

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mapping génétique et contribution à la caractérisation moléculaire du gène PH081, régulateur de la phosphatase acide chez *saccharomyces cerevisiae*

Tibor, Anne

Award date:
1988

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

mm



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

MAPPING GENETIQUE ET CONTRIBUTION A LA
CARACTERISATION MOLECULAIRE DU GENE PHO81,
REGULATEUR DE LA PHOSPHATASE ACIDE
CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

ANNE TIBOR

1988

Je remercie le Docteur J. Vandenhoute et le Professeur J. Delcour qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire et ont dirigé ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur F. Hilger, qui m'a accueillie dans le laboratoire d'ingénierie génétique de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, à Gembloux. Je le remercie aussi pour sa disponibilité et pour les connaissances qu'il m'a fait partager.

Je tiens également à remercier les membres de son laboratoire et en particulier Monsieur M. Vidal, qui m'a initiée aux joies de la microdissection ainsi que Mesdames M. Legrain, V. Gilliquet et Messieurs G. Berben, J. Dumont, M. Prévost et H. Renauld, qui ont accepté de m'encadrer aux diverses étapes initiales de ce travail.

Toute ma reconnaissance va à Mademoiselle M. Raes et à Messieurs F. Hilger et F. Zech, qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à Mesdames M. Dewez, J. Libion et R.M. Wilmet, pour leur assistance technique, à Mesdemoiselles M.C. Monville, D. Prozzi et G. Renauld, à Madame V. Cassart et à Messieurs J.P. Cassart, P. Hols et O. Laloux, pour leurs conseils judicieux et surtout pour la bonne humeur qui accompagne leur travail.

A chacun de vous, mes amis, pour votre présence,

à maman et à papa qui m'ont permis d'entreprendre ces études et qui ont su user de patience et de compréhension,

merci, vous tous à qui ceci est dédié.

Liste des abréviations.

aa: acide aminé
ADN: acide désoxyribonucléique
ARN: acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
A: adénine
bp: paire de bases
cM: centiMorgan
DO: densité optique
EDTA: éthylène diamine tétra acétate
kb: kilo bases
µg: microgramme
µl: microlitre
µm: micromètre
mg: milligramme
ml: millilitre
mM: millimolaire
M: molaire
ng: nanogramme
nm: nanomètre
Pi: phosphate inorganique
PEG: polyéthylène glycol
RNase: ribonucléase
RPM: rotations par minute
SDS: sodium dodécyl sulfate
t°: température
T: thyamine
UV: ultra-violet
λ: longueur d'onde
IR: indice de réfraction
G: guanine
C: cytosine
DTT: dithiothréitol

TABLE DES MATIERES.

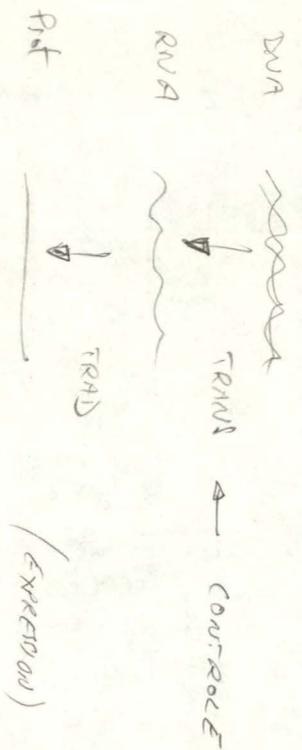
	Page
<u>CHAPITRE I.</u> <u>INTRODUCTION.</u>	
A. La transcription est centrale dans la régulation de l'expression génétique.	1
B. Facteurs décisifs dans l'initiation de la transcription chez les procaryotes.	2
C. Régulation de l'initiation de la transcription chez les eucaryotes.	6
I. Eléments moléculaires de l'appareil transcriptionnel et de sa régulation.	6
II. Modèle spéculatif du contrôle de la transcription par enhancer.	13
III. Exemples de systèmes de régulation chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .	16
1. Détermination du type cellulaire: le locus <i>MAT</i> .	16
2. Contrôle général de la synthèse d'acides aminés.	18
3. Circuit régulateur du métabolisme du galactose.	19
4. Circuit régulateur du métabolisme du phosphate.	20
IV. Arguments en faveur d'une conservation des mécanismes de régulation de l'initiation de la transcription chez les eucaryotes.	26
V. But du travail.	35
 <u>CHAPITRE II.</u> <u>MATERIELS ET METHODES.</u>	
I. Solutions et tampons.	36
1. Solutions.	36
2. Tampons.	38
II. Souches et plasmides	39
1. Souche bactérienne	39
2. Plasmides bactériens	40
3. Souches de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	43
4. Plasmides utilisés chez <i>S. cerevisiae</i> .	43
III. Milieux de culture.	44
1. Milieux de culture bactériens.	44
2. Milieux et techniques de culture pour levure <i>S. cerevisiae</i> .	45

	Page
IV. Techniques impliquées dans l'analyse de tétrades.	47
1. Distinguer au microscope une souche haploïde d'une souche diploïde.	47
2. Croisement, isolement de zygote et sporulation.	47
3. Dissection des tétrades au micromanipulateur	48
1) Equipement technique.	48
2) Dissection des tétrades.	49
V. Techniques d'ADN recombinant.	49
1. Réactions de restriction.	49
2. Electrophorèse en gel d'agarose.	50
a) Electrophorèse analytique	50
b) Electrophorèse préparative.	52
3. Réactions de ligation.	53
4. Réaction de filling.	54
5. Purification d'ADN.	54
6. Concentration par extraction au butanol.	55
7. Transformation bactérienne.	56
8. Transformation de levure <i>S. cerevisiae</i> .	57
9. Extraction rapide d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i> : (miniprep).	58
10. Extraction en grande quantité d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i> (maxiprep).	58
11. Quantification spectrophotométrique de l'ADN.	60

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.

I. Mapping génétique du gène <i>PHO81</i> .	61
1. Localisation chromosomique du gène <i>PHO81</i> .	61
2. Mapping méiotique du gène <i>PHO81</i> par analyse de tétrades.	61
- Principe.	61
- Démarches préliminaires.	67
- Le gène <i>PHO81</i> ne montre pas de liaison à des marqueurs du bras gauche du chromosome VII.	68
- le gène <i>PHO81</i> ne semble pas lié au marqueur <i>ade6</i> .	73
- le gène <i>PHO81</i> est à une distance approximative de 14,4 cM du marqueur <i>ade6</i> .	76
- Localisation du marqueur <i>pho81</i> par rapport au marqueur <i>rad2</i> .	80
- localisation du locus <i>PHO81</i> par rapport aux loci <i>ADE3</i> et <i>RAD2</i> sur le bras droit du chromosome VII.	81

	Page
II. Cartographie de restriction d'un fragment de 7kb contenant le gène <i>PHO81</i> .	82
1. Entrée en matière.	82
2. Carte de restriction.	83
3. Cerner le gène <i>PHO81</i> à l'intérieur de ce fragment.	84
III. Obtention de sous-clones en vue du séquençage.	84
A. Choix de la stratégie.	84
B. Principe de la stratégie.	84
1. Réduction de la taille du fragment de 4kb.	84
2. Analyse des délétants	86
3. Construction d'un vecteur navette levure-bactérie.	87
4. Utilisation des délétants.	87
C. Logique de la construction de vecteurs permettant l'obtention, l'analyse fonctionnelle et le séquençage de délétants.	89
1. Sites de restriction utilisables lors des délétions.	89
2. Sites et ordre d'insertion du fragment 2 μ , du gène <i>URA3</i> et de l'insert de 4kb dans le vecteur bluescript.	91
D. Mise en oeuvre de la stratégie de construction du vecteur navette.	92
I. Insertion du gène <i>URA3</i> dans bluescript.	92
II. Insertion du fragment 2 μ au site <i>EcoRI</i> du vecteur BS-URA.	94
III. Orientation du gène <i>URA3</i> et du fragment 2 μ dans le vecteur bluescript.	96
IV. Test de la fonctionnalité du vecteur BS-URA-2 μ .	97
V. Les cellules XLI-blue transformées par BS-URA conservent une activité β galactosidase.	98
E. Insertion de l'insert <i>BamHI</i> - <i>SalI</i> de 4kb dans le vecteur BS-URA-2 μ .	102
<u>CHAPITRE IV. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.</u>	107
<u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	111



I N T R O D U C T I O N .A. LA TRANSCRIPTION EST CENTRALE DANS LA REGULATION
DE L'EXPRESSION GENETIQUE.

La double hélice d'ADN renferme l'information génétique. L'expression de cette information comporte la transcription en ARN et la traduction des ARN messagers en protéines. Beaucoup de connaissances se sont accumulées concernant la biochimie de ces étapes d'expression. Par contre, les mécanismes de contrôle de l'expression sont longtemps restés obscurs, bien qu'à l'évidence ils jouent un rôle central dans l'économie générale et donc dans la survie de la cellule. Ainsi, la régulation de l'expression génétique permet par exemple à l'organisme d'adapter son métabolisme aux conditions environnementales ou de différencier des cellules à fonction spécifique. La biologie moléculaire des processus régulateurs constitue le centre d'intérêt de bon nombre de travaux actuels dans le cadre desquels s'inscrit ce travail.

Les procaryotes n'ayant pas de noyau, transcription, traduction (et même dégradation) des ARNm sont concomitantes. Généralement quand un ARNm est synthétisé, il est automatiquement traduit. C'est pourquoi le contrôle de l'expression s'exerce essentiellement au niveau de la transcription.

Chez les eucaryotes, au contraire, le compartiment nucléaire est le lieu de la transcription et le cytoplasme est le siège de la synthèse protéique. Transcription et traduction sont dans ce cas des étapes séparées dans le temps et dans l'espace. Modifications post-transcriptionnelles et traduction peuvent être l'objet d'une régulation.

Cependant, ici encore l'initiation de la transcription joue un rôle majeur dans les mécanismes de contrôle de l'expression génétique - réguler l'expression à son stade premier, l'initiation est le plus économe pour la cellule. Entrent en jeu dans ces mécanismes des séquences d'ADN et des partenaires de nature protéique dont l'ARN polymérase et des protéines régulatrices. C'est dans l'élucidation des interactions faibles s'opérant entre ces partenaires que la clé de la régulation est recherchée.

B. FACTEURS DECISIFS DANS L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES.

Pour que la machinerie de transcription soit capable de remplir son rôle, il est nécessaire que soient présents sur la séquence d'ADN des signaux délimitant l'unité de transcription. Il s'agit de signaux de début et de fin d'unité, rôles joués respectivement par le promoteur en amont et le terminateur en aval de la zone à transcrire.

L'ARN polymérase reconnaît le promoteur de par des séquences caractéristiques, elle s'y lie et initie la transcription.

Le site promoteur a été identifié comme tel grâce à l'existence de mutations affectant le taux d'expression d'un gène sans en altérer le produit. Le séquençage des gènes clonés a permis la comparaison des séquences de leur région promotrice mettant en évidence des homologies.

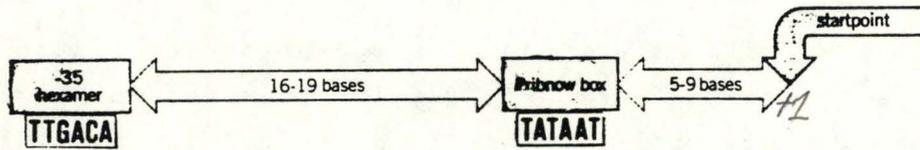


Fig. I 1. Un promoteur procaryote typique a 3 composantes: le site +1 et les sêquences -10 et -35. Ces sêquences dites consensus constituêes à partir des homologies dêcouvertes en comparant plus d'une centaine de rêgions promotrices de E. coli sont des sêquences idêales reprêsentant les bases les plus frêquentes.

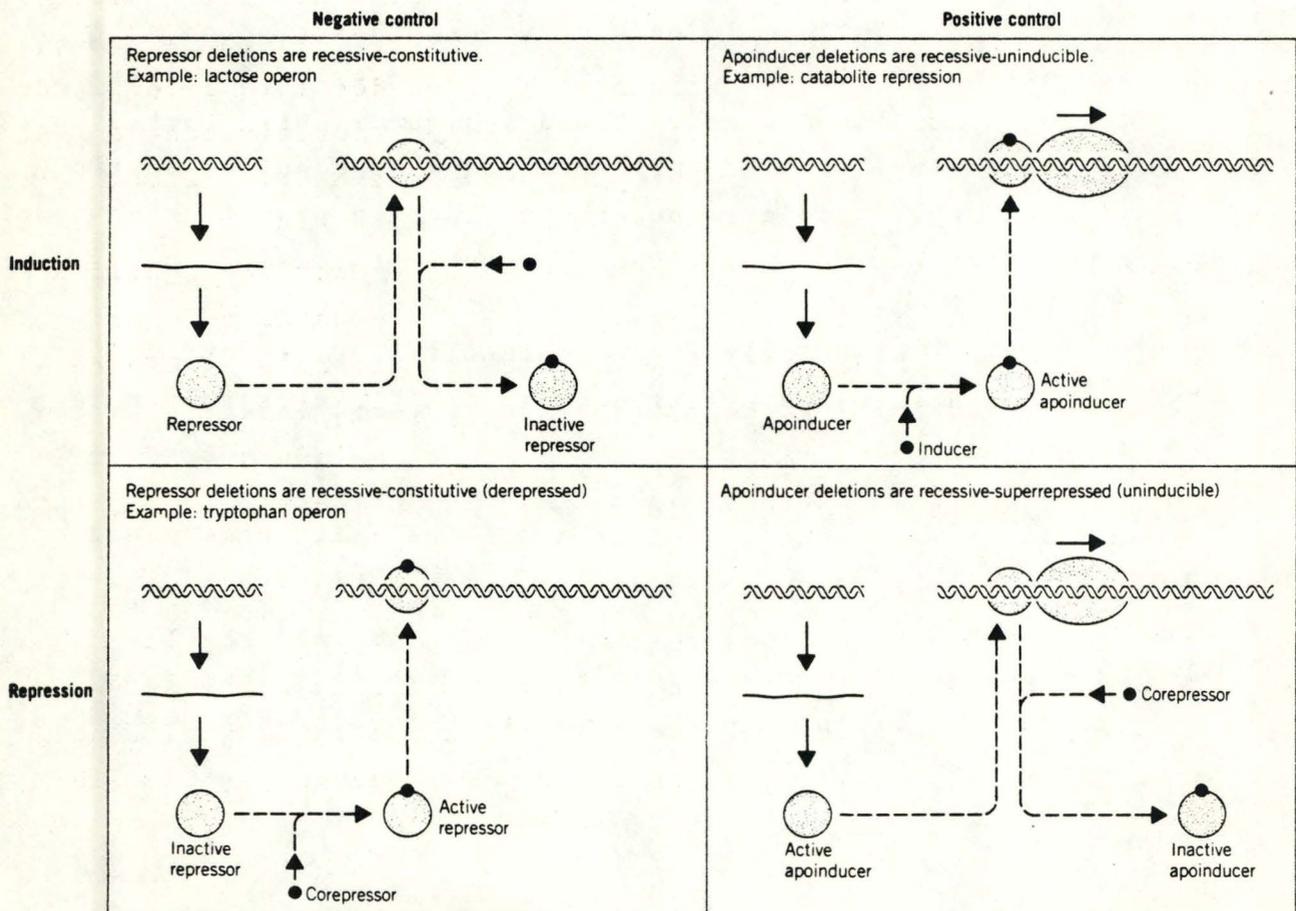


Fig. I 2. Circuits rêgulateurs assurant un contrôle positif ou nêgatif d'une induction ou rêpression.
apoinducer: activateur

Le promoteur procaryote est caractérisé par un point d'initiation de la transcription, le site +1 et par deux séquences. (voir Fig. I 1.) La séquence -10 (nommée Pribnow box) à moins d'une dizaine de paires de bases(bp) en amont du site +1, assure le désappariement de l'ADN au sein du complexe formé par l'ARN polymérase associée au promoteur. La séquence -35 fournit le signal de reconnaissance pour l'ARN polymérase. La distance entre ces deux séquences doit rester comprise entre 16 et 19 bp pour conserver l'efficacité du promoteur. Le fait que ces séquences consensus soient absentes de certains promoteurs, fait suggérer que d'autres processus de reconnaissance restent à découvrir.

Les unités transcriptionnelles ainsi signalisées ne sont pas toutes continuellement copiées. Toute la question du choix des gènes à transcrire revient dès lors à comprendre le jeu des facteurs régulateurs modulant positivement ou négativement l'activité des polymérases. (voir Fig. I 2.)

L'expression des gènes sous contrôle négatif est empêchée lorsqu'un répresseur est présent alors que les gènes sous contrôle positif ne s'expriment qu'en présence d'un activateur. La transcription des gènes inductibles nécessite la présence d'une petite molécule inductrice; celle des gènes répressibles ne se fait qu'en absence d'une petite molécule, le co-répresseur.

Illustrons ces mécanismes par des exemples chez *E. coli*. La plupart des gènes de *E. coli* forment des groupes appelés opéron. Un **opéron** est une unité génétique d'expression, il inclut des gènes de structure et des éléments contrôlant leur expression.

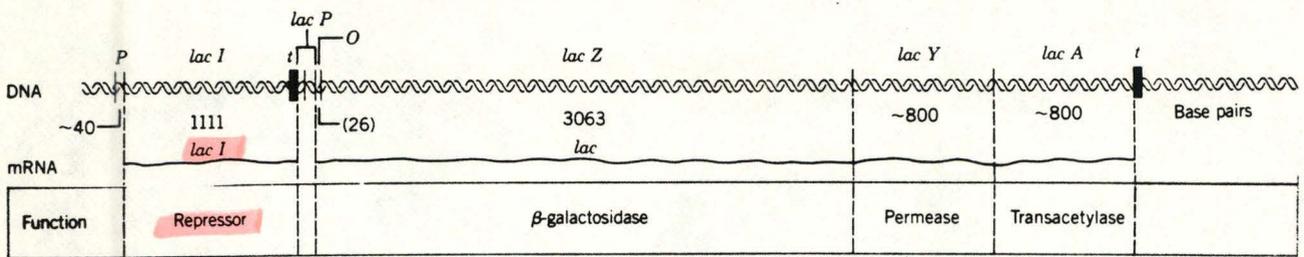


Fig. I 3. L'expression de l'opéron lactose assure le métabolisme de la lactose. Son contrôle négatif est exercé par un répresseur, produit du gène *lac I*, qui en se liant à l'opérateur, empêche l'ARN polymérase d'initier la transcription. En présence de l'inducteur, un dérivé de la lactose, l'allolactose, celui-ci se lie au répresseur formant un complexe quittant l'opérateur. L'ARN polymérase peut alors initier la transcription des gènes de structure. Le répresseur possède un site de liaison à l'opérateur et un site de liaison à l'inducteur. Suite à la liaison avec l'inducteur, le site spécifique à l'ARN perd sa capacité de se lier à l'opérateur. Ainsi, en réponse aux conditions environnementales, l'interaction entre les deux sites de liaison du répresseur contrôle l'expression des gènes adjacents à l'opérateur.

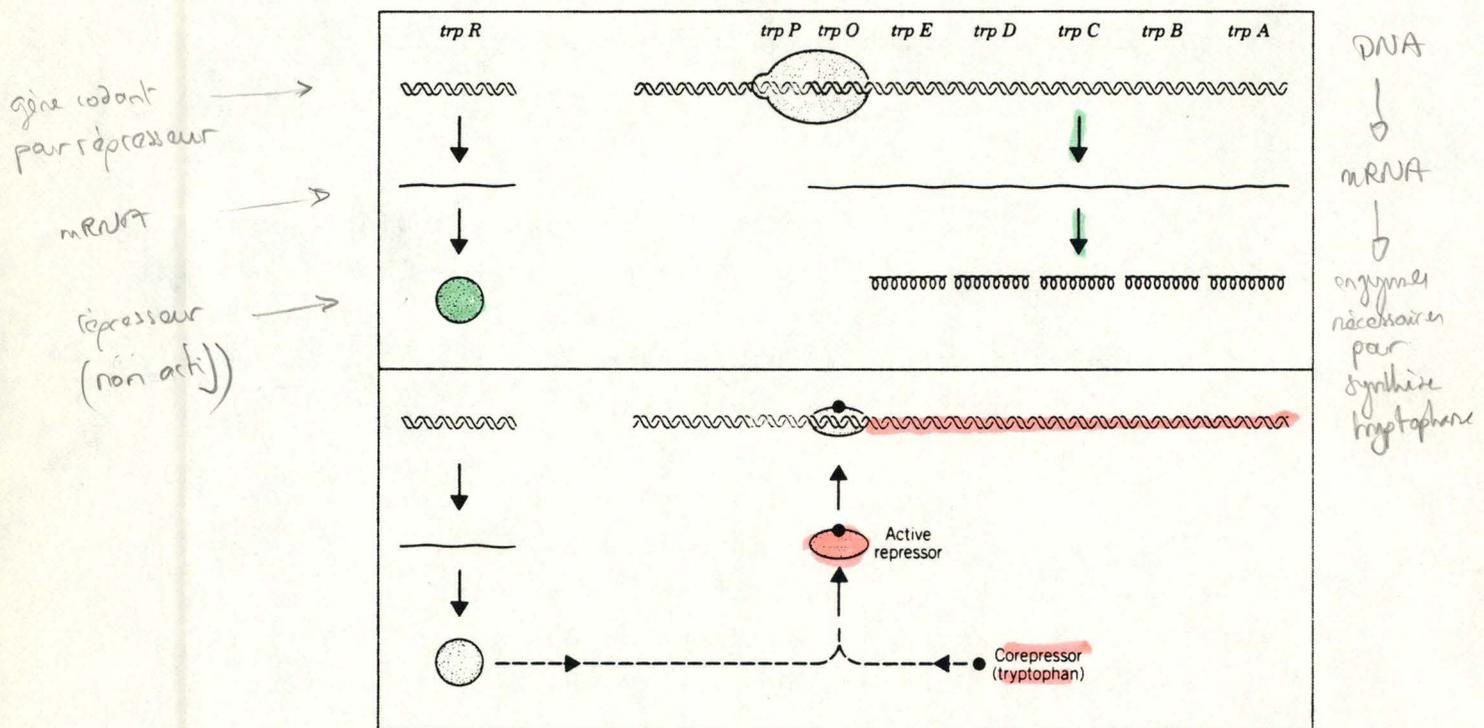


Fig. I 4. L'addition de tryptophane (jouant le rôle de corépresseur) active le répresseur de sorte qu'il se lie à l'opérateur et empêche la transcription. Par contre, en absence de tryptophane, le répresseur est inactif et l'ARN polymérase transcrit les gènes de structure.

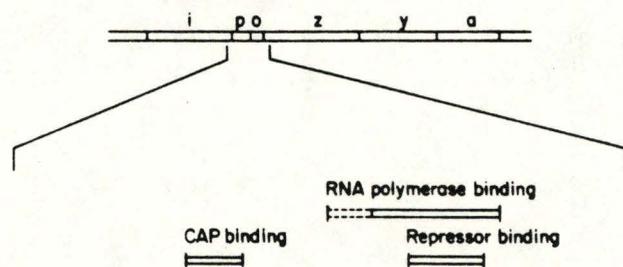
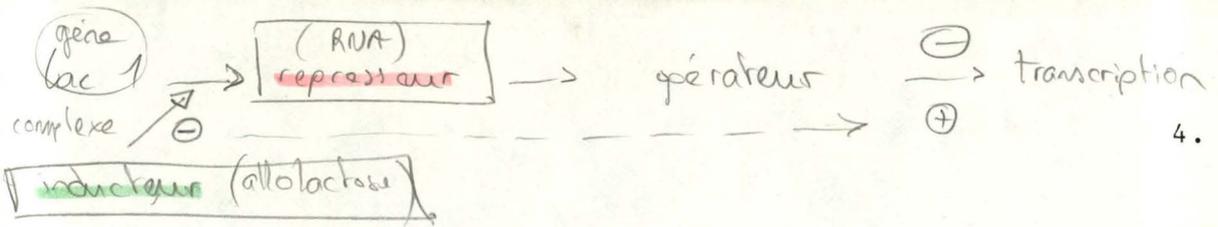


Fig. I 5. Région de contrôle de l'opéron lactose: localisation des sites de liaison de l'ARN polymérase, du répresseur et de la CAP.



1. interaction répresseur - opérateur:

- cas de l'**opéron lactose** (voir Fig. I 3.).

Il est avantageux pour la bactérie de n'induire la transcription de ses gènes de structure et donc la synthèse des enzymes que lorsque le substrat qu'elles métabolisent est présent. Le contrôle négatif répond à cet objectif.

- cas de l'**opéron tryptophane**, assurant la synthèse du tryptophane (voir Fig. I 4.).

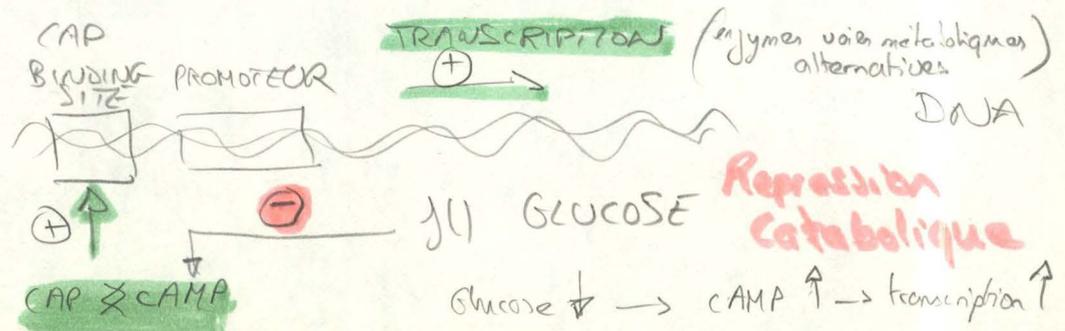
Il est utile pour la bactérie de réprimer les gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse d'un composé lorsque celui-ci est présent en quantité adéquate dans le milieu.

2. régulation positive par la CAP.

Lorsque le glucose est disponible comme source d'énergie, il est utilisé préférentiellement aux autres sucres. Ce choix est accompli en empêchant l'expression des opérons codant pour les enzymes de voies métaboliques alternatives (utilisant d'autres sucres); effet appelé **répression catabolique**. Le facteur de contrôle de ces opérons est une protéine appelée **CAP (Catabolite Activator Protein)** ou **CRP (Cyclic AMP Receptor Protein)**. Le complexe CAP-AMP cyclique se lie à l'ADN au "CAP-binding site" à proximité du promoteur (juste en amont du promoteur dans le cas de l'opéron lactose (voir Fig. I 5.)) permettant le démarrage de la transcription de ce promoteur.

La CAP n'est active qu'en présence d'AMP cyclique dont le taux est régulé par le glucose:

- en présence de glucose, le taux d'AMP cyclique est trop faible pour activer la CAP; la transcription n'a pas lieu.



Glucose
Autres Sucres
↑
Répression catabolique

Pas Glucose
Autres Sucres

TRANSCRIPTION FACTORS

sequences

DNA

product
diffusible

(repression
CAP & CAMP)

transcription

sequences

Facteur & DNA

CIS ACTION

sequences



promoteur
operateur
CAP binding site
terminateur.

Interaction avec
RNA Polymerase

- en absence de glucose, le taux d'AMPcyclique augmente, activant la CAP; par conséquent, la transcription peut avoir lieu.

Les deux hypothèses expliquant le mode d'action de la CAP se basent sur des interactions entre protéines ^① ou entre protéine et ADN. Dans le premier modèle, la CAP par son interaction même légère avec l'ARN polymérase augmenterait son affinité pour le promoteur. L'autre éventualité serait que ^② la CAP n'agisse que par sa liaison à l'ADN. Elle assurerait le désappariement de l'ADN que l'ARN polymérase n'effectuerait pas, suite à sa trop faible affinité pour le promoteur. La discussion reste ouverte (*cité dans LEWIN, 1987*).
protein Σ protein
protein & DNA

Deux types d'éléments sont décisifs pour l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase: ceux agissant en *cis* et ceux agissant en *trans*. En effet, interviennent dans l'initiation des séquences d'ADN (promoteur, opérateur, "CAP binding site", terminateur) qui exercent leur rôle non pas en exprimant un produit diffusible mais par le simple fait d'interactions avec l'ARN polymérase ou d'autres facteurs protéiques (répresseur, complexe CAP-AMPcyclique) qui les reconnaissent spécifiquement. Ces séquences sont dites cis-actives, par opposition aux séquences trans-actives codant pour les facteurs diffusibles capables d'interagir avec l'ADN ou de modifier des interactions s'exerçant à l'initiation (répresseurs, complexe CAP-AMPcyclique, facteurs de transcription...).

Le contrôle de l'initiation peut s'effectuer via des interactions moléculaires entre les protéines régulatrices *trans-actives* et des séquences d'ADN qu'elles reconnaissent spécifiquement et par des interactions entre des protéines régulatrices et des facteurs de transcription ou l'ARN polymérase elle-même, modifiant l'interaction de celle-ci avec la séquence d'ADN promoteur.

C. REGULATION DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION
CHEZ LES EUCARYOTES.

I. ELEMENTS MOLECULAIRES DE L'APPAREIL TRANSCRIPTIONNEL
ET DE SA REGULATION.

Historiquement, des séquences promotrices proches du site +1 similaires à celles des procaryotes, ont d'abord été identifiées. Le développement de la **rétrogénétique** a ouvert de nouvelles perspectives de recherche. Cette stratégie qui consiste à manipuler *in vitro* un gène cloné et à en tester les conséquences sur sa fonction dans un système *in vivo* a permis de chercher le rôle de séquences non transcrites. On a ainsi découvert que des séquences très éloignées du gène influençaient sa transcription.

Ainsi, les **processus contrôlant l'initiation** de la transcription s'avèrent-ils **plus complexes chez les eucaryotes** que chez les procaryotes. Interviennent en effet **trois types d'ARN polymérase, des facteurs transcriptionnels, des séquences extérieures à l'unité de transcription qui en sont proches mais aussi quelques fois très éloignées, des protéines trans-actives et la configuration de l'ADN.**

1) **L'ARN polymérase II** transcrit les gènes codant pour des protéines.

Les cellules eucaryotes contiennent trois types d'ARN polymérase: chacune est une enzyme multimérique constituée de deux grandes sous-unités et de plusieurs petites sous-unités. Les ARN polymérases I et III sont responsables de la synthèse, respectivement des ARN ribosomiques et des ARN de transfert et petits ARN nucléaires. Seule la régulation de la transcription des gènes de structure par l'ARN polymérase II sera abordée dans ces quelques pages.

ARN polymérase	I transcription RNA <u>ribosomique</u>
	II transcription gènes codent <u>protéine</u>
	III transcription RNA transfert.

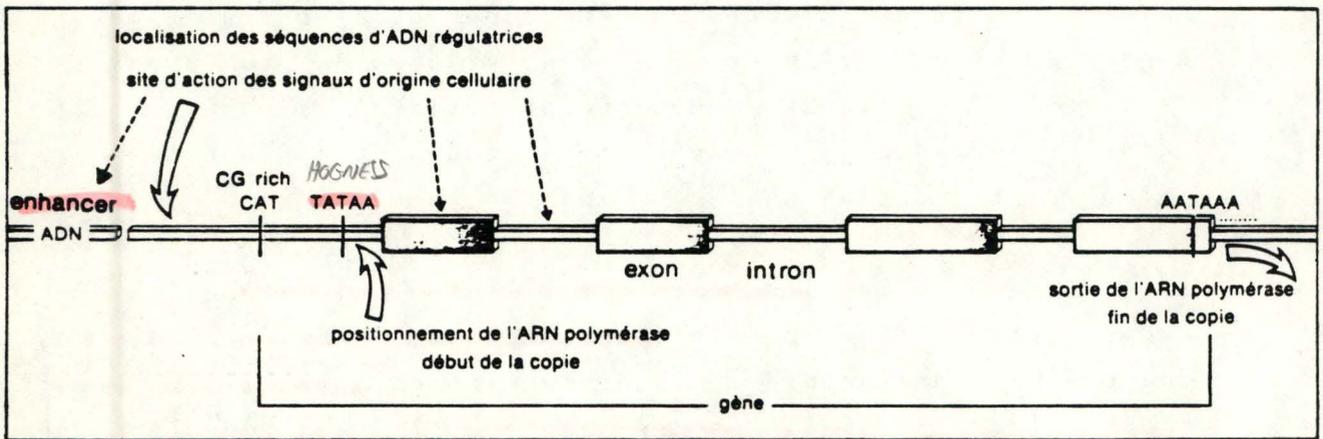
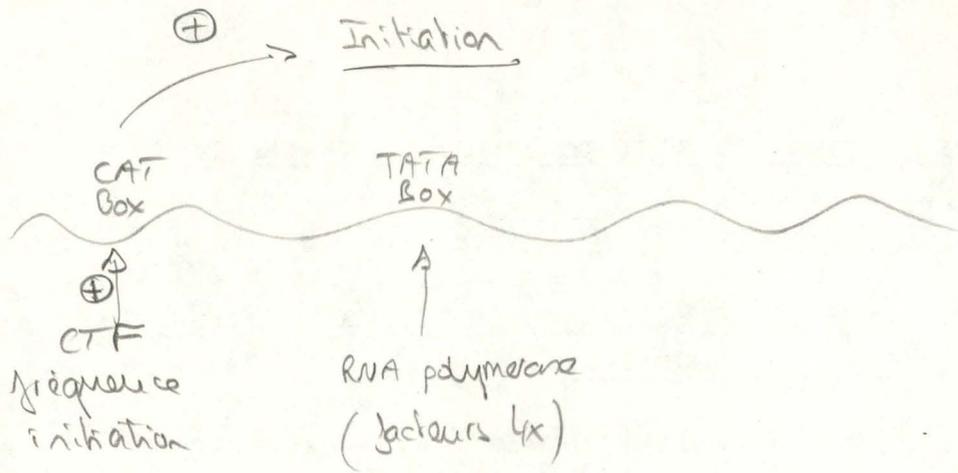
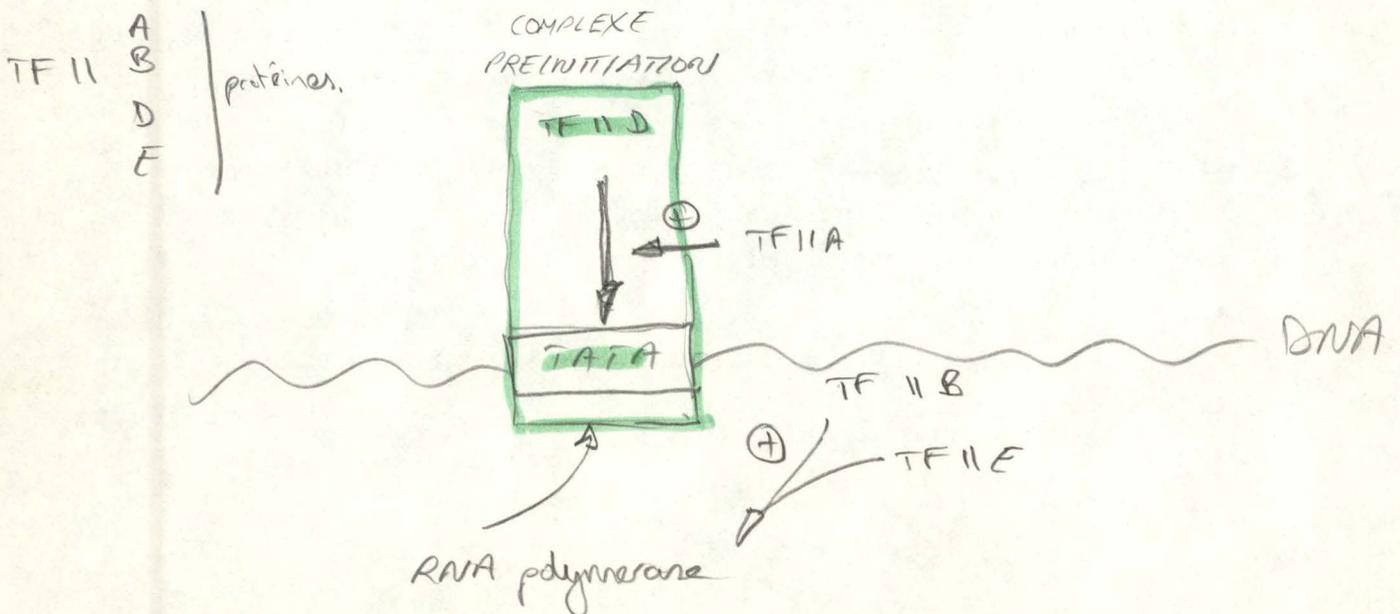


Fig. 16. Gène eucaryote typique: il est constitué de régions codantes et de régions non codantes internes ou externes à l'unité de transcription. En amont de celle-ci se localisent notamment TATA box, CAAT box GC rich box. Des séquences d'ADN régulatrices, les éléments enhancers, ont une localisation fort variable et elles agissent en interaction avec les protéines trans-actives.



2) La plupart des régions promotrices (reconnues par l'ARN polymérase II) des eucaryotes supérieurs contiennent un élément TATA, des éléments en amont mais proches de l'élément TATA et un élément enhancer (*cité dans* Cavallini, 1988) (Ce dernier fait partie des séquences éloignées dont le rôle est abordé au point 3.) (voir Fig. I 6.).

L'élément TATA (TATA box ou boîte de Hogness), riche en bases A et T est localisé à environ 30 bp en amont du site d'initiation de la transcription (site +1) de gènes de mammifères, oiseaux, amphibiens et insectes. Quatre facteurs transcriptionnels sont nécessaires pour que l'ARN polymérase II initie la transcription à partir d'un promoteur contenant l'élément TATA. Un facteur qui reconnaît et se lie spécifiquement à la TATA box est noté TFIID (ou DB ou BTF1). Ce facteur TFIID interagit avec la TATA box formant un complexe stable de préinitiation essentiel pour que la transcription s'initie au site correct. La protéine TFIIA (ou AB ou STF) facilite la formation d'un complexe stable de préinitiation sur le promoteur. Deux autres facteurs (TFIIB ou CBI ou BTF3; et TFIIE ou CBII ou BTF2) induisent probablement l'initiation en interagissant l'un avec l'autre ainsi qu'avec l'ARN polymérase II.

Ces quatre facteurs et l'ARN polymérase II sont nécessaires pour la formation du premier lieu phosphodiester, ils constituent l'appareil transcriptionnel de base.

Des séquences en amont de la TATA box (-40 à -110 bp) influencent la fréquence d'initiation. En leur absence, une transcription résiduelle subsiste qui s'initie au site correct. On pourrait par conséquent les qualifier de régulatrices. Les facteurs qui s'y lient étant alors appelés activateurs. Ces séquences varient en nombre et en position suivant le promoteur. Ainsi, la CAAT box, située à environ 40bp en amont de la TATA box est conservée dans plusieurs promoteurs. Le CTF (CAAT-binding transcription factor) se lie à la CAAT box d'un promoteur d'adénovirus et pourrait dès lors être nécessaire à la transcription à partir de promoteurs contenant cette séquence.

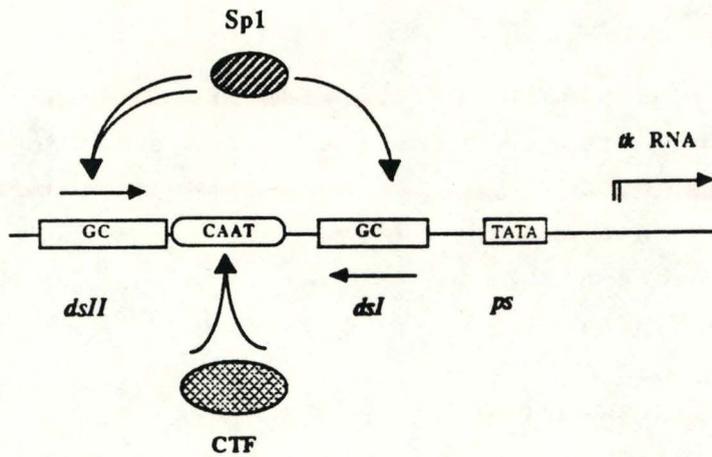


Fig. 1 7. Promoteur du gène de thymidine kinase du HSV (herpes simplex virus): en amont de la TATA box se trouve la CAAT box qui peut se lier au facteur CTF, elle est entourée de 2 hexanucléotides GC. Le facteur Sp1 peut se lier à ces boîtes GC avec plus ou moins d'affinité.

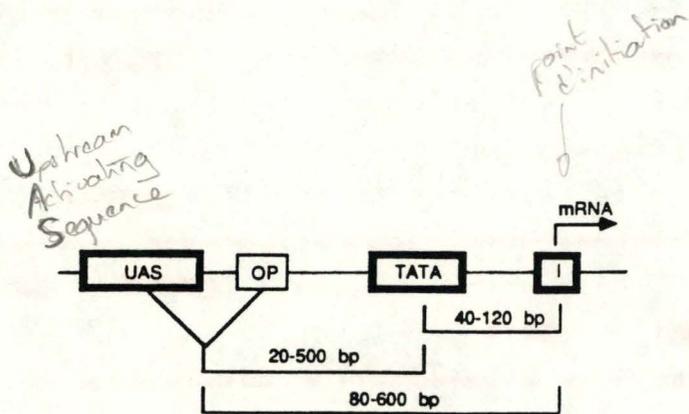


Fig. 1 8. Promoteur de levure: il est composé d'éléments UAS, TATA et du point d'initiation. Un élément opérateur (OP) impliqué dans la répression de la transcription est parfois présent.

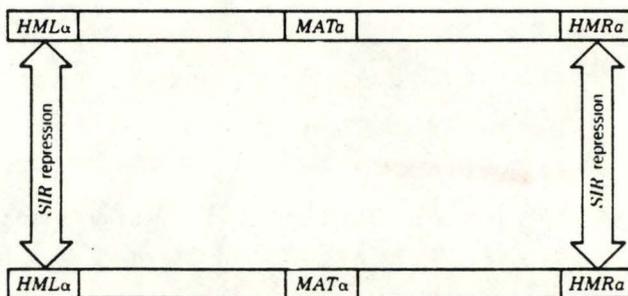


Fig. 1 9. Le locus MAT actif est entouré de 2 loci HMLα et HMRα silencieux.

Un autre élément souvent conservé en amont de la TATA box est la boîte GC contenant la séquence GGGCGG. Chez le virus SV40, par exemple, la boîte GC se lie à un facteur transcriptionnel, Spl. (voir Fig. I 7.).

Ni la boîte CAAT ni la boîte GC ne sont présentes dans tous les promoteurs connus.

Les promoteurs de *Saccharomyces cerevisiae* reconnus par l'ARN polymérase II ont une organisation similaire à ceux des eucaryotes supérieurs. Ils contiennent généralement un site d'initiation, un élément TATA et un ou plusieurs éléments UAS (upstream activating sequence); certains contiennent des éléments opérateurs impliqués dans la répression de la transcription (Struhl, 1987) (voir Fig I 8.). L'élément TATA est nécessaire mais pas suffisant à une initiation efficace de la transcription de la plupart des gènes de levure. Mais la TATA box est ici localisée plus loin et à une distance plus variable du site +1 (entre 40 et 120bp).

3) Séquences *cis*-actives interagissant avec des protéines *trans*-actives sur la transcription de gènes très éloignés.

1.- Élément silencer: répresseur de transcription.

Un élément silencer réprime la transcription du gène sous son contrôle indépendamment de son orientation et de sa distance au gène.

Un exemple chez *S. cerevisiae* illustre bien l'action d'un élément silencer.

Le type sexuel α ou a d'une cellule de levure *S. cerevisiae* est déterminé par le locus *MAT* (décrit à la page 16.). Le locus *MAT* actif est accompagné dans le génome de levure de deux loci *MAT* inactifs notés *HML α* et *HMR α* .

Manque de Dittio 17

(voir Fig I 9.). Ces loci interviennent dans les phénomènes de changement sexuel. Des éléments silenciers assurent la répression des loci *HML* et *HMR*: silenciers notés E et I localisés à gauche et à droite de chacun de ces loci et absents du locus *MAT* opérationnel. On a montré que le silencer *HMRE* remplit son rôle indépendamment de son orientation et de sa distance au locus réprimé.

La répression de la transcription nécessite les fonctions codées par quatre gènes *SIR* 1-4 et résulte probablement de l'action des protéines *SIR* aux sites E et I. Cependant, ces protéines répriment l'expression d'un gène normalement transcrit par l'ARN polymérase III. Les protéines *SIR* ne sont donc ni spécifiques d'un gène ni d'une ARN polymérase. De plus, elles empêchent le clivage de l'ADN *HML* ou *HMR* par l'endonucléase HO indiquant qu'elles affectent des interactions entre l'ADN et des protéines non impliquées dans la transcription.

En outre, chacun des silenciers E et I cloné dans un plasmide lui permet de se répliquer de façon autonome dans la levure; des fragments de DNA ayant cette capacité sont appelés éléments *ARS* (Autonomously Replicating Sequence) et représentent une origine de répllication. La coïncidence entre les sites E et I et des éléments *ARS* suggère un lien mécanique entre les processus de répllication et de répression de la transcription de l'ADN. D'autant plus que la répression de *HMR* médiée par *SIR* nécessite le passage par la phase de synthèse d'ADN du cycle cellulaire. Enfin, le remplacement du silencer *HMR E* par un élément *ARS* permet une répression partielle de la transcription de l'*HMR* sous la dépendance des *SIR* indiquant le rôle de la répllication ou d'un facteur dépendant de la répllication dans la fonction silencer (Kimmerly *et al.*, 1988).

Deux protéines reconnaissant des régions spécifiques du silencer *HMR E* ont été identifiées. Ces deux facteurs se liant au silencer sont GRFI (General Regulatory Factor) ou RAP1 (Repressor - Activator Protein) et ABFI (*ARS* - Binding Factor) ou SBF-B (Silencer Binding Factor).

Les protéines *SIR* influencent les propriétés *HMR E* via des interactions avec des protéines liées à ce silencer (GRFI, ABFI) (Kimmerly *et al.*, 1988).

ABFI se lie aussi aux silencers *HMR I* et *HML I* et peut aussi s'associer à d'autres éléments *ARS*; autre argument en faveur d'un lien entre répllication et répression de la transcription. Notons également que chez les eucaryotes supérieurs, un facteur se liant à l'ADN stimule à la fois transcription et répllication (NFI - CTF).

GRI peut également se lier à des séquences UAS notamment celles précédant les gènes *Mata* et *Mata* ainsi qu'aux télomères. Chez la levure - des preuves existent chez d'autres organismes - un même facteur *trans*-actif peut donc réguler différemment divers gènes. (ARNDT *et al.*, 1987). Ainsi, le facteur GRFI est sans doute influencé par d'autres régulateurs suivant qu'il soit lié au silencer ou à une UAS.

2.- Elément enhancer: activateur de transcription.

Un élément enhancer potentialise l'activité de transcription d'un gène soumis à son action et situé en *cis* par rapport à lui. Ces éléments ont en commun certaines propriétés. D'abord, les enhancers peuvent être localisés à plus de 1000 bp du site +1 du gène soumis à leur contrôle; leur fonction est indépendante de leur orientation ainsi que de leur position en aval ou en amont du site +1. De plus, des études ont montré que le mode d'action des enhancers faisait intervenir leur association à des protéines *trans*-actives.

Les éléments UAS nécessaires à une transcription efficace ont des propriétés communes avec les éléments enhancers de mammifères car ils fonctionnent indépendamment de leur orientation et dans une certaine mesure de la distance au site +1 (au moins jusqu'à 600 bp). Tout comme les éléments enhancer, les éléments UAS sont des sites de liaison pour des protéines régulatrices *trans*-actives.

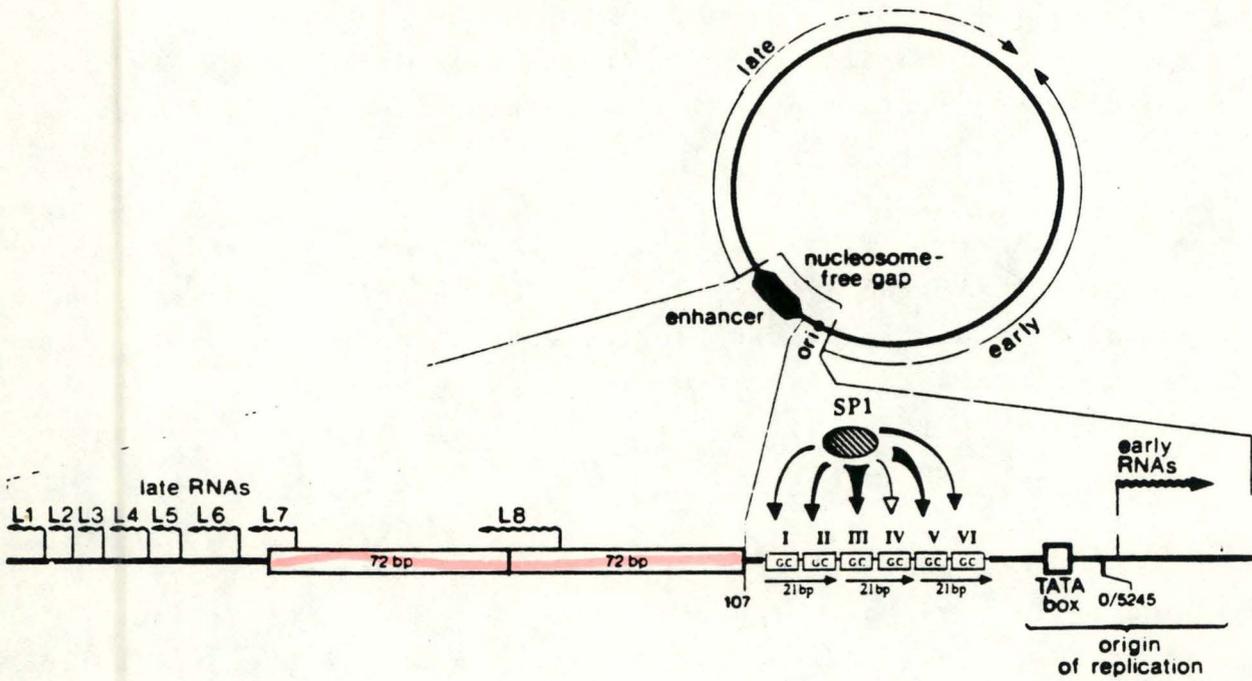


Fig. I 10. La région régulatrice du virus SV40: 2 séquences répétées de 72bp constituent l'élément enhancer; 6 boîtes GC ont des affinités différentes de liaison au facteur Sp1 et forment 3 séquences répétées de 21bp.

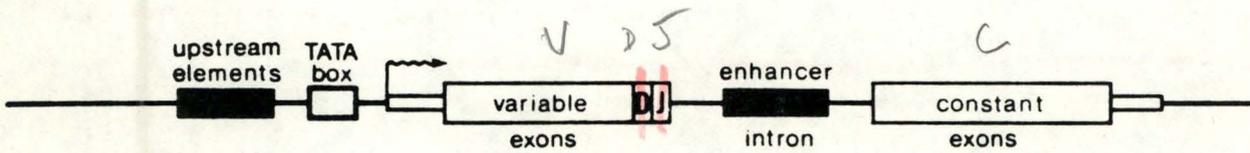


Fig. I 11. Gène de la chaîne lourde des immunoglobulines: le enhancer de ce gène est localisé dans l'intron séparant l'élément J du segment constant.

