

# Filière Technologies du vivant

## Orientation Biotechnologie

# Diplôme 2009

*Jonathan Sobel*

*Transformation  
de différents vecteurs d'expression utilisés  
pour des techniques de luminescence BRET<sup>2</sup>  
en un vecteur unique compatible  
avec le système Gateway d'Invitrogen*

Professeur	BRUNO SCHNYDER
Expert	RAPHAËL RODUIT

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr <b>2008/09</b>	No TD / Nr. DA <b>bt/2009/81</b>
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student <b>Jonathan Sobel</b>	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent <b>Bruno Schnyder</b>	Expert / Experte (données complètes) <b>Raphael Roduit</b> IRO   Gd Champsec 64   1950 Sion Raphael.rodut@irovision.ch	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <sup>1</sup> <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

## Titre / Titel

**Transformation de différents vecteurs d'expression utilisés pour des techniques de luminescence (BRET<sup>2</sup>), en un vecteur unique compatible avec le system Gateway d'Invitrogen**

## Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

- Modifier les vecteurs d'expression BRET<sup>2</sup> en système compatible Gateway.
- Proposer une stratégie de clonage et développer ce choix.
- Clonage, transformation de bactéries, test par digestion, etc.
- Séquencer et faire les cartes y relatives.
- Tester l'efficacité de ces vecteurs d'expression en cellules entières par analyse BRET<sup>2</sup>

## Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Resp. de la filière

Leiter des Studieng.: .....

<sup>1</sup> Etudiant / Student: .....

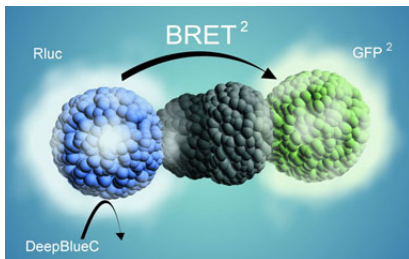
## Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:  
27.04.2009Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:  
19.08.2009 — 12h00Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:  
04.09.2009Défense orale / Mündliche Verfechtung:  
semaines 36 ou 37 — selon programme

<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.  
 Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

# Transformation des vecteurs d'expression BRET<sup>2</sup> en système gateway compatible

Diplômant/e Jonathan Sobel



## Objectif du projet

L'objectif de ce travail de diplôme est de générer les quatre vecteurs d'expression BRET<sup>2</sup>-Gateway puis de tester ces vecteurs avec NR2E3, une protéine impliquée dans la différenciation des photorécepteurs de la rétine dans l'œil.

## Méthodes | Expériences | Résultats

Dans un premiers temps, une résistance antibiotique a été changée pour les deux vecteurs BRET<sup>2</sup> contenant la Renilla luciferase, afin de les rendre compatibles avec le système de sélection Gateway. La 2<sup>ème</sup> étape de ce projet a consisté en l'introduction, au niveau du multiple cloning site des 4 vecteurs BRET<sup>2</sup>, de la cassette Gateway, contenant les séquences de recombinaison spécifiques. Dans un troisième temps, le gène d'une protéine impliquée dans la différenciation des photorécepteurs, a été introduit dans un vecteur d'entrée, qui permettra de tester les vecteurs par une analyse BRET<sup>2</sup>. Un test de fluorescence a permis de montrer que les vecteurs sont fonctionnels, et des contrôles par séquençages et digestions montrent que les constructions obtenues sont conformes aux attentes du mandant.

Travail de diplôme  
| édition 2009 |

### Filière

*Technologies du Vivant*

### Domaine d'application

*Biotechnologies*

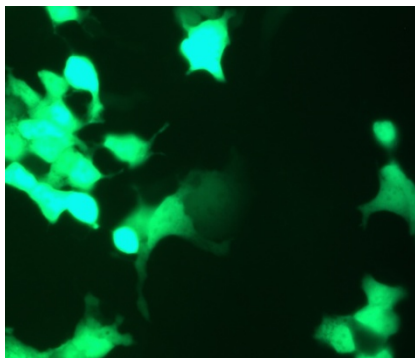
### Professeur responsable

*Dr Schnyder Bruno*

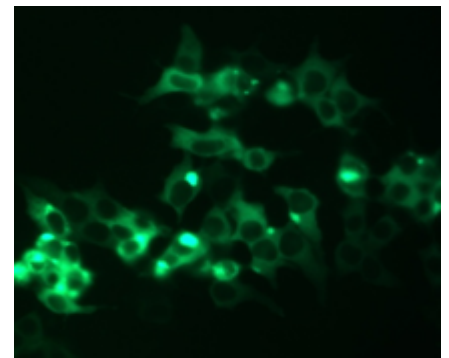
*Dr Roduit Raphael*

### Partenaire

*Institut de Recherches en  
Ophtalmologie (IRO)*



Microscopie à fluorescence sur des cellules HEK 293T exprimant la protéine GFP<sup>2</sup>.



Microscopie à fluorescence sur des cellules HEK 293T exprimant la protéine Gus-GFP<sup>2</sup> dans le cytosol.

HES-SO Valais  
Route du Rawyl 47  
1950 Sion

Tél. 027 606 85 11  
URL [www.hevs.ch](http://www.hevs.ch)





<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	4
LES TECHNIQUES BASÉES SUR LA FLUORESCENCE (FRET, BRET) .....	5
CLONAGE PAR RECOMBINAISON : LE SYSTEME GATEWAY® .....	9
NR2E3 : UN HOMO DIMER IMPLIQUE DANS LA DIFFERENCIATION DES PHOTORECEPTEURS.....	12
<b>MATERIEL &amp; METHODE .....</b>	<b>15</b>
MATÉRIEL .....	15
<i>Milieus.....</i>	<i>15</i>
<i>Cellules/Bactéries .....</i>	<i>15</i>
<i>Kit .....</i>	<i>15</i>
<i>Lab devices .....</i>	<i>15</i>
<i>Enzymes.....</i>	<i>16</i>
<i>Vecteur, insert, ADN.....</i>	<i>16</i>
<i>Primers .....</i>	<i>16</i>
<i>Réactifs.....</i>	<i>17</i>
<i>Cartes des Vecteurs et insert : .....</i>	<i>17</i>
MÉTHODE .....	19
STRATÉGIE GÉNÉRALE : .....	19
<i>Production d'un stock de vecteurs, de bactéries et de milieux.....</i>	<i>19</i>
<i>Sous- clonage de la Zéocine à la place de la kanamicine .....</i>	<i>19</i>
<i>Insertion de la Cassette de recombinaison Gateway dans les différents vecteurs BRET<sup>2</sup> .....</i>	<i>20</i>
<i>Production d'un Vecteur d'entrée contenant NR2E3.....</i>	<i>22</i>
<i>Test de fluorescence avec les pGus-BRET<sup>2</sup> .....</i>	<i>22</i>
PROTOCOLES .....	23
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>27</b>
SUIVI DE CULTURE LORS DE LA PRODUCTION DE BACTÉRIES COMPÉTENTES ET EFFICACITÉ DE TRANSFORMATION .....	27
GEL DE VÉRIFICATION DES PLASMIDES PGFP-C1, PGFP-N1, PRLUC-C1 ET PRLUC-N1 .....	28
PRÉPARATION, PURIFICATION ET QUANTIFICATION DES VECTEURS .....	29
PRÉPARATION DU SOUS-CLONAGE DE LA RÉSISTANCE À LA ZÉOCINE DANS LES VECTEURS PRLUC-C1 ET PRLUC-N1.....	30
SOUS CLONAGE DE LA ZÉOCINE DANS PRLUC-C1 ET PRLUC-N1 .....	31
PRODUCTION DE PRLUC-C1 ZEO ET DE PRLUC-N1 ZEO : GEL DE CONTRÔLE ET SÉQUENÇAGES.....	33
OUVERTURE DES VECTEURS AVEC ECORV ET PURIFICATION SUR GEL.....	35
LIGATION DES VECTEURS PRLUC C1 ZEO, PGFP C1, PRLUC N1 ZEO ET PGFP N1 AVEC LA READING FRAME CASSETTE ET	
TRANSFORMATION.....	36
SÉLECTION DES CLONES AYANT INCORPORÉ L'INSERT CORRECTEMENT .....	36
PRÉPARATION D'ADN SUR LES PDEST, GELS CONTRÔLES ET SÉQUENÇAGES.....	39
PRODUCTION DU VECTEUR D'ENTRÉE PENTR-NR2E3 .....	41
TEST DE FLUORESCENCE .....	43
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	45
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>46</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>46</b>

# Introduction

---

## *Introduction générale*

À l'heure où le « Genome Project » arrive à son terme et où de nombreux modèles biologiques ont été entièrement séquencés, il devient nécessaire d'avoir des outils performants pour comprendre les mécanismes de fonctionnement et de développement des organismes. Le code génétique, l'Acide Désoxyribonucléique (ADN), est transcrit en Acide ribonucléique (ARN) puis traduit en protéines. Celles-ci permettent d'assurer les différentes fonctions dans la cellule. Elles ont un rôle structural, moteur, immunitaire, de signalisation, enzymatique, régulateur ou encore connectif. Les interactions entre protéines permettent de créer des complexes de protéines exécutant par exemple la transcription, ou la création de canaux à travers la membrane des cellules. L'expression de différents gènes permet aux cellules de se différencier pour assumer un rôle particulier dans le fonctionnement de tissus et, par extension, d'organes. Une surexpression ou une sous-expression de ces gènes régulés par certaines protéines peut conduire à une pathologie (cancer, rétinite pigmentaire, ESCS,...). Tous ces mécanismes utilisent des protéines qui interagissent entre elles. La protéomique est donc un des nouveaux enjeux de la recherche.

Il existe de nombreuses techniques permettant de visualiser les interactions entre protéines, et ainsi de faire des cartes de ces interactions : l'interactome . Il est ensuite possible, grâce à ces cartes, de poser une hypothèse sur la fonction biologique de chacune des protéines. Les techniques classiques comme la co-immunoprécipitation, ou le « yeast two hybrid system » sont limitées soit par l'utilisation d'anticorps soit par l'environnement cellulaire (noyau) dans lequel est visualisée l'interaction entre protéine. C'est pourquoi de nouvelles techniques, basées sur la fluorescence, ont été développées.[1]

Les protéines testées peuvent être endogènes, c'est-à-dire naturellement produites par l'organisme, dans le cas de Co-immunoprécipitation. Elles peuvent être exogène, à savoir, des protéines recombinantes (ou des protéines de fusion) introduites par transfection de vecteurs d'expression, comme dans le cas du yeast two hybrid system ou de méthodes basées sur la fluorescence.

Les nouvelles techniques permettent de développer des méthodes de ciblage de ces interactions à grande échelle, de manière plus fiable et plus rapide. En effet l'une des étapes limitante est le clonage du gène des protéines d'intérêt dans un vecteur d'expression, permettant la visualisation des interactions entre protéines. En effet les sites de restriction ne sont pas toujours idéalement placés pour permettre un clonage aisé. De plus lorsqu'une technique nécessite l'utilisation de plusieurs vecteurs d'expression différents, l'étape de sous-clonage devient longue et fastidieuse. Le système de clonage par recombinaison Gateway permet de parer à cette difficulté, car il suffit de créer un seul vecteur d'entrée pour permettre la recombinaison dans tous les vecteurs d'expression.

L'objectif de ce travail de diplôme est de générer des vecteurs d'expression Bret2-Gateway puis de tester ces vecteurs avec NR2E3, une protéine impliquée dans la différenciation des photorécepteurs de la rétine dans l'œil.

## Les techniques basées sur la fluorescence (Fret, Bret)

La fusion traductionnelle de protéines peut servir à l'analyse de la fonction des protéines ainsi qu'à leur suivi dans des cellules vivantes.

La localisation d'une protéine dans la cellule est souvent un bon indicateur pour déterminer sa fonction biologique. Les protéines qui voyagent du cytoplasme au noyau quand une cellule est exposée à un stimuli, ont probablement un rôle de régulateur de l'expression des gènes en réponse à ce stimuli. L'adressage des protéines se fait notamment grâce à une séquence spécifique et courte d'acides aminés. Les protéines nucléaires contiennent une ou plusieurs séquences spécifiques d'acides aminés (peptide signal, SKL), qui servent de signal d'importation-exportation nucléaire après leur synthèse dans le cytosol. Ces régions sont identifiables par une fusion traductionnelle de ces séquences avec une protéine facilement détectable comme un traceur. La localisation et le comportement du traceur dans la cellule démontreront si la protéine contient un signal d'adressage spécifique au noyau (Nuclear Localisation Sequence NLS) ou à d'autres organelles (peroxysome, mitochondrie, etc) [1].

Ces protéines recombinantes sont produites par des méthodes classiques de biologie moléculaire, comme le sous-clonage dans un vecteur d'expression.

L'un des traceurs le plus courant actuellement est la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). Le traçage à l'aide de la GFP consiste simplement à fusionner la séquence codant la GFP à l'une des extrémités du gène codant la protéine que l'on veut marquer. Le résultat est une protéine de fusion se comportant normalement comme l'original, dont on peut suivre les mouvements par microscopie confocale à fluorescence.

La GFP et ses dérivés de différentes couleurs peuvent aussi permettre de visualiser des interactions entre protéines. Lors de cette application, deux protéines d'intérêt sont fusionnées avec deux fluorochromes différents. Le fluorochrome donneur doit avoir un spectre d'émission qui se superpose avec le spectre d'absorption du fluorochrome accepteur. Lorsque les protéines fusionnées avec leur fluorochrome respectif se rapprochent, l'énergie provenant d'une source lumineuse absorbée par le donneur se transmet à l'accepteur.

Ce transfert d'énergie se nomme Fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET).

Ceci a pour conséquence le changement du spectre de réémission de la lumière par le fluorochrome accepteur. En effet si le donneur absorbe de la lumière violette et émet de la lumière bleue et si l'accepteur absorbe la lumière bleue et émet de la lumière verte, l'interaction protéine-protéine pourra être observée si l'échantillon est exposé à une lumière violette et s'il y a émission de lumière verte.

Une représentation schématique du principe de la méthode FRET est montrée à la figure 1. Deux protéines ayant une interaction potentielle ont été fusionnées respectivement avec un donneur (CFP) et un accepteur (YFP). S'il y a interaction (rapprochement du donneur et de l'accepteur) il y a un transfert d'énergie, lorsque le donneur est excité à 433nm, l'accepteur émet alors à 527nm [2].

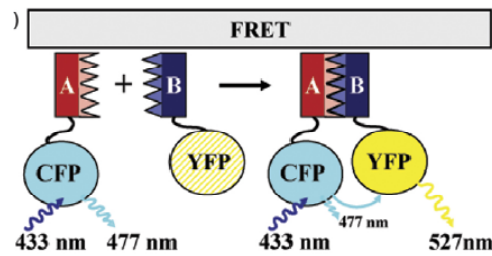


Figure 1 : méthode FRET [2]

Le principe du BRET est exposé à la figure 2. Les deux protéines sont fusionnées avec une GFP<sup>2</sup> et une enzyme Renilla Luciferase (Rluc). L'ajout d'un substrat Coelenterasine H(DeepBlueC) permet à la luciférase d'émettre de la lumière à 410nm. Si les protéines interagissent, il y aura transfert d'énergie et émission de la GFP<sup>2</sup> à 515nm.

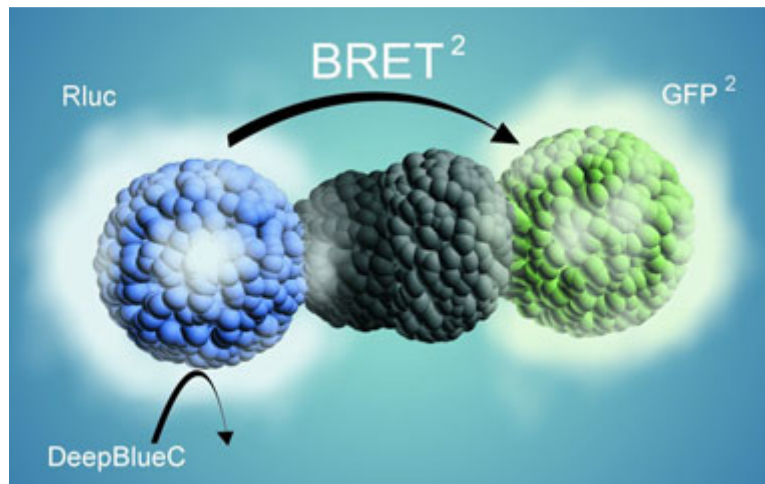


Figure 2 : principe du Bret [3]

Le principe du transfert d'énergie par résonance a été découvert par Theodor Forster à la fin des années 1940. Il consiste en un transfert d'énergie d'un chromophore excité (donneur) à un autre chromophore (accepteur). Dans le cas du FRET, il s'agit de deux protéines fluorescentes, alors que dans le cas du BRET, le donneur est une enzyme qui devient bioluminescente en catalysant la transformation d'un substrat. Une interaction protéine-protéine a pour conséquence de diminuer l'émission du donneur et d'augmenter l'émission de l'accepteur et donc sa fluorescence. Il est important de noter que l'efficacité du transfert d'énergie ( $E_{RET}$ ) est inversement proportionnelle à la distance entre le donneur et l'accepteur.

$$E_{RET} = \frac{1}{1 + R^6/R_0^6}$$

Equation 1 : efficacité du transfert d'énergie en fonction de la distance entre les chromophores (6)

$R_0$  est la distance à laquelle 50% de l'énergie maximale est transférée du donneur vers l'accepteur.  $R_0$  est en général de l'ordre de 5 nm. Cette efficacité du transfert d'énergie permet de mesurer la distance entre les protéines dans un ordre de grandeur de 5-10 nm. Le transfert d'énergie est aussi influencé par l'orientation des chromophores ainsi que par la superposition de leur spectre d'absorption et enfin par le rendement du quantum du donneur et le coefficient d'extinction de l'accepteur.



