

Table des matières

1	Introduction.....	1
1.1	CRISPR/Cas9.....	1
1.2	<i>Pseudomonas putida</i>	2
1.3	Utilisation du système CRISPR/Cas9 chez <i>E. coli</i>	3
1.4	But de ce travail de diplôme.....	4
2	Matériel et méthode.....	5
2.1	Souches, plasmides et primer utilisés.....	5
2.2	Conditions de croissances.....	6
2.3	Transformation de <i>P. putida</i> KT2440 par électroporation.....	6
2.4	Digestion avec des enzymes de restrictions.....	7
2.5	Polymerase chain reaction (PCR).....	7
2.6	Electrophorèse.....	7
2.7	Purification sur gel d'agarose.....	8
2.8	Ligation.....	8
2.9	Transformation de <i>E. coli</i> TOP10 par heat shock.....	8
2.10	Extraction de plasmide.....	8
2.11	Substitution de nucléotide.....	8
3	Résultats.....	8
3.1	Test de la transformation par électroporation de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	8
3.2	Test de la résistance à la kanamycine et à la spectinomycine dans <i>P. putida</i> KT2440.....	9
3.2.1	Digestion des plasmides <i>pCas</i> et <i>pTargetF</i> pour récupérer leur résistance et l'introduire dans <i>pVLT319</i>	
3.2.2	Transformation par électroporation dans <i>P. putida</i> KT2440.....	10
3.3	Test de l'origine de répllication <i>repA101ts</i>	12
3.4	Transformation de <i>P. putida</i> KT2440 avec <i>pSEVA551</i> et <i>pSEVA521</i>	12
3.5	Construction du plasmide <i>pTargetP</i>	13
3.5.1	Digestion du <i>pSEVA521</i> et <i>pTargetF</i> avec <i>BamHI-HF</i> et <i>HindIII-HF</i>	13
3.5.2	Transformation du <i>pTargetP</i> dans <i>E. coli</i> TOP10.....	14
3.5.3	Vérification du clonage par colonie PCR.....	15
3.5.4	Contrôle du plasmide <i>pTargetP</i>	16
3.5.5	Substitution des 20 nucléotides de <i>pTargetP</i> ciblant la PHA dépolymérase.....	17
3.5.6	Séquençage du plasmide <i>pTargetP-ΔphaZ</i>	20
3.6	Construction du deuxième plasmide appelé <i>pCasPd</i> ou <i>pCasPa</i>	21
3.6.1	Première tentative de construction.....	21
3.6.2	Construction du plasmide <i>pCasPd</i>	25
3.6.3	Construction du plasmide <i>pCasPa</i>	28
3.6.4	Contrôle des deux nouveaux plasmides <i>pCasPd</i> et <i>pCasPa</i>	30
3.6.5	Substitution du N20 des deux nouveaux plasmides <i>pCasPd</i> et <i>pCasPa</i>	33
3.7	Transformation de <i>P. putida</i> KT2440 avec les plasmides construit dans ce travail.....	36
3.7.1	Transformation de <i>P. putida</i> KT2440 avec <i>pCasPa</i> et <i>pCasPd</i>	36
3.7.2	Transformation du <i>P. putida</i> KT2440 avec <i>pTargetP-ΔphaZ</i>	36
4	Discussion.....	36
5	Conclusion.....	38

1 Introduction

Ces dernières années, différents systèmes permettant de modifier le génome d'un organisme ont été découverts. Ces modifications sont importantes pour la recherche et l'industrie biotechnologique car elles permettent de comprendre la fonction d'un gène et améliorer la production [1]. Un exemple de ses méthodes sont zinc finger nucleases (ZFNs) ou transcription activator-like effector nucleases (TALEN) mais elles demandent beaucoup de temps, elles sont cher et laborieuses [2].

1.1 CRISPR/Cas9

Le système CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) est un système de défense immunitaire retrouvé dans plusieurs bactéries [2]. Trois types de système CRISPR/Cas9 ont été découverts mais le type II est le plus étudié. Une courte séquence de l'ADN étranger est intégrée dans le chromosome au locus CRISPR comme montré à la Figure 1. Ensuite, le locus CRISPR transcrit est maturé à l'aide du *tracrRNA* (trans-activating) qui se couple aux séquences répétées de *crRNA* (CRISPR RNA) permettant d'activer l'enzyme RNase III. Cette enzyme va couper le locus CRISPR transcrit pour former des petits ARNs. L'endonucléase forme un complexe avec le *crRNA* et le trans-activating *crRNA* pour la conduire à la séquence cible de l'ADN étrangers par complémentarité. Un motif associé au protospacer (PAM) doit suivre immédiatement en 3' de la séquence cible sur l'ADN étranger pour que le système reconnaisse l'ADN. [3]

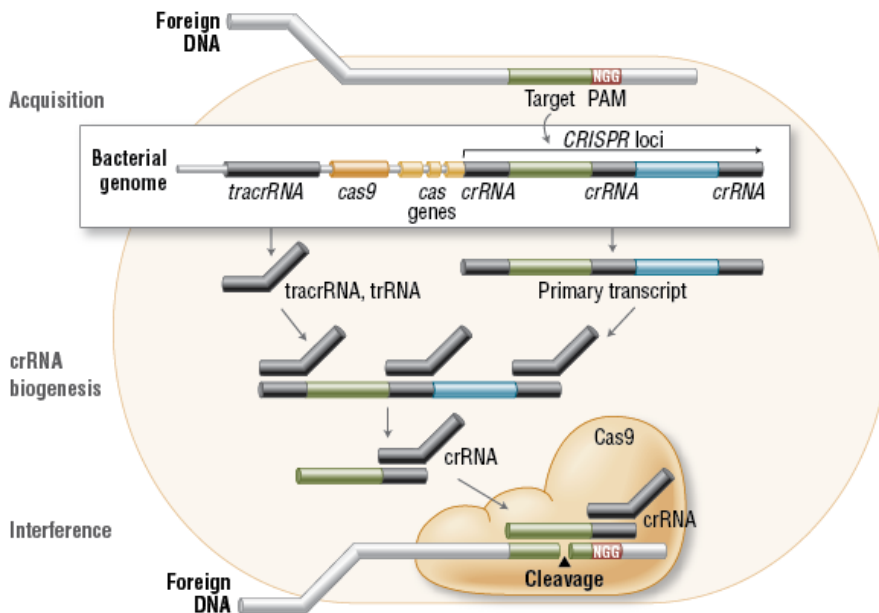


Figure 1 : Mécanisme de défense chez certaines bactéries par le système CRISPR/Cas9 [4]. Cas9 est une endonucléase, *crRNA* pour CRISPR RNA et *tracrRNA* pour trans-activating *crRNA*.

Ce système est aujourd'hui utilisé pour l'ingénierie du génome en combinant le *crRNA* et *tracrRNA* en un seul ARN guide appelé *sgRNA* [4]. Il permet de générer une cassure des deux brins sur la séquence cible. Cette cassure, initie la réparation de l'ADN soit en joignant les bouts non-homologues

(NHEJ) soit en réparant par recombinaison homologue (HDR) [4] comme montré à la Figure 2. La jonction d'extrémités non homologues est le mécanisme de réparation le plus actif mais il ne restaure pas la séquence initiale qui conduira soit à une délétion soit à une insertion [5]. La réparation par le mécanisme HDR est seulement utilisée lorsque une séquence d'ADN est homologue au locus cible [4].

Ce système a l'avantage d'être facile à manipuler ainsi que d'être plus efficace et plus spécifique que les autres outils pour l'ingénierie du génome [6]. La seule limite mise en évidence jusqu'à maintenant est l'obligation d'avoir une séquence PAM directement après en 3' de la séquence cible [6].

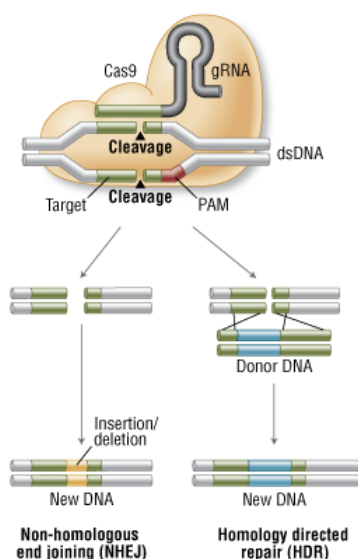


Figure 2 : Schéma illustrant le mécanisme du système CRISPR/Cas9 [4]

Ce nouveau système révolutionnaire a déjà été utilisé chez les eucaryotes et procaryote comme *E. coli*, humain, souris et poisson zèbre [2] mais jamais chez *Pseudomonas putida*.

1.2 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida est une bactérie gram négative vivant dans le sol, l'eau, les plantes et les animaux. Elle est très intéressante pour l'agriculture, la biocatalyse et la production de bioplastiques. Elle a l'avantage d'être GRAS et résistante au stress ainsi que d'être accessible à manipuler génétiquement. Le génome entier de cette souche a été séquencé et il fait 6'181'863 pb [7]. Son chromosome contient le gène *phaC1* et le gène *phaC2* qui sont deux synthèses impliquées dans la synthèse de la PHA. Ces deux gènes sont séparés par le gène *phaZ* codant pour la PHA dépolymérase [8] [9] comme montré à la Figure 3.

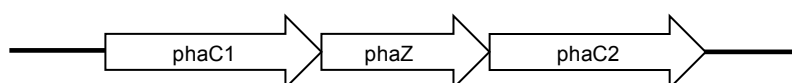


Figure 3 : Schéma illustrant la position des gènes *phaC1*, *phaC2* et *phaZ* dans le chromosome

La PHA (acide polyhydroxyalkanoïque) est une chaîne de carbone accumulée par certaine bactérie lorsqu'elles sont sous des conditions de croissance limitées. Ce biopolymère possède de bonnes propriétés thermoplastiques, biodégradabilité, biocompatibilité et d'autres traits qui attirent un intérêt académique et industriel considérable [8]. Mais la régulation du métabolisme de la PHA est complexe et très peu est connu sur la régulation de production de PHA au niveau physiologique et enzymatique [10].

Les bactéries *Pseudomonas* convertissent des intermédiaires d'acide gras ou de glucides en différents (R)-3-hydroxyacyl-CoAs à l'aide de la voie β -oxydation et la synthèse d'acide gras de novo. Ces métabolites sont ensuite utilisés par la PHA synthase pour les transformer en PHA composé d'acide gras (R)-3-hydroxy de 6 à 12 atomes de carbone (voir Figure 4). [10]

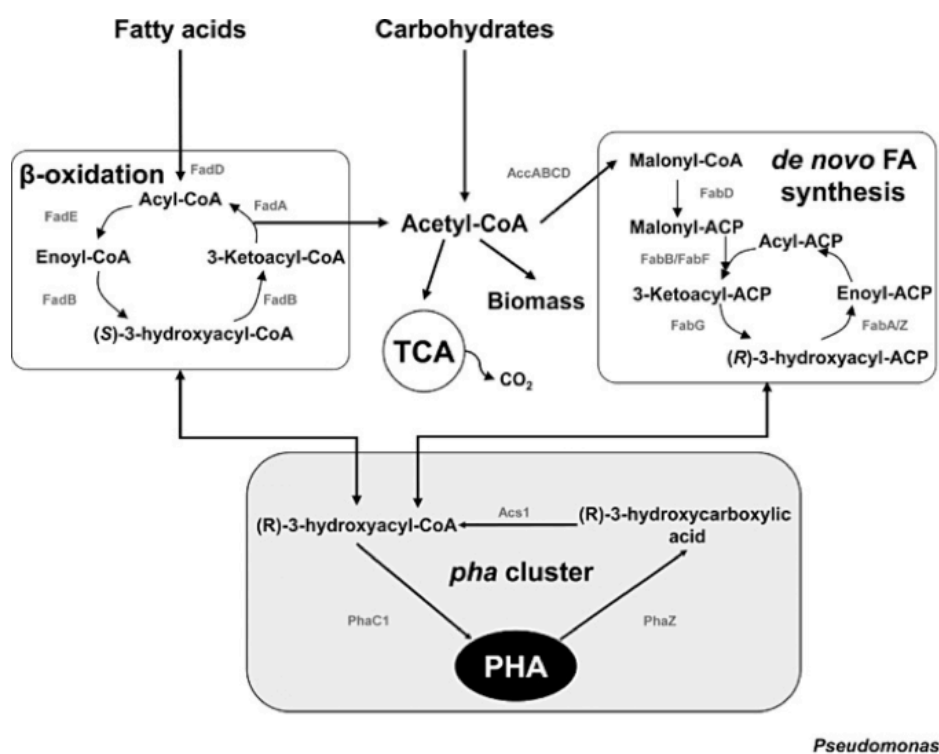


Figure 4 : Voie métabolique impliquant la biosynthèse de la PHA chez *Pseudomonas* [10]

1.3 Utilisation du système CRISPR/Cas9 chez *E. coli*

Une publication de 2015 par Yu Jiang et al. [11] a utilisé le système CRISPR/Cas9 dans *E. coli* pour réaliser des modifications précises du génome. Le système qu'ils ont développé a permis d'obtenir une efficacité de mutations élevée, c'est pourquoi il va être utilisé pour *Pseudomonas*.

Le système se base sur deux plasmides, le premier plasmide appelé pTargetF apporte le sgRNA et le deuxième appelé pCas apporte l'enzyme Cas9 comme montré à la Figure 5.

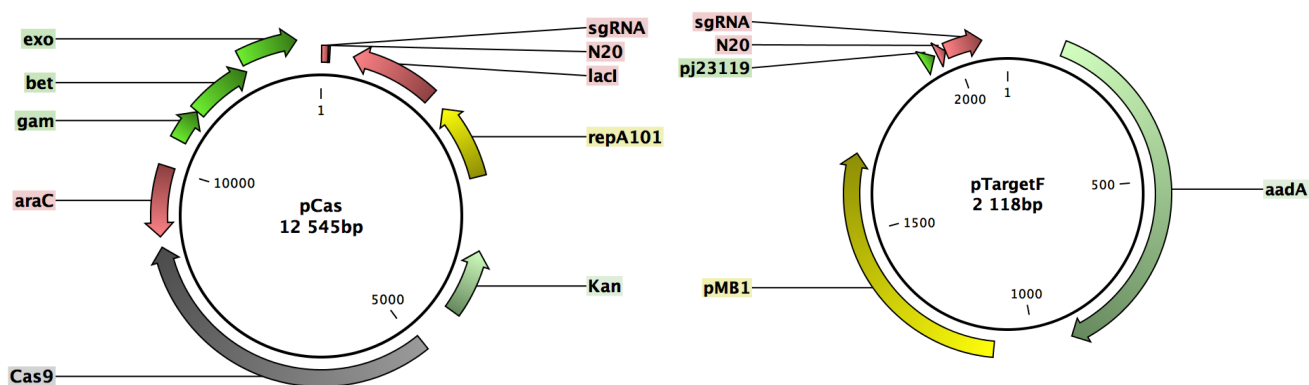


Figure 5 : Carte du plasmide pCas et pTargetF. Le pCas contient : le gène *cas9*, le système λ -red (*exo*, *bet*, *gam*) pour améliorer l'efficacité, un réplicon sensible à la température (*repA101*) pour éliminer le plasmide, une résistance à la kanamycine (*Kan*) et un sgRNA induit par arabinose guidant *cas9* vers le réplicon *pMB1* du pTargetF. Le pTargetF contient : un réplicon *pMB1*, une résistance à la spectinomycine (*aadA*), le gène *sgRNA* et le promoteur *pj23119*.

Le plasmide pCas contient les éléments génétiques suivant :

- Le système λ -red (recombination-déficient) qui vient du génome du bactériophage λ et contient trois gènes : *exo*, *bet* et *gam*. L'exonucléase *Exo* coupe les nucléotides à l'extrémité 3' d'un ADN double brin pour le rendre simple brin qui permet à *Bet* de se poser sur l'ADN simple brin et de le renaturer. *Gam* protège les produits intermédiaires de recombinaison contre les nucléases [12]. Ce système est présent sur le plasmide puisqu'il a été montré qu'il augmente l'efficacité du système CRISPR/Cas9 [11].
- Un sgRNA induit par arabinose qui guide l'enzyme *Cas9* vers l'origine de réplication du pTargetF pour l'éliminer.
- Le réplicon *repA101* qui est sensible à la température et qui permet d'éliminer le plasmide après que les modifications du génome ont été obtenues. La température optimale pour que le plasmide se réplique est de 30°C et il faut une température de 37°C minimale pour l'éliminer. [11]
- La résistance à la kanamycine permettant de sélectionner les souches avec le plasmide.
- Le gène codant pour l'endonucléase *Cas9*.

Le plasmide pTargetF contient le sgRNA qui guidera la *Cas9*, la résistance à la spectinomycine et l'origine de réplication *pMB1*.

1.4 But de ce travail de diplôme

Le but de ce travail est de développer le système CRISPR/Cas9 chez *Pseudomonas putida* KT2440 afin de modifier son génome.

Ce système va être développé sur le même principe que pour *E. coli* publié par Yu Jiang et al. [11] qui se base sur deux plasmides.

La résistance et l'origine de réplication de ces deux plasmides vont être testé chez *Pseudomonas putida*. Suite aux résultats obtenus, les deux plasmides seront construits en réalisant des digestions avec des enzymes de restrictions ou des PCR.

2 Matériel et méthode

2.1 Souches, plasmides et primer utilisés

Les plasmides utilisés pour ce travail sont répertoriés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Plasmides utilisés lors de ce travail

Plasmide	Réplicon	Caractéristiques	Référence
pBBR RESO	pBBR1	6'817 pb ; <i>Cm^R</i> , <i>Kan^R</i> , <i>Rep</i> , <i>mob</i>	MoBiTec [13]
pVLT31	RSF1010	10'000 pb ; <i>Tc^R</i> , <i>repA</i> , <i>repB</i> , <i>repC</i> , <i>lacIq/P_{tac}</i> , MCS de pUC18	[14]
pSEVA521	RK2	4'200 pb ; <i>Tc^R</i> , <i>trfA</i> , <i>OriT</i> , MCS	SEVA collection Team
pSEVA551	RSF1010	5'640 pb ; <i>Tc^R</i> , <i>repC</i> , <i>repA</i> , <i>repB</i> , <i>OriT</i> , MCS	SEVA collection Team
pCas	RepA101ts	12'545 pb ; <i>Kan^R</i> , <i>lacI^q</i> <i>P_{trc}-sgRNA-pMB1</i> , <i>P_{araB-Red}</i> , <i>Cas9</i>	[11]
pTargetF	pMB1	2'117 pb ; <i>aadA</i> , <i>pj23119</i> , N20, <i>sgRNA</i>	[11]
pTargetP	RK2	4'298 pb ; <i>Tc^R</i> , <i>trfA</i> , <i>OriT</i> , <i>sgRNA</i>	Ce travail
pCasPd	pBBR1 et RepA101ts	13'498 pb ; <i>Kan^R</i> , <i>lacI^q</i> <i>P_{trc}-sgRNA-pBBR RESO</i> , <i>P_{araB-Red}</i> , <i>Cas9</i>	Ce travail
pCasPa	pBBR1	11'833 pb ; <i>Kan^R</i> , <i>lacI^q</i> <i>P_{trc}-sgRNA-pBBR RESO</i> , <i>P_{araB-Red}</i> , <i>Cas9</i>	Ce travail

Les souches utilisées pour ce travail sont répertoriées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Souches utilisées lors de ce travail

Souche	Génotype	Génome N° GenBank	Référence
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	—	Invitrogen
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>rmo⁻</i> , <i>mod⁺</i> , PHA ⁺	AE015451.2	ATCC [15]

Les primer utilisés lors de ce travail sont répertoriés dans le Tableau 3. Ils ont tous été commandés chez Microsynth (Balgach, CH). Les nucléotides en minuscule des primer Q5SDM_targetP et Q5SDM-N20 représentent les 20 nucléotides du sgRNA et ceux en italique représentent des sites de restrictions. La température de fusion (T_m) donnée dans ce tableau provient de l'outil Primer3Plus [16].

