

ELIE Florence

2ème année DUT Génie biologie ABB19

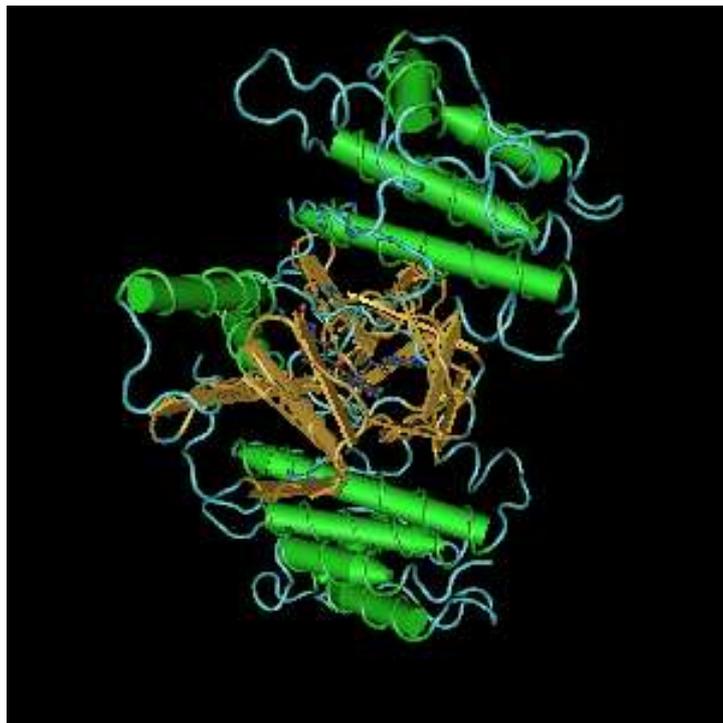
Année 2007/2008

Université du Sud Toulon, La Garde



RAPPORT
DE
STAGE

ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE CTR1 ET MKK DE LA PLANTE *Arabidopsis thaliana* en utilisant la technique Yeast Two-Hybrid



Responsable de stage: Dr Peter Morris

Tuteur enseignant : Dr Joël Grillasca

Période du stage : 14 avril au 21 juin

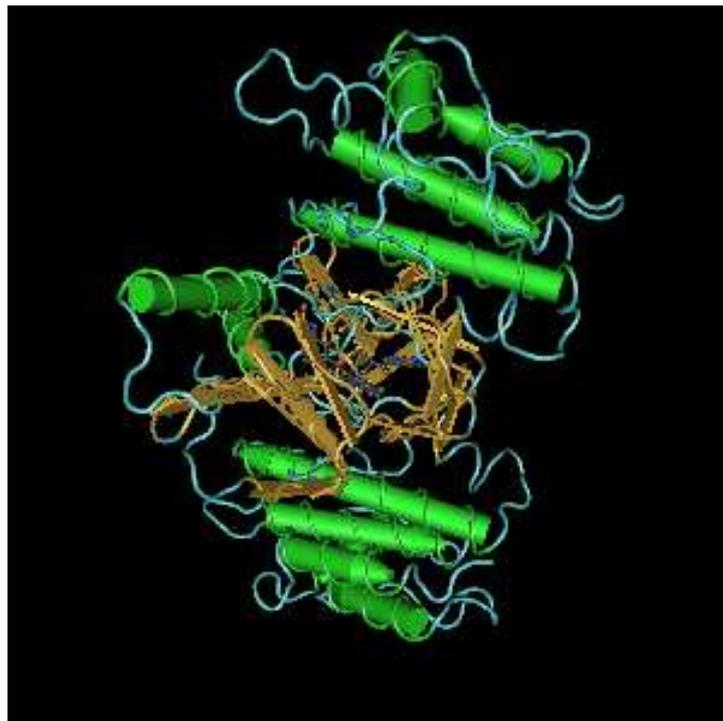
Lieu du stage : Laboratoire de recherche en biologie moléculaire, Université Heriot-Watt, Edinburgh, Ecosse

ELIE Florence
2ème année DUT Génie biologie ABB19
Année 2007/2008
Université du Sud Toulon, La Garde



RAPPORT
DE
STAGE

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE CTR1 ET MKK DE LA PLANTE *Arabidopsis thaliana* en utilisant la technique Yeast Two-Hybrid



Responsable de stage: Dr Peter Morris
Tuteur enseignant : Dr Joël Grillasca
Période du stage : 14 avril au 21 juin
Lieu du stage : Laboratoire de recherche en biologie
moléculaire, Université Heriot-Watt, Edinburgh, Ecosse

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement les personnes suivantes :

- ❖ Docteur Peter Morris qui m'a accueillie dans son laboratoire de recherche pendant mes dix semaines de stage, ainsi que de m'avoir aidée et soutenue tout au long du stage.
- ❖ Pour leurs conseils et leur accueil, les étudiants en PhD Mohammed H.Abass, Salem M.Rajab et surtout Wan Bayani Wan Omar qui m'a encadrée, épaulée tout au long du stage.
- ❖ Je remercie Dr Joël Grillasca, tuteur enseignant à l'IUT génie biologie, La Garde

Liste des abréviations

- min : Minute(s)
- μ L : Microlitre(s)
- mL : Millilitre(s)
- L : Litre(s)
- μ g : Microgramme(s)
- mg : Milligramme(s)
- g : Gramme(s)
- bp : Paire de bases
- kb : Kilobases
- rpm : rotations par minute
- X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
- β -gal : β -galactosidase
- Leu : Leucine
- Trp : Tryptophane
- MAPK : Mitogen-activated protein kinase
- MAPKK=MKK : Mitogen-activated protein kinase kinase
- MAPKKK =MKKK : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
- PCR : Polymérisation Chain Réaction
- Tm : Melting Temperature (température de fusion)
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- RNase : Ribonucléase
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- ssDNA : Acide désoxyribonucléique de sperme de saumon
- BET : Bromure d'Ethidium
- dNTP : DésoxyriboNucléotide-TriPhosphate
- Milieu LB : Milieu Luria-Bertani
- UV : Ultra-violets
- Amp : Ampicilline
- BD : Binding Domain
- AD : Activation Domain
- ONPG : O-nitrophenyl galactose
- ONP : O-nitrophenyl

Sommaire

I.	Introduction.....	8
II.	Présentation de l'entreprise.....	9
A.	L'Université Heriot-Watt:	9
B.	School of Life Sciences:.....	9
C.	Le laboratoire de recherche en biologie moléculaire:	9
III.	But et Principe de l'expérience	10
A.	Le but de l'étude :.....	10
B.	Moyen utilisé pour cette étude : Le Yeast Two-Hybrid :.....	10
IV.	Matériels et Méthodes.....	12
A.	Matériels biologiques	12
1)	Système biologique : la levure HF7C	12
2)	Système biologique : Escherichia coli.....	12
3)	Outils biologiques : les plasmides	13
B.	Protocoles et matériels	13
1)	Conditions générales lors des manipulations :.....	13
2)	Amplification par Polymerase Chain Reaction du gène CTR1 (PCR)	13
3)	Sélection et extraction du gène CTR1, à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose:.....	14
4)	Purification de l'ADN, par QIAquick PCR purification kit:	15
5)	Restriction enzymatique des extrémités 5' et 3' du gène CTR1:	15
6)	Préparation des plasmides GBT9 et GAD424:	16
7)	Restriction des plasmides GBT9 et GAD424 :.....	16
8)	Sélection et extraction de GBT9 et de GAD424, à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose :.....	16
9)	Purification des plasmides par QIAquick PCR purification kit:.....	17
10)	Ligature du gène CTR1 avec les plasmides GAD424 et GBT9:.....	17
11)	Transformation des bactéries :.....	17
12)	Transfert des bactéries:.....	18
13)	Extraction des plasmides: (Minipreps de plasmides).....	18
14)	Restriction endonucléase du plasmide, permettant de savoir si les plasmides extraits sont bien recombinés :.....	19
15)	Conservation des bactéries possédant les plasmides recombinés :	19
16)	Préparation des levures (yeast):.....	19
17)	Première transformation des levures (yeast):	19

18)	Deuxième transformation des levures (yeast):	20
19)	Essai qualitatif de la β -galactosidase sur les levures transformées:	21
20)	Préparation du contrôle CTR1 pour le test X-Gal:	22
21)	Ligature du plasmide GAD424 après restriction:	22
V.	Résultats et interprétations	23
A.	Résultats et interprétation de l'électrophorèse du gène CTR1 après amplification par PCR avec la Taq polymérase :	23
1)	Résultats :	23
2)	Interprétation :	23
B.	Résultats et interprétation de l'amplification du gène CTR1 par PCR avec Pwo :	23
1)	Résultats :	23
2)	Interprétation :	24
C.	Résultats et interprétation de la restriction du plasmide GAD424 et GBT9 :	24
1)	Résultats :	24
2)	Interprétation :	24
D.	Résultats et interprétation de la restriction endonucléase du plasmide GBT9 normalement recombiné extrait d'E.coli :	25
1)	Résultats :	25
2)	Interprétation :	25
E.	Résultats et interprétation de la restriction endonucléase du plasmide GAD424 normalement recombiné extrait d'E.coli:	26
1)	Résultats :	26
2)	Interprétation :	26
F.	Résultats et interprétation de la ligature du plasmide GAD424 après restriction :	26
1)	Résultats :	26
2)	Interprétation :	27
VI.	Conclusion	30
	Bibliographie	31
	Liste des annexes :	32
•	Annexe 1 : Présentation du plasmide GAD424	32
•	Annexe 6 : Présentation du primer RL (down)	32
•	Annexe 7 : Electrophorèse	32
	Annexe 1 : Présentation du plasmide GAD424	33

I. Introduction

Ce stage réalisé dans le laboratoire de recherche en biologie moléculaire de l'Université Heriot-Watt à Edinburgh, m'a permis de mettre en pratique mes connaissances acquises lors de mes deux années d'études en IUT, de m'apporter de nouvelles techniques comme le Yeast Two-Hybrid et de découvrir le milieu de la recherche.

Depuis quelques années la protéomique fonctionnelle est l'un des domaines les plus traités en recherche. Ce secteur a de nombreuses perspectives depuis que l'on a observé qu'une cellule humaine possède 30 000 gènes codant pour un million de protéines grâce à l'épissage alternatif. Ce qui laisse autant de possibilités de découvertes. Ce secteur de la protéomique s'intéresse à la relation entre structure et fonction de la protéine, à l'identification de ces partenaires au sein de la cellule et aux interactions entre protéines. De nombreuses techniques sont utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine. Les puces à protéines, la chromatographie d'affinité sont des techniques couramment utilisées, mais la plus privilégiée reste le système double hybride dans la levure : Yeast two-Hybrid. Cette technique a été inventée par les chercheurs Fields et Song en 1989, ce qui a permis de révolutionner la connaissance des interactions intracellulaires entre protéines. Depuis des cartes d'interactions protéine-protéine ce sont créées chez de nombreux organismes. La *Drosophila melanogaster*, organisme modèle étudié en génétique et en biologie moléculaire, ou encore la *Arabidopsis thaliana*, un des systèmes les plus utilisés chez les plantes en font partie. De nombreuses études sur les interactions protéine-protéine sont en cours sur cette plante, dont certaines sont portées sur les cascades de kinases. L'étude présentée ici porte sur l'interaction entre la kinase CTR1 (MAPKKK) et les dix kinases MAPKK de la plante *Arabidopsis thaliana* en utilisant la technique Yeast Two-Hybride.

Le but de l'expérience et le principe du Yeast Two-Hybrid seront présentés dans une première partie. Le matériel et le protocole de l'étude seront décrits dans une seconde. Une troisième portera sur les résultats et interprétations. Pour finir une conclusion en résumera la synthèse et présentera quelques perspectives.

II. Présentation de l'entreprise

A. L'Université Heriot-Watt:

L'université Heriot-Watt se situe à Edinburgh. Elle est la 8^{ème} plus ancienne université de la Grande-Bretagne. Son nom Heriot-Watt commémore 2 personnages importants qui sont : Georges Heriot financier du roi James au 16^{ème} siècle, et James Watt qui est le célèbre inventeur et ingénieur du 18^{ème} siècle qui travailla notamment sur les machines à vapeur (il donna son nom à l'unité de mesure de la puissance : le watt). L'université possède quatre campus : le campus d'Edinburgh, le campus de Galashiels (qui se trouve au plein cœur de la région Scottish Borders), le campus de Dubai (le plus récent : 2006) et le campus d'Orkney (île se trouvant au Nord de l'Ecosse).

Le campus d'Edinburgh est situé dans un cadre idyllique au milieu de la nature. Possédant des parcs, des espaces boisés et un lac, où l'on peut voir des cygnes et des lapins. L'université est très tournée vers l'international, sur les 7000 étudiants qu'elle accueille, un tiers ne vient pas du Royaume-Uni. Le campus est organisé comme une mini ville. En effet elle possède 1600 chambres étudiantes, des cafétérias, des snacks, un restaurant, mais aussi un petit supermarché, un coiffeur, une banque, une librairie, des bars et des édifices religieux. Le campus d'Edinburgh comporte environ huit départements dont le School of Life Science.

B. School of Life Sciences:

Cinquante personnes travaillent en permanence dans ce département. Il y a environ 80 étudiants qui effectuent un postgraduate et à peu près 500 étudiants qui sont en undergraduate.