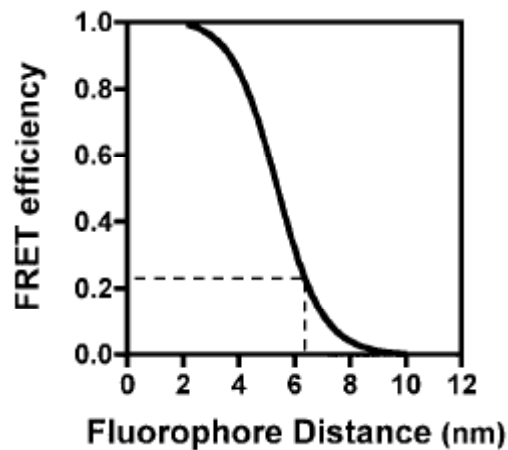


Figure 3 : corrélation entre l'efficacité FRET et la distance entre les protéines fluorescentes [2]

La corrélation représentée à la figure 3 permet d'observer une interaction avec une distance approximative de 6nm entre des protéines fluorescentes.

Les techniques basées sur la fluorescence offrent de nombreux avantages par rapport aux techniques courantes de test d'interaction de protéines, comme par exemple, le « yeast two hybrid system » qui est la plus utilisée. En effet les techniques BRET et FRET peuvent être appliquées pour observer une interaction entre protéines dans le temps car la mesure n'est pas invasive. De plus, ces techniques permettent de tester les interactions entre protéines dans différents compartiments sub-cellulaires ou organelles des cellules natives contrairement au « yeast two hybrid system » qui fonctionne uniquement dans le noyau. Le système BRET/FRET est particulièrement efficace avec des protéines membranaires où les méthodes traditionnelles sont limitées. De plus, ces méthodes ne sont pas affectées par les différentes modifications post-traductionnelles entre cellules mammifères ou végétales comme le « yeast two hybrid system » qui fonctionne uniquement dans la levure. En utilisant un promoteur spécifique à un type cellulaire et/ou une fusion à une séquence cible, il est possible de visualiser par FRET/BRET une interaction dans un compartiment d'un type cellulaire prédéfini à l'avance. Enfin ces techniques permettent de visualiser une interaction *in vivo* dans le cadre d'un processus dynamique comme la signalisation intracellulaire. [3]

Ces techniques de fluorescence permettent de localiser et de visualiser des interactions de protéines non seulement dans des cellules vivantes mais aussi dans des animaux vivants (figure 4) ou dans des plantes.[4][5]

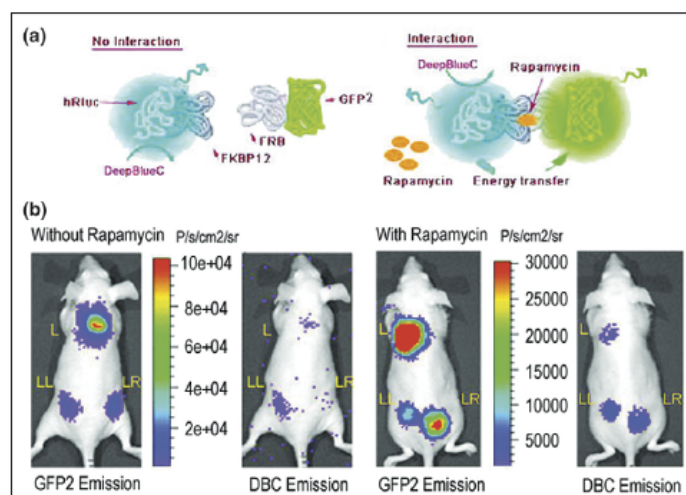


Figure 4 : interaction de protéines dans des souris vivantes [4]

De A, Gambhir SS et al ont utilisé la technique BRET pour montrer l'interaction entre FKBP12 et FRB qui est possible grâce à la rapamycine. Ils ont ensuite visualisé cette interaction in vivo avec une souris ayant reçu  $5 \times 10^6$  cellules 293T transfectées avec pFKB12Rluc ou pFRBGFP en présence ou en absence de rapamycine avec Deep Blue Coelenterazine (DBC) comme substrat pour Rluc. La partie a) montre la structure des protéines de fusion sans interaction et avec interaction en présence de rapamycine. La partie b) montre in vivo la localisation de l'interaction avec ou sans rapamycine [4].

Les techniques basées sur le transfert d'énergie par résonance ont malgré tout quelques limitations. L'efficacité de transfert est influencée par divers facteurs comme l'orientation du donneur par rapport à l'accepteur, ou les différents états conformationnels dus aux protéines de fusion qui peuvent rendre l'interaction entre les protéines défavorable. Les marqueurs GFP et Rluc sont fusionnés aux extrémités C et N qui peuvent potentiellement être les sites d'interaction de ces protéines d'intérêts. Il est donc possible que les protéines interagissent sans que leur marqueur soit suffisamment proche pour que le transfert d'énergie ait lieu. L'interaction ne serait, dans ce cas, pas détectée par cette technique. En d'autres termes, un résultat négatif avec ces techniques ne prouve pas nécessairement qu'il n'y ait pas d'interactions. Une surexpression de protéines de fusion peut aussi conduire à des faux positifs. L'utilisation de protéines exogènes peut donc induire ou empêcher des interactions ayant normalement lieu. La présence du marqueur peut aussi interférer sur l'interaction entre protéines par encombrement stérique. C'est pourquoi des marqueurs plus petits seraient souhaitables. La cinétique lente du « turn over » de la GFP, c'est-à-dire la vitesse de transition entre l'état normal et l'état excité, peut influencer la mesure lors d'interaction rapide. Des fluorochromes moins stables pourront, à l'avenir, permettre de détecter ces interactions dans le cas d'études temporelles d'interaction de protéines. Enfin, la sensibilité de la GFP au pH peut avoir une influence négative sur la mesure. [3]

La technique BRET offre quelques avantages par rapport à la technique FRET car elle ne nécessite pas l'utilisation d'une illumination comme excitation. La technique BRET est plus efficace lorsque les cellules sont photosensibles aux longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation FRET. La technique BRET est aussi souhaitable avec des cellules ayant une auto fluorescence comme les cellules de plantes. De plus, une inactivation des fluorophores par la lumière (photobleaching) est un inconvénient incontournable de la technique FRET. La technique FRET peut être compliquée par une excitation simultanée des deux fluorochromes qui augmente le bruit de fond durant de la mesure. La technique BRET ne nécessite pas d'excitation lumineuse externe car l'énergie lumineuse est produite par catalyse enzymatique en présence de coelenterazine. En revanche la technique BRET est limitée par les faibles intensités lumineuses produites, nécessitant un matériel sensible et perfectionné pour la détection et la mesure. [3]

## Clonage par recombinaison : le système Gateway®

Le séquençage entier du génome est terminé pour des centaines d'organismes. Il a permis de passer à la caractérisation biochimique et fonctionnelle du produit du gène. Chaque étape de cette analyse nécessite un clonage dans des vecteurs spécifiques qui vont conférer des propriétés particulières aux gènes d'intérêt. Les méthodes classiques de clonage, pour permettre la traduction d'une grande quantité d'ORF (Open Reading Frame), ne sont pas assez performantes pour fournir des solutions efficaces et rapides. Durant ces dernières années, certaines limitations liées à la génération de plasmides d'expression multiple ont trouvé des solutions élégantes grâce à des systèmes d'expression permettant le clonage simultané de centaines de gènes. Ces systèmes de clonage avancé utilisent des stratégies variées comme la recombinaison *in vivo*, la transposition par site spécifique, la recombinaison à l'aide de sites spécifiques, l'accouplement de bactéries et la recombinaison homologue, le transfert de simples brins grâce à la topoisomérase, et l'appariement *in vivo* de simples brins. Toutes ces stratégies sont malheureusement limitées par leurs champs d'applications et les exigences en matière d'hôtes spécifiques, par leur schéma de sélection ou par les contraintes liées au vecteur. Le système de clonage par recombinaison Gateway permet de surmonter ces contraintes en offrant la possibilité de cloner des produits de PCR dans un plasmide central (Entry clone) et de transférer des segments d'ADN entre le clone d'entrée et une variété de vecteurs à application spécifique et de lier ces segments d'ADN dans un ordre prédéfini en termes d'orientation et de cadre de lecture (figure 5). Le système de clonage par recombinaison Gateway permet d'obtenir, en un temps record, un nombre important de vecteur d'expression à application spécifique, à partir d'un seul vecteur d'entrée généré par des méthodes classiques. [6]

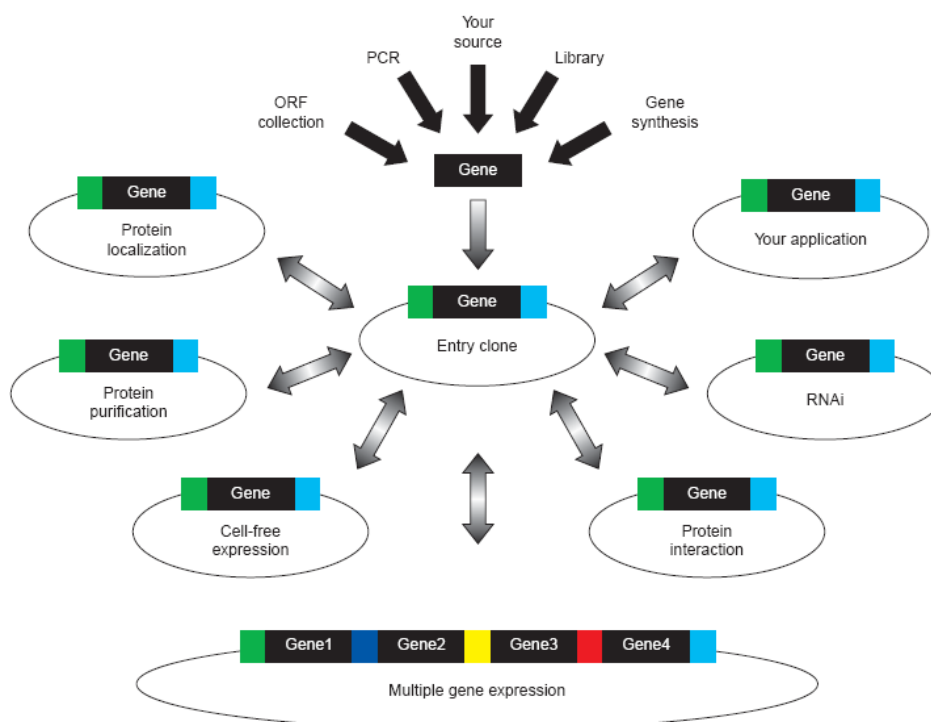


Figure 5 : vue général du système de clonage Gateway [6]

Ce système permet un transfert rapide de gènes entre un plasmide silencieux (entry clone) et une grande variété de vecteurs de destination générant des clones d'expression pour différentes

applications : purification de protéines, interaction de protéines, localisation de protéines, RNAi, etc.... [7]

La technologie Gateway se base sur la recombinaison de sites spécifiques de l'intégration ou de l'excision du phage  $\lambda$ . Ces événements ont lieu par recombinaison à des séquences d'attachement spécifique sur l'ADN du phage  $\lambda$  et sur le chromosome bactérien appelé respectivement *attP* et *attB*.

Ces sites sont composés de 7 paires de bases invariantes O (séquence « core ») entourés de séquences appelées P et P', B et B'. Ce processus de recombinaison démarre lorsque certaines molécules de l'intégrase codée par l'ADN du phage et le facteur d'intégration bactérien « intégration host factor » (IHF) s'attachent à la paire de base 232 de la séquence *attP*. Le complexe se couple alors avec la paire de base 21 de la séquence *attB* du chromosome bactérien. Des petites séquences d'ADN échelonnées sont produites aux extrémités de la séquence « core » sur *attP* et *attB* ce qui permet l'échange de brins entre elles. Il y a formation d'un heteroduplex grâce à une petite région d'homologie (7 paires de bases) lors de l'échange. Cette jonction de Holiday est ensuite déterminée et le prophage devient entouré de deux séquences hybrides des sites *att* appelées *attL* (côté gauche) et *attR* (côté droit). Cette première réaction est nommée réaction « BP ». Bien que cette recombinaison soit réversible, les conditions de la réaction permettent d'éviter une excision, après intégration (figure 6). Int et IHF interviennent seuls dans cette intégration, alors que l'excision nécessite la présence de Xis codée dans l'ADN de phage. Cette dernière réaction est nommée réaction « LR ».

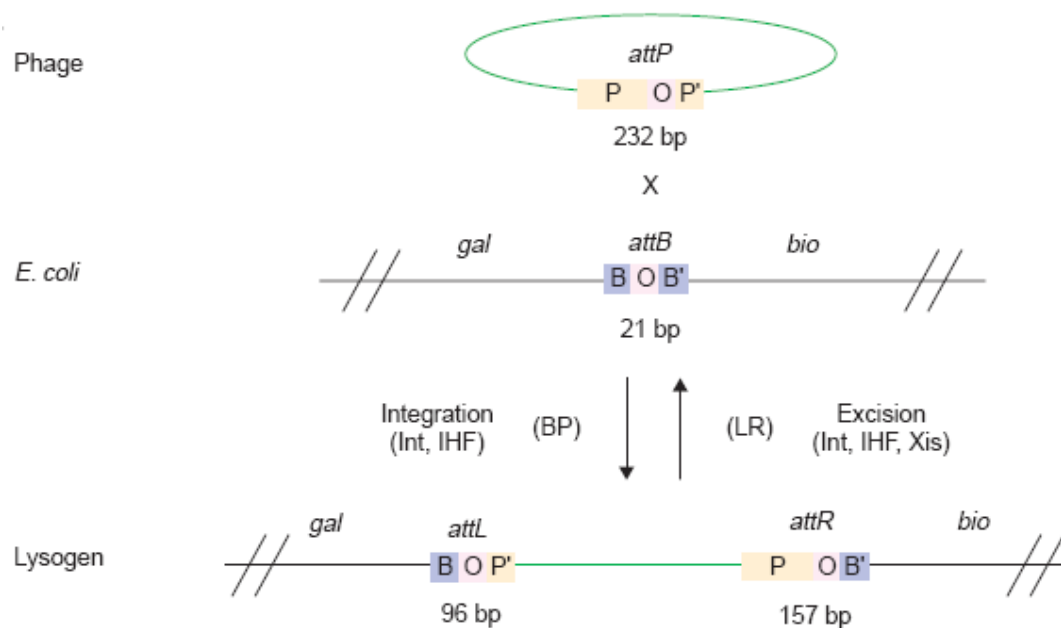


Figure 6 : recombinaison par site spécifique grâce au phage  $\lambda$ . [6]

Le système Gateway est né de l'observation des sites *att* qui peuvent être mutés pour générer un nombre important de sites de recombinaison très spécifique sans orthogonalité. En effet, il est possible de produire  $4^7 = 16384$  différents sites *att* en théorie. En pratique, il est nécessaire d'optimiser les séquences *att* pour maximiser l'efficacité de la recombinaison et éviter les réactions croisées entre les sites *att* spécifiques. La conséquence est qu'*attB1* recombinera avec *attP1*, mais pas avec *attP2* ou *attP3* par exemple. [8]



Le clone d'entrée est le point central du système Gateway (figure 7). Il s'agit d'un plasmide où le fragment d'intérêt est entouré de séquences *attL1* et *attL2*.

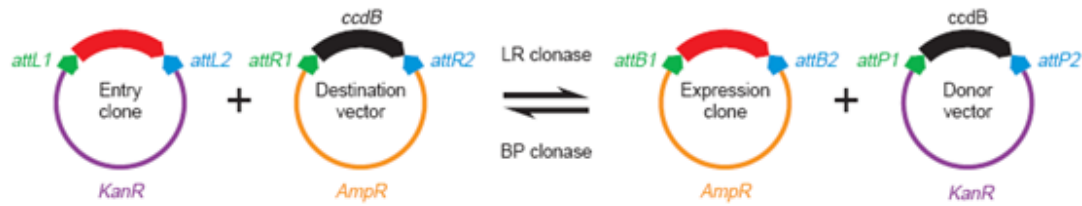


Figure 7 : les Réactions Gateway [6]

Une fois le clone d'entrée obtenu, le fragment d'intérêt peut être transféré dans un plasmide secondaire, c'est-à-dire le vecteur de destination ayant une application spécifique. Cette réaction est accomplie *in vitro* en mélangeant le clone d'entrée avec le vecteur de destination en présence de Int, IHF et Xis, qui forment le LR Clonase<sup>TM</sup> enzyme mix. Le produit de cette réaction LR est le clone d'expression qui contient le fragment d'intérêt et le vecteur donneur qui est un produit secondaire de la réaction. Une aliquote de cette réaction est ensuite utilisée pour transformer des *E.coli* compétentes. La sélection se fait par deux schémas différents pour obtenir uniquement les cellules ayant incorporé le clone d'expression. Le clone d'entrée et le vecteur de destination auront chacun un gène de résistance à des antibiotiques différents (kanamycine et ampicilline). Le vecteur de destination contient un marqueur de contre sélection, le gène *ccdB*, induisant la mort des cellules en cassant leur ADN à l'aide de gyrase. C'est ainsi que les cellules transformées sélectionnées à l'aide de l'ampicilline contiennent uniquement le clone d'expression. [6][9]

Les avantages du système Gateway sont sa facilité de mise en œuvre, sa spécificité, son adaptabilité et la possibilité de développer des méthodes automatisées pour des recherches à grandes échelles.

