

Analyse génétique de *sacB*, gène de structure d'une enzyme sécrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg

Michel Steinmetz, Dominique Le Coq, Hajer Ben Djemia*, et Philippe Gay
Laboratoire Génétique et Membranes, Institut Jacques Monod, CNRS et Université Paris VII,
Tour 43-2, place Jussieu, F-75251 Paris, Cedex 05, France

Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg

Summary. The structural gene *sacB* encoding *B. subtilis* levansucrase, a secreted enzyme, expresses in *E. coli*. *E. coli* hosts of the *sacB* gene are poisoned by sucrose. This property allowed a powerful selection of mutants affected in the cloned gene.

The plasmidic mutations were readily introduced in the *B. subtilis* chromosome. Using a collection of plasmids bearing various deletions extending in *sacB* we developed a technique of deletion mapping based on plasmid integration in the chromosome of *B. subtilis*. A generalization of this technique is discussed.

Résumé. Le gène de structure *sacB* d'une enzyme sécrétée de *Bacillus subtilis*, la lévane-saccharase, a été cloné dans *Escherichia coli* et s'y exprime (Gay et coll. 1983). Les souches d'*E. coli* qui synthétisent la lévane-saccharase sont intoxiquées par le saccharose. Cette propriété a permis la mise au point d'un crible sélectif d'isolement de mutants affectés dans le gène *sacB* cloné. Les mutations plasmidiques dans *sacB* peuvent aisément être introduites dans le chromosome de *B. subtilis*. Par ailleurs, une série de plasmides portant des fragments plus ou moins longs de *sacB* ont été construits, qui peuvent s'intégrer dans le chromosome de *B. subtilis* et être utilisés pour réaliser la cartographie par délétion de *sacB*. L'adaptation de cette technique à l'étude d'autres gènes ou groupes de gènes de *B. subtilis* est brièvement discutée.

Introduction

La lévane-saccharase est une enzyme sécrétée par *Bacillus subtilis* qui catalyse le transfert du fructose à partir du saccharose sur divers accepteurs tels que l'eau – réaction d'hy-

* Adresse actuelle: Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, Tunis, Tunisie

Abbreviations: AP: ampicilline; Ap^{R/S}: résistant/sensible à l'ampicilline 150 µg/ml; CM: chloramphénicol; Cm^{R/S}: résistant/sensible au chloramphénicol (25 µg/ml pour *E. coli*, 5 µg/ml pour *B. subtilis*); His^{+/-}: prototrophie/auxotrophie pour l'histidine; Lev^{+/-}: synthèse/absence de synthèse de lévanes; Sac: saccharose; Sac^{R/S}: résistant/sensible au saccharose (60 mM)

Tirés à part: M. Steinmetz

drolyse – ou les lévanes – réaction d'élongation des lévanes. La synthèse de la lévane-saccharase, dirigée par son gène de structure *sacB*, est inductible par le saccharose et obéit à plusieurs régulations: une régulation spécifique, altérée notamment par des mutations dans un locus régulateur *sacR*, voisin de *sacB*, mutations qui rendent constitutive cette synthèse; une régulation commune à l'ensemble des protéines impliquées dans le métabolisme du saccharose; et enfin une régulation non spécifique affectant de nombreuses autres fonctions cellulaires sans rapport avec le métabolisme du saccharose (Lepesant et coll. 1976). Cette dernière régulation a été mise en évidence par les mutations pléiotropes du locus *sacU* (*pap*) qui affectent le niveau de synthèse de la lévane saccharase, de deux protéases exocellulaires et de l' α -amylase et altèrent diverses fonctions cellulaires telles que la synthèse des flagelles et le déclenchement de la sporulation (Kunst et coll. 1974; Steinmetz et coll. 1977). Le mode d'action et la signification de cette régulation pléiotrope sont encore complètement inconnus.

L'étude de la régulation de la synthèse de la lévane-saccharase et de sa sécrétion passe, entre autres, par l'isolement de mutants affectés dans *sacB* et par la cartographie des mutations correspondantes. Or, il n'existe pas de phénotype sélectif connu associé à la présence et/ou à l'absence de lévane-saccharase active chez *B. subtilis*: il existe seulement un phénotype visible sur milieu solide, la synthèse de lévanes en présence de saccharose (Lepesant et coll. 1974). Ceci rend laborieux l'isolement de mutants affectés dans *sacB*. Cette absence de caractère sélectif associé à la synthèse de la lévane saccharase et l'absence de marqueur sélectif lié en transformation à *sacB* font que la cartographie des mutations *sacB*⁻ ne peut être réalisée que par transduction par le phage PBS1. Cette méthode permet de localiser sans ambiguïté les différentes mutations abolissant la synthèse de la lévane-saccharase dans trois loci distincts, le gène *sacB* et les loci régulateurs *sacS* et *sacU* (Lepesant et coll. 1972) mais ne permet pas la cartographie précise des différentes mutations de ces loci. Récemment, *sacB* et la région régulatrice adjacente *sacR* ont été clonés dans *E. coli*. Le gène *sacB* a pu être localisé précisément sur l'ADN cloné par comparaison de la structure primaire de la lévane-saccharase avec la carte de restriction. Ce gène s'exprime dans *E. coli* (Gay et coll. 1983). L'obtention de ce clone a permis de tourner les difficultés résumées ci-dessus: nous décrivons dans cet article une méthode aisée d'isolement de mutants affectés dans le gène *sacB* inséré dans pBR 325 et une technique précise de cartographie par délétion de *sacB*, opérationnelle dans *B. subtilis*.