Eléments enhanceurs viraux.

L'effet enhanceur a été découvert chez le virus SV40 (voir Fig. I 10.). Des séquences en amont du promoteur des gènes "early" de SV40 (gènes s'exprimant dans la phase initiale d'infection par le virus) stimulent la transcription de ces gènes. En effet, lorsque ce fragment 5' non codant est lié au gène de la β globine, il augmente de plus de deux cents fois sa transcription *in vivo* même lorsqu'il est distant de plus de 3000 bp du site d'initiation quelles que soient son orientation et sa position en amont ou en aval du gène.

Le enhanceur de SV40 fonctionne dans différentes espèces et tissus.

D'autres virus possèdent un élément enhanceur; certains sont actifs dans un large éventail d'hôtes et d'autres, comme le enhanceur du virus du polyome de souris, montrent une préférence pour une espèce hôte et même ne fonctionnent que dans un type cellulaire spécifique (expliquant au moins en partie la détermination des cellules hôtes de ce virus).

Suite à l'insertion de rétrovirus dans le génome hôte, leur enhancer en stimulant la transcription de gènes situés à proximité joue un rôle crucial dans l'oncogénèse.

Eléments enhanceurs cellulaires.

Le premier enhanceur cellulaire a été découvert dans le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines. (voir Fig. I 11.), montrant que la fonction enhanceur n'était pas unique aux virus. Le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines est constitué par fusion d'une partie variable formée d'un segment V choisi parmi des centaines, l'un des nombreux segments D et d'un segment J, ^{et} d'une partie constante C. Seul le promoteur associé au segment V réarrangé est actif, les promoteurs des autres segments V restent inactifs. Ceci s'explique par la présence d'un enhanceur à l'intérieur de l'unité de transcription, dans un intron entre J et C.

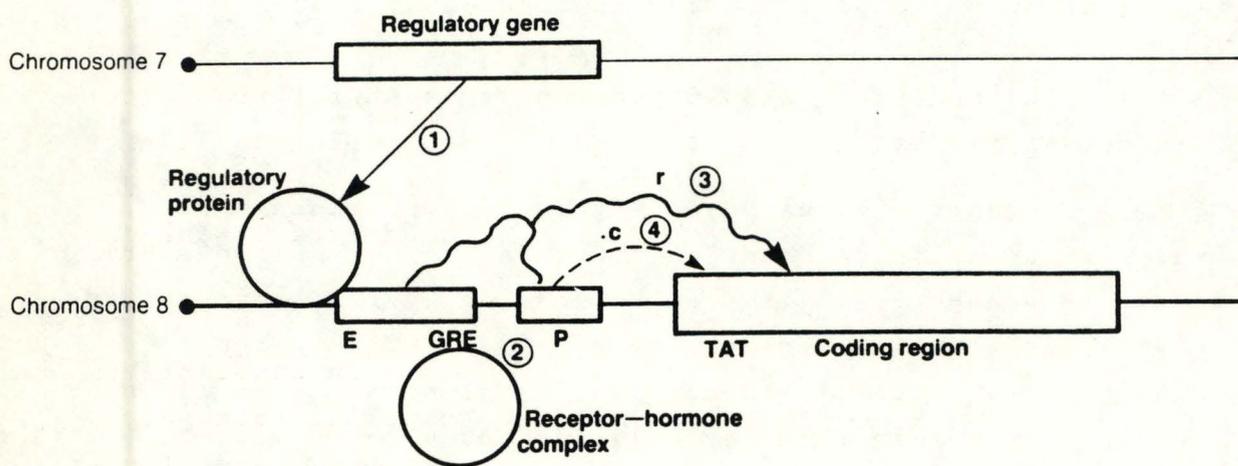


Fig. I 12. Régulation de l'expression du gène de tyrosine amino-transférase (TAT) d'hépatocytes de souris: 1) le produit d'un gène régulateur confère la compétence au enhancer; 2) la séquence enhancer GRE se lie au complexe hormone-récepteur; 3) le enhancer induit la transcription du gène TAT; 4) le promoteur produit l'expression constitutive du gène.

r: expression régulée induite
c: expression constitutive.

L'élément enhancer du gène IgC μ n'est actif que dans les lymphocytes B (Schöler et Gruss, 1985). C'est le premier élément génétique connu stimulant la transcription et spécifique d'un type cellulaire. De nombreux autres gènes contiennent un enhancer; ainsi le gène humain du lactogène placentaire possède un enhancer dont la fonction n'est pas strictement spécifique au placenta (Rogers et Saunders, 1985).

Les enhancers viraux et cellulaires appartiennent au même type d'éléments transcriptionnels. Il est difficile de trouver des homologies de séquence entre enhancers. Nommer une séquence d'ADN enhancer est plus déterminé par son effet que par sa séquence nucléotidique; c'est une définition dite "opérationnelle". Cette variabilité de séquence peut être due à la diversité des environnements dans lesquels s'expriment les enhancers.

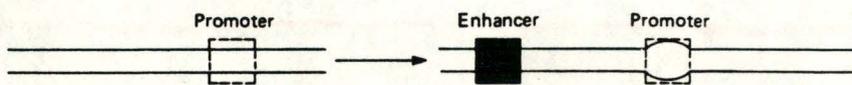
En fait, un enhancer est constitué d'un ou plusieurs motifs, parfois répétés qui sont des sites de liaison pour des facteurs agissant en synergie et pouvant être spécifiques d'un type cellulaire.

Appartiennent à ces facteurs régulateurs *trans*-actifs des récepteurs nucléaires dont la fonction dépend de leur liaison à des ligands spécifiques (stéroïdes, hormones thyroïdiennes...). Ainsi lorsqu'une hormone glucocorticoïde s'est fixée à son récepteur (voir Fig. I 12), ce complexe se lie à un élément enhancer spécifique, (Glucocorticoïd Responsive Element GRE) induisant la transcription des gènes de structure sous son contrôle. En fait, il semble qu'au cours de la différenciation cellulaire, une protéine régulatrice interagisse avec la séquence enhancer, la rendant capable de se lier au complexe hormone-récepteur (Gluecksohn - Waelsch, 1987). Cette capacité de répondre aux glucocorticoïdes n'est acquise qu'aux environs de la naissance. L'activité enhancer serait ainsi régulée au cours du développement.

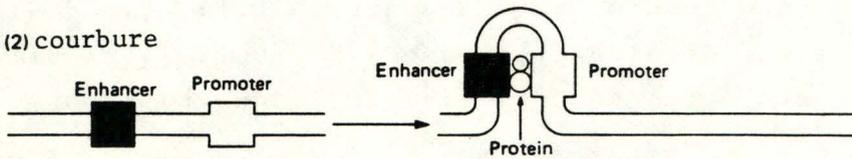
Structure
 fait
 (amphiphile)
 p. 27?

A

(1) topologique



(2) courbure



(3) glissement

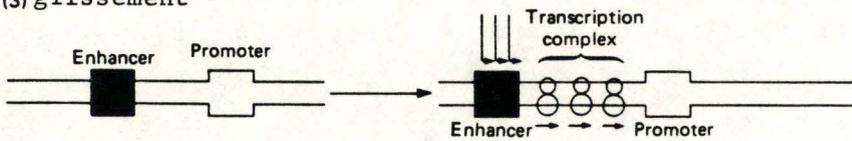


Fig. I 13. Trois modèles d'action du enhancer: représentation schématique de la manière dont l'élément enhancer influence le promoteur via une modification topologique ou une courbure ou un processus d'entrée et de glissement.

Citons encore le cas de l'oncogène v-erbA qui bloque la différenciation des érythroïdes immatures transformés par erbB. Le produit de v-erbA est une forme aberrante du récepteur à l'hormone thyroïdienne (c-erbA) dont le site de liaison à l'ADN et le site de liaison à l'hormone ont été modifiés. v-erbA produit sans doute ses effets concérigènes en altérant la régulation de la transcription des gènes soumis normalement au contrôle de c-erbA (Pawson, 1987).

En somme, silencer et enhancer (englobant UAS) sont des séquences d'ADN modulant la transcription de gènes à grande distance, quelles que soient leur position et leur orientation. Leur influence activatrice ou inhibitrice sur la transcription les différencie. Cette différence réside peut-être essentiellement dans la nature des protéines s'associant à ces séquences d'ADN ou si ces protéines sont identiques (cas GRFI) dans la régulation qu'elles subissent.

Les silenciers connus sont bien plus rares que les enhanceurs. Cela s'explique sans doute par le fait qu'on détecte plus facilement l'activation de l'expression d'un gène que sa répression; le gène réprimé n'exprimant pas de produit, son existence et par conséquent son silencer peuvent longtemps encore être ignorés.

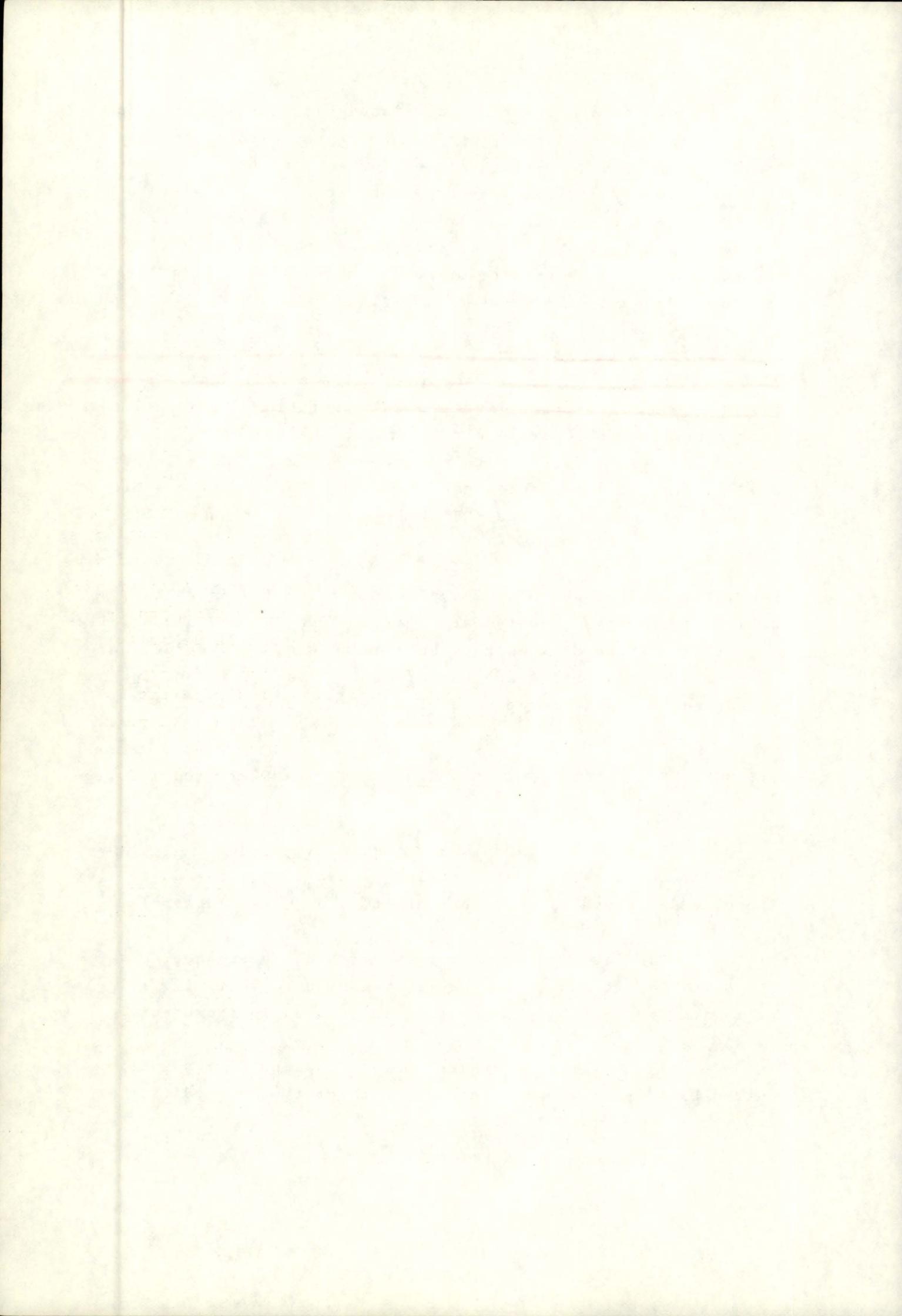
II. MODELES SPECULATIFS DU CONTROLE DE LA TRANSCRIPTION PAR ENHANCER.

La spécificité de l'effet enhancer dépend de la fidélité de reconnaissance des protéines liant l'enhancer et de l'efficacité de transmission de cet effet au promoteur contrôlé.

Plusieurs modèles de mode d'action du enhancer ont été proposés. Expliquons trois modèles mécaniques (voir Fig. 1 13.) de la manière dont l'enhancer peut influencer le promoteur.

1) L'élément enhancer peut influencer l'organisation entre ADN et protéines au sein de la chromatine ou modifier le super enroulement de la molécule d'ADN.

1) → TOPOLOGIE DNA



Des agents interférant avec l'activité topoisomérase II (enzyme modifiant le super enroulement de l'ADN) inhibent la transcription dépendante de l'ARN polymérase II. Par ailleurs, on a montré que le super enroulement était impliqué dans le contrôle de l'activation de promoteurs bactériens.

L'élément enhancer pourrait fonctionner en formant de courtes zones d'ADN-Z, hélice à pas gauche (configuration ADN-Z du enhancer de SV40 *in vitro*).

Les nucléosomes pourraient jouer un rôle, ils sont en effet absents de la région de SV40 contenant l'enhancer. A ce propos, on a suggéré que les nucléosomes recouvrant les séquences UAS du gène *PHO5* de levure empêcheraient la liaison de ces séquences avec des facteurs activateurs. Expérimentalement, par manque de l'histone H4, on provoque chez *S. cerevisiae* la perte de la moitié des nucléosomes chromosomiques (Han *et al.*, 1988). Cette disruption de structure de la chromatine provoquée sur le gène *PHO5* entraîne une augmentation sensible de sa transcription même en conditions naturellement répressives pour ce gène. Ces résultats suggèrent que les nucléosomes régulent la transcription de *PHO5* (Kim *et al.*, 1988). Cependant, la perte de nucléosomes n'a pas d'effet général sur la transcription chez *S. cerevisiae*, car la transcription de divers gènes y est insensible. (Han *et al.* 1988).

Ainsi, les enhancers par leur structure seraient reconnus par des protéines *trans*-actives qui une fois fixées, influenceraient la transcription par propagation de la conformation particulière à toute la molécule.

Cependant, certains résultats expérimentaux sont incompatibles avec ce modèle; en définitive, il n'y a pas de preuve directe que les protéines régulatrices reconnaissent l'ADN dans une autre configuration physique qu'hélicoïdale.

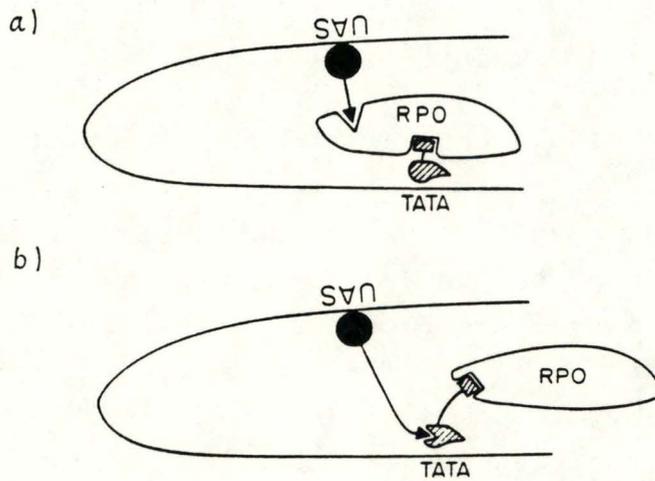


Fig. I 14. Deux mécanismes possibles d'activation transcriptionnelle chez les eucaryotes. a) un activateur se lie à l'UAS et le facteur de liaison à la TATA box se lie à la TATA box; les 2 sont en contact avec l'ARN polymérase; b) l'activateur est en contact avec le facteur de liaison à la TATA box qui se lie à l'ARN polymérase. Les 2 régions d'activation sont symbolisées par un triangle et un rectangle.

2) L'ADN pourrait se replier, se courber pour former une liaison énergétiquement favorable avec une protéine; il pourrait ainsi mettre en contact physique des protéines placées sur la même face de l'hélice contribuant de la sorte aux mécanismes de transcription. Ce processus est utilisé au niveau de la transcription des procaryotes par le répresseur du phage lambda (il se lie à plusieurs sites opérateurs séparés par un nombre entier de tours d'hélice). La courbure d'ADN pourrait ainsi amener en contact intime deux régions d'ADN distantes, comme enhancer et promoteur. L'activateur transcriptionnel associé à l'élément enhancer pourrait alors, - selon l'hypothèse - interagir soit directement avec l'ARN polymérase II soit avec le facteur de liaison à la TATA box, l'aidant ainsi à se lier à l'élément TATA et à contacter l'ARN polymérase II (voir Fig I 14.). Ceci expliquerait la relative indépendance des enhancers pour la distance mais supposerait néanmoins l'influence équivalente d'un enhancer sur des promoteurs placés en différentes distances. Des expériences menées avec SV40 s'opposent à cette dernière hypothèse. (Guarente, 1988) (*cité dans* Jeang et Khoury, 1988).

3) Site d'entrée et glissement.

Ce modèle propose que le enhancer constituerait un site d'entrée pour une protéine (ARN polymérase par exemple) qui glisserait alors le long de l'ADN jusqu'au promoteur où elle affecterait la transcription. Il est appuyé par des expériences dans lesquelles le enhancer de SV40, parmi plusieurs promoteurs, active préférentiellement les plus proches. On démontre aussi que les enhancers augmentent la densité des complexes d'initiation ARN polymérase-ADN. La présence d'une barrière physique sur la séquence séparant enhancer et promoteur réduit l'activité enhancer et constitue une vérification plus directe de ce modèle.

D'autres proposent que le enhancer fournisse un site d'attachement à un constituant nucléaire nécessaire à son action.

Quoi qu'il en soit, il est possible, vu la diversité des enhancers, qu'ils aient différents modes d'action. Les résultats expérimentaux actuels ne permettent pas d'établir un mécanisme unique pour tous les enhancers.