Dans ce département, on peut étudier de nombreux domaines comme la biologie marine, l'environnement, le brassage et la distillation de la bière et du whisky, la nutrition, la sécurité et la santé, la psychologie appliquée, microbiologie, biochimie, la science du sport et la biologie.

La School of Life Science comporte un important secteur de recherche.

Ce département s'intéresse à six domaines principaux sur lesquels travaillent des équipes de recherche et qui font l'objet des études des étudiants en PhD (doctorat) dont la plupart viennent de l'étranger. Ces domaines sont : biologie (microbiologie, biochimie, biologie moléculaire...), biologie marine et environnement, distillation et brassage, nutrition (sécurité et santé), psychologie appliquée, science du sport

C. Le laboratoire de recherche en biologie moléculaire:

Ce laboratoire se trouve au troisième étage du bâtiment School of Life Science, il est dirigé par le Dr Peter C Morris, chercheur et professeur à l'université Heriot-Watt. Les différentes études se font essentiellement sur l'orge et de l'Arabidopsis. Les différents types d'études portent sur l'enzymologie de la biosynthèse et de la dégradation d'amidon de l'orge, sur la protéomique, ainsi que sur les signaux de transductions. Peter Morris a une équipe actuelle de 3 PhDs, qui sont tous en première année. Elle est composée de Wan Bayani Wan Omar, qui travaille sur l'interaction entre protéines de la plante Arabidopsis, en utilisant la technique Yeast two-hybrid, de Mohammed H. Abass et Salem M. Rajab qui produisent de l'orge transgénique afin qu'elle puisse lutter contre les bactéries et les champignons. L'année prochaine le laboratoire accueillera trois à cinq nouveaux membres.

III. But et Principe de l'expérience

A. Le but de l'étude :

L'objectif est d'étudier la voie des Map Kinase de la plante *Arabidopsis thaliana* qui fait partie de la famille des *Brassicaceae*. Plus précisément, c'est l'interaction entre CTR1 et les différentes MAP Kinase Kinase (=MKK =MAPKK) que l'on analyse. La plupart des études en génétique et en biologie moléculaire se font sur la plante *Arabidopsis thaliana* pour plusieurs raisons : on connaît parfaitement son génome (il a été séquencé), elle est de petite taille donc facile à cultiver en laboratoire, son développement s'effectue rapidement (environ 6 semaines) et les mutations sont faciles à induire.

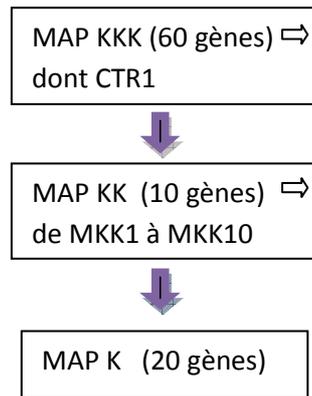


Figure n°1 : représentation de la cascade des Kinases chez *Arabidopsis thaliana*

Cette cascade de kinase (Figure n°1) est une réponse à une stimulation extracellulaire, ce qui active les MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) qui vont activer les MAP Kinase Kinase (MAPKK) par phosphorylation. Par le même moyen MAPKK vont activer les MAP Kinase (MAPK). Cette cascade a pour but d'activer l'expression des gènes codant pour les protéines essentielles répondant au stimulus externe. Cette réponse ne peut s'effectuer sans l'activation des facteurs de transcription de ces gènes. Chez *Arabidopsis thaliana* il y a 60 MAPKKK différentes (dont CTR1), 10 MAPKK différentes (MKK 1 à 10) et 20 MAPK différentes.

La protéine CTR1 a un autre rôle bien précis dans la plante : elle effectue un contrôle négatif sur l'hormone éthylène. Cette hormone joue un rôle sur la croissance et le développement de la plante. Lorsque CTR1 est mutée, elle ne peut plus réguler cette hormone. L'éthylène est en grande quantité dans la plante, ce qui entraîne une mauvaise croissance. La plante est toute petite et verte foncée.

B. Moyen utilisé pour cette étude : Le Yeast Two-Hybrid :

La technique Yeast Two-Hybrid permet d'étudier les interactions protéine-protéine. Elle s'effectue par le biais des levures (eucaryotes).

Le principe est basé sur l'interaction de deux protéines hybrides. Ces protéines ont été hybridées de telle manière que leur interaction amène un changement de phénotype de la levure par l'activation d'un gène cible : ici gène Lac Z, codant pour la β -galactosidase. Dans cette étude le phénotype de la levure peut être donc β -galactosidase + ou -. Ce gène Lac Z est activé lorsque la protéine GAL4 se fixe sur son promoteur qui se nomme UAS_G (= upstream activating sequence for yeast Gal Genes) afin de permettre à l'ARN polymérase de s'y fixer. Cette polymérase peut ainsi se lier à l'opéron du gène pour

le transcrire. Le gène Lac Z a été introduit au génome de la levure (ici la levure HF7C) par l'intermédiaire d'un plasmide. Quant au gène codant pour la protéine GAL4 de la levure, il a été bloqué. Il ne peut plus s'exprimer. Cette protéine possède deux domaines : Activation Domain (AD) qui fixe l'ARN polymérase et le Binding Domain (BD) qui se lie au promoteur UAS_G. Pour le besoin de l'expérience le gène codant pour GAL4 a été divisé en deux. La première fraction code pour AD et la seconde code pour BD. La partie du gène codant pour AD se retrouve dans le plasmide GAD424 (cf : Annexe 1) et celle codant pour BD est intégrée au plasmide GBT9 (cf : Annexe 2).

Les gènes codant pour les protéines que l'on étudie dans cette expérience, CTR1 et MKK 1 à 10, sont introduits dans ces plasmides GAD424 et GBT9. Les séquences nucléiques codant pour les protéines étudiées s'insèrent à la fin de la séquence codant pour AD (GAD424) et à la fin du gène codant pour BD (GBT9), afin d'obtenir une fois le plasmide transcrit et traduit dans la levure des protéines hybrides :

- Gène CTR1 inséré dans GAD424 → protéine hybride : AD+CTR1
- Gène CTR1 inséré dans GBT9 → protéine hybride : BD+CTR1
- Gène MKK inséré dans GAD424 → protéine hybride : AD+MKK
- Gène MKK inséré dans GBT9 → protéine hybride : BD+MKK

Ces plasmides une fois recombinés sont introduits dans la bactérie *Escherichia coli* afin qu'ils se multiplient. Après leurs extractions, on les incorpore dans les levures afin de savoir si les protéines cibles interagissent.

La protéine rattachée à BD peut-être appelée bait, ce qui signifie appât en français. La protéine rattachée à AD est appelée prey, ce qui signifie proie en français.

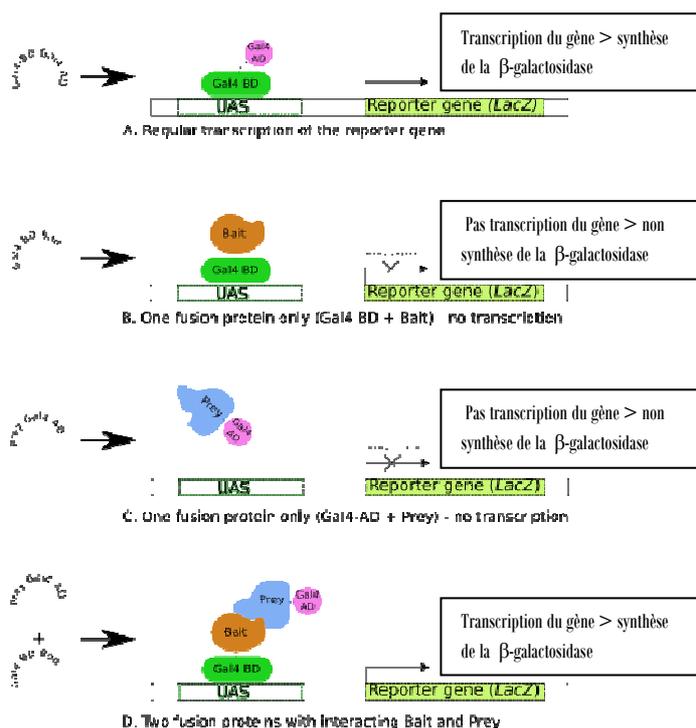


Figure n°2 : représentant la technique Yeast two-hybrid (1)

Ce schéma explique la technique Yeast two-hybrid, ainsi que les divers cas qui peuvent se produire pendant l'expérience.

Lorsque la protéine GAL4 se fixe sur le promoteur (UAS_G) du gène Lac Z, il y a expression de ce dernier et donc synthèse de la β-galactosidase (cas A de la figure n°2). Lorsque la protéine hybride BD+bait se fixe, il n'y a pas transcription du gène, car l'Activation Domain étant absent l'ARN polymérase ne peut pas s'y fixer. Le gène n'est donc pas transcrit (cas B de la figure n°2). De même lorsqu'AD+prey est la seule présente, l'ARN polymérase ne peut pas s'y fixer (cas C de la figure n°2).

Il se passe le même phénomène lorsque BD+bait se fixe sur le promoteur et que la protéine AD+prey est présente mais que la protéine "prey" et "bait" n'interagissent pas. L'ARN polymérase ne peut donc pas se fixer à AD et activer le gène Lac Z. Dans le cas contraire, quand BD+bait se fixe sur le promoteur et se lie à AD+prey, il y a transcription du gène, car la polymérase peut se fixer. Les deux protéines bait et prey ont donc interagi (cas D de la figure n°2).

Pour savoir si la β -galactosidase s'est synthétisée, on met en présence des levures du X-gal, substrat de cette enzyme. X-gal qui est hydrolysé par la β -galactosidase. Suite à cette réaction on obtient du galactose et un produit bleu. Si les colonies deviennent bleues il y a présence de la β -galactosidase. Dans le cas contraire cela signifie qu'elle est absente.

Dans notre étude deux orientations sont analysées :

1^{ère} orientation : GAD424 portant le gène CTR1 + GBT9 portant un gène MKK

2^{ème} orientation : GAD424 portant un gène MKK + GBT9 portant le gène CTR1

On effectue l'essai dans ces deux orientations possibles car il peut avoir des faux négatifs. En effet dans certains cas le site d'interaction de la protéine étudiée peut être obstrué par le domaine de la GAL4 suivant si elle est hybridée à l'Activation Domain ou au Binding Domain de cette protéine. De même la protéine étudiée peut gêner à son tour le site de fixation à l'ADN du domaine BD de GAL4 ou le site de fixation à l'ARN polymérase du domaine AD.

IV. Matériels et Méthodes

A. Matériels biologiques

1) Système biologique : la levure HF7C

Cette souche HF7C que l'on utilise dans cette expérience, appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. La levure s'adapte bien à notre étude, car elle est un eucaryote tout comme la plante *Arabidopsis thaliana* dont on va insérer une petite partie de son génome dans HF7C. L'avantage de ce micro-organisme contrairement aux bactéries est qu'il possède un même matériel cellulaire très semblable aux eucaryotes supérieurs. L'épissage de l'ARNm peut donc s'effectuer ainsi que les modifications post traductionnel. Les résultats obtenus sont donc très proche de ce qui se déroule chez la plante *Arabidopsis thaliana*. De plus l'insertion de vecteur dans la levure se fait aussi facilement que chez la bactérie. L'intérêt des levures est que le temps de génération est court. Elles sont maintenues à l'état haploïde, ce qui permet de faciliter l'interprétation des résultats.

La souche HF7C a été spécialement modifiée pour l'étude double hybride. On lui a inséré dans son génome le gène Lac Z codant pour la β -galactosidase. Le gène codant pour la protéine GAL4 a été bloqué. Pour finir la souche a été transformée afin qu'elle devienne auxotrophique pour la leucine et le tryptophane. Ceci permet de pouvoir sélectionner les levures transformées par les vecteurs qui possèdent le gène codant pour la leucine ou pour le tryptophane.

2) Système biologique : *Escherichia coli*

Dans cette étude on transforme la souche XL1-blue qui fait partie de l'espèce *Escherichia coli* par les vecteurs GAD424 ou GBT9, afin d'amplifier les plasmides pour les introduire dans les levures HF7C. Cette souche est utilisée car elle comporte de nombreux avantages : elle réplique rapidement les vecteurs qu'on lui a insérés, elle a une croissance rapide dans un milieu peu coûteux, elle est non pathogène, l'extraction de l'ADN est très facile et il reste stable lors de la culture. Cette souche possède le caractère tétracycline +. XL1-blue a été rendue compétente (cf : Annexe 3) car *E.coli* n'est pas naturellement transformable.

3) Outils biologiques : les plasmides

Pour cette étude deux plasmides différents sont utilisés : GAD424 (cf : Annexe 1) et GBT9 (cf : Annexe 2). Ils possèdent des caractères communs et différents de manière à ce que l'on puisse différencier les colonies transformées et non transformées, ainsi que de savoir par quel plasmide elles ont été transformées. Ils possèdent un caractère commun Amp⁺, mais aussi des caractères différents comme Leu⁺ et Trp⁺. Ces plasmides sont un outil indispensable pour cette expérience.

B. Protocoles et matériels

1) Conditions générales lors des manipulations :

Dans toutes les manipulations qui vont suivre, le port des gants est obligatoire. On utilise toujours des tubes Eppendorf autoclavés, de l'eau distillée autoclavée, ainsi que des embouts à pipettes autoclavés. On autoclave ce matériel à 121°C pendant 15 minutes.

Entre chaque manipulation conserver l'ADN dans la glace ou au congélateur à -21°C.

