

Filière Technologies du vivant
Orientation Biotechnologie

Diplôme 2008

Mélanie Dupasquier

Développement d'outils génétiques
pour les travaux
avec *Pediococcus damnosus*

Professeur Sergio Schmid

Expert Joachim Klein

Sion, le 30 janvier 2009

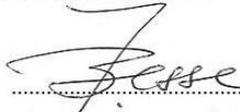
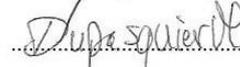
SI	TV	EE	IG	EST
X	X			

Confidentiel / Vertraulich

 oui / ja non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS bt/2008/54
Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student Mélanie Dupasquier	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Sergio Schmid	Expert / Experte (données complètes) Dr. Joachim Klein Lonza AG, 3930 Visp	

Titre / Titel Entwicklung molekulargenetischer Werkzeuge für die Arbeiten mit P.damnosus
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele <p>Das Gram-positive Milchsäurebakterium <i>Pediococcus damnosus</i> NCFB1832 produziert Pediocin PD-1, ein antimikrobielles Peptid. In unseren Arbeiten konnten wir ausgehend von der publizierten partiellen Aminosäuresequenz folgende Elemente definieren: die vollständige Pediocin PD-1 Aminosäuresequenz, die Aminosäuresequenz des Leaderpeptids und die möglichen Promotersequenzen. Diese Resultate erlaubten uns das Peptid den Typ A Lantibiotika zuzuordnen.</p> <p>Die laufenden Forschungsarbeiten haben zum Ziel, den Sekretionsmechanismus von Pediocin PD-1 für die Produktion rekombinanter Peptide und Proteine zu Nutzen machen. Dazu müssen die für die Produktion von Pediocin PD-1 notwendigen Elemente charakterisiert und die molekularbiologischen Methoden für die genetischen Arbeiten mit <i>Pediococcus damnosus</i> entwickelt und etabliert werden.</p> <p>Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollen, die in der Semesterarbeit begonnenen Arbeiten (Aufarbeitung des Pediocin PD-1 für spätere Strukturaufklärung) abgeschlossen und eine Transformationsmethode für <i>P.damnosus</i> entwickelt und etabliert werden.</p> <p>Die Ziele dieser Diplomarbeit sind :</p> <ul style="list-style-type: none">— Reinigung des Pediocins PD-1 und Bestimmung der Aktivität (abschliessende Aufgaben aus der Semesterarbeit)— Konstruktion eines <i>E.coli/P.damnosus</i> Shuttle Vektors aufbauend auf dem ori des <i>pedA</i> tragenden <i>P.damnosus</i> Plasmids— Entwicklung einer Methode für die Transformation von <i>P.damnosus</i>.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Resp. de filière Studiengangleiter  Etudiant/Student: 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 01.09.2008 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 30.01.2009 — 12.00 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 28.11.2008 Défense orale / Mündliche Verfechtung: 05 — 06.02.2009
---	---

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats

Développement d'outils génétiques pour les travaux avec *Pediococcus damnosus*

Entwicklung molekulargenetischer Werkzeuge für die Arbeiten mit *Pediococcus damnosus*

Objectif

Construire un vecteur navette *E. coli* / *P. damnosus* avec une origine de réplication provenant de *P. damnosus* DSM 20331.

Développer et établir une méthode de transformation de *P. damnosus*.

Résultats

L'origine de réplication de *Bacillus subtilis* présente dans le vecteur navette à disposition a été supprimée. Un adaptateur a par la suite été inséré avec succès dans ce vecteur navette. Le plasmide rolling circle p60 a pu être amplifié par PCR avec deux paires d'amorces. Les produits PCR ont été intégrés dans le vecteur pGEM-T easy par clonage TA et ont ensuite été extraits par digestion.

Plusieurs tentatives d'insertion du p60 dans le vecteur navette ont été réalisées sans succès. A chaque fois, les essais de transformation n'ont fourni que le pGEM-T easy reliqué.

Une transformation a été effectuée avec le vecteur pGEM-T easy contenant l'insert p60. Cette expérience a échoué, car aucune colonie ne s'est formée.

Mots-clés

Pediococcus damnosus, vecteur navette, origine de réplication, transformation

Ziel

Konstruktion eines *E. coli* / *P. damnosus* Pendelvektors mit einem Replikationsursprung aus *P. damnosus* DSM 20331.

Entwickeln und etablieren einer Transformationsmethode für *P. damnosus*.

Resultate

Der *Bacillus subtilis* Replikationsursprung, der im Pendelvektor vorhanden war, wurde entfernt. Ein Adaptor wurde in der Folge in diesen Pendelvektor erfolgreich integriert. Das rolling circle Plasmid p60 konnte mittels PCR mit zwei Paaren von Primers amplifiziert werden. Die PCR Produkte konnten in den pGEM-T easy Vektor mittels TA Klonierung integriert werden und dann durch Verdauung herausgeschnitten werden.

Mehrere Versuche das Plasmid p60 in den Pendelvektor einzufügen waren erfolglos. Die Transformationsversuche haben jedesmal nur den reliquierten pGEM-T easy geliefert.

Eine Transformation wurde mit dem pGEM-T easy Vektor, der das Insert p60 enthält, ausgeführt. Dieses Experiment ist gescheitert, weil sich keine Kolonien gebildet haben.

Schlüsselwörter

Pediococcus damnosus, Pendelvektor, Replikationsursprung, Transformation

Development of genetic tools for the work with *Pediococcus damnosus*

Aim

Build an *E. coli* / *P. damnosus* shuttle vector with an origin of replication coming from *P. damnosus* DSM 20331.

Develop and establish a *P. damnosus* transformation method.

Results

The *Bacillus subtilis* origin of replication present in the shuttle vector was eliminated. A linker was afterwards inserted successfully into this shuttle vector. The rolling circle plasmid p60 was amplified by PCR with two pairs of primers. These PCR products were integrated into the pGEM-T easy vector via TA cloning and then extracted by digestion.

Several attempts of insertion of p60 into the shuttle vector were unsuccessful. Each transformation only resulted in the religated pGEM-T easy.

A transformation was made with the pGEM-T easy vector containing the p60 insert. No colonies were formed in this experiment.

Key words

Pediococcus damnosus, shuttle vector, origin of replication, transformation

Table des matières

1. Introduction	8
1.1 Utilisation des bactéries en biologie moléculaire	8
1.2 Le genre <i>Pediococcus</i>	10
1.3 Bactériocines	11
1.4 <i>Pediococcus damnosus</i> DSM 20331 et pédiocine PD-1	17
1.5 Transformation de bactéries Gram positives	18
1.6 Vecteur navette (shuttle vector)	19
1.7 Construction d'un vecteur navette avec une origine de réplication de <i>P. damnosus</i> dans <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	20
1.8 Origine de réplication thêta	22
1.9 Origine de réplication du plasmide rolling circle p60	23
1.10 Clonage dans le vecteur pGEM-T easy	24
1.11 Développement d'une méthode de transformation de <i>Pediococcus damnosus</i>	25
1.12 Objectifs	25
2. Matériel et méthode	26
2.1 Matériel	26
2.2 Méthode	32
2.2.1 PCR rolling circle plasmide p60	32
2.2.2 Purification des produits PCR	33
2.2.3 Restrictions	33
2.2.4 Isolation des produits de restriction	36
2.2.5 Création de l'adaptateur (MCS pour pHEV101)	36
2.2.6 Ligations	37
2.2.7 Transformation des <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF par électroporation	40
2.2.8 Transformation des <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF par la méthode CaCl ₂	42
2.2.9 Transformation de <i>P. damnosus</i> par électroporation	43
2.2.10 Isolation des colonies	44
2.2.11 Extraction des plasmides	44

3. Résultats	47
3.1 Construction d'un vecteur navette avec une origine de répllication de <i>P. damnosus</i> dans <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	47
3.1.1 Restriction du pHEV101	47
3.1.2 Ligation du fragment 4073 pb et 1ère transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	51
3.1.3 Extraction de l'ADN plasmidique de 10 colonies de la 1 ^{ère} transformation....	52
3.1.4 Ligation du vecteur 4073 pb avec l'adaptateur et 2 ^e transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF.....	53
3.1.5 Extraction de l'ADN plasmidique de 9 colonies de la 2 ^e transformation.....	54
3.1.6 PCR du plasmide rolling circle p60 avec deux paires d'amorces différentes	58
3.1.7 Ligation des produits PCR avec le vecteur pGEM-T easy et 3 ^e transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF.....	60
3.1.8 Extraction de l'ADN plasmidique de 10 colonies de la 3 ^e transformation.....	61
3.1.9 Ligation du pHEV104 avec le plasmide rolling circle p60 et 4 ^e transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	64
3.1.10 Extraction de l'ADN plasmidique de 20 colonies de la 4 ^e transformation...	65
3.2 Transformation par électroporation de trois souches de <i>Pediococcus damnosus</i>	69
4. Discussion	72
4.1 Restriction du pHEV101.....	72
4.2 Ligation du fragment 4073 pb et 1ère transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	72
4.3 Ligation du vecteur 4073 pb avec l'adaptateur et 2 ^e transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	73
4.4 PCR du plasmide rolling circle p60 avec deux paires d'amorces différentes.....	74
4.5 Ligation des produits PCR avec le vecteur pGEM-T easy et 3 ^e transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	75
4.6 Ligation du pHEV104 avec le plasmide rolling circle p60 et 4 ^e transformation des cellules <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	76
4.7 Transformation par électroporation de trois souches de <i>Pediococcus damnosus</i>	77
5. Conclusion et perspectives	79
7. Remerciements	79
8. Bibliographie	80

9. Annexes	83
9.1 Séquence du vecteur pHEV101	83
9.2 Séquence terminatrice de transcription : <i>trpA</i>	85
9.3 Zone du promoteur du gène <i>bla</i>	85
9.4 Stratégie de clonage	86
9.5 Séquence du vecteur pHEV104	87
9.6 Séquence du rolling circle plasmide p60	89
9.7 Paires de primers choisies pour PCR sur le plasmide p60.....	90
9.8 Séquence du vecteur pGEM-T easy / p60 A	91
9.9 Séquence du vecteur pGEM-T easy / p60 B	93

1. Introduction

1.1 Utilisation des bactéries en biologie moléculaire

Depuis le début de l'utilisation des bactéries en génétique moléculaire, *Escherichia coli* (*E. coli*) a toujours été un système modèle apprécié. Les premières expériences de clonage ont donc été réalisées dans *E. coli*. Par la suite, d'autres bactéries ont été utilisées (entre autre Gram positifs), des levures, des champignons et finalement des cellules animales. Il s'avère que le clonage dans *E. coli* est beaucoup plus aisé qu'avec n'importe quel autre organisme. En conséquence, même s'il est souhaité de travailler avec un autre procaryote, les essais avec l'ADN sont d'abord effectués dans *E. coli* avant qu'il soit placé dans l'hôte désiré. Les bactéries sont devenues un matériel de choix avec le développement de la biologie moléculaire, car elles possèdent une division cellulaire extrêmement rapide. Un autre point crucial est qu'une grande quantité de bactéries peuvent tenir dans un très faible volume. [1]

L'utilisation de bactéries pour réaliser des produits recombinants grâce à la biologie moléculaire est connue depuis plusieurs années. Les bactéries Gram négatives sont particulièrement sollicitées. Comme expliqué ci-dessus, *E. coli* est la bactérie la plus utilisée en biologie moléculaire. Son fonctionnement est bien maîtrisé et l'expression plus ou moins forte des protéines est à présent gérée efficacement. Il existe néanmoins un aspect structurel qui complique la récupération des protéines produites : il s'agit de leur localisation dans le périplasme de la cellule. En effet, la plupart des protéines produites par *E. coli* (et les Gram négatifs en général) s'y trouvent et ne peuvent pas traverser la membrane externe. Pour avoir accès aux protéines, il est donc nécessaire de lyser les cellules. Cette étape comporte toujours le risque de détruire ou diminuer la concentration des protéines désirées. Cela crée aussi une étape de purification supplémentaire entraînant des coûts répercutés sur le prix final.

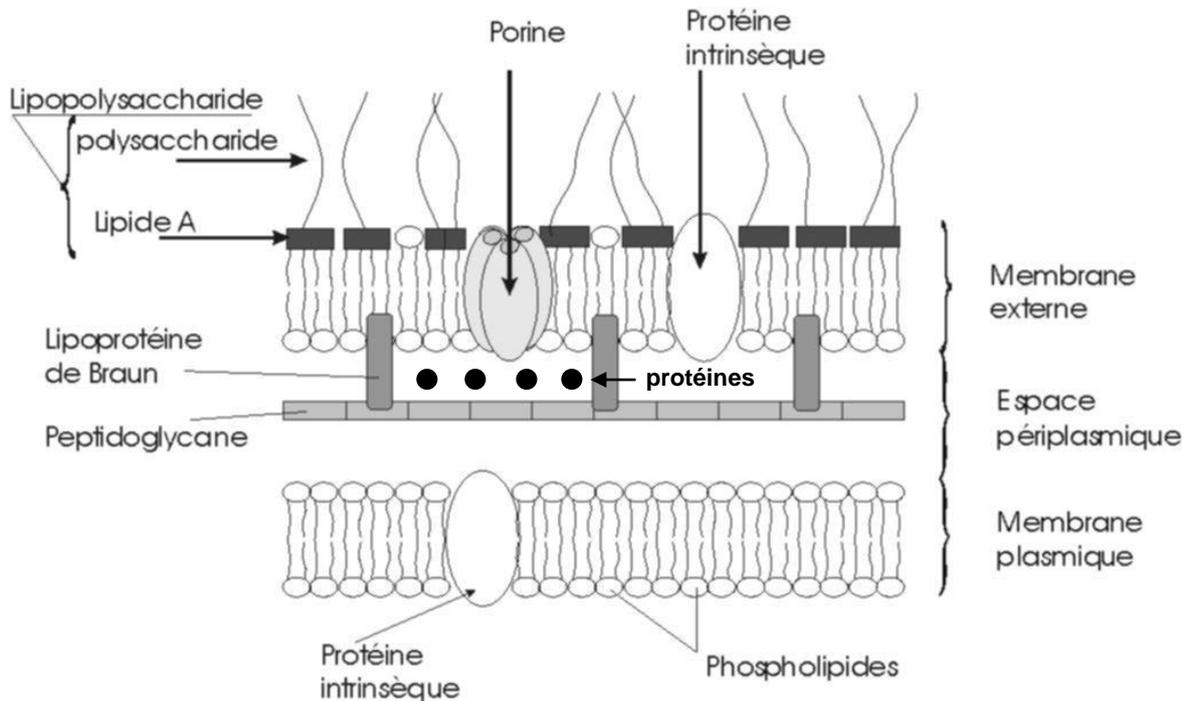


Figure 1 : schéma de l'enveloppe cellulaire d'une bactérie Gram négative [2]

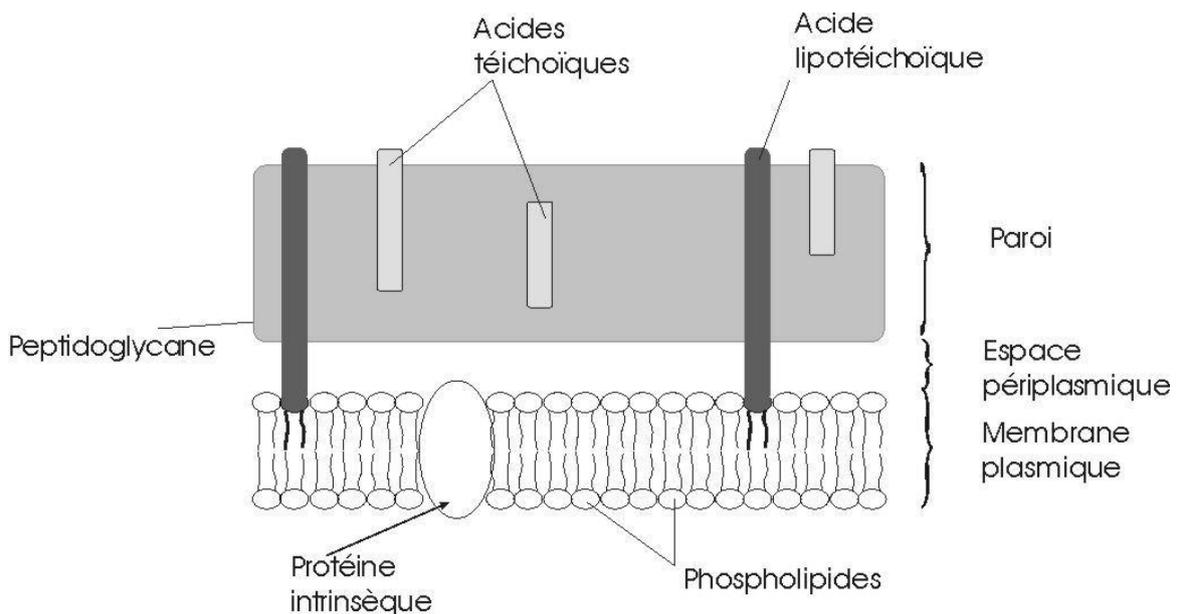


Figure 2 : schéma de l'enveloppe cellulaire d'une bactérie Gram positive [2]

Des protéines secrétées dans le milieu de culture sont donc d'un grand intérêt. Elles permettent de supprimer l'étape de la lyse cellulaire ainsi que de la séparation des débris. Il existe une alternative à l'utilisation des Gram négatifs : certains Gram positifs comme les bactéries lactiques (LAB : lactic acid bacteria). En effet, elles

possèdent un mécanisme qui permet de sécréter certaines protéines hors de la cellule. En reprenant ce mécanisme de sécrétion et en y ajoutant le(s) gène(s) de la protéine à produire, cela donnerait le moyen de récupérer la protéine recombinante directement dans le milieu de culture. Pour arriver à ce résultat, il est bien sûr nécessaire de connaître en outre les gènes responsables de la sécrétion, de pouvoir les insérer dans un vecteur permettant également l'ajout des gènes des protéines à produire... Beaucoup de facteurs entrent bien sûr en ligne de compte si l'on souhaite réaliser un système fonctionnel.

1.2 Le genre *Pediococcus*

Pediococcus fait partie des Gram positifs et plus particulièrement des bactéries lactiques. Celles-ci sont capables de transformer les hydrates de carbone en acide lactique. Elles se trouvent principalement dans la nourriture (produits laitiers, viande fermenté, bières, légumes fermentés), mais aussi dans les plantes ou dans les zones respiratoires et intestinales de l'homme et des animaux. Deux types de métabolisme existent chez les bactéries lactiques. Le métabolisme homofermentaire qui ne produit que de l'acide lactique après l'utilisation des hydrates de carbone. En plus de l'acide lactique, Le métabolisme hétérofermentaire crée d'autres produits finaux comme l'éthanol, le CO₂, l'acétate. *Pediococcus* est classé comme bactérie homofermentaire. [3] Le genre comprend sept espèces : *P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. damnosus*, *P. clausenii*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* et *P. pentosaceus* [4]. Les pédiocoques sont importants en technologie alimentaire que ça soit de manière positive ou négative. Certaines espèces peuvent causer la détérioration des aliments et d'autres, être utilisées pour fabriquer des produits. *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* sont par exemple employés pour la fermentation de légumes, viandes et pour la production de fromage [5]. *Pediococcus* a une façon spécifique de se multiplier. Il se divise alternativement dans deux directions perpendiculaires pour former des tétrades (groupe de quatre cellules résultant de la méiose). Les pédiocoques sont anaérobies aéro-tolérants. Il semblerait que la croissance de certaines souches soit améliorée par une incubation en anaérobiose, principalement lors de l'isolation primaire. Les espèces de pédiocoques diffèrent dans leur tolérance au sel. En général, leur sensibilité varie en fonction de la composition du milieu de croissance et des conditions d'incubation. Certaines espèces comme *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* supportent la présence d'éthanol, ce qui est logique étant donné leur capacité à croître dans les boissons alcooliques. [3]

1.3 Bactériocines

Les bactéries lactiques produisent des bactériocines. Elles sont synthétisées par les ribosomes et peuvent subir des étapes de maturation au cours de leur sécrétion vers le milieu de culture. Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques, mais possèdent des propriétés antibiotiques. Elles agissent comme des antibactériens. Ces peptides ont un spectre d'activité plus ou moins large. Ils ont un effet inhibiteur sur la croissance de souches de bactéries génétiquement proches. [6]

Une classification a été réalisée en se basant sur la taille des bactériocines ainsi que leurs propriétés biochimiques et génétiques. Trois classes ont été définies [7] :

- Classe I : les lantibiotiques : contiennent les acides aminés lanthionine et β -lanthionine
 - Type A : molécules allongées, cationiques, masse moléculaire < 4 kDa
 - ✦ Type A I : le leader peptide est hydrophile, possède une grande proportion d'acides aminés chargés avec une région très conservé « FLNDL » et a une nette charge négative ou légèrement positive (ex : nisine A)
 - ✦ Type A II : le leader peptide est chargé négativement et contient le motif appelé « double glycine » GG/GA/GS [8] (ex : lacticine 481)
 - Type B : molécules globulaires, masse moléculaire 1.8 à 2.1 kDa (ex : mersacidine)
- Classe II : bactériocines non modifiées, thermostables avec une masse moléculaire < 10 kDa
 - Sous-classe IIa : bactériocines anti-listeria « pediocin-like » (ex : pédiocine PA-1)
 - Sous-classe IIb : bactériocines à deux-peptides (ex : plantaricine EF)
 - Sous-classe IIc : autres bactériocines (ex : lactococcine 972)
- Classe III : bactériocines avec masse moléculaire > 30 kDa (ex : helveticine J)

Les gènes codant pour la fabrication de la bactériocine sont en général organisés en groupe d'opérons. Les opérons peuvent être situés sur le chromosome de la bactérie, sur les plasmides ou encore sur les transposons.

Pour la synthèse des lantibiotiques, les opérons contiennent en général des gènes codant pour le prépeptide (abrégé LanA), pour les enzymes servant aux modifications ultérieures (LanB,C/Lan M), pour les protéases servant à couper le leader peptide (LanP), pour les protéines de transport nécessaire à la translocation

du peptide (LanT), pour les protéines de régulation (LanR,K) et pour les protéines impliquées dans l'immunité de la souche productrice (LanI, FEG).

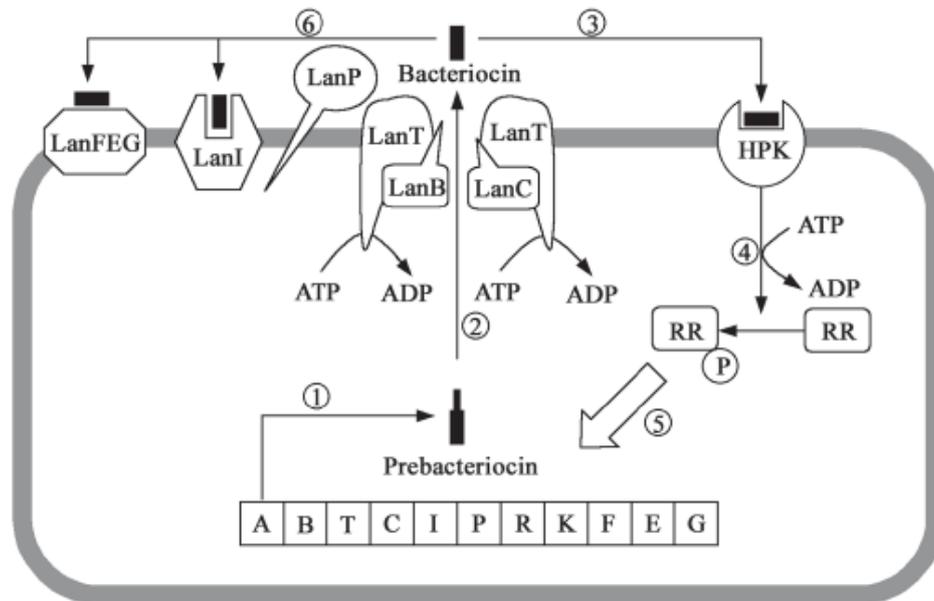


Figure 3 : schéma de la synthèse des lantibiotiques [9]

(1) formation de la prébactériocine ; (2) la prébactériocine est modifiée par LanB et LanC, transférée à travers un transporteur-ABC LanT et traitée par LanP, conduisant à la libération de la bactériocine mature ; (3) l'histidine protéine kinase (HPK) est sensible à la présence de la bactériocine et s'autophosphoryle ; (4) le groupe phosphate (P) est transféré au régulateur (RR) ; (5) RR active la transcription des gènes de régulation et (6) l'immunité de la souche productrice par les protéines d'immunité (LanI) et par les protéines dédiées au transport-ABC (LanFEG)

En ce qui concerne les bactériocines de classe II, les gènes codant des différentes souches productrices montrent certaines similitudes dans leur organisation. Il existe un gène responsable de la synthèse du peptide précurseur, suivi par un gène d'immunité, puis par un gène du transporteur-ABC ainsi qu'un gène codant pour une protéine « accessoire ». D'après les études réalisées, les protéines « accessoires » sont essentielles pour la sécrétion des bactériocines de classe II.

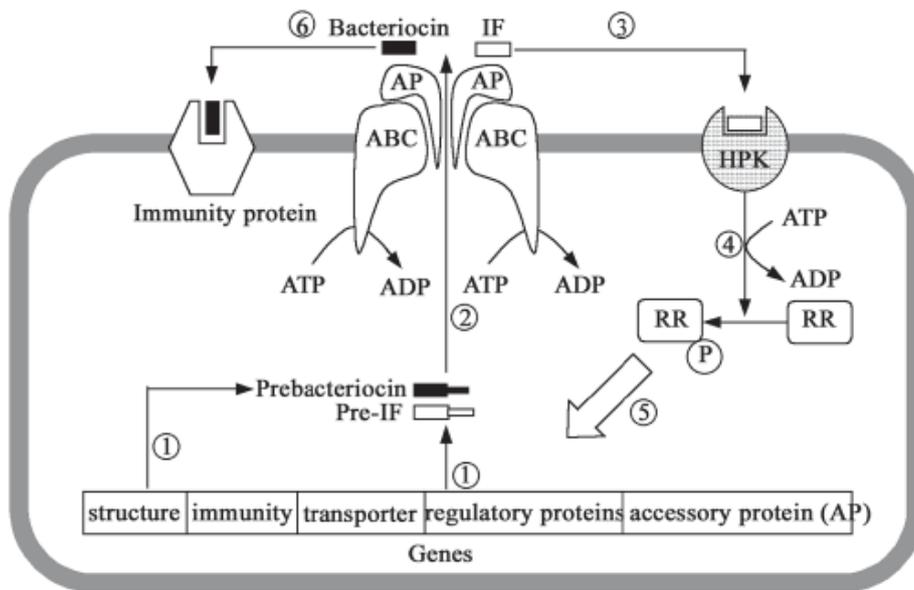


Figure 4 : schéma de la synthèse des bactériocines de classe II [9]

(1) formation de la prébactériocine et du prépeptide pour le facteur d'induction (IF) ; (2) la prébactériocine et le pré-IF sont traités et transférés par le transporteur-ABC, conduisant à la libération de la bactériocine mature et de l'IF ; (3) l'histidine protéine kinase (HPK) est sensible à la présence de l'IF et s'autophosphoryle ; (4) le groupe phosphate (P) est transféré au régulateur (RR) ; (5) RR active la transcription des gènes de régulation et (6) l'immunité de la souche productrice

L'activité des bactériocines sur les autres souches varie beaucoup de l'une à l'autre. Il semble que certains antibiotiques et bactériocines de types II possèdent un large rayon d'action sur de nombreuses bactéries Gram positives tandis que d'autres n'ont d'effet que sur quelques souches précises. Il faut également relever qu'une souche productrice d'une bactériocine peut tout à fait être sensible à d'autres bactériocines. En règle générale, les Gram négatifs ne sont pas sensibles aux bactériocines des Gram positifs. Il a cependant été observé que des bactériocines (nisine, pédiocine ACh) avaient un effet sur la croissance de certains Gram négatifs.

Les bactériocines ont différents mécanismes d'action mais le principe général reste toutefois le même. Elles forment des pores dans la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles en induisant des changements dans la perméabilité membranaire. Le potentiel de la membrane, les flux d'ions ainsi que le transport d'acides aminés s'en trouvent affectés. La taille des bactériocines de classe I et II étant petite, une action coopérative de plusieurs molécules de bactériocines peut être nécessaire pour aboutir à la formation de pores. Divers modèles ont dû être créés afin de décrire au mieux les fonctionnements de chaque classe de bactériocines. [10]

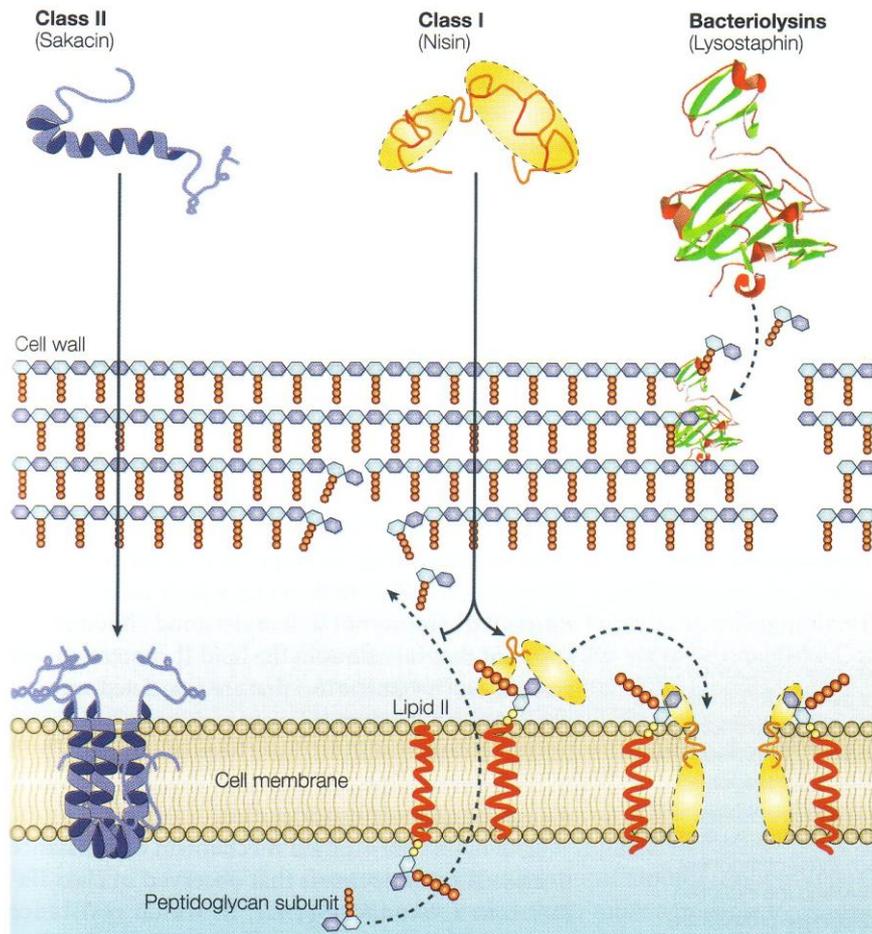


Figure 5 : mode d'action de bactériocines provenant de bactéries lactiques [11]

Certaines bactériocines de la classe I, comme la nisine, possèdent deux modes d'action. Elles peuvent se lier au lipid II, le transporteur principal des sous-unités de peptidoglycane du cytoplasme à la paroi cellulaire, et empêcher la synthèse correcte de la paroi ; ceci menant à la mort de la cellule. En outre, elles peuvent utiliser le lipid II comme une molécule d'attache afin d'initier un procédé d'insertion dans la membrane et de formation de pores conduisant à la mort de la cellule. En général, les bactériocines de classe II ont une structure amphiphile hélicoïdale qui leur permettent de s'insérer dans la membrane, ce qui mène à sa dépolariation puis à la mort de la cellule. Les bactériolysines (bactériocines classe III) peuvent agir directement sur la destruction de la paroi cellulaire des Gram positifs conduisant à la lyse et mort de la cellule cible.