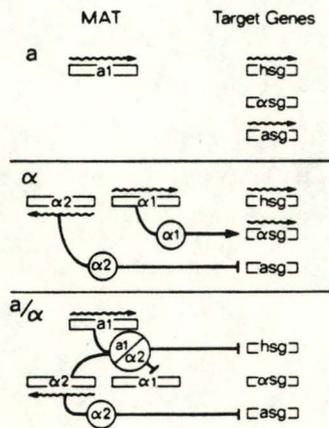


Fig. 15a. Contrôle du type cellulaire: Dans une cellule a l'expression des gènes spécifiques du type a (asg) et des gènes spécifiques de l'état haploïde (hsg) est constitutive. Dans une cellule α, le produit du gène α2 réprime les asg, alors que le produit du gène α1 active les gènes spécifiques du type α (αsg). Dans le diploïde a/α, les produits des gènes a1 et α2 répriment l'expression des hsg, incluant Mata1.

~~~~~ : le gène s'exprime.

Des enhanceurs régulés négativement ont été découverts: leur action activatrice est supprimée lorsqu'ils sont entourés de chaque côté par des séquences inhibitrices. Cette découverte est compatible avec le modèle mécanique d'entrée et de glissement.

Néanmoins, les modèles explicatifs sont une simplification de la réalité d'action des enhanceurs.

On peut résumer la régulation de l'initiation de la transcription comme résultant d'interactions réciproques entre trois ensembles de partenaires: les séquences d'ADN, l'appareil transcriptionnel de base, des facteurs *trans*-actifs. En ajoutant que des protéines *trans*-actives peuvent influencer l'ADN en s'associant à d'autres protéines *trans*-actives directement liées à cet ADN ou en s'associant à la manière de facteurs de transcription à la polymérase elle-même. Nous avons également soulevé l'importance éventuelle de la configuration spatiale de l'ADN dans l'activité transcriptionnelle. On imagine dès lors aisément la complexité du contrôle de la transcription d'un gène.

### III. EXEMPLES DE SYSTEMES DE REGULATION CHEZ LA LEVURE

#### S. CEREVISIAE.

##### 1. Détermination du type cellulaire: le locus MAT.

Deux types sexuels, a et  $\alpha$  existent chez la levure. *S. cerevisiae*; le croisement d'un haploïde a et d'un haploïde  $\alpha$  donne naissance à un diploïde a/ $\alpha$ . Le type cellulaire a ou  $\alpha$  est déterminé par les allèles *MAT*<sub>a</sub> ou *MAT* <sub>$\alpha$</sub>  localisé au locus régulateur *MAT*. Chacun de ces allèles donne deux produits de transcription *MAT*<sub>a1</sub>, *MAT*<sub>a2</sub>, et *MAT* <sub>$\alpha$ 1</sub>, *MAT* <sub>$\alpha$ 2</sub>. Ils agissent en régulant l'expression au niveau transcriptionnel de gènes nécessaires au croisement et à la sporulation (voir Fig. I 15a.).

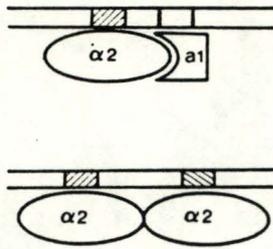


Fig. 1 15b. Aspect combinatoire du type cellulaire. L'opérateur  $\alpha 2$  est fait de 2 demi-sites  $\alpha 2$  correctement séparés de façon à se lier au dimère  $\alpha 2$ . L'opérateur  $a 1 / \alpha 2$  consiste en un demi-site  $a 1$  et en un demi-site  $\alpha 2$  espacés correctement pour se lier à l'hétérodimère. Cet opérateur ne se lie pas efficacement au dimère parce que la moitié  $a 1$  ne permet pas une liaison coopérative par les 2 molécules du dimère  $\alpha 2$ .

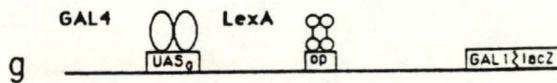


Fig. 1. 15c. Le répresseur bactérien LexA réprime la transcription de  $GAL 1$  si il se lie à l'opérateur LexA inséré entre l' $UAS_G$  et le site  $+ 1$ .

Les protéines  $MAT\alpha_1$  et  $MAT\alpha_2$  possèdent des séquences similaires aux sites de liaison à l'ADN d'autres protéines. Les séquences d'ADN reconnues par les systèmes répresseurs  $\alpha_2$  et  $\alpha_1/\alpha_2$  ont été identifiées. (Miller *et al.*, 1985) Chacune de ces séquences réprime l'expression du gène devant lequel elle est insérée par construction; c'est pourquoi ces séquences sont nommées opérateur. Le répresseur  $\alpha_2$  en se liant à sa séquence opérateur spécifique réprime les gènes spécifiques du type a. En présence du produit du gène  $\alpha_1$  l'action de  $\alpha_2$  s'étend aux gènes spécifiques de l'état haploïde. On explique cela par la liaison du complexe répresseur  $\alpha_1/\alpha_2$  sous forme d'un hétérodimère.  $\alpha_1$  permet par coopérativité la liaison d' $\alpha_2$  à l'ADN et réciproquement, expliquant qu'un dimère de molécules  $\alpha_2$  ne peut se lier à cette séquence d'ADN (voir Fig. I 15b.).

Ce modèle implique une interaction combinatoire entre protéines régulatrices sur l'ADN: des protéines différentes reconnaissant la même séquence d'ADN (cette séquence est souvent organisée en palindromes) peuvent exercer des fonctions différentes par suite de leurs interactions protéiques différentes.

La répression n'est efficace que lorsque les séquences opérateurs spécifiques sont situées entre le motif UAS et la TATA box. Le répresseur en s'associant à ces séquences opérateur pourrait empêcher, comme le propose le modèle "entrée-glissement", l'ARN polymérase de se déplacer sur l'ADN à partir de l'UAS jusqu'au site +1.

Les résultats de Ptashne et Brent seraient également en faveur du mécanisme "entrée-glissement". Ils montrent en effet qu'un répresseur bactérien bloque la transcription d'un gène de levure quand l'opérateur bactérien est placé entre l'UAS et le point d'initiation de la transcription. Des terminateurs de transcription de levure introduits au même endroit de la région promotrice ont le même effet. (Ptashne et Brent, 1984). Le répresseur constituant un obstacle physique et le terminateur une séquence signal s'opposent tous deux au déplacement de l'ARN polymérase. (voir Fig. I 15c)

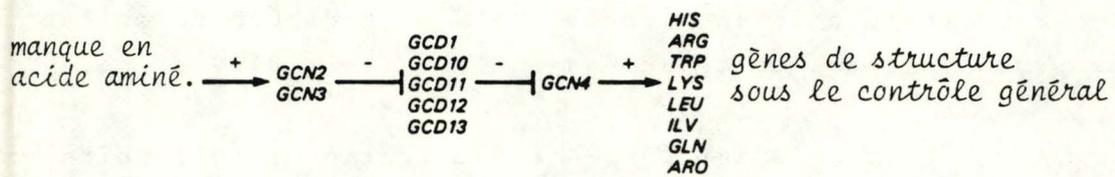


Fig. I 16. Hiérarchie des facteurs régulateurs dans le contrôle général des acides aminés. + : activation  
- : antagonisme ou répression

## 2. Contrôle général de la synthèse d'acides aminés.

Le produit du gène *GCN4* est un activateur de la transcription des gènes de structure codant pour les enzymes de multiples voies de biosynthèse d'acides aminés. Il entre en action en réponse à un manque d'un de ces acides aminés. Le système régulateur agit sur la traduction de *GCN4*, (voir Fig. I 16.): les produits des gènes régulateurs négatifs *GCD1* et *GCD10* à 13 répriment la synthèse de l'activateur *GCN4* quand l'apport extérieur en acides aminés est suffisant. Lorsque le milieu est déficient en acides aminés, les produits des gènes régulateurs positifs *GCN2* et *GCN3* dérèpriment indirectement la synthèse de l'activateur en inhibant les facteurs *GCD*.

Le produit de *GCN4* par son extrémité carboxy-terminale reconnaît et se lie spécifiquement à une petite séquence nucléotidique répétée dans la partie 5' non codante de chaque gène de structure soumis à son contrôle. Cette séquence d'acides aminés centrée dans une région acide de la protéine *GCN4* est responsable de l'activation de la transcription. (Hope et Struhl, 1986). La distance séparant la région de liaison à l'ADN de la région activatrice pourrait être suffisante pour permettre la flexibilité de position et d'orientation observée pour la séquence reconnue par la protéine *GCN4* par rapport à la TATA box. Le modèle de mécanisme d'activation propose que la région activatrice se lierait à une autre protéine qui serait un composant de l'appareil transcriptionnel ainsi activé (ARN polymérase II, ou le facteur de liaison à la TATA box par exemple,) ou encore une histone de façon à modifier la structure de la chromatine. La région activatrice étant de trop petite taille pour assumer une activité catalytique modifiant la conformation de l'ADN (topoisomérase...), l'activation impliquerait plutôt des interactions entre protéines.

Cependant, même en présence d'un excès d'acides aminés, la transcription des gènes dont les produits interviennent dans la synthèse d'acides aminés est stimulée par un second système

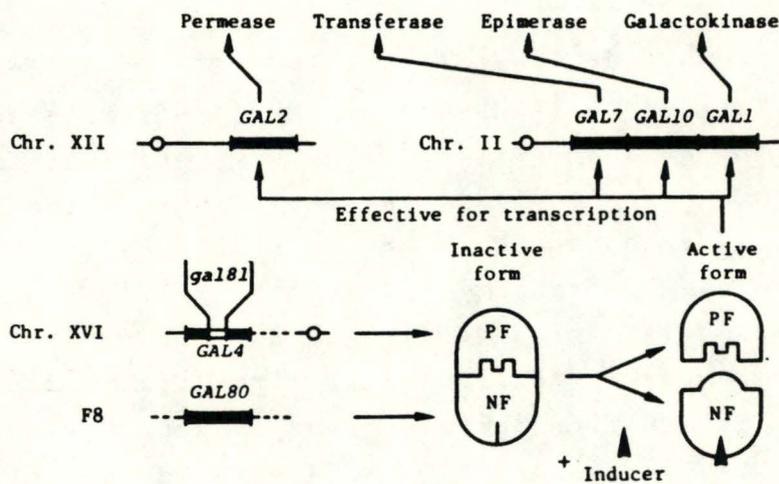


Fig. I 17. Modèle du rôle des produits des gènes  $GAL4$  (facteur positif PF) et  $GAL80$  (facteur négatif NF) dans la régulation des gènes de structure du métabolisme du galactose.

régulateur appelé le contrôle du niveau basal. Ces gènes sont efficacement transcrits en l'absence de *GCN4* suggérant que d'autres facteurs *trans*-actifs interviennent dans le maintien de leur niveau basal de transcription. Ainsi, le niveau basal de transcription du gène *HIS4* est sous le contrôle d'éléments *cis*-actifs présents en amont du gène (différents de ceux reconnus par *GCN4*) et reconnus par des facteurs *trans*-actifs produits des gènes *BAS1* et *BAS2*. Ces gènes sont également nécessaires au contrôle de la biosynthèse des purines. De plus, *BAS2* est le gène *PHO2*, un gène régulateur du métabolisme du phosphate. Une même protéine liant l'ADN, le produit du gène *PHO2*, est ainsi impliquée dans la régulation de l'histidine, de l'adénine et du métabolisme du phosphate, suggérant que la levure utilise un nombre limité de protéines *trans*-actives pour réguler des gènes de diverses voies métaboliques.

La spécificité d'action des protéines *trans*-actives s'explique par la multiplicité de leur interaction avec d'autres protéines s'associant à l'ADN. Par exemple, la spécificité de régulation du gène *HIS4* est due à l'interaction entre *BAS1*, *BAS2* et *GCN4*. (ARNDT *et al.*, 1987).

### 3. Circuit régulateur du métabolisme de galactose.

L'utilisation de galactose exogène par *S. cerevisiae* nécessite l'induction d'un système enzymatique: enzyme de transport spécifique au galactose (codée par *GAL2*) et enzymes de la voie de Leloir (gènes *GAL1*, *GAL10*, *GAL7*). Sous leur action, le galactose est converti en glucose 1-phosphate puis en glucose 6-phosphate sous l'action d'une phosphoglucomutase constitutive; le glucose 6-phosphate entre dans la glycolyse. Les enzymes de la voie métabolique sont inductibles par le galactose via l'expression de gènes régulateurs (voir Fig. I 17.).

Le produit du gène régulateur positif *GAL4* est constitutif (Oshima, 1982). Il stimule la transcription des gènes de structure et son activité est inhibée par son interaction avec le produit de *GAL80*, (Oshima, 1982) régulateur négatif, sauf lorsque celui-ci est lié à l'inducteur. Des mutations dans une

position interne du gène *GAL4* notée *gal181* modifient les sites de reconnaissance entre les produits de *GAL4* et de *GAL80* et ainsi affectent leur interaction (Oshima, 1982).

Le produit du gène *GAL4* joue son rôle d'activateur en se liant à 4 sites de 17bp à l'intérieur de la séquence UAS localisée entre les gènes de structure *GAL1* et *GAL10* et nécessaire à l'activation de leur transcription.

Pour l'activateur *GAL4*, le domaine de liaison à l'ADN est localisé dans la partie amino-terminale et les deux petites régions d'activation de la transcription, localisées dans l'extrémité carboxy-terminale de la séquence, correspondent aux deux seules parties acides de *GAL4*.

En fait, le répresseur *GAL80* agit en se liant à la protéine *GAL4* ou au complexe protéine *GAL4*-séquence UAS le rendant incapable d'activation. Le complexe ternaire *GAL80-GAL4-UAS* est stabilisé par des interactions multiples: un UAS contenant plusieurs sites de liaison à *GAL4* s'associe à plusieurs de ces protéines qui se lieraient alors à un oligomère de *GAL80* augmentant ainsi l'efficacité de la répression. (Lue *et al.* 1987).

#### 4. Circuit régulateur du métabolisme du phosphate.

Le système des phosphatases chez *S. cerevisiae* présente plusieurs avantages dans l'étude de mécanismes génétiques régulateurs:

- malgré l'existence de phosphatases constitutives, la majorité est répressible;
- le système est sous le contrôle d'un simple effecteur, le phosphate inorganique;
- la phosphatase acide est localisée dans l'espace périplasmique de l'enveloppe cellulaire, facilitant sa détection pour la détermination phénotypique. Les activités phosphatase acide et alcaline sont déterminées par des méthodes spécifiques de coloration.

- les différences d'activités enzymatiques entre les niveaux réprimé et dérèprimé sont significatives.

#### Phosphatases de levure.

La phosphatase acide est localisée dans l'espace périplasmique alors que la phosphatase alcaline est intracellulaire. La levure *S. cerevisiae* contient deux types de phosphatase acide, l'une constitutive codée par le gène *PHO3*, l'autre répressible par le phosphate inorganique (fraction majeure codée par le gène *PHO5* et fraction mineure composée des produits des gènes *PHO10* et *PHO11*). Deux phosphatases alcalines sont présentes, l'une, principalement vacuolaire, est non spécifique, répressible par le phosphate inorganique (et codée par le gène *PHO13* d'après Oshima). *S. cerevisiae* a deux systèmes de transport du phosphate; celui à faible *K<sub>m</sub>* est répressible par le phosphate inorganique extérieur et codé par le gène *PHO84*.

Par les méthodes de coloration détectant les activités phosphatases de colonies sur boîtes de milieu test, divers mutants pour la synthèse de phosphatases ont été isolés. Certains produisent de façon constitutive l'une des phosphatases répressibles alors que l'activité phosphatase d'autres est continuellement réprimée. Ces mutants ont été soumis à divers tests génétiques: test de complémentation, tests dominance-récessivité avec l'allèle sauvage correspondant ou d'autres allèles mutants à phénotypes différents, mapping grossier et fin des loci et test d'épistasie entre mutants à activité constitutive et mutant à activité supprimée. Les données obtenues permettent d'élaborer un modèle de régulation des phosphatases. Ces analyses sont suivies de travaux de génétique moléculaire: clonage de l'allèle sauvage par complémentation du mutant, séquençage du fragment cloné, études des produits de transcription dans différentes conditions d'expression... Les résultats obtenus permettent d'évaluer le modèle régulateur proposé.

*Mr Jean Court*

Yoshida et al.  
1987?

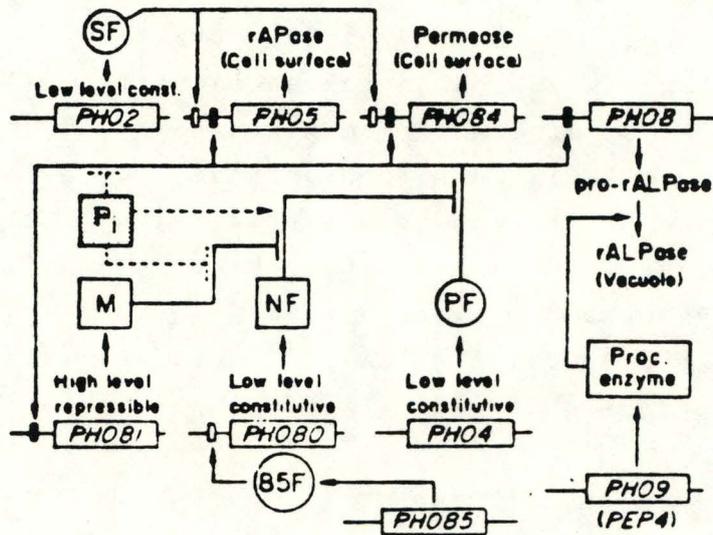


Fig. I 18. Modèle de la fonction de facteurs régulateurs dans le système phosphatase

85F: facteur encodé par PHO85, nécessaire à l'expression de PHO80

SF: facteur spécifique codé par PHO2

M: médiateur codé par PHO81

PF: facteur positif codé par PHO4

NF: facteur négatif codé par PHO80.

Gènes impliqués dans la régulation du métabolisme du phosphate.

L'expression du gène *PHO3* produisant la phosphatase acide constitutive nécessite la fonction de deux gènes complémentaires *PHO6* et *PHO7* (Yoshida *et al.*, 1987). L'expression des gènes *PHO5*, *PHO10-11* et *PHO84* en réponse au phosphate inorganique est sous la dépendance d'un système génétique constitué d'au moins 5 gènes régulateurs *PHO2*, *PHO4*, *PHO80*, *PHO81* et *PHO85*. Les quatre derniers gènes et le gène *PHO9* interviennent dans la régulation du gène *PHO8* produisant la phosphatase alcaline.

Modèle de la régulation de l'expression de *PHO5*. (voir Fig. I 18).

Le produit *PHO4*, facteur positif, agissant en interaction avec l'activateur *PHO2* est un activateur de la transcription des gènes de structure. Notons que pour l'activation du gène *PHO8*, l'activateur *PHO4* seul suffit. La disponibilité de *PHO2* est indépendante du phosphate inorganique alors que celle de *PHO4* est contrôlée par le phosphate inorganique.

PHO5? En présence de phosphate, un facteur négatif, le produit *PHO80* interagit avec le produit *PHO4*, l'empêchant d'exercer sa fonction. En absence de phosphate, un médiateur, le produit *PHO81* se lie au facteur négatif *PHO80*. Le facteur positif *PHO4* alors libre d'interagir avec d'autres molécules devient activateur. Le produit *PHO4* stimule également la transcription de *PHO81*, indiquant que le système régulateur est une sorte de circuit fermé. Dans ce modèle, le phosphate inorganique peut inhiber l'action du facteur positif et/ou du médiateur ou stimuler la fonction du facteur négatif. Des quantités de produits *PHO81* plus faibles en conditions de répression qu'en condition de dérpression sont prévues.

Signalons que le produit *PHO9* contrôle post-transcriptionnellement l'expression de *PHO8*. Il est nécessaire à la maturation de l'enzyme *PHO8* d'une forme précurseur à une forme active. (Yoshida *et al.*, 1987).

gènes faiblement et fortement exprimés:  
→ biais dans le choix de la base  
base d'un codon ≠ ?

### Le gène PH080.

Après son clonage, son séquençage permet de déduire que les codons utilisés ne correspondent pas à ceux préférentiellement utilisés dans les gènes de structure à haut niveau d'expression. L'expression de PH080 est indépendante des concentrations en phosphate (Toh-e et Shimauchi, 1986) et serait d'après Oshima de faible niveau. L'étude d'un clone du gène PH080 contenant l'entièreté de la région promotrice (Gilliquet *et al.* 1987) devrait permettre de s'en assurer ainsi que de vérifier si comme Oshima le suggère, le gène PH085 constitue un facteur essentiel à la transcription de PH080.

### Le gène PH04.

Après clonage et séquençage du gène PH04, on a montré qu'il était transcrit de façon constitutive (indépendante du phosphate inorganique (Pi) et à un faible taux (Legrain *et al.*, 1986) (Koren *et al.*, 1986). Les codons employés préférentiellement au cours de la traduction (déduits de la séquence) sont typiques de gènes faiblement exprimés (Legrain *et al.*, 1986). D'autres résultats montrent que des gènes régulateurs sont transcrits en faible quantité (PH02, PH080, GAL4) faisant suggérer que les protéines régulatrices pour lesquelles ils codent fonctionneraient à faible concentration cellulaire (Koren *et al.*, 1986). De plus, une séquence de 30bp précédant le point d'initiation de la transcription montre une grande homologie avec la région correspondante du gène GAL4 codant également pour un activateur (Legrain *et al.*, 1986). La protéine PH04 était supposée agir de façon similaire à l'activateur GAL4 qui se lie aux régions UAS de gènes de structure cibles. Cependant, les résultats de Koren et collaborateurs (1986) suggèrent un autre mécanisme que la liaison directe de la protéine PH04 à l'ADN pour la régulation de PH05. Les résultats de M. Legrain (1986) et de G. Berben (1988) le confirment. la protéine PH04 ne présente pas d'homologie de séquence avec des sites protéiques essentiels à la liaison à l'ADN. Il est plus que probable que le produit PH02 joue un rôle crucial dans l'activation en se liant à l'ADN.

### Le gène PHO2.

Le gène *PHO2* a également été cloné et séquencé, son taux de transcription tout comme celui de *PHO4* est faible et constitutif (indépendant du Pi). Il code sans doute (comme *GAL4*) pour deux protéines qui pourraient s'associer dans un multimère. Des homologues de séquence ont été identifiées dans les régions promotrices des gènes *PHO2* et *PHO4* et dans des domaines de leurs protéines. La protéine *PHO2* (déduite de la séquence nucléotidique) montre des ressemblances de structure primaire et secondaire avec des domaines de protéines identifiées comme capables de se lier à l'ADN. La protéine *PHO2* interagit sans doute directement avec l'ADN en amont des gènes qu'elle régule (Berben *et al.*, 1988).

Parmi ces gènes se trouve *PHO5*, les séquences en amont de l'unité de transcription de *PHO5* impliquées dans la régulation de ce gène ont été identifiées et contiennent deux séquences UAS homologues, chacune suffisante pour l'induction de *PHO5*. (Bajwa *et al.* 1987).

Ainsi, l'insertion d'un gène codant pour la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (gp51) du BLV (Bovine Leukemia Virus) dans un vecteur pFL1 navette levure - *E. coli* portant le fragment 5' non codant de *PHO5* permet l'expression de cette glycoprotéine en conditions de dérèpression (faible concentration en Pi) (Legrain *et al.*, 1986b).

### Le gène PHO81.

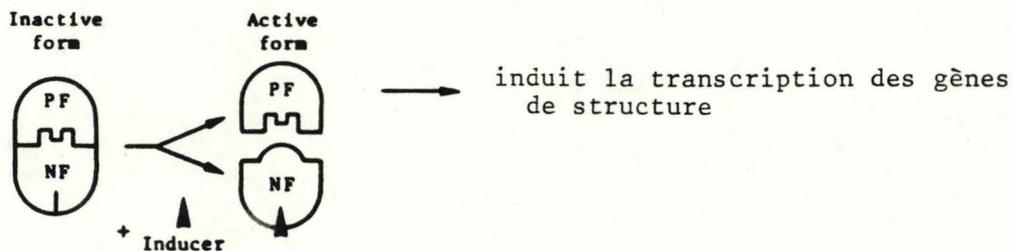
Les travaux de Yoshida (1987) indiquent qu'en conditions de dérèpression (faible concentration en Pi) un taux élevé d'ARN messagers du gène *PHO81* est produit, taux comparable à celui des gènes de structure des phosphatases. En milieu de culture riche en Pi, la transcription du gène *PHO81* est fortement réprimée. De plus, les résultats de Yoshida semblent montrer que l'expression du gène *PHO81* n'est pas dérèprimée dans un mutant *pho4*, mais serait légèrement dérèprimée dans un mutant *pho2* alors qu'elle est constitutive dans les mutants *pho80* et *pho85*.

Ainsi, la transcription de *PHO81* serait contrôlée par le Pi par l'intermédiaire de la fonction de *PHO4* et de *PHO80*. Or, l'activité de *PHO4* est influencée par le produit *PHO81*; l'expression du gène *PHO81* est donc contrôlée par le produit *PHO81* lui-même.

Apparaît donc le modèle du système régulateur en circuit fermé. Un circuit fermé a également été décrit dans le système régulateur du métabolisme de galactose chez *S.cerevisiae*.

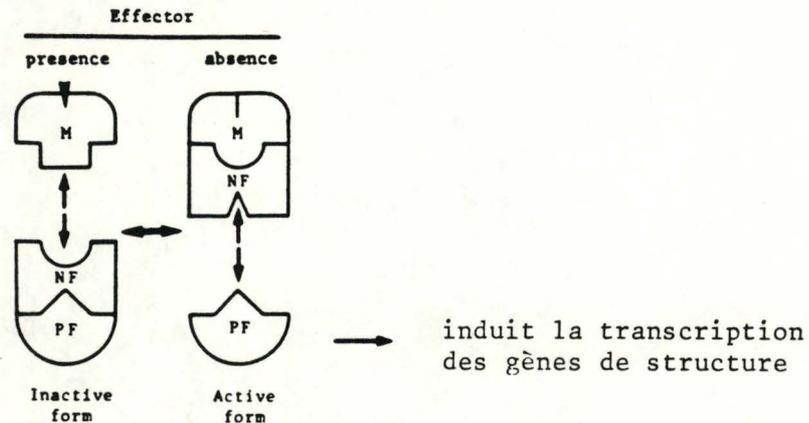
Les deux systèmes régulateurs, PHO et GAL, présentent de grandes analogies dans le mode de fonctionnement des gènes régulateurs et dans la cascade de signaux. Ces similitudes s'étendent au circuit régulateur de phosphatases acides et alcalines chez *Neurospora crassa*. Les gènes de ces deux enzymes sont également sous le contrôle de Pi. Leur expression dépend de trois gènes régulateurs, codant pour un médiateur, un facteur négatif, un facteur positif; ce dernier étant indispensable à l'expression des deux gènes de structure (*cité dans Oshima, 1982*).

Lorsque l'effecteur du système est un inducteur (cas du système galactose), il se lie au facteur négatif entraînant sa séparation du facteur positif qui devient alors activateur:



Dans les systèmes où l'effecteur agit comme co-répresseur (cas du système phosphatase) un facteur supplémentaire, le médiateur, (produit *PHO81*) est présent et joue le rôle d'intermédiaire entre l'effecteur et le facteur négatif. Ce facteur fonctionne en renversant les signaux dus à la présence ou à l'absence

de Pi: en effet, en présence de Pi, la transcription des gènes de phosphatases est réprimée alors qu'elle est stimulée en absence de Pi:



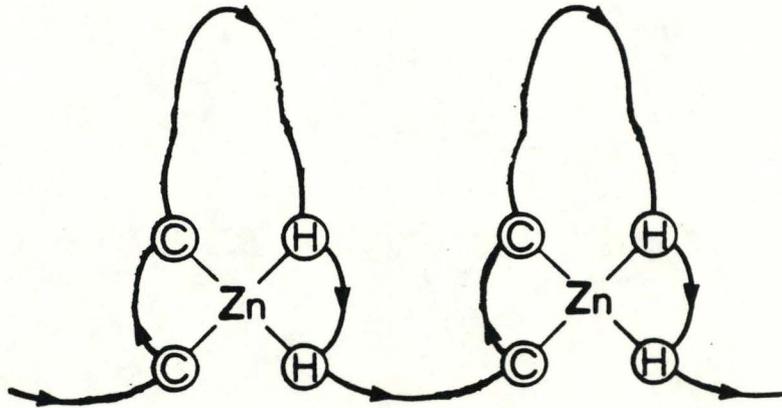
#### IV. ARGUMENTS EN FAVEUR D'UNE CONSERVATION DES MECANISMES DE REGULATION DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES.

L'idée d'une conservation de mécanismes d'activation de la transcription provient de la constatation que des éléments *cis*-actifs de levures (UAS) et de mammifères (enhancer) sont similaires. Comme on l'a vu, l'activité de ces éléments *cis*-actifs est due à des protéines activatrices de transcription qui s'y associent spécifiquement. Chez la levure, les activateurs connus contiennent un domaine pour la liaison à l'ADN séparé d'un domaine pour l'activation de la transcription.

##### Conservation des domaines de liaison à l'ADN.

Les domaines potentiels de liaison à l'ADN des protéines régulatrices *MAT $\alpha$ 1*, *MAT $\alpha$ 2* et de la protéine déduite *PHO2* présentent certaines homologies de séquence avec les homéodomaines de protéines de vertébrés et d'invertébrés soupçonnées d'agir en se liant à l'ADN (Shepherd *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1985 et Berben *et al.*, 1988).

Au niveau de leur site -supposé ou démontré- de liaison à l'ADN ces trois protéines régulatrices ainsi que *GAL4* présentent des homologies de séquence avec le domaine de liaison à l'ADN nommé helix-turn-helix de protéines régulatrices de procaryotes.



*Fig. 1 19. Représentation schématique de domaines Zn finger répétés dans le facteur transcriptionnel TFIIIA de Xenopus. Chacun est centré sur un atome de Zn formant 4 liaisons de coordination avec 2 paires invariantes de cystéine (C) et d'histidine (H).*



*Représentation schématique d'un modèle d'interaction des domaines de TFIIIA (Zn finger représentés sous forme de cylindres) avec la double hélice d'ADN. Le facteur TFIIIA est placé sur une face de l'hélice, les Zn fingers successifs pointant vers le grand creux de l'hélice.*

La protéine *GAL4* présente à l'intérieur de son domaine de liaison à l'ADN deux sites de liaison au Zn (Johnston, 1987) formant chacun une structure appelée "Zinc-finger". Ce Zn finger est un motif protéique responsable de liaison à l'ADN (Klug et Rhodes, 1987) qui a été découvert chez le facteur de transcription TFIIIA de *Xenopus* où il est répété 9 fois (voir Fig. I 19). Les domaines de liaison à l'ADN de nombreux récepteurs hormonaux, d'ailleurs très conservés, contiennent des séquences homologues au motif Zn finger. Le facteur de transcription Spl a également dans son site de liaison à l'ADN trois motifs homologues au Zn finger (Kadonaga *et al.* 1987). Le site potentiel de liaison à l'ADN de *PHO2* pourrait lui aussi s'organiser en une structure Zn finger (Berben *et al.* 1988).

En outre, la protéine activatrice *GCN4*, le produit de l'oncogène viral *v-jun* (virus du sarcome aviaire, ASV) et du proto-oncogène humain *c-jun*, les protéines FOS, MYC et AP-1 montrent des homologies de séquences au niveau des domaines de liaison à l'ADN. ~~La richesse en résidus basiques de ce domaine est compatible avec son rôle.~~ Cependant, on déduit de la séquence ce *GCN4* qu'aucun des deux motifs - hélix-turn-hélix ou Zn finger - ne serait impliqué dans l'interaction avec l'ADN (Hope et Struhl, 1986).

Se retrouvent ainsi chez levure, mammifères et procaryotes des ~~structures protéiques utilisées pour la liaison à l'ADN: motif  $\alpha$  hélix -  $\beta$  turn -  $\alpha$  hélix et Zn finger.~~ Cependant d'autres structures pourraient assurer l'interaction entre protéines et ADN; il s'agirait par exemple d'une ~~hélice  $\alpha$~~  dans le cas de *GCN4*.

#### Conservation des domaines d'activation de la transcription.

Les domaines d'activation de la transcription de *GAL4* et *GCN4* ne montrent pas d'homologies de séquence mais sont susceptibles de former dans ces régions où prédominent des acides aminés à résidus acides, une ~~hélice  $\alpha$  amphipathique~~ (Hope et Struhl, 1986). Des peptides formant une hélice  $\alpha$  amphipathique

(ayant une face hydrophile portant des résidus acides et une face hydrophobe) lorsqu'ils sont associés à un promoteur actif d'ailleurs la transcription à partir de ce promoteur (Giniger et Ptashne, 1987).

Un autre exemple est fourni par l'oncogène *c-fos*. Le produit de l'oncogène *c-fos* fusionné à un domaine de liaison à l'ADN (celui du répresseur bactérien Lex) active la transcription chez la levure après association de la protéine de fusion à son site d'ADN spécifique. (Lech *et al.*, 1988). Cela suggère que l'effet cancérigène de la protéine FOS serait dû à sa liaison (par association à d'autres protéines) au promoteur de gènes spécifiques déterminant l'activation de leur transcription. La protéine activatrice cFOS n'est pas très acide mais est chargée négativement suite à la présence de groupements phosphate. On suppose que l'activité stimulatrice de transcription d'autres phosphoprotéines eucaryotes serait due aux charges négatives des groupements phosphate. C'est au niveau de ce domaine chargé négativement que les protéines régulatrices sont supposées interagir avec les composants de l'appareil transcriptionnel. Une conservation de ces interactions est suggérée par la similitude des régions activatrices des protéines régulatrices de levure et d'eucaryotes supérieurs.

De nombreux résultats expérimentaux apportent des preuves croissantes de cette conservation des mécanismes de contrôle de l'initiation de la transcription de la levure jusqu'à l'homme.

Des expériences montrent que des activateurs de transcription de levure sont actifs dans les cellules de mammifères.

La protéine régulatrice de levure, *GAL4*, exprimée dans des cellules Hela y stimule la transcription à partir de promoteur eucaryote où son site UAS spécifique de reconnaissance est introduit (Webster *et al.*, 1988). Le taux de transcription obtenu dans ce cas est le même que celui observé en présence du enhancer de *SV40*.

En outre, placer l'UAS reconnu par *GAL4* dans le enhancer de SV40 résulte en une activation en synergie de la transcription en présence de *GAL4*.

De plus, des chimères résultant de la fusion du domaine de liaison à l'ADN du récepteur humain à oestrogènes et du domaine activateur de la transcription de *GAL4* ou *GCN4* activent la transcription à partir d'une région promotrice contrôlée par les oestrogènes dans les cellules HeLa (Webster *et al.*, 1988).

Dans l'expérience complémentaire, une chimère composée du domaine de liaison à l'ADN de *GAL4* et du domaine de liaison aux hormones du récepteur humain à ces oestrogènes stimule la transcription à partir d'un promoteur contenant l'UAS reconnu par *GAL4* et cela dans des cellules HeLa.

Ces deux expériences montrent aussi que le domaine de reconnaissance de l'ADN et le domaine d'activation sont séparés chez le récepteur à oestrogènes (chez d'autres récepteurs nucléaires également) tout comme ceux des activateurs *GAL4* et *GCN4*.

La protéine *GAL4* active un promoteur de virus (virus de tumeur mammaire de souris) dans des cellules de mammifères si l'UAS reconnu par *GAL4* est inséré en amont. Un dérivé de *GAL4* se liant à l'ADN mais n'activant pas la transcription dans la levure ne l'active pas non plus dans les cellules de mammifères. On montre aussi que *GAL4* et le récepteur de glucocorticoïdes activent un promoteur en synergie. (Kakidani et Ptashne, 1988).

D'autres expériences montrent réciproquement que des activateurs transcriptionnels de mammifères sont actifs dans la levure.

En plus du cas de la protéine Fos activant la transcription chez *S. cerevisiae*, le récepteur humain à l'oestrogène exprimé dans la levure entraîne une stimulation de la transcription via reconnaissance de son site spécifique introduit dans la levure. Cette activation se fait sous une dépendance hormonale étroite comme dans les cellules de mammifères (Metzger *et al.*, 1988).

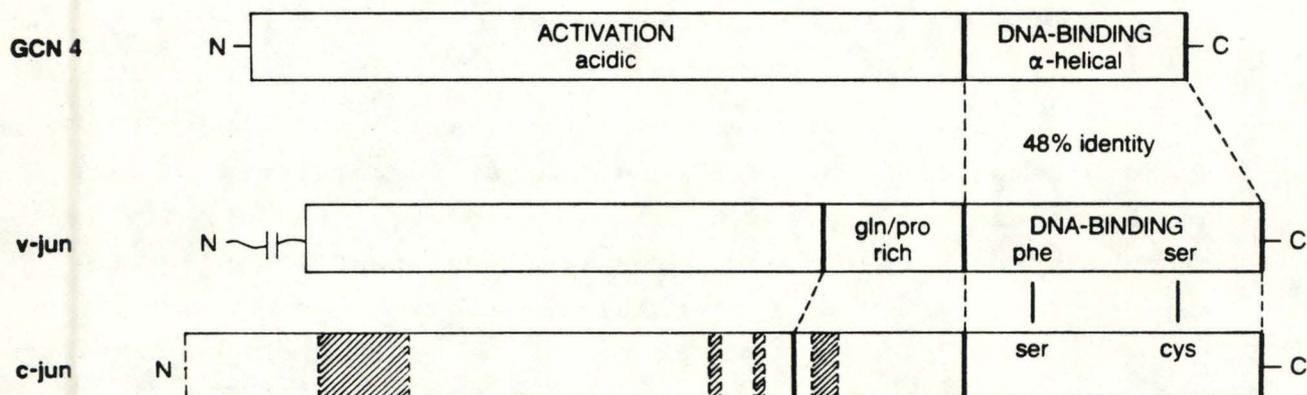


Fig. I 19b. Comparaison des protéines GCN4, v-jun et c-jun.  
 Les rectangles hachurés dans c-jun indiquent les séquences absentes dans v-jun.  
 Les substitutions d'acides aminés dans le domaine de liaison à l'ADN de v-jun sont indiquées.

De plus, une protéine hybride *GCN-vJUN* où le domaine de liaison à l'ADN de *GCN4* a été remplacé par la région correspondante de *vJUN* rempli la fonction régulatrice de *GCN4* chez la levure (Struhl, 1987).

On soupçonne le produit du protooncogène *c-jun* de correspondre à un facteur de transcription noté, par ailleurs AP-1 car AP-1 et *GCN4* reconnaissent des séquences enhancer similaires. AP-1 se lie à un élément enhancer présent dans des gènes induits par des esters de phorbol comme le TPA. Le produit du protooncogène *c-jun* et AP-1 se lie à ce enhancer avec la même affinité.

Le TPA active la protéine kinase C qui phosphoryle alors AP-1. Cette phosphorylation d'AP-1 modifierait son affinité pour la séquence enhancer ou son interaction avec des facteurs de transcription ou avec l'ARN polymérase II. Or, des oncoprotéines de la membrane cellulaire activent la protéine kinase C: cet événement à la surface cellulaire serait lié via la phosphorylation d'un régulateur transcriptionnel à une modification de l'expression génétique.

Si le produit *c-jun* est AP-1, il participe à la croissance cellulaire normale. Le produit de *v-jun*, de structure légèrement différente, stimulerait ou inhiberait l'expression de gènes normalement sous le contrôle du produit de *c-jun* (Pawson, 1987). (voir Fig. I 19b)

Rappelons qu'un autre facteur transcriptionnel structurellement aberrant, *erbA*, pourrait avoir des capacités oncogènes.

Ajoutons encore qu'au sein de l'organisation des protéines régulatrices de transcription apparaît une homologie supplémentaire: *MAT $\alpha$ 1* et *MAT $\alpha$ 2* fonctionneraient comme hétérodimère, *GCN4* se lierait à l'ADN sous forme de dimère ( *cité dans Hope et Struhl, 1986*), *PHO2* ainsi que *GAL4* produiraient chacun

deux protéines qui pourraient s'associer en une structure multimerique (Berben *et al.*, 1988), les protéines natives FOS et MYC formeraient des dimères ou des tétramères.

A ce propos, nous avons déjà évoqué le modèle d'interaction combinatoire entre protéines régulatrices sur l'ADN proposé par Miller en 1985.

Cela suggère une liaison coopérative entre les molécules activatrices. Les expériences déjà citées où une synergie entre activateurs est observée appuient cette hypothèse. Une liaison coopérative de l'activateur *GAL4* à l'ADN est également observée quand deux sites de reconnaissance pour *GAL4* ont été insérés dans la région promotrice (Giniger et Ptashne, 1988).

Les similitudes entre des régulateurs de transcription d'oiseaux, mammifères ou levure suggèrent l'existence d'un régulateur transcriptionnel ancestral commun.

Nous avons vu que l'activité d'un régulateur est maintenue lorsqu'il est introduit dans une cellule d'une espèce autre que celle dont il provient.

Or, les facteurs régulateurs fonctionnent en interaction avec les composants de l'appareil transcriptionnel, indiquant qu'au cours de l'évolution des eucaryotes, ces interactions se sont conservées.

#### Conservation de l'appareil transcriptionnel.

La structure primaire de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II est très conservée de la levure jusqu'à l'homme (Allison *et al.*, 1985).

Comme l'activateur *GAL4* et le récepteur à oestrogènes (facteur enhancer inductible humain) sont capables d'activer un promoteur minimal constitué d'un élément TATA dans des cellules humaines HeLa et dans la levure, respectivement, la recherche

de similitudes entre eucaryotes supérieurs et inférieurs s'est également orientée vers le facteur de liaison à l'élément TATA.

Ainsi a-t-on récemment découvert que *S. cerevisiae* contenait une protéine fonctionnellement similaire au facteur de liaison à l'élément TATA de mammifère, TFIID (Buratowski *et al.*, 1988). Cette protéine se substitue au facteur TFIID dans un système de transcription *in vitro* dépendant de l'ARN polymérase II de mammifère. Elle forme un complexe stable de préinitiation avec un promoteur viral et se lie spécifiquement aux éléments TATA d'un promoteur viral et d'un promoteur de levure.

La constatation que le supposé facteur TFIID de levure induise l'initiation par l'ARN polymérase II de mammifère, plaide en faveur d'une conservation des mécanismes d'initiation de la transcription au sein des eucaryotes. En effet, le facteur TFIID agit non seulement en reconnaissant l'élément TATA du promoteur mais probablement aussi en interagissant avec le complexe de l'ARN polymérase II et peut-être avec d'autres facteurs transcriptionnels généraux. De plus, il semble que des protéines régulatrices se liant à un site spécifique en amont influencent la transcription en interagissant avec TFIID.

Des études préliminaires indiqueraient que le supposé facteur TFIID de levure pourrait interagir avec des facteurs transcriptionnels et avec des facteurs régulateurs de mammifères (*cité dans* Buratowski *et al.*, 1988).

Toutefois, les facteurs TFIID de levure et de mammifère différeraient notamment par des propriétés physio-chimiques. (charge, poids moléculaire).

Bien que la distance séparant l'élément TATA du site +1 soit significativement supérieure chez la levure par rapport aux cellules de mammifère, le facteur TFIID de levure, curieusement, induit l'initiation au site +1 caractéristique du système de mammifère. Ceci indique que le facteur de liaison à l'élément TATA (TFIID) ne déterminerait apparemment pas la distance entre l'élément TATA et le site d'initiation.

Aussi, un autre composant de la machinerie de transcription (un facteur de transcription ou l'ARN polymérase elle-même) déterminerait cette distance (Buratowski *et al.*, 1988).

Quoi qu'il en soit, certains constituants de l'appareil transcriptionnel de base seraient relativement conservés au sein des eucaryotes.

Chacun des arguments évoqués au cours de ces quelques pages suggère une conservation des mécanismes régulant l'initiation de la transcription des eucaryotes inférieurs jusqu'à l'homme.

Suite à cette conservation, des facteurs transcriptionnels homologues de différents organismes sont fonctionnellement interchangeables. Ainsi, non seulement les systèmes régulateurs de levure constituent un bon modèle d'étude de la régulation chez les eucaryotes mais la levure peut de plus être utilisée dans l'étude d'activateurs de cellules normales d'eucaryotes supérieurs ou dans l'élucidation des mécanismes d'action d'oncogènes. On voit ici toute la puissance de l'outil de travail qu'est la levure dans l'étude des mécanismes d'initiation et de régulation de la transcription chez les eucaryotes.