Les inconvénients sont principalement le prix et le fait que le système Gateway doit utiliser des bibliothèques de vecteurs Gateway compatibles pour permettre la recombinaison. [6]

## NR2E3 : un homo dimer impliqué dans la différenciation des photorécepteurs

L'anatomie de l'œil est présentée à la figure 8. L'œil se compose de la cornée, l'iris, le corps ciliaires, la sclera, la choroïde, la rétine et le nerf optique. La rétine, située au fond de l'œil, est la zone où l'information visuelle est codée en influx nerveux par les photorécepteurs, puis transmise au cerveau par l'intermédiaire du nerf optique. La rétine est composée de plusieurs couches et sous-couches de tissus : la rétine neurosensorielle (inner neurosensory retina), et l'épithélium (retinal pigment epithelium RPE). La couche RPE a, notamment, un rôle métabolique et bio chimique, ainsi qu'une fonction de transport et un rôle structural. La couche neurosensorielle est responsable de la conversion des stimuli lumineux en influx nerveux. Les sous-couches contiennent les différents types cellulaires depuis les photorécepteurs, jusqu'aux ganglions en passant par les cellules bipolaires, et les cellules amacriques. Ces sous-couches sont nommées dans la littérature choriocapillaris CC, retinal pigment epithelium RPE, outer segment OS, inner segment INS, outer nuclear layer ONL, outer plexiform layer OPL, inner nuclear layer INL, inner plexiform layer IPL, ganglion cell layer GCL. [10]

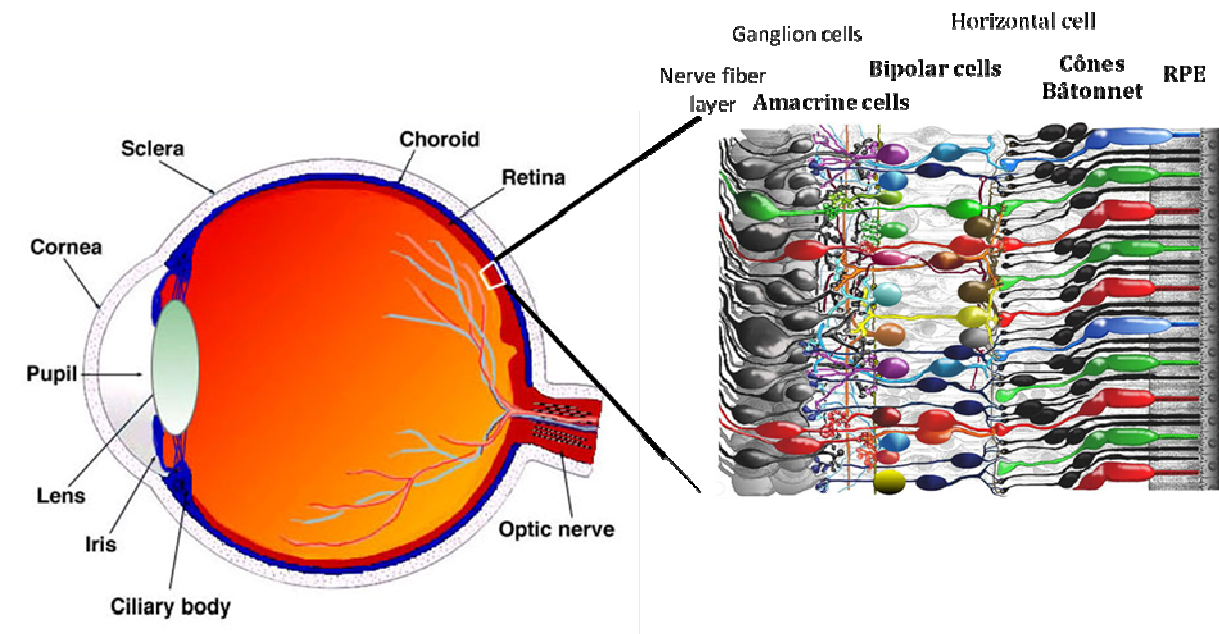


Figure 8 : anatomie de l'œil

Il existe plusieurs sous-types de photorécepteurs, à savoir les cônes-S, M et L ainsi que les bâtonnets, constitués à partir de précurseur de photorécepteurs provenant de cellules souches multi-potentes à travers trois voies principales représentées à la figure 9.

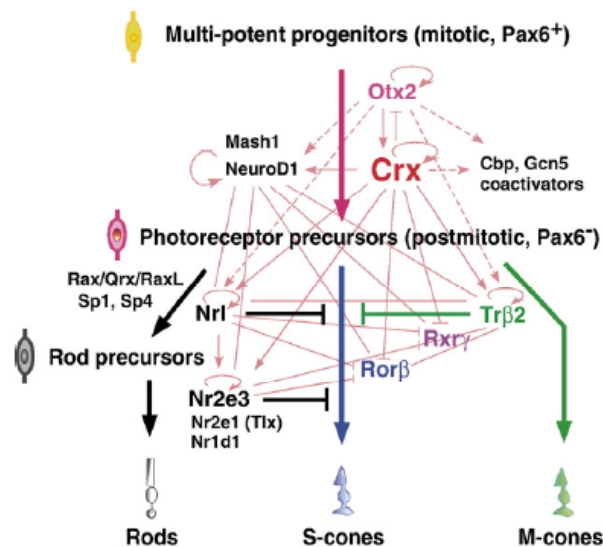


Figure 9: Modèle du réseau de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des sous-types de photorécepteurs [11]

Les facteurs de transcription des photorécepteurs, qui jouent un rôle majeur dans le processus, sont listés, sur la figure 9, à partir de leur relation épistatique démontrée par des études fonctionnelles *in vivo* ou *in vitro*.

Les lignes fines représentent des interactions entre protéines provenant de données publiées (lignes continues) ou non (lignes discontinues). Les flèches indiquent une régulation positive alors que les lignes bloquées représentent une inhibition ou une suppression.

NR2E3 est un récepteur nucléaire, de la famille des PNR (photoreceptor-specific nuclear receptor), qui réprime les gènes spécifiques aux cônes et active certains gènes des bâtonnets. Un monomère de NR2E3, montré à la figure 10, est composé de 410 acides aminés, qui forment 2 domaines, à savoir, un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison au ligand (LBD).

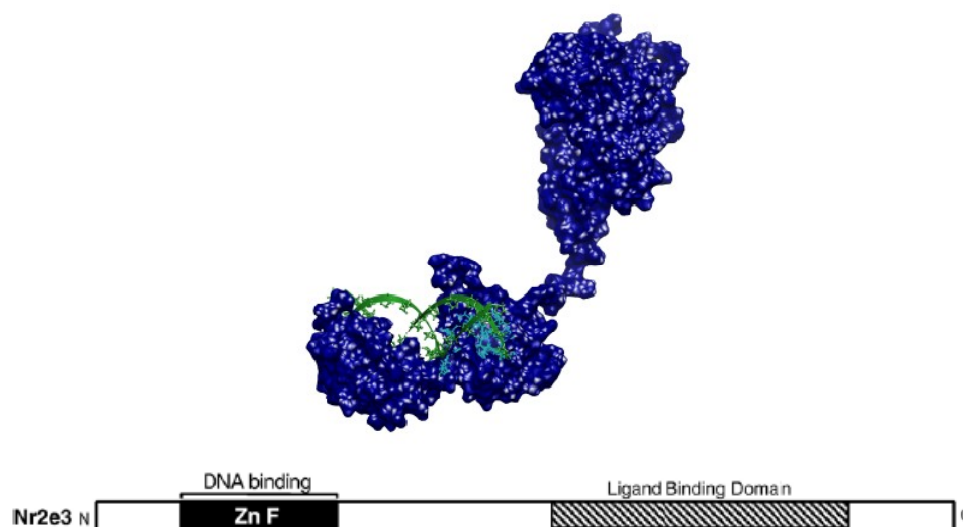


Figure 10 : structure de NR2E3 [12]

Chez les humains, une mutation de NR2E3 a été associée au syndrome d'amplification des cônes S sensibles aux petites longueurs d'ondes (ESCS) ainsi qu'à la rétinite pigmentaire (RP). Les différentes situations sont décrites par la figure 11. Chez les sujets sains, NR2E3 réprime la formation de cônes-S (bleu) à l'aide de corépresseurs, permettant ainsi la formation d'une grande quantité de bâtonnets. Dans le cas d'une mutation de NR2E3 sur le domaine de liaison au ligand ou corépresseur(LBD), il n'y a plus de régulation négative sur la formation de cônes-S, ce qui implique une production de cônes-S supérieure et une production de bâtonnets inférieure à la normale. Le même phénomène est observé lors d'une mutation sur le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Dans le cas de la rétinite pigmentaire (adRP), une mutation sur le domaine de liaison à l'ADN de NR2E3 permet une interaction avec CRX qui inhibe la production des bâtonnets ainsi que des trois sous types de cônes. [13][14][15][16]

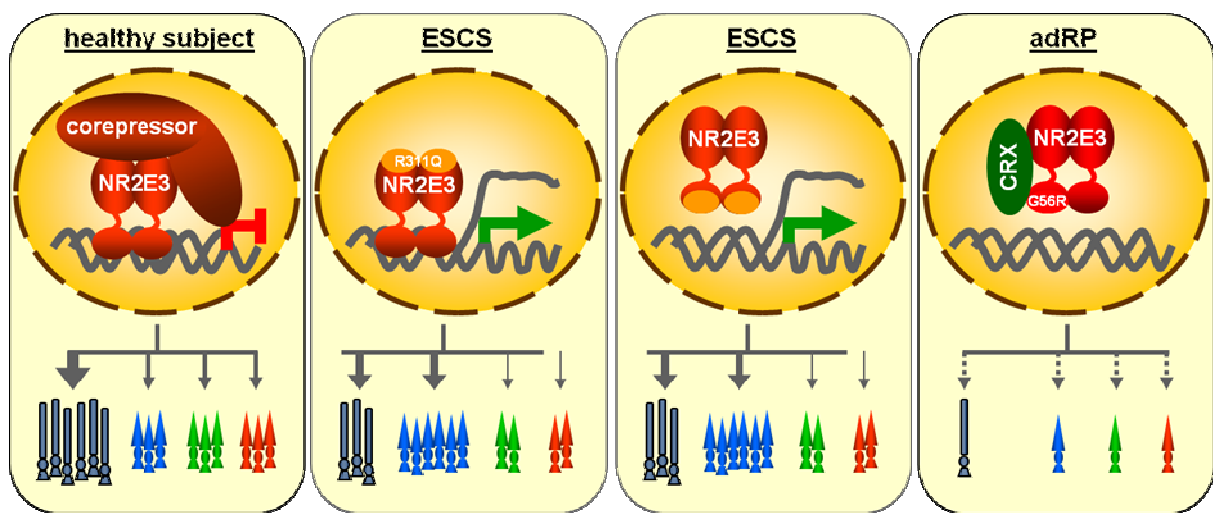


Figure 11 : régulation de la production de bâtonnets et de cônes par NR2E3 dans le cas de sujet sains ainsi que dans le cas de sujets atteints de ESCS ou adRP.[14]

La technique Bret classique a permis de montrer certaines de ces interactions comme l'homodimérisation de NR2E3 ou l'interaction entre NR2E3 et CRX lorsque la mutation G56R est présente sur le gène de NR2E3. L'idée est de reproduire le résultat du test sur l'homodimérisation de NR2E3 avec des vecteurs Bret-Gateway pour montrer la fonctionnalité de ces vecteurs d'expression.



# Matériel & Méthode

---

## Matériel

### *Milieux*

- LB MEDIUM Cat#3002-031, Lot#3002-031-119778, MP Biomedicals, LCC Illkirch, France
- LB-Agar MEDIUM Cat#3002-031, Lot#3002-031-119153, MP Biomedicals, LCC Illkirch, France
- SOC Medium Invitrogen, Cat no 15544-034 Lot no 554719, Invitrogen Carlsbad CA
- DMEM + Gluta Max TM-1 + pen/strep UFSB 10% ,Invitrogen Carlsbad CA

### *Cellules/Bactéries*

- One shot ccdB Survival 2T1R chemically competent cells, Part no A10460 lot no 585050  
Invitrogen Carlsbad CA
- Dg1 stock IRO
- DB3.1 stock IRO
- HB101 Stock IRO
- HEK 2 93 T: stock IRO

### *Kit*

- NucleoBand PC100 Cat No 740 573, Macherey-Nagel Düren Germany Lot 810/002
- QI Aquick Gel Extraction Kit (50), Cat No : 28704, Lot No : 130183848, QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
- Ligation Kit roche, Ref : rapid DNA ligation Kit, Ref 11635379001, Lot : 10738726, Roche, Mannheim Germany
- Promega Ligation Kit, T4 DNA ligase Buffer 10X 500ul, C126A 21542411, Promega, Madison USA, T4 DNA ligase 3U/ml, M180A 23043408, Promega, Madison USA
- QIA prep Spin Miniprep Kit (250), Cat no 27106 lot no 130170433, QIAGEN GmbH, Hilden Germany

### *Lab devices*

- Centrifugeuse Eppendorf 5810, 581107125 Eppendorf AG Hambourg, Germany
- Centrifugeuse Ominlab Hermile Z233MK-2, Ominlab AG Mettmenstetten, Switzerland
- Incubateur :  
Fermaks TS 8056, Serial no 3-2282, Bergen Norway  
Küher Shaker, Lab-therm, Switzerland
- Électrophorèse :, Bio Rad Power Pac 2000, Serial no 285BR, Bio Rad USA  
Bio Imaging System UVP Ominlab, Epl chemi II Darkroom, GDS-8000 System
- Autoclav :, Varioklav Steam Sterillzator, H+P Labortechnik AG
- Bain marie :  
Laud Ecoline RE107, A03070, Lauda DR.WOBSEER GmbH et CO, Lauda Königsthoffen
- Spectrophotomètre : Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer, nano drop technologies inc.  
Wilmington USA
- Microscope : Zeiss HAL 100 #036-09265, Zeiss AG, Feldbach Switzerland
- Appareil à fluorescence EBQ 100 isolated
- Flux laminaire : Hera Safe, HERAUS, Germany

## *Enzymes*

- Cla I : R0197s lot : 0350811 (5 U / ul) New England Biolabs
- Bst BI: R0519s lot : 0140901 (20 U / ul) New England Biolabs
- Bgl II : 105676639001 2000U (10 U / ul) Roche, Manheim Germany
- Pvu II : 10642690001 1000U (10 U / ul) Roche, Manheim Germany
- Cla I : 10404217001 500U (10 U / ul) Roche, Manheim Germany
- Phosphatase Alkaline AP, Ref 10 713 023 001, 1000U (1U/ul), Lot 13826120, Roche, Manheim Germany
- EcoRI : New England Biolabs
- EcoRV : New England Biolabs
- Tampon M SuRE/Cut Buffer M 1417983 10X, Roche, Manheim Germany
- Tampon B SuRE/ Cut Buffer B 10X, Roche, Manheim Germany

## *Vecteur, insert, ADN*

- Gateway Vector Conversion Reagent System (Reading frame A, C1,pEntrGus), Part no 44-2005  
lot no 585061
- pGFP C1:Biosignal ,MTL
- pGFP N1: Biosignal ,MTL
- pRluc C1: Biosignal ,MTL
- pRluc N1: Biosignal ,MTL
- pCDNA3: stock IRO
- pCDNA3.1-HIS/NR2E3: shiming chem.

## *primers*

Zeo-1: AGT-TGA-CCA-GTG-CCG-TTC-CG, lot 3526117, 40nmol, Eurogentec, Seraing Belgium

Zeo-2: GGA-AGT-TCG-TGG-ACA-CGA-CC, lot 3526118, 40nmol, Eurogentec, Seraing Belgium

ReadingFrame-1: CAC-ATT-ATA-CGA-GCC-GGA-AGC-AT, lot 3559582, 10nmol, Eurogentec, Seraing Belgium

ReadingFrame-2: CAG-TGT-GCC-GGT-CTC-TAT-CG. Lot 3559583, 10nmol, Eurogentec, Seraing Belgium

NR2E3-R-XHOI: AGG-CCT-CGA-GTA-GTT-TTT-GAA-CAT-ATC-ACA-AAG-G, lot 3620150, 40nmol, Eurogentec, Seraing Belgium

NR2E3-F-NCOI:CAT-GCC-ATG-GAG-ACC-AGA-CCA-ACA-GCT-C,lot 1055708, 40nmol, Eurogentec, Seraing Belgium

## Réactifs

- SYBR safe: SYBR Safe DNA gel Stain : lot 478385 Invitrogen Molecular Probes, Eugene Oregon, USA
- Zeocine 100mg/ml, Part no 45-0430, lot no 1307683, Invitrogen Carlsbad USA
- Calcium Chloride, 2M #E109A25698001, Promega, Madison USA
- Hepes Buffered Saline #E110A 27648301 Promega, Madison USA

## Cartes des vecteurs et insert :

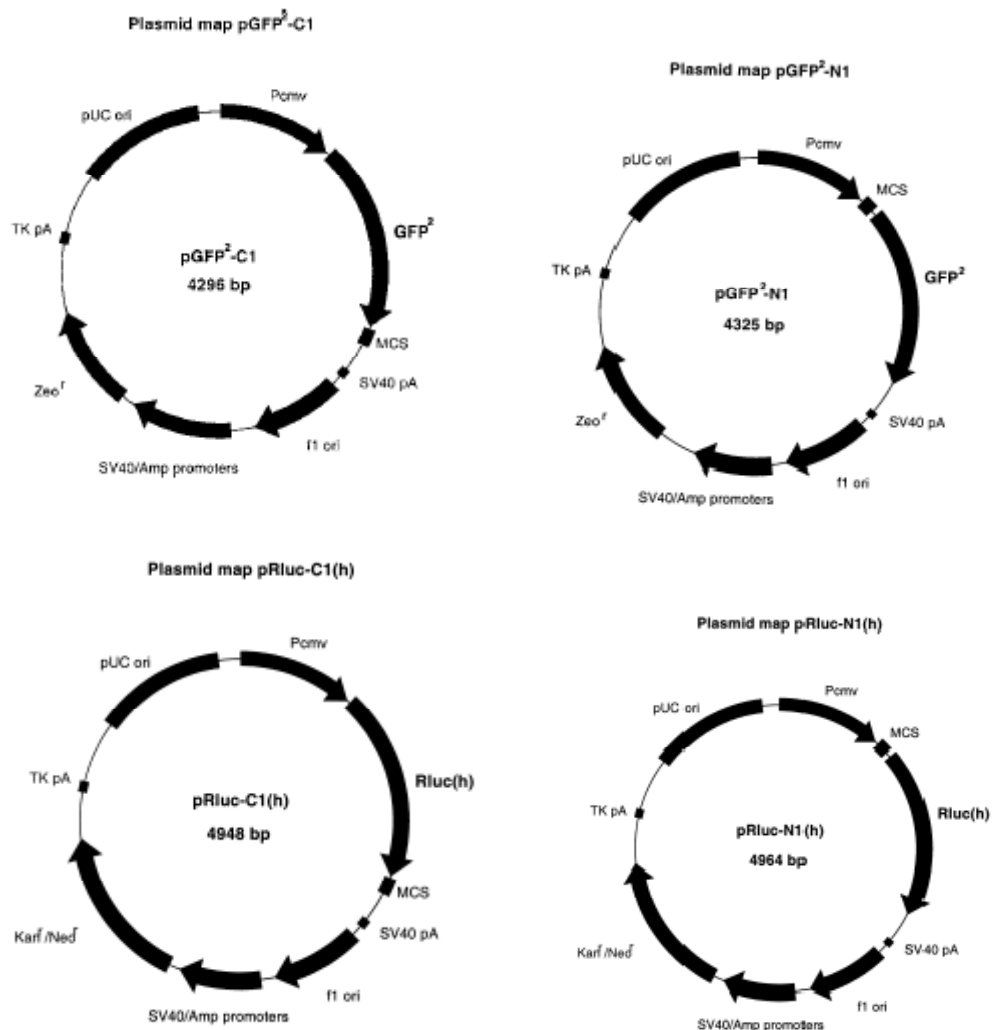


Figure 12 : Vecteurs BRET<sup>2</sup>

Les différents vecteurs d'expression du système BRET contiennent un « multiple cloning site » (MCS), localisé avant le gène de la Green fluorescent protéine (GFP) ou de la Renilla Luciferase (Rluc), pour les vecteurs en N et après pour les vecteurs en C. Le MCS permet le sous-clonage pour obtenir une protéine de fusion (protéine d'intérêt : marqueur ou marqueur : protéine d'intérêt). Le gène du marqueur a été humanisé pour permettre une expression élevée dans les cellules mammifères. Le gène de protéine de fusion est sous le contrôle d'un promoteur du cytomegalovirus (CMV) qui assure une haute expression constitutive dans bon nombre de cellules. Les différents vecteurs contiennent deux origines de répllication, la f1 ori qui permet la répllication lors d'infection de bactériophages et la pUC ori qui permet la répllication dans les bactéries E.coli entre autres. Les vecteurs contiennent aussi une résistance à un antibiotique (Kan ou Zeo) sous le contrôle d'un promoteur SV40. Il est à noter

que les vecteurs contiennent des séquences polyA (TKpA et SV40pA) permettant de stabiliser l'ARN après transcription. [17]



