la voie par laquelle un complexe de transposition interagit avec l'ADN cible. Cette spécificité peut résulter de la reconnaissance d'une séquence cible spécifique (comme dans le cas du Tn10 (Kleckner, 1989)), d'une caractéristique structurale (comme dans le cas de l'IS231A (Hallet *et al* , 1991)) , ou des régions régulatrices de gènes également connues pour leurs propriétés de flexibilité ou de courbure intrinsèque (Galas & Chandler, 1989).

L'ensemble des critères qui interviennent dans le choix de cible du Tn4430 ne sont pas connus, néanmoins nous pouvons exclure la possibilité d'une insertion spécifique dans la matrice, car l'insertion du Tn4430 dans les transposons bleus s'est faite de façon aléatoire, comme nous le montrent les profils de restriction HindIII réalisés sur 10 transposons bleus (figure 3.10).

Certains transposons présentent une spécificité dite " régionale " pour certains segments d'ADN (Galas and Chandler, 1989). C'est le cas de l'IS1 et de l'IS186 qui montrent respectivement une nette préférence pour les régions riches en A/T et en G/C. (Meyer and Lida, 1980). Des transposons cointégratifs apparentés à Tn4430 montrent également une préférence pour les régions cibles riches en paires A/T (Tu and Cohen, 1980).

Les régions codantes des gènes de levure sont connues pour présenter un pourcentage de paires GC important. Il est donc possible que la faible fréquence de transposition du Tn4430 dans LACF résulte de la préférence de ce transposon pour les régions riches en paires de base A/T que représente la matrice.

Nos observations suggèrent donc une hypothèse tout-à-fait intéressante sur un aspect encore mal connu du comportement différentiel de certains transposons.

Une série d'investigations seraient nécessaires en vue de contribuer à la compréhension des déterminants de cette spécificité "régionale".

Mais ces investigations n'entrent pas dans le cadre de ce mémoire, qui rappelons-le consiste à établir la séquence du gène LACF. L'outil Tn4430 utilisé à cette fin ne s'est pas avéré adéquat pour des raisons qui sont peut-être liées à sa spécificité "régionale" qui mériterait d'être explorée par ailleurs. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un transposon (le Tn5) , dont l'utilisation à des fins de séquençage à déjà fait ses preuves dans de nombreux travaux.

1.2. Production de transposants par le Tn5

Le bactériophage lambda 467, vecteur du transposon Tn5 (Kan^R) est affecté par des mutations non-sens dans deux gènes essentiels à la réplication (Oam et Pam) et est déleté de ces sites att d'attachement. Il ne peut donc ni se répliquer, ni s'intégrer dans E.coli. Ce phage est donc un vecteur suicide dont le seul rôle est d'apporter le Tn5.

1.2.1 Sélection des transposants

La réaction de mutagenèse consiste à infecter la souche NK5830 (lacZ⁺) préalablement transformée par le pB2 (qui apporte la résistance à l'Ampiciline) avec le phage lambda 467. Le Tn5 apportant le gène codant pour la résistance à la Kanamycine, il est donc possible de sélectionner sur un milieu LB + Amp + Kan, les individus ayant subi un événement de transposition.

1.2.2. Screening phénotypique des transposants

Afin de déterminer parmi les différents transposants ceux dont LACF est rendu inactif par disruption par le Tn5, on transforme la souche X11Blue avec une préparation plasmidique des transposants NK5830. Cette étape permet également d'éliminer tous les transposants génomiques.

Le screening phénotypique s'effectue à nouveau comme dans le cas précédent (Resultats 1.1.2.) sur un milieu LB + Amp + Kan + X-gal; il révéla un rapport de 1 colonie blanche pour 5 colonies bleues. Ce rapport correspond approximativement (cfr 1.1.2.1.) au rapport existant entre la taille de LACF et celle de l'ensemble des autres régions du plasmide susceptibles d'être mutées sans porter préjudice à la survie de la cellule.

L'enzyme de restriction HindIII a été utilisée pour restreindre les transposants blancs et vérifier la diversité d'insertion du Tn5. Tout comme dans le cas des mutants Tn4430, la restriction HindIII génère un fragment interne au Tn5, d'une taille de 3420 pb, il permet d'établir avec certitude la présence du transposon au sein du gène.

Cette piste correspond au pB2 restreint par HindIII.

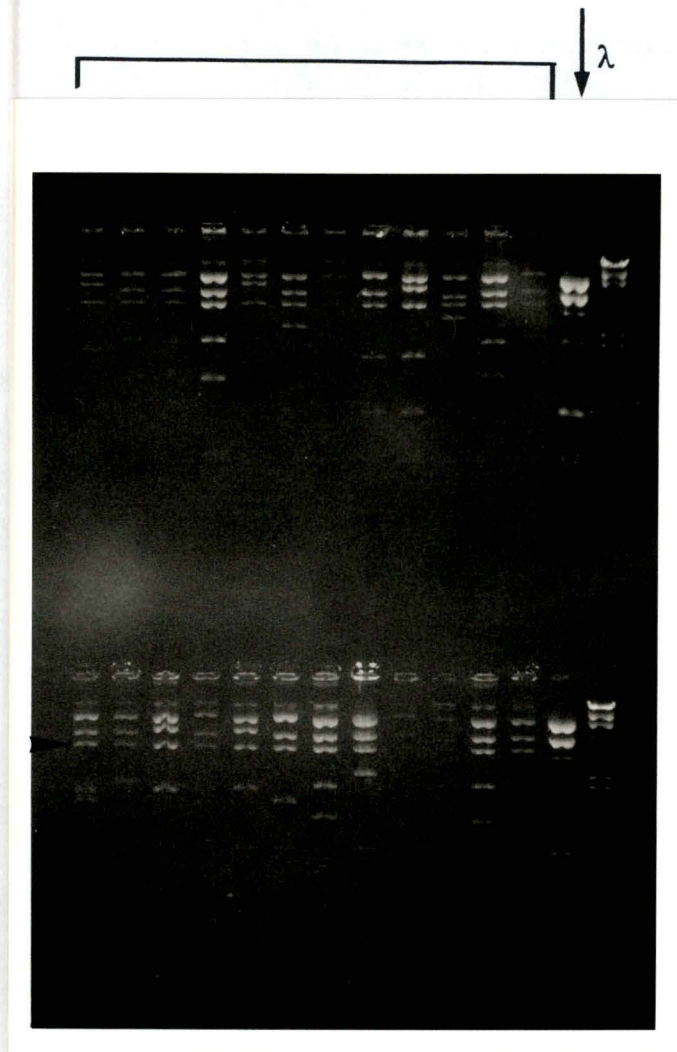


Fig.3.11:

Photo d'un gel d'électrophorèse montrant le profil de restriction HindIII de 24 transposants blancs pris au hasard. Ces profils sont différents et on observe dans chaque cas la présence du fragment interne du Tn5 de 3420pb. La localisation du Tn5 dans les transposants sera effectuée ultérieurement.

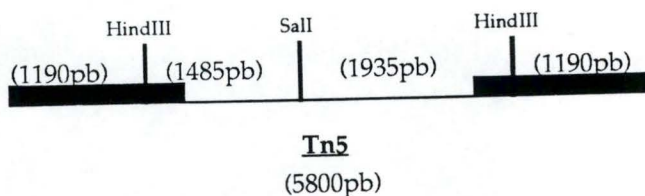


Fig.3.12: Localisation des sites HindIII sur le Tn5, on peut observer le fragment interne de 3420pb. (1485pb + 1935pb).

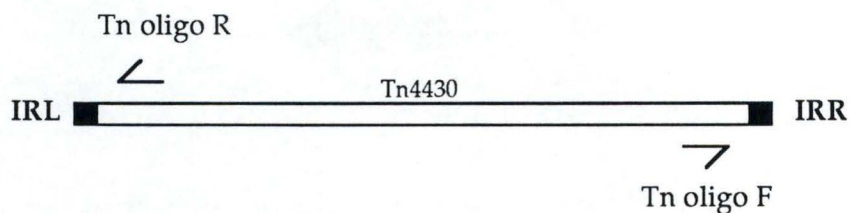


Fig.3.13: Utilisation du Tn4430 comme amorce pour le séquençage.

Les identités aux extrémités du Tn4430 se limitent aux IR de 38pb. Il est donc possible de synthétiser deux primers spécifiques (Tn oligo R et Tn oligo F) pour chaque extrémité du Tn4430, amorçant ainsi des réactions de séquençage en amont et en aval du site d'insertion du Tn.

Tn oligo R: 5'-TGATATATTTTCTGAT-3'

Tn oligo F: 5'-AGCCGTTTTATTCTTA-3'

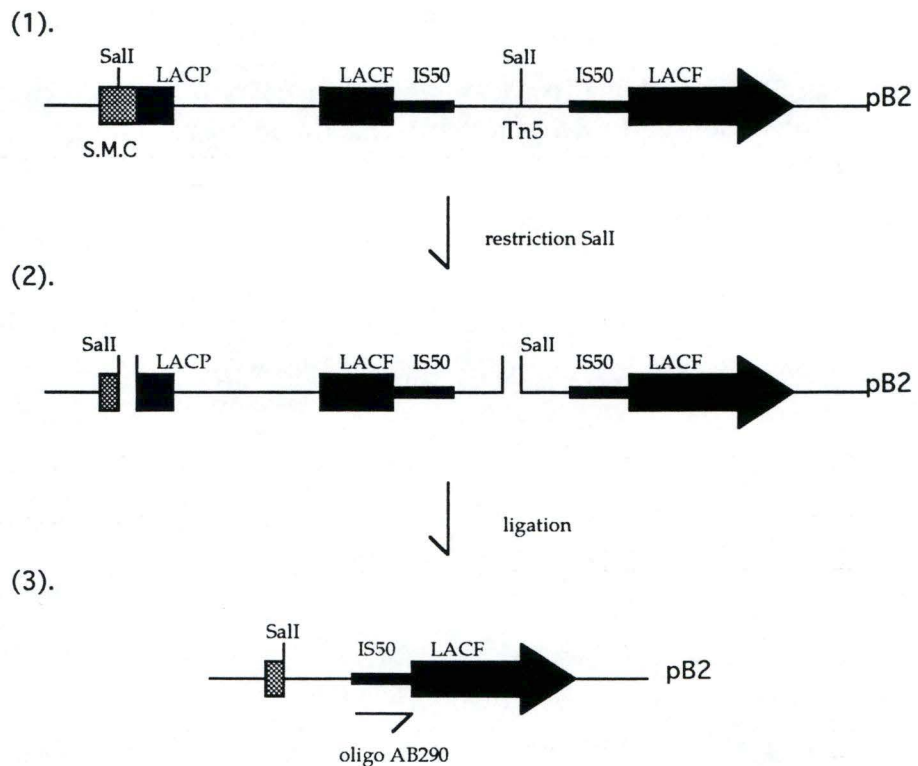


Fig. 3.14: Utilisation du Tn5 comme amorce pour le séquençage.

Dans le cas du Tn5, il est impossible de synthétiser deux primers spécifiques pour chaque extrémité; les "identités" s'étendent en effet sur plus de 1500pb (IS50R et IS50L).

Cette figure illustre l'étape de sous-clonage nécessaire pour enlever une des IS.

(1). Le gène LACF présent sur le pB2 est disrupté par le Tn5 complet.

(2). Une restriction SalI permet d'éliminer un fragment compris entre le site SalI du SMC et le site SalI interne au transposon (cfr fig. 3.12).

(3). L'amorçage de la réaction de séquençage peut alors s'effectuer avec un primer unique (AB290) se fixant sur l'extrémité de l'IS restant chez les délétants.

AB290: 5'-GAAAGGTTCCGTTTCAGGACGC-3'.

La restriction s'est effectuée sur 24 transposants Tn5 blancs pris au hasard et révéla 24 profils différents, nous rassurant sur l'absence de spécificité de cible du Tn5.(figure 3.11)

Le choix de ce nouvel outil transpositionnel est tout-à-fait concluant et va nous permettre la poursuite de notre travail par le séquençage des transposants isolés.

2. PREPARATION DES TRANSPOSANTS AU SEQUENCAGE:

Après la réalisation d'une banque de transposons, nous pouvons amorcer les réactions de séquençage à partir des extrémités connues des transposons.

Les expériences réalisées dans la première partie de ce travail, nous ont permis de réaliser une banque de transposants. Nous disposons de deux transposants Tn4430 et d'une batterie de transposants Tn5.

Nous allons préparer les différents transposants isolés, en vue de les séquencer.

Le Tn4430 est délimité par des IR de 38 pb, il est donc possible de synthétiser deux primers spécifiques localisés aux extrémités de la région comprise entre ces deux IR. (primer F pour IRR et primer R pour IRL) (figure 3.13).

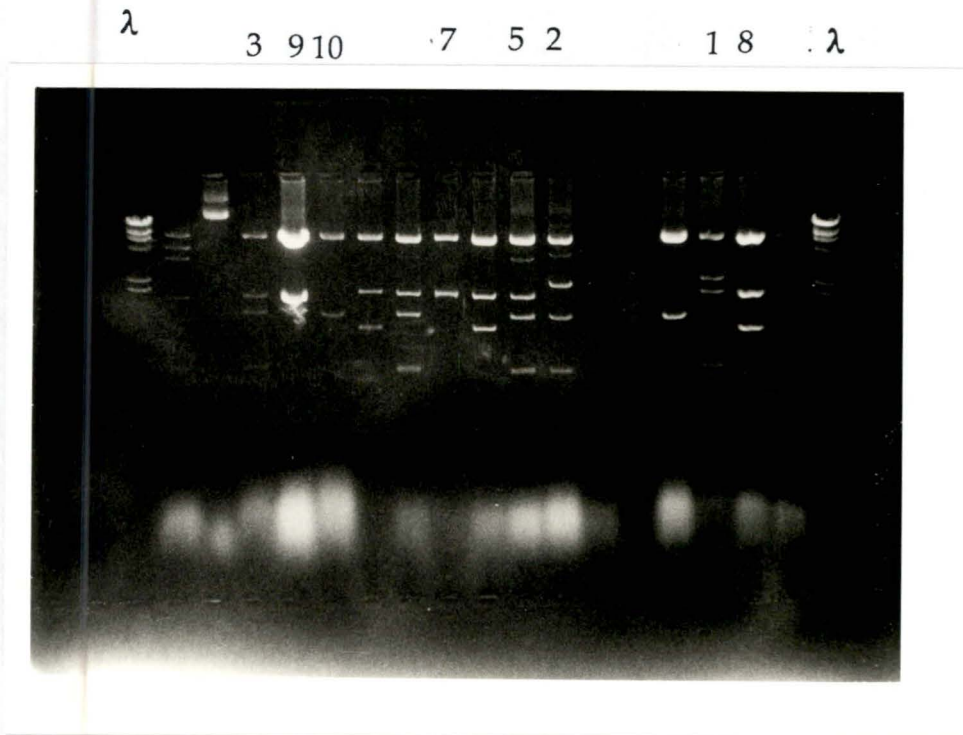
Dans le cas du Tn5, au contraire de la situation présentée par le Tn4430, les deux IS (ISR et ISL) de 1543pb étant quasi identiques ne permettent pas de concevoir au départ de chacun d'eux, des primers de séquençage distincts.

Une étape supplémentaire de sous-clonage des différents plasmides pB2::Tn5 a été réalisée par déletion de l'une des IS50 par une restriction SalI , qui élimine un fragment variable compris entre le site unique SalI du SMC du pB2 et le site interne au transposon (figure 3.14).

Une restriction diagnostic HindIII permettra par la suite d'isoler et de localiser 10 transposants Tn5 répartis tout au long du gène (figure 3.15).

Dès lors, l'ensemble des réactions de séquençage a été amorcé à partir d'un oligonucléotide unique (AB290) s'hybridant à l'extrémité de l'IS restant.

(A).



Le profil de restriction des clones 4 et 6 n'est pas présenté sur cette photo.

Fig.3.15:

(A).Photo du gel d'agarose montrant les profils de restriction HindIII des délétants Tn5. Cette restriction a permis de localiser l'IS restant sur les différents délétants. Chez ces délétants, en fonction de l'orientation initiale du Tn5, on observera soit un fragment interne au Tn de 1935pb ou de 1485pb (cfr. fig. 3.12). Le standard de taille correspond au λ , restreint par HindIII.

(B). Ce tableau reprend le nombre et la taille des fragments isolés en restriction HindIII chez ces différents clones.

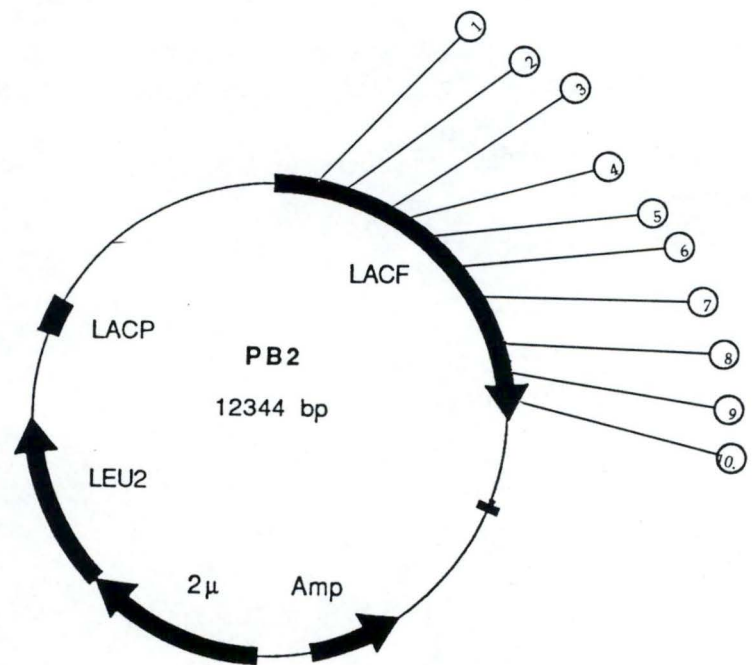
(C). Représentation de la localisation des 10 transposants Tn5 dans LACF.

(B).

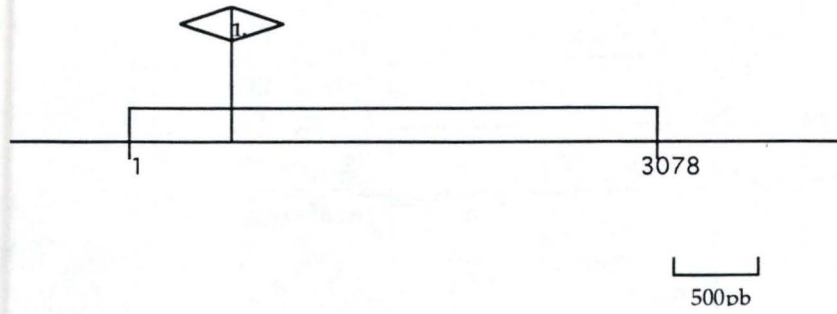
N° transposon	Nombre de fragments	Taille des fragments (en pb)		
Tn5 (1)	5	7000 2400	1935 790	360
Tn5 (2)	5	7000 2250	1321 790	360
Tn5 (3)	5	7000 1750	1935 790	360*
Tn5 (4)	5	7000 1935	1300 790	360*
Tn5 (5)	4	7000 1935	1400 790	
Tn5 (6)	4	7000 1321	1321 790	
Tn5 (7)	3	7000 1935	1930	
Tn5 (8)	3	7000 1935	1200	
Tn5 (9)	2	6700 1935		
Tn5 (10)	2	6500 1321		

*: Le fragment n'est pas visible sur la photo

(C).



(A).



(B).

