

Inactivation ou délétion d'élément génétique (y compris plasmid curing)

Introduction

La démonstration formelle de la fonction d'un gène ou d'un élément génétique (ilot génomique, plasmide etc.) requière l'inactivation ou la délétion de celui-ci pour démontrer qu'il est essentiel au phénotype. Nous utilisons un plasmide suicide, qui peut se répliquer chez la souche E. coli donneuse de conjugaison mais pas chez Vibrio. Ce plasmide est transféré au vibrio par conjugaison.

Le plasmide contient :

- **une origine de réplication, oriV**, conditionnelle dont la réplication est médiée par une protéine (Pir). Le gène codant cette protéine est présent chez la donneuse de conjugaison mais absent chez les vibrios. Ce vecteur suicide est utilisé pour des intégrations par recombinaison dans le génome afin d'inactiver ou de délété en élément génétique. On peut aussi y cloner des transposons de type mariner pour générer des banques d'insertion alléatoire.
- **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.

Dans le cas d'intégration par simple recombinaison on clone dans ce plasmide :

- **Un insert de 500 bp localisé**
 - Au milieu d'un gène si on veut l'inactiver
 - A la fin d'un gène si on veut introduire un marqueur (exemple résistance à antibiotique) dans l'élément génétique sans inactiver le gène

Dans le cas d'échange allélique (ou POP IN-POP OUT), le vecteur suicide qui contient de plus

- **araC_pBAD_ccdB** : une toxine bactérienne sous la dépendance d'un promoteur conditionnel, réprimé par 1% de glucose ; activé par 0.2% d'arabinose.
- **Un insert fusion** de 500 bp en amont et 500 bp en aval du gène que l'on veut déléter ou échanger

La souche E. coli de clonage (nommée Pi 3814) contient :

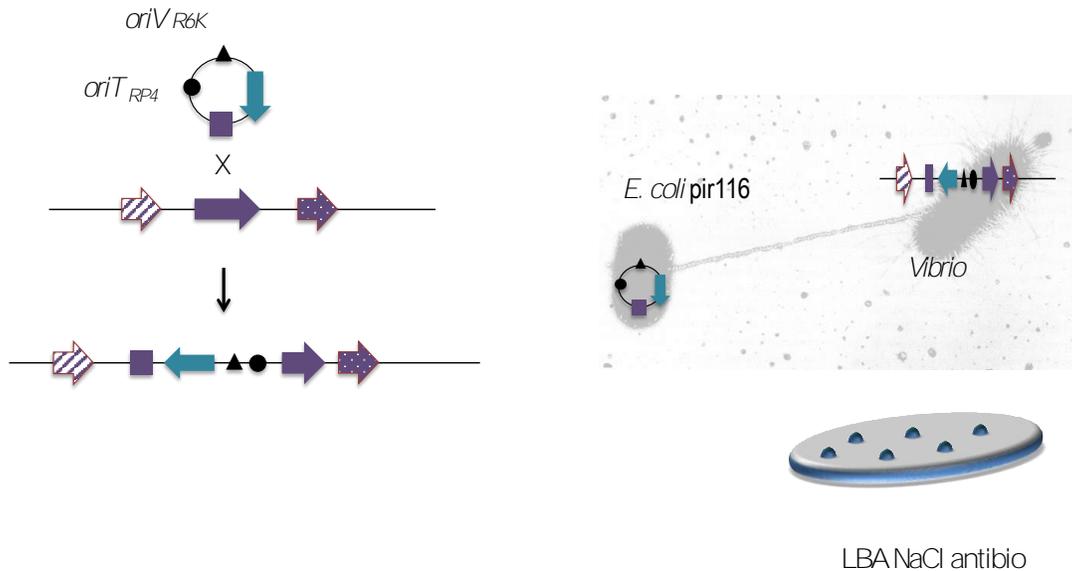
- Le gène pir pour permettre la réplication de vecteur suicide
- Elle est auxotrophe au dT (Thymidine)
- Elle possède une mutation gyrA qui la rend résistante à ccdB