2) Amplification par Polymerase Chain Reaction du gène CTR1 (PCR)

a. Hot Start PCR avec la Taq polymérase :

Principe :

On réalise d'abord une première PCR (cf : Annexe 4) avec la Taq polymérase pour vérifier que nos primers, nos solutions (dNTP, buffer...), nos différentes températures sont correctes. On utilise comme enzyme la Taq polymérase, car elle n'est pas chère, mais n'est pas très fiable. Elle peut faire des erreurs en polymérisant.

On qualifie cette PCR comme une Hot Start PCR, car on ajoute un des réactifs ici l'enzyme, non pas à température ambiante mais à une température élevée, ici 94°C. Ceci permet d'augmenter la stringence, ce qui induit une hybridation plus spécifique.

Préparation de l'échantillon :

On prépare notre échantillon dans un tube Eppendorf spécial PCR de volume de 200 µL stérile.

Pour ajouter toutes les solutions nous avons utilisé des embouts stériles dotés d'un filtre.

Mélange réactionnel : volume total = 50 µL

33 µL de H₂O, 5 µL de buffer 10X (avec MgCl₂), 8 µL de solution de dNTP déjà mélangés à 1,25 mM, 1 µL de primer FL (up) (cf : Annexe 5), 1 µL de primer RL (down) (cf : Annexe 6), 1 µL de plasmide possédant le gène CTR1, 1 µL Taq DNA polymérase.

On ajoute l'enzyme lorsque notre solution est placée dans le thermocycleur et que la température a atteint 94°C.

PCR, afin d'éliminer tout composant de notre mélange réactionnel (primer, dNTP...) que l'on ne souhaite pas.

Protocole :

Voir le protocole électrophorèse (cf : Annexe 7) pour la préparation du gel.

Mélange réactionnel : volume total = 60 μ L

45 μ L de la solution obtenue par PCR + 10 μ L de solution de charge 6X + 5 μ L d'eau distillée.

Vortexer, effectuer un pulse. Déposer dans le premier puits 1 μ L de marqueur de taille lambda DNA/HindIII. Dans les trois suivants déposer 20 μ L de la solution préparée.

Faire migrer à 100 volts pendant 15 min.

Une fois les solutions migrées, déposer le gel sur le détecteur à UV. Positionner le bouton sur 70% d'UV, car les UV dénaturent l'ADN. Tout en laissant le couvercle abaissé, découper les bandes de 2400 kb de chaque piste à l'aide d'un scalpel. Déposer les morceaux de gel dans des tubes Eppendorf.

4) Purification de l'ADN, par QIAquick PCR purification kit:

Principe :

Extraire l'ADN cible de notre gel d'agarose.

Protocole :

Peser chaque gel présent dans un tube Eppendorf en faisant la tare avec un tube vide. Ajouter ensuite dans chaque tube Eppendorf 3 volumes de Buffer QG pour 1 volume de gel (100 mg de gel > 300 μ L de Buffer QG). Incuber dans un bain-marie à 50°C jusqu'à ce que le gel soit dissout (environ 10 min). Pendant l'incubation, vortexer les tubes toutes les 2-3 min. Ajouter 1 volume d'isopropanol pour un volume de gel (100 mg de gel > 100 μ L d'isopropanol). Vortexer.

Dans un QIAquick spin column, ajouter 800 μ L de notre solution. Centrifuger pendant 1min à 13000 rpm. Jeter le surnageant. Recommencer dans le même column, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de solution. Ajouter 750 μ L de solution PE dans le QIAquick spin column, pour le nettoyer. Centrifuger pendant 1 min, jeter le surnageant. Centrifuger de nouveau pendant 1 min à 13000 rpm. Oter le spin column du collecteur tube. Le déposer dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Couper le couvercle du tube. Ajouter 50 μ L de buffer EB. Attendre 2 min et centrifuger pendant 2 min à 13000 rpm. Garder le surnageant, enlever le spin column.

Vérifier notre ADN en effectuant une électrophorèse (cf : Annexe 7)

Rôle des différentes solutions utilisées : cf Annexe 8

5) Restriction enzymatique des extrémités 5' et 3' du gène CTR1:

Principe :

Effectuer une restriction des extrémités de notre gène par deux enzymes différents (un pour chaque extrémité), afin que le gène puisse ensuite se ligaturer avec notre vecteur. Les enzymes sont SalI et EcoRI.

Protocole :

Dans un tube à essais effectuer le mélange réactionnel suivant :

Volume total = 60 μ L

45 μ L d'ADN, 6 μ L de buffer O (orange) 10X, 2,25 μ L de SalI, 2,25 μ L d'EcoRI, et 4,5 μ L d'H₂O.

Incuber pendant 1h à 2h à 37°C.

6) Préparation des plasmides GBT9 et GAD424:

Principe :

Couper les plasmides GBT9 (cf : Annexe 2) et GAD424 (cf : Annexe 1) par les enzymes EcoRI et Sall, afin qu'ils puissent se ligaturer par la suite au gène CTR1.

7) Restriction des plasmides GBT9 et GAD424 :

On veut couper 5 µg de chaque plasmide par les endonucléases EcoRI et Sall.

Calcul du volume à préparer :

○ GAD424 :

La concentration de la solution en plasmide GAD424 est de 0,68 µg/µL.

Le volume à prélever = masse souhaitée / concentration = 5 µg/0,68 µg/µL = 7,4 µL

On prélève 7,4 µL de solution plasmide GAD424, que l'on va ensuite couper.

○ GBT9 :

La concentration de la solution en plasmide GBT9 est de 0,85 µg/µL.

Le volume à prélever = masse souhaitée / concentration = 5 µg/0,85 µg/µL = 5,9 µL

On prélève 5,9 µL de solution plasmide GBT9, que l'on va ensuite couper.

Mélange réactionnel :

○ Pour GAD424 : volume final = 20 µL

7,4 µL de solution plasmide GAD424, 2,5 µL d'EcoRI, 2,5 µL de Sall, 2 µL de Buffer O (orange) 10X et 5,6 µL d'H₂O.

○ Pour GBT9 : volume final = 20 µL

5,9 µL de solution plasmide GBT9, 2,5 µL d'EcoRI, 2,5 µL de Sall, 2 µL de Buffer O (orange) 10X et 7,1 µL d'H₂O.

On laisse incuber à 37°C pendant 1h.

Effectuer une électrophorèse (cf : Annexe 7) à partir de 1 µL de la solution, pour vérifier que le plasmide a bien été coupé.

Mélange réactionnel de l'échantillon : volume final = 6 µL

1 µL de solution en plasmide, 1 µL de solution de charge 6X et 4 µL d'H₂O.

Si c'est bon, incuber la solution à 65°C pendant 20 min, afin de désactiver les enzymes, sinon continuer la restriction.

8) Sélection et extraction de GBT9 et de GAD424, à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose :

Principe :

On fait migrer toute notre solution. On extrait ensuite la bande d'intérêt (environ 6kb) .

Protocole :

Voir le protocole électrophorèse (cf : Annexe 7) pour la préparation du gel.

Mélange réactionnel : volume final = 25 µL

19 µL de solution + 4 µL de solution de charge 6X + 2 µL d'H₂O.

Vortexer, effectuer un pulse.

Déposer dans le premier puits 1 µL de marqueur de taille lambda DNA/ HindIII. Dans les deux suivants déposer 12,5 µL de notre solution.

Suivre ensuite le protocole vu précédemment : *Sélection et extraction du gène CTR1, à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose* (page 15).

9) Purification des plasmides par QIAquick PCR purification kit:

Principe :

Extraire l'ADN cible de notre gel d'agarose.

Protocole : Suivre le protocole vu précédemment : *Purification de l'ADN par QIAquick PCR purification kit* (page 16).

10) Ligature du gène CTR1 avec les plasmides GAD424 et GBT9:

Principe :

Ligature du gène codant pour CTR1 aux plasmides GBT9 (cf : Annexe 2) et GAD424 (cf : Annexe 1), grâce à l'enzyme T4 ligase.

Protocole :

A partir de notre solution du gène CTR1 préparée et de nos deux solutions de plasmides, correspondant respectivement aux plasmides GAD424 et aux plasmides GBT9 (elles aussi préalablement préparées), on effectue deux mélanges réactionnels. Un avec le gène CTR1 et le plasmide GAD424, et un deuxième avec le gène CTR1 et le plasmide GBT9.

La concentration en gène CTR1 doit être 3 fois plus importante que celle en plasmides.

Ex : Dans notre cas :

On a déterminé les concentrations en vecteur et en insert à partir de l'électrophorèse (cf : Annexe 7) et du marqueur de taille (cf : Annexe 14)

Concentration vecteur : 31,25ng/μL

Concentration insert : 10ng/μL

	Vecteur	Insert
Ratio :	1	3
Longueur fragment x ratio :	6 (ng)	3x2,4 = 7,2 (ng)
	ou 60 ng	72 ng
	ou 120 ng	144 ng
Calcul volume pour mélange réactionnel :	120/31,25= 3,8 μL	144/10= 14,4μL

Mélange réactionnel : volume final = 40 μL

14,4 μL d'insert, 3,8 μL de vecteur, 18,2 μL de buffer 2X pour ligature (le volume en Buffer doit être égal à la somme des volumes en plasmide et en vecteur), 0,5 μL de T4 ligase, 3,1 μL d'H₂O.

Faire ceci pour les 2 types de vecteurs. Laisser 1h à 1h30 à température ambiante.

11) Transformation des bactéries :

Principe :

Insérer notre plasmide recombiné à l'intérieur de bactéries Ampicilline – ; ces bactéries ne résistent pas à l'antibiotique Ampicilline. Nos plasmides sont Ampicilline +, c'est-à-dire qu'ils possèdent le gène de résistance à l'Ampicilline.

On utilise ce caractère pour savoir si nos vecteurs sont bien rentrés à l'intérieur des bactéries. Pour cela on ensemence nos bactéries sur un milieu avec ampicilline.

Protocole :

Chauffer au four micro-onde la bouteille contenant 80 mL du milieu LB avec agar préalablement préparé (cf : Annexe 9), jusqu'à ce qu'il soit liquide. Attendre que le milieu se refroidisse, et ajouter 80 µL d'ampicilline (1 µL d'ampicilline pour 1mL de milieu). Couler le milieu dans 4 boîtes de Pétri. Prendre 4 tubes de competent cells de volume 200 µL (cf : Annexe 3) conservés à 70°C. Mettre toute la solution de plasmide GAD424 portant l'insert (gène CTR1) dans un tube de competent cells. Verser toute la solution de plasmide GBT9 portant le gène CTR1 dans un second tube de competent cells. Dans les deux autres tubes competences cell, appelés contrôles, mettre 1,5 µL de plasmides préalablement préparés (qui ont subi une restriction). Dans un, mettre la solution en plasmide GBT9, dans un second mettre la solution en plasmide GAD424. Vortexer les 4 tubes, et les poser dans la glace pendant 20 min.

On effectue un choc thermique, afin que le vecteur rentre dans la bactérie, en mettant nos 4 tubes au bain marie à 42°C pendant 2 min. Poser les tubes dans la glace pendant 5 min. Ajouter 750 µL de milieu LB (milieu de croissance liquide) (cf : Annexe 9) dans chaque tube. Incuber pendant 30 min à 37°C.

Centrifuger pendant 1 min à 5000 rpm. Jeter le surnageant. Resuspendre le culot en ajoutant 100 µL d'H₂O et vortexer. Ensemencer les milieux LB avec ampicilline dans conditions stériles (près d'un bec Bunsen) préalablement coulé, par inondation à l'aide d'un râteau stérile. Incuber les milieux pendant 24h à 37°C.

12) Transfert des bactéries:

Principe : Reprendre les colonies présentes sur le milieu LB+Amp après une nuit d'incubation, dans un milieu liquide d'enrichissement LB+Amp.

Protocole :

Vérifier qu'il n'y ait aucune ou peu de colonies sur les deux milieux contrôles.

Préparer autant de tubes que de colonies présentes sur les deux milieux où l'on a ensemencé les bactéries transformées (s'il y a plus de 24 colonies sur un milieu, préparer seulement 24 tubes).

Dans chaque tube mettre 2 mL de milieu LB liquide (cf : Annexe 9) et 2 µL d'ampicilline, vortexer.

Récupérer chaque colonie à l'aide d'un embout. Plonger l'embout dans un tube. Secouer. Incuber les tubes toute une nuit à 37°C sur un shaker.

13) Extraction des plasmides: (Minipreps de plasmides)

Principe :

Extraire les plasmides recombinés des bactéries, en effectuant une succession de précipitations et de centrifugations.

Protocole :

Vortexer nos solutions que l'on a laissé incuber toute la nuit et prélever 1,5 mL que l'on met dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Centrifuger pendant 1 min à 13000 rpm. Jeter le surnageant. Resuspendre le culot dans 100 µL de solution GTE avec RNase (cf : Annexe 10) (RNase afin d'éliminer l'ARN), vortexer. Ajouter 200 µL de solution NaOH/SDS (cf : Annexe 10), mixer en tapant le tube avec les doigts. Ajouter 150 µL de solution d'acétate de potassium (cf : Annexe 10), placer le tube dans la glace pendant 5min. Il y a formation d'un précipité, NaOH/SDS et acétate de potassium précipitent les protéines et l'ADN chromosomique. Centrifuger pendant 1 min à 13000 rpm. Transférer 400 µL du surnageant dans un nouveau tube Eppendorf. Ajouter dans chaque tube 800 µL d'éthanol à 95% (permet de concentrer l'ADN plasmidique). Mixer et laisser reposer pendant 2 min à la température

ambiante du laboratoire. Centrifuger pendant 1 min à 13000 rpm, jeter le surnageant. Sécher le culot à 70°C pendant 5 à 10 min. Resuspendre le culot dans 30 µL de TE buffer (cf : Annexe 10). Vortexer.

