

Transfert d'ADN exogène (plasmide) aux *Vibrio* spp. par conjugaison

Introduction

Beaucoup de souches environnementales de *Vibrio* ne sont pas transformables par les techniques classiques (chimiocompétence, électrocompétence, chitine) et sont donc manipulées génétiquement par conjugaison. Il s'agit de transférer un plasmide d'une souche *E. coli* donneuse vers une souche *Vibrio* receveuse.

Le plasmide contient :

- **une origine de réplication, *oriV***, constitutive ou conditionnelle selon les objectifs.
 - Nous utilisons deux types de plasmides réplicatifs, *oriV*_{p15A} a un large spectre bactérien et *oriV*_{pMRB} qui est spécifique et stable chez *Vibrio*. Ces plasmides sont utilisés pour exprimer un fluorochrome (p.ex.GFP) ou pour des expériences de complémentation. Quand on veut exprimer constitutivement un gène, on le clone sous la dépendance d'un promoteur *P*_{Lac}, quand on veut une expression contrôlée on utilise le promoteur *P*_{BAD}.
 - Nous utilisons un vecteur conditionnel (ou suicide) dont la réplication est médiée par une protéine (Pir). Le gène codant cette protéine est présent chez la donneuse de conjugaison mais absent chez *Vibrio*. Ce vecteur suicide est utilisé pour des intégrations par recombinaison dans le génome afin d'inactiver ou de déléter un élément génétique. On peut aussi y cloner des transposons de type marinier pour générer des banques d'insertion aléatoire.
- **une origine de transfert *oriT*** compatible avec le système de conjugaison exprimé par la donneuse, nous utilisons le système *oriT*_{RP4}.
- **Un marqueur de sélection**, gène de résistance à une antibiotique.

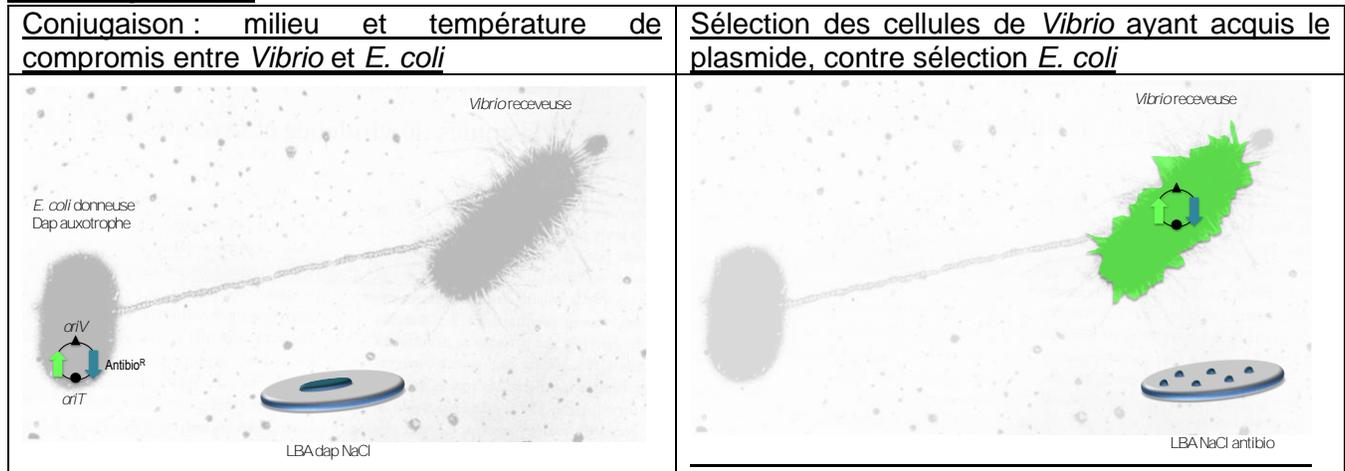
La souche *E. coli* donneuse de conjugaison (nommée beta XXX) contient :

- Les gènes de conjugaison du système RP4 couplés au gène de résistance à la kanamycine.
- Le gène *pir* pour permettre la réplication de vecteur suicide.
- Elle est auxotrophe au DAP (diaminopimelate) pour l'éliminer (contre sélection) après l'étape de conjugaison et transfert du plasmide à la souche de *Vibrio*.