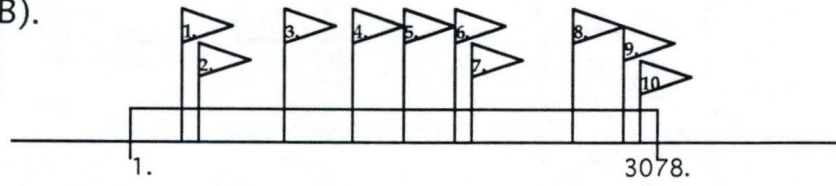


Fig. 3.16: Illustre la position des différents transposons isolés (11) disruptant LACF. L'orientation du fanion indique le sens du séquençage.

(A). Localisation du Tn4430(1), le Tn4430(2) n'a pas été séquencé.

(B). Localisation des Tn5(1-10).

3. SEQUENCAGE DE LACF A PARTIR DES TRANSPOSANTS.

Sur base des amorces fournies par les extrémités des transposons Tn4430 et Tn5 localisés tout au long du gène (figure 3.16), nous avons pu obtenir la séquence correspondant à 11 régions différentes.

Celles-ci ont été alignées les unes par rapport aux autres (par le programme "gel assemble" sur GCG) permettant d'établir un continuum entre les régions séquencées. Nous obtenons alors une séquence dites "consensus " de 1918pb non continu correspondant à l'assemblage des fragments séquences.

Par l'obtention de cette séquence correspondant à 1918pb de la région codante de LACF, nous avons réalisé notre premier but.

4. ANALYSE DE LA SEQUENCE.

Cette séquence consensus a été alignée à la séquence correspondante de la β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var *lactis* (Poch et al , 1992) par le programme "gap" sur GCG.

Cet alignement nous montre une identité de 100% entre les 1918pb séquencées chez *Kluyveromyces* var. *marxianus* et la région correspondante chez *Kluyveromyces* var. *lactis*. (figure 3.17).

Ces résultats confirment les homologies établies par les cartes physiques (De Bolle, 1990) et établissent de façon non ambiguë l'identité entre le gène LACF de *Kluyveromyces* var *marxianus* et le gène LAC4 de *Kluyveromyces* var *lactis*.

La souche utilisée pour réaliser la banque génomique est une souche diploïde, par conséquent les clones isolés à partir de cette banque contiennent un des deux allèles. Les trois clones isolés (pB1, pB2, pB3) présentant la même carte physique, il se pourrait qu'ils ne représentent qu'un des deux allèles présents dans la souche.

Seule la réalisation d'un Southern blot sur l'ADN génomique de la souche diploïde nous permettra de vérifier si l'identité observée s'applique aux 2 allèles.

GAATTCTGTT CACCGCAAAGTTCAGGGTGCTCTGGTGGGTTTCGGTTGGTCTTTGCT T GCTTCTCC - 602
T

CTTGTCTTGCATGTTAATAATAGCCTAGCCTGTGAGCCGAAACTTAGGGTAGGCTTAGTGTGGAAACGTACATATGTATC - 522

ACGTTGACTTGGTTAACCAG G CGACCTG TACCAGCCATACCCACACAGTTTTTGTATCTTCAGTATAGTTGTGAA - 442
G G

AAGTGTAGCGGAAATTTGGTCCGAGCAACAGCGTCTTTTTCTAGTAGTGCGGTCGGTTACTTGGTTGACATTGGTATT - 362

TGGACTTTGTTGCTACACCATTCACTACTTGAAGTCGAGTGTGAAGGGTATGATTTCTAGTGGTGAACACCTTTAGTTAC - 282

GTAATGTTTTCTACTGTTTTACTTGAGATTCGATTGAGAAAAAGGTATTTAATAGCTCGAATCAATGTGTTATCATT - 202

GTGAAGATGTTCTTCCCTAACTCGAAAGGTATATGAGGCTTGTGTTTCTTAGGAGAATTATTATTCTTTTGTATGTTGC - 122

GCTTGTAGTTGGAAAAGGTGAAGAGACAAAAGCGCTTAACACTTGAAATTTAGGAAAGAGCAGAATTTGGCAAAAAAAT - 42

AAAAAAAAATAAACACACATACTCATCGAGAAGTAAAAGATATGCTCTTGCCTTATTCCTGAGAATTTAAGGAACCCCAA - 38

AAAGGTTACGAAAATAGATTGCCTACTAGGGCTTACTACTATGATCAGGATATTTTGAATCTCTCAATGGCCTTGGG - 118

CTTTTGCCTTGTGATGCACCTCTTGACGCTCCGGATGCTAAGAATTTAGACTGGGAAACGGCAAAGAAATGGAGCACC - 198

ATTTCTGTGCCATCCCATTGGGAACTTCAGGAAGACTGGAAGTACGGTAAACCAATTTACACGAACGTACAGTACCTAT - 278

CCCAATCGACATCCCAAATCTCCCACTGTAATCCTACTGGTGTATGCTAGAATTTTGAATTAGATTGAAATCGA - 358

TTGAGTCGTTTCGAGCAGAGATTGAGATTTGAGGGTGTGGACAATTGTTACGAGCTTTATGTTAATGGTCAATATGTGGGT - 438

TTCAATAAGGGTCCCGTAACGGGGCTGAATTTGATATCCAAAAGTACGTTTCTGAGGGCGAAAACCTTAGTGGTCGTCAA - 518

GGTTTTCAAGTGGTCCGATCCCACTTATATCGAGGACCAAGATCAATGGTGGCTCTCTGGTATTTACAGAGACGTTTCTT - 598

TACTAAAATTCCTAAGAAGGCCATATTGAAGACGTTAGGGTCACTACAATTTTGTGGACTCTCAGTATCAGGATGCA - 678

GAGCTTTCTGTGAAAGTTGATGTCCAGGGTCTTCTTATGATCACATCAATTTACACTTTACGAACCTGAAATGATGGATC - 758

TAAAGTTACGATGCAAGCTCTTTGTTGAACGAGGAGAATGGGAACACGACTTTTTCAACTAAAGAATTTATTTCTCTCT - 838

CCACCAAAAAGAACGAAGAAACAGCTTTCAAGATCAACGTCAAGGCCCCAGAACATTGGACCGCAGAAAATCCTACTTTG - 918

TACAAGTACCAGTTGGATTTAATTGGATCTGATGGCAGTGTGATTCAATCTATTAAGCACCATGTTGGTTTCAGACAAGT - 998

GGAGTTGAAGGACGGTAACATTACTGTTAATGGCAAAGACATTCTCTTTAGAGGTGTCAACAGACATGATCACCATCCAA - 1078

GGTTCGGTAGAGCTGTGCCATTAGATTTTGTGTTAGGGACTTGATTCTAATGAAGAAGTTTAAACATCAATGCTGTTCTG - 1158

AACTCGCATTATCCAAACCATCCTAAGGTGTATGACCTCTTCGATAAGCTGGGCTTCTGGGTCATTGACGAGGCAGATCT - 1238

TGAAACTCATGGTGTTCAGAGCCATTTAATCGTCTATACGAACCTTGAGGGCTGAATATCCAGATACTAAAAATAAACTCT - 1318

ACGATGTTAATGCCATTACTTATCAGATAATCCAGAGTACGAGGTGCGTACTTAGACAGAGCTTCCCAACTTGCCTA - 1398

AGAGATGTCAATCATCCTTCGATTATTATCTGGTCTTGGGTAAACGAAGCTTGTATGGCAGAAACCACAAAGCCATGTA - 1478

CAAGTTAATTAACAATTGGATCCTACCAGACTTGTGCATTATGAGGGTGACTTGAACGCTTTGAGTGCAGATATCTTTA - 1558

GTTTCATGTACCCAACATTTGAAATTATGGAAAGGTGGAGGAAGAACCACACTGATGAAAATGGTAAGTTTGAAAAGCCT	1638
TTGATCTTGTGTGAGTACGGCCATGCAATGGTAACGGTCCTGGCTCTTTGAAAGAATATCAAGAGTTGTTCTACAAGGA	1718
GAAGTTTTACCAAGGTGGCTTTATCTGGGAATGGGCAAATCACGGTATTGAATTCGAAGATGTTAGTACTGCAGATGGTA	1798
AGTTGCATAAAGCTTATGCTTATGGTGGTGACTTTAAGGAAGAGGTTTCATGACGGAGTGTTTCATCATGGATGGTTTGTGT	1878
AACAGTGAGCATAATCCTACTCCGGGCCCTGTAGAGTATAAGAAGGTTATTGAACCCGTTTCATATTAATAATTGCGCACGG	1958
ATCTGTAACAATCACAAATAAGCAGGACTTCATTACGACAGACCACTTATTGTTTATCGACAAGGACACGGGAAAGACAA	2038
TCGACGTTCCATCTTTAAAGCCAGAAGAATCTGTTACTATTCTTCTGATACAACCTTATGTTGTTGCCGTGTTGAAAGAT	2118
GATGCTGGTGTCTAAAGGCAGGTCATGAAATTGCCTGGGGCCAAGCTGAACTTCCATTGAAGGTACCCGATTTTGTAC	2198
AGAGACAGCAGAAAAAGCTGCGAAGATCAACGACGGTAAACGTTATGTCTCAGTTGAATCCAGTGGATTGCATTTTATCT	2278
TGGACAAATTGTTGGGTAAAATTGAAAGCCTAAAGGTCAAGGGTAAGGAAATTTCCAGCAAGTTGAGGGTTCTTCAATC	2358
ACTTCTGGAGACCTCCAACGAATAATGATGAACCTAGGGACTTTAAGAACTGGAAGAAGTACAATATTGATTTAATGAA	2438
GCAAAACATCCATGGAGTGAGTGTGCAAAAAAGGTTCTAATGGTTCTCTAGCTGTAGTCACGGTTAACTCTCGTATATCCC	2518
CAGTTGATTTTACTATGGGTTTGAGACTGTTCAGAAGTACACGATCTTTGCTAACAAAATAAA CTTGAACACTTCTATG	2598
AAGCTTACTGGCAATATCAGCCTCCTGATTTCCAAGAGTTGGGTACGAATCTGGCTAGGAGATAGTTATGAATCATT	2678
TGAATGGTTAGGTGCGGGGCCCGGCAATCATATCCGGATAAGAAGGAATCTCAAAGATTCCGGTCTTTACGATTCCAAAG	2758
ATGTAGAGGAATTCGTATATGACTATCCTCAAAGAAAATGGAATCATACAGATACCCACTTTTTGAAACATAAATTTGAA	2838
GGTGCAGGAAAACATATCGATCTTCCAAAAGGAGAAGCCATTTAACTTCAAGATTTACAGACGAATACGGGGTTGATGAAGC	2918
TGCCACGCTTGTGACGTTAAAAGATACGGCAGACACTATCTAAGGTTGGA CCATGCAATCCATGGTGT TGGTAGCGAAG	2998
CATGCGGACCTGCTGTTCT GGACCAGTACAGATTGAAAGCTCAAGATTTCAACTTTGAGTTTGA TCTCGCTTTTGAATAA	3078
GAATTTTATACTTAGATAAGTATGTACTTACAGGTATATTTCTATGAGATACTGATGTATACATGCATGATAATATTTAA	3158

Fig.3.17: Alignement entre les régions séquencées dans LACF et la séquence de LAC4 (POCH *et al* , 1992). Comme l'identité entre les deux régions est de 100%, les régions séquencées dans LACF sont noircies sur LAC4. L'ORF est signalée par un encadrement.

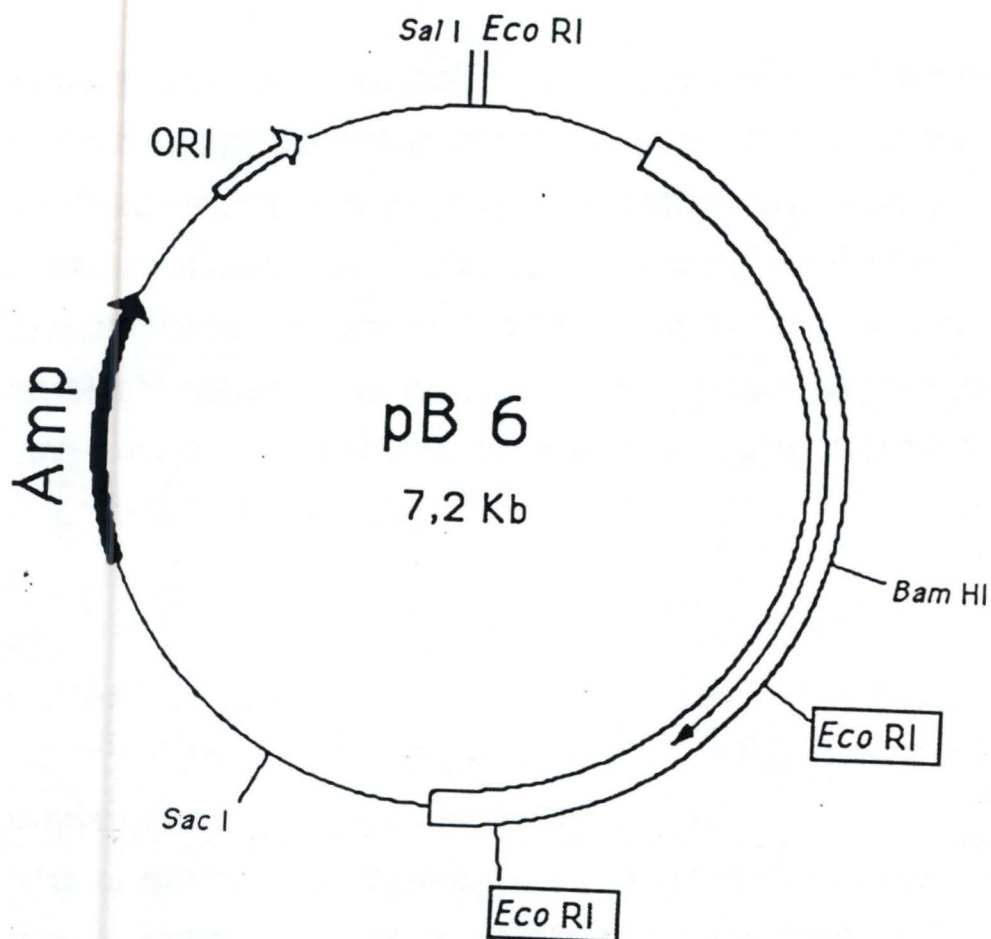


Fig. 3.18:

Le pB6 est une matrice pBluescript KS⁺ contenant un insert de 4,3Kb avec le gène LACF. Sont mis en évidence, les sites EcoRI utilisés pour isoler le fragment de 850pb de la région codante de ce gène.

Une restriction EcoRI de ce plasmide engendre 3 fragments de 3,9Kb, 2,5Kb et 0,85Kb (d'après DE BOLLE, 1990).

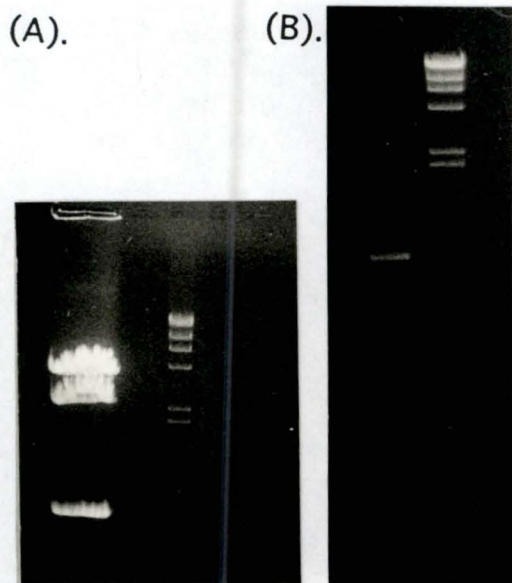


Fig. 3.19:

(A). Photo du gel d'agarose montrant les 3 fragments du pB6 restreint par EcoRI.

(B). Photo du gel d'agarose montrant le fragment de 850pb après purification (récupération sur papier).

5. ANALYSE DE L'IDENTITE ALLELIQUE PAR SOUTHERN BLOTTING

5.1. Réalisation du Southern.

Nous réalisons un Southern comparatif entre l'ADN génomique de notre banque de *Kluyveromyces var marxianus* et celui de *Kluyveromyces var lactis* (ATCC2359).

Les contrôles d'hybridation seront respectivement constitués par l'ADN génomique des souche *Kluyveromyces var marxianus* (ATCC12424, ATCC52466) et de l'ADN génomique de *S.cerevisiae* (W303).

Les ADN génomiques des différentes souches de levures ont été isolés, restreints par quatre enzymes de restriction différents (HindIII, PvuII, SalI, XbaI), et mis à migrer sur gel d'électrophorèse 1% (figure 3.20). Après le Southern blotting sur filtre de nylon, celui-ci a été hybridé avec la sonde multiprimer de 850pb.

5.2. Préparation de la sonde.

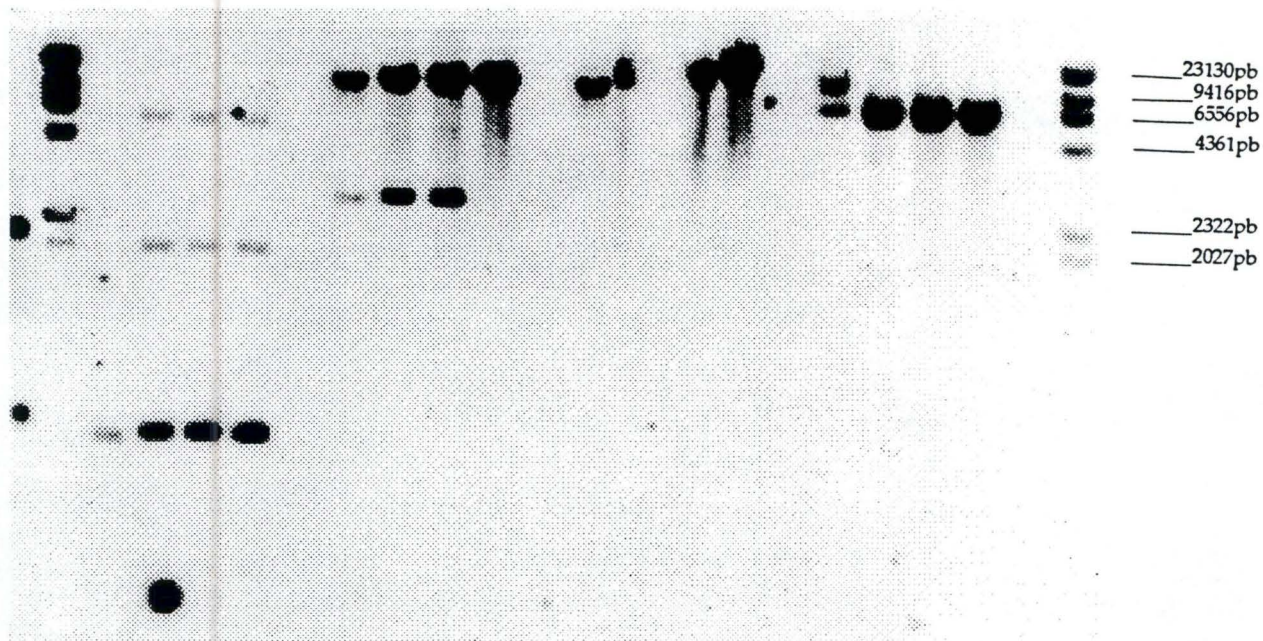
La sonde utilisée correspond à un fragment de 850pb interne à LACF. Ce fragment est préparé à partir d'une restriction EcoRI sur le pB6 (figure 3.18). Il est purifié après électrophorèse sur gel d'agarose par la méthode de récupération sur papier (figure 3.19).

La sonde est synthétisée par "multiprimer" labelling.