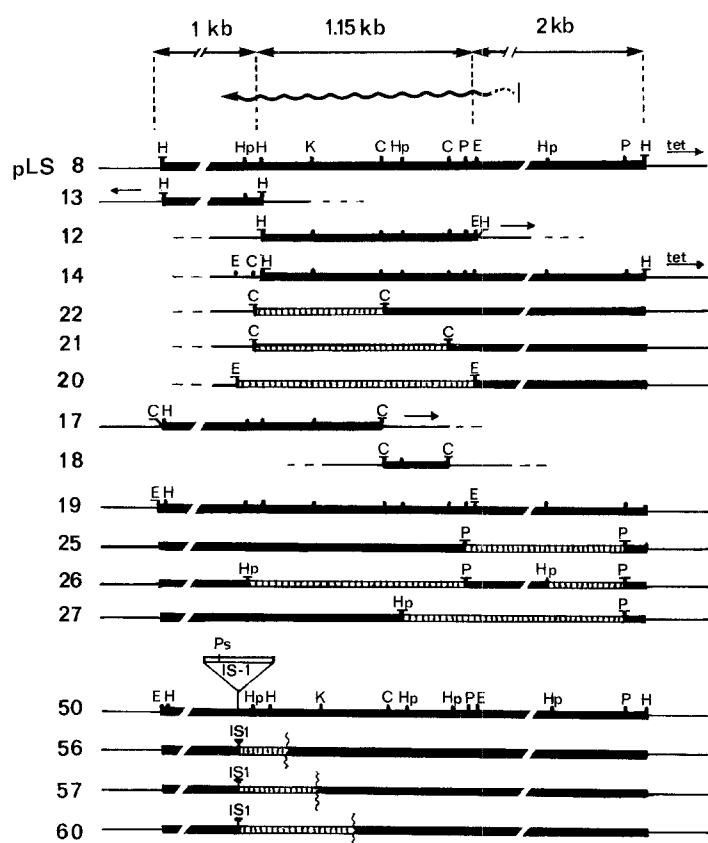


Fig. 1. Carte des insertions des plasmides construits in vitro ou sélectionnés in vivo. Les insertions issues du génome de *B. subtilis* (via pLS7) sont figurées par un trait gras, le vecteur plasmidique par un trait fin. Les cartouches hachurées correspondent au matériel délété. C, E, H, Hp, K, P et Ps désignent les sites *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *HpaI*, *KpnI*, *PvuII* et *PstI* respectivement. Les sites soulignés sont ceux ayant directement servi à la génération du plasmide. La flèche ondulante positionne et donne l'orientation du gène *sacB*; la partie du gène codant pour l'éventuelle séquence signal est en pointillé

Matériel et méthodes

Plasmides et souches bactériennes. L'isolement de λ LSC66 à partir d'une banque d'ADN de *B. subtilis* dans λ Charon 4 et la construction à partir de λ LSC66 et des plasmides pH4 et pBR325 des plasmides pLS1 à pLS8 ont été précédemment décrits. pLS8 porte le gène de structure *sacB* de la lévane-saccharase et la région régulatrice adjacente *sacR* (Gay et coll. 1983). Le plasmide pJH101 est un don de F. Ferrari. C'est un dérivé de pBR322 qui porte le gène de résistance au chloramphénicol de pC194, fonctionnel dans *E. coli* et dans *B. subtilis*, mais qui ne se réplique que dans *E. coli* (Ferrari et coll. 1982). Les plasmides que nous avons construits ou isolés pour cette étude sont décrits sur la fig. 1. Constructions de plasmides: pLS12, 13 et 14, insertions de fragments *HindIII* de pLS7 dans pJH101; pLS17 et 18, insertion d'un fragment *ClaI* de pLS8 dans pJH101; pLS20 et pLS21, délétions *EcoRI* et *ClaI*, respectivement, de pLS14; pLS22, délétion partielle *ClaI* de pLS14 (digestion partielle par *ClaI*, ligation et digestion du produit ligaturé par *KpnI* avant transformation); pLS19, insertion d'un fragment *EcoRI* de pLS7 dans pLS14; pLS25, délétion *PvuII* de pLS19; pLS26 double délétion par *PvuII* et *HpaI*

Tableau 1. Souches bactériennes

Souches de <i>B. subtilis</i> Marburg ^a				
QB2060	<i>sacR</i> ²	<i>sacB</i> 204	<i>cysB</i> 3	Gay et coll. (1983)
QB165	<i>sacA</i> 321	<i>sacS</i> ²	<i>trpC</i> 2 <i>hisA</i> 1	F. Kunst et J. Lepesant
QB174	<i>sacA</i> 321	<i>sacS</i> ²	<i>trpC</i> 2	F. Kunst et J. Lepesant
QB1057	<i>sacA</i> 321	<i>sacS</i> ²	<i>trpC</i> 2 <i>sacB</i> 91	F. Kunst et J. Lepesant
QB1058	<i>sacA</i> 321	<i>sacS</i> ²	<i>trpC</i> 2 <i>sacB</i> 197	F. Kunst et J. Lepesant
CS 41 à 48	<i>sacA</i> 321	<i>sacS</i> ²	<i>trpC</i> 2 <i>sacB</i> 41 à 48	ce travail
Souches d' <i>E. coli</i> K12				
GC4446	<i>gal1 gal2 str</i> ^R			O. Huisman ^b

^a Signification des génotypes des souches de *B. subtilis* d'après Lepesant et coll. (1976): *sacA*321 mutation abolissant la synthèse de saccharase endocellulaire; *sacS*² mutation rendant constitutive la synthèse de la lévane-saccharase, non liée à *sacB*; *sacR*² mutation rendant constitutive la synthèse de la lévane-saccharase, liée à *sacB*; *sacB*91, *sacB*197 et *sacB*204, mutations dans *sacB* induites à l'E.M.S dans *B. subtilis*

^b Transductant lac⁺ de la souche 594 (Thomas et coll. 1966)

de pLS19 avec reclonage d'un fragment *PvuII*–*HpaI* interne; pLS27, produit de délétion totale par *PvuII* et partielle par *HpaI* de pLS19. pLS50 est un dérivé spontané de pLS19 qui porte une séquence *IS1* insérée à quelques dizaines de nucléotides de la fin du gène *sacB*. Il a été isolé par sélection de mutants spontanés de GC4446 (pLS19) ayant recouvré une certaine résistance à la tétracycline (5 μ g/ml) perdue par l'insertion dans le site *HindIII* de pJH101. GC4446 (pLS50) a en outre une résistance accrue au chloramphénicol et synthétise plus de lévane-saccharase que GC4446 (pLS19). Ce phénotype pléiotrope est mal compris mais pourrait résulter du fait que pLS50 est présent à un plus grand nombre de copies par cellule que pLS19. Le mode d'obtention de pLS56, 57 et 60, produits de délétion in vivo de pLS50, est décrit dans la fin de la section *Résultats et discussion*. Les souches bactériennes utilisées sont décrites dans le tableau 1.

