

2M11.2589.8 I

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Obtention d'une banque génomique de *Staphylococcus aureus*
dans des vecteurs plasmidiques**

par

Mihaela-Irinel Pantalon

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue d'obtention du grade de
Maitre ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

NOVEMBRE, 1997

©Mihaela-Irinel Pantalon



w

4

058

1998

v.027

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Obtention d'une banque génomique de *Staphylococcus aureus*
dans des vecteurs plasmidiques**

présenté par:

Mihaela-Irinel Pantalon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury: **Dr. Patrick Hallenbeck**

Directeur de recherche: **Dr. Alexandre Sarsman**

Membre de jury: **Dr. George Szatmari**

Mémoire accepté le:.....01.....12.....1997

Sommaire

Le projet de séquençage du génome humain a incité les chercheurs à s'attaquer également aux génomes des bactéries. Considérées comme des véritables modèles en quête de la compréhension des mécanismes de la vie, plusieurs bactéries ont été prises en étude. On s'est proposé le séquençage complet de leurs génomes, ce qui demande comme étape préparatoire la construction de plusieurs banques génomiques.

Notre projet se propose la construction d'une banque génomique de *S. aureus*, bactérie pathogène très répandue, peu connue du point de vue de la génétique moléculaire et qui ne fait pas partie des micro-organismes prises comme modèles.

En vue de construction de la banque génomique, l'ADN chromosomique de *S. aureus* a été digéré partiellement avec l'endonucléase de restriction *Sau3AI*. Les fragments plus grands de 9 kpb ont été séparés du reste de matériel par ultracentrifugation en gradient de sucrose. La fraction obtenue a été clonée dans des vecteurs plasmidiques comme: pUC18 et pBluescript II SK⁺ et par la suite électrotransformée dans des cellules DH5 α . Les plasmides recombinants provenant de 3.000 clones ont été analysés et nous avons retenu un nombre de 800 clones, porteurs de fragments chromosomiques de taille d'au moins 9 kpb. Ils ont formé notre banque génomique; celle-ci a été caractérisée et ensuite conservée à long terme. La taille moyenne des fragments insérés est de 9,85 kpb et la probabilité de représentation du génome de *S. aureus* est de 94,2%.

La banque génomique construite a été utilisée pour localiser des clones contenant des fragments chromosomiques qui hybridait avec trois sondes disponibles. Il s'agit des sondes provenant de deux régions chromosomiques de *S. aureus* clonées et séquencées dans notre laboratoire. Les deux régions chromosomiques abritent des gènes respiratoires de la bactérie.

Pour chaque sonde utilisée nous avons trouvé dans la banque génomique une ou plusieurs clones qui hybridait avec la sonde. Les plasmides recombinants de cinq de ces clones ont été localisés par rapport à la carte de la région chromosomique

respectives et nous avons tracé leur carte de restriction. Ces plasmides contiennent des fragments qui élargissent la région chromosomique, déjà clonée dans notre laboratoire, de 2,6 jusqu'à 6,3 kpb.

Mots clés: *S. aureus*; banque génomique; vecteurs plasmidiques; clonage génique.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE TITRE	I
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY	II
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1. 1. <i>Staphylococcus aureus</i> ~ organisation génétique	5
1. 1. 1. <i>Étapes en vue d'élaboration de la carte génétique de Staphylococcus aureus</i>	5
1. 1. 2. <i>Carte physique du chromosome de Staphylococcus aureus</i>	11
1. 1. 3. <i>Corrélation entre la carte physique et la carte génétique</i>	14
1. 2. Banques génomiques	17
1. 2. 1. <i>Construction d'une banque génomique</i>	19
1. 2. 2. <i>Banques génomiques en E. coli et en autres bactéries</i>	25
1. 2. 3. <i>Banques génomiques ordonnées</i>	29
1. 3. Banques génomiques en S. aureus et leur utilisation en vue de cloner de nouveaux gènes de la bactérie	32
CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
2. 1. Souches bactériennes, plasmides et phages utilisés	39
2. 2. Extraction chromosomique dans le cas de S. aureus	41

2. 2. 1. <i>Première méthode</i>	42
2. 2. 2. <i>Deuxième méthode</i>	43
2. 3. Électrophorèse en champ inversé (FIGE)	44
2. 3. 1. <i>Étapes de l'analyse FIGE</i>	47
2. 3. 2. <i>Préparation d'un lysat phagique T4 de E. coli</i>	47
2. 3. 3. <i>Extraction de l'ADN du phage T4</i>	49
2. 4. Digestion partielle du chromosome bactérien	49
2. 4. 1. <i>Mise au point de la digestion partielle avec l'enzyme Sau3AI</i>	50
2. 4. 2. <i>Digestion partielle à grande échelle</i>	51
2. 4. 3. <i>Utilisation des enzymes de restriction</i>	51
2. 4. 4. <i>Purification de l'ADN</i>	52
2. 5. Gradient de sucrose	53
2. 6. Ligation des inserts dans un vecteur plasmidique	54
2. 6. 1. <i>Utilisation de la ligase</i>	55
2. 6. 2. <i>Utilisation du kit <u>Ready-To-Go pUC18 BamHI/BAP + Ligase</u></i>	55
2. 7. Transformation des cellules de E. coli	56
2. 7. 1. <i>Électrotransformation des cellules</i>	56
2. 7. 2. <i>Préparation des cellules électrocompétentes de E. coli</i>	57
2. 8. Extraction plasmidiques	58
2. 8. 1. <i>Méthode par maxi-lyse alcaline</i>	58
2. 8. 2. <i>Méthode par ébullition ("boiling")</i>	60
2. 8. 3. <i>Méthode par éclatement ("cracking")</i>	61
2. 9. Préparation des membranes et hybridation avec une sonde radioactive	61
2. 9. 1. <i>Technique de "Dot-Blot"</i>	62
2. 9. 2. <i>Technique de transfert "Southern"</i>	63
2. 9. 3. <i>Hybridation des membranes</i>	65
2. 9. 4. <i>Préparation de l'ADN de sperme de saumon</i>	66
2. 9. 5. <i>Marquage aléatoire à la radioactivité</i>	67
2. 9. 6. <i>Préparation d'une colonne de "Sephadex G-50 DNA grade"</i>	69
2. 10. Utilisation de la technique de PCR pour préparation des sondes d'ADN	69
2. 11. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose	71
2. 11. 1. <i>Méthode par électroélution</i>	71
2. 11. 2. <i>Méthode par extraction avec phénol</i>	72

2. 12. Conservation des souches à court et à long terme	73
2. 13. Mode de préparation de diverses solutions utiles	74
2. 14. Composition des milieux de culture utilisés	76
CHAPITRE 3. RÉSULTATS	77
3. 1. Obtention et préparation de l'ADN de <i>S. aureus</i> en vue de clonage	78
3. 2. Réalisation de la banque génomique en <i>S. aureus</i>	81
3. 3. Caractérisation de la banque génomique construite	82
3. 4. Organisation de la banque génomique en vue de criblage	84
3. 5. Criblage de la banque génomique	88
3. 6. Cartes de restriction pour quelques clones de la banque	108
CHAPITRE 4. DISCUSSION	115
CONCLUSION	120
RÉFÉRENCES	121
REMERCIEMENTS	138

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Description et provenance des souches bactériennes, plasmides et phages utilisés	40
Tableau II.	Répartition des plasmides recombinants de la banque génomique en fonction de la taille du fragment chromosomique contenu	82
Tableau III.	Liste des oligonucléotides utilisés pour l'obtention des sondes <i>PCR</i>	87

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les trois régions chromosomiques connues de <i>S. aureus</i>	7
Figure 2. Carte chromosomique de <i>S. aureus</i> NCTC8325	9
Figure 3. Carte physique et génétique de <i>S. aureus</i> NCTC 8325	13
Figure 4. Carte chromosomique de <i>S. aureus</i>	15
Figure 5. Étapes dans la construction d'une banque génomique	18
Figure 6. Schema-bloc de l'installation d'électrophorèse en champ inversé	46
Figure 7. Photo du gel de migration de l'ADN chromosomique de <i>S. aureus</i>	80
Figure 8. (a,b,c,d,e,f,g,h) Film du criblage de la banque avec la sonde A	92
Figure 9. (a,b,c,d,e,f,g,h) Film du criblage de la banque avec la sonde B	96
Figure 10. (a,b,c,d,e,f,g,h) Film du criblage de la banque avec la sonde C	100
Figure 11. Film du transfert <i>Southern</i> de diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde A	104
Figure 12. Film du transfert <i>Southern</i> de diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde B	105
Figure 13. Film du transfert <i>Southern</i> de diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde C	106
Figure 14. Film du transfert <i>Southern</i> de diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde C	107
Figure 15. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #369	109

Figure 16. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #545	110
Figure 17. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #333	111
Figure 18. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #486	112
Figure 19. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #91	113
Figure 20. Carte de restriction de la région chromosomique de <i>S. aureus</i> clonée dans notre laboratoire et localisation par rapport à la carte de plusieurs fragments chromosomiques contenus par la banque génomique	114

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

App. Env. Microbiol.: Applied and Environmental Microbiology

Am.: ampicilline

ARN: acide ribonucléique

ATP: adénosine triphosphate

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

BHI (milieu): Brain Heart Infusion

⁰C: degré Celsius

Can. J. Microbiol.: Canadian Journal of Microbiology

E. coli: *Escherichia coli*

éd.(s): éditeur(s)

FEBS Letters: *Federation of European Biochemical Societies Letters*

IPTG: isopropyl-bêta-D-thiogalactopyranoside (inducteur du promoteur *lac*)

J. Bacteriol.: *Journal of Bacteriology*

J. Biol. Chem.: *Journal of Biological Chemistry*

J. Clin. Microbiol.: *Journal of Clinical Microbiology*

J. Gen. Microbiol.: Journal of General Microbiology

J. Mol. Biol.: Journal of Molecular Biology

J. Virol.: Journal of Virology

kDa: kilodaltons

kpb: kilopaires de base d'ADN

Meth. in Enzymol.: Methods in Enzymology

Microbiol. Rev.: Microbiological Reviews

Mol. Microbiol.: Molecular Microbiology

mV: millivolt

NaCitrate: citrate de sodium

Nucl. Acids Res.: Nucleic Acids Research

p: plasmide

pb: paire de base d'ADN

pfu: *plaque-forming unit*

P.M.: poids moléculaire

Proc. Natl. Acad. Sci. USA: Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America

Res. Microbiol.: Research in Microbiology

rpm: revolution per minute

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SDS: sodium dodecyl sulfate

S. typhimurium: *Salmonella typhimurium*

TBE (solution): solution de Tris-borate-EDTA

Tn.: transposon

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (substrat de la β -galactosidase qui est coloré lorsque scindé)

INTRODUCTION

Comparé comme défi à la descente sur la Lune, le Projet Génome Humain (HUGO) représente sans doute une entreprise audacieuse de notre siècle. Il impressionne par son ampleur, car on se propose le séquençage d'un génome comportant environ 3 milliards de paires de bases et aussi comme effort et participation concertée, car il réunit un nombre impressionnant d'équipes de recherche répandues autour du globe.

Le projet se propose comme principal but la compréhension de l'organisation et de l'expression du génome humain, son interprétation. On espère pouvoir déchiffrer l'information qui se cache derrière la séquence d'ADN et ainsi identifier plus rapidement les gènes dont les défauts de structure ou d'expression sont à l'origine des pathologies à composantes génétiques; on espère pouvoir comprendre des maladies comme le cancer, l'Alzheimer, la schizophrénie, qui écourte la vie des millions de gens. (Watson, 1990).

Dès le commencement du projet, la communauté scientifique était consciente que les génomes des petits organismes pouvaient apporter une quantité importante d'information biologique extrapolable au génome humain. Ils pouvaient constituer donc des modèles pour l'étude des questions fondamentales en biologie et génétique. Beaucoup plus simples et donc plus faciles à analyser, ces structures cellulaires contiennent toutes les informations nécessaires à la vie. La séquence de leur génome permettrait de préciser quels sont les éléments essentiels au fonctionnement harmonieux des organismes, de distinguer plus facilement les séquences codantes pour protéines, des séquences non codantes.

Actuellement, un nombre important d'équipes s'intéressent aux petits génomes. Une attention spéciale est accordée au colibacille *Escherichia coli* et à la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais la liste des génomes en cours d'être étudiés est beaucoup plus longue.

La bactérie *Bacillus subtilis*, elle aussi fait l'objet de recherche pour plusieurs laboratoires européens et japonais. Bactérie Gram-positif non pathogène, elle représente un excellent modèle pour l'étude des bactéries pathogènes comme: *Listeria*, les staphylocoques ou les streptocoques. De plus, le séquençage en parallèle avec un Gram-négatif comme *E. coli* devient très intéressant, parce qu'il pourrait élucider l'évolution au niveau moléculaire et expliquer la divergence entre les Gram-positifs et les Gram-négatifs produite il y a 2 milliards d'années. (Woese, 1987)

Bactérie Gram-positif considérée comme pathogène majeure pour les humains, responsable de plusieurs types d'infections allant jusqu'à la septicémie fatale et aussi causant des graves empoisonnements alimentaires, *Staphylococcus aureus* ne fait pas partie des modèles d'étude choisis. Des morceaux de son génome ont été déjà séquencés et sont disponibles dans des banques de données informatiques, mais les données restent fragmentaires. Les gènes identifiés et séquencés jusqu'à présent visent essentiellement l'aspect pathogène de la bactérie, la production d'un grand nombre de facteurs de surface et de protéines sécrétées ainsi que la résistance multiple aux antibiotiques développée par la bactérie. L'étude de la biologie de la bactérie présente beaucoup de lacunes et il y a encore beaucoup de régions du génome à déchiffrer. Sans doute, beaucoup plus riche en enseignements et très utile pour rassembler les informations qu'on a acquis jusqu'à présent, serait le séquençage du génome entier.

*

Le présent travail se propose de construire une banque génomique pour la bactérie *Staphylococcus aureus*. Dans le chapitre qui suit nous analyserons de près la biologie moléculaire de la bactérie et les étapes parcourues dans l'étude de son génome. Nous discuterons aussi les méthodes et les étapes de construction d'une banque génomique, tout en nous rapportant aux exemples offerts par la littérature de spécialité.

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. 1. *Staphylococcus aureus*~ organisation génétique

1. 1. 1. *Étapes en vue d'élaboration de la carte génétique de Staphylococcus aureus*

Les pas préliminaires, faits dans la réalisation d'une carte génétique pour *Staphylococcus aureus*, trouvent leurs origines dans les premières expériences de transduction. Découverte par Zinder et Lederberg chez *S. typhimurium* (1952) et par Lennox chez *E. coli* (1955), la transduction généralisée a été rapportée pour la première fois chez *S. aureus* en 1959. (Morse, 1959) On démontre à ce moment l'évidence d'un transfert de matériel génétique de *S. aureus*, par le truchement d'un bactériophage; les premiers gènes transférés sont ceux de résistance aux antibiotiques comme la streptomycine et la novobiocine.

Dans les années suivantes les expériences de transduction se poursuivent en visant des gènes impliqués dans les voies biosynthétiques de la bactérie. Dix mutants tryptophane-dépendants sont étudiés et les recherches aboutissent à la cartographie de deux loci: un locus impliqué dans la production de l'indole, l'autre dans la conversion de l'indole en tryptophane. (Ritz et Baldwin, 1962) On réalise à ce moment que l'ordre des sites chromosomiques correspond à la séquence des réactions chimiques contrôlées par ces sites. La transduction pourrait donc devenir une technique fiable pour cartographier les loci impliqués dans la synthèse des métabolites. Les études avancent dans cette direction, plusieurs régions du chromosome sont analysées, mais les relations existantes entre ces régions restent indéterminables. En effet, les possibilités de la méthode sont limitées, conséquence de la capacité limitée d'encapsulation des bactériophages. Cette capacité, comme a été démontré plus tard, varie entre 42 et 45 kpb. (Stewart et al., 1985) De plus, on remarque une certaine homogénéité des fragments transduits qui représente une caractéristique du chromosome de *S. aureus*. (Pattee et al., 1968) La transduction généralisée laisse la place à des nouvelles techniques capables de dépasser ces limitations; elle reste avec une certaine valeur pour

l'étude de l'organisation globale du chromosome et assez importante pour l'analyse de la structure fine.

Une nouvelle étape d'étude s'ouvre avec les premières expériences de transformation de *S. aureus* NCTC8325 (Lindberg et al., 1972) quand le développement d'une carte chromosomique devient un objectif majeur des recherches. Plusieurs caractères codés par des plasmides, comme résistance à pénicilline, erythromicine et cadmium, et aussi des caractères portés par des gènes chromosomiques sont utilisés comme marqueurs génétiques dans des expériences de transformation. À la suite de ces recherches, dix loci distincts impliqués dans différentes activités biosynthétiques et dans la résistance à la novobiocine sont localisés sur trois régions chromosomiques différentes. Les relations entre ces trois régions restent encore inconnues, mais il semble logique de croire que les trois régions représentent plutôt des segments du chromosome de la bactérie. L'apport de la transformation reste important grâce à l'hétérogénéité et la taille considérable des fragments d'ADN transformés.

D'une importance cruciale, pour la réalisation de l'objectif "carte chromosomique", a été l'isolation du transposon Tn551. Il s'agit d'un transposon de 5,2 kpb qui a été détecté pour la première fois dans le plasmide pI258 et qui code pour une résistance constitutive à l'érythromicine. (Novick et al., 1979, Berger-Bächi, 1983) Tn551 peut occuper une variété de sites chromosomiques en *S. aureus* en générant des mutations silencieuses ou auxotrophiques. Dans une première étape ses sites d'insertions sont cartographiés par rapport aux trois régions du chromosome de *S. aureus* déjà identifiées (voir Fig. 1). Par la suite, en utilisant un mutant thermosensible du plasmide pI258 développé par Novick, on réussit à inactiver plusieurs gènes biosynthétiques de la bactérie et ainsi à localiser sur le chromosome de nouveaux sites d'insertion de Tn551. La majorité de ces nouveaux sites se trouvent dans les trois régions du chromosome déjà cartographiées, ce qu'apporte plus de consistance à la

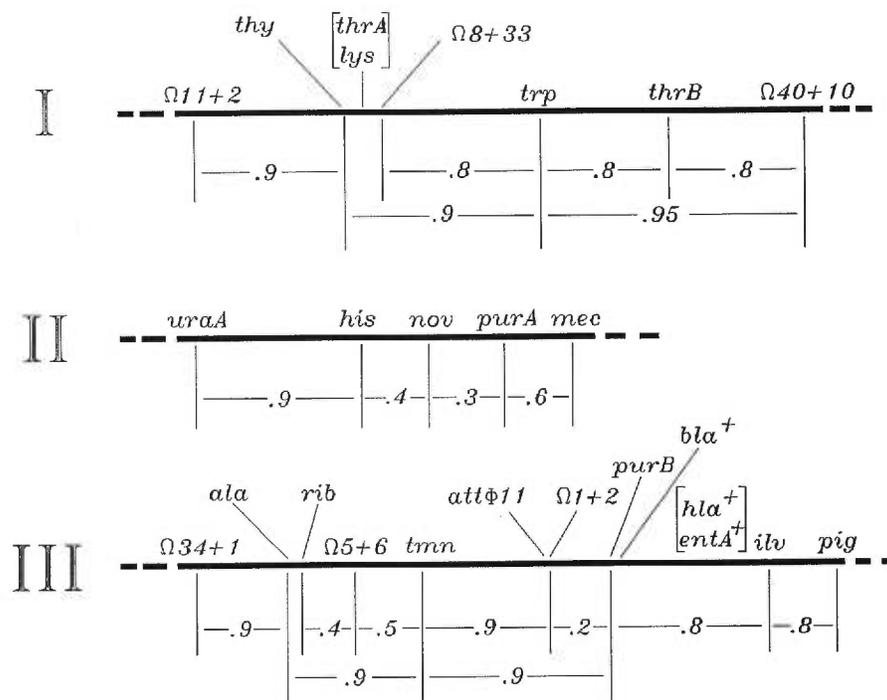


Figure 1. Les trois régions chromosomiques connues de *S. aureus*.
(référence: Pattee, 1981)

thèse que les trois régions représentent une portion substantielle du génome de *S. aureus*. (Pattee, 1981) Il est encore impossible à démontrer les relations existantes entre ces trois régions et la poursuite du projet soulève deux autres défis. Le premier était la nécessité de découvrir un autre transposon qui, pareil à Tn551, pourrait s'intégrer dans différentes sites sur le chromosome, mais qui posséderait un autre phénotype que la résistance à l'érythromycine. Le deuxième défi était de trouver une méthode pour déterminer exactement les positions des marqueurs sur le chromosome.

Un nouvel élan sera apporté par le développement de la technique de fusion des protoplastes. La fusion des protoplastes permettra de situer les trois régions connus du génome sur une carte chromosomique circulaire (voir Fig. 2) et aussi d'y localiser des nouveaux marqueurs. (Stahl et Pattee, 1983) En plus, les expériences de transformation avec de l'ADN de haute taille moléculaire isolé des protoplastes, confirmeront toutes les résultats des recherches antérieures. (Stahl et Pattee, 1983b)

Comme on peut observer dans la Fig. 2 représentant la carte chromosomique de *S. aureus* à cette étape de son développement, ils restaient encore des régions (marquées par ligne interrompue) où la continuité génétique n'avait pas été prouvée. Cependant on savait que des marqueurs non encore identifiés se situaient dans ces régions. Ce problème sera surmonté par une nouvelle procédure. Il devenait possible d'isoler des insertions du transposon Tn551 situés à côté des marqueurs non cartographiés ou bien non-sélectables et de définir leurs localisations par rapport aux marqueurs connus. (Luchansky et Pattee, 1984) Il semble bien évident, dans le contexte de ces recherches, le rôle très important du transposon Tn551 dans le travail d'établir la carte chromosomique de la bactérie *S. aureus*. D'autres transposons connus de *S. aureus* ont joué dans ce sens un rôle plus ou moins important, comme on mentionnera par la suite.

Le transposon Tn554 confère une résistance à l'érythromycine et à la spectinomycine, mais il a une grande spécificité d'insertion sur le chromosome (site attTn554) qui le rend peu utile à la cartographie. (Krolewski et al., 1981) Tn916 est

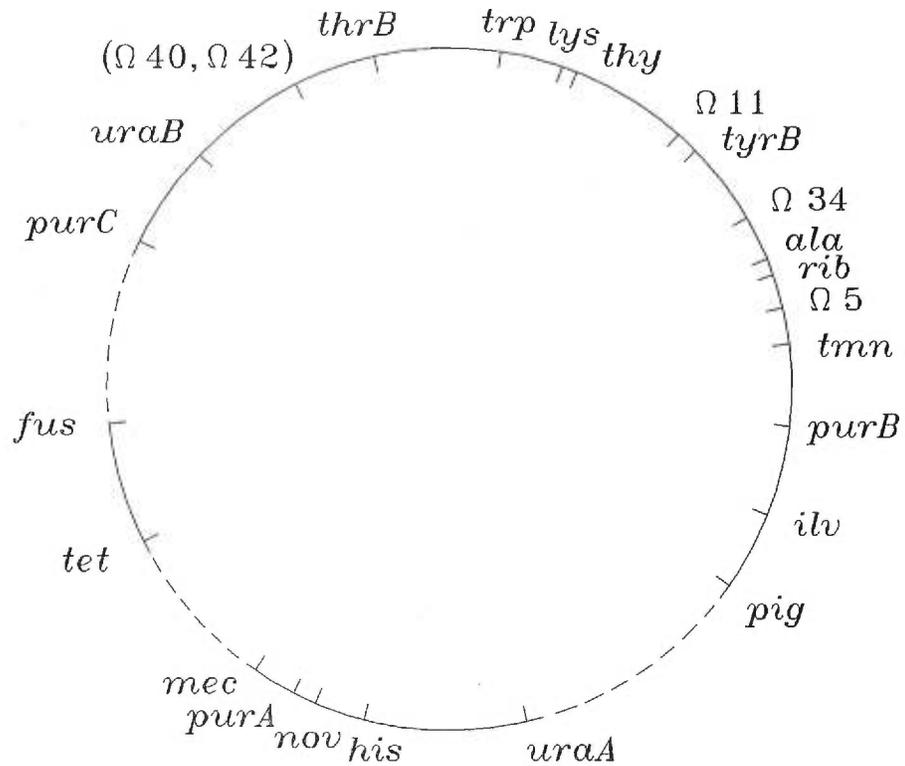


Figure 2. Carte chromosomique de *S. aureus* NCTC8325 établie par fusion des protoplastes assistée par ordinateur et par transformation. Les portions de chromosome pour lesquelles la continuité a été établie par transformation sont figurées en ligne continue. L'orientation de la région *tet-fus* par rapport à *mec* et *pur* et aussi l'ordre relatif de Ω 40 et Ω 42, sont inconnus. (référence: Stahl and Pattee, 1983)

porteur des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques, dont la tétracycline. Il a une taille d'environ 16,4 kpb et il peut s'insérer dans différents sites sur le chromosome, mais son efficacité de transposition est faible (entre 10^{-8} et 10^{-10}), raison pour laquelle il n'est pas très utile à cette fin. (Rudy et Scott, 1994; Gawron-Burke et Clewell, 1982) Le transposon Tn917 a presque la même taille que Tn551 et il confère les mêmes résistances aux antibiotiques que celui-ci (résistance MLS: macrolides, lincosamides et streptogramine B); il a été peu utilisé en cartographie. (Perkins et Youngman, 1984) Un autre transposon, Tn4001, qui code pour des résistances aux antibiotiques différentes que MLS (à la gentamicine, kanamycine et tobramycine) peut s'insérer et générer des insertions silencieuses ou auxotrophes. Cependant il a un taux plus élevé de réversion que Tn551 ou Tn917 et son utilisation nécessite une souche Rec⁻ ce qui le rendent moins intéressant. (Mahairas et al., 1989)

L'apport de chaque transposon au développement de la carte de *S. aureus* peut être déduit facilement du nombre d'insertions détectées. Ainsi, on remarque une large collection d'insertions de Tn551 et Tn4001, seulement quelques présences de Tn917, et juste 17 insertions cartographiées pour Tn916. (Pattee, 1990)

*

En 1987, réunissant toutes les données, Pattee publie une carte génétique élargie de *S. aureus*. La carte inclue 73 marqueurs et comporte deux régions majeures et une région mineure, positionnées de manière circulaire. Elle constitue un progrès considérable dans l'étude génétique de cette bactérie, mais il reste encore beaucoup de questions à clarifier, à savoir: la taille du génome bactérien, les relations existantes entre les distances génétiques et celles physiques, etc. Également on peut se demander si la carte génétique actuelle s'applique-t-elle à toutes les souches de *S. aureus* ou bien seulement à la souche NCTC8325 de *S. aureus*?

1. 1. 2. Carte physique du chromosome de *Staphylococcus aureus*

La carte génétique toute seule ne permet pas d'élucider toutes les problèmes ou de répondre à toutes les questions soulevées par la génétique moléculaire d'un organisme. Un objectif majeur à ce point de la recherche sur *S. aureus* était d'établir aussi la carte physique complète du génome. Face à ce défi la technique d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) vient d'ouvrir des nouvelles perspectives. Après la première démonstration du fait qu'en alternant la direction du champ électrique appliqué aux molécules d'ADN, on améliore de manière impressionnante leur séparation d'après la taille moléculaire (Schwartz et al., 1983), la méthode a connu plusieurs variantes. Des différentes configurations du champ électrique et des multiples paramètres expérimentaux sont essayés en vue d'arriver à la meilleure résolution possible. (Carle et Olson, 1984; Carle et al., 1986; Gardiner et al., 1986; Lalande et al., 1987)

Conçue premièrement pour les eucaryotes, la méthode est adaptée un peu plus tard pour les bactéries (Smith et al., 1987) et avec la seule modification de remplacer le lysozyme par la lysostaphine, elle peut être appliquée aussi à *S. aureus*. La technique consiste dans la digestion du chromosome avec des endonucléases de restriction qui coupent rarement l'ADN. Les fragments de la digestion sont ensuite migrés dans un appareil d'électrophorèse spécial, en parallèle avec des multimères du phage lambda.

PFGE est devenu dans les dernières années une technique très utile pour la construction des cartes chromosomiques pour les bactéries, qui donnent des informations sur l'organisation du génome, l'arrangement des gènes et de ses éléments génétiques mobiles. (Romling et al., 1992) De plus, pour *S. aureus* des études récentes ont montré la supériorité de cette technique pour le typage des différentes souches de la bactérie, par rapport à l'ancienne méthode de typage à l'aide des bactériophages. (Bannerman et al., 1995) Cette méthode garde son pouvoir de confirmer l'appartenance

d'une souche à un certain groupe même dans le cas des souches lysogènes et ceci pour au moins quatre des prophages. (Borecka et al., 1996)

En général, en vue de l'analyse par PFGE le chromosome de la bactérie est coupé avec une enzyme de restriction qui donne de cinq à une centaine de fragments. Le choix de l'enzyme se fait en fonction du contenu en G+C, du degré de méthylation et de l'usage de codons, caractéristiques de l'espèce bactérienne respective. Parce que le génome des Staphylocoques a un contenu faible en G+C (seulement 35%), une enzyme comme *SmaI*, qui a un site de reconnaissance très riche en G et C, constitue un candidat parfait pour cette analyse.