Figure 13 : Insert Reading Frame Cassette

La Reading frame cassette contient les sites de recombinaison spécifique *attR1* et *attR2* ainsi qu'un gène de résistance au Chloroamphénicol et un gène mortel *ccdB*. [9]

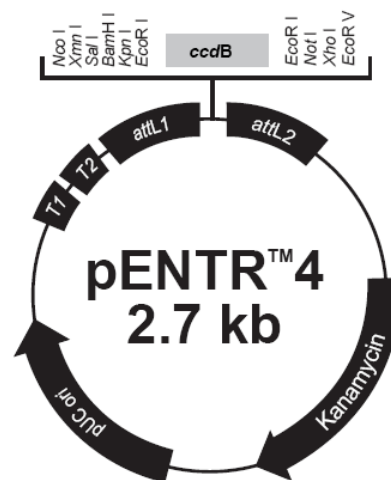


Figure 14 : Vecteur d'entrée pEntr4

Le vecteur d'entrée contient les séquences de recombinaison spécifiques *attL1* et *attL2*, une résistance à la kanamycine ainsi qu'une origine de réplication. De nombreux sites de restriction dont *NcoI* et *XhoI* entourent le gène mortel *ccdB* entre les séquences *att* pour permettre l'insertion d'un gène d'intérêt à la place du gène *ccdB*. [9]



## Méthode

### Stratégie générale :

#### *Production d'un stock de vecteurs, de bactéries et de milieux*

Dans un premier temps, quatre des douze vecteurs BRET<sup>2</sup> (GFP<sup>2</sup>-C et N, Rluc-C et N X 3 reading frame) ont été choisis (pGFP<sup>2</sup> C1, pGFP<sup>2</sup> N1, pRluc C1, pRluc N1). Il a été nécessaire de produire un stock de vecteurs Bret (GFP<sup>2</sup> et Rluc) pour permettre les différentes étapes de clonages. Des bactéries E. coli HB 101 ont été transformées à l'aide de ces vecteurs selon le protocole de transformation de bactéries compétentes. Ces bactéries ont été mises sur plaque d'agar avec antibiotiques zéocine et kanamycine (zeo pour GFP<sup>2</sup> et kan pour Rluc). Des contrôles sur les préparations d'ADN à partir de 5 ml LB medium (mini prép), par digestion enzymatique (SmaI pour GFP et SacI pour Rluc) et électrophorèse sur gel d'agarose, ont permis de vérifier la conformité des vecteurs utilisés. Des préparations d'ADN à partir de 100ml LB ont ensuite été faites pour produire une quantité suffisante de vecteurs. Un stock de milieu LB ainsi que des plaques de LB agar et antibiotique ont aussi été produites. Des stocks de bactéries compétentes HB101 DB3.1 et 2T1R ont été produits pour permettre les différentes transformations. L'efficacité de transformation de ces bactéries compétentes a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\frac{\# \text{ colonies}}{\text{pg pUC19 DNA}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\text{ug}} \times \frac{V_{\text{transformation}}}{V_{\text{sur plaque}}} \times \text{facteur de dilution}$$

*Equation 2 : Formule de l'efficacité de transformation en [cfu/ug]*

#### *Sous-clonage de la zéocine à la place de la kanamicine*

Les Vecteurs Rluc C1 et N1 contiennent une résistance à la kanamycine, qui les rend incompatibles au système de sélection gateway (ccdB et Kan). C'est pourquoi le premier clonage a consisté à échanger cette résistance Kanamycine par une résistance à la zéocine provenant de pGFP<sup>2</sup>. Les résistances ont été échangées grâce à une digestion enzymatique avec StuI et BstBI suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose, puis d'une extraction sur gel selon protocole « Qiaquick gel extraction » et enfin d'une ligation. Les vecteurs ont ensuite été vérifiés à l'aide d'une digestion enzymatique avec StuI et BstBI. Des préparations d'ADN à partir de 100ml LB Medium (midi prép) ont ensuite été effectuées avec digestion contrôle et séquençages.

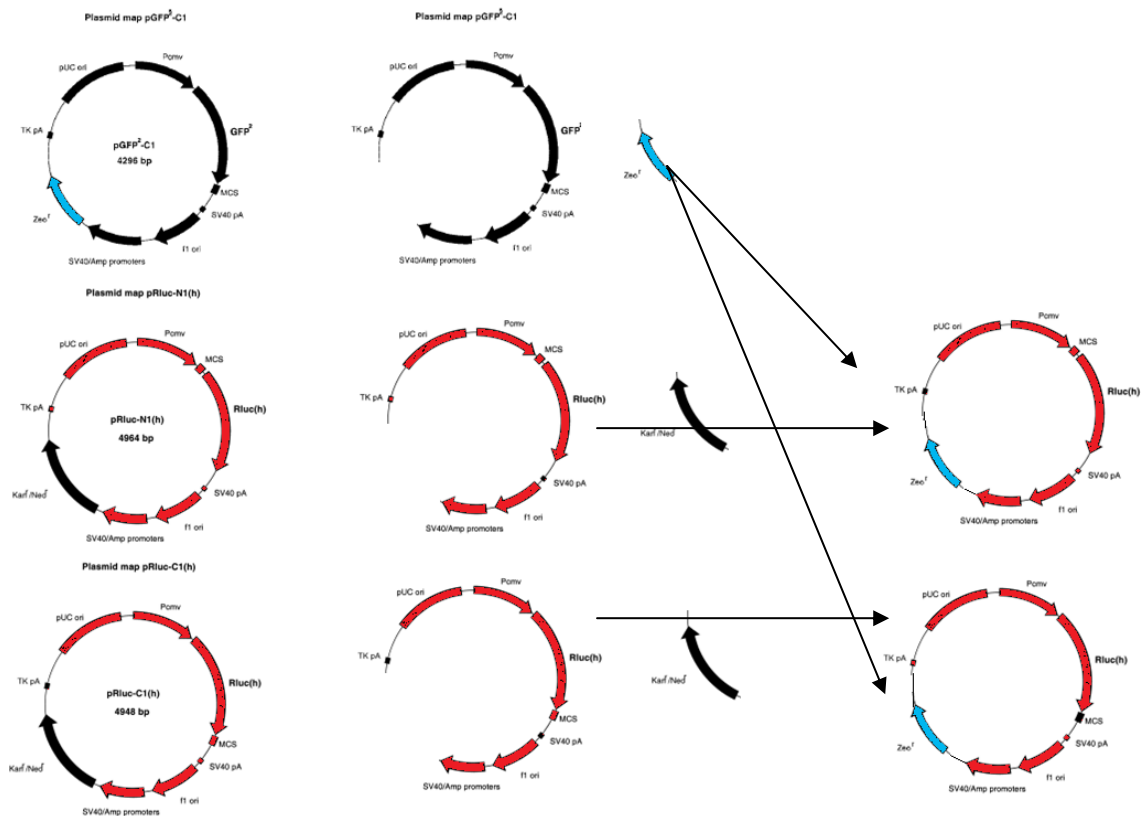


Figure 15 : sous clonage de la résistance Zeo dans pRluc C et N

### Insertion de la Cassette de recombinaison Gateway dans les différents vecteurs BRET<sup>2</sup>

Dans un deuxième temps, les vecteurs contenant tous une résistance à la zéocine ont été utilisés pour construire les vecteurs Bret-Gateway (pDest GFP2-C et N, pDest Rluc-C et N) contenant les séquences de recombinaison att. Il a fallu sélectionner les « Reading Frame Cassette » correctes pour que le gène d'intérêt soit dans le bon cadre de lecture lors de la réaction de recombinaison.

Tableau 1 : Choix des Reading Frame cassette pour les différents vecteurs

vecteur	cassette
pRluc zeo N1	Reading frame cassette A
pRluc zeo C1	Reading frame cassette A
pGFP N1	Reading frame cassette A
pGFP C1	Reading frame cassette C1

Ces « reading frame cassette » remplacent le « multiple cloning site », et contiennent les séquences *att*, une résistance à l'antibiotique chloroamphénicol ainsi qu'un gène mortel *ccdB*. Les vecteurs ont été linéarisés à l'aide de *EcoRV* puis passés à la phosphatase alcaline pour éviter qu'ils se referment sur eux-mêmes. Ils ont ensuite été ligués « over night » avec les « reading frame cassette ». Les ligations ont permis la transformation de bactéries *E.coli* DB3.1 compétentes, survivant au gène mortel *ccdB*. Le screening a été accompli à l'aide de Chloroamphénocil (CmR) sur plaque de LB agar. Un contrôle par digestion avec *EcoRI* et *EcoRV* a permis de vérifier la présence de l'insert ainsi que son sens. Un deuxième contrôle par séquençage a été accompli pour vérifier que les séquences *att* n'aient pas été endommagées lors de la ligation. Des préparations d'ADN à partir de 100 ml LB medium ont été produites pour chacun des vecteurs.

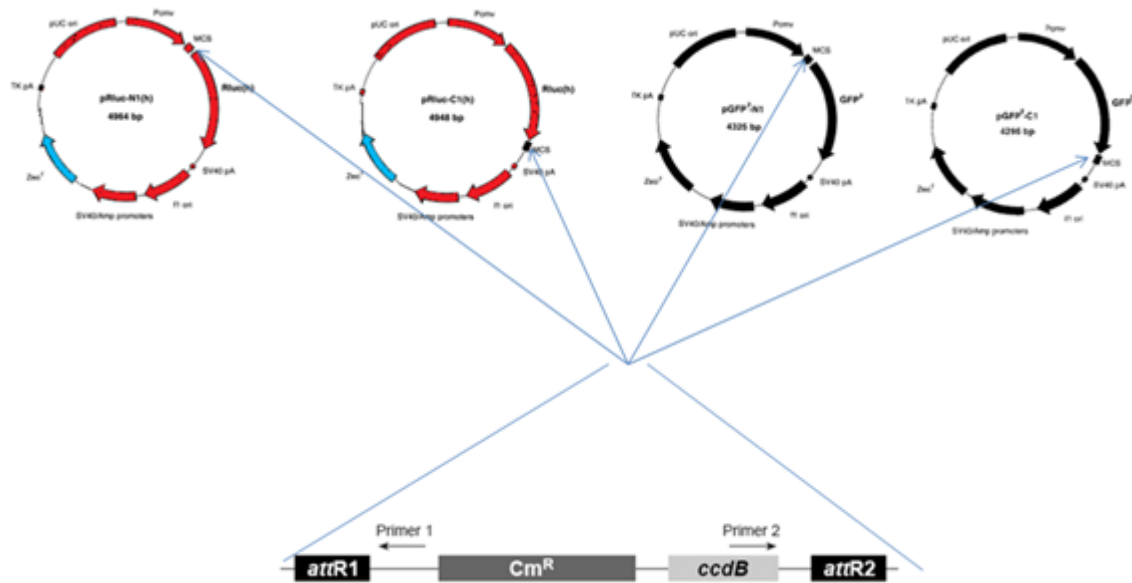


Figure 16 : insertion de la cassette gateway dans le Multi cloning site

### Production d'un vecteur d'entrée contenant NR2E3

Dans un troisième temps, un vecteur d'entrée contenant le gène de la protéine NR2E3 a été construit en sous-clonant celui-ci dans pEntry4 au moyen d'une amplification par PCR avec ajout de sites de restriction NcoI et XhoI de part et d'autre du gène. Un gel contrôle ainsi qu'un séquençage sont nécessaires pour vérifier la construction. Puis une réaction de recombinaison est accomplie entre les vecteurs pDest et pEntry afin d'obtenir le pExpression qui va permettre de faire une analyse BRET sur NR2E3 pour tester les vecteurs obtenus lors de ce travail.

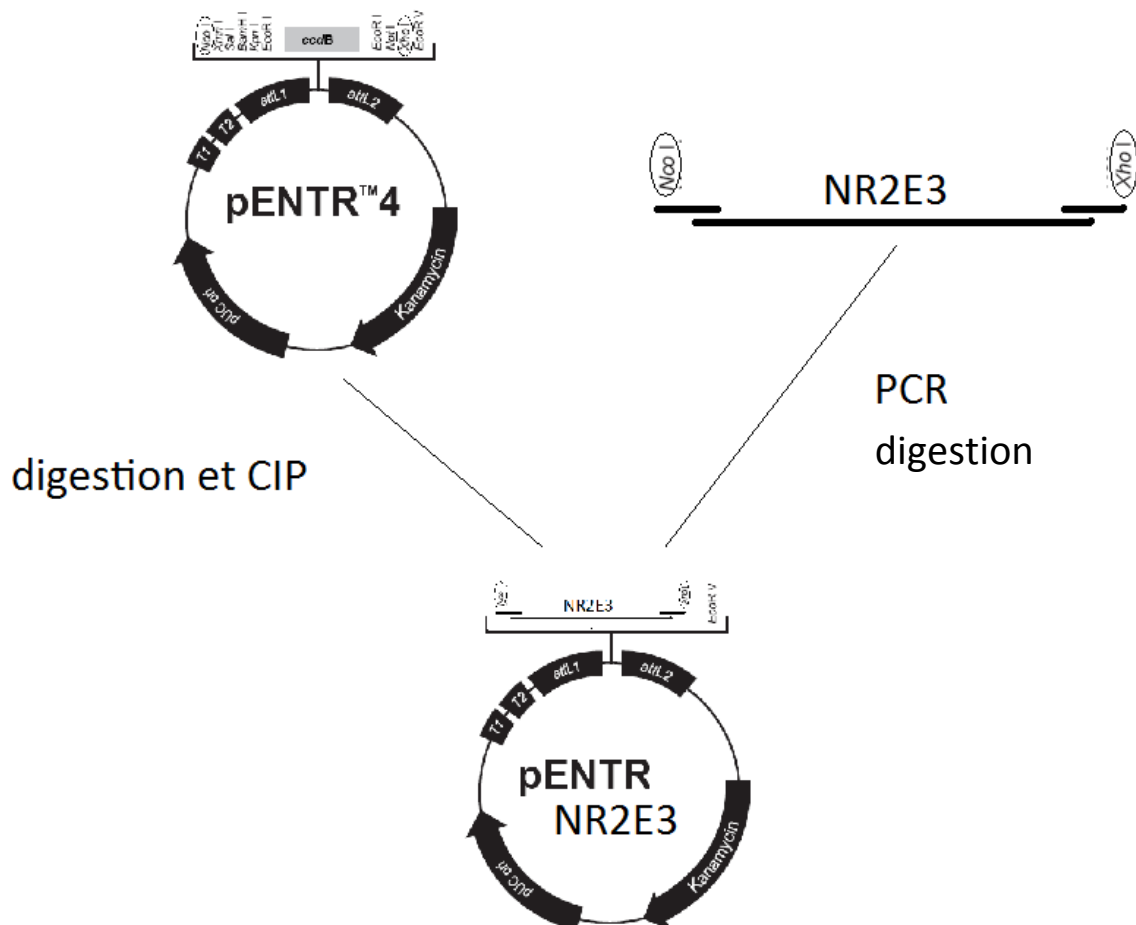


Figure 17 : insertion de NR2E3 dans pEntr4

### Test de fluorescence avec les pGus-BRET<sup>2</sup>

Une réaction de recombinaison LR a été accomplie entre un contrôle positif pEntrGus fourni avec les réactifs invitrogen, et les différents vecteurs BRET<sup>2</sup>-Gateway (pDest GFP<sup>2</sup> C et N, pDest Rluc C et N) produits pour tester leur fonctionnalité. Des cellules HEK 2.93T ont ensuite été transfectées avec ces vecteurs pGus-BRET<sup>2</sup> et des contrôles Rluc et GFP simples ainsi que des contrôles négatifs (cellules non transfectées) pour comparaison. Les cellules ont été incubées 24h, puis des photos au microscope ont été prises et la fluorescence de la GFP et de la Rluc ont été quantifiées.