Milieux et techniques génétiques. Les conditions et milieux de transformation d'*E. coli* et *B. subtilis*, les techniques de préparation des ADN plasmidiques et chromosomiques et d'analyse de restriction des plasmides ont été précédemment décrits (Gay et coll. 1983).

La mutagenèse in vitro par l'hydroxylamine du plasmide pLS8 a été réalisée comme décrit par Hashimoto et Sekiguchi (1976); la souche GC4446 est transformée par le plasmide mutagenisé et les transformants Cm^R sélectionnés; ces transformants sont répliqués sur milieu LB + AP ce qui permet de repérer et de compter les mutants Ap^S et ainsi de mesurer l'efficacité de la mutagenèse. Le mode de repérage des mutants affectés dans *sacB* est décrit dans *Résultats et discussion*. A partir de la même préparation de plasmide mutagenisé sont réalisées des transformations indépendantes qui permettent l'isolement de mutants indépendants.

L'activité de la lévane-saccharase synthétisée par les souches d'*E. coli* porteuses de pLS8 ou de ses dérivés mutés peut être révélée sur milieu solide par un test adapté du

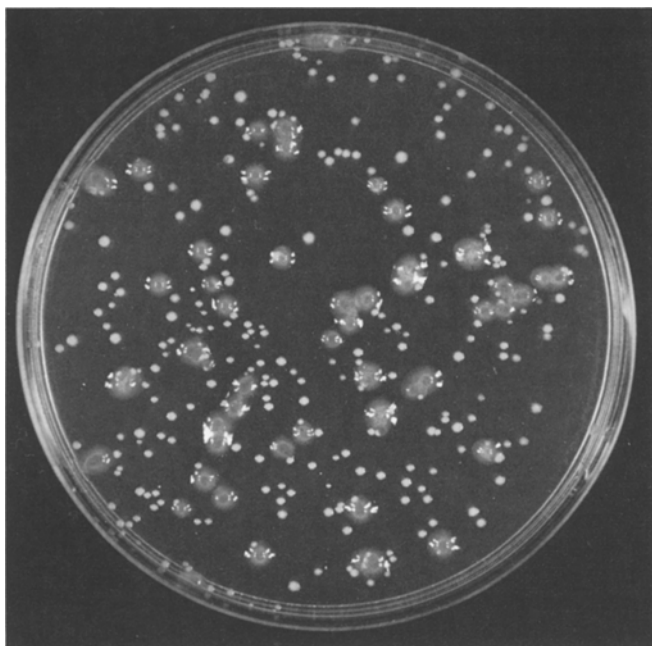


Fig. 2. Colonies Lev^+ et Lev^- . Sur milieu SGHCM les colonies synthétisant une lévane-saccharase sauvage s'entourent d'une bulle de lévanes visible au bout de 36 h de croissance à 37° C

test mis au point pour *B. subtilis* par Lepesant et coll. (1972). Après 24 h de croissance à 37° C sur milieu solide M63 + glycérol + CM (25 µg/ml) les colonies sont: 1) recouvertes par pulvérisation avec un mélange de lysozyme (10 mg/ml) et d'EDTA (10^{-3} M) et incubées 30 min à 37° C; 2) recouvertes avec une solution de saccharose (1,5 M) et incubées 60 min à 37° C; 3) recouvertes avec le réactif du glucose GOD-Perid (Boehringer). Un halo vert autour des colonies révèle le glucose produit à partir du saccharose par la lévane-saccharase. Ce halo apparaît en 1 min autour des colonies de GC4446 (pLS8) et est invisible autour des colonies GC4446 (pBR325), même au bout de 2 h. Ce test est semi-quantitatif; un faible halo vert est visible au bout d'une à 2 h autour des clones mutés de GC4446 (pLS8) qui synthétisent une activité lévane-saccharase résiduelle 10 à 50 fois plus faible que les clones non mutés.

L'identification sur milieu solide des colonies de *B. subtilis* synthétisant la lévane-saccharase se fait sur milieu SG, milieu minéral plus saccharose où les colonies sauvages synthétisent des lévanes (Gay et coll. 1982). Le milieu SGHCM est le milieu SG additionné de chloramphénicol (5 µg/ml), de tryptophane (20 µg/m) et d'hydrolysate de caséine (500 µg/ml). Il permet la sélection des transformants Cm^R de *B. subtilis* et l'identification et éventuellement le comptage parmi eux des colonies synthétisant ou non des lévanes et donc une lévane-saccharase sauvage ou non (fig. 2).