14) Restriction endonucléase du plasmide, permettant de savoir si les plasmides extraits sont bien recombinés :

Principe :

Faire subir aux plasmides extraits une restriction avec les enzymes EcoRI et SalI afin de savoir après migration s'ils comportent bien l'insert.

Protocole :

Pour chaque solution de plasmide provenant de colonies différentes effectuer ce mélange réactionnel : 5 µL de solution, 1 µL de buffer O (10X), 1 µL d'enzyme EcoRI, 1 µL d'enzyme SalI et 2 µL d'H₂O. Incuber 1h à 37°C. Effectuer une électrophorèse (cf : Annexe 7).

Si les plasmides extraits sont bien recombinés, conserver la solution de plasmides extraits à -21°C. Sinon recommencer une nouvelle ligation, puis transformation.

15) Conservation des bactéries possédant les plasmides recombinés :

Protocole :

A partir du restant des solutions qui ont été incubées toute la nuit, ajouter 2 mL de solution LB+Amp (cf : Annexe 9). Incuber les tubes toute une nuit sur un shaker à 37°C.

Vortexer les solutions après incubations. Distribuer dans un tube Eppendorf 900 µL de notre solution et 900 µL de glycérol. Conserver les tubes à -70°C.

16) Préparation des levures (yeast):

Principe :

On prépare les levures HF7C congelées à -70°C à subir les transformations à venir, en les ensemençant sur des milieux d'enrichissements spécifiques aux levures.

Protocole :

A partir des levures HF7C conservées dans le milieu YPD à -70°C on ensemence le milieu YPD (cf : Annexe 11) à l'aide d'une öse, dans des conditions stériles (près d'un bec Bunsen). On laisse incuber à 30°C pendant 2 à 3 jours.

Préparer 1 flacon comprenant 10 mL de milieu liquide YPD (cf : Annexe 11). On l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

A partir de notre gélose qui a incubé, prendre une colonie à l'aide d'un embout à pipette et l'inoculer dans le milieu liquide YPD. Vortexer. Incuber le à 30°C pendant 24h sur un shaker.

17) Première transformation des levures (yeast):

Principe :

On insère à une partie des levures les plasmides GAD424 (cf : Annexe 1) recombinés par le gène codant pour la protéine MKK (1 à 10) et possédant le gène AD, codant pour l'Activation Domain de la protéine Gal4. Il y a dix plasmides GAD424 différents. C'est dix plasmides portent chacun un gène MKK différent (1 à 10). A l'autre partie des levures, on insère les plasmides GBT9 (cf : Annexe 2) recombinés par le gène codant pour la protéine MKK (1 à 10) et possédant le gène BD, codant pour le Binding Domain de la protéine Gal4. Il y a dix plasmides GBT9 différents. Chacun portant un gène

MKK différent (1 à 10). Les plasmides GBT9 et GAD424 portant le gène codant pour un MKK ont été préparé suivant le même protocole que précédemment par Bayani, étudiante en PhD.

Protocole :

Répartir les 10 mL du milieu liquide YPD qui a incubé dans 20 tubes Eppendorf (0,5 mL de milieu dans chaque tube). Centrifuger les tubes à 13000 rpm pendant 3 minutes et jeter le surnageant.

Dans chaque tube ajouter 10 μ L de ssDNA à 10 μ g/ μ L. SsDNA est de l'ADN de sperme de saumon. C'est un carrier, il permet à l'ADN d'entrer dans la cellule. SsDNA agit en augmentant la concentration en ADN à la surface de la membrane de la cellule, ce qui aide l'ADN (ici plasmide) à entrer.

Dans 10 tubes on ajoute 2 μ L de plasmide GBT9 portant le gène MKK. Un tube pour chaque MKK. Il y a 10 gènes codant pour des MKK différents (MKK1 à 10). Et dans les 10 autres tubes on ajoute 2 μ L de plasmide GAD424 portant le gène MKK. Un tube pour chaque MKK (1 à 10). Vortexer. Ajouter dans les 20 tubes 0,5 mL de Plate solution (cf : Annexe 12).

Laisser incubé 24h à température ambiante.

Centrifuger les 20 tubes Eppendorf qui ont incubé à 13000 rpm pendant 3 min. Jeter le surnageant et ajouter dans chaque tube 100 μ L d' H_2O . Vortexer.

Ensemencer tout le contenu de chaque tube sur un milieu SC (cf : Annexe 13) sans leucine pour les levures transformées par GAD424 et sans tryptophane pour les levures transformées par GBT9, à l'aide d'un râtelier dans des conditions stériles (près d'un bec Bunsen).

Laisser incubé à 30°C pendant 2 à 4 jours.

Préparer un milieu SC sans leucine et un autre sans tryptophane. Celui sans leucine est pour les levures transformées par les plasmides GAD424 portant le gène MKK (1 à 10). Le second sans tryptophane est pour les levures transformées par les plasmides GBT9 portant le gène MKK (1 à 10).

Tracer à l'aide d'un marqueur 10 lignes de 3 traits horizontaux au dos des deux boîtes de Pétri. Sur ce milieu SC sans Leu préparé pour les colonies transformées par GAD424, transférer 3 colonies transformées par GAD424+MKK1 provenant du milieu SC sans Leu sur trois traits tracés (1 colonie sur chaque trait), étaler la colonie à l'aide de l'embout. Faire de même avec les colonies transformées par GAD424 +MKK allant de 2 à 10. Sur l'autre milieu SC sans Trp, effectuer la même chose à partir des colonies transformées par GBT9+MKK1 à MKK10, obtenues sur les milieux SC sans Trp.

Incuber les deux boîtes de Pétri à 30°C pendant 2 à 4 jours.

18) Deuxième transformation des levures (yeast):

Principe :

On insère aux levures transformées par le plasmide GAD424 (cf : Annexe 1), le plasmide GBT9 (cf : Annexe 2) recombiné par le gène codant pour la protéine CTR1 et possédant le gène BD, codant pour le Binding Domain de la protéine Gal4. De même pour les levures transformées par le plasmide GBT9, on insère le plasmide GAD424 recombiné par le gène codant pour la protéine CTR1 et possédant le gène AD, codant pour l'Activation Domain de la protéine Gal4.

Protocole :

Préparer 10 flacons de 5 mL de milieu SC liquide (cf : Annexe 13) sans Trp, et 10 autres flacons de même volume de milieu SC liquide sans Leu.

Prélever un étalement sur chaque ligne du milieu SC sans Leu qui a incubé (10 lignes donc 10 prélèvements). Chaque prélèvement correspond à des colonies de levures transformées par GAD424 portant un gène MKK différent (MKK1 à 10).

Ce prélèvement s'effectue à l'aide d'un embout à pipette stérile. Plonger les 10 embouts dans 10 flacons contenant le milieu SC sans Leu (un flacon pour chaque MKK). Agiter l'embout afin que les levures se détachent dans le milieu. Retirer l'embout du flacon. Vortexer.

Effectuer la même opération à partir du milieu SC sans Trp qui a incubé. Chaque prélèvement correspond à des colonies de levures transformées par GBT9 portant un gène MKK différent (MKK1 à 10). Mais cette fois-ci, plonger les 10 embouts dans 10 flacons contenant le milieu SC sans Trp (un flacon pour chaque MKK). Vortexer.

Incuber les 20 flacons à 30°C sur un shaker pendant 24h.

Vortexer les 20 flacons qui ont incubés. Pipeter 0,5 mL d'un flacon et verser les dans un tube Eppendorf. Faire de même avec les 19 autres flacons. Centrifuger les tubes à 13000 rpm pendant 3 minutes. Enlever le surnageant. Ajouter dans chaque tube Eppendorf 10 µL de ssDNA à 10 µg/µL.

Dans les 10 tubes Eppendorf contenant les levures transformées par le plasmide GAD424 ajouter 2 µL de plasmide GBT9 portant le gène CTR1 et dans les 10 tubes comprenant les levures transformées par le plasmide GBT9 ajouter 2 µL de plasmide GAD424 portant le gène CTR1. Vortexer les. Ajouter 0,5 mL de Plate solution (cf : Annexe 12) dans chaque tube.

Incuber les tubes à température ambiante pendant 24h.

Centrifuger ces tubes qui ont incubé à 13000 rpm pendant 3 min. Jeter le surnageant, ajouter 100 µL d'H₂O, vortexer. On ensemence le contenu de ces 20 tubes sur 20 milieux SC sans Trp et Leu à l'aide d'un râteau, dans des conditions stériles (près d'un bec Bunsen).

Incuber les boîtes de Pétri à 30°C pendant 2 à 4 jours.

Préparer deux milieux SC sans Leu et Trp, que l'on coule dans deux boîtes de Pétri.

Tracer à l'aide d'un marqueur 10 lignes de 3 traits horizontaux au dos des deux boîtes de Pétri (une ligne pour chaque type de colonie). Sur un des milieux SC, transférer 3 colonies de chaque boîte de Pétri qui ont incubé, transformées par les plasmides GAD424 portant le gène MKK (1 à 10) et par GBT9 portant le gène CTR1.

Faire de même sur l'autre boîte en transférant 3 colonies de chaque boîte de Pétri qui ont incubé, transformées par les plasmides GBT9 portant le gène MKK (1 à 10) et par le plasmide GAD424 portant le gène CTR1. Ajouter sur les deux milieux un témoin négatif qui est une colonie HF7C transformée par GBT9 et GAD424, que l'on ensemence sur une 11^{ème} ligne. De même, additionner sur une 12^{ème} ligne un témoin positif qui est une colonie HF7C transformée par GBT9 portant le gène NF-Y et GAD424 portant le gène SP1. Le gène NF-Y code pour la protéine NF-Y qui est un facteur de transcription présent chez les mammifères de même pour SP1. Ces protéines interagissent ensemble, donc si notre manipulation est correcte la colonie deviendra bleue.

19) Essai qualitatif de la β-galactosidase sur les levures transformées:

Principe :

Ce test permet de savoir s'il y a interaction entre la protéine CTR1 et les protéines MKK 1 à 10. Cette interaction est directement liée à la présence de β-galactosidase, qui est synthétisée par le gène Lac Z. On peut savoir s'il y a présence de la β-Galactosidase à l'intérieur des levures transformées, en mettant en présence le substrat de la β-galactosidase : le X-gal. Ce dernier par hydrolyse enzymatique devient bleu.

Protocole :

Couler deux milieux SC (cf : Annexe 13) sans Trp et Leu.

Poser sur chacun des deux milieux qui ont incubé un papier filtre autoclavé de même diamètre que la boîte de Pétri. A l'aide d'un bloc en plastique de diamètre légèrement en dessous de la boîte de Pétri,

presser le papier filtre contre la gélose afin de récupérer les colonies. Faire ceci pour les deux géloses. Déposer chaque papier filtre sur un milieu SC que l'on vient de préparer, de manière à ce que les colonies soient du côté extérieur. Enlever les bulles d'air. Incuber les deux boîtes à 30°C pendant 2 jours.

Prendre deux boîtes de Pétri. Dans chacune ajouter 2,5 mL de Z-Buffer, 8 µL de mercaptoéthanol à 14 M (sous la hotte) et 50 µL de X-gal à 2% (0,02g de X-gal dissout dans 1 mL de DMF= Diméthylformamide) avec 2% de X-gal. Faire un huit avec les boîtes. Conserver la solution en X-gal à l'abri de la lumière car elle le dénature.

Le Z-Buffer améliore l'activité de la β-Gal, tandis que le β-mercaptoéthanol permet au Z buffer de ne pas s'oxyder (car GAL4 agit mieux dans un milieu réducteur). DMF permet de bien conserver X-gal. A l'aide de pinces stériles déposer un par un à l'intérieur de chaque boîte, deux papiers filtre de même diamètre que la boîte de Pétri.

Déposer le papier filtre possédant les colonies dans de l'azote liquide (-196°C) pendant trois fois 1 minute. Faire de même pour le deuxième. Cette étape permet de casser les membranes des levures, afin de libérer la β-galactosidase si elle est présente, afin qu'elle soit plus vite en contact avec le X-gal. Déposer les papiers filtre avec les colonies au dessus des papiers filtre, imbibés des différentes solutions dont X-gal. Chasser les bulles d'air. Incuber les deux boîtes à 30°C pendant 2 h minimum. Vérifier toutes les 1/2h. Au bout de 30 minutes le témoin positif doit devenir bleu, ce qui correspond à l'hydrolyse du X-gal.

20) Préparation du contrôle CTR1 pour le test X-Gal:

Principe :

Le but de ce test est de savoir si la protéine CTR1 active à elle seule le gène Lac Z. Pour cela on effectue les mêmes transformations des levures mais avec un plasmide qui diffère.

Protocole :

On effectue exactement les mêmes protocoles : *préparation des levures* (page 20), *première transformation des levures (yeast)* (page 20), *deuxième transformation des levures (yeast)* (page 21) et *essai qualitatif de la β-galactosidase sur les levures transformées* (page 22). Cependant lors de la première transformation on transforme la levure par le plasmide GAD424 sans le gène MKK ou par GBT9 sans le gène MKK.