Tableau 3 : Primer utilisés lors de ce travail

Nom	Séquence 5'→3'	Tm [°C]	Utilisation
Rep-F	ATGTACTACGTAAAGTGAAGGCGGGTCAAG	62.5	Isoler origine de réplication du pBBR RESO
Rep-R	ATGTACGCGGCCGCAAGGTATAGGGCGGCGAGG	63.6	
521MCS-F	TGATCCCCCGCAGAAAAA	62.5	Amplifier MCS du pSEVA521
521MCS-R	AATTATTGGGGACCCCTGGAT	62.6	
Q5SDM_targetP-F	tgatctttaagTTTTAGAGCTAGAAATAGC	56	Substituer le N20 du pTargetP
Q5SDM_targetP-R	gcaacggcgctACTAGTATTATACCTAGGAC	56	
pBBR-Rep-F	ATGATGACTAGTAAGTGAAGGCGGGTCAAG	62.5	Isoler origine de réplication du pBBR RESO
pBBR-Rep-R	ATGATGGCGGCCGCAAGGTATAGGGCGGCGAGG	63.6	
pCas-Del-F	ATGATGGCGGCCGCGGTCTGACAGTTACGTTTC	60	Eliminer RepA101 du pCas
pCas-Del-R	ATGATGACTAGTCGCGGTATGGCATGATAG	64	
Q5SDM-N20-F	cgttctacgaTGTGTGAAATTGTTATCCG	57	Substituer le N20 du pCasPa ou pCasPd
Q5SDM-N20-R	tgaaggtgatTTTTAGAGCTAGAAATAGC	56	

2.2 Conditions de croissances

Escherichia coli a été mis en culture dans du milieu LB (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L) à 37°C et 180 rpm. Par contre, elle a été incubée à 30 °C et 180 rpm si la souche contenait le plasmide pCas qui est thermosensible.

Pseudomonas putida KT2440 a croît aussi dans du milieu LB mais à 30°C et 180 rpm.

Les antibiotiques suivant ont été ajoutés dans le milieu pour *P. putida* et *E. coli* dépendant de la résistance du plasmide : kanamycine 50 µg/ml, spectinomycine 50 µg/ml, tetracycline 25 µg/ml, chloramphenicol 25 µg/ml.

2.3 Transformation de *P. putida* KT2440 par électroporation

La méthode de Qin Wang et al. [17] a été utilisée pour faire la transformation par électroporation de *P. putida* KT2440 mais quelques modifications ont été faites :

Préparation des cellules compétentes : Les cellules ont été isolées sur une plaque LB agar (agar 15 g/L, tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L) puis incubé overnight à 30 °C. Quelques colonies ont été transférée dans 15 ml de glycérol 15% stérile jusqu'à obtenir un OD₆₀₀ de 0.4. Ensuite, la

suspension de cellule a été centrifugée 2 min à 5'000 rpm et le surnageant a été enlevé. Le culot a été lavé 3 fois avec 5 ml de glycérol 15% stérile. Finalement, le culot a été resuspendu dans 1.5 ml de glycérol 15% stérile (100 µl/ml de suspension) puis 100 µl ont été distribués dans 15 tubes eppendorf de 1.5 ml. Les manipulations ont été faites sur glace et les cellules compétentes ne peuvent pas être stockée au congélateur.

Transformation par électroporation : 20 ng d'ADN ont été ajoutés dans 100 µl de cellules compétentes, puis la suspension d'ADN et de cellules ont été transférées dans une cuvette d'électroporation de 2 mm sur glace. Les cuvettes ont été pulsées à 25µF, 200Ω et 2500V avec le GenePulser Xcell™ de BIO-RAD. Immédiatement après le pulse, 1ml de milieu SOC (2 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 0.05 % NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 20 mmol/L glucose) ont été ajoutés dans les cuvettes. La mixture de cellules a été transférée dans un tube eppendorf de 1.5 ml puis incubée 1h à 30°C et 300 rpm. Après l'incubation, 100 µl de la mixture de cellules ont été étalées sur plaque LB agar puis incubé overnight à 30°C.

2.4 Digestion avec des enzymes de restrictions

La digestion avec les différentes enzymes de restrictions provenant toutes de New England Biolabs (NEB) a été réalisée dans un volume final de 20 µl. Les concentrations, les conditions ainsi que le tampon ont été choisi selon la recommandation de NEB.

2.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Les primer ont été choisis grâce à l'outil primer3plus.

Les réactions ont été faites dans un volume final de 20 µl lorsque l'ADN polymérase phusion high fidelity (NEB ; N°art : M0530L) a été utilisée. La concentration des différents réactifs et les conditions de PCR ont été suivies selon les recommandations de NEB pour l'ADN polymérase phusion. La température d'hybridation a été déterminée grâce à l'outil Tm calculator de NEB.

Lors de la colony PCR, une colonie est isolée sur plaque à l'aide d'un cure dent stérile puis le cure dent est placé dans un tube 1.5 ml contenant 60 µl d'eau PCR. L'eau PCR avec la colonie est ensuite chauffée 5 min à 99°C puis 1 µl est ajouté dans le reste des réactifs pour la PCR. L'ADN polymérase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems ; N°art : 4311820) a été utilisé pour la réaction PCR dans un volume final de 25 µl. La concentration des réactifs et les conditions ont été suivi selon le protocole de la HES-SO//Valais.

2.6 Electrophorèse

Le gel d'agarose a été préparé avec l'agarose (Lonza ; N°art : 5001), le TBE 1x à pH 8.4 (Tris base 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 1 mM) et 0.05 mg de bromure d'éthidium. L'échantillon a été mélangé avec le tampon de charge (concentration finale 1x) pour charger sur gel et le marqueur ADN 100 pb (Fermentas ; N°art : SM0242) ou 1 kb (Fermentas ; N°art : SM0311) ont été utilisés. La migration a été fait à 140V pour un gel de 100 ml et de 120V pour un gel de 50 ml.

2.7 Purification sur gel d'agarose

La purification d'un fragment ou d'un plasmide a été fait à l'aide du kit Monarch DNA gel extraction (NEB ; N°art : T1020S). Le gel a été préparé comme expliqué au point 2.6 électrophorèse et les manipulations ont été suivi selon le protocole du fournisseur.

2.8 Ligation

La ligation a été réalisé avec l'ADN ligase T4 (NEB ; N°art : M0202S) et la concentration des réactifs ainsi que les conditions ont été suivies selon la recommandation de NEB. Après l'incubation recommandé pour la ligation, l'enzyme a été inactivé à 65°C durant 20 min.

2.9 Transformation de *E. coli* TOP10 par heat shock

Les cellules *E. coli* TOP10 ont été préparées et transformées en suivant le protocole de la HES-SO//Valais [18].

2.10 Extraction de plasmide

Les plasmides ont été extraits de *E. coli* TOP10 à l'aide du kit Monarch Miniprep plasmide (NEB ; N°art : T1010L). Le protocole du fournisseur a été suivi.

2.11 Substitution de nucléotide

La substitution de nucléotides sur un plasmide a été fait à l'aide du kit Q5 site-directed mutagenesis (NEB ; N°art : E0554S). Le protocole donné par le fournisseur a été suivi sauf pour la transformation. La transformation a été faite avec des cellules compétentes préparées à la HES-SO//Valais et le protocole de transformation par heat shock de la HES-SO//Valais a été suivi.

3 Résultats

3.1 Test de la transformation par électroporation de *Pseudomonas putida* KT2440

La méthode de transformation par électroporation de Wang Q. et al. [17] a été testé sur *P. putida* KT2440 car aucune méthode de transformation n'a été établi pour cette souche à la HES-SO//Valais. Les cellules ont été préparées de la même manière et toujours sur glace sauf qu'à la fin, elle ont été congelées à -80°C. Le lendemain, elles ont été décongelées sur glaces durant 5 min puis l'ADN a été ajouté. Après 10 min d'incubation, elles ont été pulsées dans une cuvette de 2 mm à 2500V, 25µF et 200Ω car l'appareil ne permettait pas de changer les 25 µF à 36 µF comme les paramètres utilisés par la publication. L'électroporation a été réalisée avec trois masses différentes d'ADN : 5 ng, 10 ng et 20 ng. Directement après le pulse, 1 ml de milieu SOC a été ajouté puis cette suspension a été incubée 1h à 30°C. Après 1h d'incubation à 30°C, 100 µl a été étalés sur plaque contenant soit 50 µg/ml de kanamycine pour le pBBR-RESO, soit 25 µg/ml de tétracycline pour le pVLT31. Après une nuit d'incubation à 30°C, les colonies ont été comptées.

Le résultat de l'efficacité de la transformation avec les trois différentes masses d'ADN sont regroupés dans le Tableau 4 ci dessous.

Tableau 4 : Nombre de colonies obtenu après transformation de *P. putida* KT2440 par électroporation avec pBBR RESO et pVLT31. L'unité est le nombre de colonies/ μg de plasmides.

	Transformation avec 5 ng de plasmides	Transformation avec 10 ng de plasmides	Transformation avec 20 ng de plasmides
pBBR RESO	$9.5 \cdot 10^4$	$2.1 \cdot 10^5$	$2.6 \cdot 10^6$
pVLT31	$2.2 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$	$8.3 \cdot 10^5$

Aucune colonie n'était présente pour le contrôle négatif donc il n'y a pas eu de contaminations. Le tableau ci-dessus montre une meilleure efficacité avec 20 ng d'ADN en obtenant environ 10 fois plus de colonies qu'avec 10 ng et environ 30 à 40 fois plus de colonies qu'avec 5 ng.

3.2 Test de la résistance à la kanamycine et à la spectinomycine dans *P. putida* KT2440

3.2.1 Digestion des plasmides pCas et pTargetF pour récupérer leur résistance et l'introduire dans pVLT31

Afin de vérifier si les résistances du pCas et du pTargetF fonctionnent chez *P. putida* KT2440, le plasmide pCas et pTargetF ont été digérés pour récupérer leur résistance et les introduire dans le plasmide pVLT31. Le pCas et pTargetF n'ont pas été directement transformés dans la bactérie car leur origine de répllication ne fonctionne peut être pas dans cette souche et aucune information n'a été trouvé à ce propos dans la littérature. Le pCas a été digéré avec *Pst*I-HF/*Sph*I-HF dans le tampon Cutsmart donnant normalement cinq fragments (5188 pb, 2926 pb, 2511 pb, 1673 pb et 247 pb). Le fragment à 2926 pb codant pour la résistance à la kanamycine a été récupéré sur gel. Le pTargetF a été digéré avec les enzymes de restrictions *Bam*HI/*Mlu*I dans le tampon NEB 3.1 donnant 2 fragments (1173 pb et 945 pb). Le fragment de 1173 pb codant pour la spectinomycine a été récupéré sur gel. Les deux digestions ont été faite à 37°C durant 2h. Le pVLT31 a été digéré avec les mêmes enzymes de restrictions afin de pouvoir introduire le fragment par ligation. Le résultat de la digestion est montré à la Figure 6 ci-dessous.

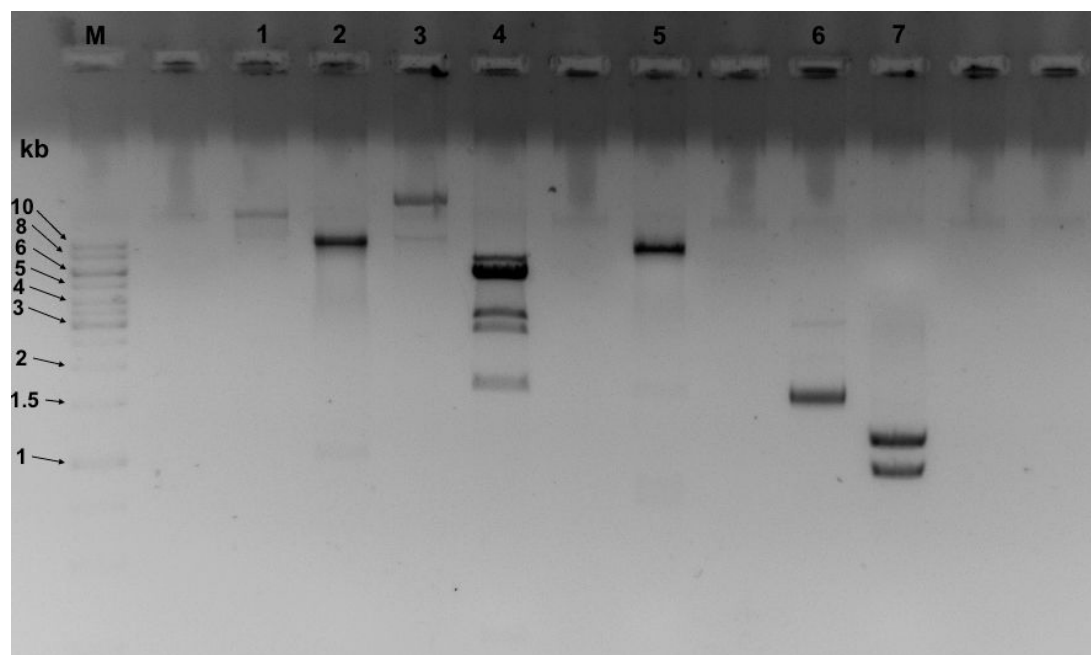


Figure 6 : Gel électrophorèse 0.8% de la digestion des plasmides pVLT31, pCas et pTargetF. M : Marqueur 1kb, 1 : pVLT31 non digéré, 2 : pVLT31 digéré avec *PstI*-HF/*SphI*-HF, 3 : pCas non digéré, 4 : pCas digéré avec *PstI*-HF/*SphI*-HF, 5 : pVLT31 digéré avec *BamHI*/*MluI*, 6 : pTargetF non digéré, 7 : pTargetF digéré avec *BamHI*/*MluI*.

Une bande vers 10 kb est observée pour le pVLT31 digéré avec *PstI*-HF/*SphI*-HF ainsi qu'avec *BamHI*/*MluI*, ce qui correspond à la taille théorique. Cinq bandes sont observées pour le pCas digéré avec *PstI*-HF/*SphI*-HF, la première bande depuis le haut ne correspond pas à une des tailles attendues. Cette première bande correspond à du plasmide non digéré et la bande à 247 pb n'est pas assez intense pour être visible sur la photo. Une bande vers 1.2 kb et une autre vers 0.9 kb sont observées pour le pTargetF digéré avec *BamHI*/*MluI*, ce qui correspond aux tailles attendues.

Pour la ligation de l'insert provenant du pTargetF dans le pVLT31, 18 ng de vecteur ont été utilisés avec 6.6 ng d'insert pour un ratio 3 :1. La ligation de l'insert provenant du pCas dans le pVLT31, 16.3 ng de plasmide ont été utilisés avec 14.2 ng d'insert pour un ratio 3 :1. La ligation a été réalisée durant 2h à température ambiante à l'aide de l'ADN T4 ligase.

3.2.2 Transformation par électroporation dans *P. putida* KT2440

Les plasmides construits précédemment ont été transformés dans *P. putida* KT2440 par électroporation. Les paramètres utilisés sont les mêmes que utilisé pour tester la méthode de transformation. La souche transformée avec le plasmide pVLT31 contenant la résistance à la kanamycine a été étalée sur une plaque contenant 50 µg/ml de kanamycine et une autre contenant 100 µg/ml. Des cellules compétentes ont été transformées sans plasmide puis étalées sur les différentes plaques contenant soit kanamycine ou spectinomycine qui servira de contrôle négatif. La souche transformée avec le plasmide pVLT31 contenant la résistance à la spectinomycine a été étalée sur une plaque contenant 50 µg/ml et 100 µg/ml de spectinomycine. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Transformation de *P. putida* KT2440 avec pVLT31 contenant soit la résistance à la kanamycine de pCas soit la résistance à la spectinomycine de pTargetF

Conc. d'antibio. [µg/ml]	Contrôle négatif avec spectinomycine	<i>P. putida</i> pVLT31 avec résistance à la spectinomycine	Contrôle négatif avec kanamycine	<i>P. putida</i> pVLT31 avec résistance à la kanamycine
50	Tapis de bactéries	Tapis de bactéries	0	5
100	Tapis de bactéries	Tapis de bactéries	0	3

Un contrôle positif a été fait en transformant *P. putida* avec 5 ng de pVLT31. 15 colonies ont poussé sur la plaque contenant 25 µg/ml de tétracycline. Ce résultat permet de confirmer que la transformation a fonctionné. Les résultats du tableau 5 montre que *P. putida* KT2440 n'est pas sensible à la spectinomycine à 50 µg/ml et 100 µg/ml en obtenant un tapis de bactéries sur le contrôle négatif et sur les plaques avec la souche contenant la résistance à la spectinomycine. Les résultats du tableau ci-dessus montre aussi que la résistance à la kanamycine fonctionne chez *P. putida* en obtenant trois à cinq colonies. Il montre finalement que la souche est sensible à la kanamycine à 50 µg/ml et 100 µg/ml en obtenant aucune colonie sur le contrôle négatif.

Pour confirmer que la souche n'est pas sensible à la spectinomycine, la souche a été isolée sur une plaque avec 100 µg/ml de spectinomycine ainsi que mise en culture avec aussi 100 µg/ml de spectinomycine. La plaque et la culture ont été incubées overnight à 30°C. Les résultats obtenus se trouvent à la Figure 7.

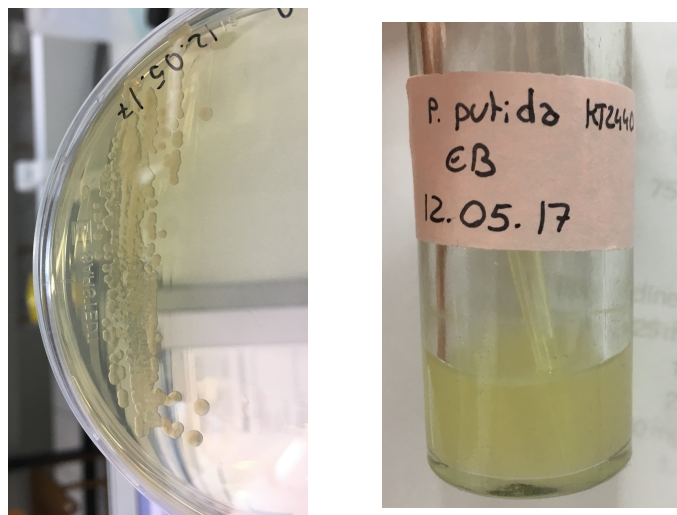


Figure 7 : A gauche, *P. putida* KT2440 sur LB agar contenant 100 µg/ml de spectinomycine et à droite, *P. putida* KT2440 dans LB broth contenant 100 µg/ml de spectinomycine

La Figure 7 montre que des colonies ont poussées sur la plaque avec spectinomycine et que la culture est devenue trouble. Ces résultats permettent de confirmer que la souche *P. putida* KT2440 sans plasmide est naturellement résistante à la spectinomycine jusqu'à 100 µg/ml.