*

La digestion de *S. aureus* NCTC8325 avec l'enzyme *SmaI* donne 16 fragments chromosomiques marqués de A - P et d'une taille située entre 673 et 9 kpb. (Pattee et al., 1990) La taille du fragment *SmaI*-A ne peut pas être déterminée directement par PFGE, mais on peut la faire indirectement en introduisant quelques sites *SmaI* additionnelles, par l'intermédiaire d'un dérivé du transposon Tn917. La taille du génome au complet a été estimée de cette manière à 2.750 kpb.

La carte physique de *S. aureus* est présentée dans la Fig. 3 et sera discutée plus en détail dans le sous-chapitre suivant.

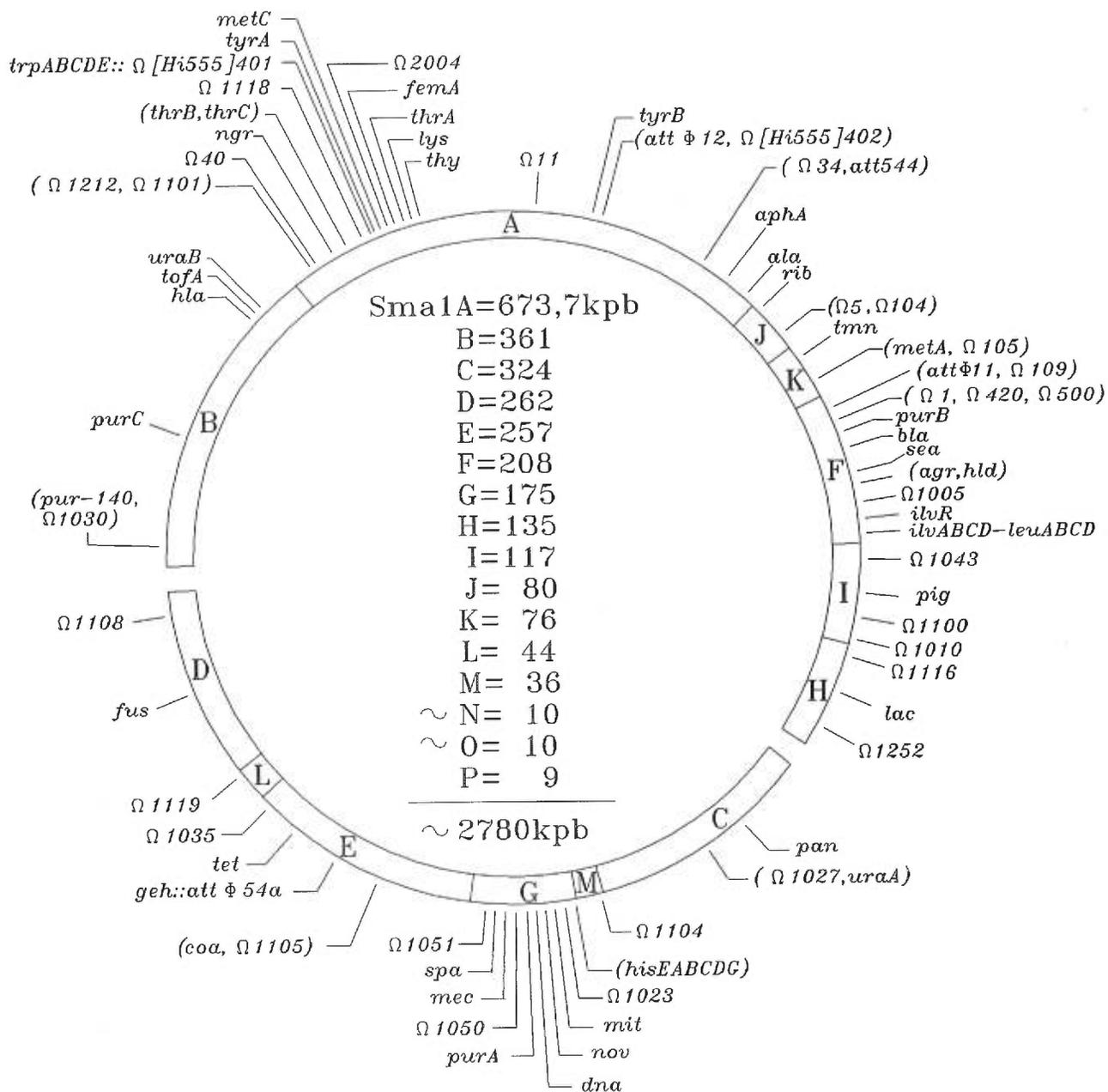


Figure 3. Carte physique et génétique de *S. aureus* NCTC8325.

La carte physique *Sma*I est réalisée à l'échelle et les tailles estimées des fragments *Sma*I sont marquées au centre. Les insertions des transposons $\Omega 1$ à $\Omega 40$ et $\Omega 1005$ à $\Omega 1051$ représentent des insertions silencieuses de Tn551. $\Omega 1100$ à $\Omega 1119$ sont des insertions silencieuses de Tn916. $\Omega 104$, $\Omega 105$, $\Omega 109$, $\Omega 1212$ et $\Omega 1252$ sont des insertions silencieuses de Tn4001. $\Omega 420$ et $\Omega 500$ sont des insertions de pI258. (référence: Pattee, 1990)

1. 1. 3. Corrélation entre la carte physique et la carte génétique

La corrélation de la carte génétique avec la carte physique de *S. aureus* a été faite sur la base des expériences d'hybridation (Smith et al., 1986; Smith et al., 1987) entre les fragments de la digestion *Sma*I et les transductants de la souche NCTC8325, qui portaient différents marqueurs. Les résultats ont été comparés avec les données obtenues par les insertions des transposons caractéristiques de la bactérie comme: Tn551, Tn917, Tn4001 et Tn916.

Cette corrélation se reflète dans la Fig. 3 qui présente la succession des fragments de la digestion *Sma*I autour d'un chromosome circulaire et aussi les positions des différents marqueurs identifiés et des insertions des différents transposons (notation du site d'insertion: Ω). Les fragments *Sma*I sont représentés à l'échelle et leurs tailles, déterminées par PFGE, sont montrées au centre de la figure. Les fragments *Sma*I-N, *Sma*I-O et *Sma*I-P n'ont pas été localisés relatif à la carte chromosomique. Les espaces entre les différents marqueurs dans le cadre du même fragment *Sma*I ont été estimés seulement par des expériences de transformation. Dans la continuité de la carte on remarque l'existence de deux interruptions (entre Ω 1030 et Ω 1108 et entre *pan* et Ω 1252) qui n'ont été couvertes ni par transformation, ni par la cartographie physique.

Pour évaluer plus exactement la localisation des marqueurs sur la carte physique, des cartes de restrictions additionnelles ont été ajoutées. La Fig. 4 présente à côté des fragments *Sma*I les fragments chromosomiques générés par les enzymes *Csp*I et *Sgr*AI. D'après ces dernières données, la taille du chromosome de *S. aureus* a été établie plus précisément comme étant de 2.800 kpb et la mise en évidence du fragment PFGE *Sgr*AI-A a prouvé la continuité du chromosome dans la région *pan* - Ω 1252. Le bout manquant sur le fragment *Sgr*AI-A pourrait être occupé par des petits fragments non représentés sur la carte et qui font environ 300 kpb. Il reste aussi au moins deux fragments *Csp*I représentant 100 kpb et trois fragments *Sma*I, à localiser sur la carte. (Pattee, 1993)

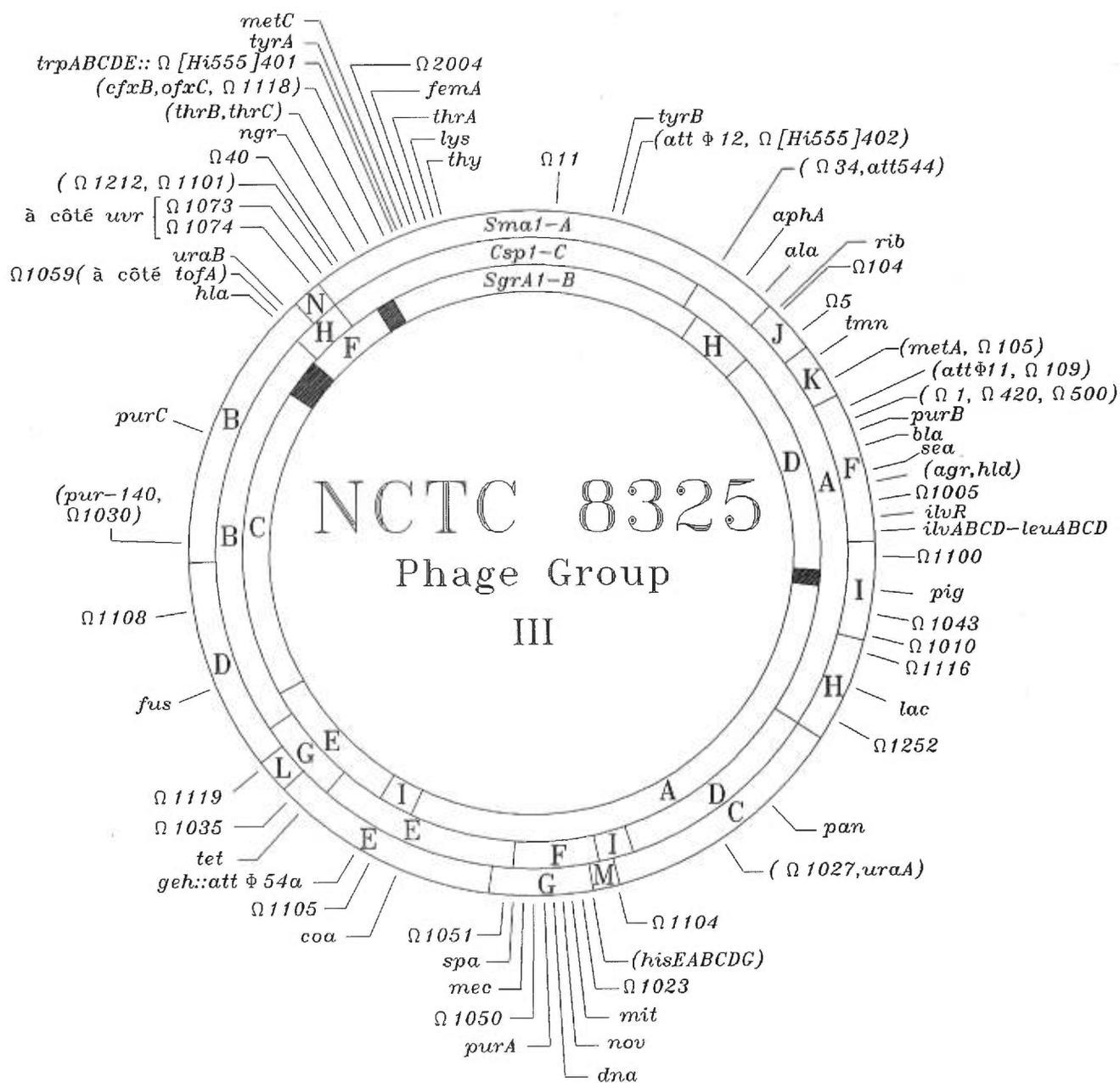


Figure 4. Carte chromosomique de *S. aureus*.

L'ordre de la majorité des marqueurs est basé sur l'analyse génétique et sur l'analyse par hybridation des fragments de restriction *SmaI*, *CspI* et *SgrAI* séparés par PFGE. L'ordre des marqueurs figurés en parenthèses n'est pas encore connu. Le chromosome au complet a 2.800 kpb et les fragments sont représentés à l'échelle. (référence: Pattee, 1993)

En utilisant les renseignements offerts par l'organisation physico-chimique du chromosome de la souche de *S. aureus* NCTC8325 groupe phagique III, on a défini une carte physique et génétique partielle pour la souche *S. aureus* Ps55 groupe phagique II. La taille du chromosome, l'ordre des gènes et une partie des sites de restriction sont conservées entre les deux souches, en dépit de leur appartenance aux groupes phagiques différents. (Bannantine et Pattee, 1996)

Pour voir si cette conservation est maintenue en général, 95 souches de *S. aureus* de différentes origines ont été digérées avec l'enzyme *Sma*I. Les patrons des fragments de restriction ont montré une hétérogénéité variable entre 30 et 100%. Cependant, le fragment *Sma*I-L (taille 44 kpb) a montré une forte conservation, puisqu'il a été retrouvé dans toutes les 95 souches. (Pantucek et al., 1996)

*

Il reste encore du travail à faire au niveau moléculaire de *S. aureus*, pour identifier toutes les régions de son chromosome, déterminer et comprendre le fonctionnement de tous ses gènes, connus ou à découvrir. Ce défi sera considérablement facilité par le séquençage au complet de la bactérie qui permettra sa compréhension exhaustive.

1. 2. Banques génomiques

La construction d'une banque d'ADN génomique représente dans la majorité des cas une tâche exigeante et laborieuse. L'approche peut être résumée facilement par le schéma suivant (Fig. 5) (Ausubel et al., 1992). L'ADN est préparé pour l'insertion dans le vecteur du choix, les deux éléments sont ligués ensemble et introduits dans la bactérie *E. coli* d'après un procédé dépendant du vecteur utilisé. Ensuite, la banque est caractérisée, préparée pour conservation à long terme ou criblée à la recherche des clones désirés.

Le problème principal réside dans l'obtention d'une population de clones, assez grande pour que chaque séquence d'ADN soit représentée au moins une fois dans cette collection. Également, il faut surveiller les caractéristiques de la banque qui entrent en jeu pour l'évaluation de sa qualité: la représentation des fragments d'intérêt, la stabilité des clones et la facilité avec la quelle on peut manipuler et cribler la banque en question.

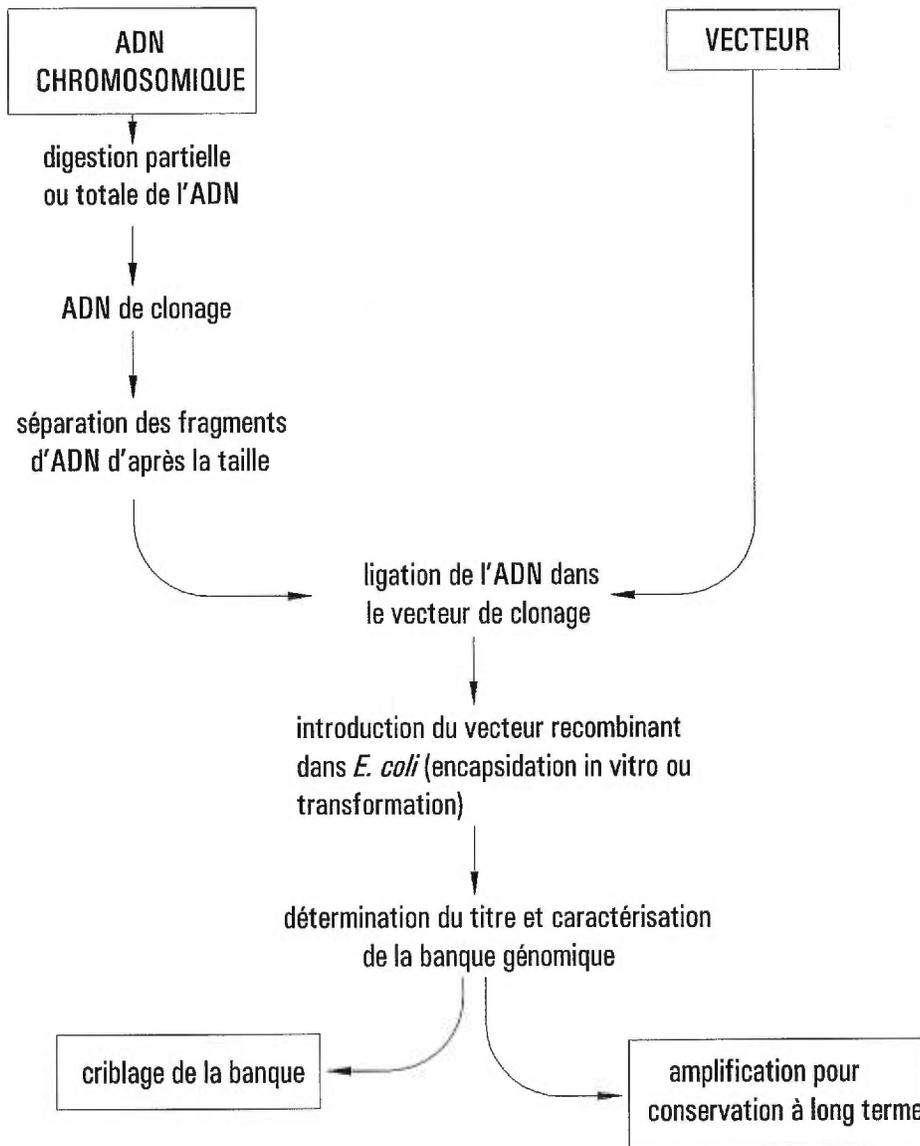


Figure 5. Étapes dans la construction d'une banque génomique.
(modifiée d'après référence: Ausubel et al. 1992)

1. 2. 1. Construction d'une banque génomique

En général, comme dans le cas de toute construction, les composantes de départ jouent un rôle important pour la qualité finale du projet. C'est pourquoi les éléments constitutifs d'une banque génomique, les fragments d'ADN chromosomiques et le vecteur de clonage, se doivent être choisis et préparés avec maximum d'attention.

En considérant maintenant une banque génomique complète, elle doit contenir au moins une fois chaque fragment d'ADN qui entre dans la constitution du génome respectif. La réalisation de cette demande réclame que la manière de couper le chromosome pour générer les inserts soit complètement aléatoire, pour donner chance égale à chaque fragment d'ADN. La littérature cite une première approche utilisée en ce sens, la digestion totale du génome avec une enzyme de restriction. La méthode a été abandonnée à cause de trois objections majeures. La première, la répartition des sites de coupure le long du chromosome n'est pas uniforme. On peut se retrouver ainsi avec un fragment coupé plus grand que la capacité de clonage du vecteur utilisé, raison pour laquelle il ne pourra pas être cloné. La deuxième objection concerne la taille des fragments coupés avec une enzyme dont le site de reconnaissance est hexanucléotidique, et qui sera relativement petite (environ 4 kpb). En conséquence, une banque complète devra contenir un nombre très grand de clones et sera donc difficile à cribler. La troisième est que les fragments coupés ne se chevauchent pas et il sera donc impossible d'utiliser la méthode de "chromosome walking" (cartographie par chevauchement) pour les ordonner.

Les trois inconvénients sont surmontés lors d'une fragmentation mécanique. Cela représente la manière idéale pour avoir un clivage parfaitement aléatoire de l'ADN, car le nombre des fragments potentiellement générés est pratiquement infini. Il est aussi possible d'utiliser les fragments d'ADN comme sondes d'hybridation pour aller chercher les clones avec lesquels ils se chevauchent. De plus, lors d'une fragmentation mécanique ménagée, la taille des fragments est assez grande pour avoir

une banque complète dans un nombre réduit de clones. La fragmentation mécanique doit être complétée par un traitement à la nucléase S_1 suivi de méthylation, ligation des "linkers" (adapteurs) et digestion des "linkers" (adapteurs) pour créer les extrémités cohésives demandées au clonage. (Maniatis et al. 1978)

La manière de clivage la plus utilisée, suffisamment aléatoire et qui donne des fragments d'ADN directement clonables, est la digestion partielle avec une enzyme de restriction. Le choix de l'enzyme est bien important; il faut trouver une enzyme qui coupe assez souvent le chromosome en question et qui garde la même spécificité toute au long du génome. Des banques construites par exemple avec l'enzyme *EcoRI*, risquent de ne pas être complètes parce que le site de reconnaissance de 6-pb n'est pas présent avec une fréquence suffisante pour assurer un clivage tout à fait aléatoire. Ce site se trouve à approximativement chaque 4^6 ou 4.096 pb et après une digestion partielle on peut arriver donc à des fragments dont la taille dépasse la capacité de clonage du vecteur. De plus, la répartition des sites *EcoRI* n'est pas vraiment aléatoire. La littérature cite l'existence des génomes qui manquent de ces sites dans certaines régions et pour lesquels, même une digestion complète, conduit aux fragments qui dépassent la taille des vecteurs. (Slightom, 1993) Plus adéquate et pour cela beaucoup plus utilisée, l'enzyme *Sau3AI* reconnaît un site de seulement quatre paires de bases (GATC) et génère des fragments compatibles avec les sites de clonage de plusieurs types de vecteurs de clonage.

Parlant maintenant de la digestion partielle, pour l'optimiser et s'assurer qu'elle donne chance égale à tous les fragments d'être efficacement clonés, on se base sur l'étude théorique de Seed. (Seed et al., 1982) L'auteur a montré que la quantité d'enzyme qu'on doit utiliser pour avoir une digestion partielle adéquate est celle qui donne la majorité des produits de digestion d'une taille égale à la capacité de clonage du vecteur. Cette quantité s'établit en essayant sur un échantillon d'ADN la digestion avec une série de concentrations d'enzyme; pour la digestion à grande échelle on prend d'habitude la moitié de la quantité d'enzyme ainsi déterminée.

Un autre aspect qui influence l'efficacité du clonage est la qualité de l'ADN chromosomique de départ. S'il est dégradé, cela va réduire la fraction des fragments qui après la digestion porteront aux deux bouts des sites compatibles au vecteur de clonage et qui par la suite pourront être clonés.

En dépit de quelques désavantages, la digestion partielle avec une enzyme de restriction donne un clivage du chromosome suffisamment aléatoire. Ses désavantages tiennent du fait que les bouts des fragments coupés ne sont pas distribués de manière totalement aléatoire le long du chromosome, étant déterminés par la location des sites de restrictions. Aussi, la variation du contenu en G+C dans une région du chromosome peut créer des distorsions dans la distribution des sites, comme le cas des sites très éloignés ou très proches l'un de l'autre, quand la chance de donner des fragments de taille clonable est beaucoup réduite.

Un autre facteur de grande importance dans la construction d'une banque est le vecteur de clonage utilisé. Historiquement, les premiers vecteurs utilisés ont été des plasmides (Clarke et Carbon, 1976), mais pour répondre à la nécessité de cloner des fragments de grande taille, de nouveaux types de vecteurs ont été développés. Les plasmides restent encore beaucoup utilisés pour construire des banques sous-génomiques ou génomiques au cas des petits génomes, et où la situation n'exige pas des inserts de grande taille. Ils ont été diversifiés pour mieux répondre aux exigences du clonage, comme: taux élevé de la transformation, sélection facile et rapide des vecteurs recombinants, stabilité des clones.

D'autres vecteurs aussi utilisés dans la construction des banques génomiques sont les vecteurs dérivés du bactériophage lambda et les vecteurs type hybrides, les cosmides. Les deux se caractérisent par une bonne efficacité de clonage et une capacité d'insertion augmentée. Les deux systèmes ont à la base le même principe: l'encapsulation de l'ADN recombinant *in vitro* dans la tête des phages lambda, pour donner des particules capables d'infecter des cellules bactériennes. L'encapsulation requiert la présence d'une séquence spécifique, dénommée *cos* et exige que la taille de

l'ADN entre les deux sites *cos* soit entre 78% à 105% de la taille du génome du phage lambda sauvage, donc entre 38 kpb et 55 kpb. (Feiss et al., 1977; Feiss et Becker, 1983) Comme la taille du vecteur lui-même détermine la capacité disponible pour insérer des fragments d'ADN étranger, la capacité de clonage sera différente d'un type de vecteur à l'autre. Les phages lambda, par exemple, ont besoin d'un minimum de 30 kpb de leur ADN pour remplir les fonctions normales d'un cycle lytique et donc leur capacité de clonage est située entre 22 - 24 kpb. Les cosmides, par contraste, ont besoin seulement de quelques kpb d'ADN codant pour les fonctions essentielles à leur réplication, sélection et pour les séquences d'encapsidation. Ils vont permettre l'insertion des fragments étrangers de taille jusqu'à peu près 50 kpb. Le choix entre ces deux types de vecteurs va se faire en fonction de la taille des fragments qu'on veut cloner. Il est évident que les cosmides sont préférables pour des projets dans lesquels on désire analyser des longues régions du génome ou de cloner des gènes trop longs pour rentrer dans un phage lambda, comme le cas des eucaryotes. Cependant, plusieurs laboratoires préfèrent les banques dans un vecteur λ parce qu'elles sont plus faciles à manipuler, cribler et amplifier. De plus, les larges inserts en cosmides augmentent la possibilité de cloner des éléments d'ADN génomique qui sont instables en *E. coli* et plus facilement délétés durant la réplication. (Slightom et al., 1993)

Dès la réalisation des premiers vecteurs lambda permettant la construction d'une banque génomique complète (Blattner et al., 1977), on assiste au fil des ans à un développement constant; le principe de base reste cependant le même. Le phage lambda possède au centre de son génome une région située entre les gènes J et N qui n'est pas essentielle au cycle lytique du phage. Dans les vecteurs dénommés de remplacement, cette région est occupée par un fragment d'ADN dénommé *stuffer* ("farce") qui doit être éliminé avant le clonage. Les premiers vecteurs de remplacement demandaient à cette étape des séparations physiques laborieuses, comme le clivage du fragment "farce" par des enzymes, suivi par des séparations dans des gradients de sucrose ou sel. (Maniatis et al., 1986) Pour la nouvelle génération de vecteurs λ EMBL, l'élimination se fait par une méthode génétique basée sur le phénotype Spi^- du phage lambda,

phénotype décrit pour la première fois par Zissler. (Zissler et al., 1971) Le fragment "farce" contient deux gènes (*red* et *gam*) qui par leurs expressions empêchent la réplication du phage dans une souche hôte qui porte le prophage P2. Les seuls phages qui vont se propager dans une telle souche sont ceux qui ont incorporé à la place du fragment "farce" un fragment d'ADN étranger. Le fragment "farce" ne nécessite plus l'élimination avant le clonage. (Murray, 1983)

Pour prévenir la re-insertion du fragment "farce", une stratégie biochimique peut être utile. Le vecteur est construit de manière qu'il contient d'un côté et de l'autre du fragment farce deux sites de restriction en orientation inversée. La digestion, avec les enzymes appropriées, génère des bouts de clonage différents pour le vecteur et le fragment "farce". Une simple précipitation à l'éthanol élimine du mélange les fragments plus petits et ainsi la possibilité de re-ligation. Comme le vecteur tout seul est trop petit pour donner un phage infectieux, seulement les phages qui ont reçu un fragment d'ADN de la taille requise vont pouvoir infecter les cellules et donner des plages. (Slightom, 1993) Le λ EMBL3, un vecteur moderne et versatile, utilise deux types de stratégies (génétique et biochimique) pour éliminer les étapes de purification des bras du vecteur. (Kaiser et Murray, 1985) Il est utilisé couramment pour la construction des banques génomiques.

Les vecteurs de la série EMBL ont été sujets de plusieurs autres modifications en vue d'améliorer leurs performances. Parmi les plus importantes se trouvent l'addition de nouveaux sites de restrictions utiles au clonage et l'addition des promoteurs T3 et T7 reconnus par les ARN-polymérases respectifs.

Concernant les cosmides, leur première utilisation date de 1978 quand on découvre qu'un plasmide qui contient les sites *cos* du phage λ peut être encapsidé, à l'aide d'un système d'encapsidation *in vitro*, dans une particule phagique lambda. Après cette encapsidation et l'infection d'une bactérie λ -sensible, les cosmides vont se répliquer comme des plasmides et pourront être sélectionnés d'après les résistances aux antibiotiques qu'ils portent. (Collins et Horn, 1978; Collins et Brüning, 1978) Les

premiers cosmides construits étaient assez limités comme applicabilité: ils possédaient seulement quelques sites de restrictions pour le clonage, ils avaient un seul gène de résistance aux antibiotiques et leur capacité de clonage n'était pas utilisée au maximum. Ils ont été suivis par d'autres cosmides améliorés, comme le cosmide pHC79 qui dérive du plasmide pBR322 et qui peut abriter des fragments d'ADN d'environ 40 kpb. (Hohn et Collins, 1980) Son utilisation a été restreinte à cause des certains inconvénients, le plus important étant la possibilité de se retrouver avec des inserts constitués de plusieurs fragments d'ADN non-contingentes sur le chromosome. Le cosmide pJB8 vient pallier à cet inconvénient car il est construit ainsi qu'il est incapable d'autoligation, mais capable d'accepter des fragments d'ADN déphosphorilés. (Ish-Horowicz et Burke, 1981)

Plus récemment de nouvelles générations de cosmides ont été conçues pour faciliter la construction des banques génomiques. (Evans et al, 1989)

Les trois types de vecteurs de clonage présentés ci-dessus ont chacun leurs avantages et désavantages. Il est évident que leur choix en vue d'utilisation pour la construction des banques génomiques se fait en fonction de leurs caractéristiques et de la taille et des particularités du génome pour lequel on veut construire la banque. Ce choix dépend aussi du but que la banque servira.

Aux cas des petits génomes et aussi pour la construction des banques génomiques ayant comme utilisation l'isolement de certains gènes bactériens, les plasmides constituent un choix convenable. Ils sont moins exigeants à l'étape de clonage et aussi ils ne demandent pas un ADN de départ de très grande taille, dont l'extraction pourrait représenter une étape critique, surtout dans le cas des bactéries difficiles à lyser. Par rapport aux banques construites en vecteurs de grande capacité, ils présentent aussi l'avantage que pour l'isolement des gènes il n'est pas nécessaire l'étape de sous-clonge, étape qui s'avère parfois très laborieuse.