La souche productrice de bactériocine est protégée contre celle-ci. Elle ne subit donc pas le mécanisme d'action de la bactériocine. Pour les antibiotiques, deux systèmes de protection coexistent. Le premier provient du gène LanI qui code pour les protéines d'immunité. Celles-ci se situent principalement à l'extérieur de la membrane cytoplasmique ce qui permettrait de protéger la cellule de la formation de pores par la bactériocine. Le deuxième système correspond aux protéines dédiées au transport (LanFEG). Les bactériocines présentes au niveau de la membrane cytoplasmique sont transférées dans le milieu extérieur. Cela permet de garder une concentration de bactériocines dans la membrane en-dessous d'un niveau critique.

Pour les bactériocines de classe II, le gène d'immunité code pour une protéine spécifique. Cette protéine est cationique et fournit une immunité totale contre la bactériocine grâce à ses interactions avec la membrane. [8]

L'organisation génétique des opérons des différentes bactériocines peut être relativement similaire si elles font partie de la même classe. Cependant, pour de nombreux antimicrobiens, tous les gènes participant à la synthèse n'ont pas été découverts. Il est par conséquent difficile d'établir un schéma typique de l'opéron pour un groupe de bactériocine.

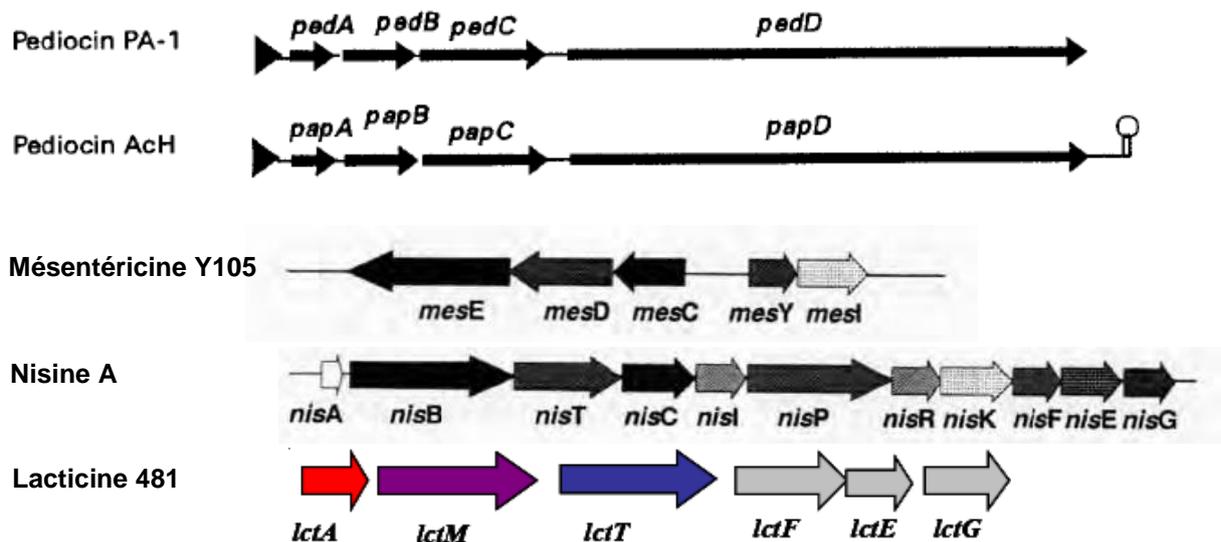


Figure 6 : organisation des gènes de différentes bactériocines [6], [10], [8]

Pediocin PA-1, Pediocin AchH, Méésentéricine Y105 : bactériocines de classe IIa

Nisine A : lantibiotique type A I

Lacticine 481 : lantibiotique type A II

Pour le cas de la pédiocine PA-1 et AchH, les gènes de l'opéron sont très proches. D'après les découvertes au niveau des gènes *pedA* et *papA* responsable de la formation de la pédiocine, la séquence de nucléotides est semblable. Cependant, il faut être prudent quand au fait de dire que toutes les pédiocines auraient la même séquence. De nombreuses différences peuvent intervenir entre les souches. C'est d'ailleurs ce qui peut être constaté par exemple avec la pédiocine PD-1. Elle ne fait pas partie de la classe II des bactériocines comme les autres pédiocines. Elle se trouve dans la classe I, Type A II. Le schéma pour la lacticine 481 semble être très proche de celui de la pédiocine PD-1 quand à la disposition et la présence des gènes.

Le grand intérêt des bactériocines se situe au niveau de la préservation des aliments. En effet, celles-ci peuvent être utilisées comme additifs. L'intérêt principal réside dans le fait que l'ajout de bactériocines pourrait remplacer en partie les additifs alimentaires chimiques toujours plus nombreux. Différentes approches ont été étudiées :

- Inoculation de la nourriture avec des bactéries lactiques produisant la bactériocine directement dans le produit
- Addition de bactériocines purifiées en tant que conservateurs pour la nourriture
- Utilisation d'un produit précédemment mis en culture avec une souche productrice de bactériocine en tant qu'ingrédient pour l'industrie alimentaire

La bactérie *Listeria monocytogenes* est un grand problème pour de nombreuses denrées alimentaires sensibles telles que la viande ou les produits laitiers. Il a été démontré que l'utilisation de bactériocines sur de la viande, fromage ou fruits de mer contenant des *L. monocytogenes* empêchait ou réduisait significativement leur croissance. Il a aussi été démontré que l'utilisation de bactériocines permettait de réduire le temps des traitements thermiques des produits alimentaires. Combiner les bactériocines et des méthodes d'inactivation des microorganismes a également été une alternative testée avec succès. L'emploi des bactériocines sert à améliorer l'efficacité des traitements. Il existe un intérêt de la part de l'industrie alimentaire pour utiliser des technologies non thermiques (haute pression, champ électrique pulsé) dans la conservation de la nourriture. Il a pu être observé que le recours aux bactériocines en combinaison avec ces techniques augmentait l'inactivation bactérienne. De plus, les bactériocines de bactéries lactiques n'ont généralement pas d'effet sur les Gram négatifs, sauf si leur paroi extérieure est abîmée ou détruite. Il a été constaté qu'après des techniques non thermiques, des Gram négatifs, tel qu'*E. coli* O157:H7, devenaient sensibles aux bactériocines. [8]

A cause de la complexité de la matrice alimentaire et la difficulté de quantifier l'activité des bactériocines dans la nourriture, des études *in vitro* ont été effectuées afin de tester la fonctionnalité de cultures starter de souches productrices. La documentation sur la capacité de telles cultures à produire des bactériocines dans l'aliment est disponible principalement pour les sauces et légumes fermentées ou les produits laitiers. Cependant, les résultats obtenus sont encourageants et montrent le rôle que les souches productrices de bactériocines peuvent jouer en augmentant la qualité et la sécurité alimentaire. [12]

L'incorporation de bactériocines directement dans l'emballage de l'aliment est également une zone de recherche. Le film contenant les antimicrobiens doit être en contact avec le produit afin qu'ils se diffusent graduellement sur sa surface. Ce type d'emballage a été en majorité testé sur de la viande.

Bien que les connaissances sur les bactériocines soient plus étendues que par le passé, il reste de nombreux aspects à comprendre comme la relation entre la structure et la fonction de la bactériocine, le mécanisme moléculaire ou encore le mécanisme d'action précis. Bien que beaucoup de bactériocines aient été découvertes, seules quelques-unes ont démontré un potentiel commercial pour leur application en industrie alimentaire. La nisine est la seule bactériocine purifiée à être autorisée pour l'utilisation alimentaire. Etant donné que les bactériocines n'ont pas forcément un spectre d'action très large et qu'elles ne sont pas actives contre les Gram négatifs, elles vont sans doute être utilisées en combinaison avec d'autres techniques de conservation des aliments. [8]

Le fait d'avoir des bactériocines à disposition est avantageux au niveau agroalimentaire, mais un autre aspect peut également être mis en avant. Comme expliqué ci-dessus, les bactériocines sont secrétées dans le milieu de culture grâce à des gènes spécifiques. En sélectionnant ces gènes et en les insérant dans un vecteur capable de se répliquer dans une bactérie lactique, il peut être possible de fabriquer des protéines recombinantes. En effet, les protéines fabriquées jusqu'à présent par des Gram négatifs pourraient être produites et secrétées par des Gram positifs. Il faudrait ajouter les gènes responsables pour la protéine recombinante sur le même vecteur contenant déjà ceux du transport et de la sécrétion.

1.4 *Pediococcus damnosus* DSM 20331 et pédiocine PD-1

La souche utilisée dans ce travail et sur laquelle l'attention est portée est *Pediococcus damnosus* DSM 20331. L'espèce *damnosus* est associée avec les produits de brasserie. Elle peut être isolée de la bière, du vin ou encore du cidre. L'adjectif latin *damnosus* signifie « destructeur ». En effet, *P. damnosus* est un organisme destructeur majeur dans la fabrication de bière, car sa croissance mène à la formation de diacétyl/acétoïne qui donnent un goût de beurre non désirable. Les cellules de *P. damnosus* peuvent se trouver seules, en paires, en tétrades ou en groupes irréguliers. La croissance est en général assez lente, même dans un milieu riche et le pH maximum est typiquement 6.5-7.0. L'optimum de pH pour la croissance est dans une gamme de 4.0-6.0. D'après les expériences réalisées avec cette espèce, la température d'incubation peut varier de 8-30 °C. Aucune croissance n'a lieu à 35 °C et au-dessus. Certaines souches grandissent en présence de 4 % de sel, quelques-unes même avec 5 %, mais la croissance s'en trouve ralentie. Par contre, aucune croissance n'est observée avec 5.5 % de sel. Comme expliqué au point 1.2, *P. damnosus* supporte la présence d'éthanol étant donné que cette espèce pousse principalement dans les boissons alcooliques. Par rapport à des espèces sensibles, *P. damnosus* est jusqu'à vingt fois plus résistant à l'action antibactérienne des acides du houblon et est donc mieux équipé pour croître dans de la bière. [3]

P. damnosus DSM 20331 produit une bactériocine appelée pédiocine PD-1 qui fait partie de la classe des lantibiotiques, plus précisément de la classe I, Type A II. Ce peptide est un lantibiotique, car il a besoin de modifications post-translotionnelles pour être actif. Il se trouve dans le Type A II, car la séquence du leader peptide est chargée négativement et contient le motif appelé « double glycine » typique de ce groupe. De plus, le motif « FLNDL » présent dans les lantibiotiques de type AI est absent, ce qui précise sa classification. Il faut tout de même préciser que la pédiocine PD-1 partage certains aspects du Type B des lantibiotiques, dont le principal est une structure globulaire.

La pédiocine PD-1 a initialement été isolé de la bière. Ce peptide est différent par rapport aux bactériocines « pediocin-like », car il n'est pas actif contre les autres souches de *Pediococcus* et qu'il a un profil de sensibilité unique face aux enzymes

protéolytiques. Il semblerait également que la pédiocine PD-1 ne soit pas très active face à la *Listeria monocytogenes*. Cette bactériocine a été étudiée sous divers aspects. Il en est ressorti qu'elle était de nature hydrophobique et résistante à la chaleur (10 min à 121 °C). Elle reste aussi active après une incubation à des pH entre 2.0 et 10.0 [13] et n'est pas affectée ni par la présence d'éthanol (15 % v/v), ni par celle de SO₂ (100 ppm) [14]. Le spectre d'activité de la pédiocine PD-1 a été testé sur de nombreuses bactéries. Il a pu être déterminé que ce peptide est actif contre des *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Propionobacterium* et les différentes souches d'*Oenococcus oeni* [15]. Il a été constaté que la pédiocine PD-1 était majoritairement produite durant la phase exponentielle de croissance de la bactérie. Des essais de différents milieux ont démontré que la production de pédiocine PD-1 était entre autre stimulée par la présence de facteurs de croissance tels que le peptone, le Tween 80 ou le MnSO₄. L'autre aspect permettant une augmentation de la pédiocine PD-1 est du à l'abaissement du pH durant la croissance (avoir un grand ΔpH) et par la quantité d'acides organiques produits [16]. Les études menées sur le mode d'action de la pédiocine PD-1 suggèrent que le peptide agit sur la membrane cytoplasmique. L'activité antimicrobienne serait du non seulement à la formation de pores, mais également à l'inhibition de la synthèse de la paroi de la cellule. Il est à noter que l'activité et l'efficacité de la pédiocine PD-1 diffèrent d'après les conditions d'utilisation (pH du milieu, présence de certains cations, température de croissance de la bactérie à inhiber). [17]

1.5 Transformation de bactéries Gram positives

Du à leur large utilisation dans divers processus industriels, de nombreux efforts ont été dirigés vers le développement de techniques moléculaires afin de pouvoir manipuler et analyser les bactéries Gram positives. Il était par conséquent indispensable de développer des vecteurs de clonage et des systèmes de transformation appropriés. Les premiers essais ont été effectués avec la méthode des protoplastes. Les protoplastes sont des bactéries Gram positives seulement enveloppées par de la membrane cytoplasmique. Leur paroi de peptidoglycane a en effet été hydrolysée par traitement avec du lysozyme. Les cellules traitées sont mélangées avec l'ADN à intégrer ainsi qu'avec du polyéthylène glycol. Un choc thermique est ensuite appliqué suivi par une incubation dans du milieu liquide [18]. L'avantage de cette méthode par rapport à l'utilisation de cellules compétentes est que de l'ADN linéaire peut être utilisé pour effectuer les transformations. Cependant, l'efficacité est plus faible avec les molécules qui ont été coupées et religaturées. La taille a également une grande influence et l'efficacité de transformation chute rapidement lorsque celle-ci augmente [1].

Bien que des transformations aient réussies avec cette technique, beaucoup de protocoles sont restreints à certaines souches de bactéries et leur transformation par de l'ADN chromosomique ne fonctionne pas [1], [19]. Il était donc d'un intérêt général

et pratique de construire des plasmides de clonage plus sophistiqués et d'améliorer les méthodes d'échanges génétiques. L'électroporation a montré son efficacité pour transférer de l'ADN dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Comparé à d'autres méthodes de transfert d'ADN, l'électroporation demande moins de temps, est en général moins compliquée, souvent moins cher et est parfois la seule méthode pouvant fournir des transformants contenant le plasmide intégré [19].

1.6 Vecteur navette (shuttle vector)

Un vecteur navette est un vecteur construit de manière à ce qu'il puisse se répliquer dans deux organismes différents. L'ADN qui y est inséré peut donc être testé et manipulé dans deux sortes de bactéries ou alors même dans deux types de cellule différents. En général, un des hôtes d'un vecteur navette est *E. coli*. Etant donné que le système de cette bactérie est très bien connu, il est aisé de réaliser de nombreuses expériences. L'insertion d'ADN ainsi que la transformation sont par exemple couramment réalisées dans *E. coli*. Une fois que le but recherché est atteint en travaillant avec cette bactérie, il est possible d'utiliser le vecteur navette dans des systèmes plus compliqués, moins connus.

Pour que le vecteur navette puisse se répliquer dans deux hôtes, il doit posséder certains éléments génétiques essentiels. Tout d'abord, pour se répliquer, tout vecteur a une origine de réplication spécifique à l'organisme dans lequel il se trouve. Le vecteur navette a besoin de deux origines de réplication : une provenant du premier hôte et une du deuxième hôte. Puisque des transformations sont effectuées avec les vecteurs navettes, il faut un système de sélection des clones approprié. Les résistances aux antibiotiques jouent ce rôle. Pour le vecteur navette, il existe deux possibilités ; soit il doit contenir deux résistances d'antibiotique (une fonctionnant pour chaque hôte), soit il peut en avoir qu'une si la résistance à l'antibiotique choisie fonctionne pour les deux hôtes. Pour ce faire, les deux organismes doivent être sensibles au même antibiotique avant d'intégrer le vecteur navette. Celui-ci doit aussi permettre une insertion facilitée de l'ADN. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir un ou même plusieurs sites multiples de clonage à disposition. Ces sites existent sur des vecteurs préparés par des entreprises, mais il est aussi possible d'en créer et intégrer soi-même dans le vecteur navette.

Pour construire un vecteur navette, différentes approches sont envisageables. Il est possible de prendre un petit plasmide connu pour se répliquer dans *E. coli*, possédant déjà une résistance à un antibiotique. Il faut y insérer ensuite une origine de réplication et une résistance provenant du deuxième hôte. La construction est encore facilitée si le petit plasmide possède déjà deux résistances d'antibiotique qui conviennent pour les deux hôtes. En effet, il ne reste plus qu'à intégrer l'origine de réplication. Une autre stratégie est de prendre en entier un plasmide du deuxième organisme. Celui-ci contient déjà l'origine de réplication et peut-être aussi une résistance à un antibiotique. L'origine de réplication d'*E. coli* doit être intégrée à ce plasmide ainsi qu'une deuxième résistance à un antibiotique. Le principal problème

peut provenir de la taille du plasmide du deuxième hôte. Si celle-ci est élevée, les diverses manipulations et transformations risquent d'être moins efficaces qu'avec un plus petit vecteur.

1.7 Construction d'un vecteur navette avec une origine de réplication de *P. damnosus* dans *E. coli* XL1-Blue MRF

Lors de sa thèse de master, Mirella Lo Scrudato a construit un nouveau vecteur à partir du vecteur navette pHT43. Au départ, celui-ci contenait l'origine de réplication pour *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* ainsi qu'une résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol. Elle y a enlevé le promoteur P_{grac} ainsi que le gène *lacI* et a inséré le gène *gfp* [20]. Cela donne au final un shuttle vecteur de 7154 pb nommé pHEV101.

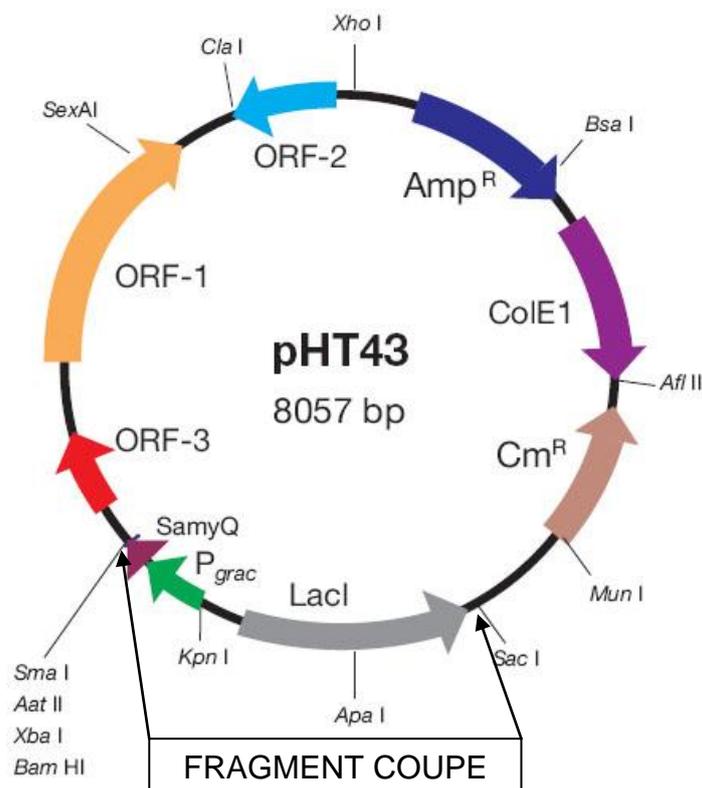


Figure 7 : carte du vecteur navette pHT43

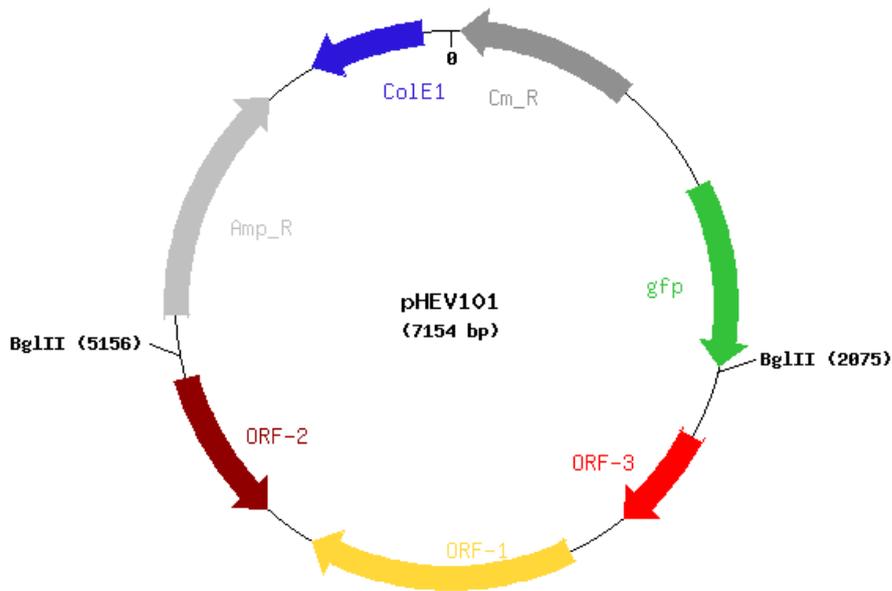


Figure 8 : carte du vecteur navette pHEV101 avec sites de restriction *Bg*III [21]

Amp_R : résistance à l'ampicilline – gris clair ; Cm_R : résistance au chloramphénicol – gris foncé ; gfp : green fluorescent protein – vert ; ColE1 : protéine Colicine E1 - bleu ; ORF-1, -2, -3 : origine de répliation de *Bacillus subtilis*

Ce vecteur a été utilisé au début du travail dans le but d'y insérer l'origine de répliation d'un plasmide de *P. damnosus* DSM 20331 à la place de l'origine de répliation de *Bacillus subtilis* (ORF-3, ORF-1, ORF-2).

L'enzyme *Bg*III permet de couper le pHEV101 en deux fragments, dont l'un deux contient l'origine de répliation que l'on souhaite éliminer. Un fragment de 4073 pb est donc récupéré pour effectuer la suite du clonage. Avant d'insérer la nouvelle origine de répliation, un adaptateur de 32 oligonucléotides a été créé artificiellement (Annexe 9.4). Les oligonucléotides ont été choisis de sorte à avoir différents sites de restriction à disposition, similaire à un petit multiple cloning site (MCS). Il est en effet intéressant d'avoir plusieurs sites de restriction entourant l'origine de répliation. Cela facilite l'insertion d'autres gènes pour des applications ultérieures. *Sal*I a été positionné en premier et est suivi par trois autres sites de restriction : *Not*I, *Eco*RV et *Hpa*I. *Not*I et *Sal*I forment des bouts collants tandis que *Eco*RV et *Hpa*I engendrent des bouts francs. Une fois l'adaptateur inséré et après vérification de la présence du vecteur modifié, l'origine de répliation de *P. damnosus* devait être ajoutée au nouveau vecteur navette.

1.9 Origine de réplication du plasmide rolling circle p60

Un plasmide de *Pediococcus damnosus* se répliquant en rolling circle a été choisi, afin d'avoir une origine de réplication fonctionnelle. Ce plasmide nommé p60 a été complètement séquencé lors du travail de Stéphane Dumas [23]. Il contient un gène *rep* pour la réplication et un gène *mob* n'ayant pas de fonction précisément définie. Un site *dso* (origine du double brin) et un site *sso* (origine du simple brin) sont aussi présents dans les plasmides rolling circle. Ils sont nécessaires lors de la réplication des plasmides rolling circle. Le site *dso* a été identifié, mais l'emplacement du *sso* n'a pas été défini avec certitude.

En l'absence de cette information, il était impossible de supprimer une partie de la séquence sous peine d'avoir un plasmide non fonctionnel, ne pouvant pas se répliquer correctement. Il était donc nécessaire d'amplifier sa séquence en entier (3298 pb).

Pour ne pas interférer dans le cadre de lecture des deux gènes présents sur le plasmide p60, une paire d'amorces a été placée après le gène *mob* et une autre paire entre le gène *rep* et le gène *mob* (Annexe 9.7).

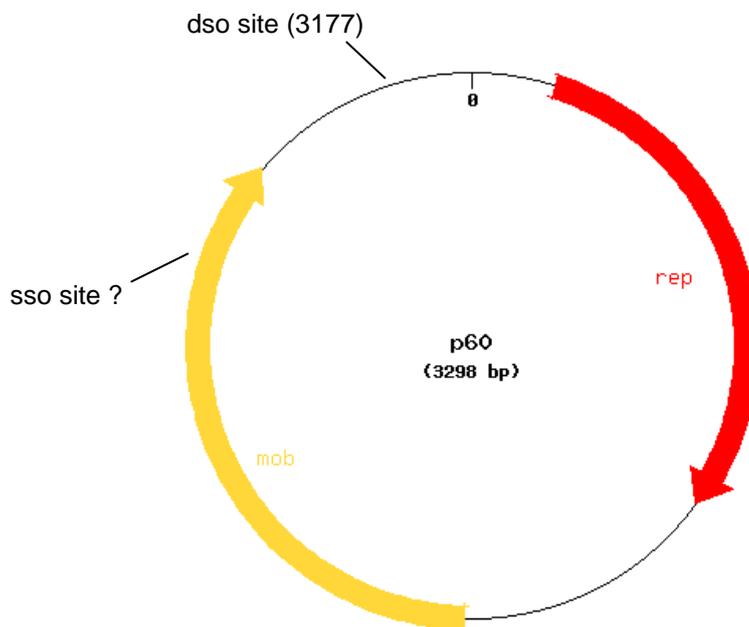


Figure 10 : carte du plasmide rolling circle p60 [21]
gène *mob* – jaune ; gène *rep* – rouge

En principe, une PCR avec des sites de restriction à chaque extrémité des primers peut être réalisée et le produit de digestion inséré dans un vecteur. Il arrive cependant que la digestion ne se passe pas correctement à cause de l'emplacement des sites de restriction aux extrémités du produit PCR. Les enzymes ne coupent alors pas correctement et la ligation se trouve compromise.

Pour éviter ce désagrément, il a été décidé d'insérer l'origine de réplication amplifiée dans un vecteur appelé pGEM-T easy.

1.10 Clonage dans le vecteur pGEM-T easy

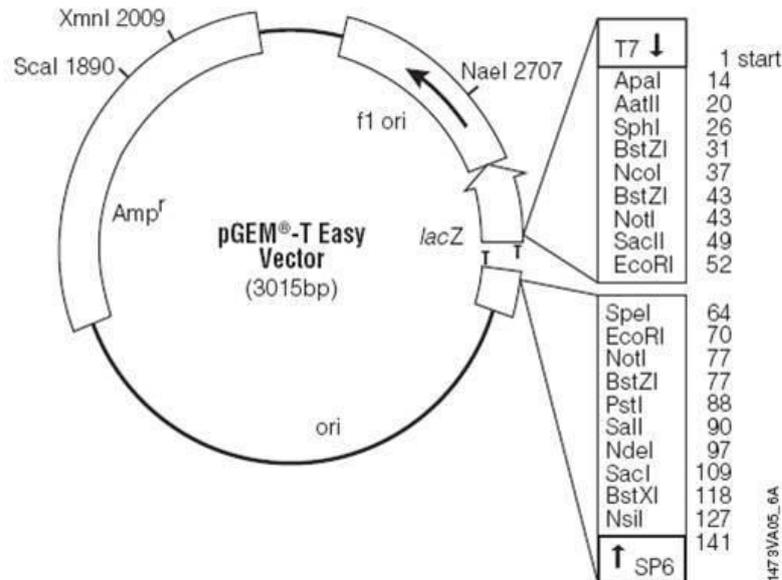


Figure 11 : carte du vecteur pGEM-T easy et sites de restriction [24]

Le vecteur pGEM-T easy contient le *lacZ* qui est coupé par EcoRV. Une base thymine est ensuite ajoutée à l'extrémité 3' de chaque brin d'ADN. Cela améliore grandement l'efficacité de la ligation d'un produit PCR dans les plasmides en évitant la recircularisation du vecteur et en fournissant des bouts compatibles. En effet, beaucoup de polymerases ajoutent des bases adénosines à l'extrémité 3' du fragment amplifié. Le pGEM-T easy est aussi un vecteur de haute copie et grâce à la destruction du gène *lacz*, les colonies transformées peuvent être sélectionnées par leur coloration blanche si les plaques de Pétri contiennent de l'X-Gal.

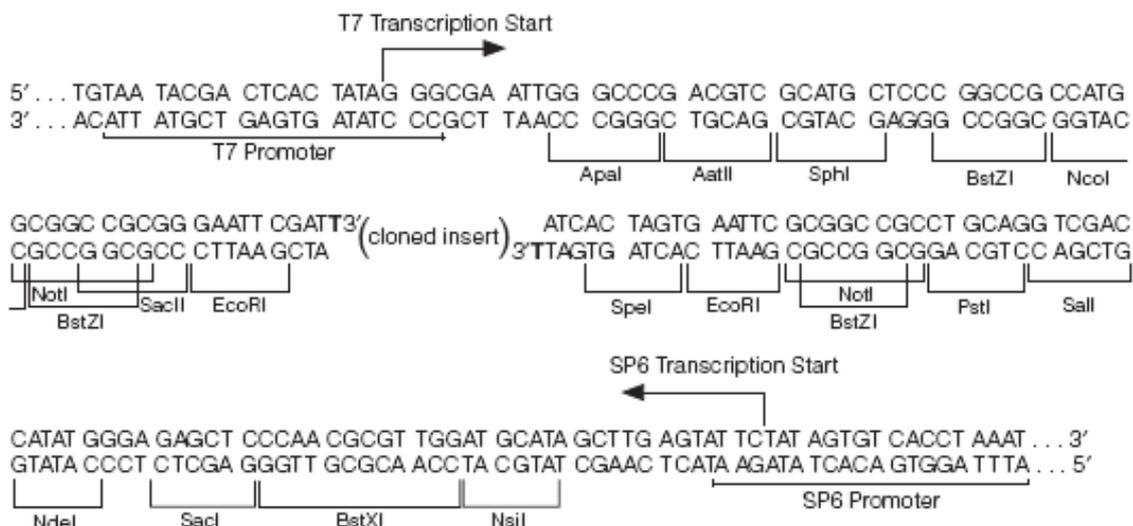


Figure 12 : zone d'insertion du pGEM-T easy avec ajout de la thymine à l'extrémité 3' [24]

La partie où devait être inséré le produit PCR se situe entre les sites de restriction *EcoRI* et *SpeI*. Une fois que le pGEM-T easy contenait le p60, le site *NotI* devait être utilisé pour extraire l'insert et le cloner dans le pHEV104, lui-même coupé avec *NotI*. Cela permettait d'obtenir des extrémités compatibles et de simplifier l'insertion de l'origine de réplication dans le vecteur navette.