3.3 Test de l'origine de réplication *repA101ts*

La résistance à la kanamycine du plasmide pCas fonctionne dans *P. putida* KT2440 ainsi elle a été transformée avec le plasmide pCas. La souche transformée a été ensuite incubée overnight à 30°C sur une plaque contenant 50 µg/ml de kanamycine. Ceci permettra de savoir si l'origine de réplication *repA101ts* du plasmide pCas fonctionne dans *P. putida*. La transformation a été faite aux mêmes conditions que faite durant le test de la méthode. La souche a été aussi transformée avec pBBR RESO comme contrôle positif et sans plasmide comme contrôle négatif.

12 colonies ont été comptées pour le contrôle positif et zéro colonie pour le contrôle négatif ainsi que pour la souche transformée.

Le nombre de colonies pour le contrôle positif est 10x plus bas que le test fait la première fois alors que les cellules compétentes sont les mêmes que utilisées durant le test. La seule différence, c'est que ces cellules compétentes ont été congelées plus longtemps. Le résultat montre aussi que l'origine de réplication du pCas ne fonctionne pas chez *P. putida* en n'obtenant aucune colonie. Pour être sûre que l'origine de réplication ne fonctionne pas dans cette souche et que ce n'est pas dû au fait que l'efficacité de la transformation est diminuée par la congélation des cellules compétentes, la transformation a été refait avec des cellules compétentes faites le jour même.

Cette fois ci, plus de 300 colonies ont été comptées pour le contrôle positif et toujours aucune pour le contrôle négatif ainsi que la souche transformée.

Le résultat montre que la congélation des cellules compétentes diminue l'efficacité en obtenant plus de 300 colonies. Ce résultat est 3 fois supérieur au test fait avec des cellules compétentes congelées une nuit et 25 fois supérieur au résultat obtenu avec des cellules congelées durant 7 jours. Les résultats obtenus confirment une deuxième fois que l'origine de réplication du pCas ne fonctionne pas dans *P. putida* en n'obtenant aucune colonie.

3.4 Transformation de *P. putida* KT2440 avec pSEVA551 et pSEVA521

Les plasmides pSEVA551 et pSEVA521 ont été transformés dans *P. putida* KT2440 afin de vérifier qu'ils fonctionnent dans cette souche. Les cellules électrocompétentes ont été réalisées le même jour que la transformation. Deux contrôles négatifs ont été réalisés avec une plaque avec kanamycine pour le pSEVA551 et une autre avec tétracycline pour le pSEVA521.

Plus de 300 colonies ont été comptées pour le contrôle positif ainsi que les deux souches transformées. Aucune colonie n'a été observée sur les deux contrôles négatifs.

Le résultat obtenu montre que la transformation a fonctionné en obtenant plus de 300 colonies pour le contrôle positif. Les deux nouveaux plasmides fonctionnent dans *P. putida* en obtenant plus de 300 colonies. Il montre aussi qu'il n'y a pas eu de contamination en n'obtenant aucune colonie sur les contrôles négatif.

3.5 Construction du plasmide pTargetP

3.5.1 Digestion du pSEVA521 et pTargetF avec *Bam*HI-HF et *Hind*III-HF

Le plasmide appelé pTargetP qui permettra d'introduire le sgRNA dans *P. putida* KT2440 a été construit en introduisant le promoteur pj23119, N20 et le sgRNA du pTargetF dans le plasmide pSEVA521. Pour récupérer la partie codant le promoteur, le N20 et le sgRNA du pTargetF, le plasmide pTargetF a été digéré avec *Bam*HI-HF et *Hind*III-HF dans le tampon Cutsmart durant 2h à 37 °C afin d'obtenir un fragment de 1950 pb et un de 168 pb. Le fragment de 168 pb code pour le N20, sgRNA et le promoteur pj23119 et va être purifié sur gel. Le plasmide pSEVA521 a aussi été digéré avec *Bam*HI-HF et *Hind*III-HF durant 2h à 37 °C afin d'obtenir une bande à 30 pb et une à 4130 pb. Le fragment de 4130 pb va être purifié sur gel car celui-ci code pour le plasmide pSEVA521. Les deux plasmides utilisés ainsi que le nouveau plasmide se trouvent à la Figure 8.

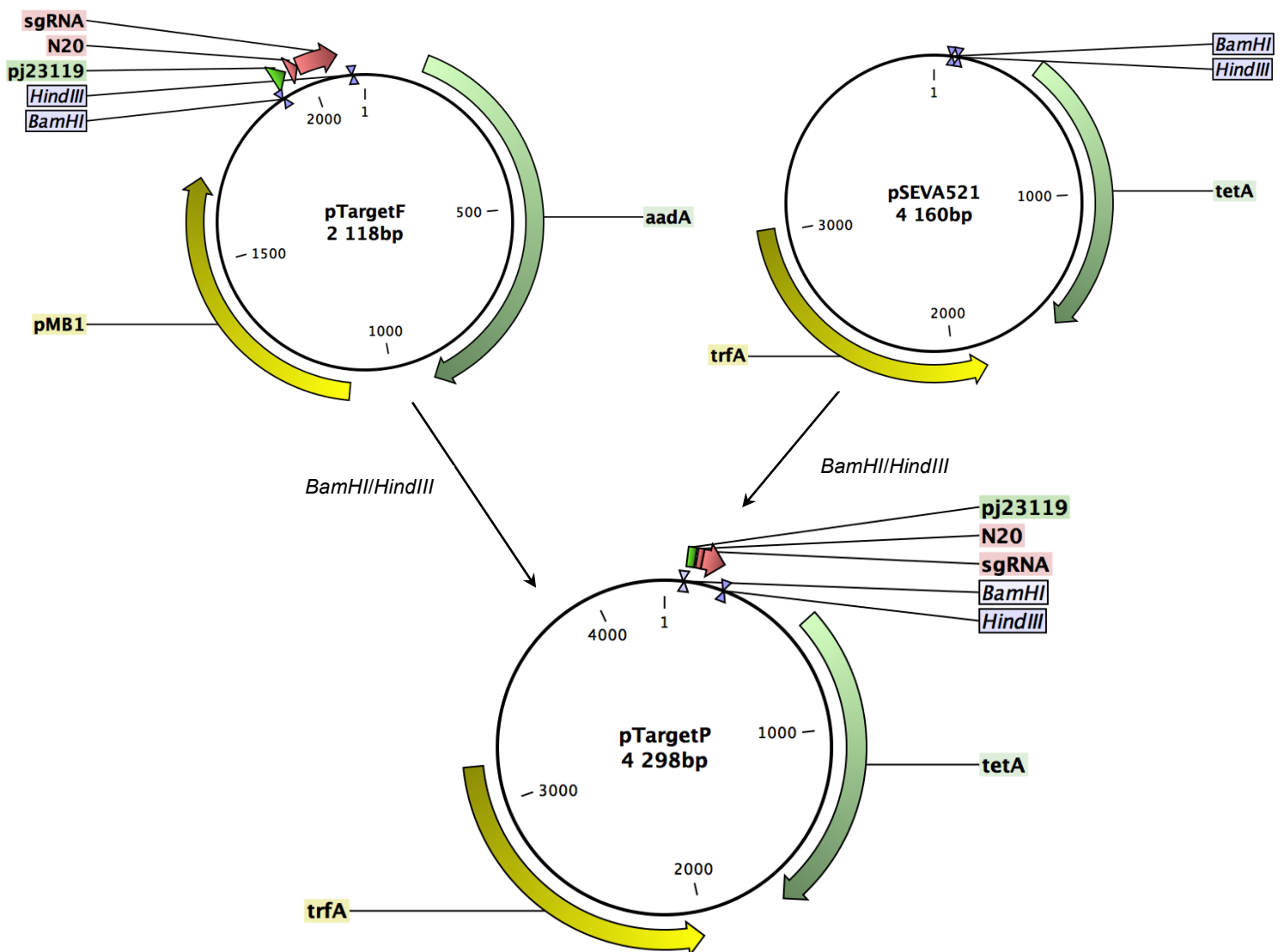


Figure 8 : Construction du plasmide pTargetP à l'aide du pTargetF et pSEVA521

Le résultat obtenu de la digestion est représenté sur un gel d'agarose 1% à la Figure 9.

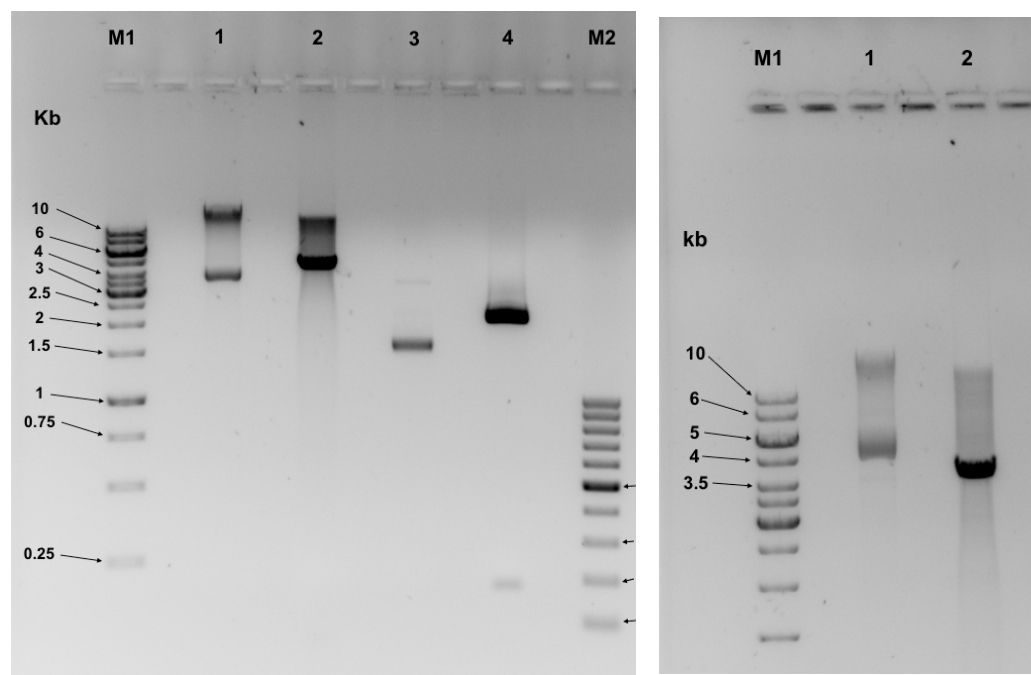


Figure 9 : A gauche, 1h de migration de la digestion du pSEVA521 et pTargetF avec *Bam*HI-HF/*Hind*III-HF. M1 : marqueur 1kb, 1 : pSEVA521 non digéré, 2 : pSEVA521 digéré avec *Bam*HI-HF/*Hind*III-HF, 3 : pTargetF non digéré, 4 : pTargetF digéré avec *Bam*HI-HF/*Hind*III-HF, M2 : marqueur 100pb. A droite, 1h30 de migration de la digestion du pSEVA521. M1 : marqueur 1kb, 1 : pSEVA521 non digéré, 2 : pSEVA521 digéré avec *Bam*HI-HF/*Hind*III-HF.

Deux bandes sont observées sur la figure de gauche pour le plasmide pSEVA521 digéré avec *Bam*HI-HF/*Hind*III-HF, la première bande depuis le haut ne correspond pas à une des tailles attendues et correspond à du plasmide non digéré. La deuxième, correspond à la taille théorique qui est encore plus visible sur la figure de droite. Deux bandes sont observées pour le pTargetF digéré avec *Bam*HI-HF/*Hind*III-HF qui correspond aux tailles attendues.

Une ligation a été réalisée à l'aide de la T4 DNA ligase avec le vecteur pSEVA521 et l'insert provenant du pTargetF durant 2h à température ambiante. Un ratio 3 :1 a été utilisé pour la ligation avec 75 ng de vecteur et 8.8 ng d'insert.

3.5.2 Transformation du pTargetP dans *E. coli* TOP10

Après une incubation overnight à 37°C, il n'y avait aucune colonie sur les plaques avec le plasmide pTargetP et juste 3 colonies pour le contrôle positif. Les plaques ont été mises une nuit de plus à 37°C. Les résultats après deux nuits à 37°C sont représentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Nombre de colonies après transformation de *E. coli* TOP10 avec pTargetP après 2 nuits à 37°C

	Contrôle négatif	Contrôle positif avec pSEVA551	<i>E. coli</i> TOP10 pTargetP 1	<i>E. coli</i> TOP10 pTargetP 2
Nombre de colonies	0	312	10	13

Le tableau ci-dessus montre que la transformation a fonctionné avec 312 colonies pour le contrôle positif. Il montre aussi que la ligation a fonctionné en obtenant 10 colonies et 13 colonies pour *E. coli* avec le nouveau plasmide. Aucune contamination n'a eu lieu durant les manipulations car aucune colonie n'est visible sur le contrôle négatif.

3.5.3 Vérification du clonage par colonie PCR

Pour vérifier que les colonies obtenues sur les plaques contiennent bien le plasmide pTargetP et pas le pSEVA521, une colonie PCR a été réalisée avec les primer 521MCS-F et 521MCS-R qui amplifient le MCS du pSEVA521 (voir Figure 10).

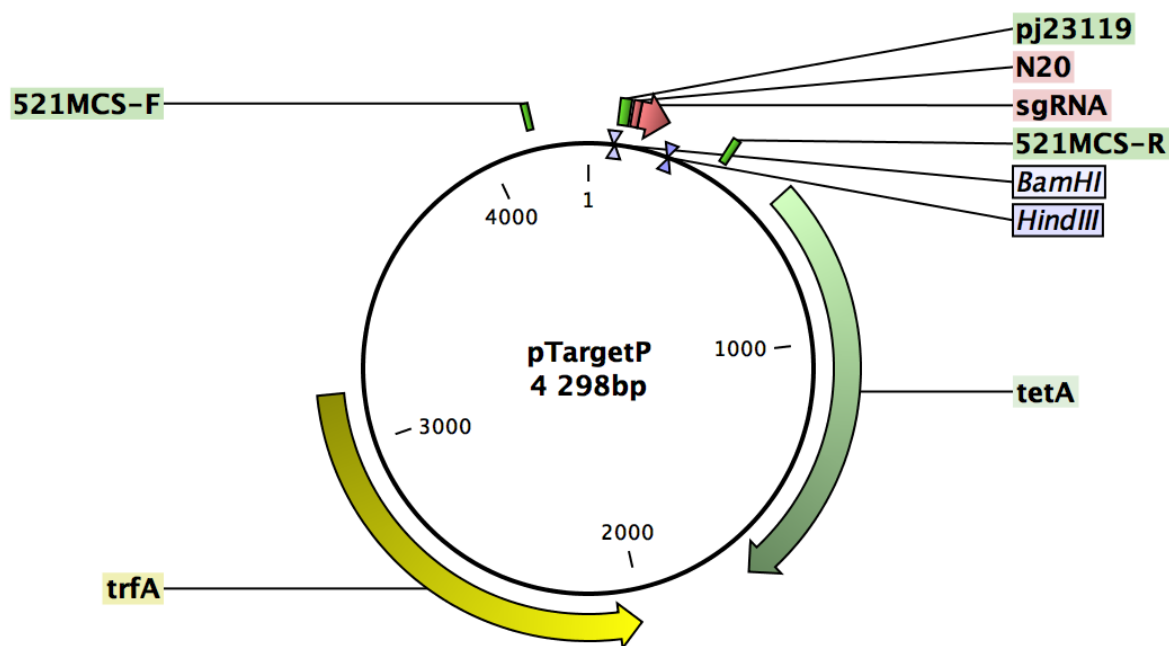


Figure 10 : Carte du pTargetP avec les primers pour la colonie PCR

La PCR a été faite avec l'ADN polymérase ampliTaq Gold et aux conditions suivantes :

Préincubation	10 min à 95°C	} 35 cycles
Dénaturation	50 sec à 95°C	
Hybridation	65 sec à 50°C	
Elongation	60 sec à 72°C	
Elongation final	10 min à 72°C	

Si les colonies contiennent le pSEVA521 avec l'insert appelé pTargetP, la bande devrait avoir une taille théorique de 578 pb. Par contre, si les colonies contiennent le pSEVA521 sans l'insert, la bande devrait théoriquement être à 440 pb. Le contrôle positif correspond au pSEVA521 pure sans transformation et devrait ainsi avoir une taille de 440 pb. Le contrôle négatif correspond à de l'eau PCR. Les résultats de la colonie PCR se trouvent à la Figure 11.

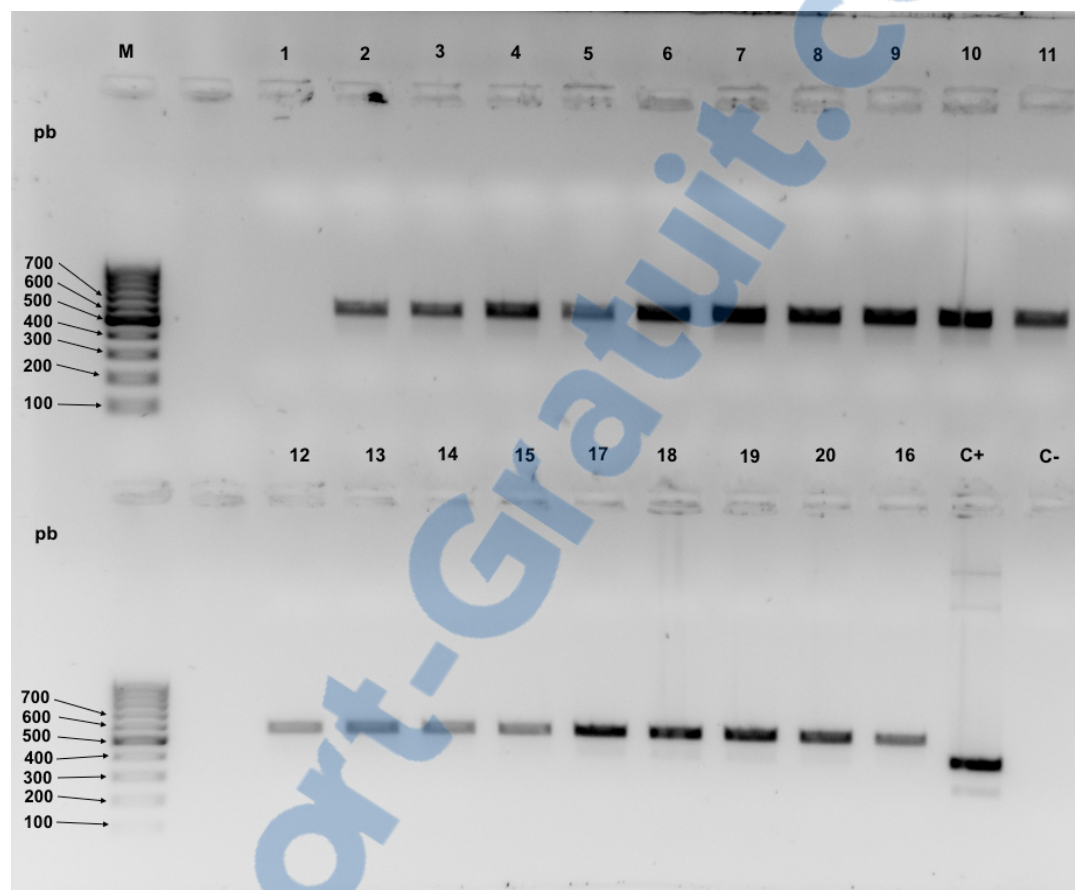


Figure 11 : Colony PCR pour vérifier si le plasmide contient l'insert. M : marqueur 100 pb, 1 à 20 : amplification du plasmide dans 20 colonies différentes, C+ : pSEVA521, C- : contrôle négatif

Les résultats obtenus montrent que les 20 colonies sélectionnées ont l'insert avec une bande vers 600 pb qui correspond à la taille attendue et qui est plus haute que le contrôle positif. Le contrôle positif à une bande vers 450 pb qui correspond à la taille théorique.