Notez que la compétence chez cette souche beta n'est pas optimale. On réalise donc nos clonages dans une autre souche (nommée Pi XXX), on contrôle les constructions et on transfère les plasmides dans la donneuse. La souche Pi contient :

- Le gène *pir* pour permettre la réplication de vecteur suicide.
- Elle est auxotrophe au dT (Thymidine).

La souche *Vibrio* receveuse peut être plus ou moins résistante aux antibiotiques (entre nos mains et le plus souvent, uniquement le chloramphénicol et la spectinomycine sont utilisables). Les *Vibrio* spp. sont plus ou moins permissives au transfert d'ADN exogène en raison des systèmes de défense qui sont nombreux chez elles. Il est donc nécessaire de réaliser un antibiogramme à l'avance et de tester plusieurs souches d'intérêt pour sélectionner la meilleure receveuse (si possible). Des astuces à la fin de cette section permettent d'améliorer la fréquence de conjugaison qui peut varier de 10^{-1} à $<10^{-7}$ selon les souches.

Résumé graphiqueMatériel (exemple pour *V. crassostreae*)

- Marine broth (MB)
- Marine agar (MA)
- Lysogeny broth (LB) Miller
- LB + agar (LBA)
- NaCl 5 M
- DAP 50mM (SIGMA 33240-5G)
- Chloramphenicol (Cm) 25 mg/mL
- LB NaCl 0.5 M
- Kanamycine (Kan) 100 mg/mL
- TSA-2 (BBL Trypticase Soy Broth (TSB), BD, ref. 211768). Pour 1L de TSA-2 : TSB 30 g ; NaCl 15 g ; Agar 15 g ; H₂O qsp 1L
- Conjugaison : TSA-2 + DAP 0.3 mM ou LBA NaCl 0.5 M + DAP 0.3 mM
- Sélection : TSA-2 + Cm 5 ug/mL ou LBA NaCl 0.5 M + Cm 5 ug/mL

Culture de bactéries

E. coli beta: LB DAP 0.3mM, 37°C, 250 rpm

Vibrio: MB, 20°C, ou LB NaCl 0.5M, agitation douce (100 rpm)

37°C incubateur pour *E. coli*

30°C incubateur pour la conjugaison

20°C incubateur pour *Vibrio* et la sélection

Protocole :**J-2**

Décongeler les cellules sur gélose

- *Vibrio* sur MA.
- Donneuse de conjugaison sur LBA+ DAP 0.3mM + Kan 100 ug/mL + antibiotique codé par le plasmide, ici Cm 25 ug/mL.

J-1

Lance 5 mL de culture pour toute la nuit

- *Vibrio* in MB.
- *E. coli* donneuse LB DAP 0.3 mM+ Cm 25 ug/mL (on n'ajoute pas de Kanamycine en phase liquide).

J0

Diluer les cultures au 1/100 dans 5 mL.

Vibrio : LB NaCl 0.5 M, 20°C, agitation douce.

E. coli : LB DAP 0.3 mM (**pas d'antibiotique**), 37°C, 250 rpm.

Suivre la croissance (DO) régulièrement. À DO 0.3 mélange 1mL de *Vibrio* avec 5 mL de *E. coli* donneuse, centrifuger à 6000 rpm 10 minutes, enlever un maximum de surnageant (retourner le tube rapidement sur papier adsorbant) et reprendre le culot par un volume minimum (25ul) de LB NaCl 0.5 M.

Déposer le mélange sur une gélose bien sèche de TSA-2 DAP 0.3 mM (le dépôt doit être très dense et petit), incuber une nuit à 30°C.

J1

Gratter le biofilm/spot bien gras avec un cône (P1000) pour tout récupérer.