1. 2. 2. Banques génomiques en *E. coli* et en autres bactéries

Il y a plus de 20 ans que la première banque génomique pour *E. coli* a été construite. (Clarke et Carbon, 1975) Elle constituait une collection de plusieurs plasmides hybrides (plasmide Col-E₁) qui contenaient des fragments d'ADN chromosomiques de *E. coli*; l'ADN de la bactérie avait été fragmenté par agitation hydrodynamique. Cette banque a servi pour isoler des clones qui pouvaient compléter plusieurs mutations déjà localisées sur la carte génétique. (Bachmann, 1983; Phillips et al., 1987)

Par la suite, plusieurs autres banques génomiques ont été construites en *E. coli*. Celle de Kohara est la plus importante et elle a été beaucoup utilisée. Kohara a préféré comme vecteur de clonage le phage lambda, et non un cosmide, pour assurer la stabilité des fragments clonés et éviter l'accumulation des délétions. Sa banque a utilisé la digestion partielle avec l'enzyme *Sau3AI* pour construire une collection de 3.400 clones d'environ 15 - 20 kpb, couvrant plus de 99% du génome de 4.700 kpb de *E. coli*; ils restaient 7 espaces ("gaps") impossibles à remplir. (Kohara et al., 1987) Une première explication de la présence des 7 "gaps" a été que certaines régions du chromosome pouvaient devenir toxiques pour la cellule, au moment où coupées du reste du génome, sont mises sur le contrôle d'un autre réplicon. Une autre explication soutenait que la répartition inégale des sites de clivage de l'enzyme le long du chromosome, pouvait donner des régions très riches ou par contre très pauvres en sites. Comme il a été déjà mentionné, cela conduit à l'impossibilité de cloner certaines régions du génome.

La banque a été ordonnée dans le sens d'établir l'ordre des clones le long du chromosome et déterminer la carte physique du génome. Un mini-set de 476 clones a été trouvé suffisant pour couvrir tout le génome, avec des amples zones de chevauchements et une bonne corrélation avec la carte génétique. (Kohara, 1990) Une telle organisation de la banque a beaucoup d'avantages car elle permet de localiser sur

la carte physique n'importe quel fragment cloné du génome ou d'obtenir le clone d'un gène pour le quel on a la position sur la carte. De plus, elle rend possible de cloner et localiser sur la carte un gène qui est induit comme réponse à un certain signal interne ou externe. Il suffit d'isoler l'ARN messager induit et l'hybrider avec notre banque.

Comme Kohara l'avait remarqué lui-même, la construction pour le même organisme de plusieurs banques, en se servant de plusieurs enzymes de restriction, est souhaitable. Ceci peut apporter plus de données en vue de compléter et détailler la carte génomique et de remplir les "gaps". Ainsi, les trois banques génomiques construites à l'aide des enzymes *Bam*HI, *Eco*RI et *Hind*III, dans le laboratoire de Daniels et Blattner ont eu un apport important. (Daniels et Blattner, 1987) Les données de 2.000 clones ont été compilées et on a déterminé 68 régions entre 18 et 200 kpb qui couvrent 67% du génome. Les autres 250 clones de la collection, qui ne se chevauchaient pas, représentaient probablement le reste du génome. Les banques de Kohara et de Daniels analysées ensemble ont réussi à remplir trois de sept "gaps" de Kohara et de réduire trois autres. Une grande partie des clones de Daniels, qui ne se chevauchaient pas, ont été localisés sur la carte par hybridation et on a réussi à cartographier 90% de génome de la bactérie, avec 68 "gaps". (Daniels, 1990)

D'autres banques construites en *E. coli* ont utilisé comme vecteurs de clonage les cosmides. Knott publie un set de 803 clones en cosmides qui forment 50 groupes de chevauchement, mais qui ne sont pas ordonnés sur la carte du génome. (Knott et al., 1988) Tabata utilise les cosmides pHC79 et pHC79EBE digérés avec l'enzyme *Eco*RI et respectivement *Sau*3AI, pour construire deux banques génomiques pour *E. coli*. Les clones sont positionnés sur la carte par la méthode de "chromosome walking" et on obtient 31 régions indépendantes, formées par des clones qui se chevauchent. La corrélation de ces régions avec la carte chromosomique est faite par trois méthodes: l'hybridation avec les fragments de la digestion *Not*I de *E. coli* (Smith et al., 1987), l'hybridation avec des banques génomiques en phage lambda (Kohara et al., 1987) et des tests de complémentation avec des marqueurs génétiques déjà connus. Finalement,

325 clones ont été localisés sur la carte chromosomique, ce que couvre au total 70% du génome de *E. coli*. (Tabata et al., 1989)

À la même époque on a commencé la construction de plusieurs autres banques génomiques complètes et ordonnées pour les bactéries. Cela a constitué une étape très importante dans l'étude des bactéries et a créé une base de travail pour les recherches ultérieures.

Ainsi, on a rapporté la construction des banques génomiques complètes pour: *Anabaena variabilis* (Herrero et Wolk, 1986), *Mycoplasma pneumoniae* (Wenzel et Herrmann, 1989), *Rhodobacter capsulatus*, (Fonstein et Haselkorn, 1993), *Mycoplasma genitalium* (Lucier et al., 1994), *Synechocystis* (Shestoplov et al., 1994), etc. Ces banques génomiques ont servi comme outil de travail pour l'établissement des cartes génétiques et physiques des génomes respectifs et ont permis, au fur et à mesure que de nouveaux gènes ont été isolés, de les localiser sur les cartes.

Le lancement du projet HUGO a apporté une nouvelle dimension à l'étude des génomes en général, et a marqué d'une façon importante l'orientation actuelle de la recherche au niveau moléculaire des bactéries. Plusieurs projets de séquençage total des génomes bactériens ont été entamés, dont une bonne partie ont été finalisés récemment; une autre partie sont en cours de publication ou en voie d'achèvement.

En citant la liste des séquences génomiques déjà complétées, il faut commencer avec *Haemophilus influenza*, le premier génome bactérien séquencé au complet et en utilisant le séquençage automatique. (Fleischmann et al., 1995) L'énumération se poursuit avec *Mycoplasma genitalium* (Fraser et al., 1995), *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich et al., 1996), *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996) et *Synechocystis* (Kaneko et al., 1996).

Durant cette dernière année la liste s'est agrandie avec deux autres génomes séquencés: *Helicobacter pylori* (Tomb et al., 1997) et finalement *Escherichia coli* (Blattner et al., 1997).

La réalisation de ces projets a réuni la participation de très grandes équipes de recherche et a coûté aussi l'effort de plusieurs années de travail. Une fois l'étape des projets "génomiques" finie, l'attention se dirige pour exploiter de la manière la plus productive l'information livrée par la séquence d'un génome. Il devient maintenant possible de comprendre et expliquer l'évolution des bactéries, tout en analysant les changements survenus au niveau de leurs gènes. En même temps, une nouvelle étape commence à se définir que pourrait être dénommée l'étape des projets "proteomes". Il s'agit d'une analyse complète des protéines encodées par la séquence génomique d'un organisme. (Sazuka et Ohara, 1997).

1. 2. 3. Banques génomiques ordonnées

Le concept "d'encyclopédie génomique" introduit par Daniels en 1987 venait de différencier un set ordonné de clones d'une collection non-ordonnée, dénommée habituellement "banque génomique". (Daniels et Blattner, 1987) Par opposition à une banque, dans le cadre d'une encyclopédie génomique complète les relations de chevauchements entre les clones le long du chromosome sont connues. Ainsi, il devient possible de tracer la carte physique du génome juste en juxtaposant les clones. La construction de la carte physique du génome est de grande importance puisqu'elle montre les relations existantes entre les loci génétiques et les fragments de la banque qui les portent. Elle permet aussi de faire des analyses comparatives entre les génomes des organismes de la même espèce ou des espèces apparentées. Finalement, elle représente une base de travail pour les projets de séquençage à grande échelle.

La première approche en vue de construire la carte physique d'un génome a été faite par la technique de "chromosome walking". (Bender et al., 1983) Cette méthode est assez laborieuse et difficile à appliquer dans le cas de grands génomes, raison pour laquelle de nouvelles méthodes ont été mises au point.

La stratégie la plus utilisée pour construire une carte physique implique en général une approche de type "bottom-up" qui consiste en organiser les fragments chromosomiques contenus dans la banque en longs "contigs" et en déterminer, fonction de leurs chevauchements, la carte physique. Pour établir les chevauchements une des méthodes possibles est celle d'empreinte génétique. Comme empreinte génétique utilisée on peut citer: la carte de restriction de chaque clone pour 6 enzymes (Daniels et Blattner, 1987), ou bien 8 enzymes de restriction. (Kohara et al., 1987) Les chevauchements sont déterminés tenant compte des similarités existantes entre les patrons de digestion des clones. D'autres types d'empreinte génétique possibles sont: patrons de double digestion pour tous les clones (Olson et al., 1986), patron d'hybridation des clones avec un set de sondes oligonucléotidiques. (Michiels et al., 1987) Une méthode plus récente consiste dans l'identification des courtes séquences

d'ADN, uniques dans le génome et dénommées "sites étiquetés par la séquence" ou "Sequence Tagged Site" (STS). (Olson et al., 1989) Par la suite on détermine les chevauchements existants entre les clones sur la base des similarités des STS contenus. (Palazzolo et al., 1991)

Toutes ces démarches ont des étapes en commun: un nombre de clones est choisi de manière aléatoire de la banque, on détermine les empreintes génétiques et on déduit après les chevauchements existants entre ces clones. L'étude mathématique a montré qu'il faut analyser un nombre de fragments suffisant pour couvrir l'équivalent de 6 à 8 génomes, afin d'avoir le degré de chevauchement requis pour déterminer la carte. (Lander et Waterman, 1988) D'autres études se sont occupées des relations mathématiques applicables en cas d'utilisation comme empreinte génétique des STS. (Barillot et al., 1991; Evans, 1991)

Plus récemment, des nouvelles stratégies pour ordonner une banque ont été développées, parmi lesquelles mentionnons celle de caractériser seulement les bouts des clones et non pas tout le clone. La variante la plus commode est de séquencer les dernières 500 pb de chaque côté du clone; cette méthode impose une analyse mathématique plus approfondie et apporte des formules additionnelles à celles établies par Lander-Waterman. (Port et al., 1994)

Le projet HUGO ("Projet Génome Humain"), avec le séquençage des micro-organismes modèles, porte une grande attention à la construction des banques génomique nouvelles, suivie de l'établissement des cartes physiques complètes. Les méthodes utilisées combinent parfois des stratégies classiques, de type "bottom-up", avec les nouvelles stratégies de type "top-down". Pour cartographier le chromosome XI de *S. cerevisiae*, par exemple, on a utilisé à côté de l'empreinte génétique et l'hybridation, une nouvelle stratégie de type "top-down". Elle est basée sur la construction de la carte I-Sce-I du génome, obtenue après l'intégration dans le chromosome de plusieurs cassettes I-Sce-I. (Thierry et Dujon, 1992) L'étape est suivie de l'arrangement des clones en ordre, par hybridation, et en respect de la carte I-Sce-I. (Thierry et al., 1995)

L'orientation actuelle est de mettre au point des stratégies qui diminuent ou même éliminent des longues opérations comme préparations des gels, séparation sur colonne, synthèse des oligonucléotides ou de sondes ARN et hybridation des filtres. Aussi, les stratégies doivent faire largement appel à l'automatisation et à l'informatique pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des données. En plus, il est préférable d'identifier un nombre plus grand de marqueurs dans chaque clone, en but de diminuer le chevauchement minime requis pour ordonner les clones dans une carte et réduire le nombre des clones analysés. (Sapolsky et Lipshutz, 1996)

1. 3. Banques génomiques en *S. aureus* et leur utilisation en vue de cloner de nouveaux gènes de la bactérie

S. aureus est une bactérie très pathogène, très résistante à la chaleur et aux désinfectants, pourvue des parois difficiles à lyser et à peine transformable. Elle produit une panoplie de facteurs de surface et de protéines, qui déterminent sa pathogénicité et aussi sa capacité de développer plusieurs résistances aux antibiotiques. Cela explique pourquoi elle constitue une permanente menace pour le milieu hospitalier et pourquoi les recherches sur la bactérie visent d'avantage l'aspect pathogène de la bactérie.

La littérature contient plusieurs articles qui rapportent l'isolement de certains gènes, impliqués dans la pathogénicité de *S. aureus*, en se servant du criblage des banques génomiques. En ce qui suit, nous tenterons de mentionner les plus récents exemples, tout en insistant aussi sur l'aspect pathogène visé par la recherche.

La grande majorité de ces articles rapportent la construction de nouvelles banques génomiques pour la bactérie. À l'encontre de *E. coli* pour laquelle plusieurs banques génomiques et même des membranes "prêtes à être criblées", contenant toute la banque ordonnée de Kohara, sont disponibles dans les catalogues de produits de spécialité, la situation n'est pas la même pour *S. aureus*. Nous avons trouvé une seule banque génomique pour *S. aureus*, offerte par la compagnie Clontech, Palo Alto, CA. La banque était disponible dans le catalogue de 1994/1995, mais ne faisait plus partie du catalogue pour l'année 1996/1997.

Nous allons présenter en ce qui suit quelques clonages des gènes de *S. aureus* qui ont utilisé des banques génomiques.

L'alpha-hémolysine fait partie des quatre hémolysines connues pour *S. aureus* et constitue une puissante cytotoxine causant nécrose locale et même la mort chez les animaux expérimentaux. Elle est sécrétée comme une protéine hydrosoluble, ayant une

masse moléculaire de 34.000 Da. Le déterminant chromosomique (*hla*⁺) de la production de l' α -hémolysine a été localisé depuis 1978 (Brown et Pattee, 1978), mais le gène comme tel a été cloné beaucoup plus tard. (Meshveliani et al., 1990) Pour ce clonage on a utilisé des oligonucléotidiques synthétiques, construites à partir des régions N- et C- terminales de la protéine codée par le gène. Les oligonucléotides ont servi comme sondes pour cribler une banque génomique de la souche *S. aureus* O15. Le vecteur de clonage a été le vecteur phagique EMBL-3. Le criblage de la banque a révélé un bactériophage recombinant capable d'exprimer d'alpha-hemolysine dans son lysat.

Dans la région chromosomique de *S. aureus* occupée par le gène de l' α -hémolysine on a localisé aussi le gène *entA*, responsable de la production de l'enterotoxine A. (Pattee et Glatz, 1980) Celle-ci fait partie des cinq enterotoxines produites par cette bactérie et provoque le syndrome d'intoxication alimentaire le plus connu. Pour le clonage du gène *entA* on a utilisé une banque génomique construite dans le vecteur plasmidique pSL5. (Chikindas et al., 1990)

La pathogénicité des souches de *S. aureus* implique souvent l'invasion des tissus ou la colonisation de la matrice intracellulaire qui s'expliquent par la capacité de certaines protéines de surface, nommées adhésines, de s'attacher aux protéines de la matrice (laminine, fibronectine et collagène). Le gène de *S. aureus* qui code pour la collagène-adhésine, *cna*, a été identifié, cloné et caractérisé. (Patti et al., 1992) Pour arriver à cette fin on a utilisé la banque génomique dans le vecteur phagique λ GT11 fournie par la compagnie Clontech, Palo Alto, CA. Pour identifier le gène codant pour la collagène-adhésine, la banque a été étalée à une densité de 1×10^4 phages par boîte, les protéines phagiques ont été transférées sur filtres de nitrocellulose et on a cherché pour l'expression du gène, en utilisant deux approches immunologiques différentes. Les deux clones positifs identifiés contenaient des fragments qui se chevauchaient et ont permis l'identification d'une région codante pour une protéine de 1.185 acides aminés. Le séquençage de la région a révélé aussi un autre cadre ouvert de lecture, suggérant la

présence d'un autre gène identifié plus tard. Il s'agit du gène *pcp* qui code pour une pyrrolidine-carboxyl peptidase de *S. aureus* et qui est à une distance de 740 pb du gène *cna*. Le gène est transcrit en sens inverse que *cna* ce qui fut démontré par des expériences ultérieures. Le rôle biologique de la protéine codée par le gène n'a pas été totalement élucidé. (Patti et al., 1995)

S. aureus provoque souvent des septicémies ayant comme point de départ des infections localisées au niveau des plaies ou des drains qui jouent le rôle de porte d'entrée pour la bactérie dans le système sanguin. L'explication est que, dans une première phase de l'invasion, la bactérie adhère aux surfaces et rendue à ce niveau elle est capable de s'attacher au fibrinogène. Il semble qu'il y a plusieurs gènes de *S. aureus* qui codent pour des protéines capables de lier le fibrinogène. (Bodén et Flock, 1994) Un de ces gènes (*fbpA*) a été identifié, cloné et exprimé à partir d'une banque génomique construite dans le vecteur λ Zap. (Cheung et al., 1995) En vue de cette construction l'ADN de la bactérie a été fragmenté mécaniquement par passage par aiguille 18G et pour le clonage on a utilisé les fragments entre 4 et 5 kpb. La banque a été criblée par des méthodes immunologiques pour rechercher les clones qui réagissaient avec le fibrinogène.

Toujours des banques génomiques ont été à la base de l'identification d'autres gènes de *S. aureus* qui jouent un rôle dans sa pathogénicité: celui de l'enzyme qui fait la dépolymérisation de l'acide hyaluronique (Farrell et al., 1995) et celui qui code pour la toxine épidermolytique A. (O'Toole et Foster, 1986) Dans les deux cas il s'agit des banques génomiques dans le vecteur phagique de remplacement λ L47.1, banques qui ont été criblés pour la présence des clones qui expriment l'activité enzymatique respective.

Deux autres banques, cette fois-ci dans les plasmides pGEM-1 et respectivement pAT153, ont servi au clonage du gène pour prolipoprotéine signal peptidase (*lsp*) et respectivement, du gène pour isoleucine-tARN synthétase (*ileS*). Le gène *lsp* a été

identifié dans la banque génomique par complémentation d'un mutant létal conditionnel *lsp*⁻ de *E. coli*. (Zhao et Wu, 1992) Des essais de complémentation d'un mutant *ileS*⁻ ont démontré que le gène *lsp* ne se trouve pas dans un opéron avec le gène *ileS*, comme dans le cas de certaines bactéries Gram⁻. Le gène *ileS*, responsable de la production d'isoleucine-tARN synthétase et qui est la cible de l'antibiotique mupirocine, a été cloné plus tard en criblant la banque génomique avec une sonde oligonucléotidique synthétisée à partir de la séquence de la protéine Ile-RS. (Chalker et al., 1994)

Un facteur important de virulence pour *S. aureus*, codé par le chromosome de la bactérie, est la production d'une capsule. Plus de 90% des souches possèdent une capsule et ils existent 12 types de capsules différentes. Les plus répandues, avec une proportion de 80% des souches isolées, sont les capsules de types CP5 et CP8. En contraste avec les capsules de type CP1 et CP2 pour lesquels on a clairement démontré qu'ils constituent des importants facteurs de virulence, les capsules de type CP5 et CP8 possèdent un rôle encore controversé. Certaines études ont démontré le rôle antiphagocytaire de ces capsules, d'autres ont démontré qu'elles atténuent la virulence de la bactérie. Plus récemment, il a été suggéré qu'elles sont des adhésines capables de s'attacher spécifiquement à des cellules humaines. Une région chromosomique impliquée dans la production de la capsule de type CP5 a été clonée en utilisant deux banques génomiques. (Lee et al., 1994) La première banque a été construite dans le vecteur pLH79 à partir d'un mutant CP5 de *S. aureus*, obtenu par mutagenèse par transposition (utilisation du transposon Tn918). Dans la banque on a identifié plusieurs recombinants qui hybridaient avec Tn918. À partir de ceux-ci on a isolé le fragment d'ADN qui flanquait le transposon. Ce fragment a servi comme sonde pour hybridation des colonies, en utilisant une banque génomique de la souche sauvage dans le vecteur pHC79. Les six clones positifs ont permis de caractériser une région chromosomique capable de compléter une série de mutants CP5. Ils restent encore des études à faire pour identifier tous les gènes impliqués dans la production de la capsule de type CP5.

L'isolement des gènes responsables de la production de la capsule polysaccharidique de type 1 est aussi le résultat de l'utilisation d'une banque génomique. Il s'agit d'une banque génomique plasmidique construite pour la souche *S. aureus* M. Dans un premier temps la banque a été infectée avec le phage 80 alpha et par l'intermédiaire des expériences de transduction on a identifié une région de 19,4 kpb impliquée dans la production de ce type de capsule. (Lee, 1992) Les recherches ont été continuées et la séquence d'intérêt de 19,4 kpb a été réduite à seulement 14,6 kpb, contenant 13 gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule. Subséquemment, on a identifié sept des protéines prédites par la séquence des gènes. (Lin et al., 1994) L'analyse transcriptionnelle de la région a suggéré que les gènes *cap1* soient organisés sous forme d'un long opéron avec au moins cinq promoteurs internes faibles, et que le long transcrit polycistronic (plus de 14 kpb) est dégradé, par la suite, en plusieurs transcrits plus courts. (Ouyang et Lee, 1997)

En prenant comme sonde des gènes *cap1*, la même équipe rapporte le clonage de plusieurs gènes de la capsule de type 8. Pour arriver à cette fin, ils ont criblé premièrement une banque génomique de *S. aureus* souche Becker construite dans le plasmide pLI50 et ils ont isolé un fragment de 14 kpb contenant une partie des gènes impliqués dans la production de cette capsule. Pour isoler d'autres gènes, impliqués probablement dans le même phénotype, les auteurs ont criblé avec le fragment de 14 kpb comme sonde, une autre banque génomique. Il s'agit d'une banque pour la même souche, mais construite dans le cosmide pLAFR3. Les auteurs ont identifié un fragment de 20,5 kpb capable de compléter tous les 18 mutants *Cap8⁻* disponibles. (Sau et Lee, 1996) L'analyse transcriptionnelle ultérieure a démontré que les gènes *cap8* sont transcrits comme un seul transcrit de 17 kpb. (Sau et al., 1997)

*

Notre travail visait la construction d'une banque génomique de *S. aureus* et son utilisation dans le laboratoire en vue d'identifier certains gènes d'intérêt. Dans une

première étape nous avons obtenu une banque génomique en nous servant des vecteurs plasmidiques pUC18 et pBluescript II SK⁺; cette banque a été analysée, caractérisée et ensuite conservée à long terme. Dans une deuxième étape nous avons criblé la banque génomique avec des sondes marquées à la radioactivité, pour identifier les clones qui portaient des fragments contenant des gènes impliqués dans la voie respiratoire de *S. aureus*.

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. 1. Souches bactériennes, plasmides et phages utilisés

Le **Tableau I** contient la description et la source de toutes les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans ce travail.

Nous avons utilisé également le phage T4 de la bactérie *E. coli*, qui a servi pour la réalisation de la technique d'électrophorèse en champ inversé.

Toutes les étapes de clonage ont été effectuées chez *E. coli* en se servant de techniques et de vecteurs de clonage adaptés pour cette espèce bactérienne.

Tableau I. Description et provenance des souches bactériennes, plasmides et phages utilisés

Souche	Description de la souche	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α		Cie Gibco-BRL
SAS2066	DH5 α /pSAS2066	B. Kafala et A. Sasarman, 1994
SAS2088	DH5 α /pSAS2088	A. Tremblay, 1995
SAS2098	DH5 α /pSAS2089	A. Tremblay, 1995
<i>S. aureus</i>		
RN450	Souche non-lysogène dérivée de la souche NCTC8325	S. Iordanescu
Plasmides		
pUC18	Ready-To-Go TM pUC18 <i>Bam</i> HI/BAP + Ligase	Pharmacia
pBluescript II SK ⁺		Cie Stratagene
pEB-S1	pUC18 avec insert <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II du gène <i>hemB</i> de <i>S. aureus</i>	B. Kafala et A. Sasarman, 1994
pSAS2088	pBluescript II SK ⁺ avec insert <i>Hind</i> III de la région chromosomique <i>erm</i> -distale du mutant SASW62 de <i>S. aureus</i>	A. Tremblay, 1995
pSAS2089	pBluescript II SK ⁺ avec insert <i>Hind</i> III de la région chromosomique <i>erm</i> -distale du mutant SASW63 de <i>S. aureus</i>	A. Tremblay, 1995
Phage		
Phage T4	Souche <i>E. coli</i> B1128	A. Sasarman

2. 2. Extraction chromosomique dans le cas de *S. aureus*

Dans la construction d'une banque génomique la qualité du matériel de départ, donc la qualité de l'ADN chromosomique, a une importance majeure. Il est préférable que l'ADN soit le moins possible fragmenté pour qu'il conserve le plus possible l'intégrité du chromosome. En même temps, il doit avoir la concentration et la pureté nécessaire pour permettre des bonnes digestions enzymatiques.

L'extraction chromosomique dans le cas de *S. aureus* soulève certains problèmes supplémentaires par rapport à *E. coli*. Les parois des staphylocoques sont beaucoup plus résistants du point de vue mécanique. Ils ne se lysent pas en présence de lysozyme, mais seulement en présence de la lysostaphine, une endopeptidase spécifique aux staphylocoques et dont la cible est représentée par les ponts de pentaglycine qui relient les chaînes de peptidoglycan de la paroi. Une fois ce traitement à la lysostaphine terminé, les sphéroplastes de *S. aureus* peuvent être traités de la même façon que les sphéroplastes de *E. coli* lors de l'extraction de l'ADN. (Novick, 1990)

Dans ce travail nous avons utilisé deux méthodes d'extraction chromosomique. La première, basée sur une méthode publiée (Dyer et Iandolo, 1983), consiste à séparer l'ADN chromosomique des autres constituants cellulaires, dans un gradient formé par deux couches de chlorure de césium (CsCl). La concentration de CsCl dans ces deux couches est telle qu'après une centrifugation à 30.000 rpm, 20⁰ C, pendant 24 heures, le chromosome doit se retrouver à l'interface. L'ADN est extrait ensuite à l'aide d'une aiguille.

La deuxième méthode employée combine des étapes spécifiques aux staphylocoques avec des étapes utilisées pour préparer l'ADN génomique des cellules eucaryotes (Blin et Stafford, 1976) dans le but de réduire le plus possible les manipulations qui pourraient fragmenter le chromosome.

2. 2. 1. Première méthode

Jour 1.

- ensemencer un Erlenmeyer de 200 ml de bouillon TSB (*Trypticase Soy Broth*) à partir d'une colonie isolée
- agiter la culture à une vitesse de 250 rpm à 37° C pendant 18 heures.

Jour 2.

- séparer la culture en deux bouteilles et centrifuger à une vitesse de 8.500 rpm et 4° C pendant 10 minutes
- faire deux lavages avec 10 ml TES (30 mM Tris pH=8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) et centrifuger ensuite à 8.500 rpm et 4° C pendant 5 minutes
- resuspendre dans 10 ml de solution TES-NaCl 2,5 M
- transférer dans un Erlenmeyer stérilisé de 250 ml
- ajouter de la lysostaphine à une concentration de 30 µg/ml
- agiter lentement pour 1 heure, à 37° C
- ajouter du N-lauroyl Sarcosine (P.M. = 293,4) à une concentration de 2% (solubiliser 0.2 g de Sarcosyl dans 1 ml de l'eau et l'ajouter au mélange)
- ajouter de la guanidine hydrochloride (P.M. = 95.53) à une concentration de 7 M (on ajoute directement dans le mélange 6,67 g de guanidine hydrochloride)
- agitation lente à 55° C pendant 1 h 30 min.
- amener la concentration de guanidine hydrochloride à 5,8 M en ajoutant environ 2 ml d'eau
- déposer délicatement dans deux tubes transparents pour le rotor SW41 2 ml d'une solution 5,7 M CsCl (P.M. = 168,37) en TE suivis de 2 ml d'une solution 2,85 M CsCl en TE (20 mM Tris pH=9, 20 mM EDTA)
- mettre délicatement environ 9 ml de lysat sur les deux couches de CsCl
- centrifuger dans un rotor type SW41 à 30 krpm, 20° C, pendant 24 heures.

Jour 3.

- retirer, à l'aide d'une aiguille 18,5 G, le chromosome se situant à l'interface des deux couches de CsCl (on collecte en général 1 à 2 ml)

- dialyser 4 fois contre 2 litres de tampon TES 5X avec agitation, pendant 3 heures au total
- déterminer la concentration de l'ADN en prenant la D.O.; l'ADN est prêt à être utilisé comme tel, sans précipitation préalable.

2. 2. 2. Deuxième méthode

- toutes les étapes jusqu'à l'ajout de la lysostaphine sont identiques à la première méthode
- ajouter la lysostaphine à 30 µg/ml et incuber à 37° C pendant 2 heures
- ajouter 15 ml de solution tampon (10 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl pH=8, 1 mM EDTA), 100 µg/ml protéinase K et 0,5% SDS
- incuber durant la nuit à 50° C sans agitation
- le lendemain extraire l'ADN avec un volume égal de phénol-chloroforme
- mélanger par inversion délicate du tube pendant 10 minutes à la température de la pièce
- centrifuger à 4000 rpm pendant 20 minutes à 10-12° C
- prélever la phase supérieure sans toucher à l'interface
- apporter la solution à 0,3 M Na-acétate, pH=5,5
- déposer délicatement, en haut de la solution, 2 volumes d'éthanol 100%
- enrouler sur une pipette Pasteur bouchée l'ADN qui précipite dans la phase supérieure du tube
- laver l'ADN avec 1 ml d'éthanol 70%
- laisser sécher l'ADN à la température de la pièce, sur un parafilm
- ajouter 4 ml tampon TE et laisser l'ADN se resuspendre sans agitation, pendant 2 jours à la température de 4° C
- déterminer la taille et la concentration de l'ADN par électrophorèse sur gel 0,4% agarose ou par électrophorèse en champ inversé.

