Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude de la stabilité de transformants α-amylolytiques d'Escherichia coli

Laloux, Olivier

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

1987

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

ETUDE DE LA STABILITE DE TRANSFORMANTS α-AMYLOLYTIQUES D'ESCHERICHIA COLI.

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

OLIVIER LALOUX

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5000 **NAMUR**
Tél. 081-22.90.61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.03.91

ETUDE DE LA STABILITE DE TRANSFORMANTS α-AMYLOLYTIQUES D'ESCHERICHIA COLI.

LALOUX Olivier

Résumé.

Dans un premier temps nous avons décrit l'instabilité de transformants α-amylolytiques de E.coli comprenant un plasmide porteur du gène d'α-amylase de Bacillus licheniformis. En l'abscence comme en présence de pression sélective (ampicilline) favorisant les transformants l'instabilité ségrégationnelle (apparition de bactéries dépourvues de plasmide) est très importante.

Nous avons alors recherché les causes de cette instabilité. Nous avons construit un modèle selon lequel l'instabilité résulterait de la charge que déterminerait le plasmide recombinant pour la bactérie hôte. Cette charge serait liée à la présence du gène d'α-amylase (niveau d'expression élevé de ce gène, localisation et accumulation périplasmique de l'amylase chez coli.

Des arguments en faveur de ce modèle ont été fournis par la mise en évidence de 2 types de mutants totalement stables. Le premier type consiste en des transformants tout à fait stables, mais qui ne produisent plus d'α-amylase. Les mutants stables du deuxième type conservent l'activité amylolytique mais semblent capables de sécréter l'enzyme dans le milieu. Celle-ci ne s'accumulerait donc plus dans le périplasme, dès lors la charge que représente le plasmide serait éliminée.

Pour démontrer de manière directe l'influence de la localisation périplasmique de l'amylase sur la stabilité des transformants nous avons délété le gène d'α-amylase de sa partie amont qui code pour le peptide signal de la protéine. Les transformants de E.coli, porteurs de ce nouveau gène, que nous avons obtenus présentent, comme attendu, une distribution inhabituelle (plus cytoplasmique) de l'enzyme et apparaissent stables. Ce résultat semble confirmer l'influence de la localisation de l'α-amylase sur la stabilité des transformants α-amylolytiques.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1987
Laboratoire de génétique moléculaire
Promoteur : Prof. J. DELCOUR

STUDY OF THE STABILITY OF α-AMYLOLYTIC TRANSFORMANTS OF *ESCHERICHIA COLI*.

LALOUX Olivier

Summary.

At first we have described the instability of the α-amylolytic transformants of *E.coli* containing a plasmid with the α-amylase gene from *Bacillus licheniformis*. In abscence as in presence of a selective pressure in favour of the transformants (ampicilline) the segregationnal instability (appearance of bacteria without plasmids) is very important.

Then we have searched for the cause of this instability. We have constructed a model in which the instability would result from the charge that could determine the recombinant plasmid for the host bacteria. This charge would be the consequence of the presence of the α-amylase gene (high expression level of this gene, localization and periplasmic accumulation of this enzyme in *E.coli*.

Arguments supporting this model were found by the discover of 2 types of mutants totally stable. The first type consists in transformants totally stable, but which produce no more α-amylase. The stable mutants of the second type conserve the α-amylolytique activity , but seem to be able to secrete the enzyme in the medium. The enzyme would accumulate no more in the periplasmic space, and, in consequence, the charge represented by the plasmid would be eliminated.

To demonstrate directly the influence of the periplasmic localization of the α-amylase on the stability of the transformants, we have deleted the α-amylase gene, of its 5' part which encodes the peptide leader of the protein. The transformants of *E.coli* bearing this new gene, that we have obtained, present a new distribution (more cytoplasmic) of the enzyme and appear stable. This result seems to confirm the influence of the localization of the α-amylase on the stability of the α-amylolytic transformants.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'a pu être réalisé qu'avec le concours d'un certain nombre de personnes auxquelles j'exprime ma reconnaissance. Je tiens à remercier plus particulièrement le Professeur J.Delcour qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a bien voulu assurer la direction de mon mémoire, le Docteur J.Vandenhaute pour ses conseils, et les membres du laboratoire qui ont essayé, d'une manière ou d'une autre, de rendre cette année des plus agréables (car on peut s'amuser en travaillant!).
Je tiens également à remercier Messieurs J.Delcour, E.Feytmans, J.Mahillon, J.Remacle, J.Vandenhaute et le Père Devos qui ont accepté de lire ce mémoire.

Et je m'en voudrais beaucoup d'oublier ma famille et tous mes amis sans lesquels tout ceci n'aurait aucun sens.

LISTE DES ABBREVIATIONS.

a.a. : acide aminé.
ADN ou DNA : acide désoxyribonucléique.
ARN ou RNA : acide ribonucléique.
bp : paire de bases.
kb : kilobase.
µl : microlitre.
ml : millilitre.
ngr : nanogramme.
µgr : microgramme.
mgr : milligramme.
mM : millimolaire.
RPM : rotation par minute.

TABLE DES MATIERES.

Page

CHAPITRE I. INTRODUCTION.

1.1. La notion d'instabilité 1

1.2. Les manifestations de l'instabilité 1

1.3. Mécanismes intervenant dans l'instabilité ségrégationnelle 2

1.3.1. La réplication des plasmides 2

1.3.2. Le phénomène de partition 6

1.4. Mécanismes intervenant dans l'instabilité structurale 13

1.5. Stratégie visant à stabiliser les plasmides 16

1.6. Que conclure de tout ceci ? 20

1.7. But du travail 21

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Souches bactériennes-plasmides 23

2.2. Culture des bactéries et milieux utilisés 30

2.3. Clonage d'un gène dans un plasmide 32

1. Réactions de restriction 32

2. Visualisation des résultats de la restriction par électrophorèse sur gel d'agarose 34

3. Récupération d'une bande de gel et élution du DNA 36

4. Les réactions de ligation 37

5. Réaction de filling 40

6. Transformation 40

7. Extraction rapide de plasmides d'E. coli 42

8. Extraction au phénol-chloroforme 44

9. Protéinase K 46

2.4. Détection sur boîte de la sécrétion d'α-amylase par des colonies bactériennes 47

2.5. La formation de sphéroplastes par un choc osmotique et la libération d'enzymes périplasmique d'E. coli 48

2.6. Lyse complète des sphéroplastes et libération des enzymes cytoplasmiques 49

2.7. Dosage de l'activité enzymatique par le test du DNS 49

Page

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

Etude de l'instabilité des transformants α-amylolytiques 52

3.1. Instabilité sur milieu solide 52

3.2. Instabilité en milieu liquide 56

3.2.1. Stabilité du plasmide non recombinant (pUC18) 57

3.2.2. Description de l'instabilité (ségrégationnelle) en milieu non sélectif liquide 58

3.2.3. Description de l'instabilité ségrégationnelle en milieu liquide sélectif 60

3.2.4. Ampicilline ajoutée au début de la culture 64

Les causes de l'instabilité des transformants α-amylolytiques 66

3.3. Responsabilité de l'insert de 2,5 kb du plasmide recombinant dans le phénomène d'instabilité 66

3.4. La charge métabolique déterminée par le plasmide recombinant 67

3.5. La charge physiologique déterminée par le plasmide recombinant 68

3.5.1. Structure de la paroi bactérienne 68

3.5.2. Transport des protéines chez les bactéries 69

3.5.3. Localisation de l'α-amylase de B. licheniformis dans E. coli 70

3.5.4. Conséquence de la localisation périplasmique de l'α-amylase chez E. coli 71

3.6. Charge du plasmide et instabilité ségrégationnelle 72

3.7. Les remèdes 73

L'apparition de mutants stables suite au processus d'instabilité structurale 73

3.8. L'apparition de mutants stables, comme confirmation des hypothèses énoncées 73

3.9. Découverte des deux types de mutants 74

3.10. Stabilité des variants amp^R, amy^- 75

3.10.1. En milieu solide 75

3.10.2. En milieu liquide 75

Page

3.11. Stabilité des variants amp^R, amy^+ partiellement stables 76

3.11.1. En milieu solide 76

3.11.2. En milieu liquide 76

3.11.3. Localisation plasmidique de la modification entraînant cette stabilisation 77

3.12. Stabilité d'un second type de variants amp^R, amy^+ : totalement stables 78

3.12.1. En milieu solide 78

3.12.2. En milieu liquide 78

3.13.3. Dosage de l'α-amylase chez ces transformants amy^+ superstables, au niveau des trois compartiments (cytoplasme, périplasme, milieu extérieur) 79

3.13. L'apparition de variants semble être un phénomène général 80

Stabilisation des transformants α-amylolytiques de *E. coli* par manipulation directe du gène d'α-amylase 84

3.14. Stabilisation par une diminution de la charge du plasmide 84

3.14.1. Construction proprement dite 86

3.14.2. Transformation de la souche TG1 avec le nouveau vecteur 89

3.14.3. Restriction du plasmide d'un clone de transformants α-amylolytiques en vue de contrôler le plasmide 90

3.14.4. Dosage de l'α-amylase dans les différents compartiments cellulaires 91

3.14.5. Etude de la stabilité des transformants en milieu solide 92

3.14.6. Etude de la stabilité des transformants en milieu liquide 96

3.14.7. Conclusions 98

Page

CHAPITRE IV . CONCLUSIONS GENERALES 100

PERSPECTIVES 104

REFERENCES 107

1. INTRODUCTION

1.1. La notion d'instabilité

En octobre 1985, un colloque sur l'instabilité des plasmides s'est tenu à Héraklion en Crête dans le cadre du programme de Génie Biomoléculaire de la Commission des Communautés Européennes(22). S'y trouvaient réunis les représentants des laboratoires européens participant à ce programme, ainsi que des experts mondiaux afin de mener une réflexion sur les mécanismes moléculaires contrôlant la stabilité génétique des systèmes transformés (bactéries, levures et plantes supérieures). Ceci souligne bien l'importance actuelle de ce problème qui se pose à tous les niveaux. Tous les secteurs qui utilisent le clonage moléculaire sont en effet concernés.

Mais qu'entend-on au fait par cette notion de "stabilité d'une cellule transformée" ?
Une définition satisfaisante pourrait s'énoncer :
"la stabilité est la capacité qu'ont les cellules transformées de conserver le plasmide inchangé durant leur croissance, en manifestant les caractéristiques phénotypiques attendues."
Cette définition implique que le maintien d'un plasmide intact dans des cellules transformées ne soit pas un événement automatique. Les cellules transformées sont en effet instables à des degrés divers.

1.2. Les manifestations de l'instabilité

Deux types d'instabilité ont été observés :

1) l'instabilité structurale qui concerne les insertions, délétions, et autres réarrangements du DNA.
2) l'instabilité ségrégationnelle qui résulte d'une répartition inégale des plasmides lors de la division, ce qui aboutit à l'apparition de cellules filles dépourvues de plasmides.

Les conséquences (de ces phénomènes d'instabilité) sont importantes. En effet, les bactéries qui auront perdu le plasmide ou qui auront "réarrangé" leur plasmide seront naturellement plus compétitives que les transformants, et deviendront donc rapidement majoritaires dans la culture en l'absence de sélection artificielle. Il y a en effet un coût de maintenance pour la cellule transformée, lié au besoin de reproduire le plasmide, de synthétiser du RNA et des protéines à partir des gènes portés par le plasmide et d'exécuter d'autres fonctions déterminées par le plasmide. Ce coût peut être quantifié en termes d'énergie additionnelle dépensée pour maintenir et répliquer le plasmide et ses fonctions. Le plasmide constitue donc une charge, un fardeau métabolique pour la cellule qui le porte. Ceci explique pourquoi les bactéries porteuses d'un plasmide manifestent plus souvent une croissance ralentie.

1.3. Mécanismes intervenant dans l'instabilité ségrégationnelle.

La propagation stable d'un réplicon, comme un plasmide auto-réplicatif, dans une population de cellules bactériennes en croissance requiert deux choses. Tout d'abord, le taux de réplication du plasmide doit être contrôlé et ajusté au taux de croissance de la culture. Ensuite, un mécanisme doit assurer que chacune des cellules filles produites pendant la division cellulaire recevra bien au moins une copie de chaque type de réplicon présent dans la cellule parentale (mécanisme de "partition").

1.3.1. La réplication des plasmides

La nature du mécanisme qui contrôle la réplication des plasmides n'est pas encore comprise dans tous les détails. Bien que de nombreux modèles aient été présentés, la plupart des données disponibles semblent en accord avec un mécanisme de contrôle négatif plutôt qu'un mécanisme de

contrôle positif. Pritchard(33) a proposé un modèle basé sur un répresseur, spécifié par le plasmide qui interagirait avec un récepteur spécifique sur l'ADN du plasmide pour contrôler la fréquence d'initiation de la réplication. Ce répresseur serait produit brièvement pendant la réplication du plasmide, inhibant dès lors une réplication ultérieure de celui-ci. Quand la cellule grandit (après la division), la concentration en molécules de répresseurs diminue jusqu'à tomber en-dessous d'une valeur critique, de sorte qu'une nouvelle réplication de plasmide peut être entreprise. Elle sera suivie d'une division cellulaire et ainsi de suite. Ce modèle du contrôle de la fréquence d'initiation des cycles de réplication, explique du même coup le contrôle du nombre de copies du plasmide.

Une autre hypothèse, concernant toujours un contrôle négatif, propose que le contrôle du nombre de copies soit permis par la synthèse d'un répresseur capable de "compter" le nombre d'origine de réplication (= ORI : endroit du plasmide où la réplication est initiée). Ce dernier modèle s'applique d'ailleurs particulièrement bien au plasmide "col E1". Ce plasmide comprend naturellement une origine de réplication (ORI) et est maintenu à raison d'une vingtaine de copies par bactéries. Un plasmide col E1 dans lequel sont insérées plusieurs séquences "ORI" sera maintenu à un nombre de copies plus faible que normalement, ce qui permet au nombre d'ORI par cellule de rester toujours constant. Dans ce cas, le mécanisme de contrôle des réplications dépendrait du nombre d'ORI (origines de réplication) et non pas, comme dans l'hypothèse précédente du nombre de molécules de plasmides (synthétisant le répresseur).

Des arguments viennent de toute façon étayer les 2 hypothèses qui contiennent sans doute chacune une part de vérité. Si le mécanisme précis est encore discuté, le principe du contrôle négatif semble,lui, tout à fait accepté.

Voyons par exemple, le système de réplication du plasmide col E1. Il a été particulièrement étudié, et est d'autant plus intéressant que le plasmide utilisé pour le clonage de l'α-amylase est un plasmide du type "pUC" dont le système de réplication est dérivé du "col E1". Ce plasmide comprend bien, d'une part des déterminants génétiques supportant le processus de réplication en soi (ORI), d'autre part des déterminants supportant le contrôle de la fréquence à laquelle cette réplication se déroule (gène répresseur).

Mécanismes d'initiation de la réplication à l'origine col E 1.

La réplication commence avec la transcription d'un RNA qui s'initie 555 bp en amont de l'origine (ORI). La transcription continue au-delà de l'origine. L'enzyme RNAse H coupe alors le transcrit à l'origine. Ceci génère une extrémité 3'-OH qui est utilisée comme amorce ("primer") pour la synthèse de DNA.

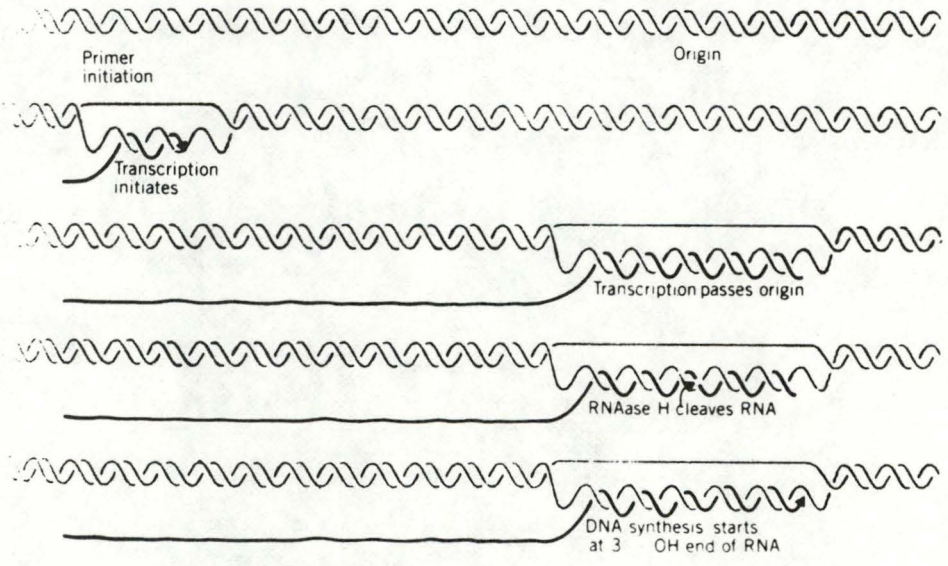


fig.1 : la réplication du DNA col E1 est initiée par la coupure du RNA ce qui génère une extrémité 3'-OH.

Mécanismes de régulation de la réplication

Il en existe deux qui exercent leur effet sur l'initiateur à RNA. Le mécanisme le plus important met en jeu une molécule de RNA, synthétisée dans la même région que l'amorce. C'est le RNA I, une molécule d'environ 108 bp, codée par le brin opposé à celui spécifiant l'amorce à RNA.

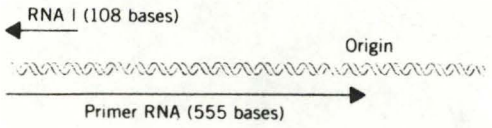


fig.2 : la séquence du RNA I est complémentaire de la région 5' terminale de l'amorce à RNA.

La molécule de RNA I se termine près du site où l'amorce à RNA débute. Donc le RNA I est complémentaire de la région 5'terminale du primer.
L'appariement du RNA I avec l'amorce empêche la RNAse H de générer une extrémité 3' à l'amorce de RNA. Le mécanisme supposé est une modification de la structure de l'amorce de RNA, suite à l'interaction avec le RNA I, empêchant la réaction de coupure et donc la réplication. Le 2ème mécanisme répresseur, nécessite l'action d'une protéine de 63 a.a., codée par le gène "rom", localisé en aval de l'ORI. Cette protéine inhibe la formation du primer en facilitant l'interaction entre le RNA I et le primer (effet de potentialisation de la répression de l'initiation). Une belle preuve de l'action de la protéine "rom" réside dans le fait que son absence entraîne une augmentation d'un facteur 5 à 10 de nombre de copies.
Soulignons que certains plasmides utilisés comme vecteurs sont rom^+ (c'est-à-dire capable de synthétiser "rom"), comme "pBR 322", tandis que d'autres comme les "pUC" sont rom^-. Ces derniers sont comparativement moins stables.

1.3.2. Le phénomène de partition

Si aucun mécanisme n'existait pour une ségrégation active des molécules de plasmides aux cellules filles pendant la division, alors la probabilité $P(_o)$ que l'une ou l'autre des cellules filles ne reçoive pas de plasmides est donnée par la distribution binomiale :

$$P(_o) = 2(1/2)^{nD}$$

avec nD = nombre de molécules de plasmides par cellule à la division.

La proportion de cellules dépourvues de plasmides sera directement liée au nombre de copies du plasmide concerné. Pour des plasmides présents normalement à un haut niveau de copies (col E1, ...) la probabilité qu'une bactérie ne reçoive pas de plasmide sera très faible,(pour un nombre de copies supérieur à 18, elle est inférieure à 10^{-5} par cellule par génération), tandis que pour des plasmides comme le facteur sexuel de E. coli, présents à raison d'une ou deux copies par bactérie, la fréquence de cellules sans plasmides sera élevée. De plus, si le mécanisme qui contrôle la réplication du plasmide est capable de corriger les anomalies dans le nombre de copies du plasmide produites par cette ségrégation aléatoire, alors toutes les cellules contiendront des nombres de plasmides équivalent à la prochaine division, indépendamment du nombre précis de plasmides qui est reçu des parents. Donc la probabilité de produire une cellule sans plasmide à la prochaine génération demeurera inchangée et les cellules sans plasmides seront produites à une fréquence constante durant la croissance de la culture.

Dans le cas de plasmides non conjugatifs, les cellules qui n'ont pas hérité de plasmide resteront dépourvues de plasmides et généreront bien entendu une progéniture sans plasmide.

Vu que la perte de plasmides naturels ne s'observe quasiment pas pendant la croissance des cellules, il doit exister un mécanisme actif permettant une répartition précise des plasmides au moment de la division cellulaire (en particulier pour les plasmides à faible nombre de copies). Divers travaux ont permis d'identifier et de caractériser une (ou des) fonction(s) génétique(s) du plasmide qui accomplit la partition active des plasmides aux cellules filles au moment de la division.

La fonction PAR (23)

Ainsi, la partition du plasmide pSC 101 est sous la dépendance d'un locus de DNA spécifique du plasmide appelé "par" (pour partition). Des expériences de délétions sur le pSC 101 ont par ailleurs montré que les déterminants nécessaires pour la partition sont physiquement et fonctionnellement séparés des fonctions de :

- réplication
- contrôle du nombre de copies du plasmide
- d'incompatibilité

La fonction "par" est fondamentalement indépendante du procédé de réplication. Ce locus "par" peut fonctionner pour stabiliser un plasmide délété dans sa propre région de contrôle de partition. Et ceci est vrai quelque soit l'endroit de l'insertion du locus et son orientation par rapport à l'origine de réplication. Inversément, il est possible de rendre instable un plasmide simplement en lui enlevant le fragment "par". La capacité de "par" de fonctionner en "cis" indique que ce locus ne code probablement pas pour un produit génique diffusible, et suggère qu'il s'agit plutôt d'un site spécifique de l'ADN du plasmide qui interagit avec d'autres composantes du système de partition. Donc, le locus "par" apparait comme étant fonctionnellement équivalent au centromère des

chromosomes eucaryotiques, qui permet une répartition précise des molécules de DNA entre les cellules filles durant la mitose. Vu que le mécanisme de partition des molécules de plasmides requiert leur distribution dans les cellules en division, le système de partition doit être capable d'orienter les molécules de plasmides en fonction du plan de division cellulaire. Ceci peut impliquer des interactions du locus "par" avec une structure cellulaire qui effectue la distribution réelle des plasmides aux cellules filles. Jacob et al (1963) ont suggéré que les molécules en réplication, du chromosome et de plasmides sont attachées à des sites spécifiques sur la membrane cytoplasmique de sorte qu'une ségrégation active des molécules répliquées se produit lors de la croissance de la membrane. Une autre possibilité est que la partition des plasmides passe par une association avec le chromosome hôte pour former une "unité de ségrégation génétique"; les molécules de plasmides seront donc "partitionnées" passivement avec les chromosomes.
En renfort de cette idée,citons l'observation que les plasmides à petit nombre de copies (qui doivent requérir le mécanisme de partition le plus précis) sont généralement trouvés en plus forte association avec le DNA chromosomique condensé que les plasmides à copies multiples.

Les fonctions sop A, sop B, sop C, ccd (28,29)

Les mécanismes de partition du plasmide F ont été décrit en 1983. Mais ici, si l'intervention d'une région cis-active a bien été mise en évidence (sop C), 2 produits (sop A, sop B) codés par des gènes du plasmide se sont révélés aussi indispensables. Ces 3 déterminants sont compris dans un segment de 3 kb situé hors de la région essentielle pour une réplication autonome du plasmide. Sop A et sop B désignent les produits géniques qui agissent en trans. Sop C est la région cis-active qui semble interagir au niveau de la membrane avec un composant cellulaire constitué de la protéine sop B et d'au moins 2 protéines de l'hôte.

Ces 3 régions sont donc requises pour assurer une partition normale de F. Un point toutefois pose problème. On connait une série de plasmides qui se répliquent en utilisant l'origine de réplication du chromosome de E. coli (ORI C), et on sait qu'ils ne sont pas maintenus de manière stable lors des divisions cellulaires (en l'absence de pression sélective).
Diverses études ont donc été réalisées pour tester l'effet stabilisateur des segments sop A, B, C s'ils sont insérés dans un de ces plasmides porteurs d'ORI C. Contrairement à toute attente, il n'a jamais été possible par ce moyen d'obtenir une stabilisation totale.
Pour avoir une stabilisation complète, il faudra ajouter en plus, un autre segment de DNA du plasmide F, désigné ccd ("coupled cell division). Celui-ci est localisé à la fois hors de la région essentielle pour une réplication autonome et des régions de partition (sop). Il semble agir en couplant la division de la cellule hôte à la prolifération du plasmide car la division de la cellule hôte est inhibée quand le nombre de copies du plasmide portant le segment ccd diminue.

Des travaux récents distinguent 2 régions fonctionnelles dans le segment ccd :

- une région ccd B inhiberait la division de la cellule hôte.
- l'autre région ccd A supprimerait la fonction inhibitrice du gène ccd B.

En cas de diminution du nombre de copies du plasmide, viendrait un moment où la fonction inhibitrice du gène ccd B ne pourrait plus continuer à être supprimée, et la division cellulaire stopperait momentanément.
L'étude de F nous a donc appris que des régions tant cis-actives que trans-actives étaient impliquées dans les mécanismes de partition.

Elle nous a de plus révélé l'existence d'un segment de DNA capable de coupler la réplication du plasmide à la division cellulaire.

Les fonctions par A et par B du plasmide R1 (9,50)

Ce système recourt à un ingénieux mécanisme permettant de stabiliser la transmission du plasmide à la descendance. Ce mécanisme, qui lie le maintien du plasmide à la survie de la bactérie, est une prototype naturel des systèmes qui sont maintenant développés en laboratoire pour stabiliser les plasmides.
Les plasmides R1, à faible nombre de copies, comportent deux loci différents intervenant dans la partition et la stabilité : par A et par B. Chacun de ceux-ci est capable d'augmenter la stabilité de mini plasmides R1, se répliquant chez E. coli, d'environ un facteur 100.
Les mini plasmides R1 portant ces 2 loci sont extrêmement stables avec une fréquence de perte inférieure à 10^{-6} par cellule par génération.

par A : semble être surtout efficient dans l'augmentation de stabilité de plasmides à petit nombre de copies et doit donc être responsable de la distribution précise des molécules de plasmides aux cellules filles lors de la division.

par B : ce locus spécifie un nouveau type de fonction de maintenance du plasmide. Deux gènes, hok (host killing) et sok (suppressor of killing) sont requis pour l'activité stabilisatrice. Le gène "hok" code pour une protéine extrêmement toxique, dont la surexpression cause une mort rapide et un changement dramatique concomitant dans la morphologie de la cellule hôte. L'autre gène "sok" code pour un produit qui contrecarre le gène "hok" tueur. Le modèle proposé pour la stabilisation du plasmide par "par B" implique la mort des cellules qui ont perdu le plasmide porteur de "par B"

durant la division cellulaire précédente.
Ce modèle propose que l'activité du produit "hok" soit induite à cause d'une baisse rapide de la concentration des molécules suppresseurs (produit du gène sok, qui est instable) dans les cellules dépourvues de plasmides seulement, tandis que la synthèse continue de molécules de suppresseur dans les cellules portant toujours un plasmide empêche l'utilisation du produit du gène "hok" dans ces cellules.

Toutes ces observations sur le système de partition, expliquent comment des plasmides à faible nombre de copies peuvent être maintenus de manière stable.

Instabilité des plasmides multicopies

On pense que le plasmide à nombre élevé de copies "col E1" contient une région "par" ce qui expliquerait son maintien très stable (taux de ségrégation inférieur à 10^{-5} par cellule par génération).
Mais le région "par" de col E1 est délétée dans le pBR322 et les plasmides dérivés (pUC,....) qui ségrègent donc au hasard lors de la division cellulaire. Les plasmides à haut nombre de copies, dépourvus de "par", peuvent donc être considérés comme instables en ce sens qu'ils ne sont plus assurés d'être distribués à chacune des cellules filles par un mécanisme actif. Vu leur répartition au hasard, il existe en effet une certaine probabilité qu'une cellule ne reçoive pas de plasmides. Pourtant, nous avons vu que pour les plasmides à nombre de copies dépassant 18, cette probabilité d'obtenir une cellule dépourvue de plasmide devient inférieure à 10^{-5} par cellule par génération. Dès lors et en théorie, l'événement : perte de plasmide, s'il n'est pas impossible, n'en est pas moins très improbable et, au vu de ces chiffres, on est en droit de s'attendre à ce que les plasmides à haut

nombre de copies, dépourvu de "par" se maintiennent de manière totalement stable.

Pourtant la plupart des plasmides multicopies utilisés sont beaucoup plus instables que prévu en ce sens qu'ils sont perdus à une fréquence comprise entre 10^{-2} et 10^{-5} par cellule par génération (en conditions non sélectives). Deux phénomènes permettent d'expliquer cela.

Premièrement, vu que les mesures des nombres de copies des plasmides sont des moyennes pour des population de cellules, on peut imaginer que certains plasmides multicopies instables manifestent une importante variance quant au nombre de copies (mauvais contrôle du nombre de copies). Dès lors un nombre significatif de cellules pourrait avoir un nombre de copies suffisamment bas pour produire des ségrégants.

Deuxièmement, l'instabilité de ces plasmides peut aussi survenir suite à la formation de formes multimères.
Il semble bien que le mécanisme qui contrôle le nombre de copies d'un plasmide assure un nombre fixe d'origines de réplication (ORI) de plasmides par bactérie, c'est à dire compte les origines plutôt que les molécules de plasmides. Les cellules contenant des plasmides multimériques, tout en conservant le même nombre d'origines de réplication de plasmides, comporteront un nombre moindre de molécules de plasmides. Autrement dit, les multimères sont maintenus à un plus petit nombre de copies que les monomères, ce qui entraine une importante instabilité si ces plasmides n'ont pas de fonction "par". Cette hypothèse n'est évidemment plausible que si le système qui contrôle le nombre de copie du plasmide compte les origines plutôt que les molécules de plasmide.

Système de protection contre les formes multimériques

Ces formes multimériques ne sont pas trouvées chez le plasmide "col E1" ce qui est explicable par l'existence d'un système naturel de résolution des multimères.

Ce système repose sur une région de 280 bp du plasmide, appelée "cer", faisant office, quand elle est présente à plus d'une copie par molécule de plasmide (comme c'est le cas dans un multimère), de substrat pour une recombinaison site-spécifique, résultant dans la régénération de monomères de plasmides à partir de multimères. L'enlèvement du "cer" entraînera inversément la multimérisation suivie d'une instabilité accrue (38).

Il est intéressant de remarquer que les réplicons de E. coli à nombre de copies très faible (une par cellule) sont également exposés à des problèmes de ce type. Ainsi, si les copies filles d'un réplicon à copie unitaire se recombinent l'une avec l'autre avant la partition, il en résultera un réplicon dimère qui ne pourra pas être réparti également aux cellules filles à la division cellulaire.
Comme les plasmides à copie unitaire se maintiennent généralement de manière stable dans les cellules au cours de la croissance bactérienne, on est en droit de postuler l'existence de séquences de résolution dans ce type de plasmide.