1.11 Développement d'une méthode de transformation de *Pediococcus damnosus*

La première technique devant être testée était celle de l'électroporation. Comme expliqué dans l'introduction théorique, cette méthode a obtenu du succès avec différentes bactéries Gram positives. Bien entendu, ce qui est valable pour une espèce de bactérie ne l'est pas pour une autre. Concernant la bactérie *Pediococcus*, des transformations ont été effectuées, mais elles ne sont pas aussi nombreuses que pour d'autres Gram positifs. Ils le sont encore moins pour *Pediococcus damnosus*, d'où l'intérêt de développer une méthode de transformation fiable et reproductible.

Un article de 2007 sur l'optimisation des conditions pour la transformation de *P. acidilactici* P60 par électroporation donne beaucoup d'informations [25]. Il recense les autres essais déjà effectués et ce qui a été réalisé pour les améliorer. Des données telles que le milieu de culture, la solution de lavage ou le milieu de recouvrement utilisé sont une bonne base pour commencer les premières expérimentations avec *P. damnosus*. Les différentes quantités d'ADN et le volume des cellules choisis pour réaliser les essais d'électroporation sont clairement indiqués. Ceci permet donc aussi d'avoir une première gamme de valeurs pour débiter les expériences.

1.12 Objectifs

Le premier but de ce travail de diplôme était de construire un vecteur navette *E. coli* / *P. damnosus* avec une origine de réplication provenant de *P. damnosus* DSM 20331. Le deuxième objectif était de développer et établir une méthode de transformation de *P. damnosus*.

Un vecteur navette contenant déjà les résistances aux antibiotiques appropriés et l'origine de réplication d'*E. coli* était à disposition. Il était nécessaire d'y ajouter d'abord un adaptateur devant permettre l'insertion de l'origine de réplication de *P. damnosus*. Ensuite, l'origine de réplication devait être en premier lieu insérée dans un autre vecteur. Celui-ci avait pour rôle de faciliter et assurer la réussite du clonage de l'origine de réplication dans le vecteur navette. Une fois le vecteur navette créé, les essais de transformations devaient être effectués. Une méthode devait être développée en prenant appui sur ce qui avait déjà été testé pour d'autres espèces de *Pediococcus*. La méthode devait être reproductible et fournir une bonne efficacité de transformation.

2. Matériel et méthode

2.1 Matériel

Milieux de culture

LB :

Tryptic digest of casein	10 g/l	lot 6F1375	Biolife, Milan (I)
Yeast extract	5 g/l	lot 6E2663	Biolife, Milan (I)
NaCl	5 g/l	lot 72070	Riedel-de Haën, Seelze (D)

Suspendre les 3 composés dans l'eau déminéralisée, porter à ébullition et autoclaver

Nutrient Agar (NA) : lot 6A5301 Biolife, Milan (I)

Beef extract	3 g/l
Peptone	5 g/l
Agar	15 g/l

Suspendre 23 g dans 1 l d'eau déminéralisée, porter à ébullition et autoclaver

Milieux sélectifs :

Après stérilisation du milieu, ajouter stérilement à T < 65 °C :

	conc. finale		
Ampicillin sodium salt	100 µg/ml	lot 1291060	Fluka, Buchs (CH)
Chloramphenicol	5 µg/ml	lot 1365758	Fluka, Buchs (CH)
Tetracycline hydrochloride	12 µg/ml	lot 1330148	Fluka, Buchs (CH)
X-Gal	80 µg/ml	lot 6C006997	Applichem, Darmstadt (D)
IPTG	0.2 mM	lot 5M006539	Applichem, Darmstadt (D)

Agarose- Gelélectrophorèse

Seakem LE Agarose	lot 708194	FMC Bioproducts, Rockland (USA)
Ethidium bromide (10 mg/ml)	lot 117H8509	Sigma, Steinheim (D)
Marker GeneRuler 1 kb (0.5 µg/µl)	lot 00024679	Fermentas, Glen Burnie (USA)
Electrophoresis buffer TAE 50x Modified Tris-Acetate EDTA	lot V94316	Millipore, Bedford (USA)

Electrophorese buffer TBE 5x
445 mM boric acid, 1 mM EDTA, 445 mM Tris-Base, pH 8.3

Hes-so Valais (CH)

Loading buffer 5x

Hes-so Valais (CH)

50 % (^w/_v) saccharose, 0.1 M EDTA, 0.02 % (^w/_v) bromophenolblue

Wide Mini-Sub Cell GT

Bio-Rad, Gladesville (USA)

Electrophorèse Power Pac 300

Bio-Rad, Gladesville (USA)

Gel Analyser ChemiDoc XRS

Bio-Rad, Milan (I)

Création de l'adaptateur

MCS_pHEV101-F

861329

Microsynth, Balgach (CH)

MCS_pHEV101-R

861330

Microsynth, Balgach (CH)

T_m = 67.2 °C

Oligonucléotides	Séquence				Longueur (pb)
	<i>Sall</i>	<i>NotI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>HpaI</i>	
MCS_pHEV101-F	5' GAT CTG TCG ACG CGG CCG CGA TAT CGT TAA CA 3'				32
MCS_pHEV101-R	5' GAT CTG TTA ACG ATA TCG CGG CCG CGT CGA CA 3'				32
	<i>HpaI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>NotI</i>	<i>Sall</i>	

Tampon Tris-HCl 1 M, pH 7.5:

Tris hydroxymethyl-methylamine

lot A0235840

Acros Organics, Geel (B)

Tris hydrochlorid

lot 5N007216

Applichem, Darmstadt (D)

Crocodile II, controlled incubation system

Appligene, Pleasanton (CA)

PCR rolling circle plasmide p60

BSA 20 mg/ml

lot 10227830

Roche, Mannheim (D)

dNTPs mix 4 mM each

lot 00027690

Fermentas, Glen Burnie (USA)

Expand High Fidelity PCR system:

lot 13362929

Roche, Mannheim (D)

- MgCl₂ 25 mM

- Expand High Fidelity Buffer sans MgCl₂ 10x

- Expand High Fidelity Enzyme Mix 3.5 u/μl

Amorces pour la PCR:

p60_1512-F ($T_m = 62.9$ °C)	# 892491	Microsynth, Balgach (CH)
p60_1511-R ($T_m = 62.1$ °C)	# 892492	Microsynth, Balgach (CH)
p60_2939-F ($T_m = 61.9$ °C)	# 892489	Microsynth, Balgach (CH)
p60_2938-R ($T_m = 61.2$ °C)	# 892490	Microsynth, Balgach (CH)

Oligonucléotides	Séquence, localisation	Longueur (pb)
p60_1512-F	5' - ¹⁵¹² AAATGCGCTCGCTATGCAA ¹⁵³¹ - 3'	19
p60_1511-R	5' - ¹⁵¹¹ CATGCAGAACTCTACCCGAGTG ¹⁴⁸⁹ - 3'	22
p60_2939-F	5' - ²⁹³⁹ AGGAGTTGACTGACTCACTAGACCAA ²⁹⁶⁵ - 3'	26
p60_2938-R	5' - ²⁹³⁸ TAAAGCCTCAAAAAGGGACTAACTG ²⁹¹³ - 3'	25

Robocycler Gradient 40

Stratagene, La Jolla (CA)

Restriction

<i>Bgl</i> II (10 u/μl) (NEBuffer 3)	lot 0400804	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Hind</i> III (20 u/μl) (NEBuffer 2)	lot 65	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Hpa</i> I (5 u/μl) (NEBuffer 4)	lot 0460804	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Not</i> I (10 u/μl) (NEBuffer 3 + BSA)	lot 0510809	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Nde</i> I (20 u/μl) (NEBuffer 4)	lot 26	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Nco</i> I (10 u/μl) (NEBuffer 3)	lot 27	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Xmn</i> I (20 u/μl) (NEBuffer 4 + BSA)	lot 0660807	New England Biolabs, Ipswich (USA)
BSA 10 mg/ml	lot 0120802	New England Biolabs, Ipswich (USA)
NEBuffer 2 10x	lot 10071	New England Biolabs, Ipswich (USA)
1 x: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 à 25 °C		

NEBuffer 3 10x	lot 0030806	New England Biolabs, Ipswich (USA)
1x: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 à 25 °C		
NEBuffer 4 10x	lot 0010804	New England Biolabs, Ipswich (USA)
1x: 20 mM Tris-acetate, 50 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 à 25 °C		

Traitement avec Antartic phosphatase

Antartic phosphatase (5 u/μl)	lot 14	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Buffer phosphatase (10x)	lot 0709	New England Biolabs, Ipswich (USA)
1x: 50 mM Bis-Tris-Propane-Hcl, 1 mM MgCl ₂ , 0.1 mM ZnCl ₂ , pH 6.0 à 25 °C		

Ligation

T4 DNA Ligase (400 u/μl)	lot 0920805	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4 DNA Ligase Buffer 10x	lot 0010805	New England Biolabs, Ipswich (USA)
1x: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, pH 7.5 à 25 °C		

Transformation *E. coli XL1-Blue MRF*

Cuvette d'électroporation 2 mm	lot 06Y209	Eurogentec, San Diego (USA)
Micropulser		Bio-Rad, Gladesville (USA)
<i>E.coli XL1-blue MRF</i>	# 200361	Stratagene, La Jolla (CA)
Glycerol anhydrous	lot 5H009498	Applichem, Darmstadt (D)
Calcium chloride dihydrate	lot 1364454	Fluka, Buchs (CH)

Milieu de recouvrement SOC :

Bacto Trypton	20 g/l	lot 6F1375	Biolife, Milan (I)
Yeast extract	5 g/l	lot 6E2663	Biolife, Milan (I)
D(+) Glucose monohydrate	3.6 g/l	lot 4W00153	Applichem, Darmstadt (D)
NaCl	0.58 g/l	lot 72070	Riedel-de Haën, Seelze (D)
KCl	0.19 g/l	lot 42650	Riedel-de Haën, Seelze (D)
MgCl ₂	0.95 g/l	lot 445831	Fluka, Buchs (CH)
MgSO ₄	1.2 g/l	lot 409019	Fluka, Buchs (CH)

Transformation de *Pediococcus damnosus*

<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	Hes-so Valais (CH)
<i>Pediococcus damnosus</i>	NCIMB 10564	Hes-so Valais (CH)
<i>Pediococcus damnosus</i>	CCM 3456	Hes-so Valais (CH)

Milieu de culture :

MRS Broth with Tween 80	lot 7A5101	Biolife, Milan (I)
L-Threonine	lot A019248101	Acros Organics, Geel (B)

Tampon d'électroporation : pH 7.5

Sucrose	0.6 M	lot 014	Merck, Darmstadt (D)
Magnesium chloride hexahydrate	7 mM	lot 445831/1	Fluka, Buchs (CH)
Potassium dihydrogen phosphate	1 mM	lot 33270	Riedel-de Haën, Seelze (D)

Milieu de recouvrement :

MRS Broth with Tween 80			
DL- Malic Acid	3 g/l	lot 314	Merck, Darmstadt (D)
Sucrose	0.5 M		

Ajustement du pH du MRS Broth à 5.20 avec 3 g/l d'acide malique

Milieu pour plaques de Pétri:

MRS Agar with Tween 80		lot 8G3703	Biolife, Milan (I)
DL- Malic Acid	3 g/l		

Ajustement du pH du MRS Agar à 5.20 avec 3 g/l d'acide malique

Extraction d'ADN par la méthode CTAB

STET Buffer : 8 % (^W/_V) sucrose, 0.1 % (^V/_V) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0

Sucrose	lot 014	Merck, Darmstadt (D)
Triton X-100	lot 16356-048	Sigma, Steinheim (D)
EDTA disodium salt dehydrate	lot 6P005866	Applichem, Darmstadt (D)
Lysozyme	lot A49720010	Applichem, Darmstadt (D)
Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	lot 87H1342	Sigma, Steinheim (D)
RNase A	lot 124125513	Qiagen, Rilden (D)

Kits biologie moléculaire

DNA Gel Extraction Kit	lot JBC1476192	Millipore, Bedford (USA)
Nucleospin Extract II	lot 809/003	Macherey-Nagel, Düren (D)
Wizard <i>Plus</i> SV Minipreps DNA Purification System	lot 263781	Promega, Madison (USA)

Matériel de laboratoire

Thermomixer comfort	Eppendorf, Bâle (CH)
Thermo Shaker TS-100	BioSan, Riga (LT)
LibraS12 spectrophotomètre	Biochrom, Cambridge (UK)
Mikro 200 centrifugeuse	Hettich, Bäch (CH)
Universal 320 R	Hettich, Bäch (CH)
Incubateur AJ118	Infors, Bottmingen (CH)
Centrivap concentrator	Labconico, Kansas City (USA)

Tableau 1 : liste des substances dangereuses [26]

Nom du produit	Symbole	Définition
Tris hydroxymethyl-methylamine		Irritant
Ampicillin sodium salt		Nocif
Chloramphenicol		Toxique
Ethidium bromide		Toxique
Hexadecyltrimethyl ammonium bromide		Nocif
Triton X-100		Irritant

2.2 Méthode

2.2.1 PCR rolling circle plasmide p60

A. Préparation du mastermix

Mix 1 :

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
BSA 20 mg/ml	2 mg/ml	10
dNTPs mix 4 mM	0.2 mM	5
p60_1512-F 10 µM	0.2 µM	2
p60_1511-R 10 µM	0.2 µM	2
ADN plasmidique 100 ng/µl	200 ng/µl	2
Eau PCR		54
Total :		75

Mix 2 :

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
MgCl ₂ 25 mM	3.5 mM	14
Expand High Fidelity Buffer 10 x	1 x	10
Expand High Fidelity Enzyme Mix 3.5 u/µl	3.5 u	1
Total :		25

Mélanger les mix 1 et 2 ensembles

Pour le contrôle négatif, 2 µl d'eau PCR ont été ajoutés au mix 1 à la place des 2 µl d'ADN plasmidique.

Note : le même mastermix a été préparé avec les autres primers : p60_2939-F et p60_2938-R

B. Conditions pour le 1^{er} Robocycler Gradient 40 :

- T. annealing : 50 °C
- Window 1 :

Dénaturation initiale	4 min à 95 °C
Nombre de cycles	1
- Window 2 :

Dénaturation	50 sec à 95 °C
Annealing	50 sec à 45°C
Elongation	150 sec à 68 °C
Nombre de cycles	5

- Window 3 :

Dénaturation	50 sec à 95 °C
Annealing	50 sec à 50°C
Elongation	150 sec à 68 °C
Nombre de cycles	10
- Window 4 :

Dénaturation	50 sec à 95 °C
Annealing	50 sec à 50°C
Elongation	180 sec à 68 °C
Nombre de cycles	15

C. Condition pour le 2^{ème} Robocycler Gradient 40 (suite de la 4^e fenêtre) :

- Window 1 :

Extension finale	10 min à 72 °C
Nombre de cycles	1

Les conditions pour la PCR ont été reprises d'un travail d'étudiants « Isolation d'une origine de répllication type thêta de *Pediococcus damnosus* DSM 20331 » [27].

2.2.2 Purification des produits PCR

La purification a été effectuée selon la méthode du kit NucleoSpin Extract II [28]. Le volume de tampon NE utilisé pour l'éluion était de 45 µl. 5 µl ont été chargés sur un gel afin de vérifier le résultat de la purification et estimer la concentration du produit PCR.

2.2.3 Restrictions

Restriction vecteur navette pHEV101 avec *Bgl*II

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Eau PCR	-----	12
NEBuffer 3 10 x	1 x	2
Vecteur pHEV101 (100 ng/µl)	500 ng	5
<i>Bgl</i> II 10 u/µl	10 u	1
Total		20

- Incuber 2 h à 37 °C
- Pour arrêter la réaction :
 - ajouter 5 µl de tampon loading buffer
- Placer 5 µl du produit de restriction dans un eppendorf (contrôle K1)

Restriction vecteur navette pHEV101 avec *Hind*III

idem que la restriction avec *Bgl*II

- Incuber 2 h à 37 °C
- Pour arrêter la réaction :
 - ajouter 3 µl de tampon de loading buffer
- Placer 10 µl du produit de restriction (contenant le loading buffer) dans un eppendorf (contrôle K2)
- Faire migrer les produits de restriction sur un gel d'agarose 0.8 %, tampon TAE 1x à 80 V

Restriction fragment 4073 pb reliqué sur lui-même avec *Bgl*II

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Eau PCR	-	2
NEBuffer 3 (10x)	1 x	2
Fragment 4073 pb reliqué (85 ng/µl)	1.2 µg	15
<i>Bgl</i> II (10 u/µl)	10 u	1
Total		20

- Incuber 2 h à 37 °C
- L'enzyme *Bgl*II ne pouvant être désactivée par chauffage, elle a été enlevée du produit de restriction avec le kit NucleoSpin Extract II.

Restriction pGEM-T easy / p60

L'appellation p60 A désigne le produit PCR (rolling circle p60) obtenu avec le primer 2939-F et 2938-R. L'appellation p60 B désigne le produit PCR obtenu avec les primers 1512-F et 1511-R.

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
pGEM-T easy / p60 A (concentré 2.5 x)	inconnue	22
NEBuffer 3 (10x)	1 x	3
BSA (10x)	1 x	3
<i>NotI</i> (10 u/µl)	20 u	2
Total		30

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
pGEM-T easy / p60 B (concentré 2.5 x)	inconnue	22
NEBuffer 3 (10x)	1 x	3
BSA (10x)	1 x	3
<i>NotI</i> (10 u/µl)	20 u	2
Total		30

- Incuber 2 h à 37 °C
- Pour arrêter la réaction :
 - ajouter 6 µl de tampon loading buffer
- Faire migrer les restrictions sur un gel d'agarose 0.8 %, tampon TAE 1x à 80 V.

Restriction pHEV104 (but : insérer le p60)

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Eau PCR	-	11
pHEV104 (280 ng/µl)	850 ng	3
NEBuffer 3 (10x)	1 x	2
BSA (10x)	1 x	2
<i>NotI</i> (10 u/µl)	20 u	2
Total		20

- Incuber 2 h à 37 °C
- Pour inactiver l'enzyme, incuber 20 min à 65 °C

Traitement avec Antartic phosphatase

Le pHEV104 a été traité par Antartic phosphatase après avoir été coupé par *NotI*.

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Eau PCR	-	3
pHEV104 coupé (35 ng/µl)	490 ng	3
Buffer phosphatase (10x)	1 x	2
Antartic phosphatase (5 u/µl)	5 u	1
Total		20

- Incuber 15 min à 37 °C
- Inactiver en incubant 5 min à 65 °C

2.2.4 Isolation des produits de restriction

- Placer le gel d'agarose 0.8 % sous les UV
- Découper la (les) bande(s) d'intérêt avec un scalpel propre, flambé à l'éthanol et les placer dans le montage du DNA Gel extraction Kit
- Centrifuger 10 min à 5'000 g
- Récupérer l'éluat au fond du tube et le transférer dans un nouvel eppendorf
- Placer 5 µl de cet éluat dans un autre eppendorf et ajouter 1 µl de loading buffer (à mettre sur gel afin d'évaluer la qualité de la purification et la concentration d'ADN)

Note : si le morceau d'agarose découpé pèse 100 mg ou plus, la purification doit être effectuée avec le kit NucleoSpin Extract II [28].

2.2.5 Création de l'adaptateur (MCS pour pHEV101)

- Aliquoter les oligonucléotides et diluer chaque oligonucléotide à une concentration de 10 µM
- Dans un tube PCR stérile, pipeter 35 µl de chaque solution d'oligonucléotide
- Ajouter 0.7 µl de Tris-HCl à pH 7.5

Programme réalisé avec l'appareil Crocodile II et suivant le manuel d'utilisation [29] :

- Incuber la solution 2 minutes à 95 °C
- Refroidir le tube (9 s / °C) jusqu'à la température de fusion des oligonucléotides (pour MCS_pHEV101-F et -R : $T_m = 67.2$ °C)

- Incuber 5 minutes à cette température
- Refroidir à 30 °C en 5 min (8 s / °C pour passer de 67.2 à 30 °C)
- Centrifuger brièvement
- Garder sur glace ou conserver à – 20 °C jusqu'à l'utilisation

2.2.6 Ligations

Ligation fragment pHEV101 4073 pb

Ligation 1

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Eau PCR	-	4
pHEV101 fragment 4073 pb (5 ng/µl)	20 ng	4
T4 DNA Ligase Buffer avec ATP 10mM (10x)	1 x	1
T4 DNA Ligase (400 u/µl)	400 u	1
Total		10

Ligation 2

idem que ligation 1, mais avec 40 ng de pHEV101 fragment 4073 pb

- Incuber 2 h à température ambiante (possibilité d'incuber une nuit à 16 °C)
- Inactiver en incubant 10 min à 65 °C

Il est possible de déterminer quelle concentration d'insert doit être utilisée par rapport à la concentration du vecteur. Des ligations avec différents ratio molaire d'insert-vecteur permettent d'augmenter les chances de réussite de la transformation.

Une équation permet d'obtenir ces informations [30] :

$$\frac{\text{ng de vecteur} \times \text{taille de l'insert}}{\text{taille du vecteur}} \times \text{ratio molaire insert : vecteur} = \text{ng d'insert}$$

Ligation adaptateur + vecteur 4073 pb

Des ratios molaires insert-vecteur de 1 :1, 5 :1 et 20 :1 ont été choisis. Deux concentrations d'ADN ont également été testées.

Ligation 1 80 ng 1 :1

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
MCS_pHEV101 adaptateur (0.39 ng/µl)	0.62 ng	1.6
Vecteur 4073 pb (17 ng/µl)	80 ng	4.7
Eau PCR	-	10.7
T4 DNA Ligase Buffer avec ATP 10mM (10x)	1 x	2
T4 DNA Ligase (400 u/µl)	400 u	1
Total		20

Ligation 2 80 ng 5 :1

Idem que ligation 1, mais avec 5 x plus de MCS_pHEV101 adaptateur (insert)

Ligation 3 80 ng 20 :1

Idem que ligation 1, mais avec 20 x plus de MCS_pHEV101 adaptateur

Ligation 4 120 ng 1 :1

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
MCS_pHEV101 adaptateur (0.39 ng/µl)	0.94 ng	2.4
Vecteur 4073 pb (17 ng/µl)	120 ng	7
Eau PCR	-	7.6
T4 DNA Ligase Buffer avec ATP 10mM (10x)	1 x	2
T4 DNA Ligase (400 u/µl)	400 u	1
Total		20

Ligation 5 120 ng 5 :1

idem que ligation 4, mais avec 5 x plus de MCS_pHEV101 adaptateur

Ligation 6 120 ng 20 :1

Idem que ligation 4, mais avec 20 x plus de MCS_pHEV101 adaptateur

- Incuber 2 h à température ambiante (possibilité d'incuber une nuit à 16 °C)
- Inactiver en incubant 10 min à 65 °C

Ligation vecteur pGEM-T easy + plasmide rolling circle p60 [31]

Pour chaque produit PCR obtenu, deux ligations ont été réalisées avec différents ratios molaires. Le produit PCR obtenu avec les amorces p60_2939-F et p60_2938-R est nommé « p60 A ». Le produit PCR obtenu avec les amorces p60_1512-F et p60_1511-R est nommé « p60 B ». Les ligations contenant ces produits PCR sont nommées « ligation p60 A » et « ligation p60 B ».

Ligation 1 : p60 B + pGEM-T easy 2 :1

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Rapid Ligation Buffer (2x)	1 x	5
pGEM-T easy (50 ng/µl)	50 ng	1
p60 B (30 ng/µl)	90 ng	3
T4 DNA Ligase (3 weiss units/µl)	3 u	1
Total		10

Ligation 2 : p60 B + pGEM-T easy 1 :2

idem que ligation 1, mais avec 2 x plus de pGEM-T easy que de p60 B

Ligation 3 : p60A + pGEM-T esay 1 :1

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
Rapid Ligation Buffer (2x)	1 x	5
pGEM-T easy (50 ng/µl)	50 ng	1
p60 A (18 ng/µl)	54 ng	3
T4 DNA Ligase (3 weiss units/µl)	3 u	1
Total		10

Ligation 4 : p60A + pGEM-T easy 1 :2

idem que ligation 3, mais avec 2 x plus de pGEM-T easy que de p60 A

- Incuber une nuit à 4 °C (ou possibilité d'incuber 1 h à température ambiante)

Ligation vecteur pHEV104 + plasmide rolling circle p60

Ligation 1 : pHEV104 + p60 A

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
p60 A	inconnue	21
pHEV104 coupé avec <i>NotI</i> (1 ng/µl)	2 ng	2
Eau PCR	-	2
T4 DNA Ligase Buffer avec ATP 10mM (10x)	1 x	3
T4 DNA Ligase (400 u/µl)	800 u	2
Total		30

Ligation 1 : pHEV104 + p60 B

	conc. finale	µl pour 1 échantillon
p60 B	inconnue	39
pHEV104 coupé avec <i>NotI</i> (0.5 ng/µl)	0.5 ng	1
T4 DNA Ligase Buffer avec ATP 10mM (10x)	1 x	4.6
T4 DNA Ligase (400 u/µl)	800 u	2
Total		46.6

- Incuber 2 h à température ambiante (possibilité d'incuber une nuit à 16 °C)
- Inactiver en incubant 10 min à 65 °C

2.2.7 Transformation des *E. coli* XL1-Blue MRF par électroporation

Préparation des cellules électrocompétentes

- Inoculer 2x 250 ml de milieu LB avec 1/100 d'une culture fraîche d'*E. coli*.
- Incuber à 37 °C en agitant à 200 rpm jusqu'à atteindre une OD₆₀₀ de 0.5-0.6
- Refroidir les cellules sur glace pendant ~20 min. Pour toutes les étapes suivantes, garder les cellules aussi proches de 0 °C que possible (sur un bain de glace/eau). Refroidir tous les tubes sur glace avant d'y ajouter les cellules.
- Transférer les cellules dans deux bouteilles stériles refroidies et centrifuger à 4000 x g pendant 15 min à 4 °C.
- Enlever prudemment le surnageant. Il est préférable de sacrifier quelques cellules plutôt que de laisser du surnageant.
- Resuspendre gentiment le pellet dans 250 ml de glycérol 10 % stérile et refroidi. Centrifuger à 4000 x g pendant 15 min à 4 °C. Enlever prudemment le surnageant.

- Resuspendre gentiment le pellet dans 125 ml de glycérol 10 % stérile et refroidi. Centrifuger à 4000 x g pendant 15 min à 4 °C. Enlever prudemment le surnageant.
- Resuspendre gentiment le pellet dans 10 ml de glycérol 10 % stérile et refroidi. Regrouper les 2 x 10 ml dans un tube falcon stérile de 50 ml refroidi. Centrifuger à 4000 x g pendant 15 min à 4 °C. Enlever prudemment le surnageant.
- Resuspendre gentiment le pellet dans un volume final de 1-2 ml de glycérol 10 % stérile et refroidi. La concentration des cellules devrait être aux alentours de $1-3 \times 10^{10}$ cells/ml.
- Aliquoter sur glace dans des eppendorfs refroidis et stocker à -70 °C.

Electroporation

L'électroporation a été réalisée selon le manuel d'instruction de Bio-Rad [32].