21) Ligature du plasmide GAD424 après restriction:

Principe :

La transformation du plasmide GAD424 (cf : Annexe 1) avec le gène CTR1 ne fonctionne pas, on obtient que des colonies possédant le plasmide sans l'insert. Le but de ce test est de savoir si le plasmide GAD424 peut être recombiné par le gène CTR1, c'est-à-dire si le plasmide est bien coupé à ses extrémités.

Protocole :

Mélange réactionnel : volume final = 10 µL

2 µL de solution en plasmide GAD424 après restriction, 0,5 µL d'enzyme T4 ligase, 1 µL de buffer 10X et 6,5 µL d'H₂O.

Laisser incuber pendant 1h à température ambiante.

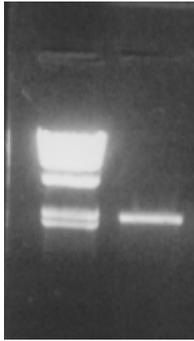
Effectuer une électrophorèse pour vérifier (cf : Annexe 7).

V. Résultats et interprétations

Pour tous les résultats d'électrophorèse : cf Annexe 14 (annexe marqueur de taille).

A. Résultats et interprétation de l'électrophorèse du gène CTR1 après amplification par PCR avec la Taq polymérase :

1) Résultats :



Piste n°1 : Il s'agit de la piste du marqueur de taille λ DNA/HindIII. On observe de nombreuses bandes qui s'étendent de 1,4 cm à 4,8 cm. Les bandes sont de différentes tailles (cf : Annexe 14).

Piste n°2 : C'est la piste où l'on a fait migrer 5 μ L de la solution après la PCR du gène CTR1. Une bande de forte intensité située à 2,6 cm est présente. Ce fragment d'ADN observé mesure dans les environs de 2,3 à 2,4 kb.

Figure n° 3: Photo électrophorèse du gène CTR1 après amplification par PCR avec la Taq

2) Interprétation :

La bande observée sur la piste 2 correspond à un fragment de taille de 2,3 à 2,4 kb, ce qui correspond à la taille du gène CTR1 qui est de 2,4 kb. Le gène CTR1 a bien été amplifié, on peut donc effectuer l'amplification de ce gène avec l'enzyme Pwo.

B. Résultats et interprétation de l'amplification du gène CTR1 par PCR avec Pwo :

1) Résultats :



Piste n°1 : C'est la piste du marqueur de taille λ DNA/HindIII. Elle comporte des bandes qui s'étendent de 0,5 cm à 1,8 cm. Les bandes sont toutes de tailles différentes (cf : Annexe 14).

Piste n°2 : Il s'agit de la piste à laquelle on a fait migrer 5 μ L de solution après la PCR du gène CTR1. On observe une bande d'intensité normale à 0,9 cm, mesurant dans les 2,4 kb.

Piste n°3 : idem que la piste n°2

Figure n° 4: Photo électrophorèse du gène CTR1 après amplification par PCR avec Pwo

2) Interprétation :

La bande observée sur la piste 2 qui est identique à celle de la piste 3, mesurent dans les environs des 2,4 kb, ce qui correspond à la taille du gène CTR1. L'amplification du gène CTR1 par Pwo a donc fonctionné. On travaillera donc à partir de cette solution. On peut passer à la purification de ce gène. NB : Le résultat observé lors de l'électrophorèse après la purification du gène CTR1 sera le même que dans ce cas. Il est possible que la bande soit de plus faible intensité car la purification peut causer une perte d'ADN.

C. Résultats et interprétation de la restriction du plasmide GAD424 et GBT9 :

1) Résultats :



Piste n°1 : Il s'agit de la piste du marqueur de taille λ DNA/Hind III. On observe des bandes qui s'étendent de 0,5 cm à 2 cm. Ces bandes sont toutes de tailles diverses (cf : Annexe 14).

Piste n°2 : Il s'agit de la piste où l'on a fait migrer le plasmide GAD424 après restriction. On observe une bande épaisse et pas claire à 0,5 cm du puits. On ne peut pas déterminer sa taille car la bande est trop épaisse

Piste n°3 : Sur cette piste à migrer le plasmide GBT9 après avoir subi une restriction. Comme sur la piste n°2 on observe une bande épaisse et pas claire à 0,6 cm. De même que précédemment, on ne peut pas connaître sa taille.

Figure n° 5: Photo électrophorèse : migration des plasmides après une heure de restriction



Piste n°1 : C'est la piste du marqueur de taille λ DNA/HindIII. Comme précédemment on observe des bandes de différentes tailles qui s'étendent de 0,6 cm à 2,1 cm du puits (cf : Annexe 14).

Piste n°2 : Sur cette piste à migrer le plasmide GAD424 après restriction. On y observe une bande fine claire et intense à 1 cm du puits. Sa taille est dans les environs de 6 kb.

Piste n°3 : On a fait migrer sur cette piste le plasmide GBT9 après restriction. On peut observer une belle bande dans les environs des 5 kb, belle, claire, intense et fine. Elle se situe à 1,1 cm du puits.

Figure n° 6: Photo électrophorèse : migration des plasmides après 1h30 de restriction

2) Interprétation :

Sur l'électrophorèse sont présentés les plasmides GAD424 (piste 2) et GBT9 (piste 3) après une heure de restriction. On observe des bandes larges, pas claires dont on ne peut pas définir la taille. La restriction de ces plasmides n'est pas correcte, il faut remettre les solutions à 37°C pour la continuer pendant minimum 30 minutes.

Les bandes observées lors de l'électrophorèse après 1h30 de restriction sont nettes, fines et précises. La bande de la piste 2 a la même taille que le plasmide GAD424 qui est de 6,6 kb. De même, la bande de la piste 3 fait dans les 5kb, ce qui correspond à la taille du plasmide GBT9. Les plasmides ont bien

été coupés, ils sont bien linéaires. On travaille à partir de ces solutions. On peut effectuer la purification.

NB : Le résultat observé lors de l'électrophorèse après la purification des plasmides est identique à la figure n°6. Cependant il est possible que les bandes soient de plus faibles intensités car la purification fait perdre du matériel génétique.

D. Résultats et interprétation de la restriction endonucléase du plasmide GBT9 normalement recombiné extrait d'E.coli :

1) Résultats :

Piste n°1 : Comme précédemment il s'agit de la piste du marqueur de taille λ DNA/HindIII. On observe des bandes de différentes tailles (cf : Annexe 14). Elles s'étendent 0,7 cm à 2,2 cm.

Piste n°2 : Sur cette piste on a fait migrer 5 μ L de la solution en vecteur GBT9 normalement recombiné après restriction, extrait de la colonie transformée n°1. On remarque deux bandes. La première bande se situe à 1 cm du puits et une deuxième à 1,3 cm. La première bande mesure dans les environs de 5 kb. La deuxième elle environne les 2,4 kb.

Piste n°3 : De même que la piste n°2 on a fait migrer sur cette piste 5 μ L de la solution en vecteur GBT9 normalement recombiné après restriction, extrait de la colonie transformée n°2. On n'observe qu'une seule bande épaisse pas claire laissant une trainée à 0,9 cm. On peut difficilement déterminer la taille de la bande, cependant elle dépasse les 6 kb.

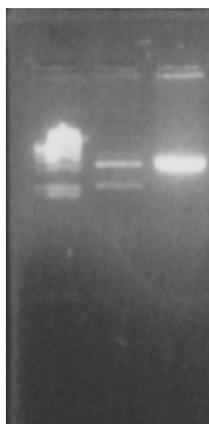


Figure n° 7: Photo électrophorèse : migration après restriction des plasmides extraits normalement transformés

2) Interprétation :

Les plasmides de la piste 3 ne contenaient pas l'insert car après restriction on n'observe aucune bande correspondante au gène CTR1 (bande au dessus du marqueur 2,322 kb). Les bactéries de cette colonie sont transformées par des plasmides non recombinés.

Les plasmides de la piste 2 sont bien recombinés par l'insert CTR1, car sur cette piste on observe deux bandes. Une d'environ 5 kb, ce qui correspond à la taille du plasmide GBT9. Une deuxième de 2,4 kb, ce qui correspond à la taille de notre insert. Les bactéries de la colonie de la piste 2 ont bien été transformées par des plasmides recombinés. On travaillera donc à partir des plasmides extraits de la colonie de la piste n°2.

E. Résultats et interprétation de la restriction endonucléase du plasmide GAD424 normalement recombiné extrait d'E.coli:

1) Résultats :

Piste n°1 : Il s'agit de la piste du marqueur de taille λ DNA/HindIII. On observe de nombreuses bandes qui sont de tailles différentes (cf : Annexe 14). La première se situe à 0,5 cm du puits la dernière à 1,3 cm.



Piste n°2 : Sur cette piste on a fait migrer 5 μ L de la solution en vecteur GAD424 normalement recombiné après restriction, extrait de la colonie transformée n°1. On n'observe qu'une seule bande épaisse pas nette à 0,7 cm. On peut difficilement déterminer la taille du fragment, cependant il dépasse les 6 kb.

Piste n°3 : De même que la piste n°2 on a fait migrer sur cette piste 5 μ L de la solution en vecteur GAD424 normalement recombiné après restriction, extrait cette fois-ci de la colonie transformée n°2.

On observe exactement le même résultat que la piste n°2.

Figure n° 8: Photo électrophorèse : migration après restriction des plasmides extraits normalement transformés

2) Interprétation :

Les plasmides de la piste n°1 et 2 n'ont pas été recombinés car après restriction on n'observe aucune bande correspondante au gène CTR1 (bande au dessus du marqueur 2,322 kb). Les bactéries de ces deux colonies sont transformées par des plasmides non recombinés. On ne peut pas passer à l'étape suivante qui est de transformer les levures. On doit arrêter l'expérience ici en ce qui concerne le plasmide GAD424 car après de nombreux essais, les résultats sont identiques : Les plasmides extraits des colonies transformées ne contiennent pas le gène CTR1. Pour savoir d'où venait le problème on a effectué une ligature du plasmide GAD424 seul après restriction.

F. Résultats et interprétation de la ligature du plasmide GAD424 après restriction :

1) Résultats :



Piste n°1 : Il s'agit du marqueur de taille λ DNA/ HindIII.

Sur cette piste il y a de nombreuses bandes de différentes tailles qui sont dans ce cas peu intenses (cf : Annexe 14). La première bande se situe à 0,5 cm et la dernière à 1,2 cm du puits.

Piste n°2 : Sur cette piste a migré 5 μ L de la solution en plasmide GAD424 après ligature. On observe une bande fine mais claire à 0,5 cm du puits. La taille du fragment doit être d'environ 23 kb.

Figure n° 9: Photo électrophorèse : migration de la solution de plasmide GAD424 après ligature

2) Interprétation :

La bande observée mesure 23 kb. Le plasmide lui mesure 6,6 kb. Les plasmides ce sont bien ligués entre eux. Les deux enzymes EcoRI et Sall ont bien coupé leur site de restriction car si une des deux enzymes n'avait pas correctement fonctionné on aurait obtenu une bande d'environ 13 kb. La ligature se ferait qu'entre les deux sites de restriction de la même enzyme qui a correctement fonctionné appartenant chacun à un plasmide différent.

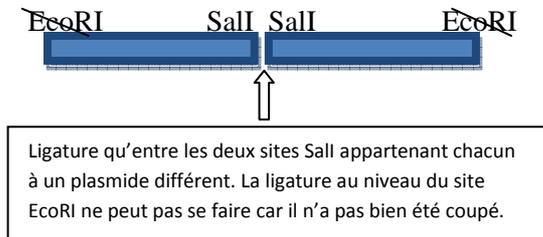


Figure n° 10: Schéma représentant la ligature des plasmides où une des deux endonucléases n'aurait pas fonctionné

Le problème, qui consiste à ne pas arriver à obtenir des bactéries transformées par GAD424 portant le gène CTR1, ne vient pas du plasmide GAD424. Il ne vient pas non plus de l'insert et de la T4 ligase car on a obtenu des bactéries transformées par GBT9 portant le gène CTR1.

Une des possibilités serait que la recombinaison du plasmide GAD424 par le gène CTR1 s'effectue correctement ainsi que la transformation d'*E.coli*, mais que le gène de la protéine hybride AD+CTR1 s'exprime dans *E.coli*. Il est possible parfois que les protéines hybrides soient toxiques pour la bactérie. Donc dans le cas de l'expérience la protéine hybride AD-CTR1 serait toxique alors que BD-CTR1 ne le serait pas. Ceci expliquerait pourquoi on obtient sur nos milieux seulement quelques colonies qui sont transformées par le plasmide non recombiné. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait utiliser le système Yeast Two Hybrid mais en remplaçant GAL4 par une autre protéine qui peut être LexA. Cette protéine active le gène lac Z lorsqu'elle se fixe sur le promoteur. Il faudra vérifier alors si on obtient des colonies transformées par des plasmides recombinés. Pour cela on devra modifier les plasmides, c'est-à-dire remplacer les gènes codant pour Gal4 AD et Gal BD par LexA DNA-BD et par LexA B42AD. On effectuera le même protocole. Si on obtient des colonies transformées par des recombinés, ceci signifierait que peut-être la protéine hybride AD-CTR1 est toxique pour *E.coli*.

Autre possibilité : parfois suivant les plasmides il faut effectuer beaucoup de transformations avant d'avoir un bon résultat. Une autre solution serait d'utiliser un autre plasmide portant le gène codant pour AD, le gène Leu2 codant pour la Leu et le gène de résistance à l'ampicilline. Peut-être qu'en effectuant ceci on obtiendrait un bon résultat dans des délais correctes.