1.4. Mécanismes intervenant dans l'instabilité structurale

L'instabilité structurale des plasmides peut provenir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions, ou de réarrangements du DNA.
Les mutations ponctuelles ne portent que sur un nucléotide : il peut y avoir substitution d'une base par une autre, délétion c'est-à-dire perte d'une base, addition d'une base supplémentaire. Ces mutations apparaissent spontanément chez tous les organismes comme résultat d'opérations cellulaires normales ou d'interactions avec l'environnement. Le taux auquel elles se produisent est caractéristique de chaque organisme. On considère généralement que chez les bactéries, les mutations spontanées qui inactivent la fonction d'un gène se produisent à un taux de 10^{-6} à 10^{-7} par locus par génération.

Les premières délétions décrites concernaient des plasmides chimériques pouvant se répliquer à la fois dans E. coli et dans B. subtilis. Des délétions spontanées ont depuis lors été observées dans un grand nombre de plasmides, virus et DNA chromosomiques. Un dénominateur commun entre ces délétions est la participation de recombinaisons homologues entre de courtes séquences répétées. Ainsi des plasmides artificiels comprenant de multiples promoteurs en tandem sont particulièrement sujets à la formation de délétions.

Il est intéressant de noter que les recombinaisons entre séquences homologues (séquences répétées) surviennent à une fréquence supérieure à la fréquence d'apparition de mutations spontanées. Ainsi, les recombinaisons survenant entre de courtes séquences homologues répétées se produisent chez E. coli à une fréquence de $\pm 10^{-4}$. Ce qui est bien supérieur à la fréquence de mutation.

L'instabilité structurale est aussi due aux éléments d'insertion ou transposons résidants dans le chromosome hôte ou sur les plasmides. Ces éléments peuvent en effet causer des mutations spontanées par leur insertion, par des délétions adjacentes ou des inversions du DNA.

Ainsi, la transformation de différentes souches d'E. coli avec des plasmides multicopies porteurs de l'opéron tyrosine a donné naissance à des plasmides modifiés avec soit des délétions, soit des insertions. Ces effets étaient dûs à l'insertion d'un élément IS près de la région régulatrice de l'opéron tyrosine. De même la transformation d'E. coli par un plasmide porteur de l'opéron tryptophane a entraîné, de la même manière, l'apparition de plasmides délétés donnant des ségrégants, toujours porteurs du plasmide, mais tryptophane négatifs

Dans ce cas, le plasmide utilisé était porteur du transposon "Tn A". La stabilité du plasmide a alors été testée en l'absence ou en la présence du transposon : les délétions de l'opéron tryptophane ont pu clairement être attribuées

à l'effet du TnA.

Facteurs influençant l'instabilité structurale

Connaissant les divers mécanismes de l'instabilité structurale, on comprend aisément que celle-ci soit fonction de divers facteurs à savoir :

1) la présence éventuelle sur le plasmide de zones sensibles du type :
   - séquences répétées directes ou inversées favorisant les recombinaisons homologues.
   - présence de sites cibles pour transposons.
   - présence de transposon(s).
   - existence de "hot spot". Sont appelés ainsi certains sites qui sont touchés par un nombre de mutations plus grand que celui attendu d'une distribution aléatoire : ils peuvent avoir aisément 10 à 100 fois plus de mutations que ce qui est prédit statistiquement.

2) le type de souche utilisé.
   - Une souche recA$^-$, par exemple, vu son incapacité relative à produire les protéines "recA", indispensables aux recombinaisons homologues, permettra déjà de se prémunir contre ce type de réarrangements.
   - La présence de un ou plusieurs transposons dans le chromosome de la bactérie hôte favorisera les phénomènes de transposition au niveau du plasmide.

Il importe toutefois de relativiser l'instabilité structurale. La fréquence de ce phénomène est très nettement inférieure à celle de l'instabilité ségrégationnelle. Il s'agit donc d'un problème secondaire par rapport au problème de la ségrégation.

1.5. Stratégie visant à stabiliser les plasmides.

Après avoir posé le problème de la stabilité, nous en avons décrit les manifestations, les conséquences. Ensuite nous avons décrit les mécanismes intervenant dans les 2 types d'instabilité. Maintenant nous pouvons décrire les principales stratégies utilisées pour essayer de stabiliser les plasmides avec un succès d'application limité, chaque nouveau transformant posant de nouveaux problèmes spécifiques !

Certaines stratégies visent à essayer d'éliminer purement et simplement toute perte de plasmides lors de la division et cela en optimalisant les mécanismes de réplication-partition. En effet, si on réussit à empêcher l'apparition de révertants, le problème de la moindre compétitivité naturelle des transformants ne se pose plus (toutes les cellules gardant le plasmide).

Pour arriver à cette fin, la plupart des méthodes consistent à ajouter à un plasmide un ou plusieurs segments d'ADN susceptibles de jouer un rôle positif dans le maintien d'un plasmide. Toutes les séquences intervenant dans la régulation de la réplication (et donc dans la détermination du nombre de copies...), dans la partition correcte (par...), dans la résolution des multimères...peuvent être utilisées.

Dans le cas de plasmides dépourvus du système "cer" et sujets à la multimérisation, différents moyens pourront être envisagés. La stabilité sera accrue, par exemple, par l'utilisation d'une souche bactérienne peu recombinogène (ex. : rec F déficiente en recombinaison du plasmide, empêchant donc la multimérisation). Quant au plasmide, il sera possible de lui insérer un système de recombinaison site-spécifique. Ainsi les transposons de la famille Tn3 spécifient un système de recombinaison site-spécifique qui résoudra les multimères de plasmides contenant le site de recombinaison ("res"), quand la résolvase appropriée (codée par un gène du transposon) est présente.

La démarche visant à insérer, dans un plasmide multicopie recombinant, un segment d'ADN porteur de fonctions de partition d'un autre plasmide, peut dans certains cas, se révéler bénéfique :

Exemple : la stabilisation du plasmide pBDE 106 (un dérivant de pBR 322 portant une partie de l'opéron ATP de E. coli). Les essais de stabilisation ont été effectués en insérant :

- par A (du plasmide R1) diminution d'un facteur 10 de la fréquence de perte du plasmide.
- par B (du plasmide R1) diminution d'un facteur 1.000.
- ccd (du plasmide F) diminution d'un facteur 10.
- sop (du plasmide F) diminution d'un facteur 1.000.
- par (du plasmide pSC 101) aucun effet.

Cependant, beaucoup de vecteurs d'expression ne sont guère stabilisés par cette méthode, et en quelques générations la majorité des bactéries n'ont plus de plasmides.

Exemple : des essais effectués sur un plasmide porteur de l'opéron tryptophane se sont révélés infructueux.

- l'addition de "par" (du plasmide pSC 101) augmente certes la stabilité du plasmide, mais les essais préliminaires ont suggéré que ce serait insuffisant pour des fermentations à grandes échelles.
- l'insertion de par A et par B n'entrainera toujours pas une stabilité totale et après 75 générations la majorité des cellules sont dépourvues de plasmides.

Tout ceci montre que cette stratégie est limitée. Dans beaucoup de cas, il se révélera très difficile, voire impossible, d'empêcher l'apparition de ségrégants. Une seule bactérie perdant le plasmide peut donner naissance à tout une population de ségrégants qui, par leur taux de croissance préférentiel vont pouvoir devenir prédominants.

Puisque même l'optimalisation du plasmide (décrite ci-dessus) ne peut empêcher dans certains cas l'apparition de révertants, et comme c'est la multiplication rapide de ceux-ci qui pose problème, il faut essayer d'enrayer leur prolifération. L'idéal est de conférer une propriété au plasmide telle que seuls les transformants seront capables de se diviser et de survivre. Le plasmide devrait donc conférer un avantage sélectif pour la bactérie qui l'héberge, cet avantage devant être supérieur à celui que la bactérie retirerait de la perte de ses plasmides.

Un moyen simple et fort usité pour défavoriser les cellules qui ne comprennent plus le plasmide désiré est d'utiliser un plasmide dans lequel est incorporé un ou plusieurs gènes permettant à la cellule de résister à des antibiotiques. Les cellules sont alors cultivées dans un milieu comprenant des antibiotiques appropriés.
Si la cellule pert le plasmide comprenant le gène cloné, elle perd du même coup sa résistance aux antibiotiques et, suivant l'action de l'antibiotique, meurt ou perd seulement la capacité de se diviser.

Exemple : l'usage d'un bactériostatique du type ampicilline.

L'ampicilline, en tant que bactériostatique, ne tue pas les bactéries dépourvues de plasmides mais les empêche de se diviser.
En présence de cet antibiotique, il va se créer un compartiment d'accumulation des révertants : ce "compartiment", bien que composé de cellules incapables de se diviser, se grossit du flux des révertants qui apparaissent à chaque division. De telle sorte, et par ajoutes successives, ce compartiment peut comprendre plus de bactéries que la population de cellules en croissance.
Des problèmes supplémentaires se poseront aussi avec la possibilité que gardent les révertants qui s'accumulent, de reprendre leurs divisions une fois que la concentration en ampicilline diminue. Dans ce cas, il suffit de quelques générations seulement pour que les révertants deviennent très largement majoritaires.

Exemple : l'usage d'un bactéricide du type tétracycline, streptomycine...

Les bactéricides, en tuant les révertants, évitent une éventuelle reprise des divisions de ceux-ci au cas où la concentration en antibiotique viendrait à baisser. Pourtant comme la mort des bactéries n'entraine pas automatiquement leur lyse, il va se constituer aussi un compartiment constitué des bactéries qui après avoir perdu le plasmide sont tuées par l'antibiotique. Dès lors, bien qu'il ne reste que les bactéries transformées en croissance, le problème de l'élimination de la biomasse de cellules mortes devra être résolu si on ne veut pas que cette biomasse devienne prédominante.

Les antibiotiques, malgré leur efficacité, ne constituent pourtant pas la solution idéale. Ils augmentent en effet très fortement les coûts dès qu'ils doivent être utilisés en fortes quantités (dans un but industriel par exemple). De plus ils entrainent des étapes supplémentaires de purification pour éliminer l'antibiotique du produit que l'on veut récupérer. Tout ceci explique pourquoi les antibiotiques ne peuvent être utilisés qu'à l'échelle des travaux de laboratoire.
D'autres systèmes ont dès lors été mis au point. Une stratégie récente et originale consiste à cloner dans le plasmide un gène responsable d'une voie de biosynthèse essentielle, gène dont la souche a été délétée. Le plasmide étant seul porteur d'une fonction essentielle pour la bactérie, les cellules sans plasmides sont désormais incapables d'assurer cette fonction et mourront. Le plasmide est rendu nécessaire pour la bactérie qui en dépend pour sa croissance et sa survie. Ce processus de sélection, outre son efficacité, présente l'avantage de ne pas alourdir le coût de production (pas d'addition d'une substance couteuse au milieu de culture, par de problème de purification...)

1.6. Que conclure de tout ceci ?

Le problème de l'instabilité reste posé. Nous venons de voir deux stratégies (antibiotique-voie métabolique essentielle) qui permettent la survie exclusive des transformants. Pourtant dans certains cas, ce sera la proportion de révertants (tués) qui s'accroitra. En effet, si le fardeau que constitue le plasmide pour la bactérie est très lourd (du fait de ses caractéristiques propres : nombre de copies...., du gène inséré, des conditions de culture), l'instabilité ségrégationnelle sera très importante et entrainera l'apparition de révertants au cours des divisions des transformants. La population des révertants s'accroitra donc malgré la pression sélective et leur proportion pourra augmenter.

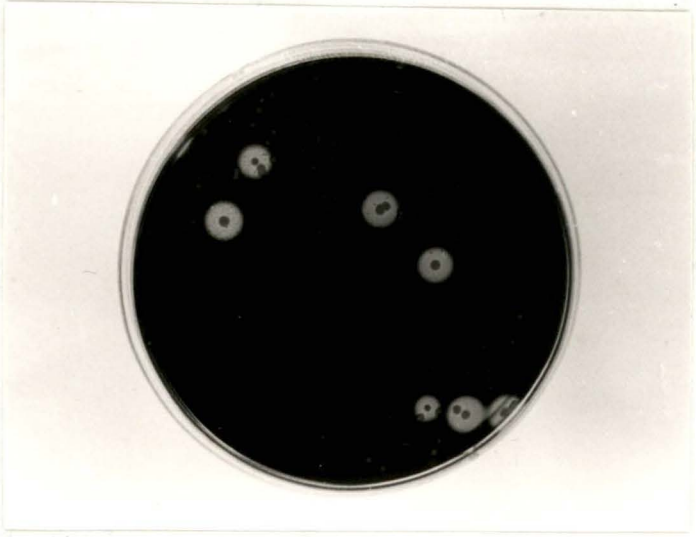
De plus, même dans le cas où les techniques exposées (notamment pour rendre le plasmide indispensable) assurent la maintenance du plasmide dans des bactéries en croissance, la possibilité que le plasmide subisse des réarrangements liés au phénomène d'instabilité structurale, bien que faible, reste à envisager. En effet, la portion du plasmide codant pour une résistance à un antibiotique ou pour une fonction essentielle de la bactérie est certes soumise à une pression sélective (étant indispensable pour la bactérie). Cette portion ne peut donc être modifiée sous peine d'entrainer la mort de la bactérie. Mais le gène cloné dans le plasmide en vue d'être surexprimé n'apporte, lui, aucun avantage à la bactérie et n'est donc pas soumis à une pression sélective. Il pourra dès lors être modifié (inactivé...) et maintenu sous cette nouvelle forme dans la bactérie.

Il n'y a donc aucune solution universelle permettant d'éviter l'instabilité. Chaque cas est différent des autres et on peut s'attendre, après chaque transformation avec un nouveau vecteur d'expression à observer un phénomène

d'instabilité bien spécifique. Il convient dès lors d'étudier les différents facteurs rendant un plasmide instable et désavantageux pour la bactérie.
Une fois ces facteurs connus, il sera alors possible d'agir dessus afin d'"adapter" au mieux le plasmide à la bactérie hôte (diminution de la charge que consitue le plasmide), et d'optimaliser les mécanismes assurant la maintenance du plasmide intact.

1.7. But du travail

Un exemple particulièrement illustratif des problèmes d'instabilité est fournit par les transformants α-amylolytiques d'E. coli qui ont servi de base à ce travail.
Ils portent un plasmide "multicopie" dans lequel est inséré le gène d'α-amylase de Bacillus licheniformis



Légende : Après quelques heures de culture de transformants α-amylolytiques en milieu liquide sans pression sélective, un étalement est réalisé sur milieu solide non sélectif. L'exemen des colonies nous montre que la plupart de celles-ci ne présentent pas le phénotype "α-amylolytique" attendu :(sur milieu solide comprenant de l'amidon, une colonie α-amylolytique apparaît, après coloration de la

boîte à l'iode, entourée d'un halo clair sur fond sombre (mauve). L'iode colore l'amidon en mauve, laissant incolores les régions où l'α-amylase a digéré celui-ci.)
Ces colonies ne produisant pas d'α-amylase sont appelées : révertants phénotypiques.
Elles sont la manifestation du phénomène d'instabilité ségrégationnelle et/ou structurelle. D'autres étalements réalisés après des temps de culture plus longs nous indiquent que la proportion de ces révertants phénotypiques ne cesse d'augmenter (ou, ce qui est équivalent, que la proportion de transformants α-amylolytiques dans la population de bactéries en croissance chute). Il y a donc bien une instabilité marquée de ces transformants.

Notre travail consistera tout d'abord à documenter ce phénomène d'instabilité dans le cas précis de ces transformants α-amylolytiques. Ensuite nous en viendrons à énoncer des hypothèses permettant d'expliquer les causes de ce phénomène. Nous réaliserons ensuite diverses constructions permettant d'éprouver certaines hypothèses et visant à augmenter la stabilité du plasmide.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Souches bactériennes - plasmides

Bactéries :	Génotype
E. coli K12(JM101)	Δlac pro, supE, thi, (r_k^+, m_k^+)/F' traD36, proAB, $lacI^q$, ZΔM15.
E. coli TG1	K12, Δlac pro, supE, thi/F', traD36, proAB, $lacI^q$, ZΔM15.
E. coli NF1	lacZ-amber, Δtrp, str^R, λΔH1, λ CI857, λN^-, (double amber).

Plasmides	propriétés
pUC9	amp^R
pUC18	amp^R
pLK57	amp^R, promoteur pL thermosensible
pα21	amp^R, amy
pα3	amp^R, amy
pα14	amp^R, amy
pα381	amp^R, amy

- La nomenclature utilisée pour désigner les souches est celle de Demerer et col. (1966).
- Il est intéressant de détailler quelques unes des caractéristiques du génotype de JM101, TG1.

  F : le facteur F code pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie (= épisome).

  Δlac pro : le chromosome bactérien est délété au niveau de l'opéron proline.

  proAB : l'épisome F porte l'opéron proline sous sa forme intacte, entraînant le caractère prototrophe pour la synthèse de la proline. Un milieu minimum permet donc la sélection des bactéries qui ont toujours

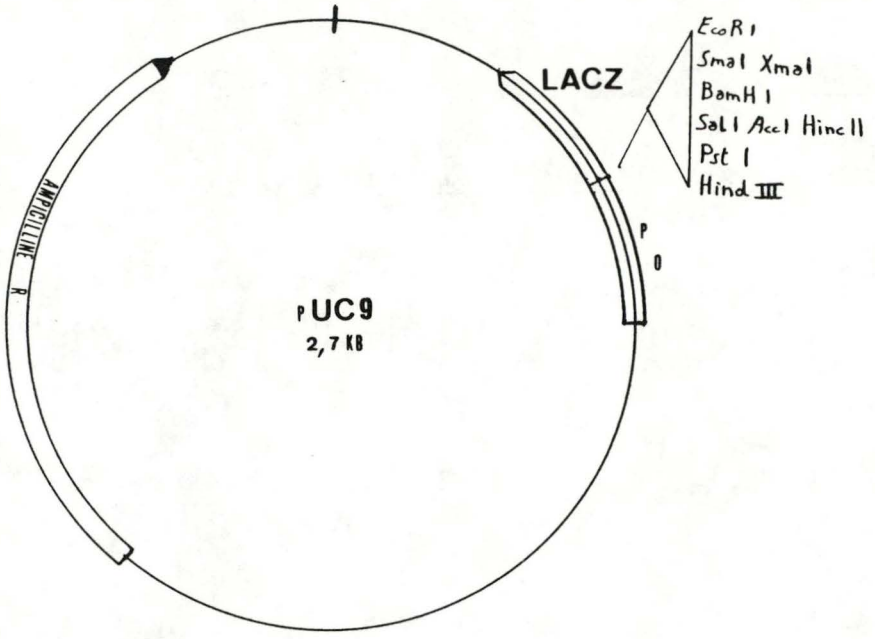


fig.3: structure du plasmide pUC 18.

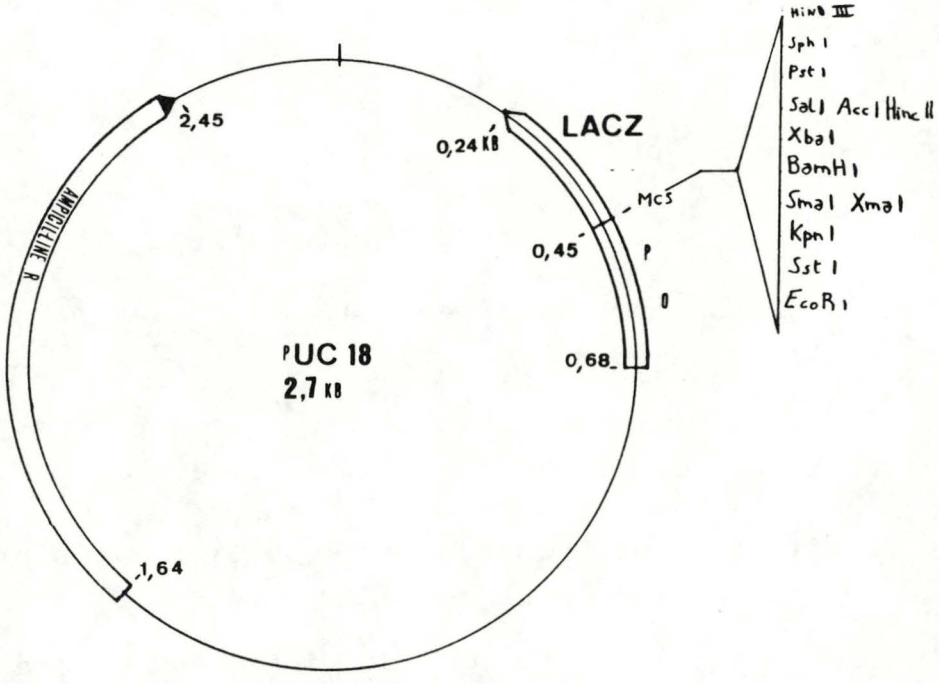


fig.4: stucture du plasmide pUC 9.

le facteur F, elles seules étant prototrophes, donc visibles sur ce milieu.

$\underline{\Delta lacZ}$: la souche comprend également un gène lacZ délété dans la région α de la β-galactosidase.

$\underline{i^q}$: mutation dans le gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose, entraînant sa surproduction (10 x).

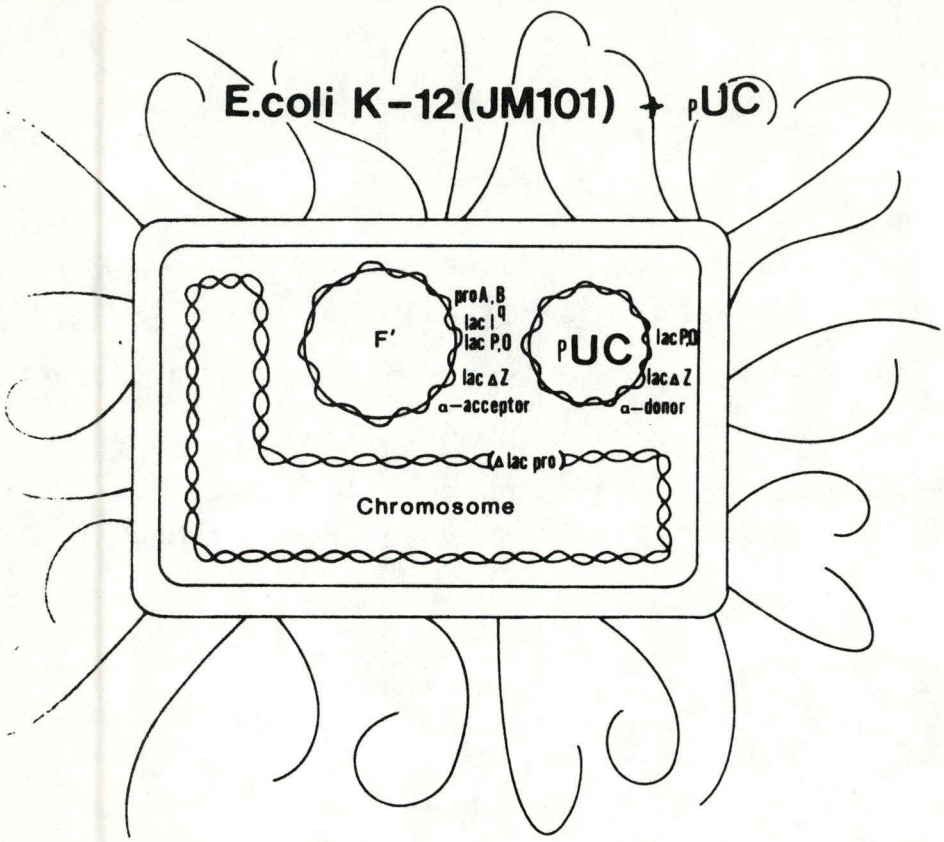


fig. 5 : complémentation du gène lacZ délété de la souche JM101 par le plasmide pUC.

Les plasmides pUC sont dérivés du pBR322. (pUC 9-18, fig.3 et 4) Ils contiennent le gène de résistance à l'ampicilline et une portion de l'opéron lactose. Cette portion comprend le promoteur "lac", l'opérateur, l'extrémité amino terminale de la β-gal (peptide donneur α). Dans la séquence codante pour le peptide donneur α , un nombre variable de sites de coupures uniques pour différents enzymes de restriction ont été introduits, c'est le MCS : "multiple cloning site".

Quand un plasmide pUC est utilisé pour transformer une souche contenant un gène lac Z délété dans la région α de la β-galactosidase, le fragment α inactif produit par le "pUC" peut interagir avec la β-galactosidase inactive produite par la cellule pour produire un octomère qui possède l'activité β-galactosidase. Il est intéressant de noter que la capacité de complémentation du peptide produit par le pUC n'est pas du tout altérée malgré qu'une batterie de sites multiples de clonage ait été insérée dans son gène (fig.5).

La régulation du gène lac Z

La β-galactosidase est codée par un gène, (lac Z), placée à la fois sous un contrôle négatif et sous un contrôle positif.
Le contrôle négatif est dû à une protéine répresseur, normalement produite par le gène lac i, qui a comme fonction de se lier au DNA, en un site opérateur, pour empêcher l'initiation de la transcription (fig. 6).

Dans le cas des transformants, de la souche TG1 ou JM101, portant un plasmide pUC (qui comprend le début de l'opéron lac), la situation est particulière. En effet, chaque bactérie des souches JM101 et TG1 porte quelques copies du facteur F sur lequel se trouve le gène i .
Ce gène code pour le répresseur, qu'il produit, suite à une mutation, en quantité 10 x supérieure à la normale.
Les molécules de répresseurs vont ainsi bloquer les opérateurs "lac" des plasmides de la bactérie. Il est toutefois notoire, que, par suite de la très grande différence entre le nombre de copies de F, (5-10 par bactérie), et celui du pUC,

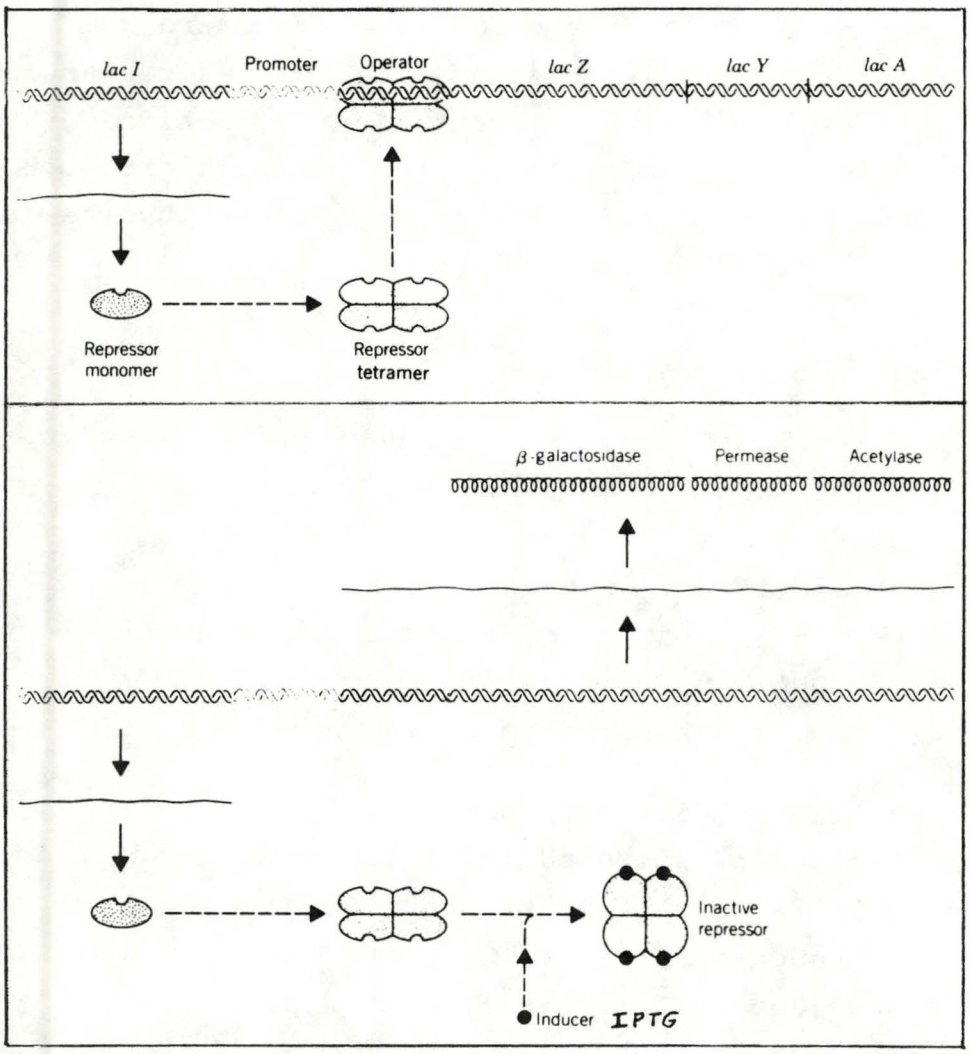


fig.6 : au-dessus : le gène lac i synthétise un répresseur qui, après formation d'un tétramère, se lie à l-opérateur et empêche la transcription des gènes de structure.

en dessous : l'addition d'un inducteur convertit le répresseur en une forme inactive qui ne peut plus se lier à l'opérateur de sorte que la transcription débute au promoteur.

(plusieurs centaines par bactérie), le nombre de molécules de répresseurs produites par le gène i est trop faible que pour réprimer complètement tous les plasmides.
Il s'ensuit qu'un petit nombre d'opérateurs reste libre.

Tout ce mécanisme contrôlé par une molécule inductrice est capable de déréprimer les opérateurs qui étaient bloqués par le répresseur. Nous avons utilisé comme inducteur de l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyrannoside), qui est un indicateur non dégradable.

Il existe, de surcroit, un second mécanisme de contrôle basé sur l'existence d'une protéine de régulation positive : la protéine CRP.
Ce système agit au niveau des opérateurs déréprimés en activant le promoteur qui leur est associé par la fixation juste en amont de celui-ci, du couple CRP-AMPc. La présence ou l'abscence de cette protéine CRP est contrôlée par la quantité de glucose dans le milieu :

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

Sachant cela, en intervenant sur la présence d'inducteur, (variation du nombre d'opérateurs bloqués par le répresseur), et sur la quantité de glucose dans le milieu, (activation possible des promoteurs), moduler l'induction du gène lac Z, et dès lors l'expression de la β-galactosidase.
Notons que pour détecter les bactéries à activité β-galactosidase, nous utiliserons un milieu solide comprenant du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indobyl- β -D-galactopyrannoside, un substrat de l'enzyme donnant un dérivé coloré). Dans ces conditions, les bactéries ayant l'activité β-galactosidase seront bleues, les autres restant blanches.