## Protocoles

### *Transformation de bactéries*

- 100 ng plasmides
- 80 ul E.coli compétentes
- 20 min sur glace
- Choc thermique : 1 min, 42°C
- 5 min sur glace immédiatement
- Ajout de 500 ul LB
- Transfert dans un tube Falcon 14 ml
- Incubation à 37°C, 60 min avec agitation
- Insémination 50 ul sur boîte de pétri (LB + anti bio)
- Incubation à 37°C pendant la nuit

### *Repiquage de colonies*

- Piquer une colonie isolée (avec un tips ou cure dent)
- Mettre dans un Falcon 14 ml avec 3 ml de LB (LB + anti bio)
- Incuber 24h avec agitation

### *Mini Prep*

- Pour chaque clone : 200 ul de culture dans un Eppendorf stocké à 4°C pour midi éventuelle
- Mini prep avec tampons du Kit « NucleoBand Macherey-Nagel »
  - S1: Resuspension Buffer
  - S2: Lysis Buffer
  - S3 : Neutralisation Buffer
- Centrifuger 10 min, 3000 tours/min
- Eliminer le surnagent
- Transférer et resuspendre avec 200 ul de tampon S1 dans un Eppendorf
- Ajouter 200 ul de tampon S2 et mélanger
- Incuber 5 à 10 min à température ambiante
- Ajouter 200 ul de tampon S3 et mélanger
- Incuber 5 à 10 min dans la glace
- Centrifuger 5 min à 13000 tours/min à 4°C
- Récupérer le surnagent dans un nouvel Eppendorf
- Précipiter l'ADN avec 0.7 Vol d'isopropanol ( ~310 ul)
- Mélanger
- Centrifuger 20 min à 15300 tours/min à 4°C
- Éliminer le surnagent
- Ajouter 1 ml d'EtOH 70%, froid et mélanger
- Centrifuger 5 min à 15300 tours/min à 4°C
- Éliminer le surnagent et sécher les tubes à l'air
- Resuspendre le culot avec 40 ul d'H<sub>2</sub>O

### *Digestion et gel d'électrophorèse*

- Préparer Gel Agarose 1% : 150 ml TBE, 1.5g Agarose, 7.5ul SYBR safe
- Préparation des échantillons : Par échantillon 10 ul mini prep , 7.5 ul H<sub>2</sub>O, 2 ul tampon et 0.5 ul Enzymes
- Incuber 1h à 37°C
- Chargement du Gel : 10 ul ladder , 20 ul échantillons + 4 ul tampon de charge (6X)

- 200V, 20 min

### *Extraction sur gel QI Aquick Gel Extraction*

- Découper les fragments d'ADN sur gel avec un scalpel
- Peser les tubes et ajouter 3 volumes de tampon QG pour un volume de gel (100mg gel ~ 100 ul tampon QG)
- Incuber à 50°C 10 min (vérifier que le gel soit bien dissout)
- Vérifier la couleur du tube (jaune) sinon ajouter sodium acétate pH 5 et mixer
- Ajouter 1 volume de gel d'isopropanol et mixer
- Placer une colonne Qlaquick spin dans un tube de 2 ml pour chaque échantillon
- Mettre les échantillons dans les colonnes et centrifuger pendant 1 min
- Jeter le permeat
- Ajouter 0.5 ml de tampon QG et centrifuger
- Jeter le permeat
- Laver avec 0.75 ml de tampon PE et centrifuger
- Jeter le permeat et centrifuger pendant une minute pour éliminer le reste de tampon PE
- Placer les colonnes dans des tubes propres
- Eluer avec une 50 ul d'eau au centre de la membrane. Laisser reposer pendant 1 min et centrifuger pendant 1 min
- Quantifier l'ADN au Nano drop

### *Ligation(kit Roche Ligation Rapide)*

- Mettre dans un tube eppendorf : 10 ul de tampon 1 + 4 ul de tampon+ 1 ul de DNA ligase 2 + vecteur et insert dans un ratio 1/3 et de l'H<sub>2</sub>O déminéralisée pour arriver à un volume final de 20 ul
- Faire un contrôle négatif sans insert
- Mettre O.N à 16°C pour des bouts francs ou 15 min à RT pour des bouts cohésifs
- Transformer des bactéries avec 10 ul de la ligation

### *Midi Prep avec Kit NucleoBond (AX 100)*

- Préparation de 4 Erlenmeyer (autoclavé au préalable) avec 100 ml LB +100 ul pré culture + anti bio
- Incubation Over Night 37°C 225RPM
- Centrifuger 5-30 ml de culture à 4,500-6000 X g pendant 15 min à 4°C
- Resuspendre dans 4 ml de tampon S1 + RNase A
- Ajouter 4 ml de tampon S2 et mélanger doucement en retournant les tubes 6-8 fois pendant 2-3 min à 25°C (ne pas vortexer !)
- Ajouter 4ml de tampon S3 refroidis préalablement et incuber sur glace pendant 5 min
- Equilibrer la colonne avec 2.5ml de tampon N2 et jeter le permeat
- Clarifier le lysat en filtrant la suspension à travers un filtre plié NucleoBond humidifié avec du tampon N2 et récupérer le permeat
- Accrochage : charger le lysat clarifié sur la colonne Nucleobond et laisser la colonne se vider par l'action de la gravité.
- Lavage : ajouter 10 ml de tampon N3 sur la colonne et jeter le permeat
- Elution : éluer l'ADN avec 5 ml de tampon N5
- Précipitation : ajouter 3.5 ml d'isopropanol , mélanger doucement et centrifuger 30 min à 4°C à 15000 X g et jeter le surnagent
- Laver et sécher le culot avec 2 ml d'EtOH 70%, vortexer brièvement et centrifuger 10min à 25°C à 15000 X g. Jeter l'EtOH et sécher le tube à l'air pendant 5-10 min



- Resuspendre l'ADN dans de l'eau déminéralisée (0.2 ml)
- Quantification au NanoDrop
- Congélation des échantillons à -20°C

### *Production de Bactéries Compétentes*

- Solution : 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1M CaCl<sub>2</sub>, Glycérol 50% v/v
- Reprendre O.N une colonie de bactéries isolées dans 5 ml de LB. (Bactéries aliquotées dans congélateur -70°C)
- Reprendre dans 1L de LB jusqu'à OD<sub>550</sub>=0.5 max
- Agiter durant 3 min dans eau/glace
- Centrifuger à 2500 rpm durant 15 min à 4°C
- Resuspendre le pellet dans un volume de 250 ml de MgCl<sub>2</sub> 0.1M froid
- Agiter 5-10 min dans eau/glace dans la chambre froide
- Centrifuger à 2500 rpm durant 15 min à 4°C
- Resuspendre le pellet dans un volume de 250 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1M froid
- Centrifuger à 2500 rpm durant 15 min à 4°C
- Resuspendre le pellet dans 43 ml CaCl<sub>2</sub> 0.1M froid +7ml Glycerol froid
- Repartir dans des Eppendorf stériles (500ul), refroidis à -20°C préalablement et les plonger dans l'azote liquide immédiatement
- Conserver à -80°C

### *PCR*

- Mettre dans un Eppendorf 0.2 ml : 10 ul master mix Qiagen + 2 ul primer R + 2 ul primer F + 500 ng cDNA + 4 ul Betain
- Programme PCR :  
94°C 5 min, 20X (94°C 1 min, 67°C 1 min, 72°C 1 min 45 sec), 72°C 10 min, 15°C pause
- Electrophorèse sur gel 1%
- Purification sur gel avec QIAquick gel extraction kit

### *Réaction de recombinaison LR Gateway*

- Mettre dans un tube Eppendorf 1.5 ml : 100 ng de vecteur d'entrée, 150 ng de vecteur de destination et ajuster à 8 ul avec du tampon TE pH8.
- Mettre le LR Clonase enzyme mix 2 min sur glace
- Vortexer brièvement le LR Clonase enzyme mix
- Ajouter 2 ul de LR Clonase enzyme mix à chaque échantillon ainsi qu'au contrôle positif ( ne pas mettre dans contrôle négatif) et vortexer brièvement
- Incuber à 25°C pendant 1h.
- Ajouter 1 ul de solution protéinase K dans chaque tube et incuber pendant 10 min à 37°C
- Transformer des bactéries HB101 avec 1 ul de la réaction pour permettre la sélection des clones d'expression(ne contenant pas de gène ccdB) et mettre sur plaque avec antibiotique adéquat.

### *Transfection des Hek 2.93T et test de fluorescence*

- Faire un passage de cellules le jour avant transfection avec  $8 \times 10^5$  cellules pour des boites de 100 mm.
- 3 heures avant la transfection, remplacer le milieu (DMEM) de boites avec du milieu frais
- Mettre tous les réactifs à température ambiante et remuer
- Pour chaque transfection, préparer 2 tubes : mettre dans le tube 1 3ug ADN + 37ul CaCl<sub>2</sub> 2M et ajuster le volume à 300 ul avec de l'H<sub>2</sub>O déminéralisée. Dans le tube 2, ajouter 300ul de 2X HBS
- Vortexer le tube contenant le 2X HBS et ajouter progressivement pendant le vortex la solution du tube 1 contenant l'ADN.
- Incuber 30 min à RT
- Vortexer et ajouter immédiatement la solution aux cellules.
- Incuber à 37°C avec du CO<sub>2</sub> pendant 24-72h.
- Prendre des photos au microscope avec appareil à fluorescence
- Décoller les cellules en pipetant délicatement et mettre dans un tube Falcon 14 ml
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 4 min
- Jeter le surnagent et ajouter 10 ml de PBS pour lavage et bien resuspendre les cellules
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 4 min
- Jeter 9 ml de surnagent et resuspendre
- Prendre 45 ul de la solution et mettre sur plaque 96 well noir pour test de fluorescence GFP
- Prendre 45 ul de la solution et mettre sur plaque 96 well blanche et ajouter coloenterasine H pour test de fluorescence luciferase
- Analyse avec le scanner à plaques et exportation des résultats en format excel

# Résultats et discussions

## *Suivi de culture lors de la production de bactéries compétentes et efficacité de transformation*

Lors de la production d'E.coli DB3.1 compétentes, un suivi de culture a été accompli au moyen de la densité optique à 550 nm.

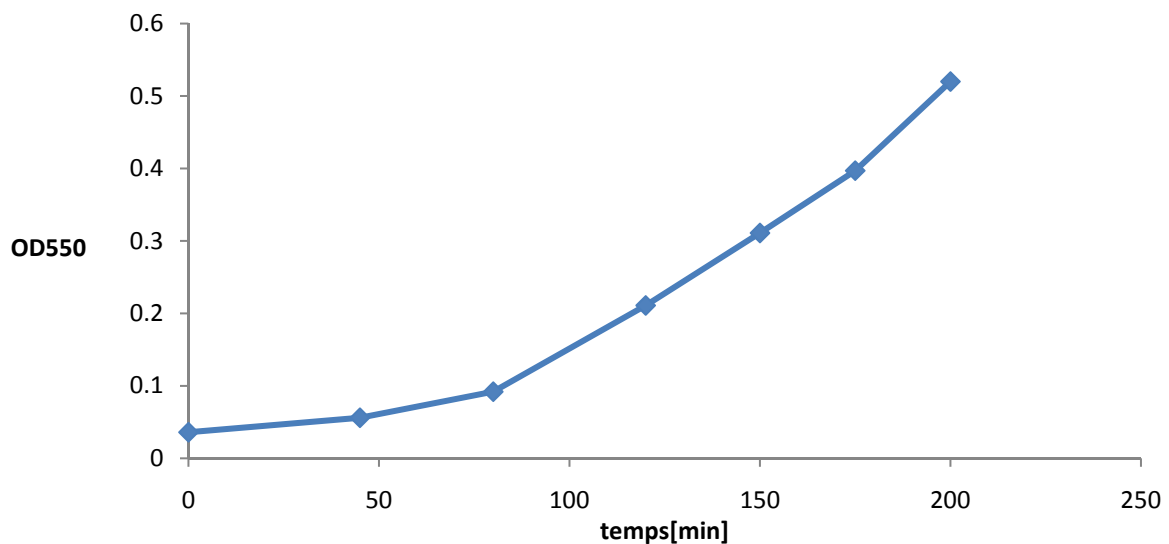


Figure 18 : suivi de culture de DB3.1

La production de bactéries compétentes nécessite des bactéries en phase de croissance exponentielle pour obtenir une bonne efficacité de transformation après le traitement au  $\text{CaCl}_2$ .

Le suivi de culture ci-dessus montre que les bactéries sont effectivement en phase de croissance exponentielle lorsque la densité optique à 550 nm est autour de 0.5.

Les bactéries produites ont été transformées avec du pCDNA3 et leur efficacité de transformation a été comparée avec celle des bactéries compétentes d'origines.

Tableau 2 : efficacité de transformation des bactéries compétentes

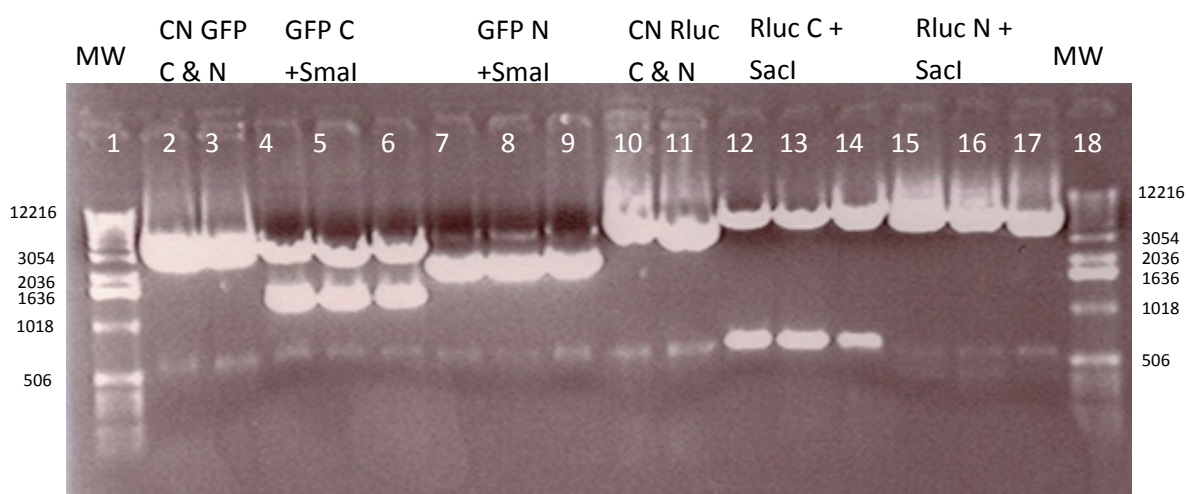
bactéries	Efficacité de transfo d'origine	Efficacité de transfo des bact. produites
HB101	1.60E+06	4.00E+05
2T1	4.05E+07	6.00E+06
DB3.1	4.80E+07	1.21E+07

Malgré une attention particulière lors de la production de bactéries compétentes, une différence d'efficacité de transformation est observée entre les bactéries originales et les bactéries produites.

### *Gel de vérification des plasmides pGFP-C1, pGFP-N1, pRluc-C1 et pRluc-N1*

Dans un premiers temps une extraction d'ADN provenant de HB101 transformée avec les différents vecteurs a été accomplie (transformation de bactéries et mini prep selon protocole).

Les plasmides ont été digérées avec les enzymes de restriction SmaI pour pGFP<sup>2</sup>-C1 et N1 et SacI pour pRluc-C1 et N1 pendant 1h à 37°C. pGFP<sup>2</sup>-C1 est coupé deux fois par l'enzyme SmaI, et donne des fragments de 1317bp et de 2979bp. pGFP-N1 coupé avec SmaI donne des fragments de 2273bp et de 2052bp. pRluc C1 est coupé deux fois avec SacI et donne des fragments de 4317bp et des fragments de 603bp. pRluc N1 donne des fragments de 4567bp ainsi que des fragments de 397bp. Pour visualiser ces différents fragments, une électrophorèse sur un gel d'agarose (200V,20 min) a été menée à bien .



*Figure 19 : gel de vérification des plasmides*

Les puits 1 et 18 contiennent le ladder, le puits 2 contient le vecteur pGFP-C1 sans enzyme de restriction (contrôle négatif), le puits 3 contient le vecteur pGFP-N1 sans enzyme de restriction (contrôle négatif), les puits 4, 5 et 6 contiennent le vecteur pGFP-C1 de 3 extractions d'ADN provenant de colonies différentes ainsi que l'enzyme SmaI, les puits 7, 8 et 9 contiennent le vecteur pGFP-N1 de 3 extraction d'ADN provenant de colonies différentes ainsi que l'enzyme SmaI, le puits 10 contient le vecteur pRluc-C1 sans enzyme de restriction (contrôle négatif), le puits 11 contient le vecteur pRluc-N1 sans enzyme de restriction (contrôle négatif), les puits 12, 13 et 14 contiennent le vecteur pRluc-C1 de 3 extraction d'ADN provenant de colonies différentes ainsi que l'enzyme SacI, enfin les puits 15, 16 et 17 contiennent le vecteur pRluc-N1 de 3 extractions d'ADN provenant de colonies différentes ainsi que l'enzyme SacI.

Le Gel de vérification des plasmides permet de constater la présence d'une bande contaminante, à environ 500bp, surtout les échantillons, y compris le contrôle négatif. Il semble que cette bande provienne de la transformation dans les bactéries HB101. Les digestions ont correctement fonctionné et les fragments obtenus correspondent aux fragments théoriques obtenus lors de ces digestions. La résolution du gel d'agarose ne permet visiblement pas de séparer les fragments de 2273 et de 2052 bp dans les puits 7, 8 et 9. L'utilisation d'enzymes double cutter (coupant deux fois) est à noter sur ce gel. L'avantage d'enzymes coupant deux fois est la facilité de mise en œuvre du contrôle. Les résultats obtenus lors de ce contrôle indiquent que les plasmides sont corrects et montrent la nécessité d'une purification sur gel pour enlever la bande contaminante. Ces résultats permettent une extraction d'ADN importante (midiprep), selon le protocole, sur les 4 vecteurs.

### Préparation, purification et quantification des vecteurs

Les extractions d'ADN (midi prep) à partir de 100 ml LB ont été accomplies sur les 4 vecteurs pGFP<sup>2</sup>-C1, pGFP<sup>2</sup>-N1, pRluc-C1 et pRluc-N1 selon le protocole midi prep. Le tableau ci-dessous expose les concentrations d'ADN mesurées, sur les 100 ul obtenus, à l'aide du Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer.

Tableau 3 : quantification de l'ADN extrait lors de midi prep avec le kit d'extraction

Nucleobond AX100

Echantillon	Quantification [ug/ul]
pRluc C1	1.6
pGFP <sup>2</sup> C1	1.6
pRluc N1	1.3
pGFP <sup>2</sup> N1	2.3

Une électrophorèse sur gel d'agarose 2%(200V, 20 min) a permis la séparation des vecteurs et de la bande contaminant.