2. 3. Électrophorèse en champ inversé (FIGE - *Field Inversion Gel Electrophoresis*)

L'électrophorèse en gel d'agarose représente sans doute un outil très utile pour l'étude biologique au niveau moléculaire. Depuis les premières expériences, cette méthode a connu des modifications ayant comme but d'améliorer certaines limitations. La méthode initiale ne permettait pas l'analyse des molécules dépassant une certaine taille; cette limitation est surmontée dans la méthode FIGE. La méthode est basée sur l'observation que la séparation des grandes molécules d'ADN s'améliore beaucoup en inversant périodiquement la direction du champ électrique auquel les molécules sont soumises. (Carle et al., 1986) La technique FIGE rend ainsi possible l'analyse des macromolécules entre 2 et 2.000 kpb.

Le principe de la technique réside dans la séparation des macromolécules d'ADN dans un gel d'agarose soumis à une tension électrique variable comme ampleur et direction. Dans un premier temps on applique un courant de certaine valeur dans la direction qui fait avancer les molécules dans le gel; après un laps de temps bien déterminé, la direction du courant est inversée et la tension est modifiée. Les molécules seront donc obligées de se réorienter dans la nouvelle direction du champ électrique. La vitesse, avec laquelle la direction de déplacement des molécules change, est fortement influencée par leur taille et cela va favoriser considérablement leur séparation dans le gel. Les caractéristiques du courant sont maintenues constantes pour un autre laps de temps, après quoi on revient aux premières valeurs. Les deux cycles se succèdent pendant toute la durée de la migration.

Nous avons utilisé FIGE pour déterminer la taille de l'ADN génomique extrait de *S. aureus* qui a servi à la construction de notre banque. Pour cette technique nous nous sommes servis d'une installation artisanale présentée dans la Fig. 6. Les paramètres d'électrophorèse comme tension et période de migration, ont été choisis en fonction des relations établies entre ces paramètres. (Lalande et al., 1987)

L'installation se compose d'un appareil horizontal d'électrophorèse de type BRL 20-25 qui est relié par l'entremise d'un montage électronique à deux sources de tension type BRL Modèle 250. Le montage électronique a comme partie principale deux temporisateurs, T_1 et T_2 , qui commandent à tour de rôle le fonctionnement d'un relais. Quand T_1 est en position de fonctionnement, T_2 est arrêté et vice versa. T_1 commande, par l'entremise du relais RI, le fonctionnement de la source S_1 qui alimente l'appareil d'électrophorèse au courant en sens "direct". Son temps de fonctionnement est ajusté par l'intermédiaire des potentiomètres P_1 et P_2 ; les valeurs qu'on peut donner se situent entre 3 secondes et 30 minutes 30 secondes. T_2 commande le fonctionnement de la source S_2 qui alimente l'appareil d'électrophorèse avec un courant de sens "inverse". La gamme des valeurs possibles pour le temps est la même que pour T_1 et s'ajuste à l'aide des potentiomètres P_3 et P_4 .

Cette construction est inspirée de la littérature (Roy et al., 1988) sauf que l'utilisation de l'ordinateur pour régler le temps de fonctionnement des sources a été remplacée par l'usage des temporisateurs. Leur réalisation est originale et a demandé une dépense modique comparativement à l'achat d'un ordinateur.

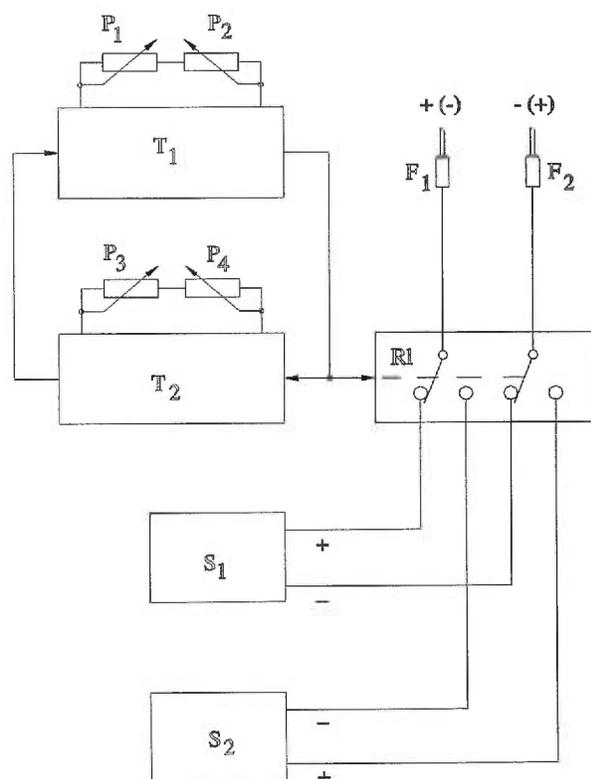


Figure 6. Schema-bloc de l'installation d'électrophorèse en champ inversé.

- P₁, P₃** potentiomètres pour le réglage du temps (en minutes);
- P₂, P₄** potentiomètres pour le réglage du temps (en secondes);
- T₁** temporisateur pour le courant en sens direct;
- T₂** temporisateur pour le courant en sens inverse;
- S₁, S₂** sources d'alimentation type BRL-250;
- R1** relais pour changer la polarité d'alimentation de l'appareil d'électrophorèse;
- F₁, F₂** fiches bananes.

2. 3. 1. *Étapes de l'analyse FIGE*

- préparer un gel d'agarose 1% dans le tampon TBE 0,5X
- charger le gel avec les échantillons d'ADN et les témoins de poids moléculaires adéquats (ex. l'ADN chromosomique du phage T4)
- brancher l'appareil d'électrophorèse à l'installation
- migrer pour 30 minutes à une tension de 40 V dans le sens direct du courant (cela permet aux échantillons d'ADN de rentrer dans le gel)
- appliquer les paramètres de l'électrophorèse en champ inversé (choisis pour notre cas) :
 - tension de 60 V en sens direct pendant 21 secondes
 - tension de 23 V en sens indirect pendant 6 secondes
- maintenir ces paramètres d'électrophorèse temps de 16 heures
- arrêter l'électrophorèse, colorer le gel et prendre la photo d'après la technique usuelle.

2. 3. 2. *Préparation d'un lysat phagique T4 de E. coli*

Jour 1.

- préparer dans du milieu BHI une culture jeune de la souche réceptrice: partir d'une culture d'une nuit, inoculer 3,5 ml BHI avec 0,5 ml culture et incuber à 37° C pour 1 heure 30 minutes
- faire une dilution 10^{-3} du phage T4 (titre phagique 10^9 - 10^{10} pfu/ml)
- distribuer dans plusieurs tubes 0,3 ml de phage T4 dilué et 1 ml de culture jeune de *E. coli*
- incuber à 37° C pendant 30 minutes
- ajouter à chaque tube 4 ml de gélose molle BHI (0,6% agar) préparée le jour même et gardée à 50° C
- mélanger vite et couler sur des boîtes BHI 1,2% agar, fraîchement préparées
- incuber les boîtes Pétri pour la nuit à 37° C dans un contenant en plastique à couvercle (à la base du contenant on dispose un papier mouillé pour garder l'humidité).

Jour 2.

- à l'aide d'une pipette Pasteur courbée à la flamme, gratter la couche de gélose molle déposée dans les boîtes Pétri
- récupérer toute la quantité dans une bouteille à centrifuger, stérile
- centrifuger à 7.000 rpm pendant 20 minutes, à 4° C
- décanter le surnageant dans plusieurs tubes (environ 100 ml par tube)
- ajouter 1 ml de chloroforme et vortexer 10 secondes
- laisser reposer sur la paillasse pendant 15 minutes
- centrifuger à 7.000 rpm pendant 10 minutes, à 4° C
- décanter le surnageant dans un Berzelius et y ajouter 10 g PEG/100 ml lysat (PEG = polyéthylèneglycol)
- agiter sur plaque magnétique à la température de la pièce jusqu'à la dissolution totale du PEG
- maintenir le Berzelius dans de l'eau glacée pendant 60 minutes
- centrifuger à 6.500 rpm pendant 10 minutes à 4° C
- resuspendre le culot en 2 ml de tampon TM et laver la bouteille de centrifugation avec autres 2 ml de tampon
- ajouter un volume égal de chloroforme et vortexer
- centrifuger à 500 rpm pendant 10 minutes à 4° C
- aspirer avec une pipette Pasteur la phase supérieure, où se trouve le phage
- construire dans un tube un gradient de glycérol en superposant délicatement 3 ml solution glycérol 5% à 3 ml solution glycérol 40% (les solutions de glycérol sont préparées dans l'eau et sont préalablement stérilisées par ébullition 20 minutes)
- ajouter en haut du gradient de glycérol le lysat phagique
- équilibrer avec un autre tube qui contient un gradient de glycérol et du tampon TM à la place du lysat phagique
- ultracentrifuger à 35.000 rpm pendant 1 heure à 4° C
- resuspendre le culot phagique dans 1 ml tampon TM
- laisser reposer à 4° C pour une nuit.

2. 3. 3. *Extraction de l'ADN du phage T4*

- ajouter à 1 ml de lysat phagique de T4 200 µl de tampon STEP (0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 0,4 M EDTA, 1 mg/ml protéinase K)
- chauffer à 50° C pendant 15 minutes
- ajouter 1 volume de phénol saturé en Tris
- centrifuger à 3.500 rpm pendant 10 minutes, à la température de la pièce
- garder la phase supérieure et faire une purification phénol-chloroforme
- précipiter l'ADN avec 2 volumes d'éthanol 95%
- entourer l'ADN filamenteux sur une pipette Pasteur bouchée
- laver dans 1 ml d'éthanol 70%
- sécher l'ADN à l'air sur un parafilm
- le resuspendre dans 1 ml tampon TE (50 mM Tris pH=8,0, 50 mM EDTA)
- garder l'ADN phagique à -70° C.

2. 4. **Digestion partielle du chromosome bactérien**

Une fois l'ADN chromosomique obtenu, l'étape qui suit réside dans le fractionnement de l'ADN selon la taille désirée. Les méthodes utilisées pour arriver à cete fin peuvent être mécaniques ou bien chimiques, comme la digestion avec des endonucleases de restriction. Dans le cas de la digestion avec une enzyme de restriction, le choix de l'enzyme à utiliser est une décision qui a un impact important sur la qualité ultérieure de la banque. La digestion partielle avec une enzyme qui a la séquence de reconnaissance de 4 paires de bases a l'avantage de donner une population aléatoire de fragments et d'éviter un clivage préférentiel ou une distribution irrégulière des sites de coupure au long du génome.

Nous avons utilisé l'enzyme *Sau3AI* qui reconnaît la séquence G-A-T-C et donne des fragments clonables directement dans des vecteurs qui portent des sites de

clonage *Bam*HI (G-G-A-T-C-C-). Dans un génome avec un contenu de 50% en (G+C), les sites *Sau*3AI ont une fréquence d'un site à chaque 256 pb et d'un site à chaque 362 pb, au cas d'un génome qui contient environ 30% (G+C). (Anderson et al., 1993) Il est nécessaire de couper seulement $1/80^{\text{ème}}$ de ces sites en vue de produire des fragments d'ADN de taille d'environ 20 kpb.

Quand les fragments *Sau*3AI sont clonés dans un vecteur coupé *Bam*HI, trois sur quatre des ligations ne vont pas refaire le site *Bam*HI, donc dans la majorité des cas une excision du fragment cloné ne sera pas possible. (Frischauf et al., 1987; Karn et al., 1983)

2. 4. 1. *Mise au point de la digestion partielle avec l'enzyme Sau3AI*

Jour 1.

- mélanger dans un tube de 1,5 ml: 10 µg d'ADN chromosomique, 15 µl du tampon 10X de l'enzyme utilisée et apporter le volume à 150 µl avec de l'eau distillée
- aliquoter le mélange à raison de 9 tubes Eppendorf: 30 µl dans le premier et 15 µl dans chaque tube suivant
- maintenir les tubes sur glace durant toutes les manipulations
- ajouter dans le premier tube 4 unités d'enzyme *Sau*3AI, vortexer bien et transférer 15 µl de ce mélange dans le tube suivant
- arriver ainsi à un volume de 30 µl dans le deuxième tube, vortexer et transférer 15 µl dans le tube suivant
- continuer de la même façon pour les huit premiers tubes
- garder seulement 15 µl du volume pour le tube numéro huit (les autres 15 µl seront jetés)
- le neuvième tube reste avec les 15 µl du mélange initial, il ne reçoit pas d'enzyme
- incuber les tubes 1 heure à 37° C
- arrêter les digestions sur glace en ajoutant de l'EDTA, à raison d'une concentration de 20 mM
- charger les neuf digestions sur un gel de 0.7 % agarose

- migrer durant la nuit à une tension de 1-2 V/cm.

Jour 2.

- colorer le gel 5 minutes dans une solution 5 µg/ml de bromure d'ethidium
- rincer avec de l'eau
- prendre la photo du gel pour différents temps d'exposition
- déterminer sur la photo, en se rapportant aux marqueurs de poids moléculaire et en fonction de la taille des fragments d'ADN, la digestion qui donne la concentration d'ADN maximale
- calculer le nombre d'unités d'enzyme utilisées pour ce tube, en sachant que le premier tube a reçu 2 unités d'enzyme/µg d'ADN.

2. 4. 2. Digestion partielle à grande échelle

- digérer 200 µg d'ADN chromosomique avec l'enzyme *Sau3AI*, en utilisant la moitié du nombre d'unités d'enzyme/µg d'ADN déterminé ci-dessus
- migrer une aliquote de la digestion (1 µg) sur un gel 0.4 % pour vérifier la distribution de la taille des fragments
- purifier l'ADN par phénol-chloroforme et chloroforme
- concentrer l'ADN par précipitation à l'éthanol et resuspendre dans 200 µl TE (10 mM Tris.HCl, 1mM EDTA pH=8.0).

2. 4. 3. Utilisation des enzymes de restriction

Les composantes d'un mélange de digestion sont généralement les suivantes:

- solution d'ADN
- solution d'enzyme commerciale (pour chaque µg d'ADN il faut ajouter 10 U d'enzyme, en même temps il faut tenir compte que le volume de la solution d'enzyme ne doit pas dépasser 10% du volume total de la digestion, étant donné que le glycérol contenu peut nuire à la digestion)
- tampon commercial de concentration 10X, spécifique pour l'enzyme (le volume ajouté doit représenter un dixième du volume total de la digestion)

- l'eau distillée (il est préférable de faire la digestion dans le volume le plus grand possible, soit entre 50 μ l et 450 μ l, dans un même tube Eppendorf).

*

En général, une digestion s'effectue pour un temps de 1 heure, à la température de 37° C. Si on veut s'assurer que la digestion sera complète on peut augmenter le temps de digestion ou augmenter le volume d'enzyme utilisé. Il est important, pour que l'enzyme garde toute son activité, que l'ADN soit pur.

2. 4. 4. Purification de l'ADN

Les étapes habituelles d'une purification d'ADN à phénol-chloroforme sont:

- mélanger la solution d'ADN à ½ volume de phénol et ½ volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1)
- vortexer et centrifuger ensuite dans une centrifugeuse à Eppendorf pour 1 minute
- retirer la phase aqueuse (phase supérieure) et la mélanger à 1 volume de chloroforme
- vortexer et centrifuger de nouveau pour 1 minute
- retirer environ 80% de la phase aqueuse (phase supérieure) et ajouter 2 volumes d'éthanol 100% et un dixième de volume d'acétate de sodium 5M
- laisser précipiter à -70° C pour minimum 15 minutes (jusqu'à 12 h)
- centrifuger à 4° C pour 20 minutes
- enlever le plus possible d'éthanol
- ajouter 50 μ l d'éthanol 70%
- centrifuger pour 15 minutes à 4° C
- enlever avec une pipette environ 100 μ l de liquide et laisser s'évaporer le reste à la température de la pièce.

2. 5. Gradient de sucrose

Après la digestion partielle du chromosome on se retrouve en général avec un mélange de fragments d'ADN de différentes tailles. Le fait de déterminer et d'utiliser la bonne concentration d'enzyme pour la digestion va nous donner un mélange enrichi en fragments de taille désirée, mais n'élimine pas totalement la présence de produits de digestion de tailles différentes.

Pour pallier à ce fait l'ADN digéré doit être passé par une centrifugation en gradient de sucrose. Le principe de la technique est qu'après une centrifugation à haute vitesse, les espèces moléculaires vont se séparer et situer au long du gradient, en fonction de leurs tailles moléculaires. On pourra par la suite extraire du gradient la couche qui contient l'ADN de taille désirée.

Jour 1.

- resuspendre l'ADN chromosomique digéré et purifié dans 100 μ l STE (10 mM Tris pH=8, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- chauffer l'ADN à 65° C pendant 5 minutes
- préparer une solution 5% et une solution 40% de sucrose dans le tampon: NaCl (1M)-Tris (20 mM)-EDTA (5 mM)
- stériliser ces solutions en les bouillant pendant 30 minutes
- superposer ces solutions sous forme de deux couches, dans un tube pour le rotor SW41
- établir le gradient linéaire avec l'appareil (temps = 1:25; angle = 81.5°; vitesse = 21)
- déposer délicatement l'ADN sur le gradient linéaire de sucrose
- ultracentrifuger à 32.000 rpm pendant 18 heures à 20° C (accélération et décélération très lentes).

Jour 2.

- percer un trou au fond du tube et récolter 15 à 18 fractions d'environ 700 μ l de solution d'ADN chacune

- migrer 30 μ l de chacune des fractions avec 10 μ l *loading buffer* 10X, sur un grand gel (250 ml) 0.9 % agarose pendant 2,5 heures à 135 volts (tampon TBE 1X) en présence des témoins de poids moléculaire
- prendre la photo du gel et choisir la ou les fractions qui possèdent la taille moléculaire qui nous intéresse
- pour précipiter, partager la fraction en 4 tubes Eppendorf
- compléter avec d'eau jusqu'au volume de 500 μ l dans chaque tube
- ajouter deux volumes d'éthanol 100% et un dixième de volume d'acétate de sodium et laisser précipiter à -70° C pour une nuit
- resuspendre dans 100 μ l TE au total (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH=8)
- vérifier la taille de l'ADN en migrant 5 μ l sur un gel d'agarose 0,4%.

2. 6. Ligation des inserts dans un vecteur plasmidique

Le matériel obtenu après un gradient de sucrose a la pureté nécessaire pour être utilisé directement dans l'étape de ligation.

Nous avons ligué les fragments d'ADN chromosomique dans deux vecteurs plasmidiques: pUC18 et pBluescript II SK⁺. Dans le cas du premier on a utilisé un kit qui se compose du mélange lyophilisé du vecteur (déjà déphosphorilé) avec la ligase et du tampon de ligation. Pour le deuxième cas nous avons réalisé dans le laboratoire toutes les étapes préliminaires de préparation du vecteur en vue de ligation.

Après ligation les plasmides recombinants ont été introduits par électroporation dans la souche de *E. coli* DH5 α et les clones contenant des inserts ont été sélectionnés.

Pour les clones sélectionnés, les plasmides recombinants ont été extraits et leur taille déterminée par électrophorèse en gel d'agarose. Nous avons retenu pour former la banque génomique seulement ceux qui contenaient des fragments chromosomiques de *S. aureus* plus grands de 9 kpb.

2. 6. 1. Utilisation de la ligase

Les composantes du mélange de ligation et les conditions de réaction sont suivantes:

- inserts d'ADN (on utilise habituellement de 100 ng à 1 µg d'inserts)
- vecteur déphosphorylé (le ratio molaire insert:vecteur est normalement 2:1)
- ligase (1 U de ligase convient normalement pour 1 µg d'ADN)
- tampon de ligation 10X (doit représenter un dixième du volume de la ligation)
- eau pour compléter le volume de la ligation, volume qui est en général de 20 µl
- incubation pendant 18 heures à 15° C
- le matériel peut être utilisé directement pour la transformation des cellules compétentes.

Le tampon de ligation 10X (doit être préparé juste avant l'utilisation):

- mélanger 10 µl tampon 10X (200 mM Tris pH=7.5, 50 mM MgCl₂) avec 1 µl DTT 1M et 1 µl ATP 500 mM.

Pour la déphosphorylation du vecteur:

- on utilise la CIP (*calf intestinal phosphatase*) avec son tampon commercial
- 10 U CIP peuvent déphosphoryler environ 2 µg de vecteur
- le volume final du mélange est habituellement de 50 µl
- la réaction a lieu à 37° C pendant 30 minutes
- la réaction est arrêtée à 75 °C pendant 10 minutes
- après une précipitation, on vérifie sur gel la concentration de l'ADN.

2. 6. 2. Utilisation du kit Ready-To-Go pUC18 BamH I/BAP + Ligase

(référence - le livret accompagnateur du kit de *Pharmacia Biotech*)

- resuspendre l'insert à liguer dans de l'eau ou dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA)

- ajouter dans le tube fournie par le kit 20 μl de solution contenant la quantité nécessaire d'ADN
- si la quantité d'ADN à ajouter se trouve dissoute dans un volume plus petit de 20 μl , compléter avec de l'eau jusqu'au 20 μl
- incuber à la température de la pièce 3-5 minutes
- mélanger doucement la cupule et la centrifuger pour ressembler tout le volume de solution
- incuber à 16° C pendant 30 minutes
- désactiver la ligase à la chaleur (70° C; 10 minutes)
- avant d'utiliser le matériel de la ligation pour l'électroporation, lui faire une purification d'après les étapes suivantes:
 - ajouter 5-13 μl de solution NaCl 5M, puis 2 volumes d'éthanol 100% à la température de la pièce
 - vortexer et placer à -70° C pendant au moins 1 heure
 - centrifuger à 4° C pour 10 minutes
 - laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70% et le sécher sous vide
 - resuspendre l'ADN dans un tampon compatible avec les étapes suivantes
- utiliser pour électrotransformer 100 μl de cellules compétentes, 1-2 μl du matériel purifié.

2. 7. Transformation des cellules de *E. coli*

Pour la transformation nous avons utilisé la méthode d'électrotransformation.

2. 7. 1. *Électrotransformation des cellules*

- préincuber à 37° C 1 ml de milieu SOC
- ajuster l'électroporateur à 2,5 kvolts, 25 μF et 200 à 400 ohms
- mélanger l'ADN provenant d'une ligation (1 ou 2 μl du mélange de ligation) à 100 μl de cellules électrocompétentes

- mettre le-tout dans une cuvette d'électroporation de 0.2 cm, prérefroidie
- s'assurer qu'aucune bulle d'air ne se forme dans la cuvette avant de l'installer dans la chambre de l'électroporateur
- appliquer le courant (le temps affiché doit être égal ou plus grand de 5 ms)
- ajouter 1 ml de SOC préchauffé à 37° C dans la cuvette et transférer le mélange SOC-bactéries dans un tube de verre
- incuber 1 heure à 37° C avec agitation modérée
- étaler 100 µl du mélange sur plusieurs Pétri sélectifs
- pour les plasmides pUC18 et pBluescriptSK le milieu sélectif doit contenir de l'ampicilline, du X-gal et de l'IPTG.

Pour préparer 100 ml de SOC on ajoute:

- 2 g bactotryptone
- 0.5 g extrait de levure
- 0.36 g glucose
- 1 ml NaCl 5M
- 1 ml MgSO₄ 1M
- 1 ml MgCl₂ 1M
- 110 µl NaOH 3N
- compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée
- stériliser en autoclavant.

2. 7. 2. Préparation des cellules électrocompétentes de E. coli

- préparer une culture en phase exponentielle (densité optique entre 0,4 et 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm) de la souche (ex. DH5α) dans 500 ml de bouillon BHI
- répartir la culture en 3 ballons de polypropylène stérilisés et prérefroidis
- laisser reposer les ballons 30 minutes sur la glace
- centrifuger à 9.000 rpm pendant 20 minutes à 4° C
- resuspendre le culot de chaque ballon dans 5 ml eau déionisée stérilisée froide
- compléter à 500 ml (au total) avec eau déionisée stérilisée froide

- reposer 25 minutes sur glace
- centrifugation à 9.000 rpm, 20 minutes, à 4° C
- resuspendre dans 350 ml (au total) eau déionisée stérilisée froide
- reposer 20 minutes sur glace
- centrifugation à 9.000 rpm, 15 minutes, à 4° C
- resuspendre dans 60 ml (au total) eau déionisée froide en répartissant le-tout dans deux ballons
- reposer 15 minutes sur glace
- centrifugation à 8.000 rpm, 15 minutes, à 4° C
- resuspendre dans 1 ml (au total) de solution stérilisée froide de 10% glycérol dans l'eau déionisée
- distribuer le mélange à raison de 100 µl/cupule dans des tubes Eppendorf stérilisés, installés dans un bain éthanol-glace sèche
- conserver les échantillons de cellules électrocompétentes à -70° C.

2. 8. Extraction plasmidique

2. 8. 1. *Méthode par maxi-lyse alcaline*

Jour 1.

- ensemencer 1 litre de milieu de culture LB ou BHI contenant le ou les antibiotiques appropriés avec 50 ml de culture bactérienne
- incuber à 37° C, avec forte agitation, 12-16 heures.

Jour 2.

- répartir le litre de culture obtenu en 6 bouteilles en polypropylène d'une capacité de 250 ml
- centrifuger à 8.000 rpm pour 10 minutes, à 4° C
- rejeter le surnageant et resuspendre les cellules dans 150 ml au total de STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH=8, 1 mM EDTA pH=8), sur glace

- centrifuger à 8.000 rpm, 4° C, pendant 10 minutes
- rejeter le surnageant et resuspendre les cellules dans 20 ml au total de Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA pH=8, 5 mg/ml lysozyme) fraîchement préparée
- ajouter 40 ml de solution II (2,5 g SDS, 2,0 g NaOH, 250 ml eau) fraîchement préparée
- mettre sur glace pendant 10 minutes
- ajouter 30 ml Solution III (30 ml acétate de potassium 5 M; 5,57 ml acide acétique glacial; 14,25 ml eau)
- mettre sur glace 10 minutes
- centrifuger à 12.000 rpm pendant 60 minutes à 4° C
- filtrer le surnageant à travers quatre épaisseurs de chiffons Kimwipes
- ajouter 55 ml d'isopropanol et mélanger par inversion
- laisser à la température de la pièce pendant 10-15 minutes
- centrifuger à 11.000 rpm pendant 30 minutes à 20° C
- rejeter le surnageant et ajouter 50 ml d'éthanol 70%
- centrifuger à 11.000 rpm pendant 30 minutes à 20° C
- rejeter le surnageant et sécher le culot à 37° C
- resuspendre le culot en 8,5 ml de TE (10 mM Tris-Cl pH=8, 1 mM EDTA pH=8)
- ajouter 9,2 g de CsCl (indice de réfraction 1.3925)
- agiter et ajouter 0,85 ml de solution 10 mg/ml en l'eau de bromure d'éthidium
- centrifuger à 8.000 rpm, 5 minutes à 20° C
- vider le surnageant dans un tube en polyallomère Quick Seal
- compléter le remplissage du tube avec de l'huile minérale légère, en laissant une petite bulle d'air
- préparer un second tube pour équilibrer (8,5 ml TE plus 9,2 g CsCl)
- équilibrer et sceller les tubes
- ultracentrifuger pendant 70 heures (39 krpm) ou 44 heures (44 krpm) à 25° C.

Jour 4 ou 5.

- extraire la bande plasmidique à l'aide d'une aiguille 18G1¹/₂ en la visualisant aux U.V.
- extraire le bromure d'éthidium 4 à 5 fois avec de l'alcool butylique
- dialyser plusieurs fois la solution d'ADN contre du TES 5X (0,25 M NaCl, 0,05 M Tris pH=8, 0,005 M EDTA pH=8) avec faible agitation
- précipiter l'ADN avec un dixième de volume de solution d'acétate de sodium 3M pH=5,2 et deux volumes d'éthanol 100% froid
- après la précipitation resuspendre l'ADN dans 100 à 500 µl d'eau et déterminer sa concentration
- conserver l'ADN à -20° C ou -70° C.

2. 8. 2. Méthode par ébullition ("boiling")

- repiquer la souche bactérienne sous forme de tapis sur le quart ou le huitième d'un Pétri sélectif
- resuspendre le tapis bactérien dans 300 µl solution STET (8% sucrose, 0,5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH=8)
- laisser sur glace
- ajouter 25 µl d'une solution de lysozyme 10 mg/ml en Tris 100 mM pH=8
- maintenir le mélange dans un bain d'eau bouillante pendant 1 minute
- laisser sur glace pour refroidir
- ajouter 375 µl d'une solution d'acétate d'ammonium 7,5 M
- centrifuger 15 minutes
- enlever le culot avec un cure-dent stérilisé
- remplir le tube Eppendorf avec de l'éthanol 100% froid
- précipiter l'ADN à -20° C pendant 15 minutes jusqu'à 1 heure
- centrifuger 15 minutes
- rincer le culot avec éthanol 70% froid
- sécher le culot

- resuspendre dans 20 à 50 μ l d'eau.

2. 8. 3. *Méthode par éclatement ("cracking")*

- repiquer sous forme de tapis jusqu'à 12 clones par pétri sélectif
- resuspendre le tapis de chaque clone dans 100 μ l tampon à <cracking>
- laisser reposer 20 minutes à la température de la pièce
- centrifuger 20 minutes
- faire migrer 15 μ l sur un gel 0,7% agarose pendant 18 heures à 35 volts (grand gel) ou 22 volts (petit gel), en présence des témoins plasmidiques de poids moléculaire.