Exemple de l'induction du gène lac Z d'un transformant pUC 9 non recombinant.

- milieu minimum à 1% glucose + X-gal

  Ce milieu ne comprend pas d'inducteur, et n'entrainera pas, vu sa richesse en glucose, la synthèse de CRP. Dans ces conditions, et bien qu'il y ait un nombre basal d'opérateurs non réprimés, les promoteurs associés à ceux-ci ne seront pas assez forts, (absence du couple CRP-AMPc), que pour entraîner une production de β-galactosidase détectable. Toutes les colonies resteront blanches.

- milieu minimum à 0,2% glucose - milieu LB + X-gal

  L'inducteur n'est toujours pas présent, le nombre d'opérateurs libres est donc le même que dans le cas précédent. Pourtant cette fois-ci, la faible quantité de glucose entraîne la synthèse de CRP, de sorte que la force des promoteurs utilisables augmente d'un facteur 10. Toutes les colonies apparaîtront bleues.

- milieu minimum à 0,2% glucose - milieu LB + X-gal + IPTG

  La présence d'inducteur entraîne une dérépression des opérateurs qui étaient bloqués. La protéine CRP est bien sûr présente (ou 0,2% glucose). L'induction est donc maximale. Toutes les colonies de transformants sont bleues. Bien qu'elles doivent avoir une activité β-galactosidase plus importante que dans le cas précédent, les colonies ne présentent pas une coloration plus marquée.

  Notons que ce dernier type de milieu, s'il contient de l'ampicilline, permettra de sélectionner les transformants porteurs d'un pUC recombinant. En effet, si un fragment de DNA est inséré dans un des sites uniques de clonage du pUC (MCS), la production du peptide α est empêchée et la complémentation α ne se fait pas. Les colonies générées par les bactéries porteuses du plasmide recombinant seront bien sûr résistantes à l'ampicilline, mais resteront blanches sur milieu X gal - IPTG?

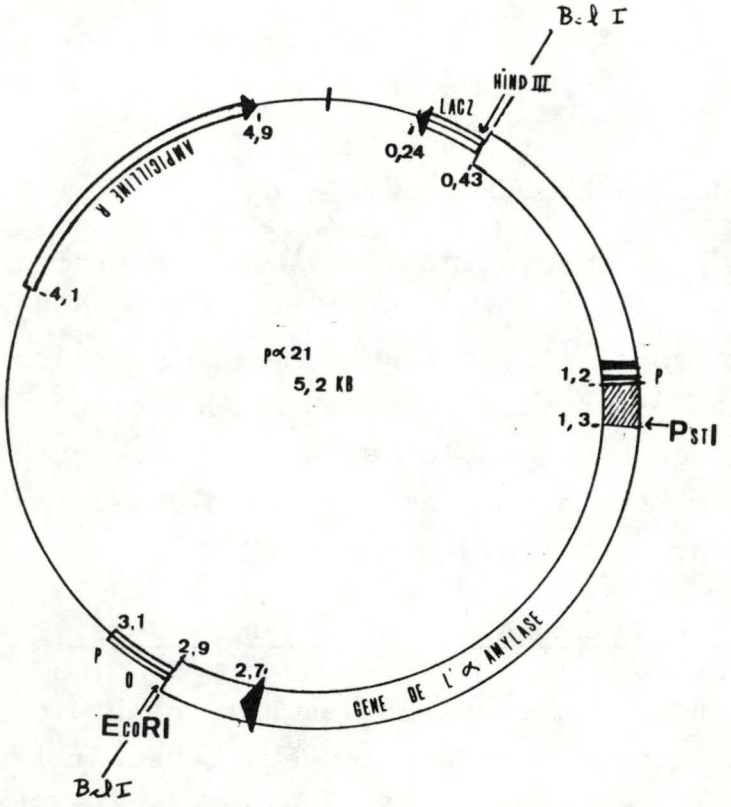


fig.7: structure d'un plasmide pUC 18 recombinant porteur de l'insert de 2,5 kb BclI-BclI comprenant le gène d' amylase.

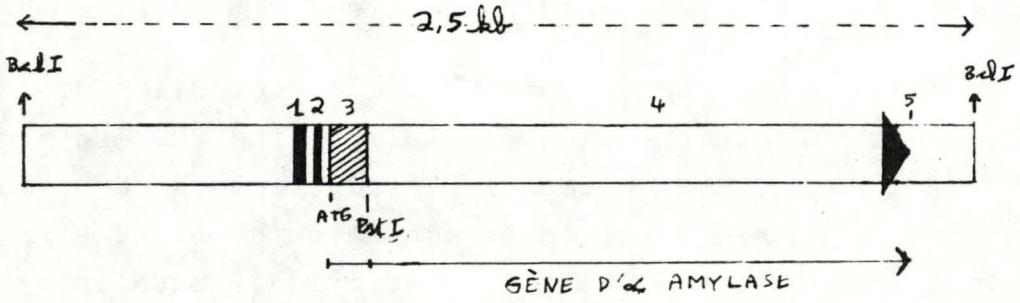


fig.8: détail de l'insert de 2,5 kb.

1 : promoteur du gène d'α-amylase (initiation de la transcription).

2 : séquence d'initiation de la traduction de ce gène.

3 : partie initiale du gène d'α-amylase codant pour le peptide signal de la protéine.

4 : région du gène d'α-amylase codant pour la protéine mature.

5 : codon "TAG" = stop de traduction de ce gène.

Les plasmides p 21 - p 14 - p 381 - p 3 : ce sont tous des plasmides "pUC 18" porteurs du gène d'α-amylase de B. licheniformis. (fig. 7 et 8)

L'histoire de la construction de ces plasmides mérite d'être expliquée vu l'importance de ceux-ci tout au long de ce travail.

- Le clonage du gène de l'α-amylase de Bacillus licheniformis a été réalisé en 1984 à l'université de Dublin. Un morceau de 3,5 kb du DNA chromosomique de B. licheniformis (souche RP01) comprenant le gène de l'α-amylase est inséré dans le vecteur pBD64 (porteur des gènes de résistance au chloremphénicol, à la kanamycine). Ce plasmide recombinant est appelé pRP1 et sert à transformer 2 souches de Bacillus subtilis. L'étape suivante sera la construction de clones d'E. coli porteurs du gène d'α-amylase en question. Outre sa manipulation aisée, la bactérie E. coli permet l'utilisation de plasmides multicopies et sera donc utilisée pour maximaliser l'expression de l'α-amylase. Du plasmide de B. subtilis pRP1 sera enlevé un morceau de 2,5 kb portant le gène entier d'α-amylase. Ce morceau sera inséré dans un plasmide multicopie de E. coli : le pUC 18. Le morceau, qui a été coupé par l'enzyme de restriction BclI, est inséré au site BamHI du pUC 18. Les extrémités générées par Bam et Bcl sont compatibles, mais une fois l'association effectuée, les sites de restriction sont perdus. Le plasmide pUC 18 - α-amylase est ensuite utilisé pour transformer la souche JM 101 de E. coli.
  Les cellules transformées attendues devant être résistantes à l'ampicilline (car pUC 18 comprend le gène de la β-lactamase permettant la résistance à cet antibiotique) et productrices d'α-amylases (après coloration, présence d'un halo clair autour de la colonie).
  Comme attendu, des colonies poussant sur milieu à ampicilline et présentant un halo seront obtenues, bien qu'en très petit nombre (7 colonies).
  Ces 7 colonies constitueront les 7 clones de transformants α-amylolytiques désignés : 3 - 4 - 14 - 18 - 21 - 36 - 38.

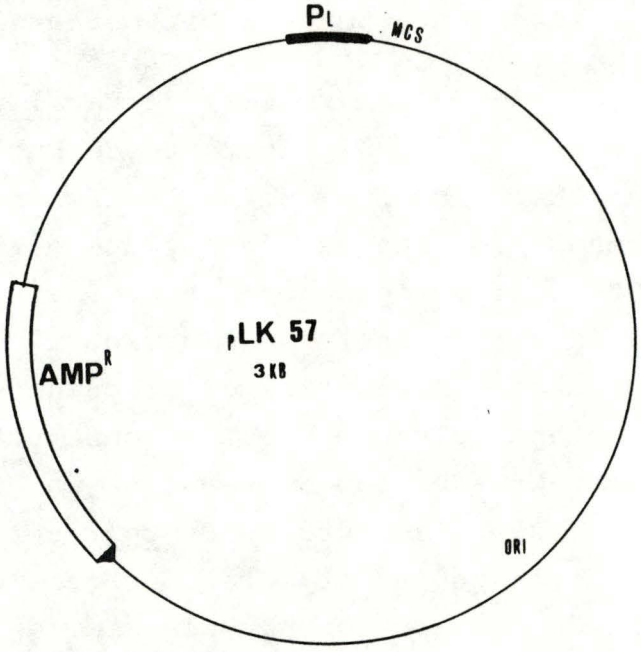


fig.9:structure du plasmide pLK 57.

Le système plasmide pLK57 - souche NF1 (fig. 9)

Le plasmide pLK57 contient le gène de résistance à l'ampicilline , une batterie de sites de clonage et surtout le promoteur fort pL du phage λ .Il a été démontré, dès 1965, que l'initiation de la transcription du promoteur pL du phage λ est réprimée par le produit du gène phagien : CI.
Bien plus, des mutants du gène CI sont maintenant disponibles qui codent pour un répresseur CI thermosensible de sorte que la transcription de pL est réprimée à basse tempétature (CI est actif), et peut être initiée à haute température (CI étant inactivé par la haute température, la répression est donc levée).
Dès lors, il devient possible, par l'utilisation concomitante d'une souche (NF1) de bactéries porteuses du gène CI thermosensible (dans le chromosome), et du plasmide pLK57 de contrôler, par la température, l'activité du promoteur pL du plasmide.
En l'occurence la température permissive est de 28°C (à cette température, le répresseur est actif, pL réprimé), les températures non permissives s'échelonnent elles de 34 à 42°C.
A cette température, la force de pL est telle que le produit du gène qui est sous son contrôle pourra représenter jusqu'à 40% des protéines totales de la cellule, ce qui entraîne la mort de la bactérie (4,34).

Stockage

- les plasmides, en solution dans du tampon TE (cf. p.37), sont stockés à -20°C.
- les souches, les cellules compétentes, les clones (transformants) sont stockés à -80°C dans du milieu de culture liquide (2xTY) à 25% glycérol.

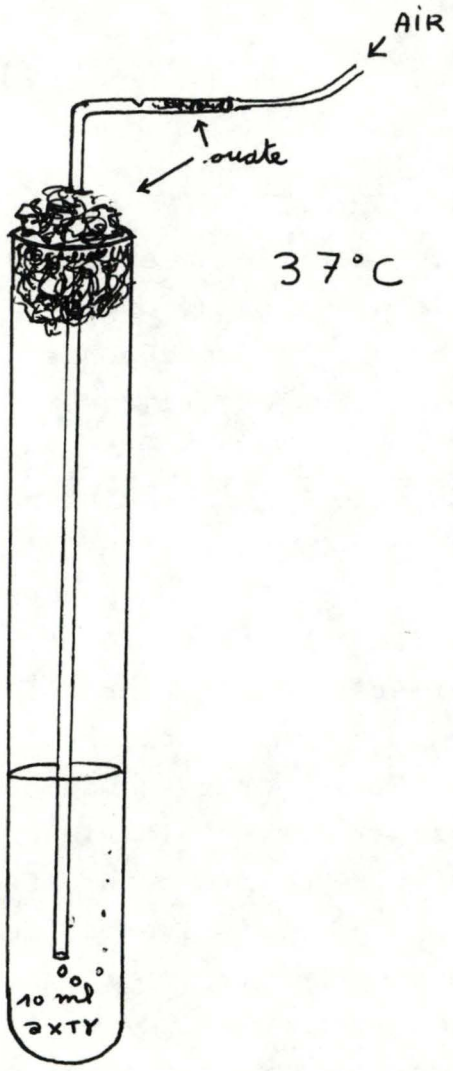


fig.10: schéma d'une culture liquide en barboteur.

2.2. Culture des bactéries et milieux utilisés

Tous les milieux sont stérilisés avant usage (autoclave : 20 minutes à 120°C).

Milieux riches

Classiquement toutes les cultures liquides sont réalisées dans le milieu riche 2xTY de composition : tryptone : 1,6%
yeast extract : 1%
NaCl : 0,5%

(en poids par volume d'eau distillée).

Le plus souvent, les cultures liquides étaient réalisées dans des éprouvettes de 25 ml (comprenant 10 ml de milieu 2xTY) obturées à leur sommet par un bouchon d'ouate et comportant un système d'oxygénation-agitation du milieu.
Le volume réduit de ces cultures et le dispositif d'oxygénation permettait le plus souvent d'obtenir après une nuit, une culture en phase stationnaire. Ces mini-cultures ont été surnommées "barboteurs" (fig. 10).

Dans le cas de culture en milieu solide, le milieu riche utilisé est le LB qui contient :
- tryptone : 1%
- yeast extract : 0,5%
- NaCl : 0;5%
- agar : 2%

(en poids par volume d'eau distillée).
Le milieu est autoclavé, coulé dans des boîtes de pétri, qui, après solidification de celui-ci, sont séchées 45minutes dans une étuve à 65°C.
Elles sont ensuite conservées en chambre froide (+ 5°C).

Milieu minimum

Le milieu minimum ne contient que des sels minéraux et une source de carbone. Il est utilisé comme milieu solide sélectif pour les souches JM101 et TG1.

sels minéraux : $MgSO_4$: 0,012%
$CaCl_2$: 0,00111%
thiamine HCl : 0,033%
Na_2HPO_4 : 6%
KH_2PO_4 : 3%
NH_4Cl : 1%
NaCl : 0,5%

source de carbone : glucose : 0,2% ou glucose 1%

gélifiant : agar : 2%

Si la culture doit se faire en conditions sélectives, l'antibiotique (ampicilline) sera ajouté à une concentration finale de 25µgr.
Il sera ajouté directement à la culture liquide.
Il sera, s'il s'agit de milieu solide, ajouté au milieu autoclavé à la même concentration avant coulage dans les boîtes et quand la température du milieu est retombée en-dessous de 50°C.

Quant à la solution stock d'ampicilline, elle est à 2,5% (poids/volume d'eau distillée). Après préparation, elle sera filtrée (Ø pores : 0,22 µm), aliquotée et conservée à -20°C.

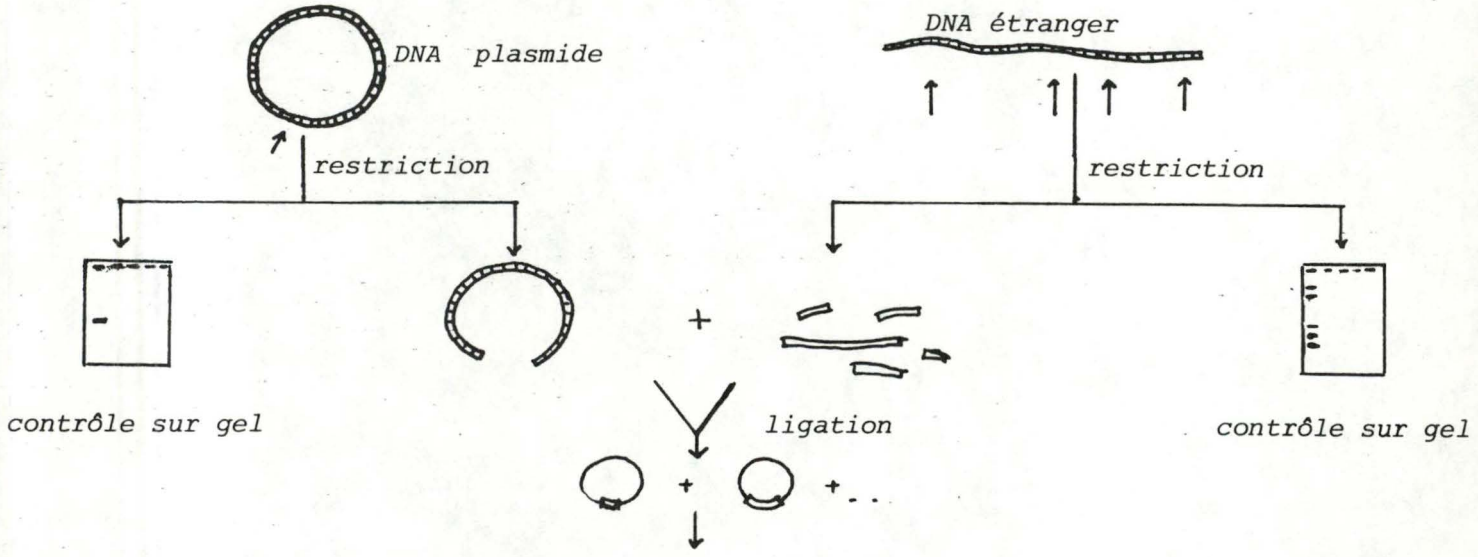
La mise en évidence de bactéries produisant la β-galactosidase sera permise en étalant au rateau à la surface du milieu solidifié d'une boîte de Pétri (avant l'étalement des bactéries)

100 µl d'une solution : 30% en volume d'IPTG (sol. stock 100mM)
30% en volume de X-gal (sol. stock à 2% dans du diméthylformamide)
40% en volume de 2xTY

N.B: Par convention nous utiliserons :
- MGA 1% pour "milieu minimum, 1% en glucose, 50 µgr/ml en ampicilline".
- MGA 0,2% pour "milieu minimum, 0,2% en glucose, 50 µgr/ml en ampicilline".

2.3. Clonage d'un gène dans un plasmide

Protocole



transformation et sélection des bons recombinants

Réactions in vitro

1) Réactions de restriction

- Les enzymes de restrictions (de classe II) clivent le DNA à des sites bien précis et donnent lieu à des fragments déterminés. Les séquences reconnues varient généralement de 4 à 6 bp, et les sites de clivages de quelques 200 enzymes sont maintenant connus.
- La plupart des enzymes ont une séquence de reconnaissance sur le DNA avec un axe de symétrie : la molécule de DNA double brin à cet endroit forme un "palindrome". Il existe deux groupes d'enzymes :
  - le premier comprend les enzymes qui hydrolysent les liens phosphodiesters selon l'axe de symétrie et forment ainsi des fragments à bouts francs ("blunt end").

- le second groupe d'enzymes clive à 2 endroits différents et forme ainsi des projections anti-complémentaires en simple brin ("bouts collants").

Classiquement, la réaction s'effectue dans un volume final de 25 µl.

- DNA à couper : x µl
- tampon de restriction 10 X : 2,5 µl
- enzyme : une unité par µgr de DNA à couper
- H_2O stérile : pour 25 µl

25 µl

L'incubation dure généralement 2 à 3 heures à 37°C.
La réaction est arrêtée en plaçant les tubes à 70°C pour une durée de 10 minutes afin de détruire les enzymes et empêcher la formation d'agrégats qui entraîneraient une mauvaise migration des morceaux coupés sur gel.

Chaque enzyme nécessite l'utilisation d'un tampon de restriction choisi parmi les 3 couramment utilisés :

- tampon low :
  - 0 mM NaCl
  - 10,00 mM Tris 7,5
  - 10,00 mM $MgCl_2$
  - 1,00 mM DTT
- tampon medium :
  - 50,00 mM NaCl
  - 10,00 mM Tris 7,5
  - 10,00 mM $MgCl_2$
  - 1,00 mM DTT
- tampon high :
  - 100,00 mM NaCl
  - 50,00 mM Tris 7,5
  - 10,00 mM $MgCl_2$
  - 1,00 mM DTT

Exception : L'enzyme Sma I nécessite l'emploi d'un tampon particulier :
- 20 mM KCl
- 10 mM Tris 8,0
- 10 mM $MgCl_2$
- 1 mM DTT

2) Visualisation des résultats de la restriction par électrophorèse sur gel d'agarose.

- quand une molécule chargée est placée dans un champ électrique, elle migre vers l'électrode de signe opposé à une vitesse, ou mobilité électrophorétique, fonction du champ électrique et de la charge nette de la molécule. Si un milieu stable non réactif est utilisé pour réduire les courants de convection, la mobilité électrophorétique est inversément proportionnelle au coéfficient de friction de la molécule (qui est une fonction de la taille et forme de la molécule et de la viscosité du milieu). Donc une mixture de différentes molécules peut être résolue électrophorétiquement sur la base de : 1) taille de la molécule
  2) forme de la molécule
  3) charge nette de la molécule.

On sait que la charge des molécules d'ADN augmente proportionnellement à leur taille (chaque nucléotide porte une charge négative au niveau de son groupement phosphate), et d'autre part que la friction augmente avec la taille des fragments d'ADN. L'observation de la migration des fragments d'ADN nous apprend qu'ils migrent à une distance inversément proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.

Dans le cas de plasmides non coupés, la situation est différente. Un plasmide non coupé mis à migrer donnera plusieurs bandes, correspondant aux différentes formes sous lesquelles ce plasmide se présente.

- ccc : covalenthy closed circular : forme superenroulée.
- linear : plasmide linéaire.
- occ : open closed circular : plasmide circulaire avec un brin d'ADN coupé.

Ces trois états du plasmide donnent chacun une bande qui migre à une distance qui lui est propre; les distances de migration étant cette fois-ci fonction de la taille

(la même pour les trois états du plasmide) et surtout de la forme. D'autres bandes apparaitront aussi qui correspondent aux formes multimériques du plasmide.

- En pratique, des gels d'agarose sont utilisés. La solution d'agarose est chauffée jusqu'à ébullition, refroidie à 50°C et coulée sur une plaque à électrophorèse du format souhaité (75 x 105 mm ou 52 x 75 mm) à l'extrémité de laquelle est placé un peigne formant des créneaux dans le gel où l'échantillon sera déposé. Le gel est immergé dans le bac à électrophorèse rempli de tampon TBE. Avant leur injection dans les puits, il est nécessaire d'ajouter aux différents échantillons une solution de bleu de bromophénol-sucrose. Le sucrose joue le rôle d'alourdisseur qui entraînera directement l'échantillon dans le fond du puits,tandis que le colorant (bleu de bromophénol) servira d'indicateur du niveau de migration. La migration s'effectue pendant $\pm$ 2heures à 70-100 V. Une fois la migration terminée, la détection des bandes se fait par coloration du gel 30 minutes ou plus dans une solution de bromure d'éthidium à 1 µgr/ml. La fluorescence du complexe DNA-Bret (intercalé entre les bases) est ensuite stimulée par illumination à la lumière U.V. (254 nm).

Tampon TBE pour électrophorèse : 0,089 M tris borate
0,089 M boric acid
0,002 M EDTA

Solution d'agarose : 0,8% d'agarose en poids par volume de TBE.

Solution d'alourdisseur, colorant 5 X :

0,25% bleu de bromophénol
40% (poids/volume) sucrose dans H_2O.

Estimation de la taille de fragments d'ADN sur gel.

- Il convient de disposer d'un ADN de référence, coupé, dont les morceaux de tailles connues serviront de standard. L'ADN le plus souvent utilisé est celui du phage λ coupé par Hind III et dont les morceaux sont connus:

λ DNA - Hind III : 23.130 (en bp).
9.416
6.557
4.361
2.322
2.027
564
127

- De l'ADN de λ -Hind sera mis à migrer en même temps que les morceaux d'ADN de tailles inconnues, dans un puits laissé libre. Après migration, lors de la visualisation du gel, il est possible de mesurer les distances de migration des différents morceaux de λ de poids moléculaires connus. Disposant dès lors, pour le λ , de couples de valeurs (distance de migration - log P.M.), il suffira de tracer la droite de régression correspondant à ceux-ci et de se servir de cette droite pour déterminer, à partir d'une distance de migration mesurée pour une bande d'ADN inconnue, le log du P.M. qui y correspond, et donc la taille.

3) Récupération d'une bande de gel et élution du DNA

Plutôt que de travailler avec des mixtures de restriction contenant de nombreux fragments de tailles diverses parmi lesquels, un seul nous intéresse, il est possible, après résolution par électrophorèse, de récupérer le fragment d'ADN souhaité.



fig.11:schéma simplifié représentant la première étape de la méthode.

La méthode de Zhu et al, décrite ci-dessous, s'avère simple et rapide.

- le fond d'un eppendorf (1,5 ml) est découpé, percé, un filtre humecté d'eau est déposé à l'intérieur contre la paroi interne (filtre millipore GVWP 04700).
- le tout, enfoncé dans un second eppendorf intact, est prêt à recevoir la bande de gel prélevée au scalpel (fig.11
- une fois la bande placée à l'intérieur
  centrifuger 10 minutes, 12.000 RPM, température ambiante.
  humecter le filtre avec un peu d'H_2O distillée.
  centrifuger 5 minutes.

La matrice du gel reste prisonnière du filtre tandis que le DNA est exprimé sous l'effet de la force centrifuge et est récupéré dans l'eppendorf inférieur.

Ce DNA doit dès lors être précipité.

Pour ce faire :
- additionner 2,5 volumes d'éthanol
- additionner des sels : 1/10 volume de NaAc 3M.
- mélanger et placer à -70°C pendant 45 minutes.
- centrifuger 20 minutes, 12.000 RPM à 4°C pour sédimenter.
- sécher sous vide l'eppendorf pendant 4 minutes.
- resuspendre dans du tampon TE.

Tampon TE : 10 mM tris pH 8
1 mM EDTA

4) Réactions de ligation

La construction de molécules de DNA recombinantes est dépendante de la capacité de lier de manière covalente des extrêmités d'ADN mono ou bicaténaires. Cette réaction est accomplie à la fois "in vivo" et "in vitro" par l'enzyme

"DNA ligase". Celle-ci catalyse la formation d'un lien phosphodiesther entre l'hydroxyle 3' et le phosphate 5' de 2 nucléotides adjacents, rétablissant ainsi la continuité structurale de l'hélice de DNA. Cette enzyme sera donc utilisée pour joindre des fragments d'ADN se terminant par des bouts collants ou par des bouts francs.

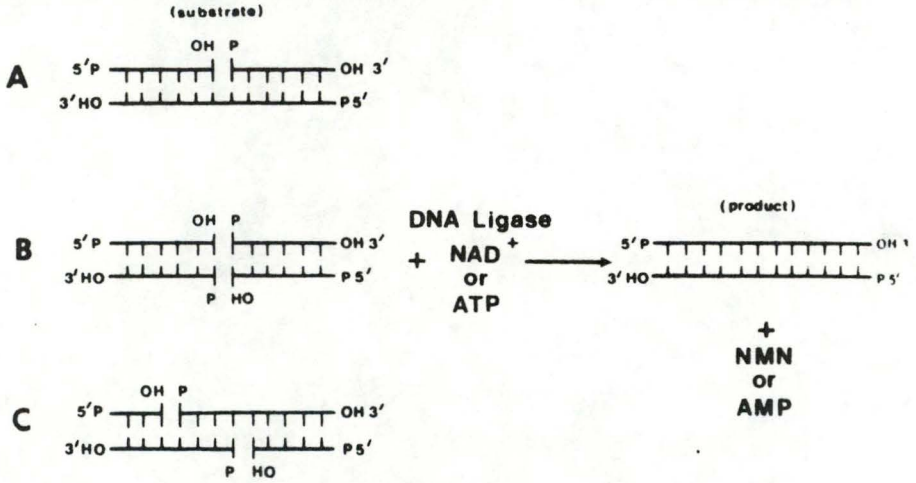


fig.12: action de la DNA ligase sur du DNA (a)ayant 1 brin coupé, (b)coupé à bouts francs, (c)coupé à bouts collants.

La réaction de ligation s'effectue dans un volume final de 25 µl.

- x ngr de DNA étranger x/y = 3
- y ngr de DNA de plasmide linéarisé
- tampon de restriction 10 X : 2,5 µl
- 1 unité de ligase
- H_2O stérile pour 25 µl

25 µl

- <u>dans le cas d'une ligation à bouts collants</u> : le tampon de ligation sera composé de :
  - tris HCl pH 7,4 20 mM
  - $MgCl_2$ 10 mM
  - DTT 10 mM
  - ATP 1 mM

La ligation s'effectuera pendant 10 heures à 14°C.

- dans le cas d'une ligation à bouts francs :

Le tampon de ligation à bouts francs comprend :

- tris HCl pH 7,4 50 mM
- $MgCl_2$ 10 mM
- PEG 8000 5%
- DTT 1 mM
- ATP 1 mM

La ligation s'effectuera pendant 4 heures à température ambiante.

Très souvent cependant, un problème survient du fait que l'ADN étranger a du être coupé avec une enzyme de restriction différente de celle utilisée pour linéariser (couper) le plasmide. Les bouts collants ainsi obtenus sont donc le plus souvent incompatibles. La seule solution consiste alors à faire du "filling", c'est-à-dire du "remplissage" des brins monocaténaires collants par les nucléotides complémentaires, et cela au niveau des deux types d'extrêmités incompatibles. Cela débouche sur la création de bouts francs, "collables" par une ligase. La réaction de "filling" est rendue possible par l'utilisation du fragment Kleenow (ou grand fragment) de la polymérase I (E. coli).
Ce peptide porte l'activité 5'-3' polymérase et l'activité 3'-5' exonucléase de la polymérase I.

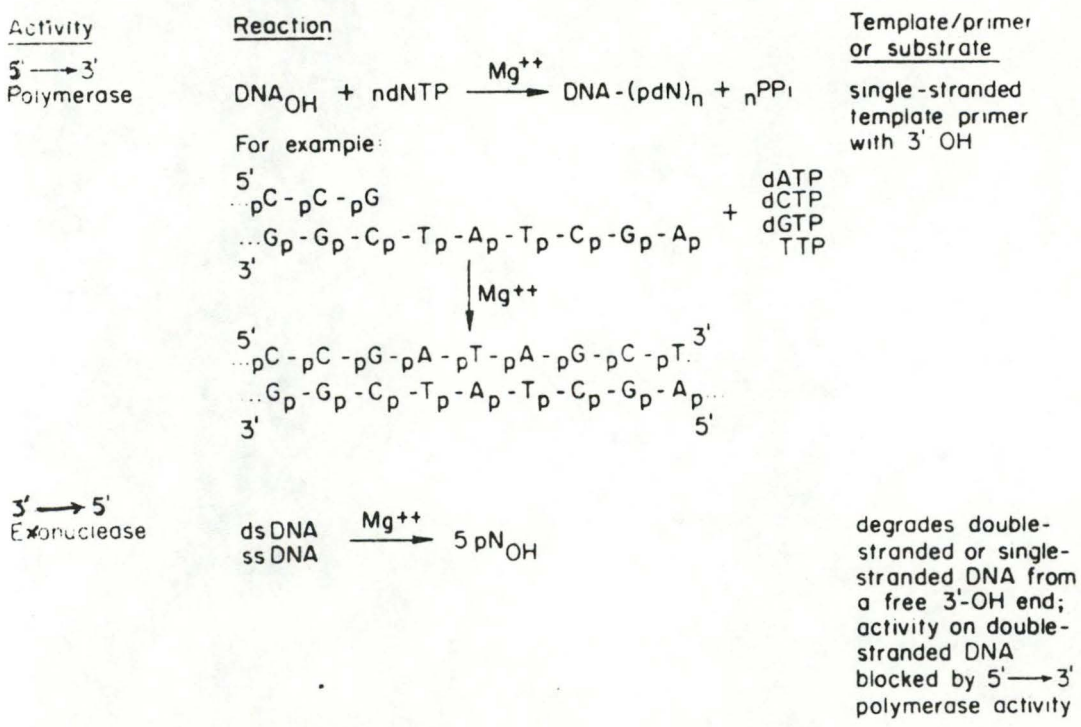
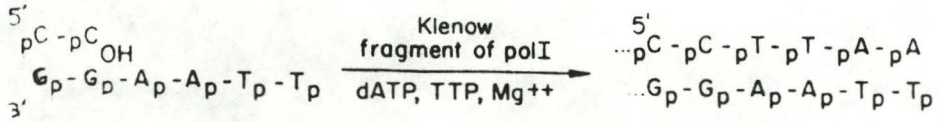


fig.13: activité du fragment Kleenow de la polymerase I.