3.5.4 Contrôle du plasmide pTargetP

Pour être sûre d'avoir le bon plasmide, pTargetP a été extrait de la colonie 4, 8, 14 et 18 puis digéré avec les enzymes de restrictions *EcoRV*-HF/*SspI*-HF dans le tampon Cutsmart durant 2h à 37°C. Il devrait théoriquement avoir une bande à 3042 pb et une autre à 1256 pb. Le résultat obtenu se trouve sur le gel de la Figure 12.

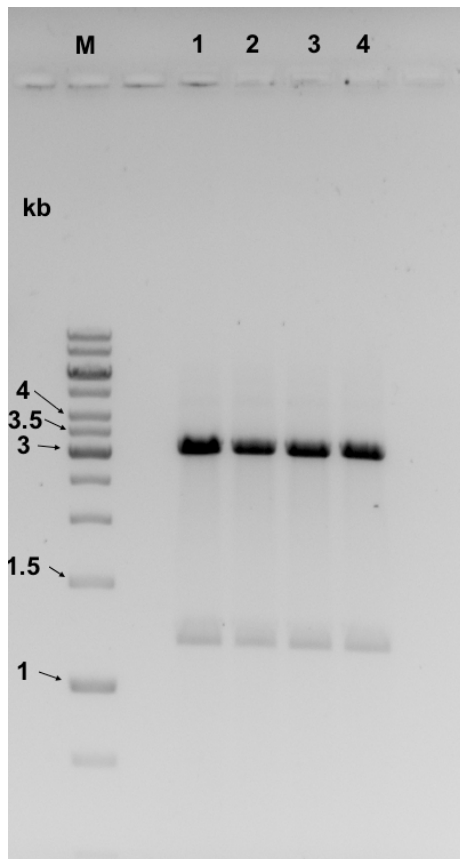


Figure 12 : Résultat de la digestion de pTargetP avec *EcoRV*-HF/*SspI*-HF. M : marqueur 1kb, 1 : digestion de pTargetP avec *EcoRV*-HF/*SspI*-HF (colonie 4 de la colony PCR), 2 : digestion de pTargetP avec *EcoRV*-HF/*SspI*-HF (colonie 8 de la colony PCR), 3 : digestion de pTargetP avec *EcoRV*-HF/*SspI*-HF (colonie 14 de la colony PCR), 4 : digestion de pTargetP avec *EcoRV*-HF/*SspI*-HF (colonie 18 de la colony PCR).

La figure ci-dessus, montre une bande vers 3 kb et une autre vers 1.3 kb pour les quatre pTargetP digéré avec *EcoRV*-HF/*SspI*-HF qui correspond aux tailles attendues.

3.5.5 Substitution des 20 nucléotides de pTargetP ciblant la PHA dépolymérase

Les 20 nucléotides appelés N20 du sgRNA ont été substitués par 20 nucléotides ciblant le gène de la PHA dépolymérase (*phaZ*) à l'aide du kit Q5 site-directed mutagenesis. Les 20 nucléotides choisis se trouvent de 85 à 104 pb du gène *phaZ* directement suivi par la séquence PAM CGG qui est montré à la Figure 13.

5'-
 ATGCCGCAACCCTATATTTTCAGGACCGTCGAGCTGGACAACCAGTCCATCCGCACC
 GCTGTTGCCCCGCAAGCCGCACCTG**ACGCCGTTGCTGATCTTTAACGG**CATCGGC
 GCCAACCTCGAGCTGGTGTTCCTCGTTTCATCGATGCACTTGACCCGGACCTGGAAGTC
 ATCGCCTTTGATGTGCCCGGGGTCGGCGGCTCGTCTACGCCACGCAACCCGTACCGC
 TTCCCTGGGCTGGCCAAGCTGACCGCGCGGATGCTCGACTACCTCGACTACGGCCAG
 GTCAACGTGATCGGCGTGTCTTGGGGCGGCGCCCTGGCCAGCAGTTTGTCTACGAT
 TACCCCGAGCGCTGCAAGAAGCTGGTGTGGATGATGGCCAGCCCCGGCGTTACGTGCAG
 GTGCCAGGCAAGCCCAAGGTGCTGTGGATGATGGCCAGCCCCGGCGTTACGTGCAG
 CCATCGCATGTCATCCGCATTGCGCCGATGATCTATGGCGGGCGGCTTCCGACGTGAC
 CCCGACCTGGCCATGCACCATGCCGCCAAGGTGCGCTCCGGCGGCAAGCTGGGCTAC
 TACTGGCAGCTGTTTCGAGGGCTCGGCTGGACCAGCATCCACTGGCTGCACAAGATC
 CGGCAGCCACCCTGGTACTGGCTGGCGACGACGCCGTTGATCCCGCTGATCAAC
 ATGCGCCTGCTGGCCTGGCGGATTCCCAATGCCAGCTACACATTATCGACGACGGC
 CATCTGTTCTGATCACCCGTGCCGAAGCCGTGCCCCGATCATCATGAAGTTCTCTG
 CAGGAAGAACGTGAGCGTGCGGTCATGCATCCCCGTCCGGCCTCGGGGGGGTGA - 3'

Séquence en bleu = N20

Séquence en rouge = PAM

Figure 13 : Gène *phaZ* avec les 20 nucléotides cible du système CRISPR et la séquence PAM

La séquence du sgRNA avec les 20 nucléotides substitués par la séquence cible montrée à la Figure 13 est la suivante :

5' -
ACGCCGUUGCUGAUCUUUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
 GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG - 3'

La Figure 14 permet de mieux visualiser comment le sgRNA cible le gène *phaZ* par complémentarité.

5' - ...CCTG**ACGCCGTTGCTGATCTTTAACGG**CATC... -3' Brin sens de *phaZ*
 3' - ...GGACT**GCGGCAACGACTAGAAATTGCC**GTAG... -5' Brin antisens de *phaZ*
 5' - **ACGCCGUUGCUGAUCUUUAA**GUUUUAG... -3' sgRNA

Figure 14 : Représentation du sgRNA ciblant le gène *phaZ* par complémentarité

Une PCR a été réalisée avec les primers Q5SDM-pTargetP-F et Q5SDM-pTargetP-R pour faire la substitution des 20 nucléotides. L'ADN polymérase Q5 hot start high-fidelity a été utilisée et les conditions de la PCR étaient les suivantes :

Préincubation	30 sec à 98°C	} 25 cycles
Dénaturation	10 sec à 98°C	
Hybridation	30 sec à 57°C	
Elongation	2 min 30 à 72°C	
Elongation final	2 min à 72°C	

Le résultat de la PCR est représenté à la Figure 15. Il devrait théoriquement avoir qu'une seule bande à 4298 pb qui correspond à la taille du plasmide pTargetP. Le contrôle négatif correspond à de l'eau PCR.

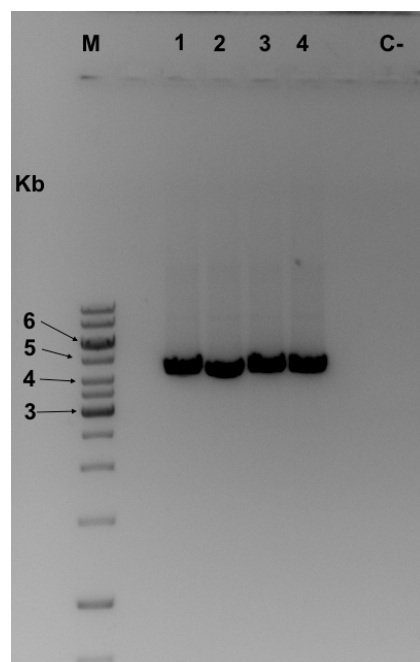


Figure 15 : Résultat de la PCR permettant de substituer 20 nucléotides du sgRNA ciblant le gène *phaZ*. M : marqueur 1kb, 1 à 4 : amplification du pTargetP pour substituer le N20, C- : contrôle négatif

La figure ci-dessus montre que la PCR a fonctionné en obtenant pour les quatre produits PCR qu'une seule bande vers 4300 pb qui correspond à la taille attendue. Aucune bande n'est visible pour le contrôle négatif qui confirme qu'il n'y a pas eu de contamination.

Le produit PCR numéro un, deux et trois du gel ci-dessus ont été recircularisés pendant 5 min à température ambiante avec une kinase, ligase et DpnI du kit Q5 site-directed mutagenesis. Ce nouveau plasmide pTargetP avec le N20 substitué par 20 nucléotides ciblant la PHA dépolymérase est appelé pTargetP- Δ *phaZ*.

Ensuite, 5 μ l de ce mix a été utilisé pour transformer le plasmide pTargetP- Δ *phaZ* dans *E. coli* TOP10 par heat shock. Le pTargetP a été utilisé comme contrôle positif pour la transformation. Les résultats obtenus après une nuit à 37°C sont répertoriés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Résultat de la transformation du pTargetP-*phaZ* dans *E. coli* TOP10

	Contrôle négatif	Contrôle positif	<i>E. coli</i> TOP10 pTargetP- Δ <i>phaZ</i> Numéro 1	<i>E. coli</i> TOP10 pTargetP- Δ <i>phaZ</i> Numéro 2	<i>E. coli</i> TOP10 pTargetP- Δ <i>phaZ</i> Numéro 3
Nombre de colonies	0	>300	30	23	30

La transformation a fonctionné en obtenant plus de 300 colonies pour le contrôle positif. Il n'y a pas eu de contamination durant cette manipulation car aucune colonie n'était visible sur le contrôle négatif. Finalement, la recircularisation du pTargetP- Δ *phaZ* et sa transformation dans *E. coli* TOP10 a fonctionné aussi en obtenant entre 23 et 30 colonies.

3.5.6 Séquençage du plasmide pTargetP- Δ phaZ

Avant d'envoyer à séquencer, le plasmide pTargetP- Δ phaZ a été digéré avec *SspI*-HF/*PstI*-HF afin de vérifier que se soit le bon plasmide. La digestion a été faite durant 2h à 37°C et dans le tampon Cutsmart. Il devrait théoriquement avoir une bande vers 3402 pb et une autre vers 896 pb. Le résultat obtenu sur gel d'agarose à 0.8% se trouve à la Figure 16.

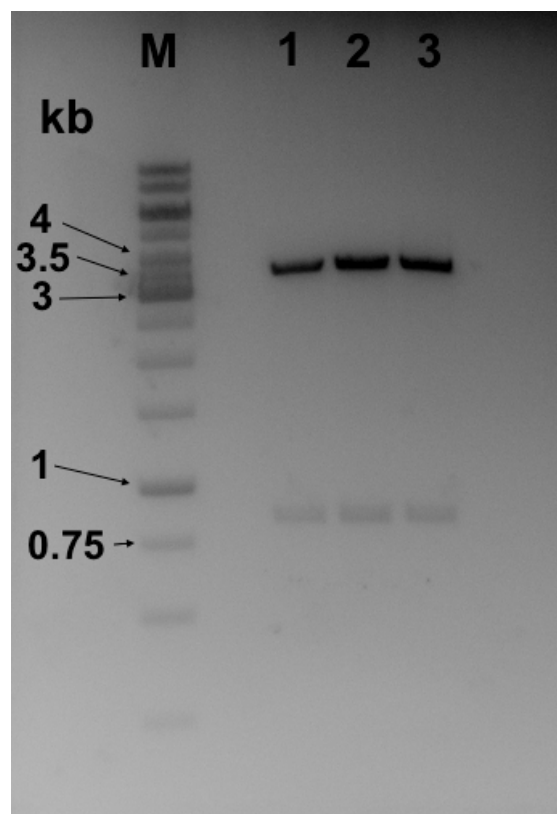


Figure 16 : Résultat de la digestion du pTargetP-phaZ avec *SspI*-HF/*PstI*-HF. M : marqueur 1kb, 1 : pTargetP-phaZ digéré par *SspI*-HF/*PstI*-HF (n°1 du produit PCR), 2 : pTargetP-phaZ digéré par *SspI*-HF/*PstI*-HF (n°2 du produit PCR), 3 : pTargetP-phaZ digéré par *SspI*-HF/*PstI*-HF (n°3 du produit PCR).

La figure ci-dessus montre une bande vers 3300 pb et une autre vers 850 pb pour les trois pTargetP- Δ phaZ digéré avec *SspI*-HF/*PstI*-HF qui correspond aux tailles attendues.

Les 20 nucléotides substitués du plasmide pTargetP- Δ phaZ numéro 1, 2 et 3 de la figure 15 ont été envoyés à séquencer chez microsynth (Balgach, CH) avec le primer 521MCS-F. Ceci permet de vérifier s'il n'y a pas eu de mutation lors de la substitution des 20 nucléotides. Le résultat du séquençage se trouve à la Figure 17.

```

pTargetP-phaZtheorique -----ttgacagctagctcagtcctaggtataata
pTargetP-phaZ1 CGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTTGACAGCTAGCTCAGTCC TAGGTATAATA
pTargetP-phaZ2 CGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTTGACAGCTAGCTCAGTCC TAGGTATAATA
pTargetP-phaZ3 CGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTTGACAGCTAGCTCAGTCC TAGGTATAATA
*****

pTargetP-phaZtheorique ctagtACGCCGTTGCTGATCTTTAAgTTTTtagagctagaatagcaagttaaaataaggc
pTargetP-phaZ1 CTAGTACGCCGTTGCTGATCTTTAAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
pTargetP-phaZ2 CTAGTACGCCGTTGCTGATCTTTAAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
pTargetP-phaZ3 CTAGTACGCCGTTNNTN-----
***** *

pTargetP-phaZtheorique tagtccggtatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctTTTTTTgaaattctctaga
pTargetP-phaZ1 TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCCGGTGC TTTTTTTGAATTCCTAGA
pTargetP-phaZ2 TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCCGGTGC TTTTTTTGAATTCCTAGA
pTargetP-phaZ3 -----

pTargetP-phaZtheorique gtcgacctgcagaAGCTTGCGGCCGCGTCGTGACTGGGAAAACCC TGCGGACTAGTCTTG
pTargetP-phaZ1 GTCGACCTGCAGAAGCTTGCGGCCGCGTCGTGACTGGGAAAACCC TGCGGACTAGTCTTG
pTargetP-phaZ2 GTCGACCTGCAGAAGCTTGCGGCCGCGYCRWGACTGCNAAAACCC TGGSGACTAS TCTTG
pTargetP-phaZ3 -----

pTargetP-phaZtheorique GACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGC
pTargetP-phaZ1 GACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGC
pTargetP-phaZ2 RACTCCTGTTGATAGATCCA K W AATGACCTCAGAACTCC M T C N GGATTTGTTTCAGAA M GC
pTargetP-phaZ3 -----

pTargetP-phaZtheorique TCGGTTGCCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAAATCCAGGGGTCCCAATAATT-----
pTargetP-phaZ1 TCGGTTGCCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAAATCCAGGGGTCCCAATAATTACGATT
pTargetP-phaZ2 TCGGTTGCCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAAATCCAGGGGTCCCAATAATTACRATT
pTargetP-phaZ3 -----

```

Figure 17 : Résultat du séquençage du pTargetP- Δ phaZ numéro 1, 2 et 3. K = G ou T, M = A ou C, N = A C G ou T, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T, Y = C ou T.

Le séquençage a permis de prouver que le plasmide provenant du produit PCR 1 n'a aucune mutation avec tous les nucléotides exacts. Le séquençage du plasmide provenant du produit PCR 2 a donné 12 nucléotides ayant différentes possibilités montrées en rouge sur la figure 13. Ces lettres en rouge donne aux quels nucléotides elles peuvent correspondre (K = G ou T, M = A ou C, N = A C G ou T, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T, Y = C ou T). En comparant la possibilité des nucléotides avec le nucléotide théorique, le bon nucléotide est toujours présent ainsi ce plasmide n'a pas de mutation. Par contre, le plasmide provenant du produit PCR 3 de la figure 15 a rencontré des problèmes lors du séquençage en obtenant des signaux superposés. Selon microsynth, ce phénomène est généralement causé par des répétitions, par un mélange de plasmides portant différents inserts, ou par des produits de PCR avec des régions hétérozygotes / multi-copies.

Le plasmide provenant du produit PCR numéro 1 a été gardé pour continuer les expériences.

3.6 Construction du deuxième plasmide appelé pCasPd ou pCasPa

3.6.1 Première tentative de construction

3.6.1.1 Amplification par PCR de l'origine de répllication du pBBR RESO

L'origine de répllication du pCas ne fonctionne pas chez *P. putida* KT2440 comme montré dans les résultats obtenus au point 3.3. Ainsi, il va être

remplacé par l'origine de répllication du pBBR RESO qui fonctionne chez *P. putida*. En premier lieu, l'origine de pBBR RESO a été amplifiée par PCR avec l'ADN polymérase high fidelity phusion et les primer Rep-F et Rep-R. L'hybridation a été réalisée à deux température différentes (66°C et 72°C) afin d'optimiser la PCR. Les conditions de la PCR sont les suivantes :

Préincubation	30 sec à 98°C	
Dénaturation	10 sec à 98°C	} 35 cycles
Hybridation	30 sec à 66/72°C	
Elongation	40 sec à 72°C	
Elongation final	10 min à 72°C	

Le produit amplifié devrait avoir théoriquement une taille de 1292 pb et le résultat se trouve à la Figure 18.