L'eucaryote qu'est *Saccharomyces cerevisiae* offre l'avantage de pouvoir être facilement utilisé dans des manipulations impliquant des techniques classiques ou des techniques de biologie moléculaire.

En outre, son existence à l'état haploïde permet l'isolement de mutations récessives (voir Fig.III 2.) De plus, les connaissances génétiques, notamment concernant la régulation de la transcription, sont très poussées chez *S. cerevisiae*.

La conservation des interactions moléculaires dans l'activation de la transcription peut être la conséquence de différents mécanismes évolutifs. Elle peut résulter selon une première hypothèse d'une solution unique à un problème biologique.

Par exemple, la conservation de l'ARN polymérase résulterait de contraintes évolutives exercées sur un complexe enzymatique ayant son activité catalytique.

Dans la seconde éventualité, les interactions entre activateur et appareil transcriptionnel peuvent avoir divergé de celle des ancêtres eucaryotes. Cependant au sein d'un système où de multiples composantes interagissent, des modifications dans une interaction ne doivent pas altérer les autres interactions.

Paluh et ses collaborateurs (1988) observent la grande conservation de séquences entre des activateurs transcriptionnels de gènes intervenant dans des voies de biosynthèse d'acides aminés chez *S. cerevisiae*, et *Neurospora crassa* (*GCN4* et *CPC-1*) et un facteur transcriptionnel de mammifère (*AP-1*). Une explication proposée est que suite à la perte de capacité de synthèse de certains acides aminés chez les mammifères, un activateur transcriptionnel à action spécifique chez la levure remplisse une autre fonction chez ces mammifères.

Chez les eucaryotes, les processus cellulaires de base, comme la réplication de l'ADN, sa transcription, le ciblage des protéines vers les organites subcellulaires, semblent avoir été conservés dans le détail des interactions moléculaires. Une fois mis en place, ces mécanismes seraient restés invariants; les capacités nouvelles apparues par la suite (comme la différenciation cellulaire) résulteraient d'une utilisation plus complexe de ces mécanismes initiaux. L'évolution aurait construit la diversité non seulement autour d'un code génétique, mais aussi autour de processus cellulaires et moléculaires de base communs à toutes les cellules eucaryotes.

## V. BUT DU TRAVAIL.

Ce travail se fait dans le cadre de l'étude du système régulateur des phosphatases chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il porte sur la caractérisation du gène *PHO81* codant pour le médiateur *PHO81* de ce système en vue d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression et la fonction de ce gène.

Lors du mapping chromosomique du gène *PHO81*, une sonde radioactive contenant le gène *PHO81* s'est hybridée à la bande d'ADN correspondant aux chromosomes VII et XV.

Tenant compte de ce résultat et disposant d'une souche mutante pour ce gène, nous tâcherons de le localiser sur son chromosome par rapport à d'autres loci. Nous utiliserons à cette fin la méthode de mapping méiotique par analyse de tétrades.

Nous disposons d'autre part d'un fragment génomique de 7kb contenant le gène *PHO81*, nous en établirons la carte de restriction afin de délimiter un segment réduit possédant toujours ce gène.

Nous devons alors élaborer puis mettre en oeuvre une stratégie destinée à séquencer ce segment.

M A T E R I E L S   E T   M E T H O D E S .I. SOLUTIONS ET TAMPONS.1. SOLUTIONS.Solutions stock d'antibiotiques.

Ampicilline (Boehringer) 25 mg/ml

Tétracycline(Sigma) 12,5 mg/ml

stérilisées par filtration sur millipore 0,22 µm,  
aliquotées et conservées à -20°C.Solution stock d'Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside.  
(IPTG) (Boehringer)

100 mM dans l'eau distillée.

stérilisée par filtration et conservée à -20°C.

Solution stock de 5 Bromo-4 chloro-3 indolyl, β-D galacto-  
pyranoside (Xgal). (Boehringer)

2 % dans du N-N diméthylformamide.

stérélisée par filtration et conservée à -20°C.

Solution M9 (10x).Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 g/lKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 g/l

NaCl 5 g/l

NH<sub>4</sub>Cl 10 g/l

ajuster le pH à 7,4 avec HCl, autoclavage.

Solution de lysozyme.

10 mg/ml

stérilisée par filtration, aliquotée et stockée à -20°C.

Solution d'agarose

0,8 % d'agarose (BRL) dans du TBE.

Solution d'alourdisseur et de colorant.

Sucrose 80 % 2,7 ml

TBE 10 x 0,3 ml

SDS 1 % 1 ml

EDTA 0,5 M 1 ml

bleu de bromophénol 1 mg

Solution de bromure d'éthidium.

2 mg/ml

Solution de phénol-chloroforme.

|                    |        |
|--------------------|--------|
| phénol             | 50 ml  |
| chloroforme        | 50 ml  |
| alcool isoamylique | 2 ml   |
| hydroxyquinoline   | 0,05 g |

saturer avec 100 ml de TE, centrifuger 5' à 5000 RPM (Rotor GSA Sorvall), éliminer le TE et recommencer deux fois (ne pas éliminer le dernier volume de TE).

Solution "TE + LiOAc".

|                    |       |
|--------------------|-------|
| acétate de lithium | 0,1 M |
| TRIS.Cl pH 7,5     | 10 mM |
| EDTA               | 1 mM  |

Solution "TE + LiOAc + PEG".

|              |      |
|--------------|------|
| "TE + LiOAc" | 1 x  |
| PEG 4000     | 40 % |

Solution de Vitamines (10 x).

Pour 1 litre

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Biotine            | 0,0025 g |
| Thiamine           | 1 g      |
| Panthoténate de Ca | 2 g      |
| Pyridoxine         | 1 g      |
| Inositol           | 10 g     |

stériliser par filtration conserver à 4°C.

Solution de traces minérales pour levure (traces métalliques).1. Solutions stocks pour préparer la solution.

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| a. acide borique $H_3BO_3$ | 0,1 % |
| b. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$    | 0,1 % |
| c. KI                      | 0,1 % |
| d. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,1 % |
| e. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$    | 1,4 % |

stériliser par filtration, stocker les solutions à l'abri de la lumière et à t° ambiante.

N.B. refaire les solutions stock tous les cinq mois.

2. Préparation de la solution de traces métalliques prête à l'usage.

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 10 ml de $H_3BO_3$              | 0,1 % |
| 1 ml de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$    | 0,1 % |
| 2 ml de KI                      | 0,1 % |
| 4 ml de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,1 % |
| 1 ml de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$    | 1,4 % |

y ajouter

|                                              |
|----------------------------------------------|
| 10 g d'acide citrique $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ |
| 400 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$                   |
| 5 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$                     |

porter à 100 ml au moyen d'eau distillée, répartir en aliquots (10 x 10 ml)

stérilisation par filtration

conserver à l'abri de la lumière à t° ambiante ou au frigo.

2. TAMPONS.Tampon TE.

à pH8

|         |     |       |
|---------|-----|-------|
| Tris.Cl | pH8 | 10 mM |
| EDTA    | pH8 | 1 mM  |

à pH7,5

|         |       |       |
|---------|-------|-------|
| Tris.Cl | pH7,5 | 10 mM |
| EDTA    | pH7,5 | 1 mM  |

Tampon de ligation 5 x (BRL).

|                   |       |       |
|-------------------|-------|-------|
| Tris.Cl           | pH7,4 | 20 mM |
| MgCl <sub>2</sub> |       | 10 mM |
| DTT               |       | 10 mM |
| ATP               |       | 1 mM  |

Tampon de polymérase.

|                          |        |      |        |
|--------------------------|--------|------|--------|
| Tris                     | pH 7,8 | 1M   | 250 µl |
| MgCl <sub>2</sub>        |        | 1M   | 25 µl  |
| β-mercaptoéthanol        |        | 14 M | 3,8 µl |
| H <sub>2</sub> O stérile |        |      | 220 µl |

Tampon de lyse: TES.

|         |     |       |
|---------|-----|-------|
| Tris.Cl | pH8 | 50 mM |
| EDTA    | pH8 | 50 mM |
| Sucrose |     | 15 %  |

Tampon SSC (20 x)

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| NaCl                    | 3 M   |
| citrate de sodium       | 0,3 M |
| ajuster à pH7 avec HCl. |       |

High salt buffer.

|      |        |       |
|------|--------|-------|
| Tris | pH 7,5 | 20 mM |
| EDTA |        | 1 mM  |
| NaCl |        | 1,5 M |

Tampons de restriction (1 x).

| tampons                |                       | low | medium | high |
|------------------------|-----------------------|-----|--------|------|
| concentrations (mM) en |                       |     |        |      |
| solutions<br>stériles  | ( Tris.Cl pH 7,5      | 10  | 10     | 50   |
|                        | ) NaCl                | 0   | 50     | 100  |
|                        | ( MgCl <sub>2</sub>   | 10  | 10     | 10   |
|                        | ) dithiothréitol(DTT) | 1   | 1      | 1    |

Tampon SmaI (1 x).

|                   |       |
|-------------------|-------|
| KCl               | 20 mM |
| Tris.Cl pH8.0     | 10 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM |
| DTT               | 1 mM  |

Les solutions stock de tampons 10 x concentrés sont préparées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C.

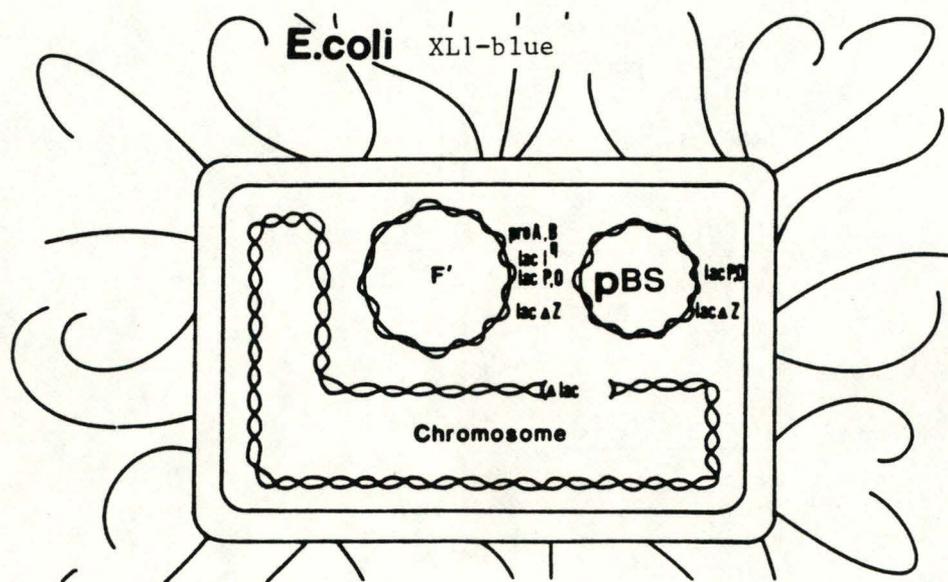


Fig. II 1. Marqueurs présents dans une bactérie de la souche XL1-blue hébergeant un plasmide Bluescript.

## II. SOUCHES ET PLASMIDES.

### 1. SOUCHE BACTERIENNE.

Nous avons utilisé la souche *E. coli* **XL1-blue** (Bullock, 1987), commercialisée par Stratagène; elle contient l'**épisode F'** (voir Fig II.1.); génotype de XL1-blue: **rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), sup E44, rel A1, λ<sup>-</sup>, (lac<sup>-</sup>), {F', proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15, Tnl0(tet<sup>R</sup>)}**.

Expliquons quelques particularités intéressantes de ce **génotype**.

**RecA1**: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre DNA endogène et exogène.

**endA1**: améliore le rendement et la qualité des préparations de DNA plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléase.

La souche XL1-blue **délétée** au niveau de l'**opéron lactose**, est incapable de métaboliser le lactose. (bc<sup>-</sup>)

L'**épisode F'** codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie porte les caractères suivants:

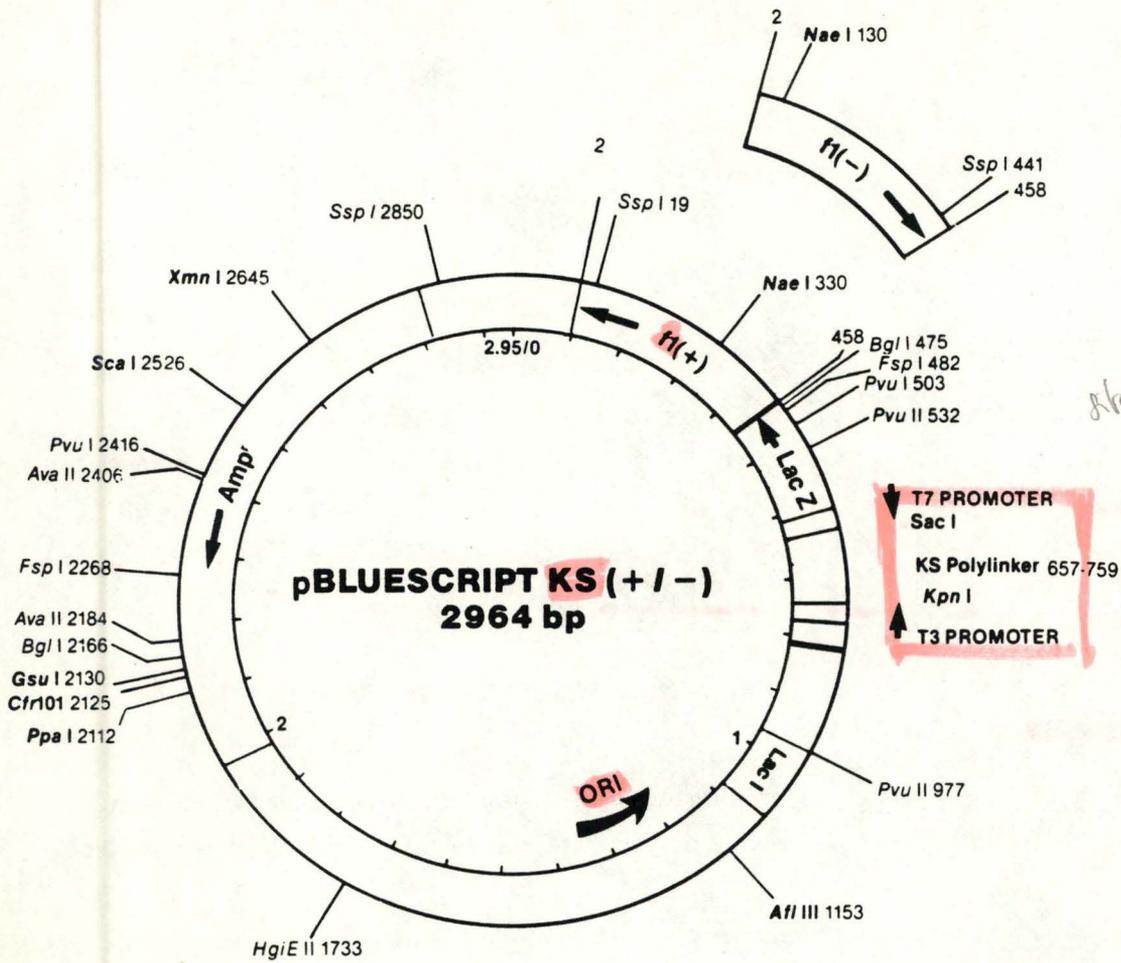
**Tnl0**: contient un **marqueur de résistance à la tétracycline** permettant de sélectionner les bactéries contenant F'.

**lac I<sup>q</sup>ΔM15**: permet la **sélection des colonies à plasmide recombinant par un test coloré bleu-blanc**:

**lac I<sup>q</sup>**: mutation augmentant la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

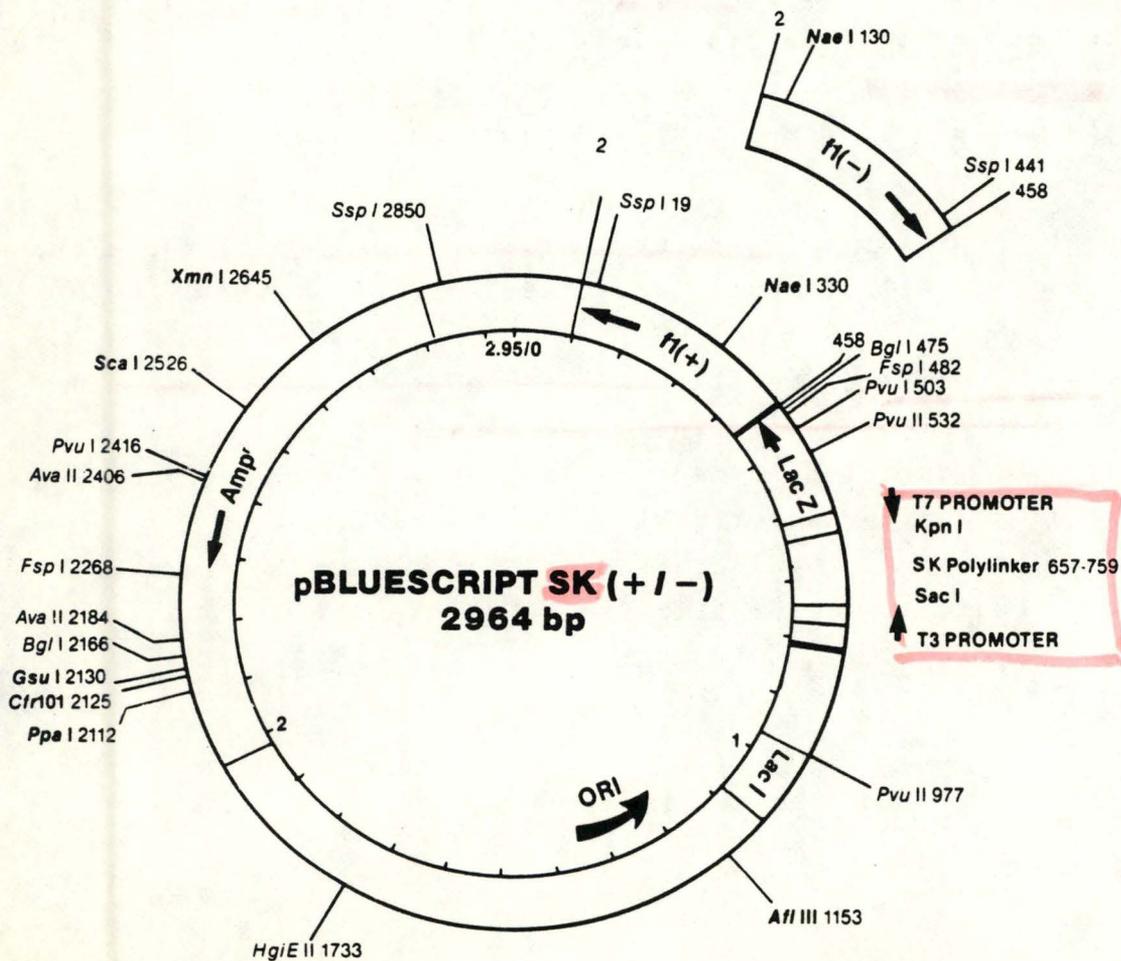
**ΔM15**: gène de βgalactosidase délété de la partie Nterminale produisant une protéine inactive.

(complémentation mitragénique par Bluescript)  
cf p. 41



*the multiple cloning*

Fig. II 2. Plasmide bluescript: forme KS et forme SK



pBSKS+ = GCG: Vecbase: Blue k Sp (2964pb) 40.

(pBS SK+ : Vecbase : Blue k Sp)

## 2. PLASMIDES BACTERIENS.

Le vecteur utilisé en vue du séquençage est le Bluescript KSM13+ commercialisé par Stratagène. (voir Fig. II 2.)

Bluescript est un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 2,964 kilobases. Il porte une origine de répllication pour *E. coli* (col El ORI) et l'origine de répllication phagienne fl. Bluescript peut ainsi se répliquer sous forme d'un plasmide bicaténaire ou d'un phage monocaténaire selon les conditions du milieu.

### Caractéristiques de Bluescript. (BS)

Amp<sup>R</sup>: gène de résistance à l'ampicilline ( $\beta$ lactamase) permettant la sélection des colonies possédant le vecteur.

LacZ: les gènes de structure de l'opéron lactose (lacZ lacY et lacA) assurent le métabolisme du lactose et leur régulation est telle que ces gènes ne s'expriment ni en l'absence de lactose ni en présence de glucose, source de carbone préférentiellement métabolisée (voir Fig. I 3.).

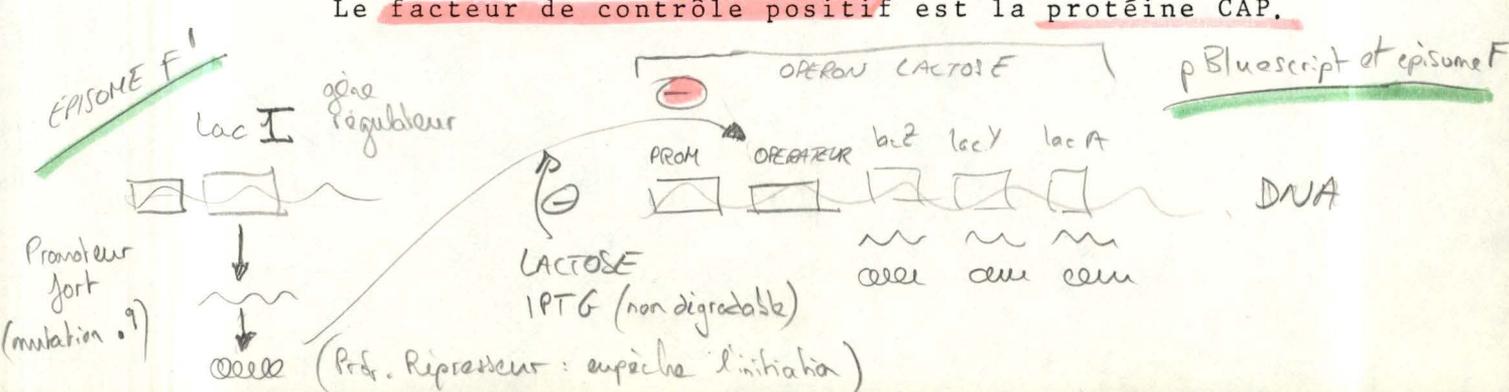
Le contrôle négatif de l'opéron est assuré par une protéine répresseur codée par le gène lacI. En se liant à l'ADN en un site opérateur, ce répresseur empêche l'initiation de la transcription de l'opéron.

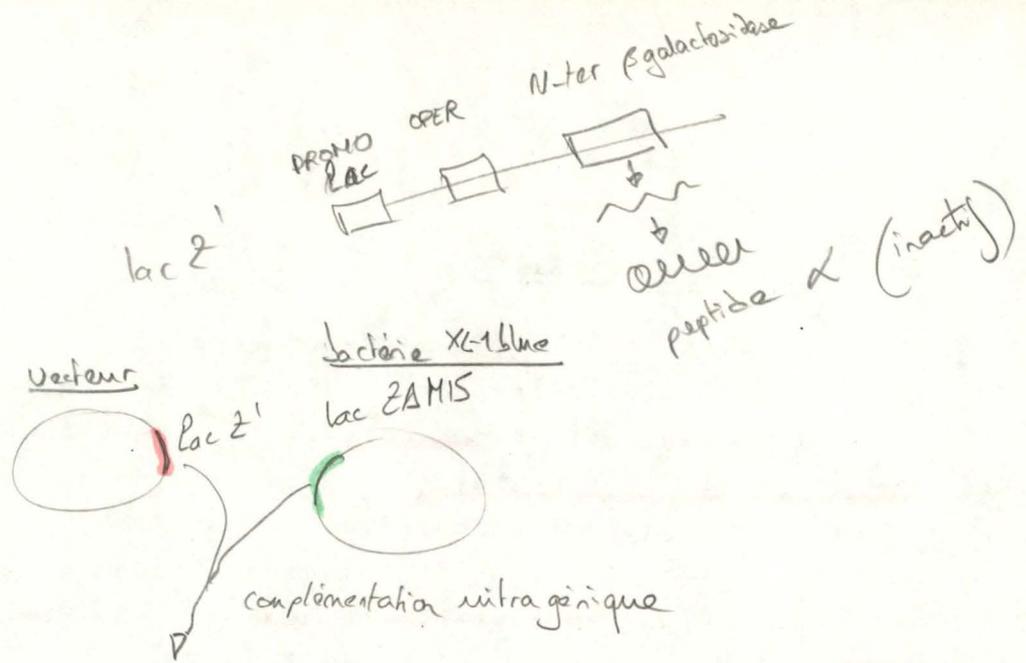
Le gène lacI<sup>q</sup> porté par l'épisome F' de la souche XL1-blue est caractérisé par la force de son promoteur. La synthèse de répresseur est augmentée d'un facteur 10. La répression peut ainsi s'exercer sur les quelques copies de F' présentes dans une bactérie mais également sur les copies plus nombreuses de BS. Cette répression empêche que l'expression des gènes portés par ce vecteur à nombre de copies élevé ne constitue un fardeau mortel pour la bactérie. Cependant en présence d'un inducteur (lactose en conditions naturelles), celui-ci se lie au répresseur formant un complexe non lié à l'opérateur. Cette dérépression permet l'initiation de la transcription au promoteur. Nous utilisons un inducteur non dégradable, l'IPTG.

Le facteur de contrôle positif est la protéine CAP.

Lac: operon  
lac: gène

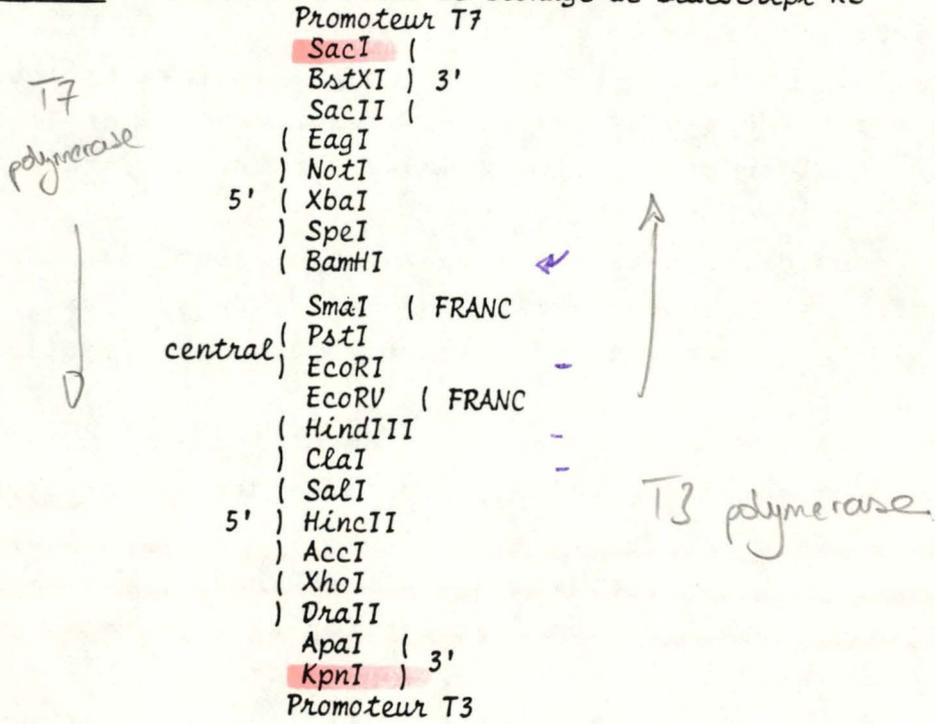
(initiation transcription  
contrôle positif)





β galactosidase  
fonctionnelle.

Fig. II 4. Batterie de sites de clonage de Bluescript KS



En combinant régulation positive et négative par l'utilisation de divers milieux, on module l'initiation de la transcription au promoteur lac et donc la synthèse de la protéine sous sa dépendance.

2 lacI: un fragment non opérationnel du gène régulateur lacI. ( le fragment opérationnel + promoteur soit: épilome F' )

lacZ : contient le promoteur lac, l'opérateur et la partie N-terminale du gène de la  $\beta$ galactosidase. Cette portion de gène code le peptide  $\alpha$ , peptide inactif. Lorsqu'un tel vecteur transforme une bactérie XL-1blue, la complémentation intragénique entre le peptide  $\alpha$  (codé par le vecteur) et le produit du gène lacZ $\Delta$ M15 (porté par F') permet d'obtenir une  $\beta$ galactosidase fonctionnelle. L'activité de la  $\beta$ galactosidase est mise en évidence par un test coloré.

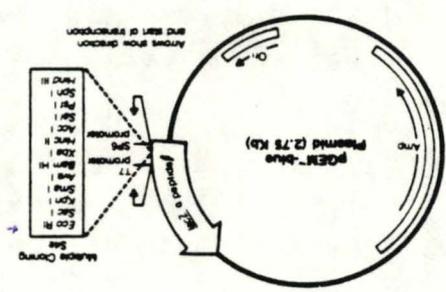
En conditions inductrices, le composé Xgal ajouté au milieu de culture est décomposé par la  $\beta$ galactosidase, donnant naissance à un chromophore colorant les colonies en bleu.

A l'intérieur de l'extrémité N terminale du gène lac Z' a été introduite une batterie de sites de clonage (oligonucléotide synthétique) où sont localisés 21 sites de restriction uniques (voir Fig. II 4.). Cette insertion n'altère pas la capacité de complémentation du peptide  $\alpha$ .

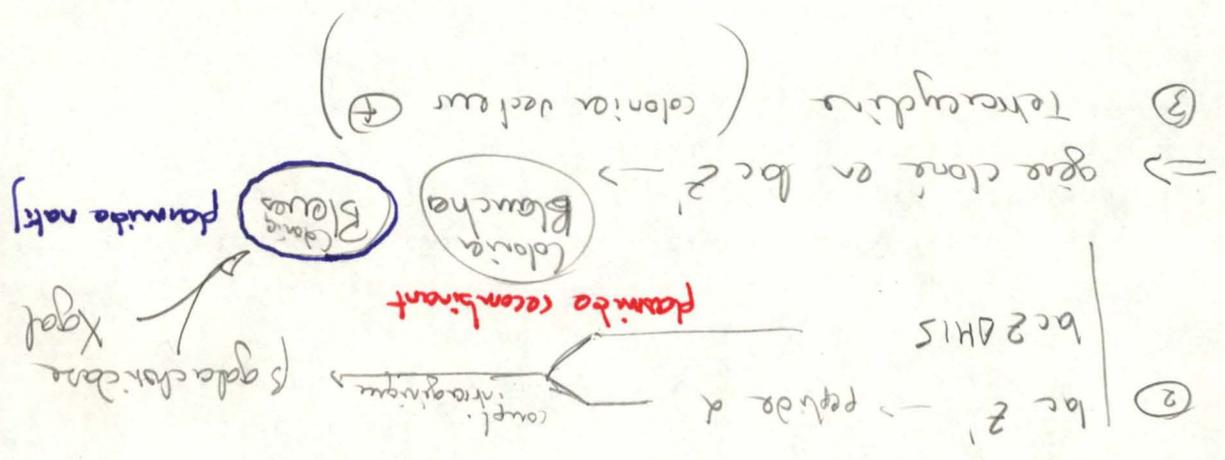
Cependant lors du clonage d'un fragment d'ADN dans un site de restriction de cette batterie (créant un plasmide recombinant), le gène lacZ est disrupté entraînant l'absence de production du peptide  $\alpha$ : la complémentation n'ayant plus lieu, les colonies restent blanches. Le test de coloration permet donc de discriminer les colonies possédant le plasmide natif et celles possédant un plasmide recombinant.

La batterie de sites est orientée de telle sorte que la transcription de lacZ se fait dans le sens *Kpn I* vers *Sac I* (appellation KS). Elle est flanquée des promoteurs phagiens T7 et T3 permettant la transcription de l'insert en ARN par les polymérases spécifiques T7 et T3.

Fig. 11.5. vecteur pGEM-blue.



1) restriction à la tétracycline (episome  $F^+$ )



⇒ gène clone en lac  $Z'$

lactose

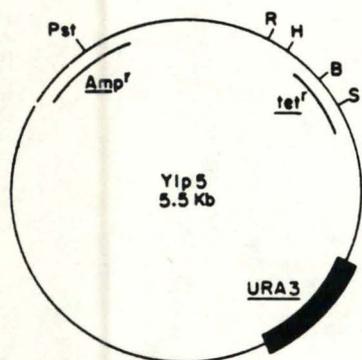
moléculisation

f1 origin: région intergénique (IG) du phage filamenteux F. Grâce à cette séquence, après infection des bactéries par un phage helper, Bluescript peut s'y répliquer sous forme monocaténaire et être exporté comme une particule de phage. Le phage helper assure la présence de protéines responsables de la réplication et de l'exportation.

Bluescript (BS) existe sous deux variantes KS+ ou KS- suivant l'orientation de la région IG de f1. Avec KS+, le brin monocaténaire produit, contient le brin codant du gène de la  $\beta$  galactosidase alors qu'avec KS-, le brin monocaténaire produit contient le brin non codant de ce gène.

- Le vecteur pGEM-blue (fourni par Promega) est utilisé comme témoin de ligation et de transformation (voir Fig. II 5.).

Ce plasmide de 2,75kb porte notamment une origine de réplication pour *E. coli*, un site multiple de clonage dans le gène lacZ'.



B, BamHI; H, HindIII; Pst, PstI; R, EcoRI; S, SalI

Fig. II 6. plasmide YIp5

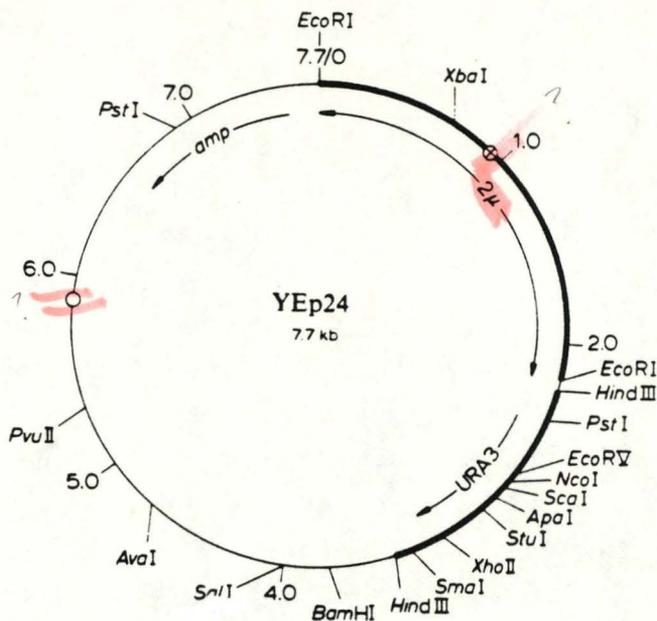


Fig. II 7. plasmide YEp24

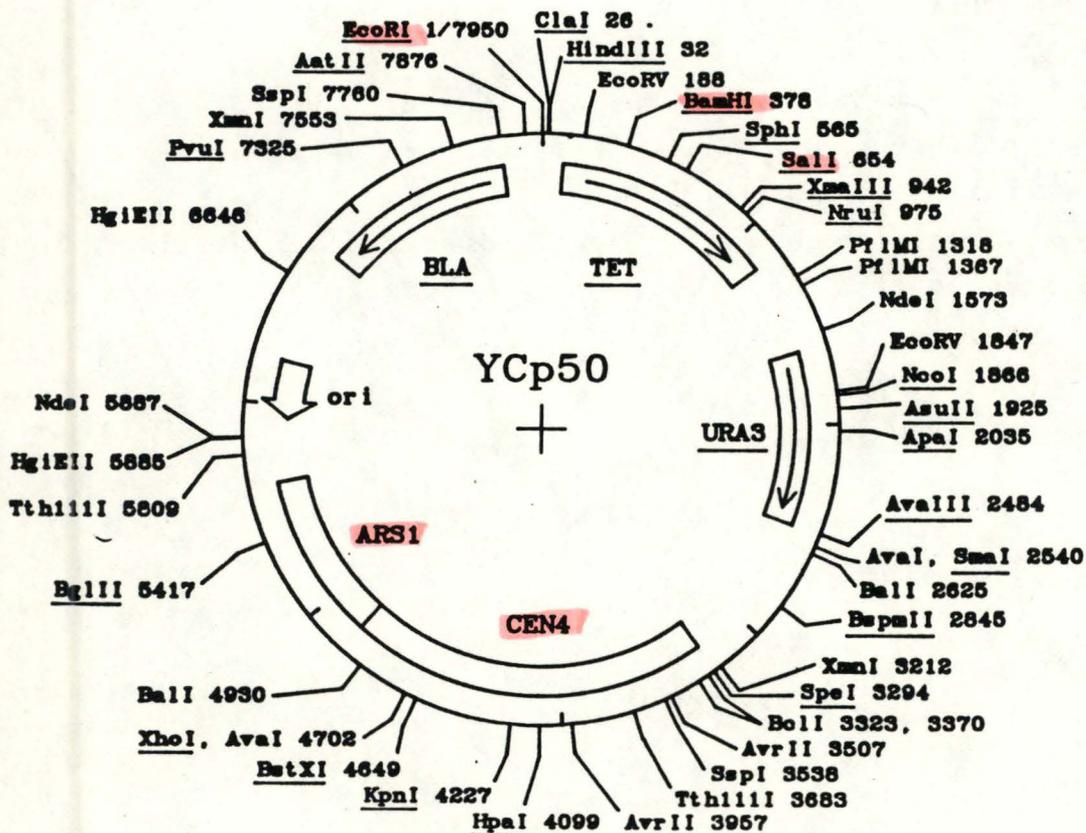


Fig. II 8. plasmide YCp50

3. SOUCHES DE LEVURES SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

|        | <u>Type sexuel</u> | <u>auxotrophies</u>                                                                                          | <u>mutations diverses</u>                                      |
|--------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Le 388 | a                  | <i>met</i> 13<br><i>leu</i> 1<br><i>trp</i> 5<br><i>aro</i> 2<br><i>lys</i> 5                                | <i>cyh</i> 2                                                   |
| Le 282 | α                  | <i>met</i> 13<br><i>trp</i> 5<br><i>aro</i> 2<br><i>lys</i> 5<br><i>ade</i> 5<br><i>arg</i> 81               | <i>gal</i>                                                     |
| Le 1   | a                  | <i>ade</i> 3<br><i>ura</i> 1<br><i>his</i>                                                                   | <i>gal</i> 2                                                   |
| Le 35  | a                  | <i>ade</i> 6<br><i>thr</i> 1<br><i>trp</i> 1<br><i>his</i> 1                                                 | <i>gal</i> 80                                                  |
| Le 358 | a                  | <i>aro</i> 7<br><i>ade</i> 1<br><i>trp</i> 1<br><i>his</i> 2<br><i>arg</i> 4<br><i>his</i> 6<br><i>asp</i> 5 | <i>pet</i> 17<br><i>gal</i> 1<br><i>cdc</i> 14<br><i>rad</i> 2 |
| VD 33d | α                  | <i>ura</i> 3                                                                                                 | <i>pho</i> 81                                                  |
| VD 33c | a                  | <i>ura</i> 3<br><i>trp</i> 1                                                                                 | <i>pho</i> 81                                                  |

4. PLASMIDES UTILISES CHEZ S. CEREVISIAE. (voir Fig. II 6,7,8.)

YIp5: ce plasmide ne peut se maintenir que par intégration dans l'ADN chromosomique homologue (**Yeast Integrating Plasmid**).

Sa fréquence de transformation est faible et les transformants obtenus très stables.

YEp24 (ou pFL1): ce plasmide se maintient grâce à la présence d'un fragment du plasmide 2μ de levure (**Yeast Episomal Plasmid**). Il transforme approximativement 10.000 fois mieux qu'un YIp et son nombre de copies par cellule est élevé (25 à 100).

YCp50: ce plasmide contient une séquence *ARS* et une séquence centromérique fonctionnelle (*CEN*) lui assurant un faible nombre de copies par cellule (1 ou 2) et une stabilité mitotique (**Yeast Centromere Plasmid**).

GCG:

Vecbase: Yep24  
(7769 pb)

\* pBS → E. coli

\* Yep50 { → S. cerevisiae  
→ E. coli (ARS)

vechur navette

Caractéristiques communes.

- marqueur de sélection *URA3* permettant la sélection dans des souches de levure mutantes pour ce gène.
- origine de répllication pour *E. coli* permettant le maintien du plasmide dans *E. coli*.
- gène de résistance à un antibiotique (ampicilline et parfois tétracycline) permettant la sélection dans *E. coli*.
- sites uniques de restriction pour le clonage.

III. MILIEUX DE CULTURE.1. MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS.Milieux riches.

LB liquide:

|               |         |        |
|---------------|---------|--------|
| Tryptone      | (oxoïd) | 10 g/l |
| NaCl          | (Merck) | 5 g/l  |
| Yeast extract | (oxoïd) | 5 g/l  |
| autoclavage   |         |        |

Les cultures liquides de 5 ou 10 ml se font à 37 °C dans des bouteilles universelles agitées ou dans des tubes continuellement oxygénés (barboteurs), permettant une augmentation rapide de la biomasse.

LB solide:

même composition que LB liquide + agar (oxoïd) 16 g/l, ce milieu autoclavé et refroidi à 55 °C est coulé dans des boîtes de pétri (conservées en chambre froide à +6°C après solidification).

- milieu sélectif contenant de l'ampicilline: cet antibiotique étant thermolabile, il sera ajouté au milieu autoclavé, refroidi à 55°C à une concentration finale de 50 µg par ml.
- milieu pour mise en évidence d'une activité βgalactosidasique: au milieu autoclavé refroidi (55°C) on ajoute de l'Xgal et de l'IPTG à une concentration finale de 40 µg/ml et 18 µg/ml, respectivement.

Milieu minimum 0,2 ou 3 % glucose.

A partir des solutions stériles suivantes

|                                           |                     |
|-------------------------------------------|---------------------|
| M9 10 x                                   | 10 % V/V            |
| glucose 20 %                              | 1 % V/V ou 15 % V/V |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 1 M   | 0,1 % V/V           |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 0,1 M | 0,1 % V/V           |
| thiamine HCl 0,1 M                        | 1 % V/V             |
| agar                                      | 16 g/l              |

Tableau II 1.

Composition des milieux synthétiques; pour 400 ml

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Adenine                   | 10,8 mg |
| Uracile                   | 9 mg    |
| L-Arginine HCl            | 12,6 mg |
| L-Aspartic acid           | 39,9 mg |
| L-Histidine HCl           | 8,4 mg  |
| L-Isoleucine              | 7,9 mg  |
| L-Leucine                 | 15,8 mg |
| L-Lysine HCl              | 14,6 mg |
| L-Methionine              | 9 mg    |
| L- $\beta$ -phénylalanine | 19,8 mg |
| L-Tyrosine                | 7,2 mg  |
| L-Valine                  | 25,8 mg |
| L-Tryptophane             | 12,2 mg |
| L-Thréonine               | 31 mg   |

2. MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE POUR LEVURES. CEREVISIAE.Milieu riche YPD.

|                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
| YPD                         | 50 g/l                    |
| agar (oxoïd)<br>autoclavage | 16 g/l (si milieu solide) |

Milieu minimum (MAM) solide.

|                                                                        |          |
|------------------------------------------------------------------------|----------|
| Yeast Nitrogen Base without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Amino ac. | 17,5 g/l |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) <i>Difco</i>                      | 5 g/l    |
| Dextrose                                                               | 20 g/l   |
| agar (oxoïd)                                                           | 16 g/l   |

porter à pH 5,5-6 avec NaOH et autoclaver

Milieux synthétiques:

Constituants du milieu minimum + acide aminé ou base azotée.

Composition: voir tableau II 1.

Milieu synthétique complet:

Milieu minimum enrichi de tous les constituants repris dans le tableau II 1.

## procédure:

- 1) peser le tout
- 2) chauffer le volume adéquat d'eau
- 3) suspendre et porter à pH 5,5 à 6 avec NaOH 10N
- 4) répartir dans les bouteilles
- 5) ajouter l'agar à raison de 16 g/l
- 6) autoclaver
- 7) ajouter éventuellement la thréonine et/ou le tryptophane stérilisés par filtration
- 8) couler en boîte de Pétri.

Milieu 165-30 solide.

## 1. Composition:

Pour 1 l

|                                                                              |         |
|------------------------------------------------------------------------------|---------|
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                                    | 0,7 g   |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                    | 0,4 g   |
| NaCl                                                                         | 0,5 g   |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$                                                      | 1,0 g   |
| acide citrique ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) | 10,5 g  |
| KOH                                                                          | 9,03 g  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                                     | 0,030 g |
| KCl                                                                          | 1,5 g   |

solide: +1,6% agar au milieu final.

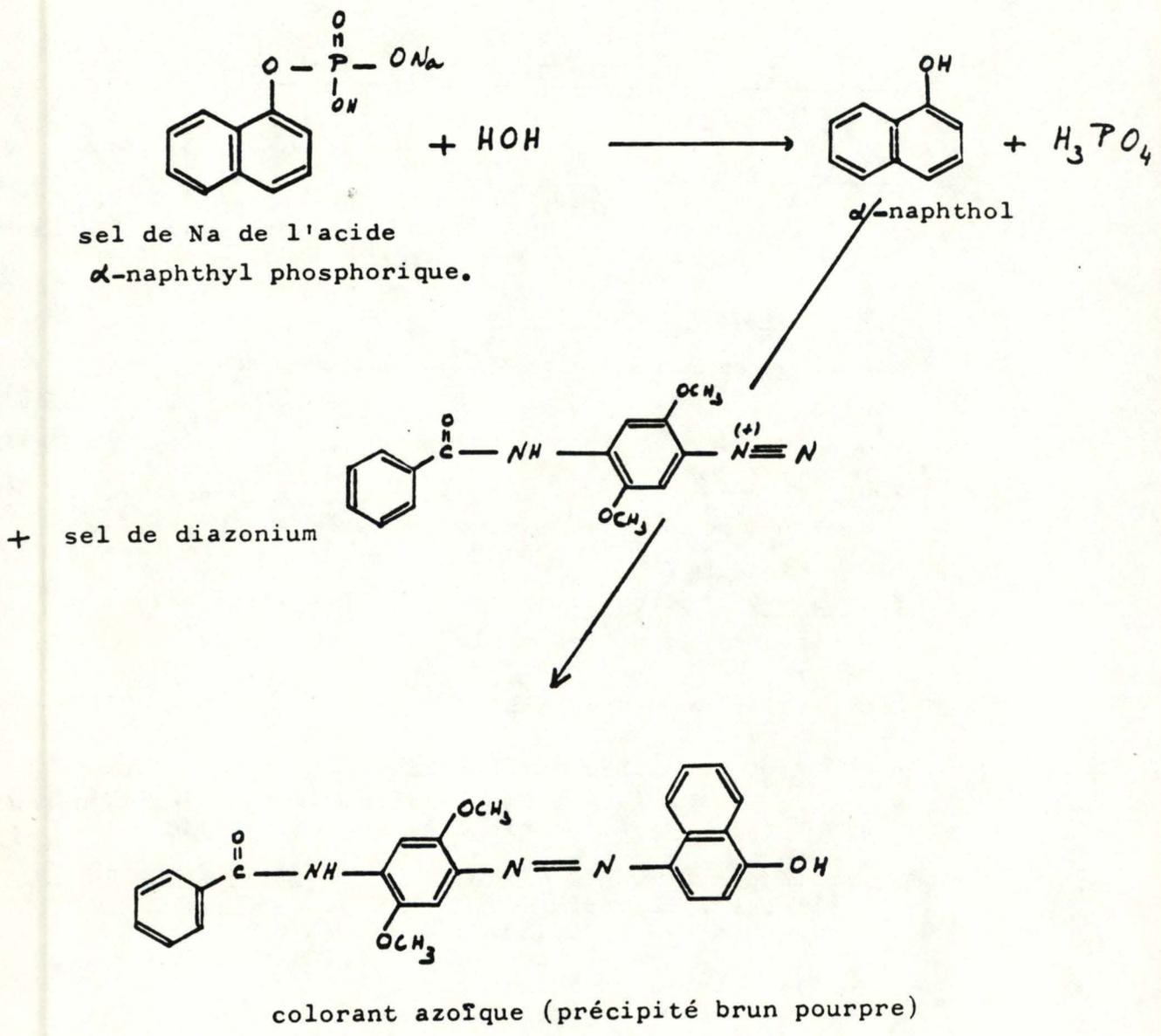


Fig. II 9. Le substrat utilisé est le sel de Na de l' $\alpha$ -naphthyl phosphate. La phosphatase libère par hydrolyse le naphthol qui est capté ensuite par un sel de diazonium (Fast Blue B salt). De ce couplage de 2 substances incolores résulte un colorant azoïque rouge. Un pH acide étant utilisé, la phosphatase acide sera révélée.

ajouts au milieu 165: à ajouter après autoclavage du milieu.

Pour 100 ml de milieu

10 ml de glucose 30 % (stérilisé par autoclavage):  
source de carbone  
7,5 ml d'asparagine 1,5 % (stérilisé par filtration): source d'azote  
0,1 ml de traces métalliques  
1 ml de vitamines 10 x concentrées

Pour tout autre apport voir le tableau II 1. .

## 2. utilisation:

Ce milieu est utilisé pour tester l'activité phosphatase acide des souches en conditions de dérépression. Il est carencé en phosphate inorganique (30 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  par litre).

En condition de carence en phosphate, chez une souche sauvage, la synthèse de phosphatase acide est déréprimée.

Si la souche porte la mutation *pho81*, la dépression n'a pas lieu et on n'observe pas de synthèse de phosphatase acide répressible.

La synthèse de phosphatase acide est mise en évidence après croissance des souches sur ce milieu 165 par un test coloré.

Test de coloration pour détecter l'activité phosphatase acide de souches de levure sur boîte de Pétri (pour deux boîtes).

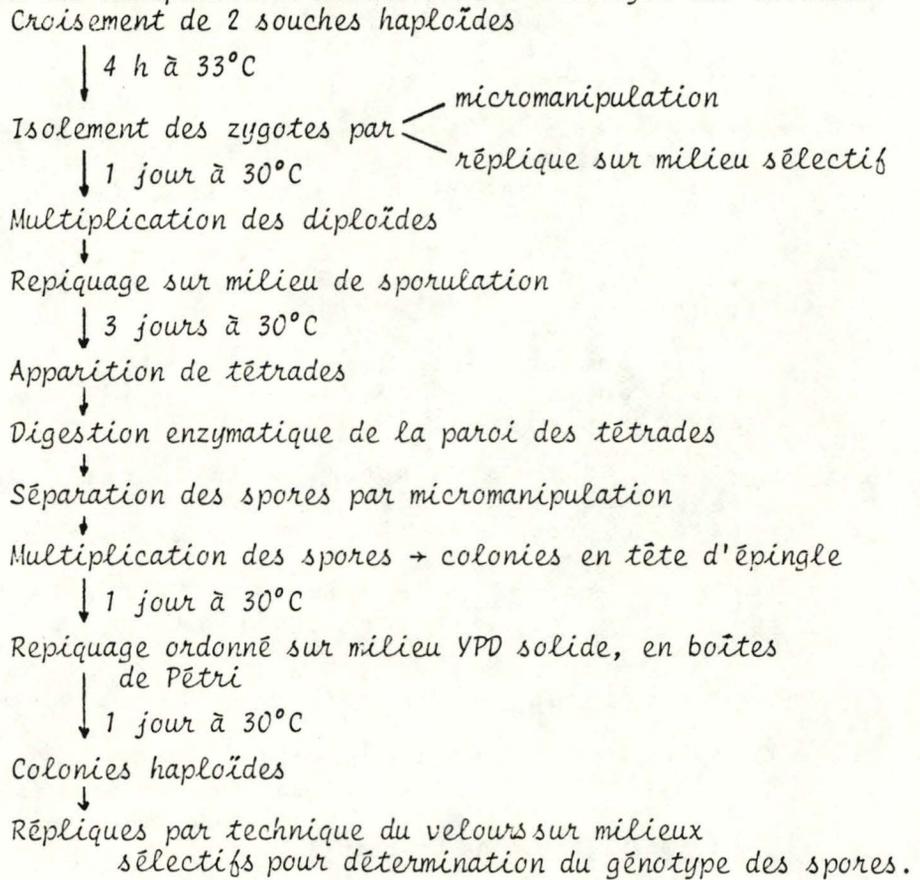
selon la méthode de Toh-e (1973).

1. faire fondre une solution d'agar 1,6 %  
acétate de potassium 0,1 M pH4  
mise en pH avec l'acide acétique  
la maintenir dans un bain à 55 °C.
2. préparer une solution à 200 mg/ml de Fast Blue B Salt  
(O-Dianisidine tetrazotized Zinc chloride complex) (Sigma)  
la maintenir quelques minutes à 55 °C.
3. préparer une solution à 20 mg/ml de 1 Naphtyle phosphate (sel  
de sodium monodrydraté, Merck)  
la maintenir quelques minutes à 55 °C.
4. ajouter dans l'ordre dans un petit tube 2 ml de 1  
1 ml de 2  
1 ml de 3.

agiter et ajouter ce mélange sur les colonies au moyen d'une pipette pasteur.

Les colonies qui restent blanches pendant un certain temps ne possèdent pas l'activité phosphatase acide, celles qui rougissent ont une activité phosphatase acide. (voir Fig. II 9.)

Fig. II 10. Plan des manipulations aboutissant à l'analyse des tétrades.



### Technique de la réplique sur velours

Cette technique de dépôt de cellules sur boîte de Pétri permet un gain considérable de temps, par rapport au repiquage. Le milieu solide (en boîte de Pétri) portant des colonies est amenée au contact d'un velours stérile de sorte que des cellules de chaque colonie s'y déposent. Un contact entre ce velours et un autre milieu solide (coulé en boîte de Pétri) entraîne le dépôt de certaines de ces cellules sur ce milieu. L'ordre des colonies sera identique sur les deux boîtes de Pétri.

## IV. TECHNIQUES IMPLIQUEES DANS L'ANALYSE DE TETRADES.

### 1. Distinguer au microscope une souche haploïde d'une souche diploïde.

- culture de la souche en phase exponentielle. Elle se fait en milieu riche dans une fiole de Wiame à 29 °C dans un agitateur pendant 3 à 4 heures.

- suivre l'évolution de la culture par mesure de l'absorbance (ou DO) au spectrophotomètre à 540 nm toutes les 30'. (suite à l'utilisation d'une fiole Wiame, il faut apporter une correction à la mesure de la DO).

- lorsque la culture a atteint une DO de 0,3 à 0,4, prélever une goutte de culture et l'observer au microscope entre lame et lamelle.

cellules apparaissant en amas: souche haploïde  
en chaînette ou rosette (dans un plan):  
souche diploïde.

### 2. Croisement, isolement de zygotes et sporulation (voir Fig. II 10.).

A partir de cultures fraîches de chaque souche parentale haploïde sur milieu riche solide (YPD): prélever des cellules d'une souche parentale (à l'anse de platine stérilisée), les déposer sur une boîte de milieu YPD solide et les mélanger à des cellules de l'autre souche parentale déposées au même endroit.

Après 4 heures d'incubation à 30°C, des zygotes se sont formés et restent identifiables au microscope (forme d'haltères ) jusqu'à 6 heures après le croisement.

Pour séparer les zygotes des souches parentales, on peut procéder de deux façons.

- les séparer par micromanipulation.

- les isoler par réplique sur velours sur milieu sélectif.

En effet, si les souches parentales portent des auxotrophies différentes, dans le set diploïde du zygote, à chaque gène mutant apporté par un parent correspond l'allèle sauvage apporté par l'autre, de sorte que le zygote soit prototrophe. On pourra donc le sélectionner sur milieu minimum.

laisser se multiplier le zygote une nuit à 30°C.

repiquer les cellules diploïdes issues du zygote sur milieu de sporulation.

Après trois jours des tétrades apparaissent (vérifier en les visualisant au microscope).

### 3. Dissection des tétrades au micromanipulateur (Sherman, 1975).

#### 1) équipement technique.

##### Micromanipulateur.

Le micromanipulateur utilisé possède un seul levier de commande qui contrôle le mouvement de la microaiguille dans les trois dimensions de l'espace. Ce levier traduit les mouvements manuels en mouvements réduits synchrones de la microaiguille. Le mouvement horizontal de la microaiguille est directement relié à un déplacement latéral du levier alors que son mouvement vertical est déterminé en tournant un bouton au sommet du levier. La transmission des mouvements est basée sur des principes pneumatiques.

Le micromanipulateur comporte deux parties reliées par trois tuyaux:

- une unité de contrôle avec un levier actionnant trois pompes à piston.

- un récepteur portant la microaiguille qui est actionnée par la pression pneumatique des pompes.

Ce système ne nous permet de contrôler que les microdéplacements de l'aiguille. Le récepteur est fixé sur un plateau dont la hauteur est réglable. Le déplacement de ce plateau permet les mouvements grossiers de l'aiguille.

Le micromanipulateur n'étant pas attaché au microscope, il est nécessaire de placer les deux appareils sur une plaque réduisant fortement les vibrations.

##### Microscope.

Nous utilisons un microscope à platine mobile et à tube fixe. La platine doit être accompagnée d'une latte graduée permettant de suivre précisément son déplacement horizontal. Des objectifs à grande profondeur de champ sont utilisés.

##### Microaiguille.

Les microaiguilles en verre sont façonnées manuellement en étirant dans la flamme d'un bec bunsen une tige de verre ( $\emptyset$ : 2mm) en une fine pointe.

A partir de celle-ci une pointe plus fine encore est étirée à chaud, à angle droit par une autre tige de verre. L'extrémité est coupée de façon à obtenir une pointe de 10 à 100  $\mu$ m de diamètre.

Plusieurs essais sont nécessaires pour produire une extrémité correcte.

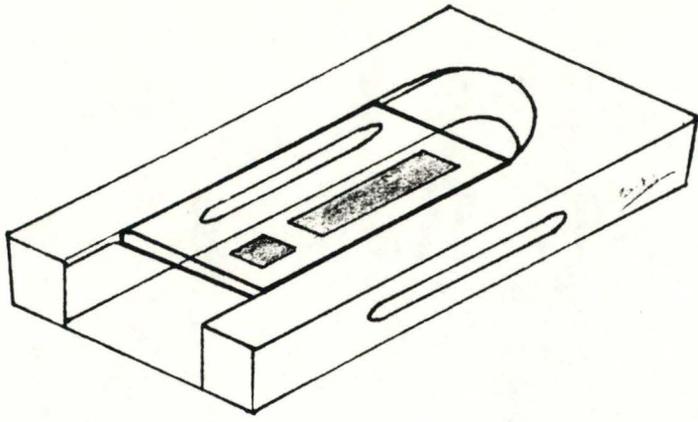
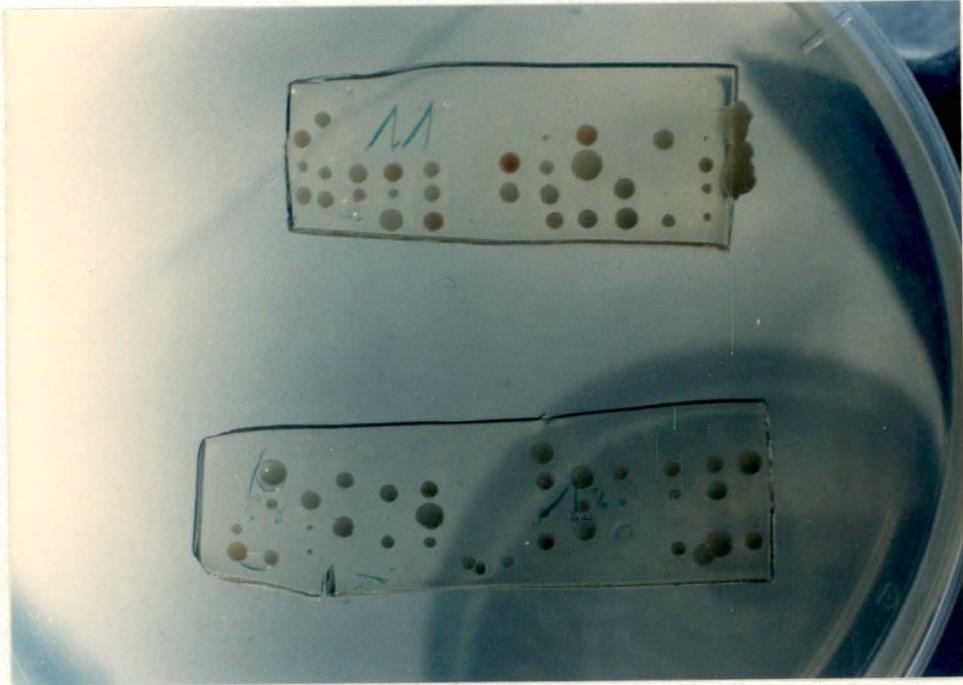


Fig. II 11. Chambre en plexiglas sur laquelle on retourne la lame de verre portant la fine couche de milieu.



d  
c  
b  
spores: a  
tétrades 1 2 3 4...

Photo II: colonies de spores sur couche mince

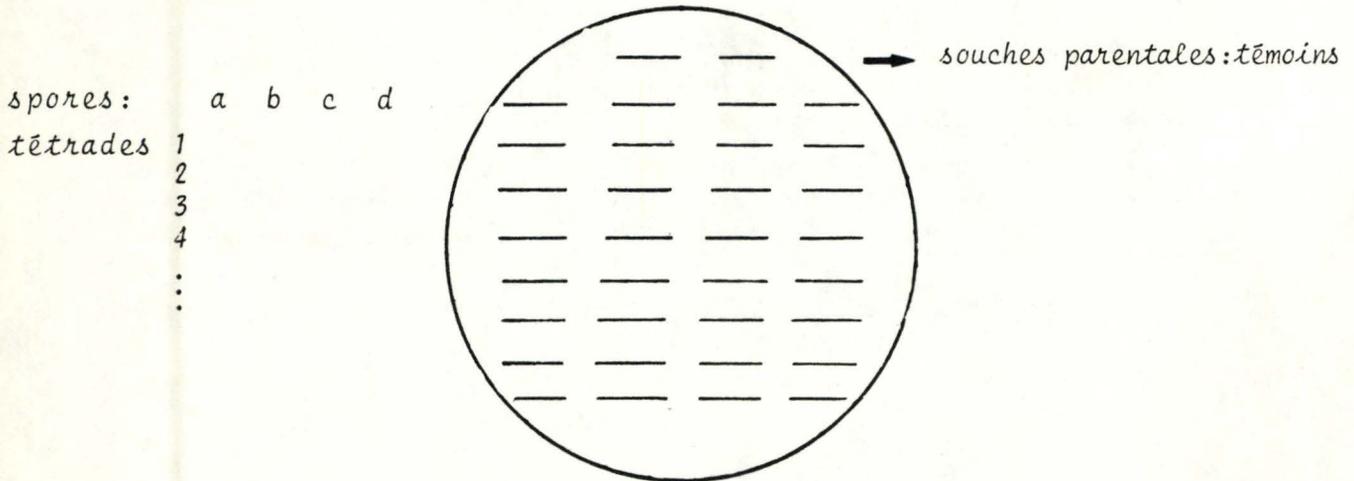


Fig. II 12. Représentation schématique des colonies ordonnées sur milieu riche.

### Chambre:

Les micromanipulations se font sur une fine tranche d'agar montée dans une chambre afin de réduire les possibilités de contamination (voir Fig. II 11.). La tranche d'agar est préparée en coupant une surface rectangulaire dans une couche mince de milieu riche coulé en boîte de Pétri.

Cette tranche d'agar est placée sur une lame de verre. Cette lame est retournée sur le sommet de la chambre. La microaiguille pénètre dans la chambre par l'extrémité ouverte du cadre en U.

### 2) Dissection des asques.

Chaque asque (nommée tétrade) contient quatre spores qui seront séparées.

Digérer la paroi des asques par la  $\beta$ -Glucuronidase (Arylsulfatase) de *Helix pomatia* (Boehringer) sans dissocier les quatre spores d'une asque:

Procéder en suspendant un prélèvement de cette colonie dans 500  $\mu$ l d'eau stérile.

Y ajouter 100  $\mu$ l de glucuronidase diluée 20 fois.

Après 20' de réaction à température ambiante, déposer une goutte de la suspension à l'extrémité de la tranche d'agar. Cette tranche qui est sur la lame de verre est retournée sur la chambre. La chambre est fixée entre les pinces de la platine du microscope et les cellules sont observées. On prélève un groupe de quatre spores à la microaiguille puis chacune de ces spores est déposée plus loin sur l'agar à l'intervalle régulier. On dissèque ainsi une douzaine de tétrades sur la tranche d'agar qui est alors placée sur une boîte de milieu riche (spores orientées vers le haut). Elle est incubée à 30°C jusqu'à ce que chaque spore ait donné naissance à une colonie visible (voir photo II).

Les colonies seront repiquées de façon ordonnée sur milieu riche solide (voir Fig II 12.) et incubées à 30°C.

Après croissance on effectuera des répliques sur velour sur milieux adéquats pour tester le phénotype des spores.

## V. TECHNIQUES D'ADN RECOMBINANT.

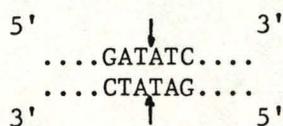
### 1. Réactions de restriction.

Les endonucléases de restriction utilisées sont réparties en deux groupes:

- enzymes hydrolysant les liens phosphodiesters de manière à libérer des fragments à bouts francs ("blunt end") (voir Fig. II 13a).

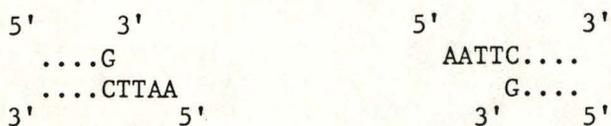
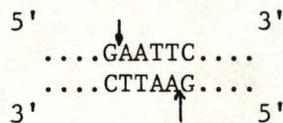
Fig. II 13a. Fragments issus d'une restriction à bouts francs.

exemple: Eco RV



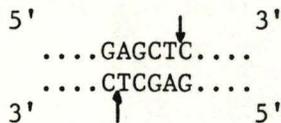
b. restriction libérant des fragments  
- à extrémités protrudantes (cohésives) 5'.

exemple: Eco RI



- à extrémités protrudantes (cohésives) 3'.

exemple: Sac I



- enzymes hydrolysant un lien phosphodiester sur chaque brin mais à quelques nucléotides de distance produisant des fragments à extrémités protrudantes cohésives monocoténares ("bouts collants") (voir Fig. II 13b.) .

Les fragments de restriction se terminent toujours par un groupement phosphate à l'extrémité 5' et par un groupement hydroxyle à l'extrémité 3'.

Les extrémités cohésives complémentaires de molécules différentes peuvent se joindre et former une molécule recombinante.

En fonction du tampon dans lequel l'enzyme est active, elle appartient à l'une des trois catégories suivantes:

- enzyme très active à force ionique élevée: nécessitant un tampon high
- enzyme très active à force ionique moyenne: nécessitant un tampon medium
- enzyme très active à faible force ionique: nécessitant un tampon low.

Les enzymes de restriction sont utilisées dans les tampons et aux températures recommandées par les fabricants.

#### Composition du milieu réactionnel.

ADN à restreindre

tampon de restriction 10 x: 1/10 volume final

enzyme de restriction 3 unités par  $\mu\text{g}$  d'ADN purifié par gradient de CsCl

10 unités par  $\mu\text{g}$  d'ADN moins pur (provenant d'une miniprep)