On obtiendra pour le test X-gal que les résultats des colonies transformées par GBT9-CTR1 et GAD424-MKK (1 à 10)

G. Résultats et interprétation test X-gal effectué sur HF7C transformée :

1) Résultats :

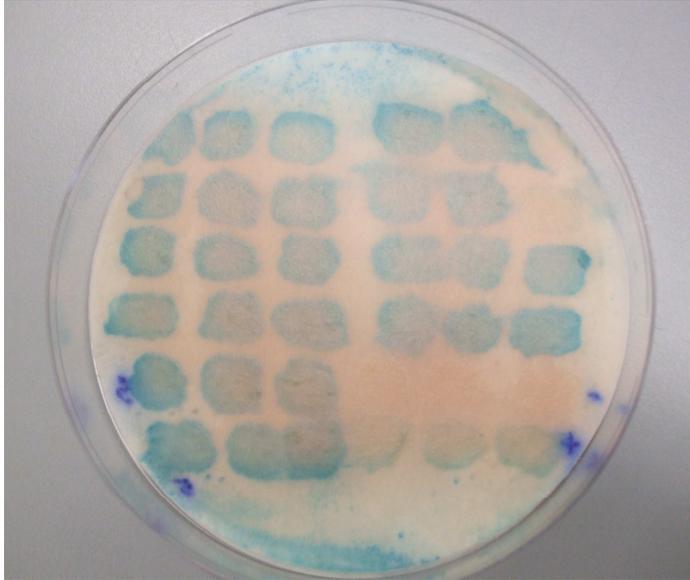


Figure n° 11: Photo représentant les résultats du test X-gal pour les levures transformées par GBT9-CTR1 et GAD424-MKK (1à10)

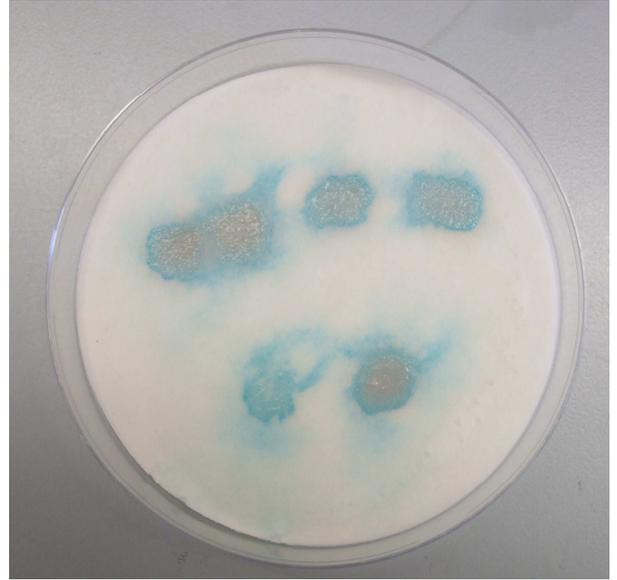


Figure n° 12: Photo représentant les résultats du test X-gal sur les colonies contrôles, transformées par GBT9-CTR1 et GAD424

Observation figure n°11 :

On observe que le témoin positif de la figure n° 11 est bleu clair (dernière ligne à droite de la boîte), le témoin négatif est resté rose (avant dernière ligne à droite de la boîte de Pétri). Toutes les colonies transformées sont devenues bleues quelques heures après le début du test X-gal (photo prise après deux heures).

Observation figure n° 12:

Les 6 colonies de la figure n°12 correspondent aux colonies contrôles transformées par GAD424 et GBT9-CTR1 après le test X-gal. Ces 6 colonies sont devenues bleues environ deux heures après ce test.

2) Interprétation :

Lorsque la colonie devient bleue ceci signifie que le X-gal que l'on a mis en présence des levures a été hydrolysé par l'enzyme β -galactosidase. La β -galactosidase est synthétisée par le gène Lac Z qui est activée lors de cette expérience lorsque les 2 protéines hybrides Binding domain-CTR1 et Activation domain-MKK (1 à 10) interagissent.

Les colonies correspondant au contrôle CTR1 sont devenues bleues. Le gène LacZ adonc été activé, la β -galactosidase synthétisée et le X-gal hydrolysé. Normalement les colonies contrôles n'auraient pas dû devenir bleues. En effet ces colonies ne comportent que la protéine hybride Binding domain-CTR1

et la protéine non hybride Activation domain. Ces deux protéines ne peuvent donc pas interagir et activer le gène. Le fait que le gène lacZ a été activé, signifie que la protéine BD-CTR1 l'a activé seule. La protéine BD-CTR1 se fixe sur le promoteur du gène lacZ grâce au binding domain et l'ARN polymérase a pu se fixer sur CTR1. Elle peut donc se fixer et transcrire le gène.

On ne peut donc pas interpréter les résultats du test X-gal effectué sur les colonies transformées par GBT9-CTR1 et GAD424-MKK (1 à 10), car la protéine hybride BD-CTR1 active elle-même le gène LacZ.

Pour étudier les interactions entre CTR1 et les kinases MKK 1 à 10 on doit utiliser une autre méthode. Les méthodes envisageables sont : la chromatographie d'affinité, la méthode FRET, la puce à protéine.

Normalement suite au test X-gal on effectue un essai quantitatif sur les colonies positives, afin de connaître la quantité de β -galactosidase active résultant de chaque interaction entre les deux protéines hybrides. Plus il y a de β -galactosidase, plus l'interaction entre les deux protéines hybrides est forte. Pour cela on effectue le test Bradford sur les levures transformées positives afin de connaître la quantité totale de protéine qu'elles possèdent. Un second test est effectué c'est celui de l'ONPG. Il permet de connaître l'activité de la β -galactosidase. La β -gal transforme l'ONPG en ONP (jaune) et en galactose. On observe l'absorbance à 420 nm (longueur d'onde du jaune) et on déduit la concentration en ONP donc en β -galactosidase par la formule : Concentration= $[A_{420} / (\text{tps} \times \text{quantité totale en protéine} \times 0,0045)]$

- Tps: temps d'attente pour que la solution devienne jaune
- 0,0045: est la valeur du coefficient d'extinction molaire du produit obtenu par action de la β -galactosidase sur l'ONPG
- Quantité : en mg

VI. Conclusion

Depuis la découverte de la technique Yeast Two-Hybrid de nombreuses interactions intracellulaires ont été détectées, ce qui permet de créer des cartes d'interaction entre protéine.

Au cours de ce stage, j'ai utilisé la technique du double hybride afin de savoir s'il y a interaction entre les protéines CTR1 et MKK 1 à 10. J'ai pratiqué de nombreuses techniques de biologie moléculaire pour arriver à ces résultats. Ce qui m'a permis d'enrichir mes connaissances en techniques, d'améliorer mon raisonnement ainsi que ma pratique. Malgré des résultats ininterprétables (car faux positifs), cela a permis de savoir que l'étude de CTR1 ne peut pas s'effectuer avec la technique Yeast Two-Hybrid. Le travail futur serait de continuer cette étude mais par le biais d'autres techniques que le Yeast Two-Hybrid tel que FRET, chromatographie d'affinité...

L'avantage de la technique Yeast Two-Hybrid par rapport aux autres est qu'elle est in-vivo, ce qui permet de détecter des interactions de faible affinité, de plus elle est facile à mettre en place. Cependant elle possède quelques inconvénients, comme : possibilité de faux positifs (cas dans cette expérience), de faux négatifs, on ne peut pas appliquer cette technique aux protéines membranaires qui représentent 30% de protéome, obligation d'effectuer une autre technique pour valider les résultats obtenues par Yeast Two-Hybrid.

Depuis son invention, cette technique est en perpétuelle évolution et des techniques parallèles ont été mises en place, comme le système simple hybride qui permet de connaître les protéines de régulation transcriptionnelle, ou le système double-hybrides qui ne se lient pas directement à l'ADN.

Toutes ces techniques permettent de faire des découvertes sur les interactions afin de mieux comprendre la complexité du système cellulaire et qui font avancer la recherche en médecine (étude des protéines interagissant dans certains cancers).

Bibliographie

Littérature :

- Karp.G, J.Bouharmont, J-C.Wissocq (2007) **Biologie Cellulaire et Moléculaire** [vu sur books.google.co.uk le 16/05/08]
- Karen L. Clark, P B. Larsen, X.Wang, C. Chang (1998) **Association of *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors**, publié par The National Academy of Sciences.

Website:

- Wikipédia: **Opéron** ; <http://fr.wikipedia.org/wiki/Op%C3%A9ron> [vu le 26/05/08]
- Université Pierre& Marie Curie : **La régulation de l'opéron lactose** ; <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/operonlactose/index.htm> [vue le 26/05/08]
- OCCC.Edu : **Plasmid Mini-preparation of pGreen** ; http://www.occc.edu/BBDiscovery/documents/Modules/Plasmid_mini_prep.htm [vu le 17/05/08]
- Wikipédia : **Two Hybrid Screening**, par Anna.K ; http://en.wikipedia.org/wiki/two-hybrid_screening [vu le 01/05/08] (1)
- Imagenes-bio: **pGAD424**; <http://www.imagenes-bio.de/info/vectors/pGAD424.pdf> [vu le 05/05/08] (2)
- Imagenes_bio : **pGBT9** ; http://www.imagenes-bio.de/info/vectors/pGBT9-D13_pic.shtml [vu le 05/05/08] (3)
- **PCR** ; www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.gif [vu le 03/06/08] (4)
- Heriot-Watt University : <http://www.hw.ac.uk>

Liste des annexes :

- **Annexe 1 : Présentation du plasmide GAD424**
- **Annexe 2 : Présentation du plasmide GBT9**
- **Annexe 3 : Préparation des competent cells**
- **Annexe 4 : Principe de la PCR**
- **Annexe 5 : Présentation du primer FL (up)**
- **Annexe 6 : Présentation du primer RL (down)**
- **Annexe 7 : Electrophorèse**
- **Annexe 8 : Rôle des solutions du kit QIAquick PCR purification, utilisées pour la purification de l'ADN**
- **Annexe 9 : Milieu LB(= milieu Luria-Bertani)**
- **Annexe 10 : Préparation des milieux utilisés pour l'extraction des plasmides**
- **Annexe 11 : Milieu YEPD ou YPD (= Yeast Extract Peptone Dextrose)**
- **Annexe 12 : Plate solution**
- **Annexe 13 : Milieu SC (Synthetic complete) media**
- **Annexe 14 : Marqueur électrophorèse λ DNA/HIND III**

Annexe 1 : Présentation du plasmide GAD424

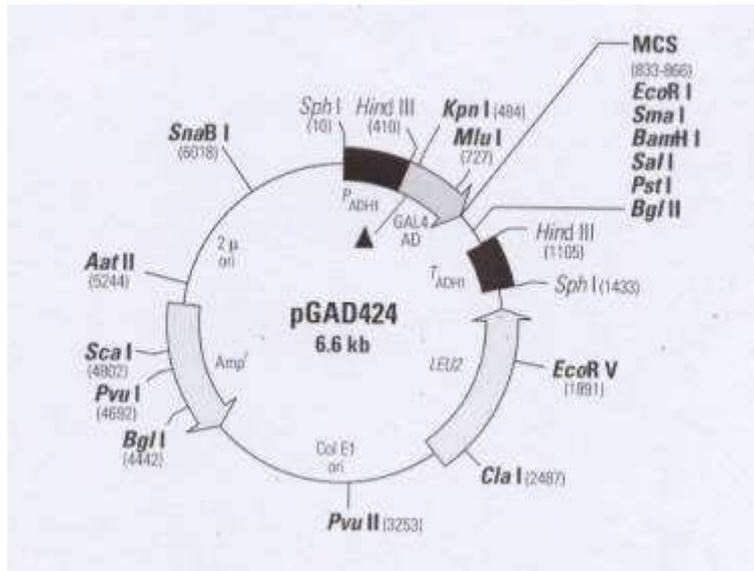


Figure n°1 : Schéma représentant le plasmide GAD424 (2)

Le plasmide GAD424 est un plasmide de 6,6 kb. Il possède le gène GAL4 AD (Activation Domain) qui code pour le domaine de la protéine Gal4 qui active le gène Lac Z. Ce domaine interagit avec ce gène, en fixant l'ARN polymérase. Ce dernier va pouvoir se lier à l'opéron ce qui va activer la synthèse de la β galactosidase.

Ce plasmide contient aussi le gène codant pour la leucine, afin que l'on puisse sélectionner les levures transformées par ce plasmide sur un milieu sans leucine (les bactéries transformées synthétisent elles-mêmes leur leucine). De même avec le gène de résistance à l'ampicilline qu'il possède ; cela permet de sélectionner les bactéries transformées par ce plasmide sur un milieu avec ampicilline.

Les deux domaines AD et BD de la protéine GAL4, sont dans la nature liés. Mais pour le besoin de l'expérience nous les avons séparés.

Ce plasmide GAD424 possède plusieurs sites de restrictions, dont plusieurs qui se trouvent à la fin du gène codant pour GAL4 AD. C'est à ce niveau que les sites nous intéressent. Le but est d'insérer le gène CTR1 à la suite du gène GAL4 AD.