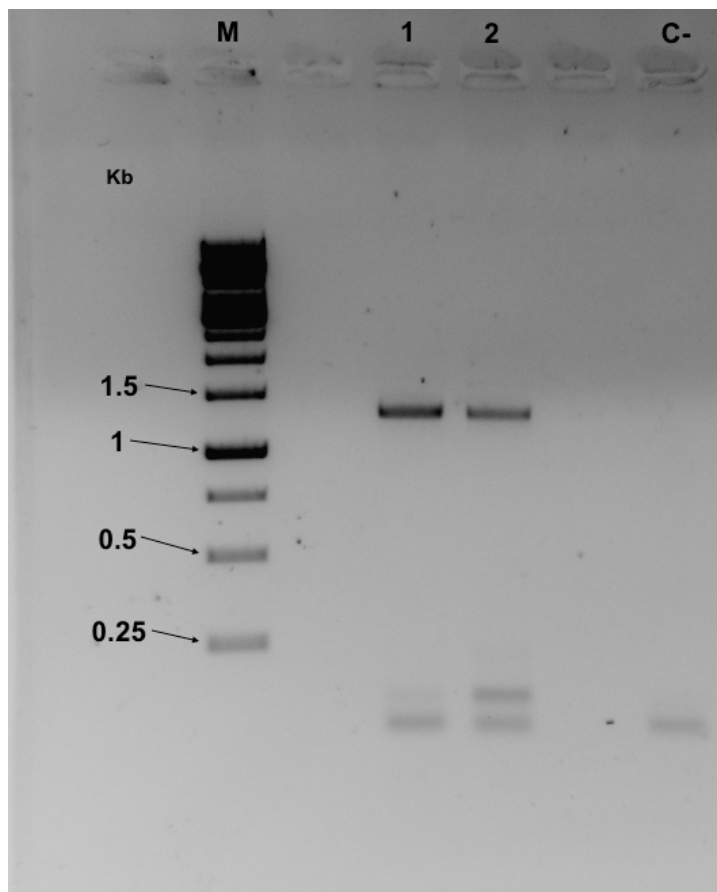


Figure 18 : Amplification par PCR de l'origine de répllication du pBBR RESO. M : marqueur 1kb, 1 : produit PCR avec hybridation à 66°C, 2 : produit PCR avec hybridation à 72°C, C- : contrôle négatif

Une bande est observée sur la figure ci-dessus vers 1.3 kb qui correspond à la taille attendu. Par contre, deux bandes sont observées vers 0.15 et 0.1 pb qui ne correspondent pas aux tailles attendus. Ceci est une contamination qui s'observe aussi dans le contrôle négatif.

3.6.1.2 Digestion de pCas avec *NotI*-HF/*SnaBI*

Le plasmide pCas a été digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI* afin d'éliminer le réplicon du pCas et le remplacer par l'origine de répllication du pBBR RESO. La

digestion à été faite dans le tampon Cutsmart à 37°C durant deux heures mais le résultat sur gel (pas montré) a montré qu'il n'a pas été digéré ou seulement linéarisé. Afin d'être sûre que ce n'est pas un problème dû à l'activité enzymatique, le pBBR RESO a été digéré avec *NotI*-HF, le pSEVA551 a été digéré avec *SnaBI* et le pCas a été de nouveau digéré avec les deux enzymes de restrictions. La digestion a été réalisée pour les trois plasmides dans le tampons Cutsmart avec la même quantité d'enzyme et d'ADN durant 4h30 à 37°C. Le pCas devrait théoriquement avoir une bande à 11'389 pb et une autre à 1156 pb. Le pBBR RESO devrait théoriquement avoir une bande à 4597 pb et une autre à 2220 pb. Finalement, le pSEVA551 devrait être linéarisé en obtenant une bande à 5640 pb. Le résultat obtenu sur gel se trouve à la Figure 19.

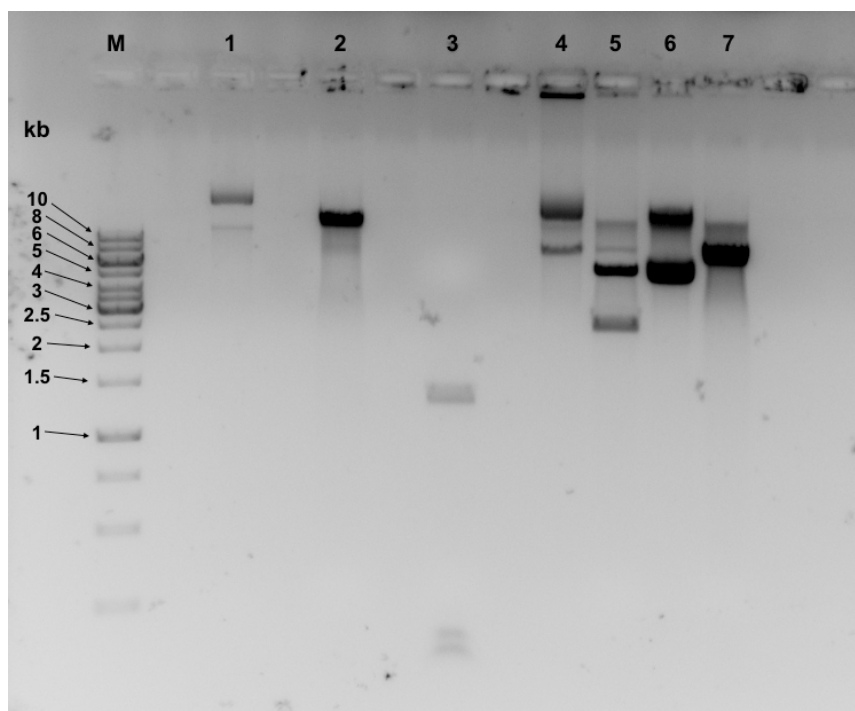


Figure 19 : Digestion du pCas avec *NotI*-HF/*SnaBI* pour éliminer son réplicon et digestion de pBBR RESO avec *NotI*-HF et du pSEVA551 avec *SnaBI* pour vérifier l'activité des enzymes de restriction. M : marqueur 1kb, 1 : pCas non digéré, 2 : pCas digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI*, 3 : produit PCR du réplicon de pBBR RESO digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI*, 4 : pBBR RESO non digéré, 5 : pBBR RESO digéré avec *NotI*-HF, 6 : pSEVA551 non digéré, 7 : pSEVA551 digéré avec *SnaBI*.

La Figure 19 montre que le pCas a été seulement linéarisé avec une des deux enzymes. Cette figure montre aussi que l'activité de *NotI*-HF est bonne car le pBBR RESO digéré avec cette enzyme de restriction a une bande à environ 4.6 kb et une autre vers 2.4 Kb qui correspond aux tailles théoriques. L'activité de *SnaBI* est bonne aussi car le pSEVA551 a été linéarisé en obtenant une bande vers 5.8 Kb qui correspond à la taille théorique.

Pour déterminer laquelle des deux enzymes ne coupe pas le pCas, une digestion a été réalisée avec les enzymes séparément et ensemble. Il devrait théoriquement avoir qu'une bande à 12.545 kb lorsque le plasmide est digéré avec une des deux enzymes et deux bandes vers 11'389 pb et une autre à 1156 pb lorsqu'il est digéré avec les deux enzymes. Les résultats obtenus se trouvent à la Figure 20.

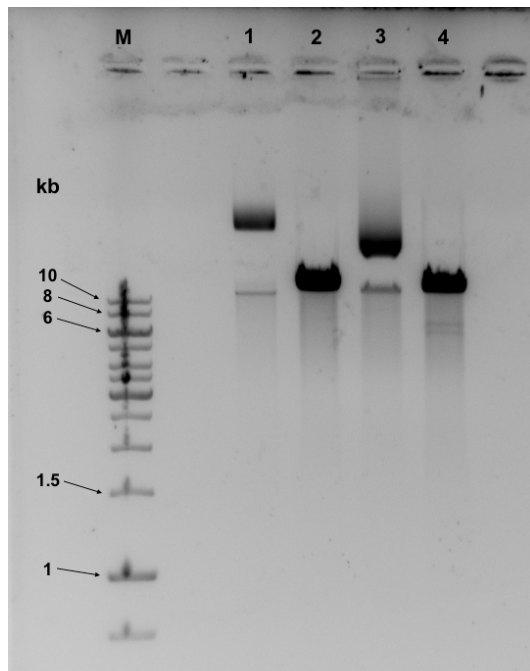


Figure 20 : Digestion de pCas avec *SnaBI* et *NotI*-HF séparément. M : marqueur 1kb, 1 : pCas non digéré, 2 : pCas digéré avec *NotI*-HF, 3 : pCas digéré avec *SnaBI*, 4 : pCas digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI*.

La figure montre que *NotI*-HF digère pCas en obtenant qu'une bande alors que *SnaBI* ne digère pas pCas en obtenant deux bandes similaires au plasmide non digéré et supérieur au plasmide digéré avec *NotI*-HF.

Une dernière expérience a été réalisée pour être sûre que le problème vient du plasmide et pas de l'enzyme en digérant le pCas avec un plus petit volume d'extrait de plasmide. L'extrait de plasmide contient des sels qui pourraient inhiber l'activité de l'enzyme ainsi seulement 5 μ l et 6 μ l d'extrait ont été utilisés dans un volume final de 20 μ l pour la digestion. Le pCas a été digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI* dans le tampon Cutsmart durant 3h à 37°C. Les résultats obtenus se trouvent à la Figure 21.

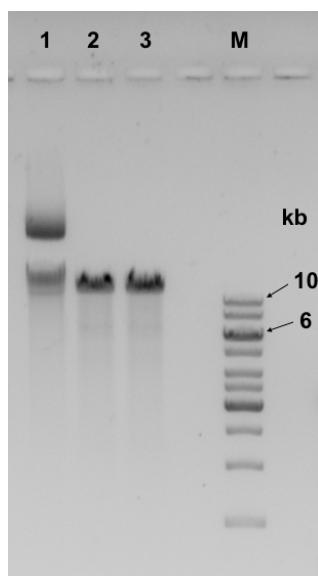


Figure 21 : Digestion de pCas avec *SnaBI*/*NotI*-HF et une petite quantité d'extrait de plasmide. M : marqueur 1kb, 1 : pCas non digéré, 2 : pCas digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI* et 5 μ l d'extrait, 3 : pCas digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI* et 6 μ l d'extrait.

La figure montre qu'une bande pour le plasmide digéré avec *NotI*-HF/*SnaBI* alors qu'il devrait théoriquement avoir une bande vers 11'389 pb et une autre à 1156 pb. Ceci montre que *SnaBI* n'a pas digéré et seul *NotI*-HF a digéré car le plasmide est linéarisé en ayant qu'une bande et différent du plasmide non digéré. Ainsi, ce concept de construction a été arrêté et deux autres concepts ont été faits en parallèle.

3.6.2 Construction du plasmide pCasPd

3.6.2.1 Digestion du pCas avec *NotI*-HF/*SpeI* pour introduire le réplicon du pBBR RESO

L'origine de réplication du pCas ne va pas être éliminé puisqu'il y a un problème au niveau du site de restriction de *SnaBI* et qu'il n'y a pas d'autre site de restriction valable permettant de l'enlever. Le plasmide va être digéré avec *NotI*-HF/*SpeI* permettant d'introduire l'origine de réplication du pBBR RESO qui a les mêmes sites de restriction aux extrémités. Il a été digéré durant 2h à 37°C dans le tampon Cutsmart avec les deux enzymes de restrictions ensemble et séparément afin d'être sûr que les deux enzymes coupe le plasmide. Il devrait théoriquement avoir une bande vers 12'225 pb et une autre vers 320 pb lorsqu'il est digéré avec les deux enzymes et devrait avoir qu'une bande à 12'545 pb lorsqu'il est digéré avec qu'une des deux. Le résultat de la digestion se trouve à la Figure 22.

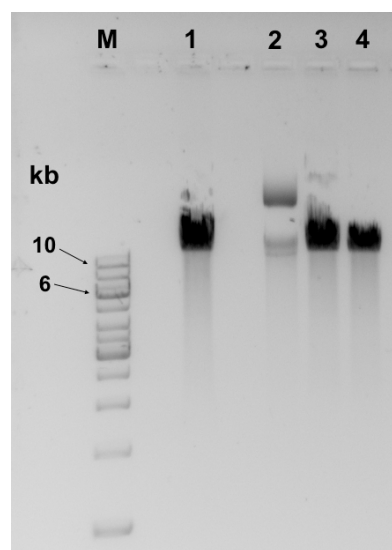


Figure 22 : Digestion du pCas avec *SpeI*/*NotI*-HF. M : marqueur 1kb, 1 : pCas digéré avec *NotI*-HF/*SpeI*, 2 : pCas non digéré, 3 : pCas digéré avec *NotI*-HF, 4 : pCas digéré avec *SpeI*.

La figure ci-dessus montre que les deux enzymes digèrent le pCas en obtenant une bande différente du plasmide non digéré et à la bonne taille. Une bande est visible plus haut que 10 kb pour le plasmide digéré avec les deux enzymes qui correspond à la taille attendue. Une bande très faible était observable vers 330 pb pour le plasmide digéré avec les deux enzymes qui correspond à une des tailles attendues.

La bande en dessus de 10 kb du pCas digéré avec *SpeI*/*NotI*-HF a été purifiée sur gel. Une concentration finale de 18.6 µg/ml a été obtenu dans 6 µl de volume final.

3.6.2.2 Amplification par PCR de l'origine de réplication du pBBR RESO

L'origine de réplication du pBBR RESO a été amplifiée par PCR avec les primer pBBR-Rep-F et pBBR-Rep-R ainsi que à l'aide de l'ADN polymérase high fidelity Phusion. Cette amplification a permis d'isoler l'origine de réplication et d'ajouter des sites de restrictions. Les conditions de la PCR étaient les suivantes :

Préincubation	30 sec à 98°C	} 35 cycles
Dénaturation	10 sec à 98°C	
Hybridation	30 sec à 66°C	
Elongation	40 sec à 72°C	
Elongation final	10 min à 72°C	

Le résultat obtenu de la PCR se trouve à la Figure 23. Il devrait théoriquement avoir une bande vers 1292 pb. Le contrôle négatif correspond à l'eau PCR utilisé pour les manipulations.

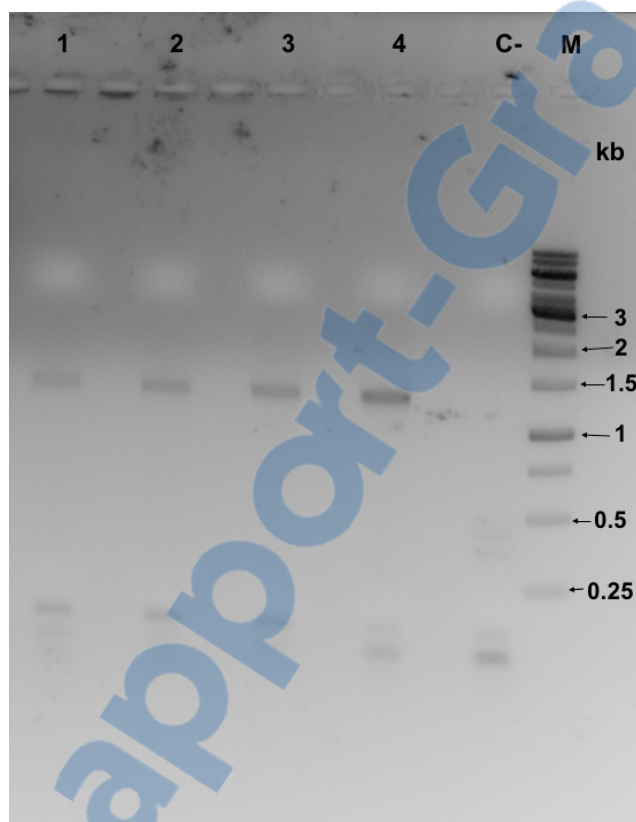


Figure 23 : Amplification par PCR de l'origine de réplication du pBBR RESO. M : marqueur 1kb, 1 à 4 : produit PCR (origine de réplication du pBBR RESO).

La figure ci-dessus montre une bande vers 1.3 kb pour le produit PCR qui correspond à la taille théorique. Deux autres bandes sont observées en dessous de 250 pb pour le produit PCR ainsi que le contrôle négatif. Ceci correspond à une contamination.

La bande vers 1.3 kb a été purifiée à l'aide du kit Monarch DNA gel extraction. Le produit PCR purifié a été ensuite digéré avec *SpeI/NotI*-HF puis les enzymes ont été inactivées 20 min à 80°C.

3.6.2.3 Ligation et transformation du nouveau plasmide dans *E. coli* TOP10

La ligation du pCas digéré avec *SpeI/NotI*-HF et purifié ainsi que le produit de digestion du produit PCR purifié a été faite à l'aide de l'ADN T4 ligase durant 1h à température ambiante. Différents ratios insert : vecteur ont été choisis pour la ligation (2 :1, 3 :1, 4 :1, 5 :1). La plaque du contrôle positif (*E. coli* TOP10-pCas) a été incubée à 30°C alors que les autres ont été incubés à 37°C. Il y avait plus de 300 colonies pour le contrôle positif après une nuit à 30°C. Le résultat de la transformation est répertorié au Tableau 8.

Tableau 8 : Résultat de la transformation de pCasPd dans *E. coli* TOP10

Ratio insert : vecteur	<i>E. coli</i> TOP10 pCasPd
2 :1	15
3 :1	0
4 :1	34
5 :1	28

Le contrôle positif prouve que la transformation a fonctionné en obtenant plus de 300 colonies. Aucune colonie n'était visible sur le contrôle négatif montrant qu'il n'y a pas eu de contamination. Le tableau ci-dessus montre que la ligation a fonctionné pour le ratio 2 :1, 4 :1 et 5 :1 en obtenant entre 15 et 34 colonies.

La Figure 24 permet de mieux visualiser comment le plasmide pCasPd a été construit.