Vu l'activité 5' - 3' polymérase, seul le remplissage d'extrémité 5' créé par digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction est rendu possible.



5) Réaction de filling

La réaction de filling s'effectue dans un volume de 25 µl.

- x ngr de DNA à "filler".
- mélange des 4 nucléotides (dATP, TTP, CTP, GTP), chacun à la concentration de 2 mM.
- tampon de filling 10 X : 2,5 µl.
- 2 unités de Kleenow polymérase.
- H_2O stérile pour 25 µl.

---

25 µl

Incuber 15 à 30 minutes à 22°C.
Chauffer 10 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme.

Le tampon de filling est constitué de :

- tris HCl pH 7,2 0,05 M
- $MgSO_4$ 0,01M
- DTT 0,1 mM
- BSA 50 µgr/ml

6) Transformation

C'est l'étape permettant l'introduction des molécules de DNA dans des microorganismes de laboratoire, ici : E. coli. Pour qu'une bactérie soit capable d'accepter de l'ADN étranger, il faut qu'elle soit dans un état appelé "compétence".

Cet état peut être artificiellement induit en exposant les cellules à du chlorure de calcium avant l'addition de DNA. Le procédé originellement reporté par Mandel et Higo inclut l'exposition des bactéries en croissance à une solution hypotonique de $CaCl_2$ à 0°C entraînant le gonflement des bactéries (formation de sphéroplastes). Le DNA ajouté à cette mixture de cellules compétentes forme un complexe résistant à la DNAse, complexe de phosphate (du DNA)-calcium qui adhère à la surface de la cellule. Ce complexe peut rentrer dans la cellule lors d'un bref choc thermique à 42°C. Après quelques heures de croissance dans un milieu riche pour permettre aux sphéroplastes de reprendre une apparence normale et aux gènes transformés d'être exprimés, les transformants peuvent être isolés par culture sur boîte de milieu sélectif.

En pratique

Préparation de cellules compétentes

- La culture de la souche choisie sur milieu minimum solide à 37°C permet de sélectionner les bactéries qui ont bien le facteur F (étape requise seulement pour les souches JM101 ou tg1).
- Une colonie de bactéries poussant sur milieu minimum sert à ensemencer un barboteur contenant 10 ml de 2xTY = préculture pendant $\pm$ 3 heures à 37°C jusqu'à obtenir une DO = 1,5 à 2.
- Les 10 ml du barboteur sont alors mis dans un erlen contenant 400 ml de 2xTY.
- Sous agitation violente (200 rpm), la croissance se poursuit alors à 37°C pendant $\pm$ 1 heure jusqu'à l'obtention d'une DO de $\pm$ 0,3.
- Lorsque la DO est de 0,3, la culture est stoppée dans la glace pendant 10 minutes.

- La suspension de cellules est divisée en 4 flacons de 100 ml.

2 x
- centrifugation : 5 minutes à 5.000 RPM à 4°C.
- surnageant jeté
- resuspension dans un demi volume de $CaCl_2$ 50 mM.

- 20 minutes dans la glace.

- centrifugation : 5 minutes à 5.000 RPM à 4°C.
- surnageant jeté.
- resuspension dans un dixième de volume (10 ml ici) de $CaCl_2$ 50 mM - glycérol 15%.
- aliquottage dans des eppendorfs et stockage à - 70°C.

Transformation proprement dite

- 200 µl d'un aliquot de cellules compétentes
  1 à 10 ngr de DNA étranger
  Incuber pendant 45 minutes dans la glace
  Incuber pendant 2 minutes à 42°C (choc thermique)
- addition d'1 ml de 2xTY : incuber pendant 1 heure à 37°C.
- étalement sur milieu sélectif solide.

7) Extraction rapide de plasmides d'E. coli

La description ci-dessous concerne une méthode rapide appelée "miniprep". Cette méthode se base sur une précipitation sélective, en présence de chlorure de lithium, des protéines, du RNA de haut poids moléculaire et du DNA chromosomique (le plasmide restant dans le surnageant).
La miniprep est suivie d'une extraction au phénol visant à éliminer la majorité des protéines contaminantes.
Les plasmides ainsi obtenus peuvent dès lors être utilisés pour d'autres transformations ou pour être restreints, visualisés sur gel...

Miniprep

- Un barboteur contenant 10 ml de 2xTY et de l'ampicilline à une concentration de 50 µgr/ml d'antibiotique est ensemencé avec une colonie de transformants.
- L'incubation se déroule toute la nuit, ce qui est généralement suffisant pour obtenir une culture d'aspect bien trouble. L'incubation se fait à 37°C.
- Prélever 1 ou 2 ml de la culture et centrifuger 5 minutes à 12.000 RPM à la température ambiante pour obtenir un culot de bactéries (centrifugeuse à eppendorf).
- Décanter.
- Resuspendre dans 200 µl de TELT (tampon de lyse et de précipitation).
- Resuspendre totalement au Vortex.
- Ajouter le lysosyme : 20 µl d'une solution à 10 mgr/ml
  soit 200 µgr.
- Bien resuspendre le lysosyme au Vortex.
- Placer une minute dans un bain à 100°C.
- Laisser 5 minutes à 0°C.
- Centrifuger 15 minutes à 12.000 RPM :-le culot sera constitué de DNA chromosomique, de protéines, de gros RNA.
  -le surnageant sera constitué lui des plasmides + RNA de petite taille.

  Le surnageant est récupéré.
- Ajouter 2 volume d'éthanol au surnageant, mélanger et laisser à -70°C pendant 2 heures pour précipiter les acides nucléiques.
- Centrifuger 15 minutes à 12.000 RPM à 4°C pour sédimenter tout ce qui est précipitable.
- Jeter le surnageant (éthanol...).

- Sécher sous vide pendant 4 minutes.
- Resuspendre le culot dans du TE.

Tampon TELT : 50 mM tris pH 8
62,5 mM EDTA
0,4% triton X100
2,5 M chlorure de lithium

8) Extraction au phénol-chloroforme

L'enlèvement des protéines, étape clé dans la purification d'acides nucléiques, peut également être menée à bien par une extraction de la solution d'acides nucléiques avec du phénol et du chloroforme.
Cette technique permet, de surcroit, d'inactiver l'enzyme utilisée dans une étape d'une expérience de clonage, avant de passer à l'étape suivante.
Si ce traitement n'est pas suffisant, l'utilisation de protéinase K sera envisagée.

En pratique

1ère extraction :

- mélanger la solution de DNA (généralement portée à un volume de ± 75 µl dans du TE) avec un volume égal de la solution phénol-chloroforme.
- agiter au Vortex jusqu'à l'obtention d'une émultion.
- centrifuger 4 minutes à 12.000 RPM dans une centrifugeuse à eppendorf pour séparer la phase organique de la phase aqueuse,
- transférer la phase supérieure (aqueuse) dans un eppendorf stérile (2ème eppendorf).

Réextraction de la phase organique et de l'interface pour avoir une meilleure récupération.

- rajouter un même volume de TE à la phase organique (présente dans le 1er eppendorf).
- agiter au Vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- centrifuger 4 minutes à 12.000 RPM dans une centrifugeuse à eppendorf pour séparer la phase organique de la phase aqueuse.
- transférer la phase supérieure (2ème phase aqueuse) dans l'eppendorf où se trouve déjà la 1ère phase aqueuse.

2ème extraction

- ajouter dans le 2ème eppendorf un volume de phénol égal à celui des 2 phases aqueuses récupérées.
- agiter au Vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- centrifuger 4 minutes à 12.000 RPM dans une centrifugeuse à eppendorf pour séparer la phase organique de la phase aqueuse.
- récupérer la phase supérieure (éviter de prélever le liquide au niveau de l'interface, car c'est là que se trouvent les protéines).

Extraction du phénol - chloroforme avec de l'éther saturé en eau bidistillée stérile.

L'éther est utilisé pour enlever les traces de phénol-chloroforme des solutions de DNA.

- ajouter à la solution de DNA (la phase aqueuse récupérée en dernier lieu), un triple volume d'éther.
- agiter au Vortex pendant 20 secondes.
- centrifuger pendant 1 minute pour séparer les 2 phases.
- enlever la phase supérieure : éther, la jeter.

Effectuer toutes ces opérations quatre fois.

Récupération des acides nucléiques par précipitation à l'éthanol.

- ajouter 1/10 du volume de sodium acétate 3M pH 5,2
  2,5 volume d'éthanol.
- mélanger et laisser à -70°C pendant 2 heures.
- centrifuger 15 minutes à 4°C à 12.000 RPM.
- jeter le surnageant.
- sécher sous vide pendant 4 minutes.
- resuspendre le culot dans du TE.

La solution phénol-chloroforme contient :
- 50 ml phénol
- 2 ml alcool isoamylique
- 0,05 gr hydroxyproline
- 50 ml chloroforme
- 100 ml TE 1x

202 ml total

9) Protéinase K

- solution stock 10 x à 0,5% en poids /volume H_2O distillée

  Cette solution est incubée 30 minutes à 37°C, cette étape de prédigestion permettant une élimination de toutes les protéines contaminantes qui se trouveraient avec l'enzyme.

- utilisation : solution de DNA + un dixième en volume de protéinase K (= concentration finale 0,05% ou 500 µgr/ml), incuber à 37°C pendant 30 à 60 minutes.

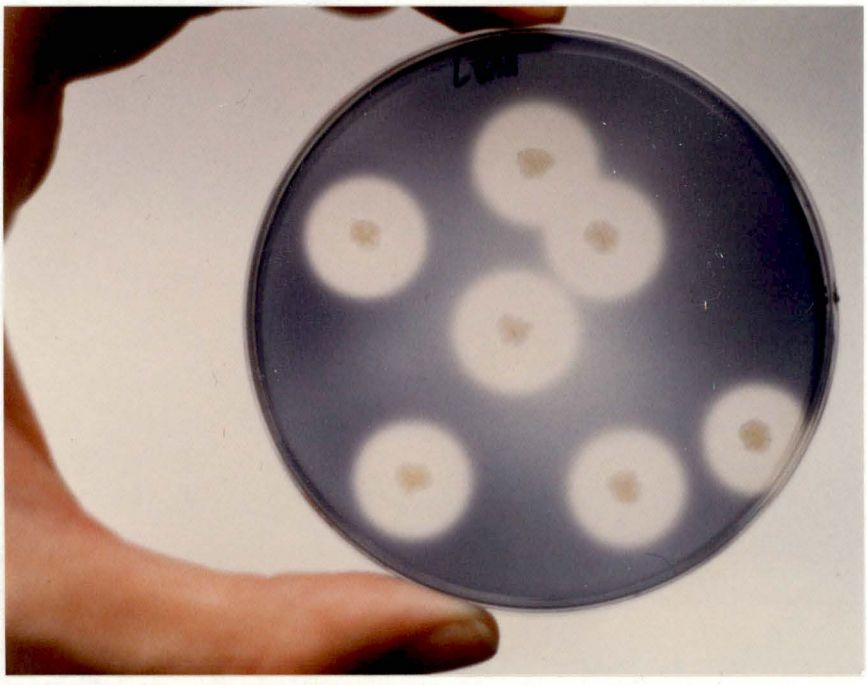


fig.14: boîte de milieu contenant de l'amidon colorée aux vapeurs d'iode.Les colonies bactériennes produisent de l'amylase sont entourées d'une zone de décoloration blanche. L'amidon intact est coloré en bleu.

2.4. Détection sur boîte de la sécrétion d' α-amylase par des colonies bactériennes.

Il faut utiliser des boîtes contenant un milieu de culture additionné d'amidon. On préparera donc une solution stock d'amidon à 2% (en poids/volume d'eau distillée). Celle-ci sera ajoutée à raison de 10% (en volume/volume de milieu) au milieu autoclavé.
Après mélange, ce milieu à l'amidon sera coulé en boîte de Pétri. Celles-ci pourront être alors utilisées pour détecter les colonies α-amylolytiques.

Après croissance des bactéries ensemencées sur le milieu "amidonné", la détection des colonies produisant de l' α-amylase se fera par simple exposition de la boîte à des vapeurs d'I_2 qui colorent momentanément l'amidon en bleu. Les colonies entourées d'un halo décoloré sont celles qui produisent de l' α-amylase et qui sont donc capables d'entraîner la digestion de l'amidon dans leur voisinage.

Cette méthode présente pourtant quelques désavantages à savoir :
- caractére éphémère de la coloration (quelques minutes).
- nocivité de l'I_2 pour les colonies bactériennes si trop longue exposition aux vapeurs d'I_2.

Il est dès lors intéressant de présenter une méthode permettant la mise en évidence de l' α-amylase sur boîte contenant de l'amidon sans l'utilisation d'I_2. Nous avons mis au point empiriquement une méthode qui repose simplement sur les conditions d'addition de la solution d'amidon au milieu autoclavé. Il existe en fait 2 possibilités :

1) si la solution stock d'amidon est conservée à température ambiante (aspect transparent), l'addition d'amidon se fera juste au moment où le milieu sort de l'autoclave, c'est-à-dire quand sa température est encore très élevée.

2) Si par contre, la solution stock d'amidon a été conservée au frigo (aspect blanc laiteux), elle sera ajoutée au milieu autoclavé un fois que sa température sera redescendue en-dessous de 65°C.

Si l'une de ces 2 méthodes est suivie pour préparer le milieu à l'amidon, après croissance des bactéries sur boîtes de ce milieu, les colonies produisant de l' α-amylase seront détectées à l'oeil nu, un halo translucide bien visible les entourant, contrastant avec l'aspect plus trouble du milieu.
Cette méthode ne nécessite donc aucun colorant, additif, aucune exposition aux vapeurs toxiques de l'I_2.
Elle sera utilisée couramment dans le travail qui va suivre.

2.5. La formation de sphéroplastes par un choc osmotique et la libération d'enzymes périplasmiques d'E. coli.

Neu et Heppel (1965) décrivent cette méthode de libération d'enzymes périplasmiques par un choc osmotique. Cette méthode se réalise sans destruction de la cellule.

Procédé

- une culture d'E. coli est arrêtée en phase exponentielle ou stationnaire en la plaçant dans un bain de glace.
- les cellules sont centrifugées 10 minutes à 6.000 RPM, lavées 3 fois avec du tris HCl 0,01 M pH 8.
- choc osmotique :
  - 1 gr de cellules est resuspendu dans 80 ml de 25% sucrose, 0,05 M tris HCl pH 8 à 24°C.
  - la suspension est traitée à l'EDTA, à une concentration finale de 0,001 M et agitée pendant 10 minutes à 24°C (les cellules rétrécissent mais les enzymes périplasmiques ne sont pas encore expulsées).
  - le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 10.000 RPM à 0°C.

- le surnageant est retiré et le culot est mélangé rapidement à 80 ml d'H_2O froide.
  Ceci provoque une augmentation de la taille des cellules et l'"enzyme" est chassée dans le milieu externe à travers la paroi cellulaire.
- la suspension est agitée dans un bain de glace pendant 10 minutes. L'expulsion de l'"enzyme" est presque totale après 5 minutes d'action à l'eau froide.
- les sphéroplastes sont centrifugés et le surnageant est retiré.

Si l'enzyme étudiée est localisée dans le périplasme de la cellule, elle est libérée par cette méthode. Si par contre elle se situe dans le cytoplasme, les sphéroplastes doivent subir une lyse complète avant de libérer les enzymes.

2.6. Lyse complète des sphéroplastes et libération des enzymes cytoplasmiques

Les sphéroplastes sont resuspendus dans un volume de 5 ml et lysés par sonication.

2.7. Dosage de l'activité enzymatique par le test du DNS

La méthode exposée ci-dessous a été décrite par Fisher et Stein.
Les amylases clivent l'amylose en sucres réducteurs : les oligosaccharides. Les sucres réducteurs sont détectés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm grâce à la coloration du DNS (dinitro salicy-lic acid reagent).
L'activité de l'enzyme sera donc estimée en dosant le produit de la réaction sur l'amylose.

Solution d'amylose

- 1 gr d'amylose est mis dans 7 ml de diméthylsulfoside (D.M.S.O.
- la suspension est bien agitée et chauffée au bain marie (100°C) en agitant pendant 30 minutes.
- quand la solution est refroidie, elle est ajustée à 10 ml avec du D.M.S.O.

Solution DNS

- 1 gr de DNS dans 16 ml de 10% sodium hydroxyde et 30 gr de sels de Rochelle (potassium sodium tartrate tétrahydrate) dans 50 ml d'eau stérile; les suspensions se dissolvent en chauffant la solution à 100°C. La solution est allongée à 100 ml avec de l'eau stérile.

Protocole

Le tube "contrôle" contient 400 µl de tris HCl 10 mM pH 7,5 (en double)
Le tube "substrat" contient 200 µl d'amylose 1%.
et 200 µl de tris HCl 10mM pH 7,5.
Le tube "enzyme" contient 200 µl d'extrait enzymatique
et 200 µl de tris HCl 10 mM pH 7,5.
Le tube "réaction" contient 200 µl d'extrait enzymatique
et 200 µl d'amylose 1%.

Ces tubes sont préparés dans la glace. La réaction est déclenchée lorsque les tubes sont déposés dans un bain d'eau à 50°C, pendant 10 minutes. Pour arrêter cette réaction, les tubes sont placés dans la glace et 400 µl de solution DNS sont ajoutés. Le DNS est un colorant spécifique des sucres réducteurs. La coloration s'effectue pendant 5 minutes à 100°C, les tubes sont ensuite replacés dans la glace et la densité de coloration est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm.

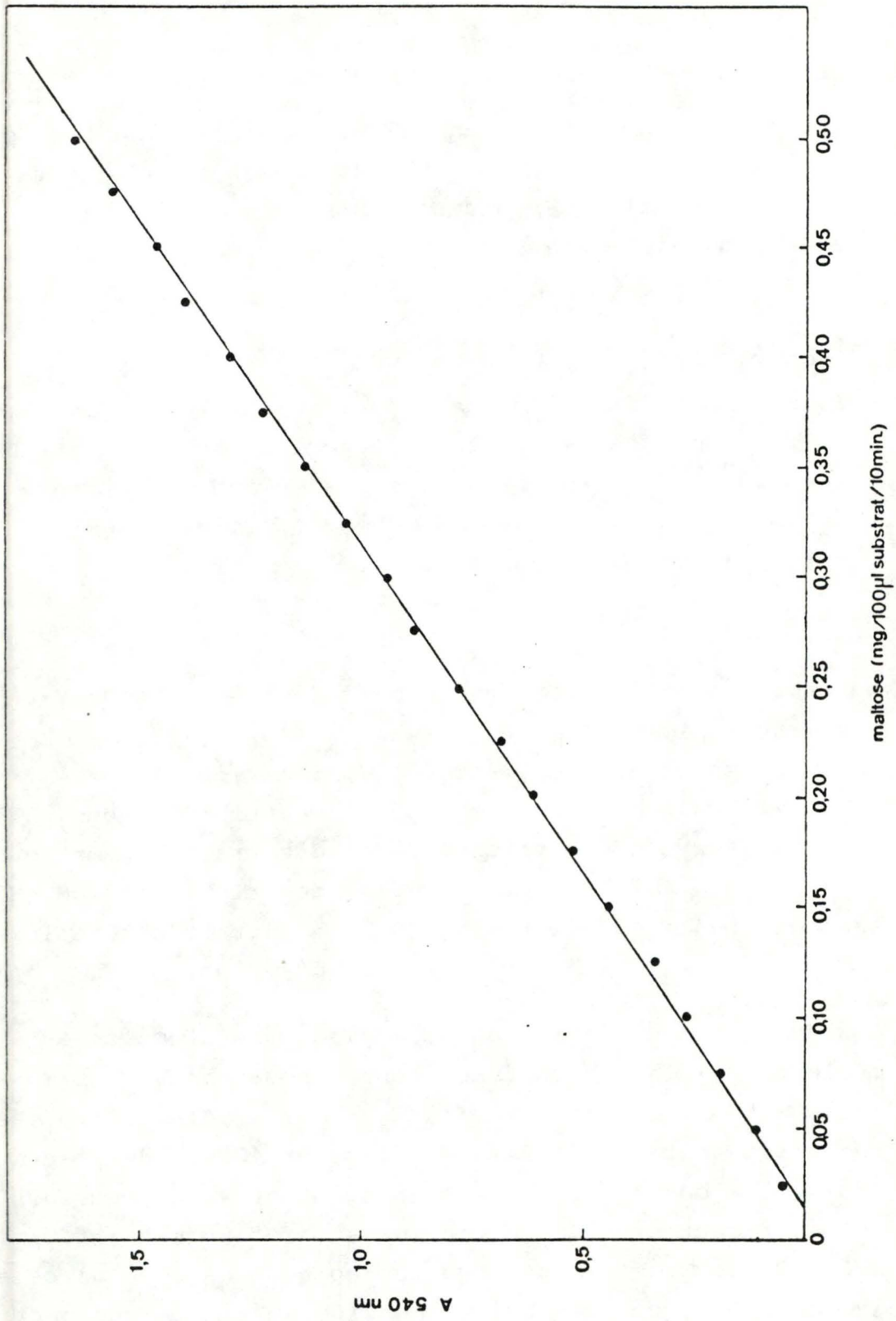


fig.15: droite d'étalonnage pour les mesures d'activité amylase. Les valeurs mesurées en unités d'absorbance à 540nm peuvent être converties en mg maltose / 100µl / 10 min.

- La mise à zéro de l'appareil se fait sur les 2 tubes contrôles ayant subi le même traitement que tous les autres mais ne comprenant que du tris 10 mM pH 7,5.
- Comme les sucres réducteurs présents dans le mélange réagissent à la coloration au DNS, il est nécessaire de mesurer la quantité de sucres réducteurs contaminant l'extrait enzymatique mesuré. Cette valeur sera soustraite de la valeur réelle.
- Dans la même optique, l'absorbance du substrat "amylose" sera mesurée une fois pour toute et systématiquement déduite des absorbances mesurées.
- D'après la droite d'étalonnage (fig.15), la valeur mesurée en unités d'absorbance à 540 nm peut être convertie en mg maltose/100 µl/10 minutes ou en U/ml/minute. Une unité enzymatique (U) est définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1 mg de sucres réducteurs (avec maltose comme référence) par minute et ceci pour un temps de stimulation ou une concentration en enzyme où la réaction reste linéaire.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Etude de l'instabilité des transformants α-amylolytiques

3.1. Instabilité sur milieu solide

Une colonie bactérienne est issue de la multiplication "in situ" d'une bactérie déposée à cet endroit (on estime à $\pm 10^6$, le nombre de bactéries contenues dans une colonie de 3 mm de diamètre, ce qui représente 20 générations). Une colonie entourée d'un halo doit dès lors provenir de la multiplication d'une bactérie initiale hébergeant le plasmide porteur du gène d' α-amylase. Durant la multiplication de cette bactérie, l'instabilité se manifestera par l'apparition de révertants. Le protocole décrit ci-dessous permettra la quantification de la proportion de révertants dans la colonie et ainsi une estimation de l'instabilité.

Protocole

Le clone 14 (soit la souche JM 101 hébergeant le plasmide p 14) a été soumise au protocole suivant :

Une colonie entourée d'un halo (α-amylolytique) est resuspendue dans un ml de milieu LB. Des dilutions sont alors effectuées de façon à pouvoir étaler une quantité n'excédant pas 1.000 bactéries sur milieu LBA, et sur milieu LBAA.

N.B. LBA désigne le milieu LB additionné d'amidon (0,2%).
LBAA désigne le milieu LB additionné d'amidon et contenant de l'ampicilline (50 µgr/ml).

Principe de ce protocole

- Un étalement est réalisé sur boîtes non sélectives. Sur ce milieu, toutes les bactéries, qu'elles aient gardé ou non un plasmide intact vont se développer en colonies. La proportion de ces colonies qui présentent un halo pourra nous donner une estimation du pourcentage de transformants α-amylolytiques dans la colonie.

- Un étalement du même nombre de bactéries est réalisé sur boîte sélective. Sur ces boîtes, seuls les transformants seront capables de former des colonies. Dès lors en rapportant le nombre de colonies (transformants) compté sur boîte sélective, au nombre de colonies (transformants + révertants) d'une boîte non sélective, on connaîtra le pourcentage de bactéries ayant perdu le plasmide au cours de la formation de la colonie (instabilité ségrégationnelle). De plus, ce type de milieu permet de distinguer parmi les transformants, ceux qui sont à la fois α-amylolytiques et résistants à l'ampicilline, de ceux qui auraient subi une inactivation de leur gène d' α-amylase tout en conservant la résistance à l'antibiotique (instabilité structurale) : les colonies du premier type manifesteront un halo, pas les secondes.

Résultats

Cette expérience a été répétée de nombreuses fois.

- En moyenne, nous avons dénombré cent fois moins de colonies sur le milieu sélectif (LBAA) ce qui signifie que 1% seulement des bactéries qui composent la colonie α-amylolytique de départ (poussant sur LBAA) ont conservé leur plasmide. Autrement dit, une bactérie portant le plasmide, mise en culture sur un milieu solide sélectif, donne naissance à une population de bactéries qui, au stade de la colonie comprend 99% de révertants.

- Toutes les colonies poussant sur LBAA, présentent un halo, c'est-à-dire sont α-amylolytiques. Il n'y a donc pas d'instabilité structurale détectable.
  Il est par ailleurs surprenant de constater qu'une colonie, malgré la faible proportion (1%) de transformants α-amylolytiques qu'elle comporte, présente un halo. Ce phénomène est révélateur de la très forte intensité de la production d'α-amylase chez les transformants amy^+, intensité expliquée par l'existence d'un promoteur fort dirigeant l'expression du gène.

- Sur milieu non sélectif (LBA), 1% des colonies sont entourées d'un halo. Les halos présentés par ces colonies sont cependant bien plus petits que ceux présentés par les colonies poussant sur LBAA. Cette observation s'expliquerait par le fait, qu'une bactérie portant le plasmide donnerait naissance, sur milieu LBA non sélectif, à une colonie comprenant une fraction de transformants α-amylolytiques à ce point faible que le halo serait réduit, voire dans certains cas, quasiment indétectable.

Commentaires

a) croissance sur milieu sélectif (LBAA)

On aurait pu penser qu'une bactérie contenant le plasmide recombinant, mise sur milieu sélectif, donnerait naissance à une colonie constituée en majorité de transformants, les bactéries curées étant incapables de se diviser. En réalité l'instabilité ségrégationnelle est telle qu'il est illusoire, sur milieu solide d'espérer que l'antibiotique puisse stabiliser les transformants α-amylolytiques. L'antibiotique limitera le problème sans pouvoir le résoudre. En effet, l'ampicilline empêchera bien les révertants de se diviser, mais n'empêchera pas leur apparition. Il va se former ainsi un compartiment d'accumulation des révertants ségrégationnels, alimenté par un flux intense de bactéries curées à chaque génération.

En présence d'antibiotique, l'augmentation de la population des révertants trouve son origine dans l'importance de l'instabilité ségrégationnelle plutôt que dans la division des révertants. Ceci n'exclut pourtant pas qu'une reprise des divisions des révertants puisse se produire en fin de culture suite à la baisse de la concentration en antibiotique. Ce phénomène de diminution de la concentration de l'antibiotique au cours de la culture n'est pas du tout hypothétique. Ainsi, il est notoire qu'une population mixte de bactéries, les unes sensibles, les autres résistantes à l'ampicilline, étalée sur milieu sélectif donne 2 types de colonies : de grandes colonies, issues de bactéries résistantes, elles-mêmes entourées de très petites colonies appelées colonies "satellites". Ces petites colonies sont issues de bactéries sensibles à l'ampicilline, mais ont pu néanmoins se développer en périphérie des colonies résistantes en profitant de la destruction de l'ampicilline dans cette région, par la β-lactamase que celles-ci produisent.

b) Croissance sur milieu non sélectif (LBA)

Comme dans le cas précédent, l'instabilité ségrégationnelle va entraîner l'apparition de révertants. Mais en plus ici, vu l'absence de pression sélective, les révertants pourront se diviser. Suite à ces 2 phénomènes, l'augmentation du nombre des révertants doit être très rapide (plus rapide en tout cas qu'en milieu sélectif) de sorte que la proportion de transformants α-amylolytiques dans la colonie finale sera très faible, déterminant par la même un halo de taille très réduite.

Conclusion

La croissance des transformants en milieu solide s'accompagne d'une importante instabilité ségrégationnelle. Il en résulte qu'une bactérie portant le plasmide donnera obligatoirement naissance, sur milieu solide, à une population bactérienne

(colonie) composée essentiellement de bactéries dépourvues de plasmides. En l'absence de pression sélective ce phénomène sera amplifié par la capacité qu'auront les révertants de se diviser. En présence d'antibiotique par contre, l'augmentation du nombre de révertants sera due à la seule instabilité ségrégationnelle, du moins initialement car en fin de culture, vu la dégradation progressive de l'ampicilline par les transformants, les révertants pourront reprendre leurs divisions.

3.2. Instabilité en milieu liquide

Protocole

Nous avons tout d'abord défini une procédure expérimentale permettant de tester la stabilité des transformants en milieu liquide.
Un inoculum de bactéries sert à ensemencer un barboteur contenant 10 ml de 2XTY (milieu riche). Après démarrage de la culture (37°C et oxygénation), on effectuera, à des intervalles de temps réguliers, des mesures de la densité optique de la culture et on procédera à des étalements sur boîtes de Pétri de fractions aliquotes diluées de la culture. La dilution est fonction de la densité optique, et est calculée en vue d'étaler un nombre voulu de bactéries sur le milieu solide en utilisant le facteur de conversion : nombre de cellules par ml = densité optique à 550 nm x $1{,}6.10^{8}$. Ce nombre est fixé de telle manière que les bactéries se développeront en colonies isolées qui pourront être comptées. Dès lors et en ensemençant à chaque intervalle de temps, sur milieu sélectif et non sélectif contenant de l'amidon, il sera possible de suivre l'apparition de révertants sous l'effet de l'instabilité ségrégationnelle.
En effet la comparaison du nombre de colonies apparaissant sur les 2 types de boîte nous donnera le pourcentage de bactéries ayant perdu le plasmide au cours de la culture, résultat de l'instabilité ségrégationnelle.