pas plus de 1/10 du volume final

H<sub>2</sub>O stérile pour atteindre le volume final.

incuber 2 heures à t° adéquate pour l'enzyme.

arrêter la réaction en inactivant l'enzyme par chauffage pendant 15 minutes à 65°C si elle est thermosensible, sinon la dénaturer par extraction au phénol.

## 2. Electrophorèse en gel d'agarose.

### a) électrophorèse analytique.

L'électrophorèse analytique en gel d'agarose est une méthode de séparation et d'évaluation de taille et de quantité des fragments d'ADN.

#### principe:

Des molécules d'ADN placées dans un champ électrique se déplacent à une vitesse déterminée par le rapport entre leur charge et leur masse. Les acides nucléiques en solution, chargés négativement au niveau des groupements phosphate migrent vers l'électrode positive. Mais le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN est identique quelle que soit leur taille.

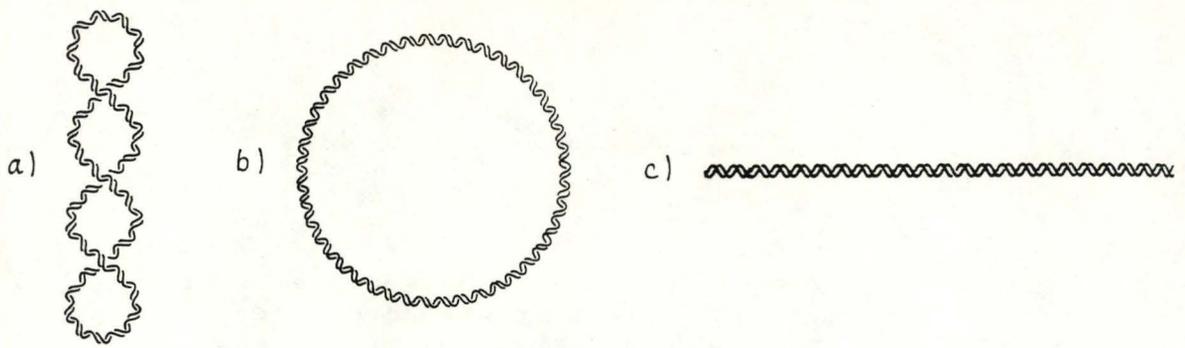


Fig. II 14. L'ADN plasmidique se présente sous trois configurations différentes.

- a) forme ccc (covalently closed circular): forme superenroulée;
- b) forme oc (open circular): un brin est coupé (nick), il n'y a plus de superenroulement;
- c) forme l (linéaire): un deuxième nick s'est produit à proximité du premier mais sur l'autre brin de l'hélice.

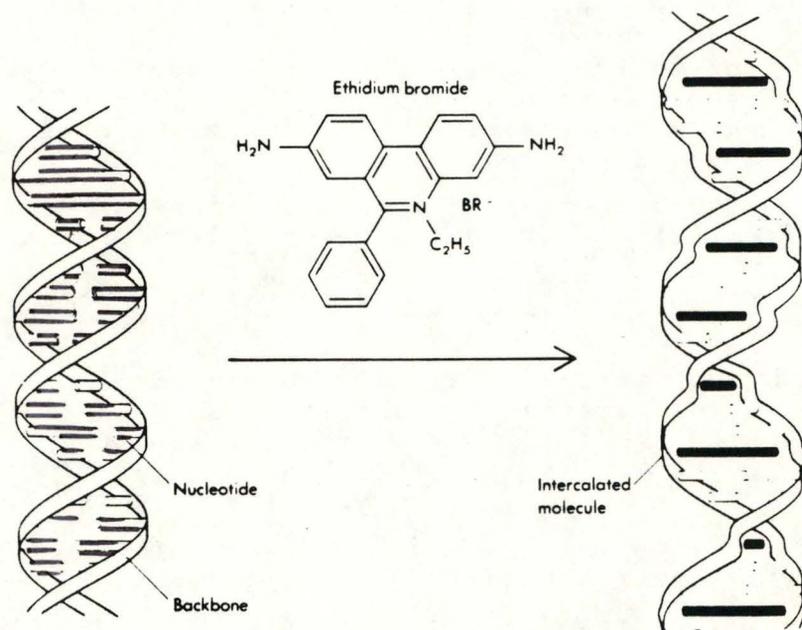


Fig. II 15a. Représentation schématique: les molécules de bromure d'éthidium s'intercalant entre les bases azotées de la double hélice.

$\lambda$  DNA-Hind III/ $\phi$ X-174RF DNA-Hinc II digest

$\lambda$  DNA-Hind III digest

| Séparation électrophorétique | Fragment number | Number of base pairs |
|------------------------------|-----------------|----------------------|
|                              | 1               | 23,13                |
|                              | 2               | 9,416                |
|                              | 3               | 6,557                |
|                              | 4               | 4,361                |
|                              | 5               | 2,322                |
|                              | 6               | 2,027                |
|                              | 7               | 0,564*               |
|                              | 8               | 0,125*               |



\*: rarement ou jamais visible.

| Fragment Number | Number of Base Pairs |
|-----------------|----------------------|
| 1               | 23130                |
| 2               | 9416                 |
| 3               | 6557                 |
| 4               | 4361                 |
| 5               | 2322                 |
| 6               | 2027                 |
| 7               | 1057                 |
| 8               | 770                  |
| 9               | 609                  |
| 10              | 564*                 |
| 11              | 495                  |
| 12              | 392                  |
| 13a             | 345                  |
| 13b             | 341                  |
| 13c             | 335                  |
| 14a             | 297                  |
| 14b             | 291                  |
| 15              | 210*                 |
| 16              | 162*                 |
| 17              | 125*                 |
| 18              | 79*                  |

Fig. II 15b. Fragments des deux marqueurs de taille utilisés.

- On a donc recours à l'électrophorèse en gel séparant les acides nucléiques suivant leur taille; la taille des pores limitant la vitesse de migration:
- La vitesse de migration de l'ADN en gel d'agarose dépend principalement des quatre paramètres suivants:
- la conformation de l'ADN (voir Fig. II 14.).  
Les formes superenroulée ("Covalently closed circular"), circulaire cassée sur un seul brin ("open circular") et linéaire d'une même molécule migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative dépend notamment de la densité des tours de la superhélice de la forme superenroulée. Souvent, cette forme migre plus vite que la forme linéaire. D'autres bandes apparaîtront correspondant aux formes multimériques du plasmide.
  - le poids moléculaire de l'ADN: les molécules linéaires de l'ADN migrent à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.
  - la concentration en agarose du gel.
  - le courant appliqué: à voltage faible, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. Mais, lorsque le voltage s'accroît, l'efficacité de la séparation décroît.

#### Protocole.

L'agarose est chauffé dans le volume approprié de TBE jusqu'à ébullition. Lorsque la solution est refroidie à 50°C, on ajoute le bromure d'éthidium (concentration finale de 0,5 µg/ml).

Après homogénéisation, la solution est coulée sur un support de plexiglas muni d'un peigne responsable de la présence de puits dans le gel durci. La taille des puits est choisie en fonction du volume d'échantillon à déposer. Le gel placé dans un bac à électrophorèse est immergé dans le tampon. Avant de déposer l'échantillon, on y ajoute de la solution bleu de bromophénol + sucrose: le sucrose en augmentant sa densité entraîne l'échantillon au fond du puits; le bleu de bromophénol en migrant à la vitesse de fragments de quelques dizaines de nucléotides sert à contrôler la progression de la migration. La migration s'effectue pendant environ 2 heures sous une différence de potentiel d'environ 80 volts. Après arrêt de l'électrophorèse, on visualise les fragments d'ADN dans le gel sous illumination UV (trans-illuminateur:  $\lambda$ :302 nm) car le bromure d'éthidium qui s'intercale entre les bases des polynucléotides est un composé fluorescent, apparaissant rose sous U.V. (voir Fig. II 15a.).

#### Evaluation de la taille d'un fragment sur gel.

Dans un puits voisin de celui de l'échantillon, on dépose un marqueur de taille. Il s'agit d'ADN coupé par une enzyme de restriction générant des morceaux de taille connue.

Nous avons utilisé 2 marqueurs de taille (voir Fig II 15b.).

- l'ADN du phage  $\lambda$  restreint par Hind III est le plus souvent utilisé.
- le second marqueur permet d'estimer la taille de fragments plus petits. Il s'agit d'un mélange de l'ADN du phage  $\lambda$  coupé par Hind III et d'ADN du phage  $\phi$ X174 restreint par Hinc II.

Grâce au marqueur on établit une courbe d'étalonnage exprimant le logarithme du poids moléculaire en fonction de la distance de migration. Cette courbe permet d'estimer la taille du fragment, en connaissant sa distance de migration.

#### Evaluation de la quantité d'un fragment déposé sur gel.

Les fragments sont d'autant plus fluorescents qu'ils sont grands puisqu'un plus grand nombre de molécules de bromure d'éthidium s'y intercalent.

La fluorescence est également proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Ainsi, nous disposons d'un moyen de quantification de fragments d'ADN.

En effet, par comparaison de la fluorescence du fragment à quantifier à celle des fragments marqueurs de taille, - la quantité déposée de ces fragments étant connue - on évolue la quantité de notre fragment.

#### b) électrophorèse préparative:

Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose selon la méthode de Dretzen et collaborateurs (1981), méthode utilisée afin d'isoler d'un mélange de restriction le fragment nous intéressant pour les étapes suivantes.

L'électrophorèse ayant séparé les fragments en fonction de leur taille, inciser le gel devant et derrière la bande à récupérer.

Introduire un papier DEAE-cellulose dans chaque fente contre le gel et touchant le fond du support en plexiglas. Le DEAE-cellulose Whatman aura auparavant été immergé dans une solution de NaCl 5M pendant 2 h 30, lavé trois fois à l'eau stérile et stocké dans une solution d'EDTA 1 mM à 4°C.

Poursuivre l'électrophorèse: après 10 minutes l'ADN se retrouve sur le papier. Vérifier la fluorescence du papier aux U.V.

Enlever le papier avec une pince, le rincer deux fois à l'eau distillée stérile, le sécher entre papier Whatman et le placer dans un tube eppendorf 1, auquel on ajoute 300 à 400  $\mu$ l d'une solution concentrée en sel (high salt buffer).

Agiter jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Incuber 2 heures à 37 °C; les ions négatifs du sel déplacent l'ADN du DEAE-cellulose. L'ADN se retrouve ainsi en solution.

Eliminer le papier: à l'aide d'une aiguille chauffée, percer un fin trou dans l'eppendorf 1 et le placer dans un eppendorf 2.

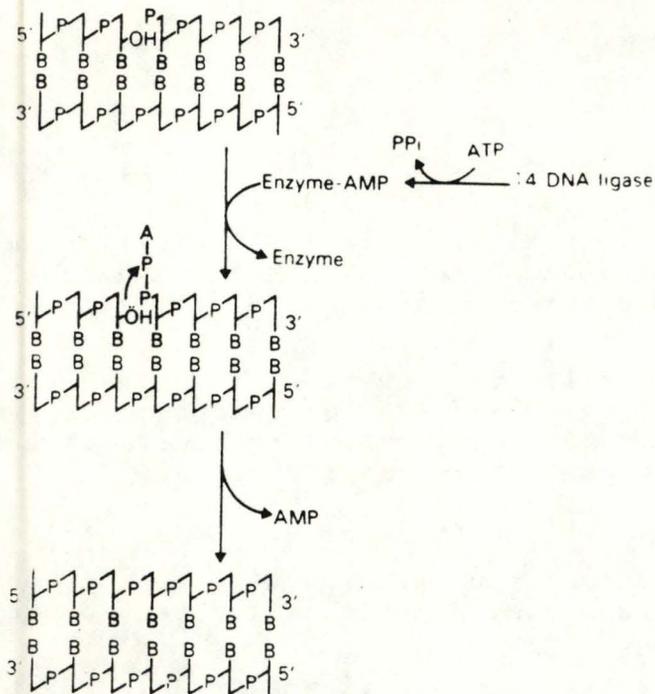
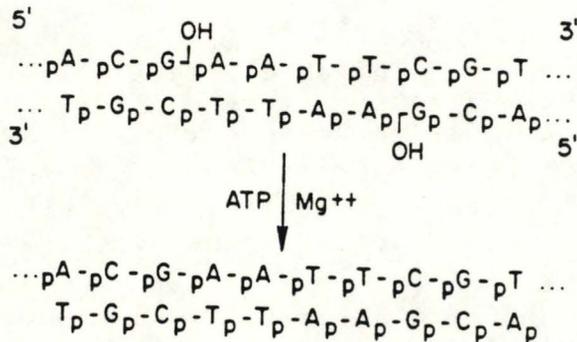
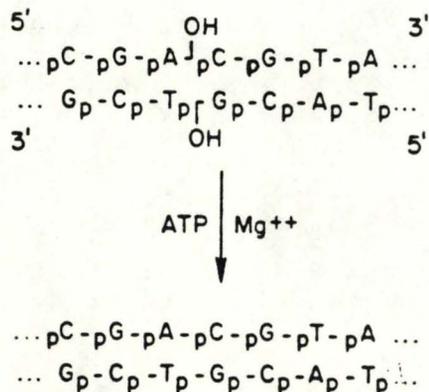


Fig. II 16. Action de la T4 DNA ligase: le complexe ligase-AMP se lie au nick portant les groupements 3'-OH et 5'-P. L'AMP réagit avec le groupement phosphate. L'attaque par le 3'-OH génère un lien phosphodiester reliant les 2 brins.

ligation d'extrémités cohésives (protrudantes): exemple



ligation de bouts francs: exemple



Les maintenir ensemble par du papier adhésif et les centrifuger 5 minutes à 10.000 RPM. (Rotor SS34 SORVALL). Le papier reste dans l'eppendorf 1, la solution est dans eppendorf 2.

Ajouter à cette solution trois volumes de N-butanol saturé d'eau. Centrifuger 5' dans centrifugeuse à eppendorf (12.000 RPM) et enlever le butanol (phase supérieure): cette étape permet d'éliminer le bromure d'éthidium. Précipiter l'ADN à l'éthanol: ajouter deux volumes d'éthanol 100 % froid (-20°C); placer 10' à -80°C.

Centrifuger 30 minutes à 12.000 RPM à 4°C éliminer l'éthanol, laver le culot avec de l'éthanol 70%, sécher sous vide puis resuspendre dans de l'eau ou du TE.

### 3. Réactions de ligation.

Pour unir de manière covalente deux fragments d'ADN étrangers, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T<sub>4</sub>. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche (voir Fig. II 16.).

L'enzyme pour être active nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg<sup>++</sup>.

Deux cas se présentent:

a) ligation entre molécules bicaténares à extrémités cohésives: des ponts hydrogènes entre brins complémentaires se forment, augmentant la probabilité de ligation.

#### Protocole.

Souvent, le volume réactionnel est de 40 µl.

4 x µg d'ADN à insérer (.placés 10 minutes à 65°C pour  
) rompre les ponts hydrogène entre  
x µg de vecteur linéarisé ( extrémités cohésives d'une même  
) molécule  
(.transférés sur glace

ajouter 8 µl de tampon de ligation 5 x (BRL)

1 µl c'est-à-dire une unité de T4 DNA -ligase (BRL).

compléter à 40 µl avec H<sub>2</sub>O stérile.

incuber à 14°C pendant 10 à 14 heures.

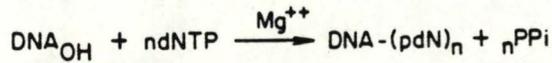
#### Témoins utilisés à chaque ligation.

- un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase: les molécules de ce vecteur restent linéaires et par là-même incapables de transformer. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'expliquent par la présence de vecteur non restreint (non décelable par électrophorèse en gel). Ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants dont sont responsables les vecteurs non restreints.

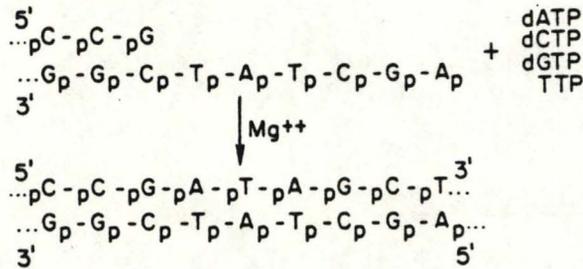
Activité

Réaction

5' → 3'  
Polymerase



For example:



filling de  
l'extrémité 3'-OH

3' → 5'  
Exonuclease

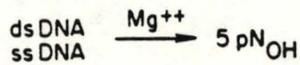


Fig. II 17. Activité du fragment Klenow de l'ADN polymérase I. Cette enzyme a une activité 5' → 3' polymérase et 3' → 5' exonucléase mais l'activité 5' → 3' exonucléase lui manque.

- un vecteur restreint soumis à l'action de la ligase, il permet de vérifier l'efficacité de la ligase.

b) ligation entre molécules bicaténaire à bouts francs. L'efficacité de ligation est moindre car les molécules ne sont pas maintenues par des interactions faibles.

Nous utilisons cette réaction pour joindre à un vecteur linéarisé une séquence bicaténaire longue de 10 nucléotides contenant un site de restriction ("linker"). La présence de ce linker en large excès par rapport au vecteur augmente la probabilité de ligation. De plus, les linkers étant déphosphorylés, ils ne peuvent se lier l'un à l'autre, seule leur ligation au vecteur est permise.

Mélange réactionnel:

1 à 2 µg de linker par µg de vecteur  
 1/5 volume de tampon de ligation 5 x  
 une unité de T<sub>4</sub> - ADN ligase.  
 Incuber à 14°C<sup>4</sup> pendant 10 à 14 heures.

4. Réaction de filling.

Pour passer d'une extrémité cohésive d'ADN (issue d'une restriction enzymatique) à une extrémité à bouts francs, on met à profit l'activité polymérase du fragment Klenow de l'ADN polymérase I. Ce fragment, produit par digestion de l'ADN polymérase I par la trypsine, possède l'activité 5' - 3' polymérase et l'activité 3' - 5' exonucléase; il est dépourvu de l'activité 5' - 3' exonucléase (voir Fig. II 17.).

Protocole.

Le volume réactionnel final est souvent de 40 µl.

x µg de fragment d'ADN restreint

4 µl de tampon de polymérase

2 µl d'une solution 2 mM en

dAPT

dCPT

dTTP

et dGTP

+ 2 unités de Klenow

pour 5 µg d'ADN

incubation d'une heure à 15°C.

5. Purification de l'ADN.

- extraction au phénol-chloroforme d'une solution aqueuse d'ADN pour éliminer les protéines.

La déprotéinisation est plus efficace lorsque deux solvants organiques différents sont utilisés. Bien que le phénol dénature efficacement les protéines et ainsi inactive les enzymes, il n'inhibe pas complètement l'activité RNase. Le problème est résolu par l'utilisation de la solution phénol-chloroforme.

ajouter à un volume d'ADN (amené à 100 ou 200  $\mu$ l) un volume égal de phénol-chloroforme.

mélanger au vortex et centrifuger 5' à 12.000 RPM (centrifugeuse à eppendorfs)

récupérer la phase aqueuse supérieure et répéter l'opération une seconde fois.

- extraction à l'éther pour éliminer les traces de phénol-chloroforme.

ajouter au volume d'ADN deux volumes d'éther saturé d'eau  
mélanger au vortex et centrifuger 1' à 12.000 RPM

éliminer l'éther (phase supérieure)

répéter encore deux fois ces étapes

éliminer les traces d'éther de la solution d'ADN en la chauffant 10' à 65°C.

- précipitation de l'ADN à l'éthanol à basse température en présence de cations monovalents en concentration modérée.

ajouter à la solution d'ADN 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M

ajouter 2 volumes d'éthanol 100 % froid (-20°C) et mélanger

laisser précipiter 15' à -80°C (prolonger si fragments très petits ou peu concentrés).

centrifuger à froid (+6°C) pendant 30' à 12.000 RPM

éliminer le surnageant.

déposer un volume d'éthanol 70 % (pour éliminer les solutés piégés par le précipité)

centrifuger à 3' à 12.000 RPM, éliminer le surnageant et sécher sous vide

resuspendre dans le tampon approprié.

6. Concentration par extraction au butanol.

Au cours de l'extraction de solutions aqueuses au 2-butanol, des molécules d'eau (pas d'ADN ni les solutés) passent dans la phase organique. En répétant deux fois l'extraction, le volume de la solution d'ADN est réduit significativement.

ajouter un volume égal de 2-butanol à l'échantillon d'ADN et mélanger

centrifuger 1' à 12.000 RPM

éliminer la phase supérieure (2-butanol)

répéter l'opération jusqu'à obtention du volume désiré

extraire deux fois l'échantillon avec de l'éther saturé d'eau pour éliminer le 2-butanol.

éliminer l'éther par évaporation à 65°C.

## 7. Transformation bactérienne.

### principe.

méthode basée sur celle de Mandel et Higa.

La transformation consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un microorganisme. A cette fin, la paroi et la membrane bactériennes doivent devenir perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente. *E. coli*, bactérie gram négative, doit être rendue compétente artificiellement par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Celui-ci déstabilise paroi et membrane, la bactérie gonfle alors prenant l'aspect d'un spéroplaste.

Après addition d'ADN, celui-ci forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Lors du choc thermique à 37°C, ce complexe peut entrer dans la cellule.

Un temps d'incubation d'au moins 30 minutes à 37°C en milieu riche permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de commencer à s'exprimer. Les transformants sont isolés par culture sur boîte de milieu sélectif contenant l'antibiotique dont le gène de résistance est apporté par le plasmide.

### Protocole.

#### a) Préparation de cellules XL1-blue compétentes.

Culture de la souche à 37°C sur milieu solide LB + tétracycline 100 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'. A partir d'une de ces colonies, ensemercer un barboteur contenant 10 ml de LB + tétracycline. Incuber cette préculture à 37°C pendant environ 4 heures jusqu'à une absorbance à 550 nm comprise entre 1,5 et 2.

Cette préculture sert à ensemercer 100 ml de LB+tétracycline. Agiter fortement la culture pendant environ 1 heure à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm de 0,3 (phase de croissance logarithmique).

arrêter la culture dans la glace pendant 10'

centrifuger la culture 5' à 4000 RPM à 4°C (Rotor SS34 SORVALL). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl<sub>2</sub> 50 mM équivalent à la moitié du volume initial. Répéter cette étape une seconde fois.

laisser la solution 20' dans la glace puis centrifuger 5' à 4°C à 4000 RPM. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl<sub>2</sub> 50 mM -15% glycérol équivalent au dixième du volume initial.

aliquoter la solution dans les eppendorfs et stocker à -80°C.

b) transformation.

à 50 µl de cellules compétentes ajouter  
 soit de 10 à 100 µg d'ADN suspendu dans H<sub>2</sub>O ou TE  
 soit 10 µl de mixture de ligation  
 incuber 30' sur glace  
 2' de choc thermique à 37°C.  
 ajouter entre 0,5 et 1 ml de LB liquide  
 incuber entre 30' et 60' à 37°C.  
 étaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une  
 nuit à 37°C.

Témoins de transformation:

- transformation avec un vecteur non restreint très effi-  
 cient pour la transformation (pGEM-blue ou Bluescript) afin  
 de vérifier la compétence des cellules.
- cellules compétentes sans ADN subissant les conditions  
 de transformation, étalées en partie,
  - sur milieu riche non sélectif comme contrôle de  
 viabilité des cellules compétentes.
  - sur milieu sélectif montrant la validité de ce  
 milieu et la proportion de mutants spontanés  
 résistants à l'antibiotique.

8. Transformation de levure *Saccharomyces cerevisiae*.

D'après la méthode de Ito (1983) à l'acétate de lithium.

inoculer le soir un volume adéquat d'YPD liquide,  
 incuber cette culture à 30°C de façon à atteindre une  
 densité de 1 à 2. 10<sup>7</sup> cellules par ml (absorbance de  
 1 à 600 nm)

centrifuger 10 ml de culture (par transformation à réa-  
 liser) 10' à 6000 RPM (Rotor SS34 SORVALL)

éliminer rapidement le surnageant (culot fragile).

laver chaque culot avec 10 ml d'H<sub>2</sub>O stérile, les rassem-  
 bler deux à deux et centrifuger 10' à 6000 RPM.

éliminer le surnageant et laver le culot avec 5 ml de  
 "TE+LiOAc"

centrifuger 10' à 6000 RPM.

resuspendre dans un centième du volume de "TE+LiOAc" et  
 incuber une heure à 30°C avec agitation légère.

ajouter 50µg de DNA "carrier" (DNA de thymus de veau soniqué)

ajouter un volume aussi faible que possible de DNA à 0,1ml

de cellules et incuber 30' à 30°C. Ajouter 0,7ml de "TE+LiOAc+PEG"

incuber une heure à 30°C. Choc thermique de 5' à 42°C.

centrifuger 1' à la centrifugeuse à eppendorfs, égoutter

resuspendre les cellules dans 200µl d'eau stérile et étaler  
 sur milieu sélectif.

témoins accompagnant la transformation:

- témoin de compétence des cellules
- témoin de viabilité des cellules compétentes
- détection de révertants sauvages spontanés.

Rebichin

5  $\mu$ l

500 ng.

+ 1  $\mu$ g/10  $\mu$ l

So  $\mu$ g/ml,  $A^{260} = 1$

+ 1  $\mu$ g  
0.

### 9. Extraction rapide d'ADN plasmique de *E. coli* (miniprep)

Selon une communication personnelle de J. Mahillon

inoculer le milieu LB+ampicilline 50 µg/ml avec une colonie de bactéries transformantes.

incuber pendant une nuit à 37 °C en barboteurs (permettant une oxygénation continue) ou en bouteilles universelles agitées

prélever 1 ou 2 ml de culture (selon son avancement) dans un eppendorf et centrifuger 5' à température ambiante à 12.000 RPM.

éliminer le milieu

resuspendre le culot bactérien à la micropipette dans 150 µl de TES. (p. 38)

ajouter 25 µl de lysosyme (p. 36)

homogénéiser par léger vortex. Laisser 15' sur table.

ajouter 400 µl d'H<sub>2</sub>O stérile froide. Laisser 5' sur glace puis 15' à 72°C.

centrifuger 10' ~~dans centrifugeuse à eppendorf~~ puis 5' dans une microfuge (Beckman de table) pour bien tasser le culot au fond du tube. Enlever le culot avec un cure-dents stérile. (Garder surnageant) *Microfuge B (12000 RPM)*

ajouter 70 µl de NaClO<sub>4</sub> 5M (homogénéiser par retournement) et 400 µl d'isopropanol (température ambiante), léger vortex

centrifuger 15' à température ambiante à 12.000 RPM (précipitation de l'ADN plasmique et de l'ARN.) Éliminer l'isopropanol.

déposer 400 µl d'éthanol 90% (pour éliminer les traces d'isopropanol)

centrifuger 3' à 12.000 RPM et éliminer le surnageant.

sécher en tapotant l'eppendorf retourné sur un essuie-tout, puis sécher sous vide pendant quelques minutes.

suspendre dans H<sub>2</sub>O stérile ou TE. (p. 38) *25-50 µl.*

Cette méthode permet de récupérer à partir d'un ml de culture entre 1 et 2 µg de plasmide Bluescript.

### 10. Extraction en grande quantité d'ADN plasmidique de *E. coli* (Maxiprep)

Cette méthode est basée sur celle de Clewell (1972).

- culture de la colonie bactérienne contenant le plasmide dans 10 ml de LB+Ampicilline (en bouteille universelle) quelques heures à 37°C.

à partir de cette préculture ensemencer 250 ml de LB-Ampicilline

incuber avec agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une absorbance de 0,8 à 660 nm.

ajouter éventuellement du chloramphénicol à raison de 200 µg/ml (pour amplifier le plasmide) et incuber avec agitation à 37°C une nuit.

centrifuger la culture 15' à 4°C à 5000 RPM (Rotor GSA SORVALL)

éliminer le milieu de culture (sécher sur essuie-tout)  
dissoudre le culot de cellules dans 200 ml de TRIS.Cl 0,05M pH8 (lavage)

centrifuger 15' à 4°C à 5000 RPM. Eliminer le surnageant et dissoudre le culot dans 1 ml de solution TRIS.Cl, 0,05M pH8 33,3 % saccharose.

placer dans un bain à 37°C

ajouter 1,2 ml de lysozyme (solution fraîche 10 mg/ml de TRIS.Cl 0,05 pH8)

et 2,5 ml EDTA 0,5M pH8

agitation douce à 37°C pendant 15'

ajouter 10 ml de TritonX100 3 %

agiter doucement à 37°C pendant 10'

transférer dans un tube pour rotor type 60Ti (Beckman) et centrifuger pendant 90' ou 60' à 30.000 RPM à 5°C.

Les parois et membranes bactériennes ainsi que les protéines dénaturées culottent.

transférer le surnageant dans un Erlen de 100 ml; ajouter le 1/9 du poids de surnageant de NaCl 5M  
le 1/9 du poids de surnageant de PEG (6000-8000)

faire dissoudre 10' à 37°C en agitant

laisser une nuit à 4°C ou 4 heures sur glace de manière à précipiter les acides nucléiques.

centrifuger 15' à 8000 RPM. Eliminer le surnageant, dissoudre le culot dans 6 ml de SSC 1/10

ajouter 9 g de CsCl et 1 ml de solution de bromure d'éthidium.

en utilisant le réfractomètre ajuster l'indice de réfraction de cette solution à IR=1,392 (cet indice permet une séparation optimale des DNA chromosomique et plasmidique).

Si IR est plus élevé ajouter du SSC 1/10, s'il est trop faible, ajouter duCsCl

faire un blanc 8 g SSC 1/10  
9 g CsCl  
1 ml BrEt 2 mg/ml.

remplir les tubes de cette solution (quick seal pour ultracentrifugeuse)

compléter jusqu'au col avec le blanc et sceller les tubes.

centrifuger 36 heures à 50.000 RPM à 4°C (Rotor type 65 Beckman)

sous ultra-violet, après avoir coupé le col du tube, éliminer à l'aide d'une pipette pasteur la bande supérieure d'ADN.

récupérer la bande inférieure (ADN plasmidique forme ccc) avec une autre pipette pasteur.

N.B. sur la paroi du tube s'est déposée une peau; il s'agit d'un complexe formé par le bromure d'éthidium et les protéines;

extraire deux fois la solution avec de l'alcool isoamylique saturé en CsCl: ajouter un volume d'alcool isoamylique, agiter, 2 phases apparaissent, la phase supérieure rosée est éliminée (alcool isoamylique contenant du bromure d'éthidium).

placer la solution dans des sacs à dialyse et dialyser quelques heures contre du SSC 1/10 à température ambiante.

extraction au phénol-chloroforme:

transférer la solution d'un sac à dialyse dans un tube Greiner ajouter un volume de phénol-chloroforme, mélanger, centrifuger 15' à 8000 RPM (Rotor SM-24 Sorvall)

dialyser 3 fois la phase supérieure contre du SSC 1/10 (en chambre froide)

récupérer la solution et mesurer sa concentration en ADN par mesure d'absorbance de la solution.

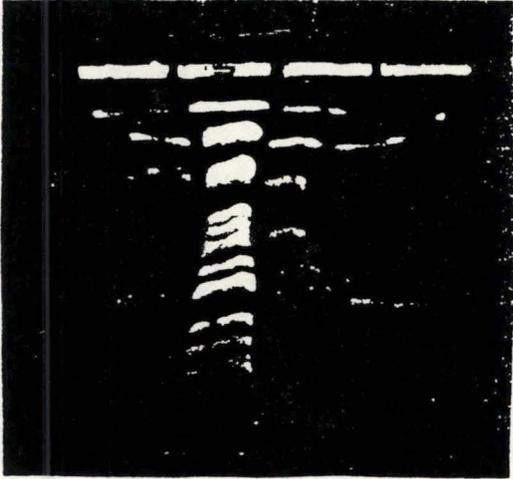
#### 11. Quantification spectrophotométrique de l'ADN.

La mesure de l'absorbance ( $D_{260}$ ) à 260 nm permet de calculer la concentration des acides nucléiques. Une absorbance de 260 nm égale à 1 correspond à 50  $\mu$ g d'ADN bicaténaire par ml.

Le rapport entre les absorbances à 260 nm et à 280 nm donne une estimation de la pureté de l'ADN. Des préparations pures ont un rap-

port  $\frac{D_{260}}{D_{280}}$  de 1,8. S'il y a contamination de la solution par du phénol ou des protéines, ce rapport sera moindre et une quantification exacte de l'ADN ne sera pas possible par cette méthode.

A.



B.

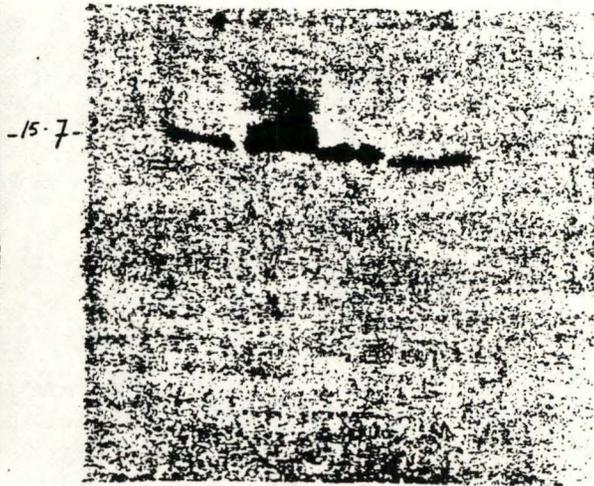


Fig. III 1. A. L'ADN chromosomique de levure est séparé par électrophorèse et visualisé sous U.V. en présence de bromure d'éthidium.  
 B. Autoradiographie du filtre de nitrocellulose hybridé avec la sonde radioactive: la bande correspondant aux chromosomes VII et XV s'allume.

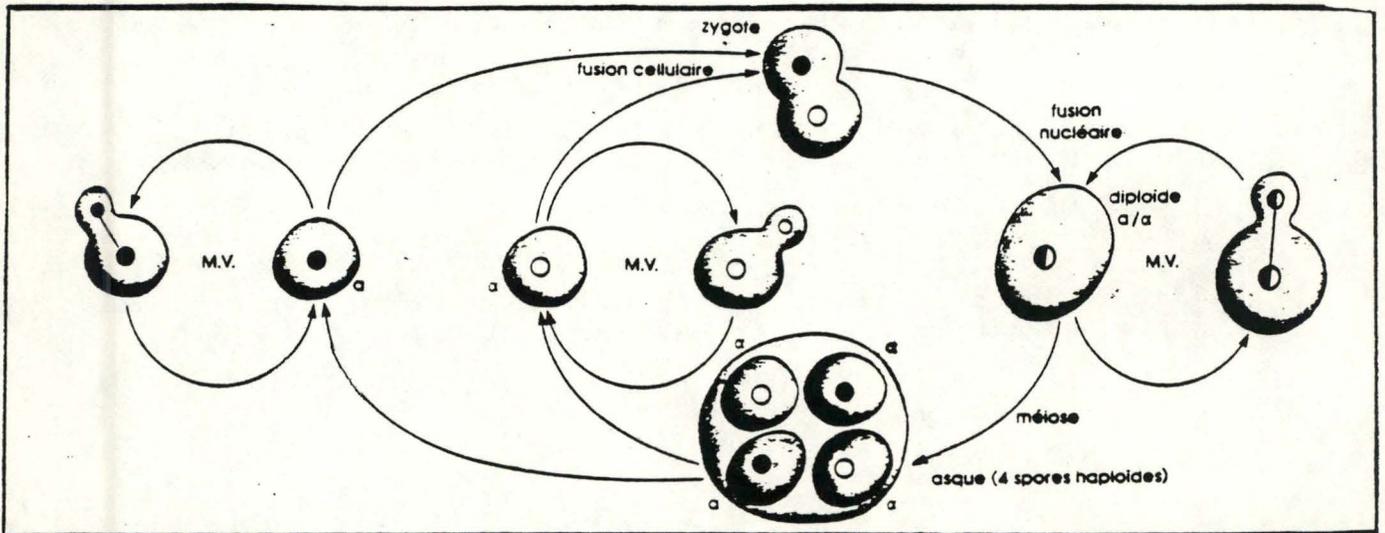


Fig. III 2. Cycle de développement de *Saccharomyces cerevisiae*.

## R E S U L T A T S   E T   D I S C U S S I O N S .

### I. MAPPING GENETIQUE DU GENE *PHO81*.

#### 1. Localisation chromosomique du gène *PHO81* (Vandehaute *et al.*, 1988).

Les chromosomes d'une souche sauvage de levure (VB -20A) sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose selon la technique de Carle et Olson (1984). Ils sont transférés sur un filtre de nitrocellulose et ce filtre est mis en contact dans des conditions d'hybridation entre brins d'ADN complémentaires avec un fragment d'ADN marqué radioactivement contenant le gène *PHO81*, selon la méthode de Southern (1978). Ce fragment s'hybride à la bande d'ADN chromosomique correspondant aux chromosomes VII et XV (l'électrophorèse n'ayant pas permis de les séparer). (voir Fig.III 1.).

Le gène *PHO81* est donc localisé sur le chromosome XV ou sur le chromosome VII. (Vandehaute *et al.*, 1988).

Nous avons recours à des techniques de génétique classique pour déterminer lequel de ces deux chromosomes porte le gène *PHO81* ainsi que pour localiser ce gène sur le chromosome.

#### 2. Mapping méiotique du gène *PHO81* par analyse de tétrades.

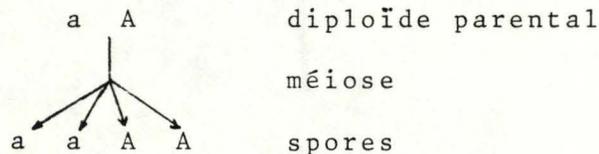
##### Principe.

Le cycle vital de *S. cerevisiae* est une alternance entre phase diploïde et phase haploïde (voir Fig. III 2.). Des cellules haploïdes de deux types existent: a et  $\alpha$ . Le croisement entre une cellule a et une cellule  $\alpha$  conduit à un diploïde hétérozygote a/ $\alpha$  (zygote) incapable de croisement mais pouvant se multiplier par mitose ou entrer en méiose sur milieu déficient en azote.

L'asque appelé tétrade, entouré d'une paroi résistante, contient les quatre spores haploïdes résultant de la méiose de la cellule diploïde. Après digestion enzymatique de la paroi de l'asque, les spores sont séparées par micromanipulation et chacune donne naissance à une colonie. Ces colonies haploïdes représentent les quatre produits d'une méiose.

Expliquons en quoi consiste l'analyse de tétrades et comment elle nous permettra de cartographier le gène *PHO81* sur son chromosome.

- Au cours d'une méiose, les deux allèles de chaque gène nucléaire (par exemple A,a) se séparent dans la descendance selon une ségrégation 2:2.

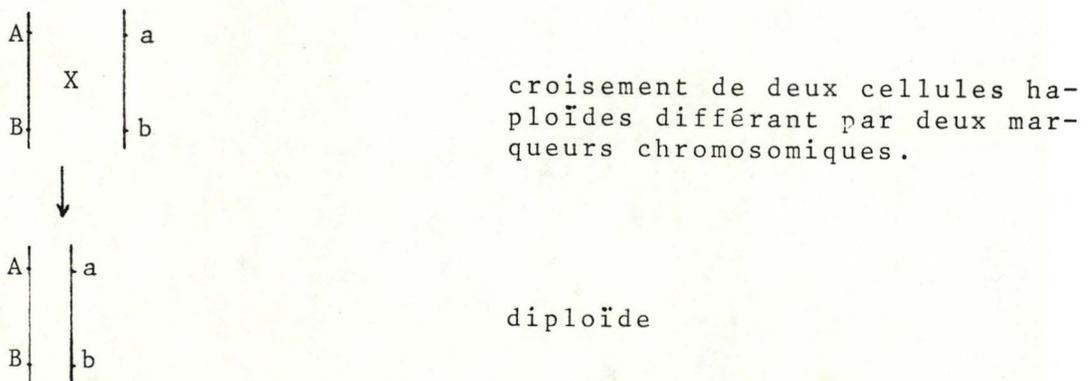


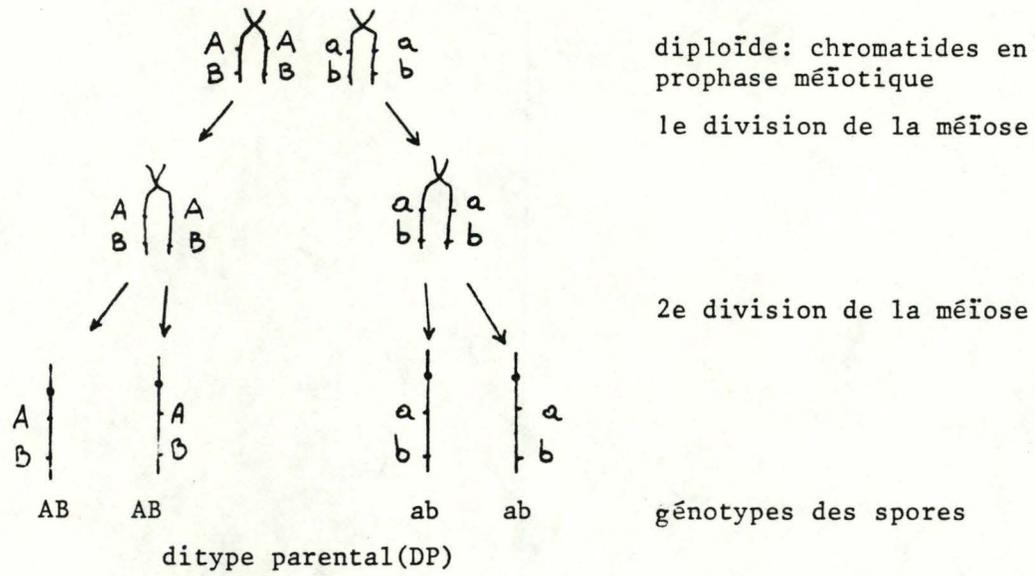
- Si le diploïde est hétérozygote pour deux marqueurs (Aa et Bb), il peut produire trois classes de tétrades: ditype parental (DP), ditype non parental (DNP) et tétratypé (T).

| Classes des tétrades | Génotype des spores |    |    |    |
|----------------------|---------------------|----|----|----|
| DP                   | AB                  | AB | ab | ab |
| T                    | AB                  | Ab | aB | ab |
| DNP                  | Ab                  | Ab | aB | aB |

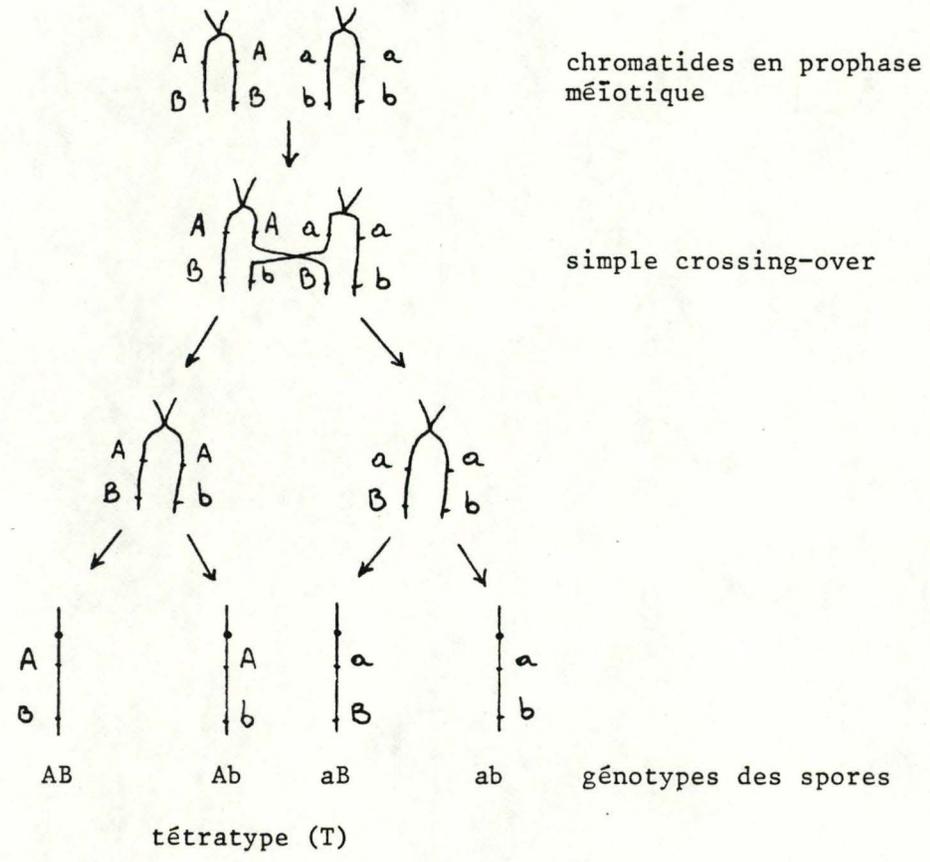
Si les gènes A et B sont localisés sur le même chromosome, chacun ségrégeant 2:2, différents modes de répartition de leurs allèles se présentent au cours de la méiose:

- S'il n'y a pas de crossing-over entre les deux marqueurs, l'asque obtenu est un ditype parental:





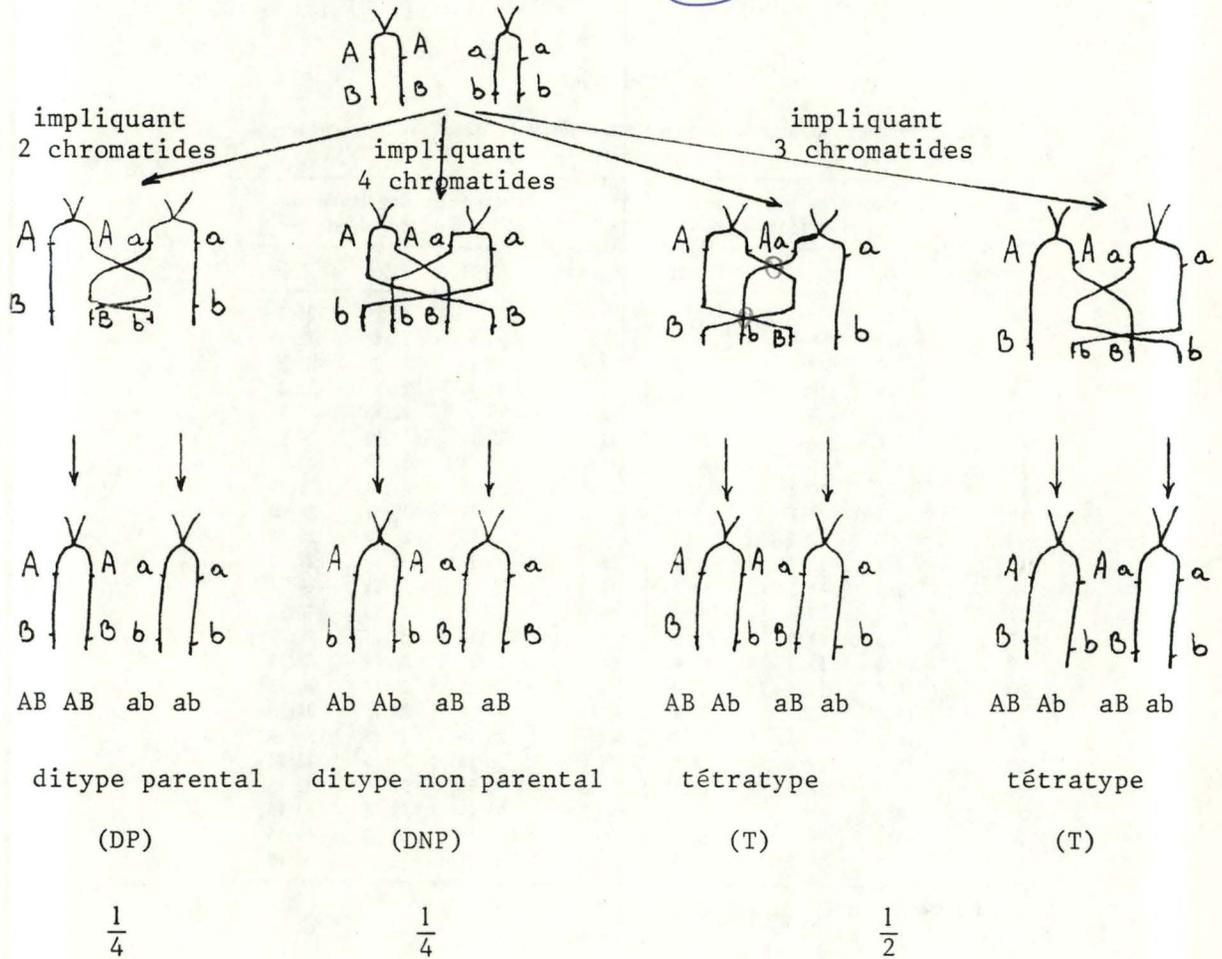
- Un crossing-over entre 2 chromatides homologues dans l'intervalle séparant les 2 loci conduit à une asque tétratype.



Si 1 exco on aura  $\frac{1}{4}$   $\frac{1}{4}$   $\frac{1}{2}$   
mais le prob. d'un exco dépend de d.

90 ds 2xco dans les classes  
et non 90 ds 7 classes!

- des crossing-over supplémentaires dans l'intervalle entre les deux marqueurs conduisent aux trois types d'asques - ditype parental, ditype non parental et tétratype - (dans les proportions 1/4, 1/4, 1/2, dans le cas d'un double crossing-over).



N.B. On postule que les crossing-over ont lieu entre chromatides homologues et non entre chromatides soeurs.

tableau III 1. Rapports DP/DNP significativement

supérieurs à 1 ( $p=0,05; 0,025; 0,01$ ) en fonction du nombre DP+DNP.

SMALLEST NUMERICAL RATIOS SHOWING SIGNIFICANT DEVIATION IN ONE DIRECTION FROM 1:1<sup>a</sup>

| Total number | Ratio attaining significance level (one-sided) |      |      | Total Number | Ratio attaining significance level (one-sided) |       |       |
|--------------|------------------------------------------------|------|------|--------------|------------------------------------------------|-------|-------|
|              | 5%                                             | 2½%  | 1%   |              | 5%                                             | 2½%   | 1%    |
| 5            | 5:0                                            | —    | —    | 28           | 19:9                                           | 20:8  | 21:7  |
| 6            | 6:0                                            | 6:0  | —    | 29           | 20:9                                           | 21:8  | 22:7  |
| 7            | 7:0                                            | 7:0  | 7:0  | 30           | 20:10                                          | 21:9  | 22:8  |
| 8            | 7:1                                            | 8:0  | 8:0  | 31           | 21:10                                          | 22:9  | 23:8  |
| 9            | 8:1                                            | 8:1  | 9:0  | 32           | 22:10                                          | 22:10 | 23:9  |
| 10           | 9:1                                            | 9:1  | 10:0 | 33           | 22:11                                          | 23:10 | 24:9  |
| 11           | 9:2                                            | 10:1 | 10:1 | 34           | 23:11                                          | 24:10 | 25:9  |
| 12           | 10:2                                           | 10:2 | 11:1 | 35           | 23:12                                          | 24:11 | 25:10 |
| 13           | 10:3                                           | 11:2 | 12:1 | 36           | 24:12                                          | 25:11 | 26:10 |
| 14           | 11:3                                           | 12:2 | 12:2 | 37           | 24:13                                          | 25:12 | 26:11 |
| 15           | 12:3                                           | 12:3 | 13:2 | 38           | 25:13                                          | 26:12 | 27:11 |
| 16           | 12:4                                           | 13:3 | 14:2 | 39           | 26:13                                          | 27:12 | 28:11 |
| 17           | 13:4                                           | 13:4 | 14:3 | 40           | 26:14                                          | 27:13 | 28:12 |
| 18           | 13:5                                           | 14:4 | 15:3 | 41           | 27:14                                          | 28:13 | 29:12 |
| 19           | 14:5                                           | 15:4 | 15:4 | 42           | 27:15                                          | 28:14 | 29:13 |
| 20           | 15:5                                           | 15:5 | 16:4 | 43           | 28:15                                          | 29:14 | 30:13 |
| 21           | 15:6                                           | 16:5 | 17:4 | 44           | 28:16                                          | 29:15 | 31:13 |
| 22           | 16:6                                           | 17:5 | 17:5 | 45           | 29:16                                          | 30:15 | 31:14 |
| 23           | 16:7                                           | 17:6 | 18:5 | 46           | 30:16                                          | 31:15 | 32:14 |
| 24           | 17:7                                           | 18:6 | 19:5 | 47           | 30:17                                          | 31:16 | 32:15 |
| 25           | 18:7                                           | 18:7 | 19:6 | 48           | 31:17                                          | 32:16 | 33:15 |
| 26           | 18:8                                           | 19:7 | 20:6 | 49           | 31:18                                          | 32:17 | 34:15 |
| 27           | 19:8                                           | 20:7 | 20:7 | 50           | 32:18                                          | 33:17 | 34:16 |

<sup>a</sup>From Perkins (1952).

La fréquence de crossing-over entre les deux marqueurs et donc les proportions relatives des trois types d'asques, dépendent de la distance qui sépare les marqueurs. 264

Si les gènes sont liés (proches sur les chromosomes), la fréquence de crossing-over est faible et le rapport  $\frac{DP}{DNP}$  est supérieur à 1.

Le tableau établi par Perkins en 1952 permet de déterminer si le rapport  $\frac{DP}{DNP}$  est significativement supérieur à 1. (voir tableau III 1.). La distance  $x$  sur la carte génétique entre 2 marqueurs est définie comme le nombre moyen de crossing-over par chromatide multiplié par 100. Cette définition est formulée par l'équation:

$$x = 100 \cdot \frac{1}{2} \cdot \sum_{r=0}^{\infty} r \cdot p(r)$$

où  $r$  est le nombre de crossing-over entre les deux marqueurs  
 $p(r)$  est la probabilité que  $r$  crossing-over aient lieu  
 $1/2$  est justifié par le fait qu'un crossing-over n'implique deux des quatre chromatides.

$x$ : distance séparant les deux marqueurs, exprimée en centiMorgans (cM).

Pour calculer la distance séparant deux marqueurs, des équations sont nécessaires décrivant la distance  $x$  en fonction du nombre de tétrades DNP, DP ou T.

S'il y a au maximum un échange entre les deux marqueurs, aucun DNP n'est observé et le nombre de tétratypés correspond au nombre de crossing-over.

La distance séparant les deux marqueurs est alors calculée par l'équation:

$$x = \frac{100}{2} \cdot \frac{T}{\text{nombre total de tétrades}} = \frac{100}{2} \cdot \frac{T}{DP+T}$$

Perkins, quant à lui, propose une équation, pour laquelle il considère que si  $r > 2$ ,  $p(r) = 0$ , c'est-à-dire que seul 0,1 ou 2 crossing-overs peuvent avoir lieu dans l'intervalle entre les marqueurs.

Voici l'équation:

$$x = \frac{100}{2} \left( \frac{T + 6 \text{ DNP}}{DP + DNP + T} \right)$$

En effet, la classe des DNP représente 1/4 des doubles crossing-overs, (voir schéma précédent) en première approximation le nombre de doubles crossing-overs = 4DNP.

De plus, on peut approximer que