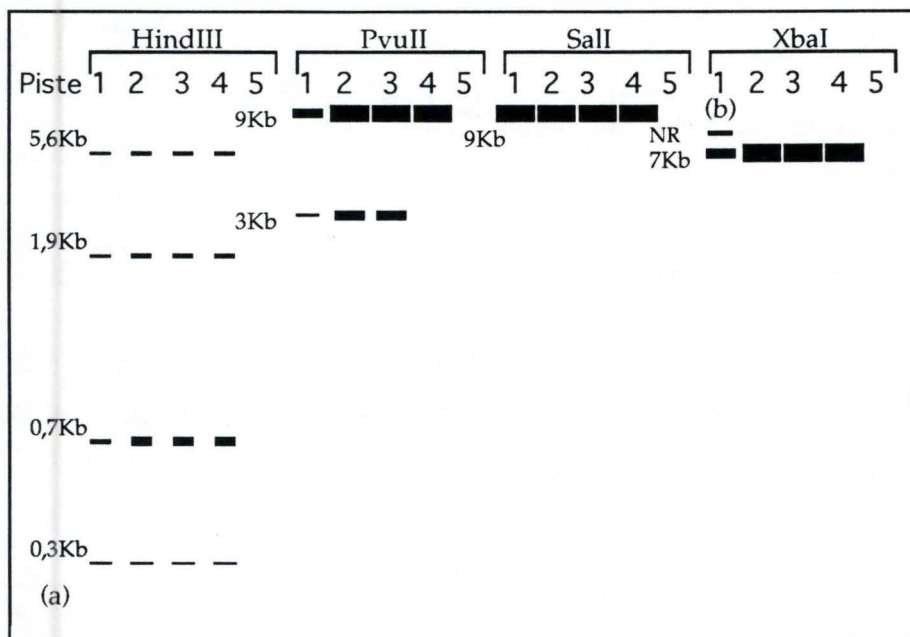
5.3. Analyse du Southern.

L'analyse du Southern (figure 3.20) révèle que pour les quatre restrictions réalisées, les profils de restriction sont identiques pour l'ADN correspondant aux souches de *K. var. marxianus* . (lignes 1, 2, 3)

(A).



(B).



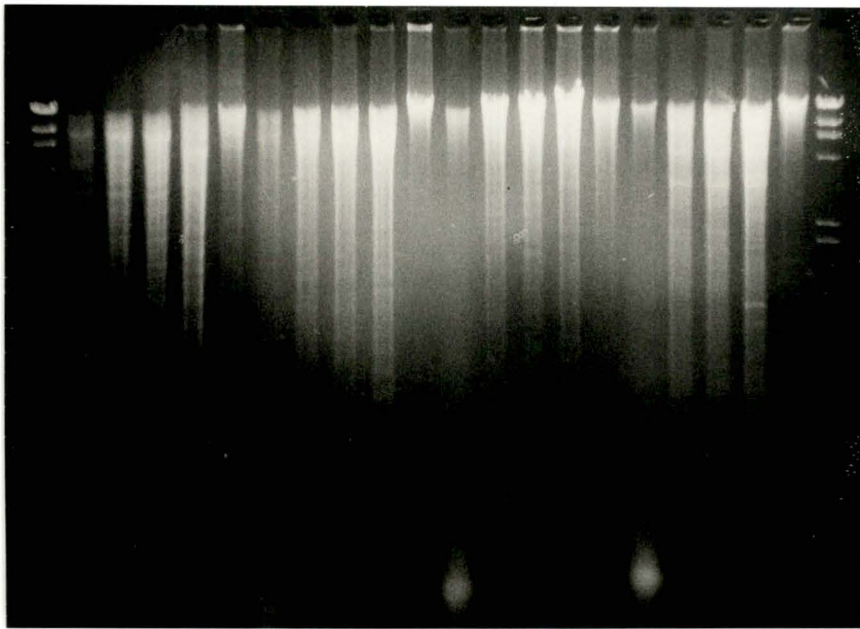


Fig. 3.20:

(A).Hybridation en Southern de la sonde β -galactosidase. On a restreint 5 souches par 4 enzymes de restriction différents (indiqués sur la photo).

Piste 1. Préparation d'ADN de *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* (ATCC12424) qui a servi a faire la banque génomique.

Piste 2. ADN génomique de *Kluyveromyces marxianus* var.*marxianus* (ATCC12424).

Piste 3. ADN génomique de *Kluyveromyces marxianus* var.*marxianus* (ATCC52466).

Piste 4. ADN génomique de *Kluyveromyce marxianus* var. *lactis* (ATCC2359).

Piste 5. ADN génomique de *S. cerevisiae.* (W303).

(B). Schéma explicatif du Southern.

(a). Le fragment HindIII de 0,3Kb a été mis en évidence lors d'une plus longue exposition.

(b). Correspond à une restriction partielle.

(C). Photo du gel d'agarose.

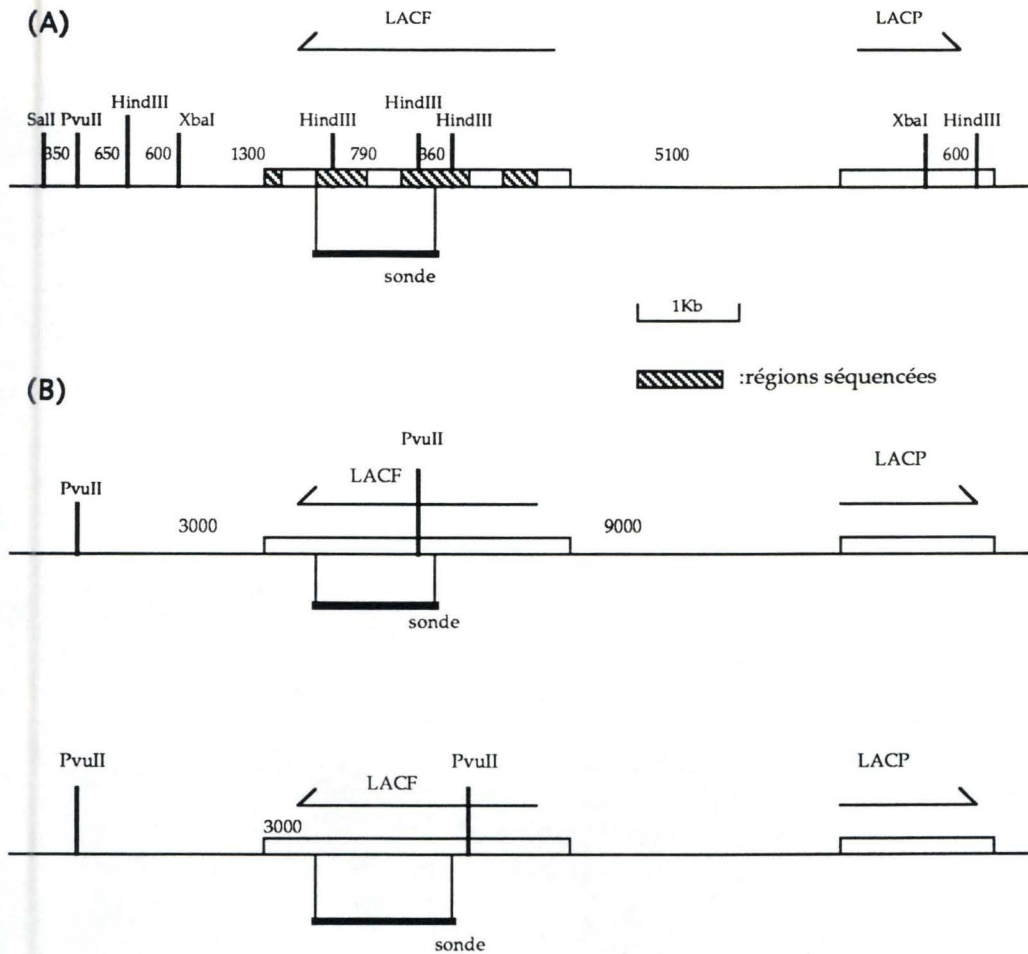


Fig.3.21:

(A). Carte physique sommaire du locus analysé en Southern, la localisation des sites de restriction utilisés pour le Southern ainsi que la taille séparant ces sites sont signalés (les tailles sont en pb).

(B). Illustration de la localisation hypothétique (a et b) de site PvuII permettant d'expliquer le profil de la seconde forme allélique observé en Southern. La localisation précise de ces sites devra être déterminée ultérieurement

La taille des fragments allumés chez *K. var.lactis* (piste 4) correspondent à ceux publiés (Poch and L'Hôte, 1992).

La spécificité de la sonde n'est pas à mettre en doute, car celle-ci ne s'hybride pas sur l'ADN génomique de *S.cerevisiae* comme le montre l'absence de signal sur cette piste. (piste 5)

Ce n'est que sur une des quatres restrictions effectuées (profil PvuII) que nous pouvons mettre en évidence une différence de profil entre *K. var. marxianus* et *K. var. lactis*.

Analysons plus en détail, les résultats de chacune des restrictions. Pour ce faire, nous disposons des cartes physiques établies (figure 3.21) et de la séquence du gène de β -galactosidase de la variété *lactis* que nous avons montré être identique au gène LACF de la variété *marxianus*.

5.2.1.Restriction HindIII

La comparaison des profils de restrictions de deux variétés nous montre qu'ils sont identiques; la sonde s'hybride, dans chacun des cas, à quatre fragments 5,6Kb, 1.9Kb, 0,7Kb et 0,3Kb (mis en évidence lors d'une exposition prolongée). La carte physique (figure 3.21) nous montre la localisation des sites HindIII (dont la position a été déterminée avec précision par le séquençage) et la position de la sonde par rapport à ces sites.

Le recouvrement total de la sonde "multiprimer" avec le fragment a 790pb explique l'intensité plus grande des bandes à cet endroit. En effet, l'intensité des bandes allumées par une sonde "multiprimer" n'est pas due à leur taille mais à la longueur des régions susceptibles de fixer le "multiprimer".

La sonde déborde de 40pb de part et d'autre du fragment de 790pb, permettant une hybridation sur une faible étendue avec les fragments adjacents, produisant donc un signal moindre avec les fragments de 1300pb et de 360pb.

L'hybridation de la sonde avec un fragment HindIII de 5,6Kb (figure 3.21) peut s'expliquer par la technique de purification de la sonde (récupération sur papier) utilisée. En effet, on ne peut exclure une légère contamination du fragment EcoRI de 790pb par des fragments EcoRI immédiatement adjacents, révélant dès lors le fragment HindIII de 5.6Kb.

5.2.2. Restriction SalI

Bien qu'il y ait une imperfection technique au niveau du blotting, celle-ci met également en évidence une identité entre les profils de *K.lactis* et de *K.marxianus* .

Elle allume un fragment unique de 9Kb compris entre le site SalI localisé en aval de LACF et un site en aval de LACP dont la localisation n'a pas été déterminée par l'établissement de la carte physique (en dehors de l'insert).

5.2.3. Restriction XbaI

Sur cette restriction, la sonde allume un fragment à 7Kb sur les 4 pistes et confirme une fois de plus l'identité entre *K. var. lactis* et *K. var. marxianus*. La taille de ce fragment correspond à celle décrite (Poch *et al* , 1992).

Le fragment supérieur sur la piste 1 correspond probablement à une restriction partielle (NR).

5.2.4. Restriction PvuII

Celle-ci correspond à l'unique restriction qui a pu mettre en évidence une différence entre *K. var.lactis* et *K. var. marxianus*.

Le fragment unique observé à 9Kb chez *K. lactis* peut s'expliquer par l'hybridation de la sonde avec un fragment compris entre le site PvuII en aval de LAC4 (Poch *et al* ,1992) et un site non localisé en aval de LAC12.

Par contre, les 2 fragments observés à 9 Kb et 3Kb chez les souches *K. var. marxianus*, ne sont pas compatibles avec les sites de restrictions localisés (De Bolle, 1990)

En effet, pour révéler deux fragments chez *K. var. marxianus*, il faudrait que la sonde recouvre un site PvuII ; ce qui permettrait de générer un fragment de 3Kb avec un site en aval de LACF, et un fragment de 9Kb avec un site en aval de LACP. Or, ni l'établissement de la carte physique (De Bolle, 1990), ni les régions séquencées n'ont pu mettre en évidence de site PvuII à cet endroit sur le gène LACF.

Nous devons donc nous orienter vers l'hypothèse qu'il existe chez *K. var. marxianus* deux formes alléliques de ce gène, et les fragments observés sur Southern correspondent à la somme des fragments hybridés sur chacun des allèles.

La première forme allélique du gène correspondrait à celle isolée par le clonage et dont la séquence a pu montrer l'identité avec *K. var. lactis* . L'absence de site PvuII dans la région hybridée par la sonde, plaide en faveur d'un fragment unique de 9Kb généré par deux sites distants de 9Kb situés de part et d'autre de la sonde. L'un de ces sites pourrait être le site PvuII en aval de LACF mentionné sur la figure (figure 3.21

La seconde forme allélique correspond à celle qui n'a pas été isolée par le clonage et qui pour rester compatible avec les fragments observés sur le Southern peut:

-soit générer un fragment unique de 3Kb . Il faut pour cela deux sites PvuII séparés par 3Kb de part et d'autre de la région d'hybridation de la sonde (figure 3.21). Dans ce cas la forme allélique non clonée présenterait au moins un site variable par rapport à l'autre forme allélique.

-soit générer deux fragments, un de 3Kb et un autre de 9Kb. Il faudrait pour cela trois

sites PvuII; un site dans la région recouverte par la sonde et deux sites de part et d'autre (figure 3.21).

Il est fort probable qu'étant donné la forte similitude qui apparaît entre les profils de *K. var. marxianus* et *K. var. lactis* (3 profils identiques sur 4), les différences existant entre les deux formes alléliques trouvées chez *K. var. marxianus* soient minimales et que les sites PvuII trouvés chez *lactis* puissent être conservés chez *marxianus* . Si le site PvuII en aval de LACF est conservé, cette forme allélique présenterait au minimum un site variable par rapport à l'autre forme.

IV. DISCUSSIONS.

IV.DISCUSSION:

Des travaux précédents réalisés au laboratoire, suggéraient fortement par la comparaison d'une carte physique sommaire et d'une courte séquence de 300 nucléotides, la possibilité d'une identité entre le gène de la β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* (LACF) et le gène correspondant chez *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (LAC4).

Afin d'apporter une réponse définitive à cette question, nous avons décidé de poursuivre le séquençage du gène LACF. dans ce but, nous avons choisi de mettre en oeuvre une technique de séquençage par transposition.

Cette technique repose sur la capacité qu'ont les transposons de s'insérer, en principe, aléatoirement, dans une séquence cible.

Dès que les différents transposants sont isolés, le séquençage en bloc du gène est effectué à partir d'une amorce qui s'hybride aux extrémités connues du transposon.

Cette voie d'approche est idéale car:

- Les transposants obtenus sont rapidement prêts au séquençage (2 semaines).
- Elle ne nécessite pas une connaissance préalable des sites de restriction de la région à séquencer, ce qui est nécessaire lors d'une opération de séquençage par sous-clonage.
- Elle est économique car elle ne nécessite que la synthèse d'un primer spécifique à l'extrémité du transposon.

Elle s'avère même optimale lorsque la disruption du gène par le transposon s'accompagne d'un test phénotypique simple sur boîte de Pétri.

Dans notre cas la localisation des événements de transposition pouvait se faire très facilement par un "screening" phénotypique. En effet, dès l'isolement des transposants , on pouvait par la réalisation d'un test blanc-bleu, localiser les clones contenant un plasmide disrupté dans LACF (colonies blanches sur milieu contenant de l'X-gal).

Ces expériences de transposition nous ont apporté des informations intéressantes concernant les différentes spécificités de cible de certains transposons et, dès lors sur les possibilités qu'ils peuvent offrir comme outil pour le séquençage.

Le Tn4430 présentait l'avantage incontestable de permettre l'amorçage d'une réaction de séquence à partir de deux primers spécifique localisés aux deux extrémités du Tn. Il ne s'est malheureusement pas révélé adéquat pour des raisons fort probablement liées à sa spécificité "régionale". Celle-ci résulterait de la préférence de ce transposon pour les régions riches en A/T.

Par contre, l'utilisation du Tn5 qui présente des mécanismes intimes de transposition différents, s'est révélé idéal pour la réalisation d'insertions aléatoires dans l'insert. L'utilisation du Tn4430 serait donc à déconseiller pour le séquençage du moins dans le cas de gènes de levure insérés dans une matrice de type Yep351 (ou apparentés).

Une fois l'étape de séquençage terminée, nous avons obtenu une séquence de 1900 pb dans l'ORF de LACF. Une identité de 100% entre les régions séquencées et les régions correspondantes chez *K.lactis* a pu être établie.

Nous avons donc pu, sur base de ce résultat et des résultats précédents (carte physique et séquence de 300 nucléotides très similaire à *K. var. lactis*) confirmer la présence d'un gène de *K. var. lactis* chez *K. var. marxianus*.

Enfin, par Southern nous avons positionné les sites de restriction présents, non seulement dans le gène même, mais aussi dans les régions flanquantes . De la sorte, nous avons étendu la comparaison déjà obtenue par la séquence stricte du gène cloné, aux régions environnantes et à leurs locus chromosomiques respectifs dans diverses souches définies.

Deux observations ont été réalisées à partir de ce Southern.

-D'une part, aucune des restrictions HindIII, SalI et XbaI n'a pu montrer de différences de profil entre *K.lactis* et *K.marxianus*, ce qui confirme l'identité des deux gènes et des régions avoisinantes.

-Une différence est néanmoins apparue avec la restriction PvuII: le profil de restriction observé sur l'ADN génomique de *K. var marxianus* (fragment à 3Kb et 9Kb), ne peut s'expliquer que par la présence d'un site PvuII dans ou juste à côté de la zone de recouvrement de la sonde (figure 3.21). Ni les cartes de restrictions réalisées sur les trois clones isolés (pB1, pB2, pB3) à partir de la banque , ni la séquence partielle réalisées dans cette région du gène ne révèlent la présence de site PvuII.

Ceci nous amène à conclure que le gène cloné est identique à celui de *K. var lactis*. Il existerait chez *K.marxianus* (souche diploïde) une autre forme allélique présentant une légère divergence avec la première dont les deux sites PvuII supplémentaires invoqués précédemment constituent un exemple.

Le fait de ne pas avoir cloné cet allèle, peut soit résulter de la loi des petits nombres (3 clones isolés sur 80.000 colonies), soit de l'état non fonctionnel de cet allèle. Rappelons en effet que le screening des clones s'est effectué par un test fonctionnel.

V. PERSPECTIVES.

V. PERSPECTIVES:

Les perspectives de ce mémoire auront pour but d'éclaircir la problématique posée par la présence d'un gène de *K. var lactis* chez *K. var marxianus*.

-Il conviendra de localiser avec plus de précision les sites PvuII de l'allèle " non fonctionnel " par une double restriction sur l'ADN génomique. Cette localisation nous permettra alors de nous orienter vers l'une ou l'autre des hypothèses concernant la localisation de ces sites.

-Il conviendra de déterminer si une ou deux modifications ponctuelles sur la séquence de l'allèle cloné peuvent générer un ou deux sites PvuII et engendrer un stop ou un changement de phase qui pourrait générer une protéine abortive ou non fonctionnelle.

-Un screening sur colonies avec la sonde lactase pourrait nous amener à isoler un clone contenant la copie " non fonctionnelle ", qu'il suffirait de séquencer.

-De manière à clarifier l'événement de transfert de gènes, il serait intéressant de voir si d'autres gènes présentent une pareille identité avec les gènes de *K. var lactis* .

Une telle comparaison pourrait être effectuée avec les gènes GAL1, GAL7, et GAL10 de *K. var marxianus* récemment cloné au laboratoire.

-Nous disposons également de deux souches de *K. var. marxianus* (haploïdes et diploïdes) disrupté en LACF par le marqueur URA3; la souche diploïde comme l'haploïde ne manifeste plus de phénotype LAC⁺. Ce qui nous amènerait, face à la très faible fréquence d'un événement de disruption, à penser que l'allèle non disrupté est naturellement non fonctionnel.