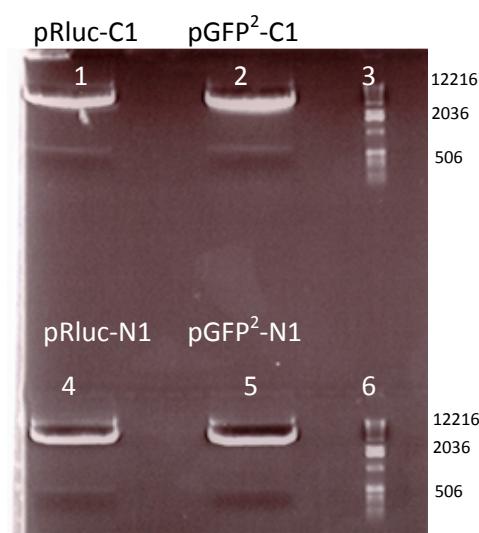


Figure 20 : gel de purification

4 puits ont été réunis pour permettre le chargement d'une quantité de 10 ug d'ADN sur gel pour les 4 vecteurs. Le haut du gel contient, de gauche à droite, pRluc-C1(1), pGFP<sup>2</sup>-C1(2), et le ladder(3). Le bas du gel contient pRluc-N1(4), pGFP<sup>2</sup>-N1(5), et le ladder(6).

Les vecteurs ont une taille de 4300 bp pour le pGFP<sup>2</sup>-C1 et N1 et de 5000bp pour le pRluc-C1 et N1. La bande contaminante est bien visible autour de 500bp. Les bandes contenant les vecteurs (bande du haut) on été découpées à l'aide d'un scalpel puis l'ADN contenu dans celles-ci a été extrait à l'aide du kit de purification sur gel « QIAquick gel extraction » selon le protocole d'extraction sur gel. Les plasmides ainsi purifiés ont été repris dans 20 ul H<sub>2</sub>O puis quantifiés à l'aide du NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Tableau 4 : quantification de la concentration d'ADN après purification

échantillon	Quantité [ng/ul]
<b>Rluc C1</b>	101.19
<b>GFP C1</b>	129.01
<b>Rluc N1</b>	101.79
<b>GFP N1</b>	93.6

Une digestion contrôle supplémentaire à l'aide de ClaI, et EcoRV pour pRluc-C1 et N1 et avec BglII et PvuII pour pGFP<sup>2</sup>-C1 et N1 a été effectuée sur les préparations d'ADN à partir de 100 ml LB medium (midi prep). Les résultats sont visibles sur le cahier de labo informatisé fourni avec les annexes.

### *Préparation du sous-clonage de la résistance à la zéocine dans les vecteurs pRluc-C1 et pRluc-N1*

Comme dit précédemment, les résistances antibiotiques des vecteurs d'entrée et de destination doivent être différentes pour pouvoir utiliser le système de double sélection gateway. C'est pourquoi la résistance Kanamycine des vecteurs pRluc C et N doit être échangée avec la Zéocine provenant d'un vecteur pGFP<sup>2</sup>.

Le sous-clonage de la résistance à la zéocine peut être effectué à l'aide de différentes enzymes de restriction, de part et d'autre du gène de la résistance à kanamycine sur pRluc-C1 et N1, ainsi que du gène de la résistance à la zéocine sur pGFP-C1 et N1. Il faut que ces enzymes soient compatibles entre les vecteurs, qu'elles fonctionnent dans le même tampon et de préférence à la même température. Les enzymes idéalement placées qui remplissent ces conditions sont StuI ou ClaI et BstBI.

Au vues des difficultés rencontrées lors de cette étape, des bactéries DG1 et des HB101 ont été utilisées pour la transformation. Certaines enzymes de restriction sont sensibles aux modifications de l'ADN comme la methylation. Il faut utiliser des souches de bactéries ayant un phénotype DAM-/DCM- qui ne methylent pas l'ADN.



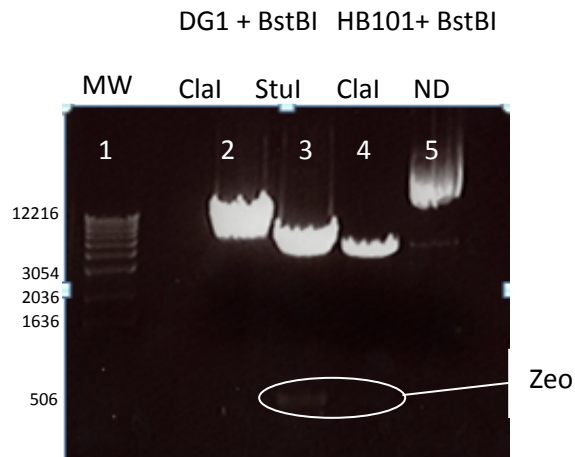


Figure 21 : gel de test pour le sous clonage de la zéocine

Le puits 1 contient le 1kb ladder, le puits 2 contient pGFP<sup>2</sup>-N1 provenant d'une extraction sur DG1 avec Clal et BstBI, le puits 3 contient pGFP<sup>2</sup>-N1 provenant d'une extraction sur DG1 avec Stul et BstBI, le puits 4 contient pGFP<sup>2</sup>-N1 provenant d'une extraction sur HB101 avec Stul et BstBI, le puits 5 contient pGFP<sup>2</sup>-N1 provenant d'une extraction sur HB101 (Contrôle Négatif).

Ce gel test montre que Clal ne coupe pas dans DG1 (puits 2) malgré la linéarisation probable du vecteur (4325bp) par BstBI. En effet L'ADN linéaire migre moins vite que l'ADN circulaire dans la forme super enroulée sur un gel d'agarose. Le couple d'enzyme (stul, BstBI) semble être idéal pour réaliser le sous-clonage du gène de résistance à la zéocine car l'insert est visible sur le puits 3 et moins clairement sur le puits 4. La présence d'ADN chromosomiques est à noter sur le contrôle négatif (puits 5). L'utilisation de DG1 semble nécessaire car la digestion avec Stul est bien plus nette sur l'ADN provenant de cette souche d'E.coli compétentes.

### *Sous-clonage de la zéocine dans pRluc-C1 et pRluc-N1*

À l'issue d'une préparation d'ADN à partir de 100 ml LB medium (midi prép) sur les bactéries compétentes DG1 transformées avec les différents vecteurs, une digestion a été accomplie sur 5 ug d'ADN dans un volume de 50 ul avec les enzymes de restriction Stul et BstBI afin d'isoler la résistance zéo du vecteur pGFP<sup>2</sup>-C1 et de sortir la résistance kan des vecteurs pRluc-C1 et N1. Cette digestion a lieu en deux temps, à savoir 1h à 37°C puis 1h à 65°C. Les 4 digestions ont ensuite été mises sur gel d'agarose 1% pour séparer les inserts des vecteurs.

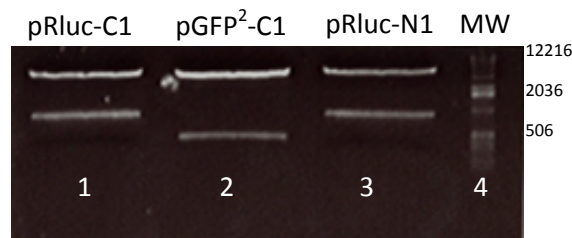


Figure 22 : gel pour le sous clonage de la zéocine dans pRluc C1 et N1

Le puits 1 contient la digestion de pRluc-C1 par Stul et BstBI, le puits 2 contient la digestion de pGFP-C1 par stul et BstBI, le puits 3 contient la digestion de pRluc-N1 par stul et BstBI, le puits 4 contient le ladder.

L'insert zéocine de 415bp est visible sur les puits 2. L'insert kanamycine de 800bp est présent dans les puits 1 et 3. Les bandes contenant les vecteurs pRluc C1 et N1 puits 1 et 3 (bande du haut) ainsi que les bandes contenant l'insert zéocine puits 2, ont été extraites du gel à l'aide du kit de purification sur gel « Qiaquick gel extraction » selon protocole, puis quantifié à l'aide du NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 pour préparer la ligation de l'insert Zéo avec les Vecteurs pRluc-C1 et pRluc-N1.

*Tableau5 : quantification de l'extraction sur gel des inserts et des vecteurs*

Échantillon	Concentration ADN [ng/ul]
pRluc C1 for ligation	118.76
Zeo C1 for ligation	64.41
pRluc N1 for ligation	71.39
Zeo N1 for ligation	50.07

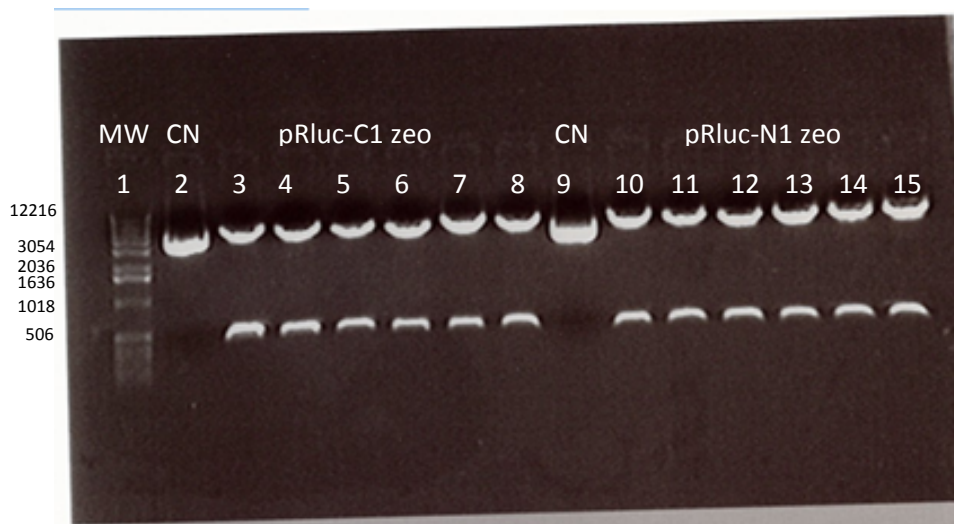
Les ligations ont été accomplies, avec le kit de ligation rapide de Roche, avec un ratio vecteur /insert de 1/3 (mol/mol). Les contrôles négatifs n'ont pas donné de colonies et les ligation ont permis de repiquer 6 colonies pRluc C1 zeo et 6 colonies pRluc N1 zeo.

Des préparations d'ADN à partir de 5 ml LB medium (mini prep) ont été accomplies selon le protocole de mini prep puis quantifiées au Nano Drop ND-1000.

*Tableau 6 : Quantification Nano drop*

échantillon	Concentration d'ADN [ng/ul]
pRluc C1 Zeo 1	805.51
pRluc C1 Zeo 2	965.31
pRluc C1 Zeo 3	433.60
pRluc C1 Zeo 4	241.70
pRluc C1 Zeo 5	523.89
pRluc C1 Zeo 6	467.20
pRluc N1 Zeo 1	1043.57
pRluc N1 Zeo 2	511.25
pRluc N1 Zeo 3	641.16
pRluc N1 Zeo 4	917.58
pRluc N1 Zeo 5	827.36
pRluc N1 Zeo 6	1044.77

10 ul de ces midi prep ont été digérées avec BstB1 et StuI, 1h à 37°C puis 1h à 65°C, puis mises sur gel d'agarose 1% pour sélectionner les clones ayant incorporé l'insert .



*Figure 23: gel de sélection des clones positif*

Le puits 1 contient le 1Kb ladder, le puits 2 contient un contrôle négatif pRluc-C1 zeo non digéré, les puits 3 à 8 contiennent les clones pRluc-C1 zeo 1-6 digéré avec Stul et BstBI, le puits 9 contient un contrôle négatif de pRluc N1 zeo non digéré et les puits 10 à 15 contiennent les clones pRluc-N1 zeo 1-6 digérés avec Stul et BstBI.

Le contrôle négatif, sous forme super enroulée, puits 2 et 9, migre mieux que la forme linéarisée. L'insert du gène de résistance à la zeocine (415bp) est clairement visible sur tous les clones, puits 3 à 8 et 10 à 15. Tous les clones ont correctement incorporé la zéocine.

### *Production de pRluc-C1 zeo et de pRluc-N1 zeo : Gel de contrôle et séquençages*

Les vecteurs pRluc-C1 zeo et pRluc-N1 Zeo ont été produit en grande quantité à partir des clones 1, selon le protocole Midi prep, puis quantifiés, à l'aide du Nano Drop ND-1000.

*Tableau 7: quantification des midi prep pRluC1 zeo et pRlucN1 zeo*

échantillon	Concentration ADN [ng/ul]
pRluc C1 zeo Midi	1069.87
pRluc N1 zeo Midi	1294.86

Une digestion contrôle avec BstBI et Stul ainsi qu'une électrophorèse sur gel d'agarose 1%, ont été accomplies.

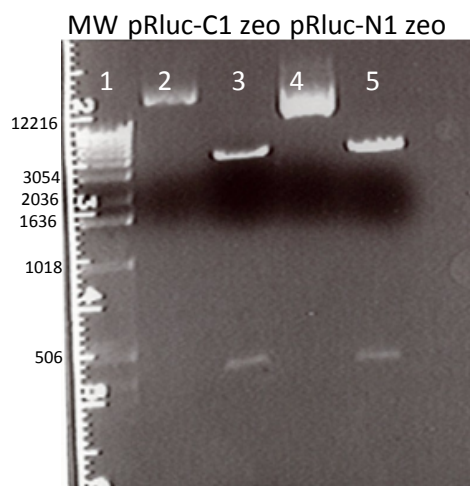


Figure 24 : Gel de contrôle des midi prep de pRluc N1 zeo et pRluc C1 zeo

Le premier puits contient le Invitrogen 1kb ladder, le puits 2 contient un contrôle négatif de pRluc C1 zeo non digéré, le puits 3 contient pRluc C1 zeo digéré avec Stul et BstBI, le puits 4 contient un contrôle négatif de pRluc N1 zeo non digéré, le puits 5 contient pRluc N1 zeo digéré avec Stul et BstBI.

L'insert zeo est bien visible (415bp) sur les digestions avec BstBI et Stul (puits 3 et 5). Les contrôles négatifs sont probablement en forme de cercle ouvert (open circle), ce qui explique pourquoi les bandes sont situées au-dessus de 12216bp. En forme de cercles ouverts, les plasmides sont fortement ralentis lors de l'électrophorèse et ainsi, ils migrent moins vite qu'en forme linéaire ou super enroulée. Les résultats sont conformes aux prévisions.

Un séquençage des 2 vecteurs pRluc N1 zeo et pRluc C1 zeo, à partir de primers se trouvant sur le gène de résistance à la zéocine (zeo1 et zeo2), a été accompli pour vérifier l'insertion.

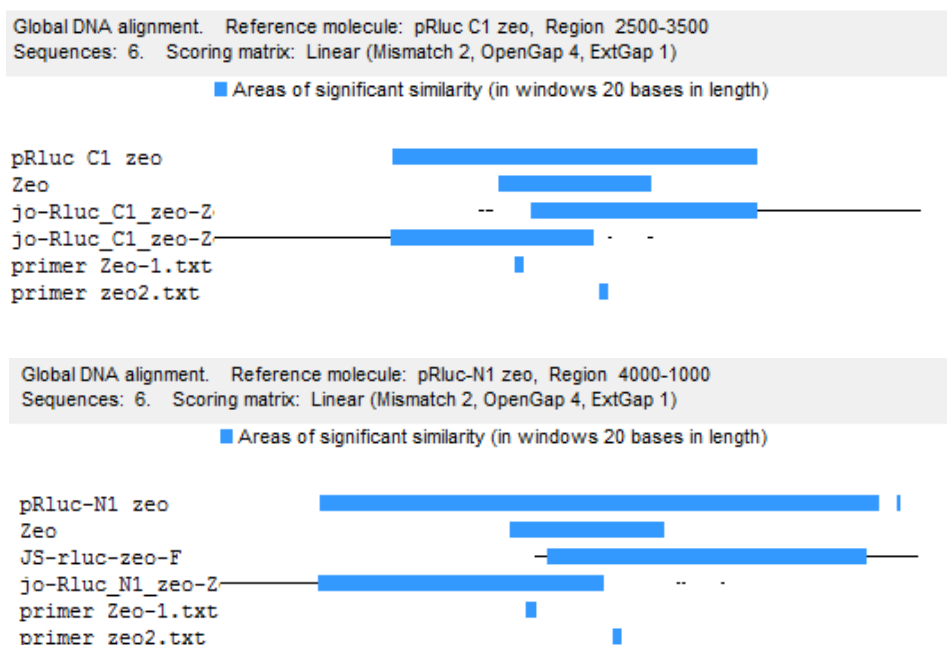


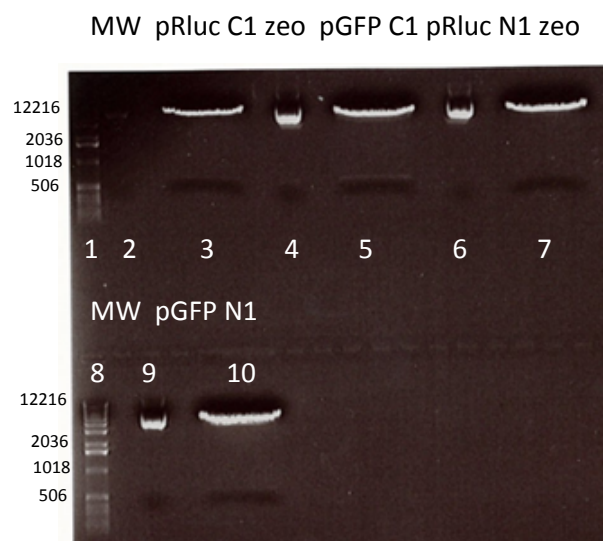
Figure 25 : résultat du séquençage de pRluc C1 zeo et pRluc N1 zeo

La figure 22 contient de haut en bas : la construction pRluc zeo théorique, le gène de résistance zeo, le séquençage forward, le séquençage revers, le primer forward et le primer revers. La partie du haut représente le séquençage de pRluc C1 zeo et la partie du bas représente le séquençage de pRluc N1 zeo.