L'introduction dans *B. subtilis* des mutations de *sacB* induites sur pLS8 est réalisée par congession: une suspension pré-compétente de la souche QB165 est diluée dans le milieu de compétence en présence d'ADN plasmidique et d'une quantité limitante d'ADN de QB174, dérivé isogénique His^+ de QB165, et les transformés His^+ sont sélectionnés sur milieu SG + tryptophane (20 µg/ml) où peuvent être repérés les doubles transformés $His^+ Lev^-$ ayant acquis

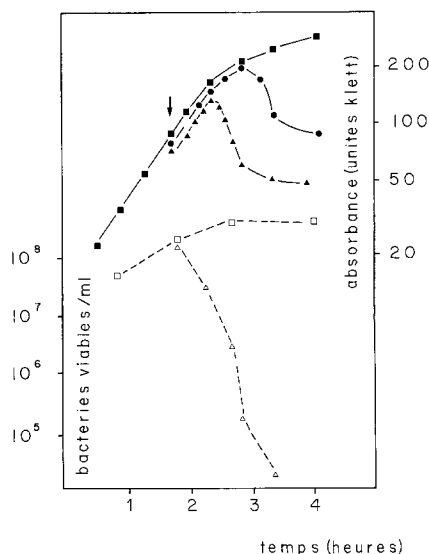


Fig. 3. Effet toxique du saccharose sur la souche GC4446 (pLS8). Les souches GC4446 (pLS8) et GC4446 (pBR325) ont été cultivées en milieu LB+CM et la densité optique des cultures mesurée par un colorimètre Klett. (↓ addition de saccharose; ▲, ● et ■ densité optique de GC4446 (pLS8) additionnée de saccharose 150 mM et 60 mM et sans addition de saccharose; △ et □, comptage des bactéries viables des cultures de GC4446 (pLS8) additionnée ou non de saccharose (150 mM). Les courbes de croissance de GC4446 (pBR325) additionnée ou non de saccharose (150 mM) et de GC4446 (pLS8) additionné de saccharose (30 mM) ne sont pas représentées, elles sont très semblables à celles de GC4446 (pLS8) sans addition de saccharose

la mutation du plasmide. Pratiquement, avec une quantité d'ADN plasmidique suffisante pour réduire par compétition le nombre de transformés His^+ d'un facteur 20 à 100 par rapport à un témoin sans ADN plasmidique, 10% à 40% des transformés His^+ sont aussi Lev^- .

Résultats et discussion

Toxicité du saccharose pour les souches d'*E. coli* synthétisant la lévane saccharase

Il a été montré précédemment que les souches d'*E. coli* porteuses du plasmide pLS8 synthétisent la lévane-saccharase (Gay et coll. 1983). En milieu liquide, LB+CM, la vitesse de croissance de la souche GC4446 (pLS8) est semblable à celle de la souche GC4446 (pBR325). L'addition de saccharose a un effet toxique sur la première, mais n'affecte pas la deuxième. L'addition de saccharose (150 mM) est suivie 40 à 60 min plus tard d'une lyse rapide mise en évidence par la chute de densité optique et confirmée par observation microscopique. Cette lyse affecte en 30 min 40% à 70% de la population, puis se poursuit à une vitesse beaucoup plus lente (fig. 3). Le comptage des bactéries viables par étalement sur milieu solide LB+CM montre que c'est en fait la quasi-totalité de la population qui est empoisonnée de manière irréversible. L'addition de saccharose à des concentrations plus faibles (60 mM et 100 mM) donne lieu à des empoisonnements plus lents.

Le mécanisme biochimique de cette intoxication n'est pas connu avec certitude. Il est probable que la lévane-saccharase synthétise des lévanes à partir du saccharose dans le périplasm ou même le cytoplasme d'*E. coli*, encom-

brant les cellules, un peu comme le font les dextrines accumulées dans le cytoplasme des mutants d'*E. coli* dépourvus de maltodextrine phosphorylase et cultivés en présence de maltose (Schwartz 1967). Mais la synthèse d'un poison secondaire différent des lévanes ne peut être exclue; la lévane-saccharase est une transfructosylase capable d'additionner des résidus fructose sur une grande variété de molécules acceptrices (Rapoport et Dedonder 1963). L'empoisonnement pourrait être dû à l'addition de fructose sur une molécule acceptrice de nature inconnue, cette molécule modifiée étant détournée de sa fonction physiologique. La localisation cellulaire de cette intoxication n'est pas connue non plus. Certes, les enzymes exocellulaires de bacillacées telles que la pénicillinase et l' α -amylase, dont les gènes de structure ont été clonés dans *E. coli* et s'y expriment, sont sécrétées dans le périplasme (Gray et Chang 1981; Imanaka et coll. 1981; Cornelis et coll. 1982) mais la situation semble moins simple pour la lévane-saccharase: l'enzyme est présente dans le périplasme comme dans le cytoplasme (Rain-Guion, résultats non publiés). Or, bien qu'*E. coli* K12 ne possède pas de système de transport spécifique du saccharose, une diffusion passive ou même un transport actif non spécifique ne peuvent être exclus aux concentrations de saccharose utilisées pour obtenir l'empoisonnement (60 mM ou 150 mM).

Isolement de mutants spontanés résistants au saccharose

L'observation décrite ci-dessus a été mise à profit pour isoler des mutants insensibles au saccharose. L'étalement d'une suspension de GC4446 (pLS8) sur milieu LB + CM + SAC (60 mM) permet d'isoler des mutants spontanés chez lesquels on détecte peu ou pas d'activité lévane-saccharase par le test sur milieu solide. La fréquence apparente de mutants spontanés obtenus dans ces conditions est anormalement élevée, de l'ordre de 10^{-4} . Cette observation reflète probablement le fait qu'une fraction de la population non mutante peut échapper transitoirement à la lyse, faire quelques cycles de division et produire des clones mutants.