Pour la préparation de 50 ml du tampon à *cracking* mélanger:

- 0,56 ml Tris-Base 1 M
- 1,94 ml Tris-HCl 1 M
- 0,2 ml EDTA 0,5 M
- 5 ml SDS 10%
- 6,85 g sucrose
- 50 μ l solution de bleu de bromophénol 10%
- eau jusqu'à 50 ml.

2. 9. Préparation des membranes et hybridation avec une sonde radioactive

En général, le criblage d'une banque génomique à la recherche d'un clone représente une opération très laborieuse. Pour faciliter cette tâche, il est nécessaire d'utiliser la méthode de criblage qui nous avantage.

Entre l'hybridation sur colonies et la méthode *Dot-Blot*, nous avons choisi, pour les avantages qu'elle offrait, la dernière. Étant donné que le développement irrégulier

des colonies bactériennes sur les filtres peut conduire à une importante variabilité de la quantité de plasmides de chaque clone et parce que la présence du chromosome de la bactérie peut apporter un bruit de fond, la technique d'hybridation sur colonies donne souvent des faux signaux. (Auffray et al., 1995) La technique *Dot-Blot* donne un signal plus spécifique car prévoit de déposer sur la membrane seulement l'ADN plasmidique et élimine ainsi la possibilité d'apparition du bruit de fond dû au chromosome.

Dans notre cas, le fait que notre banque se présentait comme une collection de 800 clones isolés, facilitait une organisation ordonnée sur les membranes d'hybridation et rendait ainsi facile l'identification du clone positif. De plus, on pouvait utiliser les mêmes membranes pour plusieurs criblages avec des sondes différentes.

Par la suite nous avons utilisé la technique d'hybridation par transfère *Southern* pour confirmer les signaux positifs obtenus par la technique de *Dot-Blot*. Les résultats de *Southern-Blot* ont servi aussi à établir avec plus de précision les cartes de restriction de plusieurs plasmides recombinants.

2. 9. 1. *Technique de "Dot-Blot"*

(protocole pour membranes de nylon chargées positivement ♦ application manuelle de la probe)

- utilisation des membranes de type *Bio-Rad Zeta-Probe*
- couper les membranes en carrés de (10x10) cm
- tracer sur les membranes, avec le bout d'un cure-dent, des carreaux de dimension 1x1 cm (100 carreaux/membrane)
- rincer les membranes dans de l'eau distillée et les laisser sécher à l'air
- déposer sur chaque carreau environ 2 µl d'ADN plasmidique, obtenu par extraction par ébullition et préparé de la manière suivante:
 - distribuer dans des tubes Eppendorf 2 µl de matériel d'extraction
 - amener la concentration en chaque tube à 1 M NaOH et 200 mM EDTA
 - dénaturer l'ADN 10 minutes sur un bain d'eau bouillante

- refroidir sur glace
- centrifuger pour 5 secondes
- laisser sécher les membranes à l'air
- les membranes sont prêtes pour les étapes de préhybridation et d'hybridation
- on peut les garder à long terme dans des sacs bien scellés, à la température de la pièce.

2. 9. 2. Technique de transfert "Southern"

Jour 1.

- charger l'ADN digéré sur un petit gel (100 ml) d'agarose de concentration 0,7% en TBE 1X
- faire migrer à 22 volts pendant 18 heures, en présence de témoin de poids moléculaires et de témoin positif et négatif d'hybridation
- pour d'ADN chromosomique utiliser environ 3 µg/puits et pour ADN plasmidique environ 2 ng/puits.

Jour 2.

- colorer le gel pendant 15 minutes dans une solution de 2 µg/ml bromure d'éthidium en eau
- décolorer dans de l'eau déionisée pendant 10 minutes
- prendre la photo avec une règle métrique fluorescente juxtaposée au gel
- préparer une membrane de nitrocellulose-nylon de la même taille que le gel (manipuler cette membrane avec des gants)
- tremper le gel successivement avec faible agitation dans:
 - HCl 0.25N (21,5 ml HCl glacial concentré par litre d'eau déionisée) pendant 10 minutes exactement
 - rinçage à l'eau déionisée
 - solution de dénaturation (116,88 g NaCl + 40,00 g NaOH/2 litres d'eau déionisée) pendant 30 minutes
 - rinçage à l'eau

- solution de dénaturation nouvelle pendant 30 minutes
- rinçage à l'eau
- solution de neutralisation pH=7,4 (242,2 g Tris Base + 176,0 g NaCl + 4,0ml EDTA 0,5M + 156,0 ml HCl glacial / 2 litres d'eau déionisée) pendant 30 minutes
- rinçage à l'eau
- solution de neutralisation nouvelle pendant 30 minutes
- rinçage du gel dans du SSC 20X pH=7,0 (701,0 g NaCl + 352,8 g citrate de sodium/4 litres d'eau déionisée)
- déposer le gel sur deux papiers 3M imbibés par capillarité, à l'aide d'un bassin, de la solution SSC 20X
- mouiller la membrane de nitocellulose-nylon en eau déionisée
- apposer la membrane sur le gel d'un seul mouvement (une fois apposer ne la bouger plus)
- ajouter en dessus de la membrane, dans cet ordre: 2 feuilles 3M mouillées, 6 feuilles 3M sèches, une pile de papiers absorbants, une plaque de verre et un poids
- laisser se faire le transfère par capillarité de l'ADN du gel vers la membrane, durant toute la nuit.

Jour 3.

- démonter le système de capillarité en ne laissant que le gel et la membrane, de même que'un papier 3M qui se trouve par-dessus la membrane
- transférer le-tout sur une plaque de verre de sorte que le gel soit au-dessus
- à travers le gel, marquer les puits avec un crayon feutre sur la membrane
- jeter le gel
- rincer la membrane 2 minutes dans du SSC 3X
- éponger la membrane sur un papier 3M et la mettre entre deux papiers 3M secs
- sécher la membrane sous-vide à 80° C pendant 2 heures
- la membrane est maintenant prête pour les étapes de préhybridation et d'hybridation on peut la garder à long terme, à la température de la pièce, bien scellée dans un sac.

2. 9. 3. *Hybridation des membranes*

(protocole à utiliser pour membranes préparées par les techniques *Dot-Blot* ou *Southern Blot*)

Jour 1.

- mouiller les membranes dans du SSC 3X
- enrouler dans des mèches de nylon et mettre dans la bouteille pour le four à hybridation
- ajouter quelques ml de SSC 3X
- dérouler les membranes, selon le sens de rotation de la bouteille dans le four à hybridation
- vider le liquide et mettre la solution de préhybridation bouillie 10 minutes et refroidie
- utiliser 5 ml de solution pour une petite bouteille et 10 ml pour une grande bouteille préhybrider une nuit à 42° C (minimum 4 heures).

Jour 2.

- vider les bouteilles
- remplacer le liquide par la solution d'hybridation (sonde radioactive comprise) bouillie 10 minutes et refroidie
- hybrider à 42° C pendant la nuit.

Jour 3.

- vider les bouteilles dans la poudre spéciale pour liquides radioactifs
- laver les membranes avec:
 - une solution SSC 0,5X et SDS 0,1% préchauffée à 60-65° C (rincer rapidement et jeter le liquide comme étant radioactif)
 - une solution SSC 0,5X et SDS 0,1% préchauffée (tourner dans le four à 60-65° C pendant 45 minutes et jeter le liquide)
 - répéter deux autres fois la dernière étape
 - une solution SSC 0,1X et SDS 0,1% à 60-65° C pendant 15 minutes (seulement dans le cas d'ADN homologue)

- éponger la membrane sur un papier 3M et l'envelopper dans du Saran Wrap
- exposer avec écran pendant 15 minutes ou plus longtemps si nécessaire, à la température de la pièce (une exposition avec écran donne un signal plus fort que sans écran, pour le même temps d'exposition).

Pour préparer la solution de préhybridation

- 500 µl HEPES 1M pH=7,0 (3,74 g HEPES dans de l'eau déionisée jusqu'à 15 ml et ajuster le pH avec NaOH)
- 2,5 ml SSC 20X
- 4,5 ml formamide
- 0,5 ml SDS 20%
- 40 µl EDTA 0,5M
- 2,0 ml DENHARDT 50X
- ADN de sperme de saumon pour une concentration de 200 µg/ml solution
- eau jusqu'à 10 ml

Pour 100 ml solution DENHARDT 50X

- 1 g Ficoll 400
- 1 g polyvinylpyrrolidone
- 1 g BSA fraction V
- filtrer et garder à -20° C.

Pour préparer la solution d'hybridation

- les mêmes composantes que pour la solution de préhybridation
- ajouter aussi la sonde marquée à la radioactivité.

2. 9. 4. Préparation de l'ADN de sperme de saumon

- ajouter 130 mg d'ADN de sperme de saumon dans 13 ml d'eau
- agiter le tout 1-2 heures sur une plaque chauffante tiède avec un agitateur magnétique stérilisé

- ajouter 1/50^e volume de NaCl 5M pour amener la concentration en sels à 0,1 M
- faire passer la solution une quarantaine de fois à travers une aiguille 18G
- faire une purification au phénol
- centrifuger à 4° C à 8.000 rpm
- faire une purification au phénol-chloroforme
- centrifuger de nouveau
- précipiter avec 2 volumes éthanol froid
- centrifuger
- sécher le culot d'ADN au moins 18 heures
- resuspendre en 6 ml d'eau (pour avoir une concentration finale de 5 à 10 mg/ml)
- mesurer la concentration par densité optique
- distribuer dans des tubes Eppendorf de façon à garder entre 4,5 à 5 mg d'ADN par échantillon
- garder au -20° C.

2. 9. 5. Marquage aléatoire à la radioactivité

- mélanger 30 à 100 ng d'ADN avec de l'eau et 5 µl solution d'hexamères 10X (62,5 A₂₆₀U ou 62,5 unités de densité optique à une longueur d'onde de 260 nm) pour un volume total de 20 µl
- bouillir 5 minutes et refroidir sur glace immédiatement
- ajouter dans cet ordre:
 - 10,5 µl eau
 - 2,0 µl solution A
 - 5,0 µl solution B
 - 2,5 µl solution trinuéotidique (dCTP, dGTP, dTTP) 0,3 mM
 - 2,0 µl solution BSA (10 mg/ml)
 - 7,0 µl ³²P-dATP
 - 1,0 µl klenow (ADN polymérase, fragment Klenow) (6 U)
- incuber pendant 2 heures à la température de la pièce
- ajouter 200 µl solution STOP puis 20 µl eau et 30 µl STE 10X

- prélever 1 μl de solution et lui mesurer la radioactivité
- passer la sonde sur la colonne de Séphadex G-50 pour éliminer les nucléotides radioactifs libres
- mesurer le volume de solution qui sort de la colonne
- compter la radioactivité de 1 μl de solution, après le passage par la colonne
- calculer la radioactivité totale de la sonde
- calculer le pourcentage d'incorporation de la radioactivité avec la formule:
radioactivité après le passage/radioactivité avant le passage = % d'incorporation
- calculer l'activité spécifique comme étant:
radioactivité totale de la sonde x volume de la sonde/quantité d'ADN dans la sonde
- habituellement on utilise pour une hybridation une activité spécifique de la sonde de 10^8 cpm/ μg (coups par minute/ μg).

Préparation des solutions

Solution O

- Tris-HCl 1,25 M pH = 8,0
- MgCl_2 0,125 M
- dans 25 ml d'eau

Solution A

- 1 ml solution O
- 18 μl β -mercaptoéthanol
- conserver à -20°C

Solution B

- HEPES 2M (59,58 g dans 250 ml eau)
- ajuster le pH à 6,6 avec du NaOH 10N
- conserver à 4°C

Solution STOP

- NaCl 20 mM
- Tris-HCl 20 mM pH = 7,5
- EDTA 2 mM

- SDS 0,25%
- dATP 1 μ M
- eau jusqu'à 5 ml
- garder à -20° C

Solution STE 10X

- Tris 100 mM pH = 7,5
- NaCl 100 mM
- EDTA 10 mM

2. 9. 6. Préparation d'une colonne de "Sephadex G-50 DNA grade"

- utiliser une seringue de 1 ml bouchée à son extrémité de laine de verre siliconisée stérilisée
- remplir de solution de *Sephadex G-50 DNA grade*
- centrifuger à plusieurs reprises la résine pour éliminer l'eau (vitesse 2.500 rpm, température de la pièce, durée 1 minute)
- bâtir ainsi une colonne solide qui fait presque toute la longueur de la seringue
- faire trois lavages avec 100 μ l STE chaque
- la colonne est prête à être utilisée.

2. 10. Utilisation de la technique de PCR pour préparation des sondes d'ADN

- ajouter dans un petit tube Eppendorf les composantes du mix PCR, en respectant l'ordre suivant:
 - 35,5 μ l eau stérilisée
 - 5,0 μ l tampon 10X tampon NEB (100 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 , 1% Triton X-100)
 - 2,0 μ l oligonucléotide A (20 pmol)

- 2,0 μ l oligonucléotide B (20 pmol)
- 4,0 μ l dNTPs 2,5 mM
- 70,0 μ l huile minérale stérilisée
- 1,0 μ l ADN plasmidique (entre 50-500 pg)
- 0,5 μ l ADN polymérase thermostable *Vent* (1U)
- mélanger bien et introduire le tube dans l'appareil à *PCR* (cycleur thermique)
- pour amplifier un fragment d'environ 900 pb et $T_{m \text{ oligo } 1} = 58^{\circ} \text{C}$, $T_{m \text{ oligo } 2} = 62^{\circ} \text{C}$, on utilise la succession suivante des cycles:
 - dénaturation thermique: 94°C pendant 4 minutes (1 fois)
 - dénaturation thermique: 94°C pendant 1 minute
 - hybridation des amorces: 55°C pendant 1 minute
 - extension des brins: 72°C pendant 1 minute
 - terminer l'extension: 72°C pendant 5 minutes (1 fois)
 - conservation à 4°C
- la température d'hybridation des amorces avec les brins doit être de 3°C plus petite que la plus petite des valeurs T_m des deux oligonucléotides utilisés
- la durée de l'extension doit être de 1 minute pour chaque kpb à amplifier
- vérifier l'amplification de l'ADN sur gel d'agarose 1% en présence de témoins de poids moléculaire, témoin positif (la sonde à amplifier) et témoin négatif (réaction sans ADN plasmidique).

Préparation des oligonucléotides

- une fois la synthèse automatisée de l'oligonucléotide terminée, laisser l'oligonucléotide à 58°C pour la nuit pour les "déprotéctionner"
- distribuer la solution de l'oligonucléotide en huit tubes Eppendorf (150 μ l par Eppendorf)
- faire évaporer l'ammoniaque au *speed-vac*
- resuspendre dans l'eau (150 μ l par Eppendorf)
- faire évaporer l'eau au *speed-vac*

- resuspendre dans un total de 450 μ l de l'eau et précipiter avec de l'acétate de sodium et de l'éthanol 100%
- resuspendre dans 100 μ l d'eau et prendre la densité optique pour avoir la concentration de l'oligonucléotide.

2. 11. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

2. 11. 1. *Méthode par électroélution*

Jour 1.

- faire migrer l'ADN plasmidique digéré, dans un puits large qui peut contenir 100 à 200 μ l (migration à 22 volts pour 18 heures), en présence des témoins de poids moléculaire
- utiliser à cette fin un petit gel (100 ml) de concentration 0.7% agarose en tampon TBE 1X
- pour un bon rendement utiliser une quantité suffisante d'ADN (plus de 20 μ g, surtout si le fragment à récupérer a moins de 1 kpb).

Jour 2.

- colorer le gel dans une solution de 2 μ g bromure d'éthidium/ml pendant 15 minutes
- décolorer dans de l'eau déionisée pendant 10 minutes
- prendre la photo du gel et analyser la position de l'ADN par rapport aux témoins de poids moléculaire
- en visualisant le gel sous les ondes ultraviolettes (U.V.), couper la bande de la sonde avec un couteau exacto, tout en minimalisant l'exposition aux U.V.
- rincer un sac de dialyse $\frac{3}{4}$ de pouce dans du TBE 1X pendant 5 minutes
- mettre deux pinces à un bout du sac
- remplir le sac de TBE 1X propre et mettre la bande dans le sac de façon perpendiculaire aux pinces

- éliminer le TBE 1X du sac en le renversant et en maintenant la position de la bande avec l'index et le majeur en ciseau
- mettre une autre pince à l'autre bout du sac et électroéluer 1 heure et 30 minutes à 93 volts, le sac bien à plat dans l'appareil à électrophorèse
- renverser la polarité des électrodes et appliquer 100 volts pendant 30 secondes
- délicatement, ouvrir le sommet du sac et récolter le TBE 1X avec une pipette Pasteur et rincer avec de l'eau déionisée stérilisée en frottant le sac
- sortir la bande et récolter le liquide de rinçage
- colorer rapidement la bande pour confirmer l'absence d'ADN
- purifier l'ADN par phénol-chloroforme et chloroforme
- concentrer l'ADN par précipitation à l'éthanol et le resuspendre dans 20 μ l d'eau (le rendement attendu est de 80 à 90% pour un fragment de 1 kpb)
- faire migrer 1 μ l à 2 μ l sur un gel 0,7% agarose pour estimer la concentration de la sonde (migrer aussi des témoins de taille moléculaire et de concentration).

2. 11. 2. Méthode par extraction avec phénol

- faire migrer l'ADN et extraire la bande d'agarose du gel de la même manière que précédemment
- briser la bande d'agarose en petits morceaux avec une lame stérilisée à la flamme
- distribuer les morceaux dans un ou plusieurs tubes Eppendorf
- ajouter 1 volume de phénol (environ 200 μ l) et vortexer
- maintenir les tubes 15 minutes dans un mélange d'éthanol-glace sèche
- centrifuger pendant 15 minutes
- récupérer la phase aqueuse (environ 100 μ l)
- ajouter 200 μ l TE à la phase phénolée restante et vortexer
- maintenir 5 minutes dans éthanol-glace sèche
- centrifuger 15 minutes
- récupérer la phase aqueuse (environ 300 μ l) et l'ajouter à la première recueillie
- faire une purification phénol-chloroforme

- précipiter l'ADN
- resuspendre dans environ 10 μ l d'eau
- vérifier sur gel la concentration en ADN.

2. 12. Conservation des souches à court et à long terme

Les souches de travail utilisées fréquemment ont été conservées à court terme sur des boîtes Pétri et ont été repiquées une fois par mois. Toutes les souches avec un plasmide pUC18 ou pBluescript II SK⁺ recombinant ont été maintenues sur milieu BHI contenant 100 μ g/ml Amp .

*

À plus long terme les souches de *E. coli* ont été conservées dans glycérol à la température de -70° C d'après le protocole suivant:

- préparer des tubes avec 3 ml de milieu BHI contenant 3 μ l de solution ampicilline 10%
- inoculer chaque tube avec une souche, à partir d'un tapis bactérien frais
- incuber à 37° C pendant une nuit
- ajouter à chaque tube 1,5 ml de solution BHI:glycerol (1:1) stérile
- mélanger bien et aliquoter dans 2 tubes Eppendorf stériles
- garder à -70° C.

2. 13. Mode de préparation de diverses solutions utiles

Solution Tris

- les solutions Tris de concentrations et pH variés sont préparées à partir de deux solutions, Tris (ou Tris base) 1 M et Tris-HCl 1 M, mélangées en des proportions différentes (voir tableaux de préparation dans les références cités en début de chapitre).

Solutions: NaCl 5 M / MgSO₄ 1 M / MgCl₂ 1 M / ZnSO₄ 1 M / CaCl₂ 1 M/Na-citrate 1M

- peser la quantité nécessaire de produit, le solubiliser dans de l'eau avec agitation et si nécessaire avec de la chaleur, compléter le volume requis avec de l'eau et autoclaver.

Acétate de sodium 3 M pH=5,2

- solubiliser le sel d'acétate dans de l'eau et ajuster le pH avec de l'acide acétique, compléter le volume avec de l'eau et autoclave.

Acétate d'ammonium 7,5 M

- solubiliser le sel dans l'eau (pas nécessaire d'ajuster le pH) et autoclave.

TBE 10X

- pour préparer 2 l de solution mélanger 216 g Tris-Base avec 110 g acide borique et 80 ml EDTA 0,5 M pH=8 et compléter le volume avec de l'eau.

EDTA 0,5 M pH=8

- pour 500 ml, solubiliser 93,05 g EDTA dans de l'eau avec des pastilles de NaOH, ajuster le pH à 8 avec une solution 10 N de NaOH et compléter le volume à 500 ml avec de l'eau, autoclaver.

DTT 1 M

- solubiliser 772,5 mg de dithiothréitol (DTT) dans 5 ml de solution d'acétate de sodium 0,01 pH=5,2, stériliser par filtration et distribuer dans une cinquantaine d'Eppendorf qu'on garde à -70° C.

ATP 500 mM

- solubiliser 60 mg d'ATP dans 0,8 ml eau, ajuster le pH à 7 avec des gouttes de NaOH 10 N, ajuster le volume à 1 ml avec eau, stériliser par filtration et distribuer dans plusieurs Eppendorf qu'on garde à -70° C.

IPTG

- préparer une solution de 20 mg/ml avec de l'eau, filtrer, distribuer dans plusieurs Eppendorf et garder à -20° C, utiliser 500 µl de cette solution- stock pour 500 ml de milieu.

X-Gal

- préparer une solution de 20 mg/ml avec du diméthylformamide, distribuer dans plusieurs Eppendorf et garder à -20° C, utiliser 500 µl cette solution-stock pour 500 ml de milieu.

ARNase

- faire une solution de 30 mg Ribonucléase A par ml de TE (10 mM Tris pH=8, 1 mM EDTA), bouillir 30 minutes, refroidir à la température de la pièce, distribuer dans plusieurs Eppendorf et garder à -20° C.

Loading buffer 10X pour électrophorèse en gel d'agarose

- 20% Ficoll 400
- 0,1 M EDTA pH=8
- 1% SDS
- 0,25% bleu de bromophénol
- 0,25% xylène cyanol

Solution ampicilline

- faire une solution de 10 à 100 mg par ml d'eau, stériliser par filtration et garder à -20° C, utiliser dans le bouillon de culture à une concentration de 50 µg/ml et dans des Pétris à une concentration de 100 µg/ml.

2. 14. Composition des milieux de culture utilisés

BHI (*Brain Heart Infusion*) Difco - 1 litre de milieu

- 15,8 g d'infusion de cerveau de veau
- 19,7 g d'infusion de coeur de boeuf
- 0,75 g de bacto protéose-peptone
- 0,15 g de bacto-dextrose
- 0,4 g chlorure de sodium
- 0,2 g de phosphate disodique

TSB (*Trypticase Soy Broth*) Difco - 1 litre de milieu

- 15 g de bacto-tryptone
- 5 g de bacto-soytone
- 5 g de chlorure de sodium

LB (*Luria Broth*) - 1 litre de milieu

- 10 g de chlorure de sodium
- 10 g de tryptone
- 5 g extrait de levure

Pour obtenir des milieux solides ajouter de l'agar-agar à raison de 15 g par litre de bouillon (1,5%).

N. B. La majorité des protocoles présentés dans ce chapitre ont été élaborés à l'aide des références suivantes: *Current protocols in molecular biology* (Ausubel et al., 1992), *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook et al., 1989), *Molecular biology Labfax* (Brown, 1991), *Manual of methods for general bacteriology* (Gerhardt et al., 1981), *Experiments with gene fusions*. (Silhavy et al., 1984).

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3. 1. Obtention et préparation de l'ADN de *S. aureus* en vue de clonage

Pour l'extraction de l'ADN chromosomique de *S. aureus* nous avons utilisé deux méthodes différentes. Le but poursuivi était d'avoir un ADN de bonne qualité du point de vue de sa taille moléculaire et de sa pureté.

La méthode avec gradient de CsCl ne comporte aucune étape de purification par phénol- chloroforme et elle a donné un matériel de bonne concentration et pureté qui a été bien digéré par les enzymes. En moyenne, en partant de 300 ml de culture de *S. aureus* nous avons obtenu environ 1 mg d'ADN. Du point de vue de la taille de l'ADN obtenu, il faut remarquer que cette méthode prévoit l'extraction de la bande chromosomique par un passage par une aiguille de seringue, étape qui pourrait causer des cassures du chromosome.

La méthode avec extraction phénol-chloroforme protège l'ADN de toute manipulation pouvant lui produire des dommages mécaniques. Le chromosome obtenu a eu une taille moléculaire supérieure celui obtenu par la méthode précédente, mais a présenté des difficultés au moment des digestions enzymatiques.

Pour le bon déroulement du travail nous avons préféré utiliser l'ADN obtenu par la première méthode d'extraction. Un échantillon de 1,5 ml à une concentration d'ADN de 1 mg/ml a été récupéré et a servi à la construction de notre banque.

Dans une première étape nous avons déterminé la taille moléculaire de l'ADN par électrophorèse conventionnelle sur un gel de 0,4% agarose. Les résultats de cette analyse nous ont encouragé de tenter le clonage de nos fragments dans un cosmide. Les essais de clonage se sont avérés infructueux, et pour expliquer cela nous sommes retournés à l'analyse de la taille de notre matériel. Cette fois-ci, nous avons utilisé la méthode d'électrophorèse en champ inversé qui donne des informations plus précises pour de l'ADN de haute taille moléculaire. Pour la réalisation de cette méthode nous avons utilisé un appareil artisanal décrit dans la section 2. 3.

La Fig. 7 présente les photos des gels de migration de l'ADN chromosomique utilisé pour la construction de la banque, analysé par électrophorèse standard et respectivement par électrophorèse en champ inversé (FIGE). Les témoins de poids moléculaire sont les mêmes pour les deux types d'électrophorèse: le phage λ digéré avec les enzymes *HindIII* et respectivement *PstI* et aussi l'ADN chromosomique du phage T4. Ce dernier témoin possède une taille moléculaire d'environ 160 kpb et représente donc un repère convenable pour interpréter les résultats de l'analyse. L'ADN de phage T4 a été obtenu par la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

La technique FIGE a facilité une meilleure séparation des fragments de haute taille moléculaire et nous a permis de conclure que la taille de l'ADN chromosomique obtenu se situe bien en haut de 23 kpb, mais beaucoup en bas de 160 kpb. En conséquence, il ne satisfait pas le critère de taille moléculaire en vue de clonage dans un cosmide fait qu'explique nos résultats.

L'étape suivante du projet a été la digestion partielle de l'ADN chromosomique avec l'enzyme *Sau3AI*. La concentration optimale de l'enzyme pour donner la majorité de produits de digestion de taille entre 9,4 et 23,1 kpb, a été déterminée comme étant 0,0156 unités/ μ g d'ADN. Après digestion l'ADN a été centrifugé dans un gradient de sucrose de 5 - 40%; l'ultracentrifugation a eu une durée de seulement 15 heures, à 38.000 rpm, pour obtenir une bonne séparation des grands fragments. Nous avons gardé et précipité les fractions du gradient de taille entre 9,4 et 23,1 kpb. Ces fractions d'ADN chromosomique ont servi par la suite pour les ligations dans les vecteurs de clonage.

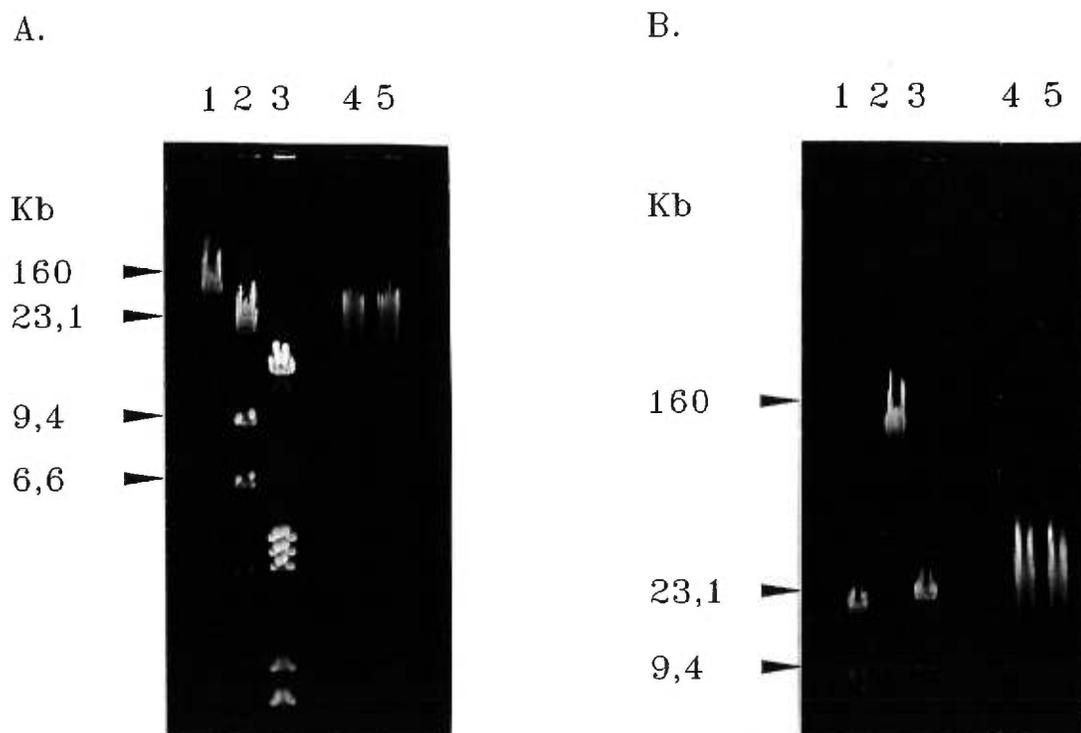


Figure 7. Photo du gel de migration de l'ADN chromosomique de *S. aureus*.