- Mettre les cellules dans la glace et pour chaque échantillon, placer un eppendorf 1.5 ml et une cuvette d'électroporation 2 mm dans la glace.
- Dans l'eppendorf de 1.5 ml, mélanger 40 µl de cellules et 1 µl du produit de ligation
- Incuber 1 min sur glace
- Sélectionner le programme Bacteria du Micro Pulser, puis Ec3 (voltage 3 kV)
- Transférer le mélange cellules-produit de ligation dans la cuvette d'électroporation froide et la taper légèrement sur le plan de travail pour que toute la suspension se trouve au fond de la cuvette
- Placer la cuvette dans le compartiment du Micro Pulser, pousser le rail jusqu'à atteindre le fond de l'appareil et appuyer sur Pulse
- Vérifier les ms indiquées sur le Micro Pulser. Il faut qu'elles se situent entre 4-5 ms. Si ce n'est pas le cas, recommencer l'opération, car l'électroporation n'aura sans doute pas marché
- Retirer la cuvette, ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC et resuspendre gentiment mais rapidement les cellules
- Transférer le mélange dans un eppendorf 1.5 ml et incuber à 37 °C pendant 1 h avec une agitation de 300 rpm
- Étaler 100 µl sur des plaques de NA avec 100 µg/ml Ampicilline. Centrifuger le reste des cellules, enlever une partie du surnageant pour en laisser 100 µl. Resuspendre le pellet dans ces 100 µl. Étaler les 100 µl de cellules concentrées sur une plaque NA + Ampicilline 100 µg/ml
- Incuber 1 nuit (ou 1 jour au maximum) à 37 °C

Tableau 2 : 1^{ère} transformation *E. coli* XL1-Blue MRF avec ligation fragment pHEV101 4073 pb

Nom	Echantillon (ADN)	Volume (µl)	Cellules (µl)
pHEV101 4073 pb 1-1	ligation 1	1	40
pHEV101 4073 pb 1-2	ligation 1	2	40
pHEV101 4073 pb 2-0.1	ligation 2	0.1	40
pHEV101 4073 pb 2-1	ligation 2	1	40
pHEV101 4073 pb 2-1.5	ligation 2	1.5	40
Contrôle positif (CP)	pHEV101 (3 ng/µl)	1	40
Contrôle négatif (CN)	-	-	40

Tableau 3 : 2^e transformation *E. coli* XL1-Blue MRF avec ligation linker + vecteur 4073 pb

Nom	Echantillon (ADN)	Volume (µl)	Cellules (µl)
80 ng 1 :1	ligation 1	1	40
80 ng 5 :1	ligation 2	1	40
80 ng 20 :1	ligation 3	1	40
120 ng 1 :1	ligation 4	1	40
120 ng 5 :1	ligation 5	1	40
120 ng 20 :1	ligation 6	1	40
Contrôle positif (CP)	vecteur 4073 pb (4 ng/µl)	1	40
Contrôle négatif (CN)	-	-	40

2.2.8 Transformation des *E. coli* XL1-Blue MRF par la méthode CaCl₂

Préparation des cellules compétentes

- Inoculer 20 ml de milieu LB avec 1/100 d'une culture fraîche d'*E. coli*
- Incuber à 37 °C en agitant à 200 rpm jusqu'à atteindre une OD₆₀₀ de 0.5-0.6
- Transférer les cellules dans un tube falcon stérile refroidi et centrifuger à 4000 x g pendant 6 min à 4 °C
- Jeter le surnageant et resuspendre gentiment le pellet dans 10 ml de CaCl₂ 100 mM stérile et refroidi
- Centrifuger à 4000 x g pendant 10 min à 4 °C
- Jeter le surnageant et resuspendre gentiment le pellet dans 2 ml de CaCl₂ 100 mM stérile et refroidi
- Aliquoter 200 µl dans des eppendorfs refroidis
- Laisser sur glace minimum 30 min jusqu'à la transformation

Transformation

- Mélanger les cellules avec le produit de ligation
- Laisser sur glace pendant 30 min
- Incuber les eppendorfs pendant 2 min à 42 °C.
- Ajouter 1 ml de milieu SOC et incuber à 37 °C pendant 1 h à 300 rpm.
- Etaler 100 µl sur des plaques NA avec 100 µg/ml Ampicilline (si sélection par colonies bleues/blanches il faut ajouter IPTG 0.2 mM et X-Gal 80 µg/ml). Centrifuger le reste des cellules, enlever une partie du surnageant pour en laisser 100 µl. Resuspendre le pellet dans ces 100 µl. Etaler les 100 µl de cellules concentrées sur une plaque NA + Ampicilline 100 µg/ml
- Incuber une nuit (ou 1 jour maximum) à 37 °C

Tableau 4 : transformation *E. coli* XL1-Blue MRF avec ligation pGEM-T + p60

Nom	Echantillon (ADN)	Volume (µl)	Cellules (µl)
p60 B + pGEM-T 2 :1	ligation 1	10	200
p60 B + pGEM-T 1 :2	ligation 2	10	200
p60 A + pGEM-T 1 :1	ligation 3	10	200
p60 A+ pGEM-T 1 :2	ligation 4	10	200
CP promega concentré	cf. [31]	10	200
Background contrôle concentré	cf. [31]	10	200
CP	pHEV104 (100 ng/µl)	1	200
CN	-	-	200

2.2.9 Transformation de *P. damnosus* par électroporation [25]**Préparation des cellules électrocompétentes**

- Inoculer 10 ml de MRS Broth - Tween 80 avec 1 colonie isolée de *P. damnosus* (ou depuis le stock), à 30 °C en agitant à 150 rpm. Laisser pousser les bactéries jusqu'à ce qu'elles se trouvent en début de phase stationnaire.
- Inoculer 50 ml de MRS Broth - Tween 80 (+ 40 mM de L-Threonine) avec 4 ml de la préculture. Incuber à 30 °C en agitant à 150 rpm jusqu'à atteindre une OD₆₀₀ de 0.6-1.1.
- Refroidir les cellules dans un bain d'eau-glace pendant 10 min. Centrifuger à 4 °C et 4'000 x g durant 10 min.
- Laver 3 fois avec du tampon d'électroporation refroidi et centrifuger à 4 °C et 4'000 x g durant 10 min.
- Resuspendre dans 1/10 du volume original avec le tampon d'électroporation

- Incuber les cellules avec une solution de lysozyme stérile (concentration finale 2000 U/ml) à 37 °C pendant 20 min.
- Centrifuger et laver 3 fois à 4 °C et 4'000 xg pendant 5 min.
- Resuspendre dans le tampon d'électroporation afin d'avoir une concentration de cellules de 10^9 - 10^{10} cfu/ml
- Garder les cellules électrocompétentes sur glace jusqu'à l'utilisation ou stocker à -20 °C pour une plus longue période

Electroporation

- Transférer 80 µl de cellules dans une cuvette d'électroporation, placer sur la glace 5 minutes et mélanger avec 2 µl d'ADN plasmidique contenant 1 µg d'ADN
- Sélectionner le programme Bacteria du Micro Pulser, puis Ec3 (voltage 3 kV)
- Placer la cuvette dans le compartiment du Micro Pulser, pousser le rail jusqu'à atteindre le fond de l'appareil et appuyer sur Pulse
- Retirer la cuvette, ajouter immédiatement 1 ml de milieu de recouvrement et resuspendre gentiment mais rapidement les cellules
- Transférer le mélange dans un eppendorf 1.5 ml et incuber à 30 °C pendant 2 h avec une agitation de 300 rpm
- Etaler 100 µl sur des plaques MRS Agar – Tween 80 contenant le bon antibiotique. Centrifuger le reste des cellules, enlever une partie du surnageant pour en laisser 100 µl. Resuspendre le pellet dans ces 100 µl. Etaler les 100 µl de cellules concentrées sur une plaque de MRS Agar – Tween 80
- Incuber jusqu'à 5 jours à 30 °C

2.2.10 Isolation des colonies

- Repiquer les colonies sur de nouvelles plaques avec le milieu NA + 100 µg/ml d'ampicilline
- Incuber une nuit (ou 1 jour maximum) à 37 °C
- Entourer les plaques de parafilm et les garder au réfrigérateur

2.2.11 Extraction des plasmides

L'ADN plasmidique est extrait avec deux méthodes différentes : en utilisant le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System pour l'extraction de quelques échantillons ou en suivant la méthode CTAB pour l'extraction d'échantillons nombreux.

- **Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System**

Préparation de la culture

- Prendre une colonie isolée d'une plaque contenant le bon antibiotique et inoculer 10 ml de milieu liquide ayant le même antibiotique
- Incuber une nuit (~16h) à 180 rpm, à la température du micro-organisme

Production d'un lysat clair

- Centrifuger 1-10 ml de culture 5 min à 10'000 x g ; enlever le surnageant et poser le tube à l'envers sur un papier absorbant pour enlever le surnageant restant
- Ajouter 250 µl de la solution de resuspension et resuspendre le pellet en vortexant ou en pipettant
- Ajouter 250 µl de la solution de lyse et mélanger en retournant le tube 4 x (ne pas vortexer) ; incuber 1-5 min jusqu'à ce que la solution s'éclaircisse (ne pas incuber plus de 5 min)
- Ajouter 10 µl de la solution d'alkaline phosphatase et mélanger en retournant le tube 4 x ; incuber 5 min à température ambiante (pas plus de 5 min)
- Ajouter 350 µl de la solution de neutralisation et immédiatement mélanger en retournant le tube 4 x
- Centrifuger à vitesse maximale (~14'000 x g) pendant 10 min à température ambiante

Isolation de l'ADN plasmidique et purification

- Transférer le lysat clair dans la spin colonne, posée auparavant dans le tube collecteur de 2 ml (attention à ne pas transférer du pellet dans la Colonne)
- Centrifuger pendant 1 min à vitesse maximale à température ambiante ; enlever la spin colonne, vider le liquide du tube collecteur et replacer la colonne
- Ajouter 750 µl de solution de lavage, préalablement diluée avec de l'éthanol 95 %, dans la spin colonne
- Centrifuger pendant 1 min à vitesse maximale à température ambiante ; enlever la spin colonne, vider le liquide du tube collecteur et replacer la colonne
- Ajouter 250 µl de solution de lavage dans la spin colonne
- Centrifuger 2 min à vitesse maximale à température ambiante
- Transférer la spin colonne dans un nouveau tube eppendorf de 1.5 ml
- Eluer l'ADN plasmidique en ajoutant 100 µl d'eau Nuclease-Free ; centrifuger 1 min à vitesse maximale
- Jeter la spin colonne et conserver l'ADN plasmidique à -20 °C

Méthode CTAB [33]

Quelques modifications ont été apportées par rapport au protocole initial

- Prendre une colonie isolée d'une plaque contenant le bon antibiotique et inoculer 10 ml de milieu liquide ayant le même antibiotique
- Incuber une nuit (~16h) à 200 rpm, à la température du micro-organisme

- Centrifuger 1.5 ml de culture 5 min à 10'000 x g ; enlever le surnageant et poser le tube à l'envers sur un papier absorbant pour enlever le surnageant restant
- Resuspendre le pellet dans 200 µl de STET Buffer
- Ajouter 4 µl de lysozyme (50 mg/ml) et incuber 5 min à température ambiante
- Mettre les échantillons 45 sec dans de l'eau bouillante (ou dans un bloc chauffant à 100 °C) et centrifuger 10 min à vitesse maximale
- Enlever le pellet avec un cure-dent
- Ajouter 8 µl de CTAB (5 % w/v) et centrifuger 5 min à température ambiante et à vitesse maximale
- Enlever le surnageant et resuspendre le pellet dans 300 µl de NaCl (1.2 M) en vortexant vigoureusement
- Précipiter l'ADN par addition de 750 µl d'éthanol pur et centrifuger 10 min à température ambiante et à vitesse maximale
- Enlever le surnageant, rincer le pellet avec 500 µl d'un mélange 70 % éthanol/eau et centrifuger 10 min à température ambiante et à vitesse maximale
- Laisser les tubes ouverts pour permettre l'évaporation de l'éthanol ou sécher par vacuum
- Resuspendre le pellet dans 50 µl d'eau PCR et ajouter 1.25 µl de RNase A (10 mg/ml)
- Conserver l'ADN plasmidique à -20 °C

3. Résultats

3.1 Construction d'un vecteur navette avec une origine de réplication de *P. damnosus* dans *E. coli* XL1-Blue MRF

3.1.1 Restriction du pHEV101

Le vecteur navette pHEV101 a pu être utilisé directement, car conservé au congélateur dans des eppendorfs. Une restriction a été effectuée via l'enzyme préalablement déterminée (ici *Bgl*II). La séquence désirée a été coupée au niveau des sites de restriction. Une migration sur gel est un moyen efficace pour récupérer le produit de la restriction. La partie du gel contenant le bon fragment peut en effet être découpée et ensuite utilisée pour la ligation. Avec cette méthode, on s'assure de ne prendre que le produit utile pour les étapes suivantes.

Réaliser une migration sur gel permet également de vérifier si la restriction a fonctionné correctement et par conséquent de savoir si l'enzyme utilisée est encore efficace ou si elle a perdu son pouvoir de restriction.

Le pHEV101 a été coupé avec *Bgl*II afin de pouvoir isoler le fragment souhaité du gel d'agarose grâce au DNA Gel Extraction Kit. Le fragment à récupérer était celui contenant la résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, le gène *ColE1* ainsi que le gène de la *gfp*.

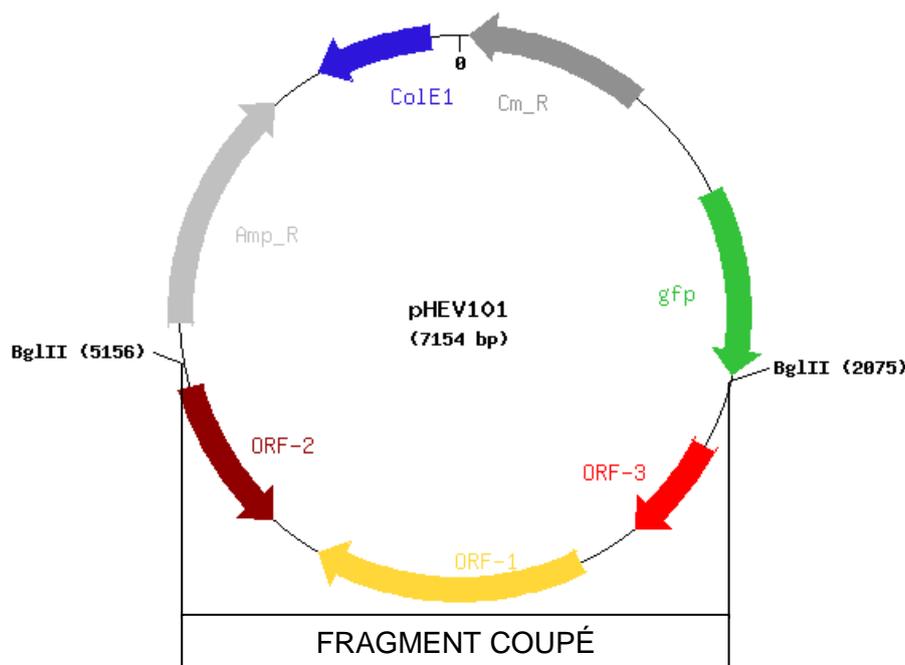


Figure 13. carte du pHEV101 avec sites de restriction de *Bgl*II [21]

Sur la carte du plasmide pHEV101, l'enzyme de restriction *Bgl*II coupe à 2075 pb, juste après le gène codant pour la *gfp* et à 5156 pb, avant le gène de la résistance à l'ampicilline. Les sites enlevés sont les trois différents ORF.

Le pHEV101 a également été coupé avec l'enzyme *Hind*III afin de s'assurer d'utiliser le bon vecteur navette.

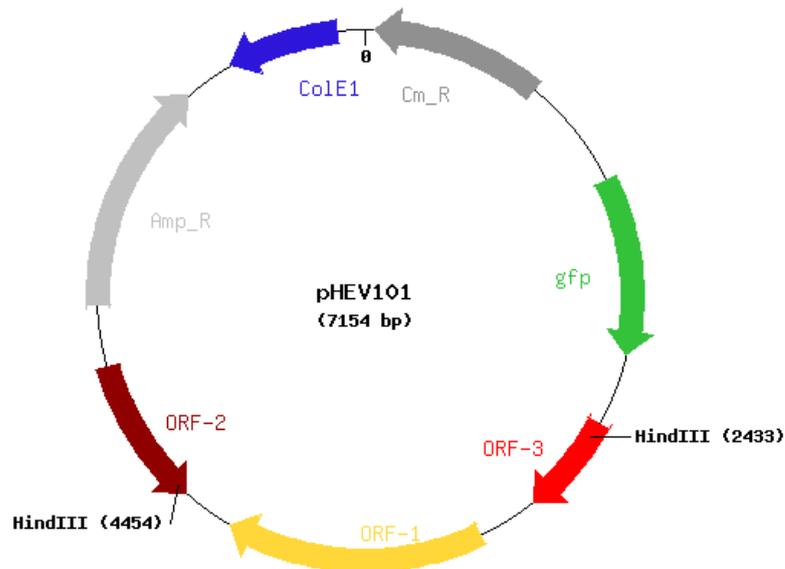


Figure 14 : carte du pHEV101 avec sites de restriction de *Hind*III [21]

Tableau 5 : taille théorique des fragments du pHEV101 après restriction avec *Bgl*II et *Hind*III

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
pHEV101 (7164 pb)	<i>Bgl</i> II	3081, 4073	2075, 5156
pHEV101 (7164 pb)	<i>Hind</i> III	2021, 5133	2433, 4454

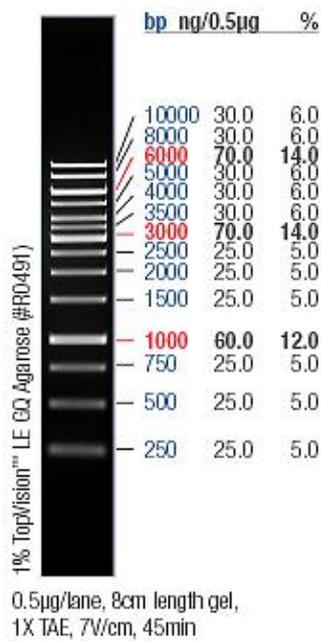


Figure 15 : échelle du marker de 1 kb [34]

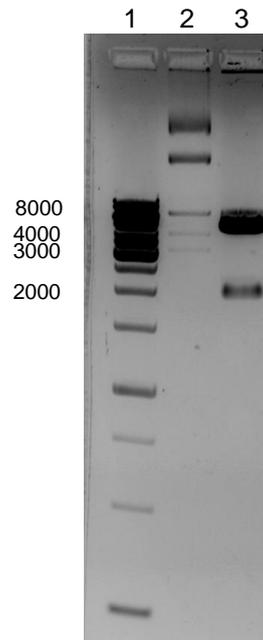


Figure 16 : restriction du pHEV101

1 : marker 1kb ; 2 : pHEV101 + *Bgl*II;
3 : pHEV101 + *Hind*III (K2)

Les bandes du marker ne sont pas totalement séparées sur la Figure 16. Cependant, connaissant les tailles des fragments, il est possible d'assez bien situer les bandes sur le gel. Dans le puits n°2, cinq bandes sont visibles. Deux d'entre elles se trouvent au-dessus de la première bande du marker de 10'000 pb. La troisième bande est présente dans la partie supérieure du marker, vers 7000 pb. La quatrième marque se trouve aux alentours de 4000 pb. Enfin, la dernière est visible vers 3000 pb. Ces deux dernières bandes sont plus claires que les trois précédentes. Dans le puits n°3, deux bandes sont présentes. Elles sont toutes les deux bien visibles. La plus haute est entre la bande de 7000 et 4000 pb. Celle d'en dessous se trouve vers 2000 pb.

Malgré les conditions standards pour la restriction, la digestion n'a pas été complète. En effet, il ne devrait y avoir que deux bandes sur la photo : une vers 4000 pb et l'autre vers 3000 pb. L'enzyme n'a pas totalement joué son rôle. Les deux premières bandes représentent sans doute le vecteur sous sa forme oc (open circle) et sous la forme partiellement linéarisée. La troisième bande est la forme linéarisée du vecteur qui vaut 7154 pb. Pour ce qui est de la troisième et quatrième bande, ce sont celles du vecteur complètement digéré. En effet, la restriction devait fournir une bande à 4073 pb et l'autre à 3081 pb. La restriction avec *Hind*III a servi de test supplémentaire pour s'assurer d'avoir le bon vecteur. La digestion devait donner deux bandes de 2021 et 5133 bp. On constate que c'est ce qui est présenté à la Figure 16. Le vecteur utilisé est donc bien le pHEV101.

Les mêmes conditions de restriction ont été utilisées pour *Bgl*II et *Hind*III. La seconde enzyme a parfaitement coupé le vecteur, tandis que la première ne l'a fait que partiellement. L'enzyme *Bgl*II devait avoir perdu en grande partie sa capacité de digestion. Un nouveau tube a été commandé et la digestion a été refaite aux mêmes conditions qu'auparavant.

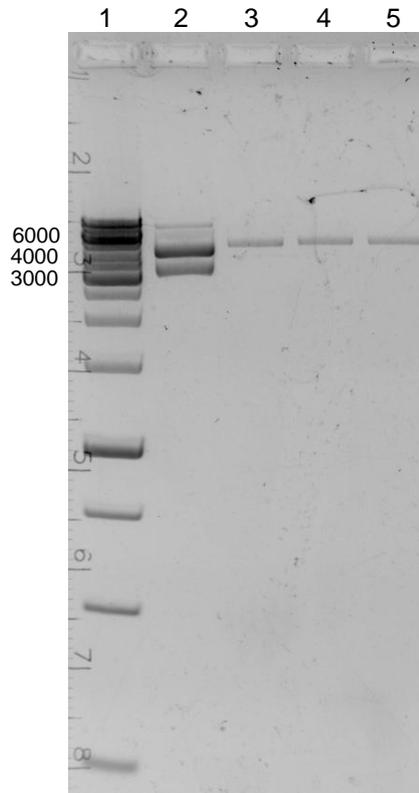


Figure 17 : Gel des contrôles

1 : marker 1 kb ; 2 : pHEV101 + *Bgl*II (K1) ;
3 : fragment pHEV101 isolé ; 4 : idem à 3 ; 5 : idem à 3

Dans le puits n°2, il est possible de constater la présence de trois bandes. Les deux bandes attendues à 4073 et 3081 pb sont bien présentes. Il reste une légère bande en dessus de 6000 pb (correspondant à la forme linéarisé du pHEV101), mais elle est très faible. Avec le résultat du puit 2, il est donc possible de constater que la restriction a fonctionné correctement. Pour les puits 3, 4 et 5, une bande est visible quasiment au niveau de celle de 4000 pb du puits n°2. Elles sont cependant moins foncées que cette dernière. Cela montre que purifier avec le Gel Montage Extraction Kit fonctionne très bien. De même, peu de produit a été perdu. En effet, ces bandes sont plus faibles que celle du puits 2, mais cela est du au volume introduit sur le gel qui était plus important dans le puits 2 que dans les trois autres puits. Après isolation et purification de la bande d'intérêt de 4073 pb, il restait suffisamment de matériel pour réaliser la ligation.

3.1.2 Ligation du fragment 4073 pb et 1^{ère} transformation des cellules *E. coli XL1-Blue MRF*

Après avoir isolé le fragment d'intérêt de 4073 pb du pHEV101, une ligation a été effectuée avec ce fragment afin qu'il se referme sur lui-même et forme à nouveau un vecteur. Il a fallu attendre 2 h pour que la ligation puisse être complètement réalisée. Afin de savoir si le nouveau plasmide a été créé, le produit de la ligation a été introduit dans les cellules électrocompétentes *E. coli XL1-Blue MRF*. La méthode de transformation utilisée est celle de l'électroporation (2.2.7). Une fois la transformation effectuée, les cellules ont été incubées 1 heure. Celles-ci ont ensuite été étalées sur des plaques contenant de l'ampicilline et mises à 37 °C pour la nuit. A noter que les cellules ont été centrifugées et le surnageant partiellement jeté. Les cellules ont été resuspendues dans les 100 µl de surnageant restant et mises sur plaques. Afin d'obtenir une culture pure, des colonies ont été repiquées sur de nouvelles plaques. Le milieu liquide a ensuite pu être ensemencé avec une colonie isolée.

Tableau 6 : Résultat de la 1^{ère} transformation

Noms des plaques de Pétri	Nbr. de colonies
pHEV101 4073 pb 1-1	6
pHEV101 4073 pb 1-2	1
pHEV101 4073 pb 2-0.1	110
pHEV101 4073 pb 2-1	120
pHEV101 4073 pb 2-1.5	80
CP	>300
CN	0

Beaucoup de colonies ont poussé pour le contrôle positif et aucune pour le contrôle négatif. Un grand nombre de colonies est apparu sur les plaques contenant la ligation 2 tandis qu'un petit nombre est présent sur les plaques portant la ligation 1. La ligation 2 ayant été réalisée avec 40 ng d'ADN plasmidique contre 20 ng pour la ligation 1, il est possible de dire que la ligation 2 a été plus efficace.

Pour le repiquage, une colonie de la plaque pHEV101 4073 pb 1-1 et une colonie de pHEV101 4073 pb 1-2 ont été choisies. Pour la plaque pHEV101 4073 pb 2-1 et pHEV101 4073 pb 2-1.5, trois colonies ont été repiquées. Deux colonies ont également été prélevées de la plaque pHEV101 4073 pb 2-0.1.

3.1.3 Extraction de l'ADN plasmidique de 10 colonies de la 1^{ère} transformation

Afin de confirmer la présence du bon vecteur dans les *E. coli*, l'ADN plasmidique a été extrait d'une culture liquide. 10 colonies des plaques de la transformation ont été choisies pour inoculer du milieu LB pendant une nuit à 37 °C. L'extraction a été réalisée grâce au kit *Plus SV Mini preps DNA Purification System* (2.2.11). Une digestion a ensuite été effectuée avec l'enzyme *Bgl*II.

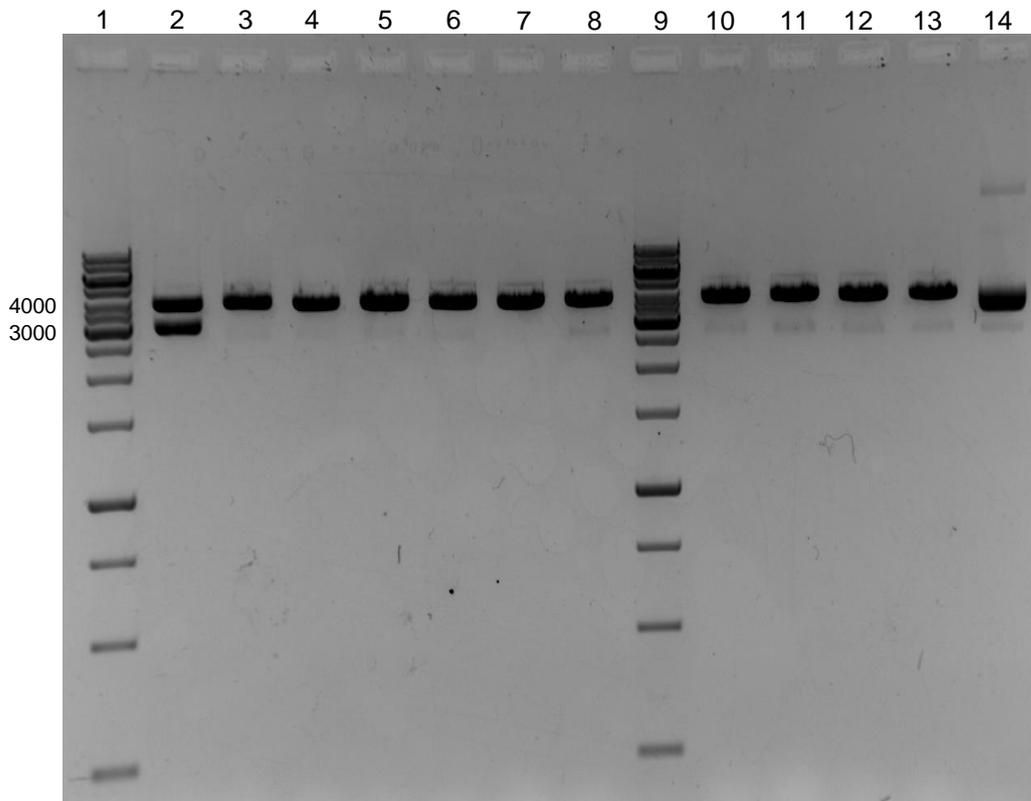


Figure 18 : Restriction des clones sélectionnés sur les plaques de transformation
1 et 9 : marker 1 kb ; 2 : pHEV101 + *Bgl*II ; 3-8 et 10-13 : ADN extrait des colonies + *Bgl*II ;
14 : clone du puits 3 non coupé

Le puits 2 montre deux bandes distinctes. L'une se situe à 4000 pb et l'autre vers 3000 pb. Elles correspondent aux tailles attendues pour pHEV101. Les puits 3-8 et 10-13 montrent tous une bande qui se trouve à 4000 pb. Cela indique clairement que la transformation a fonctionné et que toutes les colonies testées contenaient le bon insert de 4073 pb (l'origine de répllication de *Bacillus subtilis* n'existe plus). Le puits 14 est là pour être certain que l'ADN plasmidique a bien été digéré. Il contient l'ADN plasmidique extrait non digéré. Ce puits a une fine bande au-dessus du marker. On remarque que cette bande a disparu des puits contenant l'ADN digéré. Cela signifie que la digestion a eu lieu et que toutes les bandes visibles à 4000 pb sont celles de l'ADN linéarisé.

Sachant que l'ADN extrait était celui qui était recherché, l'étape suivante d'insertion de l'adaptateur a pu être entreprise.

3.1.4 Ligation du vecteur 4073 pb avec l'adaptateur et 2^e transformation des cellules *E. coli XL1-Blue MRF*

Le vecteur de 4073 pb reliqué sur lui-même a été obtenu pour toutes les colonies sélectionnées. Il y avait donc le choix pour choisir un des ADN plasmidiques extraits pour continuer le travail. L'ADN plasmidique choisi pour effectuer la prochaine ligation était celui du puits 7 de la Figure 18. L'adaptateur devait être ajouté par ligation à l'ADN extrait. L'adaptateur représente un petit multiple cloning site, abrégé MCS (Annexe 9.4).

Le vecteur de 4073 pb reliqué a été digéré avec *Bgl*II afin de l'ouvrir en préparation de l'ajout de l'adaptateur. Divers ratios d'adaptateur-vecteur ont été utilisés afin d'optimiser les chances de la ligation (2.2.6). Une fois les 2 heures de ligation passées, une transformation par électroporation a été réalisée avec les cellules *E.coli XL1-blue MRF* (2.2.7). Comme pour la première transformation, les cellules ont été étalées sur des plaques contenant de l'ampicilline et incubées à 37 °C. Le reste des cellules a été concentré avant la mise sur plaques. Afin d'obtenir une culture pure, des colonies ont été repiquées sur de nouvelles plaques. Le milieu liquide a ensuite pu être ensemencé avec une colonie isolée.

Tableau 7 : Résultats de la 2^e transformation

Noms des plaques de Pétri	Nbr. de colonies
80 ng 1 :1	>300
80 ng 5 :1	>300
80 ng 20 :1	>300
120 ng 1 :1	>300
120 ng 5 :1	>300
120 ng 20 :1	>300
CP	>300
CN	0

Pour les six différentes ligations le nombre de colonies est supérieur à 300. Le contrôle positif contient aussi beaucoup de colonies et rien n'est visible pour le contrôle négatif.

Une colonie a été prélevée sur chacune des plaques 80 ng 1 :1, 120 ng 1 :1 et 120 ng 5 :1. Deux colonies ont été choisies sur les plaques 80 ng 5 :1, 80 ng 20 :1 et 120 ng 20 :1. Cela donne un total de neuf colonies repiquées.

3.1.5 Extraction de l'ADN plasmidique de 9 colonies de la 2^e transformation

L'ADN plasmidique a été extrait de chacune des neuf cultures préparées avec les colonies isolées. Étant donné le nombre important d'ADN à extraire et le coût assez élevé du kit *Plus SV Mini preps DNA Purification System*, l'extraction a été réalisée avec la méthode CTAB (2.2.11). La pureté finale de l'ADN plasmidique n'est pas aussi élevée qu'avec le kit, mais pour effectuer les restrictions, cela ne constitue pas un problème. La digestion des ADN plasmidiques a été effectuée avec l'enzyme *HpaI* qui coupe une fois et uniquement dans l'adaptateur. Cela permettait de s'assurer de la présence de l'insert dans le vecteur.