En fonction des résultats, nous pourrions orienter notre choix vers l'une ou l'autre des hypothèses concernant la localisation des sites PvuII sur cette forme allélique, et orienter une recherche concernant l'aspect du transfert.

VI. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1.MUTAGENESE PAR TRANSPOSITION

1.1 Mutagenèse par le Tn4430

La réalisation de la mutagenèse par le Tn4430 à été réalisée selon deux approches différentes.: -Screening phénotypique par répression glucose

-Screening phénotypique chez une souche lacZ⁻

a) événement dépendant

b) événement indépendant

Ces deux approches passent chacune par les 5 mêmes étapes:

(1)-mutagenèse.

(2)-Selection des transposants plasmidiques par conjugaison.

(3)-Séparation des différents événements de transposition.

(4)-Screening phénotypique blanc/bleu.

(5)-Préparation au séquençage.

Afin d'éviter toute redite inutile, le protocole complet sera décrit dans la première approche et seules les différences propres à chaque approche seront explicitées par la suite.

1.1.1 Matériels

Chacune des approches nécessite l'utilisation des mêmes outils biologiques:

-La souche HB101 p_{ox38} :: Tn4430 d'*E. coli*.

-La souche NK6702 d'*E. coli* permet la sélection des transposants.

-La souche X11 Blue permet le screening phénotypique blanc/bleu.

-Un plasmide contenant le gène cloné à muter.

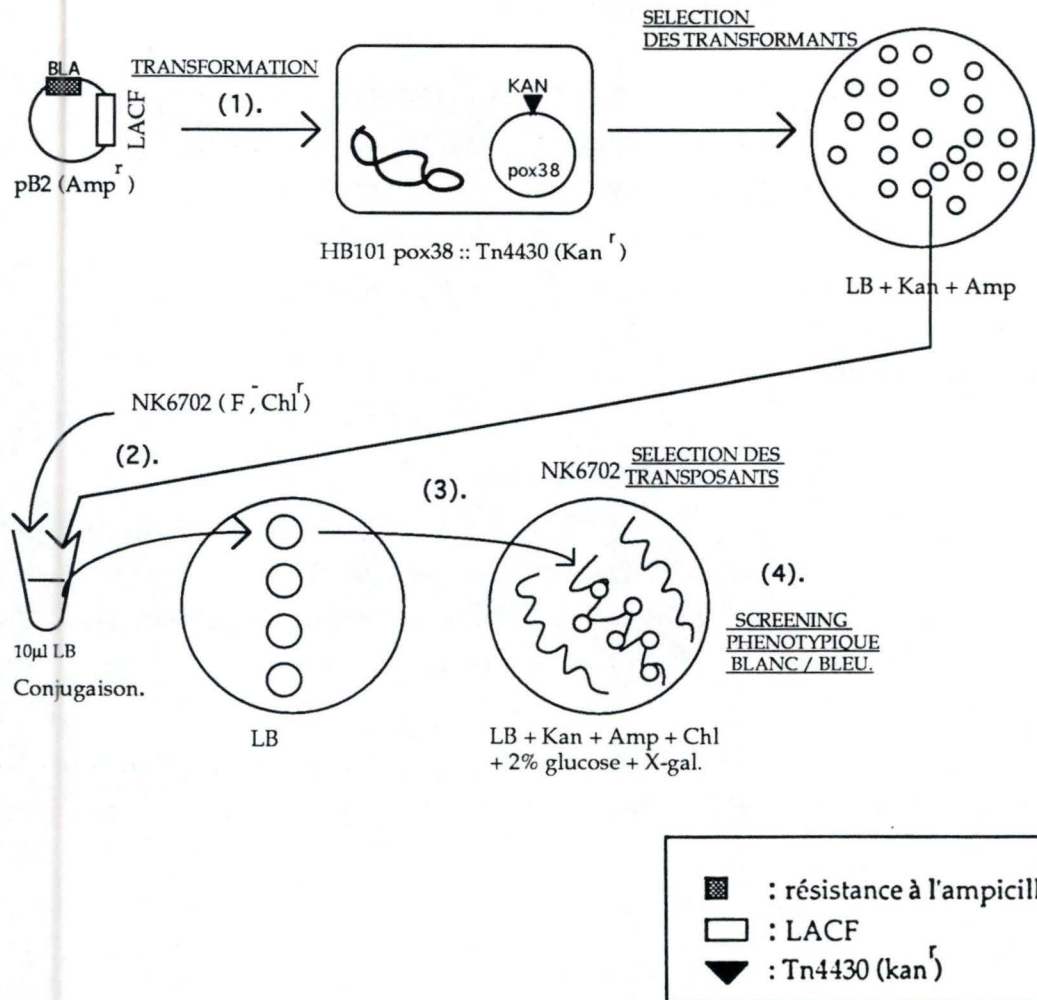


Fig. 6.1: Illustration des différentes étapes du protocole de mutagenèse recourant à la répression glucose.

- (1). Transformation et mutagenèse.
- (2). Sélection des transposants plasmidiques par conjugaison.
- (3). Séparation des différents événements de transposition.
- (4). Screening phénotypique blanc/bleu.

1.1.2 Mise en oeuvre du protocole recourant à la Répression glucose (figure 6.1)

- (1)-Transformer la souche HB101 *pox38 ::Tn4430* (Kan^R) avec le plasmide à muter (Amp^R) par électroporation.
(1µl de pB2 (400ng) + 40 µl de cellules compétentes HB101 à 2.4Kv.)
-Sélectionner les transformants sur une boîte LB+Amp+Kan
- (2)-Mélanger dans 10µl de LB une colonie de transformants HB101 (Kan^R +Amp^R) avec une colonie NK6702 (Chl^R + F⁻) **(50 conjugaisons)**
-Déposer ces 10µl sur une boîte LB. **(10 gouttes/boîtes)**
-Laissez 5 heures à 37°C (pour permettre la conjugaison).
- (3)-Strier la goutte sur un milieu LB + Amp + Kan + Chl + X-Gal + 2%Glucose.
-Laisser pousser une nuit à 37°C. **(50 stries)**

1.1.3 Mise en oeuvre du protocole de screening dans une souche lacZ-

1.1.3.1 Approche dite "par événement dépendant"(figure 6.2)

Dans ce protocole, la réalisation des mutants passe par une étape supplémentaire. En effet le screening phénotypique blanc/bleu ne se fait pas dans la souche NK6702 d'*E. coli* mais dans la souche X11 Blue d'*E.coli*.

- (1) cfr section 1.1.2
- (2) cfr section 1.1.2
- (3)-Strier la goutte sur un milieu LB + Amp + Kan + Chl. **(4 stries/boîte)**
-Laisser pousser une nuit à 37°C.
-Prélever une colonie isolée par strie. **(50 colonies)**
-Repiquer les colonies prélevées sur une boîte LB + Amp + Kan. **(50 repiquages)**
-Laisser pousser une nuit à 37°C.
-Raclez la boîte avec 1 ml de LB afin de récupérer l'ensemble des transposants.

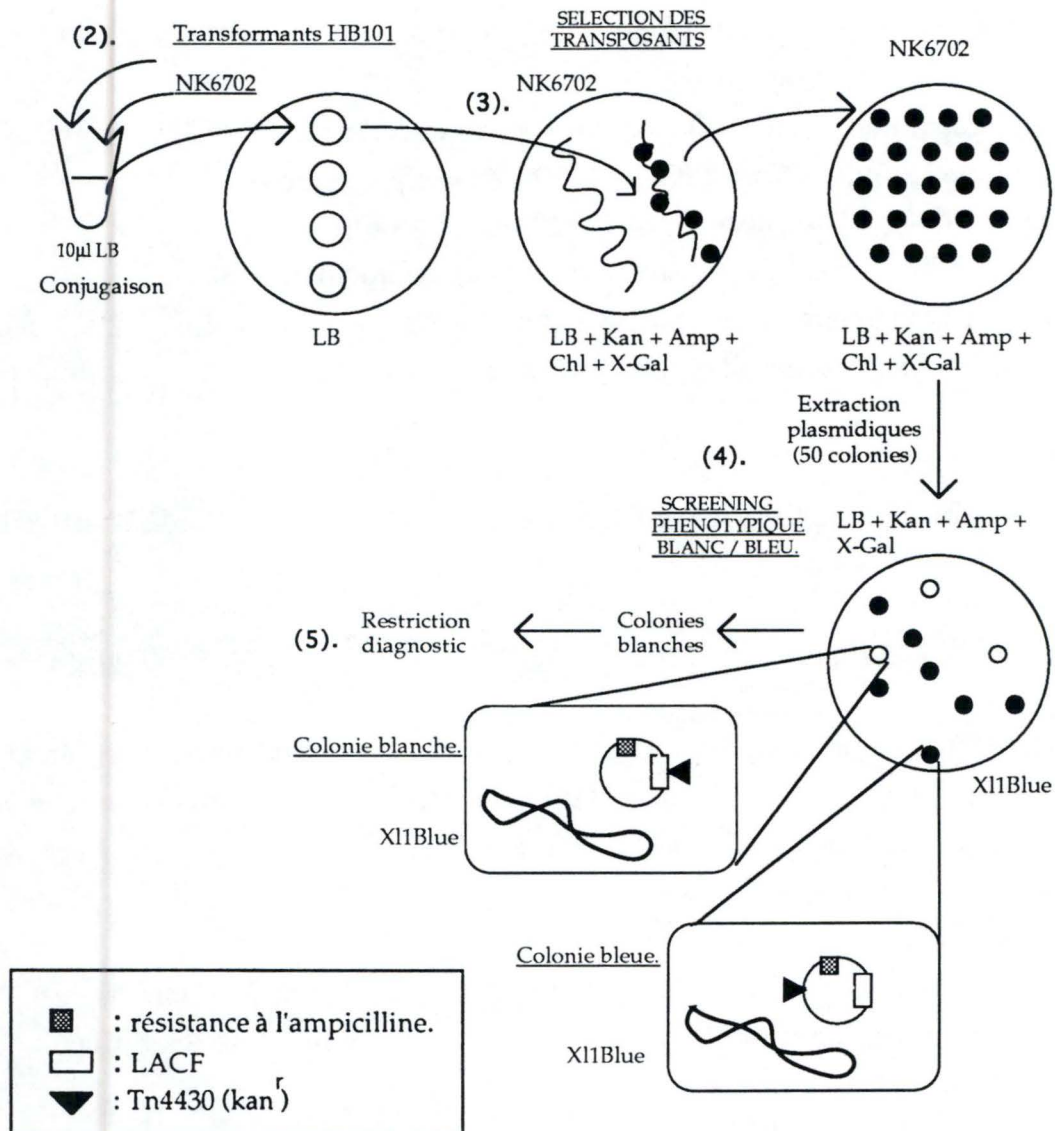


Fig. 6.2: Illustration des différentes étapes du protocole de screening dans une souche lacZ-, par l'approche dite " par événement dépendant ".

- (1). L'étape (1) est identique à celle décrite à la figure 6.1.
- (2). Sélection des transposants plasmidiques par conjugaison.
- (3). Séparation des différents événements de transposition.
- (4). Screening phénotypique blanc/bleu.
- (5). Préparation au séquençage.

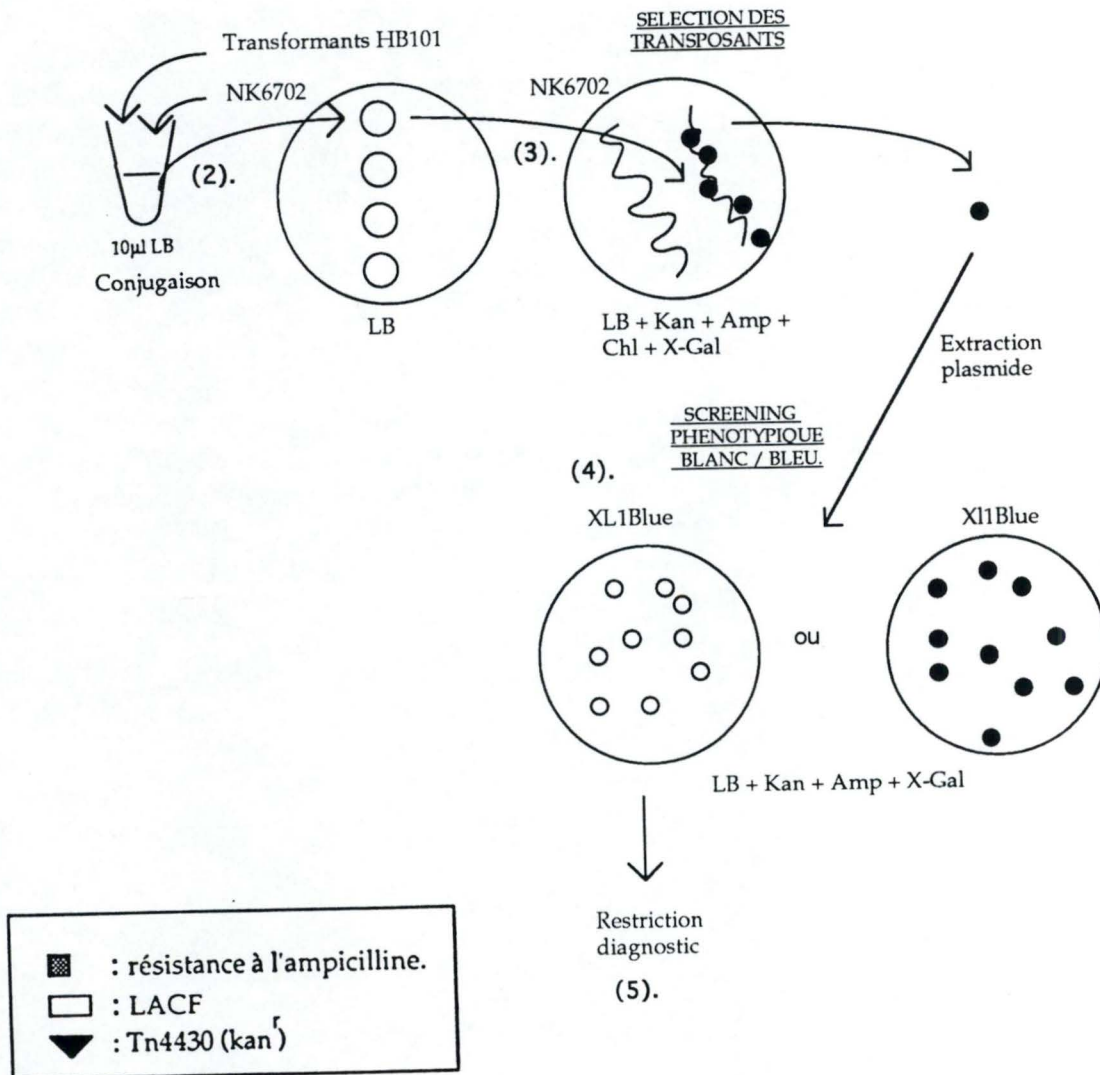


Fig. 6.3: Illustration des différentes étapes du protocole de screening dans une souche lacZ-, par l'approche dite " par événement indépendant".

- (1). L'étape (1) est identique à celle décrite à la figure 6.1.
- (2). Sélection des transposants plasmidiques par conjugaison.
- (3). Séparation des différents événements de transposition.
- (4). Screening phénotypique blanc/bleu.
- (5). Préparation au séquençage.

- Préparer l'ADN plasmidique du mélange de transposants.
- Transformer (2 transformations) la souche XL1Blue d'*E.coli* avec cette préparation par électroporation (5µl de préparation d'ADN + 40 µl de cellules compétentes XL1Blue à 2.4Kv.) et étaler sur boîte LB + Amp + Kan + X-gal.
- (4)-Prélever les transposants blancs et inoculer 5ml de culture LB + Amp + Kan.
 - Laisser pousser une nuit à 37°C. (**24 transposants**)
 - Préparer l'ADN plasmidiques des cultures (méthode miniprep).
 - Faire une restriction diagnostique pour localiser le transposon.
- (5)-Inoculer 200ml de milieu LB + Amp +Kan avec le reste de la culture de 5ml de transposants blancs localisés par restriction.
 - Préparation de l'ADN plasmidique (méthode midiprep) en vue du séquençage et purification de l'ADN sur colonne.

1.1.3.2 Approche dite "par événement indépendant" (figure 6.3)

Ce protocole est identique au précédent excepté le raclage des boîtes afin d'éviter de rassembler dans une même préparation un ensemble de transposants présentant des événements de transposition différents. En prélevant chaque colonie individuellement. On désire ainsi conserver l'indépendance entre les événements de transposition, et éviter tout risque de sélectionner préférentiellement certains clones qui correspondraient à un seul type d'événement particulier.

- (1)-cfr section 1.1.2
- (2)-cfr section 1.1.2
- (3)-Strier la goutte sur un milieu LB + Amp + Kan + Chl. (**24 stries**)
 - Laisser pousser une nuit à 37°C.
 - Prélever une colonie isolée par strie.et inoculer 5 ml de milieu LB + Amp + Kan. (**24 colonies**)
 - Laisser pousser une nuit à 37°C.
 - Préparer l'ADN plasmidique des cultures.(méthode miniprep)
 - Transformer (**24 transformations**) la souche XL1Blue d'*E.coli* avec chacune des préparations par électroporation (5µl de préparation d'ADN + 40µl de cellules XL1Blue compétentes à 2.4Kv). et étaler sur boîte LB + Amp + Kan + X-gal.
- (4)-cfr section 1.1.2
- (5)-cfr section 1.1.2

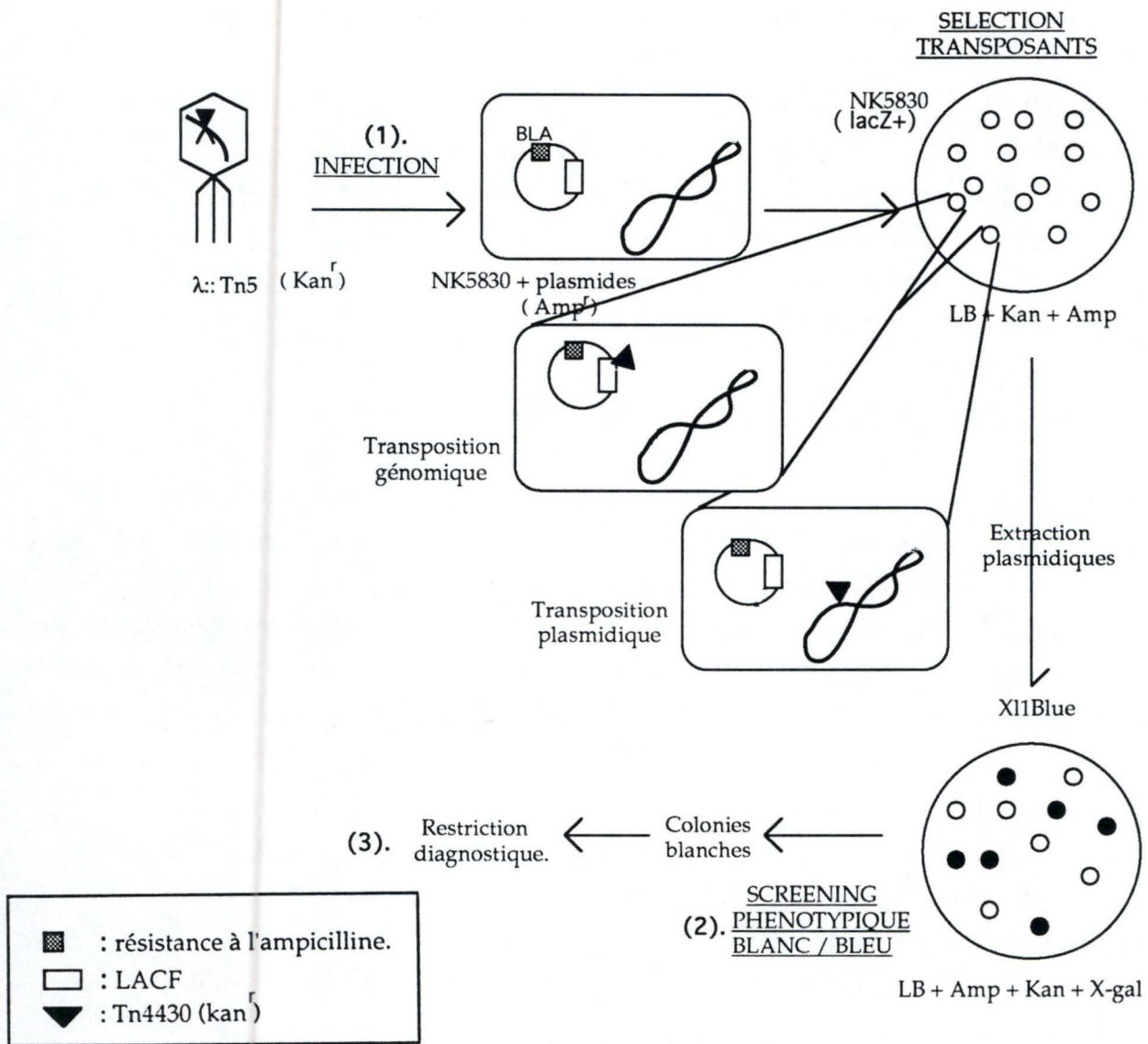


Fig. 6.4: Illustration des différentes étapes du protocole de mutagenèse par le Tn5.