Les plasmides ont été extraits de 18 de ces mutants spontanés et réintroduits par transformation dans GC4446. Les transformants correspondants à 10 mutants sont indistingua-bles des mutants d'origine. Les mutations correspondantes sont donc plasmidiques. L'analyse par digestion *Hind*III des plasmides mutés montre qu'ils sont tous porteurs d'une séquence d'insertion de type IS de 700 à 1400 paires de bases. Deux séquences IS1 et deux séquences IS2 ont été identifiées et localisées par leur taille et la présence et la position de sites d'enzyme de restriction caractéristiques: 780 paires de bases et un site *Pst*I pour IS1 (Ohtsubo et Ohtsubo 1978); 1350 paires de bases, un site *Hind*III et un site *Hpa*I pour IS2 (Ghosal et coll. 1979). Les six autres séquences IS ont une taille d'environ 1300 paires de bases mais ne portent pas de sites *Hind*III et *Pst*I: elles se distinguent donc d'IS1 et IS2 mais aussi d'IS3 qui porte deux sites *Hind*III et un site *Pst*I (Sommer et coll. 1979). Elles portent toutes un site *Eco*RI, ce qui les distingue d'IS4 (Klaer et Starlinger 1980) et pour certaines d'entre elles, un site *Bgl*II comme la séquence IS5 (Lusky et coll. 1980). Il s'agit donc de séquences IS5 et/ou de séquences d'insertion inconnues ou de variants de séquences d'insertions connues. Toutes ces 10 séquences IS sont insérées dans le segment de 1,3 kb correspondant au gène *sacB* et se répar-

tissent sur toute la longueur de ce gène. Ceci confirme que la toxicité du saccharose pour la souche GC4446 (pLS8) est bien due à la synthèse de lévane-saccharase par cette souche.

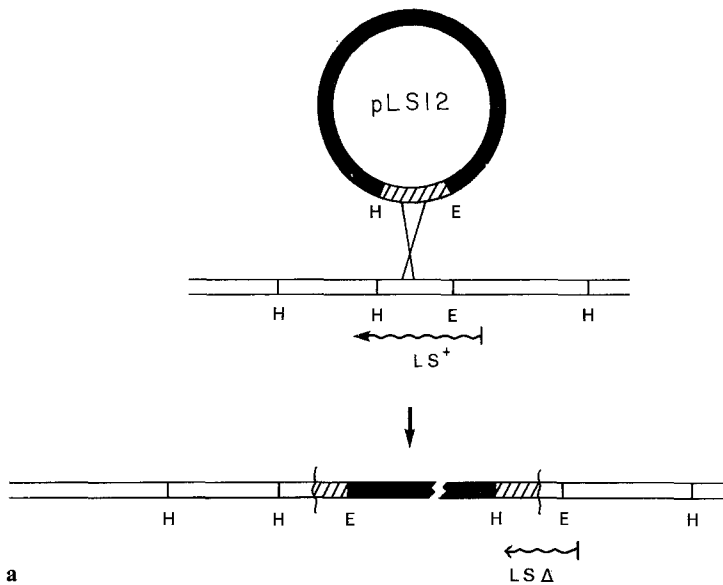
Les autres mutations conférant la résistance au saccharose sont très vraisemblablement chromosomiques: le plasmide abrité par les mutants correspondant est indistinguable de pLS8; extrait de ces mutants et réintroduit dans GC4446, il lui confère le phénotype Ap^R Cm^R Sac^S de la souche GC4446 (pLS8) d'origine. Huit mutants de ce type ont été caractérisés sommairement; leur résistance au saccharose n'est pas absolue; contrairement aux mutants du premier type, leur croissance et leur survie est affectée par des concentrations élevées en saccharose (> 100 mM) et ils produisent des quantités faibles mais détectables de lévane-saccharase; de plus, sept d'entre eux présentent une résistance diminuée à l'ampicilline mais une résistance au chloramphénicol inaltérée. Il est tentant de penser qu'il s'agit là de mutations affectant pléiotropiquement la sécrétion de la β -lactamase et de la lévane-saccharase mais d'autres interprétations sont possibles.