3.2.1. Stabilité du plasmide non recombinant (pUC 18)

Avant de commencer des expériences visant à décrire l'instabilité des transformants α-amylolytiques, c'est-à-dire l'instabilité due à un plasmide pUC 18 porteur d'un insert de 2,5 kb dans lequel se trouve un gène d' α-amylase, il est indispensable de s'assurer que le plasmide pUC 18 seul est stable.
Pour réaliser ce contrôle, nous avons transformé la souche TG1 d'E. coli avec le plasmide pUC 18 original dépourvu d'insert. Les transformants ont été sélectionnés sur boîtes sélectives où ils donnent des colonies bleues en présence de Xgal-IPTG (la résistance à l'antibiotique et la production de β-galactosidase sont bien les 2 marqueurs du pUC 18). Les bactéries transformées ont alors été testées quant à leur stabilité tant sur milieu solide qu' en milieu liquide.
En milieu solide, tant sélectif que non sélectif, une colonie se développant au départ d'un transformant contient 100% de transformants. La stabilité est totale.

En milieu liquide, nous avons ensemencé un barboteur avec une colonie de transformants. La culture a été suivie sur un total de 50 heures, et, durant cette période, aucune instabilité n'a été détectée : la proportion de transformants qui était au départ de 100% reste à cette valeur tout au long de la culture.
Et cela sans pression sélective !

Conclusion

Le pUC 18 seul, bien que constituant inévitablement un fardeau métabolique pour la bactérie qui l'héberge (nécessité d'être répliqué, expression des gènes du plasmide, nombre de copies élevé...), et malgré qu'il soit dépourvu de mécanismes de partition est maintenu en cours de culture bactérienne de manière totalement stable.

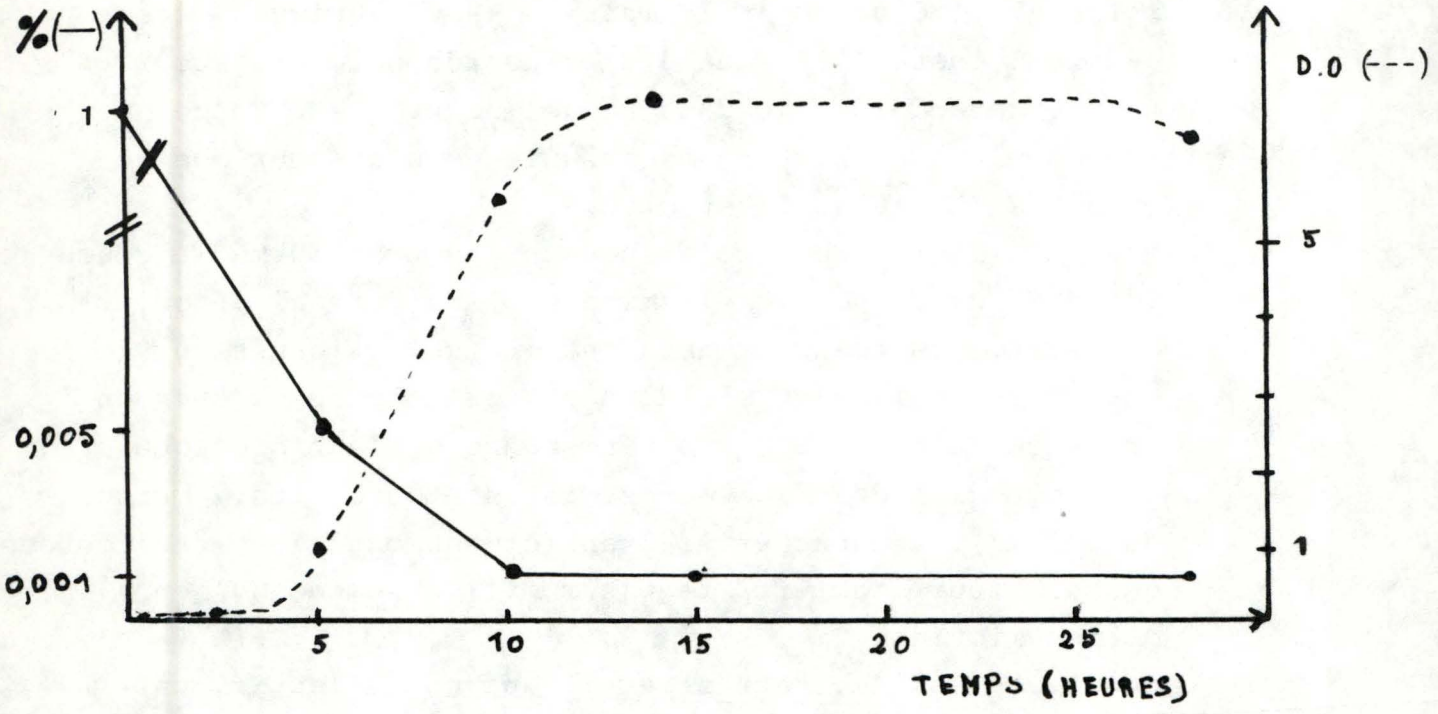


fig.16: culture liquide sans pression sélective de transformants α-amylolytiques (clone 14).

-------: représente la D.O

_____: représente le % de transformants amylolytiques.

Et cela même en l'absence de pression sélective.
Ceci est à mettre sur le compte du nombre élevé de copies du pUC, qui entraîne, lors de la répartition aléatoire des plasmides pUC survenant à la division cellulaire, une probabilité très faible d'obtenir une cellule fille qui en soit dépourvu.

3.2.2. Description de l'instabilité (ségrégationnelle) en milieu non-sélectif liquide.

Protocole

Une colonie ampicilline^{R} amylase^{+} obtenue sur boîte sélective à partir du clone 14 a été utilisée pour ensemencer un milieu liquide (barboteur).
Un test de stabilité a alors été réalisé conformément au protocole expérimental décrit précédemment.

N.B. : Nous utiliserons le symbolisme "amy^{+}" pour représenter le caractére α-amylolytique, et "amp^{R}" pour représenter le caractère de résistance à l'ampicilline.

Evolution de la proportion de transformants (fig.16)

En début de culture cette proportion est de 1%. Cela n'a rien d'étonnant vu que l'ensemencement a été réalisé à partir d'une colonie amy^{+} issue d'un milieu solide sélectif et ne contenant donc elle-même qu'1% de bactéries α-amylolytiques (cfr. p 53,54).
Ensuite la proportion de transformants va diminuer pour se stabiliser après 10 heures de culture à une très faible valeur qui restera constante jusqu'à la fin de l'expérience.

Commentaires

L'augmentation rapide pendant les premières heures de la proportion de révertants peut résulter de deux phénomènes : l'apparition de révertants suite à l'instabilité ségrégationnelle et la croissance des révertants.

Les révertants ont sans doute un taux de croissance plus rapide que les transformants, et de plus, au départ, les 99% de la population bactérienne servant à l'ensemencement sont déjà constitués de bactéries dépourvues de plasmide. A lui seul, le phénomène de croissance des révertants peut donc expliquer l'augmentation rapide de la proportion des révertants observée au début de la culture. Ceci n'exclut cependant pas un rôle joué par l'instabilité ségrégationnelle, mais l'expérience réalisée ici sans pression sélective ne nous permet pas de dissocier, dans l'augmentation de la proportion de révertants, la part dûe à l'un et à l'autre des deux phénomènes.
La stabilisation de la proportion des transformants qui survient après 10 heures coïncide avec l'entrée en phase stationnaire. Cette observation s'explique aisément.
En effet l'augmentation de la proportion de révertants est liée à la croissance bactérienne. A la croissance des révertants d'une part, (qui ont un taux de croissance supérieur à celui des transformants), et à la croissance des transformants d'autre part, dans le cas où celle-ci entraîne l'apparition de révertants suite à l'instabilité ségrégationnelle.

Conclusion

En culture liquide, sans pression sélective, la proportion des transformants diminue très rapidement. Pour essayer de remédier à ce problème et afin d'étudier l'importance de l'instabilité ségrégationnelle, nous allons maintenant exercer une pression sélective en ajoutant de l'ampicilline au milieu.

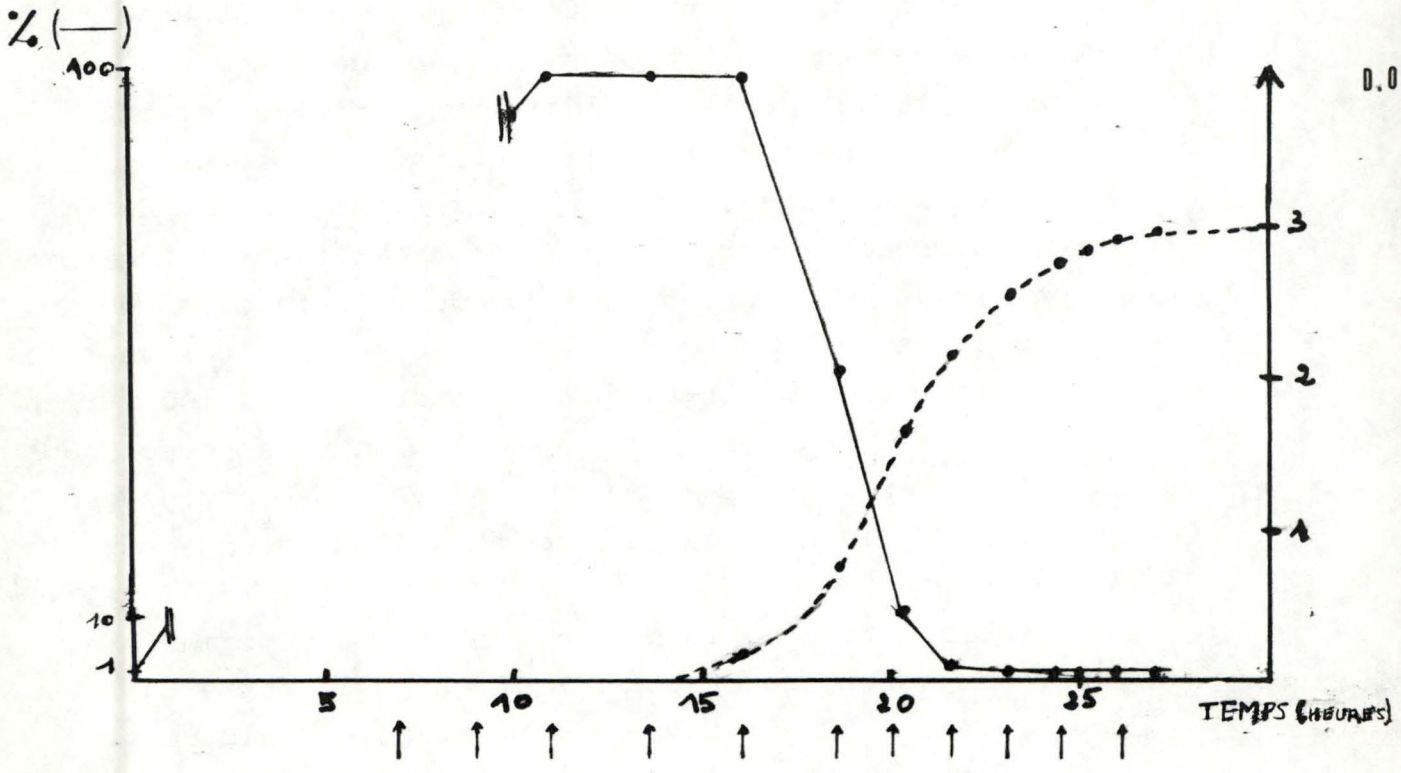


fig.17: culture liquide avec pression sélective continue.

-------: représente la D.O

_____: représente le % de transformants amylolytiques.

chaque symbole "↑" représente une addition de 500 µgr d'ampicilline / ml de culture à un moment déterminé.

3.2.3. Description de l'instabilité ségrégationnelle en milieu liquide sélectif.

Ampicilline ajoutée régulièrement au cours de la culture.

Nous avons réalisé des cultures liquides de transformants α-amylolytiques en conditions sélectives.
En additionnant de l'ampicilline non seulement au début, mais aussi en cours de culture à des intervalles de temps réguliers, nous avons bloqué la croissance des révertants tout au long de la culture, et ramené ainsi la cause de l'augmentation des révertants, en principe, à la seule instabilité ségrégationnelle (apparition de révertants au cours des divisions des transformants). Les résultats, présentés à la fig. 17 , ont été confirmés par 3 répétitions de cette expérience.

Evolution de la D.O.

La courbe de croissance obtenue a un profil fortement décalé dans le temps par rapport aux cultures précédentes se déroulant sans pression sélective. Ce retard doit être dû à la présence de l'ampicilline, qui réduit le nombre de bactéries pouvant participer à la croissance.
L'ampicilline ne semble pas modifier le taux de génération des bactéries, car le profil de la courbe de croissance semble identique, qu'il y ait ou non de l'antibiotique dans le milieu.
Il semble, d'autre part, que l'ampicilline ait un effet direct sur la durée de la phase de latence. En effet, si on refait cette expérience, en additionnant des quantités d'antibiotique plus importantes, on observe que le délai entre le début de la culture et l'apparition d'une D.O. mesurable, augmente. Nous n'avons cependant pas d'explication satisfaisante pour ce phénomène.

Evolution de la proportion de transformants

Les résultats permettent de distinguer 2 phases.

- La première concerne le début de la culture depuis l'ensemencement jusqu'à une D.O. de $\pm$ 0,1. Durant cette période, la proportion de transformants passe de 1%, (valeur attendue vu que l'ensemencement est réalisé à partir d'une colonie amp^R amy^+ provenant d'un milieu solide sélectif), à une valeur proche de 100%. Cette augmentation ne peut s'expliquer que si les transformants sont capables pendant cette première phase de se diviser en conservant le plasmide au cours des différentes générations (c'est-à-dire instabilité ségrégationnelle très faible ou nulle).

- La seconde phase est caractérisée par une augmentation rapide de la D.O. allant de pair, cette fois-ci, avec une chute rapide de la proportion de transformants. Vu que nous avons assuré, par l'addition régulière d'ampicilline une pression sélective constante, l'augmentation du nombre de révertants ne peut pas provenir d'une reprise de leurs divisions, et doit donc résulter d'un phénomène d'instabilité ségrégationnelle accompagnant, dans cette 2ème phase, la croissance des transformants. Pourtant la chute de la proportion des transformants est trop rapide que pour s'expliquer par le seul processus d'apparition - accumulation de révertants lié à l'instabilité ségrégationnelle. En effet, en 7 heures de culture, (de la 16ème à la 23ème heures), le pourcentage de transformants diminue d'un facteur 100 (100% à 1%). Or, si seule l'instabilité ségrégationnelle intervenait dans cette diminution, et en prenant le cas extrême où chaque transformant donnerait, à chaque génération, une cellule fille sur 2 dépourvue de plasmide, 100 générations seraient nécessaires pour arriver à ce résultat (soit plus de 30 heures de culture). De plus, si on compare la vitesse

à laquelle la proportion de transformants diminue à la vitesse d'augmentation de la D.O., on doit conclure que le nombre de transformants a diminué. Pour expliquer toutes ces observations, il devient nécessaire d'invoquer l'intervention d'un phénomène de lyse des transformants. Cette lyse ne s'accompagnerait pas d'une chute de D.O., car les révertants n'y seraient pas soumis et continueraient donc à s'accumuler.
Bien qu'il soit difficile d'établir un lien entre la production d' α-amylase et la lyse observée, nous pouvons toutefois citer l'observation faisant état d'un effet de l'α-amylase, qui potentialiserait la lyse des lactobacilles par le lysosyme (30).

La diminution rapide de la proportion des transformants résulterait donc, de la disparition "physique" d'une partie des transformants (lyse), associée à une apparition de révertants à chaque génération par suite de l'instabilité ségrégationnelle, (révertants qui s'accumuleraient en un compartiment des révertants devenant rapidement prédominant).

Conclusion

Tous ces résultats nous montrent aussi que l'instabilité ségrégationnelle, et bien sûr le phénomène de lyse concomittant, associés à la croissance des transformants ne sont pas des phénomènes constants. De très faibles au début, ils prennent dans un second temps, des proportions très importantes (proportion de transformants chute d'environ 100% à 1%). Les causes de cette instabilité globale, (ségrégationnelle et "lytique"), et de son déclenchement à un moment précis de la croissance des transformants seront développées plus loin. Signalons pour l'instant que le phénomène d'instabilité est généralement lié à l'importance de la "charge métabolique" que constitue le plasmide pour la bactérie.

Le déclenchement de l'instabilité à un moment particulier de la croissance indiquerait alors que cette charge métabolique est relative suivant le stade de la courbe de croissance considéré. Dans l'expérience décrite, la charge due au plasmide se manifesterait plus particulièrement à partir de la D.O. de 0,1 entraînant ainsi, à ce moment, l'apparition d'une instabilité marquée.

D'un point de vue plus appliqué, ces résultats nous montrent clairement que le maintien d'une pression sélective constante n'empêche pas la prédominance des révertants en fin de culture. Bien sûr, l'antibiotique empêchera la prolifération des révertants, mais il n'empêchera absolument pas l'instabilité ségrégationnelle, deuxième source d'augmentation de la proportion de révertants, de se manifester et un phénomène de lyse des transformants de se produire. Les révertants vont donc s'accumuler, bien sûr moins vite qu'en l'absence d'antibiotique, formant un compartiment des révertants qui deviendra, en fin de compte, prédominant.

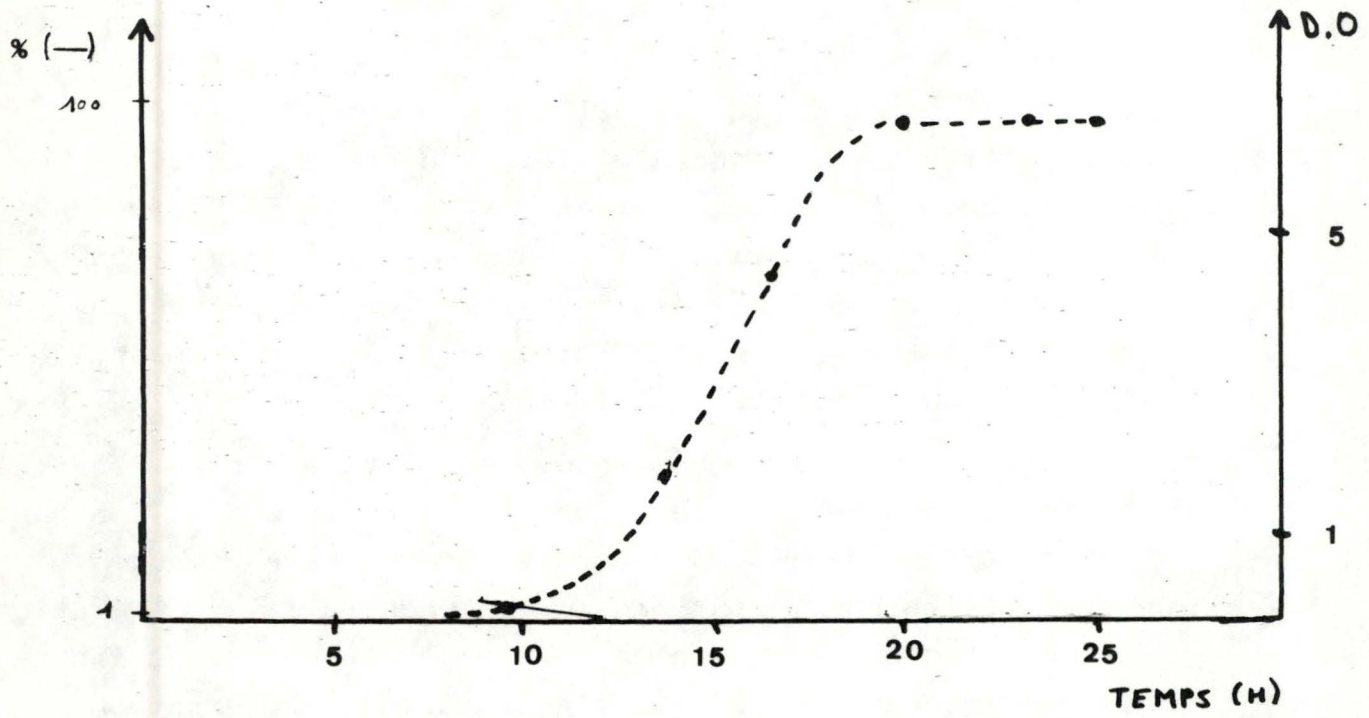


fig.18: culture liquide avec 5 µgr / ml d'ampicilline ajoutés en début de culture.
-------: représente la D.O
_____: représente le % de transformants amylolytiques.

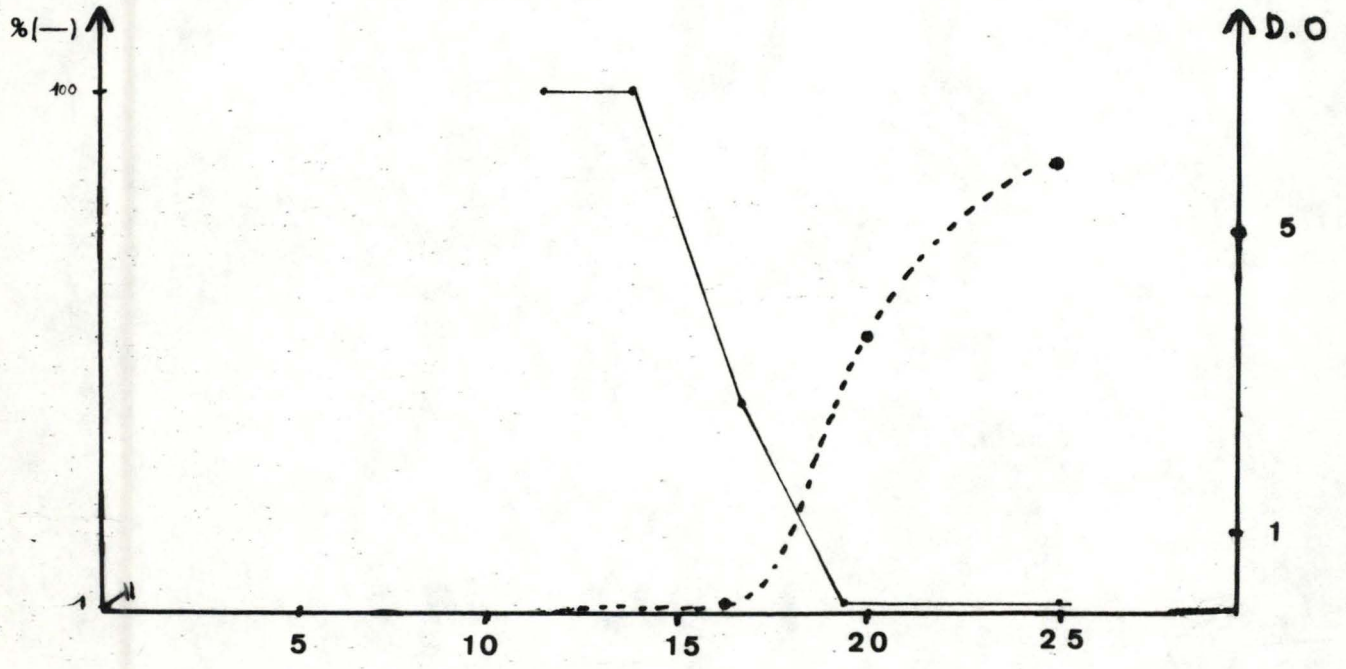


fig.19: culture liquide avec 50 µgr / ml d' ampicilline ajoutés en début de culture.
-------: représente la D.O
_____: représente le % de transformants amylolytiques.

3.2.4. Ampicilline ajoutée au début de la culture

Nous avons comparé des cultures liquides de transformants α-amylolytiques se déroulant à des concentrations différentes en ampicilline. Ces cultures ont été ensemencées évidemment avec une même quantité de bactéries. Quant à l'ampicilline, elle a été ajoutée en quantité choisie, une fois pour toute lors de l'ensemencement.

Les résultats de 2 cultures comprenant des concentrations en ampicilline différentes au départ (5 µgr/ml - 50 µgr/ml) sont présentés à la fig.18- 19.

Evolution de la D.O.

L'augmentation de la concentration d'ampicilline entraîne une augmentation du temps de latence des transformants. Il en résulte que la courbe de croissance aura un profil d'autant plus décalé dans le temps que la concentration initiale en ampicilline est importante.

Evolution de la proportion des transformants

- Si on utilise des concentrations moyennes d'ampicilline (50 µgr/ml) on observe bien les 2 phases (distinguées plus haut) : d'abord une augmentation de la proportion de transformants (jusqu'à une valeur un peu inférieure à 100%), puis, suite à l'augmentation rapide du nombre de révertants, chute de cette proportion.
  La chute de cette proportion est d'autant plus lente que la concentration initiale en ampicilline est élevée.
- Dans le cas de concentrations faibles en ampicilline (ex. : 5 µgr/ml), ces 2 phases n'apparaissent plus clairement. Il semble que l'augmentation de la proportion

des révertants se produit très tôt, bien avant que la proportion des transformants n'ait pu atteindre le maximum proche de 100% décrit précédemment.
Il en résulte que la proportion des transformants commencera bien à augmenter en début de culture, mais celle-ci n'atteindra pas des valeurs élevées et chutera rapidement.

Commentaires

Cette expérience constitue une sorte d'intermédiaire entre les 2 types décrits précédemment. En effet, ici, bien que l'on ajoute de l'ampicilline en début de culture, le fait de ne pas en rajouter au cours de la culture va permettre à la pression sélective de baisser progressivement permettant à un certain moment une reprise de la croissance des révertants. La concentration en ampicilline diminue en effet au cours d'une culture suite à sa dégradation continue par la β-lactamase produite par les transformants. Deux phénomènes interviendront dès lors de manière indépendante dans l'augmentation de la proportion des révertants. Tout d'abord l'instabilité ségrégationnelle qui se manifeste toujours plus ou moins au même stade de la culture, et ce quelque soit la concentration de départ en ampicilline. Mais aussi la croissance des révertants, qui reprend plus ou moins tard en fonction de la concentration en ampicilline au départ.

CONCLUSIONS GENERALES

Des expériences réalisées sur milieu solide, nous ont montré qu'un transformant α-amylolytique déposé sur ce type de milieu donne naissance à une population composée essentiellement de révertants, et manifeste donc une forte instabilité ségrégationnelle. Phénomène amplifié sur milieu non sélectif, (et en fin de culture sur milieu sélectif), par la possibilité qu'auront les révertants de se diviser.

Nous avons ensuite étudié le comportement des transformants en culture liquide.
En l'absence de pression sélective, la proportion de transformants chute rapidement sous l'effet conjoint de l'instabilité ségrégationnelle et de la croissance préférentielle des révertants. Nous avons alors réalisé des cultures en maintenant une pression sélective continue, ce qui nous a permis d'étudier l'instabilité ségrégationnelle, et de mettre en évidence un phénomène de lyse qui lui est associé. Il s'avère que ces deux phénomènes se déclenchent à un certain stade de la croissance, en l'occurence au début de la phase exponentielle. Quant aux cultures réalisées à différentes concentrations en ampicilline de départ, elles confirment les observations effectuées au cours des deux types d'expériences précédentes.

De tout ceci, nous pouvons conclure à l'existence d'un double phénomène d'instabilité ségrégationnelle et de lyse, dont la manifestation est relative en fonction du stade de croissance de la population.

Les causes de l'instabilité des transformants α-amylolytiques

3.3. Responsabilité de l'insert de 2,5 kb du plasmide recombinant dans le phénomène d'instabilité.

Nous avons vu (cfr p. 57) que les transformants porteurs du pUC 18 sans insert sont totalement stables. Par contre une très forte instabilité ségrégationnelle est associée au plasmide recombinant, tant en milieu solide qu'en milieu liquide. C'est donc l'insert de 2,5 kb qui doit être responsable de ce phénomène. Pour comprendre cela, nous allons essayer de déterminer les effets que peut avoir cet insert sur la bactérie hôte.

3.4. La charge métabolique déterminée par le plasmide recombinant.

Le simple examen des caractéristiques de l'insert ajouté nous permet de prédire que son introduction dans un vecteur va accroître de manière très importante la charge métabolique du plasmide pour la bactérie hôte. Cette constatation est liée à la présence d'un promoteur fort en amont du gène d' α-amylase.

Présence d'un promoteur fort

De nombreux travaux rapportent les désavantages et perturbations occasionnés à la bactérie hôte par la présence d'un promoteur fort dans un plasmide. Les travaux réalisés par Rood et al,en 1980 (35) avec des plasmides portant l'opéron tyrosine ("tyr") sont à ce sujet explicites. En modulant l'expression des gènes de l'opéron "tyr", ces auteurs observent une variation parallèle de l'instabilité. Ils concluent que l'instabilité est une conséquence directe de la charge métabolique résultant d'une surproduction des enzymes codées par l'opéron tyrosine. Pour expliquer ces observations, ils postulent qu'au plus l'expression de l'opéron est augmentée (promoteur fort...) plus grande sera la proportion du potentiel de biosynthèse de la cellule détournée vers la formation d'enzymes de l'opéron tyrosine. Cela entrainera un déséquilibre dans la production d'autres enzymes nécessaires pour la cellule.
Tout promoteur fort, indépendamment du gène qui est sous sa dépendance, augmenterait donc la charge métabolique apportée par le plasmide et par la même son instabilité.
Ce principe peut être invoqué dans la genèse de l'instabilité ségrégationnelle observée pour les transformants α-amylolytiques. On peut imaginer le schéma suivant :

promoteur fort ⟶ augmentation de la charge métabolique et perturbation de l'économie cellulaire entrainant une moindre efficacité des mécanismes de réplication et de partition du plasmide, voire aussi une diminution du nombre de copies ⟶ instabilité ségrégationnelle.

3.5. La charge physiologique déterminée par le plasmide recombinant.

Nous avons de bonnes raisons de croire que le gène d'α-amylase de Bacillus licheniformis, une fois dans E. coli peut entraîner de sérieuses perturbations pour la bactérie hôte, déterminant ainsi une charge "physiologique". En effet, l'α-amylase, protéine sécrétée chez B. licheniformis, aurait une localisation périplasmique chez E. coli du fait de la différence de structure entre la paroi de ces 2 microorganismes. Et cette localisation déterminerait la "charge physiologique".
Pour comprendre cela, il est nécessaire de se rappeler quelques notions théoriques concernant :

- la structure de la paroi bactérienne.
- le transport des protéines chez les bactéries.