La souche E. coli de conjugaison (nommée Beta 3914) contient

- Les gènes de conjugaison du système RP4 couplé 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 au vibrio.
- Elle est aussi résistante à ccdB (mutation gyrA)

Résumé graphique

1- Intégration du vecteur suicide par un seul évènement de recombinaison

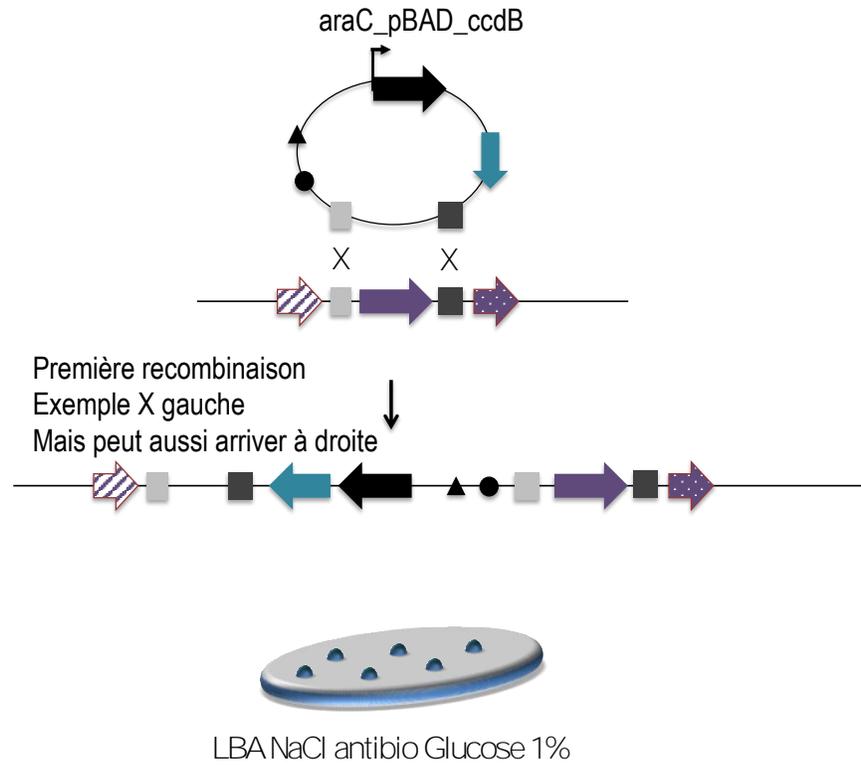


Intérêt : technique rapide (2 jours)

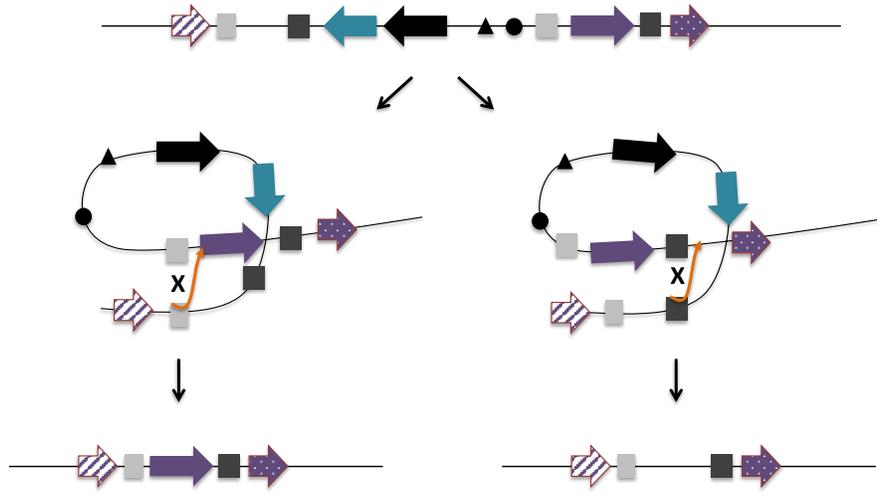
Inconvénient : le vibrio est alors résistant à l'antibiotique, on ne peut pas effectuer de multiples inactivations. De plus l'intégration du vecteur suicide peut altérer l'expression d'autres gènes dans cette région (effet polaire). D'une manière générale quand on observe la perte d'un phénotype chez le mutant, il faut toujours démontrer que la complémentation de cette mutation restaure le phénotype. Cette complémentation peut être réaliser en exprimant le gène à partir d'un plasmide ou en l'intégrant dans le génome.