Mutagenèse in vitro de pLS8

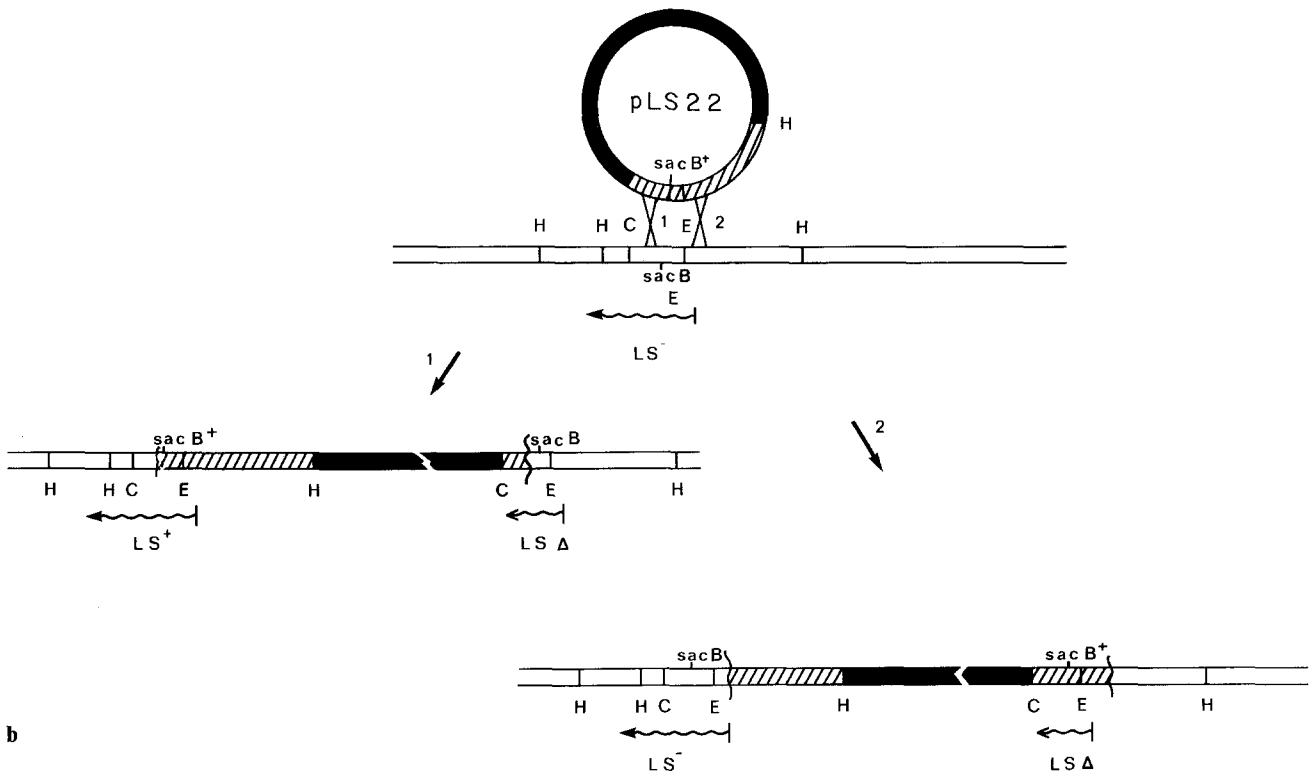
L'isolement de mutants spontanés de GC4446 (pLS8) résistants au saccharose a montré que la grande majorité des mutations spontanées correspondantes étaient soit chromosomiques, soit le fait d'insertions d'éléments IS. Or, nous sommes particulièrement intéressés à isoler des mutations ponctuelles dans *sacB* cloné dans pBR325 qui puissent donner des informations sur les éléments de séquence primaire de la lévane saccharase plus ou moins spécifiquement impliqués dans ses propriétés catalytiques et/ou sa capacité à être sécrétée. C'est pourquoi nous avons utilisé une technique de mutagenèse in vitro de plasmides dont on sait qu'elle est susceptible d'induire des mutations ponctuelles. La transformation de GC4446 par une préparation de plasmide incubée 24 h en présence d'hydroxylamine donne des transformés Cm^R dont 0,5% sont sensibles à l'ampicilline et 2% résistants au saccharose et capables de pousser sur milieu LB + CM + SAC (60 mM). Environ la moitié de ces mutants présentent un phénotype "leaky": ils synthétisent encore des quantités réduites de lévane-saccharase et sont sensibles à des concentrations élevées de saccharose (150 mM). Huit mutants ayant perdu quasiment toute activité lévane-saccharase ont été plus particulièrement étudiés. Les plasmides correspondants (nommés pLS41 à pLS48) ont été préparés; réintroduits dans GC4446 par transformation, ils confèrent à cette souche les propriétés des clones mutants d'origine; les mutations sont donc, comme attendu, plasmidiques; analysés par digestion par *Hind*III, ces plasmides sont indistinguables de pLS8: ils ne contiennent pas d'insertion et portent donc très vraisemblablement des mutations ponctuelles. Ces huit mutations ont été introduites dans la souche QB165 de *B. subtilis*. Les souches CS41 à CS48 qui portent les mutations *sacB* des plasmides pLS41 à pLS48 synthétisent des quantités de lévane-saccharase nulles ou très inférieures à ce que synthétisent QB165: sur milieu SG, milieu minéral solide contenant du saccharose (60 mM), ils ne synthétisent pas ou pratiquement pas de lévanes.

Cartographie des mutations du gène sacB

Les dérivés de pJH101 qui portent un fragment d'ADN de *B. subtilis* peuvent, contrairement à pJH101, transformer



a



b

Fig. 4a, b. Intégration dans le chromosome de *B. subtilis* des dérivés de pJH101. **a** intégration "mutagène" de pLS12. **b** intégration non mutagène et utilisation cartographique potentielle: si l'allèle sauvage d'une mutation *sacB* est situé sur l'insertion de pLS22, une partie des événements de recombinaison entre pLS22 et le chromosome d'une souche *sacB* (événements de type I) produisent des transformants $\text{Cm}^R \text{Lev}^+$. (Abbreviations et symboles: LS^+ , LS^- , $\text{LS}\Delta$: signifie que le gène gouverne la synthèse d'une lévane saccharase sauvage, mutée et tronquée respectivement; autres symboles: voir fig. 1).

cette bactérie pour la résistance au chloramphénicol. Il a été montré que les plasmides de ce type s'intégraient dans le chromosome par un événement de recombinaison de type Campbell entre leur insertion et la région homologue du chromosome (Haldenwang et coll. 1980; Ferrari et coll. 1982). Selon la nature de l'insertion, deux types d'utilisations découlent de cette propriété:

– Si l'insertion correspond à un fragment interne à un gène, c'est à dire ne comprend ni le début, ni la fin de ce gène, l'intégration du plasmide correspondant dans ce gène revient à une mutation par insertion (fig. 4a). Plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt pratique que peuvent avoir de tels plasmides chez *B. subtilis* pour identifier le phé-

notype correspondant à l'inactivation totale d'un gène et préciser les limites d'une unité de transcription, c'est à dire réaliser chez *B. subtilis* ce qui peut l'être chez *E. coli* grâce aux transposons (Niaudet et coll. 1982; Ferrari et coll. 1982). Ainsi, quand une souche Lev^+ telle que QB165 est transformée par les plasmides pLS12 ou pLS18, l'ensemble des recombinants Cm^R sont de phénotype Lev^- . Ces deux plasmides portent des insertions qui correspondent à des fragments internes du gène *sacB* (fig. 1). Le pouvoir mutagène par insertion de ces plasmides ne fait que confirmer la localisation de *sacB*.