- (1). Mutagenèse.
- (2). Screening phénotypique blanc/bleu.
- (3). Préparation au séquençage.

1.2 Mutagenèse par le Tn5

1.2.1 Matériels

Le protocole de mutagenèse par le Tn5 (Bruijn & Lupski, 1990) , nécessite l'utilisation de:

- Le bactériophage lambda 467 comme source pour le Tn5.
- La souche NK 5830 d'*E.coli* comme support biologique à la mutation.
- La souche Xl1Blue d'*E.coli* pour le screening phénotypique blanc/bleu.
- Un plasmide contenant le gène cloné à muté.

1.2.2 Mise en oeuvre

1.2.2.1 Mutagenèse (figure 6.4 (1))

- Transformer (par électroporation) la souche NK5830 avec le plasmide à muter (Amp^R) (1 µl de pB2 (600ng) + 100 µl de cellules compétentes NK5830 à 2.5Kv)
- Sélection des transformants sur milieu LB + Amp.
- Après sélection, les transformants sont mis en culture liquide de 5 ml (LB + Amp + 0,2% de maltose)
- Laisser pousser une nuit à 37°C.
- Centrifuger la culture et resuspendre les cellules dans du milieu frais (LB + Amp + 0,2% de maltose).
- Par mesure de la D.O, et estimer la concentration cellulaire.
- Ajouter à la culture la quantité du stock de phage lambda 467 nécessaire pour obtenir un rapport de un phage par bactérie.
(1 ml de cellules [10^9 cellules/ml] + 200 µl du stock de phage [5×10^9 phage/ml]
- Laissez 30 minutes à t° ambiante pour permettre l'adsorption du phage sur la bactérie.

- Laisser une heure à 37°C pour permettre l'expression des résistances aux antibiotiques.
- Étaler la culture sur boîtes LB + Amp + Kan, de façon à sélectionner les transposants (la résistance à la kanamycine est fournie par le transposon)
- Laisser pousser une nuit à 37°C.

1.2.2.2 Screening phénotypiques blanc/bleu (figure 6.4 (2))

- Racler les boîtes avec 2 ml de LB afin de récupérer l'ensemble des transposants.
- Préparer l'ADN plasmidiques du mélange de transposants.(méthode STET)
- Transformer la souche XL1Blue d'*E.coli* avec cette préparation par électroporation (5µl de la préparation d'ADN + 40µl de cellules XL1Blue compétentes à 2.3Kv.) et étaler sur boîtes LB + Amp + Kan + X-Gal.
- Screening phénotypique blanc/bleu.

1.2.2.3 Préparation au séquençage par sous-clonage:

- Mise en culture de transposants blancs dans 5 ml de milieu LB + Amp + Kan.
- Laisser pousser une nuit à 37°C.
- Préparation de l'ADN plasmidique de chaque transposant.(méthode miniprep ébullition)
- Effectuer une restriction Sall sur chacune des préparations.
- Faire une ligation sur chaque mélange de restriction.
- Transformer la souche XL1Blue d'*E.coli* avec les mélanges de ligation par transformation au CaCl₂ (5µl de ligation + 100 µl de cellules XL1Blue compétentes)
- Sélection des transformants sur milieu LB + Amp.
- Lancer une culture liquide de 5 ml LB + Amp de quelques colonies par boîte.
- Préparation de l'ADN plasmidique des transformants. (méthode miniprep ébullition)
- Restriction diagnostic HindIII des déletants potentiels et localisation de l'IS restante.
- Mise en culture liquide de 200ml LB + Amp des transposants déletés.
- Préparation de l'ADN (méthode midiprep) en vue du séquençage et purification de l'ADN par méthode diatomées.

<u>Souches</u>	<u>Caractéristiques génotypiques</u>	<u>Résistances</u>
Souches bactériennes		
HB101	<i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mtl1 recA13 ara14 proA2 supE44 hsdS20.</i>	
LE392	<i>F- hsdR51 hsdM supE44 supF58 lacY1 galT22 trpR55 metB1 supF hsdR.</i>	
NK5830	<i>Δ(lac-proXIII) recA56 arg su^o[F' lacIQ L8 Pro+] Nalr Rifr.</i>	
NK6702	(correspond à la souche W3110) <i>man::Tn9</i>	Chloramphénicol
X11Blue	<i>recA1 andA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proA+B+ lacIQ ZΔ M15 Tn10(Tcr).</i>	Tétracycline
Souches de phages		
λ467	<i>b221 rex::Tn5 c1857 Oam29 Pam80 .</i>	Kanamycine
Souches de levures		
ATCC12424	Souche <i>Kluyveromyces marxianus</i> var <i>marxianus</i> . (Banque génomique)	
ATCC52466	Souche <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> .	
ATCC8585	Souche <i>Kluyveromyces marxianus</i> var <i>lactis</i> .	
W303	Souche <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> MATa SUC2 <i>ade2-1 can1-100 his 3-11,15 leu 2-3 ,112 trp1-1 ura 3-1.</i>	

<i>LacI</i>	LacIQ est un mutant de lacI qui surproduit la protéine suppressive de l'opéron lactose
<i>LacY</i>	Mutation dans le gène codant pour la galactoside perméase.
<i>LacZ</i>	Les cellules avec une mutation dans le gène LacZ produisent des colonies blanches en présence d'X-gal, les cellules sauvages produisent des colonies bleues.
<i>LacZΔM15</i>	Correspond à une délétion N-terminale de LacZ permettant une complémentation avec le fragment manquant se trouvant sur les plasmides de type pBluescript.
<i>proAB</i>	Cette mutation nécessite l'apport de proline pour pousser sur milieu minimum.
<i>supE</i>	Suppresseur pour les mutations ambre (UAG).
<i>supF</i>	Suppresseur pour les mutations ambre (UAG).
<i>Tn5</i>	Transposon qui code pour la résistance à la Kanamycine.
<i>rex</i>	Ce gène n'est pas essentiel pour la croissance du phage et il contient dans ce cas le Tn5.
<i>b221</i>	Cette mutation est une délétion dans le génome du phage qui élimine les sites d'attachement att du phage, empêchant l'intégration au site cible de l'hôte.
<i>Oam , Pam</i>	Ces gènes interviennent dans les processus de réplication de phage et une mutation dans ces gènes empêche la réplication du phage dans les souches bactériennes non suppressives.

2.SOUCHES ET PLASMIDES

2.1 Souches bactériennes

Les caractéristiques des souches bactériennes sont reprises au tableau

Pour chacune des souches décrites, il est intéressant de détailler certaines des caractéristiques génétiques qui interviendront directement dans le cadre de ce travail.

2.1.1 Souches vectrices de transposon

Le bactériophage lambda 467 porteur du transposon Tn5 se comporte comme un vecteur suicide car il est dépourvu de sites d'intégration et de réplication fonctionnels. (De Bruijn and Lupski, 1984) . Il ne lyse donc pas les cellules qu'il infecte et son rôle se limite à apporter le Tn5.

La souche HB101 a été modifiée par l'introduction du dérivé conjugatif pox38 (Guyer *et al* 1984), un fragment HindIII de 55.6Kb provenant du facteur de conjugaison F dans lequel on a introduit le Tn4430 qui apporte la résistance à la Kan.

2.1.2 Production de β -galactosidase

Avant de s'attarder sur la production de β -galactosidase dans les diverses souches d'E.coli utilisées,il convient de faire un bref rappel concernant l'opéron lactose chez E.coli.

2.1.2.1 La régulation du gène LacZ chez *E.coli* (figure 6.5)

Chez E. coli, l'opéron lactose comprend trois gènes.

Le gène lac Z qui code pour la β -galactosidase.

Le gène lac Y qui code pour la β -galactosidase perméase, une protéine membranaire responsable de l'entrée de lactose dans la cellule.

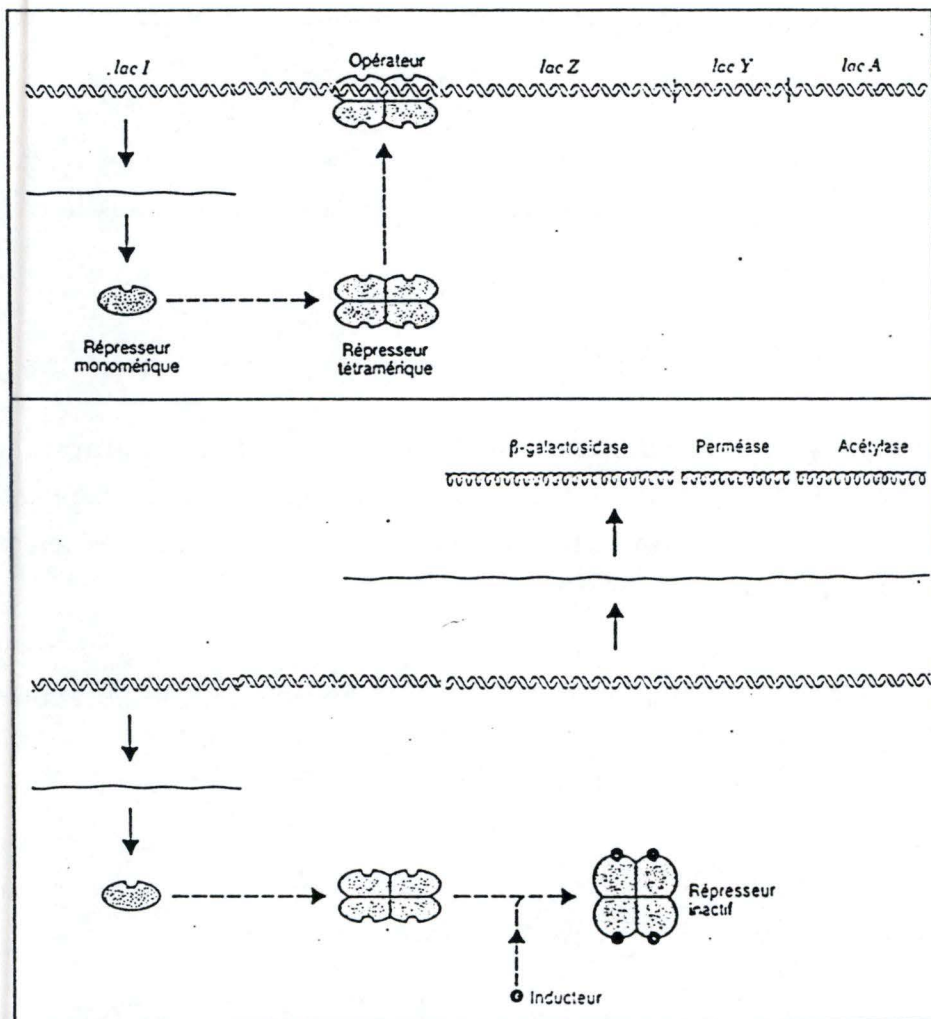


Fig. 6.5: Représentation de l'opéron lactose d'E.coli.
 (1). Le gène *lacI* synthétise un represser tétramérique qui se lie à l'opérateur en empêchant l'ARN polymérase, liée au promoteur, de transcrire les gènes adjacents.
 (2). L'inducteur (lactose ou IPTG) se fixe au represser et change sa conformation de sorte, qu'il devient incapable de se fixer à l'opérateur. L'ARN polymérase est alors capable de transcrire les gènes de l'opéron (source Lewin, 1990).

Le gène lac A qui code pour une β -galactosidase transacétylase, une enzyme qui transfère un groupe acétyl de l'acétyl-coA aux β -galactosides.

en amont de ces trois gènes se trouve le gène lac I qui code pour le represser tétramérique

Les trois gènes structuraux lacZ, lacY, lacA sont transcrits en un même ARN messager (polycistronique). La régulation transcriptionnelle de cet opéron a été particulièrement bien étudiée, et est placée à la fois sous un contrôle négatif et positif.

2.1.2.1.1 Contrôle négatif de la transcription de l'opéron lactose

Lorsque le lactose est absent du milieu, il y a répression de l'initiation de la transcription de l'opéron lactose et absence de synthèse de β -galactosidase.

En effet, le gène lac I code pour une protéine tétramérique qui en absence d'inducteur va se fixer à l'opérateur de l'opéron, empêchant sa transcription. L'opérateur se situe en aval du promoteur, au site de fixation de l'ARN polymérase.

En présence d'inducteur, celui-ci vient se fixer sur le répresser qui se dissocie aussitôt de l'opérateur, rendant possible la transcription de l'opéron.

Notons que l'inducteur de l'opéron est en fait l'allolactose, le lactose présentant un léger effet anti-inducteur. L'activité principale de la β -galactosidase est de cliver le lactose en glucose et galactose qui seront ultérieurement métabolisés. Néanmoins une activité secondaire transfère le galactose à une molécule acceptrice, produisant l'allolactose (Rawn, 1990).

L'induction provoquée par l'allolactose implique l'entrée préalable d'un peu de lactose dont une partie est transformée en allolactose par la β -galactosidase, provoquant une forte induction qui est suffisante pour contrebalancer le faible effet anti-inducteur du lactose.

2.1.2.1.2 Contrôle positif de la transcription de l'opéron lactose

Les enzymes impliquées dans le métabolisme du lactose ne seront pas synthétisées lorsqu'il y a du glucose dans le milieu, (ce dernier constitue la source de carbone "préférentielle"), on parle dans ce cas de répression catabolique.

En absence de glucose, la protéine CAP (Catabolic Activator Protein) est activée par la fixation d'une molécule d'AMPc, elle-même synthétisée abondamment par l'adénylate cyclase à partir d'ATP. La protéine CAP va se fixer (sous forme de dimère) en amont du promoteur, pour induire la transcription de l'opéron, vraisemblablement par contact avec l'ARN polymérase.

En présence de glucose, le taux d'AMPc chute dans la cellule et la protéine CAP ne peut plus fixer d'AMPc, elle reste inactive et ne peut donc induire la transcription de l'opéron lactose.

2.1.2.2 Souches productrices

Les souches HB101, NK5830 et NK6702 d'*E.coli* possèdent une β -galactosidase codée par un gène chromosomique active dont l'activité peut être décelée par l'apparition d'une coloration bleue de ces souches sur un milieu contenant de l'X-Gal.

2.1.2.3 Souches non productrices:

Chez la souche Xl1Blue d'*E.coli* , une délétion au niveau de l'opéron lactose génomique la rend incapable de métaboliser le lactose (lac^-). Une partie de cet opéron est présent sur l'épisome F' de ces bactéries. Il s'agit de la portion LacZ Δ M15 codant pour la partie C-terminale (inactive) α' de la β -galactosidase.

Cette portion porte le gène I avec le promoteur muté IQ dont la force est accrue de telle sorte que la synthèse de répresseur est augmentée d'un facteur 10. De cette façon la répression peut s'exercer efficacement non seulement sur les quelques copies de F'présents dans une bactérie mais aussi sur les copies plus nombreuses de plasmides présent dans la cellule. Cette répression empêche que l'expression des gènes portés par ces vecteurs a nombre de copies élevé ne constitue un fardeau mortel pour la bactérie.

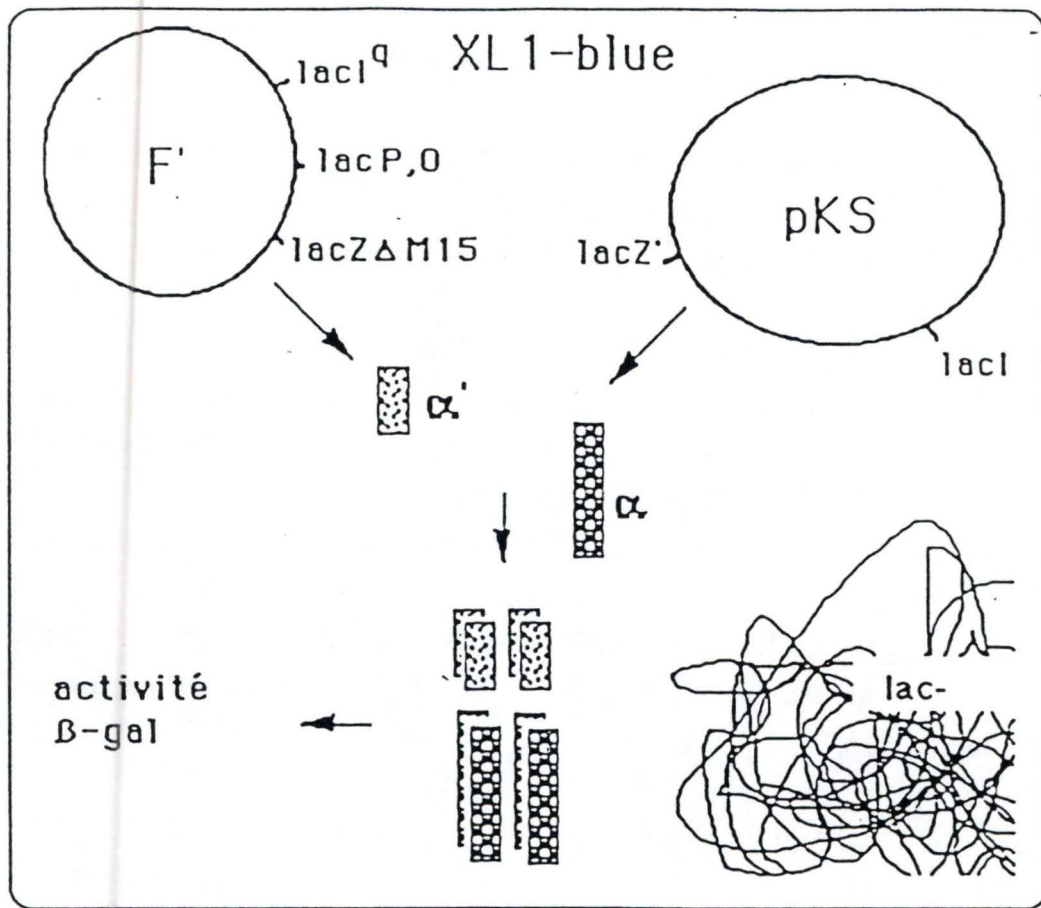


Fig. 6.6: XL1Blue - pUC, un système hôte vecteur permettant la sélection des recombinants par la couleur des colonies (test blanc - bleu).