- le nombre de tétrades, sans crossing-over correspond au nombre de DP dont on a soustrait les DP résultant d'un double échange:  $DP - DNP$
- le nombre de simple crossing-over équivaut au nombre de T dont on a retiré les T résultant d'un double échange:  $T - 2DNP$ .

Ainsi,  $T - 2 \text{ DNP} + 2(4DNP)$  ou encore  $T + 6 \text{ DNP}$  est le nombre de crossing-over ayant eu lieu.

L'équation n'est valable que lorsque les marqueurs ne sont séparés que de 35 à 40cm. Utiliser cette équation pour de plus grandes distances conduit à une sous-estimation de la distance réelle parce que les crossing-over triples et d'ordre supérieur ne peuvent plus être négligés.

Pour le mapping méiotique du gène *PH081*, nous croiserons les souches mutantes *pho81* avec plusieurs souches portant une ou plusieurs mutations (auxotrophie par exemple) localisées sur le chromosome VII pour commencer.

*Can dsh Co*

NOTE: Les mutations sont les marqueurs évoqués précédemment. Les proportions relatives des trois types d'asques obtenus après sporulation du diploïde nous indiqueront si le gène *PHO81* est lié à ces marqueurs et dans ce cas nous permettront d'évaluer la distance séparant les marqueurs du locus *PHO81*.

#### Démarches préliminaires.

Nous serons amenée à effectuer des croisements de souche mutante *pho81* avec des souches de type a et d'autres de type  $\alpha$ .

Nous devons donc disposer, pour pouvoir réaliser ces croisements, d'au moins une souche mutante *pho81*  $\alpha$  et une autre souche mutante *pho81* a.

Nous connaissons le signe de la souche VD33d:  $\alpha$ .

D'autres souches portant la mutation *pho81* mais de signe indéterminé sont à notre disposition, nous en établissons le signe en testant la capacité de croisement de chacune d'elles avec une souche a, ainsi qu'avec une souche  $\alpha$ . Si le croisement avec la souche  $\alpha$  se réalise (formation de zygote qu'on reconnaît au microscope), la souche testée est de signe a et réciproquement.

Nous obtenons les résultats suivants:

|         |              |             |              |            |
|---------|--------------|-------------|--------------|------------|
| VD 33 c | <i>pho81</i> | <u>ura3</u> | <u>trp 1</u> | : a        |
| VD 35 b | <i>pho81</i> | <u>ura3</u> |              | : a        |
| VD 34 b | <i>pho81</i> | <u>ura3</u> |              | : $\alpha$ |
| VD 37 a | <i>pho81</i> | <u>ura3</u> |              | : a        |
| VD 38 a | <i>pho81</i> | <u>ura3</u> |              | : $\alpha$ |
| VD 41 c | <i>pho81</i> | <u>ura3</u> |              | : a        |

Dans les croisements que nous avons effectués, nous avons utilisé VD 33d ou VD 33c comme souche porteuse de la mutation *pho81*.

Avant tout croisement, nous vérifions également que les souches parentales sont haploïdes. En effet, si l'une d'elles est diploïde ou si les deux le sont, l'analyse de tétrades est totalement faussée.

Les souches Lel, Le35, Le282, Le358, Le388 sont aimablement mises à notre disposition par le professeur François Hilger.

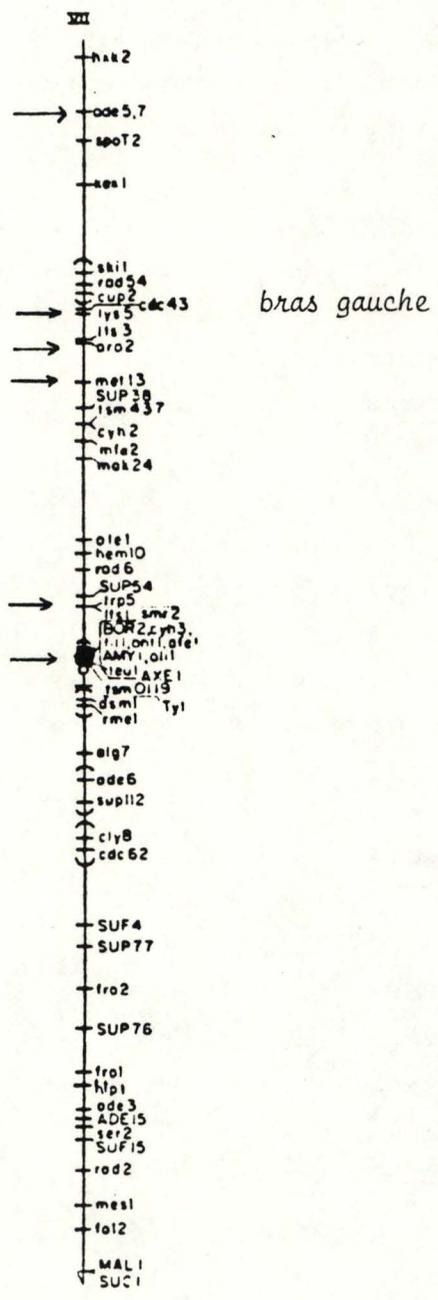


Fig. III 3. Localisation des marqueurs sur le chromosome VII.

Le gène *PHO81* ne montre pas de liaison à des marqueurs du bras gauche du chromosome VII.

Nous avons commencé par déterminer si le gène *PHO81* était localisé sur le bras gauche du chromosome VII en testant sa liaison à des marqueurs de ce bras chromosomique.

A cette fin, nous avons effectué 2 croisements entre les souches:

VD33c et Le282

VD33d et Le388.

Les mutations suivantes sont localisées sur le chromosome VII (voir Fig. III 3.):

- auxotrophies *trp5*, *met13*, *aro2*, *lys5*, *ade5* pour la souche Le282.
- auxotrophies *trp5*, *met13*, *leu1*, *aro2*, *lys5*, *ade5* pour la souche Le388.

Un résumé de la procédure suivie pour aboutir à l'analyse de tétrades est présenté à la Fig. II 10. du chapitre Matériels et Méthodes.

Parmi les 14 tétrades analysées issues du croisement (1) Le282 x VD 33c, trois montrent une ségrégation irrégulière des marqueurs (différente de 2:2) et sont donc éliminées; des 11 tétrades utilisées, 7 comportent 4 spores viables et 4 tétrades n'en contiennent que 3 viables.

Nous pouvons tenir compte de tétrades à 3 spores viables puisque en connaissant le phénotype de 3 spores, on déduit celui de la quatrième et ainsi la classe de l'asque.

Seule, une des douze tétrades analysées issues du croisement (2) Le388 x VD33d présente une ségrégation irrégulière des marqueurs. 7 des 12 tétrades utilisées possèdent 4 spores viables et 4 tétrades n'en possèdent que 3.

N.B. La souche Le388 est en fait prototrophe pour l'adénine (*ADE5*); cette souche ainsi que toutes les spores issues de son croisement avec VD33d sont capables de croître sur milieu synthétique déficient en adénine.

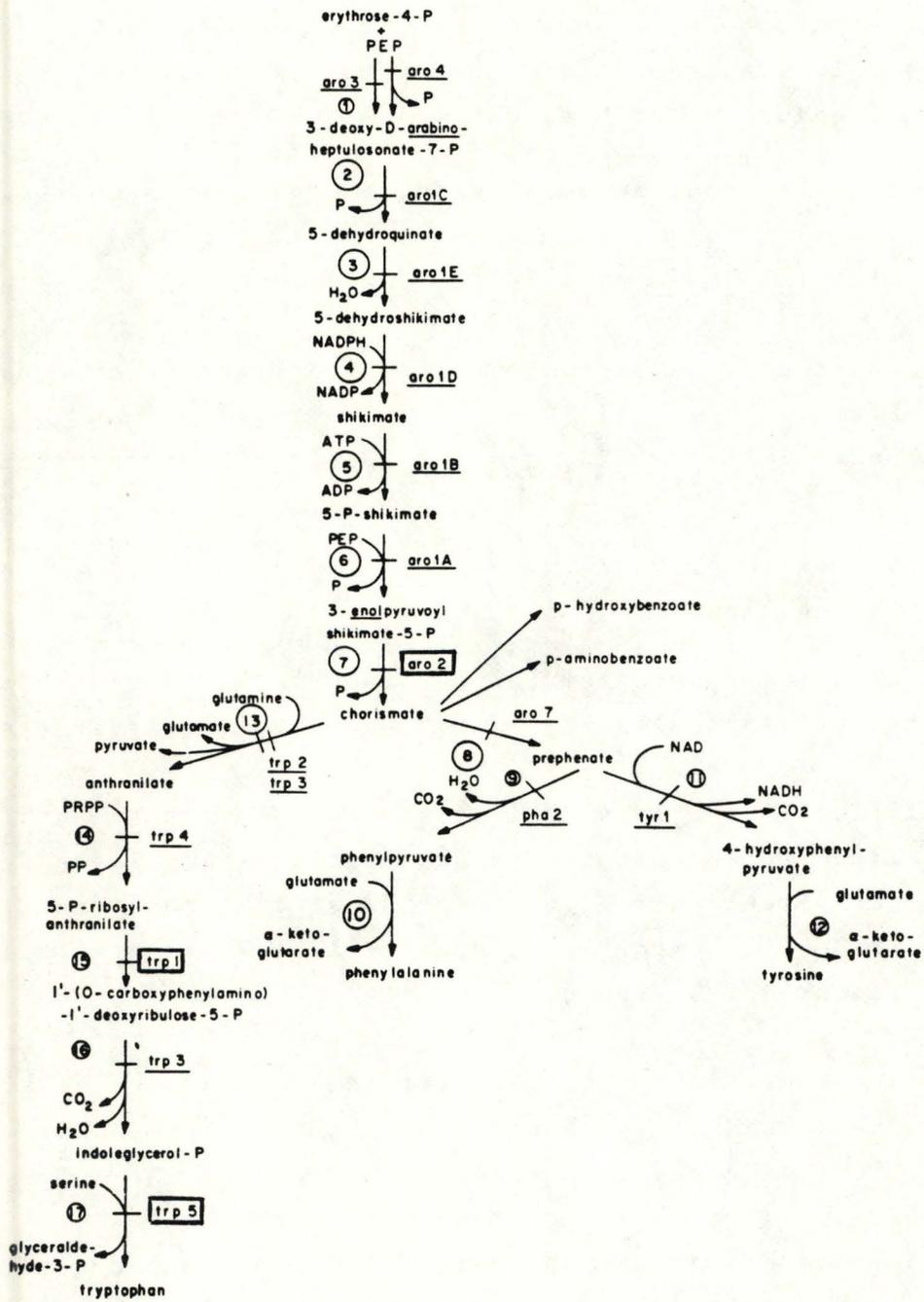


Fig. III 4. Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques.

## 1. Identification des spores portant le marqueur *trp5*.

Les souches parentales Le388 et Le282 utilisées, portent les mutations *aro2* et *trp5* et la souche VD33c est mutée en *trp1*.

Au sein des tétrades issues des 2 croisements, nous devons discerner les spores à génotype *trp5* des spores à génotype  $TRP5^+$  afin d'étudier la ségrégation du marqueur *trp5* par rapport au marqueur *pho81*. Or, les mutations *trp5*, *aro2* et *trp1* concernent la même voie métabolique et donc *aro2* et/ou *trp1* interfèrent avec le phénotype de *trp5*.

En effet, la mutation *aro2* concerne une enzyme catalysant une réaction intervenant avant la séparation des voies métaboliques de la synthèse de tryptophane et de phénylalanine et tyrosine (voir Fig.III 4.), la mutation *trp5* concerne une enzyme de la voie de synthèse du tryptophane intervenant donc en aval de cette séparation.

Aussi, une souche mutante *trp5* ainsi qu'une souche mutante *aro2* sont incapables de synthétiser le tryptophane. Par conséquent, ni une souche *trp5*  $ARO2^+$  ni une souche  $TRP5^+$  *aro2* ne croîtront sur milieu dépourvu de tryptophane. Ce test de croissance ne permettra donc pas de les différencier.

De plus, les souches portant la mutation *trp1* ne se multiplient pas non plus sur milieu déficient en tryptophane. Aussi, ne sera-t-il pas possible de distinguer sur ce milieu une souche *trp1*  $TRP5^+$  d'une souche  $TRP1^+$  *trp5*.

Pour identifier dans chaque spore, l'allèle porté au locus *TRP5*, nous supprimons l'effet des mutations *aro2* et *trp1* en les complétant par leur allèle sauvage ( $ARO2^+$  et  $TRP1^+$  respectivement au sein d'un diploïde. Ainsi, chaque spore est croisée avec une souche diploïde portant les allèles sauvages  $ARO2^+$  et  $TRP1^+$  et l'allèle mutant *trp5*.

Par conséquent, si le diploïde est incapable de se multiplier sur milieu déficient en tryptophane, nous en déduisons qu'il est issu d'une spore *trp5*.

Ce procédé porte le nom de test de complémentation.

## 2. Tableau de résultats de l'analyse de tétrades (voir tableau III 2).

Le tableau suivant indique, par couple de marqueurs, la répartition des tétrades analysées en DP, DNP et T.

Remarque concernant les notations utilisées:

par exemple  $PHO81^+$  représente l'allèle sauvage ( du gène *PHO81*  
*pho81* représente l'allèle mutant )

Tableau III 2.

Croisement (1) Le282  $\alpha$  *trp5 met13 aro2 lys5 ade5 arg81 gal*  
 X VD33c  $\alpha$  *pho81 ura3 trp1*

Paires de  
marqueurs

Répartition des tétrades en 3 classes

|                    | DP                                                                    | DNP                                                               | T                                                                                                                                         |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>met13-pho81</i> | 2 MET13 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>met13</i> PHO81 <sup>+</sup> | 2 MET13 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>met13 pho81</i>    | 1 MET13 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>met13 pho81</i><br>1 MET13 <sup>+</sup> <i>pho81</i><br>1 <i>met13</i> PHO81 <sup>+</sup> |
|                    | 1                                                                     | 2                                                                 | 8                                                                                                                                         |
| <i>ade5-pho81</i>  | 2 ADE5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>ade5</i> PHO81 <sup>+</sup>   | 2 ADE5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>ade5 pho81</i>      | 1 ADE5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>ade5 pho81</i><br>1 ADE5 <sup>+</sup> <i>pho81</i><br>1 <i>ade5</i> PHO81 <sup>+</sup>     |
|                    | 1                                                                     | 4                                                                 | 5                                                                                                                                         |
| <i>lys5-pho81</i>  | 2 LYS5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>lys5</i> , PHO81 <sup>+</sup> | 2 LYS5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>lys5 pho81</i>      | 1 LYS5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>lys5</i> PHO81 <sup>+</sup><br>1 LYS5 <sup>+</sup> <i>pho81</i><br>1 <i>lys5 pho81</i>     |
|                    | 1                                                                     | 4                                                                 | 6                                                                                                                                         |
| <i>aro2-pho81</i>  | 2 ARO2 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>aro2</i> PHO81 <sup>+</sup>   | 2 ARO2 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>aro2 pho81</i>      | 1 ARO2 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 ARO2 <sup>+</sup> <i>pho81</i><br>1 <i>aro2 pho81</i><br>1 <i>aro2</i> PHO81 <sup>+</sup>     |
|                    | 1                                                                     | 5                                                                 | 4                                                                                                                                         |
| <i>trp5-pho81</i>  | 2 TRP5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>trp5</i> PHO81 <sup>+</sup>   | 2 TRP5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>trp5 pho81</i>      | 1 <i>trp5 pho81</i><br>1 TRP5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>trp5</i> PHO81 <sup>+</sup><br>1 TRP5 <sup>+</sup> <i>pho81</i>     |
|                    | 1                                                                     | 4                                                                 | 4                                                                                                                                         |
| <i>lys5-aro2</i>   | 2 ARO2 <sup>+</sup> LYS5 <sup>+</sup> ; 2 <i>aro2 lys5</i>            | 2 ARO2 <sup>+</sup> <i>lys5</i> ; 2 <i>aro2</i> LYS5 <sup>+</sup> | 1 ARO2 <sup>+</sup> LYS5 <sup>+</sup><br>1 ARO2 <sup>+</sup> <i>lys5</i><br>1 <i>aro2 lys5</i><br>1 <i>aro2</i> LYS5 <sup>+</sup>         |
|                    | 9                                                                     | 0                                                                 | 1                                                                                                                                         |

Tableau III 2. Croisement (1) (suite)

|                   |                                                              |                                                                     |                                                                                                                                             |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>met13-aro2</i> | 2 MET13 <sup>+</sup> ARO2 <sup>+</sup> ; 2 <i>met13 aro2</i> | 2 MET13 <sup>+</sup> <i>aro2</i> ; 2 <i>met13 ARO2</i> <sup>+</sup> | 1 ARO2 <sup>+</sup><br>MET13 <sup>+</sup><br>1 ARO2 <sup>+</sup> <i>met13</i><br>1 <i>aro2 met13</i><br>1 <i>aro2</i><br>MET13 <sup>+</sup> |
|                   | 6                                                            | 0                                                                   | 4                                                                                                                                           |
| <i>lys5-met13</i> | 2 LYS5 <sup>+</sup> MET13 <sup>+</sup> ; 2 <i>met13 lys5</i> | 2 <i>lys5 MET13</i> <sup>+</sup> ; 2 LYS5 <sup>+</sup> <i>met13</i> | 1 LYS5 <sup>+</sup><br>MET13 <sup>+</sup><br>1 <i>lys5 MET13</i> <sup>+</sup><br>1 LYS5 <sup>+</sup> <i>met13</i><br>1 <i>lys5 met13</i>    |
|                   | 6                                                            | 0                                                                   | 5                                                                                                                                           |

Croisement (2) Le388 a *met 13 leu1 trp5 cyh2 aro2 lys5*X VD33d *pho81 ura3*.Paires de  
marqueursRépartition des tétrades en 3 classes

|                   | <u>DP</u>                                                           | <u>DNP</u>                                                   | <u>I</u>                                                                                                                                 |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>aro2-pho81</i> | 2 ARO2 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>aro2 PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 <i>aro2 pho81</i> ; 2 ARO2 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> | 1 <i>aro2 pho81</i><br>1 ARO2 <sup>+</sup><br>PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>aro2 PHO81</i><br>1 ARO2 <sup>+</sup> <i>pho81</i>              |
|                   | 3                                                                   | 1                                                            | 7                                                                                                                                        |
| <i>leu1-pho81</i> | 2 LEU1 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>leu1 PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 LEU1 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>leu1 pho81</i> | 1 <i>leu1 pho81</i><br>1 LEU1 <sup>+</sup><br>PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>leu1 PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 LEU1 <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
|                   | 2                                                                   | 1                                                            | 8                                                                                                                                        |
| <i>trp5-pho81</i> | 2 TRP5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>trp5 PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 TRP5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>trp5 pho81</i> | 1 <i>trp5 pho81</i><br>1 TRP5 <sup>+</sup><br>PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>trp5 PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 TRP5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
|                   | 3                                                                   | 1                                                            | 7                                                                                                                                        |
| <i>lys5-pho81</i> | 2 LYS5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>lys5 PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 LYS5 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>lys5 pho81</i> | 1 <i>lys5 pho81</i><br>1 LYS5 <sup>+</sup><br>PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>lys5 PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 LYS5 <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
|                   | 3                                                                   | 2                                                            | 6                                                                                                                                        |

Tableau III 2. Croisement (2) (suite)

|                    |                                                                       |                                                                   |                                                                                                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>met13-pho81</i> | 2 MET13 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>met13</i> PHO81 <sup>+</sup> | 2 MET13 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>met13 pho81</i>    | 1 <i>met13 pho81</i><br>1 MET13 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>met13</i> PHO81 <sup>+</sup><br>1 MET13 <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
|                    | 3                                                                     | 0                                                                 | 8                                                                                                                                         |
| <i>lys5-aro2</i>   | 2 LYS5 <sup>+</sup> ARO2 <sup>+</sup> ; 2 <i>lys5 aro2</i>            | 2 <i>lys5 ARO2</i> <sup>+</sup> ; 2 LYS5 <sup>+</sup> <i>aro2</i> | 1 <i>lys5 aro2</i><br>1 LYS5 <sup>+</sup> ARO2 <sup>+</sup><br>1 <i>lys5</i> ARO2 <sup>+</sup><br>1 LYS5 <sup>+</sup> <i>aro2</i>         |
|                    | 8                                                                     | 0                                                                 | 3                                                                                                                                         |
| <i>trp5-leu1</i>   | 2 TRP5 <sup>+</sup> LEU1 <sup>+</sup> ; 2 <i>trp5 leu1</i>            | 2 <i>trp5 LEU1</i> <sup>+</sup> ; 2 TRP5 <sup>+</sup> <i>leu1</i> | 1 <i>trp5 leu1</i><br>1 TRP5 <sup>+</sup> LEU1 <sup>+</sup><br>1 <i>trp5</i> LEU1 <sup>+</sup><br>1 TRP5 <sup>+</sup> <i>leu1</i>         |
|                    | 8                                                                     | 0                                                                 | 3                                                                                                                                         |

3. Distance entre marqueurs du chromosome VII.

Nous avons estimé la distance séparant des marqueurs proches du chromosome VII et nous l'avons comparée à la valeur trouvée dans la littérature (Mortimer et Sild, 1985 et 1980).

Pour évaluer la distance en cM, nous avons utilisé la formule:

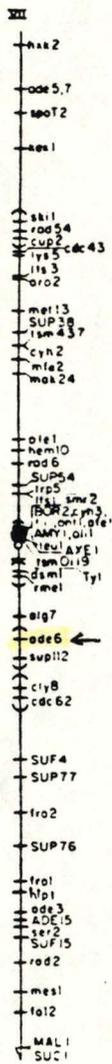
$$\text{distance } x = \frac{100}{2} \frac{T}{T + DP}$$

## croisement (1)

|                   | <u>distance</u><br><u>évaluée (cM)</u> | <u>distance</u><br><u>déduite de la littérature (cM)</u> |
|-------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>lys5-aro2</i>  | 5                                      | 9                                                        |
| <i>met13-aro2</i> | 20                                     | 13,7                                                     |
| <i>lys5-met13</i> | 22,7                                   | 19,7                                                     |

## croisement (2)

|                  |      |      |
|------------------|------|------|
| <i>lys5-aro2</i> | 13,6 | 9    |
| <i>trp5-leu1</i> | 13,6 | 17,6 |



*bras droit*

*Fig. III 5. Localisation du marqueur ade6 sur le bras droit du chromosome VII.*

Nos valeurs sont relativement proches des valeurs de la littérature; notons d'ailleurs que celles-ci fluctuent selon l'auteur.

Nous analysons un nombre de tétrades bien plus faible que les auteurs, par conséquent, notre estimation est sans doute plus approximative, mais s'avère néanmoins valable.

4. Liaison du gène *PHO81* avec les marqueurs du bras gauche du chromosome VII.

Dans le premier croisement, pour chaque paire de marqueurs (*aro2*, *trp5*, *met13*, *lys5*) - *PHO81*, le rapport  $\frac{DP}{DNP} < 1$ ; le gène *PHO81* n'est lié à aucun de ces marqueurs.

La ségrégation du gène *PHO81* par rapport aux marqueurs *aro2*, *trp5*, *met13*, *lys5* est également étudiée dans le second croisement, la liaison au marqueur *leu1* est aussi testée.

Dans aucun des cas, le rapport entre DP et DNP n'est significativement supérieur à 1, confirmant que le gène *PHO81* n'est pas lié aux marqueurs.

Un faible nombre de DP et de DNP par rapport à un nombre élevé de tétratypés, dans les deux croisements, fait suggérer que le gène *PHO81* n'est pas lié aux marqueurs, soit parce qu'il est localisé sur le chromosome XV, soit parce que les crossing-overs sont fréquents entre chaque marqueur et le gène *PHO81* situé sur le même chromosome, mais à grande distance. Cependant, dans ce cas, les marqueurs étant répartis sur toute la longueur du bras gauche du chromosome VII et ne montrant pas de liaison avec le gène *PHO81*, celui-ci serait localisé sur le bras droit du chromosome VII.

41 Le gène *PHO81* ne semble pas lié au marqueur *ade6*.

Dans cette seconde étape, nous analysons 12 tétrades issues d'un diploïde obtenu par croisement des souches VD33d et Le35. La souche Le35 porte notamment une mutation localisée dans l'extrémité centromérique du bras droit du chromosome VII, *ade6*. (voir Fig. III 5.).

Nous testons ici la liaison entre les gènes *PHO81* et *ADE6*.

Parmi les 12 tétrades utilisées, huit sont complètes et 4 ne contiennent que 3 spores.

1. La souche Le35 semble déficiente pour l'activité phosphatase acide.

Au cours du test d'activité de phosphatase acide en condition de dérèpression (faible concentration en Pi dans le milieu) une souche sauvage se colore en rouge foncé et la souche *pho81* VD33d reste blanche tandis que la colonie Le35 apparaît rose pâle à blanche.

Nous en déduisons que la souche Le35 serait déficiente pour l'activité phosphatase acide répressible. Le35 semble donc porter une mutation *pho*, notons-là *phox*.

Le diploïde obtenu par croisement entre VD33d et Le35 possède une activité phosphatase acide en condition de dérèpression; la complémentation a donc lieu au sein du diploïde indiquant que la mutation de Le35 ne touche pas le gène *PHO81* et qu'elle est récessive.

|                                  |                           |   |                          |   |                                        |
|----------------------------------|---------------------------|---|--------------------------|---|----------------------------------------|
|                                  | Le35                      | X | VD33d                    | → | diploïde                               |
|                                  | <i>phox</i>               |   | <i>PHOX</i> <sup>+</sup> |   | <i>phox</i> <i>PHOX</i> <sup>+</sup>   |
|                                  | <i>PHO81</i> <sup>+</sup> |   | <i>pho81</i>             |   | <i>PHO81</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
| détection d'activité phosphatase | -                         |   | -                        |   | +                                      |

La mutation <sup>*phox*</sup>*PHOX* de Le35 pourrait être l'une des mutations récessives connues entraînant une déficience en activité phosphatase acide:

*pho5* mutation de gène de structure *PHO5*

*pho2* mutation du gène codant pour le facteur positif *PHO2*

*pho4* mutation du gène codant pour le facteur positif *PHO4*.

Il pourrait aussi s'agir d'une mutation dans un gène du système phosphatase dont on ignorerait l'existence et donc le rôle.



3. Résultats de l'analyse de tétrades.Tableau de résultats.Paires de  
marqueursRépartition des tétrades en 3 classes.

|                   | <u>DP</u>                                                                         | <u>DNP</u>                                                                        | <u>I</u>                                                                                                                                                                 |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>pho81-ade6</i> | 2 <i>ADE6</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>ade6</i> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 <i>ade6</i> <i>pho81</i> ; 2 <i>ADE6</i> <sup>+</sup> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> | 1 <i>ade6</i> <i>pho81</i><br>1 <i>ADE6</i> <sup>+</sup> <i>PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 <i>ade6</i> <i>PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 <i>ADE6</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
|                   | 1                                                                                 | 2                                                                                 | 9                                                                                                                                                                        |
| <i>pho81-phoX</i> | 2 <i>PHOX</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>phoX</i> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 <i>phoX</i> <i>pho81</i> ; 2 <i>PHOX</i> <sup>+</sup> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> | 1 <i>phoX</i> <i>pho81</i><br>1 <i>PHOX</i> <sup>+</sup> <i>PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 <i>phoX</i> <i>PHO81</i> <sup>+</sup><br>1 <i>PHOX</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i> |
|                   | 0                                                                                 | 4                                                                                 | 7                                                                                                                                                                        |

Paire *pho81 - phoX*.

Nous n'observons aucun ditype parental; les deux loci ne sont vraisemblablement pas liés: ils sont localisés sur des chromosomes différents ou très éloignés sur le même chromosome.

Notons d'ailleurs qu'aucune autre mutation *pho* entraînant une déficience en phosphatase acide répressible n'a été localisée sur le chromosome VII.

Paire *pho81 - ade6*.

Nous n'observons pas d'excès de DP par rapport aux DNP.

Les 2 gènes ne sont pas liés. Le gène *PHO81* n'est donc pas situé à proximité du marqueur *ade6*, localisé à une extrémité du bras droit du chromosome VII.

Le gène *PHO81* est à une distance approximative de 14,4 cM du marqueur *ade3*.

Parallèlement au test de liaison à *ade6*, nous testons la liaison du gène *PHO81* à un marqueur *ade3*, localisé sur le bras droit

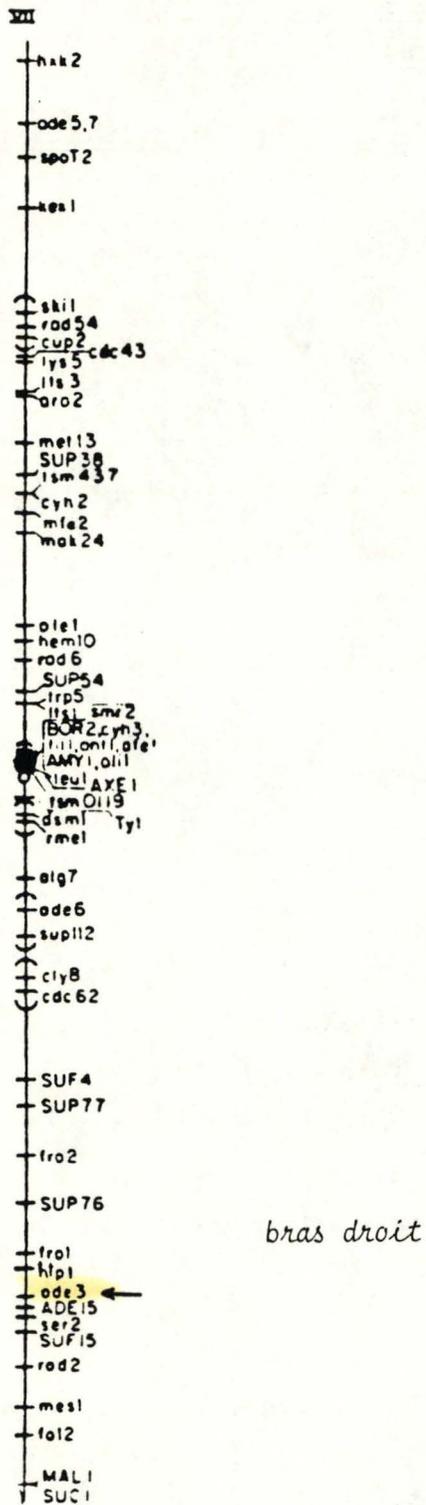


Fig. III 6. Localisation du marqueur ade3 sur le bras droit du chromosome VII.

du chromosome VII et éloigné du centromère (*ade3* et *ade6* ne sont pas liés tant ils sont éloignés) (voir Fig. III 6.).

Pour ce faire, nous avons croisé la souche VD33d avec la souche Lel portant les mutations *ade3*, *ura 1*, *gal2* et *his*.

Nous avons commencé par analyser 12 tétrades dont 8 de 4 spores viables et quatre de trois spores viables.

Nous avons répliqué les colonies provenant des spores sur milieu synthétique dépourvu d'adénine mais également sur milieu synthétique dépourvu d'histidine. Cette vérification de la ségrégation 2:2 de la mutation histidine nous confirme que le groupe de 4 cellules prélevé est une tétrade de 3 spores et non le résultat de deux mitoses.

### 1. Tableau des résultats.

Paires de  
marqueurs

Répartition des tétrades en 3 classes.

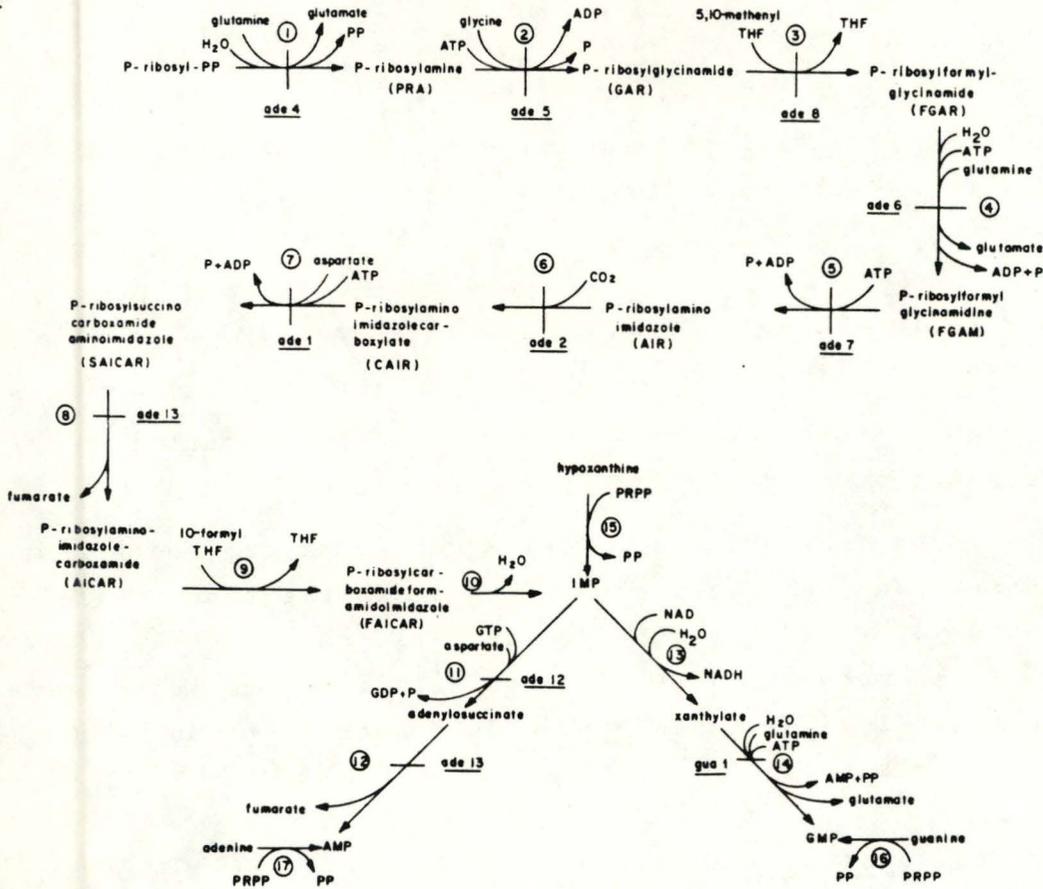
|                   | <u>DP</u>                                                           | <u>DNP</u>                                                   | <u>T</u>                                                                                                                                   |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ade3-pho81</i> | 2 ADE3 <sup>+</sup> <i>pho81</i> ; 2 <i>ade3</i> PHO81 <sup>+</sup> | 2 ADE3 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup> ; 2 <i>ade3 pho81</i> | 1 <i>ade3 pho81</i><br>1 ADE3 <sup>+</sup> PHO81 <sup>+</sup><br>1 <i>ade3</i> PHO81 <sup>+</sup><br>1 ADE3 <sup>+</sup> <i>pho81</i><br>3 |
|                   | 8                                                                   | 1                                                            |                                                                                                                                            |
| <i>ade3-his</i>   | 12                                                                  | 0                                                            | 0                                                                                                                                          |

### 2. Liaison des mutations *ade3* et *his*.

Les deux mutations ségrégeant ensemble dans chacune des tétrades étudiées, (toutes les tétrades sont des ditypes parentaux); il nous est permis de supposer qu'aucun crossing-over n'a eu lieu dans l'intervalle entre les deux mutations.

Cet intervalle calculé est par conséquent nul. Une interprétation de ce résultat aurait pu être que ces deux mutations étaient très proches l'une de l'autre; dans un échantillon plus grand de tétrades, des tétratypés auraient sans doute été observés.

a.



b.

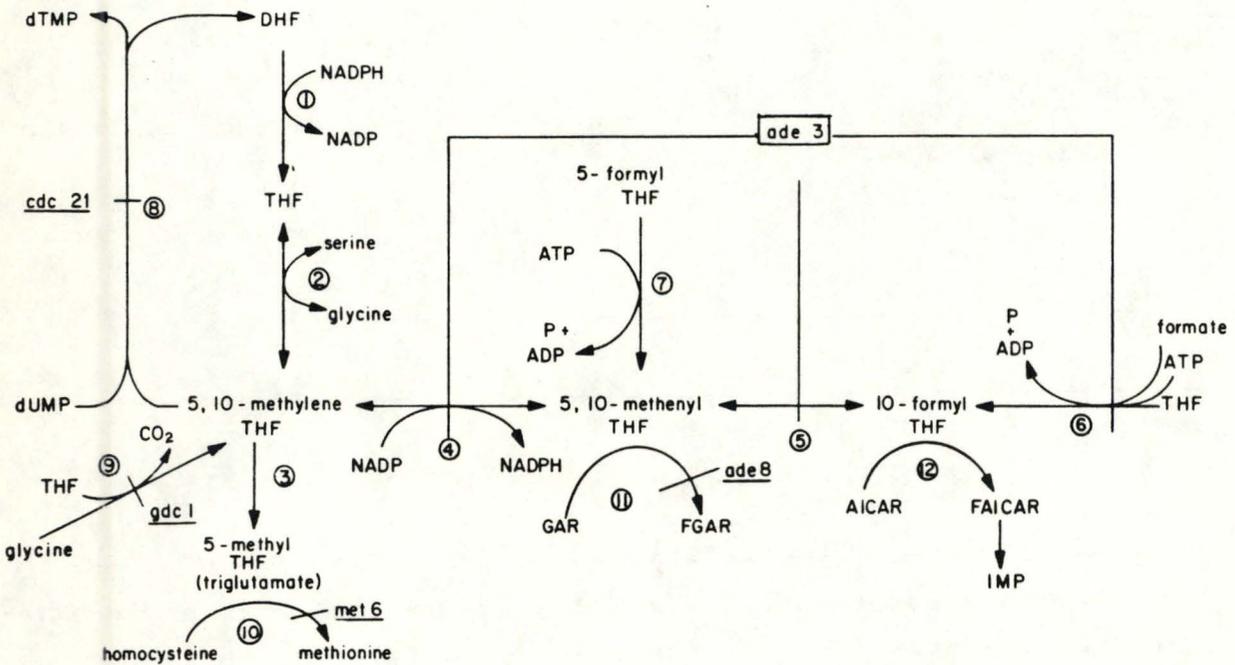


Fig. III 7a. Voie de biosynthèse des nucléotides purines: les dérivés de THF interviennent dans les réactions 3 et 9.

b. la mutation ade3 bloque la synthèse de 2 dérivés du THF et provoque l'accumulation de 5,10- méthylène THF.

Cependant, on peut trouver dans la littérature une explication plus correcte.

En effet, d'après Roman (*cité dans* Jones et Fink, 1982), les mutants *ade3* nécessitent de l'adénine et de l'histidine dans le milieu de culture. Ces mutants sont incapables de synthétiser les dérivés de tétrahydrofolate (THF). L'absence de 2 dérivés de THF dans les mutants *ade3* bloque les étapes 3 et 9 de la synthèse des purines expliquant l'auxotrophie de ces mutants pour l'adénine. (voir Fig. III 7.).

Cependant, ils accumulent un autre dérivé, le 5,10- méthylène THF qui inhibe *in vitro* l'enzyme catalysant la quatrième réaction de synthèse de l'histidine. Il provoque également *in vivo* l'accumulation du substrat de cette enzyme. Ceci expliquerait l'auxotrophie des mutants *ade3* pour l'histidine (Jones et Fink, 1982). Ainsi, la mutation localisée au locus *ade3* serait responsable d'une incapacité de synthèse à la fois d'histidine et d'adénine.

### 3. Liaison entre les loci ADE3 et PHO81.

Le rapport entre DP et DNP est significativement supérieur à un d'après la table de Perkins.

Les loci *ADE3* et *PHO81* sont liés; calculons la distance qui les sépare en utilisant la formule:

$$x = \frac{100}{2} \frac{(T + 6 \text{ DNP})}{DP+T+DNP}$$

$$X = \frac{100}{2} \cdot \frac{9}{12} = 37,5 \text{ cM}$$

Cependant à partir d'un échantillon contenant seulement douze tétrades, on peut déduire que les loci sont liés mais la valeur de distance estimée n'est pas fiable.

En effet, si l'échantillon est petit, l'estimation peut être fortement biaisée par la présence d'un type rare de tétrades, c'est-à-dire dont la fréquence est faible dans l'ensemble de la population de tétrades.

Par exemple, dans ce cas, la présence d'un DNP pourrait surestimer la distance séparant les marqueurs.

Afin de déterminer une distance plus fiable, analysons un plus grand échantillon de tétrades.

#### 4. Localisation du locus *PHO81* par rapport au locus *ADE3*.

Dans un deuxième temps, 56 tétrades provenant du même croisement entre *Lel* et *VD33d* sont analysées, 4 sont éliminées, la ségrégation de leurs marqueurs étant irrégulière. 42 asques comportent 4 spores viables et 10 asques n'en comptent que 3.

#### Tableau des résultats.

Paires de  
marqueurs

Répartition des tétrades en 3 classes.

|                   | <u>DP</u>                                                         | <u>DNP</u>                                                        | <u>T</u>                                                                                                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ade3-pho81</i> | 2 <i>ADE3<sup>+</sup> pho81</i> ; 2 <i>ade3 PHO81<sup>+</sup></i> | 2 <i>ADE3<sup>+</sup> PHO81<sup>+</sup></i> ; 1 <i>ade3 pho81</i> | 1 <i>ade3 pho81</i><br>1 <i>ADE3<sup>+</sup> PHO81<sup>+</sup></i><br>1 <i>ade3 PHO81<sup>+</sup></i><br>1 <i>ADE3<sup>+</sup> pho81</i><br>15 |
|                   | 37                                                                | 0                                                                 |                                                                                                                                                |
| <i>ade3-his</i>   | 52                                                                | 0                                                                 | 0                                                                                                                                              |

Soulignons pour commencer que cette analyse confirme la première quant à la responsabilité de la mutation *ade3* dans l'incapacité de synthèse de l'histidine et de l'adénine.

En ce qui concerne la ségrégation du marqueur *pho81* par rapport à *ade3*, le rapport entre DP et DNP est très significativement supérieur à un, la liaison entre les loci *ADE3* et *PHO81* est ainsi confirmée.

De plus, cette fois, aucun ditype non parental n'est répertorié suggérant une très faible probabilité de double crossing-over; les deux loci seraient très proches.

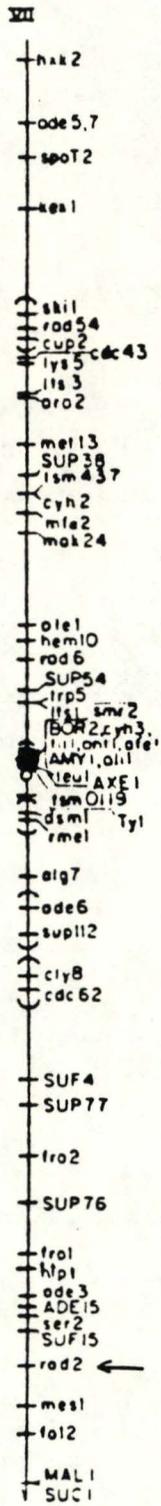


Fig. III 8. Localisation du marqueur rad2 sur le bras droit du chromosome VII.

Le calcul de distance est le suivant:

$$x = \frac{100}{2} \cdot \frac{T}{T + DP} = \frac{100}{2} \cdot \frac{37}{52} = 14,4 \text{ cm}$$

Le locus *PHO81* serait donc approximativement à 14,4 cM du locus *ADE3*.

La question se pose maintenant de déterminer de quel côté du locus *ADE3* le locus *PHO81* se situe.

Si nous obtenons une évaluation de la distance séparant *pho81* d'un autre loci proche d'*ade3*, nous pouvons en déduire, par la règle de 3 points, la position de *pho81*.

|                |             |      |   |
|----------------|-------------|------|---|
| <u>Exemple</u> | $d(ab) = 1$ | donc | c |
|                | $d(bc) = 2$ |      | b |
|                | $d(ac) = 3$ |      | a |

Localisation du marqueur *pho81* par rapport au marqueur *rad2*.

La souche Le358 porte notamment la mutation *rad2* qui est localisée sur le bras droit du chromosome VII à proximité du locus *ADE3* (voir Fig III 8.). Cette mutation est responsable de la grande sensibilité de la souche aux rayonnements ultraviolets.

Cette souche Le358 est croisée avec la souche VD33d en vue de déterminer la distance séparant les marqueurs *rad2* et *pho81*.

Sur 90 tétrades disséquées, 30 seulement comptent au moins 3 spores viables. Parmi ces 30 tétrades, plusieurs présentent une ségrégation irrégulière ou ne permettent pas une détermination sans équivoque du phénotype des spores.

En conséquence, l'interprétation portera seulement sur 15 tétrades.

Tableau des résultats.

Paires de marqueurs

Répartition des tétrades en 3 classes

|                   | DP                                      |                                         | DNP                                                  |                            | I                                                    |