3.5.1. Structure de la paroi bactérienne

La paroi est l'enveloppe externe de la bactérie. Son rôle est essentiellement un rôle de protection. Elle est une barrière contre des éléments de l'extérieur. Elle se caractérise par une grande rigidité qui confère à la bactérie sa forme caractéristique, car la cellule bactérienne est souvent exposée à des conditions hypotoniques. Cette propriété de résistance est due à la présence d'une substance complexe, appelée muréine, qui est composée de chaines de sucres aminés reliées par de courtes chaines peptidiques. Le polymère forme donc un réseau assez solide. En plus de la muréine, la paroi contient d'autres composants chimiques qui varient selon les espèces. La structure de la paroi détermine la réaction des bactéries à la coloration de Gram et permet de déterminer 2 classes : les bactéries Gram - et les bactéries Gram +.

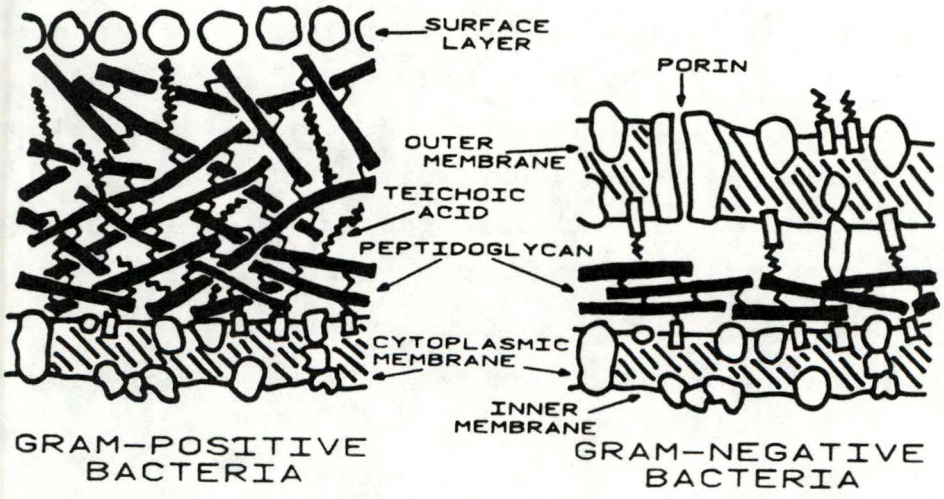


fig.20: structure schématique de la paroi des Gram- et des Gram+.

Paroi des Gram - : La paroi des Gram - est fine (10 nm) et offre, en microscopie électronique un aspect pluristratifié. Elle comporte une couche interne, rigide, formée du seul peptidoglycane basal (muréine) et une couche externe caractéristique. La couche externe est en effet constituée d'un assemblage tout à fait comparable à celui de la membrane cytoplasmique (2 couches opaques aux électrons séparées par une couche claire). Cette similitude de structure avec la membrane lui vaut d'ailleurs l'appelation de "outer membrane". L'espace qui sépare les 2 couches s'appelle le périplasme (fig.20).

Paroi des Gram + : La paroi des Gram + est relativement épaisse (20 à 50 nm) et représente jusqu'au quart du poids de la cellule. En microscopie électronique, elle apparaît relativement homogène. La couche interne est aussi constituée de muréine (peptidoglycane basal) et de polymères de nature non muréique (acides téichoïques ....) liés de manière covalente à la muréine. Sur cette couche interne est superposée une couche externe formée d'une monocouche de protéines (ou de glycoprotéines) qui agit comme barrière fonctionnelle contrôlant l'entrée d'éléments extérieurs et la sortie de produits cellulaires internes (fig.20).

3.5.2. Transport des protéines chez les bactéries

Les bactéries E. coli et les autres bactéries Gram négatives présentent 3 localisations non cytoplasmiques vers lesquelles les protéines peuvent être dirigées. Ces localisations sont la membrane interne (cytoplasmique), la membrane externe et le compartiment périplasmique qui est entouré par ces 2 structures. La sécrétion véritable, c'est-à-dire le transport et la libération

de protéines dans le milieu de culture est par contre très rare.
La plupart des études génétiques concernent des protéines destinées soit au périplasme soit à la membrane externe. Toutes ces protéines, sauf une exception, sont synthétisées d'abord sous la forme d'un précurseur qui possède une séquence "signal" du côté NH_2 terminal. Cette séquence signal sera enlevée de façon protéolytique par une peptidase signal durant la sécrétion. La seule exception est la phospholipase A qui a bien une séquence signal, mais celle-ci n'est pas enlevée.

Chez les bactéries Gram +, tel le genre "Bacillus", la sécrétion est moins bien connue. Ici, puisqu'il n'y a pas d'espace périplasmique ni de membrane externe, les localisations possibles pour des protéines exportées sont la membrane interne et le milieu extracellulaire.
Les mécanismes sont toutefois similaires à ceux des Gram - puisque les protéines sécrétées sont d'abord synthétisées sous forme d'un précurseur comportant un peptide signal.

3.5.3. Localisation de l'α-amylase de B. licheniformis dans E. coli

B. licheniformis est une bactérie à Gram positif l'α-amylase qu'elle produit est une protéine extracellulaire, comme toutes les amylases du genre Bacillus. Elle est produite sous la forme d'un précurseur comprenant une séquence signal de 29 acides aminés.

Chez E. coli on constate que les peptides signal des protéines de Bacillus sont généralement reconnues, de sorte que l'α-amylase de B. licheniformis pourra également franchir la membrane cytoplasmique de E. coli (3).

Ce faisant, l'α-amylase se retrouvera, non pas dans le milieu extérieur comme c'était le cas chez Bacillus licheniformis, mais bien dans l'espace périplasmique de E. coli. La protéine sera "prisonnière" de cet espace où elle va s'accumuler. Tout ceci est maintenant bien illustré par les travaux, de plus en plus nombreux, de clonage du gène d'α-amylase provenant de différentes bactéries Gram + (Bacillus coagulans, B. megaterium, B. licheniformis...) chez E. coli. (11,15,47).

3.5.4. Conséquence de la localisation périplasmique de l'α-amylase chez E. coli.

On peut craindre qu'une protéine étrangère s'accumulant dans l'espace périplasmique entraînera une perturbation de la physiologie bactérienne.
De nombreux arguments scientifiques existent en faveur d'un effet perturbateur de l'α-amylase périplasmique sur la physiologie de E. coli. Le travail réalisé en ce domaine par K. Willemot (47), est très significatif.
Bien que ce travail ait porté sur l'α-amylase de Bacillus coagulans clonée dans E. coli, il nous semble raisonnable d'élargir ses conclusions à l'α-amylase de Bacillus licheniformis, vu la proximité entre les 2 microorganismes. Il en ressort que l'accumulation de grandes quantités d'α-amylase, dans l'espace périplasmique de E. coli, entraîne différentes perturbations pouvant se résumer comme suit :

- il y a perturbation de l'enveloppe membranaire (sa composition protéique change, il y a une variation de la localisation de certains enzymes marqueurs...)
- les protéines (amylases) vont pouvoir bloquer certains sites destinés à d'autres protéines (dans la membrane externe et interne par exemple) ou prendre la place de protéines périplasmiques. Ceci entraîne notamment un ralentissement de la vitesse de transport de certaines

molécules (qui se manifeste par une croissance très lente sur certains milieux minimum).

- l'encombrement, dû à la présence d'α-amylase dans l'espace périplasmique, se traduit aussi par une diminution de la synthèse d'autres protéines qui sont elles aussi produites en masse (ex. : β-galactosidase, phosphatase alcaline...)

Tout ceci montre à suffisance qu'une protéine de sécrétion comme l'α-amylase, clonée chez E. coli, en s'accumulant dans l'espace périplasmique va perturber la physiologie de la bactérie hôte. L' α-amylase constitue donc une charge physiologique.

3.6. Charge du plasmide et instabilité ségrégationnelle

Nous avons vu que le plasmide recombinant constitue pour la bactérie hôte : E. coli une charge tant métabolique, (liée à l'important niveau d'expression de l' α-amylase), que physiologique, (du fait d'une localisation périplasmique).
La charge globale entraîne une importante instabilité ségrégationnelle, ainsi qu'un phénomène de lyse (disparition physique) d'une partie des transformants.
Nous avons pourtant remarqué que ces 2 phénomènes ne se manifestent pas de manière constante : au contraire, ils se déclenchent à un stade précis de la croissance bactérienne.
Ceci ne peut être imputable à une variation de la charge exercée par le plasmide vu que la production d' α-amylase est constante au cours de la croissance (47).
Par contre, nous savons que l'état physiologique des bactéries évolue au cours de la croissance. On peut dès lors raisonnablement postuler que c'est bien cette variation de l'état physiologique des bactéries au cours de la croissance qui est responsable du déclenchement de l'instabilité ségrégationnelle et du phénomène de lyse.

3.7. Les remèdes

Si l'instabilité (ségrégationnelle et "lytique") résulte bien d'une production élevée d' α-amylase (charge métabolique), et d'une localisation périplasmique de celle-ci (charge physiologique), tout moyen permettant de diminuer la production d' α-amylase ou d'en changer la localisation augmentera la stabilité.

L'apparition de mutants stables suite au processus d'instabilité structurale.

3.8. L'apparition de mutants stables, comme confirmation des hypothèses énoncées.

Si ce que nous avons supposé est vrai, c'est-à-dire si une charge existe bien aux 2 niveaux, vu l'existence de mécanismes entraînant l'instabilité structurale, on pourrait s'attendre à ce qu'apparaissent des mutants, qui soient dégagés de cette charge (soit qu'ils produiraient moins d' α-amylase, soit que la localisation de celle-ci y aurait été modifiée.)

Nous avons donc essayé de mettre en évidence l'apparition de tels mutants. Ces mutants, s'ils existent, étant dépourvus de la charge (physiologique et/ou métabolique), devraient être stables (du moins si ce que nous avons dit est juste). N'étant soumis, ni au phénomène de lyse, ni à l'instabilité ségrégationnelle, ils devraient conserver leur plasmide au cours de la culture et, dès lors, former l'essentiel de la population des transformants qui est encore présente après de longs temps de culture. Pour vérifier cela, nous avons mené des cultures liquides durant des périodes relativement longues (plus de 20 heures).

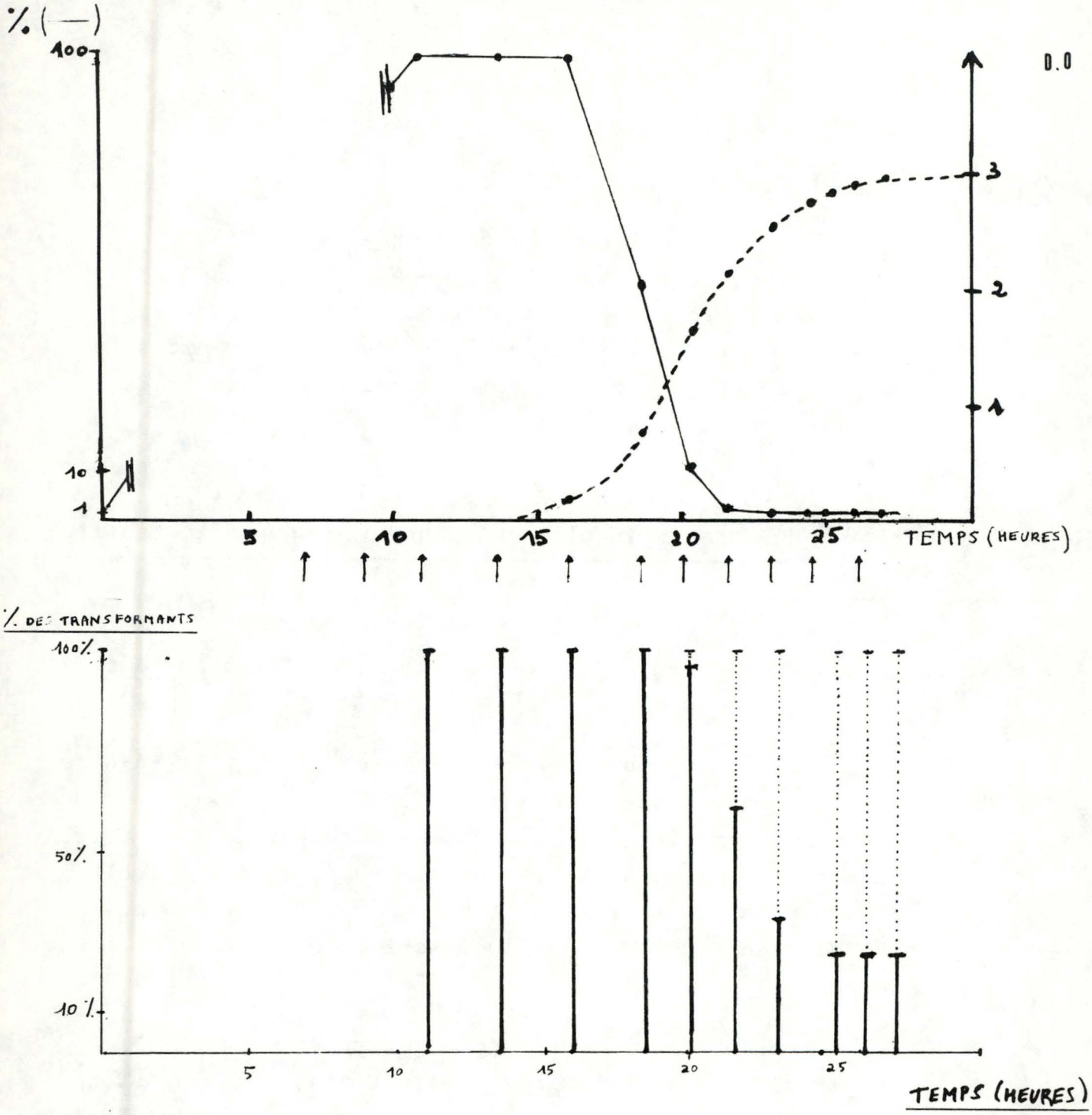


fig.21: a) culture liquide avec pression sélective constante.

-------: représente la D.O

_____: représente le % de transformants amylolytiques.

l'addition d'ampicilline se fait à des temps déterminés (cfr fig.17).

b) en fonction du temps, évolution du % des transformants qui sont α-amylolytiques.

-les verticales en tracé continu donnent le % de transformants amp^R, amy^+ par rapport au nombre total de transformants.

-les verticales en pointillés nous donne le % de transformants amy^- (résultat de l'instabilité structurale) toujours par rapport à la totalité

Il s'est avéré qu'effectivement, après de longs temps de culture liquide, tant non sélective que sélective, les seuls transformants encore présents avaient tous subi une stabilisation naturelle. Les "variants" stables, mis en évidence de la sorte, sont de 2 types. Les premiers sont bien des transformants, puisqu'ils sont résistants à l'antibiotique, mais ils ne présentent plus aucune activité α -amylase détectable sur boîtes.
Les seconds sont, eux, toujours amp^R, amy^+ et sont caractérisés par une stabilité accrue, voire totale, pour les 2 traits phénotypiques : amp^R, amy^+.

3.9. Découverte des 2 types de mutants

L'expérience réalisée ici est du même type que celle décrite au point 3.2.3. Il s'agit d'une culture liquide, ensemencée à partir d'une colonie amp^R, amy^+ du clone 14 et se déroulant avec pression sélective. La pression sélective sera maintenue par l'addition régulière d'ampicilline.

Les résultats (présentés à la fig. 21) nous montrent que la proportion des transformants se met à baisser à partir de la D.O. de 0,1, comme nous l'avions déjà observé.

Après 20 heures de culture, on remarque l'apparition de variants amp^R, amy^-. Ensuite la proportion de variants de ce type parmi les transformants va augmenter jusqu'à se stabiliser à partir de 24 heures 30.
Durant ce laps de temps, nous avons aussi caractérisé les transformants α-amylolytiques encore présents. Il s'avère que tous les transformants amy^+ testés sont toujours instables. A partir de 24 heures 30 de culture pourtant, tous les transformants α-amylolytiques étudiés se sont révélés,

cette fois-ci, totalement stables pour leurs 2 marqueurs phénotypiques (comme en témoigne les tests de stabilité en milieu solide ou liquide, qui ont été effectués pendant cette expérience). Il semble donc qu'à partir de 24heures30, tous les transformants encore présents soient stabilisés et se partagent en 2 types : amp^R, amy^- et amp^R, amy^+.

3.10. Stabilité des variants amp^R, amy^-

3.10.1. En milieu solide

Une colonie, poussant sur milieu sélectif LBAA, et dépourvue de halo, (c'est-à-dire amp^R amy^-), est prélevée et resuspendue. Après dilution de la resuspension, deux étalements sont réalisés, l'un sur LBA, l'autre sur milieu sélectif LBAA.

Il s'avère qu'il y aura autant de colonies qui vont pousser sur milieu sélectif que sur milieu non sélectif. Toutes les colonies étant bien entendu dépourvues de halo. Les transformants porteurs d'un plasmide modifié, (amy^-), sont donc stables.

3.10.2. En milieu liquide

Nous avons suivi une culture liquide, se déroulant sans pression sélective et ensemencée à partir d'une colonie amp^R, amy^-.

Comme le montrent les résultats, dès le départ la proportion de transformants (amp^R, amy^-), est de 100% (même proportion que celle d'une colonie). Au cours de la culture, cette proportion est maintenue. Il n'y a donc aucun phénomène de ségrégation visible.

L'existence de mutants stables et, qui plus est, ne produisant plus d' α-amylase est tout à fait en faveur de notre modèle selon lequel l'instabilité serait déterminée

par l'existence de 2 charges, l'une métabolique, l'autre physiologique. L'arrêt de la production d' α-amylase, en dégageant le transformant de la charge globale entraînerait donc une stabilisation.

3.11. Stabilité des variants amp^R, amy^+ partiellement stables

3.11.1. En milieu solide

Un aliquote d'une culture liquide, qui s'est déroulée pendant un minimum de 24 heures sous pression sélective continue, sert à ensemencer une boîte LBAA. Une des colonies α-amylolytiques poussant sur ce milieu est prélevée et, selon le protocole habituel, utilisée pour ensemencer un milieu non sélectif LBA, et un milieu sélectif LBAA.

Il y a autant de colonies qui se développent sur LBAA que sur LBA. Il s'en suit que toutes les bactéries constituant la colonie amp^R, amy^+, de départ contiennent bien le plasmide porteur du gène d' α-amylase. Ces transformants α-amylolytiques, obtenus en fin de culture, sont stables sur milieu solide.

3.11.2. En milieu liquide

Une culture liquide est réalisée au départ d'une colonie amp^R, amy^+ stable, sans pression sélective (fig.22). Comme attendu, la proportion de transformants est de 100% au départ. Cette proportion se maintiendra jusque 14-15 heures de culture, témoignant d'une stabilité très importante. La stabilisation n'est pourtant pas totale car vers la 15ème heure, on observe une chute de la proportion de transformants allant de pair avec une évolution tout à fait particulière de la D.O.

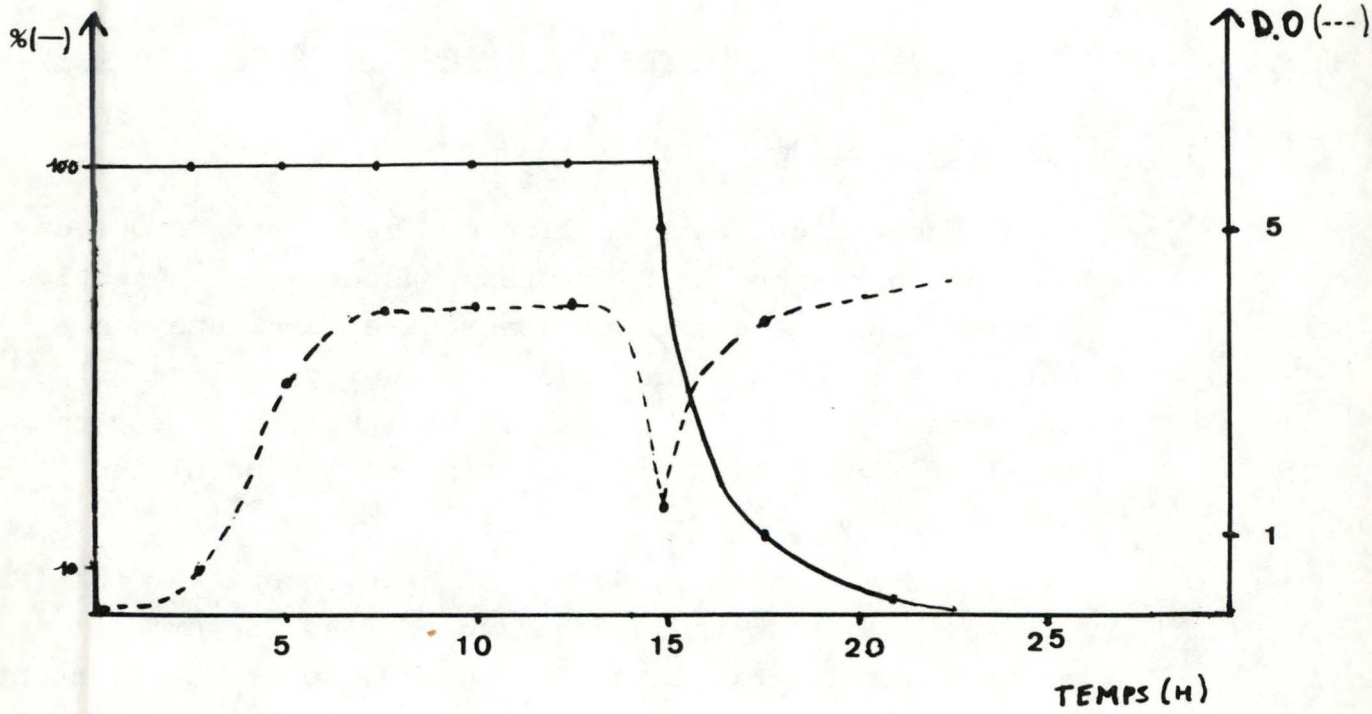


fig.22: culture liquide sans pression sélective de ces variants α-amylolytiques stables.

En effet, vers 14 heures, la D.O. chute brusquement, (ce qui doit impliquer un processus de lyse), pour remonter ensuite rapidement, parallèlement à une baisse de la proportion des transformants.

L'évolution de la proportion de transformants se déroule donc en 2 phases. Ceci n'est pas sans rappeler ce que nous avons observé pour les cultures liquides de transformants α-amylolytiques instables en présence d'antibiotiqu Dans ce cas aussi il y avait une phase initiale durant laquelle l'instabilité ségrégationnelle ne se manifestait pas, suivie d'une phase de chute de la proportion des transformants suite au déclenchement d'un processus de ségrégation. Tout ceci tendrait à indiquer que le plasmide des variants amy^+ constitue toujours une charge pour la bactérie, charge qui serait responsable du phénomène d'instabilité ségrégationnelle, qui se produit après 15 heures, et qui interviendrait probablement dans le phénomène de lyse (chute de la D.O.).

Ces transformants α-amylolytiques sont donc "partiellement" stables en l'absence de pression sélective. Il convient de signaler que ceci reste vrai même en présence de l'antibiotique (il y a juste retard de la chute de la proportion des transformants).

Nous nous sommes posé la question de savoir si le "réarrangement" subi par ces variants partiellement stables était de nature chromosomique, (modification de la souche), ou était lié au plasmide.

3.11.3. Localisation plasmidique de la modification entraînant cette stabilisation.

Le DNA de plasmide a été extrait d'une souche (TG1) de variants "amy^+", et réintroduit dans une souche

sauvage (JM101). Il s'avère que les cellules transformées sont partiellement stables au même titre que les variants amy^+, de TG1. La cause de cette meilleure stabilité doit donc se situer au niveau du plasmide.

3.12. Stabilité d'un second type de variants amp^R, amy^+ : totalement stables.

Les mutants partiellement stables, décrits ci-dessus, donnent naissance, après quelques passages successifs sur boîte de Pétri ou après quelques cultures successives en milieu liquide, à un nouveau type de variants. Les nouveaux variants sont toujours amp^R, amy^+, mais cette fois-ci totalement stables.

3.12.1. Stabilité en milieu solide

Une colonie de variants partiellement stables est repiquée, successivement, sur plusieurs milieux LBAA. La colonie (amp^R, amy^+), obtenue après quelques passages sur boîtes, est alors prélevée et utilisée pour réaliser des étalements sur milieu solide sélectif (LBAA) et non sélectif (LBA). Il y aura apparition d'autant de colonies sur LBAA que sur LBA, toutes étant α-amylolytiques. Ceci signifie qu'en milieu solide la stabilité est totale (colonie composée de 100% de transformants amp^R, amy^+).

3.12.2. Stabilité en milieu liquide

Une culture liquide est réalisée, sans ampicilline, au départ d'une colonie de ces variants. Cette fois-ci, la courbe de croissance ne présente plus le phénomène de chute, suivi d'une remontée rapide de la D.O. qui se produisait aux alentours de la 15ème heure de culture, chez les variants partiellement stables. La courbe de croissance est donc tout à fait classique. Quant à la

Surnageant:	230	91,3%
Périplasme:	22	8,7%
Cytoplasme:	indétectable	/.

fig.23: dosage de l'activité amylase chez les mutants totalement stables.

-l'activité amylase est exprimée en U maltose / L / min et en % par rapport à la culture totale.

proportion de transformants, elle restera constamment à 100% depuis le début jusqu'à la fin de la culture (tous les transformants étant bien amp^R, amy^+).
Ce qui témoigne de la totale stabilité de ces transformants.

3.12.3. Dosage de l' α-amylase chez ces transformants amy^+ superstables, au niveau des 3 compartiments (cytoplasme, périplasme, milieu extérieur)

Nous avons voulu déterminer si la stabilisation naturelle de ces variants résultait d'une diminution de la production de la production d' α-amylase ou d'une éventuelle modification de sa localisation.
Une diminution de la production d' α-amylase semble peu probable. En effet, la taille des halos, entourant les colonies de variants amy^+, ne semble absolument pas réduite, au contraire les halos sont parfaitement visibles et de grandes tailles. Ce simple examen qualitatif nous invite donc à étudier la localisation de l' α-amylase.

La localisation de l' α-amylase

Une culture liquide est ensemencée à l'aide d'une colonie de variants amy^+ totalement stable, et on lui ajoute 50 µgr/ml d'ampicilline. Elle sera arrêtée après 16 heures de culture et centrifugée. Le surnageant sera dosé pour l' α-amylase, les bactéries seront quant à elles, soumises à une méthode (décrite p 48 dans Matériel et Méthode) permettant de récupérer et doser les enzymes périplasmiques, indépendamment des enzymes cytoplasmiques. (fig.23).

Les résultats sont présentés à la fig. 23
Par référence à divers travaux, décrivant une localisation presqu'exclusivement périplasmique de différentes α-amylases clonées chez E. coli, (15,11,8) la localisation observée dans le cas de notre variant est tout à fait inhabituelle, puisque l'enzyme se répartit presqu'exclusivement dans le surnageant.

Bien qu'étonnant, ce résultat est, de prime abord, tout à fait compatible avec l'idée que nous avons développée concernant une charge physiologique, due à la localisation de l' α-amylase et qui serait en partie responsable de l'instabilité ségragationnelle. Il est donc vraissemblable bien que nous ne l'ayons pas confirmé, que les variants amy^+ totalement stables proviennent de transformants amy^+ instables qui auraient acquis la possibilité d'excréter leur α-amylase dans le milieu, ce qui les auraient dégagé de la charge physiologique, et par la même, de l'instabilité ségrégationnelle.

3.13. L'apparition de variants semble être un phénomène général

L'apparition des variants décrits précedemment, ne semble pas être un phénomène exceptionnel. Au contraire, il semble plutôt y avoir nécessairement apparition de ceux-ci après d'assez longues durées de cultures liquides. Ainsi, des mutants amp^R amy^- ont été obtenus vers la fin de chaque expériences de culture liquide se déroulant en conditions de pression sélective continue. Ils n'ont toutefois jamais été obtenus à la fin de cultures liquides se déroulant sans ampicilline, ou avec juste une addition d'ampicilline lors de l'ensemencement.
Ceci pourrait s'expliquer par la localisation périplasmique de la β-lactamase (10).
Dans des conditions où la pression sélective est continue, la bactérie amp^R, amy^+ va produire, tout au long de la culture, une importante quantité de β-lactamase qui ira s'accumuler dans l'espace périplasmique. L'encombrement provoqué par l'accumulation de l' α-amylase et de la β -lactamase, dans le périplasme entraînerait une charge telle, que tout "événement", (mutations, insertions...), entraînant l'arrêt de la production d' α-amylase va

conférer un avantage sélectif au mutant amp^R, amy^+ par rapport aux transformants amp^R amy^+, et ce variant deviendra rapidement le transformant majoritaire. Tout variant amp^S, amy^+ qui surviendrait, serait lui bloqué dans sa croissance vu sa sensibilité à l'ampicilline.

Quant aux variants stables amp^R, amy^+, ils apparaissent systématiquement à la fin de n'importe quel type de culture liquide, qu'il y ait ou non antibiotique. Ainsi, au départ d'un certain nombre de clones de transformants α-amylolytiques instables (les clones 3 - 38 - 4), nous avons pu obtenir, après culture liquide, des variants stables amp^R, amy^+.

L'apparition de ce type de mutants, et l'augmentation de leur proportion parmi les transformants manifestent leur avantage sélectif par rapport aux transformants normaux. En effet, la charge provoquée par l'accumulation d' α-amylase dans l'espace périplasmique serait telle, que tout événement entraînant une variation de localisation de l' α-amylase conférerrait un avantage sélectif au mutant. Celui-ci deviendrait rapidement prédominant.

Le fait que ces mutants se retrouvent à la fin de n'importe quel type de culture liquide, alors que les mutants amp^R, amy^- n'apparaissent qu'à la fin de culture se déroulant dans des conditions bien précises (pression sélective continue), nous indique que l'apparition des mutants amp^R, amy^+ est très nettement favorisée. Nous n'avons cependant pas d'explications satisfaisantes pour comprendre ce phénomène.

CONCLUSION

En étudiant les transformants encore présents après de longs temps de culture liquide, nous avons pu mettre en évidence le phénomène d'instabilité structurale. Celui-ci entraîne l'apparition systématique, en fin de culture, de variants stables pouvant être de 2 types (amp^R amy^-, amp^R amy^+).
L'examen de ces 2 types de mutants stables montrent qu'ils sont dégagés, en partie du moins, de la charge que constitue le plasmide recombinant. Et cela, par suite d'une diminution de la production d' α-amylase, (donc de la charge globale), dans le cas des mutants amp^R amy^-, ou à la suite d'un changement de localisation de l'enzyme, (éliminant la charge physiologique), ce qui semble être le cas des mutants amp^R amy^+.