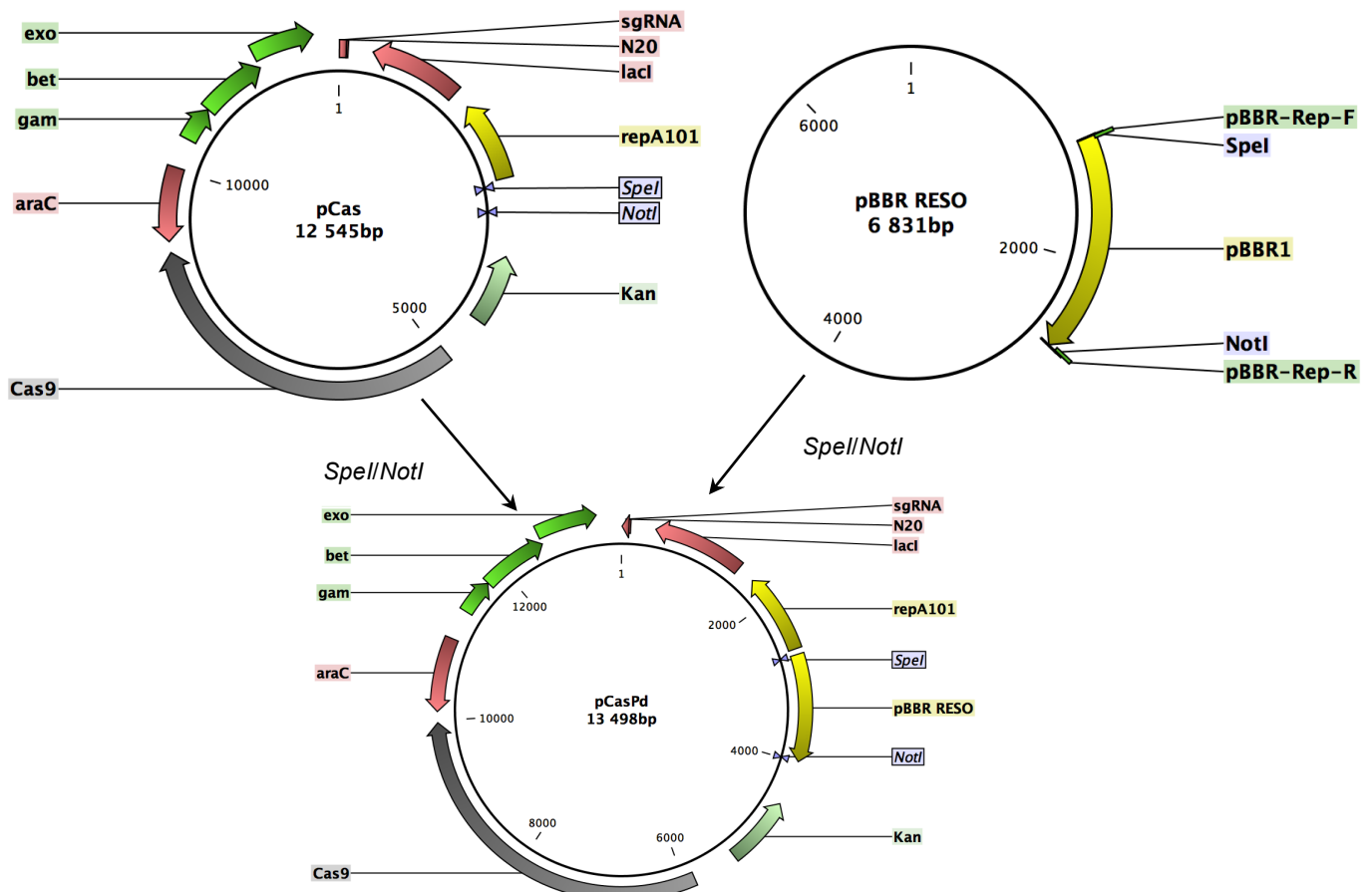


Figure 24 : Construction du plasmide pCasPd avec pCas et pBBR RESO

3.6.3 Construction du plasmide pCasPa

3.6.3.1 Amplification par PCR du pCas pour éliminer son origine de réplication

Les résultats obtenus précédemment ont montrés que le site de restriction *SnaBI* sur le pCas avait un problème et aucun autre site de restriction n'est valable pour éliminer l'origine de réplication. Ainsi, pour éliminer l'origine de réplication du pCas, il a été amplifié par PCR avec les primer pCas-Del-F et pCas-Del-R ainsi que l'ADN polymérase hot start Q5.

Les conditions de la PCR étaient les suivantes :

Préincubation	30 sec à 98°C	
Dénaturation	10 sec à 98°C	} 25 cycles
Hybridation	30 sec à 61/72°C	
Elongation	7 min à 72°C	
Elongation final	2 min à 72°C	

Le résultat de la PCR se trouve à la Figure 25. Le produit PCR devrait théoriquement avoir une bande à 10'553 pb.

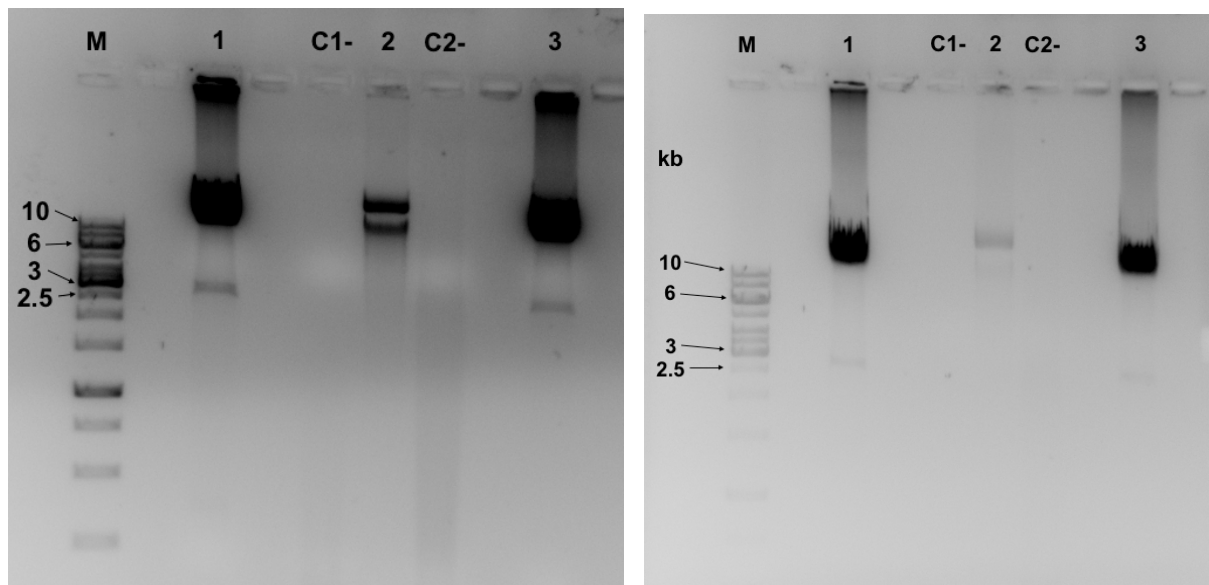


Figure 25 : Résultat de l'amplification du pCas par PCR, à gauche, migration durant 1h, à droite, migration durant 1h30. M : marqueur 1kb, 1 : produit PCR du pCas (hybridation à 61°C), C1⁻ : contrôle négatif de l'hybridation à 61°C, 2 : pCas circulaire, 3 : produit PCR du pCas (hybridation à 72°C), C2⁻ : contrôle négatif de l'hybridation à 72°C.

La figure ci-dessus, montre une bande en dessus de 10 kb et différente du pCas circulaire pour le produit PCR du pCas qui correspond à la taille théorique. L'intensité de la bande appuie que c'est le produit PCR et non pas le plasmide d'origine car seulement 25 ng de plasmide ont été utilisés pour la PCR d'un volume finale de 25 µl. Une autre bande vers 2.8 kb est visible pour les deux produits PCR de pCas qui est une amplification non spécifique. Aucune bande n'est visible pour les deux contrôles positifs, ce qui prouve qu'il n'y a pas eu de contamination.



La bande en dessus de 10 kb a été purifiée à l'aide du kit Monarch DNA gel extraction.

3.6.3.2 Ligation du pCas amplifié par PCR avec l'origine de réplication du pBBR RESO et transformation dans *E. coli* TOP10

L'origine de réplication du pBBR RESO a été amplifiée par PCR, purifiée puis digérée avec *SpeI/NotI*-HF comme expliqué au point 3.6.2.2. Pour pouvoir insérer cette origine dans le pCas amplifié par PCR, le plasmide a été digéré avec *SpeI/NotI*-HF durant 2h à 37°C. Les deux enzymes ont été ensuite inactivées à 80°C durant 20 min.

La ligation du pCas amplifié avec l'origine de réplication de la Figure 23 a été réalisée durant 2h à température ambiante et à différents ratio insert : vecteur. Un contrôle positif a été réalisé avec le pCas. La transformation a été faite à 30°C pour le contrôle positif et à 37°C pour le nouveau plasmide. Il y avait plus de 300 colonies pour le contrôle positif après une nuit à 30°C. Le résultat obtenu après une nuit se trouve dans Tableau 9.

Tableau 9 : Résultat de la transformation de pCasPa dans *E. coli* TOP10

Ratio insert : vecteur	<i>E. coli</i> TOP10 pCasPa
2 :1	180
3 :1	0
4 :1	0
5 :1	76

La transformation a fonctionné car plus de 300 colonies ont été obtenu pour le contrôle positif. Il n'y a pas eu de contamination durant ces manipulations car aucune colonie n'était visible sur le contrôle négatif. Le tableau ci dessus, montre que la ligation avec le ratio 2 :1, et 5 :1 a fonctionné en obtenant 180 et 76 colonies respectivement.

La Figure 26 permet de mieux visualiser comment le pCasPa a été construit.

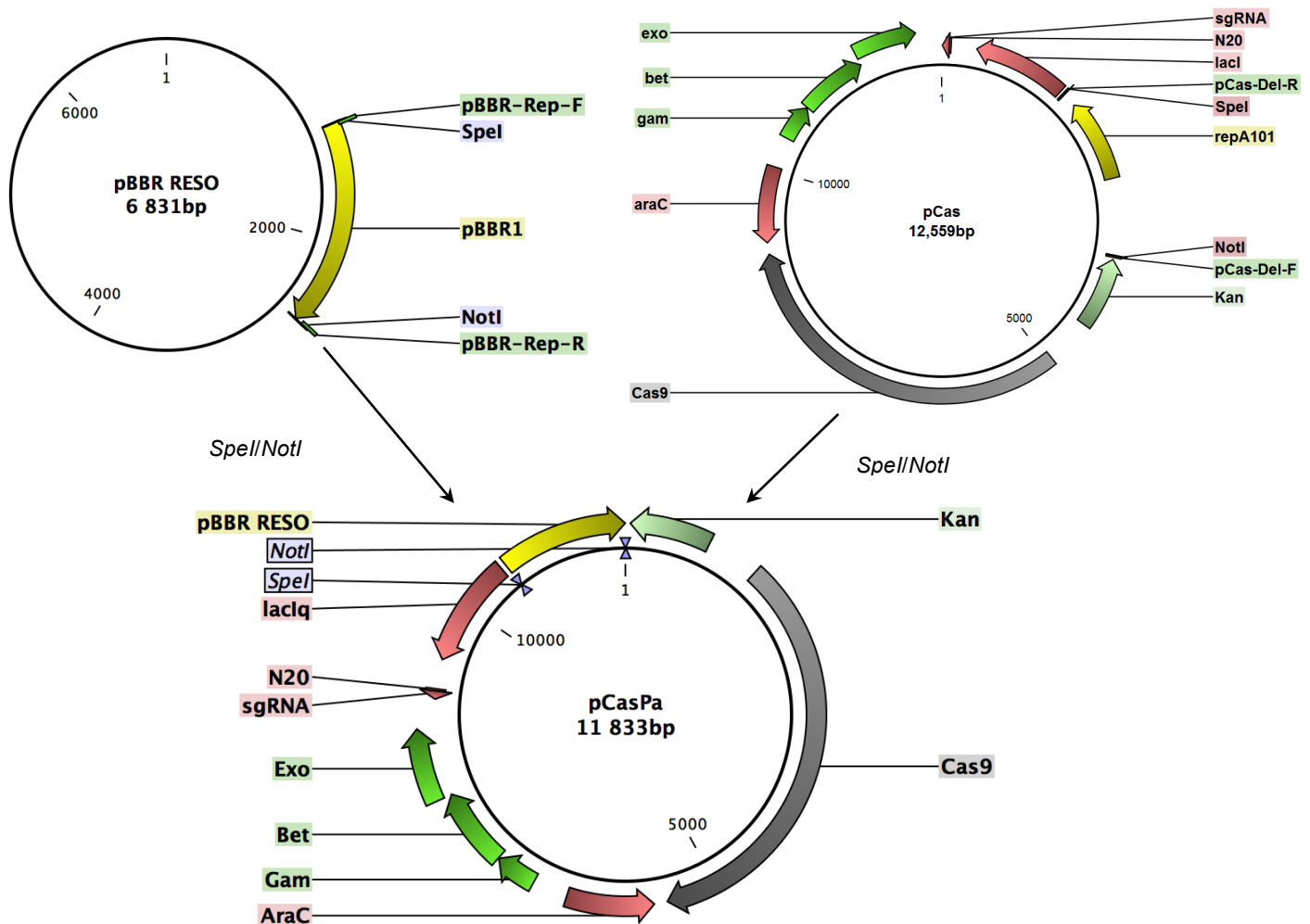


Figure 26 : Construction du pCasPa avec pCas et pBBR RESO

3.6.4 Contrôle des deux nouveaux plasmides pCasPd et pCasPa

3.6.4.1 Contrôle de la présence de l'insert par colony PCR

16 colonies de la souche avec pCasPd et 16 colonies de la souche avec pCasPa ont été isolées sur plaque LB avec 50 µg/ml de kanamycine. Une colonie PCR a été réalisée sur chacune de ces 16 colonies isolées avec les primers pBBR-Rep-F et pBBR-Rep-R ainsi que l'ADN polymérase ampliTaQ gold afin de montrer que le plasmide contient l'insert. Les conditions de la colony PCR étaient les suivantes :

Préincubation	10 min à 95°C	} 35 cycles
Dénaturation	50 sec à 95°C	
Hybridation	65 sec à 55°C	
Elongation	60 sec à 72°C	
Elongation final	10 min à 72°C	

Si la colonie contient le vecteur avec l'insert, il devrait théoriquement avoir une bande vers 1292 pb. Sinon, il ne devrait pas avoir de bandes. Le résultat de la colony PCR se trouve à la Figure 27.

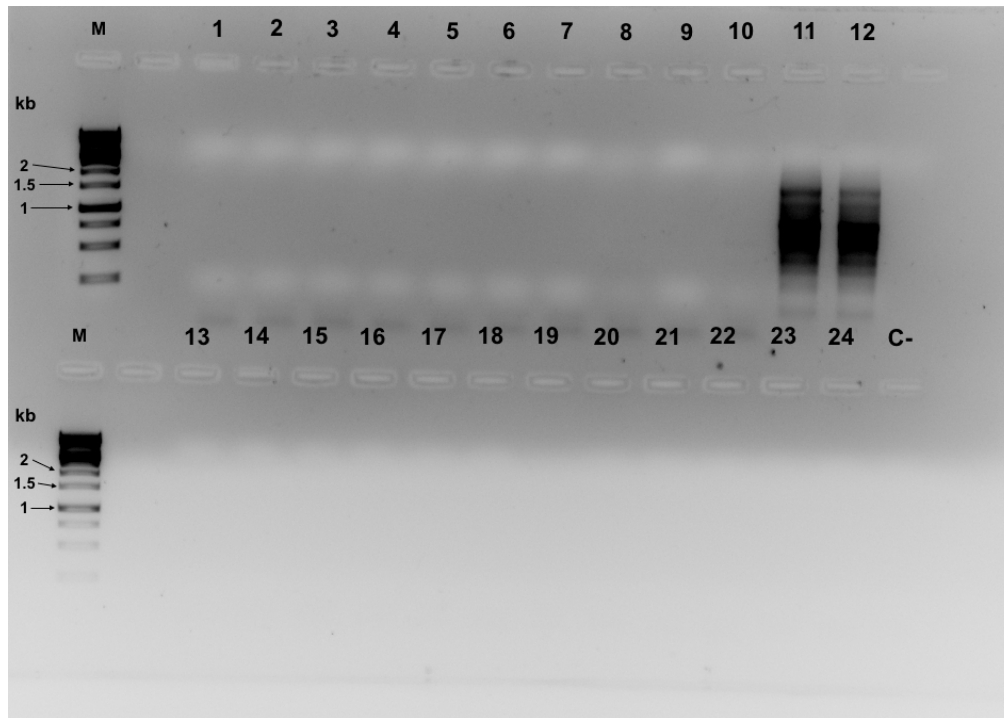


Figure 27 : Colony PCR des deux nouveaux plasmides pCasPa et pCasPd avec ampliTaQ Gold. M : marqueur 1kb, 1 à 12 : produit colony PCR du pCasPa, 13 à 24 : produit colonyPCR du pCasPd, C- : contrôle négatif.

Aucune bande n'est visible pour tous les produits de la colony PCR sauf pour le numéro 11 et 12. Cette smear pour le numéro 11 et 12 ne correspond pas au résultat attendu. Aucun contrôle positif n'a été réalisé, ainsi il est difficile de dire si c'est la PCR qui n'a pas fonctionné ou si c'est que le nouveau plasmide ne contient pas l'insert.

Une seconde colony PCR a été réalisée avec cette fois l'ADN polymérase high fidelity phusion et les mêmes primer. Les conditions de la PCR étaient les suivantes :

Préincubation	10 min à 98°C	
Dénaturation	10 sec à 98°C	} 35 cycles
Hybridation	30 sec à 66°C	
Elongation	40 sec à 72°C	
Elongation final	10 min à 72°C	

Le résultat attendu est le même que précédemment, c'est à dire une bande vers 1292 pb si le vecteur contient l'insert et aucune bande s'il ne contient pas l'insert. Le résultat de cette colony PCR se trouve à la Figure 28.

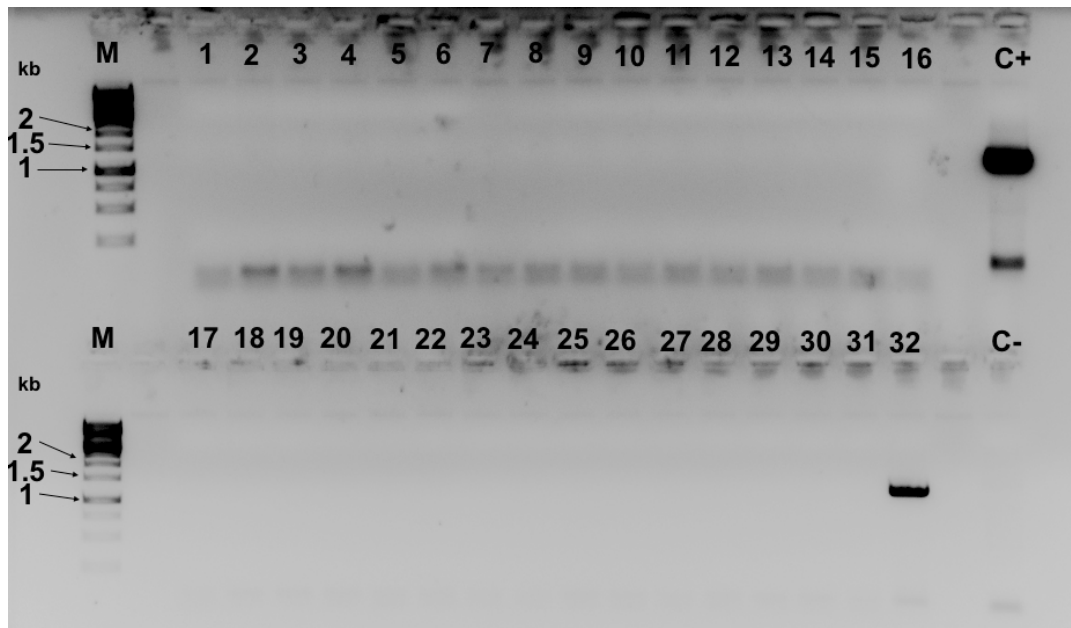


Figure 28 : Colony PCR du pCasPa et pCasPd avec l'ADN polymérase high fidelity phusion. M : marqueur 1kb, 1 à 16 : produit colony PCR du pCasPa, 17 à 32 : produit colony PCR du pCasPd, C- : contrôle négatif.

La figure ci-dessus montre que seul le numéro 32 contient l'insert en obtenant une bande vers 1300 pb qui correspond à la taille théorique. Aucune bande n'est visible pour le contrôle négatif qui prouve qu'il n'y a pas eu de contaminations. Une bande vers 1300 pb est visible pour le contrôle positif qui correspond à la taille attendue. Ceci montre que la colony PCR a fonctionné.