2- POP In POP OUT

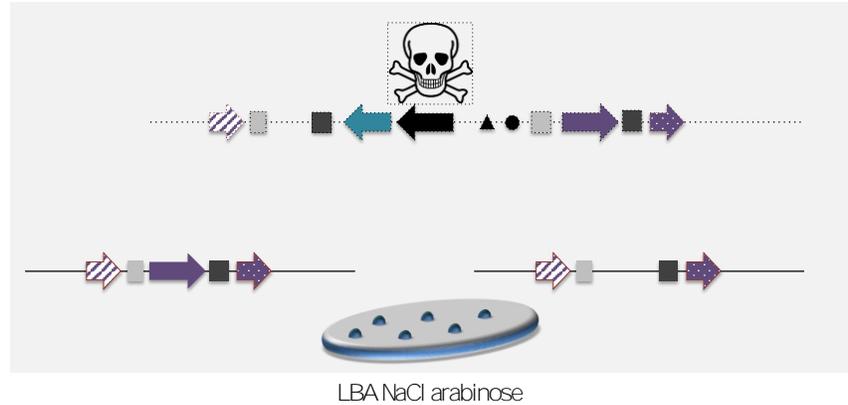
Etape 1



Etape 2 : l'intégration du vecteur suicide est sélectionné par l'antibiotique. Le glucose empêche l'expression de ccdB. Cette intégration génère une duplication des régions flanquantes (gris clair/foncé X) qui peuvent alors donner lieu à une seconde recombinaison



Les cellules qui n'ont pas subi ce second évènement de recombinaison sont contre sélectionnées en activant l'expression de ccdB (arabinose); les cellules qui porte encore le plasmide suicide meurent. Les mutats sont sélectionné par un crible de la délétion en utilisant des amorces PCR externe à la délétion.



Intérêt : on peut accumuler autant de délétions que l'on souhaite, car la contre sélection conduit à la perte du gène de résistance à l'antibiotique. La délétion ou l'échange allélique ne modifie en théorie pas les gènes adjacents.

Inconvénient : technique plus longue (5 jours)

Matériel (exemple pour *V. crassostreae*)

- Marine broth (MB)
- Lysogeny broth (LB)
- LB + agar (LBA)
- NaCl 5N
- Dap 50mM (SIGMA 33240-5G)
- Chloramphenicol (Cm) 25 mg/mL
- LB NaCl 0.5N
- Kan100 mg/mL
- TSA-2 (BBL Trypticase Soy Broth, 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** LB NaCl 0.5N + agar + dap 0.3 mM
- Sélection : TSA-2 + Cm 5ug/mL **ou** LB NaCl 0.5N + agar+ Cm 5ug/mL
- Dans le cas de l'échange allélique : sélection première recombinaison TSA-2 + Cm 5ug/mL + Glucose 1% **ou** LB NaCl 0.5N + agar+ Cm 5ug/mL+ Glucose 1% ; contre sélection seconde recombinaison : LB NaCl 0.5N + agar+arabinose 0.2%

Culture de bactéries

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

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

37°C incubateur pour E. coli

30°C incubateur pour la conjugaison

20°C incubator for vibrio and selection

Protocole:**J-2**

Décongeler les cellules sur gélose

- Vibrio sur MA
- Donneuse de conjugaison sur LBA+ dap+ Kan100+ antibiotique codé par le plasmide, ici Cm 25 ug/mL

J-1

Lance 5mL de culture la nuit

- Vibrio in MB
- E. coli donneuse LBA dap0.3 mM+ Cm25 ug/mL (on n'ajoute pas de Kana en phase liquide)

J0

Diluer les cultures au 1/100 dans 20mL

Vibrio: LB NaCl 0.5N, 20°C, agitation douce

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

Suivre la croissance (DO) régulièrement. A DO 0.3 mélange 2mL de vibrio avec 10 mL de E. coli donneuse, centrifuger a 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 0.5N