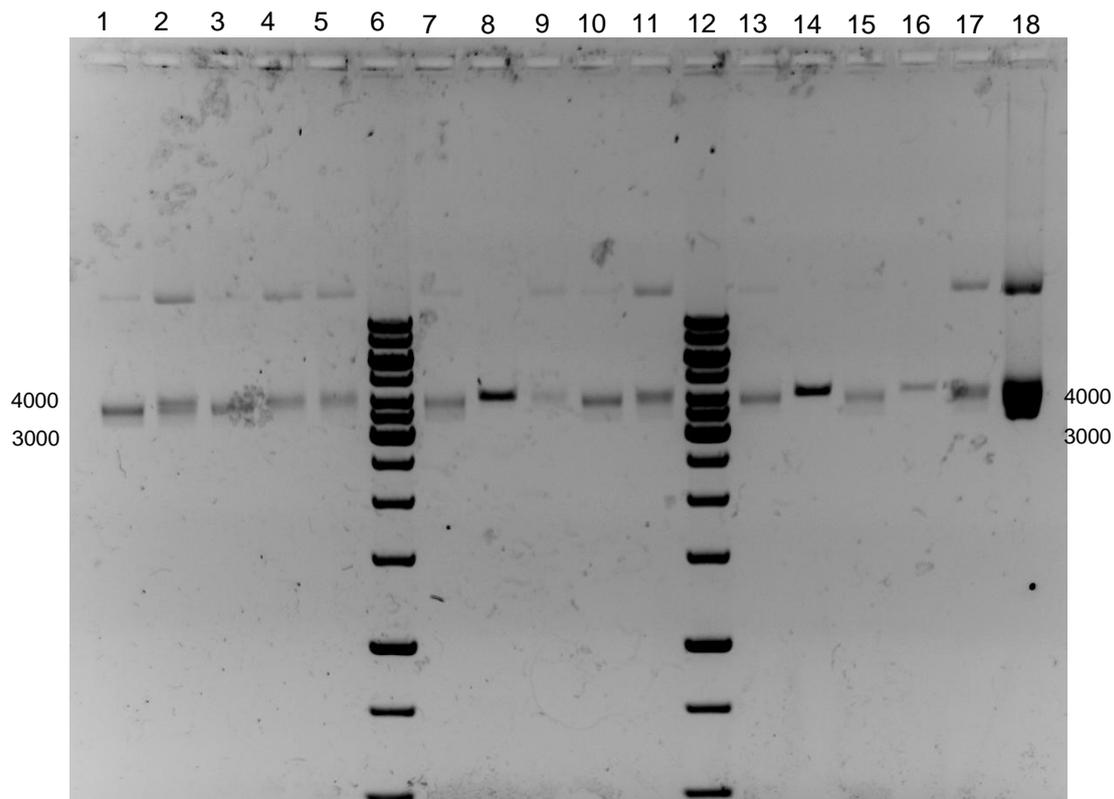


Figure 19 : Restriction des clones sélectionnés sur les plaques de transformation

80 ng 1 :1 non coupé ; 2 : 80 ng 1 :1 + *HpaI* ; 3 : 80 ng 5 :1¹ non coupé ; 4 : 80 ng 5 :1¹ + *HpaI* ; 5 : 80 ng 5 :1² + *HpaI* ; 6 : marker 1 kb ; 7 : 80 ng 20 :1¹ non coupé ; 8 : 80 ng 20 :1¹ + *HpaI* ; 9 : 80 ng 20 :1² + *HpaI* ; 10 : 120 ng 1 :1 non coupé ; 11 : 120 ng 1 :1 + *HpaI* ; 12 : marker 1 kb ; 13 : 120 ng 5 :1 non coupé ; 14 : 120 ng 5 :1 + *HpaI* ; 15 : 120 ng 20 :1¹ non coupé ; 16 : 120 ng 20 :1¹ + *HpaI* ; 17 : 120 ng 20 :1² + *HpaI* ; 18 : vecteur 4073 pb reliqué + *HpaI*

Le ¹ ou ² signifie que c'est la première et deuxième colonie prélevée sur la même plaque

Pour tous les puits ayant l'appellation « non coupé », on remarque une bande plus ou moins forte qui se situe au-dessus du marker. Pour ces puits, une deuxième bande plus prononcée est présente entre 3000 et 4000 pb. Les puits 2, 4, 5, 9, 11 et 17 ont l'appellation « + *HpaI* », mais on observe des bandes similaires aux puits dit « non coupés ». Cela veut dire que l'ADN extrait n'est pas celui souhaité, car il ne

contient pas l'adaptateur (par conséquent par de site *HpaI*). Une différence est visible aux puits 8, 14 et 16. Ceux-ci se nomment aussi « + *HpaI* », mais la bande au-dessus du marker n'existe plus. Une seule marque est visible légèrement au-dessus de 4000 pb. En comparaison avec les puits 7, 13 et 15 (ADN non coupé) qui ont une bande au-dessus du marker, la digestion de l'ADN est visible. Il est aussi possible de comparer le résultat des puits 8, 14 et 16 avec le puits 18. Ce dernier contient l'ADN du vecteur de 4073 pb digéré avec *HpaI*. Il présente aussi une bande au-dessus du marker comme pour les autres puits contenant l'ADN non coupé. Cela démontre que ce vecteur ne contient pas de site *HpaI* et que l'ADN des puits 8, 14 et 16 est différents de celui du vecteur 4073 pb.

Afin de confirmer le résultat de la Figure 19, deux des trois ADN positifs (puits 8 et 14) ont été digérés avec d'autres enzymes (Tableau 8). L'ADN 80 ng 20 :1¹ a été digéré avec les enzymes suivantes :

- *HpaI*
- *HpaI* + *NdeI*
- *NcoI*
- *NotI*

L'ADN 120 ng 5 :1 a été digéré avec les enzymes suivantes :

- *HpaI*
- *HpaI* + *NdeI*
- *NcoI*

Pour vérifier si les ADN plasmidiques extraits contenaient vraiment le bon produit, le vecteur de 4073 pb reliqué sur lui-même a également été coupé. La digestion a été réalisée avec les mêmes enzymes que l'ADN 120 ng 5 :1 (soit *HpaI*, *HpaI* + *NdeI* et *NcoI*).

Pour ces trois ADN, la forme non coupée a également été mise sur gel afin d'avoir une comparaison entre l'ADN non coupé et coupé. Le résultat de ces digestions est présenté à la Figure 20 et les fragments théoriques dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Taille théorique des fragments après restriction

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
80 ng 20 :1 ¹ (4105 pb)	<i>HpaI</i>	4105	2103
80 ng 20 :1 ¹ (4105 pb)	<i>HpaI</i> + <i>NdeI</i>	594, 3511	1509, 2103
80 ng 20 :1 ¹ (4105 pb)	<i>NcoI</i>	624, 1119, 2362	326, 1445, 2069
80 ng 20 :1 ¹ (4105 pb)	<i>NotI</i>	4105	2088

Suite du Tableau 8

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
120 ng 5 :1 (4105 pb)	<i>HpaI</i>	4105	2103
120 ng 5 :1 (4105 pb)	<i>HpaI</i> + <i>NdeI</i>	594, 3511	1509, 2103
120 ng 5 :1 (4105 pb)	<i>NcoI</i>	624, 1119, 2362	326, 1445, 2069
vecteur reliqué (4073 pb)	<i>HpaI</i>	pas coupé	pas de site
vecteur reliqué (4073 pb)	<i>HpaI</i> + <i>NdeI</i>	4073	1509
vecteur reliqué (4073 pb)	<i>NcoI</i>	624, 1119, 2330	326, 1445, 2069

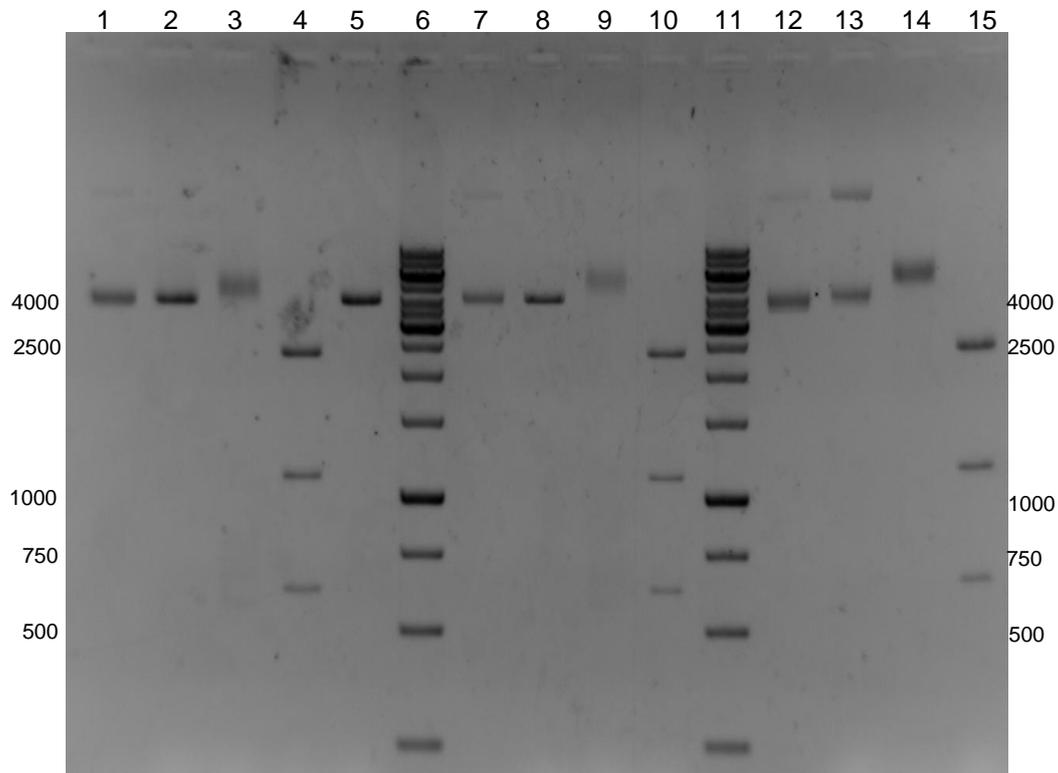


Figure 20 : Restrictions supplémentaires pour vérification des ADN plasmidiques

1 : 80 ng 20 :1¹ non coupé ; 2 : 80 ng 20 :1¹ + *HpaI* ; 3 : 80 ng 20 :1¹ + *HpaI* + *NdeI* ; 4 : 80 ng 20 :1¹ + *NcoI* ; 5 : 80 ng 20 :1¹ + *NotI* ; 6 : marker 1 kb ; 7 : 120 ng 5 :1 non coupé ; 8 : 120 ng 5 :1 + *HpaI* ; 9 : 120 ng 5 :1 + *HpaI* + *NdeI* ; 10 : 120 ng 5 :1 + *NcoI* ; 11 : marker 1 kb ; 12 : vecteur 4073 pb reliqué non coupé ; 13 : vecteur 4073 pb reliqué + *HpaI* ; 14 : vecteur 4073 pb reliqué + *HpaI* + *NdeI* ; 15 : vecteur 4073 pb reliqué + *NcoI*

Les puits 1, 7, 12 et 13 contiennent tous deux bandes. La première se situe au-dessus du marker et est difficilement visible, sauf pour le puits 13 où elle est plus foncée. La deuxième est à la hauteur des 4000 pb. Les puits 2, 5 et 8 n'ont qu'une

bande qui se trouve légèrement au-dessus des 4000 pb. C'était le résultat attendu, puisque *HpaI* et *NotI* coupent une fois dans l'adaptateur. Trois marques sont présentes dans chacun des puits 4 et 10. Elles se situent respectivement entre 2000 et 2500 pb pour la première, un peu au-dessus de 1000 pb pour la deuxième et 600 pb pour la dernière. Ces tailles pratiques sont proches des théoriques (Tableau 8) et elles confirment que l'ADN digéré est bien le nouveau vecteur navette. A chacun des puits 3, 9 et 14, une bande floue est visible vers 5000 pb. Celle-ci a été utilisée en parallèle avec *HpaI* afin que l'ADN soit coupé en deux endroits. Il y aurait théoriquement du avoir deux fragments sur le gel. Au puits 14, le vecteur 4073 pb aurait du être coupé une fois par *NdeI* et le fragment se situer par conséquent à 4073 pb. Cependant, seule la bande floue est présente et pas à la bonne hauteur dans le gel. Un problème avec la capacité de restriction de l'enzyme peut être mis en avant. Il serait peut-être nécessaire d'effectuer une digestion une nuit entière à 37 °C au lieu de deux heures. Au puits 13, on voit clairement que l'ADN du vecteur 4073 pb n'a pas été coupé. Une bande est visible au-dessus du marker comme pour le puits 12 qui contient l'ADN non coupé. Ce résultat est normal étant donné que ce vecteur n'avait pas de site de restriction *HpaI*. Pour le puits 15, les bandes sont décalées vers le haut, mais elles correspondent tout de même à celles des puits 4 et 10. En effet, dans ces puits, la seule bande qui devait changer de taille par rapport au puits 15 était celle de 2330 pb du vecteur 4073 pb. Elle devait se transformer en 2362 pb, mais la différence est trop minime pour qu'elle se voie sur le gel. Etant donné que la digestion des deux ADN extraits a fourni les fragments attendus, il est possible de dire que l'on est en présence du nouveau vecteur. Celui-ci contient donc l'adaptateur nécessaire à l'insertion de l'origine de réplication pour *P. damnosus* et a été nommé pHEV104.

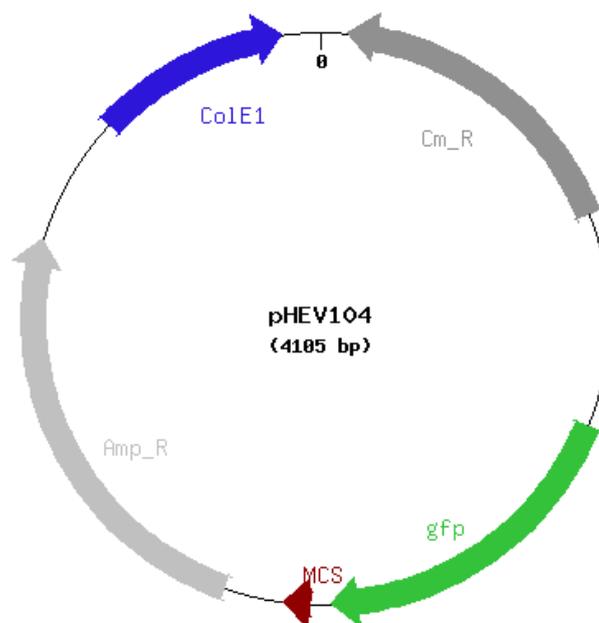


Figure 21 : carte du vecteur navette pHEV104

L'abréviation MCS de la carte du vecteur signifie « multiple cloning site » et représente l'adaptateur.

3.1.6 PCR du plasmide rolling circle p60 avec deux paires d'amorces différentes

Une origine thêta de *P. damnosus* DSM 20331 aurait du être utilisée à la place du système de réplication d'un plasmide rolling circle. Malheureusement, après séquençage, un insert à l'intérieur du gène *repA* a été découvert. Il est possible que cet insert ait une signification pour la souche de *P. damnosus*. Il faut tout de même souligner que la séquence de l'origine de réplication qui était attendu est normalement celle du plasmide pWCFS103 de *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Il n'était par conséquent pas du tout certain que l'origine de réplication thêta soit fonctionnelle. Ne connaissant pas la provenance de cet insert et son impact, il a été décidé de choisir d'amplifier le plasmide rolling circle p60.

Une PCR avec les deux paires d'amorces (Annexe 9.7) a été réalisée avec le système Expand High Fidelity PCR. Cela optimise les chances de réussite de la PCR lorsque de grands fragments doivent être obtenus. Etant donné la taille de 3298 pb de la séquence du rolling circle plasmide p60, il était judicieux de choisir ce système. Son mélange d'enzyme possède une activité de correction 3'→ 5' qui réduit largement le taux d'erreurs de la polymérase. Des bases adénosine sont également ajoutées à chaque extrémité 3' du produit PCR. Cela permet de simplifier le clonage dans le vecteur pGEM-T easy et d'augmenter le taux de réussite lors de la transformation.

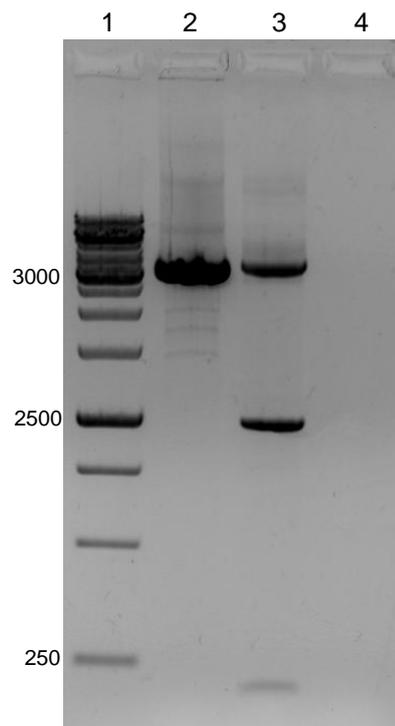


Figure 22 : PCR plasmide rolling circle p60
1: marker 1 kb; 2: PCR avec primer 1512;
3 : PCR avec primer 2939 ; 4 : contrôle négatif avec primer 1512

Il est possible de constater que la réaction a fonctionné. Pour le produit PCR avec les primers 2939-F et 2938-R (puits 3), il y a même deux bandes foncées ; celle attendue vers 3300 pb et une autre vers 2500 pb. Il semble aussi qu'il y ait d'autres bandes faibles au-dessus des 3300 pb. Pour la PCR faite avec 1512-F et 1511-R (puits 2), la bande à 3300 pb est très marquée. Il existe cependant de nombreuses bandes claires en amont et en aval. Par conséquent, il a été nécessaire de découper la bande d'intérêt de chaque puits (3300 pb) et de la purifier. Le contrôle négatif ne contient aucune bande, ce qui signifie qu'il n'y a pas eu de contamination par un autre ADN.

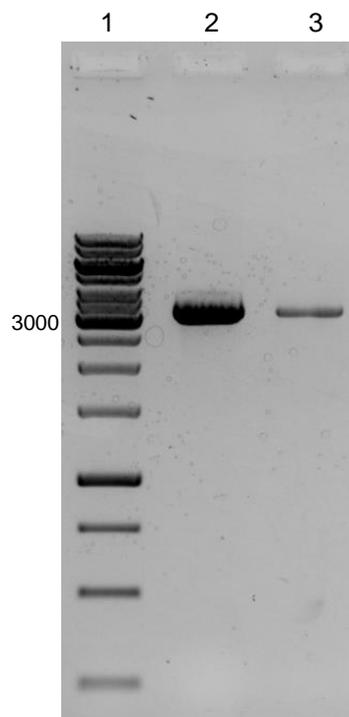


Figure 23 : Purification des produits PCR

1 : marker 1 kb ; 2 : bande PCR avec primer

1512 purifiée ; 3 : bande PCR avec primer 2939 purifiée

Au puits 2, une très forte bande est visible. Il est difficile de donner sa taille, mais elle se trouve entre 3000 et 3500 pb. Une bande beaucoup plus faible est présente au puits 3, mais sa localisation est similaire à celle du puits 2.

La purification a bien fonctionné, car seule la bande à 3300 pb est présente et, de plus, peu de produit a été perdu par cette étape. Les bandes de la Figure 22 et 23 ne peuvent pas être comparées directement, car les volumes chargés n'étaient pas similaires. Cependant, en calculant approximativement la concentration présente dans les tubes grâce au marker, il est possible de constater une faible perte d'ADN due à la purification. Néanmoins, il est clairement visible que la concentration pour le produit PCR 2 (primer 2939) est beaucoup plus faible que celle du produit PCR 1 (primer 1512).

3.1.7 Ligation des produits PCR avec le vecteur pGEM-T easy et 3^e transformation des cellules *E. coli XL1-Blue MRF*

Une fois les produits PCR purifiés, l'étape suivante était de les insérer dans le vecteur pGEM-T easy. Celui-ci a été coupé et une base thymine a été ajoutée à chacune des extrémités 3'. Grâce au système Expand High Fidelity PCR, les produits obtenus contiennent une base adénosine aux extrémités 3'. En suivant le protocole donné par le fournisseur du pGEM-T easy, les différentes ligations ont donc été incubées toute la nuit au réfrigérateur. La transformation a été effectuée avec des *E. coli XL1-Blue MRF* rendues chimiquement compétentes par chlorure de calcium. L'insertion de l'ADN plasmidique a eu lieu par choc thermique. Comme pour l'électroporation, les cellules transformées ont été incubées 1 h à 37 °C avec agitation avant d'être étalées sur plaques. Afin d'obtenir une culture pure, des colonies obtenues ont été repiquées sur de nouvelles plaques. Le milieu liquide a ensuite pu être ensemencé avec une colonie isolée.

**Rappel : l'appellation p60 A désigne le produit PCR (rolling circle p60) obtenu avec le primer 2939-F et 2938-R. L'appellation p60 B désigne le produit PCR obtenu avec les primers 1512-F et 1511-R.

Tableau 9 : Résultats de la 3^e transformation

Noms des plaques de Pétri	Nbr. de colonies blanches	Nbr. de colonies bleues
p60 B + pGEM-T 2 :1 non concentré	60	0
p60 B + pGEM-T 2 :1 concentré	>300	0
p60 B + pGEM-T 1 :2 non concentré	51	0
p60 B + pGEM-T 1 :2 concentré	>300	0
p60 A + pGEM-T 1 :1 non concentré	85	0
p60 A + pGEM-T 1 :1 concentré	>300	0
p60 A + pGEM-T 1 :2 non concentré	38	0
p60 A + pGEM-T 1 :2 concentré	>300	0
CP promega concentré	180	7
Background contrôle concentré	0	54
CP	>300	0
CN	0	0

Le contrôle positif pour la vérification de la compétence des cellules montre plus de 300 colonies. Le contrôle négatif ne contient aucune colonie. Le contrôle positif de promega a donné 180 colonies blanches et 7 colonies bleues. Pour le background

contrôle, aucune colonie blanche n'a poussé contre 54 colonies bleues. Toutes les plaques avec le produit de ligation n'ont pas eu de colonies bleues. Pour les plaques non concentrées, le nombre de colonies blanches varient entre 38 et 85. Par contre, toutes les plaques concentrées contiennent plus de 300 colonies. La transformation par la méthode de CaCl₂ a donc très bien fonctionné.

Trois colonies de la plaque p60 B + pGEM-T 2 :1 non concentré ont été repiquées et ensemencées en culture liquide. Deux colonies ont été prélevées sur la plaque p60 B + pGEM-T 1 :2 non concentré et sur la plaque p60 A + pGEM-T 1 :1 non concentré. Trois colonies ont également été repiquées depuis la plaque p60 A + pGEM-T 1 :2 non concentré.

3.1.8 Extraction de l'ADN plasmidique de 10 colonies de la 3^e transformation

Par la méthode CTAB, l'ADN plasmidique a été extrait de neuf cultures seulement, car une des colonies repiquée n'a pas permis d'obtenir une croissance en milieu liquide. La digestion des ADN plasmidiques a été effectuée avec l'enzyme *XmnI* qui coupe une fois dans le pGEM-T easy et une fois dans l'insert (le p60)

Tableau 10 : taille théorique des fragments après restriction avec *XmnI*

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
pGEM-T easy + p60 A (6315 pb)	<i>XmnI</i>	3508, 2807	2502, 5309
pGEM-T easy + p60 B (6315 pb)	<i>XmnI</i>	4678, 1637	631, 5309

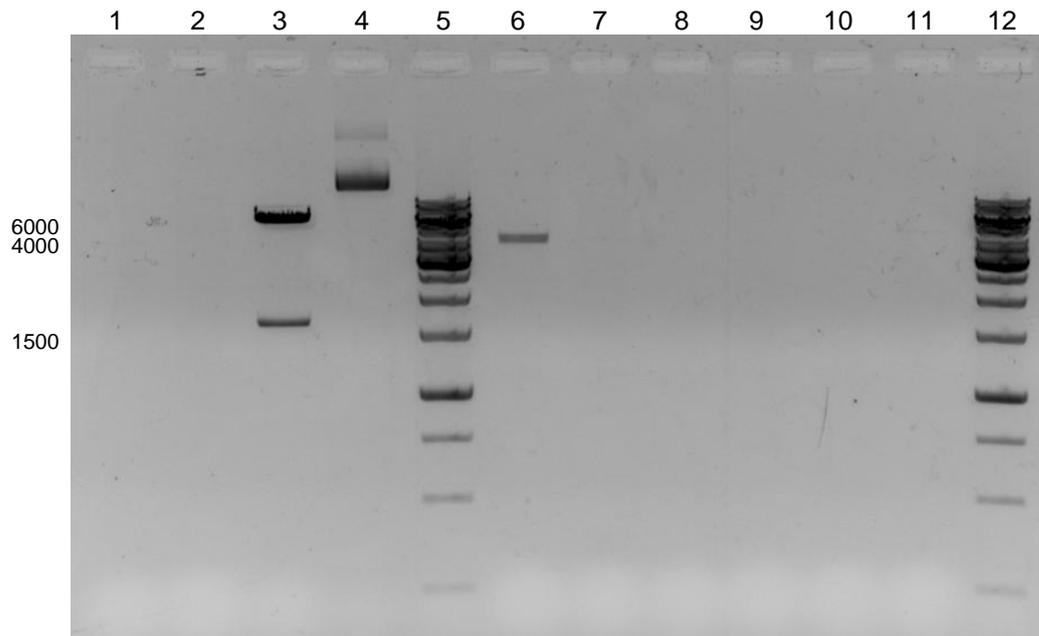


Figure 24 : Restriction des clones sélectionnés sur les plaques de transformation

1 : p60 B + pGEM-T easy¹ + *XmnI*; 2 : p60 B + pGEM-T easy² + *XmnI*; 3 : p60 B + pGEM-T easy³ + *XmnI*; 4 : p60 B + pGEM-T easy³ non coupé ; 5 : marker 1 kb ; 6 : p60 B + pGEM-T easy⁴ + *XmnI*; 7 : p60 B + pGEM-T easy⁵ + *XmnI*; 8 : p60 A + pGEM-T easy¹ + *XmnI*; 9 : p60 A + pGEM-T easy² + *XmnI*; 10 : p60 A + pGEM-T easy³ + *XmnI*; 11 : p60 A + pGEM-T easy⁴ + *XmnI*; 12 : marker 1 kb

Pour les puits 1, 2, 7, 8, 9, 10 et 11, aucune bande n'est visible. Deux marques sont présentes au puits 3 aux environs de 6000 pb et 1600 pb. Au puits 4, deux bandes, toutes deux au-dessus du marker, apparaissent. Par rapport aux bandes du puits 4, il est possible de voir qu'il y a bien eu digestion au puits 3. En effet, les bandes au-dessus du marker n'existent plus. Néanmoins, les marques obtenues ne correspondent pas aux fragments théoriques. La bande de 1637 pb semble être présente au puits 3, mais celle de 4678 n'y est pas. Au niveau des 6000 pb, une marque est très bien visible, mais elle ne devrait normalement pas exister. Par conséquent, ce n'est pas l'ADN plasmidique du nouveau vecteur. Pour le puits 6, une seule marque existe vers 4500 pb. Le fait d'avoir une seule bande au lieu de deux mène à la conclusion que ce n'est pas non plus le bon ADN.

Constatant la non présence de bandes dans la plupart des puits, les ADN plasmidiques extraits ont été concentrés 2.5 fois. Des restrictions ont ensuite été effectuées, mais pour certains ADN, leur concentration s'est révélée encore trop basse empêchant l'observation d'un résultat. Finalement, les ADN provenant de deux colonies ont pu être correctement observés sur gel. Il s'agissait d'une colonie de pGEM-T easy + p60 A et une autre de pGEM-T easy + p60 B. Les restrictions ont été effectuées avec *HpaI*, *BglII* et *NotI*.

Tableau 11 : taille théorique des fragments après restriction avec *HpaI*, *BglII* et *NotI*

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
pGEM-T easy + p60 A (6315 pb)	<i>HpaI</i>	4905, 1410	850, 2260
pGEM-T easy + p60 A (6315 pb)	<i>NotI</i>	3334, 2981	43, 3377
pGEM-T easy + p60 B (6315 pb)	<i>BglII</i>	6315	2752
pGEM-T easy + p60 B (6315 pb)	<i>HpaI</i>	4427, 1888	389, 2277
pGEM-T easy + p60 B (6315 pb)	<i>NotI</i>	3334, 2981	43, 3377

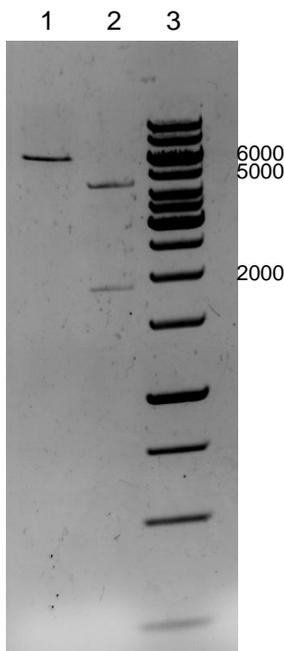


Figure 25 : Restrictions *BglII* et *HpaI*

1: p60 B + pGEM-T easy + *BglII*;
 2: p60 B + pGEM-T easy + *HpaI*;
 3: marker 1kb

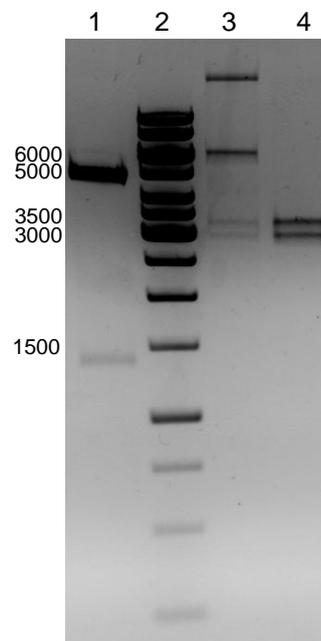


Figure 26 : Restrictions *HpaI* et *NotI*

1: p60 A + pGEM-T easy + *HpaI*; 2: marker 1 kb
 3: p60 B + pGEM-T easy + *NotI*; 4: p60 A + pGEM-T easy + *NotI*

Au puits 1 de la Figure 25, une bande est visible vers 6000 pb. Pour le puits 2, deux bandes sont présentes à respectivement ~ 4500 pb et 1900 pb. Ces marques correspondent bien aux fragments théoriques attendus. Cela indique que cet ADN extrait est celui du pGEM-T contenant l'insert p60 B.

Pour la Figure 26, deux marques apparaissent au niveau du puits 1. La première se situe vers 5000 pb et la deuxième vers 1400 pb. Elles ont une taille proche des fragments indiqués dans le Tableau 11. Le puits 3 montre quatre bandes plus ou moins fortes. La première se trouve au-dessus du marker, la deuxième à ~ 6000 pb, la troisième vers 3300 pb et la dernière à 3000 pb. Cela confirme la présence du bon vecteur, car avec *NotI*, ce sont les tailles attendues. Il est par contre possible de noter que la digestion n'a pas été complète par la présence de la bande au-dessus du marker (vecteur en forme oc) et par celle à 6000 pb (vecteur linéarisé). Le puits 4 présente deux bandes à 3300 et 3000 pb. Comme pour le pGEM-T easy + p60 B du puits 3, ces marques confirment que l'ADN est celui du pGEM-T easy + p60 A.