A. Électrophorèse standard - gel d'agarose de 0,4%

1 - ADN chromosomique du phage T4; 2 - λ HindIII; 3 - λ PstI;

4 et 5 - ADN chromosomique de *S. aureus*.

B. Électrophorèse en champ inversé - gel d'agarose de 1%

1 - λ PstI; 2 - ADN chromosomique du phage T4; 3 - λ HindIII;

4 et 5 - ADN chromosomique de *S. aureus*.

3. 2. Réalisation de la banque génomique en *S. aureus*

Les fragments chromosomiques isolés par centrifugation en gradient de sucrose ont été intégrés par ligation dans deux vecteurs plasmidiques: pUC18 et pBluescript II SK⁺. Comme les fragments ont été coupés avec l'enzyme *Sau3AI*, la ligation a été faite dans le site *Bam*HI, présent dans les deux vecteurs. Les plasmides recombinants ont été introduits dans la souche DH5 α par électrotransformation, afin de les amplifier à l'intérieur des colonies isolées. Le milieu sélectif utilisé contenait l'indicateur X-gal et l'inducteur IPTG, ce qui permettait l'identification facile des clones positifs. Ainsi, les clones transformants contenant des inserts formaient des colonies blanches tandis que les clones contenant des plasmides sans inserts donnaient des colonies bleues.

Les colonies blanches ont été analysées par une méthode rapide d'extraction plasmidique, *cracking-gel*, pour se faire une première idée sur la taille des fragments clonés. Les plasmides non-digérés ont été migrés sur gel d'agarose 0,4% en vue de déterminer la taille totale des plasmides et établir ainsi la taille des inserts contenus. Comme témoins de poids moléculaire ont servi plusieurs plasmides non-digérés (forme surenroulée), faisant partie de la collection du laboratoire. En tout, nous avons analysé par *cracking-gel* environ 3.000 transformants; de ce nombre nous avons retenu 800 clones, contenant comme inserts des fragments chromosomiques d'au moins 9 kpb et qui ont formé la banque génomique. Ceci correspond à un pourcentage de 26,67% (du total des transformants obtenus) plasmides recombinants, contenant des fragments chromosomiques plus grands ou égaux à 9 kpb.

Pour une meilleure caractérisation, les 800 clones ont été analysés par la méthode d'*extraction plasmidique par ébullition*. Cette technique a permis de déterminer plus précisément la taille des fragments chromosomiques fait qui a servi à la caractérisation de la banque génomique. De plus, l'ADN plasmidique extrait ainsi a été utilisé dans l'étape du criblage de la banque.

Les 800 clones ont été numérotés de 1 à 800 et conservés à long terme, en glycérol, à - 70° C.

3. 3. Caractérisation de la banque génomique construite

Nombre total de clones contenus par la banque	800 clones
Nombre de clones dans le plasmide pUC18	369 clones (46,13% de la banque)
Nombre de clones dans le plasmide pBluescript IISK⁺	431 clones (53,87% de la banque)

Tableau II. Répartition des plasmides recombinants de la banque génomique en fonction de la taille du fragment chromosomique contenu

Taille du fragment chromosomique (I) contenu par le plasmide recombinant	Pourcentage (%) de ce type de plasmide dans la banque
6 kpb < I ≤ 8 kpb	6,46%
8 kpb < I < 10 kpb	24,88%
I ≅ 10 kpb	54,31%
10 kpb < I < 14 kpb	14,35%

La taille moyenne des fragments d'ADN chromosomique contenus par les plasmides:

$$I = 9,85 \text{ kpb}$$

Si on considère maintenant la relation de Clarke et Carbon développée à partir de la formule de distribution Poisson, qui permet de déterminer le nombre de clones nécessaires pour constituer une banque génomique en fonction de la probabilité de représentation qu'on souhaite pour notre banque (Clarke et Carbon, 1976), on obtient:

$$N = \ln(1 - P) / \ln [1 - (I/G)]$$

où: N = nombre de clones indépendants

P = probabilité pour que chaque séquence du chromosome soit représentée au moins une fois dans la banque

I = taille moyenne des fragments d'ADN

G = taille totale du génome.

On peut l'écrire aussi sous la forme:

$$P = 1 - (1 - F)^N$$

où: $F = I/G$

F = la fraction du génome représentée par le fragment cloné

Pour notre banque

$$I = 9,85 \text{ kpb}$$

$$G = 2\,780 \text{ kpb (taille du génome de } S. \text{ aureus)}$$

$$N = 800 \text{ clones}$$

donc,

$$P = 1 - (1 - 9,85 \times 10^3 / 2,78 \times 10^6)^{800}$$

La probabilité de représentation d'un gène quelconque de *S. aureus* dans notre banque génomique:

$$P = 94,2\%$$

3. 4. Organisation de la banque génomique en vue de criblage

Nous avons déterminé à l'aide de la formule de Clarke et Carbon que, avec une probabilité de 94,2%, n'importe quel fragment du génome de *S. aureus* doit se trouver au moins une fois dans notre banque. Pour confirmer cette valeur déterminée de manière statistique et en même temps pour intégrer notre travail dans le cadre d'autres recherches faites dans le laboratoire, nous avons tenté d'identifier dans notre banque des clones contenant deux régions chromosomiques distinctes de *S. aureus*. Il s'agit des régions chromosomiques qui ont été clonées et séquencées pour la première fois dans le laboratoire de Dr. A. Sasarman. Le laboratoire est spécialisé dans l'étude des gènes respiratoires en général, et se préoccupe aussi, depuis longtemps, des gènes respiratoires de *S. aureus*. (Sasarman et al., 1971; Sasarman et al. 1974)

Les deux régions chromosomiques recherchées contiennent, comme a été démontré, des gènes impliqués dans la chaîne respiratoire de la bactérie *S. aureus*. On n'a pas encore des données concernant leurs emplacements sur la carte génétique de la bactérie, ni de leur position une par rapport à l'autre. De ce point de vue, les deux régions représentent des cibles complètement aléatoires pour le criblage de notre banque génomique.

La première des régions recherchées mesure environ 10 kpb et contient le gène *pckA* qui code pour l'enzyme PEP carboxykinase et le gène *metE* qui code pour l'enzyme S-adénosylméthionine synthétase. (Tremblay, A., 1995) D'après des recherches ultérieures, qui sont en cours de publication, la région contiendrait aussi plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse d'une composante essentielle de la chaîne respiratoire de *S. aureus*, la ménaquinone. Comme la région de 10 kpb avait été séquencée et la séquence de nucléotides était donc disponible, nous avons choisi deux fragments de cette région qui ont été utilisés comme sondes pour le criblage de notre banque. Les deux fragments se situent à une distance de plus de 6 kpb l'un de l'autre.

La deuxième des régions contient des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'hème, dont un des gènes, *hemB*, a été identifié, séquencé et caractérisé. (Kafala et Sasarman, 1994) D'autres gènes faisant partie de la même voie métabolique, organisés apparemment comme opéron, feront l'objet d'une autre publication. (Kafala, B., Thèse de doctorat - en rédaction) Pour cette région, nous avons pris comme sonde un fragment d'environ 1 kpb faisant partie du gène *hemB*.

Le criblage en vue de trouver, parmi les fragments chromosomiques contenus dans la banque, les deux régions recherchées a été réalisé par hybridation avec les trois sondes marquées à la radioactivité.

Dans un premier temps on a dû trouver une manière d'organiser la banque génomique pour que le criblage, opération assez laborieuse, se fasse avec une dépense réduite de temps et matériel. La variante préférée a été de fixer l'ADN de tous les 800 clones, par groupe de 100 clones, sur 8 membranes d'hybridation et d'aller ensuite hybrider les membranes avec chacune des trois sondes, une à la fois.

Pour la fixation de l'ADN sur membrane on a préféré, à cause de certains avantages, la méthode *Dot-blot* à la méthode d'*hybridation sur colonies*. Premièrement elle nous a permis de déposer sur une surface de 10x10 cm une centaine de clones disposés de manière ordonnée, et d'avoir donc toute la banque sur seulement 8 membranes faciles à manipuler. Un autre avantage est que, au lieu de fixer sur la membrane l'ADN totale de la colonie (chromosomique et plasmidique), la méthode utilise seulement l'ADN plasmidique. Ça donne une meilleure résolution de l'hybridation, car élimine toute possibilité de signal non-spécifique causé par l'ADN chromosomique.

Nous avons réalisé 3 séries à 8 membranes et chaque série de 8 membranes contenait la totalité de 800 plasmides recombinants formant la banque génomique. L'ADN plasmidique des 800 clones, extrait par la méthode de "*boiling*", a été déposé sur membranes manuellement. Chaque série de 8 membranes a été hybridé avec une des trois sondes marquées à la radioactivité.

Pour l'obtention des sondes d'hybridation nous avons eu à la disposition les fragments chromosomiques de *S. aureus* correspondants, clonés en plasmide. À partir de ces fragments, les sondes A et C ont été obtenues par amplification *PCR* d'une certaine région d'ADN et la sonde B par digestion enzymatique suivie d'extraction de la sonde du gel d'agarose.

Les sondes dénommées A et C ont été obtenues par amplification *PCR* à partir du fragment de 10.355 pb du chromosome de *S. aureus* cloné et séquencé par A. Tremblay. Pour la sonde A on a utilisé les oligonucléotides A1 et A2 (voir Tableau III) pour amplifier une région de 1.420 pb situé entre les nucléotides 611 et 2.031 (voir carte de la région Fig. 20 pour le positionnement des sondes). Comme matrice nous avons utilisé le plasmide pSAS2089 qui contient la région des nucléotides 180-3.642. Pour la sonde C on a utilisé les oligonucléotides C1 et C2 (voir Tableau III et Fig. 20) et on a amplifié une région de 883 pb située entre les nucléotides 8.099 et 8.982 du même fragment. Comme matrice nous avons utilisé le plasmide pSAS2088 qui contient la région entre les nucléotides 7.454 et 10.417.

La sonde B a été obtenue en digérant le plasmide pEB-S₁ avec les enzymes *Ava* I et *Eco* RV. (Kafala et Sasarman, 1994) Après digestion le fragment recherché, d'environ 1.260 pb, a été séparé sur gel d'agarose et extrait du gel.

Les témoins d'hybridation positifs ont été les plasmides qui ont servi à la construction des sondes A, B et C, respectivement pSAS2089, pEB-S₁ et pSAS2088. Comme témoins négatifs ont servi les plasmides utilisés au clonage de la banque: pUC18 et pBluescript II SK⁺. Chaque membrane contenait tous les 5 témoins d'hybridation (négatifs et positifs).

Les trois sondes ont été marquées à ³²P-dATP à un pourcentage d'incorporation entre 75 - 85% et à une activité spécifique de 2,0 - 3,0 x 10⁹ cpm/μg. L'hybridation a été faite d'après le protocole décrit dans le chapitre précédent et les signaux d'hybridation ont été révélés par autoradiographie sur film. Les films ont été exposés avec écran entre 30 minutes et 2 heures et interprétés de façon visuelle.

Tableau III. Liste des oligonucléotides utilisés pour l'obtention des sondes par *PCR*

Nom oligo.	Séquence de l'oligonucléotide	T _m (°C)	Plasmide correspondant	Position
A1	TTTTAATAATACCTGCAGGTC	58	pSAS2089	de 611-
A2	ATCCTAAATCCCTCCAAAGCG	62	pSAS2089	à 2 031
C1	TGGCATAATGATTACGAAACG	58	pSAS2088	de 8 099-
C2	AGGACAAGGTAACATATTATG	56	pSAS2088	à 8 983

3. 5. Criblage de la banque génomique

Le criblage de la banque avec la sonde A est présenté dans les Fig. 8 a, b, c, d, e, f, g, h, figures qui représentent les autoradiographies sur film des huit membranes contenant les 800 plasmides recombinants de la banque génomique, après hybridation avec la sonde radioactive.

L'analyse nous a relevé plusieurs clones qui hybridait avec la sonde A, à savoir les clones #333, #364, #375, #531, #575, #626, #641 et #783. L'intensité des signaux d'hybridation était variable et nous avons décidé de poursuivre les analyses seulement pour les clones #333, #375, #531, #575, #626 et #641 que nous avons apprécié comme donnant les signaux les plus forts. Le témoin positif, le plasmide pSAS2089, a donné un signal nettement positif et les témoins négatifs, pUC18 et pBluescript II SK⁺ n'ont pas "allumé" de tout, signe que la sonde A est spécifique au fragment recherché et qu'elle a été exempte de trace d'ADN plasmidique.

Pour confirmer le résultat obtenu, nous avons analysé les 6 clones par la méthode de *Southern Blot*. L'ADN plasmidique des clones a été digéré avec une ou deux enzymes différentes et migré sur en gel de 0,7% d'agarose qui a été transféré sur membrane; la sonde et les témoins d'hybridation ont été les mêmes que pour la première hybridation. Le résultat de l'analyse est présenté dans la Fig.11 et il a confirmé l'appariement avec la sonde A pour seulement 4 des 6 clones, respectivement #531, #575, #626 et #641.

En effet, les digestions enzymatiques pour les clones #333 et #375 (puits 2 et 3 sur le film du gel) ne présentent aucune bande d'hybridation pendant que les autres quatre clones donnent des bandes très fortes. Le témoin positif, constitué par la sonde A, et le témoin négatif ont bien fonctionné. Des digestions supplémentaires faites sur les plasmides des clones #625 et #641 ont montré des patrons de restrictions semblables. Ce résultat nous permette de croire que les deux plasmides recombinants contiennent comme insert le même fragment d'ADN chromosomique. En corollaire,

nous avons identifié dans la banque trois clones indépendants qui hybrident avec la sonde A, donc ils contiennent des fragments chromosomiques de *S. aureus* situés dans la première région ciblée.

Le criblage de la banque avec la sonde B nous a conduits à seulement un clone positif, le clone #608 (voir Fig. 9 a, b, c, d, e, f, g, h.). Les témoins positifs et négatifs ont bien répondu, et comme on s'attendait dans ce cas, la présence d'un bruit de fond est plus évidente, car la sonde B a été préparée par digestion et séparation sur gel du plasmide qui l'héberge. Il est donc plausible qu'elle contienne plus de traces de ce plasmide que les sondes A et C obtenues par *PCR*.

Par la suite, le clone #608 a été digéré et analysé par la méthode d'hybridation *Southern Blot*. Les digestions ont été faites avec des enzymes qui coupent le gène *hemB*, en conformité avec la séquence nucléotidique déterminée par séquençage. (Kafala et Sasarman, 1994) Le résultat est très concluant (voir Fig. 12), car toutes les digestions contiennent un ou plusieurs fragments qui hybrident avec la sonde. Les témoins positifs ont été constitués par la sonde B et aussi des digestions différentes du plasmide pEB-S1. Le plasmide pSAS2089 digéré avec *EcoRI*, qui a représenté le témoin négatif, présente une bande faible d'hybridation de taille d'environ 3 kpb, attribuable aussi à la présence de traces de plasmide de clonage dans notre sonde B (le vecteur de pSAS2089 est pBluescript).

Le criblage de la banque avec la sonde C a donné un nombre plus élevé de clones qui hybrident (voir Fig. 10 a, b, c, d, e, f, g, h). Comme témoin d'hybridation positif on a pris la sonde C elle même. Les témoins négatif et positif ont bien fonctionné. L'intensité des signaux d'hybridation obtenus était variable et nous avons décidé d'analyser par *Southern Blot* en tout 22 clones; une partie donnant des signaux forts, une autre des signaux faibles (voir Fig. 13 et 14).

Les clones analysés ont été: #91, #260, #261, #266, #287, #289, #333, #365, #369, #381, #425, #486, #500, #545, #593, #594, #596, #626, #657, #660, #667 et

#681. L'analyse de *Southern Blot* confirme le résultat précédant pour seulement 17 des clones qui montrent une ou plusieurs bandes d'hybridation. Une grande partie des plasmides recombinants possèdent une bande d'hybridation d'environ 1,9 kpb qui correspond à la région chromosomique entre nucléotide 8.302 et 10.238, fragment généré par la digestion *EcoRI* (voir carte de la région, Fig.20). Les plasmides correspondants aux clones #545 et #594 présentent des bandes d'hybridation multiples et de différentes intensités, qui sont probablement dû à une digestion incomplète.

Un nombre de 5 clones: #365, #381, #425, #500 et #626 ont été éliminés car les digestions de leurs plasmides recombinants ne présentaient pas des bandes d'hybridation avec la sonde C. En effet, ces 5 clones ont eu au moment du criblage de la banque des signaux plus faibles que la majorité des clones et on pouvait donc s'attendre à un résultat différent. Nous pouvons expliquer cela comme un artefact dû aux variations en concentrations du matériel obtenu par "boiling" (la croissance du tapis bactérien varie beaucoup d'un clone à l'autre).

Les 17 clones trouvés positifs ont constitué l'objet d'analyse supplémentaire, en but d'identifier des candidats possibles pour la dernière étape du projet. Nous avons effectué plusieurs digestions enzymatiques simples et multiples pour permettre de situer les sites de digestion les uns par rapport aux autres et essayer de tracer une mini-carte physique du clone. L'objectif était de pouvoir ainsi localiser le fragment chromosomique contenu par le clone, par rapport à la carte de restriction de la région limitrophe à la sonde C. Les enzymes utilisées ont été choisies d'après la séquence nucléotidique de la région. (Tremblay, 1995)

Cette étape nous a relevés deux groupes de clones: #260, #261, #266, #287, #289 en plasmide pUC18 et #657, #660, #681 en plasmide pBluescript II SK⁺ semblant contenir des fragments chromosomiques de la même taille et avec les patrons de digestion très semblables. Ce fait laisse croire qu'il est question en effet du même, ou à peu près le même fragment chromosomique. On peut penser que cette région

chromosomique présente une particularité qui la rend plus susceptible à être coupée par l'enzyme *Sau3AI*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pUC ₁₈	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
pBlue _{SK⁺}	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
pEB _{S₁} ⁻	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
pSAS ₂₀₈₈	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Figure 8. a. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 1-100) avec la sonde A

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
pUC ₁₈	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
pBlue _{SK⁺}	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
pEB _{S₁} ⁻	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
pSAS ₂₀₈₈	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200

Figure 8. b. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 101-200) avec la sonde A

	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
pUC ₁₈	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
pBlue _{SK+}	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
pEB _{S1}	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
pSAS ₂₀₈₈	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300

Figure 8. c. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 201-300) avec la sonde A

	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
pUC ₁₈	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
pBlue _{SK+}	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
pEB _{S1}	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
pSAS ₂₀₈₈	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400

Figure 8. d. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 301-400) avec la sonde A

	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
pUC 18	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
pBlue SK+	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
pEB- S1	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
pSAS 2088	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
pSAS 2088	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500

Figure 8. e. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 401-500) avec la sonde A

	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
pUC 18	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
pBlue SK+	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
pEB- S	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
pSAS 2088	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
pSAS 2088	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600

Figure 8. f. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 501-600) avec la sonde A

	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
pUC 18	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
pBlue SK+	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
pEB- S1	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
pSAS 2088	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700

Figure 8. g. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 601-700) avec la sonde A

	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
pUC 18	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
pBlue SK+	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
pEB- S1	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
pSAS 2088	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800

Figure 8. h. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 701-800) avec la sonde A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pUC 18	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
pBlue SK ⁺	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
pSAS 2088	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
pSAS 2089	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Figure 9. a. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 1-100) avec la sonde B

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
pUC 18	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
pBlue SK ⁺	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
pSAS 2088	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
pSAS 2089	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200

Figure 9. b. Film (exposé 2 heures (avec écran) du criblage de la banque (clones 101-200) avec la sonde B

	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
pUC 18	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
pBlue SK ⁺	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
pSAS 2088	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
pSAS 2089	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300

Figure 9. c. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 201-300) avec la sonde **B**

	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
pUC 18	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
pBlue SK ⁺	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
pSAS 2088	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
pSAS 2089	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400

Figure 9. d. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 301-400) avec la sonde **B**

	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
pUC 18	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
pBlue SK+	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
pSAS 2088	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
pSAS 2089	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500

Figure 9. e. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 401-500) avec la sonde B

	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
pUC 18	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
pBlue SK+	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
pSAS 2088	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
pSAS 2089	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600

Figure 9. f. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 501-600) avec la sonde B

	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
pUC 18	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
pBlue SK ⁺	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
pSAS 2088	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
pSAS 2089	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700

Figure 9. g. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 601-700) avec la sonde B

	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
pUC 18	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
pBlue SK ⁺	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
pSAS 2088	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
pSAS 2089	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800

Figure 9. h. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 701-800) avec la sonde B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pUC 18	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
pBlue SK ⁺	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
pEB- S ₁	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
pSAS 2089		92	93	94	95	96	97	98	99	100

Figure 10. a. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 1-100) avec la sonde C

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
pUC 18	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
pBlue SK ⁺	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
pEB- S ₁	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
pSAS 2089	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200

Figure 10. b. Film (exposé 2 heures (avec écran) du criblage de la banque (clones 101-200) avec la sonde C

	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
pUC ₁₈	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
pBlue _{SK+}	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
pEB _{S1} ⁻	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
pSAS ₂₀₈₉	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300

Figure 10. c. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 201-300) avec la sonde C

	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
pUC ₁₈	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
pBlue _{SK+}	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
pEB _{S1} ⁻	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
pSAS ₂₀₈₉	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400

Figure 10. d. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 301-400) avec la sonde C

	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
pUC 18	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
pBlue SK+	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
pEB- S1	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
pSAS 2088	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
pSAS 2089	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500

Figure 10. e. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 401-500) avec la sonde C

	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
pUC 18	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
pBlue SK+	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
pEB- S	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
pSAS 2088	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
pSAS 2089	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600

Figure 10. f. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 501-600) avec la sonde C

	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
pUC 18	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
pBlue SK+	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
pEB- S1	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
pSAS 2089	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700

Figure 10. g. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 601-700) avec la sonde C

	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
pUC 18	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
pBlue SK+	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
pEB- S1	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
pSAS 2089	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800

Figure 10. h. Film (exposé 2 heures avec écran) du criblage de la banque (clones 701-800) avec la sonde C

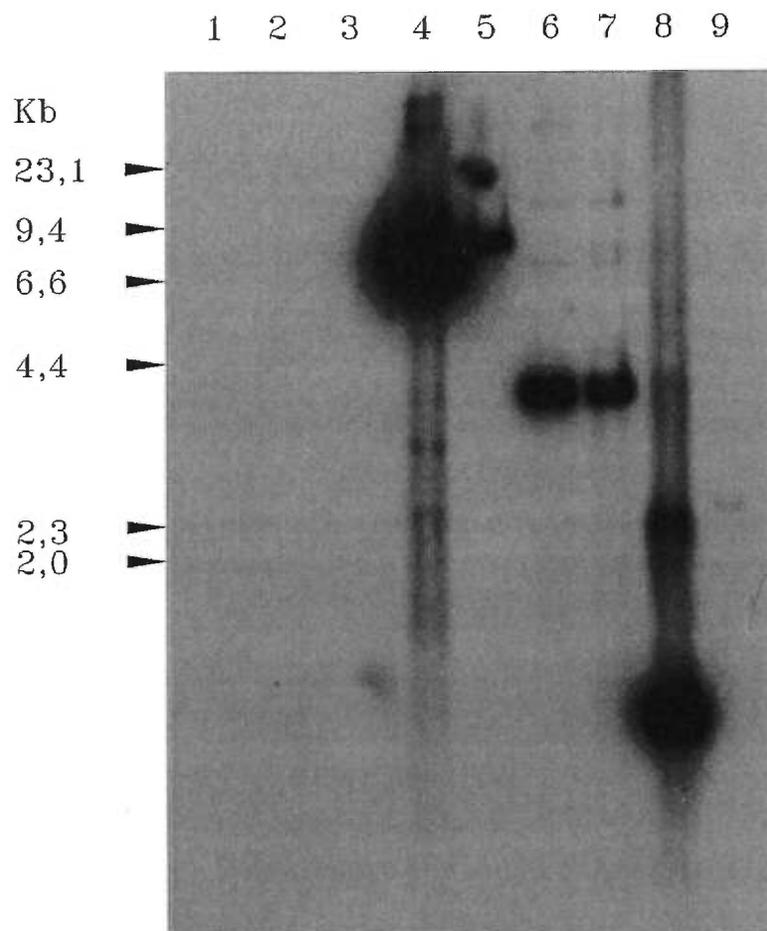


Figure 11. Film (exposé 4 heures avec écran) du transfert *Southern* des diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde A.

1- λ *Hind*III; 2-clone 333(*Eco*RI+*Hind*III);
 3-clone 375(*Eco*RI+*Hind*III); 4-clone 531*Eco*RI;
 5-clone 575*Eco*RI; 6-clone 626*Hind*III; 7-clone 641
 (*Eco*RI+*Hind*III); 8-sonde A (témoin positif); 9-plasmide
 pSAS2088*Eco*RI (témoin négatif).

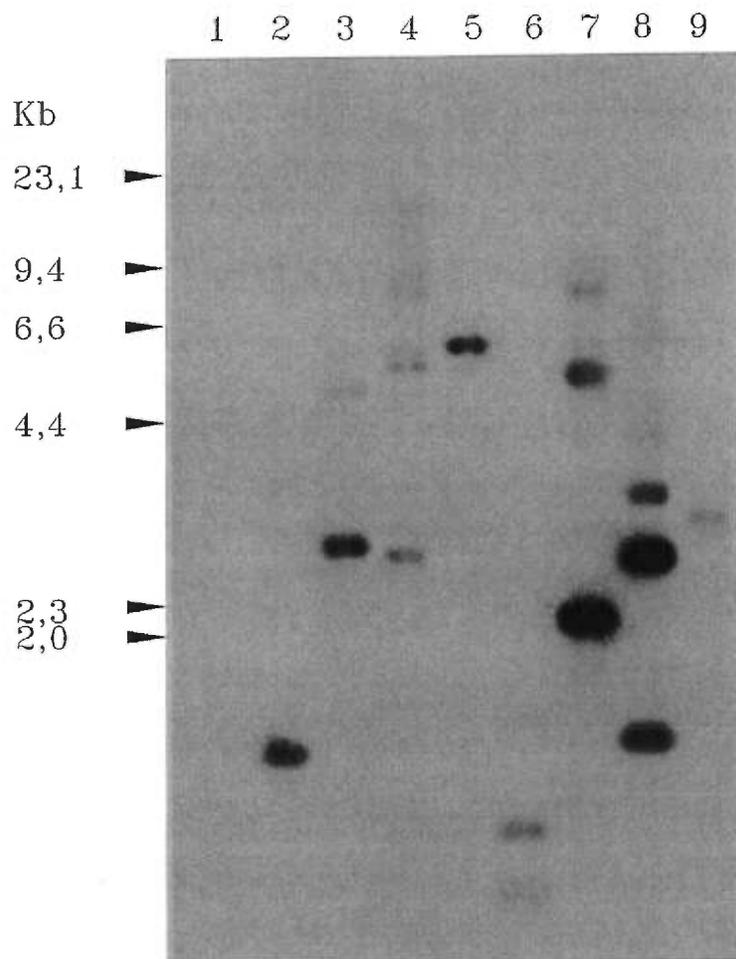


Figure 12. Film (exposé 4 heures avec écran) du transfert *Southern* des diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde **B**.
 1- λ *Hind*III; 2-sonde B (témoin positif); 3-clone 608 (*Xba*I + *Eco*RV); 4-clone 608*Hinc*II; 5-clone 608*Hind*III
 6-clone 608*Hinf*I; 7-plasmide pEB-S1(*Xba*I + *Eco*RV);
 8-plasmide pEB-S1*Hinc*II; 9-plasmide pSAS2089*Eco*RI (témoin négatif).