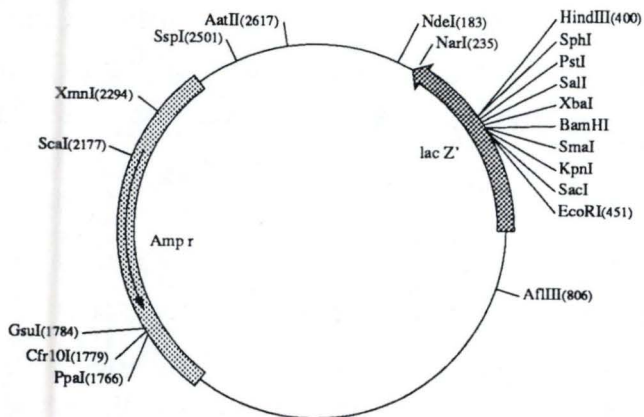


Fig. 6.7: Carte physique du plasmide pUC18.

Le reste de l'opéron est présent sur des vecteurs de type pUC. En effet, ceux-ci sont porteurs d'un fragment non opérationnel lacI (le régulateur de l'opéron) et d'un fragment lacZ' 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, soit le peptide α inactif.

La complémentation intragénique consiste en l'assemblage des peptides α et α' , ce qui génère une enzyme β -galactosidase fonctionnelle dont l'activité peut être décelée sur un milieu contenant de l'X-Gal + IPTG (figure 6.6).

Par construction, un site multiple de clonage (SMC) a été inséré en phase dans la région (antérieure (5')) peu importante pour l'activité β -galactosidase ce qui n'empêche pas la restauration de l'activité par complémentation intragénique.

Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans ce SMC, l'ORF de la portion lacZ' est disruptée et le peptide α n'est plus synthétisé.

Les bactéries transformées par de tels vecteurs (dits recombinants) donneront naissance à des colonies blanches sur un milieu contenant de l'X-Gal. Un test de coloration permet donc de discriminer les colonies possédant le plasmide natif de celles possédant un plasmide recombinant.

2.2 Plasmides

pox38: Le pox38 est un dérivé conjugatif d'une taille de 55.6 Kb provenant du facteur de conjugaison F (Guyer *et al* , 1980). Le Tn4430 y a été inséré, lui conférant la résistance à la Kanamycine.

pUC18: Le plasmide pUC18 d'une taille de 2686pb (figure 6.7) présente les caractéristiques suivantes:

- Le gène BLA, responsable de la résistance à l'ampicilline, codant pour une β -lactamase.
- Une origine de répllication pour *E.coli* (col E1ori).
- Un MCS ("multiple cloning site ").

YEp351: Le plasmide YEp351 d'une taille de 5644pb (figure 6.8) est un vecteur navette capable de se répliquer dans *E.coli* ainsi que dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

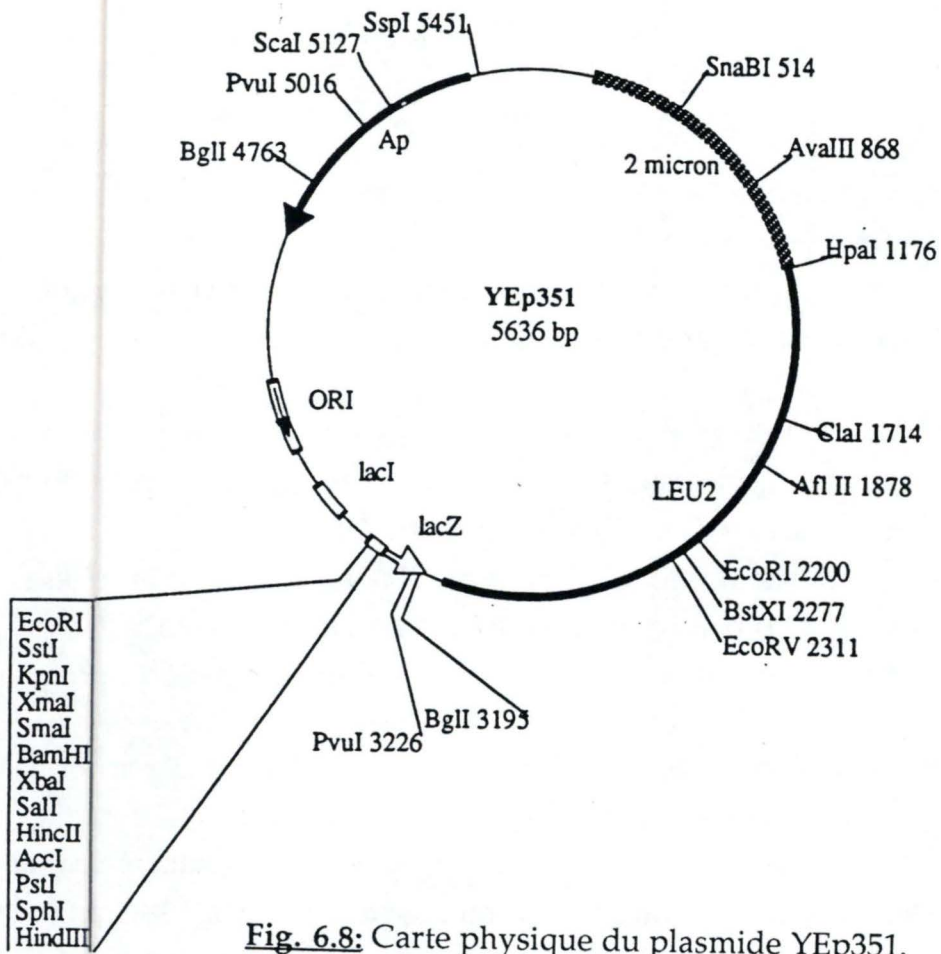


Fig. 6.8: Carte physique du plasmide YEp351.

Celui-ci a été construit à partir d'un pUC 18 auquel on a ajouté un fragment d'ADN de levure contenant l'origine de réplication 2μ et le marqueur d'auxotrophie Leu2 (Hill *et al* , 1986)

En plus de ces caractéristiques qui lui sont propres, le YEp351 présente toutes les caractéristiques trouvées chez le pUC18.

3. TECHNIQUES D'ADN RECOMBINANTS

3.1.Constructions génétiques

3.1.1.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. Il s'agit de la restriction, de la ligation et de 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 bp). Le nombre de fragments générés dépend de la fréquence d'occurrence du site dans la molécule d'ADN.

Ces fragments peuvent ensuite être soumis à une ligation à l'aide de la T₄ DNA ligase, pour autant que les extrémités des morceaux que l'on désire assembler soient compatibles.

Deux cas peuvent se présenter: soit l'enzyme clive l'ADN en générant des extrémités à bouts francs (ex: SmaI), soit en générant des bouts collants. Si il génère des bouts collants, ils seront 5' protrudants (ex:Sall), ou 3' protrudants (ex: Sph I).

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 protrudantes de même longueur et de séquence nucléotidique complémentaire

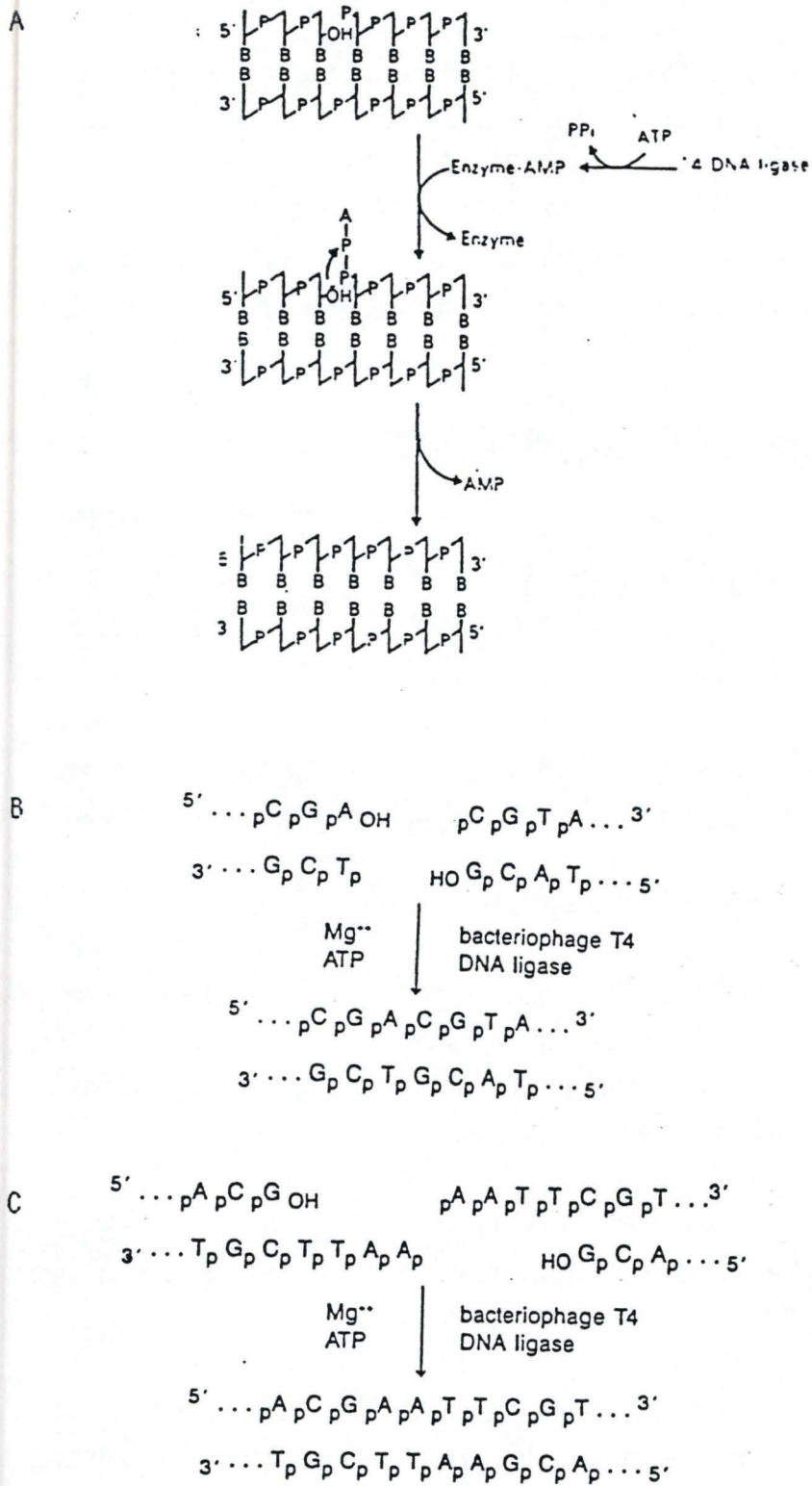


Fig. 6.9:

(A). Action générale de la T4 ligase. L'attaque par le 3'-OH génère un lien phosphodiester reliant les deux morceaux du brin.

(B). exemple de ligation de fragments à bouts collants.

(C). exemple de ligation de fragments à bouts francs.

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

3.1.2. Restriction

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

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 / μ g d'ADN).
- 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 inactiver 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 stockées dans du glycérol susceptible à forte concentration d'inactiver ou de conférer une activité "star". Une enzyme présente une activité "star" lorsqu'elle restreint en des sites qui ne lui sont pas spécifiques.

3.1.3. Ligation

La ligase du phage T4 est utilisée pour catalyser la formation de liens phosphodiester entre un groupement hydroxyle en 3' et un groupement phosphate en 5'. Pour être active, l'enzyme requiert la présence d'ATP et de Mg^{2+} (figure 6.9).

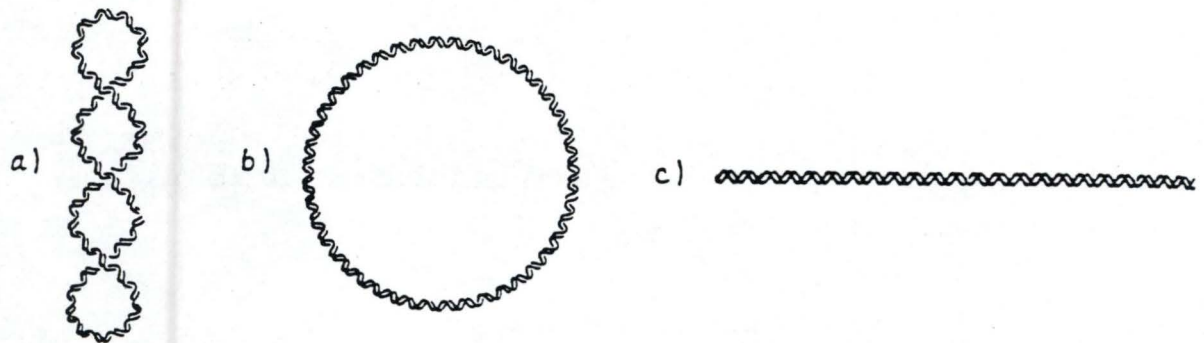


Fig.6.10:

L'ADN plasmidique se présente sous trois configurations différentes.

- a. La forme CCC (covalently closed circular): forme superenroulée.
- b. La forme OC (open circular): plasmide circulaire sans superenroulement.
- c. La forme L (linear): plasmide linéarisé par restriction.

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 cette température 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).

3.2 .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).

3.2.1.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 (figure). 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.(figure 6.10)

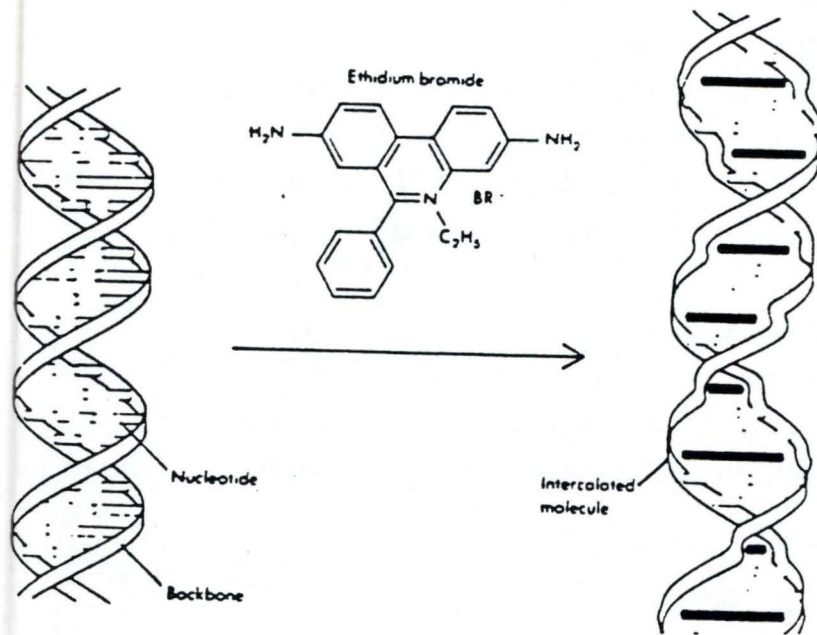


Fig.6.11:

Visualisation de l'ADN au bromure d'éthidium. Les molécules de bromure d'éthidium s'intercalent entre les bases azotées de la double hélice.

HindIII (48502pb)	total de 600ng
<u>taille</u>	<u>concentration</u>
23130pb	286ng
9416pb	116ng
6557pb	81ng
4361pb	53ng
2322pb	28ng
2027pb	25ng
564pb	7ng
127pb	1,5ng

Fig. 6.12: Marqueur de taille obtenu par restriction du phage λ par HindIII. Taille et concentration des fragments.

Les molécules d'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur PM.

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.

3.2.2. 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'insérer entre les bases de l'ADN (figure 6.11). Lorsque ce composé est excité par des U.V (302 nm), il devient fluorescent.

3.2.3. 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 Hind III est utilisé dans le cas des gels 0,8% (figure 6.12).

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 taille.

3.2.4. Estimation de la quantité des fragments

Pour estimer la concentration d'un fragment donné, on se réfère à nouveau au marqueur de taille. On connaît la concentration correspondant à chacune des bandes de ce marqueur (figure 6.12).

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.

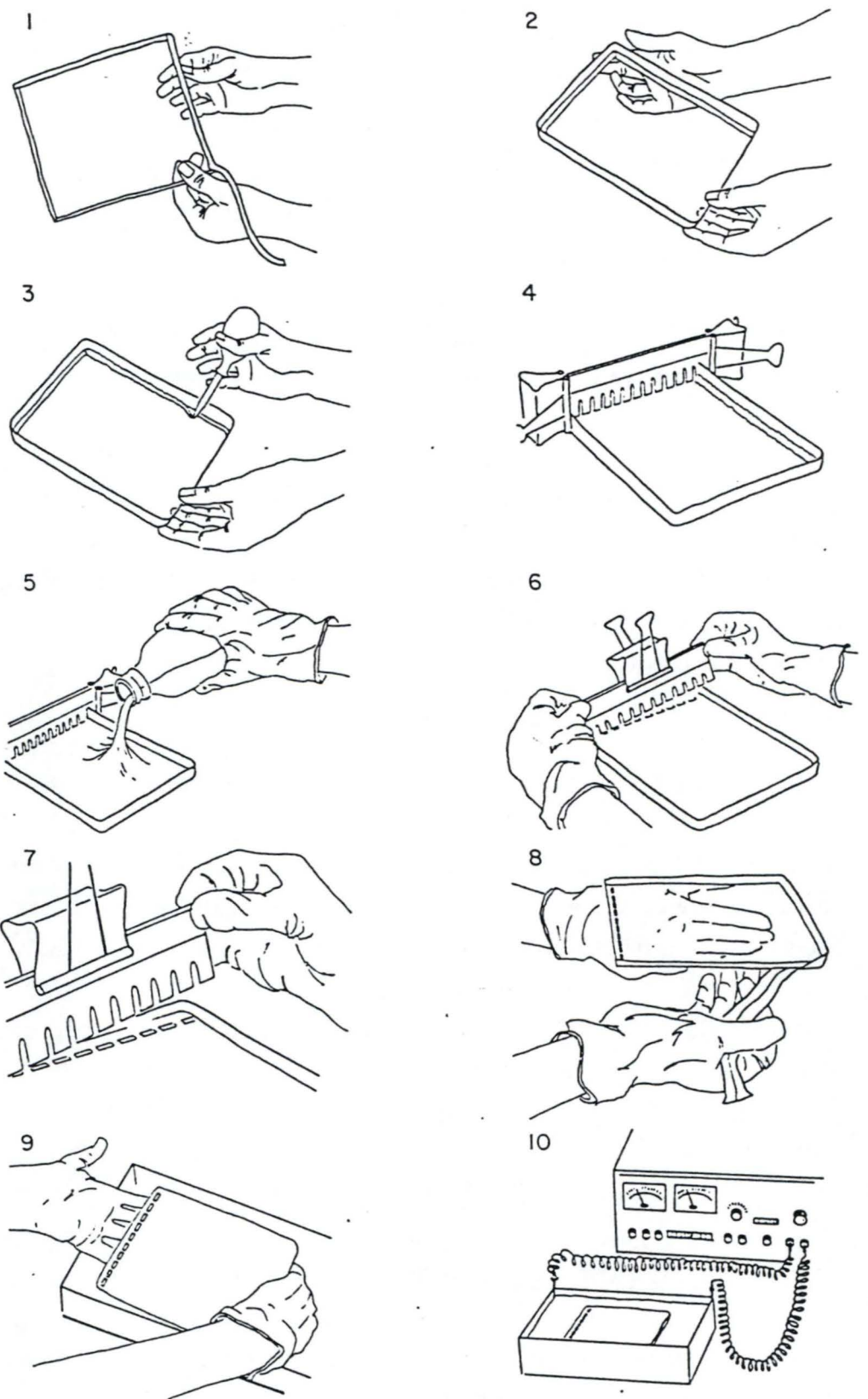


Fig. 6.13: Montage du gel pour électrophorèse en gel d'agarose.

3.2.5.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 (figure 6.13).
 - 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).