3.1.9 Ligation du pHEV104 avec le plasmide rolling circle p60 et 4^e transformation des cellules *E. coli* XL1-Blue MRF

Afin d'avoir un vecteur navette qui puisse se répliquer dans *P. damnosus* après sa transformation, il était nécessaire d'insérer une origine de réplication provenant de *P. damnosus* dans le vecteur pHEV104. Cette origine de réplication est présente dans le plasmide rolling circle p60 qui a été amplifié par PCR, puis cloné dans le vecteur pGEM-T easy. Ayant récupéré par restriction le fragment contenant le p60 (avec l'enzyme *NotI*), celui-ci a ensuite été inséré dans le pHEV104 au niveau de l'adaptateur (plus précisément au niveau du site de restriction *NotI*). Afin d'éviter une religation du pHEV104 sur lui-même, celui-ci a été traité avec de l'antartique phosphatase, ce qui a permis d'enlever les groupes phosphates.

Grâce à la PCR réalisée avec les deux paires de primers, deux fragments p60 étaient à disposition : le p60 A et le p60 B. Chacun de ces fragments devait être inséré dans le pHEV104 afin d'obtenir deux vecteurs navettes.

La transformation a été effectuée avec des *E. coli* XL1-Blue MRF rendues chimiquement compétentes par chlorure de calcium. L'insertion de l'ADN plasmidique a eu lieu par choc thermique. Les cellules transformées ont été incubées 1 h à 37 °C avec agitation avant d'être étalées sur plaques. Afin d'obtenir une culture pure, des colonies obtenues ont été repiquées sur de nouvelles plaques. Le milieu liquide a ensuite pu être ensemencé avec une colonie isolée.

Des colonies ont été obtenues pour les deux types de ligations : pHEV104 + p60 A et pHEV104 + p60B. Pour chacune de ces transformations, 10 colonies ont été prélevées sur plaques et isolées sur de nouvelles plaques. Les colonies isolées obtenues ont été ensemencées dans du milieu liquide afin de pouvoir réaliser ensuite l'extraction.

3.1.10 Extraction de l'ADN plasmidique de 20 colonies de la 4^e transformation

Par la méthode CTAB, l'ADN plasmidique a été extrait des vingt cultures. La digestion des ADN a été effectuée avec l'enzyme *HpaI* qui coupe deux fois dans l'insert p60 et une fois dans le vecteur navette pHEV104. Il est à relever que l'insert pouvait être positionné dans deux directions. La taille des fragments pouvaient donc différer en fonction de l'orientation de l'insert.

Tableau 12 : taille théorique des fragments après restriction avec *HpaI*

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
pHEV104+ p60 A (7439 pb) orientation 1	<i>HpaI</i>	1132, 1410, 4897	2895, 4305, 5437
pHEV104+ p60 A (7439 pb) orientation 2	<i>HpaI</i>	822, 1410, 5207	3205, 4615, 5437
pHEV104 + p60 B (7439 pb) orientation 1	<i>HpaI</i>	1115, 1888, 4436	2434, 4322, 5437
pHEV104 + p60 B (7439 pb) orientation 2	<i>HpaI</i>	361, 1888, 5190	3188, 5076, 5437

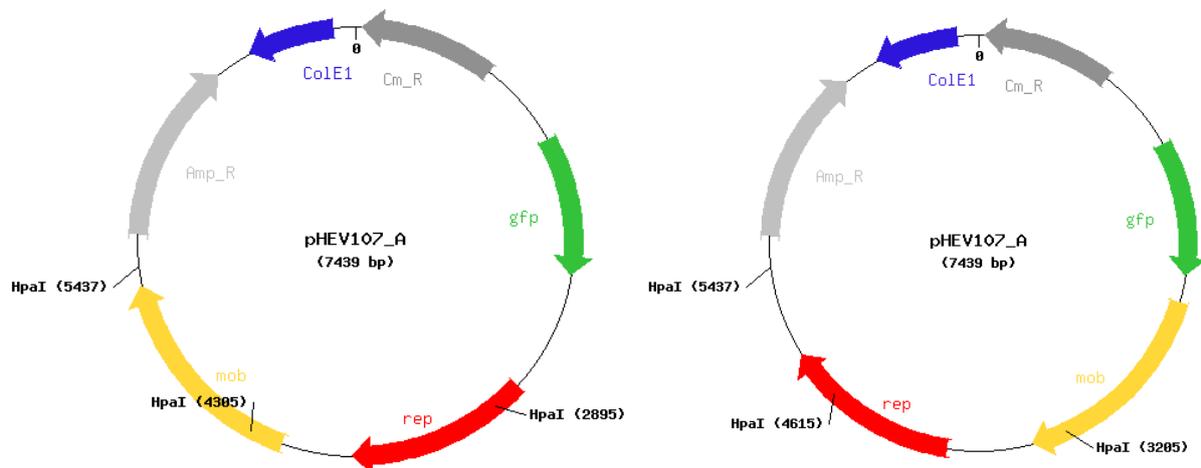


Figure 27 : carte des vecteurs navettes pHEV107 A avec sites de restriction *HpaI* : de gauche à droite, orientation 1 - orientation 2 [21]

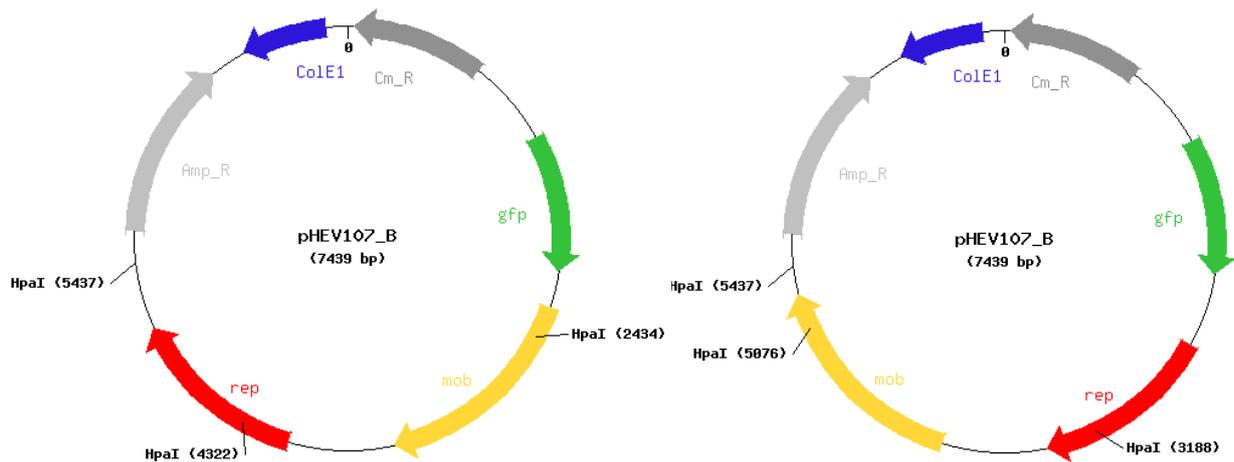


Figure 28 : carte des vecteurs navettes pHEV107 B avec sites de restriction *HpaI* : de gauche à droite, orientation 1 - orientation 2 [21]

Dix ADN ont été extraits pour le supposé pHEV107 A et dix autres pour le supposé pHEV107 B. Des vingt ADN extraits, les mêmes résultats ont été obtenus. C'est pourquoi, seule une partie des gels est présentée. A signaler que suite au résultat de la Figure 29, vingt autres ADN du supposé pHEV107 B ont été extraits et digérés avec *HpaI*. Le gel n'est pas présent, car il a également fourni le même profil de bandes que la Figure 29.

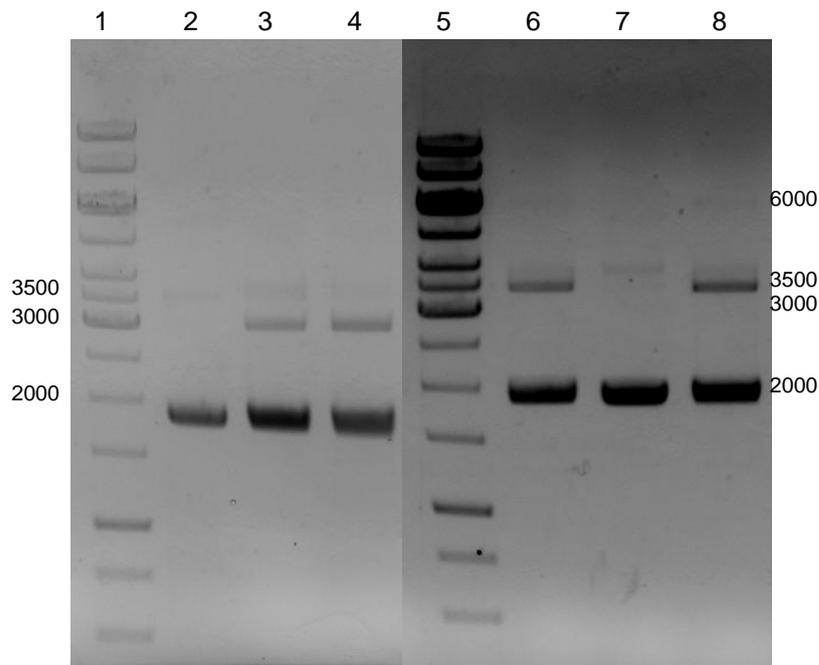


Figure 29 : Restrictions *HpaI* sur supposé pHEV107 A et B
 1 : marker 1 kb ; 2 : pHEV107 A non coupé ; 3 : pHEV107 A + *HpaI*
 4 : idem à 3 ; 5 : marker 1 kb ; 6 : pHEV107 B + *HpaI* ; 7 : pHEV107 B non coupé ; 8 : idem à 6

Pour tous les puits, une bande forte est présente en dessous de 2000 pb. Par rapport au puits 2, une bande de 3000 pb semble être apparue aux puits 3 et 4. Par contre, la marque à 3500 pb est présente dans les trois puits. Cela donne l'impression que la marque à 3000 pb provient du fait de la restriction, même si cela ne peut pas être garanti. Les bandes des puits 6 et 8 sont similaires. Une légère bande est présente à 6000 et à 3700 pb. Une plus foncée est visible un peu en dessous de 3500 pb. Le puits 7 ne semble par contre pas avoir cette bande à 3500 pb. La situation entre l'ADN coupé et non coupé est similaire pour le pHEV107 A et B. Une marque supplémentaire est arrivée avec la digestion des ADN. Il est en tout cas possible de dire que les ADN extraits ne sont pas ceux recherchés étant donné que les bandes du gel ne correspondent pas à celles qui étaient attendues. Le pHEV107 A et B n'ont pas été formés par la ligation.

Cependant, la situation n'étant pas très claire, il a été décidé de couper un des ADN extrait de pHEV107 A et B par trois enzymes : *NotI* (devrait couper 2x), *BglII* (devrait couper 3x) et à nouveau *HpaI*. De plus, le pHEV104 a également été digéré par ces mêmes enzymes pour vérifier que les ADN extraits ne sont pas le pHEV104 reliqué. Afin de s'assurer de la présence des sites de restrictions sur le p60, le clone réalisé par Stéphane Dumas [23] a été coupé (pZErO-2 contenant l'insert p60) avec *BglII*, *HpaI* et *XhoI* (tous coupant au moins une fois à l'intérieur de l'insert). *BglII* possède un site de restriction dans l'insert et un site sur le pZErO-2 ; la situation est similaire pour *XhoI*. *HpaI* est présent deux fois sur l'insert, mais pas sur le pZErO-2.

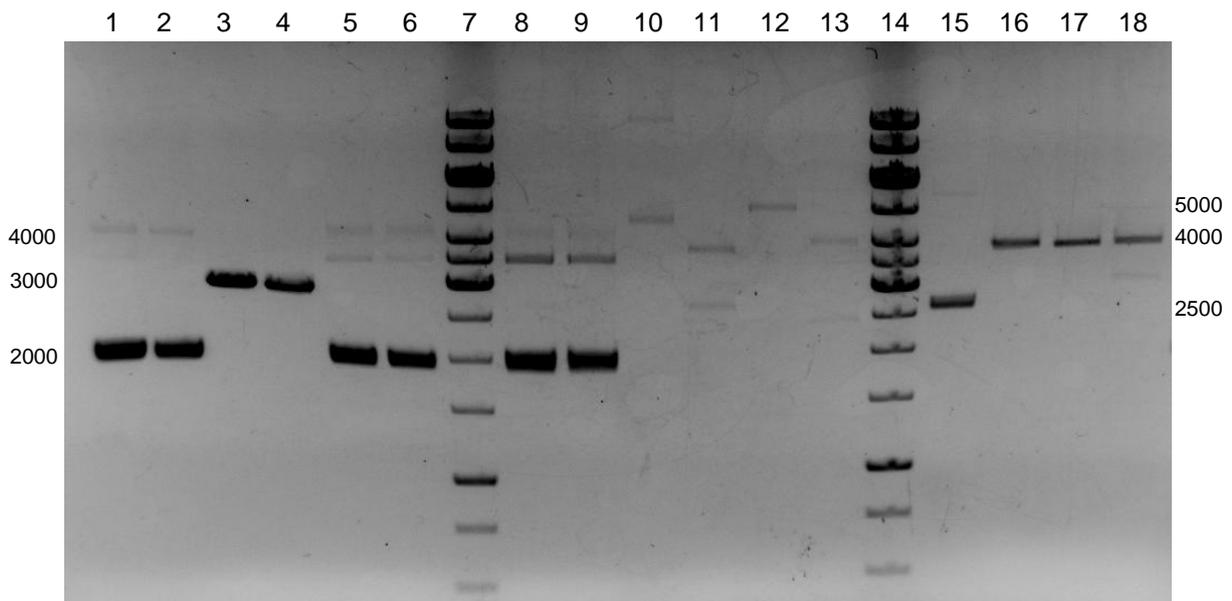


Figure 30 : Restrictions des supposés pHEV107 A et B, du pZErO-2 - p60, du pHEV104
 1 : pHEV107 A non coupé ; 2 : pHEV107 B non coupé ; 3 : pHEV107 A + *NotI* ; 4 : pHEV107 B + *NotI* ; 5 : pHEV107 A + *BglII* ; 6 : pHEV107 B + *BglII* ; 7 : marker 1 kb ; 8 : pHEV107 A + *HpaI* ; 9 : pHEV107 B + *HpaI* ; 10 : pZErO-2 - p60 non coupé ; 11 : pZErO-2 - p60 + *BglII* ; 12 : pZErO-2 - p60 + *HpaI* ; 13 : pZErO-2 - p60 + *XhoI* ; 14 : marker 1 kb ; 15 : pHEV104 non coupé ; 16 : pHEV104 + *NotI* ; 17 : pHEV104 + *BglII* ; 18 : pHEV104 + *HpaI*

Il est possible de voir que les puits pHEV107 A et B ont exactement le même profil pour les restrictions avec *Bgl*II et *Hpa*I et pour la forme non coupée (puits 1, 2, 5, 6, 8 et 9). La même bande forte est présente à environ 2000 pb. Deux autres marques sont présentes un peu au-dessus de 4000 pb et au niveau des 3500 pb. La situation est beaucoup plus claire qu'à la Figure 29. Aucune digestion n'a eu lieu avec les deux enzymes citées ci-dessus, car le profil est le même que pour l'ADN non coupé. Par contre, avec *Not*I, une digestion a eu lieu et la bande linéarisée est de la taille de 3000 pb. Il est donc confirmé que les ADN extraits ne sont pas ceux du pHEV107 A et B. Ce ne sont pas non plus ceux du pHEV104 qui se serait reliqué, car le profil des bandes n'a rien en commun avec celui du vecteur digéré (puits 16, 17, 18). Il ne s'agit pas non plus d'un problème dans le séquençage du p60. En effet, le clone contenant cet insert a montré la bonne taille des fragments après restrictions. Les sites *Bgl*II et *Hpa*I sont donc bien présents sur le p60.

Il reste néanmoins le fait qu'une digestion a eu lieu avec *Not*I. En regardant la taille de 3000 pb de la bande, une possibilité a été envisagée. Après avoir coupé le pGEM-T easy contenant le p60 par *Not*I, deux fragments se sont retrouvés sur le gel (Figure 26) ; le fragment du p60 et le fragment du pGEM-T easy. Ce dernier faisait justement 3000 pb. Les tailles des deux fragments étant proches, il est possible qu'en coupant la bande de 3300 pb, une partie de la 3000 pb ait été prélevée. Il est envisageable que le fragment du pGEM-T easy se soit reliqué et ait été introduit dans les *E. coli* lors de la transformation. Pour confirmer cette hypothèse, les deux ADN pris pour les restrictions ci-dessus ont été digérés avec des enzymes présentes dans le pGEM-T easy : à savoir *Nco*I et *Pvu*II.

Tableau 13 : taille théorique des fragments après restriction avec *Nco*I et *Pvu*II

Vecteur	Enzyme de restriction	Taille des fragments (pb)	Emplacement des sites de restriction (pb)
pGEM-T easy reliqué (2981 pb)	<i>Nco</i> I	2981	37
pGEM-T easy reliqué (2981 pb)	<i>Pvu</i> II	417, 2564	307, 2871

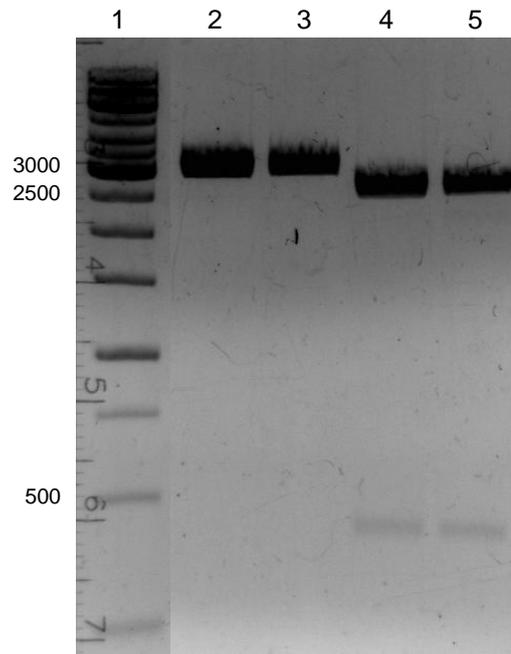


Figure 31 : Restrictions du pGEM-T religué avec *Nco*I et *Pvu*II
 1 : marker 1 kb ; 2 : pGEM-T easy religué A + *Nco*I ; 3: pGEM-T easy religué B + *Nco*I ; 4 : pGEM-T easy religué A + *Pvu*II ; 5 : pGEM-T easy religué B + *Pvu*II

Les puits 2 et 3 montrent une bande à 3000 pb. Elles correspondent au fragment théorique attendu de 2981 pb. Deux marques sont visibles aux puits 4 et 5, se situant à 2500 pb et 420 pb. Ces deux bandes confirment également les tailles théoriques du Tableau 13.

Grâce à ces restrictions, le constat est clair. Les ADN extraits suite aux transformations sont ceux du pGEM-T easy religué après avoir été digéré par *Not*I.

3.2 Transformation par électroporation de trois souches de *Pediococcus damnosus*

Comme expliqué dans l'introduction (1.10), l'électroporation a été la méthode testée pour effectuer les transformations de *P. damnosus*. Trois souches différentes ont été choisies, afin d'observer si l'une ou l'autre avait une meilleure capacité de transformation. Les souches utilisées étaient *P. damnosus* DSM 20331, *P. damnosus* NCIMB 10546, *P. damnosus* CCM 3456. Le protocole suivi est celui décrit au point 2.2.9 et qui provient de l'article écrit par Rodríguez et al. [25]. Etant donné que le nouveau vecteur navette avec l'insert p60 n'a pas pu être créé, un test de transformation a été effectué avec le vecteur pGEM-T - p60B. La sélection par antibiotique a été réalisée avec de l'ampicilline à 100 µg/ml.

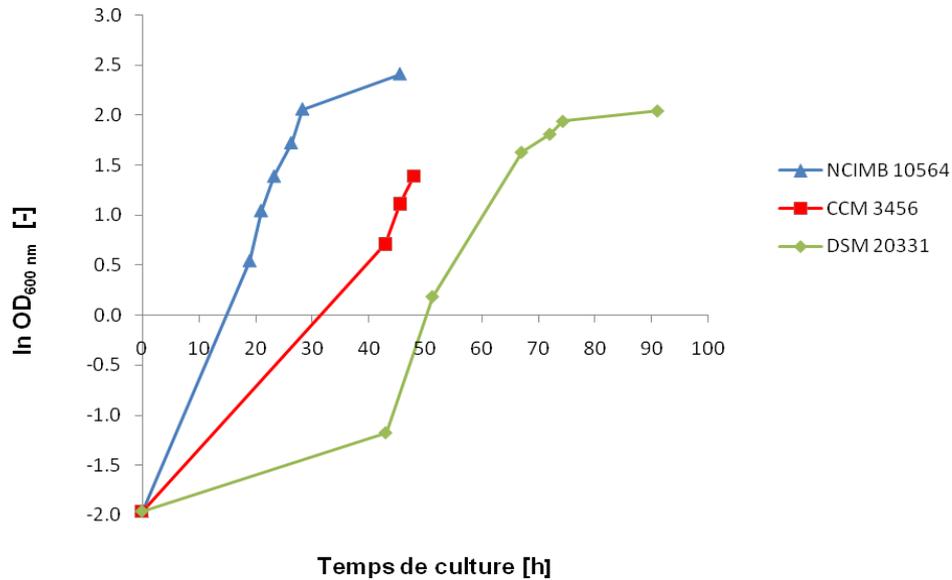


Figure 32 : courbes de croissance des précultures de trois souches de *P. damnosus*

Afin de préparer les cellules électrocompétentes de *P. damnosus*, des précultures de trois souches ont été effectuées (100 µl de cellules depuis le stock - 80 °C dans 10 ml de milieu). Le début de croissance de NCIMB 10564 intervient plus rapidement que chez les deux autres souches ; il n'y a pas de phase de latence. Cependant, n'ayant pas de valeur avant 20 h, il est difficile de le certifier. Le même cas de figure se présente pour CCM 3456. Une phase de latence peut par contre être observée pour DSM 20331. Elle semble durer dans les 40 h. La phase stationnaire commence aux alentours des 30 h pour le NCIMB 10564 et vers 70 h pour la souche DSM 20331. Aucune information n'est disponible à ce sujet pour CCM 3456, car les mesures d'absorbance n'ont pas été relevées au-delà de 48 h.

Les transformations avec le pGEM-T easy – p60 ont été réalisées avec ~ 50 ng d'ADN plasmidique et 80 µl de cellules. Les mêmes volumes et quantités ont été pris pour effectuer les trois transformations : une première avec les cellules de NCIMB 10564, une deuxième avec CCM 3456 et une troisième avec DSM 20331. Après 5 jours d'incubation, aucune colonie n'est apparue sur aucune plaque.

La sensibilité de *P. damnosus* DSM 20331 à l'ampicilline a été testée après les résultats négatifs obtenus lors de la transformation. La concentration de 100 µg/ml dans les plaques était en effet peut-être trop haute pour permettre une croissance de cellules transformées. Les résultats de la Figure 33 sont ceux obtenus après 4 jours de culture de la bactérie dans du milieu MRS Broth pH 5.2 à 30 °C, 150 rpm.

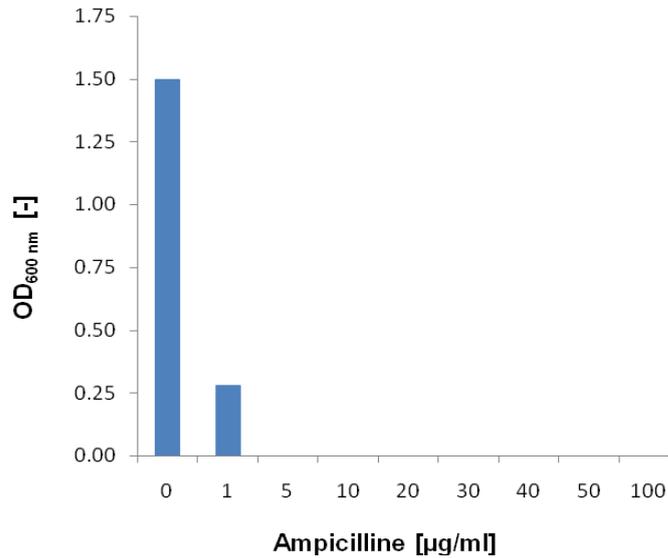


Figure 33 : Sensibilité de *P. damnosus* DSM 20331 à l'ampicilline

Il est possible de voir qu'avec 1 µg/ml d'ampicilline, la croissance de la bactérie est déjà bien diminuée. Avec 5 µg/ml, plus aucune croissance n'a lieu. Pour toutes les autres concentrations supérieures, le constat est le même : inhibition de la croissance de *P. damnosus* DSM 20331.

4. Discussion

4.1 Restriction du pHEV101

Avant d'effectuer la restriction du pHEV101 pour supprimer l'origine de réplication de *Bacillus subtilis*, il a fallu déterminer l'emplacement précis d'un terminateur se situant après le gène codant pour la *gfp*. En effet, il était important de conserver ce terminateur pour s'assurer de la complète et correcte transcription de la *gfp*. Celui-ci se trouve de 2031 pb à 2056 pb (Annexe 9.2). L'enzyme de restriction *Bgl*II avait des chances d'être choisie, car elle coupe à 2075 pb dans le pHEV101. Cette enzyme coupe également après l'ORF-2, ce qui est délimite exactement le fragment du vecteur à éliminer. Néanmoins, le deuxième site de restriction de *Bgl*II se situe à 5156 pb, proche du début du gène *bla* codant pour la résistance à l'ampicilline. L'emplacement du promoteur de ce gène devait être connu afin de ne pas le détruire lors de la restriction du vecteur (Annexe 9.3). Le site de *Bgl*II étant éloigné de plus de 100 pb de la -35 box du promoteur *bla*, il n'y avait pas de risque à utiliser cette enzyme.

4.2 Ligation du fragment 4073 pb et 1ère transformation des cellules *E. coli* XL1-Blue MRF

Une fois le fragment du pHEV101 de 4073 pb isolé, la religation sur lui-même a pu être réalisée. Au début du projet, il avait été décidé d'insérer directement l'adaptateur dans le pHEV101 après sa restriction par *Bgl*II. De multiples tentatives ont été effectuées. Divers ratios molaires d'insert-vecteur ont été utilisés pour la ligation (de 1:1 à 20:1) ainsi que différents temps d'incubation (2 h à température ambiante ou une nuit à 16 °C). Des essais ont également été réalisés soit avec le fragment de 4073 pb traité par de l'antartique phosphatase, soit avec le fragment non traité. Pour la majorité des transformations, aucune colonie n'a pu être obtenue. Il est arrivé d'obtenir une colonie ou deux, mais après avoir digéré l'ADN extrait par diverses enzymes, il s'est avéré qu'aucune colonie ne contenait le nouveau vecteur navette.

Un changement de stratégie a donc été effectué. A la place de vouloir insérer directement l'adaptateur, le fragment de 4073 pb a d'abord été reliqué sur lui-même puis inséré dans des *E. coli* par électroporation.

Deux quantités d'ADN avaient été choisies pour réaliser la religation du fragment 4073 pb : 20 et 40 ng. Au vu des résultats du Tableau 6, il peut être conclu que la ligation avec 40 ng d'ADN a beaucoup mieux fonctionné. Les ng d'ADN pris ensuite pour réaliser l'électroporation n'ont que peu d'influence. Il est donc préférable de tester plusieurs ligations avec différentes quantités d'ADN que de tester plusieurs quantités d'une même ligation lors de l'électroporation.

Lors d'un essai d'électroporation avec les *E. coli XL1-Blue MRF*, le contrôle positif (vecteur navette pHEV101) a été étalé en partie sur une plaque contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et sur une autre contenant du chloramphénicol (5 µg/ml). La question pouvait se poser quand à l'intérêt d'avoir deux résistances à un antibiotique dans le vecteur navette si le chloramphénicol fonctionnait aussi comme sélection pour les *E. coli* transformés. Il est évidemment préférable d'avoir un vecteur de la plus petite taille possible et la suppression de la résistance à l'ampicilline aurait fourni une diminution de taille d'au moins 956 pb. Le test des plaques permettait d'observer si la résistance au chloramphénicol fonctionnait avec les *E. coli*. Après une nuit à 37 °C, la plaque avec l'ampicilline avait beaucoup de colonies et celle avec le chloramphénicol, aucune. Le constat est resté le même après prolongement de l'incubation à un jour et demi. L'expérience a été répétée une deuxième fois et le résultat a été similaire. Il peut donc être conclu que la présence des deux résistances est indispensable à ce vecteur navette. Un point à relever cependant est que le test n'a été réalisé qu'avec des *E. coli XL1-Blue MRF*. Si un grand nombre de souches était testé, le résultat pourrait différer. Plusieurs cultures liquides d'*E. coli XL1-Blue MRF* pourrait également être réalisée en parallèle avec différentes concentrations de chloramphénicol. Ce test permettrait de savoir si cette souche est sensible à cet antibiotique et si oui, à partir de quelle concentration.

4.3 Ligation du vecteur 4073 pb avec l'adaptateur et 2^e transformation des cellules *E. coli XL1-Blue MRF*

Après sélection des clones positifs (fragment de 4073 pb reliqué) et extraction de l'ADN plasmidique, le fragment reliqué a été coupé par *Bgl*II et l'adaptateur ajouté. Plusieurs ligations ont été réalisées afin d'assurer l'insertion de l'adaptateur. Trois ratios molaires d'insert-vecteur ont été choisis : 1 :1, 5 :1 et 20 :1. Il a en effet souvent été constaté qu'avoir une surabondance d'un insert très court augmentait les chances de réussite de la ligation, d'où les tests avec un ratio élevé 20 :1. La première transformation a permis d'obtenir beaucoup de colonies et de trouver l'ADN du nouveau vecteur navette contenant l'adaptateur : le pHEV104. La quantité d'ADN présent lors des ligations n'a pas joué de rôle contrairement à la première transformation. Par contre, les résultats des différents ratios molaires ont confirmé qu'il était nécessaire d'ajouter en excès un très petit insert. Seuls les ratios 5 :1 et 20 :1 ont fourni des colonies ayant l'ADN du nouveau vecteur.

D'après les expériences effectuées, il semblerait donc plus aisé d'insérer un adaptateur en deux étapes plutôt qu'en une seule. Néanmoins, en première expérience, il vaudrait la peine d'essayer d'ajouter un adaptateur directement au fragment isolé. Si le résultat de la transformation se révélait négatif, il serait alors préférable de décomposer l'insertion en deux étapes, comme réalisé dans ce travail.