Un travail récent (47), bien que ne portant pas sur l'étude de la stabilité, confirme la plupart des observations que nous venons de faire. Ce travail a, en effet, pu mettre clairement en évidence l'existence de perturbations physiologiques liées à la production d' α-amylase chez E. coli.
Il a de plus démontré le lien entre cette charge physiologique, déterminée par l'accumulation d' α-amylase dans l'espace périplasmique, et un ralentissement de la croissance des souches transformées sur différents milieux solides. Des mutants, ne produisant plus d' α-amylase, ont par ailleurs été mis en évidence, mutants chez lesquels la capacité de croissance est pleinement retrouvée.
Un parallèlisme étroit existe donc bien entre ce travail et le nôtre.

Les mutants que nous avons trouvé témoignent donc, par leur apparition, de la présence d'un phénomène d'instabilité structurale, et par leurs caractéristiques, (stabilité, production et localisation de l'α-amylase, du bien fondé des hypothèses émises quant aux causes de l'instabilité.

A ce titre, ils mériteraient d'être étudiés en détail afin de comprendre par quels mécanismes moléculaires précis, l'instabilité structurale a pu permettre, d'une part l'arrêt de la production d' α-amylase, d'autre part l'exportation de l' α-amylase (et donc la diminution du fardeau physiologique). Il convient d'ailleurs de signaler que des mutants amy^- ont déjà été étudiés (47-48), et que, dans ce cas du moins, il s'est avéré que l'arrêt de la production d' α-amylase résultait de l'insertion d'éléments mobiles IS dans le gène d' α-amylase.

Nous n'avons toutefois pas choisi d'étudier ces mutants. Il nous a semblé plus intéressant de tester directement notre hypothèse, (déjà partiellement confirmée par l'apparition des 2 types de mutants), en essayant de créer, par manipulation du gène d' α-amylase, des transformants α-amylolytiques stables.

Stabilisation des transformants α-amylolytiques de E. coli par manipulation directe du gène d' α-amylase.

3.14. Stabilisation par une diminution de la charge du plasmide

Nous nous sommes demandés s'il ne serait pas possible d'effectuer, par manipulation directe du plasmide porteur du gène d' α-amylase, la stabilisation des transformants α-amylolytiques.
Ceci revient à essayer de diminuer l'importance de la charge globale que détermine le gène d' α-amylase cloné chez E. coli. Deux stratégies sont envisageables pour diminuer cette charge. La première consisterait à diminuer la production d' α-amylase en vue de diminuer la charge métabolique. La seconde serait de modifier la localisation de l' α-amylase, dans le but de "réduire" la charge physiologique. La stratégie visant à diminuer la charge métabolique implique une diminution de la production d' α-amylase, ce qui est contraire au but habituellement recherché par les projets à vocation industrielle. On préférera dès lors la 2ème stratégie, qui vise la stabilisation des transformants α-amylolytiques via une variation de la localisation de l' α-amylase, et donc indépendamment de toute variation du niveau de production de l'enzyme.

Changer la localisation d'une protéine périplasmique revient, soit à provoquer sa sécrétion dans le milieu, soit à l'"obliger" à rester dans le cytoplasme.

La sécrétion dans le milieu, qui semble être la solution retenue par la nature pour diminuer la charge physiologique (cfr : mutants amp^R, amy^+), présente plusieurs avantages pratiques liés principalement à l'élimination en continu de l'enzyme, à sa récupération-purification plus aisée.

Pourtant, la sécrétion chez E. coli est un phénomène très limité, et il y a encore tellement peu d'informations disponibles quant aux mécanismes impliqués, qu'il nous a semblé très peu faisable, en pratique, de pouvoir forcer la sécrétion dans le milieu extérieur.

Le maintien de la protéine dans le cytoplasme apparait beaucoup plus réalisable. Il existe beaucoup de bases théoriques concernant les mécanismes d'exportation des protéines vers l'espace périplasmique. On sait notamment que l'exportation de l' α-amylase dans l'espace périplasmique est liée à la présence d'un peptide signal (cfr. P.10). Nous avons dès lors imaginé une stratégie consistant à produire une α-amylase dépourvue de peptide signal. L'α-amylase ainsi modifiée resterait confinée dans le cytoplasme, et, du fait de ce changement de localisation, ne déterminerait plus de fardeau physiologique pour la bactérie au sens où nous l'avons défini précédemment.

Stratégie visant à produire une α-amylase cytoplasmique

La stratégie imaginée consiste à produire une α-amylase dépourvue de peptide signal. Ceci nécessite l'excision de la portion initiale du gène d' α-amylase, qui code pour le peptide signal. Ensuite, il faudra placer le gène ainsi délété, sous le contrôle d'une batterie de signaux (promoteur, site de fixation du ribosome) pour en assurer l'expression.
En effet, le gène amputé du début de sa séquence codante correspondant au peptide signal, perd du même coup toutes les régions situées en amont de cette séquence, parmi lesquels se trouvent ses propres signaux d'initiation de transcription et de traduction.

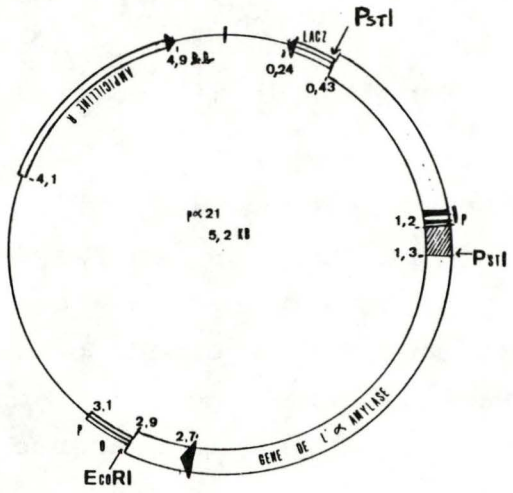


fig.24: structure du plasmide p 21 avec la localisation des 2 sites de coupure de l'enzyme PstI et le site unique d' EcoRI.
-la partie hachurée de l'insert située au début du gène d'α-amylase code pour le peptide signal de la protéine.
-en amont on retrouve les signaux de contrôle du gène d'amylase (région marquée par un "p").

N.B: PstI reconnait la séquence : 5' CTGCAG 3'
↑ site de coupure

soit 5' CTGCAG 3'
3' GACGTC 5'

EcoRI reconnait la séquence :5' GAATTC 3'
↑ site de coupure

soit 5' GAATTC 3'
3' CTTAAG 5'

3.14.1 Construction proprement dite

Préparation du gène dépourvu de séquence signal (préparation de l'insert).

Matériel :

Nous avons utilisé le plasmide p 21, purifié à partir du clone 21. Comme tous les autres plasmides recombinants, porteurs d'un gène d' α-amylase, utilisés jusqu'à présent, il s'agit d'un pUC18 comprenant un insert de 2,5 kb dans lequel se trouve le gène d' α-amylase.

Choix des sites de restriction : PstI, EcoRI.

Toute la stratégie décrite ci-dessus n'est rendue possible que par l'existence d'un site de coupure, pour l'enzyme de restriction PstI, proche de la jonction entre la fin de la séquence codant pour le peptide signal, et le début de la séquence codant pour la protéine.

Nous avons, en outre, sélectionné l'enzyme de restriction EcoRI, qui a un site unique de coupure situé après le gène.
Dès lors, en effectuant la digestion du plasmide par PstI et par EcoRI, on libèrera un morceau de plasmide, comprenant le gène d' α-amylase amputé de toute sa partie située en amont de PstI, c'est-à-dire de 26 codons sur les 30 que compte la séquence codant pour le peptide signal, et de ses signaux de transcription et de traduction (fig.24).

Pratiquement, nous avons clivé 6 µgr de p 21 simultanément par 40 unités d'enzyme PstI et par 40 unités d'enzyme EcoRI.
La réaction s'est déroulée pendant 3 heures, à 37°C, dans du tampon médium.
Cette double digestion, si elle est complète, doit nous donner 3 morceaux (fig.24)

λ

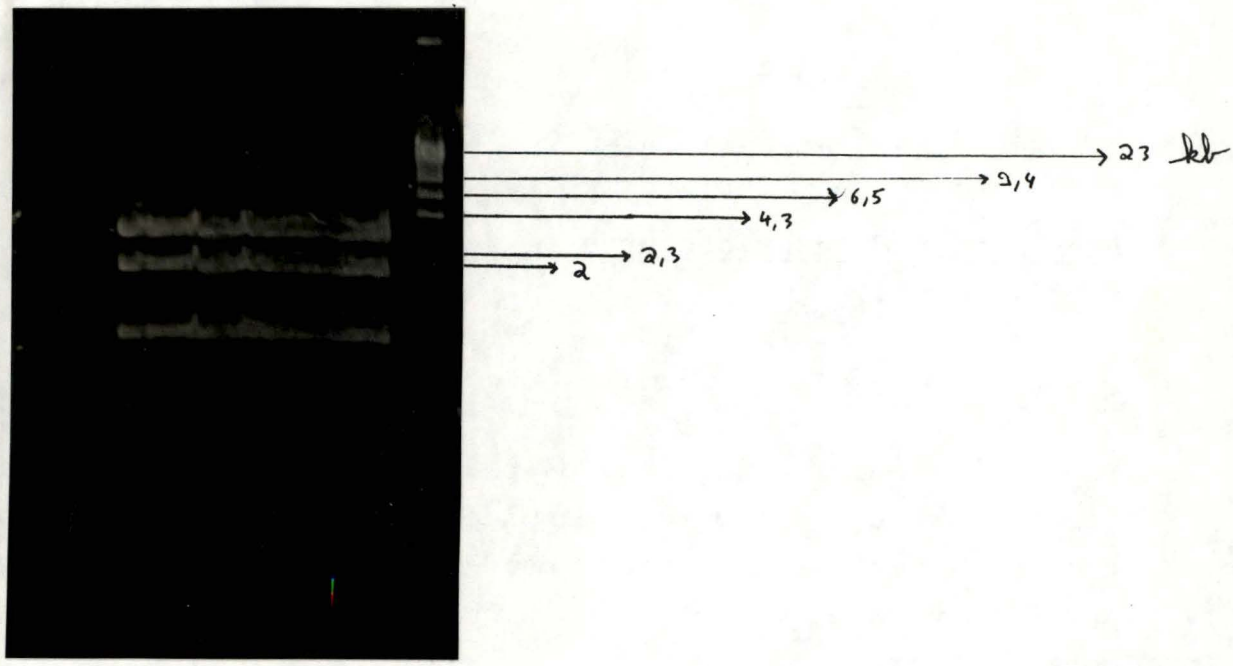


fig.25: électrophorèse sur minigel préparatif d'agarose de la solution de restriction du p 21 par PstI-EcoRI.
- la bande intermédiaire (diffuse car migration sous un haut voltage) sera récupérée.



fig.26: électrophorèse sur gel d'agarose de:
-piste 1: un échantillon de DNA récupéré sur gel (cfr.fig.25).
le morceau est bien là, et a la bonne taille (1,66 kb).
-piste 2: un échantillon de pUC 9 coupé PstI-EcoRI
la bande a bien la taille attendue (+2,5kb).

- un morceau PstI-PstI de 0,8 kb (0,24 µgr de ce morceau)
- un morceau PstI-EcoRI de 1,66 kb (1,95 µgr de ce morceau)
- un morceau EcoRI-PstI de 2,64 kb (3,10 µgr de ce morceau)

Récupération du morceau de 1,66 kb correspondant au gène d' α-amylase privé de séquence signal.

La totalité de la solution de restriction est soumise à une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (40 minutes à 130 volts). Lors de la visualisation du gel coloré au bromure d'éthidium en fluorescence (fig.25), on observe 3 bandes qui correspondent aux trois morceaux attendus. La bande intermédiaire, qui correspond au morceau PstI-EcoRI de 1,66 kb nous intéressant, est extraite du gel par la méthode de Zhu et al, (cfr p 32 Matériel et Méthodes), permettant l'élution du DNA présent dans un gel d'agarose. En soumettant un échantillon de DNA récupéré du gel à une électrophorèse, nous pouvons estimer la quantité totale de matériel récupérée a 1 µgr (fig.26).

Choix d'un vecteur et clonage proprement dit.

Principe

Le clonage a été conçu de manière à pouvoir rendre fonctionnel le gène d' α-amylase contenu dans le fragment de 1,66 kb. L'idée est d'insérer ce fragment dans un pUC, selon une stratégie telle que le gène d' α-amylase se retrouvera sous le contrôle des signaux du gène lacZ. Ceci requiert de pouvoir assurer à l'insert qui sera placé dans la batterie de sites de clonage (MCS), la même orientation que le gène de la β-galactosidase, et de pouvoir le mettre en phase avec la séquence codante, de la β-galactosidase, qui précède.

Choix du vecteur - critères

Notre choix s'est porté sur le pUC9. (fig.27).

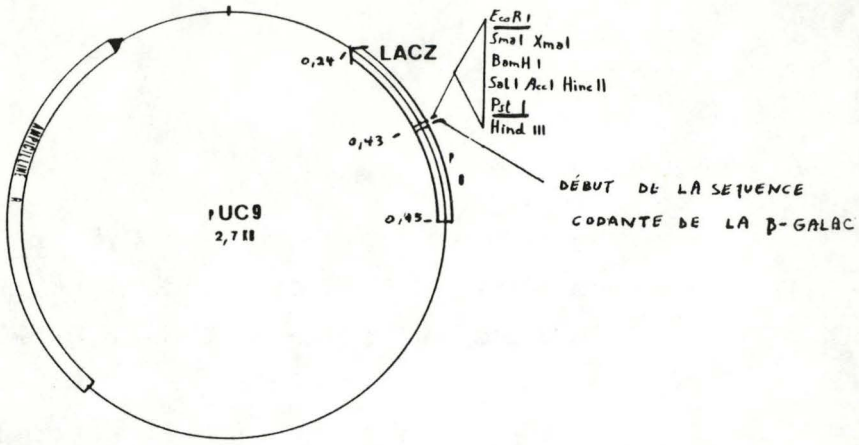
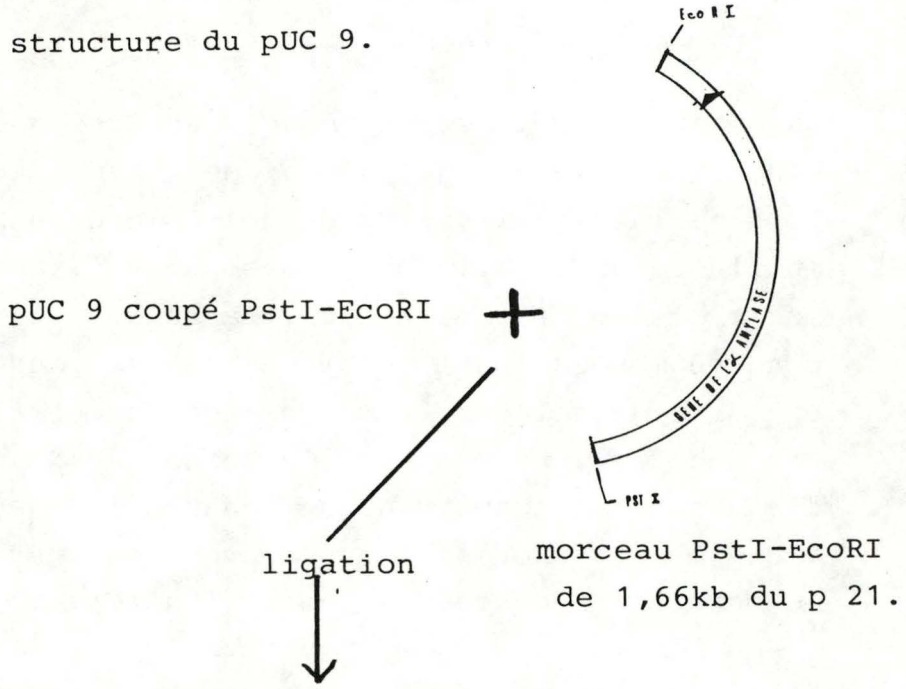


fig.27: structure du pUC 9.



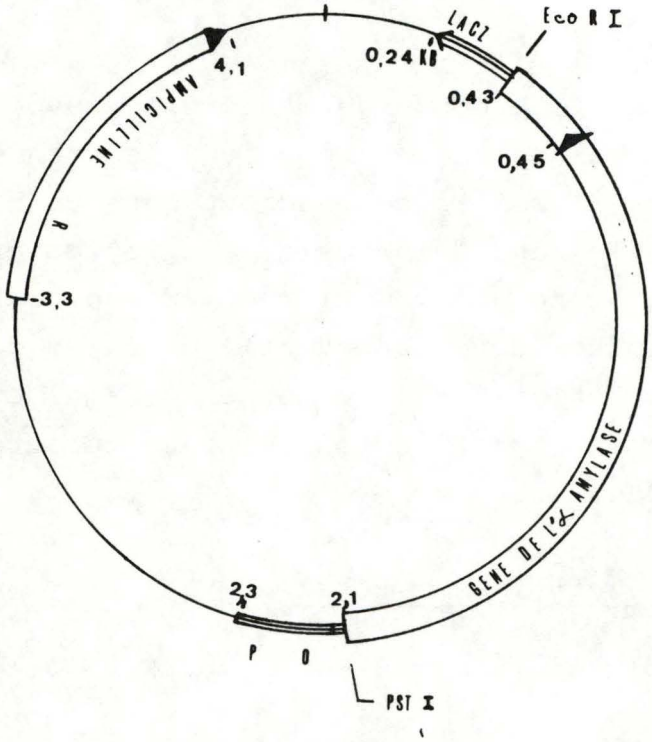
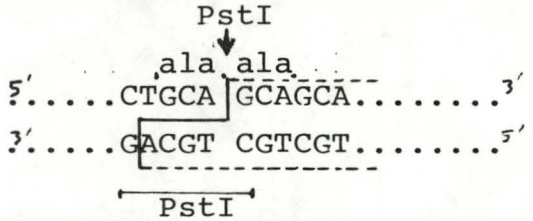


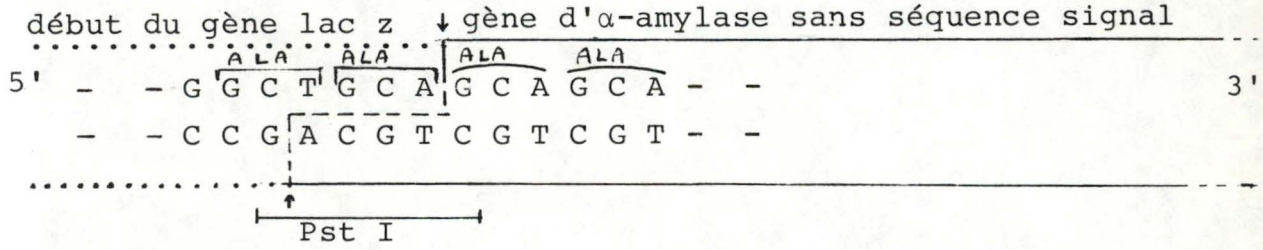
fig.28: ligation, et structure du plasmide recombinant

Dans celui-ci, tout d'abord, l'orientation des sites de restriction de la MCS est inversée par rapport à celle du pα21, et, de ce fait, permet l'insertion du gène dans la bonne orientation relativement au promoteur lac.

Ce vecteur va, de plus, permettre l'insertion en phase.
En effet, on sait que le site PstI, dans le gène d' α-amylase est situé entre 2 codons :



D'autre part, dans le vecteur pUC9, le site PstI est également placé entre 2 codons, de sorte que la ligation des 2 extrémités PstI à bouts collants (pUC9 + insert) respectera la phase de lecture.



phase ouverte de lecture

Une protéine de fusion sera ainsi produite, protéine hybride comprenant les 9 premiers acides aminés* de la β-galactosidase suivis des 487 acides aminés de l' α-amylase dépourvue de peptide leader.
*:PstI coupe en effet entre le 9è et le 10è codon du gène lacz.

En pratique : préparation du vecteur

Un µgr de pUC9 a été clivé par 5 unités d'enzyme PstI et 5 unités d'enzyme EcoRI (réaction se déroulant une nuit à 37°C).

Il en résulte, si la double digestion est complète, un morceau de 2,62 kb et un petit fragment de 25 nucléotides, qui vu sa petitesse n'influencera pas la suite des manipulations.
Une extraction au phénol a été réalisée sur la solution de restriction, dont un échantillon a ensuite été prélevé, afin d'être soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose.
L'examen du gel (fig.26) nous permet de confirmer la présence d'un grand fragment linéaire de 2,6 kb, qui doit être le morceau PstI-EcoRI du pUC9.

En pratique : ligation vecteur-insert (fig.28)

Une ligation a été ensuite réalisée entre le vecteur linéarisé (pUC9 coupé par PstI-EcoRI), et l'insert de 1,66 kb (gène d' α-amylase dépourvu de peptide signal) suivant une proportion d'environ 5 molécules d'insert par molécule de plasmide. 100 ngr de pUC9 et 300 ngr d'insert ont été mélangés en présence d'une unité de T4 DNA ligase, et laissés 18 heures à 14°C

3.14.2 Transformation de la souche TG1 avec le nouveau vecteur

Les 25 µl de la ligation ont été utilisés pour transformer la souche TG1.
Des étalements ont été réalisés sur des boîtes LBAA (sans IPTG), et sur des boîtes MGA 1% (sans IPTG). Après une nuit d'incubation à 37°C, on observe qu'en moyenne 10% des colonies poussant sur LBAA sont entourées d'un halo, alors qu'il n'y a aucune colonie de ce type sur le milieu MGA 1%.

Les colonies entourées d'un halo, poussant sur LBAA (sans IPTG) doivent être issues de transformants hébergeant le plasmide qui nous intéresse. Deux observations peuvent être faites à propos de ces colonies. Premièrement, leur proportion est très faible,

seulement 10%, ce point sera discuté plus loin. Ensuite, les halos observés sont de taille réduite, ce qui est tout à fait attendu. En effet, nous utilisons un milieu sans IPTG, ce qui signifie que la dérépression des opérateurs lac Z n'est que partielle, et donc que l'expression de l' α-amylase est réduite. En outre, la taille réduite des halos est tout à fait compatible avec une localisation cytoplasmique de l' α-amylase.
Etant confinée au cytoplasme, celle-ci aurait peu tendance à passer dans le milieu pour déterminer un halo.

L'absence totale de halo sur milieu MGA 1% (sans IPTG), milieu dont on sait qu'il réprime totalement le gène lac Z, (cfr p. 27), tend à démontrer que le gène d' α-amylase est bien placé sous le contrôle des signaux, (promoteur, opérateur...), du gène de la β -galactosidase (lac Z), et est aussi soumis à la même régulation par le glucose et l'IPTG.
Un contrôle a, par ailleurs, été réalisé. Nous avons étalé sur une boîte LBAA (sans IPTG) un inoculat de bactéries TG1 compétentes. Aucune colonie ne se développe, confirmant par là que les bactéries hôtes utilisées pour la transformation sont bien dépourvues de la résistance à l'antibiotique et de toute activité α-amylolytique.

3.14.3 Restriction du plasmide d'un clone de transformants α-amylolytiques en vue de contrôler le plasmide.

Afin de vérifier que les transformants α-amylolytiques hébergent bien le plasmide que nous avons construit, nous avons réalisé l'expérience suivante.
Une colonie, entourée d'un halo, est prélevée de la boîte sélective comprenant les transformants, et sert à ensemencer un barboteur contenant 10 ml de 2XTY et de l'ampicilline à raison de 50 µgr/ml. Après 16 heures, la culture est arrêtée, 5 ml en sont prélevés, afin de constituer un stock à -70°C de ce nouveau clone.
Le restant de la culture, quant à lui, sera soumis au protocole d'extraction rapide de plasmide (décrit p. 42).

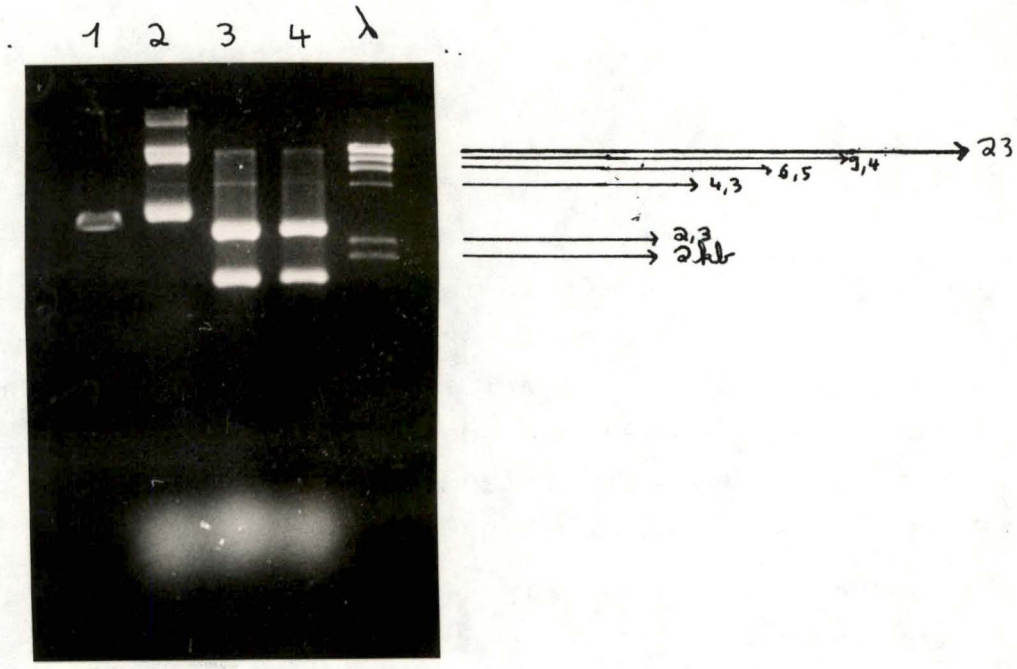


fig.29: - piste 1: 200 ngr de pUC 9 coupé par PstI
bande à 2,6 kb, OK

- piste 2: plasmide recombinant (pUC 9 avec l'insert PstI-EcoRI du p 21) non coupé
- piste 3 et piste 4: plasmide recombinant coupé par PstI et EcoRI. Les 2 morceaux ont bien les tailles attendues (2,5 et 1,6kb).
- piste 5: 400 ngr de DNA de phage λ coupé par HindIII servant de référence (les tailles des bandes sont indiquées à droite).

N.B: sur les pistes 2,3,4 apparait une légère bande au niveau de la taille 4,3kb, il s'agit de plasmide recombinant linéarisé (une seule coupure).

Surnageant:	21	14,9%
Périplasme:	66	46,8%
Cytoplasme:	54	38,3%

fig.30: dosage de l'activité amylase chez les transformants.
-l'activité amylase est exprimée en U maltose / L / min et en % par rapport à la culture totale.

La moitié du matériel récupéré sera digérée par 10 unités d'enzyme EcoRI et 10 unités de PstI. La réaction de restriction se déroule pendant 3 heures à 37°C. Ensuite la solution de restriction est passée 10 minutes dans un bain à 65°C (inactivation de l'enzyme), puis est soumise à une électrophorèse sur gel d'agarose (2 heures à 100 mV).
Dès lors, si la digestion est totale, et si le plasmide est bien celui que nous avons construit, on s'attend à "ressortir" l'insert du plasmide recombinant ce qui revient à obtenir 2 morceaux. L'un de 2,5 kb correspondant au pUC9 coupé en PstI-EcoRI. L'autre de 1,6 kb correspondant à l'insert PstI-EcoRI, et comprenant le gène d' α-amylase sans séquence signal.
L'examen, en fluorescence, du gel coloré au bromure d'éthidium nous confirme parfaitement le profil de restriction attendu (cfr fig. 29).

Le clone testé s'avère donc bien contenir le plasmide attendu, plasmide responsable de la production d'une α-amylase sans peptide signal. Divers tests vont être effectués sur ce clone afin de préciser la localisation précise de l' α-amylase, et en vue de déterminer la stabilité.

3.14.4 Dosage de l' α-amylase dans les différents compartiments cellulaires

On ensemence, à partir du clone décrit ci-dessus, un barboteur contenant 10 ml de 2XTY (sans ampicilline, sans IPTG).
La culture se déroule à 37°C pendant 17 heures.
Elle va alors subir une centrifugation (3.000 RPM pendant 5 minutes) permettant de récupérer le surnageant. Le culot sera ensuite remis en suspension et soumis à un protocole permettant la libération des enzymes périplasmiques (cfr p.48).
Les cellules seront lysées, en finale, pour permettre la récupération des enzymes cytoplasmiques. L'α-amylase sera dosée dans les 3 compartiments : surnageant, périplasme, cytoplasme (fig.30).

Ces résultats sont bien différents de ceux généralement présentés pour l' α-amylase de B. licheniformis clonée intacte, (c'est-à-dire avec son peptide signal), dans E. coli, qui font mention d'une activité de plus de 90% dans le périplasme (11), (15). Ici, la localisation se distribue entre le cytoplasme et le périplasme. Bien qu'une partie de l'activité se retrouve toujours au niveau du périplasme, la répartition est bien plus équilibrée ici (46% dans le périplasme, 38% dans le cytoplasme), que dans le cas d'une amylase avec peptide signal (environ 90% dans le périplasme, 5-10% dans le cytoplasme).

3.14.5 Etude de la stabilité des transformants en milieu solide

Une colonie amp^R, amy^+, issue d'un clone de nouveaux transformants, est soumise au protocole décrit p 52 , permettant d'étudier la stabilité en milieu solide. Comme précédemment, nous comparerons le nombre de colonies apparaissant sur une boîte LBA (sans IPTG) et une LBAA (sans IPTG), boîtes ensemencées au départ d'une resuspension de la colonie amp^R amy^+ prélevée.

Le nombre de colonies compté est le même sur milieu solide sélectif que sur milieu non sélectif. Ceci signifie que les transformants sont totalement stables au point de vue du caractère amp^R.

Si on s'intéresse à la proportion de colonies entourées d'un halo, sur la boîte LBAA, après un jour d'incubation à 37°C, on remarque que celle-ci n'est que de 10%. Les colonies amp^R amy^-, qui représentent donc 90% du total, ne sont pas sans nous rappeler les mutants résultant de l'instabilité structurale (cfr p 74).

Cependant 2 constatations rendent l'idée de l'instabilité structurale très peu plausible :

1) Pour que, dans notre cas, les 90% de colonies dépourvues de halos soient bien amy^-, et donc résultent du phénomène

	15h d'incubation	48h	>48h
LBAA	10%	50%	50%
LBAA IPTG	20%	70%	70%

fig.31: % de colonies entourées d'un halo sur milieu LBAA, avec ou sans inducteur(IPTG), en fonction du temps d'incubation.

d'instabilité structurale, il faudrait que ce phénomène puisse se produire à une fréquence très élevée (pour donner 90% de colonies amy^-), et en l'absence de toute instabilité ségrégationnelle (puisque les 100% des colonies sont amp^R). Or, nous avons vu au contraire que l'instabilité structurale était un phénomène toujours précédé de l'instabilité ségrégationnelle, et très peu fréquent par comparaison à cette instabilité.