– D'autres dérivés de pJH101 que nous avons construits portent une extrémité et une seule de *sacB*. Comme le mon-

Tableau 2. Transformation des souches *sacB*⁻ de *B. subtilis* par différents dérivés de pJH101^a

Plasmides transformants	Souches réceptrices ^b					
	CS47	QB1057	CS46	QB1058	CS42	CS41
pLS14	+	+	+	+	+	+
pLS56	-	+	+	n	+	n
pLS57	-	-	+	n	+	n
pLS60	-	-	+	n	+	+
pLS22	-	-	-	+	+	+
pLS21	-	-	-	-	-	+
pLS26	n	n	n	n	-	+
pLS20	n	n	n	-	-	+
pLS25	n	n	n	+	-	n
pLS27	n	n	n	-	-	n
pLS17	+	+	+	-	-	-
pLS13	n	n	n	n	-	-

^a Les transformants Cm^R sont sélectionnés sur milieu SGHCM où les éventuels recombinants Cm^R Lev⁺ sont repérés (+ = présence de recombinants Lev⁺; - = absence de recombinants Lev⁺ (< 1⁰/₁₀₀); n = croisement non réalisé)

^b A titre d'exemple, 6 prototypes donnant des résultats différents. Les 5 autres mutations testées donnent des résultats identiques à l'un ou l'autre de ces prototypes, voir fig. 5

tre la fig. 4b, ils peuvent théoriquement être utilisés comme un système de localisation par délétion des mutations de *sacB* dans *B. subtilis*. Nous avons montré que c'était le cas; des mutants *sacB* ont été transformés par ces plasmides et les transformants Cm^R sélectionnés sur milieu SGHCM où peuvent être repérés les éventuels doubles transformants Cm^R Lev⁺ (fig. 2). Les résultats obtenus, décrits sur le tableau 2, montrent que: 1) les allèles sauvages correspondant aux 11 mutations testées sont portés par pLS14 qui contient inséré 93% du gène *sacB*; 2) comme attendu, quand l'allèle sauvage d'une mutation donnée est porté par un plasmide contenant une insertion donnée, il n'est pas porté par les plasmides contenant une insertion sans recouvrement avec la première. Pour trois sites de restriction situés dans *sacB*, les sites *PvuII* et *HindIII* et le site *Clal* le plus central nous disposons de deux plasmides complémentaires portant insérées les parties de *sacB* situées en amont et en aval du site (fig. 1). Ces trois paires de plasmides complémentaires permettent donc de définir quatre domaines distincts de *sacB* dans lesquels nous avons pu localiser toutes les mutations étudiées sauf une, *sacB42*. (L'ambiguïté sur la localisation de cette mutation est significative des limites de la technique utilisée mais aussi de l'effectif de recombinants analysés; en effet, dans un croisement mettant en jeu un mutant *sacB* et un plasmide porteur de l'allèle *sacB*⁺, la fréquence

des recombinants Lev⁺ diminue avec la distance séparant l'allèle *sacB*⁺ de la fin de l'insertion du plasmide). Pour certaines des dix mutations localisées sans ambiguïté dans un domaine donné, il est possible de préciser cette localisation à l'aide des plasmides dont nous ne possédons pas de complémentaire; ainsi les trois mutations situées en amont du site *PvuII* sont de plus en amont du site *EcoRI*. Une carte peut être proposée à partir de ces données (fig. 5).

La batterie de plasmides utilisée peut encore être complétée, par d'autres produits de délétion fabriqués in vitro à partir de pLS14 et pLS19 mais aussi par des produits de délétion in vivo obtenus à partir du plasmide pLS50. Ce plasmide porte un gène *sacB* qui s'exprime dans *E. coli*, comme pLS8, et une séquence *IS1* à quelques dizaines de nucléotides de la fin de ce gène. GC4446 (pLS50) est, comme GC4446 (pLS8), sensible au saccharose et il est possible d'isoler des mutants spontanés Sac^R de cette souche. La majorité des mutations correspondantes sont, comme prévu (Reif et Saedler 1975) des délétions s'étendant plus ou moins loin dans *sacB*, et au delà, et partant toutes de l'*IS1*. Trois produits de délétion in vivo de pLS50 (pLS56, pLS57 et pLS60 fig. 1) ont été isolés dont les délétions s'étendent jusqu'en trois points différents situés entre le site *HindIII* et le site *Clal* central. Ces trois plasmides délétés ont permis d'établir l'ordre des 4 mutations du domaine *Clal-HindIII* présenté sur la carte de la fig. 5.

La technique de cartographie par délétion que nous avons mise au point s'apparente formellement à des techniques utilisées depuis plusieurs dizaines d'années chez *E. coli* et ses phages (Benzer 1959; Shapiro et Adhya 1969; Hatfield et coll. 1969) mais elle est originale chez *B. subtilis*. La construction de la batterie de plasmides que nous avons réalisée nécessitait de disposer de données d'analyse de restriction relativement approfondies. Cependant, des informations qui peuvent être utiles et suffisantes pour certains types d'études peuvent être tirées de l'utilisation d'un nombre de plasmides moins important: en effet, comme le suggère la fig. 4b, il devrait théoriquement être possible d'utiliser le pourcentage de recombinants Cm^R Lev⁺ obtenu dans un croisement par transformation entre un mutant *sacB*⁻ et un plasmide porteur de l'allèle *sacB*⁺ comme une mesure de la distance génétique séparant cet allèle de la fin de l'insertion issue du chromosome de *B. subtilis* de ce plasmide. Et c'est effectivement le cas: ainsi les pourcentages de recombinants Cm^R Lev⁺ obtenus dans les transformations de CS41, CS42, QB1058, CS46 et CS47 par le plasmide pLS14 à une concentration limitante sont de 31%, 28%, 23%, 8%, et 4% respectivement et permettent donc de prédire un ordre de mutations *sacB* correspondantes identiques à celui obtenu par la méthode par délétion. Mais il est évident que cette dernière méthode est plus sûre.