4.4 PCR du plasmide rolling circle p60 avec deux paires d'amorces différentes

Comme expliqué dans l'introduction, deux diverses paires de primers ont été utilisées. En effet, le but était d'avoir une origine de réplication de *P. damnosus* qui soit fonctionnelle. En utilisant un plasmide de type rolling circle, il est important de garder intact toutes les parties nécessaires à la réplication, dont le gène *rep*, le site d'origine du double brin (dso : « double strand origin ») et le site d'origine du simple brin (sso : « single strand origin »). Ne sachant pas l'emplacement exact du sso, il a été décidé d'amplifier toute la séquence du p60 et les deux paires d'amorces ont été disposées de manière à ne pas détruire le cadre de lecture du gène *rep* et *mob* ni celui du site dso. La séquence du plasmide p60 étant connue, la taille de la bande à obtenir par PCR devait être de 3298 pb.

Le choix de la température d'annealing a été dicté par les températures de fusion des amorces. Celles-ci se situant aux alentours des 62 °C, la température d'annealing utilisée était de 55 °C. Malheureusement, cette PCR n'a fourni aucun résultat. Il a donc été décidé de réduire la température à 50 °C. Grâce à cette modification, la bande d'intérêt est apparue et ce pour les deux paires de primers. Il est à noter que cette température d'annealing assez basse a donné d'autres bandes que celles attendues (Figure 22). Cela n'a cependant pas porté à conséquence, car un découpage spécifique et une purification de la bonne marque ont pu être réalisés (Figure 23). Une réflexion peut être réalisée sur les températures de fusion proposées par les sites de design de primers. En effet, lors de la réception des amorces, la température de fusion de chacune d'elles est indiquée. Il a pu être constaté qu'elles étaient de plusieurs degrés inférieures par rapport à celles définies par les sites de design. Les conditions de la PCR (concentration de sel, de Mg^{2+} , de dNTP_s) peuvent faire varier la température de fusion des amorces. Les différences de températures entre les modèles varient en fonction de conditions et de la méthode de calcul utilisées. Afin de s'assurer l'obtention du produit PCR désiré, il est donc recommandé de tester une gamme de températures d'annealing. La température optimale dans des conditions précises sera déterminée expérimentalement.

Comme constaté dans la partie à la Figure 22, deux fortes bandes ont été détectées sur gel pour la PCR avec les amorces 2939-F et 2938-R. En découpant la bande de 3.3 kb, cette deuxième marque est éliminée, mais elle réduit grandement la quantité d'ADN de la bande d'intérêt. En effet, la concentration du produit PCR a été partagée en deux. Afin de continuer le projet dans les meilleures conditions, il a été nécessaire de concentrer 4 fois le produit PCR purifié. Si de nouvelles PCR devaient être effectuées avec ces amorces, il serait raisonnable d'essayer l'optimisation des conditions de réaction afin de réduire la présence de la seconde bande ou de choisir d'autres amorces.

4.5 Ligation des produits PCR avec le vecteur pGEM-T easy et 3^e transformation des cellules *E. coli* XL1-Blue MRF

La transformation des ligations avec les *E. coli* XL1-Blue MRF a du être été réalisée deux fois avec deux méthodes différentes. Pour la première transformation, la ligation des produits PCR (p60 A et p60 B) avec le pGEM-T easy a d'abord été incubée 1 h à température ambiante. Ensuite, l'électroporation a été réalisée comme décrit dans la méthode (2.2.7). Les résultats de cette transformation n'ont pas été montrés. En effet, un problème est apparu avec le contrôle positif fourni dans le kit du pGEM-T easy : aucune colonie n'a poussé. Quelques colonies sont apparues sur les plaques des ligations, mais après ensemencement en culture liquide, les bactéries ont pris beaucoup de temps pour pousser (2 jours au lieu d'une nuit normalement pour *E. coli*). Après extraction de l'ADN plasmidique, aucune bande n'était visible sur le gel. Il a été décidé de tester la ligase et le tampon fourni par Promega afin de vérifier qu'ils soient actifs. Le pUC18 a été choisi pour effectuer les tests. Il a été coupé par *EcoRI* et religué. La religation a été réalisée d'un côté avec la ligase standard T4 et son tampon, et d'un autre côté avec la ligase et le tampon fourni par Promega. Leur contrôle positif a également été refait. Chacune des ligations a été utilisée pour une transformation par électroporation et une avec la méthode de chlorure de calcium. La religation avec la ligase T4 a fonctionné pour les deux méthodes. Pour le test avec la ligase et le tampon de Promega, seule la méthode par chlorure de calcium a fourni des colonies (que ça soit pour le contrôle positif ou pour le pUC18 religué). Il en a été conclu qu'il était préférable de choisir la méthode au CaCl₂ pour transformer les cellules avec le pGEM-T easy. Pour l'électroporation, il était sans doute nécessaire d'avoir des cellules avec une très grande efficacité de transformation, ce qui n'était pas le cas des cellules utilisées.

Une nouvelle transformation a donc été effectuée, mais cette fois avec la méthode des cellules rendues compétentes par chlorure de calcium. Les ligations de pGEM-T easy + p60 ont passé une nuit à 4 °C au lieu d'une heure à température ambiante. Ce changement a été effectué d'après le protocole du pGEM-T easy [31], qui indique une augmentation du nombre de colonies transformées. La transformation avec les cellules chimiquement compétentes a donné beaucoup de colonies, ce qui montre une plus grande efficacité par rapport à l'électroporation. Après restriction des ADN extraits et leur mise sur gel, seuls deux ADN sur les neuf ont montrés des bandes sur le gel (Figure 24). La concentration d'ADN était donc trop faible directement après l'extraction. Ceci est étonnant, car en travaillant avec des *E. coli* ainsi qu'avec un vecteur à copies élevées (pGEM-T easy), l'extraction fournit en principe une concentration élevée d'ADN. Même en répétant l'extraction avec plus de volume de culture (20 ml), la concentration obtenue est restée en deçà de la normale qui est de ~ 50 ng/µl. Il était à chaque fois nécessaire de concentrer les ADN avant d'effectuer des restrictions. La croissance en culture liquide était elle-même un peu plus longue que le temps nécessaire généralement. Une nuit en incubateur suffit à *E. coli* avant de pouvoir réaliser l'extraction, mais avec les cellules transformées, un jour minimum était requis. Dans la partie « problèmes » du protocole du pGEM-T easy, il est

expliqué qu'une faible concentration obtenue peut venir d'un plasmide ayant un nombre bas de copies. Il est peut-être possible que l'insertion du p60 ait modifié le nombre de copies du vecteur. Des transformations pourraient être à nouveau réalisées, mais en changeant de souches d'*E. coli*. Au lieu des *XL1-Blue MRF*, les *E. coli DH5 α* ou TOP10 seraient utilisés. Afin de pouvoir réaliser d'autres étapes avec cet ADN de pGEM-T + p60, l'utilisation d'un kit Midi Prep serait à envisager. Cela permettrait d'avoir plus de matériel à disposition pour les expériences. En effet, le volume final après l'extraction est plus élevé qu'avec un kit Miniprep. De plus, en réduisant ce volume par évaporation de l'eau, la concentration de l'ADN sera sans doute assez élevée.

4.6 Ligation du pHEV104 avec le plasmide rolling circle p60 et 4^e transformation des cellules *E. coli XL1-Blue MRF*

Avant d'obtenir les résultats présentés dans ce chapitre, une première transformation avait été effectuée sans traiter le pHEV104 avec de l'antartique phosphatase. Des colonies se sont formées, mais après extraction et restriction, il s'est avéré qu'il ne s'agissait que du pHEV104 reliqué. C'est suite à cette constatation que les transformations suivantes ont été réalisées avec le pHEV104 traité par phosphatase. La formation des deux nouveaux vecteurs navettes a échoué. Cependant, il a été clairement identifié que l'ADN des colonies obtenues après transformations était le pGEM-T easy reliqué. Pour effectuer de nouvelles transformations avec le fragment p60, il est indispensable de laisser migrer le produit de restriction assez longtemps afin d'avoir des bandes très bien séparées. Néanmoins, étant donné la taille très proche des bandes, il est peut-être difficile de parfaitement séparer les fragments. De plus, si la quantité d'ADN chargée sur le gel est élevée, les bandes sont d'autant plus épaisses et cela réduit la possibilité de séparation. Il est également envisageable que ce soit le fragment p60 qui se referme sur lui-même lors de la ligation avec le pHEV104. Si l'insertion du p60 s'avérait impossible, une autre alternative existerait.

Pour rappel, l'insertion du produit PCR p60 dans le pGEM-T easy avait pour but de faciliter ensuite son clonage dans le pHEV104. En effet, il a été remarqué que créer des sites de restriction aux extrémités d'un produit PCR pouvait mener à une incapacité de ligation avec un vecteur. Le problème est que les enzymes de restriction sont des endonucléases et qu'elles ne coupent pas forcément correctement à l'extrémité d'un fragment linéaire, d'où le problème lors de la ligation. En insérant le produit PCR dans le pGEM-T, la difficulté était contournée. Les enzymes de restriction *NotI* pouvaient couper correctement de chaque côté de l'insert, celui-ci n'étant plus sous la forme linéaire mais incorporé dans un vecteur. Au vu du problème d'insertion du p60 dans le pHEV104, il serait intéressant de tester la méthode la plus directe. Aux amorces choisies pour ce projet, il faudrait ajouter un site de restriction *NotI*. Ainsi, lors de la PCR, le site serait artificiellement créé. La restriction serait ensuite effectuée avant de réaliser la ligation avec le pHEV104. Par la même occasion, le problème de faible concentration de l'ADN du pGEM-T easy –

p60 serait résolu. En effet, la PCR fournit beaucoup d'ADN et cette quantité reste élevée même après avoir purifié la bande d'intérêt.

4.7 Transformation par électroporation de trois souches de *Pediococcus damnosus*

Très peu d'expériences de transformation sur *Pediococcus damnosus* ayant été réalisées, il était impossible de dire si une souche ou une autre possédait une plus grande efficacité de transformation. C'est la raison pour laquelle il a été décidé de tester trois souches de *P. damnosus*. La DSM 20331 est celle d'où provient l'origine de répllication. Il était donc nécessaire de la choisir pour effectuer les essais. Les deux autres souches (NCIMB 10456 et CCM 3456) retenues contiennent apparemment moins de plasmides que d'autres souches de *P. damnosus*. Cela facilite la vérification de l'ADN plasmidique des colonies après la transformation. Une seule expérience de transformation a pu être effectuée en utilisant le vecteur pGEM-T easy – p60, le vecteur navette définitif n'ayant pas pu être créé. L'antibiotique choisi pour la sélection a été l'ampicilline, étant donné que seule cette résistance était présente sur le pGEM-T easy.

La transformation a échoué, car aucune colonie n'a poussé sur les plaques. Connaissant très peu les conditions optimales pour la transformation de *P. damnosus*, il est difficile de donner les raisons de cet échec. D'après les articles scientifiques concernant la transformation des Gram positifs, une grande quantité d'ADN était utilisée. Il est possible que les 50 ng mélangés aux cellules n'étaient pas suffisants. Il se peut également que le nombre de cellules n'était pas assez élevé pour réussir la transformation. Un point important est que la concentration d'ampicilline sur les plaques était trop élevée. En effet, *P. damnosus* DSM 20331 a déjà sa croissance inhibée à partir de 5 µg/ml d'ampicilline. Les 100 µg/ml présents dans les plaques étaient largement supérieurs à cette concentration. Cela a pu empêcher la croissance d'éventuelles cellules transformées. Un essai pourrait être rapidement réalisé en étalant le mélange d'électroporation sur des plaques contenant 5 µg/ml d'ampicilline. Il faut cependant noter que cette valeur est valable pour la souche DSM 20331 et que la sensibilité des deux autres souches n'a pas été testée. Il se peut qu'elles aient un tout autre comportement face à l'ampicilline. Une autre possibilité pour l'échec de la transformation est que l'insert p60 ne soit pas fonctionnel et qu'il ne puisse donc pas servir pour la répllication du vecteur. De nombreux paramètres peuvent être mis en question, d'où l'intérêt de pouvoir effectuer de nombreux essais de transformation.

Afin d'optimiser la méthode d'électroporation de *P. damnosus*, les points suivants devraient être testés. Comme premiers essais, le protocole du point 2.2.9 pourrait être suivi. Un des paramètres à varier serait la quantité d'ADN utilisée pour l'électroporation. Un autre point à tester serait le volume de cellules mélangé avec l'ADN. Le voltage utilisé lors du pulse peut jouer un rôle important. Sur le BioRad

Micro Pulser, les programmes ont un voltage fixé, mais il est également possible d'entre un autre voltage manuellement. Certaines expérimentations d'électroporation avec d'autres espèces de *Pediococcus* mentionnent la remise sur glace de la cuvette pendant 5 min après le pulse et l'ajout du milieu de recouvrement [35]. Lors du mélange des cellules et de l'ADN, le protocole indique de réaliser directement le pulse. Des tests pourraient être faits en laissant l'ADN et les cellules ensemble sur glace pendant différents temps avant de les soumettre au choc électrique. En ce qui concerne la préparation des cellules compétentes, différents points peuvent avoir une influence sur le résultat de la transformation. Les cellules pourraient être récoltées à plusieurs OD₆₀₀ afin d'observer s'il est préférable de prendre les cellules au début ou au milieu de la phase exponentielle. Différents moyens de fragilisation de la paroi de la cellule durant la croissance devraient être testés (par ex. glycine au lieu de L-Thréonine). Le tampon d'électroporation est également important et sa composition pourrait être modifiée. L'étape d'incubation avec du lysozyme met en relation plusieurs paramètres : le temps, la température d'incubation ainsi que la concentration de lysozyme. Un temps, une température ou une concentration inappropriés pourraient provoquer la destruction complète de la paroi. Une autre expérience serait possible : ne pas du tout traiter les cellules avec le lysozyme [35]. Il est clair que l'optimisation d'une méthode de transformation demande à se pencher sur chaque aspect pouvant avoir un impact avec le résultat.

5. Conclusion et perspectives

La construction du vecteur navette *E. coli* / *P. damnosus* n'a pas été entièrement réalisée. Le premier objectif du travail n'est donc pas totalement atteint. Néanmoins, une voie à suivre pour l'insertion d'un adaptateur a pu être déterminée. Prendre le temps de réaliser cette construction en deux étapes a donné des résultats positifs contrairement à la construction en une étape (intégration directe de l'adaptateur dans le vecteur navette). Grâce à la PCR, il a été démontré que le plasmide rolling circle p60 existait bien parmi l'ADN plasmidique de *P. damnosus* DSM 20331. Il a été constaté que la transformation du pGEM-T easy avec un insert fonctionnait parfaitement avec la méthode du CaCl₂ et très mal avec l'électroporation. La faible concentration d'ADN après extraction du vecteur pGEM-T easy / p60 n'a pas trouvé de véritable explication à part une éventuelle diminution du nombre de copie du plasmide. L'insertion du p60 dans le vecteur navette pHEV104 n'a pas été obtenue, malgré les colonies apparues après les transformations. Il s'est avéré que l'ADN extrait était celui du pGEM-T easy reliqué. Il serait donc nécessaire de refaire des transformations. Il faudrait par contre vraiment prêter attention à ne prélever que le fragment du p60 sur le gel et aucunement la bande du pGEM-T easy. En parallèle, une PCR pourrait être réalisée avec des amorces contenant le site de restriction *NotI*. Ceci permettrait d'insérer directement le fragment obtenu dans le pHEV104.

Le développement d'une méthode de transformation de *P. damnosus* n'a pas pu être entrepris étant donné que le vecteur navette n'a pas été entièrement construit. L'essai réalisé avec le pGEM-T easy / p60 n'a pas donné de résultat. Une nouvelle tentative serait à réaliser en abaissant la concentration d'ampicilline dans les plaques de Pétri. Si le vecteur navette final était créé, les transformations pourraient être effectuées en modifiant de nombreux paramètres. La quantité d'ADN et de cellules, le traitement par lysozyme, le voltage appliqué lors du pulse, la composition du tampon d'électroporation et d'autres variables jouent sans aucun doute un rôle dans la capacité de transformation des cellules et dans la reproductibilité de la méthode.

7. Remerciements

Un très grand merci à Sergio Schmid qui m'a aiguillée tout au long de ce travail de diplôme. Je remercie également Sarah Wegmüller qui a toujours été disponible pour mes questions et pour m'aider à comprendre les problèmes survenus au cours du projet. Merci également à Christel Forré qui a permis de travailler dans de bonnes conditions dans le laboratoire.

Je tiens à dire merci à mes parents qui m'ont non seulement soutenue pendant ce travail de diplôme, mais aussi durant les trois années passées à la Hes-so Valais.

8. Bibliographie

- [1] Primrose S., Twyman R., Old R. (2004) Principes de génie génétique, De Boeck Université
- [2] Sciences et techniques industrielles, Biotechnologies, Académie de Montpellier (26.01.2009)
http://pedagogie.ac-montpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/microbio_cours.html
- [3] Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (1995) The Genera of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic & Professional
- [4] Zhang B., Tong H., Dong X. (2005) *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 2167-2170
- [5] Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (2004) Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, Inc.
- [6] Cenatiempo Y., Berjeaud J.M, Biet F., Fremaux C., Héchard Y., Robichon D. (1996) Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques, Lait 76, 169-177
- [7] Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen LM., Prévost H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 564-582
- [8] McAuliffe O., Ross P.R., Hill C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, FEMS Microbiol. Rev. 25, 285-308
- [9] Chen H., Hoover D.G. (2003) Bacteriocins and their Food Applications, Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf. 2, 81-100
- [10] Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. (1995) Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria, Microbiol. Rev. 59, 171-200
- [11] Cotter P.D., Hill Colin, Ross R.P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food, Nat. Rev. Microbiol. 3, 777-788
- [12] De Vuyst L., Leroy F. (2007) Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications, J. Mol. Micorbiol. Biotechnol. 13, 194-199

- [13] Green G., Dicks L.M.T., Bruggeman G., Vandamme E.J., Chikindas M.L. (1997) Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832, J. Appl. Microbiol. 83, 127-132
- [14] Bauer R., Nel H.A., and Dicks L.M.T. (2003) Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine, Am. J. Enol. Vitic. 54, 86–91
- [15] Dicks L.M.T., Dellaglio F., Collins M.D. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrig.) gen. nov., comb. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 395–397
- [16] Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J., Dicks L.M.T. (2001) Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1, J. Appl. Microbiol. 91, 1131-1138
- [17] Bauer R., Chikindas M.L., Dicks L.M.T., (2005) Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832, Intern. J. of Food Microbiol. 101, 2005, 17-27
- [18] Wirth R., An F.Y., Clewell D.B. (1986) Highly Efficient Protoplast Transformation System for *Streptococcus faecalis* and a New *Escherichia coli*-*S. faecalis* Shuttle vector, J. Bacteriol. 165, 831-836
- [19] Luchansky J.B., Muriana P.M., Klaenhammer T.R. 1988, Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*, Mol. Microbiol. 2, 637-646
- [20] Lo Scudato M., Master thesis 2008, Development of an Expression Platform for the Production of Recombinant Peptides, Hes-so Valais
- [21] JustBio, Bioinformatics at the tip of your fingers (12.09.08)
<http://www.justbio.com/netplasmid/index.php>
- [22] Van Kranenburg R., Golic N., Bongers R., Leer R., de Vos W., Siezen R., Kleerebezem M. (2005) Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*, Appl. and Env. Microbiol. 71, 1223-1230
- [23] Dumas S., Diploma work 2007, Identification of the genetic elements involved in pediocin PD-1 synthesis, Hes-so Valais
- [24] Technical manual for pGEM-T and pGEM-T easy Vectors system, Promega, USA

- [25] Rodríguez M. C., Alegre M. T., Mesas J. M. (2007) Optimization of technical conditions for the transformation of *Pediococcus acidilactici* P60 by electroporation, *Plasmid* 58, 44-50
- [26] Wikipedia, (05.09.2008)
http://fr.wikipedia.org/wiki/Signalisation_des_substances_dangereuses
- [27] Angei F., Anthamatten D., Leunberger J., Wegmuller J. (2008), Travaux pratiques de biologie moléculaire, Isolation d'une origine de réplication type thêta de *Pediococcus damnosus* DSM 20331
- [28] PCR clean-up Gel extraction, User Manual NucleoSpin Extract II, April 2008 / Rev. 07, Macherey-Nagel, Deutschland
- [29] Instruction manual, version 2.1, june 1993, Appligene, Canada
- [30] Promega Enzyme Ressource Guide, (10.10.2008)
http://www.promega.com/guides/cloning_guide/genecloning.pdf
- [31] Technical Manual for pGEM-T and pGEM-T Easy Vector systems, Revised 5/07, Promega, USA
- [32] Micro Pulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide, Catalog Number 165-2100, Bio-Rad, Etats-Unis
- [33] Del Sal G., Manfioletti G., Schneider C. (1988), A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing, *Nucleic acids research* 16, 9878
- [34] Fermentas Life Sciences (15.09.2008)
<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm#1kb>
- [35] Caldwell S.L., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R. (1996) Development and Characterization of Lactose-Positive *Pediococcus* Species for Milk Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 936-941

9. Annexes

9.1 Séquence du vecteur pHEV101

```

1 ttaagttatt ggtatgactg gttttaagcg caaaaaaagt tgctttttcg tacctattaa
61 tgtatcgttt tagaaaaccg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa
121 gccagtcatt aggcctatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcatgat
181 aaccatcaca aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacctt
241 tattaatgaa ttttctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat
301 ttaagttaaa ccagtaaat gaagtcctat gaataataga aagagaaaaa gcattttcag
361 gtataggtgt tttgggaaac aatttccccg aaccattata tttctctaca tcagaaaggt
421 ataaatcata aaactctttg aagtctattt ttacaggagt ccaaatacca gagaatggtt
481 tagatacacc atcaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atccaataa cctaactctc
541 cgctcgctct gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt tatcacctt gtcactaaga
601 aaataaatgc aggttaaaat ttatacctt cttgttttat gtttcggtat gaaactactaa
661 tatcaatttc tgtggttata ctaaaagtcg tttgttggtt caaataatga ttaaatatct
721 cttttctctt ccaattgtct aatcaattt tattaaagtt catttgatat gcctcctaaa
781 tttttatcta aagtgaattt aggaggctta cttgtctgct ttcttcatta gaatcaatcc
841 ttttttaaaa gtcaatatta ctgtaacata aatataatatt ttaaaaatat ccactttat
901 ccaattttcg tttgttgaac taatgggtgc tttagttgaa gaataaagac cacattaaaa
961 aatgtggctt tttgtgtttt tttaaaggtt ttgagcgtag cgaaaaatcc ttttctttct
1021 tatcttgata ataagggtaa ctattgccga tcgtccattc cgacagcatc gccagtcact
1081 atggcgtgct gctagcgcca ttcgccattc aggcctcgca actggtggga agggcgatcg
1141 gtgcgggcct ctctgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta
1201 agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattc
1261 ggatcctcta gaaggtacca tgagtaaagg agaagaactt ttactggag ttgtcccaat
1321 tctgttgtaa ttagatggtg atgtaatgg gcacaaattt tctgtcagtg gagaggggga
1381 aggtgatgca acatacggaa aacttacctt taaatttatt tgcactactg gaaaactacc
1441 tgttccatgg ccaacacttg tctactctt ctcttatggt gttcaatgct tttcccgta
1501 tccggatcat atgaaacggc atgactttt caagagtgcc atgccgaag gttatgtaca
1561 ggaacgcact atatctttca aagatgacgg gaactacaag acgcgtgctg aagtcaagtt
1621 tgaaggtgat acccttgta atcgtatcga gttaaaaggt attgatttta aagaagatgg
1681 aaacattctc ggacacaaac tcgagtaca ctataactca cacaatgat acatcacggc
1741 agacaaacaa aagaatggaa tcaaaagctaa cttcaaaatt cgccacaaca ttgaagatgg
1801 atccgttcaa ctagcagacc attatcaaca aaatactcca attggcgtatg gcctgtcct
1861 tttaccagac aaccattacc tgtcgacaca atctgccctt tcgaaagatc ccaacgaaaa
1921 gcgtgaccac atggctcttc ttgagttgt aactgctgct gggattacac atggcatgga
1981 tgagctctac aaataatgaa ttccaactct agagtgcagc tcccggggc agcccccta
2041 atgagcgggc ttttttcacg tcacgcgtcc atggagatct ttgtctgcaa ctgaaaagtt
2101 tataccttac ctggaacaaa tgggtgaaac atacgaggct aatctcggtt tattaggaat
2161 agtccctgta ctaataaaat agtggatcag agttgatcag tatattttgg acgaagctcg
2221 gaaagaattt ggagatgact tgcttaattc cacaattaaa ttaagggaaa gaataaagcg
2281 atttgatggt caaggaatca cggaagaaga tactcatgat aaagaagctc taaaactatt
2341 caataacctt acaatggaat tgatcgaaag ggtggaaggt taatggtacg aaaattaggg
2401 gatctaccta gaaagccaca aggcgatagg tcaagcttaa agaaccctta catggatctt
2461 acagattctg aaagtaaaga aacaacagag gttaaacaaa cagaaccaa aagaaaaaaa
2521 gcattgttga aaacaatgaa agttgatggt tcaatccata ataagattaa atcgtgcac
2581 gaaattctgg cagcatccga agggaattca tattacttag aggatactat tgagagagct
2641 attgataaga tgggtgagac attacctgag agccaaaaaa ctttttatga atatgaatta
2701 aaaaaaagaa ccaacaagg ctgagacaga ctccaaacga gtctgttttt ttaaaaaaaa
2761 tattaggagc attgaaatata tattagagaa ttaagaaaga catgggaata aaaatatttt
2821 aatccagta aaaatatgat aagattattt cagaatatga agaactctgt ttgtttttga
2881 tgaaaaaaca acaaaaaaaa atccacctaa cggaatctca atttaactaa cagcggccaa
2941 actgagaagt taaatttgag aaggggaaaa ggcgatttta tacttgatt taactatctc
3001 cattttaaca ttttattaaa cccatacaa gtgaaaatcc tcttttacac tgttcttta
3061 ggtgatcgcg gagggacatt atgagtgaag taaacctaaa aggaaataca gatgaattag
3121 tgtattatcg acagcaaac actgaaata aaatcgccag gaagagaatc aaaaaagga
3181 aagaagaagt ttattatggt gctgaaacgg aagagaagat atggacagaa gagcaataa
3241 aaaaactttt tttagacaaa tttggtacgc atatacctta catagaaggt cattatacaa
3301 tcttaataaa ttacttctt gatthttggg gctatthttt aggtgctgaa ggaattgctc
3361 tctatgctca cctaactcgt tatgcaatag gcagcaaaaga cttttgcttt cctagtctac
3421 aaacaatgct taaaaaatg gacaagactc ctgttacagt tagaggctac ttgaaactgc
3481 ttgaaaggta cggthttatt tggaaggtaa acgtccgtaa taaaaccaag gataacacag
3541 aggaatcccc gatthtttaag attagacgta aggttctctt gctttcagaa gaactthtaa
3601 atggaaaccc taatattgaa attccagatg acgaggaagc acatgtaaaag aaggctthaa

```

3661 aaaaggaaaa agagggtcct ccaagggttt tgaaaaaaga gcacgatgaa tttgttaaaa
3721 aatgatgga tgagtcagaa acaattaata ttccagaggc cttacaatat gacacaatgt
3781 atgaagatat actcagtaaa ggagaaattc gaaaaaaga caaaaaacaa atacctaatac
3841 ctacaacatc ttttgagagt atatcaatga caactgaaga ggaaaaagtc gacagtactt
3901 taaaaagcga aatgcaaaat cgtgtctcta agccttcttt tgatacctgg tttaaaaaca
3961 ctaagatcaa aattgaaaat aaaaattggt tattacttgt accgagtgaa tttgcatttg
4021 aatggattaa gaaaagatat tttagaaciaa ttaaaacagt ccttgaagaa gctggatatg
4081 ttttcgaaaa aatcgaaacta agaaaagtgc aataaactgc tgaagtattt cagcagtttt
4141 ttttatntag aaatagttaa aaaaatataa tcagggaggt atcaatattt aatgagtact
4201 gatttaaatt tatttagact ggaatataa attaacacgt agactaatta aaatttaatg
4261 agggataaag aggatacaaa aatattaatt tcaatcccta ttaaatttta acaagggggg
4321 gattaaaatt taattagagg tttatccaca agaaaagacc ctaataaaat ttttactagg
4381 gttataacac tgattaattht cttaatgggg gagggattaa aatttaatga caaagaaaac
4441 aatcttttaa gaaaagcttt taaaagataa taataaaaag agctttgcca ttaagcaaaa
4501 ctctttactt tttcattgac attatcaaat tcatcgattt caaattggtg ttgtatcata
4561 aagttaattc tgttttgac aaccttttca ggaatataaa acacatctga ggcttgtttt
4621 ataaactcag ggtcgctaaa gtcaatgtaa cgtagcatat gatattggat agcttccacc
4681 caagttagcc tttctgcttc ttttgaatgt ttttcatata ctccatggg tatctctaaa
4741 tgattttcct catgtagcaa ggtatgagca aaaagtttat ggaattgata gttcctctct
4801 ttttctcaa cttttttatc taaaacaaac actttaacat ctgagtcaat gtaagcataa
4861 gatgtttttc cagtcataat ttcaatccca aatcttttag acagaaattc tggacgtaaa
4921 tcttttggtg aaagaattht tttatgtagc aatataatcc atacagcacc ttctaaaagc
4981 gttggtgaat agggcaattht acctatctcc tctcaattht tggaaataaa atagtcatat
5041 tctgctcatc acctatccta ttatcgaaca gttgaacttht ttaatcaagg atcagtcctt
5101 tttttcatta ttcttaaact gtgctcttaa cttaacaac tctgatttgt tttccagatc
5161 tctgaggtaa ctagcctgc cgatcccgca agaggcccg cagtcagggt gcacttttcg
5221 gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacaattcaa atatgtatcc
5281 gctcatgaga caataaccct gataaatgtc tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag
5341 tattcaacat ttccgtgctg ccttatttcc ctthtttgcg gcattttgcc ttctgttht
5401 tctcaccoca gaaacgctgg tgaaaagtaa agatgctgaa gatcagttgg gtgacaggt
5461 gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccaaga
5521 acgttttcca atgatgagca ctthtaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat
5581 tgacgcccgg caagagcaac tccgtcggcg catacactat tctcagaatg acttggttga
5641 gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggtatggcatg acagtaagag aattatgcag
5701 tctgcccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta ctctgaca cagctggagg
5761 accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat catgtaact gccttgcctg
5821 ttgggaaccg gagctgaatg aagcacaacc aaacgacgag cgtgacacca cgtgctgtg
5881 agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg
5941 gcaacaatta atagactgga tggagcggaa taaagttgca ggaccactt tgcgctcggc
6001 ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtcctcggg
6061 tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgt atctgagtt tctacacgac
6121 ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact
6181 gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa
6241 acttcaattht taatttaaaa ggtataggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa
6301 aatcccctaa cgtgagtttht cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg
6361 atcttcttga gatccttht tctgctcgt aatctgctgc ttgcaaaa aaaaaccacc
6421 gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttht cgaaggtaac
6481 tggcttcagc agagcgcaga taccaaaata tctccttcta gtgtagcctg agttaggcca
6541 ccacttcaag aactctgtag caccgctac atacctgct ctgctaactc tgttaccagt
6601 gctgctgcc agtggcgata agtctgtct taccgggtt gactcaagac gatagttacc
6661 ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagcca gcttggagcg
6721 aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc
6781 cgaagggaga aagcgggaca ggtatccgg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac
6841 gagggagctt ccagggggaa acgctgtgta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct
6901 ctgacttgag cgtcgattht tgtgatgct gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc
6961 cagcaacgcg gccttht tac gttcctgct gtttctgct ccttht gct acatgttctt
7021 tctgctgta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gccttht gagt gagctgatac
7081 cgtcgcggc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg
7141 cccaatagc atgc

sélection 2031-2056 pb : terminateur *trpA*

sélection 5276-5338 : zone du promoteur du gène *bla*

sélection 2075-2080 + 5156-5160 pb : sites de restriction *BglI*

9.2 Séquence terminatrice de transcription : *trpA*

2031
5' AGCCCGCCTA ATGAGCGGGC TTTTTT 3' 2056

9.3 Zone du promoteur du gène *bla*

5101 TTTTTCATTA TTCTTAAACT GTGCTCTTAA CTTTAAACAAC TCGATTTGTT TTTCCAGATC
5161 TCGAGGGTAA CTAGCCTCGC CGATCCCGCA AGAGGCCCGG CAGTCAGGTG GCACTTTTCG
5221 GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTTCTAA ATACA **TTCAA** ATATGTATCC
-35 box