3.6.4.2 Digestion du pCasPd et pCasPa

Théoriquement, le résultat de la colony PCR devrait être positif pour tous les clones car l'insert est l'origine de réplication et sans elle, la résistance du plasmide ne devrait pas fonctionner. Même pour le pCasPd qui contient toujours le *RepA101* car la transformation et l'incubation se sont faites à 37°C et que cette origine est sensible à cette température. Pour vérifier que ce n'est pas un problème au niveau de la colony PCR, car le contrôle positif est un plasmide pur et que les échantillons testés viennent d'un clone, les plasmides numéros 9, 11, 12, 27 et 32 ont été extraits puis digérés avec 3 enzymes de restrictions. Les plasmides extraits ainsi que le pCas ont été digérés avec *BglIII/Sall/XhoI* dans le tampon NEB 3.1 durant 2h à 37°C. Le résultat attendu est 3 bandes pour le pCasPa à 6515 pb, 3641 pb et 1677 pb, 3 bandes pour le pCasPd à 6515 pb, 5306 pb et 1677 pb et finalement 3 bandes pour le pCas à 6515 pb, 4353 pb et 1677 pb. Le résultat de la digestion se trouve à la Figure 29.

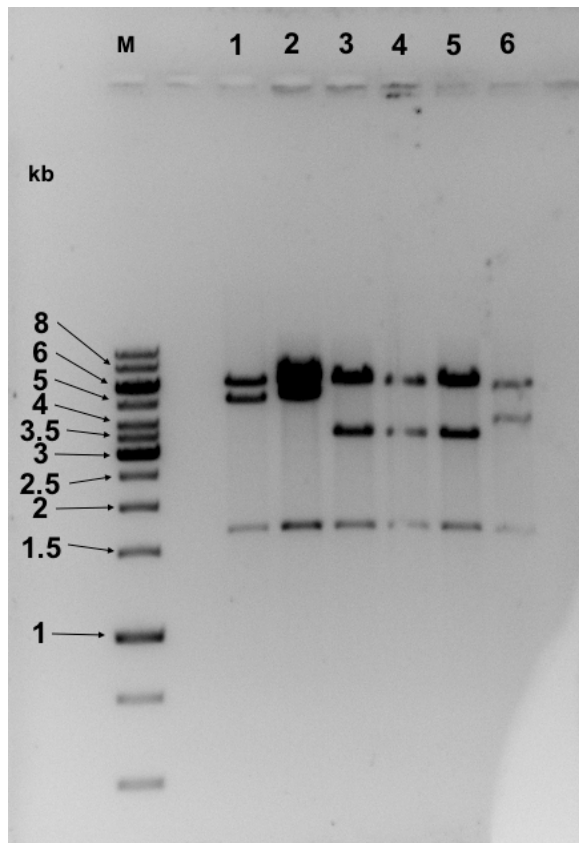


Figure 29 : Digestion de pCasPd, pCasPa et pCas avec *BglIII/Sall/XhoI*. M : marqueur 1kb, 1 : pCasPd n°27, 2 : pCasPd n°32, 3 : pCasPa n° 9, 4 : pCasPa n°11, 5 : pCasPa n°12, 6 : pCas.

Trois bandes sont observables pour le pCasPd vers 6.5 kb, 5.1 kb et 1.7 kb qui correspondent aux tailles attendus. Trois bandes sont observables pour le pCasPa vers 6.5 kb, 3.6 kb et 1.7 kb qui correspondent aux tailles attendus. Finalement, trois bandes sont observables pour le pCas vers 6.5 kb, 4.3 kb et 1.7 kb qui correspondent aux tailles attendus.

3.6.5 Substitution du N20 des deux nouveaux plasmides pCasPd et pCasPa

Les 20 nucléotides appelés N20 du sgRNA ont été substitués par 20 nucléotides ciblant le gène codant la protéine *trfA* du plasmide pTargetP à l'aide du kit Q5 site-directed mutagenesis qui permettra d'éliminer le pTargetP avec le système CRISPR/Cas9. Les 20 nucléotides choisis se trouvent de 652 à 671 pb du gène *trfA* directement suivi par la séquence PAM CGG qui est montré à la Figure 30.

5' -
 CTAGCGTTTGCAATGCACCAGGTCATCATTGACCCAGGCGTGTTCACCAGGCCGCT
 GCCTCGCAACTCTTCGCAGGCTTCGCCGACCTGCTCGCGCCACTTCTTCACGCGGGT
 GGAATCCGATCCGCACATGAGGCGGAAGGTTTCCAGCTTGAGCGGGTACGGCTCCCG
 GTGCGAGCTGAAATAGTCGAACATCCGTCGGGCGGTTCGGCGACAGCTTGCGGTACTT
 CTCCCATATGAATTTTCGTGTAGTGGTCGCCAGCAAACAGCACGACGATTTTCTCGTC
 GATCAGGACCTGGCAACGGGACGTTTTCTTGCCACGGTCCAGGACGCGGAAGCGGTG
 CAGCAGCGACACCGATTCCAGGTGCCAACGCGGTTCGGACGTGAAGCCCATCGCCGT
 CGCCTGTAGGCGCGACAGGCATTCTCGGCCCTTCGTGTAATACCGGCCATTGATCGA
 CCAGCCCAGGTCCTGGCAAAGCTCGTAGAACGTGAAGGTGATCGGCTCGCCGATAGG
 GGTGCGCTTCGCGTACTCCAACACCTGCTGCCACACCAGTTTCGTCATCGTCGGCCCG
 CAGCTCGACGCCGGTGTAGGTGATCTTCACGTCCTTGTTGACGTGGAAAATGACCTT
 GTTTTGCAGCGCCTCGCGCGGGATTTTCTTGTTGCGCGTGGTGAACAGGGCAGAGCG
 GGCCGTGTCGTTTGGCATCGCTCGCATCGTGTCCGGCCACGGCGCAATATCGAACAA
 GGAAAGCTGCATTTCTTGATCTGCTGCTTCGTGTGTTTCAGCAACGCGGCCTGCTT
 GGCTTCGCTGACCTGTTTTGCCAGGTCCTCGCCGGCGGTTTTTTCGCTTCTTGGTTCGT
 CATAGTTCTTCGCGTGTTCGATGGTCATCGACTTCGCCAAACCTGCCGCCTCCTGTTC
 GAGACGACCGAACGCTCCACGGCGGCCGATGGCGCGGGCAGGGCAGGGGGAGCCAG
 TTGCACGCTGTCGCGCTCGATCTTGGCCGTAGCTTGCTGGACTATCGAGCCGACGGA
 CTGGAAGGTTTCGCGGGGCGCACGCATGACGGTTCGGCTTTCGATGGTTTTCGGCATC
 CTCGGCGGAAAACCCCGCGTCGATCAGTTCCTTGCCTGTATGCCTTCGGTCAAACGT
 CCGATTCAT-3'

Séquence bleu = N20

Séquence rouge = PAM

Figure 30 : Gène *trfA* avec les 20 nucléotides cible du système CRISPR et la séquence PAM

La séquence du sgRNA avec les 20 nucléotides substitués par la séquence cible montrée à la Figure 30 est la suivante :

5' UCGUAGAACGUGAAGGUGAUUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC
 UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG-3'

La Figure 31 permet de mieux visualiser comment le sgRNA cible le gène *trfA* par complémentarité.

5' ...GACGTTTTCTTGCCTCGTAGAACGTGAAGGTGATCGGTGCAGCAGCG...-3'
 3' ...CTGCAAAAAGAACGAGCATCTTGCACCTCCACTAGCCACGTCGTCGC...-5'
 5' -UCGUAGAACGUGAAGGUGAUUUUUAGAGC...-3' sgRNA

Figure 31 : Représentation du sgRNA ciblant le gène *trfA* par complémentarité

Le résultat de la PCR avec les primer Q5SDM-N20-F et Q5SDM-N20-R ainsi que l'ADN polymérase Q5 hot start high-fidelity est représenté à la Figure 32. Il devrait théoriquement avoir une bande à 13'498 pb pour le pCasPd et une à 11'833 pb pour le pCasPa. Le contrôle négatif correspond a de l'eau PCR utilisé pour les manipulations.

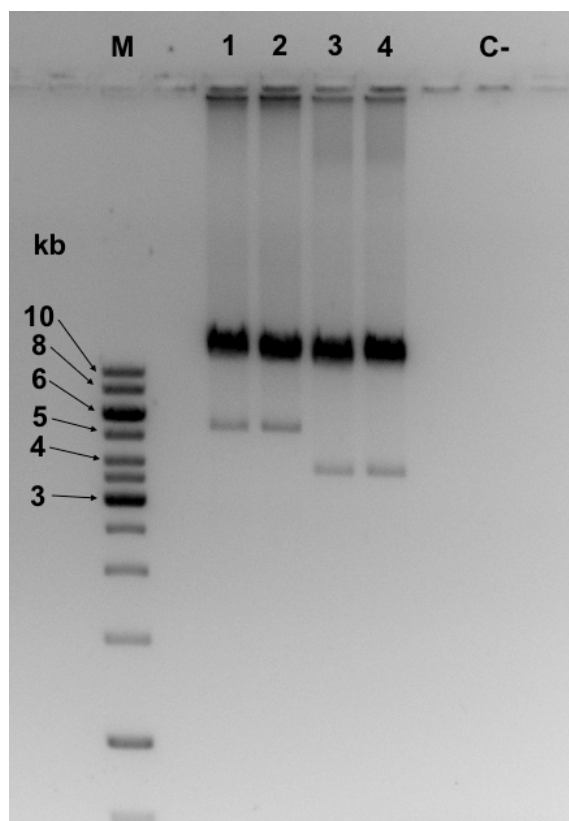


Figure 32 : Substitution du N20 par PCR du pCasPa et pCasPd avec l'ADN polymérase Q5 hot start. M : marqueur 1 kb, 1 : pCasPd n°27, 2 : pCasPd n°32, 3 : pCasPa n° 9, 4 : pCasPa n°12, C- : contrôle négatif.

Une bande en dessus de 10 kb est observée pour le pCasPd et une autre vers 5.5 kb. La bande en dessus de 10 kb correspond au résultat attendu et l'autre bande est une amplification non spécifique. Une bande en dessus de 10 kb et une autre vers 3.5 kb est observée pour le pCasPa. La bande en dessus de 10 kb est le résultat attendu mais elle est à la même hauteur que le pCasPd. Ceci est dû au fait que la migration n'était pas assez longue. L'autre bande vers 3.5 kb correspond à une amplification non spécifique.

Le produit PCR a été ensuite recircularisé à l'aide de la kinase, ligase et DpnI du kit Q5 site-directed mutagenesis.

Finalement, le plasmide circulaire a été transformé par heat shock dans *E. coli* TOP10. Le pCasPd a été utilisé comme contrôle positif pour la transformation. Les cellules transformées ont été étalées sur plaque LB avec 50 µg/ml de kanamycine.

Après une nuit à 37°C, plus de 300 colonies ont été obtenu pour *E. coli* transformé avec le plasmide pCasPa ou pCasPd. Chaque plasmide a été extrait de deux colonies différentes puis digérés avec *BglIII/SallI/XhoI* pour vérifier si s'est le bon plasmide. Le résultat (pas montré) a donné une bande vers 5.5 kb pour le pCasPd et une vers 3.5 kb pour le pCasPa qui ne correspond pas à la taille attendu. La bande obtenue correspond à la bande non spécifique de la Figure 32.

Le produit PCR de la Figure 32 a été remis sur gel afin de purifier la bande en dessus de 10 kb. Le mix du kit Q5 site-directed mutagenesis permettant de recirculariser le plasmide était fini et il n'y avait pas assez de temps pour

attendre dessus. Ainsi, le produit purifié a été ensuite digéré avec *DpnI* durant 2h pour éliminer le plasmide de départ et garder que le plasmide amplifié par PCR car l'enzyme *DpnI* digère que les ADN méthylés. Ensuite, le plasmide a été recircularisé avec la T4 DNA ligase durant 16h à 16°C. Le plasmide recircularisé a été transformé dans *E. coli* TOP10 par heat shock. Après une nuit à 37°C, aucune colonie n'avait poussé sauf pour le contrôle positif montrant que la transformation a fonctionné mais pas la recircularisation ou la purification.

3.7 Transformation de *P. putida* KT2440 avec les plasmides construits dans ce travail

3.7.1 Transformation de *P. putida* KT2440 avec pCasPa et pCasPd

P. putida KT2440 a été transformé par électroporation avec le pCasPd ou pCasPa et les cellules ont été préparées le même jour que la transformation. Les plasmides transformés n'étaient pas totalement finis car il manque encore la substitution des 20 nucléotides qui permet d'éliminer le pTargetP mais cette transformation permet de vérifier si les plasmides fonctionnent dans la souche. Après la transformation, les cellules ont été étalées sur une plaque LB avec 50 µg/ml de kanamycine puis incubé une nuit à 30°C.

86 colonies ont été comptées pour le pCasPd et 123 colonies pour le pCasPa. Ce résultat permet d'affirmer que ces deux nouveaux plasmides fonctionnent dans *P. putida* KT2440. Aucune colonie n'a été comptée pour le contrôle négatif qui montre qu'il n'y a pas eu de contamination.

3.7.2 Transformation du *P. putida* KT2440 avec pTargetP- Δ phaZ

P. putida KT2440 a été transformé par électroporation et les cellules ont été préparées le même jour que la transformation. Après la transformation, les cellules ont été étalées sur une plaque LB avec 25 µg/ml de tétracycline puis incubé une nuit à 30°C.

Aucune colonie n'était visible pour le contrôle positif ni les cellules transformées. Ce résultat montre que les cellules n'étaient pas compétentes.

4 Discussion

Le test de la résistance à la spectinomycine dans *P. putida* KT2440 a révélé qu'elle n'était pas sensible à la spectinomycine jusqu'à 100 µg/ml. Selon la publication de Lázaro Molina et al. [19], *Pseudomonas putida* KT2440R est sensible à la spectinomycine à partir de 30 µg/ml sur plaque LB. *P. putida* KT2440R est dérivé spontanément de *P. putida* KT2440 en l'exposant à la rifampicine. Elle présente une mutation au nucléotide 1562 du gène *rpoB* de l'ARN polymérase, l'adénine remplacé par guanine. C'est une mutation faux sens en changeant l'acide aminé acide aspartique par glycine [20]. Cette mutation, ne devrait pas rendre *P. putida* KT2440R sensible à la spectinomycine car cet antibiotique agit sur le ribosome bactérien et inhibe la synthèse des protéines [21] alors que la mutation est au niveau de l'ARN polymérase inhibant la fixation de l'antibiotique rifampicine [22].

Une explication de cette résistance naturelle à la spectinomycine pourrait être dû aux intégrons qu'on retrouve dans plusieurs centaines d'espèces tels *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Nitrosomonas*, *Treponema*, etc. Les intégrons comprennent deux éléments essentiels : un site (*attI*), et un gène (*int*) codant pour une recombinase, intégrase ou site-spécifique. La recombinase et le site *attI* peuvent reconnaître une famille de gène, dénommés cassettes, et les capturer. Les cassettes sont transitoirement libres dans le cytoplasme et sont incapables de se répliquer de manière autonome et peuvent donner une résistance à un antibiotique ou autre. [23]

Le test de la résistance à la kanamycine a révélé que la souche était sensible entre 50 et 100 µg/ml en n'obtenant aucune colonie sur les contrôles négatifs. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus par Lázaro Molina et al. [19] car ceux-ci ont montré que *P. putida* KT2440R était sensible à partir de 10 µg/ml. Ce test a aussi révélé que la résistance fonctionne chez *P. putida* KT2440 en obtenant des colonies pour la souche transformée avec la résistance. Ce qui corréle avec la publication de Lei Cai et al. [8] car ceux-ci ont utilisé la résistance à la kanamycine dans *P. putida*.

Le résultat de ses tests a permis de proposer un concept pour construire les deux plasmides qui permettront d'introduire le système CRISPR/Cas9 dans *P. putida* KT2440.

Le plasmide d'origine pTargetF n'a pas été gardé car la résistance ne pouvait pas être utilisée comme moyen de sélection puisque *P. putida* n'est pas sensible à la spectinomycine. Aucune information dans la littérature n'a été trouvée si l'origine de réplication pMB1 fonctionne dans *P. putida* ainsi il était plus simple de prendre le gène codant pour le sgRNA et son promoteur et de l'introduire dans un autre plasmide qui fonctionne dans *P. putida*. Le pSEVA521 a été choisi puisque son origine RK2 fonctionne chez *P. putida* selon la publication de Aayushi et al. [24] et que la résistance à la tétracycline fonctionne aussi puisqu'elle a été utilisée dans *P. putida* KT2440 dans la publication de Victor de Lorenzo et al. [14]. Les informations obtenues dans les publications sur la résistance tétracycline et sur l'origine RK2 a été confirmé dans ce travail car la souche a été transformée avec pSEVA521 et des colonies ont poussé. Le pSEVA521 avait aussi l'avantage de contenir deux mêmes enzymes de restrictions que sur le pTargetF et qui isolaient le sgRNA avec son promoteur (voir Figure 8). La digestion est préférée à la PCR pour isoler un fragment car par digestion, il y a moins de risque de mutation. Finalement, le pSEVA521 a été choisi plutôt que le pSEVA551 car il était plus petit et plus le plasmide est petit plus c'est facile de travailler avec.

Les 20 nucléotides du pTargetP ont été substitués afin de pouvoir cibler le gène de la PHA dépolymérase du génome de *P. putida* KT2440. Ceci permettra de faire un knock out de ce gène à l'aide du système CRISPR/Cas9. La séquence cible a été choisie de sorte qu'il y ait une séquence PAM NGG directement après en 3'. Les trois premiers plasmides de la Figure 15 ont été séquencés afin de vérifier qu'il n'y a pas eu de mutation durant la PCR. Le numéro un a été gardé pour continuer car la qualité du signal du séquençage était la meilleure et qu'il n'y avait aucune mutation.

Après avoir testé les résistances, l'origine de réplication du pCas, *repA101*, a été testé dans *P. putida* car aucune information n'a été trouvée dans la littérature. Le test a révélé que cette origine ne fonctionnait pas dans *P. putida*. Le reste des gènes du pCas étaient tous intéressants pour utiliser dans la souche ainsi il était plus simple de garder le plasmide pCas et de changer juste l'origine de réplication. Le système red sur le pCas a été gardé car selon Yu Jiang et al. [11], il augmente l'efficacité du système CRISPR/Cas9 chez *E. coli*. Il voulait ainsi être testé chez *P. putida* car selon la review de Christopher R. T. Hillyar [12], le système lambda est indépendant de son hôte.

La première proposition pour changer l'origine de réplication était de faire par digestion car il y a moins de risque de mutation. Il a été aussi choisi d'enlever l'origine de réplication *repA101* afin de diminuer la taille du plasmide. L'origine choisie pour remplacer le *repA101* est celui du pBBR RESO car ce plasmide était déjà dans le laboratoire et selon Aayushi et al. [24] elle fonctionnait dans *P. putida*.

Le site de restriction *SnaBI* du pCas choisi pour éliminer l'origine du pCas avait un problème comme montré dans les résultats au point 3.6.1.2. Cette enzyme peut être bloquée ou altérée lorsque l'ADN est méthylé par une méthylase CpG (NEB). La souche (*E. coli* TOP10) d'où provient le plasmide ne méthyle pas les CpG [25]. Ceci est affirmé par l'autre enzyme de restriction utilisée car elle a coupé le même ADN et elle est aussi sensible à la méthylation des CpG.