Les séquençages et les digestions contrôles montrent que la résistance à la zéocine s'est parfaitement intégrée dans les 2 vecteurs. Ces constructions pourront être utilisées pour la transformation des vecteurs BRET<sup>2</sup> en vecteurs BRET<sup>2</sup>-Gateway.

### *Ouverture des vecteurs avec EcoRV et purification sur gel*

Les vecteurs pRluc C1 zeo, pGFP C1, pRluc N1 zeo et pGFP N1 sont linéarisés à l'aide d'une digestion avec EcoRV selon le protocole de digestion. Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% a été accomplie avec les différentes digestions et des contrôles négatifs non digérés.



*Figure 26 : pRluc C1 zeo, pGFP C1, pRluc N1 et pGFP n1 linéarisés avec EcoRV*

Les puits 1 et 8 contiennent le 1kb ladder, les puits 2, 4, 6 et 9 contiennent les contrôles négatifs non digérés respectivement de pRluc C1 zeo, pGFP C1, pRluc N1 zeo et pGFP N1. Les puits 3, 5, 7 et 10 contiennent les digestions, avec EcoRV, de respectivement pRluc C1 zeo, pGFP C1, pRluc N1 zeo et pGFP N1.

La digestion a eu lieu correctement. Deux bandes sont visibles dans les contrôles négatifs. Il s'agit de la forme super enroulée (plus bas et plus marquée) et de la forme cercle ouvert des vecteurs. La forme super enroulée migre plus vite que la forme linéarisée ou la forme cercle ouvert. Les résultats obtenus sont conformes aux prévisions.

Les bandes contenant les vecteurs ont été découpées sur le gel et purifiées à l'aide du kit Qlaquick gel extraction selon le protocole. Un traitement à la phosphatase alcaline a été opéré à deux reprises pour éviter que les vecteurs ne se referment sur eux-mêmes lors de l'étape de ligation. En effet l'enzyme EcoRV donne des bouts francs après digestion, et rend l'étape de ligation moins spécifique que lors de ligations avec des bouts cohésifs. Les vecteurs sont ensuite quantifiés avec le Nano Drop ND-1000.

Tableau 8 : quantification au Nano Drop ND-1000

échantillon	Concentration ADN [ng/ul]
Rluc C1 zeo EcoRV	59.71
GFP C1 zeo EcoRV	79.71
Rluc N1 zeo EcoRV	89.21
GFP N1 zeo EcoRV	95.30

### *Ligation des vecteurs pRluc C1 zeo, pGFP C1, pRluc N1 zeo et pGFP N1 avec la Reading Frame cassette et transformation*

L'insertion de la Reading frame cassette est une étape critique. La ligation sur bout franc est beaucoup moins efficace que la ligation avec des bouts cohésifs. L'insert doit rentrer dans le vecteur dans le bon sens. De plus, les quantités d'inserts et de bactéries E.coli 2T1 ccdB survival, résistant au gène mortel ccdB, fournies dans le kit Invitrogen, sont très faibles. Différents kits de ligation ont été testé (kit de ligation rapide de Roche et kit de ligation de Promega) avec des bactéries compétentes 2T1 ainsi que des bactéries compétents DB3.1, résistantes au gène mortel. Les bactéries compétentes DB3.1, avec un ratio vecteur/insert de 1/3, et avec le kit de ligation rapide de Roche, ont permis d'obtenir 2 colonies de GFP C1 + RF C1 (pDest GFP C), à partir d'une transformation mise sur une boîte de pétri, contenant du chloroamphénicol, permettant la sélection de clones ayant incorporé l'insert. Pour les ligations avec l'insert RFA après obtention de 3 colonies de la même façon qu'avec pGFP C1 + RF C1, il a été possible de produire de la RFA concentrée 10 X (40 ng/ul), ce qui a facilité l'insertion de la cassette avec les 2 vecteurs pRluc zeo. Après transformation, concentration et mise sur plaques, une dizaine de colonies ont été obtenues sur pDest Rluc C (pRluc-C zeo + RFA) et pDest Rluc N (pRluc-N zeo + RFA). 5 colonies ont été repiquées dans chaque cas. Aucune colonie n'a été obtenue sur les contrôles négatifs.

Tableau 9 : vecteurs et reading frame cassette correspondante

vecteur	cassette
pRluc zeo N1	Reading frame cassette A
pRluc zeo C1	Reading frame cassette A
pGFP N1	Reading frame cassette A
pGFP C1	Reading frame cassette C1

### *Sélection des clones ayant incorporé l'insert correctement*

La sélection des clones ayant correctement incorporé l'insert se fait dans un premier temps à l'aide d'une digestion EcoRI pour vérifier son sens. Une digestion EcoRV permet de voir sa présence et de vérifier que la ligation a été correctement effectuée (sans délétion). Le tableau suivant montre les tailles des fragments obtenus par digestion des préparations d'ADN à partir de 5 ml LB medium (mini prep) pour les colonies ayant correctement incorporé l'insert Gateway dans les différents plasmides de destination.

Tableau 10 : taille des fragments attendus lors de la digestion *EcoRI* et *EcoRV* pour les *pDest*

Digestions	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>
<b>pDest GFP C</b>	474,5536	1.7kbp
<b>pDest GFP N</b>	472,5564	1.7kbp
<b>pDest Rluc C</b>	472,5740	1.7kbp
<b>pDest Rluc N</b>	472, 2247,3956	1.7kbp

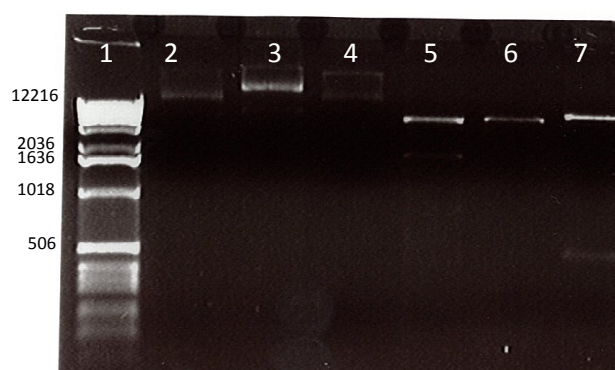


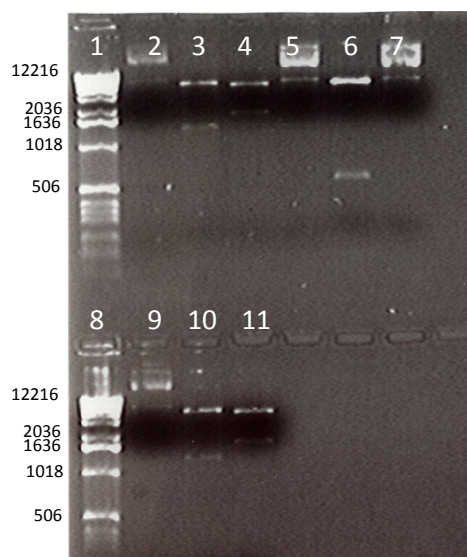
Figure 27 : sélection des colonies GFP C+RFC (*pDestGFP-C*)

Lors de la transformation des colonies GFP C1 + RFC , deux colonies ont été obtenues sur plaque. Le puits 1 contient le 1 kb ladder, les puits 2 et 3 contiennent les contrôles négatifs non digérés des plasmides de la colonie 1 et de la colonie 2, les puits 4 et 5 contiennent la digestion *EcoRI* des plasmides, des colonies 1 et 2, et les puits 6 et 7 contiennent la digestion *EcoRV* des plasmides, des colonies 1 et 2.

La Colonie 2 a incorporé l'insert au vu de la digestion *EcoRV* montrée au puits 5. L'insert fait environ 1.7Kbp . De plus l'insert est dans le bon sens car la digestion *EcoRI* donne un fragment théorique de 474 bp. Le puits 7 contenant la digestion des plasmides de la colonie 2 avec *EcoRI* contient un fragment d'environ 500bp.

La transformation de DB3.1 avec GFPN1 + RFA a donné trois colonies. Après extraction (mini prep) les plasmides ont été digérés avec *EcoRI* et *EcoRV* pour la sélection.





*Figure 28 : sélection des colonies GFPN +RFA (pDestGFP-N)*

Les puits 1 et 8 contiennent le 1 kb ladder, les puits 2,5 et 9 contiennent les contrôles négatifs non digérés des plasmides des colonies 1, 2 et 3, les puits 3,6 et 10 contiennent les digestions avec EcoRI; les puits 4,7 et 11 contiennent les digestions avec EcoRV.

L'insert RFA est présent dans les 3 colonies (digestion EcoRV) et il est dans le bon sens dans la colonie 2. La digestion théorique de pDestGFP-N donne un fragment de 472bp et un fragment de 5564bp. Enfin, lors de la ligation, un site EcoRV a été perdu. Un séquençage permettra de vérifier, si la construction de la colonie 2 est fonctionnelle, et si la reading frame est conservée malgré la perte du site EcoRV.

Lors de la transformation des DB3.1 avec pRluc-C1 zeo +RFA et pRluc-N1 zeo +RFA, une douzaine de colonies ont été obtenues dans les 2 plaques. La concentration d'ADN (vecteur et insert RFA) était 4 à 5 fois plus importante. La cassette RFA a pu être produite à partir du clonage de GFP N + RFA, et concentrée pour faciliter le clonage. 5 colonies pour chaque construction ont été repiquées pour extraction mini prep et digérées par EcoRI et EcoRV pour la sélection.

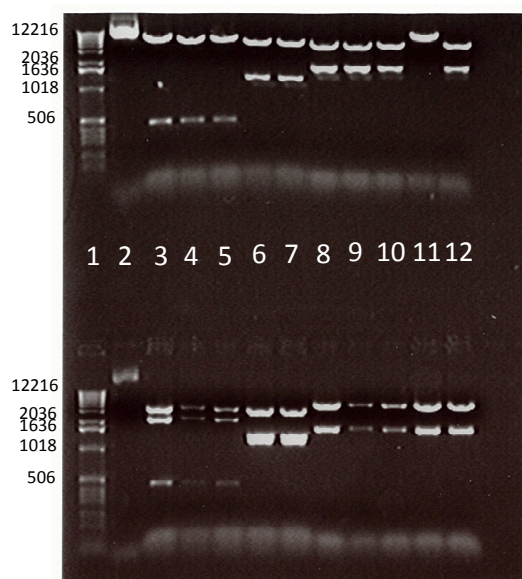


Figure 29 : sélection des colonies pRluc Zeo C et N + RFA

Le haut du gel contient les colonies pRluc C zeo + RfA et le bas du gel contient les colonies pRluc N zeo + RfA. Le puits 1 contient le 1kb ladder. Le puits 2 contient le contrôle négatif non digéré. Les puits 3 à 7 contiennent la digestion des plasmides des colonies 1 à 5 avec EcoRI et les puits 7 à 12 contiennent la digestion avec EcoRV des plasmides des colonies 1 à 5.

Les 5 colonies pRluc C1 zeo + RFA et les 5 colonies pRluc N1 zeo + RFA contiennent l'insert RFA (bande présente à 1.7kbp dans les puits 7 à 12). De plus les colonies 1,2 et 3 de pRluc C zeo+ RFA et les colonies 1,2 et 3 de pRluc N zeo + RFA ont incorporé l'insert dans le bon sens. Les digestions théorique avec EcoRI donne des fragments de 472 bp et 5740 bp pour pDest Rluc C et de 472 bp , 2247bp et 3956bp pour pDest Rluc N .

Une colonie ayant incorporé l'insert RF correctement pour chaque construction a été choisie pour produire des plasmides en quantité à l'aide d'une extraction midi prep selon protocole.

### Préparation d'ADN sur les pDest, gels contrôles et séquençages

Les quatre vecteurs de destinations ont été préparés à partir de 100 ml LB medium, pour un volume final de 100 ul, selon le protocole (midi prep), puis quantifiés à l'aide du nano drop ND-1000 spectrophotometer.

Tableau 11 : quantification des préparations d'ADN

vecteur	Concentration ADN[ng/ul]
pDest-Rluc-C	2435
pDest-GFP-C	107
pDest-Rluc-N	1765
pDest-GFP-N	2298

Des Digestions enzymatiques contrôles ont été accomplies avec EcoRV pour vérifier la présence de l'insert à 1.7kbp et avec EcoRI pour vérifier son sens. Ces digestions ont été passées sur gel d'agarose 1% et sont présentées ci-dessous.

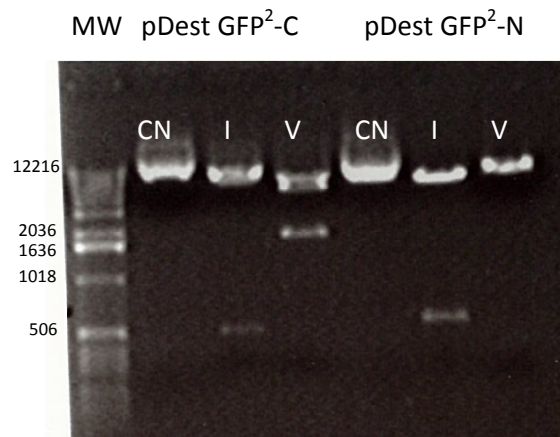


Figure 30 : gel contrôle sur les préparations d'ADN midi de pGFP<sup>2</sup>-C et N

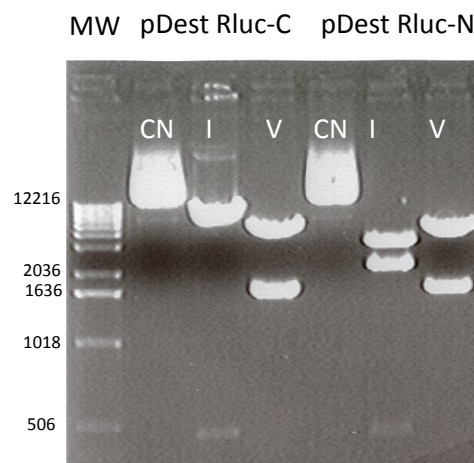


Figure 31 : gel contrôle sur les préparations d'ADN midi de pRluc-C et N

Les profils de restriction EcoRI et EcoRV correspondent aux profils attendu, sauf pour la construction pDest GFP<sup>2</sup>-N. En effet la digestion avec EcoRV ne permet pas de ressortir la cassette gateway. Il semble que cette construction ait perdu un site EcoRV lors de la ligation. Une nouvelle construction pDest GFP<sup>2</sup>-N a été produite puis des bactéries DB3.1 ont été transformées et mises sur plaque avec sélection chloroamphénicol (CmR). Les colonies ont été repiquées puis analysées avec un gel de contrôle sur une digestion EcoRI et EcoRV. Ces gels ne sont pas montrés dans ce rapport. Les différentes constructions des pDest ont été séquencées à l'aide des primers sur la cassette gateway pour vérifier l'insertion correcte de celle-ci et comparer les séquences réel aux constructions théoriques. Les différents séquençages sont présentés ci-dessous.

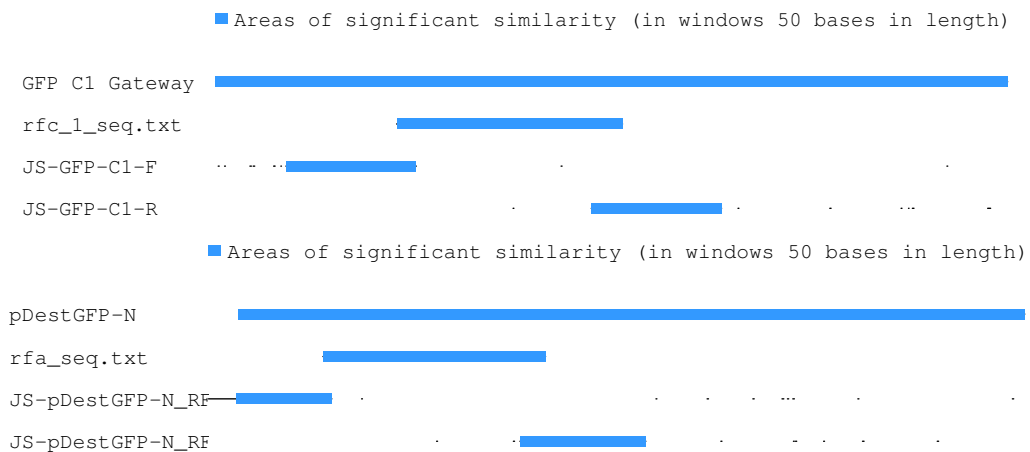


Figure 32: séquençage de *pDest GFP<sup>2</sup>-N* et *pDest GFP<sup>2</sup>-C*

Les séquençages montrent que les constructions théoriques sont les cartes exactes des différents pDest. Les séquençages des constructions pDest Rluc-C et N donnent des résultats similaires.

### Production du vecteur d'entrée *pEntr-NR2E3*

Le gène de NR2E3 a été amplifié lors d'une PCR suivant plusieurs conditions (master mix qiagen, master mix qiagen et betain, proof reading polymerase PFU). Les primers ont été designer pour permettre l'insertion du gène « in frame » à l'aide des sites de restriction XhoI et NcoI.

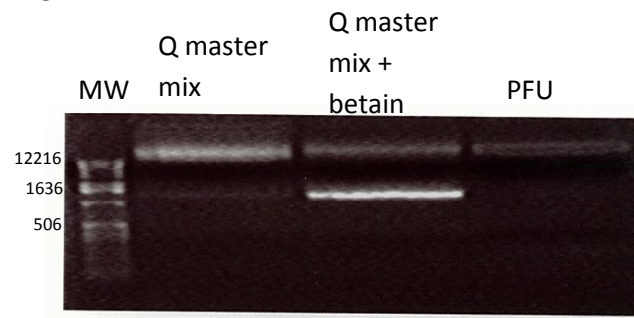


Figure 33 : PCR avec NR2E3

Le produit PCR (1.7Kbp) du puits contenant la réaction avec le Qiagen master mix et la betain a été découpé sur gel et purifié à l'aide du kit Qlaquick gel purification puis quantifiée à 9.7 ng/ul dans 50 ul H<sub>2</sub>O grâce au NanoDrop ND-1000 spectrophotometer .

Le vecteur pEntr4 a été digéré avec NcoI et XhoI puis mis sur gel d'électrophorèse 1%.