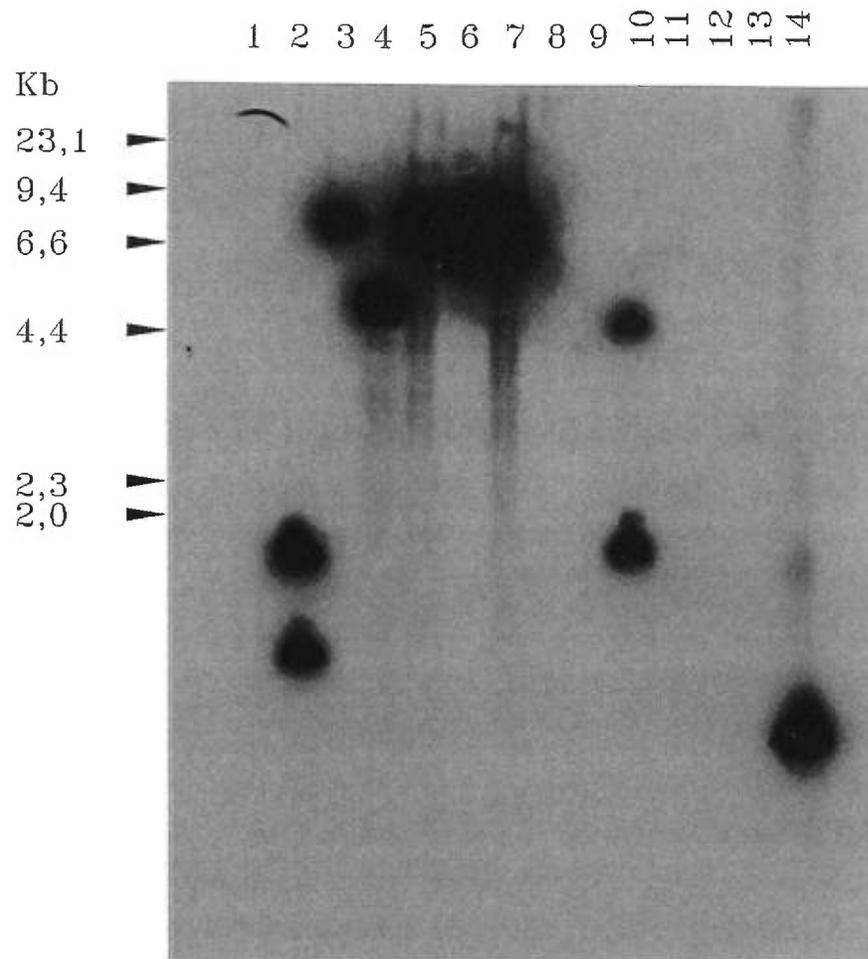


Figure 13. Film (exposé 4 heures avec écran) du transfert *Southern* des diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde C.
 1- λ *Hind*III; 2-clone 91*Eco*RI; 3-clone 260*Bam*HI;
 4-clone 261*Hind*III; 5-clone 266*Bam*HI; 6-clone 287*Bam*HI;
 7- clone 289*Bam*HI; 8-clone 365*Eco*RI; 9-clone 381*Eco*RI;
 10-clone 369*Eco*RI; 11-clone 425*Eco*RI; 12-clone 500*Eco*RI
 13-plasmide pSAS2089*Bam*HI (témoin négatif); 14-sonde C (témoin positif).

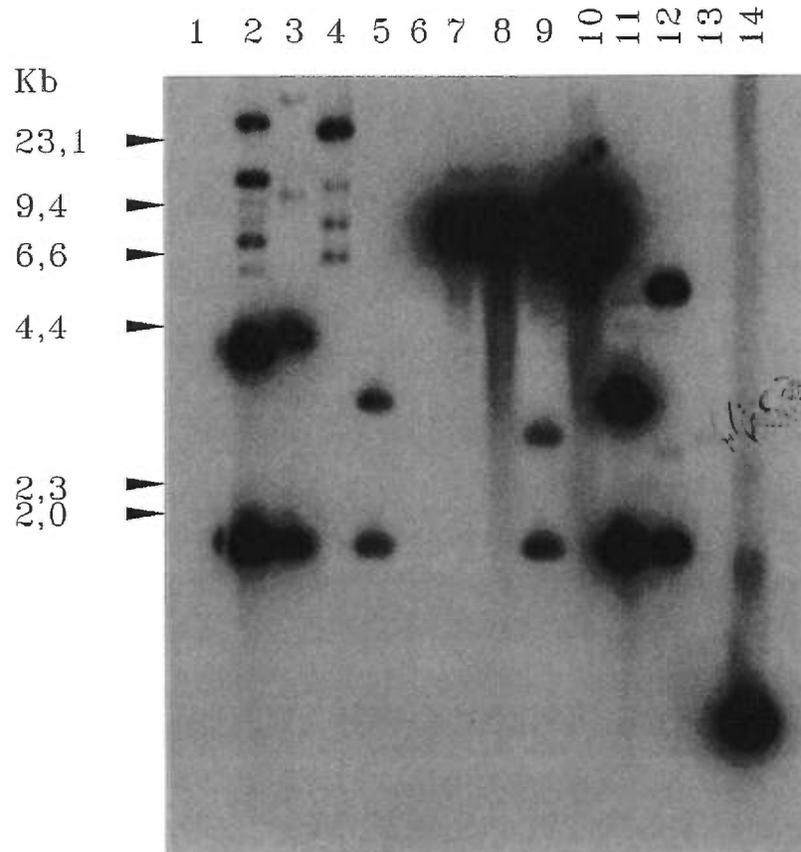


Figure 14. Film (exposé 4 heures avec écran) du transfert *Southern* des diverses digestions enzymatiques des clones trouvés positifs dans le criblage de la banque avec la sonde C.
 1- λ HindIII; 2-clone 545EcoRI; 3-clone 593EcoRI;
 4-clone 594BamHI; 5-clone 596EcoRI; 6-clone 626BamHI;
 7-clone 657BamHI; 8-clone 660BamHI; 9-clone 667EcoRI;
 10-clone 681BamHI; 11-clone 333EcoRI; 12-clone 486EcoRI;
 13-plasmide pSAS2089BamHI (témoin négatif); 14-sonde C (témoin positif).

3. 6. Cartes de restrictions pour quelques clones de la banque

Tel qu'a été déjà mentionné, un des buts du projet était de trouver des clones qui pouvaient contenir des fragments chromosomiques situés en aval de la région séquencée par Annie Tremblay; le bout de cette région se situe au site de coupure de l'enzyme *HindIII*, à la position 10.355 sur la carte (voir Fig. 20). Nous avons choisi les clones: #369, #545, #333, #486 et #91, pour poursuivre l'analyse de leurs plasmides recombinants. Des digestions supplémentaires nous ont conduits à une caractérisation plus détaillée des fragments chromosomiques respectifs et nous ont permis la construction de 5 cartes de restriction (voir fig. 15, 16, 17, 18 et 19).

Les sites de restriction déjà connus (entre position 0 et 10.355) d'après la séquence nucléotidique de la région (Tremblay, 1995) ont été retrouvés en totalité sur nos fragments. Ils sont marqués sur la carte à leurs positions précises. Suite à nos résultats la région caractérisée a été prolongée jusqu'à 16.500 kpb, avec la mention que les sites de restriction à partir de 10.355 ont un positionnement approximatif. Les distances chromosomiques ont été appréciées seulement par migrations sur gel d'agarose. La carte de la région et les positions par rapport à la carte des 5 fragments chromosomiques sont indiquées dans la Fig. 20. Le but de trouver au moins un clone porteur d'une région en aval du site *HindIII* (position 10.355 sur la carte) a été atteint; tous les 5 plasmides cartographiés portent des fragments couvrant cette région chromosomique. Ils dépassent la position 10.355 de 2,6 jusqu'à environ 6,3 kpb.

Ces résultats apportent aussi de nouvelles données sur la qualité de la banque. En effet, les digestions faites ont permis de déterminer la taille des plasmides recombinants également sous forme de fragments linéaires. Elles ont révélé des inserts plasmidiques entre environ 8,5 kpb et 12,0 kpb, ce que donne une taille moyenne pour les fragments chromosomiques d'environ 9,86 kpb. Ce résultat est très proche de la valeur $I=9,85$ kpb, déterminée à l'étape de caractérisation de la banque génomique.

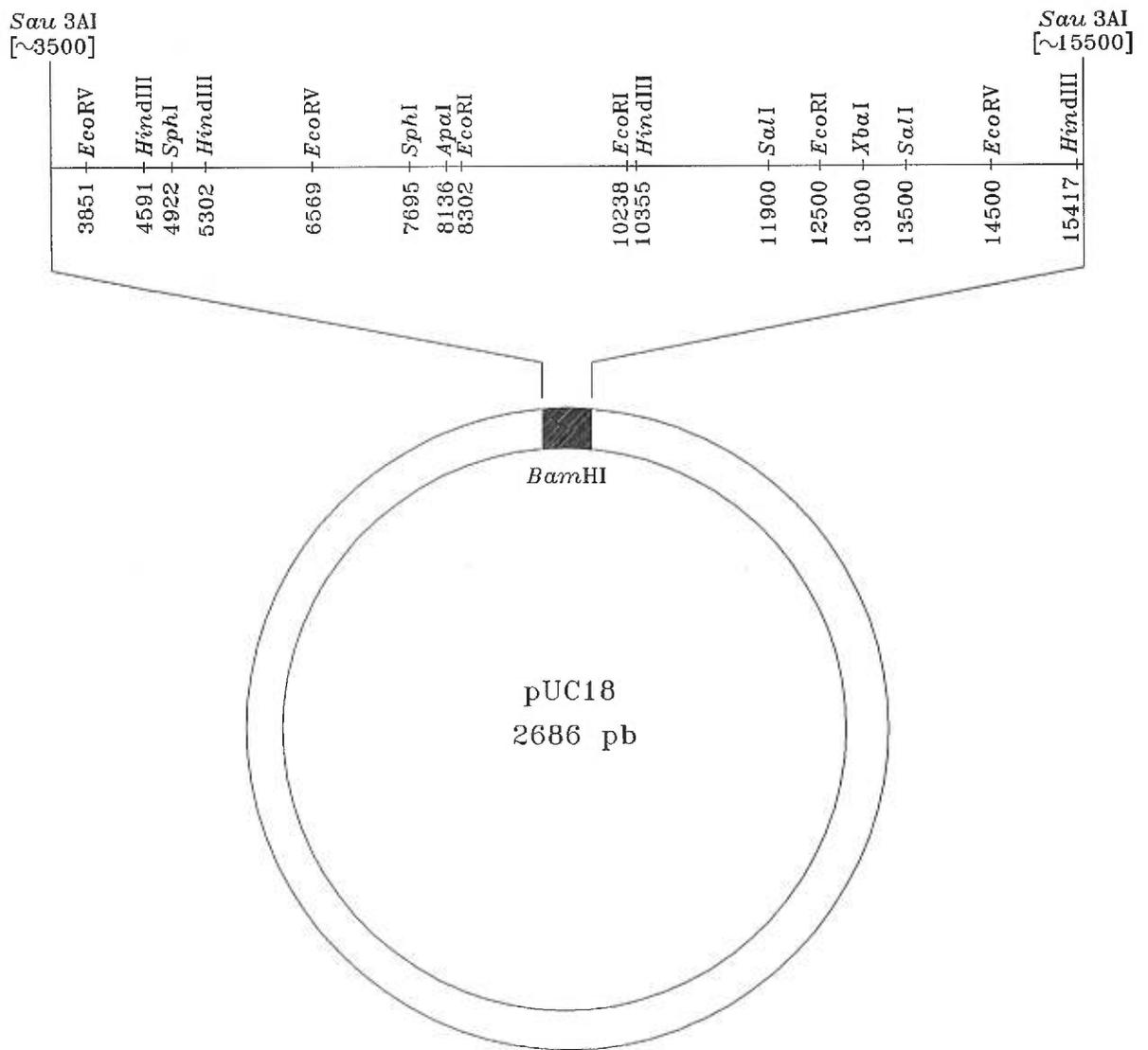


Figure 15. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #369.
(fragment chromosomique contenu, I-369)

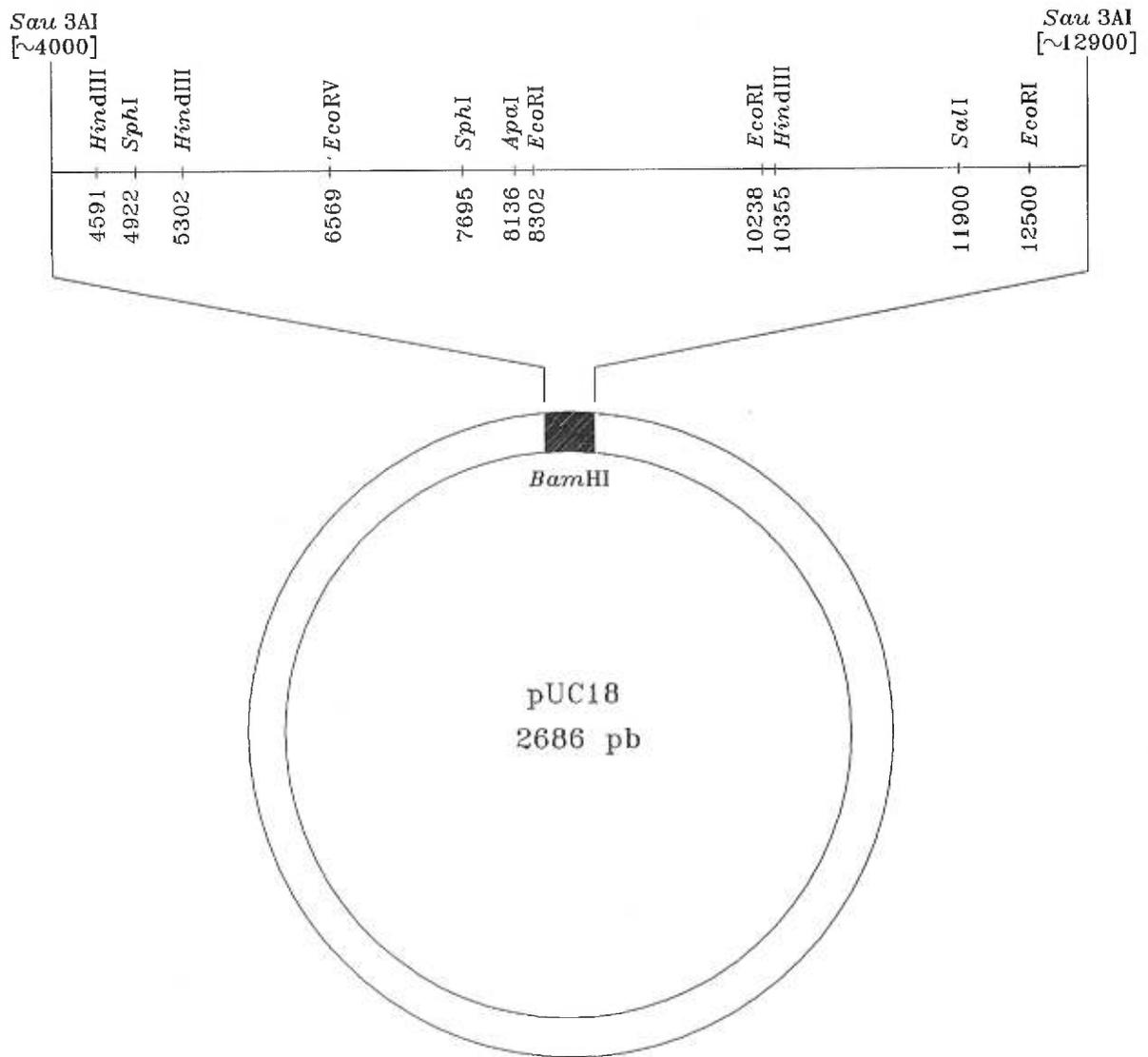


Figure 16. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #545.
(fragment chromosomique contenu, I-545)

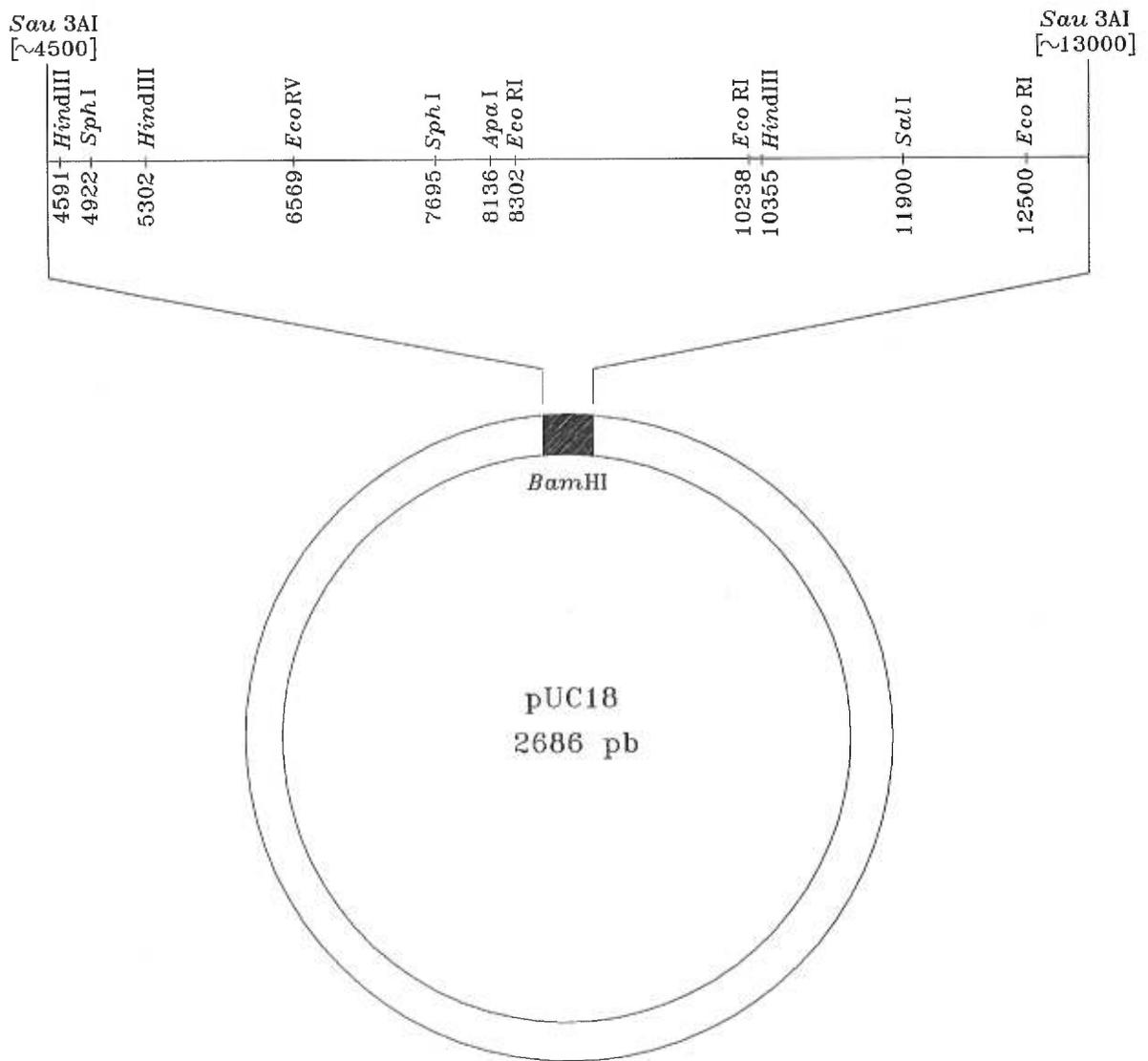


Figure 17. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #333.
(fragment chromosomique contenu, I-333)

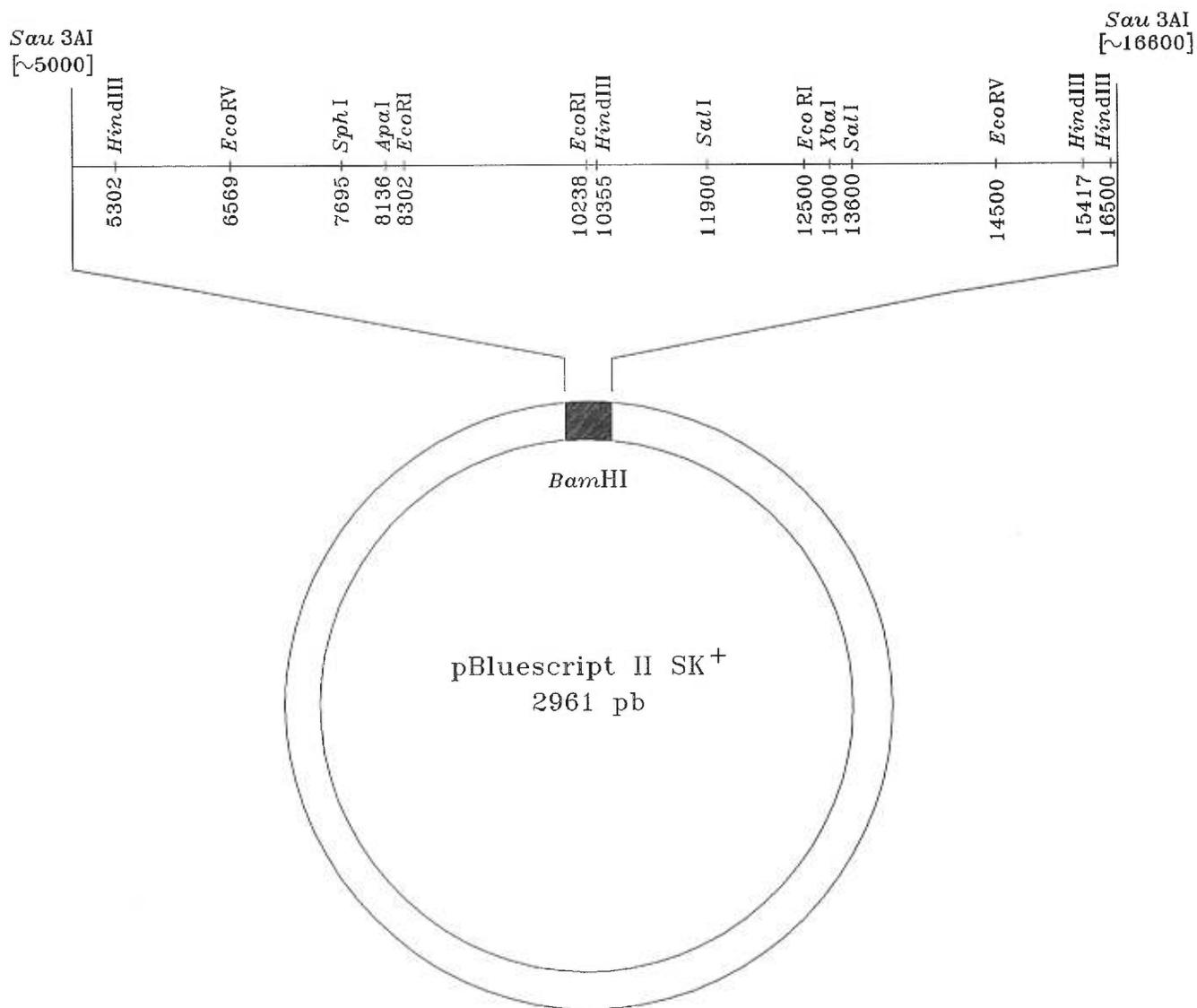


Figure 18. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #486.
(fragment chromosomique I-486)

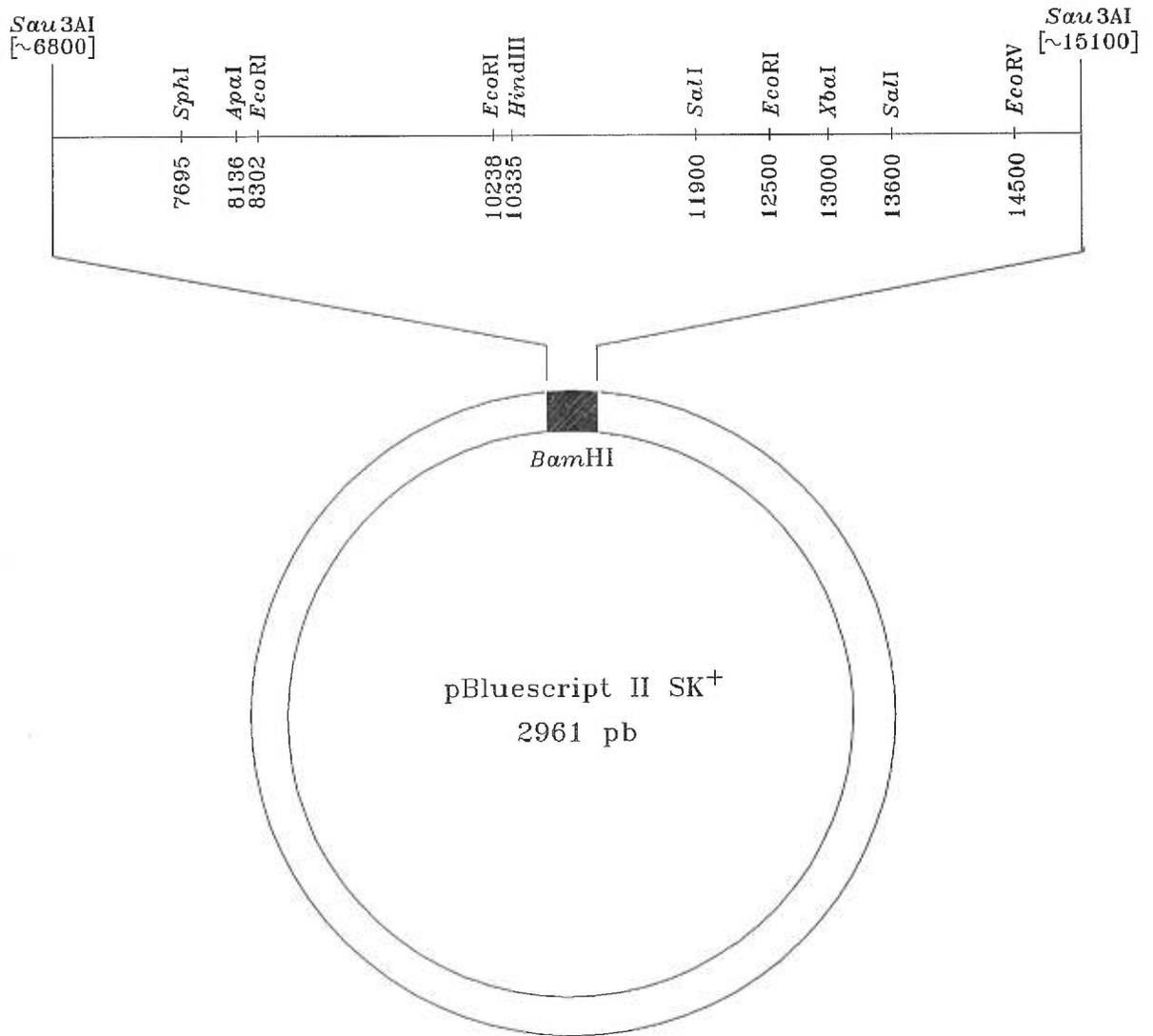


Figure 19. Carte de restriction du plasmide recombinant du clone #91.
(fragment contenu, I-91)

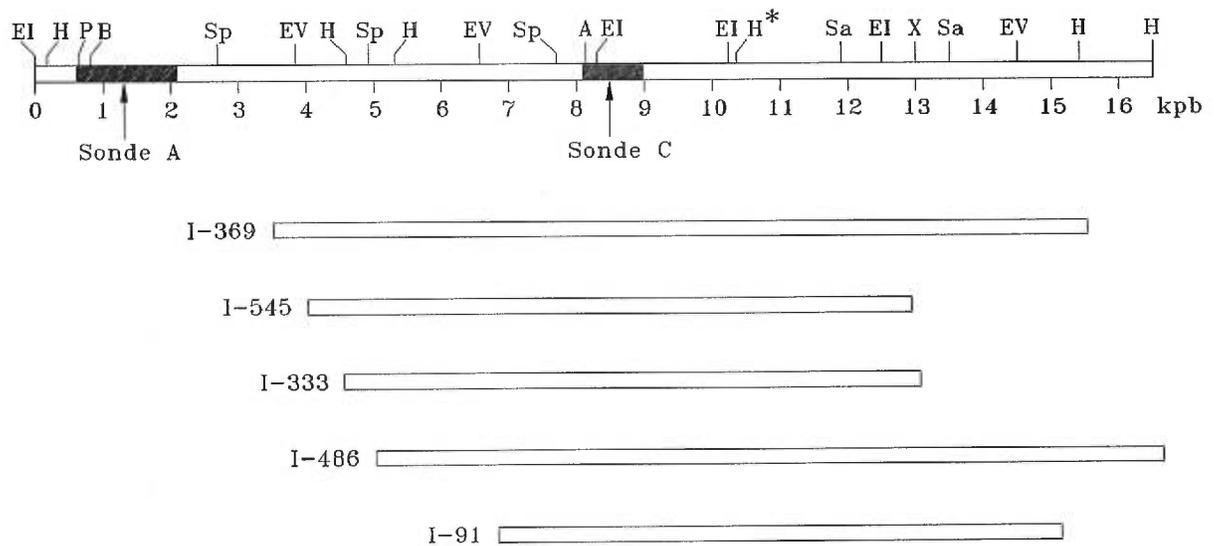


Figure 20. Carte de restriction de la région chromosomique de *S. aureus* clonée dans notre laboratoire (référence: Tremblay, 1995) et localisation par rapport à la carte de plusieurs fragments chromosomiques contenus par la banque génomique. Les abréviations utilisées: EI=*EcoRI*; H=*HindIII*; P=*PstI*; B=*BamHI*; Sp=*SphI*; EV=*EcoRV*; A=*ApaI*; Sa=*SalI*; X=*XbaI*. Les notations I-369, I-545, I-333, I-486 et I-91 désignent le fragment chromosomique contenu par le plasmide recombinant de clone # 369, # 545, # 333, # 486, et respectivement # 91. La notation H* indique la fin du fragment cloné et séquencé par A. Tremblay.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

Notre intention initiale était de construire une banque génomique de *S. aureus* dans un cosmide. Pour cela nous avons choisi d'utiliser pour le clonage "SuperCos 1 cosmid Vector Kit" de la compagnie *Stratagene*, suivie d'encapsidation à l'aide de "Gigapack[®] II XL gold packaging extract", de la même compagnie.

Le SuperCos 1 est connu comme vecteur de clonage très versatile car, il accepte l'insertion des fragments génomiques de taille entre 30 et 42 kpb et aussi il possède un système efficace de synthèse de sondes "walking", spécifiques aux extrémités des inserts. Cette procédure est extrêmement utile pour l'isolement séquentiel des clones qui se chevauchent et la réalisation des cartes physiques.