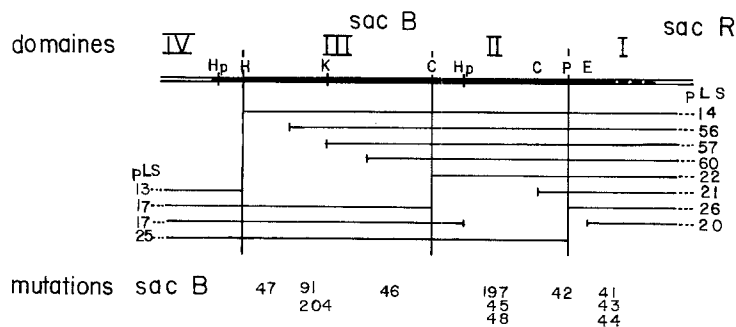


Fig. 5. Carte de *sacB*. Le gène *sacB* est représenté par un trait gras, son éventuelle séquence signal en pointillé et les insertions des 12 plasmides de localisation par un trait simple. Les frontières des 4 domaines sont aussi figurées

Le travail que nous avons effectué s'inscrit dans un projet de cartographie structurale et fonctionnelle de *sacB*, gène de structure d'une enzyme sécrétée de Bacillacée et sera donc particulièrement utile pour localiser très précisément les mutations situées dans ce gène. L'outil de localisation précis et sûr que nous avons mis au point devrait permettre de simplifier le travail de séquençage nucléotidique des mutations les plus intéressantes.

Remerciements. Ce travail a bénéficié d'une Aide à la Recherche par la Mission des Biotechnologies (Ministère de la Recherche et de l'Industrie). H. Ben Djemia a bénéficié d'une bourse du Gouvernement Français.

Bibliographie

- Benzer S (1959) On the topology of the genetic fine structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:1607-1620
- Cornelis P, Digneffe C, Willemot K (1982) Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 186:507-511
- Ferrari F, Ferrari E, Hoch J (1982) Chromosomal location of a *B. subtilis* DNA fragment uniquely transcribed by sigma-28-containing RNA polymerase. *J Bacteriol* 152:780-785
- Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Ferrari E, Hoch J (1983) Cloning the structural gene *sacB* of the exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*. Expression of the cloned gene in *E. coli*. *J Bacteriol* 153:1424-1431
- Ghosal D, Sommer H, Saedler H (1979) Nucleotide sequence of the transposable DNA-element IS2. *Nucl Acid Res* 6:1111-1122
- Gray O, Chang S (1981) Molecular cloning and expression of *B. licheniformis* β -lactamase gene in *E. coli* and *B. subtilis*. *J Bacteriol* 145:422-428
- Haldewang W, Banner C, Ollington J, Losick R, Hoch J, O'Connor M, Sonenshein A (1980) Mapping a cloned gene under sporulation control by insertion of a drug resistance marker into the *Bacillus subtilis* chromosome. *J Bacteriol* 142:90-98
- Hashimoto T, Sekiguchi M (1976) Isolation of temperature-sensitive mutants of R plasmid by *in vitro* mutagenesis with hydroxylamine. *J Bacteriol* 127:1561-1568
- Hatfield D, Hofnung M, Schwartz M (1969) Genetic analysis of the maltose A region in *E. coli*. *J Bacteriol* 98:559-567
- Imanaka T, Tanaka T, Tsunekawa H, Aiba S (1981) Cloning of the genes for penicillinase, *penP* and *penI*, of *B. licheniformis* in some vector plasmids and their expression in *E. coli*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. *J Bacteriol* 147:776-786
- Klaer R, Starlinger P (1980) IS4 chromosomal site in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 178:285-291
- Kunst F, Pascal M, Lepesant-Kejzlarova J, Lepesant JA, Billault A, Dedonder R (1974) Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie* 56:1481-1489
- Lepesant JA, Kunst F, Lepesant-Kejzlarova J, Dedonder R (1972) Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol Gen Genet* 118:135-160
- Lepesant JA, Lepesant-Kejzlarova J, Pascal M, Kunst F, Billault A, Dedonder R (1974) Identification of the structural gene of levansucrase in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol Gen Genet* 128:213-221
- Lepesant JA, Kunst F, Pascal M, Lepesant-Kejzlarova J, Steinmetz M, Dedonder R (1976) Specific and pleiotropic regulatory mechanisms in the sucrose system in *Bacillus subtilis* 168. In Schlesinger (ed) *Microbiology - 1976*. American Society for Microbiology, Washington DC, p 58-69
- Lusky M, Kroger M, Hobom G (1981) Detection of replicational inceptor signals in IS5. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 45:173-176
- Niaudet B, Goze A, Ehrlich SD (1982) Insertional mutagenesis in *B. subtilis*: mechanism and use in gene cloning. *Gene* 19:277-284
- Ohtsubo H, Ohtsubo E (1978) Nucleotide sequence of an insertion element, IS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:615-619
- Rapoport G, Dedonder R (1963) Le lévane-sucrase de *B. subtilis* III. Reaction d'hydrolyse, de transfert et d'échange avec des analogues du saccharose. *Bull Soc Chim Biol (France)* 45:515-535
- Reif HJ, Saedler H (1975) IS1 is involved in deletion formation in the *gal* region of *E. coli* K12. *Mol Gen Genet* 137:17-18
- Schwartz M (1967) Expression phénotypique et localisation génétique de mutations affectant le métabolisme du maltose chez *E. coli* K12. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 112:673-700
- Shapiro J, Adhya S (1969) The galactose operon of *E. coli*. II. A deletion analysis of operon structure and polarity. *Genetics* 62:249-264
- Sommer H, Cullum J, Saedler H (1979) Integration of IS3 into IS2 generates a short sequence duplication. *Mol Gen Genet* 177:85-89
- Steinmetz M, Kunst F, Dedonder R (1976) Mapping of mutations affecting synthesis of exocellular enzymes in *Bacillus subtilis*. Identity of the *sacU^h*, *amyB* and *pap* mutations. *Mol Gen Genet* 148:281-285
- Thomas R (1966) Control of development in temperate bacteriophages. *J Mol Biol* 22:79-95

Memoire présenté par K. Illmensee

Reçu le 20 février / 25 avril, 1983