Placer le cône avec les bactéries dans un tube 15mL contenant 2 mL de LB NaCl 0.5 M et vortexer fort 5 secondes pour bien re-suspendre les cellules.

Étaler directement, et/ou diluer sur gélose de sélection TSA-2 Cm 5 ug/mL; alternativement (quand la fréquence de conjugaison est bonne, c.-à-d. 10^{-3} minimum) déposer 10 µl de suspension et effectuer des stries d'isolation sur boîte.

Incuber 24 à 48 heures à 20°C selon les souches de *V. crassostreae*.

Le rapport entre le nombre de conjuguants sélectionnés sur antibiotique et le nombre de colonies de *Vibrio* obtenues sur gélose sans antibiotique vous donne la fréquence de conjugaison.

Repiquer quelques clones sur milieu sélectif LBA NaCl 0.5 M Cm 5 ug/mL et incuber à 20°C toute la nuit. Confirmer la présence du plasmide para miniprep ou PCR.

Astuces!

Il faut bien comprendre que chaque souche de *Vibrio* a sa propre particularité : type d'antibiotique possible pour la sélection, permissivité à l'ADN exogène, etc. Nous fournissons donc ici quelques conseils pour démarrer un projet de génétique chez votre souche préférée.

- Essayer d'avoir une collection de souches plutôt qu'une souche unique à manipuler. Déterminer si votre souche est génétiquement modifiable (la plus génétiquement modifiable) est peut-être quelque chose à déterminer avant de la séquencer.
- Tester la résistance de vos souches aux antibiotiques utilisés au laboratoire (et résistances portées par vos plasmides) en général chloramphenicol, spectinomycine, ampicilline et kanamycine.
- Les *Vibrio* spp. vivent dans diverses niches écologiques. Les *Vibrio* spp. bretonnes sont cultivées à 20°C, les *Vibrio* spp. norvégiennes à 16°C, les *Vibrio* spp. neo-calédoniennes à 28°C. Ces paramètres sont à prendre en compte pour la culture liquide et la conjugaison. Par exemple, les *Vibrio* spp. du froid vont mourir à 30°C, prévoir donc une conjugaison à température moins élevée mais plus longue.
- La conjugaison et la sélection peuvent être réalisées sur LBA NaCl 0.5 M à la place du TSA-2, en fonction des souches. La référence initiale citée utilise exclusivement le LB et ses dérivés.
- La conjugaison se fait en général avec des cultures de *Vibrio* en phase exponentielle de croissance mais certains préfèrent des DO plus forte (0.9).
- La sélection antibiotique est aussi variable ; par exemple on sélectionne *V. crassostreae* sur Cm 5 ug/mL alors que *V. nigripulchritudo* et *V. aesturianus* sont sélectionnables sur Cm 1ug/mL.
- Quand la fréquence de conjugaison est élevée, une alternative « rapidos » est de prélever les bactéries donneuses et receveuses directement sur les géloses, les mélanger avec un cône sur la boîte de conjugaison TSA-2 DAP 0.3 mM et incubé (c.-à-d. sans passer par une étape de cultures liquides) ; il suffit alors après une incubation de nuit à 30°C de prélever le biofilm/spot et le re-suspendre en LB NaCl 0.5 M.
- Au contraire quand la fréquence est faible, il est préférable d'effectuer un mélange de 10mL de donneuses et 1 mL de receveuses, faire 10 gouttes de biofilm/spot et sélectionner sur un grand nombre de boîtes.
- Quand on re-suspend le biofilm/spot dans 2 mL de LB NaCl 0.5 M et que l'on étale le mélange directement, on peut avoir un sérieux bruit de fond, il est donc nécessaire de le diluer pour l'étape de sélection.
- Certaines souches sont peu permissives au transfert de plasmides répliatifs (fréquence faible à nul) mais acceptent des plasmides suicides, donc restent génétiquement modifiables (voir protocoles mutation par intégration et mutation par échange allélique).

Reference

Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counter-selectable suicide vector. **Appl Environ Microbiol.** 2007 73(3), 777-84.