Les tentatives de clonage dans le cosmide se sont avérées infructueuses et pour comprendre les causes de l'échec nous nous sommes penchés avec plus d'attention sur l'analyse de la qualité de l'ADN chromosomique de départ. Comme les seules données sur la taille de l'ADN étaient obtenues par électrophorèse conventionnelle, pour plus d'information nous avons utilisé électrophorèse en champ inversé. Cette analyse a expliqué pleinement notre échec; la taille de l'ADN chromosomique extrait de *S. aureus* a été trouvée inférieure à celle suggérée par le fournisseur pour le bon fonctionnement du clonage dans le cosmide, c'est-à-dire une taille comparable à l'ADN génomique du phage T4 (environ 160 kpb). Comme le clonage en phage lambda risquait aussi d'être problématique à cause de la même raison, nous avons décidé de réaliser la banque dans un plasmide, mais en sélectionnant nos clones pour des inserts de la plus grande taille possible. La solution adoptée a occasionné probablement un volume supplémentaire d'analyse, mais s'est avérée plus fiable pour notre cas et a conduit en fin de compte à la construction d'une banque génomique avec une taille moyenne des inserts et une représentation satisfaisantes.

Tel que nous l'avons montré, nous avons construit la banque génomique de *S. aureus* dans deux vecteurs plasmidiques: pUC18 et pBluescript II SK⁺. La banque contient 800 clones qui portent comme inserts des fragments chromosomiques dépassant 9 kpb. La taille moyenne des inserts a été établie à 9,85 kpb par la suite à la détermination de la taille de chaque insert. La probabilité de représentation d'un gène quelconque dans la banque a été calculée comme étant de 94,2%.

Trois fragments chromosomiques de *S. aureus*, clonés précédemment, ont été utilisés pour construire trois sondes, désignées A, B, C qui ont été hybridées avec la banque. Les résultats de criblage de notre banque génomique avec ces sondes ont montré l'existence de trois clones indépendants qui hybridait avec la sonde A et de seulement un clone qui hybridait avec la sonde B. Pour la sonde C la situation a été différente, car on a eu beaucoup plus de signaux, dont une partie représentaient le même clone. L'existence d'un certain biais causé par les clones identiques d'une banque est inévitable, mais il est préférable qu'il ne soit pas présent de manière systématique. La littérature mentionne que, pour une banque génomique, une proportion de clones identiques allant jusqu'à 2% peut être considérée comme acceptable. (Thierry et al., 1995)

En considérant de nouveau le résultat du criblage avec la sonde C il faut remarquer que même après qu'on écarte les clones identiques, on reste avec un nombre élevé de clones qui hybrident. Une des explications possibles serait que la région chromosomique ciblée par la sonde C représente un environnement génétique plus favorable au clivage de l'enzyme *Sau3AI*. Pour vérifier cette hypothèse nous nous sommes intéressés principalement au contenu en G-C des différentes régions chromosomiques en question. (Kafala et Sasarman, 1994; Tremblay, 1995)

L'analyse n'a pas relevé des différences significatives entre les trois régions qui ont fourni les sondes: le pourcentage G-C se situait aux alentours de 35%, le taux normal retrouvé chez *S. aureus*. Pour cette raison, il reste à considérer d'autres facteurs que le contenu en G-C comme responsables de ces résultats.

On peut penser aux facteurs reliés à la séquence nucléotidique elle-même ou aux complexes protéiques qui y sont associés de façon plus stable et qui pourraient aider ou empêcher l'accès de l'enzyme à l'ADN. On peut penser également aux facteurs qui pourraient faciliter une meilleure ligation de ces fragments, comme la structure secondaire de l'ADN ou bien aux facteurs qui pourraient favoriser la croissance plasmidique, comme la présence dans cette région de certains gènes impliqués dans ce mécanisme.

Quant aux aspects techniques, il faut mentionner que le criblage de notre banque n'a pas soulevé des problèmes en dépit du nombre élevé d'échantillons sur chaque membrane (environ 100). De même, la manipulation des 8 membranes, en triple exemplaire, nous a permis d'effectuer les expériences d'hybridation avec les trois sondes radioactives en même temps. Mentionnons en fin, que les mêmes membranes pourront être réutilisées pour criblage avec d'autres sondes.

Le criblage de la banque avec d'autres sondes serait aussi souhaitable pour apporter de nouvelles confirmations sur la représentativité de la banque et aussi pour vérifier si la présence des clones identiques n'a pas un caractère systématique. Le fait que le phénomène n'a pas été rencontré avec les sondes A et B est rassurant de ce point de vue.

*

Pour l'avenir, après une meilleure caractérisation de la banque par l'entremise de nouveaux criblages, une importante amélioration pour notre banque serait de l'ordonner. Comme nous l'avons largement exemplifié dans la section 1. 2. 3., on peut utiliser plusieurs manières pour arriver à cette fin. Nous considérons qu'une variante commode, étant donné le nombre de clones et les particularités de notre banque, serait d'utiliser une méthode de type "bottom-up". Comme les fragments générés par la digestion du chromosome de *S. aureus* avec l'enzyme *Sma*I sont bien identifiés et dans

un nombre pas trop élevé, on pourra dans un premier temps, par expériences d'hybridations, déterminer les clones de notre banque qui hybrident avec chacun des 16 fragments *Sma*I. Dans un second temps, une méthode comme "chromosome walking" sera appropriée pour établir les chevauchements existants entre les clones de la banque qui hybrident avec le même fragment *Sma*I.

CONCLUSION

Nous avons construit une banque génomique pour la bactérie *S. aureus* dans deux vecteurs plasmidiques: pUC18 et pBluescript II SK⁺. La banque contient 800 clones qui portent comme inserts des fragments chromosomiques plus grands de 9 kpb. La taille moyenne des inserts a été établie à 9,85 kpb suite à la détermination de la taille de chaque insert. La probabilité de représentation d'un gène quelconque dans la banque a été calculée comme étant 94,2%. Trois fragments chromosomiques de *S. aureus*, clonés précédemment, ont été utilisés pour construire trois sondes qui ont été hybridées avec la banque. Dans tous les trois cas, un ou plusieurs clones ont été trouvés positifs. Cinq clones qui hybridaient avec la sonde C ont subi des analyses supplémentaires; leurs cartes de restriction et leurs positions par rapport au fragment de référence ont été établies. Une meilleure caractérisation de la banque impliquera des criblages avec de nouvelles sondes et une considérable amélioration sera apportée en établissant l'ordre des clones par rapport à la carte de restriction *Sma*I du génome de *S. aureus*.

RÉFÉRENCES

Anderson, B., McDonald, G., *Construction of DNA Libraries of A-T Rich Organisms Using EcoRI Star Activity*, *Analytical Biochemistry*, vol. 211, p. 325-327, 1993.

Auffray, C., Behar, G., Bois, F., Bouchier, C., Da Silva, C., Devignes, M. D., Duprat, S., Houlgatte, R., Jumeau, M. N., Lamy, B., Lorenzo, F., Mitchell, H., Mariage-Samson, R., Pietu, G., Pouliot, Y., Sebastiani-Kabaktchis, C., Tessier, A., *IMAGE: intégration au niveau moléculaire de l'analyse du génome humain et de son expression*, *C. R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie*, vol. 318, p. 263-272, 1995.

Ausubel, F. M., Brent, K., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (éd.), *Current protocols in molecular biology*, New York, John Wiley & Sons, 1992.

Bachmann, B. J., *Linkage map of Escherichia coli K-12*, ed. 7, *Microbiol. Rev.*, vol. 47, p. 180-230, 1983.

Bannantine, J. P., Pattee, P. A., *Construction of a chromosome map for the phage group II Staphylococcus aureus Ps55*, *J. Bacteriol.*, vol. 178, p. 6842-6848, 1996.

Bannerman, T. L., Hancock, G. A., Tenover, F. C., Miller, J. M., *Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, p. 551-555, 1995.

Barillot, E., Lacroix, B., Cohen, D., *Theoretical analysis of library screening using a N-dimensional pooling strategy*, *Nucleic Acids Research*, vol. 19, p. 6241-6247, 1991.

Bender, W., Spierer, P., Hogness, D. S., *Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in Drosophila melanogaster*, J. Mol. Biol., vol. 168, p. 17-33, 1983.

Berger-Bächi, B., *Insertional Inactivation of Staphylococcal Methicillin Resistance by Tn551*, J. Bacteriol., vol. 154, no. 1, p. 479-487, 1983.

Blattner, F. R., Williams, B. G., Blechl, A. E., Denniston-Thompson, K., Faber, H. E., Furlong, L. A., Grunwald, D. J., Kiefer, D. O., Moore, D. D., Schumm, J. W., Sheldon, E. L., Smithies, O., *Charon Phages: Safer Derivatives of Bacteriophage Lambda for DNA Cloning*, Science, no. 196, p. 161-169, 1977.

Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. H., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Maykew, G. F., Gregor, J., Davis, N. N., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*, Science, vol. 277, p. 1453-1474, 1997.

Blin, N., Stafford, D. W., *A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes*, Nucl. Acids Res., no. 9, p. 2303-2308, 1976.

Bodén, M. K., Flock, J., *Cloning and characterisation of a gene for a 19 KD fibrinogen-binding protein from Staphylococcus aureus*, Mol. Microbiol., vol. 12, p. 599-606, 1994.

Borecka, P., Rosypal, S., Pantucek, R., doskar, J., *Localisation of prophages of serological group B and F on restriction fragments defined in the restriction map of Staphylococcus aureus NCTC 8325*, FEMS Microbiol. Lett., vol. 143, p. 203-210, 1996.

Brown, D. R., Pattee, P. A., *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, H95, p. 119, 1978.

Brown, T. A., (éd.), *Molecular Biology Labfax*, Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited, 1991.

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M., Venter, J. C., *Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii*, *Science*, vol. 273, p. 1058-1073, 1996.

Carle, G. F., Olson, M. V., *Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alteration gel electrophoresis*, *Nucl. Acids Res.*, vol. 12, p. 5647-5664, 1984.

Carle, G. F., Frank, M., Olson, M. V., *Electrophoretic Separations of Large DNA Molecules by Periodic Inversion of the Electric Field*, *Science*, vol. 232, p. 65-68, 1986.

Chalker, A. F., Ward, J. M., Fosberry, A. P., Hodgson, J. E., *Analysis and toxic overexpression in Escherichia coli of a staphylococcal gene encoding isoleucyl-tRNA synthetase*, *Gene*, vol. 141, p. 103-108, 1994.

Cheung, A. I., Projan, S. J., Edelstein, R. E., Fischetti, V. A., *Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of a Staphylococcus aureus Gene (fbpA) Encoding a Fibrinogen-Binding Protein*, *Infection and Immunity*, vol. 63, no. 5, p. 1914-1920, 1995.

Chikindas, M. L., Isaeva, S. V., Chistiakova, L. G., Klinskii, E. I., Grabovetskii, V. V., Vasilenko, O. V., Sveshnikov, P. G., Alakhov, V. I., Kiselev, V. I., *Expression of Staphylococcus aureus enterotoxine A gene in heterologous systems*, Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol., vol. 21, no. 4, 1990.

Clarke, L., Carbon, J., *Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the Escherichia coli genome*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 72, p. 4361-4365, 1975.

Clarke, L., Carbon, J., *A colony band containing synthetic ColE₁ hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome*, Cell, vol. 9, p. 91-99, 1976.

Collins, J., Brüning, J., *Plasmids useable as gene-cloning vectors in an "in vitro" packaging by coliphage λ : "cosmids"*, Gene, vol. 4, p. 85-107, 1978.

Collins, J., Hohn, B., *Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is packageable "in vitro" in bacteriophage λ heads*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, no. 9, p. 4242-4246, 1978.

Daniels, D. L., Blattner, F. R., *Mapping using gene encyclopaedias*, Nature (London), vol. 325, p. 831-832, 1987.

Daniels, D. L., *Constructing Encyclopaedias of Genomes*, p. 43-51, dans: Drlica, K., Riley, M. (eds.), The Bacterial Chromosome, Washington, D. C., American Society of Microbiology, 1990.

Dyer, D. W., Iandolo, J. J., *Rapid isolation of DNA from Staphylococcus aureus*, App. Env. Microbiol., vol. 46, p.283 -285, 1983.

Evans, G. A., Lewis, K., Rothenberg, B. E., *High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis*, Gene, vol. 79, p. 9-20, 1989.

Evans, G., *Combinatoric strategies for genome mapping*, Bioessays, vol. 13, p. 39-44, 1991.

Farrell, A. M., Taylor, D., Holland, K. T., *Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the Staphylococcus aureus hyaluronate lyase gene*, FEMS Microbiology Letters, vol. 130, p. 81-85, 1995.

Feiss, M., Fisher, R. A., Crayton, M. A., Egner, C., *Packaging of the bacteriophage lambda chromosome: effect of chromosome length*, Virology, vol. 77, p. 281-293, 1977.

Feiss, M., Becker, A., in *Lambda II*, Hendrix, R., Roberts, J., Stahl, F., Weisberg, R., (eds.), p. 305, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1983.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., et al., *Whole - genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.*, Science, vol. 269, p. 496-512, 1995.

Fonstein, M., Haselkorn, R., *Chromosomal structure of Rhodobacter capsulatus strain SB1003: cosmid encyclopedia and high-resolution physical and genetic map*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 90, p. 2522-2526, 1993.

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., et

al., *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium*, Science, vol. 270, p. 397-403, 1995.

Frischauf, A. M., λ *Phage Vectors-EMBL Series*, Meth. in Enzymol., vol. 153, p. 103-115, 1987.

Gardiner, K., Laas, W., Patterson, D., *Fractionation of Large Mammalian DNA Restriction Fragments Using Vertical Pulsed-Field Gradient Gel Electrophoresis*, Somatic Cell and Molecular Genetics, vol. 12, no. 2, p. 185-195, 1986.

Gawron-Burke, C., Clewell, D. B., *A transposon in Streptococcus faecalis with fertility properties*, Nature (London), vol. 300, p. 281-284, 1982.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B., (éds.), *Manual of methods for general bacteriology*, Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1981.

Herrero, A., Wolk, C. P., *Genetic mapping of chromosome of the cyanobacterium, Anabaena variabilis. Proximity of the structural genes for nitrogenase and ribulose-bisphosphate carboxylase*, J. Biol. Chem. , vol. 261, p. 7748-7754, 1986.

Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B. C., Herrmann, R., *Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae*, Nucleic Acids Res., vol. 24, p. 4420-4449, 1996.

Hohn, B., Collins, J., *A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments*, Gene, vol. 11, p. 291-298, 1980.

Ish-Horowicz, D., Burke, J. F., *Rapid and efficient cosmid cloning*, Nucleic Acids Research, vol. 9, p. 2989-2998, 1981.

Kafala, B., Sasarman, A., *Cloning and sequence analysis of the hemB gene of Staphylococcus aureus*, Can. J. Microbiol., vol. 40, p. 651-657, 1994.

Kaiser, K., Murray, N., en *DNA Cloning*, vol. I, p. 1-47, IRL Press, Oxford, 1985.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S., *Sequence analysis of genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803.II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions*, DNA Res., vol. 3, p. 109-136, 1996.

Karn, J., Brenner, S., Barnett, L., *New Bacteriophage Lambda Vectors with Positive Selection for Cloned Inserts*, Meth. in Enzymol., vol. 101, p. 3-20, 1983.

Knott, V., Rees, D. J., Cheng, Z., Brownlee, G. G., *Randomly picked cosmid clones overlap the pyrB and oriC gap in the physical map of the E. coli chromosome*, Nucleic Acids Res., vol. 16, p. 2601-2612, 1988.

Kohara, Y., Akiyama, K., Isono, K., *The Physical Map of the Whole E. coli Chromosome: Application of a New Strategy for Rapid Analysis and Sorting of a Large Genomic Library*, Cell, vol. 50, p. 495-508, 1987.

Kohara, Y., *Correlation between the Physical and Genetic Maps of the Escherichia coli K-12 Chromosome*, p. 29-30, dans: Drlica, K., Riley, M., (eds.), *The Bacterial Chromosome*, Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1990.

Krolewski, J. J., Murphy, E., Novick, R. P., Rush, M.G., *Site-specificity of the chromosomal insertion of Staphylococcus aureus transposon Tn554*, *J. Mol. Biol.*, vol. 152, p. 19-33, 1981.

Lalande, M., Noolandi, J., Turmel, C., Rousseau, J., Slater, G. W., *Pulsed-field electrophoresis: Application of a computer model to the separation of large DNA molecules*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, p. 8011-8015, 1987.

Lander, E. S., Waterman, M. S., *Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis*, *Genomics*, vol. 2, p. 231-239, 1988.

Lee, C. Y., *Cloning of genes affecting capsule expression in Staphylococcus aureus strain M*, *Mol. Microbiol.*, no. 6, p. 1515-1522, 1992.

Lee, J. C., Xu, S., Albus, A., Livolsi, P. J., *Genetic Analysis of Type 5 Capsular Polysaccharide Expression by Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, vol. 176, p. 4883-4889, 1994.

Lin, W. S., Cunneen, T., Lee, C. Y., *Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, vol. 176, p. 7005-7016, 1994.

Lindberg, M., Sjöström, J. E., Johansson, T., *Transformation of Chromosomal and Plasmid Characters in Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* vol. 109, no. 2, p. 844-847, 1972.

Luchansky, J. B., Pattee, P. A., *Isolation of Transposon Tn551 Insertions Near Chromosomal Markers of Interest in Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., vol. 159, p. 894-899, 1984.

Lucifer, T. S., Hu, P. Q., Peterson, S. N., Song, X. Y., Miller, L., Heitzman, K., Bott, K. F., Hutchison, C. A. 3rd, Hu, P. C., *Construction of an ordered genomic library of Mycoplasma genitalium*, Gene, vol. 150, no. 1, p. 27-34, 1994.

Mahairas, G. G., Lyon, B. R., Skurray, R. A., Pattee, P. A., *Genetic Analysis of Staphylococcus aureus with Tn4001*, J. Bacteriol., vol. 171, no. 7, p. 3968-3972, 1989.

Maniatis, T., Hardison, R. C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., *The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eucaryotic DNA*, Cell, vol. 15, p. 687-701, 1978.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986.

Meshveliani, D. K., Adamiia, R. S., Vashakidze, R. P., Mamulashvili, N. A., Kvachadze, L. I., Ogarkova, O. A., *Cloning of alpha-hemolysin gene from Staphylococcus aureus strain 015*, Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. vol. 9, no. 11, 1990.

Michiels, F., Craig, A. G., Zehetner, G., Smith, G. P., Lehrach, H., *Molecular approaches to genome analysis: a strategy for the construction of ordered overlapping clone libraries*, Copmut. Appl. Biosci., vol. 3, p. 203-219, 1987.

Morse, M. L., *Transduction by Staphylococcus Bacteriophage*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 45, p. 722-727, 1959.

Murray, N. E., en *Phage Lambda and Molecular Cloning*, Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W., Weisberg, R. A. (eds.) p. 395, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, **1983**.

Novick, R. P., Edelman, I., Schwesinger, M. D., Gruss, A. D., Swanson, E. C., Pattee, P. A., *Genetic translocation in Staphylococcus aureus*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. **76**, no. 1, p. 400-404, **1979**.

Novick, R. P., *The Staphylococcus as a Molecular Genetic System*, p. 1-37, dans: Novick, R. P. (éd.), *Molecular Biology of the Staphylococci*, New York, VCH Publishers, **1990**.

Olson, M., Hood, L., Cantor, C., Bolstein, D., *A common language for physical mapping of the human genome*, Science, vol. **245**, p. 1434-1435, **1989**.

O'Toole, P. W., Foster, T. J., *Molecular cloning and expression of the epidermolytic toxin A gene of Staphylococcus aureus*, Microbial Pathogenesis, vol. **1**, p. 583-594, **1986**.

Ouyang, S., Lee, C. Y., *Transcriptional analysis of type capsule genes in Staphylococcus aureus*, Mol. Microbiol., vol. **23**, p. 473-482, **1997**.

Palazzolo, M. J., Sawyer, S. A., Martin, C. H., Smoller, D. A., Hartl, D. L., *Optimized strategies for sequence-tagged-site selection in genome mapping*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. **88**, p. 8034-8038, **1991**.

Pantucek, R., Gotz, F., Doskar, J., Rosypal, S., *Genomic variability of Staphylococcus aureus and the other coagulase-positive Staphylococcus species*

estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis, Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 46, p. 216-222, 1996.

Pattee, P. A., Kloos, W. E., Bodensteiner, J. B., Zara, A., *Homogeneity in a Staphylococcus aureus Transducing Fragment*, J. Virol. , vol. 2, No. 6, p. 652-654, 1968.

Pattee, P. A., Neveln, D. S., *Transformation Analysis of Three Linkage Groups in Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., vol. 124, no. 1, p. 201-211, 1975.

Pattee, P. A., Glatz B. A., *Identification of a Chromosomal Determinant of Enterotoxin A Production in Staphylococcus aureus*, App. Env. Microbiol., vol. 39, no. 1, p. 186-193, 1980.

Pattee, P. A., *Distribution of Tn551 Insertion Sites Responsible for Auxotrophy on the Staphylococcus aureus Chromosome*, J. Bacteriol., vol. 145, no. 1, p. 479-488, 1981.

Pattee, P. A., *Genetic and Physical Mapping of the Chromosome of Staphylococcus aureus NCTC 8325*, p. 163-169, dans: Drlica, K., and Riley, M., (eds.), *The Bacterial Chromosome*, Wiley, New York, 1990.

Pattee, P. A., Lee, Hin-C., Bannantine, J. P., *Genetic and Physical Mapping of the Chromosome of Staphylococcus aureus*, p. 41-58, dans: Novik, R. P. (éd.), *Molecular Biology of the Staphylococci*, New York, VCH Publishers, 1990.

Pattee, P. A., *The Genetic Map of Staphylococcus aureus*, p. 489-496, dans: Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R., (eds.), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, Washington, D.C.: American Society Microbiology, 1993.

Patti, J. M., Jonsson, H., Guss, B., Switalski, L. M., Wiberg, K., Lindberg, M., Höök, M., *Molecular Characterization and Expression of a Gene Encoding a Staphylococcus aureus Collagen Adhesin*, J. Biol. Chemistry, vol. 267, no. 7, p. 4766-4772, 1992.

Patti, J.M., Schneider, A., Garza, N., Boles, J. O., *Isolation and characterization of pcp, a gene encoding a pyrrolidone carboxyl peptidase in Staphylococcus aureus*, Gene, vol. 166, p. 95-99, 1995.

Perkins, J. B., Youngman, P. J., *A physical and functional analysis of the Tn917, a Streptococcus transposon in the Tn3 family that functions in Bacillus*, Plasmid, vol. 12, p. 119-138, 1984.

Phillips, T. A., Vaughn, V., Bloch, P. L., Neidhardt, F. C., *Gene-protein index of Escherichia coli K-12*, edition 2, p. 919-966. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1987.

Port, E., Sun, F., Martin, D., Waterman, S., *Genomic Mapping by End-Characterized Random Clones: A Mathematical Analysis*, Genomics, vol. 26, p. 84-100, 1994.

Ritz, H. L., Baldwin, J. N., *A Transduction Analysis of Complex Loci Governing the Synthesis of Tryptophan by Staphylococcus aureus*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., vol. 110, p. 667-671, 1962.

Romling, U., Grothues, D., Heuer, T., Tummeler, B., *Physical genome analysis of bacteria*, Electrophoresis, vol. 13, p. 626-631, 1992.

Roy, G., Wallenburg, C., Chartrand, P., *Inexpensive and simple set-up for field inversion gel electrophoresis*, Nucleic Acids Research, vol. 16, no. 2, p. 768, 1988.

Rudy, C. K., Scott, J. R., *Length of the coupling sequence of Tn916*, J. Bacteriol., vol. 176, p. 3386-3388, 1994.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (éd.), *Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn)*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sapolsky, R., Lipshutz, R., *Mapping Genomic Library Clones Using Oligonucleotide Arrays*, Genomics, vol. 33, p. 445-456, 1996.

Sasarman, A., Surdeanu, M., Portelance, V., Dobardzic, R., Sonea, S., *Classification of vitamin K-deficient mutants of Staphylococcus aureus*, J. Gen. Microbiol., vol. 65, p. 125-130, 1971.

Sasarman, A., Purvis, P., Portelance, V., *Role of menaquinone in nitrate respiration in Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., vol. 117, p. 911-913, 1974.

Sau, S., Lee, C. Y., *Cloning of Type 8 Capsule Genes and Analysis of Gene Clusters for the Production of Different Capsular Polysaccharides in Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., vol. 178, no. 7, p. 2118-2126, 1996.

Sau, S., Sun, J., Lee, C. Y., *Molecular characterization and transcriptional analysis of type 8 capsule genes in Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., vol. 179, p. 1614-1621, 1997.

Sazuka, T., Ohara, O., *Towards a proteome projet of cyanobacterium Synechocytis sp. strain PCC6803: linking 130 protein spots with their respective genes,* Electrophoresis, vol. 18, no. 8, p. 1252-1258, 1997.

Schwartz, D. C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R.,Goldenberg, M., Cantor, C. R., Cold Spring Harbon Symp. Quant. Biol., vol. 42, p. 189-195, 1983.

Seed, B., Parker, R. C., Davidson, N., *Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion,* Gene, vol. 19, p. 201-209, 1982.

Shestoplov. V. I., Nashchokina, O. O., Shestakov. S. V., Iankovskii, N. K., *Construction of the genomic library for cyanobacteria Synechocystis sp. PCC6803 using a cosmid,* Genetika, vol. 30, no. 4, p. 452-455, 1994.

Silhavy, T. J., Berman, M. L., Enquist, L. W., *Experiments with gene fusion,* Cold Spring Harbon Lab., New York, 1984.

Slightom, J. L., *Optimal Preparative Methods for Producing Comparative Gene Libraries,* Methods in enzymol., vol. 224, p. 251-277, 1993.

Smith, C. L., Warburton, P. E., Gaal, A., Cantor, C. R., *Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis.* In Setlow, J. K., Hollaender, A. (eds.), Genetic Engineering. Principles and Methods, vol. 8, p. 45-70. Plenum, New York and London, 1986.

Smith, C. L., Econome, J. G., Schutt, A., Klco, S., Cantor, C. R., *A physical map of the Escherichia coli K-12 genome,* Science, vol. 236, p. 1448-1453, 1987.

Stahl, M. L., Pattee, P. A., *Computer-Assisted Chromosome Mapping by Protoplast Fusion in Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., vol. **154**, no.1, p. 395-405, **1983(a)**.

Stahl, M. L., Pattee, P. A., *Confirmation of Protoplast Fusion-Derived Linkages in Staphylococcus aureus by Transformation with Protoplast DNA*, J. Bacteriol., vol. **154**, no.1, p. 406-412, **1983(b)**.

Stewart, P. R., Waldron, H. G., Lee, J. S., Matthews, P. R., *Molecular Relationships Among Serogroup B Bacteriophages of Staphylococcus aureus*, J. Virol., vol. **55**, No. 1, p. 111-116, **1985**.

Tabata, S., Higashitani, A., Takanami, M., Akiyama, K., Kohara, Y., Nishimura, Y., Nishimura, A., Yasuda, S., Hirota, Y., *Construction of a Ordered Cosmid Collection of the Escherichia coli K-12 W3110 Chromosome*, J. Bacteriol., vol. **171**, p. 1214-1218, **1989**.

Thierry, A., Dujon, B., *Nested Chromosomal Fragmentation in Yeast Using the Meganuclease I-Sce-I: a New Method for Physical Mapping of Eucaryotic Genomes*, Nucl. Acids Res., vol. **20**, p. 5625-5631, **1992**.

Thierry, A., Gaillon, L., Galibert, F., Dujon, B., *Construction of a Complete Genomic Library of Saccharomyces cerevisiae and Physical Mapping of Chromosome XI at 3·7 Kb Resolution*, Yeast, vol., **11**, p. 121-135, **1995**.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., FitzGerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Venter, J. C., et al., *The complete*

genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori, Nature, vol. 388, p. 539-547, 1997.

Tremblay, A., *Obtention des mutants men de Staphylococcus aureus à l'aide du transposon Tn917; isolement des gènes pckA et metE*, Mémoire de M. Sc. en biologie moléculaire, Université de Montréal, 1995.

Watson, J. W., *The Human Genome Project: Past, Present, and Future*, Science, vol. 248, p. 44-49, 1990.

Wenzel, R., Herrmann, R., *Cloning of the complete Mycoplasma pneumoniae genome*, Nucleic Acids Res., vol. 17, no. 17, p. 7029-7043, 1989.

Woese, C. R., *Bacterial evolution*, Microbiol. Rev., vol. 51, p. 221-271, 1987.

Zhao, X. -J., Wu H. C., *Nucleotide sequence of the Staphylococcus aureus signal peptidase II (lsp) gene*, Federation of European Biochemical Societies, vol. 299, no. 1, p. 80-84, 1992.

Zissler, J., Signer, E. R., Schaefer, F., en *The Bacteriophage Lambda*, Hershey, A. D., (ed.), p. 455, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1971.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier cordialement mon directeur de recherche, **Dr. Alexandre Sasarman**, qui avec sa grande compétence professionnelle, son enthousiasme scientifique et aussi son grand coeur m'a aidé à parcourir tout ce chemin.

Je voudrais saluer amicalement **Mme Annie Tremblay**, **Mme Pauline Phoenix** et **M. Jean Lauzer** pour m'avoir partagé avec générosité de leur expérience en laboratoire.

Un grand merci à mon mari, **M. Elian Grigore** pour la construction de l'appareil d'électrophorèse en champ inversé et pour son constant encouragement.