Puisque le site de restriction *SnaBI* ne fonctionnait pas et qu'aucun autre site ne pouvait être remplacé pour éliminer l'origine du pCas, deux manières de construire le pCas ont été faites en parallèle. La première par digestion sans éliminer l'origine *repA101* du pCas qui a été appelé pCasPd et l'autre par PCR pour éliminer l'origine *repA101* qui a été nommé pCasPa.

Le plasmide pCasPa et pCasPd ont été transformés dans *P. putida* KT2440 afin de vérifier s'ils fonctionnaient. Il manquait juste la substitution du N20 sur les deux nouveaux plasmides qui permettrait par la suite d'éliminer le pTargetP avec le système CRISPR/Cas9. Entre 86 et 123 colonies ont poussées montrant que l'origine et la résistance fonctionnent comme trouvé dans la littérature [24] [8].

Le système permettant d'éliminer le pCas a été supprimé en le remplaçant par une origine de réplication non sensible à la température mais le but de ce travail était de développer un système pour *P. putida* et il sera par la suite amélioré.

5 Conclusion

Pour conclure, deux nouveaux plasmides ont pu être construits durant ce travail qui permettront d'introduire le système CRISPR/Cas9. Le plasmide pTargetP est fini et a été vérifié par séquençage. Le pCasPa et pCasPd sont presque finis, il faut encore substituer les 20 nucléotides qui permettront d'éliminer le pTargetP. Ces deux plasmides ont déjà été testés dans *P. putida* KT2440 et ils fonctionnent.



Il serait intéressant par la suite de refaire la substitution des 20 nucléotides à l'aide du kit Q5 site-directed mutagenesis et les primer Q5SDM-N20-F et Q5SDM-N20-R puis de purifier le produit PCR et de recirculariser le plasmide avec le même kit. Si les deux plasmides fonctionnent après la substitution, il serait plus intéressant de garder le pCasPa pour la suite car il est de plus petite taille.

Le prix pour envoyer à séquencer tout le plasmide pCasPa ou pCasPd revient très cher (plus de 2000 fr) ainsi il serait intéressant de tester chaque gène avec différents plasmides pour affirmer que le gène fonctionne et qu'il n'y a pas de mutation.

Une méthode pour vérifier le knock out du *phaZ* serait de lancer deux cultures dans un Erlenmeyer : *P. putida* KT2440 wild type et l'autre *P. putida* KT2440 Δ phaZ. La culture se ferait dans du milieu E2 avec 10 mM d'acide octanoïque et durant plus de 48h à 30°C et 180 rpm. Un échantillon serait récolté toute les 2h durant la culture pour mesurer l'OD₆₀₀, mesurer la biomasse sèche, colorer la PHA avec Nile Red et de quantifier la PHA par cytomètre de flux à l'aide de la méthode de stephanie Karmann et al. [26]. Si une augmentation puis un plateau est obtenu sur un graphe avec la quantité de PHA en fonction du temps pour le *P. putida* KT2440 Δ phaZ et une augmentation puis une diminution de la PHA pour *P. putida* KT2440 wild type, le knock out peut être confirmé.

Remerciement

Je remercie le Professeur Schmid Sergio pour m'avoir permis de travailler dans la recherche en biologie moléculaire ainsi que de m'avoir suivie durant ce travail et de l'aide apportée.

Je remercie Madame Pistoletti Blanchet Gordana pour les conseils fournies lors de ce travail ainsi que son soutien.

Je remercie l'équipe SEVA collection de Madrid pour avoir donné généreusement le plasmide pSEVA521 et pSEVA551.

Je remercie le Docteur Monica Bassas Galia pour avoir communiqué avec l'équipe SEVA collection et d'avoir aidé pour trouver une solution pour quantifier la PHA.

Je remercie le Docteur Wegmüller Sarah pour l'aide apporté durant ce travail.

Bibliographie

1. Li Y, Lin Z, Huang C, Zhang Y, Wang Z, Tang YJ, Chen T, Zhao X, Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing, *Metab Eng*, 2015, 31, 13-21.
2. Zhao D, Yuan S, Xiong B, Sun H, Ye L, Li J, Zhang X, Bi C, Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9, *Microb Cell Fact*, 2016, 15 (1), 205.
3. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, A. Doudna J, Charpentier E, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *science*, 2012, 337 (6096), 816-821.
4. Reis A, Hornblower B, Robb B, Tzertzinis G, CRISPR/Cas9 and targeted genome editing: A new era in molecular biology, *New England Biolabs*, 2014, (1).
5. CRISPR/Cas9, <https://www.addgene.org/crispr/guide/>, (consulté le 10.08.17).
6. Ran FA, D. Hsu P, Wright J, Agarwala V, A. Scott D, Zhang F, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *nature protocols*, 2013, 8, 2281-2308.
7. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M et al, Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440, *Environ Microbiol*, 2002, 4 (12), 799-808.
8. Cai L, Yuan MQ, Liu F, Jian J, Chen GQ, Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442, *Bioresour Technol*, 2009, 100 (7), 2265-2270.
9. de Eugenio LI, Escapa IF, Morales V, Dinjaski N, Galan B, Garcia JL, Prieto MA, The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance, *Environ Microbiol*, 2010, 12 (1), 207-221.
10. Escapa IF, Garcia JL, Buhler B, Blank LM, Prieto MA, The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*, *Environ Microbiol*, 2012, 14 (4), 1049-1063.
11. Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S, Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system, *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81 (7), 2506-2514.
12. Hillyar cRT, Genetic recombination in bacteriophage lambda, *BioscienceHorizons*, 2012, 5.
13. pBBR RESO, numéro de catalogue RESO01, MoBiTec.
14. de Lorenzo V, Eltis L, Kessler B, N. Timmis K, Analysis of *Pseudomonas* gene products using $lacI^q/P_{trp}$ -lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes, *Gene*, 1993, 123, 17-24.
15. *Pseudomonas putida* KT2440, numéro de catalogue 47054, ATCC.
16. Primer3Plus, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, (consulté le 16.07.17).

17. Wang Q, P. Mueller A, Ring Leong C, Matsumoto Ki, Taguchi S, T. Nomura C, Quick and efficient method for genetic transformation of biopolymer-producing bacteria, *Journal of chemical technology and biotechnology*, 2009, 85v(6), 775-778.
18. Forré C, transformation with heat shock method, HES-SO/Valais, Sion 2014.
19. Molina L, Udaondo Z, Duque E, Fernández M, Molina-Santiago C, Roca A, Porcel M, de la Torre J, Segura A, Plesiat P et al, Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital, *PLoS One*, 2014, 9 (1), e81604.
20. Espinosa-Urgel M, Ramos JL, Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440, *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 (9), 5190-5198.
21. Thapa LP, Oh TJ, Liou K, Sohng JK, Biosynthesis of spectinomycin: heterologous production of spectinomycin and spectinamine in an aminoglycoside-deficient host, *Streptomyces venezuelae* YJ003, *J Appl Microbiol*, 2008, 105 (1), 300-308.
22. Goldstein BP, Resistance to rifampicin: a review, *J Antibiot (Tokyo)* 2014, 67 (9), 625-630.
23. Paolozzi L, Liébart J-C, *Microbiologie*, DUNOD, Paris, 2015, 509.
24. Aayushi J, Preeti S, Broad host range plasmids, *FEMS microbiology letters*, 2013, 348 (2), 87-96.
25. NEB , <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dam-dcm-and-cpg-methylation>, (consulté le 24.06.17)
26. Karmann S, Follonier S, Bassas-Galia M, Panke S, Zinn M, Robust at-line quantification of poly(3-hydroxyalkanoate) biosynthesis by flow cytometry using a BODIPY 493/503-SYTO 62 double-staining, *J Microbiol Methods*, 2016, 131, 166-171.

Annexe

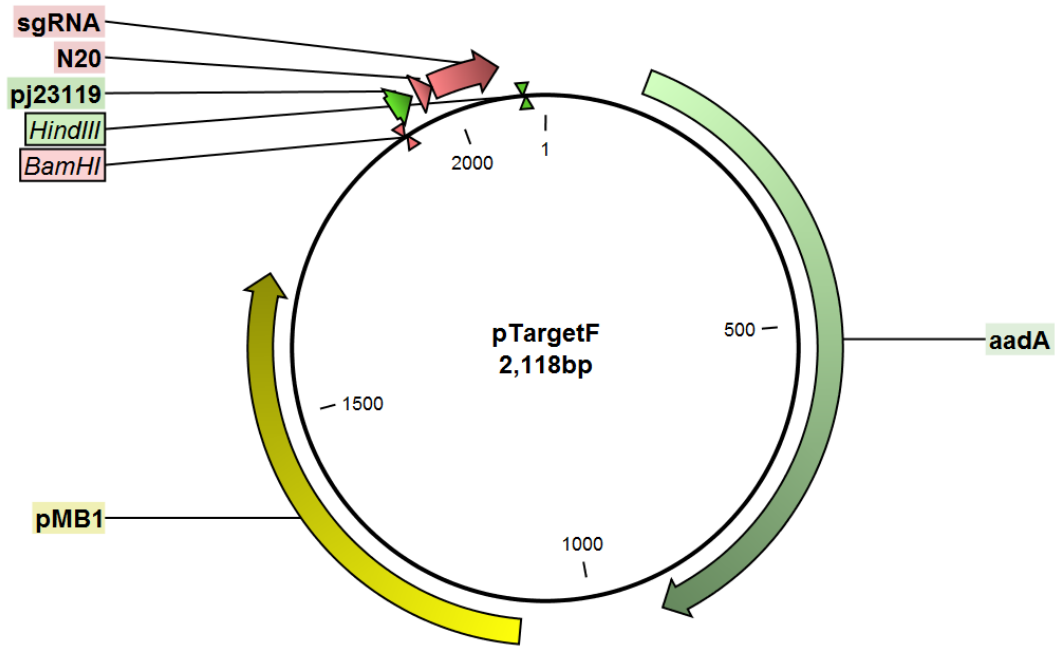


Figure 1 : carte du pTargetF. pMB1 est l'origine de réplication, aadA est la résistance à la spectinomycine et pj23119 est le promoteur du sgRNA.

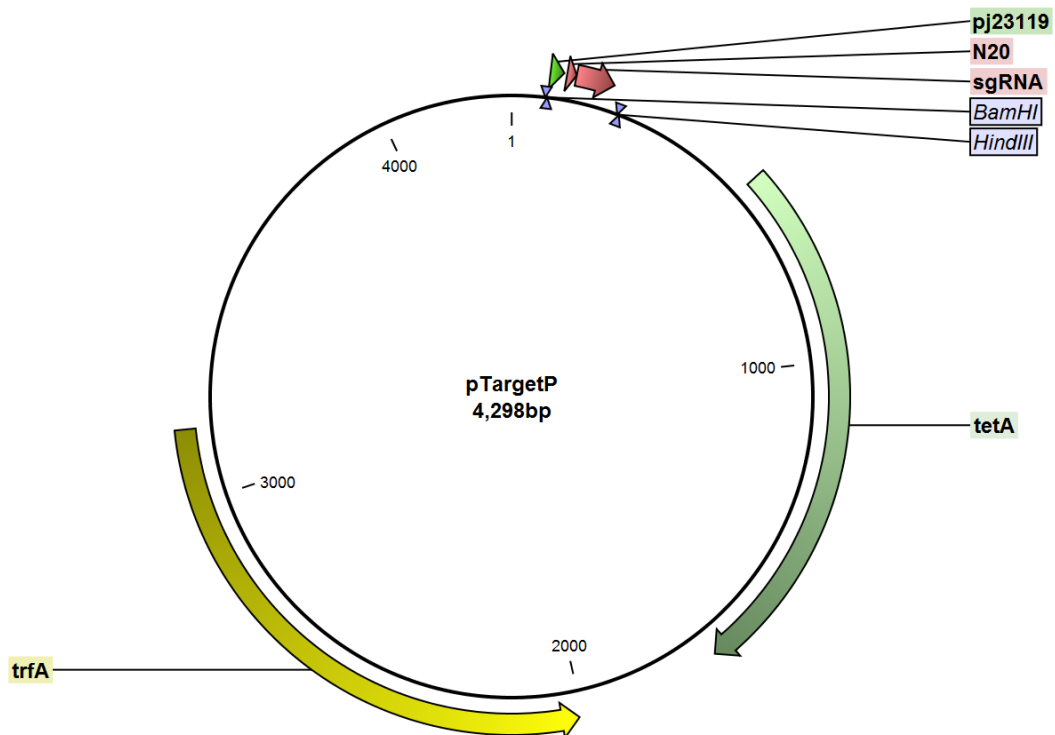


Figure 2 : Carte du pTargetP. trfA est la protéine pour la réplication, tetA est la résistance à la tétracycline et pj23119 est le promoteur.

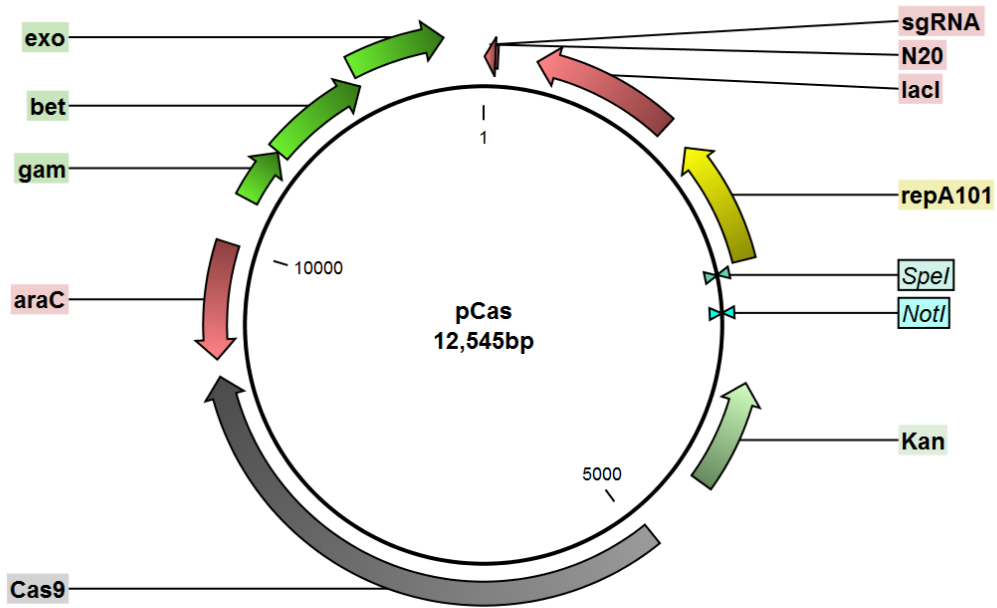


Figure 3 : carte du pCas. repA101 est l'origine de répliation sensible à la température, Kan est la résistance à la kanamycine et gam, bet, exo sont le système Red.

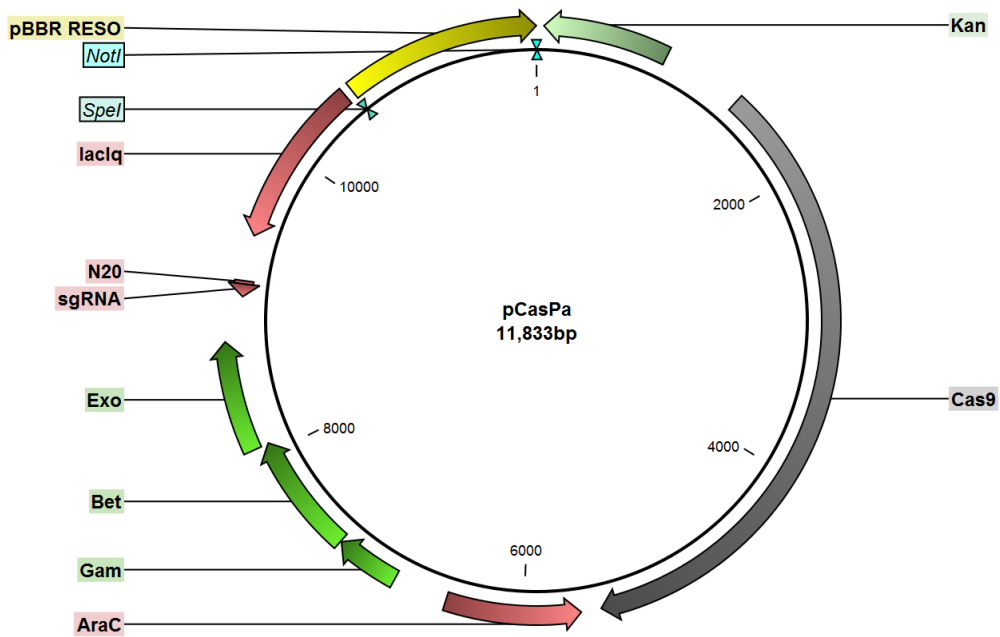


Figure 4 : carte du pCasPa. pBBR RESO est l'origine de répliation, Kan est la résistance à la kanamycine et gam, bet, exo sont le système Red.

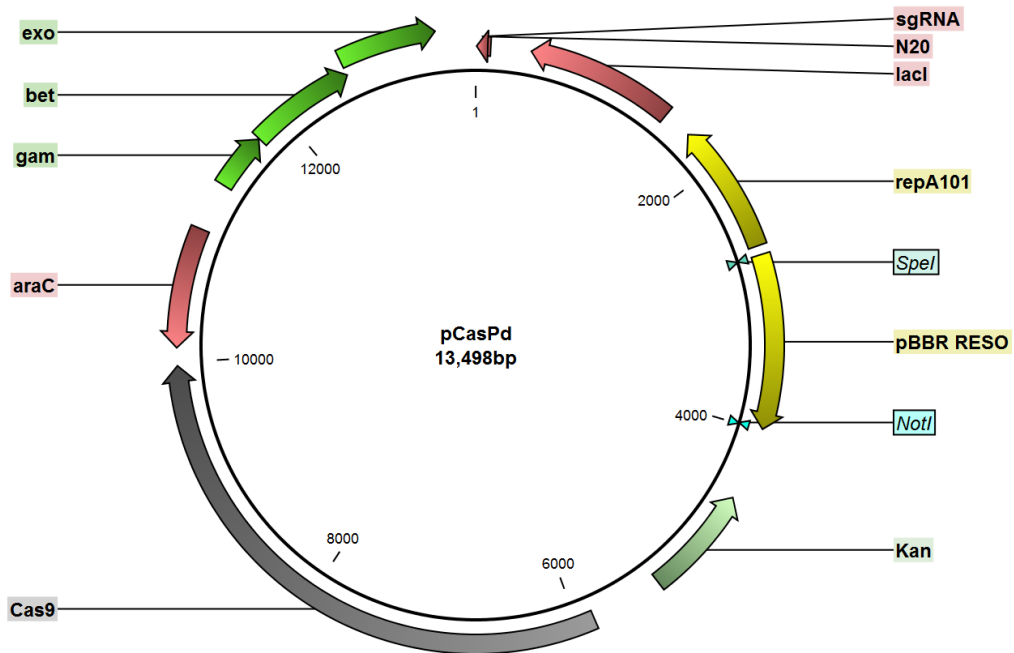


Figure 5 : carte du pCasPd. repA101 est l'origine de réplication sensible à la température, pBBR RESO est la deuxième origine de réplication, Kan est la résistance à la kanamycine et gam, bet, exo sont le système Red.