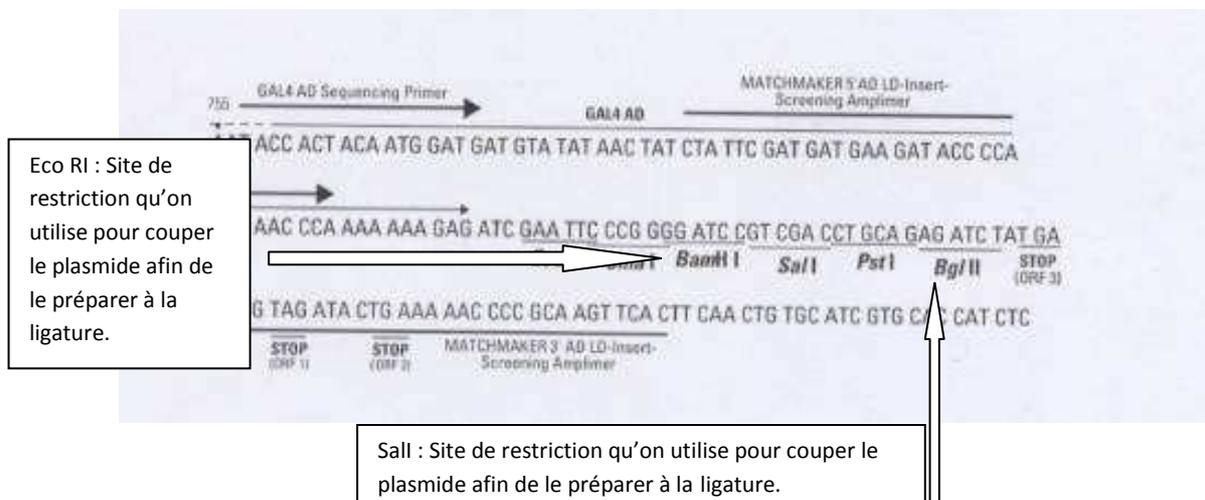


Figure n°2 : Schéma représentant les différents sites de restriction se trouvant à la fin du gène GAL4 AD (2)

Annexe 2 : Présentation du plasmide GBT9

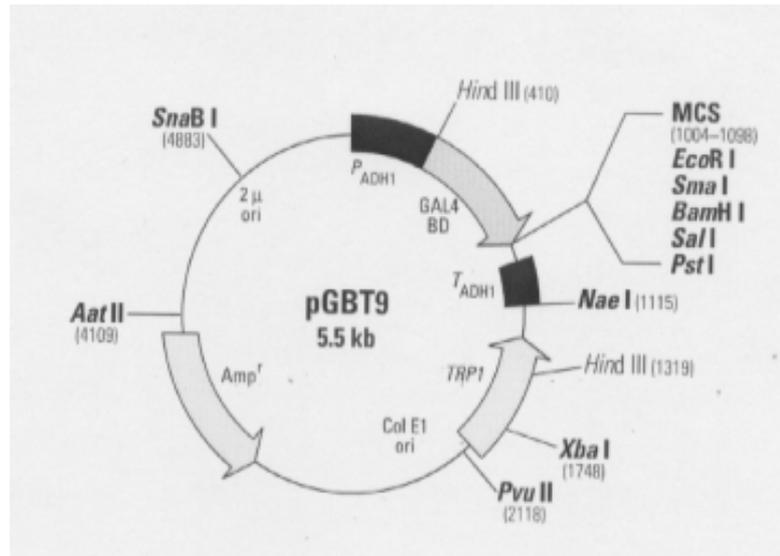


Figure n°3 : Schéma représentant le plasmide GBT9 (3)

Le plasmide GBT9 est un plasmide de 5,5 kb. Il possède le gène GAL4 BD (Binding Domain) qui code pour le domaine de la protéine GAL4 qui se fixe sur l'ADN. Il se lie au promoteur du gène lac Z, gène codant pour la β -galactosidase.

Ce plasmide contient aussi le gène codant pour le tryptophane, afin que l'on puisse sélectionner les levures transformées par ce plasmide sur un milieu sans tryptophane (les bactéries transformées synthétisent elles-mêmes leur tryptophane). De même avec le gène de résistance à l'ampicilline qu'il possède ; cela permet de sélectionner les bactéries transformées par ce plasmide sur un milieu avec ampicilline.

Les deux domaines AD et BD de la protéine GAL4, sont dans la nature liés. Mais pour le besoin de l'expérience nous les avons séparés.

Ce plasmide GBT9 possède plusieurs sites de restrictions, dont plusieurs qui se trouvent à la fin du gène codant pour GAL4 BD. C'est à ce niveau que les sites nous intéressent. Le but est d'insérer le gène CTR1 à la suite du gène GAL4 BD.

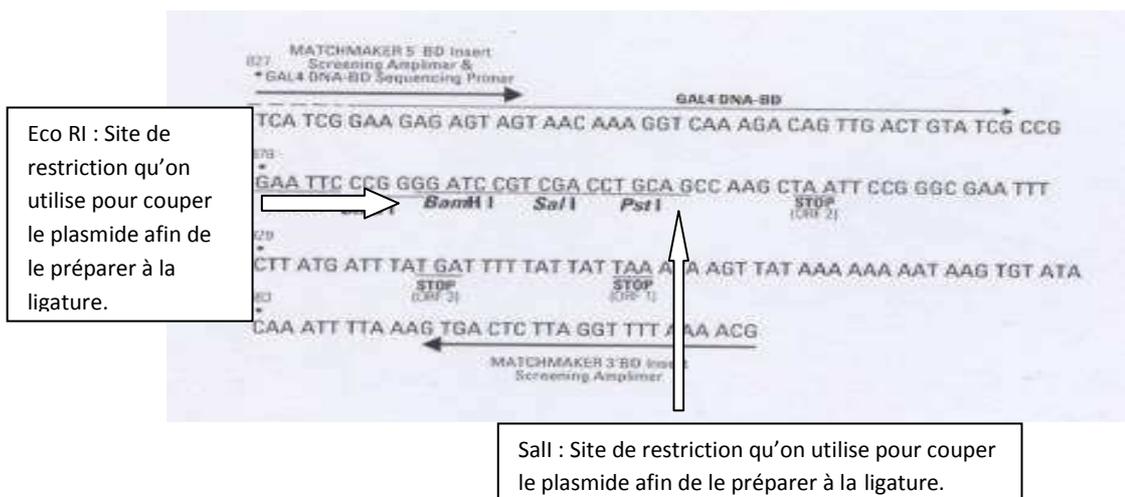


Figure n°4: Schéma représentant les différents sites de restriction se trouvant à la fin du gène GAL4 BD (3)

Annexe 3 : Préparation des competent cells

On prépare les competent cells à partir d'une culture de la souche XL1-blue de l'espèce *Escherichia coli* sur le milieu LB + Tetracycline.

Dans un flacon mettre 5 mL de milieu LB + 100 µL de $MgSO_4$ (1M). L'autoclaver. Inoculer une colonie provenant du milieu à l'aide d'un embout. Secouer. Incuber à 37°C pendant toute une nuit sur un shaker.

Dans un ballon de 500 mL ajouter 250 mL de milieu LB + 5 mL de $MgSO_4$ à 1 M. L'autoclaver.

Après incubation vortexer le flacon et inoculer son contenu dans le milieu préparé dans le ballon, mélanger. Fermer le ballon en mettant du papier d'aluminium sur le haut du goulot. Incuber le ballon dans une pièce aérée de température 23°C pendant 7 à 8 h sur un shaker. Afin de savoir si les bactéries sont assez nombreuses au bout de cette durée, passer la solution au spectrophotomètre à la longueur d'onde 600 nm. On doit obtenir comme absorbance une valeur comprise entre 0,4 et 0,6. Transférer la solution dans une bouteille stérile, la placer dans la glace pendant 10 minutes et la centrifuger pendant 10 min à 4°C à 3000 rpm. Jeter le surnageant et suspendre le culot dans 80 mL de solution froide de TB*, vortexer. Poser la solution 10 minutes dans la glace. Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Jeter le surnageant, suspendre le culot dans 20 mL de solution froide de TB, vortexer. Puis ajouter 1,5 mL de DMSO (cryoprotecteur : pour stabiliser les bactéries à -70°C). Laisser dans la glace pendant 10 minutes. Déposer dans chaque tube Eppendorf stérile 400 µL de solution, les laisser dans la glace. Les stocker à -70°C.

***Solution TB:**

Volume préparé : 500 mL

10 mL de Pipes-HCl pH 6,7 à 0,5 M, 15 mL de $CaCl_2$ à 0,5 M, 62,5 mL de KCl à 2M et 27,5 mL à $MnCl_2$ 1 M.

La solution TB contient beaucoup de calcium, car les bactéries lorsqu'elles sont dans un milieu riche en calcium elles peuvent être ensuite transformées par choc thermique (42°C) suivi d'un moment dans la glace.

Annexe 4 : Principe de la PCR

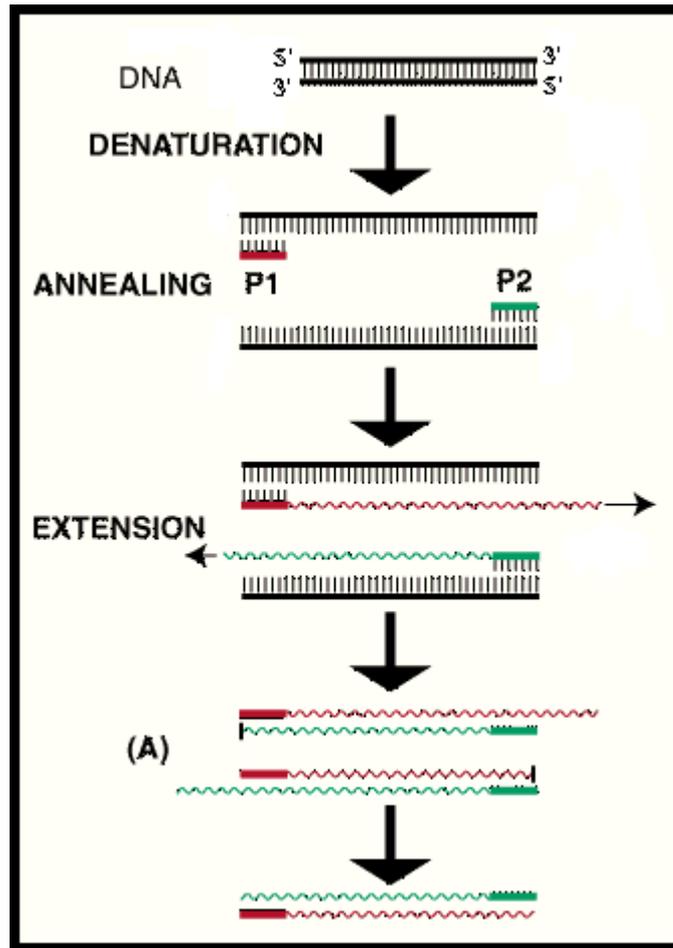


Figure n° 5: Schéma représentant les différentes étapes d'un cycle de PCR (4)

La PCR permet d'amplifier une séquence nucléotidique d'intérêt.

Pour cela nous avons besoin de réaliser comme mélange réactionnel : l'ADN cible, le primer R (reverse), le primer F (forward), le tampon spécifique à l'ADN polymérase, Mg^{2+} (généralement inclus dans le tampon), dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), de l'eau et l'ADN polymérase.

Lors d'une PCR, plusieurs cycles sont effectués. Le nombre de cycle dépend du nombre d'amplifiat que l'on souhaite. 30 cycles, et le nombre le plus couramment utilisé.

Un cycle de PCR est constitué de plusieurs étapes :

- 1- La pré-dénaturation ($94^{\circ}C$) : permet de casser les liaisons faibles de l'ADN bicaténaire
- 2- La dénaturation (94°) : l'ADN double brin devient 2 monobrin
- 3- Annealing : hybridation des amorces à la matrice
- 4- Extension ($72^{\circ}C$) : extension des amorces par l'ADN polymérase. La température est optimale ($72^{\circ}C$) pour que la polymérase synthétise le brin complémentaire à la matrice
- 5- Final extension ($72^{\circ}C$): s'effectue uniquement à la fin du dernier cycle de la PCR
- 6- Hold : s'effectue après l'extension finale. A cette température la polymérase n'agit plus, ce qui évite les contaminations.

La température d'hybridation (annealing) dépend des primers. On la détermine à partir de leur T_m .

T_m est la température à laquelle du point de vu statistique, il y a la moitié des liaisons des appariements entre deux monobrin d'ADN qui sont formés (la moitié de notre ADN est sous forme monobrin). Les T_m sont données lorsqu'on reçoit les primers par l'entreprise qui les a fabriqués. Ou on peut les calculer à partir de la formule : $T_m = 2^{\circ}C \times [A + T] + 4^{\circ}C \times [G + C]$

Mais généralement T_m avoisine les $60^{\circ}C$. La température d'hybridation doit être $5^{\circ}C$ inférieure à T_m , afin qu'il y ait un compromis entre une dénaturation suffisante de l'ADN et une température suffisamment basse pour permettre l'hybridation.

Annexe 5 : Présentation du primer FL (up)

CTR1-FL			1/3
5'-GAG GAA TTC ATG GAA ATG CCC GGT AGA AGA TCT AAT TAC-3'			
Amount	Concentration (Volume 1 ml)	7 pmol/ μ l	Length 39-mer
3.2 OD	Volume for 100 pmol/ μ l	70 μ l	GC Content 41 %
84 μ g	Molecular Weight	12088 g/mol	Scale 0.01 μ mol
7.0 nmol	T_m	69.5 °C	Purification HPSF

Figure n°6 : document présentant les diverses informations sur le primer FL

La séquence du primer FL est :

5'-GAG GAA TTC ATG GAA ATG CCC GGT AGA AGA TCT AAT TAC-3'



Cette séquence du primer correspond au site de restriction de l'endonucléase EcoRI

Cette séquence du primer est complémentaire au début de la séquence codante du gène CTR1 (code pour la protéine)

On a ajouté au primer FL la séquence du site de restriction de l'endonucléase Eco RI, afin que notre gène une fois amplifié possède cette séquence. Ceci permet de pouvoir ligaturer le gène CTR1 au plasmide par l'enzyme T4 ligase, après avoir effectué une restriction par EcoRI.