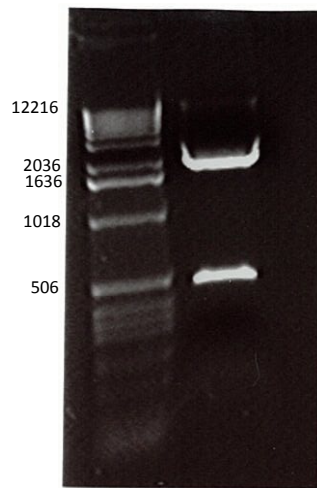


Figure 34 : digestion de pEntr4 avec XhoI et NcoI

Le vecteur (2.2Kbp) a été découpé sur gel et purifié à l'aide du kit Qlaquick gel purification puis quantifié à 31 ng/ul dans 50 ul H<sub>2</sub>O grâce au NanoDrop ND-1000 spectrophotometer .

Une ligation avec les fragments de NR2E3 et de pEntr4, purifiés et passés à la phosphatase alcaline, a été accomplie avec un ratio vecteur/insert de 1/3. Des bactéries compétentes HB101 ont été transformées avec la ligation et mises sur plaques, puis un test PCR a été mené sur les colonies repiquées pour déterminer les colonies positives.

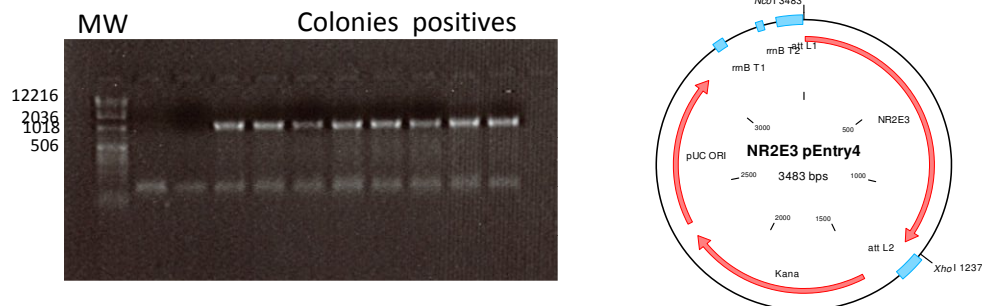


Figure 35 : Test PCR et Carte De pEntr-NR2E3

Le test PCR a permis de faire des préparations d'ADN à partir de 5ml LB sur 6 colonies positives (présence de la bande à 1.7Kbp). Les bandes de petites tailles correspondent aux dNTP ou à des primer dimer. La carte du vecteur montre comment le gène de NR2E3 s'intègre dans le vecteur d'entrée. Une mutation sur le gène de NR2E3 peut être présente car la PCR n'a pas fonctionné avec la polymérase haute fidélité PFU. Un séquençage entier du gène de NR2E3 est nécessaire pour vérifier son intégrité.

### Test de fluorescence

Une réaction de recombinaison LR entre les vecteurs pDest GFP<sup>2</sup>-C et N, pDest Rluc-C et N et le vecteur pEntr-Gus a été accomplie pour obtenir les différents vecteurs d'expression pGus GFP<sup>2</sup>-C et N et pGus Rluc-C et N selon le protocole de réaction de recombinaison LR. Des bactéries HB101 ont été transformées pour permettre la double sélection (positive avec zeo et négative avec ccdB) des vecteurs d'expression. Des préparations d'ADN à partir de 5 ml LB medium (mini prep) ont été faites sur 5 colonies pour chaque vecteur d'expression afin de vérifier ceux-ci. Puis des préparations d'ADN à partir de 100 ml LB ont été produites et reprises dans 100 µl H<sub>2</sub>O, et quantifiée à l'aide du NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Tableau 12 : quantification des vecteurs d'expressions

échantillon	Concentration ADN[ng/ul]
pGusGFPC	389.88
pGusGFPN	278.85
pGusRlucC	232.58
pGusRlucN	87.97

Des cellules Hek 2.93T ont été transfectées avec 3 µg d'ADN pour chaque construction ainsi qu'avec des contrôles positifs et négatifs, selon le protocole de transfection. Les cellules ont été incubées 24h à 37°C. Des photos au microscope à fluorescence ont été prises, puis les cellules ont été lavées au PBS et resuspendues pour permettre la quantification de la fluorescence de GFP<sup>2</sup> et de Rluc en présence de coloentérasine-H.

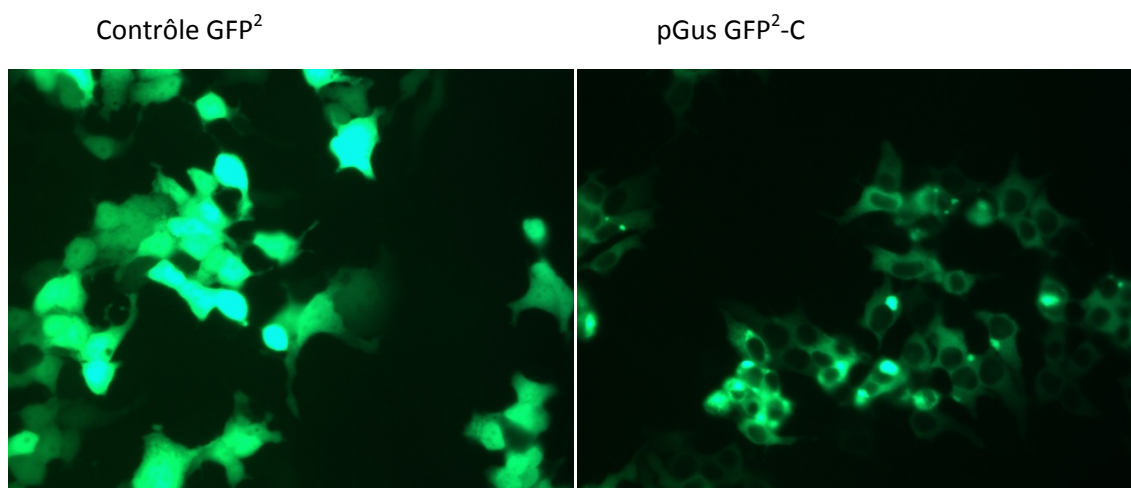


Figure 36 : photo au microscope à fluorescence

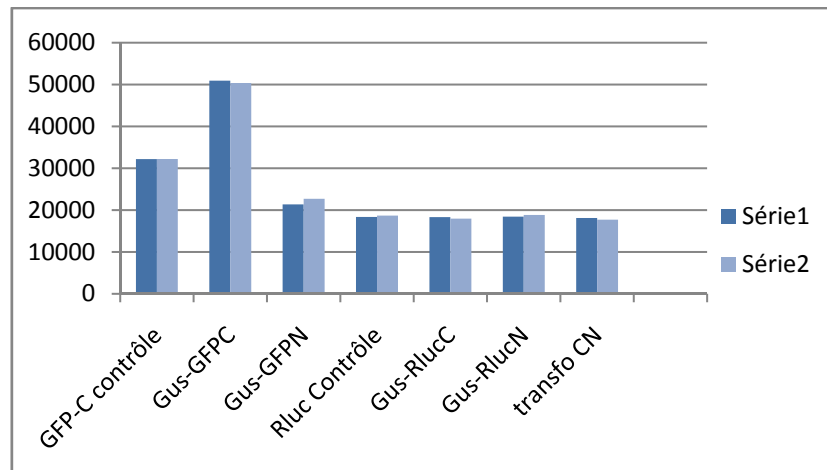


Figure 37 : quantification de la fluorescence GFP<sup>2</sup>

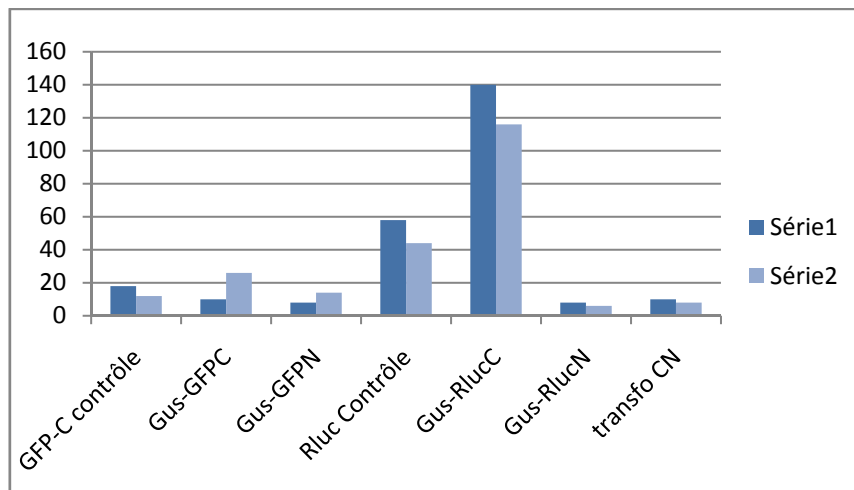


Figure 38 : quantification de la fluorescence Rluc

Ces différents résultats montrent clairement que les constructions en C terminales sont fonctionnelles. En effet la photo des cellules transfectées avec pGus GFP<sup>2</sup>-C montre que la GFP est exprimée dans le cytosol car gus est une protéine cytosolique impliquée dans le métabolisme des inositols. Les quantifications de la fluorescence montrent une différence significative entre les constructions en C terminal et les contrôles négatifs. Les constructions en N terminal n'ont par contre rien donné car le gène de Gus contient un stop sur le vecteur d'entrée. Le gel contrôle montre que le gène a bien été inséré dans le vecteur d'expression, mais le stop empêche la traduction du marqueur (gel non présenté dans le rapport).



## Discussion Générale

Les Vecteurs pDest GFP2-C et N et pDest Rluc C et N ont été correctement produits avec l'insert gateway et des résistances zeo compatibles avec le système de sélection gateway. Les séquençages et les gels contrôles montrent que les cartes théoriques respectent les séquences réelles de ces vecteurs. Les vecteurs obtenus sont exposés ci-dessous.

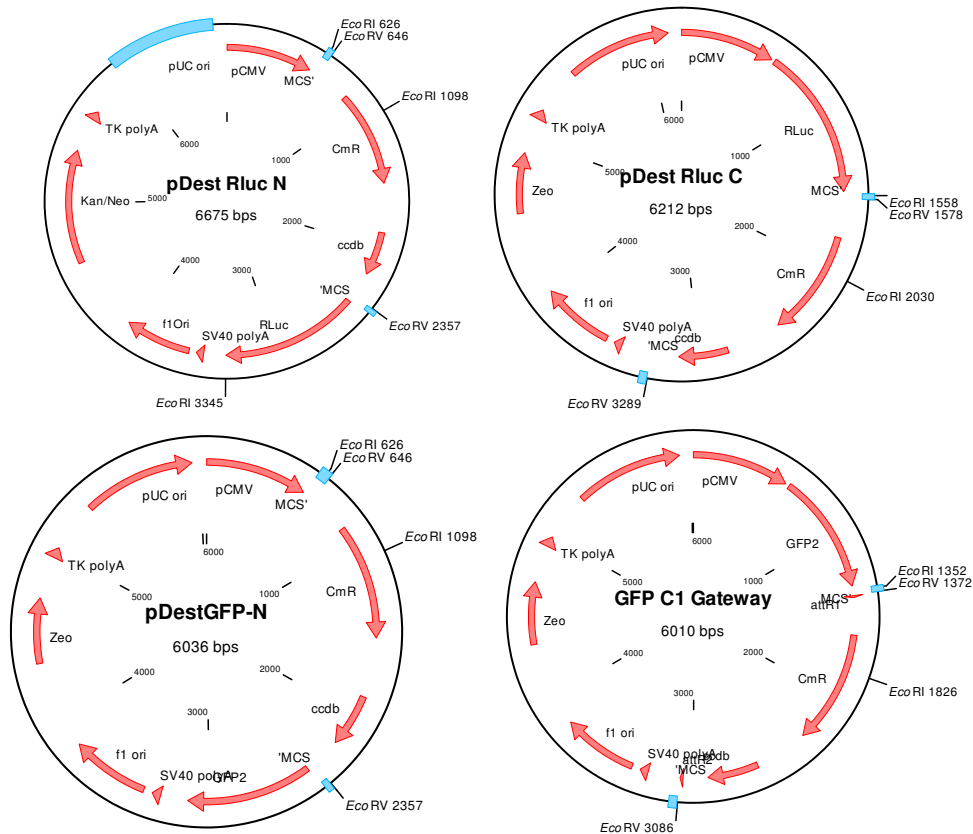


Figure 39 : vecteurs de destination BRET<sup>2</sup>-Gateway

Le test de fluorescence a permis de montrer que les constructions sont effectivement fonctionnelles en C terminal. Les constructions en N terminal nécessitent l'introduction de gène de protéine ne contenant pas de stop. Un vecteur d'entrée contenant NR2E3 a été produit avec succès. Ce vecteur permettra de confirmer que les constructions en N terminal sont aussi fonctionnelles. Par manque de temps ce gène n'a pas pu être séquencé pour vérifier son intégrité. Un gène de NR2E3 parfaitement conservé est nécessaire pour reproduire les résultats de l'expérience BRET de Roduit R. et Escher P. avec les vecteurs de destination BRET-Gateway et ainsi montrer que ces vecteurs donnent des résultats équivalents en un temps record. En effet, une fois le vecteur d'entrée produit, les 4 vecteurs BRET sont rapidement obtenus par la réaction de recombinaison spécifique LR. De plus ce vecteur d'entrée pourra par la suite être utilisé avec des vecteurs de destinations ayant des applications différentes.

# Conclusion et perspectives

---

Le système gateway permet de gagner un temps considérable pour obtenir des vecteurs d'expression à application diverse. Les vecteurs BRET<sup>2</sup> sont un outil formidable pour tester et localiser les interactions entre protéines. Les vecteurs BRET<sup>2</sup>-Gateway sont une combinaison prometteuse pour de nombreuses expériences afin d'étudier des mécanismes impliquant des protéines. La différenciation des photorécepteurs est un bon exemple dans lequel ce système pourra démontrer son efficacité et son potentiel. Une optimisation de la production de vecteurs d'entrée amènera d'autres améliorations de ce système, qui permettront peut-être, à terme, d'établir des systèmes automatisés pour le screening de bibliothèques entières de cDNA gateway compatible.[18]

## Remerciements

---

- Raphaël Roduit, Bruno Schnyder
- Daniel Schorderet , Pascal Escher
- Martine Emery
- Pascale Evequoz
- Toute l'équipe de l'IRO

## Bibliographie

---

1. *Molecular biology of the cell, fourth edition.* **B.Alberts A.Johnson J.Lewis M.Raff K.Roberts P.Walter** . s.l. : Garland Science, 2002 p520-521.
2. *Fluorescence-based methods in the study of protein–protein interactions in living cells.* **Ciruela, Francisco.** 2008, Current Opinion in Biotechnology , pp. 19:338–343.
3. *Luminescence Biotechnology instruments and applications.***Knox Van Dyke, Christopher Van Dyke, Karen Woodfork.** CRC PRESS, 2001 p529-556
4. *Reporter gene imaging of protein–protein interactions in living subjects.* **Massoud, Tarik F.** 2007, Current Opinion in Biotechnology , pp. 18:31–37.
5. *Detection of b2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET),* **Stephane Angers, Ali Salahpour, Eric Joly, Sandrine Hilaiet, Dan Chelsky, Michael Dennis, and Michel Bouvier,** 3684–3689 PNAS March 28, 2000 vol. 97 no. 7
6. *Gateway recombinational cloning a biological oparating system.* **Katzen, Federico.** 2007, expert opinion drug discovery, pp. 571-590.

7. *Rapid Cloning and Purification of Proteins: Gateway Vectors for Protein Purification by Self-Cleaving Tags*. **Alison R. Gillies, Judy F. Hsui, Seachol Oak, David W. Wood**. October 1, 2008, Biotechnology and Bioengineering, pp. Vol. 101 No. 2 :229-241.
8. *Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system*. **Yukari Sasaki, Takefumi Sone , Shouhei Yoshida , Kazuhide Yahat , Junko Hotta ,Jonathan D. Chesnut , Takeshi Honda, Fumio Imamoto**. 2004, Journal of Biotechnology , pp. 107 :233–243.
9. **corporation, invitrogen**. Gateway® Vector Conversion System with One Shot® ccdB Survival™ 2 T1R Competent Cells. 5791 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008 : s.n.
10. *The Eye basic sciences in practice, third edition*. **John V. Forrester, Andrew D. Dick, Paul G. McMenamin, Fiona Roberts**. Saunders Elsevier 2008 p40-60
11. *Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network*, **Anne K. Hennig, Guang-Hua Peng, Shiming Chen**, BRAINRESEARCH 2007
12. *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. **Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE**. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12. Image of NR2E3 created by **Sobel Jonathan**
13. *Mutations in NR2E3 Can Cause Dominant or Recessive Retinal Degenerations in the Same Family*, **Pascal Escher, Peter Gouras, Raphael Roduit, Leila Tiab, Sylvain Bolay, Tania Delarive, Shiming Chen, Chih-Cheng Tsai, Masanori Hayashi, Jana Zernant, Joanna E. Merriam, Nicolas Mermod, Rando Allikmets, Francis L. Munier, and Daniel F. Schorderet**, HUMAN MUTATION 2008
14. *The DNA binding domain (DBD) is essential for NR2E3 dimerization and interaction with CRX*, **Roduit R, Escher P, Emery M, Voirol N, Schoderet D F**. Poster IRO 2009
15. *Fuctional analysis of disease-causing NR2E3 (PNR) mutations*, **Escher P, Roduit R, Voirol N, Favez T, Schoderet D F**. Poster IRO 2009
16. *Atrophins are corepressors for NR2E3 (PNR)*, **Escher P, Voirol N, Favez T, Roduit R, Cheng S, Tsai C, Mermod N, Menier F, Schoderet D F**. Poster IRO 2009
17. BRET<sup>2</sup><sub>TM</sub> Technical Data Sheet, BioSignal Packard, 1744 William, Suite 600, Montréal Canada
18. *A suite of Gateway® cloning vectors for high-throughput genetic analysis in Saccharomyces cerevisiae*. **Simon Alberti, Aaron D. Gitler<sup>1</sup>, and Susan Lindquist**. 2007 October, Yeast, pp. 24(10): 913–919.