5281 GTCATG **GA CAAT** AACCCT **GATAA**ATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGT **ATGAG**
-10 box ↑ initiation site of transcription ↑ codon START

9.4 Stratégie de clonage

Après restriction du pHEV101 avec *Bgl*II :

```

                2075                5157
5' ACG CGT CCA TGG A 3' ..... 5' GA TCT CGA GGG TAA CTA 3'
3' TGC GCA GGT ACC TCT AG 5' ..... 3' A GCT CCC ATT GAT 5'
    
```

Adaptateur MCS_pHEV101:

```

                Sali       NotI       EcoRV       HpaI
5' GA TCT GTC GAC GCG GCC GC GAT ATC GTT AAC A 3'
3'      A CAG CTG CGC CGG CG CTA TAG CAA TTG TCT AG 5'
    
```

Après ligation (pHEV104) :

```

5' ACG CGT CCA TGG AGA TCT GTC GAC GCG GCC GC GAT ATC GTT AAC AGA TCT CGA GGG TAA CTA 3'
3' TGC GCA GGT ACC TCT AGA CAG CTG CGC CGG CG CTA TAG CAA TTG TCT AGA GCT CCC ATT GAT 5'
    
```

9.5 Séquence du vecteur pHEV104

```

1  ttaagttatt ggtatgactg gttttaagcg caaaaaaagt tgctttttcg tacctattaa
61  tgtatcgttt tagaaaaccg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa
121 gccagtcatt aggcctatct gacaattcoct gaatagagtt cataaacaat cctgcatgat
181 aaccatcaca aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacctt
241 tattaatgaa ttttctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat
301 ttaagttaaa cccagtaaat gaagtcctatg gaataataga aagagaaaaa gcattttcag
361 gtatagggtg tttgggaaac aatttccccg aaccattata tttctctaca tcagaaaggt
421 ataaatcata aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt
481 tagatacacc atcaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atccaataa cctaactctc
541 cgctcgtatt gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt tatcaccctt gtcactaaga
601 aaataaatgc agggtaaaat ttatacctt cttgttttat gtttcgggat aaaacactaa
661 tatcaatttc tgtggttata ctaaaagctg tttgttggtt caaataatga ttaaatactt
721 ctttctctct ccaattgtct aaatcaattt tattaaggtt catttgatat gcctcctaaa
781 tttttatcta aagtgaattt aggaggctta cttgtctgct ttcttcatta gaatcaatcc
841 ttttttaaaa gtcaatatta ctgtaacata aatatatatt ttaaaaatat cccactttat
901 ccaattttct tttgttgaac taatgggtgc tttagttgaa gaataaagac cacattaaaa
961 aatgtgggtc tttgtgtttt tttaaaggat ttgagcgtag cgaaaaatcc ttttctttct
1021 tatcttgata ataagggtaa ctattgcccga tcgtccattc cgacagcatt gccagtcact
1081 atggcgtgct gctagcggca ttcgcccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg
1141 gtgcgggctt cttcgtctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta
1201 agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgcagggc cagtgaattc
1261 ggatcctcta gaaggtacca tgagtaaagg agaagaactt ttactggag ttgtccaat
1321 tcttggtgaa ttagatgggt atgttaatgg gcacaaaatt tctgtcagtg gagaggggtg
1381 aggtgatgca acatacggaa aacttaccct taaatttatt tgcactactg gaaaactacc
1441 tgttccatgg ccaacacttg tctactctt ctcttatggt gttcaatgct tttcccgta
1501 tccggtatcat atgaaacggc atgacttttt caagagtgcc atgcccgaag gttatgtaca
1561 ggaacgcact atatctttca aagatgacgg gaactacaag acgctgctg aagtcaagtt
1621 tgaagtgat acccttgta atcgtatcga gttaaaaggt attgatttta aagaagatgg
1681 aaacattctc ggacacaaac tcgagtacaa ctataactca cacaatgtat acatcacggc
1741 agacaaaaca aagaatggaa tcaaaagctaa cttcaaaatt cgccacaaca ttgaagatgg
1801 atccgttcaa ctagcagacc attatcaaca aaatactcca attggcgatg gcctgtctt
1861 tttaccagac aaccattacc tgtcgacaca atctgccctt tcgaaagatc ccaacgaaaa
1921 gcgtgaccac atggtccttc ttgagtttgt aactgctgct gggattacac atggcatgga
1981 tgagctctca aaataatgaa ttccaactct agagtgcagc tccccggggc agcccgccta
2041 atagtcgggc ttttttcacg tcacogctcc atggagatct gtcgacggcg ccgogatatc
2101 gttaaacagat ctcgagggta actagcctcg ccgatcccgc aagaggcccg cagtcagggt
2161 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca
2221 aatatgtatc cgctcatgag acaataaccg tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg
2281 aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc
2341 cttcctggtt ttgctcaccg agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg
2401 ggtgcacagc tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt
2461 cgcccogaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtg
2521 ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat
2581 gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga
2641 gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt gataaactcg cggccaactt acttctgaca
2701 acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact
2761 cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc
2821 acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgaaactat taactggcga actacttact
2881 ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaaagttgc aggaccactt
2941 ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt
3001 gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt
3061 atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata
3121 ggtgcctcac tgattaagca ttgtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag
3181 attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat
3241 ctatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtaaga
3301 aagatcaaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaca
3361 aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt
3421 ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata ctgctcttct agtgtagccg
3481 tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate
3541 ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga
3601 cgatagttac cggataaggg gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc
3661 agcttgagag gaacgaccta caccgaactc agatacctac agcgtgagct atgagaaagc
3721 gccacgcttc ccgaagggag aaagcgggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca
3781 ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg
3841 tttcgcacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggaaccta

```

```
3901 tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct
3961 cacatggtct ttctgcggt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag
4021 tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa
4081 gcggaagagc gcccaatagc catgc
```

sélection 2075-2107: adaptateur

9.6 Séquence du rolling circle plasmide p60

```

1  gaattcctag tttggcgacc cggaacacgt gagttaatct tgaatattcg tatttactag
61  acatagttta aagcttgagt tagtaagcgt caagccctta gttttagtaa atacataaaa
121 gattagatgt tctcacgtgg ttggaatgaga ggagcttttt agtttggctg atagaaaagt
181 tttagttgat cgatcgcagt cgggaaaagt acgaccatgg cgagaaacata agttagagaa
241 tttacagtat ggtgattatt tacaaatggt gcactacaag aaagcccatc gagttaaaga
301 gtgtggtgaa gtattacggt ttgtggaaga taaaaatggt cacaaaaaat tggtcagac
361 ttggttttgc cattcccggt tgtgtccggt atgtaattgg cggcgggtcaa tgaacaatc
421 taaccagtta actcaaattt tgacagaagc agttaaacag cgaaaaacgg gtcggttctt
481 atttttaacg ctgacggttg aaaataccac cggtaatcag ttaaaaagtg aattacgaca
541 aatgggacga gccattcgtg atttaatgcg ttataaaaag ccagctaaga atttgttggg
601 ctatgtgctg tcaactgagg ttaccattaa tcacgaagca gatcagccga tgatcacca
661 ccatatgcat gttttgcttt ttatgaaatc gagttatfff acaggaactg ataattatat
721 ttcacaaagca gaatggacta gatattggca acgagcgatg aaattagctt atgcccgggt
781 tgtgaatggt gaagcgggta aaccgaatgt gaaacgccag aaaaattcct tgctggctag
841 tgctcaagaa acggctaaat atcaggtgaa gtccaaagat attttaacta ataatcaaga
901 acaagatcta caagtaattg atgatttggg acaagctttg gctggttccc ggcaaattag
961 ttatggtggc ttgcttaaag aaattcggca gcagttgcaa ttagaagatg ttgaaaatgg
1021 cgatttgatt aatacggata gtggtgatca agaaactgat caagtagtgc gtgaaaatgt
1081 tgctaaagtgg gactatcagc gtaaaaatta tttcgtatag atggaaaatt tgtgaagtat
1141 tgaagataaa ggagactaga gatgaaaaat aaaaataaaa ctgcattttg gatacctttt
1201 tctattacgt tttgcgtttt tttgtttttc ctttttgctg agcctttttt gaataaaaata
1261 tttggctact accctttttt atattgggta atattattgc ttatcgttag tttgcattct
1321 ggagttggtg gtaattatat tagttataaa tataacaaaa gacataagta aaaaagaatt
1381 tatacaatac tctatacact tacattttgt aaccaatcag catgttgtgt ttaactatga
1441 gatttatttc tcatagtttt tttgtgggta agctggcatc agcttgccc actcgggtag
1501 agttctgcat gaaatgcgct cgctatgcaa tagcccgccg gaggtttttc tagccggata
1561 ataggcgcag aaaaatagca attctcccag taggaaggga gaacgctact acctcgtaga
1621 gcccaaactt tacaaggtaa agtatatggt gctatacctt gcatggaggt tttccgaatt
1681 ctgtgctatg ctctaaccac atttagctgt ttggaatgga gtggtgaaat gagttattta
1741 gtggctaata tgcaaaaatt aaaagctgat aatttagttg gcttgggtaa tcatgatcaa
1801 cgccgaaccc gacatcaca aaatactgat attgacgtta accgttctga cttaaatat
1861 gatttagttg ctggtcggac taaccatttc aaaacggata ttgaggctta tattaacgag
1921 cataaaacca gtcagcagac ggtcagaaaa gatgccgttt tagtcaatga atggattatt
1981 tcgagcagta gcaatttctt tgctaaatfa acggcggctg atacgcgcaa atattttgaa
2041 acagctaaag cttactttgc tgaaaaatft ggtgaagaaa acattcgtta tgogattggt
2101 catcttgatg agagtacgcc ccatagcct atgggaattg ttccatttga tgatgagtat
2161 aaattatcgg ctaaacgggt gtttaatcgt gcccgtttgc aaaacgttca agatcaattg
2221 ccagtttatt tacgacaaca cggatttgat gttgaacgtg gtattcaaga atcgcaacat
2281 aaaagttaa cggtaaccaga atacaagct atgcccgaag acttgaaaaa ggcagcgtt
2341 caaaaacgag aaatacaagc tgaacttgaa gatgccagaa aacgccttgc tgaacttaa
2401 cctcgtgatc agcaggaat tgagagcaa cctactcttt taagcaagga taaagtgggt
2461 gttagaaaaa gtgatcttca tgactagaaa tctcagcag ctgtcagtga tattataaat
2521 caacaacaga accgtttaa acttgataat caaagcttaa attatcaact gcttgaagtt
2581 aaagacaata attatgattt aagcaagaaa aatgagaagc tccaaaaatt agtgatagc
2641 ttacaaggaa ttgttcggag cgttgaccgg ttcttacagc gcaaattagg tggttgctta
2701 ccaagtgagt ggctagaacg agctggacta aaagaaccgt ctaaaaaagc ccctcagagg
2761 ccacaggaac gttcagagag acagcatgat gaattagatg gtccaagtct ttgacttgg
2821 cctagggctt taatttacc gctgatgatc attgaagctg gttaatggcc gtcagtcaac
2881 ggtaaatcga attaaagga cttactgctt tagcagttag tccctttttg aggctttaa
2941 gagttgactg actcactaga ccaagacact tttgcgcatg caaagaaaag cacacctgct
3001 ttttttgcct gcctcacggc gagtgccggg tgagtttgag cgggggctcc cgctcattta
3061 tggtgtccag ctggttcagc tggtcagtat ggctgaaagc catggtctta aaaagcagtt
3121 cggcgatttt tgctgatctg ctttttgggg tttgaaccg tcgttttttc gacggtttct
3181 tcttatcttg atactattag aaacaacgga ctttttaaaa agctggctaa agccttgaca
3241 gaactgggct taggcgtatt atgagtttat aaaatgaata aagaaaaaac ccacgtga

```

sélection 164-1120 pb: gène *rep*

sélection 1663-2814 pb: gène *mob*

sélection 3176-3193 pb: site *dso*

9.8 Séquence du vecteur pGEM-T easy / p60 A

```

1  gggcgaattg ggcccgacgt cgcattgctcc cggccgccat ggcggccgcg ggaattcgat
61  taggagttag ctgactcact agaccaagac acttttgccg atgcaaagaa aagcacacct
121 gctttttttg cctgcctcac ggcgagtgcg ggtgagttt gagcgggggc tcccgtcat
181 ttatggggtc cagctgggtc agctggtcag tatggctgaa agccatggtc ttaaaaagca
241 gttcggcgat ttttctgat ctgctttttg ggttttgaaa ccgtcgtttt ttcgacggtt
301 tcttcttata ttgatactat tagaaacaac ggacttttta aaaagctggc taaagccttg
361 acagaactgg gcttaggcgt attatgagtt tataaaatga ataaagaaaa aaccacgctg
421 agaattccta gtttggcgac ccggaacacg tgagttaatc ttgaatatc gtatttacta
481 gacatagttt aaagcttgag ttagtaagcg tcaagccctt agttttagta aatacataaa
541 agatagatag ttctcacgtg gttggatgag aggagctttt tagtttggct gatagaaaaa
601 ttttagttga tcgactgcag tcgggaaaag tacgacctg cggagaacat aagttagaga
661 atttacagta tggtgattat ttcaaaatgt tgactacaa gaaagcccat cgagttaaag
721 agtgtggtga agtattacgt tttgtggaag ataaaaatgg tcacaaaaaa ttggctcaga
781 cttggttttg ccattcccgt ttgtgtccgt tatgtaattg cggcgggtca atgaaacaat
841 ctaaccagtt aactcaaatt ttgacagaag cagttaaaca gcgaaaaacg ggtcggttct
901 tatttttaac gctgacgggt gaaaatacca ccgtaataca gttaaaaagt gaattacgac
961 aaatgggacg agccattcgt gatttaatgc gttataaaaa gccagctaag aatttgttgg
1021 gctatgtgcg ttcaactgag gttaccatta atcacgaagc agatcagccg atgtatcacc
1081 accatatgca tgttttgctt tttatgaaat cgagttattt tacaggaact gataattata
1141 tttcacaagc agaatggact agatattggc aacgagcgat gaaattagct tatgcccggg
1201 ttgtgaatgt tgaagcgggt aaaccgaatg tgaacgccca gaaaaattcc ttgctggcta
1261 gtgctcaaga aacggctaaa taccaggtga agtccaaaga tattttaact aataatcaag
1321 aacaagatct acaagtaatt gatgatttgg aacaagcttt ggctggttcc cggcaaatta
1381 gttatgggtg cttgcttaaa gaaattcgca agcagtttga attagaagat gttgaaaatg
1441 gcgatttgat taatacggat agtggtgatc aagaaactga tcaagtagtg cgtgaaaatg
1501 ttgctaagtg ggactatcag cgtaaaaatt atttcgtata gatggaaaat ttgtgaagta
1561 ttgaaagata aggagactag agatgaaaaa taaaaataaa actgcatttt ggataccttt
1621 ttctattacg ttttgcgttt ttttgttttt cttttttgct gagccttttt tgaataaaat
1681 atttggctact cacccttttt tataattgggt aatattattg ctatcgtta gtttgcctatc
1741 tggagtgtgt gtaattataa ttagtataaa atatacaaaa agacataaag aaaaagaat
1801 ttatacaata ctctatacac ttacattttg taaccaatca gcatgttgtg ttaactatg
1861 agatttattt ctcatagttt ttttgtgggt aagctggcat cagcttgccc cactcgggta
1921 gagttctgca tgaatgccc tcgctatgca atagcccgc ggaggtttt ctagccggat
1981 aataggcgca gaaaaatagc aattctccca gttaggaagg agaacgctac tacctcgtag
2041 agcccaaac ttacaaggta aagtatattg ggctatacct tgcatggagg ttttccgaat
2101 tctgtgctat gctctaacca aatttagctg ttggaatgg agtggtgaaa tgagttattt
2161 agtggctaat atgcagaaat taaaagctga taatttagtt ggctgggta atcatgaca
2221 acgcccgaac cgacatcaca aaaatactga tattgacgtt aaccgttctg acttaaatga
2281 tgatttagtt gctggtcgga ctaaccattt caaaacggat attgaggctt atattaacga
2341 gcataaaaacc agtcagcgag cgtcagaaa agatgcogtt ttagtcaatg aatggattat
2401 ttcgagcgat agcaatttct ttgctaattt aacggcggct gatcgcgca aatattttga
2461 aacagctaaa gcttactttg ctgaaaaatt ttgtgaagaa aacattcgtt atgcgattgt
2521 tcactttgat gagagtacgc cccatatgca tatgggaatt gttccatttg atgatgagta
2581 taaattatcg gtaaacggg tgtttaatcg tgcggctttg caaaacgttc aagatcaaat
2641 gccagtttat ttacgacaac acggatttga tgttgaacgt ggtattcaag aatcgcaaca
2701 taaaagttta acggtaccag aatacaaagc tatgcccggaa gacttgaaaa aggcgacgct
2761 tcaaaaacga gaaatacaag ctgaacttga agatgccaga aaacgccttg ctgaacttaa
2821 acctcgtgat cagcaggaaa ttgagagcaa acctactctt ttaagcaagg ataaagtggg
2881 tgtagaaaa agtgatcttc atgacttaga atctcagaca gctgtcagtg atatttataa
2941 tcaacaacag aaccgtttta aacttgataa tcaaaagctta aattatcaac tgcttgaagt
3001 taaagacaat aattatgatt taagcaagaa aatgagaag ctccaaaaat tagtggatac
3061 gttacaagga attgttcgga gcgttgaccg gttcttacag cgcaaattag gtgttggtt
3121 accaagttag tggctagaac gagctggact aaaagaaccg tctaaaaaag cccctcagag
3181 gccacaggaa cgttcagaga gacagcatga tgaattagat ggtccaagtc tttgaacttg
3241 gcttagggct ttaatttacc cgtgatgat cattgaagct ggttaatggc cgtcagtcac
3301 cggtaaatcg aattaaagg acttactgct ttagcagttt gtccttttt gaggtcttaa
3361 atcactagt gtaaacggc cgctgcagg tcgacctat tggagagctc ccaacgcgtt
3421 ggatgcatag cttgagtatt ctatagtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggctat
3481 agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa
3541 gcataaagt taaagcctgg ggtgccta atgagtgact actcacatta atgctgttc
3601 gctcactgcc cgtttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc
3661 aacgcgcggt gagagcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgttctctc ctactgact
3721 cgtcgcctc ggtcgttcgg ctgcggcag cgtatcagc tcaactcaag cgggtaatac
3781 ggttatccac agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa gccagcaaaa
3841 aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg

```

3901 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa
3961 gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc
4021 ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac
4081 gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt gtgcacgaac
4141 ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccocg
4201 taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgagg
4261 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa
4321 cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct
4381 cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtgggtt tttgtttgc aagcagcaga
4441 ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgcagc
4501 ctcaagtggaa cgaaaactca cgtaagggg ttttggcat gagattatca aaaaggatct
4561 tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt
4621 aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgggac acctatctca gcgatctgtc
4681 tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgctcgtga gataactacg ataccggagg
4741 gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga tacccgcaga cccacgctca ccgctccag
4801 atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaact
4861 tatccgcctc catccagctc attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgcag
4921 ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt
4981 ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca
5041 tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg
5001 ccgagtggtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat
5161 ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgt
5221 tgccgagacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg cccatagca
5281 gaactttaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct
5341 taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtc acccaactga tcttcagcat
5401 cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgaaaaa
5461 aggaataaag ggcgacacgg aatggtgaa tactcact cttcctttt caatattatt
5521 gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa
5581 ataaacaaa atgggttccg gcacatctc cccgaaaagt gccacctgat gcggtgtgaa
5641 ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagga aattgtaagc gtaaatattt
5701 tgttaaaatt ccggttaaat tttgtttaa tcagctcatt ttttaaccaa taggccgaaa
5761 tcggcaaaa ccttataaa tcaaaagaat agaccgagat aggggtgagt gttgttccag
5821 tttgaaaca gagtccacta ttaaagaacg tggactcaa cgtcaaaggc cgaaaaaccg
5881 tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac catcacccta atcaagtttt ttggggtcga
5941 ggtgccgtaa agcactaaa cggaaacct aagggagccc ccgatttaga gcttgacggg
6001 gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg
6061 cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc
6121 cgctacaggg ccgctccatt ccgattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcgg
6181 gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag
6241 ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattgta
6301 atacgactca ctata

9.9 Séquence du vecteur pGEM-T easy / p60 B

```

1  gggcgaattg ggccccgacgt cgcattgctcc cggccgccat ggcggccgcg ggaattcgat
61  taaatgcgct cgctatgcaa tagccccgcyg gaggtttttc tagccggata ataggcgcag
121  aaaaaatagca attctcccag taggaagggg gaacgctact acctcgtaga gcccaaaact
181  tacaaggtaa agtatattgg gctatacctt gcatggaggt tttccgaatt ctgtgctatg
241  ctctaacca aatttagctgt ttggaatgga gtggtgaaat gagttattta gtggctaata
301  tgcagaaatt aaaagctgat aatttagttg gcttgggtaa tcatgatcaa cgccgaaccc
361  gacatcacia aaatactgat attgacgtta accgttctga cttaaattat gatttagttg
481  ctggctcgac taaccatttc aaaacggata ttgaggctta tattaacgag cataaaacca
421  gtcagcgagc ggtcagaaaa gatgccgttt tagtcaatga atggattatt tccagcgata
541  gcaattttct tgtaattta acggcggctg atacgcgcaa atattttgaa acagaataag
601  tttactttgc tgaaaaattt ggtgaagaaa acattcgtta tgcgattgtt catcttgatg
661  agagtacgcc ccataatgcat atgggaattg ttccatttga tgatgagtat aattatcgg
721  ctaaacgggt gttaaatcgt gcgcttttgc aaaacgttca agatcaattg ccagtttatt
841  tacgacaaca cggatttgat gttgaacgtg gtattcaaga atcgaacat  aaaagtttaa
781  cggtagcaga atacaagct atgcgggaag acttgaaaaa ggcgacgctt caaaaacgag
901  aaatacaagc tgaacttgaa gatgccagaa aacgccttgc tgaacttaaa cctcgtgatc
961  agcaggaaat tgagagcaaa cctactcttt taagcaagga taaagtgggt gttagaaaaa
1021  gtgatcttca tgacttagaa tctcagcag ctgtcagtga tatttataat caacaacaga
1081  accgtttaaa acttgataat caaagcttaa attatcaact gcttgaagtt aaagacaata
1141  attatgattt aagcaagaaa aatgagaagc tccaaaaatt agtggatagc ttacaaggaa
1201  ttgttcggag cgttgaccgg ttcttacagc gcaaattagg tgttggctta ccaagtgagt
1261  ggctagaacg agctggacta aaagaaccgt ctaaaaaagc ccctcagagg ccacaggaac
1321  gttcagagag acagcatgat gaattagatg gtccaagtct ttgaacttgg cctagggctt
1381  taatttacc cctgatgatc attgaagctg gttaatggcc gtcagtcaac ggtaaatcga
1441  attaaaggg aattactgct tagcagttag tccctttttg aggtttaaag gagtgcactg
1501  actactaga ccaagacact tttgcgcatg caaagaaaag cacacctgct ttttttgcct
1561  gcctcacggc gagtgcgggg tgagtttgag cgggggctcc cgctcattta tggggtccag
1621  ctggttcagc tggtcagtat ggctgaaagc catggtctta aaaagcagtt cggcgatttt
1681  tgctgatctg ctttttgggg tttgaaaccg tcgttttttc gacggtttct tcttatcttg
1741  atactattag aaacaacgga ctttttaaaa agctggctaa agccttgaca gaactgggct
1801  taggcgtatt atgagtttat aaaatgaata aagaaaaaac ccacgtgaga attcctagtt
1861  tggcgaccgg gaacacgtga gttaatcttg aatattcgta tttactagac atagtttaaa
1921  gcttagtata gtaagcgtca agccttagt tttagtaaat acataaaaaga ttataggttc
1981  tcactgtggt ggatgagagg agcttttttag tttggctgat agaaaagttt tagttgatcg
2041  atcgcagtcg gaaaaagtac gaccatggcg agaacataag ttagagaatt tacagtatgg
2101  tgattattta caaatgttgc actacaagaa agcccatcga gttaaagagt gttgtgaggt
2161  attactgttt gtggaagata aaaatggtca caaaaaattg gctcagactt ggttttgcca
2221  tttccgtttg tgtccgttat gtaattggcg gcggtcaatg aaacaatcta accagttaac
2281  tcaaattttg acagaagcag ttaaacagcg aaaaacgggt cggttcttat ttttaacgct
2341  gacggttgaa aataccaccg gtaatcagtt aaaaagtgaa ttacgacaaa tgggacgagc
2401  cttcgtgat ttaatgcggt ataaaaagcc agctaagaat ttgttgggct atgtgcgctc
2461  aactgaggtt accattaatc acgaagcaga tcagccgatg taccaccacc atatgcagtg
2521  tttgcttttt atgaaatcga gttattttac aggaactgat aattatattt cacaagcaga
2581  atggactaga tattggcaac gagcagtgaa attagcttat gcgcccgttg tgaatgttga
2641  agcgttataa ccgaatgtga aacccagaa aaattccttg ctggctagtg ctcaagaaac
2701  ggctaaatat caggtgaagt ccaaagatat ttaactaat aatcaagaac aagatctaca
2761  agtaattgat gatttggaac aagctttggc tggttcccgg caaattagtt atgggtggctt
2821  gcttaaagaa attcgcaagc agttgcaatt agaagatggt gaaaatggcg atttgattaa
2941  tacggatagt ggtgatcaag aaactgatca agtagtgcgt gaaattgttg ctaagtggga
2881  ctactcagct aaaaattatt tcgtatagat ggaaaatttg tgaagtattg aaagataagg
3001  agactagaga tgaaaaataa aaataaaact gcattttgga tacctttttc tattacgttt
3061  tgcgtttttt tgtttttcct ttttgctgag ctttttttga ataaaatatt tggactcac
3121  ctttttttat attgggtaat attattgctt atcgttagtt tgctatctgg agttgttggc
3181  aattatatta gttataaata taacaaaaga cataagtaaa aaagaattta tacaatactc
3241  tatacactta cattttgtaa ccaatcagca tgttgtggtt aactatgaga tttattttct
3301  atagtttttt tgtggttaag ctgcatcag cttgccccac tccggtagag tctcgcagta
3361  atcactagtg aattcggcgg cgctgcagg tccaccatat gggagagctc ccaacgcggt
3421  ggatgcatag cttgagtatt ctatagtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggtcat
3481  agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa
3541  gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgcagta actcacatta attgcggttg

```

3601 gctcactgcc cgctttccag tccggaaacc tgtcgtgcc gctgcattaa tgaatcggcc
 3661 aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact
 3721 cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcgvcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggaatac
 3781 ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggcagcaaa
 3841 aggcagggaa ccgtaaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg
 3901 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa
 3961 gataccaggc gtttcccctt ggaagctccc tctgcgctc tctgttccg accctgccgc
 4021 ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac
 4081 gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac
 4141 cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tctgcttgag tccaaccggg
 4201 taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcaggt
 4261 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa
 4321 cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttgtagct
 4381 cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtgggtt tttgtttgc aagcagcaga
 4441 ttaccgvcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg
 4501 ctcaagtggaa cgaaaactca cgtaagggg ttttggctat gagattatca aaaaggatct
 4561 tcacctagat cttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaagct atatatgagt
 4681 aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtggagg acctatctca cggatctgtc
 4621 tatttcgttc atccatagtt gctgactccc ccgctcgtgta gataactacg atacgggagg
 4741 gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccgctccag
 4801 atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg cctgcaactt
 4861 tatccgcctc catccagtct attaatgttt gccgggaagc tagagtaagt agttcccgag
 4921 ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgtcctcgt
 4981 ttggtatggc ttcattcagc tccggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgcacccca
 5041 tgttgtgcaa aaaaagcgggt agtccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagttgg
 5001 ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgcat
 5221 ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaacca gtcattctga gaatagtgta
 5161 tgcgvcgacc gagtgtctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg cccatagca
 5281 gaactttaa agtgcctatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct
 5341 taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtc acccaactga tcttcagcat
 5401 cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaa
 5461 agggaataag ggcgacacgg aatgttgaa tactcactt cttcttttt caatattatt
 5521 gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa
 5641 ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgat gcggtgtgaa
 5581 ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagga aattgtaagc gtaaatattt
 5701 tgttaaaatt cgcgttaaat ttttgtaaaa tcagctcatt ttttaacca taggccgaaa
 5761 tccgcaaaat ccctataaaa tcaaaagaat agaccgagat agggttgagt gttgttccag
 5821 tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg
 5881 tctatcaggg cgatggccca ctactgtaac catcaccta atcaagtttt ttggggtcga
 5941 ggtgccgtaa agcactaaat cggaaacct aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg
 6001 gaaagccggc gaacgtggcg agaaaagga ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg
 6061 cgctggcaag ttagcggctc acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc
 6121 cgctacaggg cgcgtccatt cgcattcag cctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggg
 6181 gcggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag
 6241 ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattgta
 6301 atacgactca ctata