Zoom sur le site de restriction :

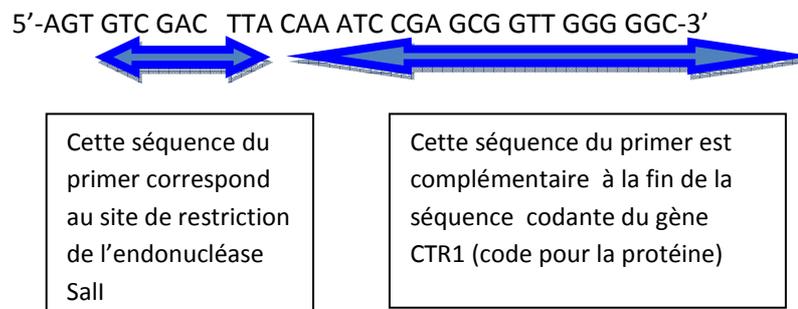
5'-GAG **GAA TTC**

Annexe 6 : Présentation du primer RL (down)

CTR1-RL				2/3
5'-AGT GTC GAC TTA CAA ATC CGA GCG GTT GGG GGC-3'				
Amount	Concentration (Volume 1 ml)	15 pmol/μl	Length	33-mer
5.5 OD	Volume for 100 pmol/μl	151 μl	GC Content	57.6 %
154 μg	Molecular Weight	10235 g/mol	Scale	0.01 μmol
15.1 nmol	T _m	73.2 °C	Purification	HPSF

Figure n° 7: document présentant les diverses informations sur le primer RL

La séquence du primer RL est :



On a ajouté au primer RL la séquence du site de restriction de l'endonucléase Sall, afin que notre gène une fois amplifié possède cette séquence. Ceci permet de pouvoir ligaturer le gène CTR1 au plasmide par l'enzyme T4 ligase, après avoir effectué une restriction par Sall.

Zoom sur le site de restriction :



Cependant au cours de l'expérience nous avons remarqué une erreur au niveau du primer RL. En effet, la séquence nucléotidique du primer n'est pas exacte. L'extrémité 3' du primer aurait dû se terminer par GGG CGG au lieu de GGG GGC. Cette partie de la séquence du primer est complémentaire à la séquence codante du gène CTR1. Ceci implique, qu'après amplification du gène, ce dernier a une modification de sa séquence nucléotidique, qui se traduit par un changement d'acide aminé de la protéine CTR1 une fois traduite. L'acide aminé proline est remplacé par l'alanine, ce qui change légèrement la conformation de la protéine. Ce changement n'est pas très important et ne devrait pas intervenir au niveau de l'étude de l'interaction entre CTR1 et MAPKK.

Annexe 7 : Electrophorèse

Préparation du gel:

On choisit le pourcentage d'agarose de notre gel en fonction de la taille de la séquence nucléique que l'on souhaite faire migrer. Le gène d'intérêt mesure 2,4 kb, pour cela on choisit comme pourcentage d'agarose 1%, car il sépare les fragments d'ADN qui ont une taille comprise entre 0,5 et 7 kb.

Le volume à préparer est identique à celle de la cuve qui est de 25 mL.

Nous pesons 250mg d'agarose que nous diluons dans 25mL de TBE à 0,5X.

Faire chauffer la préparation au four micro-onde, afin que l'agarose soit totalement dilué.

Ajouter ensuite 1 μ L de BET (Bromure d'éthidium) dans la solution. Attention ce produit est cancérigène, les gants sont obligatoires. Le BET est un intercalant, il se fixe entre les bases azotées.

Installer le plateau de moulage et positionner le peigne en fonction du nombre de puits désirés. Dans cette étude un peigne à 8 pistes est suffisant.

Couler la solution et laisser solidifier pendant 20 à 30 minutes.

Retirer le peigne et installer le plateau contenant le gel dans la cuve à électrophorèse contenant la solution tampon.

Préparation de nos échantillons:

5 μ L de la solution d'intérêt obtenu par la PCR + 2 μ L de solution de charge a 6X + 3 μ L d' H₂O distillé.

On vortex et effectuer un pulse.

Le marqueur de taille choisi est λ DNA / Hind III.

On dépose 1 μ L de marqueur de taille dans le premier puits. On dépose ensuite 10 μ L de l'échantillon dans le second puits.

Faire migrer à 100 volts pendant environ 20 minutes. Surveiller.

Révélation:

On révèle grâce à un appareil à rayonnement UV possédant un couvercle de protection pour les yeux. Prendre une photographie.

Annexe 8 : Rôle des solutions du kit QIAquick PCR purification, Utilisées pour la purification de l'ADN

- **Buffer QG :**

Il permet de solubiliser le gel d'agarose.

- **Isopropanol :**

Permet d'augmenter le rendement en fragments d'ADN qui sont de longueurs inférieures à 500 bp et supérieures à 4 kb.

Dans notre cas, l'isopropanol n'est pas obligatoire car notre fragment d'ADN est de 2,4 kb.

- **PE Buffer :**

Il permet de laver la colonne. Il enlève les différents buffers. Au fond de notre colonne il ne reste que l'ADN.

- **EB Buffer :**

Il permet de récupérer l'ADN qui est au fond de la colonne.

Annexe 9 : Milieu LB(= milieu Luria-Bertani)

Préparation du milieu LB liquide

Ce milieu permet la croissance des bactéries E.coli et permet de les maintenir vivantes.

Nous préparons le milieu LB à partir de la poudre LB Broth, qui contient du tryptone (10g/L), du chlorure de sodium (10g/L), et de l'extrait de levure (5g/L).

Pour 500 mL de milieu :

Peser 12,5 g de poudre LB. La Dissoudre dans 500 mL d'eau distillée. Mélanger. Autoclaver le milieu pendant 15 minutes.

Préparation du milieu LB avec Agar

Préparer 500 mL de solution LB de la même manière que précédemment. Ajouter 7,5 g d'agar, mélanger. Verser 80 mL du milieu dans des flacons. Autoclaver.

Annexe 10 : Préparation des milieux utilisés pour L'extraction des plasmides

- **Solution GTE (Glucose Tris EDTA) :**

Volume préparé= 100 mL

Concentration en glucose : 50 mM = 5 mL de solution glucose à 1M.

Concentration en Tris-Cl (pH=8) : 25 mM = 2,5 mL de solution Tris-Cl à 2M.

Concentration en EDTA : 10 mM = 2 mL de solution EDTA à 0,5M.

Concentration en Rnase : 50 µg/mL = 500 µL de solution Rnase à 10mg/mL.

Compléter jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée.

- **Solution d'acétate de potassium (5 M à pH 4,8):**

29,5 mL d'acide acétique à 99%.

Une pastille de KOH à pH 4,8.

Verser environ 100 mL d'eau distillée, en présence d'un pH-mètre s'arrêter de verser lorsque le pH atteint 4,8.

- **Solution NaOH/SDS :**

Volume préparé= 40 mL

Concentration en NaOH : 0,2 M = 8 mL de solution NaOH à 1 M.

Concentration en SDS : 1% = 4 mL de solution SDS à 10%.

- **Solution TE Buffer (Tris-Cl EDTA)**

Volume préparé= 100 mL

Concentration en Tris-Cl pH 8 : 10 mM = 1 mL de solution Tris-Cl à 1 M.

Concentration en EDTA pH 8 : 1 mM = 0,2 mL de solution EDTA à 0,5 M.

Annexe 11 : Milieu YEPD ou YPD (= Yeast Extract Peptone Dextrose)

YEPD est un milieu de culture qui permet la pousse des levures avant la première transformation.

Composition :

- 20g d'extrait de levure
- 10g de peptone bactériologique
- 20g de glucose
- 20g d'agar
- Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes. Couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

Annexe 12 : Plate solution

La solution Plate est utilisée lors de la seconde transformation des levures. Elle permet d'aider l'entrée du ssDNA (ADN de sperme de saumon) et du plasmide recombiné. Elle est composée de diverses solutions, c'est l'acétate de lithium (LiOAc) qui permet cette entrée.

Composition :

- 13,5 mL de solution PEG (Polyéthylène Glycol) à 45%
- 1,5 mL de solution LiOAc 1M (pH 7,5)
- 150 µL de solution Tris-Cl 1M (pH 7,5)
- 30 µL de solution EDTA 0,5M (pH 7,5)

Annexe 13 : Milieu SC (Synthetic complete) media

Ce milieu est utilisé pour faire pousser les levures après transformation.

Composition

- 20g de glucose
- 1,7g d'YNB (Yeast Nitrogen Base sans acides aminés et sulfate d'ammonium)
- 5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 25mL de solution 40X de mélange d'acides aminés
- 20g d'agar
- Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée

Autoclaver à 121°C pendant 15 min. Couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

Ce milieu est utilisé comme milieu liquide. C'est la même composition, mais on n'ajoute pas d'agar. Il est ensuite autoclavé dans les mêmes conditions.

Dans cette étude nous utilisons ce milieu sans leucine ou sans tryptophane ou sans les deux, afin de sélectionner les bonnes levures. Pour cela on ajoute 25mL de solution 40X de mélange d'acide aminé qui ne comporte pas de leucine ou pas de tryptophane ou aucun des deux, suivant ce que l'on souhaite.

Solution de mélange d'acides aminés 40X :

Composition :

200 mg L-Arginine, 100 mg sulfate d'adénine, 400 mg L-Lysine, 600 mg L-Thréonine, 600 mg L-Isoleucine, 200 mg uracile, 100 mg L-Histidine, 400 mg L-Tryptophane, 100 mg L-méthionine, 600 mg L-Leucine, 600 mg L-Phénylalanine.

Dissoudre ceci dans 100 mL d'eau distillée et autoclaver.

Préparer cette solution sous trois formes différentes :

- Sans L-Leucine
- Sans L-Tryptophane
- Sans L-Leucine et sans L-Tryptophane

Annexe 14 : Marqueur électrophorèse λ DNA/HIND III

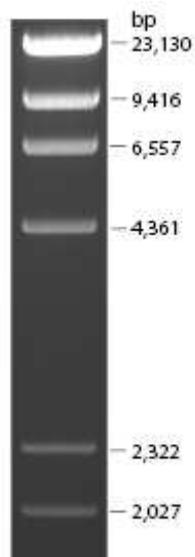


Figure n° 8: Photo représentant les différentes tailles des bandes du marqueur de taille λ DNA/HindIII (taille en bp)

fragment	taille (bp)	masse (ng)
1	23 130	477
2	9 416	194
3	6 557	135
4	4 361	90
5	2 322	48
6	2 027	42

Figure n°9 : Tableau présentant la taille des fragments et la concentration en ADN des bandes du marqueurs λ DNA/HindIII (pour 1 μ L) en fonction de sa position sur le gel.

Résumé

La protéomique différentielle comporte de nombreuses techniques dont le système double hybride (Yeast Two-Hybrid), qui a été inventée par Fields et Song en 1989. Cette technique permet d'observer les interactions protéine-protéine au sein d'un organisme vivant, la levure. Cette technique a été utilisée dans cette expérience afin de connaître les interactions entre la kinase CTR1 (MAPKKK) et les 10 kinases MKK (MAPKK) de la plante *Arabidopsis thaliana*. Les souches HF7C de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et XL1-blue d'*Escherichia coli* sont des outils biologiques indispensables à cette expérience, de même que les plasmides GAD424 et GBT9. Cependant les résultats obtenus ne sont pas très concluants, d'autres méthodes de protéomique doivent être utilisées pour cette étude. Une des protéines d'études, CTR1, interagit à elle seule avec notre gène cible (gène LacZ), ce qui empêche l'interprétation des résultats de l'expérience.

Mots clefs

Système double hybride - Yeast Two-Hybrid - interaction protéine-protéine - protéomique différentielle - *Arabidopsis thaliana* - cascade de kinase - CTR1 - MAPKKK (MKKK) - MAPKK (MKK) - Test X-gal.

Abstract

The differential proteomy involves a lot of techniques like the Yeast Two-Hybrid, which has been invented by Fields and Songs in 1989. This technique permits the observation of protein-protein interactions inside a living organism, the yeast. This technique has been used inside this experimentation in order to know the interaction between the kinase CTR1 (MAPKKK) and the 10 kinases MKK (MAPKK) of the plant *Arabidopsis thaliana*. The strains HF7C of the specie *Saccharomyces cerevisiae* and XL1-blue of *Escherichia coli* are indispensable biological tools for this experiment, also the plasmids GAD424 and GBT9. However, the obtained results are not completely conclusive, other methods of proteomy must be used for this study. One of the studies proteins, CTR1, interacts by itself with the target gene (LacZ gene), which makes difficulties in the interpretation of the results.

Keys words

Double hybrid system - Yeast Two-Hybrid - protein-protein interactions - differential proteomy - *Arabidopsis thaliana* - kinase cascade - CTR1 - MAPKKK (MKKK) - MAPKK (MKK) - X-gal test.