2) D'autre part, les observations suivantes démontrent clairement que des colonies puissent être α-amylolytiques sans s'entourer automatiquement d'un halo.

- En effet, nous avons réalisé à nouveau le test de stabilité sur milieu solide (décrit ci-dessus), en laissant cette fois incuber la boîte sélective pendant plusieurs jours à 37°C. On remarque que certaines colonies, qui étaient dépourvues d'un halo après 15 heures d'incubation et classées en conséquence parmi les amy^-, vont par la suite pouvoir en déterminer un, révélant ainsi leur caractère α-amylolytique. Ainsi, on passe de 10% de colonies amp^R amy^+ sur LBAA après un jour, à 50% après trois jours (fig 31).

- Dans la même optique, si cette expérience est reproduite en travaillant avec des milieux solides ayant des capacités inductrices plus fortes du gène lac Z, la proportion de colonies amp^R amy^+ augmente encore (fig. 31).

Cette "révélation" progressive des halos, et donc du caractère amy^+ des colonies, montre bien que nous ne sommes pas en présence d'une instabilité structurale comme nous aurions pu le croire après examen des boîtes cultivées un seul jour. Nous pouvons, au contraire, considérer que toutes

les colonies sont α-amylolytiques, mais que ce caractère ne détermine plus directement l'apparition d'un halo.
Le caractère α-amylolytique n'entraine plus automatiquement l'apparition d'un halo.
Pour comprendre ce phénomène, il faut s'intéresser aux différents mécanismes intervenant dans la formation d'un halo.
L'apparition d'un halo autour d'une colonie requiert la présence d' α-amylase dans le milieu. Celle-ci doit provenir, soit d'un phénomène de lyse d'une partie des bactéries de la colonie, qui "larguent" alors leur enzyme, soit d'un phénomène naturel de sécrétion de l' α-amylase par toutes les bactéries de la colonie. Dans les 2 cas, il est clair qu'une α-amylase sans peptide signal, vu sa localisation plus "interne", sortira moins facilement de la bactérie qu'une α-amylase normale exclusivement périplasmique.
Ce problème de la fuite plus ou moins grande de l' α-amylase dans le milieu constitue le problème dit de "leakage" et doit expliquer en partie l'apparition tardive des halos.

Les résultats montrent qu'un problème d'expression doit aussi intervenir. En effet la proportion des colonies entourées d'un halo est supérieure sur milieu comprenant l'inducteur (LBAA IPTG) que sur le milieu qui en est dépourvu (LBAA). On comprend aisément qu'en augmentant la production d' α-amylase, une quantité plus importante de celle-ci passe à l'extérieur et détermine donc un halo visible plus tôt.

Une observation reste toutefois à discuter.
En effet, même après plus de 2 jours de culture sur milieu LBAA IPTG, on remarque que certaines colonies ne présentent toujours pas de halos.
Si une colonie de ce type est prélevée, resuspendue, et étalée sur LBAA IPTG, elle ne donnera naissance, même après une longue incubation, qu'à des colonies dépourvues de halo.

Toutes les bactéries, composant la colonie dépourvue de halo que nous avons prélevée, semblent donc avoir hérité de cette incapacité de déterminer un halo.
Pour pouvoir définitivement écarter l'hypothèse d'une instabilité structurale, (mutant amp^R amy^-), dans le cas de ces colonies, 2 démarches devraient être envisagées.
D'une part il serait justifié d'étudier leur plasmide afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de tailles avec le plasmide attendu.
D'autre part, il serait très intéressant de doser l' α-amylase des transformants de ces colonies dépourvues de halos.

Bien que n'ayant pu effectuer ces 2 études, nous considérerons toutefois, au vu des expériences décrites précédemment que toutes ces colonies sont bien α-amylolytiques, et que c'est suite aux problèmes de "leakage" et d'expression qu'elles ne déterminent pas de halo détectable. Quant aux justifications de l'absence de halo autour de ces colonies, alors que d'autres colonies, poussant sur la même boîte, en présentent un depuis longtemps, elles vont venir dans le point suivant.

Les transformants présentent une importante variabilité quant à la capacité de déterminer un halo.

Il reste encore à expliquer pourquoi, d'une manière générale, il y a une telle variabilité chez les transformants, dans la capacité à déterminer un halo. En effet, des transformants, poussant sur la même boîte, (et donc soumis aux mêmes conditions d'induction), ayant la même durée d'incubation, donnent pourtant des halos après des temps différents, (un jour, deux jours...), voire n'en donnant pas du tout (ex. les colonies décrites ci-dessus).

Plusieurs explications peuvent être proposées.
Entre autres, on sait que ces transformants α-amylolytiques, même cultivés sur un même milieu ne vont pas exprimer leur gène de la même manière.

En effet, si on contrôle la quantité d'inducteur (IPTG) et de glucose dans le milieu, on ne contrôle absolument pas les facteurs : nombre de copies du pUC et du facteur F (importante variance de ces nombres de copies autour d'une valeur moyenne). Les valeurs prises par ces nombres de copies détermineraient, bien entendu, une production variable d' α-amylase, et donc une capacité variable de déterminer un halo.

Il semble que l'on puisse faire intervenir aussi des différences de "leakage" entre les transformants qui seraient liés à des différences d'état physiologique des bactéries. Toutefois, il n'y a pas vraiment d'explications satisfaisantes à ce sujet.

En résumé, ce seraient donc ces différences de "leakage" et d'expression de l' α-amylase, de transformants à transformants, qui justifient la présence, sur une même boîte, de colonies entourées d' halo alors que d'autres n'en ont toujours pas.

3.14.6 Etude de la stabilité en milieu liquide

- 3 expériences de culture liquide (en milieu 2XTY sans IPTG) ont été menées. La première sans pression sélective. La seconde avec une concentration en ampicilline de 50 µgr/ml au départ. La troisième avec 500 µgr/ml d'ampicilline ajoutés à différents moments au cours de la culture (0H, 11H, 13H, 14H30, 16H, 18H, 20H30, 23H, 25H). Dans les 3 cas, l'ensemencement a été réalisé à partir du même clone de transformants.

- proportion de transformants amp^R

Depuis le début jusqu'à la fin de la culture (36 heures de culture), la proportion de transformants résistants à l'ampicilline est de 100%. Ces transformants sont totalement stables pour le marqueur amp^R.

Proportion de transformants amy^+

Cette proportion est difficile à estimer vu que, comme nous l'avons dit au point précédent, la proportion de colonies amy^+ qui produit un halo est fonction de la durée d'incubation, des conditions d'incubation du milieu etc... Nous avons choisi de compter le nombre de halos sur des boîtes sélectives (LBAA sans IPTG) incubées 2 jours à 37°C, sachant que toute augmentation supplémentaire de la durée d'incubation n'entraîne plus la révélation de nouveaux halos.

Résultats

Du début jusqu'à la fin de la culture, (et ceci est vrai dans les 3 cas), 50% des transformants amp^R sur LBAA se sont révélés α-amylolytiques, (suivant le critère : présence d'une halo après 2 jours d'incubation). Des autres 50% restant, on ne peut rien affirmer quant à leur caractère α-amylolytique ou non (bien qu'il y ait toutes les raisons de croire, cfr 3. 14.5 , qu'il s'agit bien de colonies amy^+, mais sans halo détectable).
Le fait que le pourcentage de transformants, donnant des colonies entourées d'un halo, reste constant tout au long de la culture, qu'il y ait ou non pression sélective, signifie que ces transformants α-amylolytiques sont totalement stables pour les 2 marqueurs phénotypiques : amp^R amy^+.
En culture liquide, les transformants α-amylolytiques, (en tout cas ceux détectés comme tels, après 2 jours de culture sur boîte), sont donc tout à fait stables.

3.14.7 Conclusion

Nous avons créé, dans le but de contourner la charge physiologique, un gène d' α-amylase codant pour une enzyme dépourvue de peptide signal. Ce gène a été inséré dans un plasmide de sorte à pouvoir être sous la dépendance des signaux, et donc des mécanismes de régulation, de l'opéron "lac". Nous avons alors réalisé la transformation de la souche TG1 par ce plasmide, et obtenu des colonies présentant un halo. Par extraction et restriction du plasmide d'une de ces colonies, nous avons pu vérifier que ce plasmide était bien conforme à ce que nous attendions. En utilisant des milieux solides différemment inducteurs de l'opéron "lac", nous avons pu modifier la proportion des colonies amp^R amy^+ capables de déterminer un halo, ce qui revient à confirmer que le gène d' α-amylase est bien sous le contrôle du promoteur "lac".

Nous avons alors réalisé des dosages enzymatiques de l'activité de l' α-amylase dans les différents comparti ments cellulaires, ce qui a permis de montrer une localisation "plus interne" de cette α-amylase dépourvue de peptides leader. Cette nouvelle localisation doit contribuer à diminuer fortement la charge physiologique. Les premières études réalisées en milieu liquide ont confirmé cela, puisque les transformants α-amylolytiques, (détectés suivant notre critère), s'y sont révélés stables. En milieu solide, un point reste à éclaircir vu que certaines colonies ne présentent pas de halo même après plusieurs heures d'incubation. Nous avons cependant d'excellentes raisons de croire que ces colonies sont bien α-amylolytiques, mais ne déterminent pas de halo suite aux problèmes de leakage et d'expression de l' α-amylase.

Une remarque doit encore être formulée au sujet de la stratégie générale de clonage. En effet, pour permettre l'expression du gène d' α-amylase délété, nous avons été contrait de le placer sous la dépendance de signaux de contrôle du gène lac Z.

Ce faisant, nous avons évidemment changé le promoteur du gène d' α-amylase. Mais, comme nous avons travaillé en assurant des conditions d'induction importante du promoteur lac Z, (par la faible concentration en glucose du milieu, par la présence d'IPTG), nous pouvons considérer que ce promoteur s'est comporté avec une force semblable à celle du promoteur original du gène de l' α-amylase. Nous ne devons donc pas avoir introduit de différences. Toutefois, pour rendre cette expérience tout à fait probante, il serait intéressant de réaliser une expérience contrôle avec un gène d' -amylase intact, (comportant sa séquence signal), qui serait cloné de la même manière derrière les signaux de lac Z (dans le pUC9). Les transformants hébergeant ce plasmide contrôle, produiraient une α-amylase à nouveau périplasmique, c'est-à-dire subiraient à nouveau l'effet d'une charge métabolique, et devraient donc se révéler instable.

4. CONCLUSIONS GENERALES

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes attaché à décrire le phénomène d'instabilité lié aux transformants α-amylolytiques d' E. coli dont nous disposions.

En l'absence de pression sélective, il s'avère que des transformants α-amylolytiques mis en culture, tant sur milieu solide qu'en milieu liquide, donnent naissance à une population de bactéries composée essentiellement de révertants. Le processus généralement invoqué pour expliquer ce comportement fait intervenir une instabilité ségrégationnelle, qui entraîne l'apparition de révertants lors des divisions de transformants, et une croissance de ces révertants qui, favorisés par un taux de croissance plus rapide que celui des transformants, deviennent rapidement prédominants.
Nous avons alors cherché à remédier à ce problème en travaillant en présence d'ampicilline, ce qui revient à établir une pression sélective en faveur des transformants. Même dans ces conditions, une apparition brutale de révertants se produira systématiquement à un stade précis de la croissance des transformants.
Vu la présence d'antibiotique empêchant la multiplication des révertants, l'augmentation rapide de leur proportion doit dépendre d'un phénomène d'instabilité ségrégationnelle particulièrement marqué, mais aussi, vu la rapidité de cette augmentation, d'un phénomène de lyse préférentielle des transformants.

Disposant de toutes ces informations, nous avons cherché à comprendre les causes de l'instabilité ségrégationnelle (et, bien entendu, du phénomène de lyse qui lui est associé). Ceci nous a conduit à construire un modèle selon lequel l'instabilité résulterait de la charge que déterminerait le plasmide recombinant pour la bactérie hôte. Cette charge, liée à la présence du gène de l' α-amylase serait, d'une part métabolique (perturbation de l'"économie" cellulaire liée à la présence d'un promoteur fort

devant le gène), et d'autre part physiologique (perturbation de la physiologie bactérienne due à l'accumulation d'α-amylase dans l'espace périplasmique).
Toute diminution de la charge, que ce soit au niveau métabolique, (diminution de l'expression du gène), ou physiologique, (changement de localisation de l'α-amylase), devrait donc entraîner une augmentation de la stabilité.
Des arguments en faveur de cette hypothèse ont été fournis par la mise en évidence de 2 types de mutants, résultant de l'instabilité structurale, qui sont totalement stables et qui sont effectivement libérés d'une partie de la charge que constitue la plasmide recombinant pour la bactérie. Les mutants stables du premier type n'ont pas d'activité α-amylolytique, ce qui doit diminuer très fortement la charge globale du plasmide. Les mutants stables du second type, conservent l'activité α-amylolytique, mais semblent capables de sécréter l'α-amylase dans le milieu. Celle-ci ne s'accumulerait donc plus dans le périplasme, en conséquence de quoi, la charge physiologique serait éliminée.

Encouragé par ces arguments en faveur de notre modèle, nous avons alors conçu une expérience destinée à tester directement notre modèle. Celle-ci vise à diminuer, par manipulation du gène d'α-amylase, l'importance du fardeau α-amylolytique pour la bactérie, ce qui doit résulter, si le modèle est correct, en une stabilité accrue des transformants. Plutôt que de diminuer l'importance du fardeau métabolique, ce qui reviendrait à réduire l'expression du gène d'α-amylase, nous avons choisi de contourner la charge physiologique, et cela, en créant une α-amylase à localisation cytoplasmique. Pour y arriver, nous avons délété le gène de l'α-amylase de sa partie amont qui code pour le peptide signal de la protéine. Le gène ainsi manipulé, a été introduit dans un vecteur, sous le contrôle des signaux du gène lac Z.
Des transformants porteurs de ce plasmide ont été obtenus.
Des dosages de l'activité de l'α-amylase dans les différents

compartiments cellulaires de ces transformants ont mis en évidence une distribution inhabituelle de l'enzyme.
Plutôt que de se retrouver majoritairement dans le périplasme (cas d'une amylase avec peptide signal), l'amylase ici, est répartie entre le périplasme et le cytoplasme. Cette nouvelle localisation doit contribuer à diminuer fortement la charge physiologique.
Comme attendu, ces nouveaux transformants apparaissent stables tant en milieu solide, qu'en milieu liquide. Cependant, en toute rigueur, d'autres expériences devraient être réalisées afin de confirmer ces premières observations.

Que conclure de tout ceci ?

L'existence de mutants naturellement stables, et le caractère stable des transformants α-amylolytiques produisant une enzyme à nouvelle localisation, semblent bien confirmer notre modèle postulant l'existence de 2 charges, déterminées par le plasmide, et qui seraient à l'origine de l'instabilité importante de nos transformants α-amylolytiques.

Généralisation et évaluation des différents moyens pour stabiliser des transformants.

- Dans la plupart des cas, le phénomène d'instabilité ségrégationnelle est très peu marqué, et le problème vient juste de la prolifération favorisée des quelques révertants apparus, prolifération que les rendra prédominants.
Si on empêche la prolifération des révertants par le maintien d'une pression sélective, (antibiotique, utilisation d'un plasmide porteur d'une fonction nécessaire à la bactérie...), le problème est éliminé.
Cette faible instabilité ségrégationnelle étant souvent liée à un problème de partition, on pourra même, le plus souvent, rendre le plasmide tout à fait stable en l'absence de pression sélective en lui insérant une des régions de contrôle de partition du type : pAR A, pAR B....

•Par contre, dans le cas de nos transformants α-amylolytiques, le problème ne pourra être résolu par aucune de ces 2 stratégies. Le maintien d'une pression sélective, bien qu'empêchant la prolifération des révertants, n'empêchera pas, (cfr p. 60), l'apparition de ségrégants durant la croissance, par suite d'une forte instabilité ségrégationnelle.
D'autre part, comme cette instabilité est liée à un phénomène de charge déterminée par le plasmide recombinant, on peut prévoir que l'addition d'une région de partition au plasmide limitera peut-être, mais n'empêchera certainement pas l'apparition de révertants. L'apparition de ceux-ci ne sera empêchée qu'à la condition de pouvoir éliminer les causes de l'instabilité ségrégationnelle, à savoir les perturbations du métabolisme et de la physiologie de la bactérie hôte par le plasmide. Ceci est rendu possible, comme nous l'avons vu, en manipulant le gène cloné, afin d'en réduire l'expression, ou afin de modifier la localisation de la protéine pour laquelle il code.

Dès lors, dans tous les cas où l'instabilité est très importante et ne peut être résolue par le maintien d'une pression sélective, il faudra essayer de déterminer, au vu des caractéristiques du plasmide recombinant (nombre de copies, promoteur du gène cloné et localisation du produit de clui-ci), si celui-ci ne détermine pas un fardeau pour la bactérie hôte capable d'entraîner l'instabilité. S'il s'avère qu'il en est ainsi, il sera dès lors possible d'appliquer une stratégie semblable à celle utilisée pour les transformants α-amylolytiques, c'est-à-dire de diminuer, par manipulation du gène cloné, la charge du plasmide, et par là même l'instabilité.

PERSPECTIVES

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

- Une première catégorie comprend toutes les expériences destinées à mieux comprendre certains phénomènes que nous avons observés, et qui n'ont pas pu recevoir d'explications théoriques précises.

    - Ainsi, dans les cultures liquides avec pression sélective continue, le déclenchement de l'instabilité ségrégationnelle, associé à un phénomène de lyse, nécessiterait une étude approfondie. Il faudrait notamment préciser la cause du déclenchement soudain de ces 2 phénomènes, à un stade précis de la croissance. Nous avions postulé que la charge, déterminée par le plasmide, était relative en fonction de l'état physiologique de la bactérie. Toutefois, en l'absence de confirmation, la question de la cause reste posée.

    - Le phénomène de lyse devrait aussi être étudié. Le déclenchement de cette lyse peut, bien sûr, coincider avec un état physiologique de la bactérie plus sensible à la charge du plasmide, mais cette explication n'est pas suffisante. Il serait, à ce sujet, intéressant de tester l'influence de l'augmentation de la concentration en α-amylase dans le milieu sur ce phénomène de lyse.

- Un deuxième groupe d'expériences pourrait, quant à lui, servir à caractériser les différents mutants stables qui ont été fournis spontanément par la nature. D'un point de vue fondamental tout d'abord, afin de préciser quels réarrangements ils ont subi, et comment ceux-ci ont pu entraîner l'arrêt de l'expression du gène d'α-amylase, (mutants amp^R amy^-), ou bien la sécrétion d'enzyme dans le milieu, (mutants stables amp^R amy^+)
  D'un point de vue appliqué, l'étude des mutants stables amp^R amy^+

est pleinement justifiée. Ces variants sont stables, produisent toujours de l' α-amylase, et, qui plus est, celle-ci est sécrétée presque totalement dans le milieu, ce qui présente plusieurs avantages notamment au point de vue de la récupération, (possible en continu), et de la purification.

- Le troisième type d'expériences, pouvant être réalisé, tendrait plutôt à tester une potentielle application du gène d' α-amylase que nous avons créé. Ce gène présente en effet 2 avantages. Tout d'abord, la protéine pour laquelle il code ne comprend plus de peptide signal, et n'entraîne donc plus de perturbations physiologiques importantes. Ensuite, le fait que cette α-amylase reste "prisonnière" de la bactérie (cfr peu d'activité détectée dans le milieu; "leakage" très faible entraînant, comme nous l'avons vu, une apparition très lente des halos), permet une concentration rapide de l'enzyme produite par des transformants en culture liquide. En effet, en centrifugeant les cellules, on récolte un culot dans lequel toute l'activité α-amylolytique se retrouve.
  Dès lors, disposant d'un pareil gène, nous pourrions être tenté de concevoir un système, basé sur ce gène, visant à surexprimer l' α-amylase, cela dans un but appliqué. On peut se demander toutefois si la surproduction de cette protéine, en augmentant du même coup la charge métabolique, ne va pas entraîner de nouveaux problèmes de stabilité. Pour tester cette hypothèse, il serait possible par exemple, de cloner le gène d' α-amylase (sans peptide signal) dans un vecteur à promoteur fort régulable. Nous disposons déjà d'un vecteur de ce type, en l'occurence le pLK57. Il comprend le promoteur fort pL du phage λ, régulable par le répresseur thermosensible CI produit par la souche NF1 d'E. coli. En conditions permissives (28°C), le niveau d'expression du gène contrôlé par le promoteur pL n'est pas détectable (répresseur CI actif).

Par contre, à partir de 34°C, le niveau d'expression augmente progressivement jusqu'à 42°C, où la force du promoteur est telle que la protéine produite sous le contrôle de celui-ci représentera bientôt 30-40% de la quantité totale de protéines produites dans la cellule.

En pratique, on réalisera une construction comprenant le plasmide pLK57 dans lequel on aura inséré le gène d'α-amylase dépourvu de séquence signal juste à la suite du promoteur pL. Toutefois, pour assurer l'expression du gène, il est nécessaire d'insérer entre le gène ainsi cloné et le promoteur régulable, un site d'initiation du ribosome.
Nous disposons de ce matériel au laboratoire, et avons déjà commencé les étapes préliminaires à la réalisation de ce travail (purification du pLK57, ...).

1. AUSTIN S., ABELES A. (1983) Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. J. Mol. Biol. 169, 353-372.

2. AUSTIN S., ABELES A. (1983) Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. J. Mol. Biol. 169, 373-387.

3. BENSON S.A., HALL M.N., SILHAVY T.J. (1985) Genetic analysis of protein export in Escherichia coli K 12. Ann. Rev. Biochem. 54, 101-134.

4. BERNARD H.U., REMAUT E., HERSHFIELD V., DAS H., HELINSKI D. (1979) Construction of plasmid cloning vehieles that promote gene expression from the bacteriophage lambda Pl promoter. Gene, 5, 59-76.

5. BOLIVAR F., BETLACH M., HEYNEKER H., SHINE J., RODRIGUEZ R., BOYER H. (1977) Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 74, n° 12, pp 5265-5269. Biochemistry.

6. BREDA P. (1979) Plasmids, Freeman (eds).

7. COLEMAN J., INOUYE M., NAKAMURA K. (1985). Mutations upstream of the ribosome-binding site affect translational efficiency. J. Mol. Biol. 181, 139-143.

8. CORNELIS P., DIGNEFFE C., WILLEMOT K. (1982). Cloning and expression of a bacillus coagulans amylase gene in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 186, 507-511.

9. GERDES K., LARSEN J.E.L., MOLIN S. (1985). Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. J. Bacteriology 161, 1, 292-298.

10. GRAY O., CHANG S. (1981). Molecular cloning and expression of Bacillus licheniformis β-lactamase gene in Escherichia coli and Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 145, 422-428.

11. GRAY G., MAINZER S., REY M., LAMSA M., KINDLE K., CARMONA C., REQUARDT C. (1986). Structural genes encoding the thermophilic α-amylases of Bacillus stearothermophilus and Bacillus licheniformis. J. Bacteriology, 635-643.

12. HELLINGS R., KINNEY T., ADAMS J. (1981). The maintenance of plasmid-containing organisms in population of Escherichia coli. J. of General Microbiology, 123, 129-141.

13. IMANAKA T., TSUNEKAWA H., AIBA S. (1980). Phenotypic stability of trp operon recombinant plasmids in Escherichia coli. J. General Microbiol. 118, 253-261.

14. JONES J.M., PRIMROSE S.B., ROBINSON A., ELLWOOD D.C. (1980)
Maintenance of some col E1 - type plasmids in chemostat culture.
Molec. Gen. Genet. 180, 579-584.

15. JOYET P., GUERINEAU M., HESLOT H. (1984). Cloning of a thermostable α-amylase gene from Bacillus licheniformis and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis.
FEMS Microbiol. Letters 21, 353-358.

16. KALLIO P. (1986). The effect of the inverted repeat structure on the production of the cloned Bacillus amyloliquefaciens α-amylase.
Eur. J. Biochem. 158, 491-495.

17. KALLIO P., ULMANEN I., PALVA I. (1986). Isolation and characterization of a 2.2 kb operon preceding the α-amylase gene of Bacillus amyloliquefaciens.
Eur. J. Biochem. 158, 497-504.

18. KLEIMAN M.J., GINGOLD E.B., STANBURY P.F. (1986). The stability of the yeast plasmid pJDB 248 depends on growth rate of the culture.
Biotechnology letters vol. 8, n° 4, 225-230.

19. KOPECKO D.J., BREVET J., COHEN S.N. (1976). Involvement of multiple translocating DNA segments and recombinational hotspots in the structural evolution of bacterial plasmids.
J. Biol. 108, 333-360.

20. LAUFFENBURGER D.A. (1987). Bacteriocin production as a method of maintaining plasmid-bearing cells in continious culture.
Tibtech. vol. 5, 87-89.

21. LUGTENBERG B. (1981). Composition and function of the outer membrane of Escherichia coli.
Tibs octobre 1981, 262-266.

22. MAGNIEN E., GOFFEAU A. (1986). Instabilité des plasmides.
Biofutur avril 1986.

23. MEACOCK P.A., COHEN N. (1980). Partitioning of bacterial plasmids during cell. Division : a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance.
Cell vol. 20, 529-542.

24. MIKI T., EASTON A.M., ROWND R.H. (1980). Cloning of replication, incompatibility, and stability functions of R plasmid NR1.
J. Bacteriology, 141, 1, 87-99.

25. MOLIN S., NORDSTROM K. (1980). Control of plasmid R1 replication : functions involved in replication, copy number control, incompatibility, and switch-off of replication.
J. Bacteriology, 141, 1, 111-120.

26. MUNSON L.M., STORMO G.D., NIECE R.L., REZNIKIFF W.S. (1984). Lac Z translation initiation mutations.
J. Biol. 177, 663-683.

27. NILSSON J., SKOGMAN G. (1986). Stabilisation of Escherichia coli tryptophan-production vectors in continuous cultures : a comparison of three different systems.
Biotechnology, 4, october 1986, 901-903.

28. OGURA T., HIRAGA S. (1983). Partition mechanism of F plasmid : two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition.
Cell, 32, 351-360.

29. OGURA T., HIRAGA S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation.
P.N.A.S., 80, 4784-4788.

30. OKAMOTO T., FUJITA Y., IRIE R. (1982). Protoplast formation and regeneration of streptococcus lactis cells.
Agric. Biol. Chem., 47, 2, 259-263.

31. ORTLEPP S.A., OLLINGTON J.F., McCONNELL D.J. (1983). Molecular cloning in Bacillus subtilis of a Bacillus licheniformis gene encoding a thermostable α-amylase.
Gene, 23, 267-276.

32. PIGGOTT R.P., ROSSITER A., ORTLEPP S.A., PEMBROKE J.T., OLLINGTON J.F. (1984). Cloning in Bacillus subtilis of an extremely thermostable α-amylase : comparison with other cloning heatstable α-amylase.
Biochemical and Biophysical research communications, 122, 1, 175-183.

33. PRITCHARD R.H. (1978). Control of DNA replication in bacteria. In DNA Synthesis : Present and Future. I. Molineux and M. Kohiyama, eds. (New York : Plenum Publishing Corp.), 1-26.

34. REMAUT E., STANSSENS P., FIERS W. (1981). Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. Gene, 15 , 81-93.

35. ROOD J.I., SNEDDON M.K., MORRISON J.F. (1980). Instability in tyr R strains of plasmids carrying the tyrosine operon : isolation and characterization of plasmid derivatives with insertions or deletions. J. Bacteriology, 144, 2, 552-559.

36. SCHERRER R. (1984). Gram's staining reaction, Gram types and cell walls of bacteria. Elsevier science publishers B.V.

37. SJÖSTROM M., WOLD S., WIESLANDER A., RILFORS L. (1987). Signal peptide amino acid sequences in Escherichia coli contain information related to final protein localization. A multivariate data analysis. Embo J., 6, 3, 823-831.

38. SUMMERS D.K., SHERRATT D.J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability : Col E1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. Cell, 36, 1097-1103.

39. STEPHENS M.A., ORTLEPP S.A., OLLINGTON J.F., McCONNEL D.J. (1984). Nucleotide sequence of the 5' region of the Bacillus licheniformis α-amylase gene : comparison with Bacillus amyloliquefaciens gene. J. Bacteriology, 158, 1, 369-372.

40. TAKKINEN K., PETTERSSON R.F., KALKKINEN N., PALVA I., SODERLUND H., KAARIAINEN L. (1983). Amino acid sequence of α-amylase from Bacillus amyloliquefaciens deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. J. Biological Chemistry, 258, 2, 1007-1013.

41. TOMIZAWA J.I., OHMORI H., BIRD R.E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. P.N.A.S., 74, 5, 1865-1869. Biochemistry.

42. TSUNEKAWA H., TATEISHI M., IMANAKA T., AIBA S. (1981). TnA-directed deletion of the trp operon from RSF2124-trp in Escherichia coli. J. Microbiology, 127, 93-102.

43. VEHMAANPERA J.O., KORHOLA M.P. (1986). Stability of the recombinant plasmid carrying the Bacillus amyloliquefaciens α-amylase gene in Bacillus subtilis.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 456-461.

44. WATSON T.G., PINCHES A., LOUW M.E. (1986). Effect of growth rate on the maintenance of a recombinant plasmid in Bacillus subtilis.
Biotechnology letters, 8, 10, 687-690.

45. WARNES A., STEPHENSON J.R. (1986). The insertion of large pieces of foreign genetic material reduces the stability of bacterial plasmids.
Plasmid, 16, 116-123.

46. WILLEMOT K. (1980). Etude d'une gène amylase de Bacillus megaterium cloné dans Escherichia coli, mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme spécial de génétique, laboratoire de cytogénétique, Université Catholique de Louvain.

47. WILLEMOT K. (1986). Etude physiologique et génétique de deux α-amylases de Bacillus (B. megaterium et B. coagulans) dont les gènes ont été clonés chez Escherichia coli et Bacillus subtilis. Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences, laboratoire de génétique microbienne, Université Catholique de Louvain.

48. WILLEMOT K., CORNELIS P. (1983). Growth defects of Escherichia coli cells which contain the gene of an α-amylase from Bacillus coagulans on a multicopy plasmid.
J. Gen. Microbiol., 129, 311-319.

49. YANG M., GALIZZI A., HENNER D. (1983). Nucleotide sequence of the α-amylase gene from Bacillus subtilis.
Nucleic acid research, 11, 2, 237-249.

50. Le compte rendu de la session organisée sur le thème de l'instabilité des plasmides à Héraklion du 16 au 18 octobre 1985, par la commission des communautés européennes.