Déposer le mélange sur une gélose bien sèche de TSA-2 Dap 0.3 mM (le dépôt doit faire un demi millimètre), incubé une nuit à 30°C

J1

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

Placer le cône avec la boulette de bactéries dans un tube 15mL contenant 2 mL de LB NaCl 0.5N, vortexer fort 5 secondes pour bien resuspendre les cellules

Étaler 500 ul sur une grande boîte de gélose de sélection ; selon les souches et les gènes ciblés, une à plusieurs boîtes sont nécessaires.

- Dans le cas d'une intégration par une seule recombinaison sélectionner sur TSA-2 Cm5
- Dans le cas d'un échange allélique, sélectionner sur TSA-2 Cm5 Glucose 1%

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

Dans le cas d'une intégration par une seule recombinaison, confirmer l'intégration au bon endroit par PCR en utilisant une amorce dans le plasmide et une amorce dans le génome bactérien.

Dans le cas d'un échange allélique, poursuivre par la seconde recombinaison pour cela :

J2

Sélectionner 4 clones sur TSA-2 Cm5 Glucose 1% et les cultiver en LB NaCl 0.5N Cm5 pendant 6 à 8 heures.

Etaler 10 (isolement) et 100 ul (rateau) sur LB NaCl 0.2% arabinose.

Incuber 24 heures à 20°C

Cribler les mutants par PCR en utilisant des amorces externes

Important tips!

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. En plus des conseils donnés dans le protocole conjugaison, voici quelques trucs pour l'intégration :

- Les fréquences cumulées conjugaison/intégration varie grandement en fonction des souches et de la cible. Pour *V. crassostreae*, en général nous isolons plusieurs meriploïdes sur une boîte (de sélection 500 ul du jus de conjugaison), pour *V. aestuarianus*, il nous faut 10 à 20 grandes boîtes (5 conjugaisons, repris par 2 mL = 10 mL, 500 uL étalé sur 20 boîtes...)
- La fréquence d'intégration du plasmide suicide dépend de la taille de la région utilisée pour la recombinaison, en général 500 bp, mais on peut diminuer jusqu'à 150 bp si besoin
- Certaines souches sont non permissives à des plasmides réplicatifs mais permissive à l'intégration d'un vecteur suicide, donc ne désespérez pas !
- Certains auraient tendance à ajouter du glucose dans la gélose de conjugaison, non ! Le glucose a un effet négatif sur *E. coli* qui ne conjugue plus. On utilise le glucose que pour la sélection des vibrios conjugants.
- Pour les îlots génomiques (en particulier ceux qui sont impliqués dans la défense antiphage) il peut être nécessaire d'effectuer des sous délétions pour arriver à déléter l'îlot complet ; comme pour les plasmides, on peut aussi recourir à la délétion de la toxine d'un système d'addiction pour pouvoir effectuer la délétion totale
- Les mêmes outils sont utilisés pour **curer un plasmide**, on peut
 - o Cloner l'origine de répllication du plasmide de vibrio dans le vecteur suicide (sans *ccdB*), le transférer dans la souche de vibrio, sélectionner sur antibiotique. Le plasmide endogène et le plasmide transféré rentre en compétition (incompatibilité liée à une même origine de répllication) et on sélectionne des souches ayant perdu le plasmide endogène (Le Roux NAR 2011)
 - o Cloner 500 bp du plasmide endogène dans plasmide suicide codant *ccdB*, sélectionner l'intégration par recombinaisons sur antibiotique/glucose, puis cultiver en arabinose afin de contre sélectionner la perte du plasmide (Bruto ISME J 2017).

References

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 counterselectable suicide vector. **Appl Environ Microbiol.** 2007 73(3), 777-84.

Le Roux F, Davis BM, Waldor MK. Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. **Nucleic Acids Res.** 2011 39(3), 1004-13.

Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivresse S, Alunno-Bruscia M, Polz MF, Le Roux F. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. **ISME J.** 2017 11(4), 1043-1052.