3.3 Electrophorese préparative et purification de fragments d'ADN.

Après avoir réalisé une électrophorèse préparative, il est possible de purifier un fragment d'ADN.

Dans la méthode utilisée, le gel est incisé sous la bande d'intérêt afin d'y introduire un morceau de papier filtre (DEAE cellulose / Whatman DE81). Après 10 minutes de migration, le fragment d'intérêt est transféré du gel sur le papier Whatman.

Protocole détaillé:

- Préparation des filtres Whatman DE81:
 - Découper à la taille désirée.
 - Incuber 2-3 heures dans du NaCl 2,5 M.
 - Laver plusieurs fois à l'eau.
 - Conserver dans de l'EDTA 1mM à 4°C.
 - Avant emploi, rincer une fois avec du TBE 1 X.

- Couper le gel avec une lame de scalpel juste en dessous de la bande à récupérer et y glisser le papier.
- Faire migrer 10 minutes à 100 volts
- Rincer le papier avec de l'eau froide pour enlever le TBE.
- Buvarder le papier entre deux filtres.
- Placer le papier dans un Eppendorf.
- Ajouter 350 µl de High Salt Buffer (tampon d'élution).
- Mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte.
- Incuber 2 heures à 37°C en agitant de temps en temps.
- A l'aide d'une épingle chauffée faire un petit trou dans le fond de l' Eppendorf.
- Enfoncer l' Eppendorf dans un second Eppendorf non troué.
- Centrifuger 5 minutes 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.
- Éliminer la phase supérieure (butanol).
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu, mélanger.
- Placer 30 minutes à -80° ou une nuit à -20°C.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Décantier.
- 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.

3.4 Transformation bactérienne

3.4.1 Electroporation

La technique d'électroporation repose sur le phénomène suivant: lorsqu'une membrane biologique est soumise à un champ électrique, elle 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)

Nous avons utilisé l'électroporateur "GENE PULSEUR" commercialisé par la firme Bio-RAD . Cet appareil délivre, par la décharge d'un condensateur, un choc électrique à décroissance exponentielle dans une cuvette pourvue d'électrodes en contact avec la suspension de cellules à transformer.

3.4.1.1 Caractéristique liées au 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'est à dire 25 microfarads. En vertu de l'équation $\tau = RC$, nous obtenons un choc de longue durée. La valeur τ 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% de V_0 . ($V_0 = V_{initial}$)

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 ce phénomène soit réversible pour permettre 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.

3.4.1.2 Mise en oeuvre:

Avant de réaliser l'électroporation proprement dite il convient de réaliser des aliquots de cellules compétentes à l'électroporation, à savoir des cellules en phase exponentielle de culture extraites de leurs milieux de culture et stockées dans de l'eau.

Car la composition du milieu d'électroporation pauvres en sels est importante non seulement du point de vue électrique mais aussi parce que ses composants, normalement exclus des cellules peuvent y entrer pendant l'électroporation et provoquer des effets indésirables.

3.4.1.3 Préparation des cellules:

- Inoculer une préculture de 5 ml de LB avec la souche a préparer
- Laisser pousser une nuit à 37 °C
- Inoculer 200 ml de LB avec 2 ml de volume de la préculture
- Incuber a 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO de 0.5 à 0.8
- Refroidir la culture sur glace 15 à 30 minutes.
- Centrifuger la culture à 4°C à 4000 G pendant 15 minutes.
- Resuspendre le culot dans 200 ml (volume initial) d'eau froide stérilisée.
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 G
- Resuspendre le culot dans 100 ml (volume initial / 2) d'eau froide stérilisée.
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 G
- Resuspendre le culot dans 4 ml (volume initial / 50) de glycerol 10 %.
- Recentrifuger 15 minutes à 4000 G
- Resuspendre le culot dans 400 µl de glycerol 10 %.
- Aliquoter 100 µl par eppendorf, et conserver à - 80°C jusqu'à 6 mois.

3.4.1.4 Electroporation proprement dite

- Placer la cuvette d'électroporation dans la glace
- Placer dans un eppendorf 40µl de cellules compétentes et 1 à 2 µl d'ADN plasmidique.
- Mélanger et placer la solution 1 minute sur glace.
- Transférer dans la cuvette le contenu de l'eppendorf.
- Placer la cuvette d'électroporation dans l'électroporateur.
- Réaliser l'électroporation à 25µF / 200 Ohms / 2.2 - 2.5 Kv.
- Ajouter très vite après la décharge, 1 ml de SOC.
- Transférer ensuite dans un eppendorf et laisser 1 heure a 37°C.
- Etaler ensuite sur boite et laissez pousser une nuit a 37°C.

3.4.2 Transformation au CaCl₂

La transformation au CaCl₂ consiste à introduire l'ADN plasmidique sous forme d'un précipité d'ADN-Calcium-Phosphate qui adhère à la surface cellulaire. L'efficacité de transformation peut être augmentée en donnant un choc physiologique avec du diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui va augmenter la perméabilité membranaire et favoriser l'adsorption du précipité par la cellule.

3.4.2.1 Préparation des cellules compétentes

- Strier des cellules d'un stock congelé (dans du LB + 7% DMSO) sur une boîte de LB et faire pousser une nuit à 37°C.
- Ensemencer une culture de 250 ml avec une colonie.
- Laisser pousser la culture jusqu'à une DO de 0,6.
- Placer la culture sur la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 3000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 80 ml de TB (Transformation buffer) froid.
- Incuber 10 minutes sur glace.
- Recentrifuger 10 minutes.
- Resuspendre doucement dans 20 ml de TB et ajouter du DMSO à une concentration finale de 7% en mélangeant doucement.
- Aliquoter en Eppendorf et stocker à -80°C.

3.4.2.2 Transformation

- Ajouter 1 à 5 µl de plasmides (ne pas dépasser 10 ng d'ADN) à 200 µl de cellules compétentes.
- Incuber sur glace pendant 30 minutes.
- Faire un choc thermique de 30 secondes à 42°C et puis réincuber sur glace.
- Ajouter 0,8 ml de SOC et placer les tubes à 37°C.
- Incuber pendant une heure.
- Etaler sur boîte.

3.5 Préparation de l'ADN

3.5.1 Minipréparation d'ADN plasmidiques: (Nucleobond AX 100)

Ce protocole permet d'obtenir de l'ADN plasmidique rapidement et en quantité suffisante pour être soumis à une restriction diagnostique.

3.5.1.1 Mise en oeuvre:

- Inoculer 5 ml de LB avec une colonie.
- Ajouter des antibiotiques si nécessaire.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de culture pendant 5 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µl de P1+RNase.
- Ajouter 300 µl de tampon P2.
- Mélanger doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de tampon P3.
- Mélanger doucement.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique.

Précipitation de l'ADN:

- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol à température ambiante.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm (Janetzki).
- Laver le surnageant avec 300 µl d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot 10 minutes sous vide.
- Resuspendre l'ADN dans 10 à 50 µl de tampon TE.

3.5.2 .Midipréparation d'ADN plasmidiques:(Nucleobond AX100).

3.5.2.1. Mise en oeuvre:

- Inoculer 100 ml de LB avec une colonie.
Ajouter des antibiotiques si nécessaire.
- Incuber 12 heures à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm et température ambiante (rotor GSA Sorvall).
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1+RNase.
- Transférer dans un corex de 30 ml.
- Ajouter 4 ml de tampon P2.
- Mélanger délicatement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de tampon P3.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm et 4°C (rotor SS34 Sorvall).
- Récupérer le surnageant
- Déposer le surnageant au sommet d'une colonne Nucleobond AX 100 pré-équilibrée avec 2 ml de tampon N2.
- Laver la colonne avec 2 X 4 ml de tampon N3.
- Eluer l'ADN avec 2 ml de tampon N5 et récupérer l'éluat dans un corex de 15 ml.

Précipitation de l'ADN:

- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol à température ambiante.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm et température ambiante (rotor SS34 Sorvall).
- Eliminer le surnageant.
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70% froid.
- Recentrifuger 5 minutes
- Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot sous vide.
- Resuspendre l'ADN dans 100 à 1000 µl de tampon TE.

3.5.3 Methode STELT

- Inoculer 5 ml de culture avec une colonie
- Laisser pousser une nuit à 37 °C
- Centrifuger 3' 2 X 1,5 ml de la culture dans un eppendorf
- Eliminer le surnageant
- Resuspendre dans 250 µl de STET
- Ajouter 40 µl de lysozyme à 10 mg/ml.
- Placer l'eppendorf une minute dans l'eau bouillante.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C
- Enlever le culot gélatineux avec un cure dent.stérile.

Précipitation de l'ADN:

- Ajouter 300 µl d'isopropanol au surnageant
- Recentrifuger 15 minutes.
- Eliminer le surnageant.
- Laver le culot avec 500 µl d'ethanol 70%
- Sécher le culot.
- Resuspendre le culot d'ADN dans de l'eau distillée.

3.5.4 Préparation d'ADN génomique de levures

3.5.4.1 Mise en oeuvre

a. Sphéroplastes

- Faire une culture de 100 ml
- Laissez pousser jusqu'à une DO de 4.
- Centrifuger et laver les cellules, puis les resuspendre dans 10 ml de tampon SCE + b-ME 14 mM.
- Ajouter 250 µl de zymoliase 100000 à 5mg/ml dans du glycérol 60%.
- Incuber 30 minutes à 37°C.

b.Lyse

- Centrifuger les sphéroplastes et les resuspendre dans 10 ml de EDTA 50mM pH 8.5, SDS 0,2%.

c. Précipitation des protéines et traitement à la RNase

- Chauffer 15 mn à 70°C
- Ajouter 1 ml de K Acétate 5 M et laisser précipiter 30 mn dans la glace.
- Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm.

d. Phénol-chloroforme

- Ajouter 5 ml de phénol-chloroforme au surnageant et mélanger avec douceur.
- Centrifuger 30 mn à 10000 rpm.

e. Précipitation de l'ADN

- Prélever le surnageant avec une pipette de 10 ml et rajouter doucement 20 ml d'éthanol à température ambiante.
- Mélanger doucement par rotation du tube.
- Récupérer le cheveu d'ADN formé avec un cône.
- Rincer le cheveu avec de l'éthanol 70%.
- Laissez sécher légèrement 10 mn tube ouvert sur la paille.
- L'ADN est dissout dans 1 ml de TE.

3.6 Purification de l'ADN

3.6.1 Par extraction phénol-chloroforme

Cette opération a pour but d'enlever les sels et les protéines. On l'utilise notamment entre deux restrictions pour lesquelles les tampons d'incubation des enzymes sont différents ou lorsque la préparation d'ADN n'est pas pures.

3.6.1.1 Mise en oeuvre:

- Porter le volume à purifier à 100 µl avec de l'eau.
- Ajouter un volume de phénol / TE ou phénol / chloroforme.
- Vortexer jusqu'à l'obtention d'une solution blanche.

- 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.
- Centrifuger quelques secondes.
- Eliminer la phase supérieure.

Récupération de l' ADN:

- Ajouter: -2,5 volumes d'éthanol 100% froid.
-0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2.
- Incuber 20 minutes à -80°C.
- Culoter l' ADN en centrifugeant 20 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Laver le culot à l'éthanol 70%.
- Sécher 10 minutes sous vide puis resuspendre dans un volume approprié d'eau stérile.

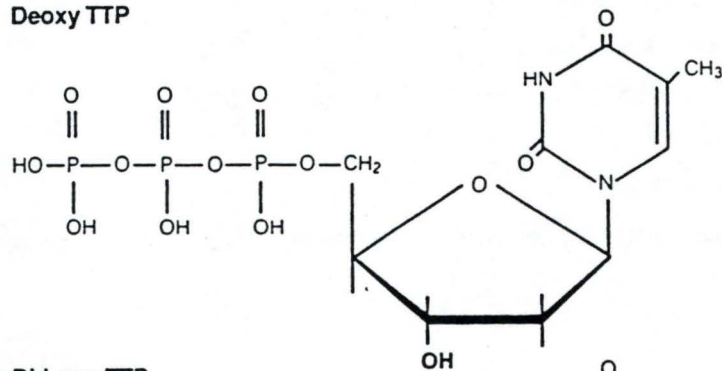
3.6.2 Par fixation de l'ADN sur des diatomées

Dans cette méthode de purification décrite par MJ Carter et I.D Milton (Carter & Milton, 1993), la matrice de fixation d'ADN est constituée de diatomées, particules de silice chargées positivement. Celles-ci sont stockées à une concentration de 10 mg/ml dans une solution constituée de:

-Guanidine thiocyanate	4M
-Tris-HCl (pH 7)	50mM
-EDTA	20mM

Cette méthode de purification peut faire suite à n'importe quel type de préparation d'ADN. Elle s'applique juste avant la précipitation de l'ADN par l'isopropylalcool.

Deoxy TTP



Dideoxy TTP

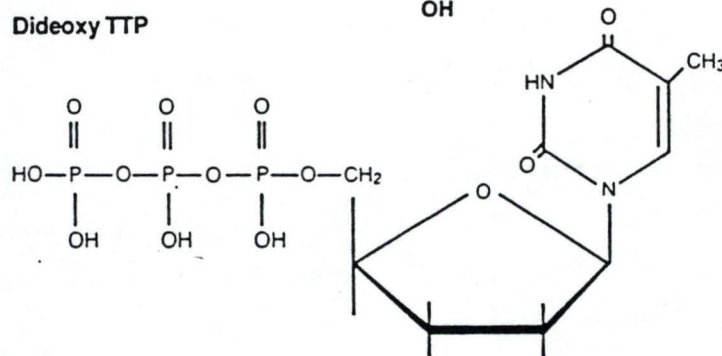


Fig. 6.14: Représentation d'un déoxynucléotide possédant un groupement 3' hydroxyle et d'un didéoxynucléotide ne possédant pas de groupement 3' hydroxyle.

Un volume de 800µl de stock de diatomées (diatomaceous earth (Sigma)) est nécessaire pour fixer 5 µg d'ADN.

- Mélanger 1 ml de la solution à purifier avec 800µl de solution de diatomées.
- Mélanger pendant 2 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 5-10 secondes.
- Enlever le surnageant
- Resuspendre le culot dans 1 ml de DWB.
- Centrifuger 5-10 secondes.
- Enlever le surnageant.
- Recommencer l'étape de resuspension et de centrifugation.
- Laver le culot avec 1 ml d'acétone.
- Centrifuger 5-10 secondes.
- Enlever le surnageant (Speedvac 1 minutes à 65°C)
- Resuspendre le culot dans 50-200 µl d'eau.
- Incuber 2 minutes à 65°C.
- Recentrifuger et récupérer le surnageant contenant l'ADN purifié.

3.7 Séquençage

(T7Sequencing™ kit Pharmacia.)

3.7.1.Principe du séquençage.:(Sanger et al ,1977).

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. Celle-ci repose sur l'utilisation de 2'-3' dideoxyribonucleoside triphosphates (ddNTP) .

Ceux-ci se distinguent des précurseurs desoxynucleotidiques de la synthèse d'ADN par la substitution d'hydrogène au groupe hydroxyle 3'(figure 6.14). Les didéoxyribonucléotides sont parfaitement reconnus par les ADN polymérase et greffés à la chaîne polynucléotidiques en croissance. la réaction normale de polymérisation se faisant par la formation de lien phosphodiester entre le 3' -OH du desoxyribose et le P du nucleotide suivant.

Cependant, comme le groupe hydroxyle -3' leur fait défaut; ils sont incapables d'attaquer le prochain nucléosides 5' triphosphate.

Leur incorporation met donc un terme à la croissance de la chaîne.(figure 6.15)

L'introduction de petites proportions de dideoxyribonucléotides dans le milieu où s'effectue une réaction de réplication permet de terminer la synthèse d'ADN spécifiquement à la position correspondante à une base donnée.

Le séquençage à l'aide de ddNTP requiert les étapes suivantes:

L'ADN à séquencer est isolé sous forme de molécule monocaténaire et additionnée d'un court oligonucléotide complémentaire de la séquence d'ADN située du côté 3' de la séquence à déchiffrer.

Cet oligonucléotide sert d'amorce au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. La molécule amorcée sur l'oligonucléotide est alors distribuée dans 4 tubes de réaction A T G C.

On introduit dans chacun une petite quantité de nucléotides radioactif qui servira à détecter par autoradiographie les ADN néoformés.

Chaque tube reçoit ensuite un excès des 4 dNTP non radioactifs dont l'un contient une petite quantité du ddNTP correspondant.

Les ddnucléotides vont ainsi être incorporés au hasard au cours de la réaction de polymérisation engendrant ainsi dans chacun des eppendorf, des fragments de taille différentes terminés chacun par le ddNTP introduits.

Après avoir séparé l'ADN néoformé des amorces et fractionné les produits de chaque type de réaction dans un gel de polyacrylamide dont le pouvoir de résolution est suffisant pour distinguer une différence de taille d'un nucléotides, on peut déduire directement la séquence en interprétant le profil du gel (figure 6.16).

3.7.2 .Réaction de séquençage

3.7.2.1 Dénaturation

Placer dans un Eppendorf:

- 1,5 à 2 µg d'ADN dans 8 µl d' eau stérile.
- 2 µl de NaOH 2N.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.

Précipitation de l'ADN dénaturé

- Ajouter:
- 3 µl de NaAc 3M pH4,8.
- 7 µl d'eau stérile.
- 60 µl d'éthanol 100% froid.
- Mélanger.
- Incuber 15 minutes à -80°C.
- Centrifuger 4 minutes à 13000 rpm et 4°C (Janetzki).
- Eliminer le surnageant.
- Laver à l'éthanol 70%.
- Sécher sous vide.

3.7.2.2 Hybridation ("Annealing").

Cette étape correspond à l'hybridation du primer (amorce) sur le brin "template" matrice.

- Resuspendre le culot sec dans 10 µl d'eau stérile.
- Ajouter:
- 2 µl de primer.
- 2 µl d'annealing buffer.
- Incuber 20 minutes à 37°C puis 10 minutes à température ambiante.

3.7.2.3. Marquage radioactif ("Labelling")

Cette étape correspond au marquage du brin néoformé; la polymérisation par l'enzyme T7 DNA polymérase commence en absence de ddNTP et en présence des quatre dNTP dont un est marqué permettant la synthèse d'un court brin marqué par extension du primer(amorce de quelques dizaines de nucléotides).

Ajouter:

- 3 µl de labelling mix (dCTP,dGTP et dTTP).
- 1 µl de [α - 35 S] dATP.
- 3 unités de T7 DNA polymérase diluée dans son tampon de dilution jusqu'à 1.5 unités par µl.
- Centrifuger quelques secondes.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.

3.7.2.4 Terminaison

Lors de cette étape, l'ensemble T7 DNA polymérase + brin template (matrice) avec primer (amorce) allongé , sont mis en présence de dNTP et de ddNTP.

Dans quatre Eppendorfs (notés A, C, G et T), ajouter 2,5 µl d'un mélange de nucléotides.

- Préincuber ces Eppendorfs à 37°C.
- Ajouter à chaque tube 4,3 µl du mélange issu de la réaction de labelling.
- Incuber 5 minutes à 37°C.
- Ajouter 5 µl de solution stop.
- Stocker à -20°C une semaine ou utiliser immédiatement.

3.7.2.5 .Electrophorèse en gel de polyacrylamide

- Laver les deux plaques de verre (eau de ville, eau distillée puis éthanol).
- Laver, sur la plus grande des deux plaques, la surface qui sera en contact avec le gel avec 10 ml de diméthyl dichloro silane (silicone).
- Placer les spacers sur cette même plaque.
- Adjoindre la petite plaque.
- A l'aide d'adhésif, sceller les deux plaques tout en les maintenant jointes à l'aide de pinces.