|-------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>pho81-rad2</i> | 2 <i>RAD2</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i> | 2 <i>rad2</i> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 <i>RAD2</i> <sup>+</sup> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> | 2 <i>rad2</i> <i>pho81</i> | 1 <i>rad2</i> <i>PHO81</i> <sup>+</sup>              |
|                   |                                         |                                         |                                                      |                            | 1 <i>RAD2</i> <sup>+</sup> <i>PHO81</i> <sup>+</sup> |
|                   |                                         |                                         |                                                      |                            | 1 <i>rad2</i> <i>pho81</i>                           |
|                   |                                         |                                         |                                                      |                            | 1 <i>RAD2</i> <sup>+</sup> <i>pho81</i>              |
|                   | 4                                       |                                         | 0                                                    |                            | 11                                                   |

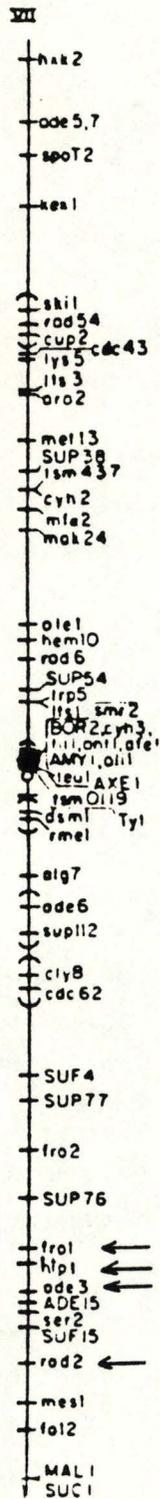


Fig. III 9. Localisation des marqueurs ade3, rad2, hip1 et fro1 sur le bras droit du chromosome VII.

La distance séparant les loci *RAD2* et *PHO81* est calculée en utilisant la formule

$$x = \frac{100}{2} \cdot \frac{T}{DP+T}$$

$$x = 36,6 \text{ cM}$$

Rappelons qu'au delà de 35 cM, la distance calculée par cette équation est sous-estimée. Retenons une distance de 36,6 cM entre les deux loci tout en sachant qu'elle est peut-être supérieure. Une analyse portant sur un nombre plus élevé de tétrades accompagnée de l'utilisation d'équations plus complexes (élaborées par Snow) permettrait une évaluation plus correcte de la distance (Mortimer et Sild, 1985).

Localisation du locus *PHO81* par rapport aux loci *ADE3* et *RAD2* sur le bras droit du chromosome VII.

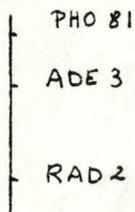
La distance entre *rad2* et *ade3* rapportée dans la littérature est de 33,8 cM (*mes1-ade3* - *mes1-rad2*) (Mortimer et Sild, 1980).

Cependant d'après la carte génétique (Mortimer et Sild, 1985) elle serait comprise entre 20 et 25 cM.

Nous avons estimé la distance entre *pho81* et *ade3* à 14,4 cM.

En nous basant <sup>du moins</sup> sur un nombre plus petit de tétrades, nous avons évalué à 36,6 cM la distance séparant *pho81* et *rad2*.

Nous en concluons que l'ordre de ces trois loci sur le bras droit du chromosome VII est (probablement) le suivant:



Ainsi, le gène *pho81* serait sans doute proche de *hip1* et *fro1*. (voir Fig. III 9.).

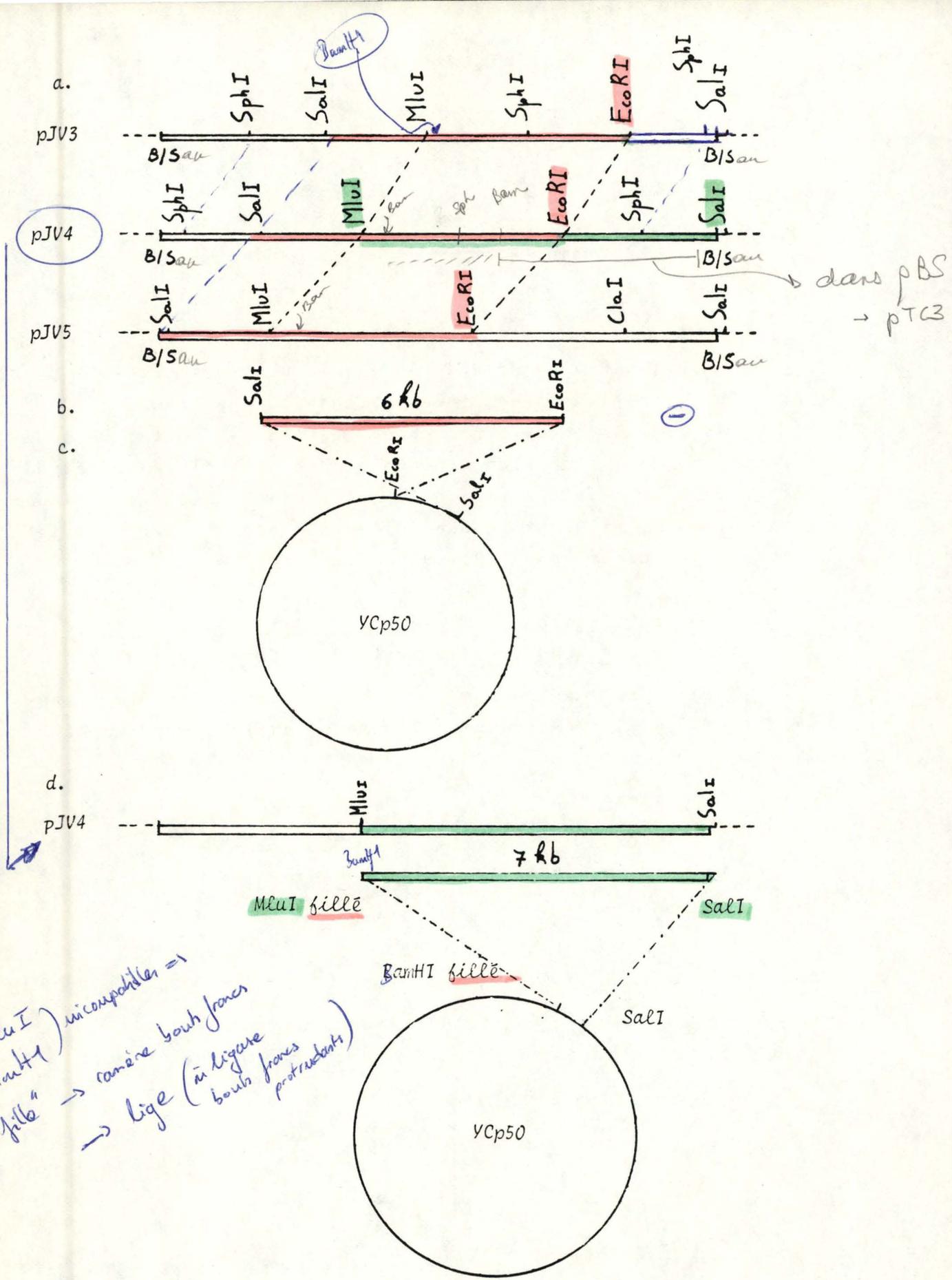


Fig. III 11. a. Les clones pJV3, pJV4, pJV5 complémentant la mutation *pho81* ont été étudiés; b. le fragment de restriction *SalI* - *EcoRI* est commun aux 3 inserts; c. clonage de ce fragment dans YCp50; d. clonage du fragment *MluI* - *SalI* de pJV4 dans YCp50, construisant pJV8.

— : insert  
 - - - : matrice d'YCp50

Cette première partie de notre travail, impliquant la mise en pratique de principes de génétique classique aboutit à la localisation du locus *PHO81* sur le bras droit du chromosome VII à 14,4 cM du marqueur *ade3* du côté opposé au marqueur *rad2*.

Notre approche moléculaire de l'étude du gène *PHO81*, cloné en 1988, visera la caractérisation physique de ce gène.

## II. CARTOGRAPHIE DE RESTRICTION D'UN FRAGMENT DE 7kb CONTENANT LE GENE *PHO81*.

### 1. Entrée en matière.

Rappelons que nous disposons d'un mutant *pho81* (souche VD33d); cette mutation est responsable de l'absence d'activité phosphatase acide même en conditions de dérèpression (faible concentration en Pi); un test coloré permet de la détecter.

Par complémentation du phénotype mutant *pho81* au départ d'une banque génomique de levure sauvage établie dans le vecteur YCp50 (Rose *et al.*, 1987) plusieurs clones ont été isolés et 3 étudiés plus particulièrement (Vandehaute *et al.*, 1988) (voir Fig. III 10.). Il s'agit des plasmides pJV3, pJV4 et pJV5 portant chacun un insert d'environ 11 kb (voir Fig. III 11a.). Les inserts de ces plasmides ont en commun une importante portion (voir Fig. III 11b.) indiquant qu'ils proviennent du même locus. Le fragment limité par les sites *SalI* et *EcoRI* commun aux trois clones a été sous-cloné mais s'est avéré incapable de restaurer le phénotype *PHO81* sauvage (voir Fig. III 11c.).

Au contraire, cette restauration est réalisée par le fragment *MluI* - *SalI* de pJV4 cloné dans YCp50; plasmide nommé pJV8 (voir Fig. III 11d.).

On a vérifié que la complémentation de la mutation *pho81* par le fragment *MluI* - *SalI* était due à la présence dans ce fragment génomique d'un allèle sauvage du gène *PHO81* et non d'un suppresseur extragénique de cette mutation (V. Coquette, 1988).

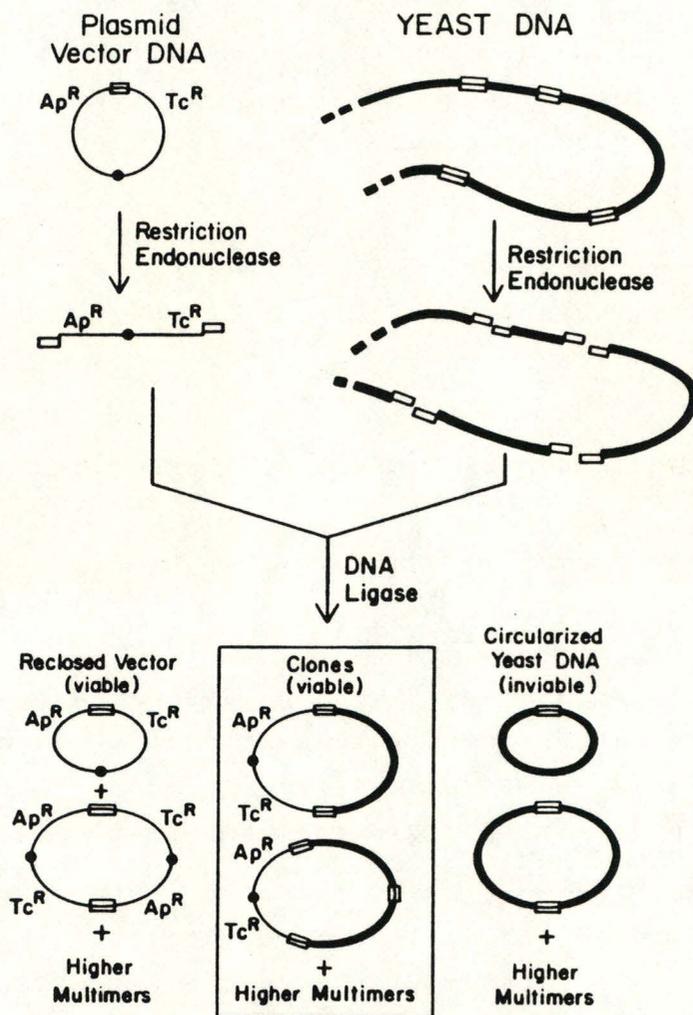


Fig. III 10. Résumé schématique de la construction d'une banque génomique dans un vecteur comme YCp50.

La caractérisation physique du fragment *MluI* - *SalI* débute par l'établissement d'une carte de restriction, c'est-à-dire par la localisation dans le fragment des sites de clivage de diverses enzymes de restriction.

## 2. Carte de restriction.

Nous avons utilisé le plasmide pJV8: il s'agit, rappelons-le du vecteur YCp50 ayant intégré le fragment *MluI* - *SalI* de pJV4.

Lors de la construction du plasmide pJV8, le site *MluI* est perdu. Cependant, un site *BamHI* interne au fragment est localisé à quelques dizaines de paires de bases de l'extrémité *MluI*. Par conséquent, nous avons établi la carte de restriction du fragment *BamHI* - *SalI* de 7kb porté par pJV8.

Dans ce but, nous avons restreint le plasmide pJV8 par une série d'enzymes dont nous connaissions la localisation des sites de restriction sur la matrice YCp50. La taille des fragments issus de chaque restriction est évaluée par une électrophorèse en gel d'agarose (voir photo III 1.).

Les enzymes de restriction utilisés, l'estimation de taille des fragments de restriction obtenus et les positions déduites des sites de clivage sont présentées dans le tableau III 3.

Nous constatons que parfois la restriction de pJV8 par une seule enzyme suffit à localiser son site de clivage dans l'insert. Néanmoins, il est souvent nécessaire d'avoir recours à une double restriction de pJV8 (c'est-à-dire par deux enzymes différentes) pour localiser sans ambiguïté le ou les sites de restriction d'une enzyme.

La carte de restriction du fragment *BamHI* - *SalI* de 7kb construite grâce à ces données est la suivante:

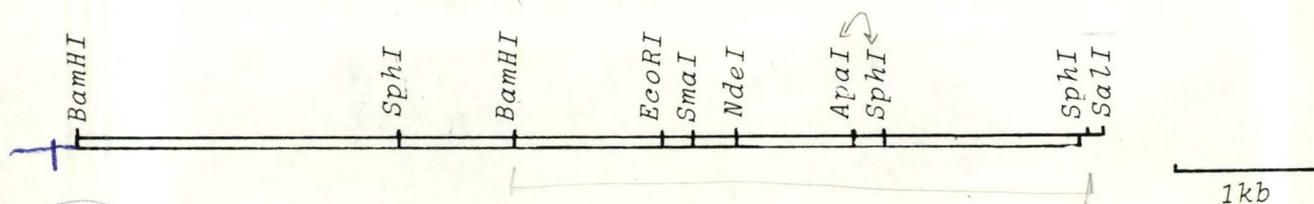


photo III 1. Profil électrophorétique des différentes restrictions du plasmide pJV8.

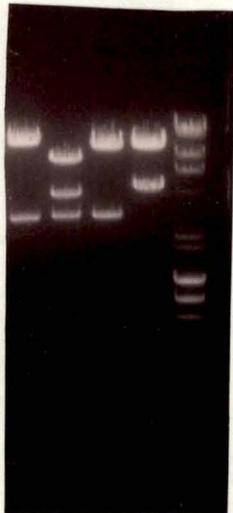
**a** 1 2 3 4 5 6 7 8



**b** 1 2 3



**c** 1 2 3 4 5



Les mélanges de restriction déposés sont les suivants:  
gel a, pistes 1: ApaI; 2: SmaI; 3: NdeI; 4: SphI; 6: NdeI-SphI  
7: ApaI-SmaI; 8: SmaI-SphI. Gel b, pistes 2: NdeI-EcoRI; 3: EcoRI.  
gel c, pistes 1: BamHI; 2: BamHI-SalI; 3: BamHI-EcoRI; 4: EcoRI.  
marqueurs de taille (voir p 52):  $\lambda$  HindIII (pistes a5 et b1)  
ou  $\lambda$  HindIII/ $\phi$ X174 HincII (piste c5).

Tableau III 3. Résultats des restrictions du plasmide pJV8.

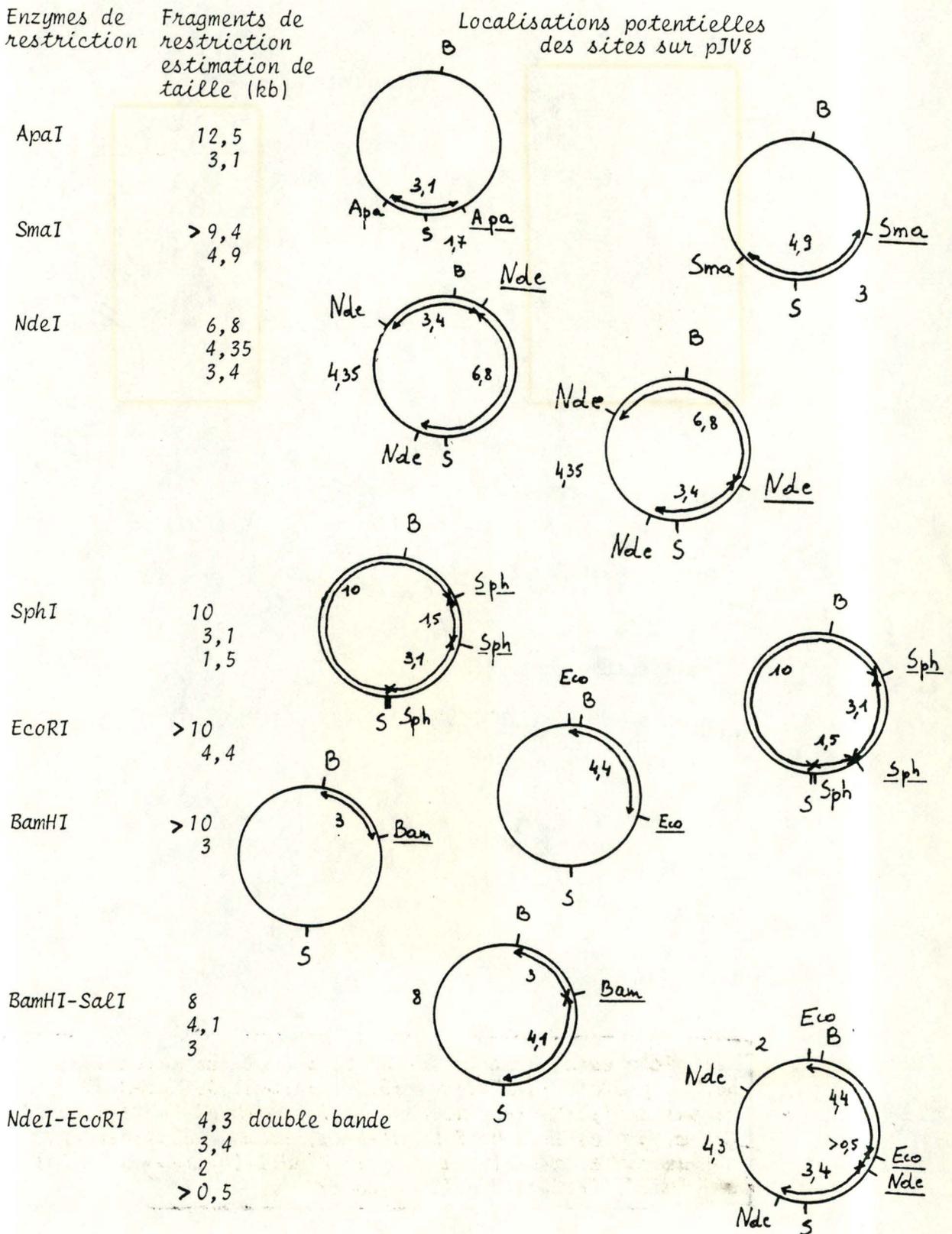
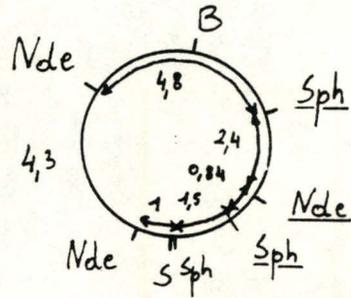
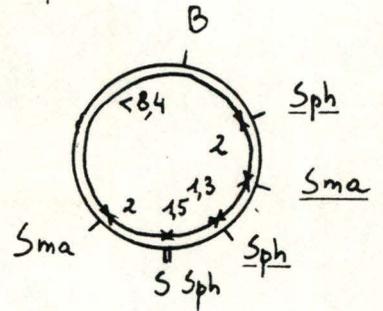


Tableau III 3. (suite)

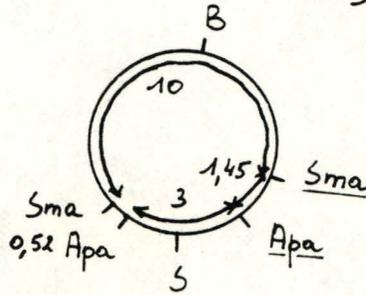
NdeI-SphI  
 10 ·  
 6 ·  
 4,8  
 4,3  
 3,4 ·  
 2,4  
 1,5  
 1  
 0,84



SmaI-SphI  
 12,5 ·  
 < 8,4  
 2,8 ·  
 2 double bande  
 1,5  
 1,3



ApaI-SmaI  
 10  
 3  
 1,45  
 0,52



· : restriction partielle

B ou Bam: BamHI; Apa: ApaI; Nde: NdeI; Sma: SmaI; Sph: SphI  
 S: SalI; Eco: EcoRI.

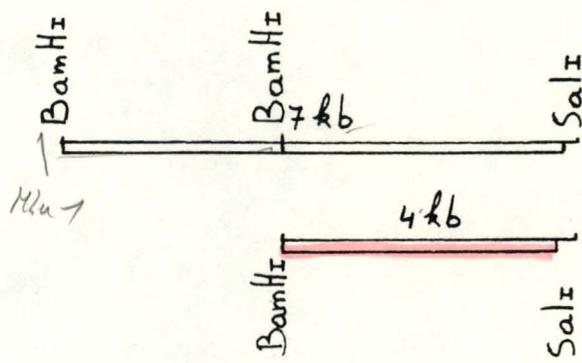


Fig. III 12. réduction de la taille du fragment contenant le gène PHO81 de 7 à 4kb.

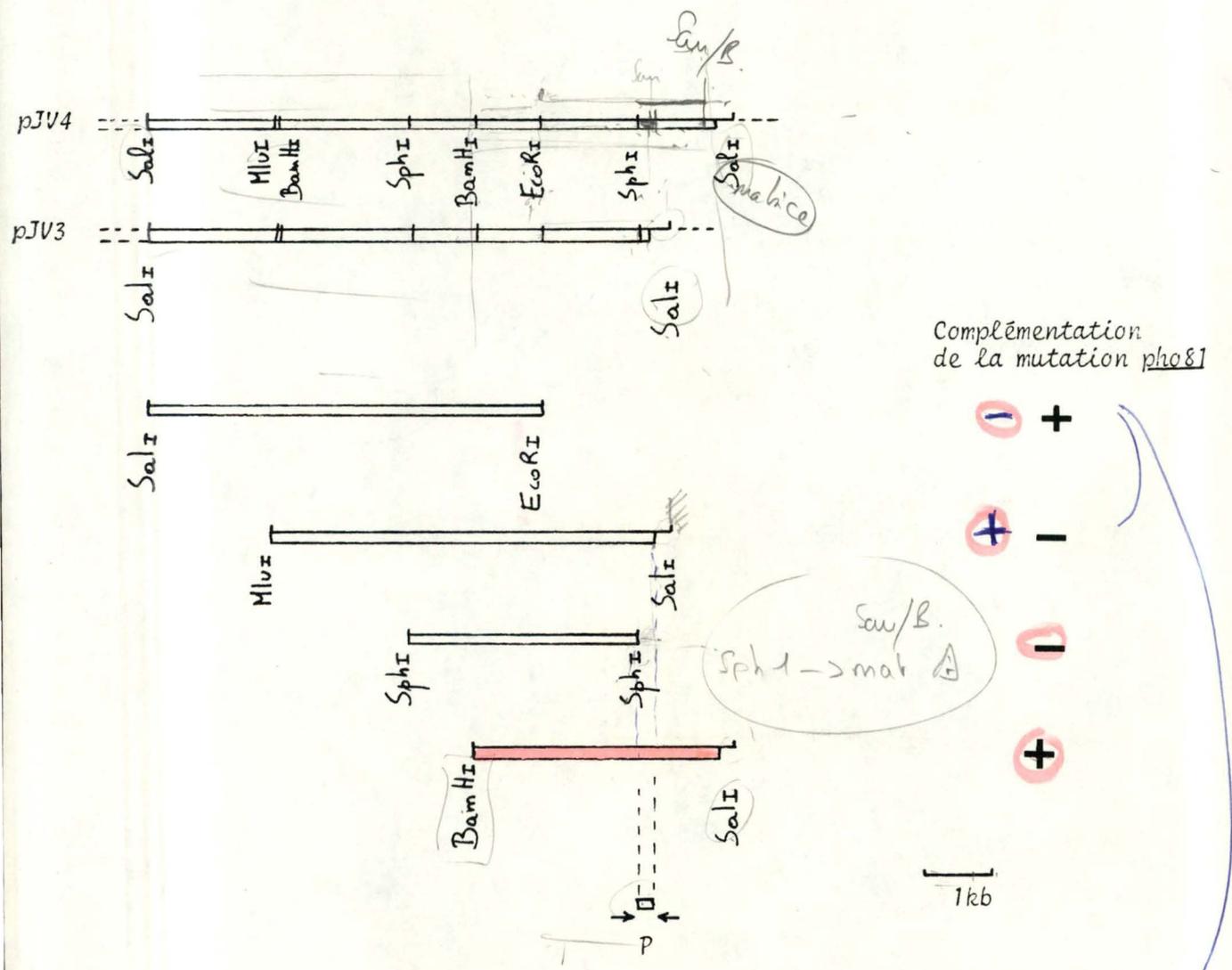


Fig. III 13. Comparaison des capacités de complémentation de différents fragments de restriction.

Le fragment p est nécessaire à la complémentation.

Fig. III 14. Batterie de sites de clonage du vecteur Bluescript.

Promoteur T7  
 SacI ( )  
 BstXI ) 3'  
 SacII ( )  
 ( EagI )  
 ) NotI  
 5' ( XbaI )  
 ) SpeI  
 ( BamHI  
 SmaI ( FRANC  
 central ( PstI )  
 ) EcoRI  
 EcoRV ( FRANC  
 ( HindIII )  
 ) ClaI  
 ( SalI )  
 5' ) HincII  
 ) AccI  
 ( XhoI )  
 ) DraII  
 ApaI ( 3'  
 KpnI )  
 Promoteur T3

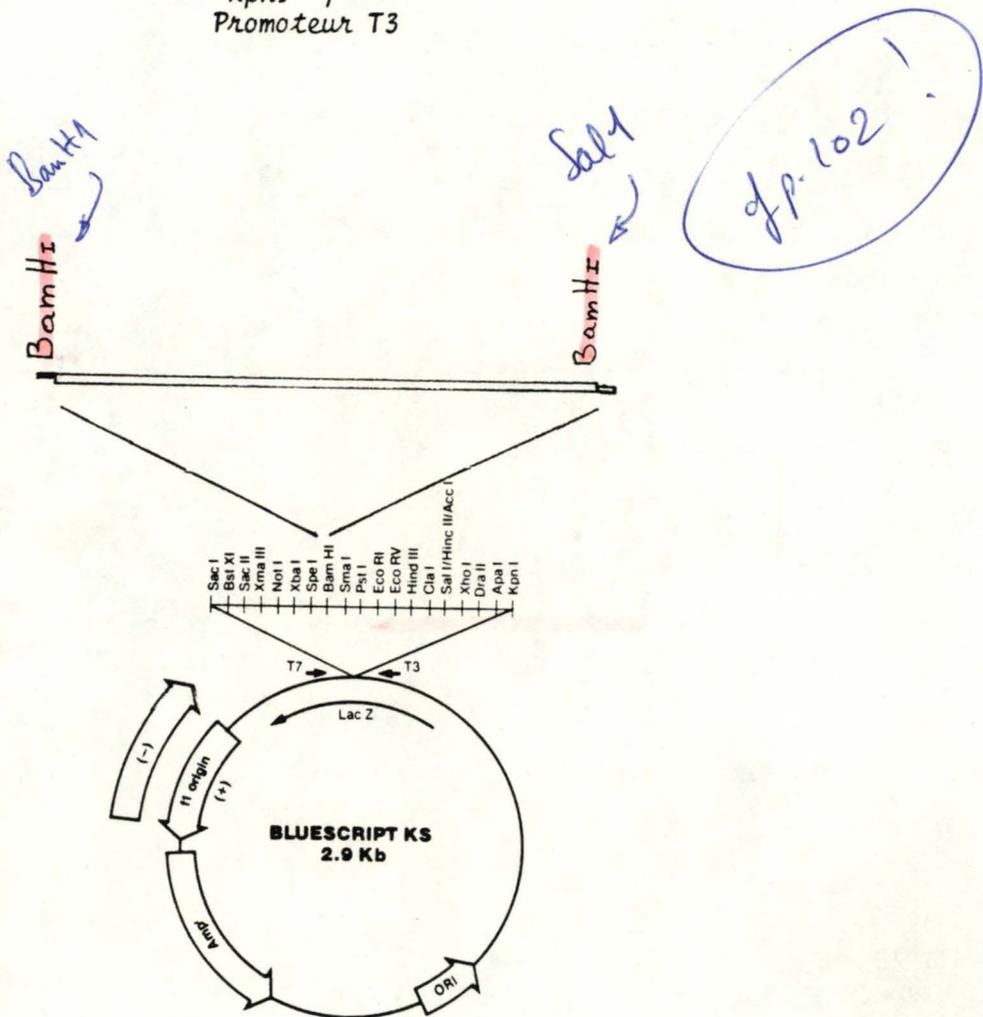


Fig. III 15. Clonage d'un insert dans un site de batterie de BS.

### 3. Cerner le gène PHO81 à l'intérieur de ce fragment.

A partir de cette carte de restriction apparaissent plusieurs possibilités de sous-clonage de fragments de restriction; le fragment *BamHI* - *SalI* de 4kb sous-cloné par V. Coquette (1988) se montre capable de compléter la mutation *pho81*. De cette façon, la taille du fragment contenant le gène *PHO81* a été réduite de 7kb à 4kb (voir Fig. III 12.).

Nous disposons ainsi d'un indice nous permettant de cerner plus précisément le gène *PHO81*. En effet, les fragments *MluI* - *SalI* de pJV3 et *BamHI* - *SalI* de pJV4 complètent alors que le fragment de pJV3 limité par les sites *SphI* qui a été sous-cloné précédemment ne complète pas la mutation *pho81*. On en déduit (voir Fig III 13.) que le petit fragment p est nécessaire à la complémentation.

Le petit fragment d'insert (p) entre le site *SphI* et *SalI* de pJV3 contient donc l'extrémité du gène *PHO81*.

La suite du travail consiste à construire, à partir du fragment *BamHI* - *SalI* de 4kb des sous-clones destinés au séquençage.

## III. OBTENTION DE SOUS-CLONES EN VUE DU SEQUENCAGE.

### A. Choix de la stratégie.

Nous avons choisi une stratégie qui vise à réduire le plus possible la taille du segment à séquencer. L'objectif étant de débiter le séquençage juste en amont des signaux promoteurs ou juste en aval du signal terminateur de transcription du gène *PHO81*.

### B. Principe de la stratégie.

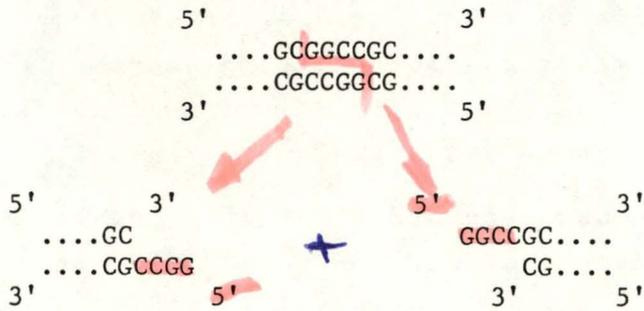
#### 1. Réduction de taille du fragment de 4kb:

Nous disposons du vecteur Bluescript commercialisé par la firme Stratagene, permettant de diminuer la taille des fragments qu'on y clone puis de les séquencer.

En effet, ce vecteur Bluescript (BS) possède une batterie de sites de clonage particulière (voir Fig. III 14.).

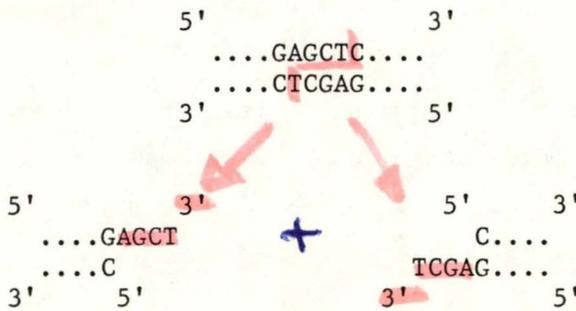
Fig. III 16. a. Exemples de sites de restriction  
 - à extrémités protrudantes 5' : site 5'

Not I

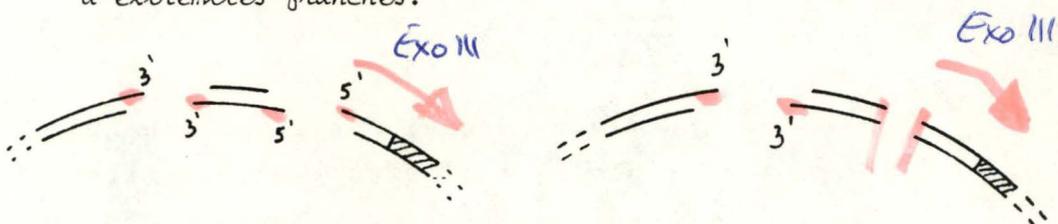


- à extrémités protrudantes 3' : site 3'.

Sac I



b. double restriction: sites 3' et 5' ou site 3' et site à extrémités franches.



== : matrice de BS

//// : insert

Exonuclease III 3' → 5'

- 5' protrudant
- franc

Les sites de restriction centraux permettent d'insérer un fragment: le vecteur est clivé par une enzyme de restriction en un de ces sites de façon à produire des extrémités compatibles avec celles du fragment à cloner puis il est ligué à ce fragment (voir Fig. III 15).

Le vecteur BS contenant dès lors ce fragment dans sa batterie, est dit "recombinant".

Les sites centraux sont entourés de sites de restriction à extrémités protrudantes 5' suivies de sites de restriction à extrémités protrudantes 3'.

Le vecteur BS recombinant subit alors une double restriction: il est soumis à une enzyme coupant en un site 5' ou en un site à bouts francs et à une autre, coupant en un site 3'; les deux sites étant situés du même côté du fragment inséré (voir Fig. III 16.).

#### Principe de la délétion progressive.

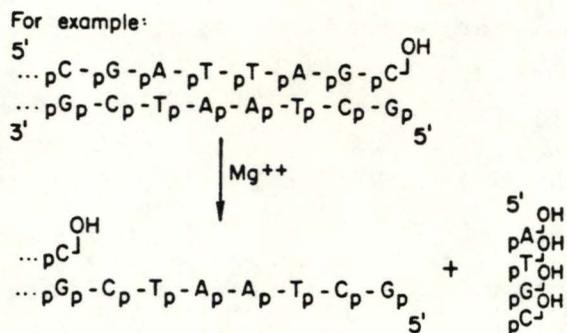
Le vecteur ainsi clivé est soumis à l'action de l'exonucléase III.

Cette enzyme dégrade un brin d'ADN dans le sens 3' vers 5' à partir d'une extrémité 5' protrudante ou d'une extrémité à bouts francs.

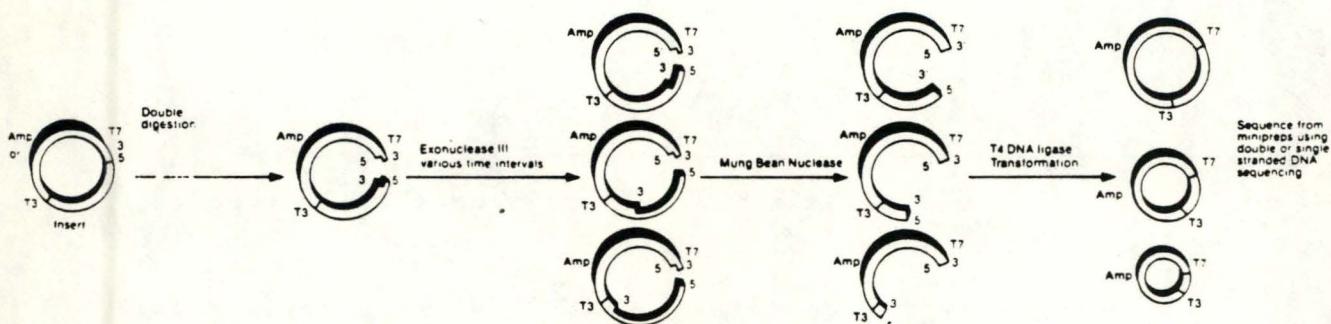
Il s'ensuit une dégradation progressive de la courte séquence de la batterie de restriction précédant le fragment puis de celui-ci tandis que la matrice BS est elle, protégée par l'extrémité 3' protrudante (voir Fig. III 17a.).

En fonction de la température et du temps de réaction, l'enzyme dépolymérise le brin d'ADN sur une longueur plus ou moins grande.

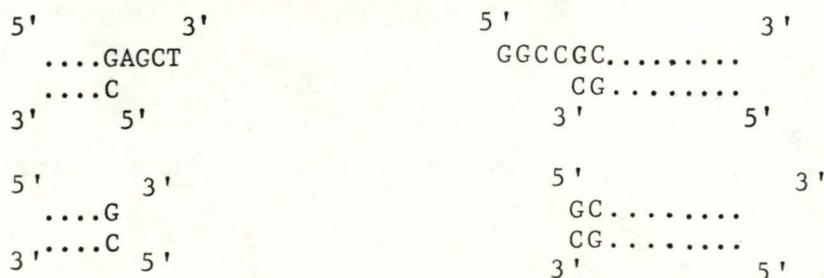
Fig. III 17.a. L'exonucléase III catalyse la dépolymérisation du brin d'ADN dans le sens 3' → 5'.



b. Obtention de délétants progressifs par l'utilisation de l'exonucléase III et de la mung bean nucléase.



c. La mung bean nucléase dégrade les extrémités monocaténaire produisant 2 extrémités franches.



En prélevant des échantillons du mélange réactionnel à intervalles réguliers, en stoppant la réaction, on obtient des vecteurs dont un brin est dépolymérisé sur une distance de plus en plus grande à partir de l'extrémité protrudante 5' (ou franche) (voir Fig. III 17b.).

Le brin monocaténaire subsistant après l'action de l'exonucléase III est dégradé par la Mung Bean nuclease, enzyme ne dépolymérisant que les brins monocaténaires générant de la sorte deux extrémités franches (voir Fig. III 17c.)

Les vecteurs obtenus sont refermés sur eux-mêmes (ligation). Ils sont bien porteurs d'inserts de plus en plus petits (leur taille diffère d'environ 200bp) et sont appelés des délétants. Le procédé permettant de les obtenir est appelé délétion progressive.

## 2. Analyse des délétants.

Les premiers délétants contiennent, précédant le gène, une grande portion de séquence étrangère au gène. Au fur et à mesure que les délétions augmentent, la taille de cette portion diminue jusqu'à arriver au gène en le préservant néanmoins intègre.

Puis pour les délétants suivants, une partie amont de plus en plus étendue de gène est absente.

Parmi les délétants progressifs obtenus, il faut déterminer celui chez qui la délétion s'est arrêtée le plus près possible du gène sans porter atteinte à l'intégrité de son unité transcriptionnelle. Autrement dit, le gène contenu dans le fragment réduit du délétant, doit rester fonctionnel. Le gène qui nous préoccupe est le gène *PHO81*. Nous possédons un test fonctionnel pour ce gène: il consiste à vérifier si le délétant est encore capable de compléter la souche de levure portant la mutation *pho81* (VD33d). A cette fin, nous devons transformer des cellules de cette souche avec chaque délétant, contrôler la capacité de complémentation des délétants en testant l'activité phosphatase acide des transformants en conditions de dérèpression (faible concentration extérieure en  $P_i$ ).

mont  
de l'insert  
ou gène selon mutations  
de l'insert!

Le séquençage débutera par le dernier délétant capable de restaurer l'activité phosphatase acide.

### 3. Construction d'un vecteur navette levure-bactérie.

Le test fonctionnel du gène *PHO81* nécessite le passage des délétants dans la levure. Or, le plasmide BS, matrice contenant les inserts délétés, est un vecteur bactérien; il porte une origine de répllication lui permettant de se répliquer dans *E. coli* mais il ne porte pas d'origine de répllication de *S. cerevisiae*. La seule façon pour lui de se maintenir dans cette levure est de s'intégrer dans son génome. La transformation par intégration se fait cependant à un taux très faible.

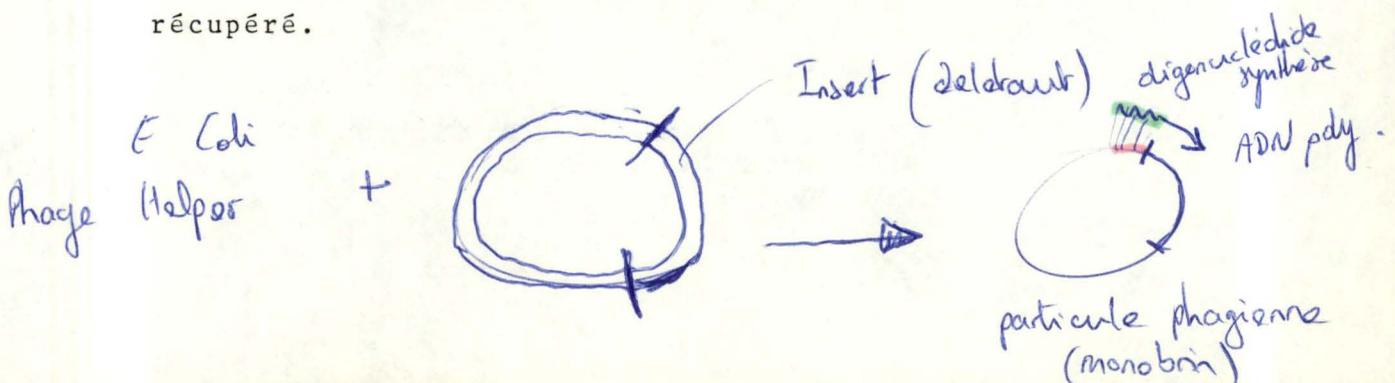
Pour augmenter l'efficience de transformation d'un facteur 10.000 environ, nous nous proposons d'insérer dans le vecteur BS une origine de répllication pour la levure: le fragment nommé 2 $\mu$  du plasmide 2 $\mu$  de *S. cerevisiae*. Afin de pouvoir sélectionner les transformants, nous introduirons également dans BS un marqueur de sélection pour la levure, l'allèle sauvage du gène *URA3*. La souche transformée étant auxotrophe pour l'uracile (*ura3*), les transformants seront sélectionnés sur milieu déficient en uracile.

### 4. Utilisation des délétants.

Le dernier délétant à préserver l'intégrité de l'unité de transcription de *PHO81* ainsi que les délétants suivants sont utilisés pour le séquençage.

Auparavant, des cellules d'une souche *E. coli* infectée par un phage helper seront transformées par chacun des délétants. La présence du phage helper dans la cellule et de l'origine de répllication du phage  $\phi$ 1 dans la matrice BS du délétant permettra l'exportation du délétant sous forme de particule phagienne. Cette particule ne contient qu'un des brins d'ADN du vecteur délétant.

L'ADN monocaténaire de chacun de ces délétants est récupéré.



brin monocaténaire récupéré: <sup>Sac I</sup> ...CCGCTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTAGTGGTATTACAAATTCAGTCGCCGCTTTTAC 3  
 3 GATATCACTCAGCATAA 5 3 TGACCCGGCAGCAAATG 5  
 TT PRIMER M13 20 PRIMER

Fig. III 18. L'amorce T<sub>7</sub> ou l'amorce M13 -20 sont utilisables; elles s'hybrident en aval de SacI.

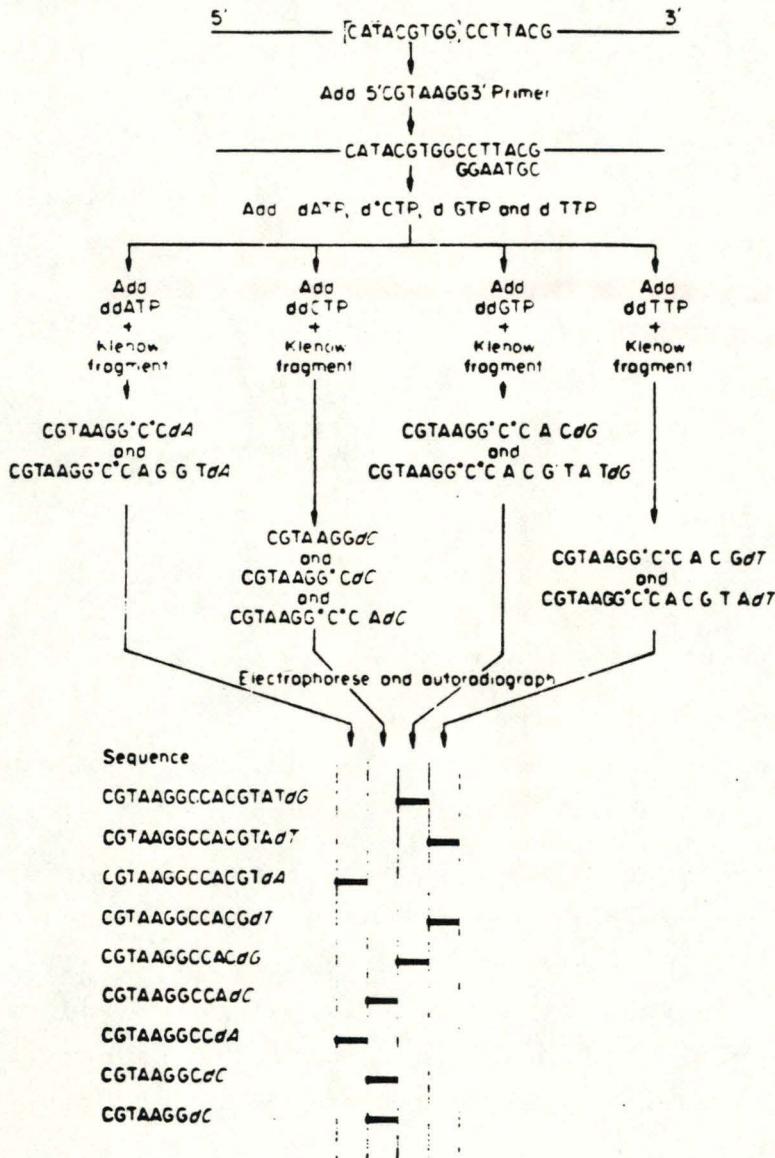


Fig. III 19. Principe du séquençage selon la méthode au didéoxynucléotide de Sanger.

Le brin d'ADN est hybridé à un oligonucléotide de synthèse. Celui-ci est en fait complémentaire d'une séquence de BS située directement avant (ou après) la batterie de sites de clonage (voir Fig. III 18.). Il est utilisé comme amorce pour l'ADN polymérase. La méthode de séquençage à utiliser est en effet celle de Sanger (1978).

L'ADN polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir de l'amorce et ce dans un mélange réactionnel contenant les quatre désoxyribonucléotides dont l'un est radioactif (A,T,C,G) mais aussi un des quatre didésoxyribonucléotides.

Lorsque l'ADN polymérase incorpore un didésoxyribonucléotide, la synthèse s'arrête; le didésoxyribonucléotide ne possédant pas d'hydroxyle en 3' ne peut former une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant.

Pour chaque vecteur, quatre mélanges de polymérisation sont utilisés.

| Mélange réactionnel              | A                                         | T                                         | C                                         | G                                         |
|----------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| désoxyribonucléotides présents   | dAPT<br>dTTP<br>dCTP <sup>*</sup><br>dGTP | dATP<br>dTTP<br>dCTP <sup>*</sup><br>dGTP | dATP<br>dTTP<br>dCTP <sup>*</sup><br>dGTP | dATP<br>dTTP<br>dCTP <sup>*</sup><br>dGTP |
| didésoxyribonucléotides présents | ddATP                                     | ddTTP                                     | ddCTP                                     | ddGTP                                     |

\* : marqué ou S<sup>35</sup> .

Les proportions des constituants sont telles que, statistiquement, à chaque nucléotide (de la séquence complémentaire du didésoxyribonucléotide présent), s'arrête la synthèse d'au moins une molécule d'ADN monocaténaire (voir Fig. III 19.).

Pour chaque mélange, les brins radioactifs de longueur variable ainsi synthétisés sont déposés dans des puits voisins d'un gel de polyacrylamide et séparés suivant leur taille par électrophorèse.

L'analyse de l'autoradiographie du gel séché permet d'établir la séquence des 300 nucléotides (environ) en aval de la portion complémentaire de l'amorce (voir Fig. III 18.). Pour chaque délétant, seule la séquence des 300 premiers nucléotides sera obtenue. Or, la différence de taille entre un délétant et le suivant étant d'environ 200bp, si on superpose les résultats de séquence obtenus, d'un délétant au suivant, les séquences devraient se chevaucher sur environ 100b .

Ainsi, la séquence du gène entier peut être établie.

C. Logique de la construction de vecteurs permettant l'obtention, l'analyse fonctionnelle et le séquençage de délétants.

Nous débuterons cette construction par l'insertion dans BS du fragment  $2\mu$  et du gène *URA3* de Yep24.

Dans ce nouveau vecteur, appelé BS-URA- $2\mu$ , nous clonons le fragment *BamHI - SalI* de 4kb contenant le gène *PHO81*.

*BamHI - BamHI (g p. 102)*

1. Sites de restriction utilisables lors des délétions.

Le vecteur BS contenant  $2\mu$ , *URA3* et le fragment de 4kb devra être restreint en deux sites uniques localisés dans la batterie du même côté de l'insert de 4kb, avant d'être soumis à l'action de l'exonucléase III; ces sites libérant une extrémité protrudante 3' pour l'un et protrudante 5' ou franche pour l'autre.

Chacun de ces sites doit être unique sinon lors de la restriction un ou des fragments de la construction seront perdus. Ces sites appartenant à la batterie de sites de clonage de BS sont donc uniques dans la matrice BS.

Les sites utilisables devront donc être absents à la fois du fragment  $2\mu$  du gène *URA3* et de l'insert de 4kb.

Nous disposons de la séquence et de la liste des sites de restriction du fragment  $2\mu$  et du gène *URA3*. Nous les consultons pour déterminer quels sites de la batterie sont absents de ces deux séquences.

Les données pour l'ensemble des sites de la batterie sont reprises dans le tableau ci-dessous:

Les sites uniques de la batterie sont les suivants:

|                 |                         | <u>2μ</u> | <u>URA3</u> | <u>insert de 4kb</u> |
|-----------------|-------------------------|-----------|-------------|----------------------|
| <u>côté 1</u>   |                         |           |             |                      |
| sites 3'        | <i>SacI</i>             | -         | -           | - (pl)               |
|                 | <i>BstXI</i>            | -         | -           |                      |
| sites 5'        | <del><i>SacII</i></del> | -         | -           |                      |
|                 | <i>EagI</i> ?           | -         | -           |                      |
|                 | <i>NotI</i>             | -         | -           |                      |
|                 | <i>XbaI</i>             | +         | -           |                      |
|                 | <i>SpeI</i>             | +         | -           |                      |
| insert          | <i>BamHI</i>            | ⊖         | ⊖           | -                    |
| sites francs    | <i>SmaI</i>             | -         | +           | +                    |
| <u>côté 2</u>   |                         |           |             |                      |
| sites 3'        | <i>KpnI</i>             | -         | -           | +                    |
|                 | <i>ApaI</i>             | -         | +           | +                    |
| sites 5'        | <del><i>DraII</i></del> | +         | +           |                      |
|                 | <i>XhoI</i>             | -         | -           | +                    |
|                 | <del><i>AccI</i></del>  | +         | +           |                      |
|                 | <i>HincII</i> ?         |           |             |                      |
|                 | <i>SalI</i>             | -         | -           | -                    |
|                 | <del><i>ClaI</i></del>  | -         | -           |                      |
| sites francs    | <i>HindIII</i>          | ⊕         | ⊖           | +                    |
|                 | <i>EcoRV</i>            | -         | +           |                      |
| <u>centraux</u> |                         |           |             |                      |
|                 | <i>EcoRI</i>            | ⊖         | ⊖           | +                    |
|                 | <i>PstI</i>             | +         | +           |                      |

Nous connaissons également l'existence de certains sites de restriction dans le fragment de 4kb à partir de la carte de restriction du fragment de 7kb. De plus, des restrictions précédentes du vecteur contenant le sous-clone de 4kb montrent la présence dans cet insert des sites *KpnI*, *XhoI* et *HindIII*.

Signalons que l'utilisation de l'enzyme *SacII* est déconseillée. L'extrémité protrudante qu'elle produit ne comporte que deux nucléotides et ne protège pas le vecteur d'une digestion par l'exonucléase III. Nous n'utiliserons pas *SacII*.

Il apparaît directement qu'aucun site à extrémité protrudante 3' ne peut être utilisé du côté 2.

Les délétions ne peuvent donc pas s'effectuer à partir de ce côté de la batterie. Du côté 1, les sites à extrémité protrudante 3' *SacI* et *BstXI* et les sites à extrémité protrudante 5' *NotI* et *BamHI* et *SalI* sont absents des 2 fragments.

- Hind III → URA3 (Yep24)
- EcoRI → 2μ (Yep24)
- BamHI → insert 4 kb



- SacI → 3' protrudant
- NotI → 5' protrudant

Pistes 1: pJV8 restreint par BstXI et EcoRI  
 2: marqueur de taille λ HindIII

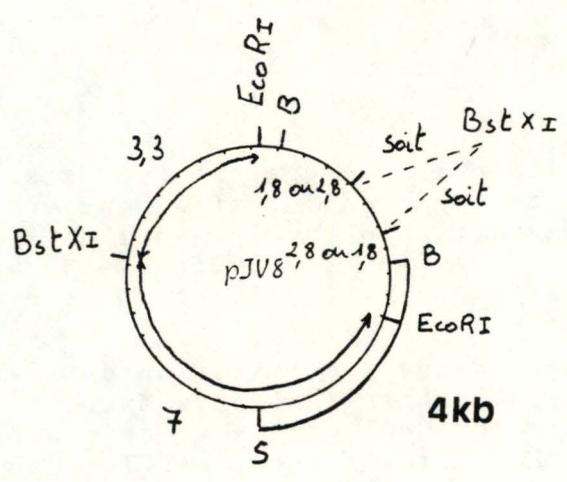


Fig. III 20. Résultats de la restriction de pJV8 par EcoRI et BstXI;  
 B: BamHI; S: SalI  
 le site BstXI est externe au fragment de 4kb.

Nous ne possédons pas d'information quant à la présence de *EagI*.

Il nous faut déterminer maintenant lesquels de ces sites sont absents du fragment de 4kb.

La double restriction de pJV8 par *EcoRI* et *BstXI* montre que *BstXI* ne coupe pas le fragment de 4kb (voir Fig. III 20.). La matrice du vecteur portant le sous-clone de 4kb contient les sites uniques *NotI* et *SacI*. La restriction du sous-clone par chacune de ces enzymes ne donne qu'un unique fragment de restriction de la taille du vecteur, indiquant qu'aucune des deux enzymes ne clive l'insert de 4kb.

Nous disposons donc de deux sites uniques à extrémité cohésive 3': *SacI* et *BstXI* ainsi que des sites uniques à extrémité cohésive 5' *NotI*, *BamHI* et *SalI*.

Cependant, les sites *BstXI* et *NotI* se chevauchent dans la batterie, une restriction par *BstXI* éliminerait le site *NotI*. Nous n'utiliserons donc pas l'enzyme *BstXI*.

## 2. Sites et ordre d'insertion du fragment 2 $\mu$ , du gène *URA3* et de l'insert de 4kb dans le vecteur Bluescript

Ces trois segments sont insérés dans la batterie de sites de clonage de BS.

Le gène *URA3* provenant de YEp24 est limité par les sites de restriction *HindIII* et est inséré au site *Hind III*.

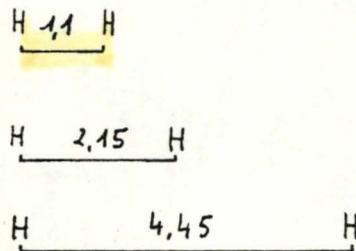
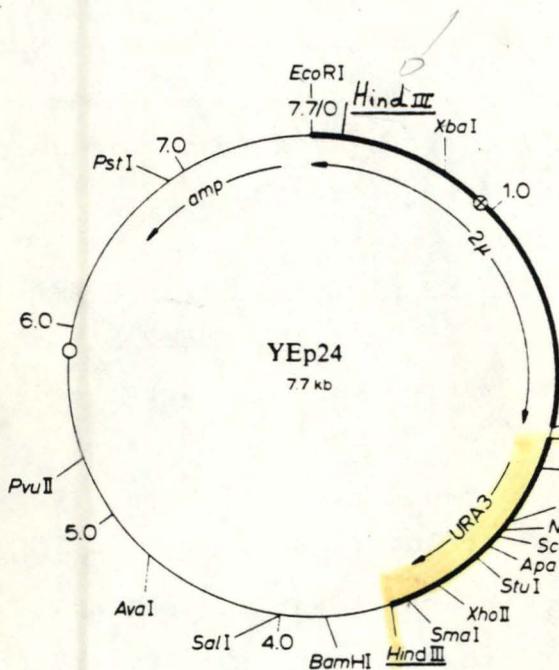
Les sites *EcoRI* entourent le fragment 2 $\mu$  de YEp24 permettant son introduction au site *EcoRI*. Le fragment de 4kb est inséré au site *BamHI*. Ainsi après restriction de ce nouveau vecteur par *SacI* et *NotI*, l'insert de 4kb sera soumis à l'action de l'exonucléase III alors que les segments 2 $\mu$  et *URA3* resteront intacts.

L'ordre d'insertion des trois segments est déterminé de la façon suivante: un fragment inséré ne peut porter dans sa séquence aucun des sites utilisés pour l'introduction des fragments suivants.

pistes: 1 2 3



Pistes 1: restriction de pJV8( BS ) par HindIII.  
 2: marqueur de taille: λ HindIII.



restriction par HindIII

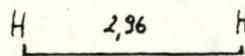
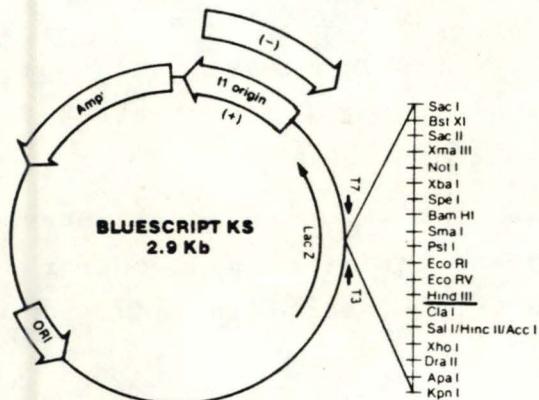


Fig. III 21 a. Fragments issus de la restriction de BS et d' YEp24 par HindIII.

H: HindIII

|      | hords    | inséra. | E | B | Done |
|------|----------|---------|---|---|------|
| URA3 | Hind III | -       | - | - | 1°   |
| ep   | Eco RI   | +       | - | - | 2°   |
| 4kb  | Bam HI   | +       | + | - | 3°   |

Le gène *URA3* ne présentant pas le site *EcoRI* ni de site *BamHI*, sera introduit en premier lieu. Le fragment 2 $\mu$  porte un site *HindIII* mais pas le site *BamHI* alors que l'insert de 4kb porte un site *EcoRI*. Par conséquent, le fragment 2 $\mu$  sera inséré en second lieu et l'insert de 4kb en dernier lieu.

#### D. Mise en oeuvre de la stratégie de construction du vecteur navette.

##### I. Insertion du gène *URA3* dans Bluescript.

Les vecteurs Bluescript et YEp24 utilisés ont été purifiés par gradient en chlorure de césium (maxiprep d'ADN plasmidique).

##### 1. Restriction.

2 $\mu$ g de Bluescript KSM13+ et 2 $\mu$ g de YEp14 sont séparément restreints chacun par 20 unités de l'enzyme *HindIII* dans du tampon medium.

Les mélanges réactionnels sont incubés 2 heures à 37°C.

La restriction de BS entraîne sa linéarisation.

Si la restriction de YEp24 est complète, elle génère 3 morceaux (voir Fig. III 21a).

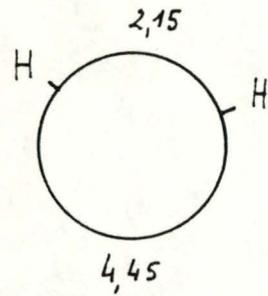
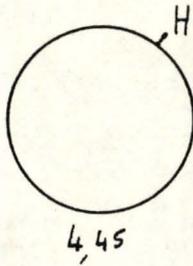
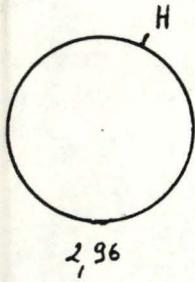
Une fraction du volume de chaque mélange réactionnel est soumise à une électrophorèse en gel d'agarose. Le gel éclairé aux UV permet de visualiser une bande d'ADN correspondant à BS linéarisé ainsi que les trois fragments de restriction de YEp24 indiquant que la restriction est complète.

L'enzyme *HindIII* est alors inactivée par extraction au phénol.

##### 2. Ligation.

Les mêmes quantités pondérales de BS et d'YEp24 restreints sont mises en présence et soumises à l'action d'une unité de T4-DNA ligase pendant une nuit à 14°C. Dans ce mélange de ligation BS (2,95kb) et YEp24 (7,6kb) sont présents dans un rapport molaire de  $\frac{7,6}{2,95} = 2,6$ .

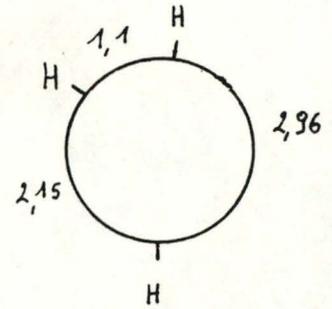
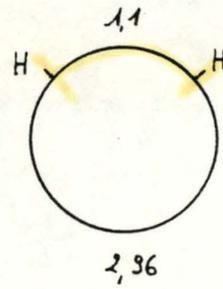
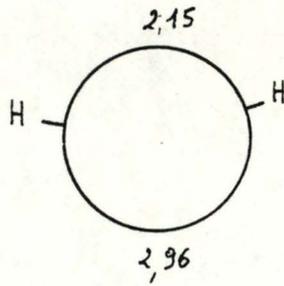
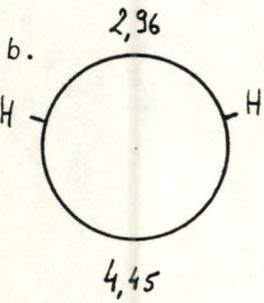
b.



d. 15

10

1



d. 1

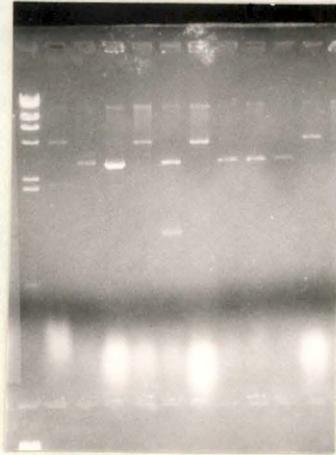
1

2

1

c.

pistes: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Pistes 2: vecteur constitué des fragments de 4,35 et 2,15 kb  
 3,4,8,9,10: BS refermé sur lui-même (2,96 kb)  
 5,7,11: vecteur constitué du fragment de 4,35 kb.  
 6: construction BS-URA  
 1: marqueur de taille:  $\lambda$  HindIII.

Fig. III 21 b. Schéma des constructions obtenues par ligation des fragments de la figure 21 a. c. analyse par électrophorèse de ces constructions d. proportions de ces constructions.

N.B. la taille des vecteurs dessinés n'est pas proportionnelle au nombre de kb qu'ils représentent.

Les diverses associations - par ligation - des fragments présents (3 fragments de YEp24 et BS linéarisé) donnent lieu à différents vecteurs (voir Fig. III 21b); seul nous intéresse le vecteur BS ayant intégré le fragment *HindIII* de 1,1kb contenant le gène *URA3*, plasmide nommé BS-URA.

### 3. Transformation.

La transformation permet d'individualiser et d'amplifier les vecteurs résultant de la ligation.

4 x 10 µl du mélange de ligation sont utilisés pour transformer des cellules XL1-blue compétentes. Elles sont étalées sur milieu sélectif LB+ ampicilline contenant de 1'Xgal et de 1'IPTG.

### 4. Identification des transformants.

Après 12 heures d'incubation à 37°C, apparaissent de petites colonies toutes encore blanches. 48 de ces colonies servent chacune à ensemercer un milieu liquide sélectif de 10ml en barboteur. Après 6 heures d'incubation à 37°C, 1 ml de chaque culture est prélevé et soumis à la méthode de préparation rapide d'ADN plasmidique (miniprep).

Le dixième de l'ADN plasmidique extrait de chaque culture est restreint par trois unités d'enzyme *HindIII* pendant 2 heures à 37°C. Chacun de ces mélanges de restriction est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

Dans le gel placé sous ultra-violet, les fragments de restriction sont visualisés et leur taille évaluée en fonction de leur distance de migration (exemple Fig. III 21c.).

La taille des fragments de restriction permet d'identifier le vecteur contenu dans les cellules de 37 de ces colonies transformantes testées, les quantités d'ADN étant trop faibles dans les 11 autres cultures.

5. Proportions des différents vecteurs construits  
(voir Fig. III 21d.).

Seules subsistent dans une cellule d'*E. coli* les constructions contenant une origine de réplication; celle-ci est apportée soit par le vecteur BS soit par le fragment de 4,45kb d'YEp24.

Il est fréquent qu'un fragment autorépliatif se referme sur lui-même car cela n'implique qu'un événement de ligation. Les vecteurs BS non recombinants et les fragments de 4,45kb d'YEp24 refermés sur eux-mêmes sont par conséquent abondants. Le nombre de moles de BS étant approximativement 2,5 fois plus élevé que celui de YEp24, la proportion de vecteur BS parmi les résultats de la ligation est supérieure à celle du fragment autorépliatif d'YEp24.

L'insertion d'un segment est plus rare car elle implique deux fragments et donc deux événements de ligation. Plus la construction contient de fragments, moins elle est fréquente. Le maximum observé ici est de 3 fragments et ne concerne qu'une colonie. Les molécules de BS étant les plus nombreuses, la ligation de BS avec un fragment d'YEp24 est plus probable que la liaison de fragments d'YEp24 entre eux. Ainsi, on augmente la probabilité d'obtenir la construction BS-URA.

Deux des 48 transformants contiennent le vecteur BS ayant intégré au site *HindIII*, le gène *URA3* de 1,1kb.

II. Insertion du fragment 2 $\mu$  au site *EcoRI* du vecteur BS-URA.

1. Restrictions.

Le plasmide BS-URA obtenu par préparation rapide d'ADN plasmidique est concentré au butanol. Environ 300 ng de ce vecteur sont restreints par dix unités de l'enzyme *EcoRI* dans du tampon high à 37°C pendant 2 heures.

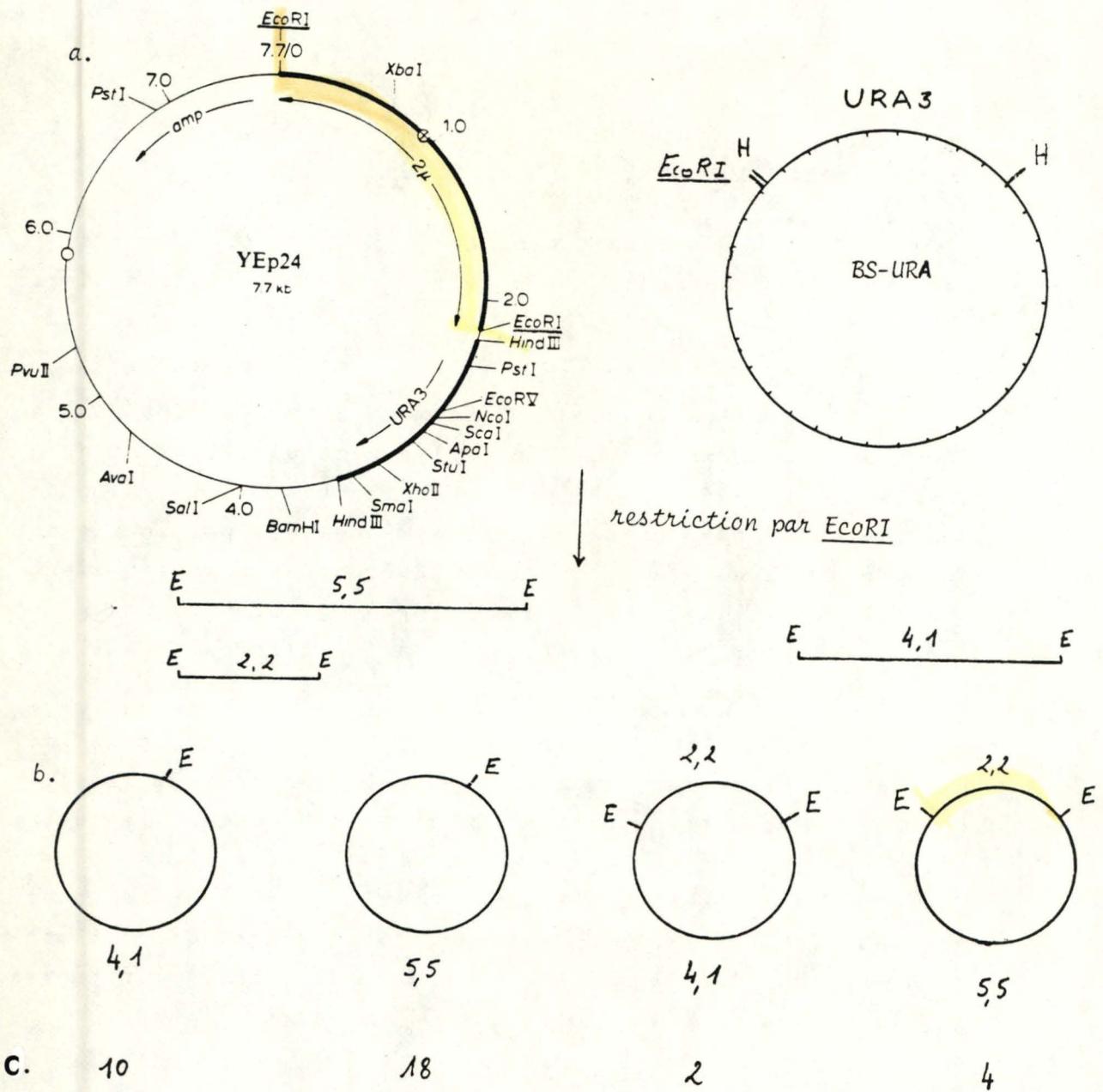


Fig. III 22 a. Fragments issus de la restriction d'YEp24 et de BS-URA par *EcoRI*. b. schéma des constructions obtenues par ligation des fragments.

c. proportions de ces constructions.  
 N.B. H: *HindIII*; E: *EcoRI*.

D'autre part, environ 1,8  $\mu\text{g}$  d'YEp24 sont soumis à 10 unités d'*EcoRI* dans les mêmes conditions. Le vecteur BS-URA est ainsi linéarisé et si la restriction d'YEp24 est complète, elle génère un fragment 2 $\mu$  de 2,2kb et un fragment de 5,5kb (voir Fig. III 22a.)

L'électrophorèse en gel d'agarose d'un échantillon de chaque restriction suivie de l'observation du gel sous UV montre qu'on obtient les fragments attendus et que la restriction est complète.

L'enzyme *EcoRI* est inactivée par une extraction au phénol.

## 2. Ligation.

Le vecteur BS-URA restreint par *EcoRI* et les fragments de restriction *EcoRI* d'YEp24 sont rassemblés dans un mélange de ligation contenant une unité de T4-DNA ligase.

L'incubation se fait à 14°C pendant une nuit.

Les constructions obtenues suite à cette ligation sont répertoriées à la Fig. III 22b. Rappelons que nous cherchons la construction ayant inséré au site *EcoRI* de BS-URA le fragment 2 $\mu$  (nommée BS-URA-2 $\mu$ ).

## 3. Transformation et identification des transformants.

Des cellules XL1-blue compétentes sont transformées avec le mélange de ligation puis étalées sur milieu sélectif LB+Ampicilline. De l'ADN plasmidique est préparé à partir de 34 cultures liquides ensemencées par des colonies transformantes et incubées quelques heures à 37°C.

Le dixième de l'ADN plasmidique correspondant à chacune de ces cultures est restreint par 5 unités d'*EcoRI*.

Chaque mélange de restriction est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose séparant ainsi les fragments de restriction en fonction de leur taille, ce qui permet d'identifier les vecteurs contenus dans les colonies prélevées initialement (voir Fig. 22 c.).

#### 4. Proportion des différents vecteurs construits (voir Fig. III 22d.).

N'ayant obtenu dans l'expérience précédente que deux colonies contenant BS-URA parmi 37 testées, nous avons inversé les proportions entre le vecteur receveur BS-URA et le vecteur donneur YEp24. Le rapport molaire entre YEp24 et BS-URA est de 3,3. Cependant, dans ces conditions, nous obtenons un grand pourcentage de fragments autoréplicatifs d'YEp24 (5,5kb) refermés sur eux-mêmes. En fait, la probabilité de reconstituer le plasmide YEp24 est supérieure à celle d'insérer le fragment  $2\mu$  dans BS-URA.

Nous n'obtenons à nouveau que deux constructions BS-URA- $2\mu$  sur 34 candidats.

Dans les deux étapes de construction qui viennent d'être décrites, nous avons envisagé de mettre en présence lors de la ligation, le vecteur receveur (matrice) et un excès d'insert isolé de(s) l'autre(s) fragment(s) de restriction d'YEp24 par une extraction de gel.