3.7.2.6 .Préparation du gel

Placer dans un berlin:

- 42 g d'urée.
- 10 ml de TBE 10X.
- 15 ml d'acrylamide 20%-bisacrylamide 0,8%.
- 40 ml d'eau distillée.
- Après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78 BUC).
- Ajouter rapidement (pour polymériser)
- 600 µl de persulfate d'ammonium.
- 30 µl de TEMED (Biorad).
- Aspirer la solution à l'aide d'une seringue de 100 ml, et couler le mélange sans tarder entre les deux plaques. Placer les peignes à l'envers afin de déterminer une ligne de base. La polymérisation est terminée après une heure, le gel peut être stocké à 4°C.

3.7.2.7 .Migration des échantillons et autoradiographie

La migration s'effectue dans du TBE 1X.

- Préchauffer le gel une demie-heure (60 watts,1600 volts).
 - Placer les dents du peignes contre la ligne de base préalablement formée afin de déterminer l'emplacement des puits.
 - Nettoyer les puits de toute trace d'urée.
 - Placer les échantillons 5 minutes à 85°C (dénaturation de l'ADN).
 - Charger 2,5 µl d'échantillon par run.
- Généralement, on effectue plusieurs migrations (7, 5 et 2 heures).

Après la migration

- Démouler les plaques.
- Placer la plaque sur laquelle est resté accroché le gel dans un bain de fixateur pendant 15 minutes.
- Transférer le gel sur un Buvard Whatman (3MM Chr).
- Sécher sous vide à 60°C pendant une heure.
- Placer avec un film photo dans une cassette à 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.

3.8 Southern Blotting

Le Southern Blotting est l'étape de transfert de fragments d'ADN à partir d'un gel électrophorétique sur un support de nylon (ou l'ADN est immobilisé). par la suite, les fragments d'ADN peuvent être soumis à l'analyse par hybridation qui permettra d'identifier les fragments similaires à la sonde.

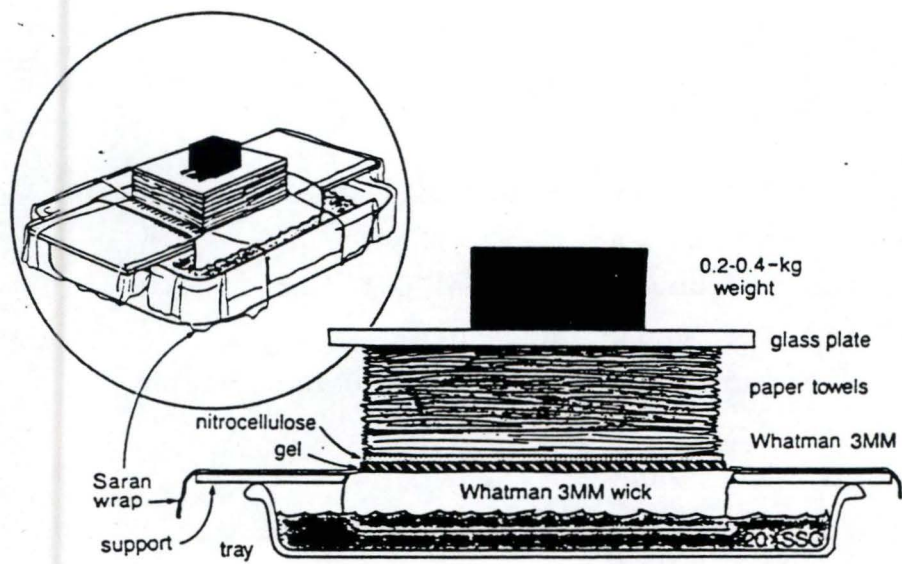


Fig. 6.17: Représentation du montage permettant le transfert de l'ADN du gel sur le filtre.

3.8.1 Mise en oeuvre:

3.8.1.1 Traitement du gel d'agarose

- Placer le gel d'électrophorèse successivement :
 - 2 x 20' dans solution de dénaturation (500ml).
 - 2 x 20' dans solution de neutralisation (500 ml).
 - 30' dans duSSC 20x.

3.8.1.2 Montage: (figure 6.17)

Réaliser le montage de manière à ce que l'ADN soit transféré par capillarité sur la membrane de nylon comme suit:

- Sur une plaque de verre servant de support, déposer un papier Whatman 3MM imbibé de SSC 20X. Ce papier Whatman sert de mèche puisqu'il est trempé dans un bain contenant le SSC 20X. Placer le gel à l'envers bien à plat sur le papier Whatman.
- Déposer une feuille de nylon (Hybond-N, Amersham) sur celui-ci.
- Mettre trois feuilles de papier Whatman 3MM sur la feuille de nylon ainsi que plusieurs couches de papiers-filtres.
- Placer sur le tout une plaque de verre sur laquelle repose un poids de 1 Kg.
- Le transfert s'effectue durant une nuit à température ambiante.
- Récupérer le filtre de nylon portant les fragments d'ADN dénaturé.
- Laver délicatement le filtre dans du SSC 3X.
- Le sécher puis l'exposer 5 minutes aux UV pour fixer l'ADN.

3.8.1.3. Transfert

- Le transfert s'effectue pendant une nuit.
- Vérifier la fluorescence du gel et du filtre de nylon aux U.V.

3.8.1.4 Fixation

- Fixer l'ADN en exposant le filtre 5' aux U.V

3.8.1.5 Préhybridation

- Laver le filtre de nylon dans du SSC 2x.
- Placer le filtre dans un sachet plastique.
- Ajouter: -10 ml de solution Denharts 50X
 - 10 ml de SSC 20X
 - 0,5 ml de SDS 10%
 - 10 ml d'ADN de thymus de veau (2,3 mg/ml)
- Porter le volume à 50 ml avec de l'eau stérile.
- Éliminer les bulles d'air
- Laissez incuber pendant 4 heures dans un bain d'eau à 65°C sous agitation.

3.8.1.6 Synthèse de la sonde radioactive (Random primed DNA labelling kit)

(pour 25 ng d'ADN)

- Dénaturer 25 ng d'ADN dissoud dans 5-20 µl d'eau distillée en le chauffant pendant 5 minutes à 100°C.
- Placer sur glace.
- Ajouter successivement: -2 µl d'ATP solution
 - 2 µl d'GTP solution
 - 2 µl d'αTP solution
 - 15 µl de Random Primers Buffer Mixture.
 - 5 µl de [α-32P] dCTP, 3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl
- Monter le volume à 49 µl avec de l'eau distillée.
- Mélanger brièvement.
- Ajouter 1 µl de Klenow, mélanger et centrifuger brièvement.
- Incuber une heure à 25°C.
- Ajouter 5 µl de solution STOP.

3.8.1.7 Hybridation

- Dénaturer la sonde radioactive en la plaçant 2 minutes dans de l'eau bouillante.
- Ajouter la sonde au sachet contenant le filtre.
- Sceller le sachet.
- Incuber une nuit à 65°C.

3.8.1.8 Lavages

- Laver le filtre 2x10' à température ambiante dans du SSC 2X et du SDS 0,1%.
- Laver le filtre 2x10' à température ambiante dans du SSC 0,2X et du SDS 0,1%.

3.8.1.9 Révélation

- Placer le filtre en cassette avec un film autoradio, 3 heures à -80°C.
- Révéler le film pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Fixer le film pendant 15 minutes.
- Rincer à l'eau et sécher.

4. MILIEUX DE CULTURE:

4.1 Milieu LB :

Bactotryptone	10g/l
NaCl	5g/l
Yeast extract	10g/l
Agar	20g/l (si milieu solide)

- Portez le volume à un litre avec de l'eau distillée.
- Stériliser 20 minutes à 120°C.
- Laisser refroidir avant d'y ajouter les antibiotiques.

4.2 Milieu SOC:

Bactotryptone		20g/l
NaCl 10mM		0,585g/l
Yeast extract		10g/l
KCl 2,5 mM		0,187g/l
MgCl ₂ 6H ₂ O	10mM	2,032g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	10mM	2,46g/l
Glucose	20mM	3,965g/l

5. SOLUTIONS ET TAMPONS:

5.1 Solutions:

Solutions stock d'agarose:

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

Solutions stock d'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.

-Tétracycline (Sigma) 12,5mg/ml dans 50:50 eau distillée: éthanol,
à diluer 1000 X.

-Chloramphénicol (Boehringer) 50mg/ml dans de l'éthanol.

- Kanamycine (Boehringer) 50 mg/ml dans de l'eau distillée,
à diluer 1000 X.

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

Solution stock de bromure d'éthidium:

1, 2 ou 10 mg/ml dans de l'eau.

Solution de dénaturation (Southern):

pour 400ml: NaOH 0,5M	8gr
NaCl 1,5M	35gr

Solution de neutralisation (Southern):

pour 400ml: NaCl 1,5M 35gr
 TRIS (pH 7,5) 0,5M 26gr
 EDTA 0,001M 0,15gr

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

-Bleu de bromophénol 0,25%
-EDTA 25mM
-Glycérol 50%
Porter à volume avec de l'eau distillée.

Solution de fixateur (pour gel de séquençage):

-Acide acétique 10%
-Méthanol 10%

SSC 20X:

pour 400ml: NaCl 3M 70gr
 Citrate de (tri-Sodium) dihydrate 35,3gr

Phénol-Chloroforme:

25 volumes de phénol: 24 volumes de chloroforme: 1 volume
d'isoamylalcool.

RNaseA (Boehringer): (10 mg/ml)

Incuber 15 minutes à 100°C
Aliquoter et stocker à -20°C

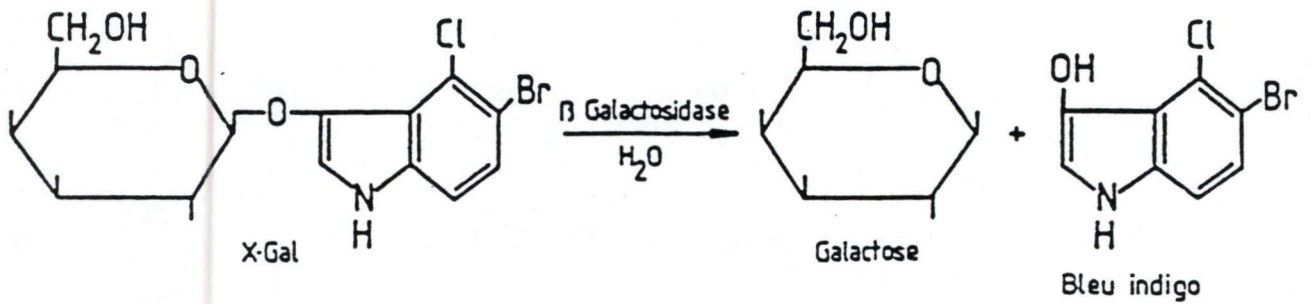


Fig. 6.18: La présence d'une β -galactosidase dans un milieu de culture peut-être détectée par le test blanc-bleu.

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse d'un analogue du lactose, le 5-bromo 4-chloro 3-indoloyl β D galactoside (abrégé en X-gal) ou le glucose est remplacé par du 5-bromo, 4-chloro, 3-indole. La scission de l'X-gal *in vivo* ou *in vitro* produit le colorant 5-bromo 4-chloro indole, facilement détecté grâce à sa coloration bleu. En l'absence de β -galactosidase active, l'X-gal reste intact et aucune coloration n'apparaît.

Xgal:(5Bromo-4chloro-3indolyl, β -D galactopyranoside). (figure 6.18)

2% dans du N-N diméthylformamide.

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

5.2 Tampons:

Tampon DWB:

Ethanol	50%
NaCl	200mM
EDTA	10mM
Tris-HCl	50mM (pH 7.4)

Tampon STET :

Sucrose	8%
Triton	5%
TRIS (pH 8,0)	50mM
EDTA	50 mM
+ 2 mg / ml de Lysosyme frais	

Tampon TB (transformation buffer)

Pour 500 ml: HEPES	1,19gr
CaCl ₂	1,10 gr
KCl	9,32gr

-Dissoudre dans 500ml d'eau pure.

-Ajuster le pH à 6,7 avec du KOH puis ajouter:

MnCl ₂	5,44gr
-------------------	--------

-La solution est ensuite stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,45 μ m.

Tampon TE :

TRIS.Cl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Tampon de ligation 5x (BRL):

TRIS.Cl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon TBE 10X :

TRIS	108 gr
Borate	55 gr
EDTA	9,3 gr

Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Tampon P1 (Nucleobond) :

TRIS.Cl pH 8,0	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Ajouter de la solution de RNaseA à une concentration finale de 400 µg par ml.

Tampon P2 (Nucleobond) :

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon P3 (Nucleobond) :

Kac (pH 5.2)	2,8 M
---------------	-------

Ajuster à PH avec de l'acide acétique concentré.

Tampon N2 (Nucleobond) :

Tris/H3PO4	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	900 mM
pH	6.3

Tampon N3 (Nucleobond) :

Tris/H3PO4	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1 150 mM
pH	6.3

Tampon N5 (Nucleobond):

Tris/H3PO4	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1000 mM
pH	8.5

Tampon SCE:

Sorbitol	1,2M
Citrate de Na	0,1M
EDTA	0,06M

VII. BIBLIOGRAPHIE.

Amemura, J., Ichikawa, H. and Ohtsubo, E. (1990). Tn3 transposition immunity is conferred by the transposase - binding domain in the terminal inverted repeat sequence of Tn3. *Gene* 103: 11 - 16.

Berg, D.E., Davies, J., Allet, B. and Rochaix, J-D. (1975). Transposition of R factor genes to bacteriophage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3628-3632.

Berg, D.E., Johnsrud, L., McDivitt, L., Ramabhadran, R. , and Hirschel, B.J. (1982). Inverted repeats of Tn5 are transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79.

Berg, D.E. and Berg, C.E. (1983). The prokaryotic transposable element Tn5. *Bio/technology* july.

Berg, D.E., Davies, J. , Allet, B. and Rochaix J.D.(1975). Transposition of R factor to bactériophage λ . *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* vol 72, No.9, pp 3628-3632, september.

Breunig, K.D., Dahlems, U., Das, S., Hollenberg, C.P. (1984) Analysis of eukaryotic β -galactosidase gene: the N-terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *Escherichia coli* lacZ gene product. *Nucleic Acids Research* vol 12 Number 5.

Carter, M.J. and Milton I.D. (1993). An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particules. *Nucleic Acids Research*, vol 12, No. 4.

De Bolle, X. (1990). Caractérisation du gène codant pour la β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. (mémoire de licence en sciences zoologiques, FUNDP).

De Bruijn, F.J. and Lupski J.R. (1984). The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids. *Gene* , 27, 131 - 149.

Galas, D.J. and Chandler, M. (1989). Bacterial insertion sequences. In *Mobile DNA* . Berg, D.E. and Howe, M.M. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 109 - 162.

Guyer, M.S., Reed, R.R., Steitz, J.A. and Low, K.B. (1980). Identification of a sex-factor-affinity Site in *E. coli* as $\gamma\sigma$. *Cold-Spring Harbor-Symp. Quant. Biol.* , 45, 135-140.

Grootwassing, J.W.D and Fleming, S.E. (1980). Non specific β -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis* : batch and continous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. *Enz. Microb. Technol.* 2, 45 - 53.

Hallet, B., Rezsöhazy, R. and Delcour, J. (1991). IS231 A from *Bacillus thurnigensis* is functionnal in *Escherichia coli* : transposition and insertion specificity. *Journal of Bacteriology* , July, p. 4526 - 4529.

Hill, J.E., Myers A.M., Koerner T.J. and Tzagoloff A. (1986). Yeast/ *E.coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Gene* , vol.2: 163-167.

Kans, J.A. and CASADABAN, M.J. (1989). Nucleotide sequences required for Tn3 transposition immunity. *J. bacteriol.* ,171: 1904 - 1914.

Kleckner, N. (1989). Transposon Tn10. In *Mobile DNA* . Berg, D.E. and Howe, M.M. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Ladrière, J.M., Delcour, J. and Vandenhaute, J. (1992). Sequence of a gene coding for a cytoplasmic alcohol dehydrogenase from *Kluyveromyces var. marxianus* ATCC12424. *Biochemica et Biophysica Acta* , BXE90495.

Laloux, O., De Bolle, X., Genicot, R.M., Delcour, J., Vandenhoute, J. (1990). Cloning of the gene coding for the *Kluyveromyces fragilis* lactase. *Société Belge de biochimie*, 3 mars, B83.

Langridge, W.H.R., Szalay, A.A. (1987). Uptake of DNA and RNA into cells mediated by electroporation. 336 - 350. In R.Wu & L. Grossman (eds), *Methods in enzymology*, 153. Academic press.

Lewin, B. (1990). *Genes IV*. Medecine-Sciences Flammarion.

Mahillon, J. and Lereclus, D. (1988). Structural and fonctionnal analysis of Tn4430: identification of an integrase - like protein involved in the co-integrate-resolution process. *EMBO J.* vol.7 No.5 pp. 1515-1526.

Mahillon, J., Seurinck, J., Delcour, J. and Zabeau, M. (1985). *EMBO J.*, 4, 3895-3899.

McCommas, S.A. and Syvanen, M. (1988). Temporal control of transposition in Tn5. *Journal of Bacteriology*, Feb., p. 889-894.

Meyer, J., Lida, S. and Arber, W. (1980). Does the insertion element IS1 transpose preferentially into A + T rich DNA segments. *Mol. Gen. Genet*, 178: 471 - 473.

Mizuuchi, K. (1992 a). Transpositional recombination: Mechanistic insight from studies of Mu and other elements. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1011-51.

Mizuuchi, K. (1992 b). Polynucleotidyl Transfer reactions in transpositional DNA recombination. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 267, No. 30.

O'Connor, M.B. and Malamy, M.H. (1984). Role of the F factor oriV1 region in *recA*- independant illegitimate recombination. *J. Mol. Biol.* 175, 263-284.

Poch, O., L'Hôte, H., Dallery, V., Debeaux, F., Fleer, R. and Sodoyer, R. (1992). Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β - galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* ,118 , 55 - 63.

Ragnini, A. and Fukuhara, H. (1988). Mitochondrial DNA of the yeast *Kluyveromyces*: guanine - cytosine rich sequence clusters. *Nucleic Acids Research* vol 16 number 17.

Rawn, J.D. (1990). *Traité de Biochimie*. De Boeck Université.

Rezsöhazy, R. (1993). Clonage et caractérisation de cinq éléments d'insertion de *Bacillus Thurnigensis* . (1993) Thèse, UCL nov.

Roberts, D., Hoopes, McClure, W.R. and Kleckner, N. (1985). IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell* ,vol. 43, 117 - 130.

Rothstein, S. J. and Reznikoff, W. (1981). The functional differences in the inverted repeats of Tn5 caused by a single base pair nonhomology. *Cell* , vol 23, 191 - 199.

Saliola, M., Shuster, J.R. and Falcone, C. (1990) *Yeast* 6, 193-204.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (a laboratory manual), 2d ed. Cold spring harbor laboratory press.

Sidenber, D.G. and Lachance, M.A. (1986). Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der walt. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Jan, p. 94-102.

Sor, F. and Fukuhara, H. (1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces* . *Yeast* , 5, 1-10.

Stark, W.M., Boocock, M.R. and Sheratt, D.J. (1989). Site-specific recombination by Tn3 resolvase. *Trends genet.* 5: 304-309.

Stark, W.M., Boocock, M.R. and Sheratt, D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8: 432-439.

Steesma, H.Y., De Jongh, F.C.M. and Linnekamp, M. (1988). The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* 14: 311 - 317.

Tu, C.-P.D. and Cohen, S.N. (1980). Translocation specificity of the Tn3 element: characterization of sites of multiple insertions. *Cell* 19: 151-160.

Van de Putte, P. and Goosen, N. (1992). DNA inversions in phages and bacteria. *Trends Genet.* 8: 457-462.

Weinreich, M.D. and Reznikoff, W.S. (1992). Fis plays a role in Tn5 and IS50 transposition. *Journal of Bacteriology*, July, p. 4530 - 4537.