En effet, cette procédure augmente notablement la probabilité d'obtenir la construction attendue. Cependant, la méthode d'extraction testée jusque là n'avait qu'un faible rendement.

Par la suite, nous avons utilisé un autre protocole d'extraction (Méthode de Dretzen) bien plus performant quant à la quantité d'ADN récupéré.

### III. Orientation du gène *URA3* et du fragment $2\mu$ dans le vecteur Bluescript.

Nous connaissons la localisation des sites de restriction *EcoRV* sur le fragment *URA3* et sur BS et *XbaI* sur le fragment  $2\mu$  et sur BS.

Nous utilisons 10 unités de *XbaI* pour restreindre environ  $1\mu\text{g}$  de vecteur BS-URA- $2\mu$ . Dans une autre mixture réactionnelle environ  $1\mu\text{g}$  BS-URA- $2\mu$  est restreint par *PvuII*, puis, après ajustement du tampon, par *EcoRV*.

1 2 3



|           |       |
|-----------|-------|
| $\lambda$ | 23 kb |
|           | 9.4   |
|           | 6.6   |
|           | 4.9   |
|           | 2.3   |
|           | 2.0   |
| $\phi$    | 1.1   |
|           | 0.77  |
|           | 0.61  |

Pistes 1:) BS-URA-2 $\mu$  restreint par ( PvuII et EcoRV  
 3:) XbaI  
 2: marqueur de taille:  $\lambda$  HindIII /  $\phi$ X174 HincII

→ 3  
 → 2

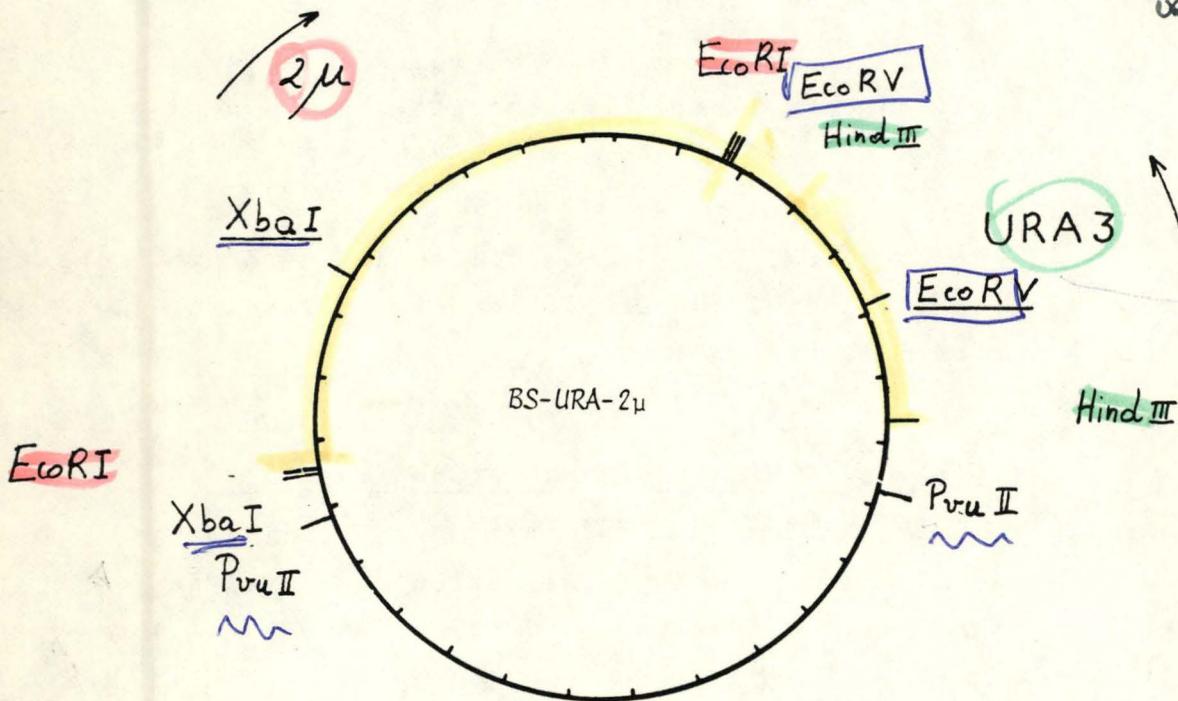
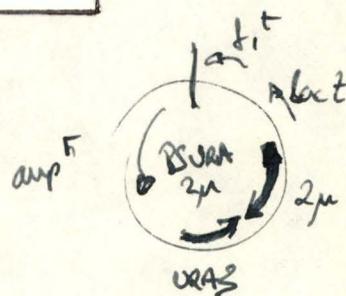


Fig. III 23. Restrictions de BS-URA-2 $\mu$  afin de déterminer l'orientation de 2 $\mu$  et de URA3.

Après restriction, les mixtures sont soumises à une électrophorèse en gel d'agarose; ce gel est photographié sous lumière ultra-violette. D'après la taille des fragments de restriction évaluée sur ce gel, on déduit l'orientation des fragments (voir Fig. III 23.).

Le gène *URA3* est orienté dans le même sens que le gène *lacZ* alors que le fragment  $2\mu$  est orienté en sens inverse.

#### IV. Test de la fonctionnalité du vecteur BS-URA- $2\mu$ .

Nous avons vérifié que le plasmide BS-URA- $2\mu$ , par la présence du fragment  $2\mu$ , est capable de se maintenir dans des cellules de levure et que, sous l'action du gène *URA3*, il confère à une souche mutante *ura3* transformée par ce plasmide la capacité de croître sur milieu dépourvu d'uracile.

#### Transformation de la souche VD33d.

Cette souche porte notamment la mutation *ura3*.

Après avoir rendu des cellules de cette souche compétentes, nous en transformons différents échantillons par 450 ng d'YEp24, par 600 ng de BS-URA- $2\mu$  et par 20 ng de BS-URA (ces quantités sont approximatives).

Les cellules de chaque échantillon sont étalées sur milieu minimum (dépourvu d'uracile).

Après deux jours de croissance à 30°C apparaissent 24 transformants YEp24 et 9 colonies à partir des cellules transformées par BS-URA- $2\mu$ .

Nous n'observons aucun transformant BS-URA; le taux de transformation est très faible car il doit s'intégrer dans le génome pour se maintenir dans la levure.

Les colonies transformantes contenant BS-URA- $2\mu$  montrent que ce vecteur se maintient dans les cellules de levure et leur confère la capacité de synthétiser de l'uracile.

Les quantités molaires de BS-URA-2 $\mu$  et de YEp24 utilisées pour la transformation étaient dans un rapport d'environ 1.

Nous obtenons plus de colonies transformées par YEp24 que par BS-URA-2 $\mu$  mais le taux de transformation de BS-URA-2 $\mu$  est du même ordre de grandeur que celui d'YEp24: BS-URA-2 $\mu$  transforme avec beaucoup plus d'efficacité qu'un vecteur d'intégration; le fragment 2 $\mu$  lui permet de se multiplier dans la levure.

Notre construction BS-URA-2 $\mu$  est donc fonctionnelle dans l'hôte levure.

#### V. Les cellules XL1-blue transformées par BS-URA concervent une activité $\beta$ galactosidase.

Le vecteur BS natif en transformant une cellule XL1-blue y restaure, en conditions industrielles, l'activité  $\beta$  galactosidase, grâce au peptide  $\alpha$  pour lequel il code. h

La  $\beta$  galactosidase dégrade l'Xgal du milieu, générant un composé colorant la colonie en bleu.

Normalement, en insérant un fragment d'ADN dans un site de la batterie de BS, le gène lacZ' codant pour le peptide  $\alpha$  est disrupté. Les cellules transformées par un tel vecteur recombinant n'ont pas d'activité  $\beta$  galactosidase et cultivées en présence d'Xgal (et de l'inducteur IPTG), elles restent blanches.

Ce test coloré aurait dû nous permettre de discriminer les clones recombinants et les clones BS non recombinants.

Cependant, les cellules transformées par le vecteur BS ayant intégré le gène *URA3* au site *HindIII* de sa batterie donnent lieu à des colonies bleues sur milieu contenant de l'Xgal et de l'IPTG. Un peptide  $\alpha$  capable de restaurer l'activité  $\beta$  galactosidase, est donc synthétisé à partir de ce vecteur recombinant.

A partir du gène lacZ' interrompu par un fragment de 1,1kb, les systèmes de transcription et de traduction parviennent à synthétiser une protéine capable de remplir sa fonction.



La machinerie de transcription de *E. coli* synthétise souvent un ARN messager codant pour plusieurs protéines nommé ARNm polycistronique. Dans BS, le promoteur de l'opéron lactose situé en amont du gène *lacZ'* est reconnu par l'ARN polymérase qui y initie la transcription. Elle parcourt l'ADN jusqu'au site terminateur constitué de deux séquences inversément répétées. L'ARN polymérase qui commence à transcrire le gène *lacZ'* pourrait poursuivre dans le gène *URA3* qu'elle copierait, puis elle transcrirait la fin de *lacZ'*, ceci à condition qu'il n'y ait pas de séquence homologue à un terminateur procaryote dans le gène *URA3*. On peut imaginer que l'ARNm polycistronique ainsi synthétisé soit traduit par la machinerie de synthèse protéique. Un ribosome initiant la traduction au codon correspondant à l'ATG du gène *lacZ'* sera arrêté par le codon STOP correspondant au TGA des bases 40 à 42 du gène *URA3*.

En effet, en examinant la séquence de BS et du gène *URA3*, au site d'insertion, on voit que le gène *lacZ'* est en phase avec le codon STOP TGA. (voir Fig. III 24.). De plus, à la fin du gène *URA3*, 2 ATG (positions 1121-23 et 1133-35) sont en phase avec la suite du gène *lacZ'* et au delà de ces ATG on ne trouve plus dans le gène *URA3* de codons STOP en phase.

Un ribosome pourrait peut-être initier la traduction à un AUG (correspondant à un de ces ATG) et donner lieu à une protéine de fusion entre 10 ou 14 acides aminés codés par l'extrémité de *URA3* et les acides aminés codés par le gène *lacZ'* au-delà du site *HindIII*.

Selon une autre hypothèse, cette protéine pourrait être synthétisée à partir d'un ARNm monocistronique transcrit par l'ARN polymérase à partir d'une séquence interne au gène *URA3*, homologue à un promoteur procaryote.

Dans les deux hypothèses, la protéine de fusion serait synthétisée et serait capable, comme le peptide  $\alpha$ , de complémentation intragénique avec la  $\beta$  galactosidase inactive de XLI-blue pour produire une  $\beta$  galactosidase active. (voir Matériels et Méthodes.) Pourtant, il manquerait à cette

protéine les 31 premiers acides aminés du peptide  $\alpha$  qui seraient remplacés par 10 à 14 acides aminés du fragment *URA3*. Il est possible que ces premiers acides aminés soient inutiles à la fonction du peptide  $\alpha$  ou s'ils avaient un rôle celui-ci pourrait être rempli par les 10 à 14 acides aminés remplaçants.

La complémentation intragénique se ferait entre 2 molécules - la  $\beta$  galactosidase inactive native et la protéine de fusion - ou par interaction avec un troisième partenaire, le peptide de 44 acides aminés codé par le début du gène *lacZ'* (jusqu'au codon STOP).

Lors de la traduction d'un ARNm polycistronique ou monocistronique, le ribosome se lie à une séquence spécifique (Shine Dalgarno) située en amont de l'AUG initiateur. Cette séquence est habituellement localisée entre 5 et 9bp en amont de l'ATG initiateur et compte au moins 2 G, souvent accompagnés d'un A. Si cette séquence est expérimentalement insérée plus loin ou plus près de l'ATG, le taux de traduction diminue.

Dans notre cas, nous relevons la présence de la séquence GG aux sixièmes et septièmes bases en amont du premier ATG potentiel et de la séquence GGAA du douzième au quinzième nucléotides en amont de cet ATG. Une de ces séquences pourrait jouer le rôle de site de liaison pour le ribosome initiant alors la synthèse protéique à l'ATG.

*promoteur* 

Nous vérifions si le promoteur de l'opéron lactose contrôle la transcription du gène responsable de l'activité  $\beta$  galactosidase dans le vecteur BS-URA.

Rappelons que l'expression de l'opéron lactose est empêchée par un répresseur lié à l'opérateur lacO, sauf en présence d'inducteur (IPTG). De plus, le complexe CAP-AMPC active le promoteur lacP quand celui-ci n'est pas lié au répresseur. Ce complexe est actif quand l'AMPC est abondant, c'est-à-dire en milieu pauvre en glucose (0,2 %) (voir Matériels et Méthodes).

Milieu minimum sélectif + 0,2% glucose + Xgal.

Dans beaucoup de vecteurs, l'opérateur est lié au répresseur car l'inducteur IPTG est absent. Mais quelques opérateurs sont libres et permettent l'activation du promoteur par le complexe CAP-AMPC; ce complexe est en effet actif dans ces conditions de faible concentration en glucose (0,2 %).

Les cellules transformées par BS et celles transformées par BS-URA donnent des colonies bleues sur ce milieu; on en déduit que le gène codant pour le peptide  $\alpha$  est transcrit.

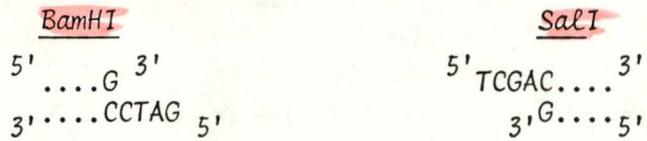
Milieu minimum sélectif + 3% de glucose + Xgal.

Dans les quelques cas où l'opérateur n'est pas lié à un répresseur, le promoteur reste inactif. En effet, dans ce milieu à concentration élevée en glucose (3 %), il n'y a pas de complexe CAP-AMPC actif.

Les colonies transformées par BS ou BS-URA restent blanches. Ceci indique que dans BS le gène codant pour le peptide  $\alpha$  et dans le vecteur BS-URA, le gène codant pour la protéine de fusion peptide  $\alpha'$  sont tous deux sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose. Un messenger polycistronique est donc transcrit à partir du promoteur lac sur le vecteur BS-URA.

Les cellules transformées par BS-URA-2 $\mu$  forment des colonies blanches, sur milieu LB + Xgal + IPTG ainsi que sur les deux milieux évoqués plus haut. L'activité  $\beta$  galactosidase est absente de ces cellules; dans le vecteur BS - URA-2 $\mu$ , le gène lacZ' disrupté ne peut produire une protéine fonctionnelle.

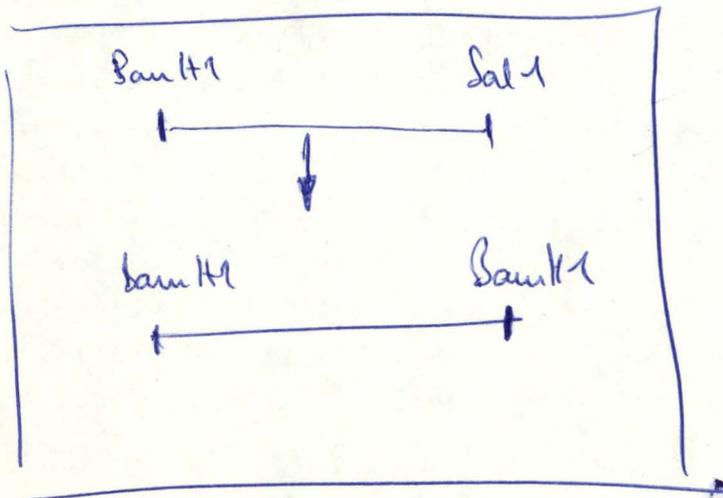
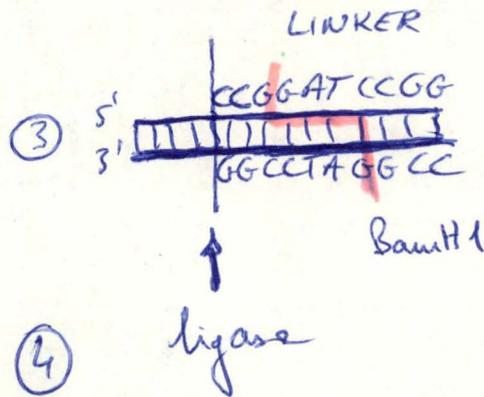
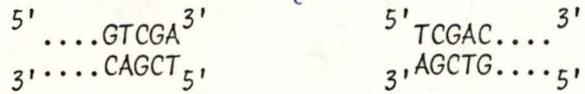
Fig. III 25a. Les extrémités protrudantes de BamHI et SalI sont non complémentaires (incompatibles)



b. ① extrémités de restriction SalI



② filling (ADN polymérase)



E. Insertion de l'insert BamHI - SalI de 4kb dans le vecteur BS - URA-2 $\mu$ .

1. Stratégie de construction.

Le fragment *BamHI - SalI* tel quel ne peut s'insérer au site *BamHI* du vecteur BS - URA-2 $\mu$ , car les extrémités protrudantes *SalI* et *BamHI* n'étant pas complémentaires, elles ne peuvent pas s'apparier (voir Fig. III 25a.).

Pour contourner cet obstacle, nous soumettons le partenaire à insérer à quelques manipulations supplémentaires. L'extrémité *SalI* est soumise à l'action d'une ADN polymérase qui synthétise à partir de l'hydroxyle 3' un brin complémentaire à l'extrémité protrudante; il en résulte une extrémité à bouts francs (voir Fig. III 25b.).

Cette extrémité est liguée à un oligonucléotide synthétique de 10bp contenant un site *BamHI* (linker). La restriction par l'enzyme *BamHI* génère dès lors un fragment *BamHI - BamHI* de 4kb.

Ce fragment est inséré au site *BamHI* du vecteur BS - URA-2 $\mu$ .

En fonction de l'orientation dans laquelle le fragment de 4kb est introduit, on obtient deux vecteurs différents (voir Fig. III 27c.). Des délétants progressifs seront réalisés et testés à partir de ces deux vecteurs.

Dans l'étape de production de la forme monocaténaire des délétants (destinée au séquençage), le brin monocaténaire synthétisé contient chez les délétants de chacun des deux vecteurs, le brin codant du gène de la  $\beta$  galactosidase. Dans les deux vecteurs, la région IG du phage F est en effet orientée dans le même sens M13+ (voir Matériels et Méthodes).

Ainsi, à partir d'un vecteur, le brin codant du gène *PHO81* sera obtenu puis séquencé et à partir du second vecteur, le brin non codant de ce gène, sera produit et également séquencé.

La séquence de ces deux brins doit être complémentaire (brin "Crick" et brin "Watson") offrant une vérification des résultats du séquençage.

## 2. Construction de deux vecteurs BS- URA-2 $\mu$ contenant le fragment *BamHI* - *SalI* de 4kb..

pJV8 est le vecteur donneur du fragment de 4kb, le plasmide pJV8 utilisé a été purifié par gradient de chlorure de césium (maxiprep).

### 1) Restriction par *SalI*.

30  $\mu$ g de pJV8 sont restreints par 80 unités de l'enzyme *SalI* dans du tampon high pendant 4 heures à 37 °C. Un échantillon est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

Dans le gel, on visualise sous U.V. une bande unique d'ADN indiquant que le plasmide a bien été linéarisé, *SalI* étant un site unique (voir Fig. III 26 a.).

L'ADN plasmidique de pJV8 est alors purifié par deux extractions au phénol suivies de trois extractions à l'éther et d'une précipitation à l'éthanol. L'ADN est resuspendu dans de l'eau distillée stérile.

### 2) Filling.

Le plasmide pJV8 restreint, est soumis à l'action du fragment Klenow de l'ADN polymérase, celui-ci remplit les extrémités protrudantes *SalI* d'un certain nombre de vecteurs restreints.

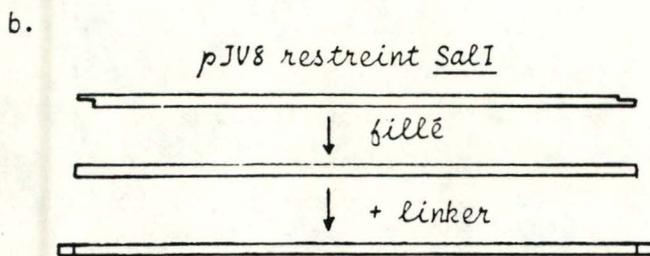
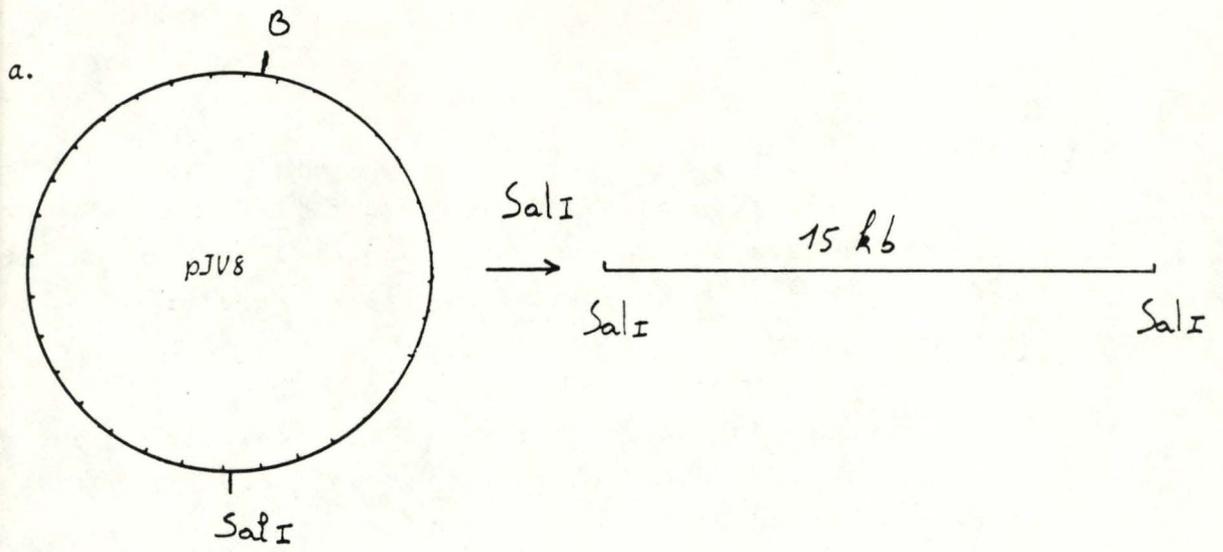


Fig. III 26a. Plasmide pJV8 restreint par SalI

b. Le linker BamHI (oligonucléotide synthétique de 10bp contenant un site BamHI) se lie au vecteur pJV8 fillé.

linker BamHI

d5'.CCGATCCGG.3'  
3'.GGCCTAGGCC.5'd

Après une heure d'incubation, à 14 °C, l'enzyme est dénaturée par extraction au phénol, puis l'ADN est précipité à l'éthanol et resuspendu dans 40 µl d'eau distillée stérile. L'électrophorèse en gel d'agarose d'un échantillon du plasmide suivie de l'observation sous U.V. indique que nous disposons encore de plus de 20 µg de plasmide.

3) Ligation à l'oligonucléotide contenant un site *BamHI* (*linker*).

Le plasmide pJV8 resuspendu est mis en présence de 2,5 µg de linker et d'une unité de T4 DNA ligase dans du tampon de ligation pendant une nuit à 13 °C.

Les linker n'étant pas phosphorylés (extrémités 5'-OH et 3'-OH), la ligase ne peut pas les lier l'un à l'autre.

Parmi les plasmides "fillés", un certain pourcentage se voit adjoindre un linker à une des deux, ou aux deux extrémités (voir Fig. III 26b.).

Le large excès de molécules de linker par rapport aux molécules de plasmide optimalise ce pourcentage.

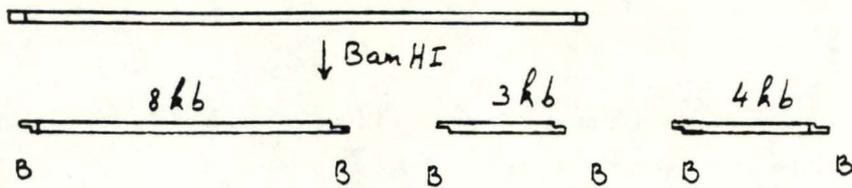
Cette étape est également suivie d'une extraction au phénol inactivant l'enzyme et d'une précipitation à l'éthanol.

4) Restriction par *BamHI*.

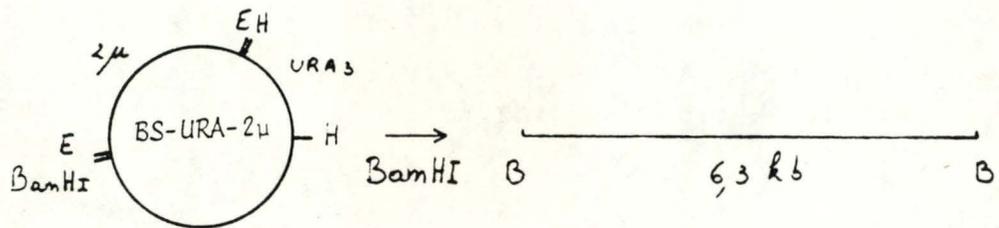
Le plasmide resuspendu est restreint par 25 unités de *BamHI* dans du tampon high pendant 2 heures à 37 °C. Cette restriction génère 3 fragments de 3kb, 4kb et 7,6kb environ.

L'électrophorèse en gel d'agarose d'un échantillon de restriction indique qu'elle est complète (voir Fig. III 27a.)

a. pJV8 linéarisé fillé+ linker



b.



c.

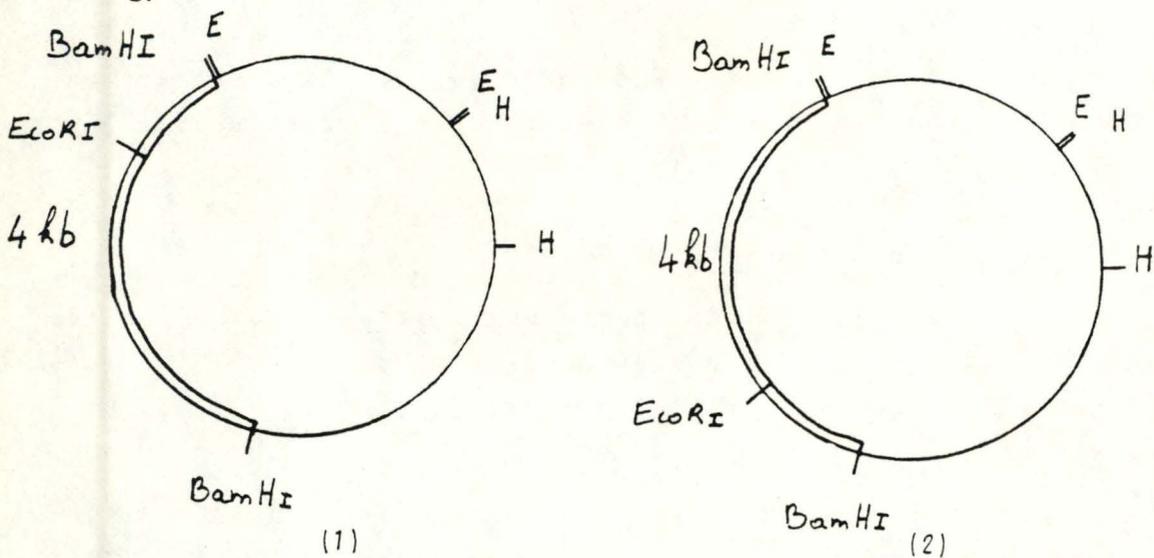


Fig. III 27a. Restriction BamHI de pJV8 coupé SalI après filling et ligation au linker; b. restriction BamHI de BS-URA-2 $\mu$ ; c. insertion du fragment de 4kb dans BS-URA-2 $\mu$ .

5) Extraction de gel.

La totalité du mélange de restriction est déposée dans les puits d'un gel d'agarose. L'électrophorèse est poursuivie jusqu'à ce que les fragments de 3 et 4kb soient suffisamment séparés. Alors, on extrait le fragment du 4kb par la méthode de Dretzen.

Ce fragment de 4kb ainsi isolé des deux autres fragments de restriction est utilisé pour le clonage dans le vecteur BS-URA-2 $\mu$ .

6) Restriction du vecteur BS-URA-2 $\mu$  par *BamHI*.

Le vecteur BS-URA-2 $\mu$  obtenu par préparation rapide d'ADN plasmidique est concentré en butanol. Environ 5  $\mu$ g de BS-URA-2 $\mu$  sont restreints par 30 unités de *BamHI*.

L'électrophorèse d'un échantillon indique que la restriction complète a conduit à linéariser le plasmide (voir Fig. III 27b.).

Le mélange est alors extrait au phénol puis l'ADN est précipité à l'éthanol et resuspendu dans de l'eau distillée stérile.

7) Ligation.

On ajoute à la solution contenant le fragment de 4kb un  $\mu$ g de BS-URA-2 $\mu$  restreint par *BamHI* et on soumet le mélange à une unité de T4 DNA ligase dans du tampon de ligation pendant une nuit à 13°C.

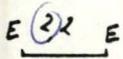
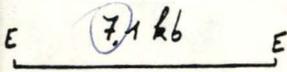
Parmi les fragments de 4kb, ceux qui sont limités par deux extrémités protrudantes *BamHI* peuvent s'insérer dans le vecteur receveur ouvert en *BamHI*.

En fonction de l'orientation d'insertion du fragment, deux vecteurs différents sont construits (voir Fig. III 27c). Certains de ces vecteurs peuvent aussi se refermer sur eux-mêmes.

PAT 721

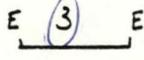
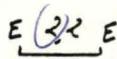
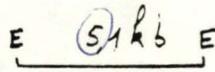
restriction de (1)

d.

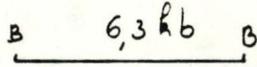


PAT 532

restriction de (2)



e. vecteur



restriction de (1) ou (2)

insert

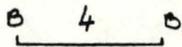
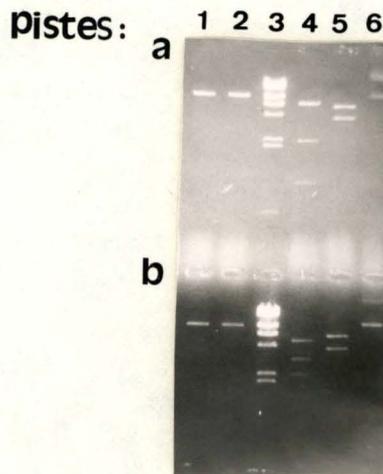


Fig. III 27d. et e. Les 2 vecteurs BS-URA-2 $\mu$  ayant intégré le fragment de 4kb restreints par (d.) EcoRI (e.) BamHI.



Pistes 1: restriction SacI  
 2: " NotI  
 4: restriction EcoRI  
 5: restriction par BamHI  
 6: plasmide non restreint  
 3: marqueur de taille:  $\lambda$  HindIII.  
 a: vecteur (1)      b: vecteur (2)

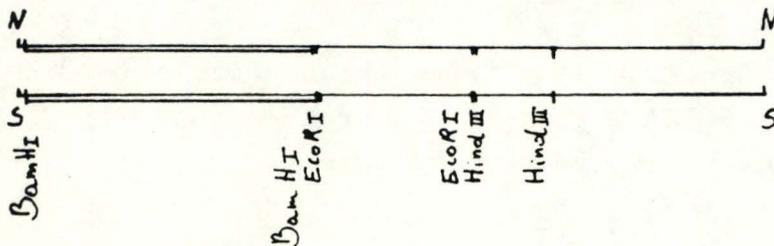


Fig. III 28. Les vecteurs (1) et (2) sont linéarisés par SacI et par NotI.

8) Transformation et identification des clones.

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des cellules XLI-blue compétentes. Ces cellules sont étalées sur milieu sélectif LB + Ampicilline. Les colonies transformantes apparaissent après 12 à 14 heures d'incubation à 37°C. Parmi celles-ci, 48 sont choisies au hasard pour ensemencer chacune un milieu liquide sélectif.

Après 6 à 8 heures d'incubation à 37°C, un ml de chaque culture est prélevé et est utilisé pour l'extraction rapide d'ADN plasmidique. Une fraction de chaque préparation d'ADN est restreinte par 5 unités d'EcoRI. Les fragments issus de chaque restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose et leur taille est évaluée, ce qui permet d'identifier le plasmide contenu dans les cellules de chaque culture.

On isole ainsi deux clones<sup>148!</sup> contenant trois fragments de restriction *EcoRI*: les tailles de ces fragments sont 7kb, 2,2kb et 1kb pour l'un, 5,1kb, 3 kb et 2,2kb pour l'autre. Ces deux clones contiennent au site *BamHI* du vecteur BS-URA-2 $\mu$  le fragment de 4kb inséré dans un sens ou dans l'autre. (voir Fig. III 27d.). La restriction par *EcoRI* permet donc de connaître l'orientation du fragment de 4kb dans le vecteur.

9) Restriction de vérification.

a) Un échantillon de chacun des deux vecteurs est restreint par dix unités de l'enzyme *BamHI*. Dans les deux cas, deux fragments (4kb et 6,3kb) sont obtenus (voir Fig. III 27e.) correspondant à l'insert de 4kb et à la matrice BS-URA-2 $\mu$ .

b) Le principe de la délétion progressive sera appliqué à chaque vecteur. Dans cette perspective, nous avons restreint un échantillon de chacun des deux vecteurs par dix unités de *SacI* et un autre par dix unités de *NotI*. Les deux vecteurs sont linéarisés par chaque enzyme (voir Fig. III 28.); ces deux enzymes reconnaissent donc un seul site de restriction sur chaque vecteur et comme prévu, pourront être utilisées pour restreindre les vecteurs avant que n'agisse l'exonucléase III.

OK

C O N C L U S I O N S   G E N E R A L E S   E TP E R S P E C T I V E S .

Le système régulateur des phosphatases de *S. cerevisiae* de par ses multiples composantes, illustre à souhait la complexité des mécanismes de régulation de l'expression génétique chez la levure mais aussi chez les eucaryotes supérieurs. Pour mettre en lumière les jeux d'interaction entre les partenaires intervenant dans le contrôle de la transcription, il est nécessaire de caractériser ces partenaires.

Ainsi, après les analyses de génétique classique, comprenant leur mapping, les gènes régulateurs font l'objet d'une caractérisation moléculaire. Un de ces gènes de contrôle, le gène *PHO81* codant pour le médiateur, est notre centre d'intérêt.

Notre contribution à son étude débute par son mapping.

Par analyse de tétrades, procédé de génétique classique nous avons localisé le locus *PHO81* sur le bras droit du chromosome VII approximativement à 14,4 cM du marqueur *ade3*, vraisemblablement du côté distal du marqueur *rad2*.

Au cours de cette analyse, la souche Le35 nous a semblé déficiente pour l'activité phosphatase acide. Il pourrait être intéressant d'entreprendre son étude en vue d'éclaircir l'origine de cette déficience. Des croisements entre cette souche et des souches portant des mutations connues de gènes du système phosphatase, permettront peut-être d'identifier l'éventuelle mutation de Le35 à l'une d'elles ou de mettre en évidence l'existence d'un gène supplémentaire dans le système de régulation des phosphatases, gène pour lequel Le35 serait mutée.

Concernant la caractérisation moléculaire du gène *PHO81*, notre travail a débuté par l'établissement de la carte de restriction d'un fragment *BamHI* - *SalI* de 7kb contenant ce gène. Signalons que dans une publication de l'équipe de Yoshida (1987), une brève mention du clonage du gène *PHO81* est faite. Elle est accompagnée d'une carte de restriction rudimentaire du fragment génomique cloné. Les similitudes de localisation de certains sites de restriction pourraient suggérer que nous travaillons sur le même segment génomique. Cependant, d'autres sites sont localisés différemment, nous obligeant à rester prudents, dans l'attente d'informations plus détaillées.

A partir du fragment de 7kb, un sous-clone *BamHI* - *SalI* de 4kb a par ailleurs été obtenu qui s'est avéré contenir le gène *PHO81*.

Ayant opté pour une stratégie de séquençage du gène *PHO81*, nécessitant l'obtention et l'analyse fonctionnelle de délétants progressifs de ce fragment de 4kb, nous avons choisi de construire, à partir du vecteur Bluescript, conçu pour les délétions et du plasmide autorépliquatif de levure YEp24 un plasmide navette *E. coli* - *S. cerevisiae* BS-URA-2 $\mu$  répondant à ces exigences.

Le vecteur chimérique construit, s'est montré apte à transformer et à se maintenir dans une souche de levure

Nous avons alors inséré le fragment *BamHI* - *SalI* de 4kb dans chaque orientation dans ce vecteur BS-URA-2 $\mu$ , obtenant deux vecteurs prêts à fournir des délétants destinés au séquençage.

Notre travail sera donc suivi de l'obtention de délétants à partir de ces deux vecteurs. Ces délétants serviront à transformer des cellules de levure VD33d afin de déterminer leur capacité à compléter la mutation *pho81*.

Dans un des deux vecteurs, l'extrémité promotrice du gène *PHO81* sera ainsi cernée et dans l'autre vecteur la limite terminale de ce gène sera localisée. Nous pouvons déjà prévoir que l'extrémité du gène localisée par l'analyse des délétants du vecteur (2) précédera de peu le site *SphI* situé à 1,5kb de l'extrémité à déléter du fragment de 4kb.

Pour les deux vecteurs, les délétants s'étendant entre les deux limites ainsi déterminées transformeront chacun des cellules XLI-blue infectées par un phage helper. Ainsi, chacun des délétants sera produit sous forme de particule phagienne dont l'ADN monocaténaire sera purifié. Environ 300 bases de chacun de ces brins pourront être séquencées par la méthode de Sanger. Comme les délétants successifs diffèrent de 200bp, en superposant les séquences obtenues, on pourra établir la séquence complète des brins de l'hélice d'ADN constituant le gène *PHO81*. Ces deux séquences devront être complémentaires, nucléotide par nucléotide, si aucune erreur de séquençage n'a eu lieu.

La séquence du gène *PHO81* permettra la localisation de la région codante du gène (phase ouverte de lecture débutant par un ATG), ainsi que la recherche d'éventuelles séquences "promoteur" et "termineur" mais aussi de séquences régulatrices de la transcription.

Dans le même ordre d'idées, il sera possible de rechercher des homologies avec des séquences 5' non codantes de régions promotrices d'autres gènes de levure.

Toujours sur base de la séquence et par mutagenèse dirigée, le rôle régulateur potentiel de ces séquences dans la transcription du gène *PHO81* pourra être étudié.

Quant à la région codante du gène *PHO81*, elle pourrait être utilisée comme sonde qui en s'hybridant aux ARNm de ce gène, permettrait d'étudier son taux de transcription, en condition de répression et de dérèpression dans une souche sauvage ou dans différents mutants de régulation du système phosphatase.

Le modèle de régulation en circuit fermé des phosphatases pourrait ainsi être vérifié.

## B I B L I O G R A P H I E .

- ALLISON, L.A., MOYLE, M., SHALES, M. et INGLES, J. (1985).  
Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and procaryotic RNA polymerases.  
*Cell* 42, 599-610.
- ARNDT, K.T., STYLES, C. and FINK, G.R. (1987).  
Multiple global regulators control HIS4 transcription in yeast.  
*Science* 237, 874 - 880
- BAJWA, W., RUDOLPH, H. et HINNEN, A. (1987).  
PH05 Upstream sequences confer phosphate control on the constitutive PH03 gene  
*Yeast* 3, 33 - 42.
- BERBEN, G., LEGRAIN, M. et HILGER, F. (1988).  
Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene PH02.  
*Gene* 66, 307 - 312.
- BRENT, R. et PTASHNE, M. (1984).  
A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene.  
*Nature* 312, 612 - 615.
- BURATOWSKI, S., HAHN, S., SHARP, P.A. et GUARENTE, L. (1988).  
Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system.  
*Nature* 334, 37 - 42.
- CAVALLINI, B., HUET, J., PLASSAT, J-L., SENTENAC, A., EGLY, J.M. et CHAMBON, P. (1988).  
A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor.  
*Nature* 334, 77 - 80.
- CLEWELL, D.B. (1972).  
*J. Bacteriol.* 110, 667-676.
- COQUETTE, V. (1988).  
Contribution au clonage, à la caractérisation physique et au sous-clonage dans un vecteur Bluescript aménagé du gène PH081 de levure.  
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques.
- DRETZEN, G., BELLARD, M., SASSONE-CORSI, P. et CHAMBON, P. (1981).  
A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels.  
*Anal. Biochem.* 12 295-298.
- GILLIQUET, V., LEGRAIN, M. et HILGER, F. (1987).  
Sequence of the region 5' to the negative regulatory gene PH080 of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Nucl. Ac. Res.* 15, 5893.

- GINIGER, E. et PTASHNE, M. (1988).  
Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 382 - 386.
- GINIGER, E. et PTASHNE, M. (1987)  
Transcription in yeast activated by a putative amphipathic  $\alpha$  helix linked to a DNA binding unit.  
*Nature* 330 670 - 672.
- GLUECKSOHN - WAELSCH, S. (1987).  
Regulatory genes in development.  
*TIG* 3, 123 - 127.
- GUARENTE, L. (1988).  
UASs and enhancers: Common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals.  
*Cell* 52, 303 - 305.
- HAN, M., KIM, U.J. KAYNE, P. et GRUNSTEIN, M. (1988).  
Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the PHO5 gene in Saccharomyces cerevisiae.  
*Embo J.* 7, 2221 - 2228.
- HOPE, I.A. et STRUHL, K. (1986).  
Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast.  
*Cell* 46, 885 - 894.
- ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. et KIMURA, A. (1983).  
Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.  
*J. Bacteriol.* 153, 163.
- JEANG, K.T. et KHOURY, G. (1988).  
The mechanistic role of enhancer elements in eukaryotic transcription.  
*Bioessays* 8, 104 - 107.
- JOHNSTON, M. (1987).  
Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL4 protein.  
*Nature* 328, 353 - 355.
- JONES, E.W. et FINK, G.R. (1982).  
Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Eds). The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY pp 181-299.
- KADONAGA, J.T., CARNER, K.R., MASIARZ, F.R. et TJIAN, R. (1987).  
Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain.  
*Cell* 51, 1079 - 1090.
- KAKIDANI, H. et PTASHNE, M. (1988).  
GAL4 activates gene expression in mammalian cells.  
*Cell* 52, 161 - 167.

- KIM, U.J. HAN, M., KAYNE, P. et GRUNSTEIN, M. (1988).  
Effects of histone H4 depletion on the cell cycle  
and transcription of Saccharomyces cerevisiae.  
*Embo J.* 7, 2211 - 2219.
- KIMMERLY, W., BUCHMAN, A., KORNBERG, R. et RINE, J. (1988).  
Roles of two DNA-binding factors in replication, segregation  
and transcriptional repression mediated by a  
yeast silencer.  
*Embo J.* 7, 2241 - 2253.
- KLUG, A. et RHODES, D. (1987).  
'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid  
recognition.  
*TIBS* 12, 464 - 469.
- KOREN, R., LE VITRE, J. et BOSTIAN, K.A. (1986).  
Isolation of the positive-acting regulatory gene  
PHO4 from Saccharomyces cerevisiae.  
*Gene* 4, 271 - 280.
- LECH, K., ANDERSON, K. et BRENT, R. (1988).  
DNA-bound fos proteins activate transcription in yeast.  
*Cell* 52, 179 - 184.
- LEGRAIN, M., DE WILDE, M. et HILGER, F. (1986).  
Isolation, physical characterization and expression  
analysis of Saccharomyces cerevisiae positive regula-  
tory gene PHO4.  
*Nucl. Ac. Res.* 14, 3059 - 3073.
- LEGRAIN, M., PORTETELLE, D., DUMONT, J., BOURDEAUD'HUY, J.L.,  
BURNY, A. et HILGER, F. (1986b).  
Expression of information from the gene coding for the  
bovine leukemia virus (BLV) glycoprotein gp-51 in  
Saccharomyces cerevisiae.  
*Yeast 2* (special issue) 13th Int. conf. on yeast genetics  
and molecular biology, Banff, Canada. S206.
- LEWIN, B. (1987).  
*Genes*, 3rd ed.  
John Wiley & Sons, New York, pp 761.
- LUE, N.F., CHASMAN, D.I. BUCHMAN, A.R. et KORNBERG, R.D. (1987).  
Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins  
in vitro.  
*Mol. Cell. Biol.* 7, 3446 - 3451.
- METZGER, D., WHITE, J.H. et CHAMBON, P. (1988).  
The human oestrogen receptor functions in yeast.  
*Nature* 334, 31 - 36.
- MILLER, A.M. MACKARY, V.L. et NASMYTH, K.A. (1985).  
Identification and comparison of two sequence elements  
that confer cell-type specific transcription in yeast.  
*Nature* 314 598 - 603.

- MORTIMER, R. K. et HAWTHORNE, D.C. (1975)  
Genetic mapping in yeast.  
*Methods Cell. Biol.* 11, 221 - 233.
- MORTIMER, R.K. et SHILD, D. (1985).  
Genetic map of Saccharomyces cerevisiae, Edition 9.  
*Microbiol Rev.* 49, 181 - 212.
- MORTIMER, R.K. et SHILD, D. (1980).  
Genetic map of Saccharomyces cerevisiae.  
*Microbiol. Rev.* 44, 519 - 571.
- OSHIMA, Y. (1982).  
Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate. In Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Eds), *The Molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp 159-180.
- PALUH, J.L., ORBACH, J.M., LEGERTON, T.L. et VANOFISKY, C. (1988).  
The cross-pathway control gene of Neurospora crassa, cpc-1, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene v-jun - encoded protein.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3728 - 3732.
- PAWSON, T. (1987).  
Transcription factors as oncogenes.  
*TIG* 3, 333 - 334.
- ROGERS, B.L. et SAUNDERS, G.F. (1985).  
Transcriptional enhancers play a major role in gene expression.  
*Bio Essays* 4, 62 - 65.
- ROSE, M.D., NOVICK, P., THOMAS, J.H., BOTSTEIN, D. et FINK, G.R. (1987).  
A Saccharomyces cerevisiae genomic plasmid bank based on a centromere containing shuttle vector  
*Gene* 60, 237 - 243.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977).  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 - 5467.
- SCHOLER, H.R. et GRUSS, P. (1985).  
Cell type - specific transcriptional enhancement in vitro requires the presence of trans-acting factors.  
*Embo J.* 4, 3005 - 3013.
- SHEPHERD, J.C.W., Mc GINNIS, W., CARASCO, A.D., DE ROBERTIS, E.M. et GEHRING, W.J. (1984).  
Fly and frog homeo- domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins.  
*Nature* 310, 70 - 71.
- SHERMAN, F. (1975)  
Use of micromanipulators in yeast studies.  
*Methods Cell. Biol.* 11, 189 - 199.

- STRUHL, K. (1987).  
Promoters, Activator Proteins, and the Mechanism of Transcriptional Initiation in Yeast.  
*Cell* 43, 295 - 297.
- STRUHL, K. (1987b).  
The DNA - binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous.  
*Cell* 50, 841 - 846.
- TOH-E A. et SHIMAUCHI, T. (1986).  
Cloning and sequencing of the PH080 gene and CEN15 of Saccharomyces cerevisiae.  
*Yeast* 2, 129 - 139.
- TOH-E, A. UEDA, Y., KAKIMOTO, S. and OSHIMA, Y. (1973).  
Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in Saccharomyces cerevisiae.  
*J. Bacteriol.* 113, 727 - 738.
- VANDENHAUTE, J., LEGRAIN, M., COQUETTE, V., TIBOR, A. et HILGER, F. (1988).  
Molecular cloning, genetic mapping and preliminary characterization of PH081, a Saccharomyces cerevisiae gene involved in the transcriptional regulation of the repressible acid phosphatase gene (PH05).  
*Arch. int. Physiol. Biochim.* 96, B46.
- WEBSTER, N., JIN, J.R., GREEN, S., HOLLIS, M. et CHAMBON, P. (1988).  
The yeast UAS<sub>G</sub> is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator.  
*Cell* 52, 169 - 178.
- ~~YOSHIDA, K., KUROMITSU, Z., OGAWA, N. OGAWA, K. et OSHIMA, Y. (1987).  
Regular circuit for phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. In Torriani - Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S. Wright, A. and Yagil, E. (Eds), Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. American Society for Microbiology, N.W., Washington pp 49-55.~~

| GENE          | LOCALISATION                      | FONCTION                                                   |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>PHO 2</i>  | bras gauche chr. IV               | facteur positif activateur de <i>PHO 5</i>                 |
| <i>PHO 3</i>  | centromère chr. II                | phosphatase acide constitutive                             |
| <i>PHO 4</i>  | bras droit chr. VI                | facteur positif activateur de <i>PHO 5</i> et <i>PHO 8</i> |
| <i>PHO 5</i>  | chr. II (à côté de <i>PHO 3</i> ) | phosphatase acide répressible (fraction majeure)           |
| <i>PHO 6</i>  |                                   | nécessaire à la synthèse de <i>PHO 3</i>                   |
| <i>PHO 7</i>  |                                   | nécessaire à la synthèse de <i>PHO 3</i>                   |
| <i>PHO 8</i>  | chr. IV                           | phosphatase alcaline répressible                           |
| <i>PHO 9</i>  |                                   | protéinase A                                               |
| <i>PHO 10</i> | télomère chr. VIII                | phosphatase acide répressible (fraction mineure)           |
| <i>PHO 11</i> | télomère chr. I                   | phosphatase acide répressible (fraction mineure)           |
| <i>PHO 80</i> | chr. XV                           | facteur négatif                                            |
| <i>PHO 81</i> | chr. VII                          | médiateur                                                  |
| <i>PHO 84</i> | bras gauche chr. XIII             | transporteur du $P_i$                                      |
| <i>PHO 85</i> | bras gauche chr. XIV              | protéine kinase (facteur négatif)                          |

Figure I: Localisation chromosomique et fonction présumée des principaux gènes intervenants dans le métabolisme du phosphate.

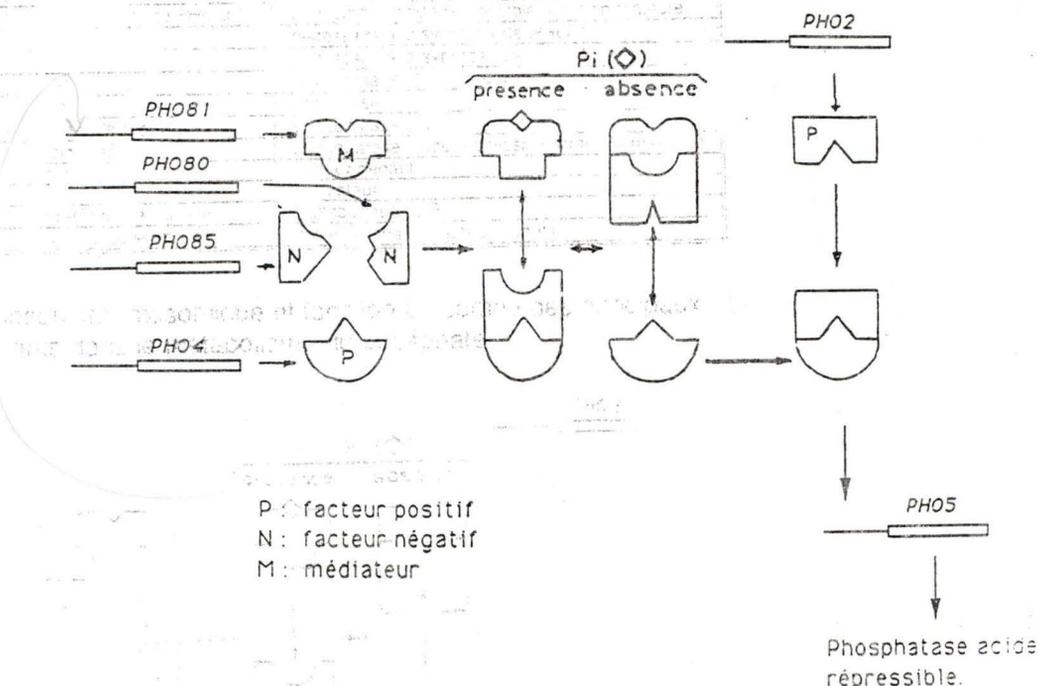


Figure II: Modèle du fonctionnement du circuit de régulation de la phosphatase acide répressible (Oshima, 1982).

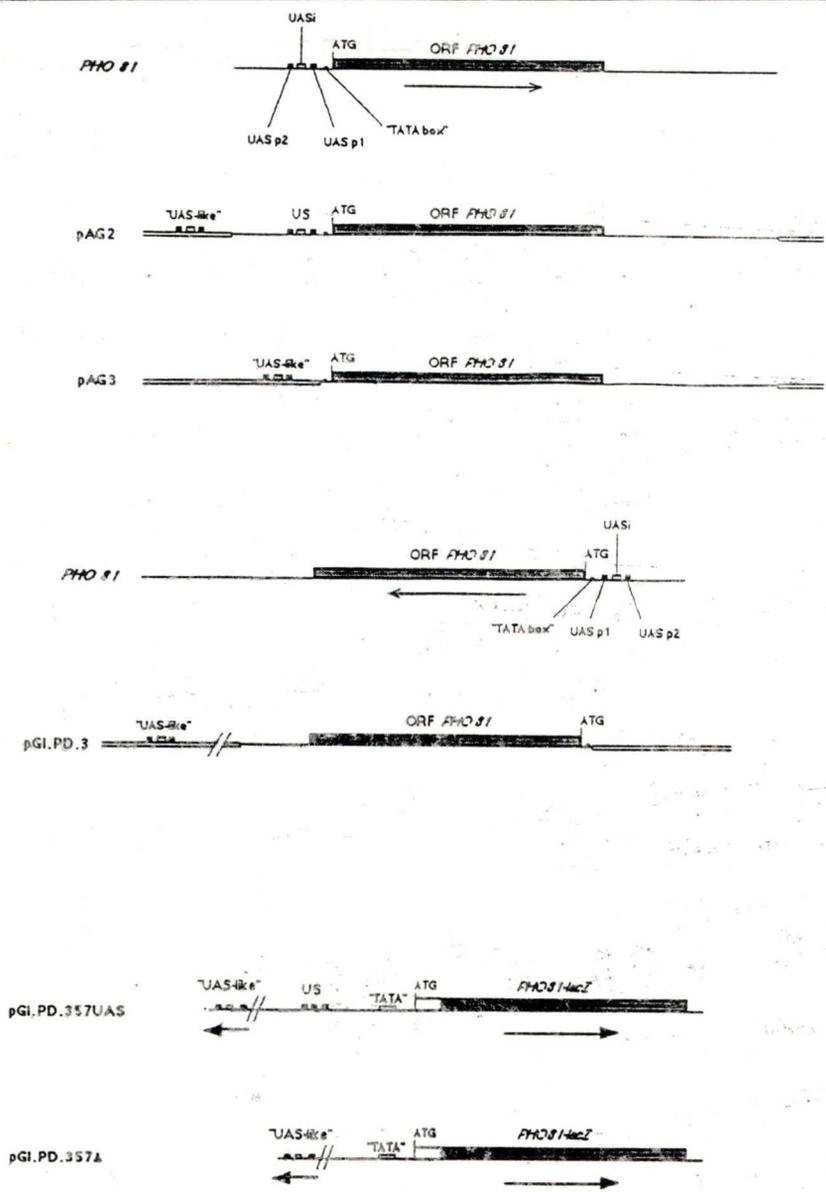


Figure III: Représentation schématique des principales constructions utilisées.